SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

RADNA VERZIJA

Anđela Matić

RAZVOJ BIOTEHNOLOŠKOG KASKADNOG PROCESA OBRADE PIVSKOG TROPA ZA PROIZVODNJU ŠIROKOG SPEKTRA PROIZVODA VISOKE DODANE VRIJEDNOSTI U OKVIRU KONCEPTA BIORAFINERIJE

DOKTORSKI RAD

Osijek, mjesec, godina

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:

Znanstveno područje:	**Biotehničke znanosti**
Znanstveno polje:	**Prehrambena tehnologija**
Znanstvena grana	**Inženjerstvo**
Tema rada	**prihvaćena je na III. sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 18. prosinca 2025.**
Mentor:	**prof. dr. sc. Marina Tišma**

RAZVOJ BIOTEHNOLOŠKOG KASKADNOG PROCESA OBRADE PIVSKOG TROPA ZA PROIZVODNJU ŠIROKOG SPEKTRA PROIZVODA VISOKE DODANE VRIJEDNOSTI U OKVIRU KONCEPTA BIORAFINERIJE

Anđela Matić, 0113140593

Sažetak:
Cilj doktorskog rada bio je razviti integrirani biotehnološki postupak valorizacije pivskog tropa u okviru koncepta biorafinerije primjenom fermentacije na čvrstim nosačima s gljivama *Trametes versicolor* i *Thermomyces lanuginosus*. Razvijeni su i validirani procesi uzgoja obje gljive na uzorcima pivskog tropa porijeklom iz različitih pivovara pri čemu su proizvedeni a) ekstrakti hidrolitičkih (ksilanaza, celulaza, β-glukozidaza i invertaza) i lignolitičkih enzima (lakaza i mangan-peroksidaza), te b) fermentirani pivski trop. Ksilanaza proizvedena tijekom rasta *T. lanuginosus* na pivskom tropu prepoznata je među svim ispitivanim enzimima kao enzim s najvećim potencijalom za komercijalnu primjenu. Ekstrakt bogat ksilanazom djelomično je pročišćen, a dobiveni enzimski pripravak karakteriziran. Biokatalitička aktivnost sirovog ekstrakta i djelomično pročišćene ksilanaze testirana je u hidrolizi različitih lignoceluloznih supstrata s ciljem proizvodnje reducirajućih šećera. Kompletna kemijska analiza (udio proteina, aminokiselina, lipida, vlakana, polifenola i minerala) te analiza sigurnosti pokazale su da su svi proizvedeni fermentirani uzorci pivskog tropa nutritivno obogaćeni i sigurni za upotrebu u hranidbi životinja. Procjenom životnog ciklusa utvrđen je potencijal okolišne optimizacije razvijenog procesa kroz alternativne procesne i energetske scenarije.

Ključne riječi: **pivski trop, fermentacija na čvrstim nosačima, ksilanaza, *Trametes versicolor, Thermomyces lanuginosus***

Rad sadrži:
195 stranica
35 slika
17 tablica
1 prilog
246 literaturnih referenci

Jezik izvornika: **hrvatski**

Sastav Povjerenstva za ocjenu:

1.	**prof. dr. sc. Mirela Planinić**	**predsjednik**
2.	**prof. dr. sc. Ana Bucić-Kojić**	**član**
3.	**dr. sc. Daniela Horvat, zn. savj.**	**član**
4.	**prof. dr. sc. Daliborka Koceva Komlenić**	**zamjena člana**

Datum obrane:

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 u Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici u Osijeku

RADNA VERZIJA

BASIC DOCUMENTATION CARD

DOCTORAL THESIS

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

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. III. held on 18 December 2025.**
Mentor: **Marina Tišma, PhD, full professor**

DEVELOPMENT OF A BIOTECHNOLOGICAL CASCADE PROCESS FOR BREWER'S SPENT GRAIN TREATMENT FOR THE PRODUCTION OF A WIDE RANGE OF HIGH-VALUE BIOPRODUCTS WITHIN THE BIOREFINERY CONCEPT

Anđela Matić, 0113140593

Summary:
The aim of this doctoral thesis was to develop an integrated biotechnological process for the valorisation of brewer's spent grain within the biorefinery concept, using solid-state fermentation with the fungi *Trametes versicolor* and *Thermomyces lanuginosus*. Cultivation processes for both fungi were developed and validated using brewer's spent grain samples originating from different breweries, resulting in the production of (a) extracts containing hydrolytic enzymes (xylanase, cellulase, β-glucosidase and invertase) and ligninolytic enzymes (laccase and manganese peroxidase), and (b) fermented brewer's spent grain. Among all the enzymes investigated, xylanase produced during the growth of *T. lanuginosus* on brewer's spent grain was identified as the enzyme with the greatest potential for commercial application. The xylanase-rich extract was partially purified, and the resulting enzyme preparation was characterised. The biocatalytic activities of the crude extract and partially purified xylanase were evaluated in the hydrolysis of various lignocellulosic substrates for the production of reducing sugars. Comprehensive chemical analyses (protein, amino acid, lipid, fibre, polyphenol and mineral contents), together with safety assessments, demonstrated that all fermented brewer's spent grain samples produced were nutritionally enriched and safe for use in animal feed. Life cycle assessment identified opportunities for environmental optimisation of the developed process through alternative processing and energy scenarios.

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

Thesis contains: **195 pages**
35 figures
17 tables
1 supplement
246 references
Original in: **Croatian**
Review (Evaluation) committee:

1.	*Mirela Planinić, PhD, prof.*	**chair person**
2.	*Ana Bucić-Kojić, PhD, prof.*	**member**
3.	*Daniela Horvat, PhD, Senior Scientific Adviser*	**member**
4.	*Daliborka Koceva Komlenić, PhD, prof.*	**stand-in**

Defense date: **date**
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 in University Library in Osijek

RADNA VERZIJA

DOKTORSKI RAD JAVNO JE OBRANJEN DANA

_____

Pred Povjerenstvom za obranu doktorskog rada:

1. **prof. dr. sc. Mirela Planinić** predsjednik _____
(potpis)

2. **prof. dr. sc. Ana Bucić-Kojić** član _____
(potpis)

3. **dr. sc. Daniela Horvat, zn. savj.** član _____
(potpis)

RADNA VERZIJA

Zahvala

RADNA VERZIJA

Sadržaj

1. Uvod 1

2. Teorijski dio 5

2.1. Koncept i razvoj biorafinerija 6

2.1.1. Klasifikacija biorafinerijskih sustava 7

2.1.2. Održivost biorafinerija i procjena životnog ciklusa 11

2.1.3. Industrijska primjena i razvoj biorafinerija 12

2.2. Lignocelulozna biomasa 14

2.2.1. Struktura i kemijski sastav lignocelulozne biomase 15

2.2.1.1. Celuloza 17

2.2.1.2. Hemiceluloza 17

2.2.1.3. Lignin 18

2.2.2. Metode predobrade lignocelulozne biomase 19

2.3. Pivski trop 25

2.3.1. Kemijski i nutritivni profil pivskog tropa 25

2.3.1.1. Proteini, lipidi i fenolni spojevi 27

2.3.2. Skladištenje i stabilnost pivskog tropa 28

2.3.3. Tradicionalna primjena pivskog tropa 30

2.3.3.1. Primjena u hranidbi životinja 30

2.3.3.2. Primjena u prehrambenoj industriji 31

2.3.3.3. Sigurnost i regulatorni zahtjevi 31

2.3.4. Suvremeni pristupi valorizaciji pivskog tropa 32

2.4. Fermentacija na čvrstim nosačima 35

2.4.1. Karakteristike čvrstih supstrata 36

2.4.2. Radni mikroorganizmi 37

2.4.2.1. *Trametes versicolor* 39

2.4.2.2. *Thermomyces lanuginosus* 39

2.4.3. Procesni parametri 40

2.4.4. Produkti fermentacije 41

2.4.4.1. Potencijal primjene fermentirane lignocelulozne biomase u hranidbi životinja 44

3. Eksperimentalni dio 48

RADNA VERZIJA

3.1. Zadatak 49
3.2. Materijali 50
3.2.1. Supstrati 50
3.2.2. Mikroorganizmi 50
3.2.3. Kemikalije 51
3.2.4. Uređaji 52
3.3. Metode 54
3.3.1. Biološka obrada pivskog tropa 54
3.3.1.1. Fermentacija na čvrstim nosačima s *Trametes versicolor* 54
3.3.1.2. Fermentacija na čvrstim nosačima s *Thermomyces lanuginosus* 55
3.3.2. Proizvodnja sirovih ekstrakata hidrolitičkih i ligninolitičkih enzima 55
3.3.2.1. Priprema sirovih ekstrakata hidrolitičkih i ligninolitičkih enzima iz *Trametes versicolor* 55
3.3.2.2. Priprema sirovih ekstrakata hidrolitičkih enzima iz *Thermomyces lanuginosus* 57
3.3.3. Mjerenje aktivnosti enzima 57
3.3.3.1. Mjerenje aktivnosti ksilanaze iz *Trametes versicolor* 57
3.3.3.2. Mjerenje aktivnosti ksilanaze iz *Thermomyces lanuginosus* 59
3.3.3.3. Mjerenje aktivnosti invertaze 60
3.3.3.4. Mjerenje aktivnosti β-glukozidaze 60
3.3.3.5. Mjerenje aktivnosti celulaze 61
3.3.3.6. Mjerenje aktivnosti lakaze i mangan-peroksidaze 62
3.3.3.7. Mjerenje aktivnosti lignin-peroksidaze 63
3.3.3.8. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije proteina 64
3.3.4. Djelomično pročišćavanje sirovog ekstrakta ksilanaze iz *Thermomyces lanuginosus* 65
3.3.4.1. Liofilizacija sirovog ekstrakta ksilanaze iz *Thermomyces lanuginosus* 66
3.3.4.2. Taloženje amonijevim sulfatom 67
3.3.5. Karakterizacija sirovog i djelomično pročišćenog ksilanaznog pripravka iz *Thermomyces lanuginosus* 69
3.3.5.1. Stabilnost sirovog i djelomično pročišćenog ksilanaznog pripravka tijekom skladištenja 70
3.3.5.2. Termostabilnost sirovog i djelomično pročišćenog ksilanaznog pripravka 70
3.3.5.3. pH-stabilnost sirovog i djelomično pročišćenog ksilanaznog pripravka 71

RADNA VERZIJA

3.3.5.4. Ovisnost aktivnosti sirovog i djelomično pročišćenog ksilanaznog pripravka o temperaturi 72
3.3.5.5. Ovisnost aktivnosti sirovog i djelomično pročišćenog ksilanaznog pripravka o pH vrijednosti 72
3.3.5.6. SDS-PAGE analiza ksilanaznih pripravaka iz *Thermomyces lanuginosus* 73
3.3.6. Enzimska hidroliza lignoceluloznih materijala primjenom ksilanaznih pripravaka iz *Thermomyces lanuginosus* 74
3.3.7. Analiza kemijskog sastava sirovog i fermentiranog pivskog tropa 75
3.3.7.1. Udio suhe tvari 75
3.3.7.2. Udio pepela 76
3.3.7.3. Lignocelulozni sastav 76
3.3.7.4. Pojedinačni šećeri i ukupni reducirajući šećeri 78
3.3.7.5. Pojedinačni fenolni spojevi, ukupni polifenoli, flavonoidi i proantocijanidini 79
3.3.7.6. Analiza ukupnog ugljika (TC), anorganskog ugljika (IC), ukupnog organskog ugljika (TOC) i ukupnog dušika (TN) 83
3.3.7.7. Sirovi proteini 85
3.3.7.8. Analiza aminokiselinskog sastava 86
3.3.7.9. Slobodne masti 86
3.3.8. Analiza mineralnih elemenata i nepoželjnih tvari 87
3.3.8.1. Mineralni elementi 87
3.3.8.2. Nitrati i nitriti 87
3.3.8.3. Mikotoksini 88
3.3.8.4. Poliklorirani bifenili i policiklički aromatski ugljikovodici 88
3.3.8.5. Ergot alkaloidi 88
3.3.8.6. Tropan alkaloidi 88
3.3.9. Analiza bruto energije 88
3.3.10. LCA analiza integriranog procesa biološke valorizacije pivskog tropa 89
3.3.10.1. Granice sustava i inventar životnog ciklusa 89
3.3.10.2. Procjena okolišnih utjecaja i scenarijska analiza 91
3.3.11. Statistička obrada podataka 91
4. Rezultati i rasprava 93
4.1. Biološka obrada pivskog tropa gljivom *Trametes versicolor* 94
4.1.1. Promjena mase i pH tijekom fermentacije na čvrstim nosačima s *Trametes versicolor* 94

RADNA VERZIJA

4.1.2. Aktivnost hidrolitičkih enzima iz *Trametes versicolor* 96
4.1.3. Aktivnost ligninolitičkih enzima iz *Trametes versicolor* 98
4.1.4. Promjene kemijskog sastava pivskog tropa nakon fermentacije na čvrstim nosačima s *Trametes versicolor* 100
4.1.4.1. Osnovni kemijski i lignocelulozni sastav 100
4.1.4.2. Aminokiselinski sastav 102
4.1.4.3. Topljivi ugljikohidrati 104
4.1.4.4. Ugljik i dušik 106
4.1.4.5. Fenolni spojevi 108
4.1.5. Procjena analiziranih pokazatelja sigurnosti pivskog tropa nakon fermentacije s *Trametes versicolor* za potencijalnu primjenu u hranidbi životinja 112
4.1.5.1. Mineralni elementi, metali i metaloidi 113
4.1.5.2. Nepoželjne tvari 114
4.2. Biološka obrada pivskog tropa gljivom *Thermomyces lanuginosus* 119
4.2.1. Promjena mase i pH tijekom fermentacije na čvrstim nosačima s *Thermomyces lanuginosus* 120
4.2.2. Aktivnost hidrolitičkih enzima iz *Thermomyces lanuginosus* 120
4.2.3. Djelomično pročišćavanje ksilanaze iz *Thermomyces lanuginosus* 122
4.2.4. Karakterizacija sirovog i djelomično pročišćenog pripravka ksilanaze iz *Thermomyces lanuginosus* 124
4.2.4.1. Stabilnost sirovog i djelomično pročišćenog pripravka ksilanaze tijekom skladištenja 125
4.2.4.2. Ovisnost aktivnosti sirovog i djelomično pročišćenog pripravka ksilanaze o temperaturi i pH 126
4.2.4.3. Stabilnost sirovog i djelomično pročišćenog pripravka ksilanaze pri različitim temperaturama i pH 127
4.2.4.4. SDS-PAGE analiza 128
4.2.5. Primjena ksilanaznih pripravaka u hidrolizi lignoceluloznih supstrata 129
4.2.6. Promjene kemijskog sastava pivskog tropa nakon fermentacije na čvrstim nosačima s *Thermomyces lanuginosus* 132
4.2.6.1. Osnovni kemijski i lignocelulozni sastav 132
4.2.6.2. Aminokiselinski sastav 133
4.2.6.3. Topljivi ugljikohidrati 136
4.2.6.4. Ugljik i dušik 137
4.2.6.5. Fenolni spojevi 139

RADNA VERZIJA

4.2.7. Procjena analiziranih pokazatelja sigurnosti pivskog tropa nakon fermentacije s *Thermomyces lanuginosus* za potencijalnu primjenu u hranidbi životinja 142
4.2.7.1. Mineralni elementi, metali i metaloidi 143
4.2.7.2. Nepoželjne tvari 144
4.3. Procjena nutritivnog potencijala biološki obrađenog pivskog tropa za primjenu u hranidbi životinja 147
4.4. Rezultati LCA analize integriranog procesa biološke valorizacije pivskog tropa 153
4.4.1. Okolišni profil osnovnog integriranog procesa 155
4.4.2. Utjecaj procesnih i energetskih scenarija 156
5. Zaključci 160
6. Literatura 165
7. Prilozi 192

RADNA VERZIJA

Popis oznaka, kratica i simbola

Oznake

A	ukupna aktivnost enzima [U]
A_0	ukupna aktivnost enzima u sirovom ekstraktu [U]
A_1	ukupna aktivnost enzima u izdvojenoj frakciji [U]
A_{400}	apsorbancija izmjerena pri 400 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 [-]
dA/dt	promjena apsorbancije u vremenu [min^{-1}]
a	volumen 0,01 M otopine NaOH utrošen za titraciju slijepe probe [mL]
a_{AS}	tablična vrijednost mase amonijeva sulfata za željeni stupanj zasićenja [g/L]
b	volumen 0,01 M otopine NaOH utrošen za titraciju uzorka [mL]
c	koncentracija analita u reakcijskoj smjesi, ovisno o primijenjenoj metodi [µmol/mL ili mg/0,5 mL]
c_{DNS}	maseni udio reducirajućih šećera [mg ekvivalenata glukoze/g suhe tvari]
$c_{šećer}$	maseni udio pojedinog šećera [mg/g suhe tvari]
c_u	koncentracija reducirajućih šećera u hidroliziranom uzorku [mg/mL]
c_k	koncentracija reducirajućih šećera u kontrolnoj probi sa supstratom bez enzima [mg/mL]
c_e	koncentracija reducirajućih šećera u kontrolnoj probi s enzimom bez supstrata [mg/mL]
c_{UP}	koncentracija ukupnih fenolnih spojeva [mg_{GAE}/g suhe tvari]
c_{UF}	koncentracija ukupnih flavonoida [mg_{CE}/g suhe tvari]
c_{UEP}	koncentracija ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina [mg/g suhe tvari]
c_{TOC}	maseni udio ukupnog organskog ugljika [mg/g suhe tvari]
c_{TN}	maseni udio ukupnog dušika [mg/g suhe tvari]
DF	faktor razrjeđenja [-]
E	količina dodanog enzima [U/g suhe tvari supstrata]
ε	koeficijent molarne ekstinkcije [L/µmol cm]
f	faktor standardizacije 0,01 M otopine natrijeva hidroksida [-]

RADNA VERZIJA

rpm	broj okretaja u minuti [-]
w/*v*	maseno-volumni omjer
v/*v*	volumni omjer
γ_{DNS}	masena koncentracija reducirajućih šećera u ekstraktu [mg ekvivalenata glukoze/mL]
$\gamma_{protein}$	masena koncentracija proteina [mg/mL]
$\gamma_{šećer}$	masena koncentracija pojedinog šećera u ekstraktu [mg/mL]
$\gamma_{polifenol}$	masena koncentracija pojedinačnog fenolnog spoja u ekstraktu [mg/mL]
γ_{UP}	masena koncentracija ukupnih fenolnih spojeva u ekstraktu [mg_{GAE}/mL]
γ_{UF}	masena koncentracija ukupnih flavonoida u ekstraktu [mg_{CE}/mL]
γ_{UEP}	masena koncentracija ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina u ekstraktu [mg/mL]
γ_{TOC}	koncentracija ukupnog organskog ugljika u ekstraktu [mg/L]
γ_{TN}	koncentracija ukupnog dušika u ekstraktu [mg/L]
I	iskorištenje enzimske aktivnosti [%]
l	duljina optičkog puta kroz kivetu [cm]
M	molarna masa cijanidina [g/mol]
m	masa uzorka, supstrata ili liofiliziranog ekstrakta, ovisno o jednadžbi [g]
m_{AS}	masa amonijeva sulfata koju je potrebno dodati uzorku [g]
m_{L}	ukupna masa dobivenog liofilizata [g]
$m_{s.t.}$	masa suhe tvari uzorka [g]
$m_{uz.}$	masa uzorka [g]
m_1, m_2, m_3	mase korištene u gravimetrijskim izračunima pepela, vlakana i masti; pojedinačno su definirane uz odgovarajuće jednadžbe [g]
N	udio dušika [%]
p	*p*-vrijednost, pokazatelj statističke značajnosti [-]
n	broj paralelnih mjerenja/ponavljanja [-]
pH	negativni dekadski logaritam aktivnosti vodikovih iona [-]
P	ukupna količina proteina [mg]
R.A.	relativna aktivnost enzima [%]
RS	količina oslobođenih reducirajućih šećera [mg ekvivalenata glukoze/g suhe tvari biomase]
S.A.	specifična aktivnost enzima [U/mg]

RADNA VERZIJA

SP	stupanj pročišćavanja [-]
t	vrijeme trajanja reakcije [min]
V	volumen uzorka, ekstrakta ili frakcije, ovisno o jednadžbi [mL ili L]
V.A.	volumna aktivnost enzima [U/mL ili U/L]
V_e	volumen enzimskog pripravka/ekstrakta [mL]
V_r	ukupni volumen reakcijske smjese [mL]
V_L	početni volumen sirovog ekstrakta podvrgnutog liofilizaciji [mL]
V_R	volumen rekonstituiranog ekstrakta [mL]
$V_{ekstrakt}$	volumen ekstrakta [mL]
w_{pepeo}	maseni udio pepela [%]
$w_{pepeo,s.t.}$	maseni udio pepela izražen na suhu tvar [% suhe tvari]
$w_{s.t.}$	udio suhe tvari u uzorku [%]
$w_{polifenol}$	maseni udio pojedinačnog fenolnog spoja [mg/g suhe tvari]
w_{TC}	maseni udio ukupnog ugljika u krutom uzorku [% suhe tvari]
w_{IC}	maseni udio anorganskog ugljika u krutom uzorku [% suhe tvari]
w_{TOC}	maseni udio ukupnog organskog ugljika u krutom uzorku [% suhe tvari]
w_N	udio dušika [%]
$w_{masti,s.t.}$	maseni udio slobodnih masti izražen na suhu tvar [% suhe tvari]
$w_{ADL,s.t.}$	maseni udio kiselog detergent lignina (ADL) izražen na suhu tvar [% suhe tvari]
$w_{protein}$	maseni udio proteina izražen na suhu tvar [% suhe tvari]
$w_{NDF,ADF,s.t.}$	maseni udio neutralnih; kiselih detergentnih vlakana (NDF/ADF) izražen na suhu tvar [% suhe tvari]
*	statistički značajna razlika pri $p < 0,05$

RADNA VERZIJA

Kratice

ADF	kisela detergentna vlakna (eng. *Acid Detergent Fiber*)
ADL	kiseli detergent lignin (eng. *Acid Detergent Lignin*)
AFEX	Ekspanzija vlakana amonijakom (eng. *Ammonia Fiber Expansion*)
ANOVA	analiza varijance (eng. *Analysis of Variance*)
AOAC	eng. *AOAC INTERNATIONAL*
ATCC	eng. *American Type Culture Collection*
BBI JU	eng. *Bio-based Industries Joint Undertaking*
BIC	eng. *Bio-based Industries Consortium*
BSA	goveđi serumski albumin (eng. *Bovine Serum Albumin*)
BSG	pivski trop (eng. *Brewer's Spent Grain*)
C	komercijalna ksilanaza
CE	ekvivalenti katehina (eng. *Catechin Equivalents*)
CBE JU	eng. *Circular Bio-based Europe Joint Undertaking*
CFC-11	triklorofluorometan; referentna tvar za izražavanje potencijala oštećenja ozonskog sloja
CORDIS	Informacijska služba Zajednice za istraživanje i razvoj (eng. *Community Research and Development Information Service*)
CTUe	usporedna toksična jedinica za ekosustave (eng. *Comparative Toxic Unit for ecosystems*)
CLD	kemiluminiscentni detektor (eng. *Chemiluminescence Detector*)
CTUh	usporedna toksična jedinica za ljude (eng. *Comparative Toxic Unit for humans*)
DMP	2,6-dimetoksifenol
DSMZ	Njemačka zbirka mikroorganizama i staničnih kultura
DNS	3,5-dinitrosalicilna kiselina / DNS metoda za određivanje reducirajućih šećera
EC	eng. *Enzyme Commission*; klasifikacijska oznaka enzima
EN	europska norma
EF	metoda okolišnog otiska (eng. *Environmental Footprint*)
eq	ekvivalent (eng. *equivalent*)
EPO	Europski patentni ured (eng. *European Patent Office*)
EU	Europska unija
FPU	jedinice aktivnosti celulaze prema filter papiru (eng. *Filter Paper Units*)

RADNA VERZIJA

EZ	Europska zajednica
GA_3	giberelinska kiselina
GAE	ekvivalenti galne kiseline (eng. *Gallic Acid Equivalents*)
GC-MS/MS	plinska kromatografija povezana s tandemskom spektrometrijom masa (eng. *Gas Chromatography–Tandem Mass Spectrometry*)
GE	ekvivalenti glukoze (*Glucose Equivalents*)
GH11	11 glikozid-hidrolaza (eng. *Glycoside Hydrolase Family 11*)
GH43	43 glikozid-hidrolaza (eng. *Glycoside Hydrolase Family 43*)
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *High-Performance Liquid Chromatography*)
HRN	hrvatska norma
HSD	Tukeyjeva metoda iskreno značajne razlike (eng. *Honestly Significant Difference*)
IC	anorganski ugljik (eng. *Inorganic Carbon*)
ICP-MS	induktivno spregnuta plazma sa spektrometrijom masa (eng. *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*)
IEA	Međunarodna agencija za energiju (eng. *International Energy Agency*)
IEC	Međunarodno elektrotehničko povjerenstvo (eng. *International Electrotechnical Commission*)
ISO	Međunarodna organizacija za normizaciju (eng. *International Organization for Standardization*)
JRC	Zajednički istraživački centar (eng. *Joint Research Centre*)
LCA	procjena životnog ciklusa (eng. *Life Cycle Assessment*)
LCC	troškovna analiza životnog ciklusa (eng. *Life Cycle Costing*)
LCSA	procjena održivosti životnog ciklusa (eng. *Life Cycle Sustainability Assessment*)
LOQ	granica kvantifikacije (eng. *Limit of Quantification*)
LC-MS/MS	tekućinska kromatografija povezana s spektrometrijom masa (eng. *Liquid Chromatography–Mass Spectrometry*)
Mtoe	milijun tona ekvivalenta nafte (eng. *Million tonnes of oil equivalent*)
MWCO	granična molekulska masa membrane (eng. *Molecular Weight Cut-Off*)
MZKI	zbirka mikrobnih kultura Nacionalnog instituta za kemiju, Ljubljana (eng. *Microbial Culture Collection of the National Institute of Chemistry*)
NASA	Nacionalna uprava za aeronautiku i svemir (eng. *National Aeronautics and Space Administration*)

RADNA VERZIJA

NDF	neutralna detergentna vlakna (eng. *Neutral Detergent Fiber*)
NMR	nuklearna magnetska rezonancija (eng. *Nuclear Magnetic Resonance*)
NDIR	nedisperzivni infracrveni detektor (eng. *Non-Dispersive Infrared Detector*)
NMVOC	nemetanski hlapljivi organski spojevi (eng. *Non-Methane Volatile Organic Compounds*)
NPOC	nehlapljivi organski ugljik (eng. *Non-Purgeable Organic Carbon*)
PAH	policiklički aromatski ugljikovodici (eng. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*)
PCB	poliklorirani bifenili (eng. *Polychlorinated Biphenyls*)
PDA	krumpir-dekstrozni agar (eng. *Potato Dextrose Agar*)
PHA	polihidroksialkanoati
PK	pogača konoplje
p-NPG	*p*-nitrofenil-β-D-glukopiranozid
PP	djelomično pročišćeni ksilanazni pripravak
PT	pivski trop
PT1	pivski trop 1
PT2	pivski trop 2
PT3	pivski trop 3
PTFE	politetrafluoretilen (eng. *Polytetrafluoroethylene*)
RR	rezanci šećerne repe
S1–S5	alternativni scenariji LCA analize 1–5
RID	detektor indeksa loma (eng. *Refractive Index Detector*)
SAD	Sjedinjene Američke Države
S-LCA	društvena procjena životnog ciklusa (eng.*Social Life Cycle Assessment*)
SD	standardna devijacija
SDGs	Ciljevi održivog razvoja (eng. *Sustainable Development Goals*)
SDS	natrijev dodecil-sulfat (eng. *Sodium Dodecyl Sulfate*)
SDS-PAGE	elektroforeza u poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijeva dodecil-sulfata (eng. *Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)
SE	sirovi enzimski ekstrakt; sirovi ksilanazni pripravak
SmF	submerzna fermentacija (eng. *Submerged Fermentation*)
SSF	fermentacija na čvrstim nosačima (eng. *Solid-State Fermentation*)
s.t.	suha tvar

RADNA VERZIJA

TC	ukupni ugljik (eng. *Total Carbon*)
TN	ukupni dušik (eng. *Total Nitrogen*)
TOC	ukupni organski ugljik (eng. *Total Organic Carbon*)
TRL	razina tehnološke spremnosti (eng. *Technology Readiness Level*)
UHPLC	tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (eng. *Ultra-High-Performance Liquid Chromatography*)
UPLC	tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (eng. *Ultra Performance Liquid Chromatography*)
UV/VIS	ultraljubičasto/vidljivo područje spektra (eng. *Ultraviolet/Visible*)

RADNA VERZIJA

Indeksi

AS	amonijev sulfat
e	enzimski pripravak/enzim
ekstrakt	ekstrakt uzorka
IC	anorganski ugljik
k	kontrolna proba sa supstratom bez enzima
L	liofilizat odnosno liofilizacija
N	dušik
R	rekonstituirani ekstrakt
r	reakcijska smjesa
t	vrijednost nakon određenog vremena skladištenja ili inkubacije
u	hidrolizirani uzorak
UEP	ukupni ekstraktibilni proantocijanidini
UF	ukupni flavonoidi
UP	ukupni fenolni spojevi
uz.	uzorak

RADNA VERZIJA

RADNA VERZIJA

1. Uvod

Prekomjerno iskorištavanje fosilnih resursa za proizvodnju energije, kemikalija i materijala, rast proizvodnje i potrošnje te kontinuirano nakupljanje otpada doveli su do znatnog opterećenja okoliša. Ti su procesi istodobno doprinijeli gospodarskim i društvenim izazovima povezanima s klimatskim promjenama, iscrpljivanjem fosilnih resursa i nesigurnošću opskrbe, rastom troškova proizvodnje, te sve većim pritiskom na sustave gospodarenja otpadom.

Strateški okvir za suočavanje s navedenim izazovima na globalnoj razini pružaju Ciljevi održivog razvoja Ujedinjenih naroda (engl. *Sustainable Development Goals*, SDGs). Prema Izvješću o održivom razvoju za 2025. godinu, Republika Hrvatska zauzima osmo mjesto među 167 država prema ukupnom stupnju njihova ostvarivanja (Sachs i sur., 2025). Na europskoj razini taj okvir nadopunjuju Europski zeleni plan i Strategija za konkurentno i održivo biogospodarstvo Europske unije, koji potiču prijelaz prema klimatski neutralnom i resursno učinkovitom gospodarstvu te održivo korištenje bioloških resursa. Republika Hrvatska donijela je Strategiju biogospodarstva do 2035. godine, kojom se kao ključni razvojni prioriteti ističu uspostava održive proizvodnje i tržišta sirovina namijenjenih biogospodarstvu te jačanje dodane vrijednosti u nacionalnom biogospodarskom sektoru (Hrvatski sabor, 2026).

Kako bi se ostvarili navedeni ciljevi, radi se na istraživanju i razvoju novih tehnologija temeljenih na učinkovitoj pretvorbi biomase, obnovljivog biološkog resursa, u biobazirane proizvode. Takve tehnologije mogu pridonijeti smanjenju potrošnje fosilnih resursa, emisija stakleničkih plinova i količina nastalog otpada (Zayed i sur., 2024).

Operativni okvir kružnog biogospodarstva predstavljaju biorafinerije. Biorafinerije su integrirani sustavi u kojima se biomasa prerađuje u hranu, hranu za životinje, biobazirane kemikalije i materijale te iskorištava za proizvodnju bioenergije. Posebno važnu ulogu imaju lignocelulozne biorafinerije koje kao sirovinu koriste lignocelulozu biomasu odnosno otpadne procesne struje i/ili nusproizvode podrijetlom iz prehrambene industrije, šumarstva, drvne industrije i poljoprivrede (Valdez-Vazquez i sur., 2024).

Unutar prehrambene industrije, pivarski sektor veliku pažnju posvećuje primjeni načela kružnog biogospodarstva, s naglaskom na povećanje energetske učinkovitosti, smanjenje potrošnje vode, uporabu obnovljivih izvora energije te cjelovitije iskorištavanje sirovina i valorizaciju svojih otpadnih procesnih struja i nusproizvoda. Takav pristup pridonosi smanjenju

RADNA VERZIJA

okolišnog opterećenja proizvodnje piva i približavanju konceptu proizvodnje bez otpada (engl. *zero waste*).

Pivarska industrija raspolaže velikim količinama pivskog tropa (engl. *brewer's spent grain*, BSG). Pivski trop je po kemijskom sastavu lignocelulozni materijal i čini približno 85 % ukupne mase nusproizvoda nastalih tijekom proizvodnje piva. Njegova godišnja proizvodnja procjenjuje se na približno 37,6 milijuna tona na svjetskoj razini te 10,22 milijuna tona na području Europe, od čega 3,4 milijuna tona u Europskoj uniji (Dancker i sur., 2025; Statista, 2025a; Statista, 2025b) i oko 57 720 tona u Republici Hrvatskoj (Statista, 2024).

Zbog velike dostupnosti, kontinuirane proizvodnje tijekom cijele godine i niske tržišne vrijednosti pivski trop predstavlja perspektivnu sirovinu za proizvodnju biobaziranih proizvoda više dodane vrijednosti unutar koncepta biogospodarske vrijednosne piramide. Međutim, učinkovitu valorizaciju pivskog tropa kao i standardizaciju procesa otežavaju njegova kompleksna lignocelulozna struktura i varijabilnost kemijskog sastava (Aradwad i sur., 2025; Carella i Lamacchia, 2025).

Među biotehnološkim postupcima obrade pivskog tropa u najnovijim istraživanjima posebna se pozornost posvećuje fermentaciji na čvrstim nosačima (engl. *solid-state fermentation*, SSF). Iako se ova tehnologija stoljećima primjenjuje u azijskim zemljama za proizvodnju fermentirane hrane, danas se sve intenzivnije istražuje diljem svijeta zbog svojeg potencijala za valorizaciju nusproizvoda i otpadnih tokova iz šumarstva, poljoprivrede i prehrambene industrije. Premda se za provedbu SSF mogu koristiti različite vrste mikroorganizama, filamentozne gljive su osobito prikladne zahvaljujući sposobnosti lučenja hidrolitičkih i ligninolitičkih enzima tijekom micelijskog načina rasta na lignoceluloznim supstratima, koji nalikuje njihovu rastu u prirodnim staništima (Wang i sur., 2023, Andlar i sur., 2018). Odabir filamentozne gljive treba temeljiti na poznavanju kemijskog sastava sirovine i sposobnosti gljive da sintetizira enzime potrebne za željenu biokonverziju supstrata i dobivanje ciljanog proizvoda.

U ovom istraživanju, za biološku obradu pivskog tropa u uvjetima SSF-a, korištene su dvije filamentozne gljive: *Trametes versicolor* i *Thermomyces lanuginosus*. *Trametes versicolor* se često naziva gljiva bijele truleži, a poznata je po sposobnosti sinteze enzima uključenih u oksidativnu razgradnju lignina. Jedan je od najpoznatijih mikroorganizama koji se koristi za komercijalnu proizvodnju lakaze (EC 1.10.3.2) i mangan-peroksidaze (EC 1.11.1.13) Sinergističkim djelovanjem lignolitičkih enzima može se razgraditi ili modificirati lignin te

RADNA VERZIJA

povećati dostupnost polisaharidnih sastavnica biomase za daljnju primjenu (Caroca i sur., 2022). Ligninolitički enzimi mogu imati različite industrijske primjene, kao primjerice u detoksikaciji različitih onečišćivala, uključujući mikotoksine, organske zagađivače, sintetske boje i halogenirane fenole (Suryadi i sur., 2022).

Za razliku od *T. versicolor*, termofilna gljiva *Thermomyces lanuginosus* poznata je po sposobnosti sinteze termostabilnih hidrolitičkih enzima koji također imaju veliki industrijski potencijal, osobito ksilanaze (EC 3.2.1.8), ali i β-glukozidaze (EC 3.2.1.21), celulaze (EC 3.2.1.4), lipaze (EC 3.1.1.3) i hitinaze (EC 3.2.1.14) (Šibalić i sur., 2020; Mohammad i sur., 2023).

Cilj ovog doktorskog rada bio je razviti integrirani biotehnološki pristup kaskadnoj valorizaciji pivskog tropa za dobivanje širokog spektra proizvoda visoke dodane vrijednosti u skladu s načelima lignocelulozne biorafinerije. Istraživanje je temeljeno na primjeni filamentoznih gljiva *T. versicolor* i *T. lanuginosus* u fermentaciji na čvrstim nosačima, pri čemu je pivski trop razmatran kao supstrat za proizvodnju ekstracelularnih enzima te kao sirovina čijom se biološkomobradom mogu dobiti različiti vrijedni proizvodi i frakcije. U jedinstvenu istraživačku cjelinu objedinjeni su: (i) proizvodnja sirovih enzimskih pripravaka s aktivnostima hidrolitičkih enzima (ksilanaze, invertaze, celulaze i β-glukozidaze) te ligninolitičkim enzima (lakaze i mangan-peroksidaze); (ii) djelomično pročišćavanje i karakterizacija ksilanaze te ispitivanje primjene sirovog i djelomično pročišćenog pripravka u hidrolizi lignoceluloznih sirovina s ciljem oslobađanja reducirajućih šećera; (iii) proizvodnja fermentiranog pivskog tropa, karakterizacija njegova kemijskog, aminokiselinskog i energetskog profila,procjena nutritivnog potencijala i odabranih pokazatelja sigurnosti za moguću primjenu u hranidbi životinja; (iv) određivanje promjena koncentracije i sastava fenolnih spojeva kao pokazatelja dodatnog potencijala valorizacije bioaktivne frakcije pivskog tropa; te (v) procjena potencijalnih utjecaja procesa na okoliš primjenom metodologije procjene životnog ciklusa (LCA).

RADNA VERZIJA

RADNA VERZIJA

2. Teorijski dio

2.1. Koncept i razvoj biorafinerija

Održivi gospodarski razvoj temelji se na dostupnosti sigurnih, obnovljivih i dugoročno održivih izvora sirovina koji mogu zadovoljiti rastuće potrebe industrijske proizvodnje uz minimalan utjecaj na okoliš. Prema procjenama, globalne zalihe nafte mogle bi biti iscrpljene unutar sljedećih 270 godina, dok prirodni ciklus njihove regeneracije traje približno 280 milijuna godina. Demografski trendovi dodatno povećavaju pritisak na energetske resurse. Naime, predviđa se da će svjetska populacija do 2050. dosegnuti 9,2 milijarde, što će višestruko povećati potražnju za energijom i ostalim proizvodima. Iako fosilna goriva i dalje čine okosnicu globalnog energetskog sustava, njihova potrošnja porasla je s manje od 9000 Mtoe[1] 1990. na više od 14 000 Mtoe 2018., uz predviđeni porast na oko 20 000 Mtoe do 2050. godine (Velidandi i sur., 2023; Conteratto i sur., 2021). Rastuća potrošnja energije i ograničenost fosilnih resursa nameću potrebu za razvojem alternativnih, obnovljivih izvora, pri čemu biorafinerije predstavljaju ključnu tehnološku platformu.

Pojam biorafinerije postupno se razvijao od kraja 1990-ih, a jednu od najčešće prihvaćenih definicija formulirala je IEA Bioenergy Task 42, prema kojoj biorafinerija predstavlja održivu preradu biomase u spektar tržišno relevantnih proizvoda i energije. Koncept biorafinerije dodatno je razrađen u izvješću *EU Biorefinery Outlook to 2030*, u kojem se naglašava uloga biorafinerija u pretvorbi biomase u različite skupine proizvoda, uključujući prehrambene proizvode, krmiva, kemikalije i materijale. Ključni cilj biorafinerijskog koncepta jest maksimizirati gospodarski potencijal proizvodnje bioproizvoda kroz ponovnu uporabu nusproizvoda, ostvarenu integracijom različitih pretvorbenih tehnologija. Takav pristup povećava ukupnu učinkovitost proizvodnog ciklusa, smanjuje gubitke sirovina i doprinosi razvoju kružnog i održivog gospodarstva (Europska komisija, 2021; Ubando i sur., 2021).

Razvoj biorafinerijskih koncepata može se pratiti kroz postupne promjene u vrsti korištenih sirovina, tehnološkom fokusu i portfelju proizvoda, pri čemu se u literaturi često razlikuju različite generacije biorafinerija. U razdoblju od kasnih 1990-ih do ranih 2000-ih godina razvoj biorafinerija bio je dominantno usmjeren na proizvodnju biogoriva prve generacije, u kojima

[1] Mtoe - milijun tona ekvivalenta nafte; 1 tona naftnog ekvivalenta (toe) je energija oslobođena izgaranjem jedne tone sirove nafte, što iznosi približno 41,868 GJ ili 11 630 kWh (Eurostat, 2026).

RADNA VERZIJA

se iz prehrambenih sirovina proizvode bioetanol i biodizel. Od sredine 2000-ih do kraja 2010-ih dolazi do prijelaza prema drugoj generaciji biogoriva, u kojoj se naglasak pomiče na lignocelulozne sirovine i otpadne tokove, uključujući poljoprivredne ostatke i komunalni biootpad. Od početka 2020-ih koncept biorafinerija sve više teži integriranim i višefunkcionalnim sustavima, u kojima se paralelno proizvode goriva, kemikalije i materijali više dodane vrijednosti, a nusproizvodi se recirkuliraju unutar procesa (Khakimova i sur., 2025).

Iz dostupne literature proizlazi da su se biorafinerije razvile od sustava usmjerenih prvenstveno na proizvodnju biogoriva prema integriranim proizvodnim konceptima koji omogućuju istodobnu proizvodnju energije, kemikalija, materijala i drugih visokovrijednih bioproizvoda. Danas je općeprihvaćeno da gospodarska i okolišna učinkovitost biorafinerije u velikoj mjeri ovisi o odabiru odgovarajuće biomase i tehnologija njezine pretvorbe. Međutim, razvoj procesa koji omogućuju gotovo potpuno iskorištavanje lignocelulozних nusproizvoda uz istodobnu proizvodnju više vrijednih produkata i dalje predstavlja jedno od ključnih istraživačkih područja.

2.1.1. Klasifikacija biorafinerijskih sustava

Razvojem biorafinerijskih sustava i povećanjem njihove tehnološke složenosti razvijeni su različiti pristupi njihovoj klasifikaciji. Biorafinerije se najčešće razvrstavaju prema vrsti sirovine, tehnološkoj platformi, procesima pretvorbe, međuproduktima, portfelju proizvoda i stupnju tehnološke razvijenosti (Wenger i Stern, 2019). Jedan od najčešće primjenjivanih klasifikacijskih pristupa razvijen je u okviru IEA Bioenergy Task 42, prema kojem se biorafinerijski sustavi opisuju s obzirom na vrstu sirovine, platformu, procese pretvorbe i konačne proizvode. Takav pristup omogućuje usporedbu različitih tehnoloških rješenja te predstavlja osnovu za planiranje razvoja biorafinerijskih sustava i oblikovanje javnih politika. Drugi često korišteni pristup temelji se na generacijskoj podjeli biogoriva i biorafinerija na sustave prve do četvrte generacije, pri čemu se naglasak stavlja na održivost sirovinske osnove i stupanj tehnološke razvijenosti. Iako je takva podjela široko zastupljena u regulatornim i političkim analizama, manje je prikladna za usporedbu pojedinih procesnih rješenja (Ahmed i sur., 2025).

Stupanj tehnološke razvijenosti biorafinerijskih sustava najčešće se procjenjuje primjenom metodologije engl. *Technology Readiness Level* (TRL), pri čemu se koriste podaci iz baza IEA Bioenergy Task 42, izvješća Zajedničkog istraživačkog centra Europske komisije (Joint

RADNA VERZIJA

Research Centre, JRC) te dostupne znanstvene i industrijske literature (IEA Bioenergy, 2026). TRL metodologija, izvorno razvijena u NASA-i, obuhvaća devet razina tehnološke spremnosti, od osnovnih istraživanja i laboratorijske validacije koncepta do demonstracije tehnologije u stvarnim uvjetima i njezine pune komercijalne primjene (Yfanti i Sakkas, 2024).

Važan kriterij klasifikacije predstavlja i vrsta sirovine, budući da njezina dostupnost, fizikalno-kemijska svojstva i pogodnost za procese biokonverzije u velikoj mjeri određuju učinkovitost biorafinerijskog sustava. Najčešće korištene sirovine uključuju lignocelulozu biomasu uključujući i nusproizvode prehrambene industrije, biomasu algi i komunalni kruti otpad, zbog čega se razlikuju lignocelulozne, otpadne i algalne biorafinerije (Shah i sur., 2021). Osim sirovine, važnu ulogu imaju i tehnološke platforme koje predstavljaju međufazu između sirovine i konačnih proizvoda te omogućuju povezivanje različitih putova pretvorbe biomase. Prema dominantnim međuproduktima razlikuju se šećerna, sintezno-plinska i bioplinska platforma, dok se prema glavnim proizvodima biorafinerije mogu usmjeriti na proizvodnju biogoriva, biokemikalija ili biomaterijala. S obzirom na tehnologiju pretvorbe razlikuju se biokemijski, termokemijski i fizikalni sustavi, koji se u suvremenim biorafinerijama često međusobno kombiniraju radi povećanja učinkovitosti iskorištavanja biomase (Gandam i sur., 2022; Vickram i sur., 2025).

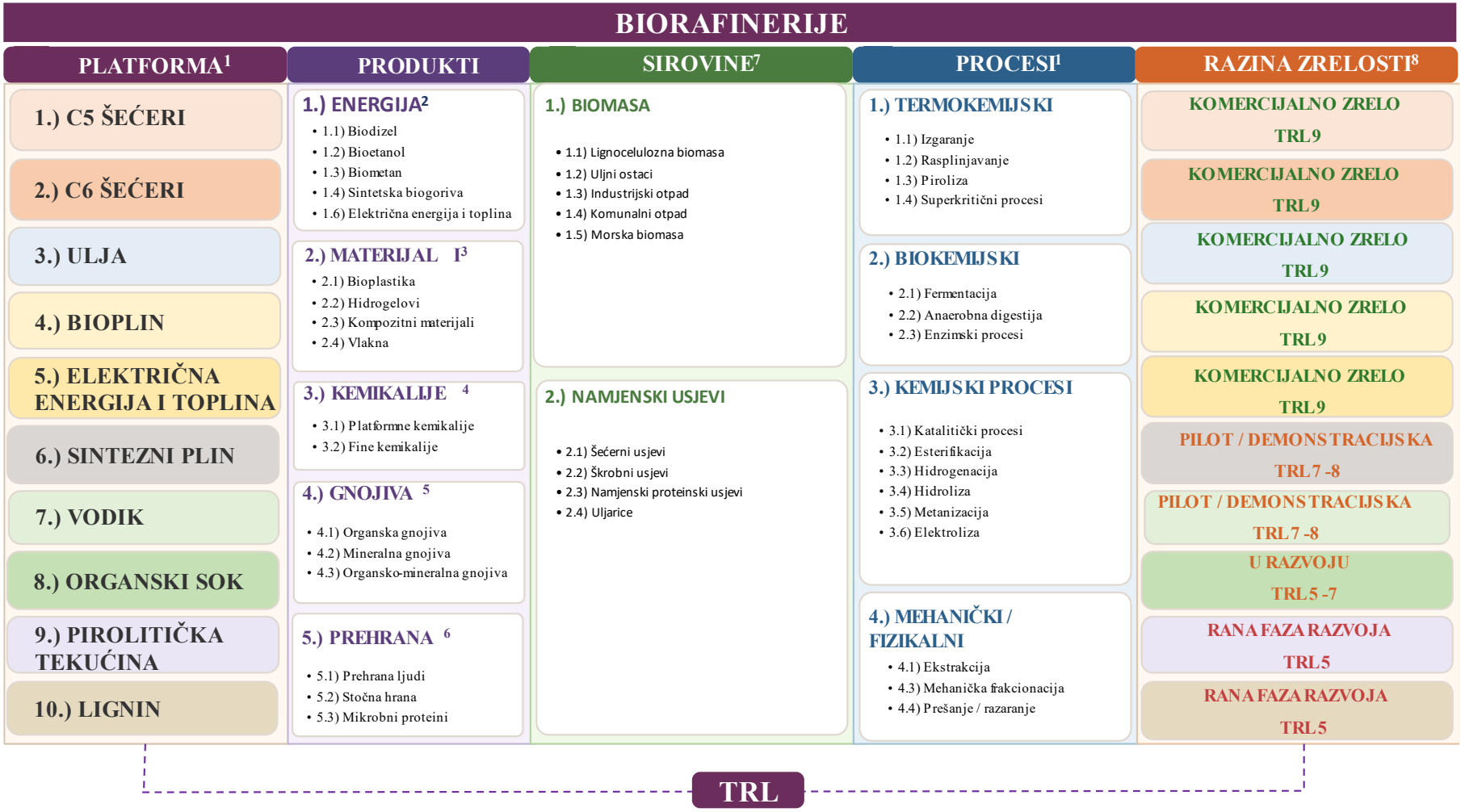
Pregled najčešće primjenjivanih kriterija klasifikacije biorafinerijskih sustava prikazan je na **Slici 1**[2].

Iz prikazanih klasifikacijskih pristupa proizlazi da se suvremene biorafinerije razlikuju prema vrsti sirovine, tehnološkoj platformi, procesima pretvorbe i portfelju proizvoda, no njihov zajednički cilj ostaje što učinkovitije iskorištavanje biomase uz proizvodnju više proizvoda različite dodane vrijednosti. Odabir odgovarajuće sirovine pritom predstavlja jedan od ključnih čimbenika koji određuje izbor tehnologije i ukupnu učinkovitost biorafinerijskog sustava. Budući da lignocelulozna biomasa predstavlja najrasprostranjeniji obnovljivi organski resurs i najvažniju sirovinsku osnovu suvremenih biorafinerija, u sljedećem poglavlju prikazana su njezina građa, svojstva i čimbenici koji određuju mogućnosti njezine biološke valorizacije.

[2] Cherubini i sur. (2009); 2. De Bhowmick i sur. (2018); 3. Enawgaw i sur. (2023); 4. Nitzsche i sur. (2021); 5. Chojnacka i sur. (2023); 6. Paz Cedeno i sur. (2025); 7. Wenger i Stern (2019); 8. Paz Cedeno i sur. (2025), IEA-Bioenergy Task 42 (2026)

RADNA VERZIJA

RADNA VERZIJA



Slika 1 Klasifikacija biorafinerija prema platformi, sirovinskoj osnovi, proizvodima i procesima te prikaz tehnološke zrelosti pojedinih platformi unutar raspona razina tehnološke spremnosti (TRL)

2.1.2. Održivost biorafinerija i procjena životnog ciklusa

Održivost predstavlja jedan od temeljnih čimbenika razvoja i implementacije biorafinerijskih sustava. Procjena održivosti biorafinerija temelji se na analizi lanca vrijednosti, pri čemu se razmatraju okolišni, ekonomski i društveni aspekti tijekom relevantnih faza životnog ciklusa, u skladu s definiranim ciljem i granicama promatranog sustava. U tu se svrhu primjenjuje metodologija procjene održivosti životnog ciklusa (engl. *Life Cycle Sustainability Assessment*, LCSA), koja predstavlja integrirani analitički okvir za procjenu ukupnih učinaka tehnoloških sustava (Hingsamer i Jungmeier, 2019). Temelji LCSA koncepta postavljeni su krajem 1980-ih kroz metodologiju engl. *Product Line Analysis*, pojam LCSA službeno je uveden tek početkom 21. stoljeća (Finkbeiner i sur., 2010; Zhou i sur., 2007). Tijekom 2000-ih godina intenziviran je razvoj metodoloških pristupa kojima se konvencionalna procjena životnog ciklusa (engl. *Life Cycle Assessment*, LCA) proširuje uključivanjem ekonomskih i društvenih pokazatelja održivosti, čime je uspostavljen integrirani okvir za sveobuhvatniju procjenu održivosti tehnoloških sustava (Costa i Dias, 2019). LCSA objedinjuje tri komplementarna pristupa: procjenu životnog ciklusa (LCA), kojom se procjenjuju potencijalni okolišni utjecaji proizvoda i procesa, troškovnu analizu životnog ciklusa (engl. *Life Cycle Costing*, LCC), usmjerenu na procjenu ekonomskih aspekata, te društvenu procjenu životnog ciklusa (engl. *Social Life Cycle Assessment*, S-LCA), kojom se razmatraju društveni učinci i utjecaji na relevantne skupine dionika. Primjenom tih pristupa moguće je procijeniti potrošnju resursa, emisije stakleničkih plinova, energetsku učinkovitost, troškove proizvodnje te društvene i okolišne posljedice povezane s korištenjem biomase (Valdivia i sur., 2021).

LCA se široko primjenjuje za procjenu potencijalnih okolišnih utjecaja biorafinerija i bioproizvoda te predstavlja jedan od ključnih alata za analizu okolišne dimenzije održivosti biorafinerijskih sustava. Metodologija je utemeljena na normama ISO 14040:2006 i ISO 14044:2006 te omogućuje procjenu potencijalnih okolišnih utjecaja proizvoda, procesa ili usluge tijekom njihova životnog ciklusa (Gaffey i sur., 2024). Prema navedenim normama, LCA se provodi kroz četiri osnovne faze: a) definiranje cilja i opsega istraživanja (određivanje funkcionalne jedinice, granica sustava i relevantnih okolišnih kategorija utjecaja), b) analiza inventara životnog ciklusa (prikupljanje i kvantifikacija ulaznih i izlaznih tokova unutar definiranih granica sustava, uključujući sirovine, energiju, vodu i emisije nastale tijekom procesa), c) procjena okolišnih utjecaja (klasifikacija i kvantifikacija inventarnih podataka u

RADNA VERZIJA

odgovarajuće kategorije utjecaja, poput klimatskih promjena ili zakiseljavanja okoliša, primjenom karakterizacijskih faktora) te d) interpretacija rezultata (analiza i tumačenje dobivenih rezultata, identifikacija ključnih izvora okolišnih utjecaja te procjena osjetljivosti i nesigurnosti podataka) (Osman i sur., 2021; Vickram i sur., 2025). Metodološke smjernice za provedbu LCA analiza detaljno su prikazane u radu Ahlgren i sur. (2015).

Suvremeni razvoj biorafinerija usmjeren je prema integriranim i višefunkcionalnim sustavima, čime se povećava složenost procjene njihovih potencijalnih okolišnih utjecaja. Ključni metodološki izazovi uključuju definiranje funkcionalne jedinice, raspodjelu okolišnih utjecaja među proizvodima i sirovinama, procjenu utjecaja korištenja zemljišta te razmatranje biogenog ugljika i emisija stakleničkih plinova. Osim energetskih pokazatelja, procjena održivosti treba obuhvatiti i utjecaje na tlo, vodne resurse i bioraznolikost, pri čemu i dalje postoji potreba za daljnjim usklađivanjem metodoloških pristupa u LCA analizama biorafinerijskih sustava. U provedbi LCA analiza primjenjuju se specijalizirani softverski alati, poput programskog paketa SimaPro, baze inventarnih podataka, poput baze ecoinvent, te metode procjene utjecaja životnog ciklusa, među kojima se često primjenjuje ReCiPe. Njihovom se primjenom omogućuje sustavna kvantifikacija inventarnih tokova i procjena potencijalnih okolišnih utjecaja promatranog proizvoda ili procesa (Kumar i Verma, 2021).

Daljnji razvoj procjene održivosti životnog ciklusa usmjeren je na bolju integraciju okolišnih, ekonomskih i društvenih pokazatelja, usklađivanje metodoloških pristupa te uključivanje interdisciplinarne suradnje i relevantnih dionika u procese odlučivanja. Primjena LCSA pristupa omogućuje cjelovitiju procjenu održivosti biorafinerijskih sustava te može pridonijeti razvoju održivijih tehnoloških rješenja (Ortigueira i Lopes, 2025).

2.1.3. Industrijska primjena i razvoj biorafinerija

Unatoč značajnom tehnološkom napretku i rastućem interesu za razvoj kružnog biogospodarstva, implementacija i komercijalizacija biorafinerijskih sustava i dalje su suočene s nizom tehničkih, ekonomskih i društvenih izazova. Jedan od najvažnijih ograničavajućih čimbenika jest dostupnost i varijabilnost biomase, pri čemu sezonske oscilacije, geografska raspršenost i heterogenost sirovine mogu narušiti stabilnost procesa i povećati proizvodne troškove. Dodatni izazov predstavlja tehnološka složenost procesa pretvorbe biomase, uključujući predobradu, hidrolizu, fermentaciju i separaciju proizvoda, što otežava prijenos procesa s laboratorijske na industrijsku razinu kao i standardizaciju procesa. S ekonomskog aspekta, visoki početni investicijski troškovi, produljeno razdoblje povrata ulaganja i

RADNA VERZIJA

ograničena konkurentnost u odnosu na konvencionalne procese temeljene na fosilnim sirovinama dodatno usporavaju tržišnu primjenu biorafinerija. Razvoj ovih sustava otežavaju i regulatorni zahtjevi, administrativni postupci te razina društvene prihvaćenosti novih bio-baziranih tehnologija i proizvoda (Aryanfar i sur., 2024; Makepa i Chihobo, 2024).

Kao odgovor na navedene izazove razvija se koncept integriranih biorafinerija, čija je osnovna prednost mogućnost istodobne proizvodnje više proizvoda različite dodane vrijednosti iz jedne sirovinske osnove. Takvi sustavi omogućuju fleksibilniju prilagodbu promjenama u dostupnosti biomase, učinkovitije iskorištavanje sirovine te bolju ekonomsku održivost procesa. Međutim, njihov daljnji razvoj zahtijeva optimizaciju konverzijskih tehnologija, razvoj učinkovitijih separacijskih postupaka te odabir sirovina koje omogućuju stabilnu i dugoročnu proizvodnju. Istodobno, važnu ulogu imaju javne politike koje kroz regulatorne mjere, financijske poticaje i ulaganja u infrastrukturu stvaraju preduvjete za širu industrijsku primjenu biorafinerijskih tehnologija (Pandey i Sharma, 2024).

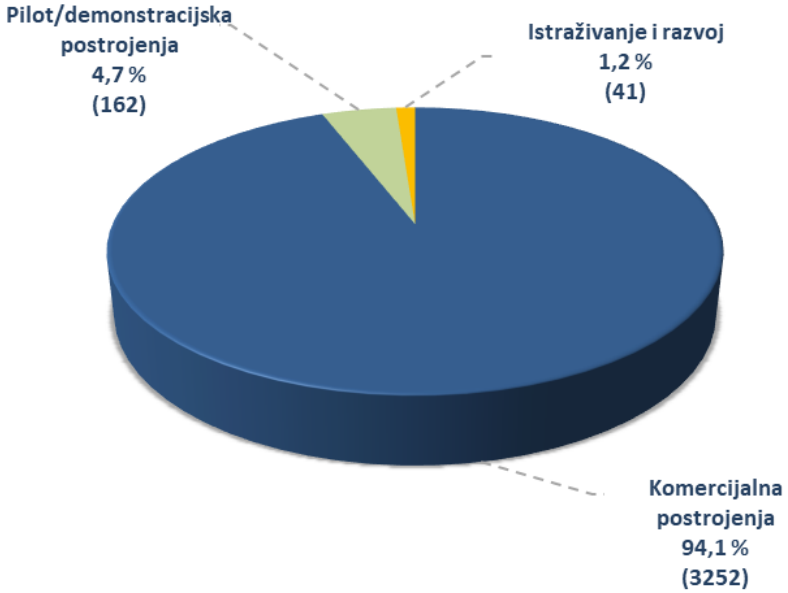
Na europskoj razini važan instrument za razvoj i implementaciju biobaziranih i biorafinerijskih tehnologija predstavlja *Circular Bio-based Europe Joint Undertaking* (CBE JU), institucionalizirano europsko partnerstvo između Europske unije i *Bio-based Industries Consortiuma* (BIC), koje djeluje u okviru programa Horizon Europe i predstavlja pravnog nasljednika prethodnog partnerstva *Bio-based Industries Joint Undertaking* (BBI JU) (CBE JU, 2026).

Najnoviji podaci Europske komisije potvrđuju kontinuiran rast broja biorafinerijskih postrojenja i sve veći udio integriranih biorafinerijskih sustava u Europi, što ukazuje na ubrzanu implementaciju načela kružnog biogospodarstva u različitim industrijskim sektorima (Europska komisija, 2025). Za Republiku Hrvatsku evidentirano je jedno postrojenje u kategoriji biobaziranih kemikalija, jedno u kategoriji tekućih biogoriva te tri postrojenja u kategorijama celuloze i papira te škroba i šećera (Gurría i sur., 2025).

Iz navedenoga proizlazi da uspješna implementacija biorafinerija ne ovisi isključivo o razvoju novih tehnologija, već ponajprije o odabiru odgovarajuće sirovine koja omogućuje stabilnu, ekonomičnu i okolišno prihvatljivu proizvodnju više visokovrijednih proizvoda. Pregled aktivnih biorafinerija u Europskoj uniji, razvrstanih prema stupnju tehnološke zrelosti, prikazan je na **Slici 2**. U tom se kontekstu lignocelulozna biomasa, zbog svoje velike dostupnosti, obnovljivosti i kemijskog sastava, smatra jednom od najperspektivnijih sirovinskih osnova za

RADNA VERZIJA

razvoj integriranih biorafinerijskih sustava. Zbog toga se u nastavku razmatraju njezina građa, svojstva i čimbenici koji određuju mogućnosti njezine učinkovite biološke valorizacije.



Slika 2 Postotna raspodjela biorafinerija u Europskoj uniji razvrstanih prema stupnju tehnološke zrelosti. Brojevi u zagradama označavaju broj postrojenja (Europska komisija, 2025).

2.2. Lignocelulozna biomasa

Lignocelulozna biomasa predstavlja najzastupljeniji obnovljivi organski resurs na Zemlji te jednu od najvažnijih sirovinskih osnova suvremenih biorafinerijskih sustava. Nastaje fotosintetskom asimilacijom ugljikova dioksida, pri čemu se Sunčeva energija pohranjuje u kemijskim vezama strukturnih biopolimera, prvenstveno celuloze, hemiceluloze i lignina. Zahvaljujući mogućnosti prirodne obnove i sudjelovanju u biogenom ciklusu ugljika, lignocelulozna biomasa predstavlja obnovljiv izvor sirovina, dok njezin stvarni klimatski učinak ovisi o načinu gospodarenja biomasom, procesima njezine prerade i definiranim granicama promatranog sustava (Fiala i Nonini, 2018).

Razvoj poljoprivrede, šumarstva i prehrambene industrije rezultira kontinuiranim nastankom velikih količina lignoceluloznih ostataka. Godišnja proizvodnja lignocelulozne biomase na svjetskoj razini procjenjuje se na približno 181,5 milijardi tona, što potvrđuje njezinu veliku dostupnost i značajan potencijal kao obnovljive sirovinske osnove za razvoj biobaziranih tehnologija (Tišma i sur., 2021a). Upravo zbog velike dostupnosti i raznolikosti sirovinske osnove, lignocelulozna biomasa danas predstavlja temelj razvoja biorafinerija druge generacije.

RADNA VERZIJA

Ovisno o podrijetlu, lignocelulozna biomasa obuhvaća širok raspon sirovina koje se razlikuju prema kemijskom sastavu, fizikalnim svojstvima i mogućnostima primjene. Najvažnije skupine uključuju:

- poljoprivredne ostatke i agroindustrijske nusproizvode - rižina slama, pšenična slama, stabljike pamuka, ljuske zobi, rižine ljuske, kukuruzovina itd. (Okolie i sur., 2021, Pandey i sur., 2025);
- šumsku biomasu - vrba, topola, eukaliptus, kore drveta, drveni blokovi, drvna sječka od vrhova i grana te ostali ostaci od prerade drva (Cai i sur., 2017);
- energetske usjeve - miskantus, divovska trska, divlje proso, trstikasta vlasulja (Scordia i Cosentino, 2019);
- recikliranu / otpadnu lignoceluloznu biomasu - papir, karton, otpad iz vrtova, prehrambeni ostaci, prehrambeni otpad, poljoprivredni otpad iz prerade, frakcija komunalnog čvrstog otpada (Li i sur., 2026).

Učinkovita valorizacija lignocelulozne biomase ograničena je njezinom kompleksnom strukturom i izraženom otpornošću na biološku razgradnju. Stoga razvoj učinkovitih tehnologija pretvorbe zahtijeva integrirani pristup koji uključuje odgovarajuću predobradu biomase, optimizaciju procesnih uvjeta te primjenu biokemijskih i/ili termokemijskih postupaka prilagođenih svojstvima pojedine sirovine. Takav pristup omogućuje povećanje iskorištenja svih strukturnih komponenti biomase, proizvodnju više visokovrijednih produkata te smanjenje nastanka otpada (Velvizhi i sur., 2022).

Iz navedenoga proizlazi da potencijal lignocelulozne biomase ne proizlazi isključivo iz njezine velike dostupnosti, već ponajprije iz mogućnosti njezine višestruke biološke i tehnološke valorizacije. Međutim, uspješnost takvih procesa u najvećoj mjeri određuje kemijska organizacija biljne stanične stijenke, odnosno međusobni odnosi celuloze, hemiceluloze i lignina. Zbog toga se u nastavku razmatra kemijska struktura lignocelulozne biomase kao ključni čimbenik koji određuje mogućnosti njezine biokonverzije.

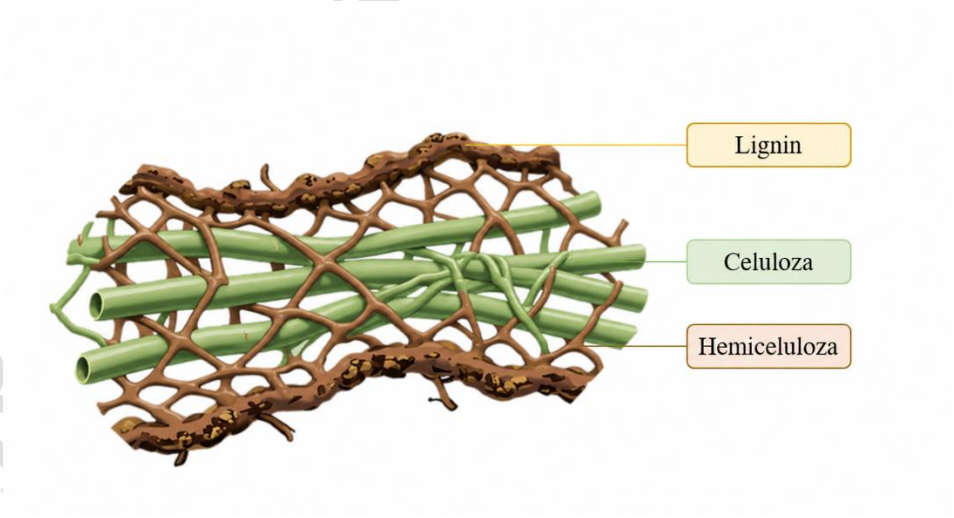
2.2.1. Struktura i kemijski sastav lignocelulozne biomase

Lignocelulozna biomasa predstavlja kompleksnu strukturnu matricu biljne stanične stijenke, izgrađenu od triju glavnih biopolimera: celuloze (30–50 %), hemiceluloze (20–40 %) i lignina (5–30 %) (Carrillo-Nieves i sur., 2022; Poskart i sur., 2021; Mankar i sur., 2021). Ovi biopolimeri međusobno su povezani u složenu trodimenzionalnu mrežu u kojoj svaki od njih

RADNA VERZIJA

ima specifičnu strukturnu i funkcionalnu ulogu. Temeljne strukturne komponente lignocelulozne biomase i njihov međusobni raspored prikazani su na **Slici 3**. Celuloza čini nosivu strukturnu komponentu biljne stanične stijenke, hemiceluloza povezuje celulozna mikrovlakna i doprinosi stabilnosti njihove organizacije, dok lignin ispunjava međuprostor polisaharidne matrice, povećavajući mehaničku čvrstoću, hidrofobnost i otpornost biljnih tkiva na kemijsku i biološku razgradnju. Upravo ovakva organizacija stanične stijenke predstavlja glavni uzrok izražene otpornosti lignocelulozne biomase na kemijsku i biološku razgradnju te jedan od ključnih izazova u razvoju učinkovitih procesa njezine konverzije.

Maseni udjeli pojedinih strukturnih komponenti razlikuju se ovisno o botaničkom podrijetlu sirovine, uvjetima uzgoja, stupnju zrelosti biljke, vremenu žetve te načinu rukovanja i skladištenja biomase (Yan i sur., 2020). Osim celuloze, hemiceluloze i lignina, lignocelulozna biomasa sadrži manje količine proteina, lipida, ekstraktivnih tvari i mineralnih sastavnica (pepela), čiji udjeli također ovise o vrsti i načinu obrade sirovine (Poskart i sur., 2021). Udio ugljika, koji se kreće između 34,1 i 53,5 %, predstavlja jedan od glavnih čimbenika energetske vrijednosti biomase, dok su udjeli dušika (<1,8 %) i sumpora (0,1–0,6 %) znatno niži nego kod fosilnih goriva, što dodatno potvrđuje njezin potencijal kao obnovljive sirovine za razvoj održivih biorafinerijskih procesa (Poskart i sur., 2021).



Slika 3 Temeljne strukturne komponente lignocelulozne biomase (izradio autor u grafičkom alatu Picsart[3])

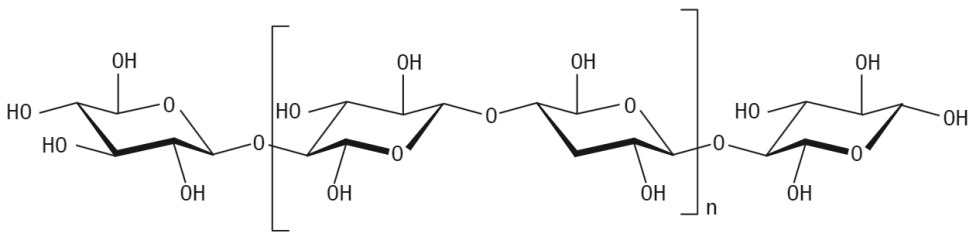
[3] Picsart. (2025) https://picsart.com

2.2.1.1. Celuloza

Celuloza je linearni polisaharid sastavljen od D-glukoznih jedinica međusobno povezanih β-(1→4)-glikozidnim vezama, čime nastaje polimer β-1,4-glukan (**Slika 4**). Strukturu celuloze čine kristalna i amorfna područja koja se međusobno isprepliću. Kristalna područja karakterizira visok stupanj uređenosti, a njihova struktura rezultat je intramolekulskih i intermolekulskih vodikovih veza između glukoznih jedinica. Između kristalnih područja nalaze se manje uređena amorfna područja, koja predstavljaju potencijalna mjesta kemijskog i enzimskog djelovanja.

Biosinteza celuloze odvija se u plazmatskoj membrani djelovanjem enzima celulozna sintaza (EC 2.4.1.29). Katalitička podjedinica enzima koristi uridin-difosfat glukozu kao supstrat za sintezu celuloznog polisaharida, koji se potom prenosi kroz membransku poru.

Visok stupanj polimerizacije, koji može doseći do približno 10 000 glukoznih jedinica, kristaliničnost te razvijena mreža intra- i intermolekulskih vodikovih veza odgovorni su za složenu strukturu celuloze i predstavljaju jedan od glavnih čimbenika otpornosti lignocelulozne biomase na kemijsku i enzimsku razgradnju. Celuloza je netopljiva u vodi i većini uobičajenih organskih otapala, poput etanola, acetona i toluena, što je posljedica njezine visoke kristaliničnosti i razvijene mreže intra- i intermolekulskih vodikovih veza. Uređen raspored polimernih lanaca u mikrofibrilama i visok stupanj kristaliničnosti pridonose njezinoj mehaničkoj stabilnosti, dok prisutnost hidroksilnih skupina određuje njezina svojstva, uključujući biokompatibilnost, stereoregularnost, hidrofilnost i kemijsku reaktivnost (Petridis i Smith, 2018; Chen i sur., 2017; Mankar i sur., 2018).



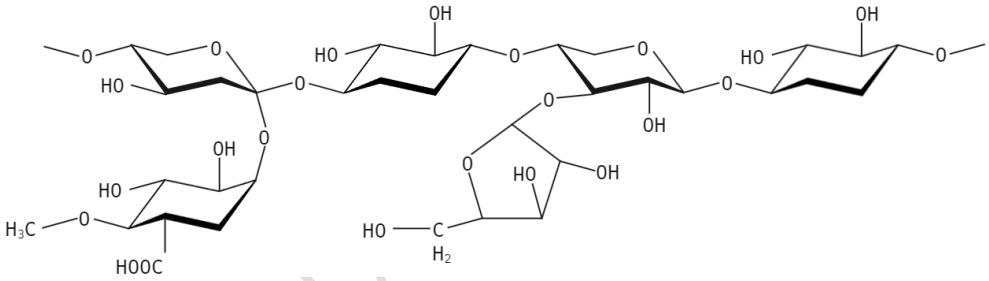
Slika 4 Kemijska struktura celuloze (izradio autor u grafičkom alatu BioRender[4])

2.2.1.2. Hemiceluloza

Za razliku od celuloze, koju čine linearni lanci glukoznih jedinica, hemiceluloza obuhvaća skupinu strukturno raznolikih polisaharida čiji su lanci izgrađeni od različitih monosaharidnih

[4] https://www.biorender.com

jedinica, ponajprije ksiloze, arabinoze, manoze, galaktoze i glukoze (**Slika 5**). Glavne strukturne komponente hemiceluloze razlikuju se ovisno o biljnoj vrsti. U tvrdom drvu (hrast, bukva, breza, topola i eukaliptus) prevladavaju glukuronoksilani, u mekom drvu (bor, jela i smreka) dominantni su galaktoglukomanani, dok su arabinoksilani karakteristični za trave i pojedina drvenasta tkiva (Aniza i sur., 2026). Hemiceluloza djeluje kao poveznica između celuloze i lignina te doprinosi čvrstoći i stabilnosti biljne stanične stijenke. U usporedbi s celulozom, karakterizira je niži stupanj polimerizacije i izostanak kristalnih područja, zbog čega je podložnija kemijskoj i enzimskoj razgradnji. Hidrolizom hemiceluloze mogu nastati različiti monosaharidi, prvenstveno ksiloza, arabinoza, manoza, galaktoza i glukoza, kao i glukuronska kiselina i njezini derivati, ovisno o sastavu i podrijetlu hemicelulozne frakcije. Prisutnost reducirajućih šećera u celulozi i hemicelulozi povećava njihov značaj kao sirovine za proizvodnju kemikalija više dodane vrijednosti (Roy i sur., 2020; Chen i sur., 2017; Mankar i sur., 2021).



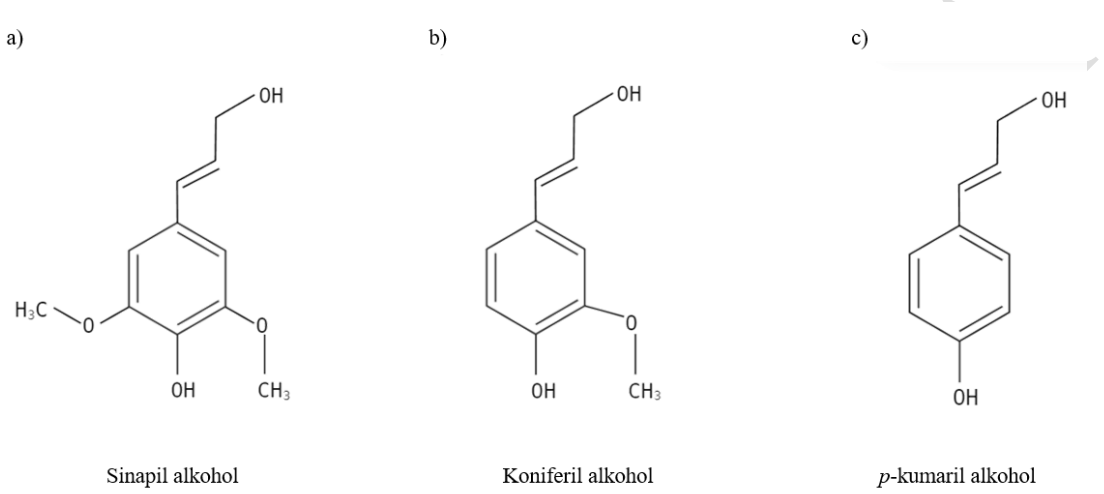
Slika 5 Kemijska struktura hemiceluloze (izradio autor u grafičkom alatu BioRender)

2.2.1.3. Lignin

Lignin je složen aromatski biopolimer nepravilne i izrazito razgranate strukture, koji nastaje oksidativnim povezivanjem *p*-kumarilnog, koniferilnog i sinapilnog alkohola (**Slika 6**). Fenolni monomeri međusobno su povezani eterskim i ugljik–ugljik vezama, pri čemu nastaje složena polimerna struktura. Lignin ispunjava međuprostor između celuloze i hemiceluloze u biljnoj staničnoj stijenci te zajedno s njima tvori čvrstu strukturnu cjelinu. Osim strukturne uloge, lignin doprinosi mehaničkoj čvrstoći i hidrofobnosti provodnih tkiva biljke te omogućuje održavanje funkcionalnosti tijekom transporta vode. Sastav monomernih jedinica u ligninu

ovisi o klimatskim uvjetima, starosti biljke, biljnoj vrsti te primijenjenim metodama ekstrakcije i izolacije (Roy i sur., 2020).

Lignini s većim relativnim udjelom *p*-hidroksifenilnih jedinica mogu imati nižu molekulsku masu, što može utjecati na njihovu strukturu i podložnost razgradnji. Zbog prisutnosti aromatskih prstenova lignin pokazuje hidrofobna svojstva. U vodenim otopinama pri sobnoj temperaturi poprima kompaktne, staklaste i elipsoidne oblike (Petridis i Smith, 2018).



Slika 6 Kemijska struktura monomernih jedinica lignina: a) sinapil alkohol, b) koniferil alkohol i c) *p*-kumaril alkohol (izradio autor u grafičkom alatu BioRender)

2.2.2. Metode predobrade lignocelulozne biomase

Obrada lignocelulozne biomase širi je pojam koji obuhvaća različite postupke promjene njezinih svojstava i sastava, dok se predobrada odnosi na postupke kojima se biomasa priprema za učinkovitiju provedbu naknadne hidrolize ili drugih procesa konverzije. Stoga uporaba naziva obrada ili predobrada ovisi o ulozi pojedinog postupka u cjelokupnom procesu valorizacije biomase i ciljanom proizvodu. U ovom dijelu teksta korist će se termin predobrada, kao ključan korak u procesima proizvodnje energije i visokovrijednih produkata iz lignocelulozne biomase.

Prirodna otpornost lignocelulozne biomase na razgradnju posljedica je visokog stupnja kristaličnosti celuloze, visokog stupnja polimerizacije te čvrstih međusobnih veza između celuloze, hemiceluloze i lignina. Zbog njihove međusobne povezanosti razgradnja pojedine komponente često je ograničena prisutnošću ostalih sastavnica biomase. Predobradom se narušava kompleksna struktura lignoceluloze, povećava poroznost biomase te poboljšava

pristupačnost celuloze enzimskoj hidrolizi. Smanjenje udjela lignina dodatno pogoduje mikrobnoj razgradnji celuloze, budući da lignin i njegovi derivati mogu inhibitorno djelovati na rast mikroorganizama i aktivnost enzima tijekom biološke predobrade. S obzirom na to da se koncept biorafinerije temelji na učinkovitom i održivom iskorištavanju biomase, odabir odgovarajuće metode predobrade predstavlja jedan od ključnih čimbenika uspješnosti cjelokupnog procesa. Ciljevi predobrade uključuju: (1) minimiziranje degradacije reducirajućih šećera, (2) povećanje učinkovitosti hidrolize celuloze i hemiceluloze, (3) smanjenje nastajanja nusprodukata koji negativno utječu na procese saharifikacije i fermentacije, (4) izbjegavanje uporabe kemikalija koje uzrokuju onečišćenje okoliša ili koroziju opreme, (5) smanjenje količine nastalog krutog otpada uz maksimalno iskorištavanje sirovine te (6) optimizaciju troškova procesa i povećanje ekonomske isplativosti proizvodnje (Mathew i sur., 2018; Chen i sur., 2017).

Metode predobrade lignocelulozne biomase mogu se podijeliti na kemijske, fizikalne, fizikalno-kemijske i biološke postupke. Konvencionalne metode predobrade, iako učinkovite u narušavanju strukture biomase, povezane su s određenim ograničenjima u postizanju ekonomski isplativih i okolišno prihvatljivih procesa. Njihovom primjenom mogu nastati brojni spojevi, poput alifatskih kiselina, vanilina, uronske kiseline, 4-hidroksibenzojeve kiseline, fenola, furaldehida, cinamaldehida i formaldehida, koji mogu negativno utjecati nanaknadne procese koji slijede (npr. hidroliza enzimima ili fermentacija) Zbog toga se posljednjih godina sve veća pozornost posvećuje biološkim metodama predobrade kao što je SSF,. Međutim, biološku predobradu i dalje ograničavaju dugo vrijeme obrade, niži prinosi i gubici ugljikohidrata, zbog čega su daljnja istraživanja usmjerena na razvoj tehnologija koje će omogućiti njihovu učinkovitu primjenu u industrijskim uvjetima (Hassan i sur., 2018).

U **Tablici 1** prikazane su najčešće primjenjivane metode pripreme i predobrade lignocelulozne biomase te njihove prednosti i nedostaci, uzimajući u obzir potencijalno stvaranje spojeva inhibitornih za enzimatsku hidrolizu i mikrobnu fermentaciju, mogućnost recikliranja kemikalija, energetsku potrošnju i ekonomsku isplativost pojedinih postupaka. Prikaz obuhvaća postupke pripreme biomase (npr. sušenje, mljevenje i sjeckanje) te metode predobrade kojima se mijenjaju fizikalna i/ili kemijska svojstva lignocelulozne biomase radi povećanja učinkovitosti njezine daljnje biokonverzije.

Iz prikazanih metoda predobrade proizlazi da ne postoji univerzalni postupak prikladan za sve vrste lignocelulozne biomase. Odabir odgovarajuće metode ovisi o kemijskom sastavu sirovine,

RADNA VERZIJA

ciljanom proizvodu i zahtjevima procesa, pri čemu je potrebno uskladiti učinkovitost predobrade s okolišnim i ekonomskim aspektima procesa. Upravo zbog tih razloga posljednjih godina sve se veća pozornost posvećuje biološkim metodama predobrade.

RADNA VERZIJA

Tablica 1 Pregled najčešće primjenjivanih metoda pripreme i predobrade lignocelulozne biomase

	Kategorija/ grupa predobrade	Metoda predobrade	Ciljana skupina/ komponenta	Prednosti	Nedostatci	Referenca
KONVENCIONALNE METODE	Fizikalna	Drobljenje, mljevenje, sjeckanje	Hemiceluloza, celuloza, lignin	Smanjenje veličine čestica i povećanje specifične površine; intenzivno mljevenje može smanjiti kristaliničnost celuloze i povećati dostupnost biomase za daljnju obradu	Visoki troškovi obrade i operativni troškovi, najčešće se kombinira s kemijskim metodama zbog nemogućnosti uklanjanja hemiceluloze, celuloze i lignina	Chen i sur., 2017; Roy i sur., 2020
		Ekstruzija	Hemiceluloza, celuloza i lignin	Ne dolazi do stvaranja inhibitornih spojeva i razgradnje šećera, jednostavna i ekonomična oprema, povećana enzimska dostupnost celuloze, kontinuiran proces	Velika potrošnja energije, učinak je ograničen kada se ne koriste kemijska sredstva	Capolupo i Faraco, 2016; Hassan i sur., 2018; Chen i sur., 2017
	Kemijska	Kiseline (HCl, H_2SO_4, HNO_3, H_3PO_4, HCOOH CH_3COOH, $C_3H_6O_2$)	Hemiceluloza, celuloza, lignin	Hidroliza celuloze i hemiceluloze do fermentabilnih šećera, poboljšana dostupnost za aktivnost enzima, pogodna za industrijsku proizvodnju	Korozija reaktora, stvaranje inhibitora fermentacije, zagađenje okoliša, visoki troškovi	Tian i sur., 2018; Chen i sur., 2017; Mankar i sur., 2021; Hassan i sur., 2018
		Lužine (NaOH, Na_2CO_3, KOH, $Ca(OH)_2$, NH_4OH	Hemiceluloza i lignin	Učinkovito uklanjanje hemiceluloze i lignina, niži stupanj razgradnje šećera u odnosu na predobradu kiselinama	Dugo vrijeme predobrade, stvaranje soli i inhibitora	Tian i sur., 2018; Chen i sur., 2017

RADNA VERZIJA

		Organska otapala (metanol, glicerol, aceton, etilen, tetrahidrofurfuril alkohol)	Hemiceluloza i lignin	Uspješno uklanjanje lignina, ne utječe na strukturu uklonjenih komponenti	Zapaljivost i hlapljivost, energetski intenzivan i skup proces	Tian i sur., 2018; Chen i sur., 2017; Mankar i sur., 2021
		Oksidansi (ozon, vodikov peroksid)	Hemiceluloza i lignin	Ne stvaraju se dodatne otrovne tvari i inhibitorni spojevi, učinkovito uklanjanje lignina na sobnoj temperaturi i normalnom tlaku	Visoka cijena, potrebna velika količina ozona,nestabilnost vodikovog peroksida u lužnatim otopinama i razgradnja u prisutnosti metala, npr. Mn, Fe	Chen i sur., 2017; Roy i sur., 2020
ALTERNATIVNE/ZELENE METODE	Fizikalna	Mikrovalno zračenje	Hemiceluloza, celuloza i lignin	Kratko vrijeme reakcije, brzo i ravnomjerno zagrijavanje, niska energija aktivacije reakcije, visok prinos proizvoda, minimalan broj nusproizvoda, ekonomičan, ekološki prihvatljiv proces	Visoka kapitalna ulaganja, udio vlage u uzorku biomase, velika opterećenja i visoki tlak, visoka potrošnja energije	Mankar i sur., 2021; Chen i sur., 2017
		Ultrazvuk	Hemiceluloza i lignin	Kratko vrijeme reakcije, visoka aktivacijska energija i dovoljan prijenos mase za učinkovitu dekonstrukciju komponenti biomase	Visoka potrošnja energije, visoka temperatura i tlak	Mankar i sur., 2021
	Fizikalno - kemijska	Eksplozija vodenom parom	Hemiceluloza i lignin	Niska kapitalna ulaganja, umjerena potrošnja energije, ekološki prihvatljiv proces	Visoka radna temperatura i tlak	Hassan i sur., 2018; Chen i sur., 2017

RADNA VERZIJA

		Ekspanzija vlakana amonijakom (AFEX)	Hemiceluloza, celuloza, lignin	Minimalno stvaranje inhibitora, kratko vrijeme reakcije, deacetilacija hemiceluloze	Visoki kapitalni troškovi i visoka cijena amonijaka, visoki tlak, povećani energetski zahtjevi za recikliranje amonijaka	Mankar i sur., 2021
	Kemijska	Eutektička otapala	Hemiceluloza, celuloza, lignin	Dobiveni iz prirodnih i netoksičnih izvora, mogu djelovati kao otapala, katalizatori i mediji otporni na djelovanje enzima, ekonomična i biorazgradiva otapala, široka prilagodljivost supstratima	Visok stupanj viskoznosti, dugo vrijeme predobrade, niska toplinska stabilnost	Roy i sur., 2020; Mankar i sur., 2021
		Superkritični fluidi (Superkritični CO_2, superkritična voda)	Hemiceluloza, celuloza, lignin	Visok stupanj difuzije i niska viskoznost, netoksična i relativno jeftina otapala, nekancerogeni, nezapaljivi i termodinamički stabilni, lako prodiru kroz čvrste materijale, niski operativni troškovi i visoka energetska učinkovitost	Dugo vrijeme reakcije za hidrolizu, visoka radna temperatura i tlak, stvaranje inhibitora	Mankar i sur., 2021; Roy i sur., 2020;
		Ionske kapljevine	Celuloza i lignin	Zamjena za hlapljiva organska otapala, ne stvaraju se eksplozivni ili otrovni plinovi, velik temperaturni raspon, dobra kemijska stabilnost, ponovna upotreba	Visok stupanj viskoznosti, teško rukovanje tijekom procesa, negativan učinak na aktivnost celulaze, visoki troškovi	Tian i sur., 2018; Chen i sur., 2017; Capolupo i Faraco, 2016
	Biološka	Mikroorganizmi (gljive bijele i smeđe truleži, bakterije)	Hemiceluloza, celuloza, lignin	Biološka modifikacija i djelomična razgradnja lignina, blagi procesni uvjeti, niska potrošnja energije te ograničeno stvaranje toksičnih nusprodukata	Produljeno vrijeme procesa te potreba za kontrolom mikrobioloških uvjeta radi sprječavanja neželjene kontaminacije	Tian i sur., 2018; Capolupo i Faraco, 2016

RADNA VERZIJA

2.3. Pivski trop

Pivski trop glavni je čvrsti nusproizvod pivarske industrije koji nastaje nakon ukomljavanja i odvajanja tekuće faze od čvrstih ostataka slada i drugih žitarica upotrijebljenih u proizvodnji piva. Tijekom ukomljavanja enzimi kataliziraju hidrolizu škroba endosperma slada, pri čemu nastaju fermentabilni šećeri, maltoza i maltotrioza, te nefermentabilni ugljikohidrati, uključujući dekstrine. Nakon izdvajanja sladovine zaostaje čvrsta frakcija koja čini osnovu lignocelulozno sastava pivskog tropa (Zeko-Pivač i sur., 2022a). Pivski trop sastoji se pretežito od ljuske zrna ječma, uz manje udjele perikarpa, dijelova endosperma i spojeva koji tijekom ukomljavanja nisu pretvoreni u fermentabilne šećere (Fărcaş i sur., 2014). Na svakih 100 litara proizvedenog piva nastaje približno 20 kg vlažnog pivskog tropa. Zbog visokog udjela vlage, koji iznosi približno 80 %, te značajnog udjela polisaharida i proteina, svježi pivski trop izrazito je podložan mikrobnom kvarenju te mu je bez primjene odgovarajućih postupaka konzerviranja rok trajanja ograničen na približno 3–5 dana (Terefe i sur., 2022; Zhang i sur., 2023a). Prema statističkim podacima o proizvodnji piva za 2024. godinu, procjenjuje se da je na svjetskoj razini nastalo približno 37,6 milijuna tona pivskog tropa, od čega oko 10,22 milijuna tona na području Europe (Statista, 2025a; Statista, 2025b). U Republici Hrvatskoj tijekom 2023. godine proizvedeno je približno 2,89 milijuna hektolitara piva (Statista, 2024), na temelju čega se, uz prosječno nastajanje približno 20 kg vlažnog pivskog tropa na 100 L proizvedenog piva, može procijeniti nastanak oko 57 720 tona pivskog tropa. Prema dostupnim literaturnim procjenama, oko 70 % proizvedenog pivskog tropa koristi se u hranidbi životinja, približno 10 % za proizvodnju bioplina, dok se preostalih 20 % odlaže na odlagališta (Mitri i sur., 2022). Odlaganje pivskog tropa na odlagalištima povezano je sa značajnim okolišnim opterećenjem, pri čemu se procjenjuje da odlaganje jedne tone pivskog tropa može rezultirati emisijom približno 513 kg CO_2 ekvivalenta stakleničkih plinova (Kavalopoulos i sur., 2021).

2.3.1. Kemijski i nutritivni profil pivskog tropa

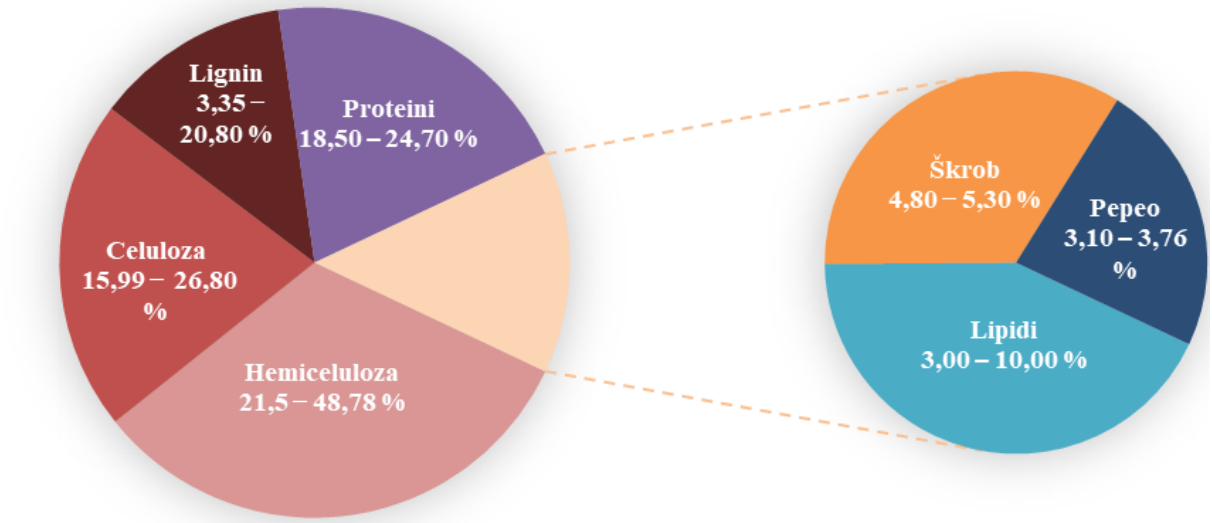
Kemijski sastav pivskog tropa (**Slika 7**) ovisi o brojnim čimbenicima, među kojima su najznačajniji vrsta ječma i drugih sirovina korištenih u proizvodnji slada, uvjeti i tehnike žetve, kvaliteta slada te tehnološki uvjeti proizvodnje piva. Dodatni utjecaj imaju aditivi koji se primjenjuju tijekom proizvodnje piva, poput gume arabike, propilen-glikol alginata, polipeptida te spojeva cinka, željeza i nikla, a koriste se s ciljem poboljšanja pjenjenja i stabilnosti pjene. Njihova primjena može dovesti do hidrolize β-glukana, eliminacije oksalne kiseline i smanjenja udjela polifenola, čime dodatno utječe na konačni kemijski sastav pivskog tropa. Na kemijski

RADNA VERZIJA

sastav pivskog tropa utječu i uvjeti njegova skladištenja. Prema dostupnim istraživanjima, smrznuti uzorci sadrže veći udio proteina i lipida u usporedbi s liofiliziranim i osušenim uzorcima, dok istodobno pokazuju niže koncentracije šećera, osobito arabinoze. Pivski trop predstavlja lignocelulozni materijal bogat strukturnim polisaharidima, ligninom i proteinima. Hemiceluloza je njegova najzastupljenija strukturna komponenta te najčešće čini 19–20 % suhe tvari, dok u pojedinim slučajevima njezin udio može doseći 41,30 %. Slijedi celuloza, čiji se udio kreće između 15,20 i 28,70 % suhe tvari. Prosječan udio lignina iznosi 11,41 %, uz zabilježene vrijednosti od 3,35 do 21 %, što potvrđuje značajnu varijabilnost udjela pojedinih strukturnih komponenti (Zeko-Pivač i sur., 2022a).

Osim strukturnih komponenti, pivski trop sadrži i značajne količine proteina, čiji se udio kreće između 18,50 i 24,70 % suhe tvari. Udio lipida iznosi 3,00–10,00 %, udio škroba 4,80–5,30 %, dok se udio pepela kreće između 3,10 i 3,76 % suhe tvari. Varijabilnost kemijskog sastava pivskog tropa potrebno je uzeti u obzir pri odabiru odgovarajuće tehnologije njegove obrade i valorizacije, budući da izravno utječe na učinkovitost biokonverzijskih procesa i svojstva konačnih proizvoda (Vanreppelen i sur., 2014; Zeko-Pivač i sur., 2022a; Schmidt i sur., 2023; Mathur i sur., 2025).

RADNA VERZIJA



Slika 7 Prikaz glavnih komponenti kemijskog sastava pivskog tropa s rasponima udjela (%) na bazi suhe tvari prema literaturnim podacima (izradio autor prema Vanreppelen i sur. (2014), Zeko-Pivač i sur. (2022a), Schmidt i sur. (2023) i Mathur i sur. (2025)

2.3.1.1. Proteini, lipidi i fenolni spojevi

Proteinske frakcije pivskog tropa prema sekvencijalnoj ekstraktibilnosti razvrstavaju se na albumine, globuline, gluteline i hordeine. Najzastupljeniju frakciju čine hordeini, odnosno prolamini, karakterizirani visokim udjelom prolina i glutamina, koji čine približno 43 % ukupnih proteina pivskog tropa. Glutelini, bogati glutaminom, prolinom, glicinom i drugim hidrofobnim aminokiselinama, zastupljeni su s približno 21,5 %, dok albumini i globulini zajedno čine oko 7,5 % ukupne proteinske frakcije (Ikram i sur., 2017). Esencijalne aminokiseline čine približno 30 % ukupnih proteina, pri čemu je lizin, kao limitirajuća aminokiselina u žitaricama, zastupljen s 14,3 % ukupnog proteinskog udjela pivskog tropa (Lynch i sur., 2016).

RADNA V

U ječmu i sladu 70–90 % masnih kiselina prisutno je u obliku triglicerida, 10–20 % u obliku sterola, dok približno 10 % čine slobodne masne kiseline (Lordan i sur., 2019).

Pivski trop predstavlja i značajan izvor fenolnih spojeva, pri čemu se njihov ukupni udio kreće između 1,30 i 3,80 mg ekvivalenata galne kiseline po kilogramu uzorka (mg_{GAE}/kg) (da Rosa Almeida i sur., 2017). Među hidroksicimetnim kiselinama najzastupljenija je ferulinska kiselina (1860 do 1948 μg/g), nakon koje slijedi *p*-kumarinska kiselina (565 do 794 μg/g). Sinapinska, kafeinska i siringinska kiselina prisutne su u nižim koncentracijama (McCarthy i sur., 2013). Ječam je također izvor proantocijanidina, uključujući oligomerne i polimerne oblike flavan-3-ola, dok je u pivskom tropu ukupna koncentracija flavonoida bila od 8,51 do 9,71 mg ekvivalenata kvercetina po gramu uzorka (mg_{QE}/g), ovisno o načinu obrade uzorka i primijenjenoj metodi ekstrakcije (Fărcaș i sur., 2013).

Mineralni sastav pivskog tropa, izražen na bazi suhe tvari, obuhvaća makroelemente i mikroelemente, među kojima su kalcij (3515 mg/kg), magnezij (1958 mg/kg), fosfor (5186 mg/kg), sumpor (1980 mg/kg), natrij (309,30 mg/kg), željezo (193,4 mg/kg) i cink (178 mg/kg). Pivski trop sadrži i kolin (1800 mg/kg) te vitamine, uključujući niacin (44 mg/kg), pantotensku kiselinu (8,50 mg/kg), riboflavin (1,50 mg/kg), tiamin (0,70 mg/kg), piridoksin (0,70 mg/kg), folnu kiselinu (0,20 mg/kg) i biotin (0,10 mg/kg) (Mussatto i sur., 2006).

2.3.2. Skladištenje i stabilnost pivskog tropa

Visok udio vlage predstavlja jedno od glavnih ograničenja pri skladištenju i daljnjoj primjeni pivskog tropa, budući da pogoduje intenzivnom razvoju mikroorganizama i posljedičnoj degradaciji materijala. Svježi pivski trop prirodno sadrži raznoliku mikrofloru, uključujući aerobne mezofilne i termofilne bakterije, bakterije roda *Pseudomonas*, kvasce, plijesni te mikroaerofilne i anaerobne bakterije. Takav mikrobiološki sastav doprinosi njegovoj nestabilnosti tijekom skladištenja, pri čemu se brojnost i sastav mikroorganizama mogu značajno mijenjati ovisno o uvjetima proizvodnje i skladištenja. Osim mikrobiološke kvarljivosti, potencijalni problem predstavlja i prisutnost mikotoksina, koji mogu potjecati iz početne sirovine ili nastajati tijekom neodgovarajućeg skladištenja uslijed razvoja toksikogenih plijesni. Istraživanja su pokazala prisutnost fumonizina i aflatoksina B_1 u svježim i skladištenim uzorcima pivskog tropa, pri čemu se njihove koncentracije mogu povećavati tijekom skladištenja, dok su ostali mikotoksini uglavnom određeni u niskim koncentracijama unutar propisanih zakonskih ograničenja. Navedeni rezultati naglašavaju potrebu za praćenjem mikrobiološke i mikotoksikološke ispravnosti pivskog tropa kako bi se osigurala njegova

RADNA VERZIJA

sigurna primjena u prehrani ljudi i hranidbi životinja (Aradwad i sur., 2025). Zbog navedenih ograničenja, sušenje predstavlja jednu od najčešće primjenjivanih metoda stabilizacije pivskog tropa jer smanjuje udio vlage, volumen materijala te olakšava njegov transport i skladištenje. Postupak sušenja obično uključuje prethodno mehaničko uklanjanje dijela vode prešanjem, pri čemu se udio vlage smanjuje ispod 60 %, nakon čega slijedi završno sušenje do udjela vlage manjeg od 10 %. Sušenje u sušioniku jedna je od najčešće primjenjivanih metoda zbog svoje jednostavnosti i ekonomske prihvatljivosti, no zahtijeva pažljivu kontrolu temperature kako bi se izbjeglo pregrijavanje i prženje pivskog tropa. Osim toga, pri višim temperaturama mogu nastajati emisije dušikovih i sumporovih oksida (NO_x i SO_x), koje predstavljaju dodatno okolišno opterećenje. Zbog toga se preporučuje provođenje procesa pri temperaturama nižima od 60 °C. Alternativne metode uključuju liofilizaciju i sušenje pregrijanom parom. Iako liofilizacija omogućuje učinkovito očuvanje materijala, njezina je primjena ograničena zbog visokih troškova. Sušenje pregrijanom parom predstavlja ekološki prihvatljiviju i energetski učinkovitiju alternativu te omogućuje istodobnu sterilizaciju, pasterizaciju, brže uklanjanje vlage i bolje očuvanje vrijednih organskih spojeva. Međutim, zahtijeva složeniju procesnu opremu te nije pogodno za temperaturno osjetljive proizvode (Chanie i FieVez, 2017; Johnson i sur., 2010). Odabrana metoda skladištenja i stabilizacije može značajno utjecati na kemijsku i mikrobiološku stabilnost pivskog tropa. Robertson i sur. (2010) utvrdili su da pri skladištenju svježeg pivskog tropa pri 20 °C dolazi do brzog razvoja mikroorganizama i istodobnog gubitka pojedinih sastavnica materijala, dok su pri hlađenju navedene promjene bile manje izražene. Nasuprot tome, tijekom skladištenja zamrznutog pivskog tropa nisu utvrđene promjene njegova kemijskog sastava, što potvrđuje učinkovitost zamrzavanja kao postupka stabilizacije i

RADNA VERZIJA

očuvanja sastava pivskog tropa. **Slika 8** prikazuje najčešće načine skladištenja pivskog tropa te izgled svježeg pivskog tropa neposredno nakon procesa proizvodnje piva.



a) Svježi pivski trop | b) Pivski trop osušen na 25 °C | c) Pivski trop osušen na 60 °C | d) Smrznuti pivski trop na - 20 °C

Slika 8 Pivski trop u različitim uvjetima skladištenja: a) svježi pivski trop, b) osušen pri sobnoj temperaturi (25 °C), c) osušen u laboratorijskoj pećnici pri 60 °C i d) smrznuti pivski trop (fotografije autora).

2.3.3. Tradicionalna primjena pivskog tropa

Najznačajnija područja primjene pivskog tropa uključuju hranidbu životinja i prehrambenu industriju.

2.3.3.1. Primjena u hranidbi životinja

Pivski trop ima široku primjenu u hranidbi životinja zahvaljujući povoljnom nutritivnom sastavu, osobito sadržaju proteina i prehrambenih vlakana. Njegova hranidbena vrijednost i učinci uključivanja u obroke ovise o životinjskoj vrsti, sastavu obroka te udjelu pivskog tropa u ukupnoj hranidbi. U govedarskoj proizvodnji dodatak pivskog tropa može poboljšati iskorištavanje hranjivih tvari i povećati mliječnost, no istodobno može smanjiti unos suhe tvari te utjecati na sastav mlijeka, uključujući smanjenje udjela proteina i mliječne masti (Faccenda i sur., 2017). U hranidbi peradi njegova je primjena ograničena zbog visokog udjela prehrambenih vlakana, koja smanjuju probavljivost i nutritivnu iskoristivost obroka. Nasuprot tome, uključivanje pivskog tropa u obroke svinja i janjadi povezano je s poboljšanjem proizvodnih svojstava, uključujući povećanje prirasta tjelesne mase i poboljšanje kvalitete mesa (Amoah i sur., 2017; Radzik-Rant i sur., 2018).

Pivski trop sadrži bioaktivne komponente poput arabinoksilana i β-glukana, koji u gastrointestinalnom traktu životinja predstavljaju fermentabilni supstrat za korisne

RADNA VERZIJA

mikroorganizme crijevne mikrobiote. Mikrobnom fermentacijom tih polisaharida nastaju kratkolančane masne kiseline, koje predstavljaju važan izvor energije za mikroorganizme crijevnog sustava te sudjeluju u procesima povezanima s apsorpcijom hranjivih tvari, metabolizmom glukoze i lipida, imunološkim odgovorom i ograničavanjem razvoja pojedinih patogenih bakterija. Zbog navedenih svojstava pivski trop istražuje se i kao funkcionalni dodatak hranidbi životinja s ciljem povoljnog djelovanja na crijevnu mikrobiotu i opći zdravstveni status životinja (Lao i sur., 2020).

2.3.3.2. Primjena u prehrambenoj industriji

U prehrambenoj industriji pivski trop istražuje se i primjenjuje kao sastojak za obogaćivanje različitih prehrambenih proizvoda, uključujući kruh, kekse, tjesteninu i grickalice (Eche i sur., 2025), jogurt (Błaszak i sur., 2025) te fermentirano mlijeko (Aradwad i sur., 2025). Njegova primjena temelji se ponajprije na visokom udjelu prehrambenih vlakana i prisutnosti bioaktivnih spojeva. Fenolni spojevi prisutni u pivskom tropu doprinose njegovom antioksidativnom kapacitetu, zbog čega se posljednjih godina istražuje njegova primjena u razvoju funkcionalnih prehrambenih proizvoda. Dosadašnja istraživanja upućuju na potencijal funkcionalnih sastojaka pivskog tropa, međutim njihovi učinci na zdravlje ljudi ovise o brojnim čimbenicima te zahtijevaju daljnja istraživanja prije donošenja konačnih zaključaka (Naik i sur., 2024).

2.3.3.3. Sigurnost i regulatorni zahtjevi

Sigurna primjena pivskog tropa u prehrani ljudi i hranidbi životinja uvjetovana je mogućom prisutnošću kontaminanata i drugih nepoželjnih tvari. Među najvažnijima su mikotoksini koje proizvode plijesni rodova *Aspergillus, Fusarium* i *Penicillium,* kao i ergot alkaloidi koje sintetiziraju gljive roda *Claviceps*. Potencijalni rizik predstavljaju i poliklorirani bifenili (PCB) te potencijalno toksični elementi, uključujući arsen, kadmij, olovo i živu, čija prisutnost može negativno utjecati na zdravlje ljudi i životinja. Stoga je prije uporabe pivskog tropa potrebno procijeniti njegovu zdravstvenu ispravnost i usklađenost s važećim regulatornim zahtjevima (Zeko-Pivač i sur., 2022b). U Europskoj uniji prisutnost nepoželjnih tvari u hrani za životinje uređena je Direktivom 2002/32/EZ, kojom su propisane najveće dopuštene koncentracije pojedinih kontaminanata radi zaštite zdravlja životinja, sigurnosti hrane i okoliša (EUR-Lex, 2002).

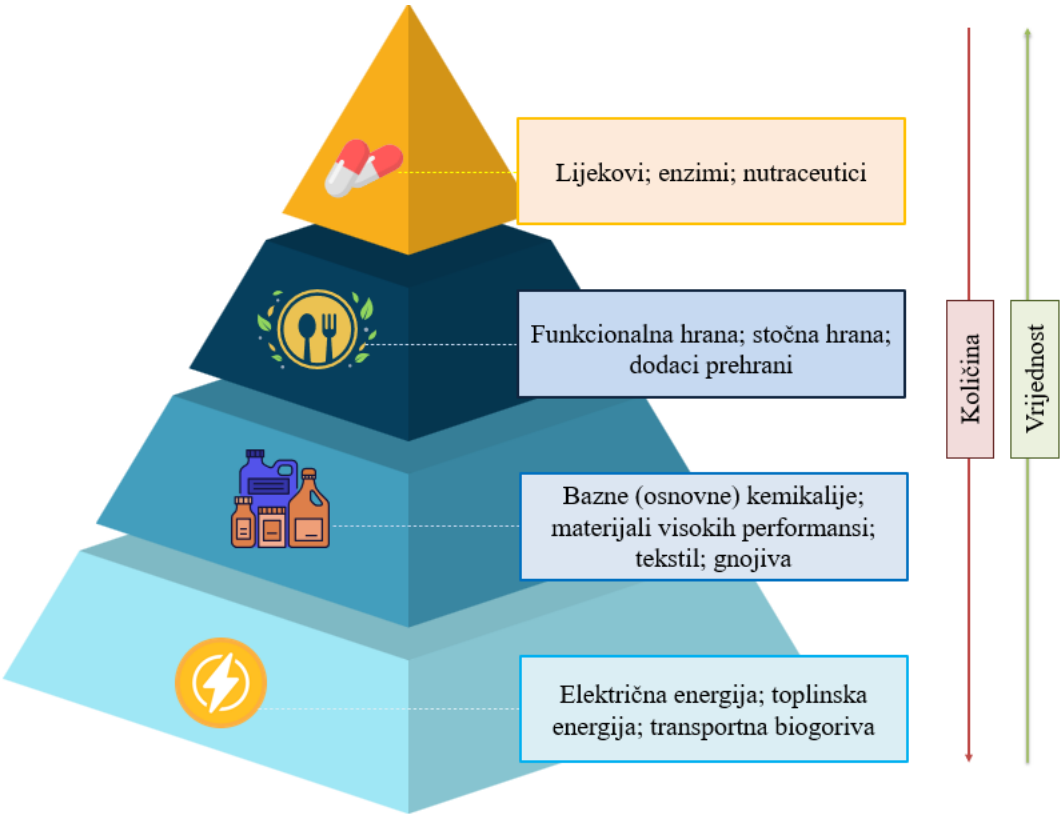
RADNA VERZIJA

2.3.4. Suvremeni pristupi valorizaciji pivskog tropa

Suvremena valorizacija pivskog tropa temelji se na konceptu biogospodarske vrijednosne piramide (**Slika 9**), koja prikazuje hijerarhijski pristup iskorištavanju biomase s ciljem ostvarivanja što veće dodane vrijednosti uz istodobno smanjenje otpada. U takvom pristupu pivski trop ne promatra se isključivo kao nusproizvod, već kao vrijedna sirovina s višestrukim mogućnostima primjene, čija se vrijednost povećava ovisno o stupnju prerade i krajnjoj namjeni. Takav hijerarhijski model omogućuje kaskadno iskorištavanje biomase te optimalnu valorizaciju njezina potencijala u skladu s konceptom integrirane biorafinerije prikazanim na **Slici 9** (Zeko-Pivač i sur., 2022a). Važno je naglasiti da biogospodarska vrijednosna piramida predstavlja konceptualni okvir za usporedbu mogućih načina valorizacije biomase, a ne univerzalnu hijerarhiju koja se može jednako primijeniti u svim slučajevima. Iako se proizvodi više dodane vrijednosti, poput enzima ili bioaktivnih spojeva, nalaze na vrhu piramide, njihov odabir nije nužno najprikladnije rješenje za svaku sirovinu ili tehnološki kontekst. Suvremeni pristupi valorizaciji biomase stoga se sve više temelje na višekriterijskim okvirima odlučivanja koji, uz ekonomsku vrijednost proizvoda, uzimaju u obzir dostupnost i svojstva sirovine,

RADNA VERZIJA

zahtjeve predobrade, tehnološku izvedivost, regulatorne zahtjeve te okolišnu i kružnu učinkovitost cjelokupnog procesa.



Slika 9 Hijerarhijski prikaz suvremenih mogućnosti valorizacije pivskog tropa prema konceptu biogospodarske vrijednosne piramide (prilagođeno prema Zeko-Pivač i sur., 2022a).

Na najnižoj razini piramide nalazi se energetska oporaba, koja obuhvaća proizvodnju bioplina, biometana, bioetanola, biobutanola, biovodika te toplinske i električne energije. Iako se na ovoj razini ostvaruje najmanja dodana vrijednost, iskorištava se najveći volumen biomase (Kalak, 2026). Sljedeću razinu čini proizvodnja kemikalija i materijala, uključujući platformne kemikalije poput limunske, octene i mliječne kiseline (Pathania i sur., 2018; Outeirino i sur., 2024), ksilitola (Gil-Montenegro i sur., 2019), funkcionalnih biomaterijala poput biougljena (Lorente i sur., 2020), tekstilnih nanovlakana (Hann i sur., 2026) te gnojiva (Bianco i sur., 2024). Višu razinu predstavlja primjena pivskog tropa u prehrani ljudi kao funkcionalnog prehrambenog sastojka (Soto-Maldonado i sur., 2026) te u proizvodnji proteinski obogaćene hrane za životinje (Eliopoulos i sur., 2022; Zeko-Pivač i sur., 2022b). Na vrhu vrijednosne

piramide nalaze se proizvodi najveće dodane vrijednosti, uključujući enzime, poput endocelulaza, β-glukozidaza, ksilanaza, mananaza, amilaza, lakaza i lignin-peroksidaza, namijenjene primjeni u farmaceutskoj, prehrambenoj i drugim granama industrije (Esparza-Vasquez i sur., 2026; Zeko-Pivač i sur., 2022a).

Razvoj suvremenih tehnologija valorizacije pivskog tropa može se pratiti analizom znanstvene literature, patentnih prijava i europskih istraživačkih projekata. Dok znanstveni radovi pružaju uvid u razvoj novih bioprocesa, patentna dokumentacija odražava tehnološka rješenja s potencijalom industrijske primjene (Evaristo i sur., 2023). Analizom patentnih prijava podnesenih Europskom patentnom uredu (EPO) izdvojene su tehnologije usmjerene na proizvodnju teksturiranih biljnih proteina (EP4190168A1, EP4190165A1), ekstrakciju proteina i vlakana iz pivskog tropa (EP3840586B1), razvoj visokoproteinskih prehrambenih proizvoda (EP4661686A1), kultivacijskih medija za mikroalge temeljenih na hidrolizatu pivskog tropa (WO2024253585A1) te bio-baziranih proteinskih ekstrakata za proizvodnju zamjenskih materijala za kožu (WO2024100420A1) (Europski patentni ured, 2026). Prema podacima baze Community Research and Development Information Service (CORDIS), u Europskoj uniji provodi se više projekata usmjerenih na valorizaciju pivskog tropa u okviru kružne bioekonomije, uključujući razvoj alternativnih proteinskih proizvoda (mEAT-BSG, PLANTOMYC), bioplastike i biopolimera (POLYMEER, FriendlyKnife), biostimulatora za poljoprivredu (BrewSelBar) te proizvodnju bioaktivnih spojeva i drugih visokovrijednih bioprodukata (BiOBreW, BojaS). U okviru tih projekata razvijaju se laboratorijska, pilotna i demonstracijska biorafinerijska postrojenja na području pojedinih država članica Europske unije, poput Belgije, Italije i Španjolske (Europska komisija, 2026).

Unatoč značajnom napretku, stupanj tehnološke spremnosti suvremenih postupaka valorizacije pivskog tropa znatno se razlikuje. Dok su proizvodnja stočne hrane i bioplina već komercijalno primijenjene tehnologije, većina procesa usmjerenih na proizvodnju enzima, bioaktivnih spojeva i funkcionalnih biomaterijala još se nalazi u fazi laboratorijskog ili pilot razvoja. Njihovu širu industrijsku primjenu ograničavaju zahtjevi povezani s predobradom lignocelulozne biomase, složenošću integracije procesnih koraka, regulatornim zahtjevima te ekonomskom isplativošću proizvodnje.

RADNA VERZIJA

2.4. Fermentacija na čvrstim nosačima

Fermentacija na čvrstim nosačima (engl. *solid-state fermentation,* SSF) temelji se na uzgoju mikroorganizama na čvrstom supstratu s odgovarajućim udjelom vlage, bez prisutnosti slobodne vode ili uz njezinu minimalnu količinu. Riječ je o heterogenom sustavu koji obuhvaća čvrstu, tekuću i plinovitu fazu. U procesu mogu sudjelovati različite skupine mikroorganizama, uključujući filamentozne gljive, bakterije i kvasce. Za razliku od submerzne fermentacije (engl. *submerged fermentation,* SmF), koja se provodi u tekućim hranjivim medijima, SSF koristi čvrste supstrate kao podlogu za rast mikroorganizama. Kolonizacija mikroorganizama odvija se na površini ili u neposrednoj blizini čestica supstrata, pri čemu vlaga postoji uglavnom u adsorbiranom obliku unutar čvrste matrice, bez stvaranja slobodne tekuće faze. Takvi uvjeti oponašaju prirodno stanište brojnih filamentoznih gljiva te omogućuju njihov učinkovit rast i sintezu ekstracelularnih enzima (Costa i sur., 2018; Singh nee' Nigam i Pandey, 2009). U usporedbi sa submerznom fermentacijom, SSF u određenim procesnim sustavima može omogućiti manju potrošnju vode, smanjene zahtjeve za sterilizacijom i manji volumen procesne opreme, dok ukupna potrošnja energije i zahtjevi za aeracijom ovise o konstrukciji bioreaktora i mjerilu procesa (Tišma i sur., 2021b). Dodatna prednost je što se proizvodi, poput enzima i drugih metabolita, često nalaze u koncentracijama višim nego se to postiže u submerznom uzgoju, što može pojednostaviti njihovu izolaciju i smanjiti troškove izolacije i pročišćavanja. Istodobno, zbog manje količine procesne vode smanjuju se i troškovi obrade otpadnih voda. Unatoč navedenim prednostima, SSF karakterizira dulje trajanje procesa te složenija kontrola ključnih procesnih parametara, poput temperature, udjela vlage i prijenosa kisika, osobito pri povećanju mjerila procesa (Tišma i sur., 2021b).

S obzirom na vrstu korištenog supstrata, SSF se može podijeliti na procese koji koriste inertne nosače, pri čemu supstrat služi isključivo kao potpora za rast mikroorganizama, te procese koji koriste neinertne lignocelulozne sirovine pri čemu biomasa predstavlja mehaničku potporu te izvor ugljika i hranjivih tvari potrebnih za rast i metabolizam mikroorganizama (Srivastava i sur., 2019).

Zbog mogućnosti izravne primjene lignoceluloznih nusproizvoda kao fermentacijskih supstrata, SSF nalazi široku primjenu u različitim biotehnološkim procesima. Primjenjuje se u bioremedijaciji i biološkoj detoksikaciji agroindustrijskih ostataka, nutritivnom obogaćivanju biomase te proizvodnji brojnih proizvoda više dodane vrijednosti, uključujući enzime, organske

RADNA VERZIJA

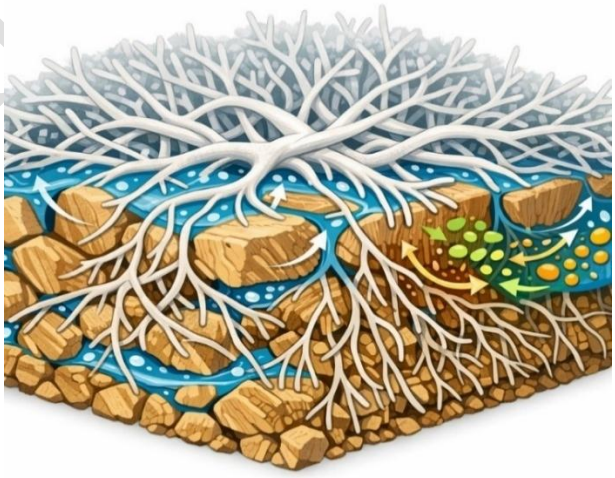
kiseline, antibiotike, alkaloide, biosurfaktante, biogoriva, aromatske spojeve, biopesticide i druge sekundarne metabolite (Costa i sur., 2018).

Uspješnost procesa SSF-a ovisi o međusobnom djelovanju brojnih čimbenika, među kojima su najvažniji odabir odgovarajućeg supstrata i mikroorganizma, udio vlage, temperatura, pH, aeracija te vrijeme fermentacije. Osim optimizacije procesnih uvjeta, važnu ulogu imaju i učinkovita izolacija te pročišćavanje ciljnog proizvoda, kao i odgovarajući odabir konstrukcije bioreaktora, osobito pri prijenosu procesa s laboratorijske na pilot ili industrijsku razinu (Costa i sur., 2018).

Zbog mogućnosti istodobne proizvodnje enzima i biološke modifikacije lignocelulozne biomase, SSF predstavlja značajan biotehnološki pristup integriranoj valorizaciji agroindustrijskih nusproizvoda u okviru koncepta biorafinerije. Upravo iz tog razloga predstavlja temeljni bioproces primijenjen u ovom doktorskom istraživanju.

2.4.1. Karakteristike čvrstih supstrata

Lignocelulozni materijali među najčešće su korištenim supstratima u fermentaciji na čvrstim nosačima. Zbog netopljivosti u vodi i sposobnosti zadržavanja vlage omogućuju rast i metaboličku aktivnost mikroorganizama. Kolonizacija supstrata ovisi o vrsti mikroorganizma, bakterije i kvasci uglavnom rastu na površini čestica, dok filamentozne gljive prodiru hifama u unutrašnjost supstrata i iskorištavaju dostupne hranjive tvari (**Slika 10**) (Singh nee' Nigam i Pandey, 2009).



Slika 10 Prikaz kolonizacije lignoceluloznog supstrata micelijem filamentozne gljive tijekom fermentacije na čvrstim nosačima (SSF) (izradio autor grafičkom alatu Picsart)

RADNA VERZIJA

Priroda čvrstog supstrata jedan je od najvažnijih čimbenika koji određuju učinkovitost procesa SSF-a. Kemijski sastav, fizikalna svojstva, dostupnost hranjivih tvari izravno utječu na rast mikroorganizama i produktivnost procesa. Kada prirodni sastav supstrata ne zadovoljava nutritivne zahtjeve odabranog mikroorganizma, potrebno ga je nadopuniti dodatnim izvorima hranjivih tvari (Costa i sur., 2018).

Osim kemijskog sastava, na uspješnost fermentacije značajno utječu i fizikalna svojstva supstrata, uključujući udio vlage, poroznost i veličinu čestica. Nedovoljna količina vlage ograničava rast i metaboličku aktivnost mikroorganizama, dok prekomjerna vlaga smanjuje poroznost supstrata, otežava prijenos kisika i može nepovoljno utjecati na tijek fermentacije. Porozna struktura lignocelulozne biomase omogućuje učinkovitu izmjenu plinova i zadržavanje vode unutar kapilarne mreže vlakana (Srivastava i sur., 2019). U SSF-u se, ovisno o vrsti supstrata i mikroorganizmu, najčešće primjenjuju čestice veličine 0,25–7,5 mm. Čestice manjeg promjera unutar tog raspona osiguravaju veću specifičnu površinu dostupnu mikroorganizmima, ali pretjerano usitnjavanje može dovesti do aglomeracije supstrata, smanjenja poroznosti i otežane aeracije. Nasuprot tome, veće čestice omogućuju bolju izmjenu plinova zbog većih međučestičnih prostora, ali istodobno smanjuju kontaktnu površinu između mikroorganizma i supstrata (Šelo i sur., 2021).

2.4.2. Radni mikroorganizmi

Uspješnost SSF procesa ovisi o usklađenosti fizioloških svojstava radnog mikroorganizma s karakteristikama supstrata te procesnim uvjetima, uključujući temperaturu, udio vlage, pH, aeraciju i prijenos topline. Budući da se fermentacija odvija u uvjetima ograničene količine slobodne vode, SSF prirodno pogoduje rastu filamentoznih gljiva, čiji micelij učinkovito kolonizira čvrstu matricu i izlučuje ekstracelularne enzime potrebne za razgradnju složenih lignoceluloznih polimera. Nasuprot tome, intenzivno miješanje može uzrokovati mehaničko oštećenje hifa te se pri projektiranju SSF procesa posebna pozornost posvećuje odabiru odgovarajućeg tipa bioreaktora i načina aeracije (Singh nee' Nigam i Pandey, 2009; Srivastava i sur., 2019). Osnovne biološke značajke, dominantni enzimi te uloga pojedinog mikroorganizma korištenog u okviru ovog istraživanja prikazani su u **Tablici 2**.

NA VERZIJA

Tablica 2 Osnovne taksonomske i biološke značajke, enzimski potencijal te uloga odabranih filamentoznih gljiva prikazani su u **Tablici 2**

Mikroorganizam	**Taksonomija**	**Biološke značajke**	**Enzimski potencijal**	**Ciljana komponenta**	**Funkcionalna uloga**
Trametes versicolor	Basidiomycota	Filamentozna gljiva bijele truleži; izražen ligninolitički potencijal	lakaza, mangan-peroksidaza, višenamjenska peroksidaza te hidrolitički enzimi	Lignin i lignocelulozna matrica	Biološka razgradnja i modifikacija lignocelulozne biomase djelovanjem ligninolitičkih i hidrolitičkih enzima te povećanje dostupnosti strukturnih polisaharida
Thermomyces lanuginosus	Ascomycota	Termofilna filamentozna gljiva; izražen hemicelulolitički potencijal	Ksilanaza, β-glukozidaza, lipaza	Hemicelulozna frakcija, ksilan	Enzimska razgradnja hemicelulozne frakcije lignocelulozne biomase, prvenstveno djelovanjem ksilanaza, uz potencijal primjene u proizvodnji hidrolitičkih enzima i valorizaciji biomase

RADNA VERZIJA

2.4.2.1. *Trametes versicolor*

T. versicolor (sin. *Coriolus versicolor*, *Polyporus versicolor*), pripada bazidiomicetama te je jedna od najistraživanijih gljiva bijele truleži. U prirodi nastanjuje različite vrste tvrdog drveća, poput hrasta i roda *Prunus*, ali i pojedine četinjače, uključujući jelu i bor, pri čemu se plodišta najčešće razvijaju na panjevima i odumrlim deblima tijekom cijele godine. Optimalni uvjeti rasta ovise o soju i sastavu hranjivog medija, a povoljan rast micelija najčešće se postiže pri temperaturama približno 25–30 °C i u blago kiselom području pH, približno 4–6 (Jo i sur., 2010). Karakteristična je po razvijenom ligninolitičkom enzimskom sustavu i sposobnosti razgradnje lignina te drugih strukturnih komponenti lignocelulozne biomase, zbog čega uzrokuje bijelu trulež drva. U laboratorijskim uvjetima može se uzgajati primjenom SmF-a ili SSF-a (Tišma i sur., 2021b). Izražen biotehnološki potencijal *T. versicolor* proizlazi iz razvijenog ligninolitičkog enzimskog sustava koji uključuje lakazu, mangan-peroksidazu i višenamjensku peroksidazu. Ovi enzimi kataliziraju oksidativnu razgradnju lignina i drugih aromatskih polimera, čime povećavaju dostupnost celuloze i hemiceluloze za djelovanje hidrolitičkih enzima. Zbog razvijenog ligninolitičkog enzimskog sustava *T. versicolor* primjenjuje se u biološkoj predobradi lignocelulozne biomase, uključujući poljoprivredne i agroindustrijske nusproizvode (Tišma i sur., 2021b), primjerice pšenične mekinje (Baker i Charlton, 2023), hrastovu piljevinu i ljuske kave (Sánchez i Montoya, 2020), pivski trop (Zeko-Pivač i sur., 2022b), kukuruzna silaža (Bucić-Kojić i sur., 2017; Tišma i sur., 2018) te trop grožđa (Šelo i sur., 2022). Takva primjena omogućuje istodobnu proizvodnju ligninolitičkih i hidrolitičkih enzima te biološku modifikaciju lignocelulozne matrice. Osim u biokonverziji biomase, *T. versicolor* istražuje se i u procesima bioremedijacije, obradi otpadnih voda te proizvodnji bioaktivnih spojeva i drugih proizvoda veće dodane vrijednosti (Tišma i sur., 2021b).

2.4.2.2. *Thermomyces lanuginosus*

T. lanuginosus (sin. *Humicola lanuginosa*) termofilna je filamentozna gljiva koja se prirodno pojavljuje u organskim ostacima i različitim raspadajućim biljnim materijalima. Optimalan rast ostvaruje pri temperaturama između 40 i 50 °C, dok pojedini sojevi mogu rasti i pri 60 °C, ali ne pokazuju rast pri temperaturama nižim od 20 °C (Sreelatha i sur., 2017). Zbog sposobnosti razgradnje lignocelulozne biomase i sinteze termostabilnih hidrolitičkih enzima, *T. lanuginosus* primjenjuje se u procesima SSF-a za proizvodnju različitih industrijski značajnih enzima. Ova

RADNA VERZIJA

gljiva učinkovito raste na različitim izvorima ugljika te proizvodi brojne hidrolitičke enzime, uključujući celulaze (EC 3.2.1.4), ksilanaze (EC 3.2.1.8) i β-glukozidaze (EC 3.2.1.21). Posebno se ističe proizvodnja termostabilnih enzima, koji zadržavaju katalitičku aktivnost pri povišenim temperaturama te omogućuju provedbu bioprocesa pri temperaturama koje mogu smanjiti rizik od kontaminacije mezofilnim mikroorganizmima. Osim toga, povišene temperature mogu povećati brzinu difuzije i enzimskih reakcija unutar temperaturnog raspona pogodnog za aktivnost i stabilnost enzima, što može povoljno utjecati na učinkovitost procesa (Moretti i sur., 2012; Azad i sur., 2013). Osim ksilanaza, *T. lanuginosus* predstavlja i značajan izvor termostabilnih lipaza (EC 3.1.1.3) (Šibalić i sur., 2020). U uvjetima SSF-a *T. lanuginosus* uzgajan je na različitim lignocelulozним i agroindustrijskim supstratima, uključujući pogaču buče (Šibalić i sur., 2020), stabljiku kukuruza (Shi i sur., 2020), lišće eukaliptusa s pšeničnim mekinjama (Dixit i sur., 2023) te pogaču konoplje (Parlov Vuković i sur., 2026; Tišma i sur., 2026). Industrijski potencijal ove gljive dodatno potvrđuju istraživanja ko-kultivacije s bakterijom *Thermobifida fusca*. U takvim sustavima *T. lanuginosus* primarno razgrađuje hemiceluloznu, odnosno ksilansku matricu lignocelulozne biomase, čime olakšava pristup celulozi i povećava proizvodnju bakterijskih celulaza za 19–25 % u odnosu na monokulturne sustave (Shi i sur., 2020). Navedena istraživanja potvrđuju funkcionalnu svestranost i značajan industrijski potencijal *T. lanuginosus* u razvoju održivih bioprocesa i kružnog biogospodarstva.

2.4.3. Procesni parametri

Uspješnost SSF-a uvelike ovisi o međudjelovanju svojstava supstrata, fizioloških svojstava mikroorganizma i procesnih uvjeta. Budući da svaki sustav mikroorganizam–supstrat predstavlja jedinstvenu cjelinu, procesne parametre potrebno je prilagoditi specifičnim zahtjevima odabranog mikroorganizma i željenom proizvodu. Osim što utječu na rast mikroorganizama, procesni uvjeti određuju sintezu primarnih i sekundarnih metabolita te proizvodnju izvanstaničnih enzima. Među najvažnijim procesnim parametrima izdvajaju se predobrada supstrata, veličina čestica, kemijski sastav medija, sterilizacija, udio vlage, koncentracija inokuluma, temperatura, pH, miješanje i prozračivanje. Njihova međusobna povezanost određuje učinkovitost prijenosa mase i topline, dostupnost hranjivih tvari te intenzitet metaboličkih aktivnosti tijekom fermentacije (Singh nee' Nigam i Pandey, 2009; Srivastava i sur., 2019).

Aeracija i miješanje imaju ključnu ulogu u održavanju aerobnih uvjeta, opskrbi kisikom i uklanjanju ugljikova dioksida, ali i u prijenosu topline i vlage kroz fermentacijski sustav.

RADNA VERZIJA

Međutim, intenzitet miješanja potrebno je prilagoditi osjetljivosti mikroorganizma na mehaničko smicanje, osobito kod filamentoznih gljiva, kod kojih pretjerano miješanje može uzrokovati oštećenje hifa. Promjene relativne vlažnosti plinske faze mogu značajno utjecati na udio vlage u supstratu, ovisno o njegovim sorpcijskim svojstvima, što dodatno naglašava važnost pravilnog upravljanja prozračivanjem (Singh nee' Nigam i Pandey, 2009). Temperatura i pH predstavljaju najvažnije čimbenike koji određuju rast mikroorganizama i sintezu željenih produkata. Za razliku od submerzne fermentacije, njihova kontrola u SSF sustavima znatno je zahtjevnija zbog heterogenosti sustava. Tijekom fermentacije može doći do stvaranja toplinskih gradijenata koji ograničavaju rast mikroorganizama i smanjuju produktivnost procesa. Filamentozne gljive općenito dobro podnose blago kisele uvjete, pri čemu optimalna pH vrijednost ovisi o vrsti mikroorganizma i ciljanom bioprocesu, a kiseli uvjeti mogu istodobno ograničiti razvoj pojedinih bakterijskih kontaminanata (Singh nee' Nigam i Pandey, 2009). Kemijski sastav fermentacijskog medija također značajno utječe na učinkovitost procesa. Osim izvora ugljika i dušika, mikroorganizmima su za rast i biosintezu enzima potrebni makroelementi, mikroelementi, vitamini i drugi kofaktori. Kao izvori dušika najčešće se koriste amonijeve i nitratne soli, dok minerali poput kalcija, magnezija, željeza, mangana, cinka i bakra sudjeluju u brojnim metaboličkim procesima. Optimalni omjer ugljika i dušika (C:N) ovisi o vrsti mikroorganizma, sastavu supstrata i ciljanom proizvodu te ga je potrebno prilagoditi pojedinom procesu SSF-a (Srivastava i sur., 2019).

2.4.4. Produkti fermentacije

SSF omogućuje višestruku valorizaciju lignocelulozne biomase, pri čemu vrsta i količina dobivenih produkata ovise o mikroorganizmu, supstratu i procesnim uvjetima, a istodobno dobivanje više vrijednih produkata može pridonijeti učinkovitijem iskorištavanju biomase u okviru integrirane biorafinerije (Cooray i Chen, 2018; Mitri i sur., 2022). Primjena SSF-a u valorizaciji pivskog tropa može se podijeliti u dva osnovna pristupa. Prvi se temelji na korištenju fermentiranog pivskog tropa kao funkcionalno modificirane biomase, pri čemu fermentacija može povoljno utjecati na njegova nutritivna, tehnološka i bioaktivna svojstva za primjenu u prehrani ljudi i hranidbi životinja. Drugi pristup usmjeren je na proizvodnju i izdvajanje visokovrijednih bioprodukata, pri čemu pivski trop služi kao supstrat za biosintezu enzima, organskih kiselina, vitamina, aminokiselina, bioaktivnih metabolita, biogoriva i drugih spojeva više dodane vrijednosti (Mitri i sur., 2022). Iako se oba pristupa temelje na istom bioprocesu, njihov je krajnji cilj različit. U prvom slučaju fermentirana biomasa predstavlja

RADNA VERZIJA

završni proizvod, dok je u drugom slučaju biomasa prvenstveno proizvodna platforma za sintezu i izdvajanje visokovrijednih bioprodukata. Odabir odgovarajućeg pristupa ovisi o svojstvima sirovine, ciljnom proizvodu i zahtjevima planiranog biorafinerijskog procesa.

Na temelju dostupnih literaturnih podataka, u **Tablici 3** prikazani su najznačajniji produkti dobiveni biotehnološkom valorizacijom pivskog tropa, pripadajući radni mikroorganizmi te njihova potencijalna industrijska primjena.

U ovom doktorskom istraživanju primijenjen je integrirani pristup kaskadnoj valorizaciji pivskog tropa fermentacijom na čvrstim nosačima s gljivama *T. versicolor* i *T. lanuginosus*. Istraživanje je obuhvatilo proizvodnju hidrolitičkih i ligninolitičkih enzima, djelomično pročišćavanje i karakterizaciju ksilanaze te ispitivanje primjene sirovog i djelomično pročišćenog enzimskog pripravka u hidrolizi lignoceluloznih supstrata radi oslobađanja reducirajućih šećera. Istodobno su ispitane promjene kemijskog, aminokiselinskog i fenolnog sastava fermentiranog pivskog tropa te je procijenjen njegov nutritivni potencijal i odabrani pokazatelji sigurnosti za moguću primjenu u hranidbi životinja. Dodatno je provedena procjena potencijalnih utjecaja procesa na okoliš primjenom LCA analize.

U ovom doktorskom istraživanju primijenjena su oba pristupa valorizaciji pivskog tropa. Istraživana je proizvodnja i karakterizacija ksilanaze kao visokovrijednog bioprodukta te je procijenjen potencijal fermentiranog pivskog tropa kao biomase obogaćene proteinima za primjenu u hranidbi životinja.

RADNA VERZIJA

Tablica 3 Primjeri produkata dobivenih biotehnološkom valorizacijom pivskog tropa, pripadajući mikroorganizmi i područja njihove primjene

Kategorija produkata	Produkt	Značaj / primjena	Radni mikroorganizam [5]	Referenca
Fermentirani pivski trop	Proteinski obogaćena biomasa	Hrana za životinje	*Pleurotus ostreatus*	Eliopoulos i sur., 2022.
	Biomasa obogaćena aminokiselinama i masnim kiselinama	Povećana nutritivna vrijednost supstrata, prehrambena industrija	*Bacillus subtilis*	Tan i sur., 2019.
	Nutritivno poboljšana biomasa	Hrana za životinje	*Trametes versicolor*	Zeko-Pivač i sur., 2022b.
	Biokontrolno gnojivo	Primjena u poljoprivredi	*Beauveria bassiana*	Qiu i sur., 2019.
Enzimi	Endo-1,4-β-glukanaza, ksilanaza, amilaza, β-glukozidaza	Proizvodnja papira, stočne hrane, lignocelulozna hidroliza	*Aspergillus niger*	Guimarães i sur., 2024.
	β-ksilozidaza, α-L-arabinofuranozidaza	Industrijska primjena	*Penicillium janczewskii*	Terrasan i Carmona, 2015.
	Lignin-peroksidaza, karboksimetil celulaza, proteaza, tanaza	Industrijska primjena, prehrambena industrija	*Pleurotus sajorcaju*, *Penicillium chrysogenum* i *Aspergillus niger*	Khidzir i sur., 2010.
	Lakaza, mangan-peroksidaza	Bioremedijacija, bioizbjeljivanje	*Trametes versicolor*	Zeko-Pivač i sur., 2022b.
Fenolni i antioksidativni spojevi	Ukupni polifenoli	Prirodni antioksidansi za funkcionalnu	*Trametes versicolor*	Tišma i sur., 2018.

[5] Pojedini mikroorganizmi mogu istodobno proizvoditi više skupina produkata, ovisno o sastavu supstrata i uvjetima fermentacije.

RADNA VERZIJA

Kategorija produkata	Produkt	Značaj / primjena	Radni mikroorganizam [5]	Referenca
		hranu i nutraceutike		
	Ferulinska, *p*-kumarinska i kafeinska kiselina	Antioksidativna i antimikrobna svojstva	*Aspergillus oryzae*	da Costa Maia i sur., 2020.
Proteinski proizvodi	Proteinski ekstrakt, mikoproteini	Funkcionalni sastojci hrane	*Rhizopus oryzae*	Rusbjerg-Weberskov i sur., 2025.
	Peptidi	Bioaktivni sastojci funkcionalne hrane i nutraceutika	*Bacillus licheniformis*	Liu i sur., 2023.
Organske kiseline	Mliječna kiselina	Proizvodnja hrane i farmaceutski proizvodi	*Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum*	Outeirino i sur., 2024.
	Limunska kiselina	Zakiseljivač i konzervans u prehrambenoj industriji	*Aspergillus niger*	Pathania i sur., 2018.
Prebiotički spojevi	Arabinoksilan	Prebiotički sastojak funkcionalne hrane	*Fusarium oxysporum*	Cervantes-Ramirez i sur., 2022.
Biomaterijali i biopolimeri	Polihidroksialkanoati (PHA)	Biorazgradiva ambalaža i bioplastični materijali	*Aspergillus niger*, *Burkholderia cepacia* i *Cupriavidus necator*	Corchado-Lopo i sur., 2021.
	Giberelinska kiselina (GA_3)	Biljni regulator rasta	*Fusarium fujikuroi*	da Silva i sur., 2021.
	Ergosterol	Prekursor vitamina D i farmaceutska industrija	*Cordyceps militaris*	Gregori, 2014.

2.4.4.1. Potencijal primjene fermentirane lignocelulozne biomase u hranidbi životinja

Lignocelulozna biomasa nastala kao nusproizvod poljoprivredne i prehrambene industrije predstavlja potencijalan izvor hranjivih tvari za životinje, no njezina je primjena često ograničena visokim udjelom strukturnih polisaharida, prisutnošću lignina i smanjenom dostupnošću pojedinih hranjivih sastavnica. SSF omogućuje biološku modifikaciju takvih

RADNA VERZIJA

supstrata djelovanjem mikroorganizama i njihovih enzima, pri čemu može doći do djelomične razgradnje lignocelulozne strukture, promjena udjela proteina i smanjenja pojedinih antinutritivnih čimbenika. Tako dobivena biomasa može imati povoljnija nutritivna svojstva, pri čemu učinkovitost procesa ovisi o vrsti supstrata, korištenom mikroorganizmu i uvjetima fermentacije (Yafetto i sur., 2023; Betchem i sur., 2024; Yan i sur., 2025). Potencijal primjene fermentirane lignocelulozne biomase razlikuje se ovisno o probavnom sustavu i hranidbenim potrebama pojedinih životinjskih vrsta. Preživači, poput goveda, ovaca i koza, zahvaljujući mikroorganizmima buraga mogu probaviti celulozu i hemicelulozu, dok prisutnost lignina ograničava dostupnost tih polisaharida mikrobnoj razgradnji. Biološka obrada gljivama bijele truleži može pridonijeti povećanju probavljivosti vlaknastih sastavnica djelomičnom razgradnjom lignina i promjenama strukture biljne stanične stijenke. Pritom je važna selektivnost razgradnje jer istodobni gubitak celuloze i hemiceluloze može smanjiti količinu potencijalno iskoristivih ugljikohidrata. Učinkovitost takve obrade ovisi o soju mikroorganizma, sastavu supstrata i trajanju fermentacije, zbog čega se promjene kemijskog sastava ne mogu izravno poistovjetiti s povećanjem probavljivosti (van Kuijk i sur., 2015; Yan i sur., 2025). Za razliku od preživača, svinje i perad imaju ograničeniju sposobnost iskorištavanja lignoceluloznih vlakana, zbog čega su u njihovoj hranidbi osobito važne promjene udjela vlakana, dostupnosti proteina i prisutnosti nepoželjnih spojeva. SSF različitih biljnih sirovina, uključujući sačmu uljane repice, pamučnu sačmu, pogaču palminih koštica i lupinu, istraživana je kao postupak poboljšanja njihove hranidbene vrijednosti za brojlere. U pojedinim istraživanjima zabilježeno je smanjenje nepoželjnih čimbenika i poboljšanje iskorištavanja hranjivih tvari, no učinci ovise o vrsti supstrata, mikroorganizmu i sastavu obroka (Olukomaiya i sur., 2019). U istraživanju na svinjama, primjena fermentirane krmne smjese rezultirala je usporedivim prirastom i probavljivošću hranjivih tvari u odnosu na konvencionalni obrok, unatoč promjenama sastava tijekom fermentacije. Navedeno potvrđuje da poboljšanje pojedinih nutritivnih pokazatelja fermentirane biomase ne mora nužno rezultirati boljim proizvodnim rezultatima životinja (Hu i sur., 2008).

Među lignoceluloznim nusproizvodima pivski trop je potencijalan supstrat zbog prisutnosti proteina, hemiceluloze, celuloze i drugih hranjivih sastavnica. Fermentacija s filamentoznim gljivama može promijeniti odnos proteinskih i vlaknastih frakcija te pridonijeti poboljšanju nutritivnih svojstava biomase. Tijekom SSF-a pivskog tropa s *Pleurotus ostreatus* zabilježeno je povećanje udjela proteina za 49,49 %, približno desetostruko povećanje udjela β-glukana te

RADNA VERZIJA

smanjenje udjela celuloze za 11,42 % (Eliopoulos i sur., 2022). Fermentacijom pivskog tropa s *Aspergillus ibericus* udio proteina povećan je s 25,30 na 29,31 %, dok se udio vlakana smanjio s 59,94 na 43,30 %, celuloze s 21,16 na 14,73 %, a hemiceluloze s 23,77 na 15,29 % (Fernandes i sur., 2022). Međutim, povećanje masenog udjela proteina ne mora značiti povećanje njihove ukupne količine jer tijekom fermentacije dolazi do razgradnje i gubitka drugih sastavnica supstrata. Dodatni potencijal SSF-a lignoceluloznih nusproizvoda povezan je s rastom filamentoznih gljiva i nastajanjem gljivične biomase bogate proteinima. Tijekom fermentacije gljivični micelij može pridonijeti proteinskom obogaćivanju supstrata, dok se njegovim kontroliranim uzgojem može proizvesti gljivična biomasa namijenjena dobivanju mikoproteina. Mikoproteini predstavljaju alternativni izvor proteina čija proizvodnja može uključivati različite agroindustrijske nusproizvode i fermentacijske postupke, uključujući SSF. Njihova nutritivna svojstva, osobito udio proteina i aminokiselinski profil, ovise o korištenoj vrsti gljive, supstratu i uvjetima uzgoja (Upcraft i sur., 2021; Ahmad i sur., 2022; Majumder i sur., 2024). Pregled dostupnih istraživanja pokazuje da SSF agroindustrijskih ostataka može pridonijeti proizvodnji proteinski obogaćene biomase za hranidbu životinja, pri čemu se uz promjene nutritivnog sastava mogu smanjiti i pojedini antinutritivni čimbenici (Yafetto i sur., 2023). Mikoproteini se također istražuju kao alternativni proteinski sastojci hrane za vodene organizme, osobito u kontekstu djelomične zamjene konvencionalnih izvora proteina. Međutim, njihova primjenjivost ovisi o nutritivnoj kvaliteti, probavljivosti, sigurnosti i udjelu u hranidbenoj smjesi (Khalasi i sur., 2026). Pritom je potrebno razlikovati proteinski obogaćenu fermentiranu lignoceluloznu biomasu od izdvojene gljivične biomase jer fermentirani supstrat, osim gljivičnih proteina, sadržava i preostale sastavnice izvornog materijala. Stoga, povećanje ukupnog udjela proteina tijekom SSF-a nije izravan pokazatelj količine nastalih mikoproteina, a procjena hranidbene vrijednosti zahtijeva dodatno razmatranje aminokiselinskog sastava, probavljivosti i sigurnosti fermentirane biomase (Upcraft i sur., 2021; Ahmad i sur., 2022; Yafetto i sur., 2023).

Mogućnost primjene fermentiranog pivskog tropa potvrđena je i hranidbenim istraživanjima na ribama. Tijekom SSF-a pivskog tropa s *A. ibericus* postignute su promjene proteinskih i vlaknastih frakcija, a uključivanje 20 % fermentiranog pivskog tropa u obroke juvenilnog europskog lubina (lat. *Dicentrarchus labrax*, brancin) rezultiralo je većom probavljivošću suhe tvari, proteina, pojedinih aminokiselina, lipida i energije u usporedbi s jednakim udjelom nefermentiranog tropa (Estevão-Rodrigues i sur., 2024). U zasebnom desetotjednom

RADNA VERZIJA

hranidbenom eksperimentu uključivanje 10 % fermentiranog pivskog tropa poboljšalo je rast i učinkovitost iskorištavanja hrane u odnosu na kontrolnu skupinu, dok su pri udjelu od 20 % proizvodni pokazatelji ostali približno na razini kontrole (Estevão-Rodrigues i sur., 2025a). Povoljni učinci zabilježeni su i kod ribe hame (lat. *Argyrosomus regius*), pri čemu je uključivanje fermentiranog pivskog tropa ublažilo negativne učinke nefermentiranog supstrata na rast i učinkovitost iskorištavanja hrane. Ipak, uočene su i promjene histološke građe crijeva, što upućuje na potrebu dodatnog ispitivanja učinaka fermentirane biomase na zdravlje životinja (Estevão-Rodrigues i sur., 2025b).

Unatoč navedenim mogućnostima, primjena fermentirane lignocelulozne biomase u hranidbi životinja zahtijeva cjelovitu procjenu nutritivne vrijednosti i sigurnosti. Osim kemijskog i aminokiselinskog sastava, potrebno je razmotriti probavljivost hranjivih tvari, mikrobiološku ispravnost, moguću prisutnost mikotoksina i drugih kontaminanata te stabilnost biomase tijekom skladištenja. Posebnu pozornost potrebno je posvetiti odabiru mikroorganizma i kontroli fermentacijskih uvjeta jer promjene kemijskog sastava same po sebi ne potvrđuju sigurnost ni poboljšanu hranidbenu učinkovitost. Stoga fermentirana lignocelulozna biomasa predstavlja potencijalan sastojak hrane za životinje, ali njezinu primjenjivost i optimalne udjele u obrocima potrebno je potvrditi odgovarajućim ispitivanjima probavljivosti, sigurnosti i hranidbenim pokusima (van Kuijk i sur., 2015; Betchem i sur., 2024; Yan i sur., 2025).

RADNA VERZIJA

RADNA VERZIJA

3. Eksperimentalni dio

3.1. Zadatak

Zadatak ovog istraživanja bio je ispitati mogućnosti kaskadne valorizacije pivskog tropa primjenom filamentoznih gljiva *T. versicolor* i *T. lanuginosus* u fermentaciji na čvrstim nosačima u skladu s konceptom lignocelulozne biorafinerije. Eksperimentalne faze prikazane su na **Slici 11**.

Faza I: Proizvodnja, pročišćavanje, karakterizacija i implementacija enzima

1. Razviti proces uzgoja gljive *T. versicolor* na pivskom tropu u uvjetima SSF
2. Razviti proces uzgoja gljive *T. lanuginosus* na pivskom tropu
3. Mjeriti aktivnost hidrolitičkih i ligninolitičkih enzima tijekom SSF-a
4. Proizvesti sirove ekstrakte hidrolitičkih enzima (ksilanaza, invertaza, β-glukozidaza i celulaza) te ligninolitičkih enzima (lakaza, mangan-peroksidaza i lignin-peroksidaza).
5. Odabrati enzim s najvećom izmjerenom aktivnošću, provesti njegovo djelomično pročišćavanje te odrediti parametre pročišćavanja.
6. Karakterizirati djelomično pročišćeni i sirovi enzimski pripravak određivanjem optimalne temperature i pH vrijednosti, termostabilnosti, pH-stabilnosti i stabilnosti tijekom skladištenja te analizom proteinskog profila primjenom SDS-PAGE.
7. Ispitati mogućnost primjene proizvedenog enzima.

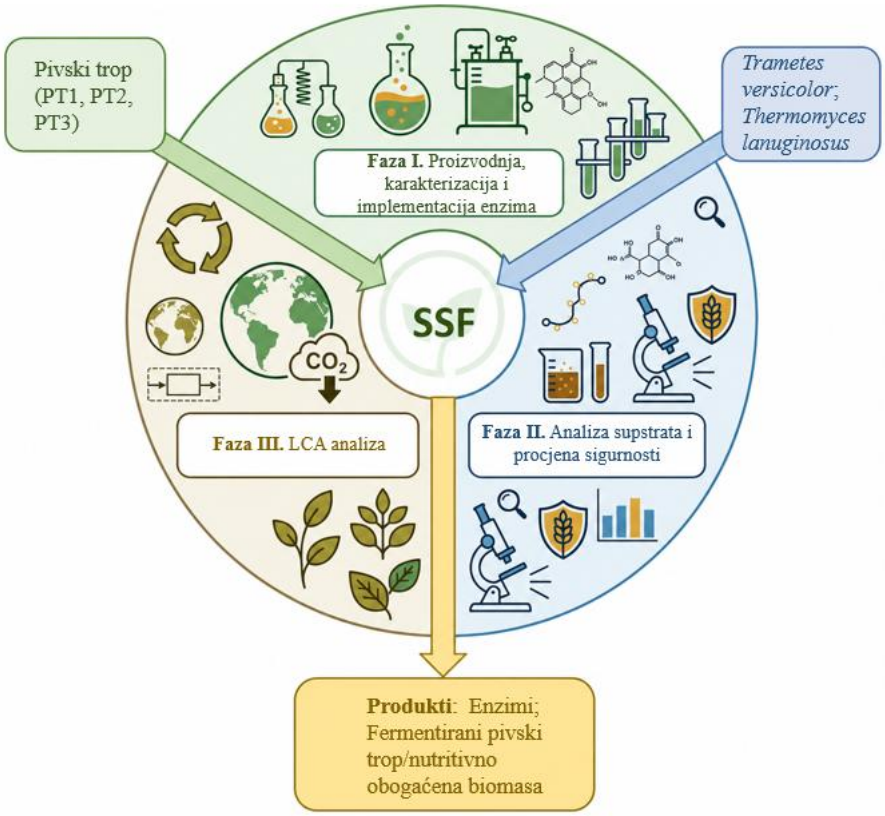
Faza II: Analiza supstrata i procjena sigurnosti

8. Odrediti promjene kemijskog sastava sirovog i fermentiranog pivskog tropa nakon provedene fermentacije.
9. Procijeniti odabrane pokazatelje sigurnosti fermentiranog pivskog tropa s ciljem procjene njegova potencijala za primjenu u hranidbi životinja.

Faza III: Procjena održivosti biotehnološkog procesa

10. Procijeniti potencijalne okolišne utjecaje razvijenog bioprocesa primjenom analize životnog ciklusa (LCA)
11. Procijeniti mogućnost integracije razvijenog procesa u koncept lignocelulozne biorafinerije i kružnog gospodarstva višestrukom valorizacijom pivskog tropa.

RADNA VERZIJA



Slika 11 Shematski prikaz faza istraživanja, korištenih mikroorganizama i analiziranih produktnih tokova u procesu fermentacije na čvrstim nosačima

3.2. Materijali

3.2.1. Supstrati

Za provedbu SSF-a korištena su tri uzorka pivskog tropa: pivski trop 1 (PT1) i pivski trop 3 (PT3) iz Osječke pivovare d.d. (Osijek, Republika Hrvatska), te pivski trop 2 (PT2) iz Vukovarske pivovare d.o.o. (Vukovar, Republika Hrvatska). Početni udio vlage uzoraka pri zaprimanju iznosio je 70,92 % za PT1, 75,35 % za PT2 i 65,43 % za PT3.

Za provedbu biotransformacija (**3.3.6.**) korišteni su sljedeći supstrati: pogača konoplje (PK, Frankolovo, Slovenija) s udjelom vlage od 6,52 % te rezanci šećerne repe (RR, Županja, Republika Hrvatska) s udjelom vlage od 12,13 %.

3.2.2. Mikroorganizmi

T. lanuginosus Tsiklinsky (ATCC® 76323™, Leibniz Institute DSMZ, Njemačka) uzgajan je na krumpir-dekstroznom agaru (PDA; Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italija) uz dodatak 0,5 % (w/v) ekstrakta kvasca (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italija) pri 45 °C tijekom 10 dana.

RADNA V.

Trametes versicolor TV-6 (MZKI, Ljubljana, Slovenija) uzgajana je na PDA pri 27 °C tijekom 14 dana. Radi osiguravanja usporedivosti pokusa, starost inokuluma standardizirana je za svaku vrstu mikroorganizma, pri čemu su korištene desetodnevne kulture *T. lanuginosus* i četrnaestodnevne kulture *T. versicolor*. Inokulum za pokretanje fermentacije svaki je put uziman iz periferne, aktivno rastuće zone kolonije na Petrijevoj zdjelici.

3.2.3. Kemikalije

U eksperimentalnom dijelu istraživanja korištene su sljedeće kemikalije i reagensi: citratna kiselina monohidrat, apsolutni etanol, D-(+)-glukoza, bezvodni natrijev sulfat, natrijev hidroksid, natrijev nitrit, natrijev acetat trihidrat, aceton i vodikov peroksid (**Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska**); pšenični arabinoksilan (**Megazyme, Bray, Irska**); goveđi serumski albumin (BSA), 4-nitrofenil-β-D-glukopiranozid (*p*-NPG), 99 %, 4-nitrofenol (*p*-nitrofenol), 99 %, malonska kiselina, natrijev tartarat dihidrat, natrijev dihidrogenfosfat monohidrat, manganov(II) sulfat i veratrilni alkohol (**Acros Organics, New Jersey, SAD**); D-(−)-fruktoza, D-(−)-riboza, D-(+)-saharoza, 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina, vanilinska kiselina, bezvodni bakrov(II) sulfat i 3,5-dinitrosalicilna kiselina (DNS) (**Acros Organics, Geel, Belgija**); tartaratna kiselina, natrij-kalijev tartarat tetrahidrat, Coomassie Brilliant Blue G-250, bezvodni dinatrijev hidrogenfosfat, 1-butanol, fosforna kiselina i acetonitril HPLC čistoće (**Fisher Chemical, Loughborough, Ujedinjeno Kraljevstvo**); D-(+)-ksiloza, željezov(II) sulfat heptahidrat, kalijev hidrogenftalat, natrijev karbonat i kalijev nitrat (**Kemika, Zagreb, Hrvatska**); 2,6-dimetoksifenol, bezvodni natrijev sulfit, monohidrat galne kiseline, n-oktanol, celit opran kiselinom, p-hidroksibenzojeva kiselina, (+)-katehin hidrat, siringinska kiselina, (−)-epikatehin, (−)-epigalokatehin, p-kumarinska kiselina, o-kumarinska kiselina, ferulinska kiselina, kaempferol i komercijalna ksilanaza (**Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, SAD**); procijanidin B1 (**Extrasynthese, Genay, Francuska**); amonijev sulfat (**Lach-Ner, Zagreb, Hrvatska**); natrijev citrat dihidrat (**T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska**); metanol HPLC čistoće (**J.T. Baker, Arnhem, Nizozemska**); ledena octena kiselina (**Macron Fine Chemicals, Gliwice, Poljska**); klorovodična kiselina, sumporna kiselina i *n*-heksan (**Carlo Erba Reagents GmbH, Emmendingen, Njemačka**); aluminijev(III) klorid heksahidrat (**Alfa Aesar GmbH & Co. KG, Kandel, Njemačka**); te Folin–Ciocalteuov reagens (**CPAchem, Bogomilovo, Bugarska**).

Za SDS-PAGE analizu korišteni su Novex Tris-Glycine Mini gelovi (WedgeWell format), Novex Tris-Glycine SDS pufer za uzorke (2×), NuPAGE redukcijski reagens za uzorke (10×),

RADNA VERZIJA

PageRuler Plus predobojeni proteinski standard (10–250 kDa) i Tris-Glycine SDS pufer za elektroforezu (10×) (**Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD**).

Reagensi korišteni u uslužnim analizama

Za uslužno određivanje aminokiselinskog sastava korištena je standardna smjesa aminokiselina koja je sadržavala histidin, serin, arginin, glicin, asparaginsku kiselinu, glutaminsku kiselinu, treonin, alanin, prolin, lizin, tirozin, valin, izoleucin, leucin, fenilalanin i metionin u koncentraciji od 2,5 mmol/L te cistein u koncentraciji od 1,25 mmol/L (**Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD**). Za predkolonsku derivatizaciju korišten je AccQ-Tag komplet reagensa, dok je kao sastavnica mobilne faze korišten koncentrirani AccQ-Tag Ultra Eluent A (**Waters, Milford, Massachusetts, SAD**); druga mobilna faza bio je acetonitril. Za kiselu hidrolizu i pripremu uzorka korištena je 6 mol/L klorovodična kiselina s 0,1 % (w/v) fenola te dušik, pri čemu su ti reagensi osigurani u laboratoriju u kojem je provedena uslužna analiza.

Tashiro indikator, korišten pri određivanju udjela sirovih proteina Kjeldahlovom metodom, preuzet je iz vanjskog laboratorija te podatak o proizvođaču nije bio dostupan. Kemikalije, standardi i reagensi za analizu mineralnih elemenata, metala i metaloida, mikotoksina, PCB-ova, PAH-ova, ergot alkaloida i tropan alkaloida osigurani su u akreditiranom laboratoriju, a analize su provedene prema zahtjevima norme HRN EN ISO/IEC 17025:2017.

3.2.4. Uređaji

U istraživanju je korištena sljedeća laboratorijska oprema:

- tehnička vaga (PA4102C, OHAUS Europe GmbH, Nänikon, Švicarska)
- analitička vaga (Nimbus NBL-214i, Adam Equipment, Kingston, Engleska)
- vrtložna miješalica (MX-S, DLab, Los Angeles, SAD)
- magnetska miješalica (SMHS-6, Witeg, Njemačka)
- vodena kupelj s tresilicom (SW-23, Julabo, Seelbach, Njemačka)
- termostatirana tresilica odnosno termomikser (VWR® Thermal Shake Touch, VWR International, Radnor, Pennsylvania, SAD)
- ultrazvučna kupelj (Elmasonic P 120 H, Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Njemačka), korištena za degaziranje mobilnih faza prije kromatografskih analiza

RADNA VERZIJA

- pH-metar (pH/ORP HI 2211, HANNA Instruments d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- analizator vlage (HR-73, Mettler Toledo, Zürich, Švicarska)
- sušionik (UFE 500, Memmert, Njemačka)
- zamrzivač (SWUF-80 UniFreeze Smart-Lab™, Wertheim, Njemačka)
- inkubator (KB 115, BINDER GmbH, Tuttlingen, Njemačka)
- autoklav (AMA270, Astell Scientific, Sidcup, Kent, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- mufolna peć (MF12-124, Forns Hobersal, Barcelona, Španjolska)
- centrifuga (Z 326 K, Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Njemačka)
- ultracentrifugalni mlin (ZM200, Retsch GmbH, Haan, Njemačka)
- liofilizator Alpha 2-4 LSCplus s vakuumskom pumpom CRV PRO 4 (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Njemačka)
- UV/VIS spektrofotometar (UV-1280, Shimadzu, Kyoto, Japan)
- analizator vlakana (FIWE 3, VELP Scientifica, Usmate Velate, Italija)
- uređaj za digestiju uzoraka prema Kjeldahlu (Behrotest K12, Behr Labor-Technik GmbH, Düsseldorf, Njemačka)
- uređaj za destilaciju uzoraka prema Kjeldahlu (Vapodest 1, C. Gerhardt GmbH & Co. KG, Königswinter, Njemačka)
- analizator ukupnog ugljika TOC-L CPH/CPN opremljen modulom za analizu krutih uzoraka SSM-5000A i jedinicom za određivanje ukupnog dušika TNM-L (Shimadzu, Kyoto, Japan)
- univerzalni sustav za ekstrakciju (B-811 LSV, Büchi, Flawil, Švicarska)
- sustav za tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti UHPLC Nexera XR, opremljen detektorom indeksa loma i detektorom s nizom fotodioda (Shimadzu, Kyoto, Japan)
- sustav za gel-elektroforezu Mini Gel Tank (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD)
- jedinica za napajanje elektroforeze PowerEase™ Touch 120W Power Supply (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD).

RADNA VERZIJA

Uređaji korišteni u uslužnim analizama

Za uslužno određivanje aminokiselinskog sastava korišten je Acquity UPLC sustav opremljen PDA detektorom (Waters, Milford, Massachusetts, SAD) te AccQ-Tag Ultra C18 kolona (2,1 × 100 mm; 1,7 µm; Waters, Milford, Massachusetts, SAD).

Za uslužne analize mineralnih elemenata i nepoželjnih tvari korišteni su spektrofotometar, sustav induktivno spregnute plazme sa spektrometrijom masa (ICP-MS), sustav tekućinske kromatografije s tandemskom spektrometrijom masa (LC-MS/MS) te sustav plinske kromatografije s tandemskom spektrometrijom masa (GC-MS/MS). Podaci o proizvođačima i modelima uređaja nisu bili dostupni jer su analize provedene u akreditiranom laboratoriju primjenom akreditiranih i validiranih metoda ispitivanja.

3.3. Metode

3.3.1. Biološka obrada pivskog tropa

U okviru ovog istraživanja biološka obrada pivskog tropa provedena je primjenom SSF-a. U tu svrhu provedene su tri zasebne fermentacije na supstratima PT1, PT2 i PT3. Supstrati PT1 i PT2 inokulirani su gljivom *T. versicolor*, dok je supstrat PT3 inokuliran gljivom *T. lanuginosus*.

3.3.1.1. Fermentacija na čvrstim nosačima s *Trametes versicolor*

Uzorci PT1 i PT2 prethodno su osušeni u sušioniku pri 45 °C tijekom 8 h kako bi se osigurala stabilnost materijala tijekom skladištenja. Nakon sušenja pohranjeni su na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi.

Za provedbu SSF-a u laboratorijske staklenke volumena 720 mL odvagano je po 30 g uzoraka PT1 i PT2 te dodano 50 mL demineralizirane vode. Nakon homogenizacije supstrati su sterilizirani pri 121 °C tijekom 15 min i ohlađeni na sobnu temperaturu. Inokulacija je provedena dodatkom pet micelijskih diskova gljive *T. versicolor*, promjera 1 cm, suspendiranih u 10 mL sterilne demineralizirane vode. Udio vlage supstrata podešen je na 70 %, a visina sloja iznosila je približno 4,5 cm. SSF je proveden pri 27 °C tijekom 15 dana, uz dvije paralelne staklenke za svaki dan fermentacije, odnosno ukupno 30 staklenki po uzorku pivskog tropa.

Uzorkovanje je provedeno svakodnevno uklanjanjem dviju paralelnih staklenki iz inkubatora. Cjelokupni sadržaj svake staklenke izvagan je radi praćenja promjene mase tijekom fermentacije, a zatim homogeniziran. Gubitak mokre mase izračunat je u odnosu na početnu masu fermentacijske smjese određenu neposredno prije početka inkubacije prema **jednadžbi 1**.

RADNA VERZIJA

$$Gubitak\ mokre\ mase = \frac{m_0 - m_t}{m_0} \times 100 \quad (\mathbf{1})$$

Gdje je: gubitak mokre mase [%], m_0 – početna masa fermentacijske smjese neposredno prije inkubacije [g]; m_t – masa fermentacijske smjese nakon određenog vremena fermentacije [g].

Homogenizirani uzorci korišteni su za ekstrakciju enzima (poglavlje **3.3.2.**) i određivanje aktivnosti proizvedenih enzima (poglavlje **3.3.3**.). Preostali fermentirani supstrat steriliziran je radi inaktivacije mikrobne aktivnosti, sušen pri sobnoj temperaturi tijekom 48 h te usitnjen ultracentrifugalnim mlinom do veličine čestica ≤ 1 mm za potrebe daljnjih analiza (poglavlje **3.3.7.**).

3.3.1.2. Fermentacija na čvrstim nosačima s *Thermomyces lanuginosus*

Uzorak PT3 prethodno je pohranjen u zamrzivaču pri −20 °C radi očuvanja početnih svojstava supstrata, udjela vlage te sprječavanja neželjenih mikrobioloških i biokemijskih promjena tijekom skladištenja. Prije početka fermentacije uzorak je odmrznut pri 4 °C tijekom 24 h, nakon čega je 50 g supstrata preneseno u laboratorijske staklenke volumena 720 mL. Supstrat je steriliziran u autoklavu pri 121 °C tijekom 15 min, ohlađen na sobnu temperaturu te inokuliran s pet micelijskih diskova gljive *T. lanuginosus* promjera 1 cm, suspendiranih u 5 mL sterilne demineralizirane vode, pri čemu je formiran sloj supstrata visine približno 4 cm. Fermentacija je provedena u ventiliranom inkubatoru pri 45 °C uz ventilaciju postavljenu na 20 % tijekom 10 dana. Eksperimentalni dizajn uključivao je dvije paralelne staklenke za svaki dan fermentacije, pri čemu je pripremljeno ukupno 20 staklenki. Uzorkovanje fermentiranog supstrata te njegova daljnja obrada provedeni su prema postupku opisanom u poglavlju **3.3.1.1**.

3.3.2. Proizvodnja sirovih ekstrakata hidrolitičkih i ligninolitičkih enzima

3.3.2.1. Priprema sirovih ekstrakata hidrolitičkih i ligninolitičkih enzima iz *Trametes versicolor*

Tijekom svakog dana SSF-a iz svake od dviju laboratorijskih staklenki odvagano je po 2 g homogeniziranog supstrata te ekstrahirano u 10 mL odgovarajućeg ekstrakcijskog pufera.Za ekstrakciju ksilanaze primijenjen je 0,05 M citratni pufer (pH 5,3) (Bailey i sur., 1992), za invertazu 0,1 M acetatni pufer (pH 5,0) (Margetić i Vujčić, 2017), za β-glukozidazu 0,1 M acetatni pufer (pH 5) (Karpe i sur., 2016), a za celulazu 0,05 M citratni pufer (pH 4,8) (Adney i Baker, 2008). Ligninolitički enzimi ekstrahirani su primjenom 0,05 M natrij-malonatnog

RADNA VERZIJA

pufera (pH 4,5) (Lueangjaroenkit i sur., 2020) za lakazu i mangan-peroksidazu te 0,05 M natrij-tartaratnog pufera (pH 3,0) (Field i sur., 1996) za lignin-peroksidazu.

Ekstrakcija je provedena na vrtložnoj miješalici tijekom 30 min, nakon čega su uzorci centrifugirani pri 10 000 × *g* tijekom 10 min. Enzimske aktivnosti određene su u dobivenim supernatantima prema metodama opisanim u poglavljima **3.3.3.1.; 3.3.3.3**–**3.3.3.7.** Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD) dvaju zasebno pripremljenih ekstrakata (n = 2), pri čemu je svaki ekstrakt analiziran u tri paralelna spektrofotometrijska mjerenja.

Priprema ekstrakcijskih pufera

Citratni pufer (1 M, pH 4,5) pripremljen je otapanjem 210 g citratne kiseline monohidrata u približno 750 mL demineralizirane vode uz kontinuirano miješanje. Nakon potpunog otapanja, otopina je kvantitativno prenesena u odmjernu tikvicu volumena 1000 mL, nadopunjena demineraliziranom vodom do oznake te je pH po potrebi podešen na 4,5.

Citratni pufer (0,05 M, pH 4,8 i 5,3) pripremljen je razrjeđivanjem prethodno pripremljenog 1 M citratnog pufera demineraliziranom vodom, nakon čega je podešen pH.

Acetatni pufer (0,1 M, pH 5,0) pripremljen je miješanjem dviju prethodno pripravljenih otopina: (A) 11,5 mL ledene octene kiseline razrijeđene demineraliziranom vodom do volumena od 1000 mL i (B) 27,2 g natrijeva acetata trihidrata otopljenog u demineraliziranoj vodi te nadopunjenog do volumena od 1000 mL. U 500 mL demineralizirane vode dodano je 148 mL otopine A i 352 mL otopine B uz kontinuirano miješanje, nakon čega je pH po potrebi podešen.

Natrij-malonatni pufer (0,05 M, pH 4,5) pripremljen je otapanjem 1,3 g malonske kiseline u 250 mL demineralizirane vode. Pripremljene su dvije zasebne otopine jednake koncentracije, pri čemu je u prvoj pH podešen na 4,0, a u drugoj na 5,0. Za pripravu pufera pomiješano je 120 mL otopine pH 4,0 i 80 mL otopine pH 5,0, nakon čega je pH konačne otopine po potrebi dodatno podešen na 4,5.

Natrij-tartaratni pufer (0,05 M, pH 3,0) pripremljen je otapanjem 2,8 g vinske (tartarne) kiseline u 200 mL demineralizirane vode te 1,5 g natrijeva tartarata dihidrata u zasebnih 200 mL demineralizirane vode. Obje otopine su potom spojene, kvantitativno prenesene u odmjernu tikvicu volumena 500 mL i nadopunjene demineraliziranom vodom do oznake. Konačni pH pufera po potrebi je dodatno podešen.

RADNA VERZIJA

3.3.2.2. Priprema sirovih ekstrakata hidrolitičkih enzima iz *Thermomyces lanuginosus*

Tijekom svakog dana fermentacije na čvrstim nosačima (SSF), iz svake laboratorijske staklenke odvagano je po 2 g homogeniziranog uzorka u duplikatu te ekstrahirano u 10 mL odgovarajućeg ekstrakcijskog pufera. Ekstrakcija je provedena na vrtložnoj miješalici tijekom 30 min, nakon čega su uzorci centrifugirani pri 10 000 × *g* tijekom 10 min. Za ekstrakciju ksilanaze korišten je 0,1 M natrij-fosfatni pufer (pH 6,0) (Božinović i sur., 2023) te je za β-glukozidazu korišten 0,1 M acetatni pufer (pH 5,0). Enzimske aktivnosti određene su u dobivenim supernatantima prema metodama opisanim u poglavljima **3.3.3.2.; 3.3.3.4**. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD) dvaju zasebno pripremljenih ekstrakata (n = 2), pri čemu je svaki ekstrakt analiziran u tri paralelna spektrofotometrijska mjerenja.

Priprema* ekstrakcijskog *pufera

Natrij-fosfatni pufer (0,1 M, pH 6,0) pripremljen je miješanjem dviju prethodno pripravljenih 0,2 M osnovnih otopina. Otopina A pripravljena je otapanjem 13,80 g natrijeva fosfata monobaznog monohidrata ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) u demineraliziranoj vodi do konačnog volumena od 500 mL, dok je otopina B pripravljena otapanjem 2,84 g bezvodnog natrijeva fosfata dibaznog (Na_2HPO_4) u demineraliziranoj vodi do konačnog volumena od 100 mL. Za pripremu 1 L pufera pomiješano je 442,90 mL otopine A i 57,10 mL otopine B. Nakon provjere i po potrebi prilagodbe pH na 6,0, otopina je nadopunjena demineraliziranom vodom do konačnog volumena od 1 L.

3.3.3. Mjerenje aktivnosti enzima

3.3.3.1. Mjerenje aktivnosti ksilanaze iz *Trametes versicolor*

Za određivanje aktivnosti ksilanaze iz *T. versicolor* primijenjena je DNS metoda prema Božinović i sur. (2023), kojom je određena količina reducirajućih šećera nastalih razgradnjom pšeničnog arabinoksilana. U reakciju je dodano 900 µL 1 %-tne (w/v) otopine pšeničnog arabinoksilana i 100 µL sirovog enzimskog ekstrakta. Slijepa proba i kontrola enzima pripremljene su s jednakim volumenom supstrata (900 µL). Nakon inkubacije pri 50 °C tijekom 5 min dodano je 1500 µL DNS reagensa radi zaustavljanja reakcije. Slijepoj probi potom je dodano 100 µL citratnog pufera (0,05 M, pH 5,3), a kontroli enzima jednak volumen sirovog enzimskog ekstrakta. Smjese su homogenizirane na vrtložnoj miješalici te zagrijavane 5 min pri 100 °C. Neposredno nakon dodatka DNS reagensa u slijepu probu dodano je 100 µL 0,05 M citratnog pufera (pH 5,3), dok je u kontrolu enzima dodano 100 µL sirovog ekstrakta

RADNA VERZIJA

ksilanaze. Uzorci su zatim vorteksirani i zagrijavani 5 min pri 100 °C, nakon čega su ohlađeni na sobnu temperaturu. Apsorbancija je izmjerena pri 540 nm u odnosu na slijepu probu. Kalibracijska krivulja izrađena je korištenjem D-ksiloze u rasponu koncentracija od 0,5 do 10 µmol/mL, primjenom istog postupka inkubacije i mjerenja kao za analizirane uzorke. Za izračun koncentracije oslobođene ksiloze korištena je razlika između apsorbancije uzorka i apsorbancije kontrole enzima te odgovarajuća kalibracijska krivulja prema **jednadžbi 2**.

$$c = \frac{\mathrm{A540} + 0{,}0118}{0{,}0485} \qquad (\mathbf{2})$$

Gdje je: c – koncentracija ksiloze [µmol/mL]; A540 – apsorbancija pri 540 nm [-].

Volumna aktivnost ksilanaze izračunata je na temelju koncentracije oslobođene ksiloze prema **jednadžbi 3**.

$$\mathrm{V.A.} = \frac{c \times V_\mathrm{r} \times \mathrm{DF}}{V_\mathrm{e} \times t} \qquad (\mathbf{3})$$

Gdje je: V.A. - volumna aktivnost enzima [U/mL]; c – koncentracija oslobođenih reducirajućih šećera [µmol/mL], V_r – volumen reakcijske smjese [mL]; DF – faktor razrjeđenja; t - vrijeme trajanja reakcije [min], V_e – volumen enzimskog ekstrakta u reakcijskoj smjesi [mL].

Specifična aktivnost izračunata je iz volumne aktivnosti enzima i koncentracije proteina prema Bradfordovoj metodi (**3.3.3.8.**) (**jednadžba 4**).

$$\mathrm{S.A.} = \frac{\mathrm{V.A.}}{\gamma_\mathrm{protein}} \qquad (\mathbf{4})$$

Gdje je: S.A. - specifična aktivnost enzima [U/mg]; V.A. - volumna aktivnost enzima [U/mL]; γ_protein - masena koncentracija proteina [mg/mL].

Aktivnost ksilanaze izražena je kao volumna aktivnost preračunata na masu suhe tvari uzorka (**jednadžba 5)**.

$$\mathrm{A} = \frac{\mathrm{V.A.} \times V_\mathrm{e} \times 100}{m_\mathrm{uz.} \times \mathrm{s.t.}} \qquad (\mathbf{5})$$

RADNA VERZIJA

Gdje je: A – aktivnost enzima preračunata na masu suhe tvari uzorka [U/$g_{s.t.}$]; V.A. - volumna aktivnost [U/mL]; V_e - volumen sirovog ekstrakta [mL]; $m_{uz.}$ – masa fermentiranog uzorka [g], s.t. - suha tvar [%].

Priprema DNS reagensa

Za pripremu 100 mL DNS reagensa 2,18 g 3,5-dinitrosalicilne kiseline otopljeno je u 80 mL otopine natrijeva hidroksida koncentracije 0,5 mol/L uz miješanje i zagrijavanje na 70 °C. Nakon potpunog otapanja dodano je 30,00 g natrijeva kalijeva tartarata tetrahidrata. Otopina je ohlađena na sobnu temperaturu, kvantitativno prenesena u odmjernu tikvicu volumena 100 mL te nadopunjena destiliranom vodom do oznake.

3.3.3.2. Mjerenje aktivnosti ksilanaze iz *Thermomyces lanuginosus*

Aktivnost ksilanaze iz *T. lanuginosus* određena je DNS metodom prema Marinhu i sur. (2023) i Božinović i sur. (2023). Za analizu je pripremljena reakcijska smjesa od 900 µL 1 %-tne (w/v) otopine pšeničnog arabinoksilana i 100 µL sirovog enzimskog ekstrakta. U slijepu probu i kontrolu enzima dodano je po 900 µL supstrata. Inkubacija je trajala 5 min pri 65 °C, nakon čega je reakcija prekinuta dodatkom 1500 µL DNS reagensa. Potom je slijepoj probi dodano 100 µL natrij-fosfatnog pufera (0,1 M, pH 6,0), a kontroli enzima 100 µL sirovog enzimskog ekstrakta. Nakon homogenizacije na vrtložnoj miješalici smjese su zagrijavane pri 100 °C tijekom 5 min i ohlađene na sobnu temperaturu. Apsorbancija je određena pri 540 nm uz slijepu probu kao referencu. Kalibracija je provedena s D-ksilozom u koncentracijskom rasponu od 0,5 do 10 µmol/mL, uz jednake uvjete inkubacije i mjerenja kao za uzorke. Koncentracija oslobođenih reducirajućih šećera, izražena kao ekvivalent ksiloze, izračunana je na temelju razlike apsorbancija uzorka i kontrole enzima te pripadajuće kalibracijske krivulje (**jednadžba 6)**.

$$c = \frac{A540+0,0167}{0,0582} \quad (6)$$

Volumna aktivnost, specifična aktivnost i aktivnost ksilanaze preračunata na masu suhe tvari izračunate su primjenom **jednadžbi 3–5**.

RADNA VERZIJA

3.3.3.3. Mjerenje aktivnosti invertaze

Aktivnost invertaze određena je DNS metodom prema Margetić i Vujčić (2017), koja se temelji na kvantifikaciji reducirajućih šećera nastalih hidrolizom saharoze. Reakcijska smjesa sadržavala je 400 µL 0,3 M otopine saharoze pripremljene u 0,1 M natrij-acetatnom puferu (pH 5,0) te 100 µL sirovog enzimskog ekstrakta. Slijepa proba i kontrola enzima sadržavale su 400 µL supstrata. Reakcijske smjese inkubirane su 5 min pri 50 °C, nakon čega je reakcija zaustavljena dodatkom 500 µL DNS reagensa. Neposredno nakon dodatka DNS reagensa u slijepu probu dodano je 100 µL 0,1 M natrij-acetatnog pufera (pH 5,0), dok je u kontrolu enzima dodano 100 µL sirovog ekstrakta invertaze. Uzorci su zatim vorteksirani i zagrijavani 5 min pri 100 °C, nakon čega su ohlađeni na sobnu temperaturu i razrijeđeni dodatkom 4 mL demineralizirane vode. Apsorbancija je izmjerena pri 540 nm u odnosu na slijepu probu.

Kalibracijska krivulja izrađena je korištenjem standardnih otopina glukoze i fruktoze jednakih molarnih koncentracija, pomiješanih u omjeru 1 : 1, u rasponu koncentracija od 0,5 do 20 µmol/mL, primjenom istog postupka inkubacije i mjerenja kao za analizirane uzorke. Za izračun koncentracije oslobođenih reducirajućih šećera korištena je razlika između apsorbancije uzorka i apsorbancije kontrole enzima te kalibracijska krivulja (**jednadžba 7**).

$$c = \frac{A_{540} + 0{,}0019}{0{,}0255} \qquad (7)$$

Gdje je: c – koncentracija otopine glukoze i fruktoze [µmol/mL]; A_{540} – apsorbancija pri 540 nm [-].

Volumna aktivnost, specifična aktivnost te aktivnost invertaze preračunata na masu suhe tvari izračunate su primjenom **jednadžbi 3–5**.

3.3.3.4. Mjerenje aktivnosti β-glukozidaze

Aktivnost β-glukozidaze određena je metodom Karpe i sur. (2016), na temelju oslobađanja *p*-nitrofenola hidrolizom *p*-nitrofenil-β-D-glukopiranozida (*p*-NPG). Reakcijska smjesa pripremljena je dodatkom 500 µL natrij-acetatnog pufera (0,1 M, pH 5,0), 250 µL otopine p-NPG (0,02 M) i 250 µL sirovog enzimskog ekstrakta. Slijepa proba sadržavala je iste sastojke, pri čemu je volumen enzimskog ekstrakta nadomješten s 250 µL natrij-acetatnog pufera (0,1

RADNA VERZIJA

M, pH 5,0). Nakon inkubacije pri 50 °C tijekom 5 min reakcija je zaustavljena dodatkom 1 mL otopine natrijeva karbonata (0,2 M). Uzorci su homogenizirani na vrtložnoj miješalici, a apsorbancija je izmjerena pri 400 nm u odnosu na slijepu probu.

Kalibracijska krivulja izrađena je korištenjem standardnih otopina *p*-nitrofenola u rasponu koncentracija od 0,01 do 0,15 μmol/mL, primjenom istog postupka inkubacije i mjerenja kao za analizirane uzorke. Za izračun koncentracije oslobođenog *p*-nitrofenola korištena je razlika između apsorbancije uzorka i apsorbancije slijepe probe te odgovarajuća kalibracijska krivulja (**jednadžba 8**).

$$c = \frac{A_{400} + 0{,}0145}{5{,}3318} \qquad (\mathbf{8})$$

Gdje je: c – koncentracija *p*-nitrofenola [μmol/mL]; A_{400} - apsorbancija pri 400 nm [-].

Volumna aktivnost, specifična aktivnost te aktivnost β-glukozidaze preračunata na masu suhe tvari izračunate su primjenom **jednadžbi 3–5**.

3.3.3.5. Mjerenje aktivnosti celulaze

Aktivnost celulaze određena je prema metodama Ghose (1987) i Adney i Baker (2008) primjenom 3,5-dinitrosalicilne (DNS) metode, koja se temelji na kvantifikaciji reducirajućih šećera nastalih hidrolizom celuloze. Kao supstrat korišten je zarolani filter papir (Whatman No. 1; dimenzije 1,0 × 6,0 cm; masa 50 mg). Reakcijska smjesa sadržavala je filter papir, 500 μL sirovog enzimskog ekstrakta i 1000 μL 0,05 M natrij-citratnog pufera (pH 4,8). Kontrola enzima sadržavala je 500 μL sirovog enzimskog ekstrakta i 1000 μL 0,05 M natrij-citratnog pufera, kontrola supstrata filter papir i 1500 μL 0,05 M natrij-citratnog pufera, dok je slijepa proba sadržavala 1500 μL 0,05 M natrij-citratnog pufera. Sve reakcijske smjese inkubirane su 60 min pri 50 °C, nakon čega je reakcija zaustavljena dodatkom 3000 μL DNS reagensa. Uzorci su vorteksirani i zagrijavani 5 min pri 100 °C, zatim ohlađeni u kupelji s hladnom vodom. Nakon hlađenja, 200 μL reakcijske smjese razrijeđeno je s 2500 μL demineralizirane vode, homogenizirano te je apsorbancija izmjerena pri 540 nm u odnosu na slijepu probu. Konačna vrijednost apsorbancije uzorka korigirana je oduzimanjem apsorbancije kontrole enzima i kontrole supstrata.

RADNA VERZIJA

Kalibracijska krivulja izrađena je korištenjem standardnih otopina glukoze u rasponu od od 1,00 do 3,35 mg/0,5 mL, primjenom istog postupka razvoja obojenja i mjerenja kao za analizirane uzorke. Koncentracija oslobođene glukoze izračunata je iz izmjerene apsorbancije primjenom **jednadžbe 9**.

$$c = \frac{A_{540} + 0{,}0162}{0{,}1987} \qquad (\mathbf{9})$$

Gdje je: c – koncentracija glukoze [mg/0,5 mL]; A_{540} – apsorbancija pri 540 nm [-].

Zbog primjene filter papira kao supstrata, aktivnost celulaze izražava se u jedinicama FPU (*engl. Filter Paper Units*). Aktivnost celulaze određena je metodom filter papira, pri čemu je korišteno razrjeđenje enzimskog ekstrakta koje tijekom 60 min pri 50 °C i pH 4,8 oslobađa reducirajuće šećere u količini ekvivalentnoj 2,0 mg glukoze iz 50 mg filter papira prema **jednadžbi 10**.

$$\frac{\text{FPU}}{\text{mL}} = \frac{0{,}37}{V_\text{e}} \qquad (\mathbf{10})$$

Gdje je: V_e – volumen enzima koji oslobađa 2,0 mg glukoze pod navedenim uvjetima [mL], 0,37 - empirijski faktor.

Aktivnost celulaze izražena je kao volumna aktivnost (**jednadžba 11**) preračunata na masu suhe tvari uzorka (**jednadžba 5**). Specifična aktivnost izračunata je prema **jednadžbi 4**.

$$\text{V. A.} = \frac{\text{mg oslobođene glukoze}/0{,}18016\,\frac{\text{mg}}{\mu\text{mol}}}{0{,}5\ \text{mL uzorka} \times 60\ \text{min}} \qquad (\mathbf{11})$$

3.3.3.6. Mjerenje aktivnosti lakaze i mangan-peroksidaze

Aktivnost lakaze i mangan-peroksidaze određena je prema metodi Lueangjaroenkit i sur. (2020), koja se temelji na enzimski kataliziranoj oksidaciji 2,6-dimetoksifenola (DMP) uz nastajanje 2,2′,6,6′-tetrametoksidibenzo-1,1′-dikinona, čije je stvaranje praćeno spektrofotometrijskim mjerenjem porasta apsorbancije pri 469 nm.

RADNA VERZIJA

Za mjerenje aktivnosti lakaze pripremljena je reakcijska smjesa od 800 µL natrij-malonatnog pufera (50 mM, pH 4,5), 100 µL otopine DMP-a (1 mM) i 100 µL sirovog enzimskog ekstrakta. Apsorbancija je mjerena pri 469 nm tijekom 120 s, a nagib pravca promjene apsorbancije u vremenu (d*A*/d*t*) primijenjen je za izračun volumne aktivnosti lakaze. Volumna aktivnost lakaze izračunata je prema **jednadžbi 12**, pri čemu je za izračun korišten molarni ekstinkcijski koeficijent reakcijskog produkta nastalog oksidacijom 2,6-dimetoksifenola pri 469 nm (ε_{469} = 0,0496 L/µmol cm).

$$\text{V.A.} = \frac{V_r}{\varepsilon \times l \times V_\text{e}} \times \frac{\text{d}A}{\text{d}t} \qquad (\mathbf{12})$$

Gdje je: V.A. – volumna aktivnost enzima [U/L][6]; V_r – ukupni volumen reakcijske smjese [mL], V_e – volumen sirovog ekstrakta enzima [mL], ε – ekstinkcijski koeficijent [L/µmol cm], l – duljina optičkog puta kroz kivetu [1 cm], d*A*/d*t* – promjena apsorbancije u vremenu (nagib pravca) [1/min].

Za određivanje ukupne aktivnosti lakaze i mangan-peroksidaze reakcijska smjesa sadržavala je 640 µL 50 mM natrij-malonatnog pufera (pH 4,5), 100 µL 1 mM otopine manganova(II) sulfata, 100 µL 1 mM otopine DMP-a, 100 µL sirovog ekstrakta enzima i 60 µL 0,1 mM vodikova peroksida. Promjena apsorbancije pri 469 nm praćena je tijekom 120 s, a volumna aktivnost izračunata je prema **jednadžbi 12**. Aktivnost mangan-peroksidaze određena je kao razlika između ukupne aktivnosti enzima (lakaza + mangan-peroksidaza) i aktivnosti lakaze.

Specifična aktivnost te aktivnost lakaze i mangan-peroksidaze preračunate na masu suhe tvari izračunate su primjenom **jednadžbi 4** i **5**.

3.3.3.7. Mjerenje aktivnosti lignin-peroksidaze

Aktivnost lignin-peroksidaze određena je prema Field i sur. (1996) te Linko i Haapala (1993), praćenjem oksidacije veratrilnog alkohola u veratraldehid uz prisutnost vodikova peroksida. Nastajanje veratraldehida određeno je porastom apsorbancije pri 310 nm.

[6] Jedinica enzimske aktivnosti (U) definira se kao količina enzima koja katalizira oksidaciju 1 µmol supstrata u jednoj minuti, pri definiranim uvjetima reakcije.

RADNA VERZIJA

Za analizu je pripremljena reakcijska smjesa od 860 µL otopine veratrilnog alkohola (2 mM) u natrij-tartaratnom puferu (50 mM, pH 3,0), 100 µL sirovog enzimskog ekstrakta i 40 µL otopine vodikova peroksida (0,4 mM). Dodatkom vodikova peroksida započeta je reakcija, a apsorbancija je odmah praćena pri 310 nm tijekom 120 s na sobnoj temperaturi. Iz promjene apsorbancije u vremenu (d*A*/d*t*) izračunana je volumna aktivnost lignin-peroksidaze. Volumna aktivnost lignin-peroksidaze izračunata je prema **jednadžbi 12**, pri čemu je za izračun korišten molarni ekstinkcijski koeficijent reakcijskog produkta pri 310 nm (ε_{310} = 0,0093 L/µmol cm). Specifična aktivnost te aktivnost lignin-peroksidaze preračunate na masu suhe tvari izračunate su primjenom **jednadžbi 4** i **5**.

3.3.3.8. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina određena je Bradfordovom metodom (Bradford, 1976), koja se temelji na promjeni apsorpcijskih svojstava boje Coomassie Brilliant Blue G-250 nakon vezanja za proteine u kiselom mediju. Vezanjem boje dolazi do promjene njezina obojenja iz smeđeg u plavo, pri čemu je apsorbancija pri 595 nm proporcionalna koncentraciji proteina. Vezanje boje ponajprije ovisi o prisutnosti bazičnih aminokiselinskih ostataka, osobito arginina, lizina i histidina (Kielkopf i sur., 2020; He, 2011).

Za analizu je pomiješano 100 µL sirovog enzimskog ekstrakta i 2,0 mL Bradfordova reagensa, prethodno razrijeđenog destiliranom vodom u omjeru 1 : 4. Slijepa proba pripremljena je s 100 µL odgovarajućeg ekstrakcijskog pufera umjesto enzimskog ekstrakta, uz dodatak 2,0 mL razrijeđenog Bradfordova reagensa. Nakon 5 min inkubacije na sobnoj temperaturi izmjerena je apsorbancija pri 595 nm u odnosu na slijepu probu.

Kalibracijska krivulja izrađena je korištenjem standardnih otopina goveđeg serumskog albumina (BSA) pripremljenih u destiliranoj vodi u rasponu od 0,1 do 0,6 mg/mL. Mjerenja su provedena u tri paralelna ponavljanja, a koncentracija proteina određena je iz izmjerene apsorbancije pri 595 nm primjenom odgovarajuće jednadžbe kalibracijske krivulje (**jednadžba 13**).

$$\gamma_{protein} = 0{,}8002 \times A_{595} - 0{,}0628 \qquad (\mathbf{13})$$

Gdje je: $\gamma_{protein}$ - masena koncentracija proteina [mg/mL]; A_{595} – apsorbancija pri 595 nm [-].

RADNA VERZIJA

3.3.4. Djelomično pročišćavanje sirovog ekstrakta ksilanaze iz *Thermomyces lanuginosus*

Sirovi ekstrakt ksilanaze iz *T. lanuginosus*, osim ciljnog enzima, sadrži i brojne proteinske te neproteinske komponente podrijetlom iz gljive i supstrata. U svrhu povećanja specifične aktivnosti ksilanaze i uklanjanja dijela pratećih nečistoća proveden je postupak djelomičnog pročišćavanja, koji je uključivao liofilizaciju, frakcijsko taloženje amonijevim sulfatom pri različitim stupnjevima zasićenja, odabir frakcije s najvećom specifičnom aktivnošću te njezinu dijalizu. Shematski prikaz postupka djelomičnog pročišćavanja prikazan je na **Slici 12**.

RADNA VERZIJA



Slika 12 Shematski prikaz eksperimentalnog postupka djelomičnog pročišćavanja sirovog ekstrakta ksilanaze proizvedenog fermentacijom na čvrstim nosačima (SSF) primjenom gljive *Thermomyces lanuginosus.*

3.3.4.1. Liofilizacija sirovog ekstrakta ksilanaze iz *Thermomyces lanuginosus*

Sirovi enzimski ekstrakt podvrgnut je sušenju smrzavanjem (liofilizaciji) radi dobivanja stabilnog suhog enzimskog pripravka pogodnog za skladištenje i daljnju primjenu (Javadi i sur., 2021). Za proizvodnju fermentiranog materijala namijenjenog ekstrakciji i djelomičnom pročišćavanju ksilanaze provedena je zasebna desetodnevna SSF u pet paralelnih laboratorijskih staklenki. U svaku je staklenku uneseno 50 g PT3, odnosno ukupno 250 g početnog supstrata. Nakon 10 dana fermentacije sadržaj staklenki objedinjen je te je za ekstrakciju korišteno 50 g dobivenog fermentiranog materijala. Nakon 10 dana fermentacije s

T. lanuginosus, 50 g fermentiranog pivskog tropa (PT3) ekstrahirano je u 200 mL natrij-fosfatnog pufera (pH 6,0) uz kontinuirano miješanje na magnetskoj miješalici pri 600 rpm tijekom 1 h na 25 °C. Nakon 1 h ekstrakcije pri 25 °C čvrsti ostatak uklonjen je filtracijom kroz pamučnu gazu (Tosama d.o.o., Domžale, Slovenija). Filtrat je centrifugiran pri 10 000 × *g* tijekom 10 min, a izdvojeni supernatant upotrijebljen je kao sirovi enzimski ekstrakt.

Za liofilizaciju je izdvojeno 100 mL sirovog enzimskog ekstrakta, raspoređeno u Petrijevu zdjelicu i zamrznuto pri −80 °C tijekom 24 h. Uzorak je zatim liofiliziran u dvije faze. Primarno sušenje trajalo je 24 h pri tlaku od 0,250 mbar, a sekundarno 1 h pri tlaku od 0,001 mbar. Liofilizirani enzimski pripravak čuvan je u tamnim staklenim bočicama pri 4 °C do daljnje uporabe.

3.3.4.2. Taloženje amonijevim sulfatom

Prije djelomičnog pročišćavanja liofilizirani ekstrakt ksilanaze rekonstituiran je u 0,1 M natrij-fosfatnom puferu (pH 6,0). Masa liofiliziranog pripravka potrebna za rekonstituciju izračunata je proporcionalno ukupnoj masi dobivenog liofilizata i početnom volumenu sirovog ekstrakta (100 mL), prema **jednadžbi 14**.

$$m = \frac{m_{\mathrm{L}}}{V_L} \times V_{\mathrm{R}} \qquad (\mathbf{14})$$

Gdje je: m – masa liofiliziranog ekstrakta potrebna za rekonstituciju [g]; m_{L} – ukupna masa dobivenog liofilizata (g); V_{L} – početni volumen sirovog ekstrakta podvrgnutog liofilizaciji [100 mL]; V_{R} – volumen rekonstituiranog ekstrakta [mL].

Rekonstitucija je provedena tako da je količina liofilizata u pripremljenom volumenu odgovarala ekvivalentnoj količini početnog sirovog enzimskog ekstrakta, čime je omogućena usporedba enzimske aktivnosti prije i nakon liofilizacije. Rekonstituirani pripravak u nastavku rada označen je kao sirovi ksilanazni pripravak (SE).

Djelomično pročišćavanje SE provedeno je metodom taloženja amonijevim sulfatom, koja se temelji na smanjenju topljivosti proteina pri povećanju ionske jakosti otopine (engl. *„salting-out*“). Budući da se pojedini proteini talože pri različitim stupnjevima zasićenja amonijevim sulfatom, navedena metoda omogućuje njihovu djelomičnu separaciju i istodobno koncentriranje enzimskog pripravka. Radi određivanja optimalnog stupnja zasićenja za taloženje ksilanaze, pripremljeni su zasebni alikvoti SE, volumena 2 mL. Svaki alikvot

RADNA VERZIJA

neovisno je podvrgnut taloženju pri 30, 40, 50, 60, 70 i 80 % zasićenja amonijevim sulfatom, pri čemu za svaki ispitivani stupanj zasićenja nije provedeno uzastopno frakcioniranje istog uzorka, već zasebno taloženje. Potrebna masa čvrstog amonijeva sulfata za postizanje pojedinog stupnja zasićenja određena je prema tabličnim vrijednostima Green i Hughes (1955), koje izražavaju masu amonijeva sulfata potrebnu za postizanje željenog stupnja zasićenja u 1 L otopine pri 25 °C. Budući da je početni volumen svakog uzorka iznosio 2 mL, tablične vrijednosti proporcionalno su preračunate prema **jednadžbi 15**.

$$m_{AS} = a_{AS} \times V \quad (\mathbf{15})$$

Gdje je: m_{AS} – masa amonijeva sulfata koju je potrebno dodati uzorku [g]; a_{AS} – tablična vrijednost mase amonijeva sulfata za željeni stupanj zasićenja [g/L]; V – početni volumen uzorka [L].

Definirana masa amonijeva sulfata postupno je dodavana u svaki alikvot SE uz kontinuirano miješanje do potpunog otapanja soli. Nakon dodatka amonijeva sulfata uzorci su inkubirani pri 4 °C tijekom 24 h kako bi se omogućilo potpuno taloženje proteinskih frakcija. Po završetku inkubacije uzorci su centrifugirani pri 10 000 × g tijekom 10 min, pri čemu su odvojeni supernatant i proteinski talog. Supernatant je pažljivo dekantiran, dok je taložena proteinska frakcija resuspendirana u 300 µL 0,1 M natrij-fosfatnog pufera (pH 6,0). Aktivnost ksilanaze određena je u supernatantu i resuspendiranoj proteinskoj frakciji primjenom DNS metode, kako je opisano u poglavlju **3.3.3.2.**, dok je koncentracija proteina određena prema postupku opisanom u poglavlju **3.3.3.8**.

Nakon određivanja aktivnosti ksilanaze i koncentracije proteina u svim frakcijama izračunati su ukupna enzimska aktivnost, ukupna količina proteina, specifična aktivnost (**jednadžba 4**), stupanj pročišćavanja i iskorištenje enzimske aktivnosti.

Ukupna enzimska aktivnost određena je kao umnožak izmjerene aktivnosti enzima i volumena odgovarajuće frakcije prema **jednadžbi 16**.

$$\mathrm{A} = \mathrm{V.A.} \times V \quad (\mathbf{16})$$

Gdje je: A – ukupna enzimska aktivnost [U]; V.A. – enzimska aktivnost [U/mL]; V – volumen frakcije [mL].

Ukupna količina proteina određena je kao umnožak koncentracije proteina i volumena odgovarajuće frakcije prema **jednadžbi 17**.

$$\mathrm{P} = \gamma_{protein} \times V \quad (\mathbf{17})$$

RADNA VERZIJA

Gdje je: P – ukupna količina proteina [mg]; $\gamma_{protein}$ – koncentracija proteina [mg/mL]; V – volumen frakcije [mL].

Stupanj pročišćavanja izračunat je kao omjer specifične aktivnosti određene frakcije i specifične aktivnosti SE prema **jednadžbi 18**.

$$\mathrm{SP} = \frac{S.A._1}{S.A._0} \quad (\mathbf{18})$$

Gdje je: SP – stupanj pročišćavanja, $S.A._0$ – specifična aktivnost sirovog ekstrakta [U/mg]; $S.A._1$ – specifična aktivnost promatrane frakcije [U/mg].

Iskorištenje enzimske aktivnosti određeno je kao omjer ukupne enzimske aktivnosti određene frakcije i ukupne enzimske aktivnosti SE, izražen u postotku, prema **jednadžbi 19**.

$$\mathrm{I} = \frac{\mathrm{A_1}}{\mathrm{A_0}} \times 100 \quad (\mathbf{19})$$

Gdje je: I – iskorištenje enzimske aktivnosti [%]; A_0 – ukupna enzimska aktivnost sirovog ekstrakta [U]; A_1 – ukupna enzimska aktivnost određene frakcije [U].

Proteinska frakcija dobivena taloženjem pri 50 % zasićenja amonijevim sulfatom, koja je imala najveću specifičnu aktivnost ksilanaze, resuspendirana je u 300 µL 0,1 M natrij-fosfatnog pufera (pH 6,0) te podvrgnuta dijalizi radi uklanjanja zaostalog amonijevog sulfata i drugih niskomolekulskih komponenata. Dijaliza je provedena korištenjem dijalizne vrećice (engl. *Dialysis Sacks*, MWCO 14 kDa, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD). Dijaliza je provedena tijekom 24 h pri 25 °C u tri uzastopna volumena od po 500 mL 0,1 M natrij-fosfatnog pufera (pH 6,0), uz kontinuirano miješanje pufera na magnetskoj miješalici. Nakon završetka dijalize dobiven je djelomično pročišćeni ksilanazni pripravak (PP), koji je korišten u svim daljnjim analizama.

3.3.5. Karakterizacija sirovog i djelomično pročišćenog ksilanaznog pripravka iz *Thermomyces lanuginosus*

Nakon rekonstitucije liofiliziranog ekstrakta i djelomičnog pročišćavanja enzimskog pripravka provedena je karakterizacija SE i PP iz *T. lanuginosus* radi određivanja njihovih katalitičkih svojstava i stabilnosti u različitim reakcijskim uvjetima.

U sklopu karakterizacije ispitana je stabilnost SE i PP tijekom skladištenja (poglavlje **3.3.5.1.**), stabilnost pri različitim temperaturama (poglavlje **3.3.5.2.**) i pH vrijednostima (poglavlje

RADNA VERZIJA

3.3.5.3.), kao i utjecaj temperature (poglavlje **3.3.5.4.**) i pH vrijednosti (poglavlje **3.3.5.5.**) na aktivnost enzima.

3.3.5.1. Stabilnost sirovog i djelomično pročišćenog ksilanaznog pripravka tijekom skladištenja

Rekonstituirani sirovi ksilanazni pripravak (SE) i djelomično pročišćeni ksilanazni pripravak (PP) skladišteni su pri −20 °C. Enzimska aktivnost određivana je 0., 7., 14., 21., 30., 45. i 60. dana primjenom standardne metode za određivanje aktivnosti ksilanaze opisane u poglavlju **3.3.3.2**. Dobiveni rezultati izraženi su kao relativna aktivnost enzima (%) u odnosu na početnu aktivnost pojedinog pripravka određenu na početku eksperimenta (0. dan), koja je definirana kao 100 %, prema **jednadžbi 20**.

$$\text{R. A.} = \frac{\text{V. A.}_t}{\text{V. A.}_0} \times 100 \qquad (\mathbf{20})$$

Gdje je: R.A. – relativna aktivnost [%]; V.A.$_t$ – aktivnost enzima nakon određenog vremena skladištenja [U/mL]; V.A.$_0$ – početna aktivnost enzima određena 0. dana [U/mL]. Sva mjerenja provedena su u tri paralelna ponavljanja, a rezultati su izraženi kao srednja vrijednost.

3.3.5.2. Termostabilnost sirovog i djelomično pročišćenog ksilanaznog pripravka

Termostabilnost SE i PP ispitana je određivanjem preostale enzimske aktivnosti nakon predinkubacije pri različitim temperaturama. Enzimski pripravci inkubirani su bez dodatka supstrata pri 35, 45, 55, 65, 75, 85 i 95 °C tijekom 60 min, nakon čega je određena preostala aktivnost ksilanaze primjenom standardne metode opisane u poglavlju **3.3.3.2.**, pri standardnim reakcijskim uvjetima određivanja aktivnosti. Rezultati su izraženi kao relativna preostala enzimska aktivnost (%) u odnosu na početnu aktivnost odgovarajućeg enzimskog pripravka, određenu prije predinkubacije pri standardnim uvjetima mjerenja aktivnosti ksilanaze i definiranu kao 100 %, prema **jednadžbi 21**.

$$\text{R. A.} = \frac{\text{V. A.}_t}{\text{V. A.}_0} \times 100 \qquad (\mathbf{21})$$

Gdje je: R.A. – relativna aktivnost [%]; V.A.$_t$ – volumna aktivnost određenog pripravka nakon inkubacije pri određenoj temperaturi [U/mL]; V.A.$_0$ – početna volumna aktivnost odgovarajućeg pripravka određena prije predinkubacije pri standardnim uvjetima mjerenja

RADNA VERZIJA

aktivnosti ksilanaze [U/mL]. Sva mjerenja provedena su u tri paralelna ponavljanja, a rezultati su izraženi kao srednja vrijednost.

3.3.5.3. pH-stabilnost sirovog i djelomično pročišćenog ksilanaznog pripravka

pH-stabilnost SE i PP određena je praćenjem preostale enzimske aktivnosti nakon predinkubacije pri različitim pH vrijednostima. Enzimski pripravci inkubirani su tijekom 60 min pri 4 °C u puferima pH vrijednosti od 3,0 do 8,0. Za pripremu otopina različitih pH vrijednosti korišteni su 0,1 M natrij-citratni pufer (pH 3,0–5,0) i 0,1 M natrij-fosfatni pufer (pH 6,0–8,0). Nakon završetka predinkubacije određena je preostala aktivnost ksilanaze primjenom standardne metode opisane u poglavlju **3.3.3.2**.

Rezultati su izraženi kao relativna preostala enzimska aktivnost (%) u odnosu na početnu aktivnost odgovarajućeg enzimskog pripravka, određenu prije predinkubacije pri standardnim uvjetima mjerenja aktivnosti ksilanaze i definiranu kao 100 %, prema **jednadžbi 21**. Sva mjerenja provedena su u tri paralelna ponavljanja, a rezultati su izraženi kao srednja vrijednost.

0,1 M natrij-citratni pufer (pH 3,0–5,0)

Natrij-citratni puferi koncentracije 0,1 M i pH vrijednosti 3,0, 4,0 i 5,0 pripremljeni su otapanjem odgovarajućih masa citratne kiseline monohidrata i natrijeva citrata dihidrata u demineraliziranoj vodi do konačnog volumena od 100 mL. Mase korištene za pripremu pufera prikazane su u **Tablici 4**.

Tablica 4 Sastav 0,1 M natrij-citratnih pufera različitih pH vrijednosti

pH vrijednost	$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ [g]	$Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ [g]	Volumen [mL]
3,0	1,72	0,53	100
4,0	1,24	1,21	100
5,0	0,74	1,91	100

0,1 M natrij-fosfatni pufer (pH 6,0–8,0)

RADNA VERZIJA

Priprema 0,1 M natrij-fosfatnog pufera pH 6,0 opisana je u poglavlju **3.3.2.2**. Natrij-fosfatni puferi pH vrijednosti 7,0 i 8,0 pripremljeni su prema istom postupku miješanjem odgovarajućih volumena 0,2 M otopine natrijeva fosfata monobaznog monohidrata (otopina A), i 0,2 M otopine bezvodnog natrijeva fosfata dibaznog (otopina B). Volumeni osnovnih otopina korišteni za pripremu 100 mL pufera prikazani su u **Tablici 5**.

Tablica 5 Sastav 0,1 M natrij-fosfatnih pufera različitih pH vrijednosti

pH vrijednost	Otopina A: 0,2 M $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ [mL]	Otopina B: 0,2 M Na_2HPO_4 [mL]	Volumen [mL]
6,0	44,29	5,71	100
7,0	21,84	28,16	100
8,0	3,60	46,40	100

3.3.5.4. Ovisnost aktivnosti sirovog i djelomično pročišćenog ksilanaznog pripravka o temperaturi

Ovisnost aktivnosti SE i PP o temperaturi određena je mjerenjem enzimske aktivnosti pri 35, 45, 55, 65, 75, 85 i 95 °C. Za svaku ispitivanu temperaturu reakcijska smjesa inkubirana je pri odgovarajućoj temperaturi, dok su ostali uvjeti određivanja aktivnosti bili jednaki onima opisanim u poglavlju **3.3.3.2**. Enzimska aktivnost izražena je kao volumna aktivnost enzima (U/mL), a optimalna temperatura definirana je kao temperatura pri kojoj je izmjerena najveća enzimska aktivnost. Sva mjerenja provedena su u tri paralelna ponavljanja, a rezultati su izraženi kao srednja vrijednost.

3.3.5.5. Ovisnost aktivnosti sirovog i djelomično pročišćenog ksilanaznog pripravka o pH vrijednosti

Ovisnost aktivnosti SE i PP o pH vrijednosti određena je mjerenjem volumne aktivnosti enzima pri pH 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0 i 8,0. Za pripremu reakcijskih smjesa korišteni su 0,1 M natrij-citratni pufer (pH 3,0–5,0) i 0,1 M natrij-fosfatni pufer (pH 6,0–8,0). Kao supstrat korištena je 1 %-tna otopina arabinoksilana pripremljena u odgovarajućem puferu željene pH vrijednosti. Za svaku ispitivanu pH vrijednost enzimska reakcija provedena je primjenom standardne metode za određivanje aktivnosti ksilanaze opisane u poglavlju **3.3.3.2**., pri čemu su svi ostali reakcijski uvjeti bili jednaki. Aktivnost enzima izražena je kao volumna aktivnost (U/mL), a

RADNA VERZIJA

optimalna pH vrijednost određena je kao pH pri kojem je izmjerena najveća volumna aktivnost. Sva mjerenja provedena su u tri paralelna ponavljanja, a rezultati su izraženi kao srednja vrijednost.

3.3.5.6. SDS-PAGE analiza ksilanaznih pripravaka iz *Thermomyces lanuginosus*

Proteinski profil komercijalne ksilanaze (C), proteinske frakcije dobivene taloženjem amonijevim sulfatom prije dijalize, djelomično pročišćenog ksilanaznog pripravka nakon dijalize (PP) i sirovog ksilanaznog pripravka (SE) analiziran je denaturirajućom elektroforezom u poliakrilamidnom gelu u reducirajućim uvjetima uz prisutnost natrijeva dodecil-sulfata (SDS-PAGE). Elektroforeza je provedena u Mini Gel Tank sustavu primjenom prethodno lijevanog 16 %-tnog Novex Tris-Glycine poliakrilamidnog gela (WedgeWell format, 10 jažica, debljina gela 1,0 mm). Za pripremu uzoraka pomiješano je 10 µL odgovarajućeg enzimskog pripravka, 20 µL 2 × Tris-Glycine SDS pufera za uzorke, 4 µL 10 x reducirajućeg sredstva i 6 µL ultračiste vode, čime je dobiven konačni volumen od 40 µL. Pripremljene smjese inkubirane su pri 85 °C tijekom 10 min, nakon čega su ohlađene na sobnu temperaturu. U prvu jažicu gela naneseno je 40 µL prethodno obojenog proteinskog markera molekulskih masa u rasponu od 10 do 250 kDa, dok je u sljedeće četiri jažice naneseno po 40 µL pripremljenih uzoraka C, proteinske frakcije nakon taloženja amonijevim sulfatom prije dijalize, PP i SE. Radni pufer za elektroforezu pripremljen je deseterostrukim razrjeđivanjem 10 × Tris-Glycine SDS pufera ultračistom vodom do konačne koncentracije 1 x. Nakon postavljanja gela u elektroforetski sustav unutarnja i vanjska komora napunjene su radnim puferom, a elektroforetsko razdvajanje proteina provedeno je pri konstantnom naponu od 200 V tijekom 35 min. Po završetku elektroforeze gel je pažljivo izdvojen iz zaštitne kazete te uronjen u otopinu za bojenje pripremljenu otapanjem 0,1 g Coomassie Brilliant Blue G-250 u 50 mL metanola, 7 mL 10 %-tne (v/v) vodene otopine ledene octene kiseline i 43 mL ultračiste vode. Bojenje je provedeno tijekom 1 h pri sobnoj temperaturi uz kontinuirano lagano miješanje. Nakon bojenja gel je obezbojen u ultračistoj vodi tijekom 24 h uz višestruku izmjenu vode i miješanje.

Prividna molekulska masa proteinskih vrpci procijenjena je na temelju njihove relativne elektroforetske pokretljivosti u odnosu na proteinski marker poznatih molekulskih masa.

RADNA VERZIJA

3.3.6. Enzimska hidroliza lignoceluloznih materijala primjenom ksilanaznih pripravaka iz *Thermomyces lanuginosus*

Za ispitivanje učinkovitosti različitih ksilanaznih pripravaka provedena je hidroliza triju lignoceluloznih supstrata: RR, PT3 i PK, primjenom C, SE i PP. Prije provedbe hidrolize svi su supstrati osušeni i samljeveni do veličine čestica ≤ 1 mm.

Reakcije hidrolize provedene su u termomikseru pri 50 °C tijekom 24 h uz miješanje pri 700 rpm. U svaku reakcijsku smjesu dodano je 0,1000 g odgovarajućeg lignoceluloznog supstrata, pri čemu je ukupni volumen reakcijske smjese iznosio 5,0 mL. Količina pojedinog enzimskog pripravka prilagođena je njegovoj prethodno određenoj volumnoj aktivnosti tako da je nominalna volumna aktivnost ksilanaze u reakcijskoj smjesi iznosila približno 300 U/mL. Aktivnost korištena za izračun doze određena je standardnom metodom pri 65 °C, dok je hidroliza provedena pri 50 °C. Volumen pojedinog enzimskog pripravka potreban za postizanje željene volumne aktivnosti izračunat je prema **jednadžbi 22**.

$$V_e = \frac{\mathrm{V.A._r} \times V_\mathrm{r}}{\mathrm{V.A._e}} \qquad (\mathbf{22})$$

Gdje je: V_e – volumen enzimskog pripravka dodan u reakcijsku smjesu [mL], $\mathrm{V.A._r}$ – željena volumna aktivnost u reakcijskoj smjesi [U/mL], V_r – ukupni volumen reakcijske smjese [mL], $\mathrm{V.A._e}$ – volumna aktivnost enzimskog pripravka [U/mL].

Količina dodanog enzima izražena u U/g suhe tvari supstrata određena je za svaki lignocelulozni supstrat zasebno na temelju ostvarene volumne aktivnosti ksilanaze u reakcijskoj smjesi, ukupnog volumena reakcijske smjese, mase dodanog supstrata i njegova udjela suhe tvari, prema **jednadžbi 23**.

$$\mathrm{E} = \frac{\mathrm{V.A._r} \times V_\mathrm{r}}{m \times \mathrm{s.t.}} \qquad (\mathbf{23})$$

Gdje je: E – količina dodanog enzima [U/g suhe tvari supstrata]; $\mathrm{V.A._r}$ – ostvarena volumna aktivnost ksilanaze u reakcijskoj smjesi [U/mL]; V_r – ukupni volumen reakcijske smjese [mL]; m – masa lignoceluloznog supstrata dodana u reakcijsku smjesu [g]; s.t. – udio suhe tvari lignoceluloznog supstrata [g/g].

Po završetku 24-satne hidrolize reakcijske smjese centrifugirane su pri 10 000 × g tijekom 5 min. Iz dobivenih supernatanata odmah su uzeti alikvoti za određivanje koncentracije

RADNA VERZIJA

reducirajućih šećera primjenom metode s 3,5-dinitrosalicilnom kiselinom (DNS), opisane u odjeljku **3.3.7.4.2.** Kao kontrolne probe korištene su reakcijske smjese koje su sadržavale lignocelulozni supstrat i pufer bez dodatka enzima te reakcijske smjese koje su sadržavale odgovarajući enzimski pripravak i pufer bez dodatka supstrata, kako bi se u obzir uzeo doprinos reducirajućih šećera koji potječu od samog supstrata odnosno enzimskog pripravka. Za svaku kombinaciju lignoceluloznog supstrata i enzimskog pripravka provedene su tri neovisne reakcije. Neto količina reducirajućih šećera oslobođenih tijekom hidrolize izračunata je oduzimanjem koncentracija reducirajućih šećera određenih u odgovarajućim kontrolnim probama od koncentracije reducirajućih šećera određene u hidroliziranom uzorku. Rezultati su izraženi kao mg ekvivalenata glukoze po gramu suhe tvari lignoceluloznog supstrata te su izračunati prema **jednadžbi 24**.

$$\mathrm{RS} = \frac{(c_\mathrm{u} - c_\mathrm{k} - c_\mathrm{e}) \times V_\mathrm{r}}{m \times \mathrm{s.t.}} \qquad (\mathbf{24})$$

Gdje je: RS – količina oslobođenih reducirajućih šećera [mg ekvivalenata glukoze/g suhe tvari biomase]; c_u – koncentracija reducirajućih šećera određena u hidroliziranom uzorku [mg/mL]; c_k – koncentracija reducirajućih šećera određena u kontrolnoj probi koja sadrži lignocelulozni supstrat i pufer bez enzima [mg/mL]; c_e – koncentracija reducirajućih šećera određena u kontrolnoj probi koja sadrži enzimski pripravak i pufer bez supstrata [mg/mL]; V_r – ukupni volumen reakcijske smjese [mL]; m – masa lignoceluloznog supstrata dodana u reakcijsku smjesu [g]; s.t. – udio suhe tvari lignoceluloznog supstrata [g/g].

3.3.7. Analiza kemijskog sastava sirovog i fermentiranog pivskog tropa

U svrhu procjene promjena kemijskog sastava i svojstava pivskog tropa prije i nakon fermentacije provedena je analiza sirovog i fermentiranog materijala. Metode primijenjene za određivanje pojedinih parametara kemijskog sastava opisane su u odjeljcima **3.3.7.1.**–**3.3.7.9**.

3.3.7.1. Udio suhe tvari

Udio suhe tvari određen je termogravimetrijskom metodom pomoću analizatora vlage s radijacijsko-infracrvenim sustavom zagrijavanja. Na aluminijsku posudicu odvagano je 1,0000 g homogeniziranog uzorka, a mjerenje je provedeno pri 105 °C. Za automatski završetak analize

RADNA VERZIJA

korišten je kriterij isključivanja 3 (engl. switch-off criterion 3), pri kojem je mjerenje završeno nakon što je promjena mase uzorka bila manja od 1 mg tijekom 50 s.

3.3.7.2. Udio pepela

Udio pepela određen je gravimetrijski prema AOAC (1995b), uz prilagodbu trajanja žarenja. U prethodno žarene, ohlađene i izvagane porculanske lončiće dodano je po 2,00 g uzorka. Žarenje je provedeno u mufolnoj peći pri 600 °C tijekom 4 h. Nakon žarenja lončići su ohlađeni u eksikatoru do sobne temperature i ponovno izvagani. Udio pepela izračunan je iz mase preostalog anorganskog ostatka prema **jednadžbi 25**.

$$w_{\text{pepeo}} = \frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1} \times 100 \qquad (\mathbf{25})$$

Gdje je: w_{pepeo} – maseni udio pepela [%], m_1 – masa praznog lončića [g], m_2 – masa lončića s uzorkom prije žarenja [g], m_3 – masa lončića s pepelom nakon žarenja [g]. Maseni udio pepela, izražen na suhu tvar, izračunat je prema **jednadžbi 26**.

$$w_{\text{pepeo,s.t.}} = \frac{w_{\text{ pepeo}}}{w_{\text{s.t.}}} \times 100 \qquad (\mathbf{26})$$

Gdje je: $w_{\text{pepeo,s.t.}}$ - maseni udio pepela izražen na suhu tvar [%$_{\text{s.t.}}$]; w_{pepeo} – maseni udio pepela [%]; $w_{\text{s.t.}}$ – udio suhe tvari u uzorku [%].

3.3.7.3. Lignocelulozni sastav

Maseni udjeli neutralnih detergent vlakana (NDF), kiselih detergent vlakana (ADF) i kiselog detergent lignina (ADL) određeni su prema metodi Goeringa i Van Soesta (1970) primjenom analizatora vlakana. Na temelju dobivenih vrijednosti izračunani su maseni udjeli hemiceluloze, celuloze i lignina.

U prethodno osušene, ohlađene i izvagane filtracijske gučeve dodan je 1,0 g celita, nakon čega je odvagano 1,0 g homogeniziranog uzorka. Za određivanje NDF-a uzorku je dodano 0,5 g natrijeva sulfita, 100 mL neutralne detergentne otopine te dvije do tri kapi *n*-oktanola radi sprječavanja prekomjernog stvaranja pjene tijekom zagrijavanja. Uzorci su zagrijani do vrenja i refluksirani tijekom 60 min. Po završetku ekstrakcije ostatak je filtriran, ispiran kipućom

RADNA VERZIJA

destiliranom vodom i acetonom te sušen pri 105 °C tijekom 24 h. Nakon sušenja filtracijski lončići ohlađeni su u eksikatoru do sobne temperature i izvagani. Određivanje ADF-a provedeno je na ostatku dobivenom nakon NDF analize. Ostatku je dodano 100 mL kisele detergentne otopine i nekoliko kapi *n*-oktanola, nakon čega su uzorci refluksirani tijekom 60 min. Po završetku ekstrakcije ostatak je filtriran, ispiran kipućom destiliranom vodom i acetonom, sušen pri 105 °C tijekom 24 h, ohlađen u eksikatoru do sobne temperature te izvagan. Za određivanje ADL-a ostatku dobivenom nakon ADF analize dodano je 25 mL 72 %-tne sumporne kiseline. Uzorci su inkubirani tijekom 3 h pri sobnoj temperaturi uz povremeno miješanje radi osiguravanja ravnomjernog kontakta uzorka s kiselinom i potpune hidrolize celulozne frakcije. Nakon inkubacije ostatak je ispiran kipućom destiliranom vodom do neutralne reakcije, sušen pri 105 °C tijekom 24 h, ohlađen u eksikatoru i izvagan. Korekcija udjela ADL-a na mineralni ostatak provedena je žarenjem ostatka u mufolnoj peći pri 550 °C tijekom 2 h. Nakon žarenja filtracijski gučevi ohlađeni su u eksikatoru do sobne temperature i ponovno izvagani.

Maseni udjeli NDF-a, ADF-a i ADL-a izraženi su na suhu tvar uzorka. Masa suhe tvari analiziranog uzorka izračunana je prema **jednadžbi 27**.

$$m_{\text{s.t.}} = m_{\text{uz.}} \times \frac{w_{\text{s.t.}}}{100} \qquad (\mathbf{27})$$

Gdje je: $m_{\text{s.t.}}$ - masa suhe tvari uzorka [g]; $m_{\text{uz.}}$ - masa uzorka [g]; $w_{\text{s.t.}}$ - udio suhe tvari u uzorku [%].

Maseni udjeli NDF-a, ADF-a i ADL-a izračunati su prema **jednadžbama 28 i 29**.

$$w_{\text{NDF,ADF,s.t.}} = \frac{m_1}{m_{\text{s.t.}}} \times 100 \qquad (\mathbf{28})$$

$$w_{\text{ADL,s.t.}} = \frac{m_1 - m_2}{m_{\text{s.t.}}} \times 100 \qquad (\mathbf{29})$$

RADNA VERZIJA

Gdje je: m_1 - masa ostatka nakon sušenja [g]; m_2 - masa ostatka nakon žarenja [g]; $m_{s.t.}$ - masa suhe tvari uzorka [g].

Udio hemiceluloze izračunan je oduzimanjem ADF-a od NDF-a, dok je udio celuloze dobiven oduzimanjem ADL-a od ADF-a. Udio lignina odgovarao je vrijednosti ADL-a.

3.3.7.4. Pojedinačni šećeri i ukupni reducirajući šećeri

Za analizu pojedinačnih i ukupnih reducirajućih šećera pripremljeni su vodeni ekstrakti sirovog i fermentiranog pivskog tropa. U 1,00 g osušenog i samljevenog uzorka dodano je 25 mL demineralizirane vode. Ekstrakcija je provedena u vodenoj kupelji s tresilicom pri 30 °C i 170 rpm tijekom 30 min. Uzorci su zatim centrifugirani pri 10 000 × *g* tijekom 10 min, a izdvojeni supernatanti korišteni su za analizu šećera (Bucić-Kojić i sur., 2023). Ekstrakcija je provedena u dvije paralelne probe.

3.3.7.4.1. Analiza pojedinačnih šećera UHPLC metodom

Pojedinačni šećeri (saharoza, glukoza, ksiloza i riboza) određeni su metodom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti (UHPLC) uz detekciju detektorom indeksa loma (RID), prema metodi Martinović i sur. (2023). Kromatografsko razdvajanje provedeno je primjenom kolona Aminex® HPX-87H (300 × 7,8 mm; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, SAD) i Nucleogel® Sugar Pb VA (300 × 7,8 mm; Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Njemačka). Saharoza, ksiloza i riboza određene su na koloni Aminex® HPX-87H uz 5 mM sumpornu kiselinu kao mobilnu fazu, dok je glukoza određena na koloni Nucleogel® Sugar Pb VA uz ultračistu vodu kao mobilnu fazu. Identifikacija pojedinačnih šećera provedena je usporedbom retencijskih vremena sa standardnim otopinama, dok je njihova kvantifikacija provedena primjenom odgovarajućih baždarnih krivulja. Kromatografski podaci obrađeni su u programu LabSolutions (verzija 5.87), a dobivene masene koncentracije pojedinačnih šećera u ekstraktima preračunate su u njihove masene udjele, izražene kao mg/g suhe tvari uzorka, prema **jednadžbi 30.**

$$c_{\text{šećer}} = \frac{\gamma_{\text{šećer}} \times V}{m_{\text{s.t.}}} \qquad (\mathbf{30})$$

Gdje je: $c_{\text{šećer}}$ - maseni udio pojedinog šećera [mg/g$_{s.t.}$]; $\gamma_{\text{šećer}}$ – masena koncentracija pojedinog šećera u ekstraktu [mg/mL]; V – volumen ekstrakta [mL]; $m_{s.t.}$- masa suhe tvari uzorka [g].

RADNA VERZIJA

3.3.7.4.2. Analiza ukupnih reducirajućih šećera

Ukupni reducirajući šećeri u ekstraktima određeni su spektrofotometrijskom DNS metodom prema Milleru (1959). Metoda se temelji na reakciji reducirajućih šećera s 3,5-dinitrosalicilnom kiselinom pri povišenoj temperaturi, uz nastajanje 3-amino-5-nitrosalicilne kiseline (Jain i sur., 2020). Nastali obojeni produkt omogućuje određivanje koncentracije reducirajućih šećera mjerenjem apsorbancije pri 540 nm.

Za mjerenje je pomiješano 500 µL ekstrakta i 500 µL DNS reagensa. Smjesa je zagrijavana pri 100 °C tijekom 5 min, a zatim hlađena u hladnoj vodi tijekom 10 min. Apsorbancija je određena pri 540 nm uz slijepu probu pripremljenu s demineraliziranom vodom. Masena koncentracija ukupnih reducirajućih šećera izračunana je iz baždarne krivulje glukoze u koncentracijskom rasponu od 0,1 do 0,5 mg/mL, prema **jednadžbi 31**.

$$\gamma_{\mathrm{DNS}} = 0{,}3353 \times A_{540} + 0{,}0211 \qquad (\mathbf{31})$$

Gdje je: γ_{DNS} – koncentracija reducirajućih šećera u ekstraktu [$\mathrm{mg_{ekvivalenata\ glukoze}/mL}$]; A_{540}– apsorbancija uzorka izmjerena pri 540 nm [-].

Koncentracija reducirajućih šećera izražen kao mg ekvivalenata glukoze po gramu suhe tvari uzorka ($\mathrm{mg_{ekvivalenata\ glukoze}/g_{s.t.}}$) izračunat je prema **jednadžbi 32.**

$$c_{DNS} = \frac{\gamma_{\mathrm{DNS}} \times V \times \mathrm{DF}}{m_{\mathrm{s.t.}}} \qquad (\mathbf{32})$$

Gdje je: c_{DNS} - maseni udio reducirajućih šećera [$\mathrm{mg/g_{s.t.}}$]; V - volumen ekstrakta [mL]; DF – faktor razrjeđenja [-]; $m_{\mathrm{s.t.}}$ - masa suhe tvari uzorka [g].

3.3.7.5. Pojedinačni fenolni spojevi, ukupni polifenoli, flavonoidi i proantocijanidini

Za određivanje fenolnih spojeva provedena je ekstrakcija kruto-tekuće prema Šelo i sur. (2022). U tamne laboratorijske staklenke odvagano je 1,000 ± 0,001 g osušenog i usitnjenog uzorka (≤ 1 mm) te dodano 40 mL 50 %-tne vodene otopine etanola (v/v), uz omjer krute i tekuće faze 1 : 40 (w/v). Uzorci su ekstrahirani u vodenoj kupelji s tresilicom pri 80 °C i 200 rpm tijekom 120 min. Nakon ekstrakcije provedeno je centrifugiranje pri 10 000 × *g* tijekom 5 min. Izdvojeni supernatant korišten je za određivanje pojedinačnih fenolnih spojeva (**3.3.7.5.1.**), ukupnih fenolnih spojeva (**3.3.7.5.2.**), ukupnih flavonoida i ostalih fenolnih sastavnica.

RADNA VERZIJA

3.3.7.5.1. Analiza pojedinačnih fenolnih spojeva UHPLC metodom

Pojedinačni fenolni spojevi određeni su metodom reverzno-fazne tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti (UHPLC) s detektorom s nizom fotodioda, prema Bucić-Kojić i sur. (2017). Analizirani su galna, *p*-hidroksibenzojeva, 3,4-dihidroksibenzojeva, vanilinska, siringinska, p-kumarinska, *o*-kumarinska i ferulinska kiselina te katehin, epikatehin, epigalokatehin, procijanidin B1 i kemferol.

Prije analize ekstrakti su filtrirani kroz membranske filtre promjera pora 0,45 µm (Chromafil Xtra PTFE, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Njemačka). Za razdvajanje spojeva korištena je reverzno-fazna kolona Kinetex® C18 core-shell (100 × 4,6 mm; 2,6 µm). Primijenjen je linearni gradijent s mobilnom fazom A, koju je činila 1 %-tna (v/v) vodena otopina octene kiseline, i mobilnom fazom B, sastavljenom od metanola i acetonitrila u omjeru 50 : 50 (v/v). Temperatura kolone iznosila je 30 °C, protok mobilne faze 1,0 mL/min, a volumen injektiranja 20 µL.

Udio mobilne faze B povećavan je s početnih 5 na 30 % tijekom 25 min, zatim na 40 % tijekom 10 min, na 48 % tijekom 5 min, na 70 % tijekom 10 min te na 100 % tijekom završnih 5 min. Nakon 5 min pri 100 % mobilne faze B početni kromatografski uvjeti ponovno su uspostavljeni tijekom 10 min, uz dodatnu ekvilibraciju kolone od 12 min.

Identifikacija fenolnih spojeva temeljila se na usporedbi retencijskih vremena i UV-Vis apsorpcijskih spektara s odgovarajućim standardima analiziranima u jednakim uvjetima. Koncentracije su određene metodom vanjskog standarda na temelju pripadajućih baždarnih krivulja. Hidroksibenzojeve kiseline detektirane su pri 252–280 nm, hidroksicimetne kiseline pri 276–277 nm, flavan-3-oli pri 273–277 nm, flavonoli pri 365–370 nm, a procijanidini pri 278 nm. Za obradu kromatografskih podataka korišten je program LabSolutions (verzija 5.87). Maseni udjeli pojedinačnih fenolnih spojeva izraženi su na osnovi suhe tvari uzorka i izračunani prema **jednadžbi 33**.

$$w_{\text{polifenol}} = \frac{\gamma_{\text{polifenol}} \times V_{\text{ekstrakt}} \times \text{DF}}{m_{\text{s.t.}}} \qquad (\mathbf{33})$$

Gdje je: $w_{\text{polifenol}}$ – koncentracija pojedinačnog fenolnog spoja [mg/g$_{\text{s.t.}}$]; $\gamma_{\text{polifenol}}$ – masena koncentracija pojedinačnog fenolnog spoja u ekstraktu [mg/mL]; V_{ekstrakt} – volumen ekstrakta [mL]; DF – faktor razrjeđenja; $m_{\text{s.t.}}$ – masa suhe tvari uzorka [g].

RADNA VERZIJA

Analiza fenolnih spojeva u ekstraktima provedena je u dva paralelna ponavljanja, a vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± SD.

3.3.7.5.2. Analiza ukupnih fenolnih spojeva

Koncentracija ukupnih fenolnih spojeva određena je spektrofotometrijski primjenom Folin–Ciocalteuove metode prema Martinović i sur. (2023). Metoda se temelji na redukciji Folin–Ciocalteuova reagensa, pri čemu nastaje plavo obojenje čiji je intenzitet povezan s koncentracijom fenolnih spojeva u uzorku.

Za analizu je pomiješano 40 µL ekstrakta, 3160 µL redestilirane vode i 200 µL Folin–Ciocalteuova reagensa. Nakon 8 min dodano je 600 µL 20 %-tne vodene otopine natrijeva karbonata. Smjesa je homogenizirana na vrtložnoj miješalici te inkubirana u vodenoj kupelji pri 40 °C tijekom 30 min. Apsorbancija je zatim određena pri 765 nm u odnosu na slijepu probu, u kojoj je umjesto ekstrakta korišteno ekstrakcijsko otapalo. Masena koncentracija ukupnih fenolnih spojeva u ekstraktu određena je iz baždarne krivulje galne kiseline prema **jednadžbi 34**.

$$\gamma_{\mathrm{UP}} = 1{,}0188 \times A_{765} + 0{,}018 \qquad (\mathbf{34})$$

Gdje je: γ_{UP} – masena koncentracija ukupnih fenolnih spojeva u ekstraktu [mg_{GAE}/mL]; A_{765} – apsorbancija izmjerena pri valnoj duljini od 765 nm [-].

Koncentracija ukupnih fenolnih spojeva, izražen kao ekvivalent galne kiseline po gramu suhe tvari uzorka, izračunat je prema **jednadžbi 35**.

$$c_{\mathrm{UP}} = \frac{\gamma_{\mathrm{UP}} \times V_{\mathrm{ekstrakt}} \times \mathrm{DF}}{m_{\mathrm{s.t.}}} \qquad (\mathbf{35})$$

Gdje je: c_{UP} – koncentracija ukupnih fenolnih spojeva [$mg_{GAE}/g_{s.t.}$]; γ_{UP} – masena koncentracija ukupnih fenolnih spojeva u ekstraktu [mg_{GAE}/mL]; $V_{ekstrakt}$ – volumen ekstrakta [mL]; DF – faktor razrjeđenja; $m_{s.t.}$ – masa suhe tvari uzorka [g].

3.3.7.5.3. Analiza ukupnih flavonoida

Koncentracija ukupnih flavonoida određena je spektrofotometrijski prema Martinović i sur. (2023), na temelju nastajanja obojenih kompleksa flavonoida s aluminijevim ionima. Apsorbancija nastalog kompleksa povezana je s koncentracijom flavonoida u uzorku.

RADNA VERZIJA

Za analizu je pomiješano 500 µL ekstrakta, 2 mL destilirane vode i 150 µL 5 %-tne vodene otopine natrijeva nitrita. Nakon 5 min dodano je 150 µL 10 %-tne vodene otopine aluminijeva klorida heksahidrata, a nakon dodatnih 6 min 1 mL natrijeva hidroksida. Smjesa je zatim razrijeđena destiliranom vodom do ukupnog volumena od 10 mL i homogenizirana na vrtložnoj miješalici. Apsorbancija je određena pri 510 nm u odnosu na slijepu probu, u kojoj je ekstrakt zamijenjen destiliranom vodom.

Masena koncentracija ukupnih flavonoida u ekstraktu određena je iz baždarne krivulje (+)-katehina, prema **jednadžbi 36**.

$$\gamma_{\mathrm{UF}} = 0{,}3267 \times A_{510} + 0{,}0056 \qquad (\mathbf{36})$$

Gdje je: γ_{UF} – masena koncentracija ukupnih flavonoida u ekstraktu [mg_{CE}/mL]; A_{510} – apsorbancija izmjerena pri valnoj duljini od 510 nm [-].

Koncentracija ukupnih flavonoida, izražena kao ekvivalent (+)-katehina po gramu suhe tvari uzorka, izračunata je prema **jednadžbi 37**.

$$c_{\mathrm{UF}} = \frac{\gamma_{\mathrm{UF}} \times V_{\mathrm{ekstrakt}} \times \mathrm{DF}}{m_{\mathrm{s.t.}}} \qquad (\mathbf{37})$$

Gdje je: c_{UF} – koncentracija ukupnih flavonoida [$mg_{CE}/g_{s.t.}$]; γ_{UF} – masena koncentracija ukupnih flavonoida u ekstraktu [mg_{CE}/mL]; $V_{ekstrakt}$ – volumen ekstrakta [mL]; DF – faktor razrjeđenja; $m_{s.t.}$ – masa suhe tvari uzorka [g].

3.3.7.5.4. Analiza ekstraktibilnih proantocijanidina

Koncentracija ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina određena je spektrofotometrijski prema Martinović i sur. (2023), primjenom kiselinsko-butanolne metode. U reakciji dolazi do depolimerizacije proantocijanidina i nastajanja crveno obojenih antocijanidina, čija se koncentracija određuje mjerenjem apsorbancije.

Za analizu je u 500 µL ekstrakta dodano 5 mL reagensa pripremljenog otapanjem 77 mg željezova(II) sulfata heptahidrata ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) u 500 mL smjese klorovodične kiseline i 1-butanola (2 : 3, v/v). Nakon homogenizacije reakcijska smjesa inkubirana je u vodenoj kupelji pri 95 °C tijekom 15 min te naglo ohlađena. Apsorbancija je određena pri 540 nm u odnosu na slijepu probu, u kojoj je ekstrakt zamijenjen destiliranom vodom. Masena koncentracija ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina u ekstraktu izračunata je prema Beer–Lambertovu zakonu koristeći molarnu masu cijanidina (287 g/mol) i koeficijent molarne ekstinkcije (34 700 L/mol cm), prema **jednadžbi 38**.

RADNA VERZIJA

$$\gamma_{\mathrm{UPA}} = \frac{\mathrm{A}_{540} \times \mathrm{M} \times \mathrm{DF}}{\varepsilon \times l} \quad (\mathbf{38})$$

Gdje je: γ_{UPA} – masena koncentracija ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina u ekstraktu [mg/mL]; A_{540} – apsorbancija izmjerena pri valnoj duljini od 540 nm [-]; M– molarna masa cijanidina [287 g/mol]; DF – faktor razrjeđenja; ε – koeficijent molarne ekstinkcije cijanidina [34 700 L/mol cm]; *l*– duljina optičkog puta kivete [1 cm].

Koncentracija ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina, izražena na osnovi suhe tvari uzorka, izračunata je prema **jednadžbi 39**.

$$c_{\mathrm{UEP}} = \frac{\gamma_{\mathrm{UEP}} \times V_{\mathrm{ekstrakt}}}{m_{\mathrm{s.t.}}} \quad (\mathbf{39})$$

Gdje je: c_{UEP} – koncentracija ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina [mg/$g_{s.t.}$]; γ_{UPA} – masena koncentracija ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina [mg/mL]; V_{ekstrakt} – volumen ekstrakta [mL]; $m_{\mathrm{s.t.}}$ – masa suhe tvari uzorka [g].

3.3.7.6. Analiza ukupnog ugljika (TC), anorganskog ugljika (IC), ukupnog organskog ugljika (TOC) i ukupnog dušika (TN)

Za određivanje ukupnog ugljika (TC), anorganskog ugljika (IC), ukupnog organskog ugljika (TOC) i ukupnog dušika (TN) korišten je analizator TOC-L CPH/CPN s modulom za krute uzorke SSM-5000A i jedinicom za analizu ukupnog dušika TNM-L.

3.3.7.6.1. Analiza ukupnog ugljika (TC) i anorganskog ugljika (IC) u krutim uzorcima

Približno 30 mg homogeniziranog uzorka odvagano je u keramičke lađice prethodno žarene pri 550 °C tijekom 60 min i ohlađene na sobnu temperaturu. Za određivanje TC-a uzorak je prekriven keramičkom vunom i podvrgnut oksidaciji pri 900 °C. IC je određen pri 200 °C, uz dodatak 300 µL 25 %-tne fosforne kiseline, kojom su karbonati i hidrogenkarbonati prevedeni u ugljikov dioksid (CO_2). Nastali produkti izgaranja transportirani su strujom kisika protoka 500 mL/min do nedisperzivnog infracrvenog detektora (NDIR), gdje je provedena detekcija ugljikova dioksida. Količina ugljika određena je usporedbom dobivenog signala s odgovarajućim baždarnim krivuljama izrađenima uporabom kalijeva hidrogenftalata za određivanje ukupnog ugljika i natrijeva karbonata za određivanje anorganskog ugljika. Obrada podataka provedena je u programu TOC-Control L (verzija 1.04).

Maseni udio ukupnog organskog ugljika u krutom uzorku izračunat je kao razlika između masenog udjela TC i IC prema **jednadžbi 40**.

RADNA VERZIJA

$$w_{\mathrm{TOC}} = w_{\mathrm{TC}} - w_{\mathrm{IC}} \quad (\mathbf{40})$$

Gdje je: w_{TOC} – maseni udio ukupnog organskog ugljika u krutom uzorku [$\%_{\mathrm{s.t.}}$]; w_{TC} – maseni udio ukupnog ugljika u krutom uzorku [$\%_{\mathrm{s.t.}}$]; w_{IC} – maseni udio anorganskog ugljika u krutom uzorku [$\%_{\mathrm{s.t.}}$].

3.3.7.6.2. Analiza ukupnog organskog ugljika (TOC) i ukupnog dušika (TN) u vodenim ekstraktima

Ukupni TOC u vodenim ekstraktima određen je primjenom metode NPOC (Non-Purgeable Organic Carbon). Prije analize anorganski ugljik je uklonjen dodatkom 1,5 %-tne otopine klorovodične kiseline, pri čemu su anorganski ugljikovi spojevi prevedeni u ugljikov dioksid i uklonjeni iz sustava. Nakon uklanjanja anorganskog ugljika uzorci su podvrgnuti katalitičkoj oksidaciji pri 680 °C uz primjenu platinskog katalizatora, pri čemu je organski ugljik kvantitativno oksidiran u ugljikov dioksid. Nastali ugljikov dioksid transportiran je strujom sintetskog zraka (150 mL/min) kroz sustav za uklanjanje vlage i halogenih spojeva do NDIR-a. Masena koncentracija TOC-a određena je prema baždarnoj krivulji kalijeva hidrogenftalata kao standarda.

Dobivene masene koncentracije ukupnog organskog ugljika u vodenim ekstraktima preračunate su u maseni udio TOC-a izražen kao mg/g suhe tvari prema **jednadžbi 41**.

$$c_{\mathrm{TOC}} = \frac{\gamma_{\mathrm{TOC}} \times V \times \mathrm{DF}}{m_{\mathrm{s.t.}}} \quad (\mathbf{41})$$

Gdje je: c_{TOC} – maseni udio ukupnog organskog ugljika [$\mathrm{mg/g_{s.t.}}$]; γ_{TOC} – koncentracija ukupnog organskog ugljika u ekstraktu [mg/L]; V – volumen ekstrakta [mL], DF – faktor razrjeđenja; $m_{\mathrm{s.t.}}$ - masa suhe tvari uzorka [g].

TN u vodenim ekstraktima određen je primjenom jedinice TNM-L metodom katalitičkog izgaranja pri 720 °C. Tijekom analize dušikovi spojevi kvantitativno su prevedeni u dušikov monoksid (NO), koji je reakcijom s ozonom stvarao pobuđene dušikove okside. Emisija svjetlosti nastala njihovom relaksacijom detektirana je kemiluminiscentnim detektorom (CLD), a masena koncentracija TN određena je usporedbom prema baždarnoj krivulji kalijeva nitrata kao standarda.

RADNA VERZIJA

Dobivene masene koncentracije ukupnog dušika u vodenim ekstraktima preračunate su u maseni udio ukupnog dušika izražen kao mg/g suhe tvari prema **jednadžbi 42.**

$$c_{\mathrm{TN}} = \frac{\gamma_{\mathrm{TN}} \times V \times \mathrm{DF}}{m_{\mathrm{s.t.}}} \qquad (\mathbf{42})$$

Gdje je: c_{TN} – maseni udio ukupnog dušika [mg/$g_{s.t.}$], γ_{TN} – koncentracija ukupnog dušika u ekstraktu [mg/L], V – volumen ekstrakta [mL], DF – faktor razrjeđenja, $m_{\mathrm{s.t.}}$ - masa suhe tvari uzorka [g].

3.3.7.7. Sirovi proteini

Maseni udio sirovih proteina određen je Kjeldahlovom metodom prema AOAC-u (Wendt Thiex i Latimer, 2023). Za analizu je odvagano 0,200 g homogeniziranog uzorka, koji je omotan celofanskom folijom i prenesen u digestijsku epruvetu. Dodano je 10,0 g natrijeva sulfata, 0,1 g bakrova(II) sulfata i 15 mL koncentrirane sumporne kiseline. Nakon 30 min stajanja na sobnoj temperaturi uzorci su promiješani te podvrgnuti digestiji pri 420 °C tijekom 1 h. Ohlađenim digestatima dodano je po 75 mL destilirane vode.

Za destilaciju je u svaku epruvetu dodano približno 50 mL 35 %-tne (w/v) otopine natrijeva hidroksida. Oslobođeni amonijak (NH_3) prenesen je vodenom parom u Erlenmeyerovu tikvicu s 25 mL otopine klorovodične kiseline (0,01 M) i nekoliko kapi Tashirova indikatora. Izlazna cijev tijekom destilacije bila je uronjena u prihvatnu otopinu, a prikupljeno je približno 100 mL destilata. Preostala klorovodična kiselina titrirana je standardiziranom otopinom NaOH (0,01 M) do trajne promjene boje indikatora. Slijepa proba provedena je istim postupkom, uz prazan komadić celofanske folije umjesto uzorka. Maseni udio ukupnog dušika izračunat je prema **jednadžbi 43**.

$$w_{\mathrm{N}} = \frac{(a-b) \times f \times 1{,}14}{m \times 10} \qquad (\mathbf{43})$$

Gdje je: N – udio dušika [%]; a – volumen 0,01 M otopine NaOH utrošen za titraciju slijepe probe [mL]; b – volumen 0,01 M otopine NaOH utrošen za titraciju uzorka [mL]; f – faktor standardizacije 0,01 M otopine natrijeva hidroksida koji iznosi 1; m – masa uzorka [g].

Maseni udio sirovih proteina izračunat je iz masenog udjela ukupnog dušika primjenom konverzijskog faktora 6,25 te preračunat na osnovi suhe tvari uzorka prema **jednadžbi 44**.

$$w_{\mathrm{protein}} = \frac{w_{\mathrm{N}} \times 6{,}25}{w_{\mathrm{s.t.}}} \times 100 \qquad (\mathbf{44})$$

RADNA VERZIJA

Gdje je: $w_{protein}$ – maseni udio proteina izražen na suhu tvar [%$_{s.t.}$], w_N – udio dušika [%], $w_{s.t.}$ – udio suhe tvari u uzorku [%].

3.3.7.8. Analiza aminokiselinskog sastava

Aminokiselinski sastav sirovih i fermentiranih uzoraka pivskog tropa određen je kao uslužna analiza u vanjskom laboratoriju primjenom UHPLC metode prema modificiranoj AOAC metodi 994.12 (AOAC, 1995a), uporabom sustava Acquity UPLC. Prije kromatografske analize uzorci su podvrgnuti kiseloj hidrolizi radi oslobađanja slobodnih aminokiselina. U tu svrhu suhi uzorak odvagan je u bočicu volumena 30 mL, nakon čega je dodano 25 mL 6 mol/L klorovodične kiseline s 0,1 % (w/v) fenola. Hidroliza je provedena pri 110 °C tijekom 23 h. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu hidrolizat je filtriran, talog ispran tri puta redestiliranom vodom, a filtrat kvantitativno prenesen u odmjernu tikvicu te nadopunjen redestiliranom vodom do volumena od 100 mL. Alikvot od 1 mL hidrolizata uparen je pod strujom dušika, a suhi ostatak ponovno otopljen u 2 mL redestilirane vode. Prije UHPLC analize aminokiseline su derivatizirane uporabom AccQ-Tag Ultra reagensa prema uputama proizvođača. Za identifikaciju i kvantifikaciju korištena je standardna smjesa aminokiselina koja je sadržavala histidin, serin, arginin, glicin, asparaginsku kiselinu, glutaminsku kiselinu, treonin, alanin, prolin, lizin, tirozin, valin, izoleucin, leucin, fenilalanin i metionin u koncentraciji od 2,5 mmol/L te cistein u koncentraciji od 1,25 mmol/L. Kromatografsko razdvajanje provedeno je na AccQ-Tag Ultra C18 koloni (2,1 × 100 mm; 1,7 μm) primjenom gradijentnog eluiranja s mobilnim fazama AccQ-Tag Ultra Eluent A (A) i acetonitrilom (B) tijekom 10 min. Analiza je provedena pri protoku mobilne faze od 0,7 mL/min, temperaturi kolone od 55 °C, temperaturi uzoraka od 20 °C, volumenu injektiranja od 1 μL te detekciji pri valnoj duljini od 260 nm. Identifikacija aminokiselina provedena je usporedbom retencijskih vremena sa standardnom smjesom aminokiselina, dok je kvantifikacija provedena metodom vanjskog standarda. Rezultati su izraženi kao mg/g suhe tvari.

3.3.7.9. Slobodne masti

Maseni udio slobodnih masti određen je Soxhletovom metodom prema AOAC-u (2005b), uporabom univerzalnog sustava za ekstrakciju B-811. U postupku je korišteno 2,0 g homogeniziranog uzorka i n-heksan kao ekstrakcijsko otapalo. Primijenjen je standardni Soxhletov program s trajanjem ekstrakcije od 2 h, ispiranjem tijekom 5 min te uklanjanjem otapala i sušenjem ekstrakta tijekom 15 min. Izdvojene masti prikupljene su u staklene tikvice

RADNA VERZIJA

koje su prethodno osušene, ohlađene i izvagane. Po završetku ekstrakcije tikvice s ekstrahiranim mastima dodatno su sušene u sušioniku pri 105 °C tijekom 30 min, ohlađene u eksikatoru do sobne temperature te ponovno izvagane. Masa ekstrahiranih slobodnih masti određena je iz razlike mase tikvice s ekstraktom i mase prazne tikvice, a maseni udio slobodnih masti, izražen na suhu tvar uzorka, izračunat je prema **jednadžbi 45**.

$$w_{\text{masti,s.t.}} = \frac{m_1}{m_{\text{s.t.}}} \times 100 \qquad (\mathbf{45})$$

Gdje je: $m_{\text{s.t.}}$ – masa suhe tvari uzorka [g]; m_1 – masa ekstrahiranih masti [g]; $w_{\text{masti,s.t.}}$– maseni udio slobodnih masti [$\%_{\text{s.t.}}$].

3.3.8. Analiza mineralnih elemenata i nepoželjnih tvari

U svrhu procjene sigurnosti sirovog i fermentiranog pivskog tropa za potencijalnu primjenu u hranidbi životinja provedena je analiza mineralnih elemenata i nepoželjnih tvari u akreditiranom laboratoriju primjenom akreditiranih i validiranih metoda ispitivanja u skladu sa zahtjevima norme HRN EN ISO/IEC 17025:2017. Analiza je obuhvatila određivanje makroelemenata, metala i metaloida, mikotoksina, polikloriranih bifenila (PCB), policikličkih aromatskih ugljikovodika (PAH), ergot alkaloida i tropan alkaloida.

3.3.8.1. Mineralni elementi

Udio fosfora određen je spektrofotometrijskom metodom prema normi HRN ISO 6491:2001, dok je koncentracija kalcija, kalija, željeza, olova, kadmija i arsena određena metodom RU-305-05 primjenom induktivno spregnute plazme sa spektrometrijom masa (ICP-MS). Rezultati su izraženi u % za fosfor i u mg/kg za kalcij, kalij, željezo, olovo, kadmij i arsen.

3.3.8.2. Nitrati i nitriti

Koncentracija nitrata i nitrita određena je u akreditiranom laboratoriju metodom RU-308-01 primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC). Rezultati su izraženi u mg/kg.

RADNA VERZIJA

3.3.8.3. Mikotoksini

Koncentracija mikotoksina određena je metodom RU-287-04 primjenom tekućinske kromatografije povezane sa spektrometrijom masa (LC-MS/MS). Analiza je obuhvatila određivanje aflatoksina B_1, aflatoksina B_2, aflatoksina G_1, aflatoksina G_2, ukupnih aflatoksina, deoksinivalenola, fumonizina B_1, fumonizina B_2, ukupnih fumonizina, zearalenona, T-2 toksina, HT-2 toksina, zbroja T-2 i HT-2 toksina te okratoksina A. Rezultati su izraženi u mg/kg ili µg/kg, ovisno o analiziranom mikotoksinu.

3.3.8.4. Poliklorirani bifenili i policiklički aromatski ugljikovodici

Koncentracija PCB-a i PAH-ova određena je primjenom plinske kromatografije povezane sa spektrometrijom masa (GC-MS/MS) metodama RU-231-04, RU-257-01, RU-230-03 i RU-256-02. Analiza je obuhvatila određivanje ukupnih PCB-a, PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 118, PCB 138, PCB 153 i PCB 180 te benzo(a)antracena, benzo(a)pirena, krizena, benzo(b)fluorantena i zbroja benzo(a)pirena, benzo(a)antracena, benzo(b)fluorantena i krizena. Rezultati su izraženi u mg/kg.

3.3.8.5. Ergot alkaloidi

Koncentracija ergot alkaloida određena je metodom RU-149-04 primjenom LC-MS/MS-a. Analiza je obuhvatila određivanje ergokristina, ergokristinina, ergotamina, ergotaminina, ergokriptina, ergokriptinina, ergokornina, ergokorninina, ergozina, ergozinina, ergometrina, ergometrinina i ukupnih ergot alkaloida. Rezultati su izraženi u µg/kg.

3.3.8.6. Tropan alkaloidi

Koncentracija tropan alkaloida određena je metodom RU-418-01 primjenom LC-MS/MS-a. Analiza je obuhvatila određivanje atropina i skopolamina. Rezultati su izraženi u µg/kg.

3.3.9. Analiza bruto energije

Bruto energija sirovih i fermentiranih uzoraka pivskog tropa određena je kalorimetrijskom metodom prema normi HRN EN ISO 9831:2004. Dobivene vrijednosti predstavljaju količinu energije oslobođenu potpunim izgaranjem uzorka, a rezultati su izraženi u kJ/kg.

RADNA VERZIJA

3.3.10. LCA analiza integriranog procesa biološke valorizacije pivskog tropa

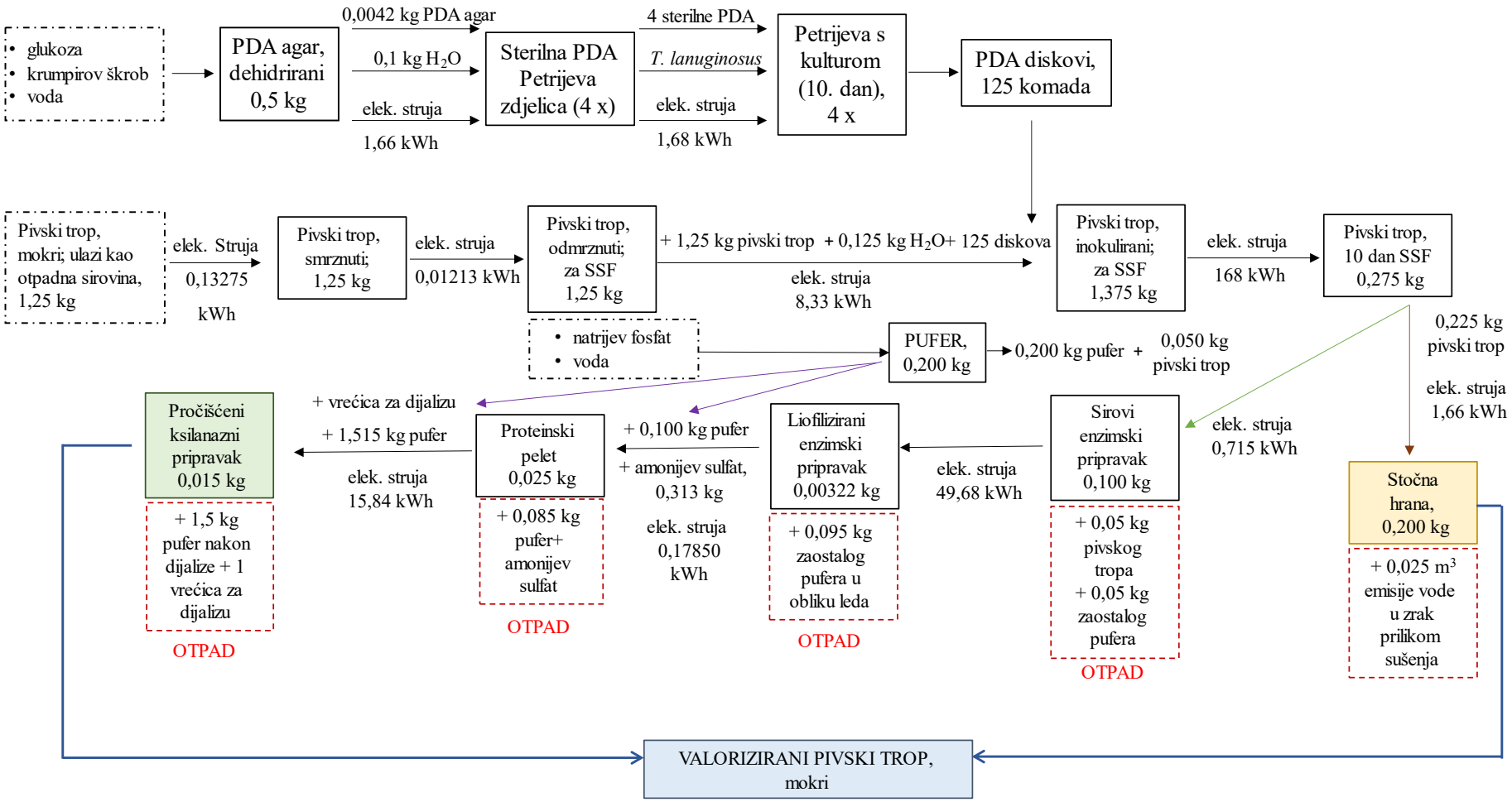
LCA analiza provedena je radi kvantifikacije potencijalnih okolišnih utjecaja laboratorijskog procesa biološke valorizacije pivskog tropa primjenom *T. lanuginosus*. Analizirane su tri međusobno povezane cjeline: a) proizvodnja djelomično pročišćenog ksilanaznog pripravka, b) proizvodnja fermentiranog pivskog tropa namijenjenog potencijalnoj primjeni kao stočna hrana te c) integrirani sustav valorizacije pivskog tropa koji objedinjuje oba proizvodna toka.

Cilj analize bio je utvrditi okolišni profil razvijenog procesa, identificirati procesne faze s najvećim doprinosom potrošnji resursa i potencijalnim okolišnim utjecajima te procijeniti mogućnosti njihova smanjenja promjenama procesnih i energetskih parametara. Uz osnovni laboratorijski model provedena je scenarijska analiza usmjerena na učinkovitije iskorištenje kapaciteta opreme, smanjenje energetskih zahtjeva, izostavljanje liofilizacije i skraćivanje trajanja SSF-a. Takav pristup omogućuje da se okolišna procjena ne ograniči samo na pojedinačni proizvod, nego da se razmotri cjelovit sustav višestruke valorizacije biomase, što odgovara načelima integriranog biorefinerijskog pristupa (Zahović i sur., 2026). Primjena LCA već u ranoj fazi razvoja procesa osobito je korisna za identifikaciju okolišnih kritičnih točaka i procjenu različitih tehnoloških varijanti prije povećanja procesnog mjerila (Hren i sur., 2023; da Fonseca i sur., 2024).

3.3.10.1. Granice sustava i inventar životnog ciklusa

Analizirani sustav obuhvatio je pripremu inokuluma, skladištenje i pripremu pivskog tropa, sterilizaciju, inokulaciju i SSF te dvije proizvodne grane nakon fermentacije: proizvodnju fermentiranog pivskog tropa namijenjenog potencijalnoj primjeni u hranidbi životinja i proizvodnju djelomično pročišćenog ksilanaznog pripravka. Inventar životnog ciklusa izrađen je na temelju primarnih podataka dobivenih tijekom laboratorijskog istraživanja. Eksperimentalni postupci na kojima se inventar temelji opisani su u poglavljima **3.3.1.2.**, **3.3.2.2.** i **3.3.4.**, dok su u LCA model uključeni pripadajući materijalni i energetski ulazi, proizvodi te otpadni i emisijski tokovi. Referentne količine iznosile su 0,015 kg djelomično pročišćenog ksilanaznog pripravka, 0,200 kg fermentirane biomase te 1,000 kg valoriziranog pivskog tropa za integrirani sustav. Granice sustava i inventarni tokovi osnovnog laboratorijskog procesa prikazani su na **Slici 13**.

RADNA VERZIJA



Slika 13 Granice sustava i inventar integriranog procesa biološke valorizacije pivskog tropa

3.3.10.2. Procjena okolišnih utjecaja i scenarijska analiza

Procjena potencijalnih okolišnih utjecaja provedena je metodom Environmental Footprint v3.1 (EF v3.1). Normalizacija i ponderiranje rezultata nisu primijenjeni, za alokaciju su zadržane zadane postavke procesa (eng. *process defaults*), dok kriterij isključivanja (eng. *cut-off*) nije primijenjen. Izračunate su sve kategorije i potkategorije dostupne u metodi EF v3.1. U rezultatima su detaljnije razmatrane kategorije klimatskih promjena, uporabe neobnovljivih energetskih resursa, uporabe vode, ekotoksičnosti slatkih voda i zakiseljavanja. U svim alternativnim scenarijima integriranog sustava zadržani su jednaka referentna količina valoriziranog pivskog tropa i iste metodološke postavke LCA analize. U **Scenariju 1** ispitana je korekcija potrošnje energije u odnosu na maksimalne vrijednosti snage uređaja te raspodjela potrošnje liofilizatora prema njegovu raspoloživom kapacitetu. **Scenariji 2** i **3** temeljili su se na potpunijem iskorištenju kapaciteta autoklava i inkubatora te izostavljanju liofilizacije, dok su **Scenariji 4** i **5** dodatno uključili skraćivanje SSF-a s 10 na 7 dana (**Tablica 6**).

Tablica 6 Postavke osnovnog modela i alternativnih scenarija LCA analize

Model	Postavke procesa
Osnovni model	SSF u trajanju 10 dana; potrošnja električne energije prema osnovnom laboratorijskom modelu; uključena liofilizacija
Scenarij 1 (S1)	Potrošnja energije autoklava i inkubatora smanjena za 30 %; potrošnja liofilizatora korigirana prema iskorištenju 25 % njegova kapaciteta
Scenarij 2 (S2)	Puni kapacitet autoklava i inkubatora; izbjegnuta liofilizacija; povećana masa proizvedene stočne hrane bez proporcionalnog povećanja količine pročišćene ksilanaze
Scenarij 3 (S3)	Postavke S2 uz dodatno smanjenje potrošnje energije autoklava i inkubatora za 30 %
Scenarij 4 (S4)	SSF skraćen na 7 dana; manji gubitak mase i veća masa proizvedene stočne hrane; manja potrošnja energije zbog kraćeg trajanja procesa; puni kapacitet autoklava i inkubatora; izbjegnuta liofilizacija
Scenarij 5 (S5)	Postavke S4 uz dodatno smanjenje potrošnje energije autoklava i inkubatora za 30 %

3.3.11. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka provedena je uporabom programskog paketa Statistica 14.0 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, SAD). Statističke metode odabrane su u skladu s

RADNA VERZIJA

eksperimentalnim dizajnom i vrstom analiziranih podataka. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD), a razlike su smatrane statistički značajnima pri $p < 0,05$.

Statistička usporedba kemijskog sastava te koncentracije bioaktivnih spojeva sirovog i fermentiranog pivskog tropa provedena je Studentovim t-testom za ovisne uzorke (engl. *paired Student's t-test*). Za svaki ispitivani pivski trop početni i fermentirani materijal potjecali su iz istog homogeniziranog uzorka, pri čemu je dio materijala analiziran prije fermentacije, dok je odgovarajući dio istog početnog materijala podvrgnut fermentacijskom postupku i analiziran nakon njegova završetka. Analize su provedene u paralelnim analitičkim ponavljanjima, iz kojih su izračunate srednje vrijednosti i standardne devijacije.

Dobivene *p*-vrijednosti korištene su za procjenu razlika između analitički određenih vrijednosti početnog i završnog stanja pojedinog uzorka pivskog tropa. Budući da analitička ponavljanja ne predstavljaju neovisne biološke odnosno procesne replike, statistički rezultati interpretirani su u okviru ispitivanih uzoraka PT1, PT2 i PT3 te se ne koriste za procjenu varijabilnosti između različitih proizvodnih šarži pivskog tropa.

Rezultati enzimske hidrolize analizirani su dvofaktorskom analizom varijance (engl. *two-way ANOVA*), pri čemu su vrsta lignoceluloznog supstrata i vrsta enzimskog pripravka definirani kao fiksni čimbenici. U slučaju statistički značajnih glavnih učinaka ili njihove interakcije proveden je Tukeyjev HSD post hoc test radi utvrđivanja statistički značajnih razlika između pojedinih kombinacija supstrata i enzimskih pripravaka.

Statistički značajne razlike u tabličnim i grafičkim prikazima označene su u skladu s primijenjenom statističkom analizom. Kod višestrukih usporedbi različite slovne oznake označavaju statistički značajne razlike ($p < 0,05$), dok vrijednosti označene istim slovom nisu statistički značajno različite. Kod izravnih usporedbi sirovih i fermentiranih uzoraka statistička značajnost prikazana je pripadajućim *p*-vrijednostima, pri čemu * označava $p < 0,05$.

RADNA VERZIJA

RADNA VERZIJA

4. Rezultati i rasprava

4.1. Biološka obrada pivskog tropa gljivom *Trametes versicolor*

Biološka obrada pivskog tropa s *T. versicolor* temelji se na sposobnosti gljive da sintetizira ekstracelularne hidrolitičke i lignolitičke enzime koji kataliziraju hidrolizu strukturnih polisaharida te oksidativnu razgradnju i transformaciju lignina. Takva obrada rezultira fermentiranim pivskim tropom izmijenjenog kemijskog sastava i strukturnih svojstava koji može imati povećanu dostupnost hranjivih tvari, poboljšanu probavljivost ili veću podložnost daljnjoj (bio)konverziji. Navedene promjene mogu povećati potencijal primjene pivskog tropa u hranidbi životinja ili kao sirovine za proizvodnju prehrambenih dodataka, biogoriva, biognojiva i platformnih kemikalija.

Tijekom biološke obrade pivskog tropa gljiva raste i razgrađuje sastojke supstrata, pri čemu nastaju CO_2 i metabolička voda. CO_2 se oslobađa u plinovitu fazu, dok dio vode isparava, pa se unatoč porastu biomase micelija mokra masa fermentiranog supstrata može postupno smanjivati. Promjena mokre mase stoga odražava promjene mase suhe tvari i količine vode u supstratu (Mehta i Chelike, 2024; Šelo i sur., 2022; Tišma i sur., 2012; Tišma i sur., 2021b). Zbog toga je, tijekom dizajna industrijskog procesa vrlo važno poznavati podatke o gubitku mase fermentiranog supstrata, promjene vlažnosti fermentiranog supstrata, brzini rasta mikroorganizma i naravno, kemijskom sastavu supstrata prije i na kraju procesa.

Stoga je u prvom dijelu ovog istraživanja učinkovitost biološke obrade dvije vrste pivskog tropa porijeklom iz dvije različite pivovare (PT1 i PT2) s *T. versicolor* analizirana praćenjem gubitka mase te promjenom udjela suhe tvari i pH supstrata tijekom vremena (**4.1.1.**). Radi jednostavnosti izražavanja, u ovom se radu upotrebljava izraz „gubitak mase supstrata", pri čemu se izmjerene vrijednosti mase odnose na fermentirani supstrat. Dodatno, mjerena je aktivnost hidrolitičkih (ksilanaza, celulaza, β-glukozidaza i invertaza) (**4.1.2.**) i ligninolitičkih enzima (lakaza, mangan-peroksidaza i lignin-peroksidaza) (**4.1.3.**). kako bi se procijenio potencijal gljive za proizvodnju enzima visoke aktivnosti od interesa za daljnju biotehnološku primjenu.

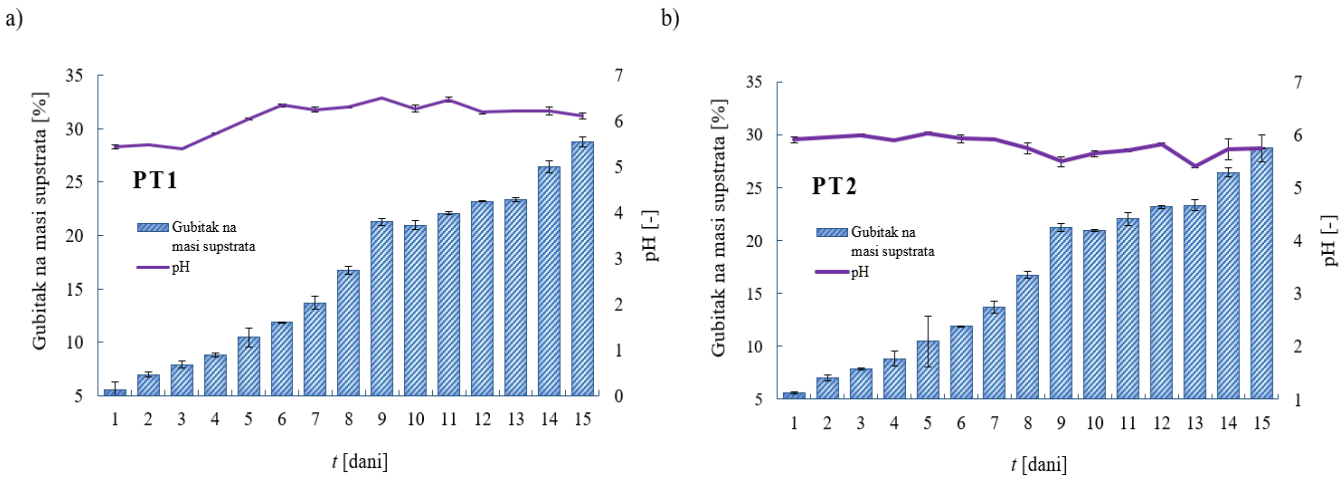
4.1.1. Promjena mase i pH tijekom fermentacije na čvrstim nosačima s *Trametes versicolor*

Rezultati promjene gubitka mase i pH tijekom 15 dana fermentacije prikazani su na **Slici 14**. Prvog dana fermentacije gubitak mase supstrata iznosio je 5,61 ± 0,75 % u eksperimentu sa

RADNA VERZIJA

supstratom PT1, odnosno 7,63 ± 0,08 % u eksperimentu sa supstratom PT2. U oba eksperimenta najveći gubitak mase postignut je na kraju procesa, 15. dana fermentacije, te je iznosio 28,74 ± 0,42 % za PT1 i 31,01 ± 1,26 % za PT2. Dobiveni rezultati su u skladu s istraživanjem Tišme i sur. (2018), u kojem je nakon 14 dana fermentacije pivskog tropa gljivom *T. versicolor* došlo do 35 % gubitka mase supstrata. Usporedba ovih istraživanja pokazuje da su fermentacijom triju različitih pivskih tropova istom gljivom postignuti usporedivi gubici mase tijekom sličnog razdoblja uzgoja (14–15 dana).

Početna pH-vrijednost supstrata PT1 iznosila je 5,44 ± 0,04 te je tijekom fermentacije postupno rasla do najveće vrijednosti od 6,50 ± 0,01, zabilježene devetog dana. Nakon toga se smanjila te je na kraju procesa iznosila 6,11 ± 0,06. U eksperimentu sa supstratom PT2 pH-vrijednost tijekom 15 dana fermentacije bila je u rasponu od 5,40 ± 0,03 do 6,03 ± 0,02, uz završnu vrijednost od 5,75 ± 0,01. Promjene pH povezane s metaboličkom aktivnošću mikroorganizma i promjenama kemijskog sastava supstrata, a pH istodobno utječe na rast i proizvodnju mikrobnih metabolita i enzima (Kabir i sur., 2025).



Slika 14 Gubitak na masi i pH-vrijednost tijekom uzgoja *Trametes versicolor* na pivskom tropu: (a) PT1 i (b) PT2. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (n = 2)

Tijekom fermentacije nije došlo do značajnije promjene udjela suhe tvari. U eksperimentu sa supstratom PT1 udio suhe tvari iznosio je 33,12 ± 0,45 % na početku fermentacije te 32,17 ± 1,30 % nakon 15 dana, dok je u eksperimentu sa supstratom PT2 porastao s 30,04 ± 0,01 % na 32,52 ± 1,42 %.

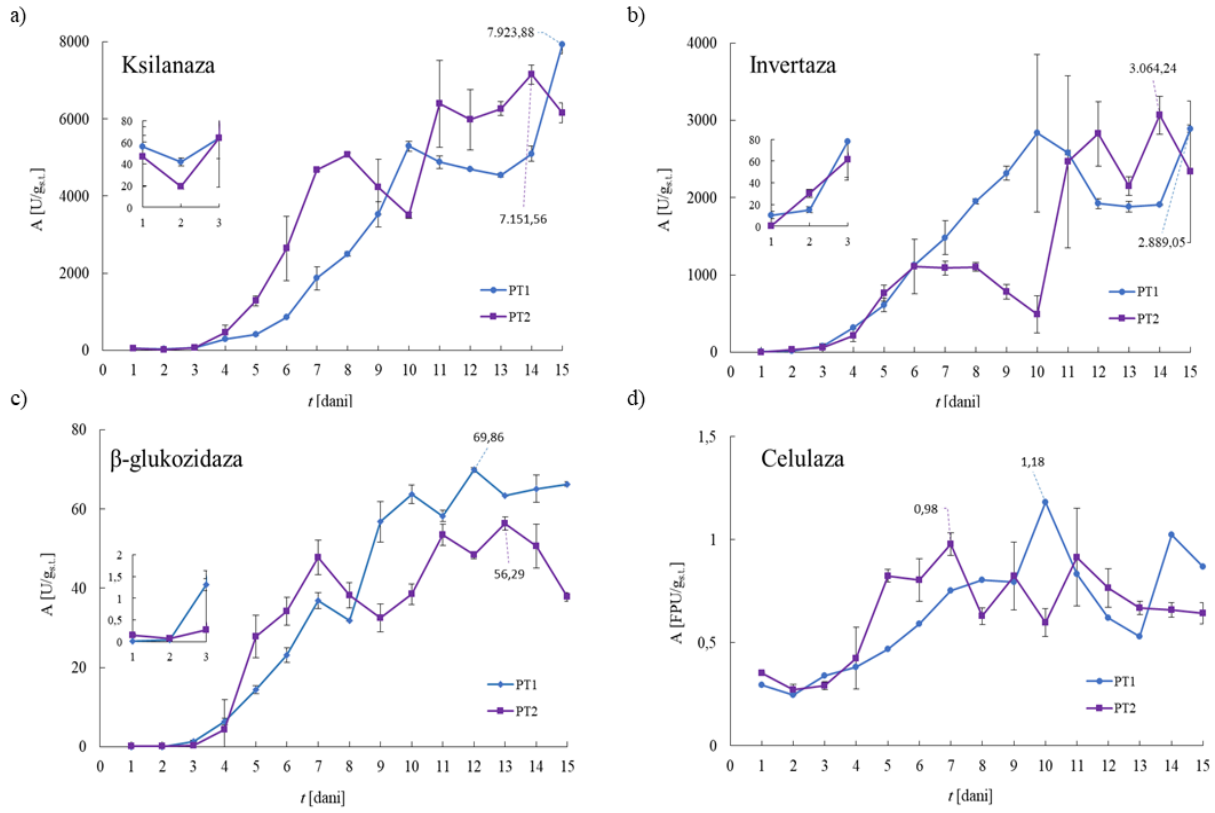
Udio vode jedan je od ključnih čimbenika uspješnosti SSF-a jer utječe na rast i metaboličku aktivnost mikroorganizma, prijenos hranjivih tvari i metabolita, te izmjenu plinova unutar fermentacijske smjese. Prekomjerna količina vode može smanjiti poroznost supstrata i ograničiti prijenos kisika, a nedovoljna količina može spriječiti rast ili smanjiti brzinu rasta micelija i metaboličku aktivnost gljive (He i sur., 2019). Dobiveni rezultati upućuju na to da u ispitivanim uvjetima nije bilo potrebno dodatno vlažiti supstrat tijekom fermentacije. Mogući razlog je nastanak vode tijekom metabolizma gljive čime se mogu nadoknaditi gubitci vode isparavanjem. Budući da tijekom fermentacije nije bilo potrebno dodavati vodu niti su nastale otpadne vode, takav način provedbe procesa predstavlja potencijalnu ekonomsku i okolišnu prednost zbog manje potrošnje vode i izostanka potrebe za obradom otpadnih voda.

4.1.2. Aktivnost hidrolitičkih enzima iz *Trametes versicolor*

Hidrolitički enzimski sustav *T. versicolor* obuhvaća veliki broj enzima uključujući endoglukanaze, celobiohidrolaze, β-glukozidaze, endoksilanaze, β-ksilozidaze, endomananaze, β-manozidaze, celulaze te invertaze (Valášková, i Baldrian, 2006; Iandolo i sur., 2011; Šelo i sur., 2024). Kada i koje enzime će gljiva sintetizirati ovisi o kemijskom sastavu supstrata (osobito o prisutnosti slobodnih šećera) i procesnim uvjetima. Smanjena dostupnost slobodnih šećera, koje gljiva prvenstveno koristi za rast, može potaknuti sintezu hidrolitičkih enzima te posljedično, oslobađanje šećera iz polisaharida.

Na **Slici 15** prikazani rezultati aktivnosti ksilanaze, invertaze, β-glukozidaze i celulaze tijekom 15 dana biološke obrade PT1 i PT2 s *T. versicolor*.

RADNA VERZIJA



Slika 15 Aktivnosti hidrolitičkih enzima tijekom uzgoja *Trametes versicolor* na pivskom tropu (PT1 i PT2): a) ksilanaza, b) invertaza, c) β-glukozidaza i d) celulaza. Umetnuti grafikoni prikazuju aktivnosti enzima tijekom početnog razdoblja fermentacije radi jasnijeg prikaza nižih vrijednosti aktivnosti. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD) (n = 2)

Ksilanaze su hidrolitički enzimi koji kataliziraju hidrolizu unutarnjih β-1,4-glikozidnih veza u glavnom lancu ksilana, sastavnom dijelu hemiceluloze, pri čemu nastaju ksilooligosaharidi različitih stupnjeva polimerizacije (Mendonça i sur., 2023). Najveća aktivnost ksilanaze izmjerena je petnaestog dana SSF-a u eksperimentu provedenom na supstratu PT1 (7923,88 ± 241,62 U/$g_{s.t.}$) te četrnaestog dana u eksperimentu provedenom na supstratu PT2 (7151,56 ± 251,20 U/$g_{s.t.}$). Izmjerene aktivnosti ksilanaze bile su više od literaturnih vrijednosti. Primjerice, tijekom uzgoja *Penicillium janczewskii* na pivskom tropu postignuta je aktivnost ksilanaze od 371 U/$g_{s.t.}$ (Terrasan i Carmona, 2015), 1400,80 U/$g_{s.t.}$ pri uzgoju *Aspergillus niger* (Moran-Aguilar i sur., 2021), 67 U/$g_{s.t.}$ pri uzgoju *Mucor* sp. (Hassan i sur., 2020) te 599,61 U/$g_{s.t.}$ pri uzgoju *Trichoderma* sp. (Lojananan i sur., 2024). Međutim, pri usporedbi ovih rezultata

potrebno je uzeti u obzir razlike u uvjetima fermentacije, postupcima ekstrakcije enzima i metodama određivanja enzimske aktivnosti.

Invertaza katalizira hidrolizu saharoze na glukozu i fruktozu. Najveća aktivnost invertaze postignuta je u eksperimentu provedenom na supstratu PT1 nakon petnaest dana fermentacije (2889,05 ± 48,13 U/$g_{s.t.}$), dok je u eksperimentu provedenom na supstratu PT2 najveća aktivnost postignuta četrnaestog dana (3064,24 ± 244,84 U/$g_{s.t.}$). U literaturi nisu pronađeni podaci o proizvodnji invertaze tijekom uzgoja mikroorganizam na pivskom tropu u uvjetima fermentacija na čvrstim nosačima.

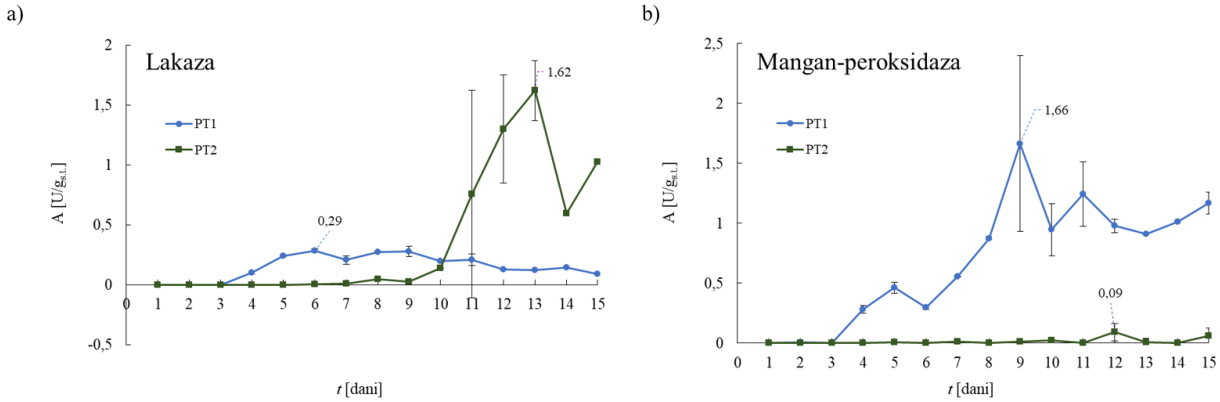
Celulaze i β-glukozidaza djeluju sinergijski tijekom razgradnje celuloze. Celulaze depolimeriziraju celulozne lance uz oslobađanje celobioze, dok β-glukozidaza hidrolizira celobiozu do glukoze te uklanja njezin inhibitorni učinak na celulolitički sustav, omogućujući nastavak učinkovite hidrolize celuloze (Lu i sur., 2024). Najveća aktivnost β-glukozidaze u eksperimentu provedenom na supstratu PT1 postignuta je dvanaestog dana (69,86 ± 0,55 U/$g_{s.t.}$), dok je u eksperimentu provedenom na supstratu PT2 najveća vrijednost postignuta trinaestog dana (56,29 ± 1,65 U/$g_{s.t.}$). Najveća aktivnost celulaze u eksperimentu provedenom na supstratu PT1 postignuta je je desetog dana (1,18 ± 0,09 FPU/$g_{s.t.}$), dok je u eksperimentu provedenom na supstratu PT2 najveća aktivnost postignuta sedmog dana (0,98 ± 0,24 FPU/$g_{s.t.}$). Za usporedbu, tijekom biokonverzije pivskog tropa s *Trichoderma sp*. primjenom uzastopne SSF i SmF postignute su aktivnosti β-glukozidaze od 16,97 ± 0,77 U/$g_{s.t.}$ i celulaze od 35,84 ± 0,27 U/$g_{s.t.}$ (Lojananan i sur., 2024). Cjelokupni profil aktivnosti hidrolitičkih enzima može upućivati na međudjelovanje hemicelulolitičkog i celulolitičkog enzimskog sustava tijekom SSF-a, pri čemu se pojedini enzimi sintetiziraju kao dio usklađenog procesa razgradnje lignocelulozne biomase (Esparza-Vásquez i sur., 2026).

4.1.3. Aktivnost ligninolitičkih enzima iz *Trametes versicolor*

Ligninolitički sustav *T. versicolor* čine lakaza, mangan-peroksidaza i lignin-peroksidaza (Iqbal i sur., 2011).

Na **Slici 16** prikazane su aktivnosti lakaze i mangan-peroksidaze tijekom 15 dana SSF-a na PT1 i PT2.

RADNA VERZIJA



Slika 16 Aktivnosti ligninolitičkih enzima tijekom uzgoja *Trametes versicolor* na pivskom tropu PT1 i PT2: a) lakaza i b) mangan-peroksidaza. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD) (n = 2)

Prilikom uzgoja na supstratu PT1 aktivnost lakaze nije detektirana tijekom prva tri dana fermentacije. Prvi je put detektirana četvrtog dana (0,10 ± 0,01 U/$g_{s.t.}$), nakon čega se postupno povećavala do najveće vrijednosti zabilježene šestog dana (0,29 ± 0,00 U/$g_{s.t.}$). U eksperimentu sa supstratom PT2 aktivnost lakaze nije detektirana tijekom prvih pet dana fermentacije, dok je nakon desetog dana zabilježen njezin porast. Najveća aktivnost postignuta je trinaestog dana i iznosila je 1,62 ± 0,25 U/$g_{s.t.}$, nakon čega se smanjivala. Aktivnost mangan-peroksidaze na supstratu PT1 zabilježena je od četvrtog dana fermentacije, dok je najveća aktivnost postignuta devetog dana (1,66 ± 0,74 U/$g_{s.t.}$). U eksperimentu sa supstratom PT2, aktivnost mangan-peroksidaza bila je vrlo niska tijekom cijelog procesa, pri čemu je najveća vrijednost izmjerena dvanaestog dana (0,09 ± 0,07 U/$g_{s.t.}$). Aktivnost lignin-peroksidaze nije detektirana tijekom cijelog procesa fermentacije. Iako je za *T. versicolor* potvrđena sposobnost proizvodnje lignin-peroksidaze, pri čemu je tijekom SSF-a zelenog otpada zabilježena najveća aktivnost od 766,52 U/g nakon 48 sati -a (Ocaña-Romo i sur., 2024), aktivnost ovog enzima nije detektirana tijekom SSF-a pivskog tropa u primijenjenim uvjetima istraživanja.

Dobiveni rezultati uspoređeni su s literaturnim podacima o aktivnostima ligninolitičkih enzima tijekom uzgoja *T. versicolor* na drugim lignoceluloznim supstratima. Tijekom obrade tropa grožđa s *T. versicolor* postignute su najveće aktivnosti lakaze od 2,66 U/g i mangan-peroksidaze od 0,32 U/g (Šelo i sur., 2024). Tijekom SSF-a agroindustrijskih ostataka postignuta je aktivnost lakaze od 6,37 U/g (Montoya i sur., 2021). Može se zaključiti da postignute aktivnosti lakaze tijekom uzgoja *T. versicolor* na supstratima PT1 i PT2 nisu bile visoke, dok je aktivnost MnP bila izraženija u eksperimentu na supstratu PT1 nego na PT2.

RADNA VERZIJA

Prema Tišma i sur. (2024) veće aktivnosti lignolitičkih enzima mogu se postići dodatkom različitih induktora, uključujući lignin i njegove derivate, fenolne spojeve, etanol i Cu^{2+} ione. Tako je, primjerice, na pšeničnim mekinjama soj *T. versicolor* CM13 nakon 28 dana fermentacije postigao maksimalnu aktivnost lakaze od 750–820 U te mangan-peroksidaze od 21–23 U (Baker i Charlton, 2023). Nadalje, optimizacijom sastava hranjivog medija i dodatkom bakrova i manganova sulfata ostvarena je proizvodnja lakaze (11,96 U/g), mangan-peroksidaze (1,32 U/g) i endo-1,4-β-D-ksilanaze (2,63 U/g) nakon 17 dana fermentacije (Montoya i sur., 2021).

Na temelju provedenih eksperimenata, može se zaključiti da pri primijenjenim procesnim uvjetima izmjerene su više vrijednosti aktivnosti hidrolitičkih enzima u odnosu na ligninolitičke enzime. Sličan obrazac opisuju i Esparza-Vásquez i sur. (2026), koji navode da se u osnovnim uvjetima SSF-a na pivskom tropu najveći potencijal očituje u proizvodnji hidrolitičkih i hemicelulolitičkih enzima, dok je oksidativna razgradnja lignina manje izražena.

4.1.4. Promjene kemijskog sastava pivskog tropa nakon fermentacije na čvrstim nosačima s *Trametes versicolor*

Tijekom fermentacije, analizirane su promjene osnovnog kemijskog sastava (**4.1.4.1.**), aminokiselinskog sastava (**4.1.4.2.**), udjela topljivih ugljikohidrata (**4.1.4.3.**), udjela ugljika i dušika (**4.1.4.4.**) te bioaktivnih spojeva (**4.1.4.5.**).

4.1.4.1. Osnovni kemijski i lignocelulozni sastav

Analiza osnovnog kemijskog sastava i lignocelulozne strukture pivskog tropa PT1 i PT2 prije i nakon 15 dana SSF-a s *T. versicolor* prikazane su u **Tablici 7**.

Tablica 7 Kemijski sastav pivskog tropa prije fermentacije (sirovi PT1 i sirovi PT2) te nakon 15 dana fermentacije s *Trametes versicolor* (fermentirati PT1 i fermentirani PT2). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD) na osnovi suhe tvari (s.t.)

Sastavnica [$\%_{s.t.}$]	Sirovi PT1	Fermentirani PT1	Sirovi PT2	Fermentirani PT2
Hemiceluloza	$30,95 \pm 1,55^{a}$	$27,87 \pm 1,99^{a}$	$14,89 \pm 0,16^{a}$	$26,60 \pm 0,75^{b}$
Celuloza	$21,47 \pm 1,21^{a}$	$17,82 \pm 1,51^{b}$	$28,34 \pm 0,14^{a}$	$20,26 \pm 2,39^{b}$
Lignin	$6,94 \pm 0,95^{a}$	$5,75 \pm 0,10^{a}$	$3,81 \pm 0,08^{a}$	$6,90 \pm 1,98^{a}$
Sirovi proteini	$26,09 \pm 0,14^{a}$	$20,38 \pm 0,27^{b}$	$19,18 \pm 0,01^{a}$	$27,07 \pm 0,26^{b}$

RADNA VERZIJA

Masti	8,10 ± 0,16[a]	3,83 ± 0,19[b]	8,85 ± 0,05[a]	3,99 ± 0,21[b]
Pepeo	3,87 ± 0,02[a]	5,01 ± 0,00[b]	4,24 ± 0,06[a]	5,74 ± 0,11[b]

Nakon 15 dana SSF-a u ekperimentu s PT1 došlo je do smanjenjaa udjela hemiceluloze, celuloze i lignina, dok je statistički značajno smanjenje utvrđeno samo za celulozu. U eksperimentu sa supstratom PT2 udio hemiceluloze statistički se značajno povećao 1,79 puta, dok se udio celuloze statistički značajno smanjio 1,40 puta. Iako je nakon fermentacije zabilježen porast udjela lignina, razlika nije bila statistički značajna. Boardman i sur. (2025) također su dokazali da se tijekom SSF-a opseg razgradnje celuloze i hemiceluloze razlikuje između supstrata, što su povezali s njihovim različitim kemijskim sastavom. Povećanje relativnog udjela hemiceluloze i lignina u PT2 može se objasniti relativnim obogaćivanjem teže razgradivih strukturnih sastavnica uslijed mikrobiološke razgradnje lako dostupnih ugljikohidrata, lipida i drugih organskih sastavnica supstrata (Šelo i sur., 2022). Promjene udjela sirovih proteina razlikovale su se između ispitivanih supstrata. Na uzorku PT2 zabilježeno je 1,41 puta povećanje udjela sirovih proteina, dok je na PT1 njihov udio bio 1,28 puta manji u odnosu na početni uzorak. Eliopoulos i sur. (2022) tijekom SSF-a na pivskom tropu s *Pleurotus ostreatus* zabilježili su povećanje udjela proteina za 49,49 %. Tojang i sur. (2021) utvrdili su smanjenje udjela proteina tijekom SSF-a u proizvodnji tempeha, što potvrđuje da promjene proteinske frakcije tijekom SSF-a ovise o vrsti supstrata, korištenom mikroorganizmu i uvjetima fermentacije. Udio slobodnih lipida smanjio se 2,11 puta na PT1 i 2,22 puta na PT2. Smanjenje udjela slobodnih lipida može se povezati s njihovim iskorištavanjem tijekom rasta i metabolizma *T. versicolor*, pri čemu predstavljaju jedan od dostupnih izvora ugljika i energije tijekom SSF-a. Usporedive rezultate zabilježili su Cooray i sur. (2018), koji su tijekom SSF-a pivskog tropa gljivom *Rhizopus oligosporus* utvrdili smanjenje udjela lipida s početnih 10,9 % na 4,52 % nakon tri dana fermentacije.

Udio pepela povećao se 1,30 puta na PT1 i 1,35 puta na PT2. Povećanje udjela pepela može se povezati s razgradnjom organske tvari i metaboličkom aktivnošću gljive tijekom SSF-a, uslijed čega dolazi do relativnog obogaćivanja preostale biomase mineralnim sastavnicama odnosno to je učinak koncentriranja mineralnih tvari uslijed gubitka organske tvari. Shi i sur. (2021) također su zabilježili povećanje udjela pepela nakon SSF-a.

RADNA VERZIJA

4.1.4.2. Aminokiselinski sastav

Tijekom uzgoja *T. versicolor* na pivskom tropu došlo je do promjene u profilu esencijalnih i neesencijalnih aminokiselina pivskog tropa, pri čemu su uočene razlike između supstrata PT1 i PT2 (**Slike 17 i 18**). Nakon fermentacije u supstratu PT1 došlo je do povećanja koncentracije histidina, dok je koncentracija većine preostalih esencijalnih aminokiselina bila niža u odnosu na sirovi uzorak. Suprotno tome, u supstratu PT2 fermentacija je rezultirala povećanjem koncentracije većine esencijalnih aminokiselina, pri čemu je najizraženiji porast također zabilježen za histidin. Kod neesencijalnih aminokiselina u supstratu PT1 povećanje je utvrđeno samo za asparaginsku kiselinu, dok su koncentracije ostalih neesencijalnih aminokiselina bile niže nego u sirovom uzorku. U supstratu PT2 je, za razliku od supstrata PT1, nakon SSF-a zabilježen porast koncentracije većine neesencijalnih aminokiselina, pri čemu su najizraženije promjene uočene za glutaminsku i asparaginsku kiselinu.

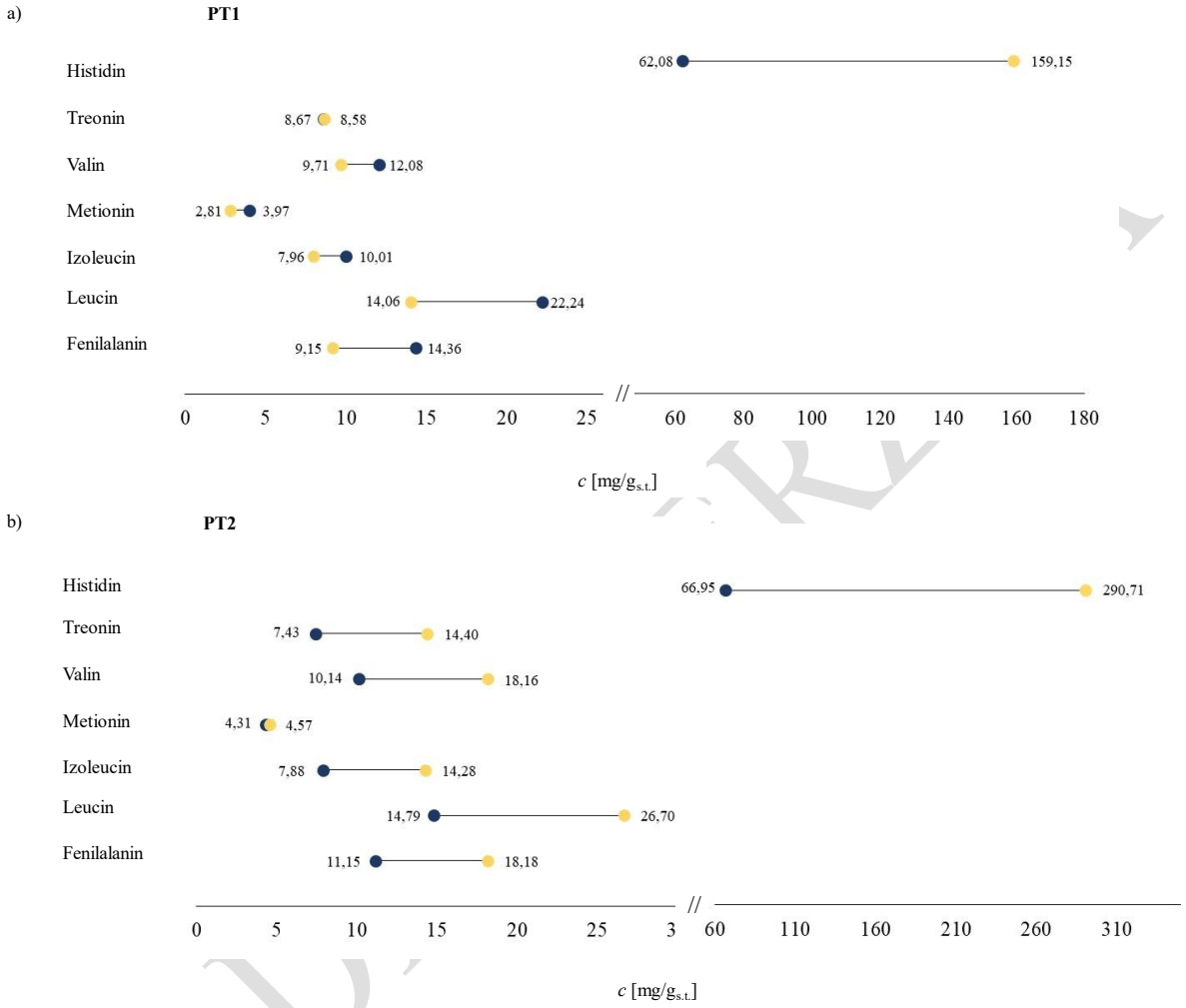
Različit aminokiselinski profil između supstrata PT1 i PT2 može se povezati s različitim početnim sastavom, budući da aminokiselinski profil pivskog tropa ovisi o nizu čimbenika, uključujući sortu ječma, uvjete slađenja i parametre procesa proizvodnje piva (Barrera-León i sur., 2025). Osim početnog sastava supstrata, promjene aminokiselinskog sastava tijekom SSF-a mogu biti povezane s rastom gljivične biomase i iskorištavanjem dostupnih izvora dušika (Liu i sur., 2017). Ovisnost učinka SSF-a o vrsti supstrata potvrđuju Boardman i sur. (2025), koji su tijekom SSF-a s *T. versicolor* utvrdili povećanje ukupne koncentracije esencijalnih aminokiselina u smjesama sojinih ljuski i pogače kameline, dok su u smjesama pšeničnih posija i rižinih ljuski zabilježena smanjenja.

Cooray i Chen (2018) su uzgajali *Rhizopus oligosporus* na pivskom tropu pri čemu je također došlo do porasta koncentracije svih analiziranih aminokiselina. Nakon tri dana fermentacije njihova ukupna koncentracija povećala se s 3,807 na 7,772 mg/g, pri čemu je među esencijalnim aminokiselinama posebno izražen bio porast treonina, s 0,056 na 0,337 mg/g.

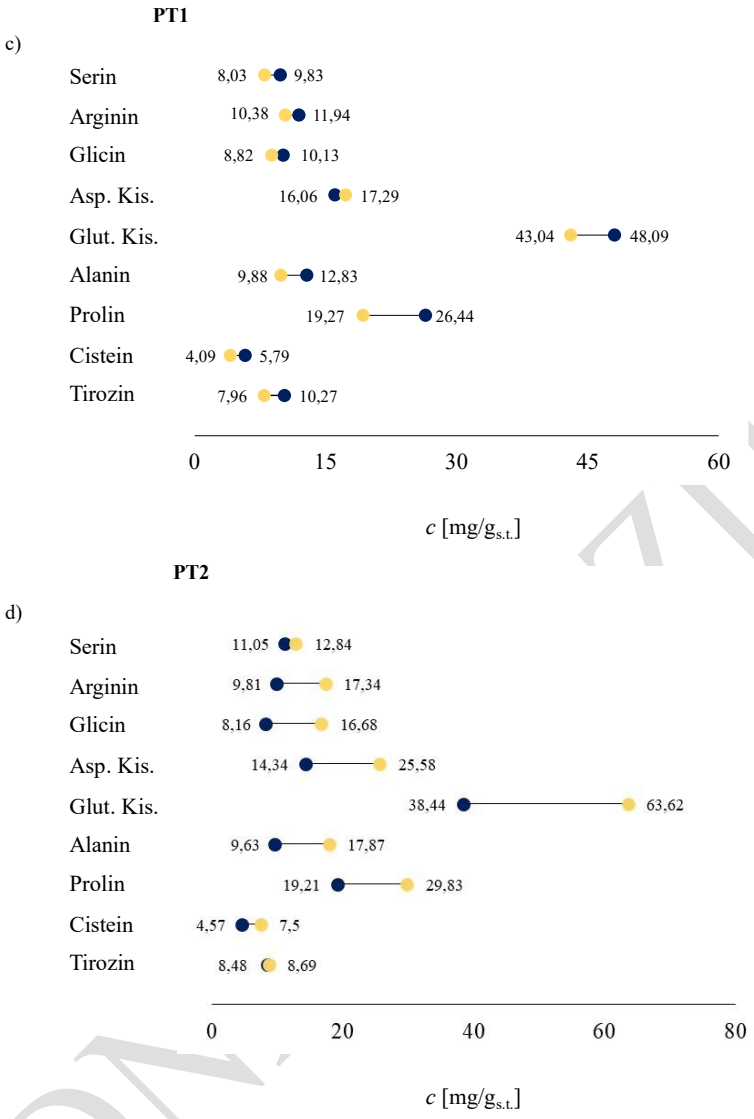
Promjene aminokiselinskog sastava nisu u svim slučajevima pratile promjene udjela sirovih proteina. Navedeno je potrebno razmatrati s obzirom na različitu analitičku osnovu ovih dvaju pokazatelja, budući da se udio sirovih proteina procjenjuje na temelju ukupnog dušika uz primjenu konverzijskog faktora, dok je aminokiselinski sastav određen nakon kisele hidrolize i

RADNA VERZIJA

kromatografske kvantifikacije pojedinačnih aminokiselina. Stoga se promjene udjela sirovih proteina ne mogu izravno poistovjetiti s promjenama koncentracije pojedinačnih aminokiselina.



Slika 17 Profil esencijalnih aminokiselina ● sirovog i ● fermentiranog pivskog tropa nakon 15 dana fermentacije na čvrstim nosačima s *Trametes versicolor*, (a) PT1; (b) PT2. Koncentracije aminokiselina izražene su kao mg/g suhe tvari

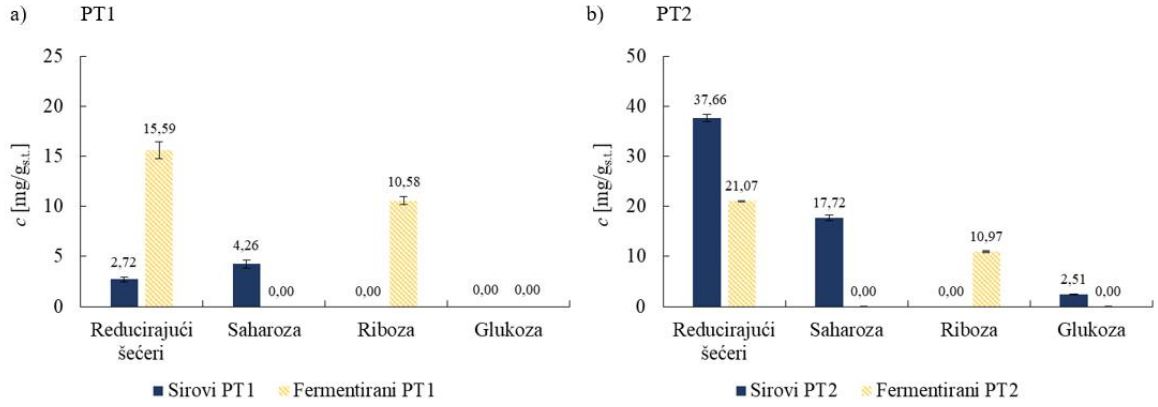


Slika 18 Profil neesencijalnih aminokiselina ▨ sirovog i ● fermentiranog pivskog tropa nakon 15 dana fermentacije na čvrstim nosačima s *Trametes versicolor*, (c) PT1; (d) PT2. Koncentracije aminokiselina izražene su kao mg/g suhe tvari

4.1.4.3. Topljivi ugljikohidrati

Primjena SSF-a s *T. versicolor* rezultirala je različitim promjenama koncentracije reducirajućih šećera u supstratima PT1 i PT2 (**Slika 19**). U supstratu PT1 koncentracija ukupnih reducirajućih šećera povećala se s 2,72 ± 0,22 na 15,59 ± 0,85 $mg_{GE}/g_{s.t.}$, odnosno 5,73 puta (p = 0,037). Suprotno tome, u supstratu PT2 koncentracija reducirajućih šećera smanjila se s 37,66 ± 0,75 na 21,07 ± 0,09 $mg_{GE}/g_{s.t.}$, odnosno 1,79 puta (p = 0,023).

Razlike su utvrđene i u sastavu pojedinačnih topljivih šećera. U sirovom PT1 saharoza je određena u koncentraciji 4,26 ± 0,40 mg $g^{-1}_{s.t.}$, dok nakon fermentacije nije detektirana. Riboza u sirovom PT1 nije bila detektirana, a nakon SSF-a određena je u koncentraciji 10,58 ± 0,42 mg $g^{-1}_{s.t.}$ Sličan obrazac utvrđen je u PT2, u kojem je početna koncentracija saharoze iznosila 17,72 ± 0,54 mg $g^{-1}_{s.t.}$, dok nakon fermentacije saharoza nije detektirana. Riboza prije fermentacije nije bila detektirana, a nakon SSF-a određena je u koncentraciji 10,97 ± 0,23 mg $g^{-1}_{s.t.}$. Glukoza je u sirovom PT2 određena u koncentraciji 2,51 ± 0,05 mg $g^{-1}_{s.t.}$, dok u fermentiranom uzorku nije bila detektirana.



Slika 19 Koncentracija reducirajućih i pojedinačnih šećera tijekom uzgoja *Trametes versicolor* na: (a) PT1 i (b) PT2 . Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± SD. Reducirajući šećeri izraženi su kao mg ekvivalenata glukoze (GE)/g suhe tvari, a pojedinačni šećeri kao mg/g suhe tvari

Razlika u početnoj koncentarciji reducirajućih šećera između supstrata PT1 i PT2 može se povezati s varijabilnošću sastava sirovina i parametrima procesa proizvodnje piva. Širok raspon koncentracije reducirajućih šećera u sirovom pivskom tropu potvrđuju i literaturni podaci; Llimos i sur. (2022) utvrdili su 30 $mg/g_{s.t.}$, dok su Fernandes i sur. (2021) izmjerili 6,7 $mg/g_{s.t.}$. Promjene tijekom SSF-a mogu se povezati s istodobnim oslobađanjem reducirajućih šećera hidrolitičkom razgradnjom polisaharida i njihovim iskorištavanjem kao izvora ugljika u metabolizmu gljive (Zamora Zamora i sur., 2021; Eliopoulos i sur., 2022). Tišma i sur. (2010) tijekom SmF-a potvrdili su sposobnost *T. versicolor* za iskorištavanje glukoze te hidrolizu saharoze djelovanjem invertaze. Pojava riboze nakon SSF-a u oba supstrata može se povezati s hidrolitičkom razgradnjom ugljikohidratnih komponenti PT-a. Mata i sur. (2015) također su

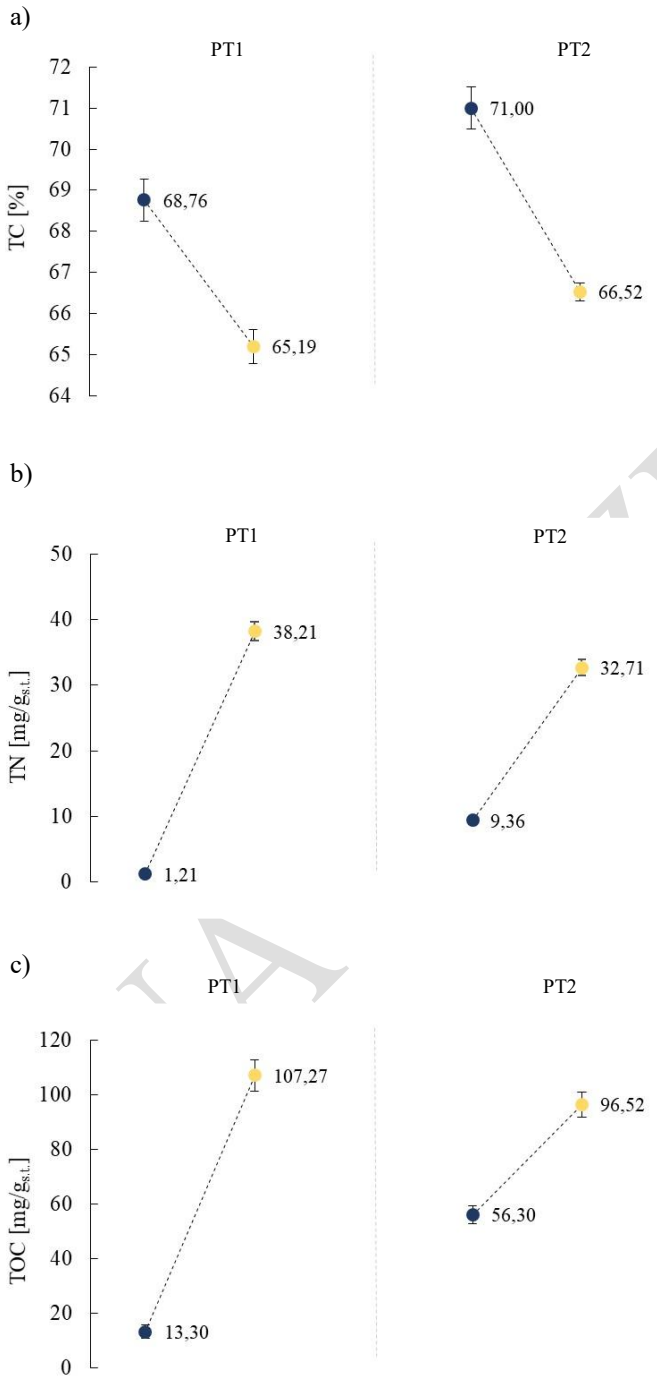
tijekom hidrolize pivskog tropa utvrdili oslobađanje riboze, koja je u uvjetima najveće konverzije činila približno 66 % ukupnih oslobođenih šećera.

4.1.4.4. Ugljik i dušik

Primjena SSF-a s *T. versicolor* rezultirala je promjenama TC-a, TOC-a i TN-a u PT1 i PT2 (**Slika 20**). U PT1 TC se smanjio s 68,76 ± 0,51 % na 65,19 ± 0,42 % nakon 15 dana SSF-a (p = 0,011), dok se u PT2 smanjio sa 71,00 ± 0,51 % na 66,52 ± 0,21 % (p = 0,030). IC nije detektiran ni u jednom analiziranom supstratu.

Suprotno TC-u, TOC se tijekom SSF-a povećao u oba supstrata. U PT1 TOC se povećao s 13,30 ± 2,46 na 107,27 ± 5,77 mg/$g_{s.t.}$, odnosno 8,07 puta (p = 0,016), dok se u PT2 povećao s 56,30 ± 3,20 na 96,52 ± 4,64 mg/$g_{s.t.}$, odnosno 1,71 puta, pri čemu razlika nije bila statistički značajna (p = 0,087). Povećanje je utvrđeno i za TN. U PT1 TN se povećao s 1,21 ± 0,18 na 38,21 ± 1,43 mg/$g_{s.t.}$, odnosno 31,58 puta (p = 0,015). U PT2 povećao se s 9,36 ± 0,66 na 32,71 ± 1,21 mg/$g_{s.t.}$, odnosno 3,49 puta (p = 0,036).

RADNA VERZIJA



Slika 20 Promjene ukupnog ugljika (TC) u čvrstim uzorcima te ukupnog dušika (TN) i ukupnog organskog ugljika (TOC) u vodenim ekstraktima ● sirovog i ● fermentiranog pivskog tropa nakon 15 dana fermentacije na čvrstim nosačima (SSF) s *Trametes versicolor*: (a) TC; (b) TN; (c) TOC. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD)

Smanjenje TC-a u oba supstrata može se povezati s razgradnjom i metaboličkim iskorištavanjem ugljikovih komponenti pivskog tropa tijekom SSF-a s *T. versicolor*. Navedena promjena u skladu je s prethodno utvrđenim gubitkom mase PT1 i PT2 te upućuje na potrošnju ugljikovih spojeva tijekom rasta i metaboličke aktivnosti gljive.

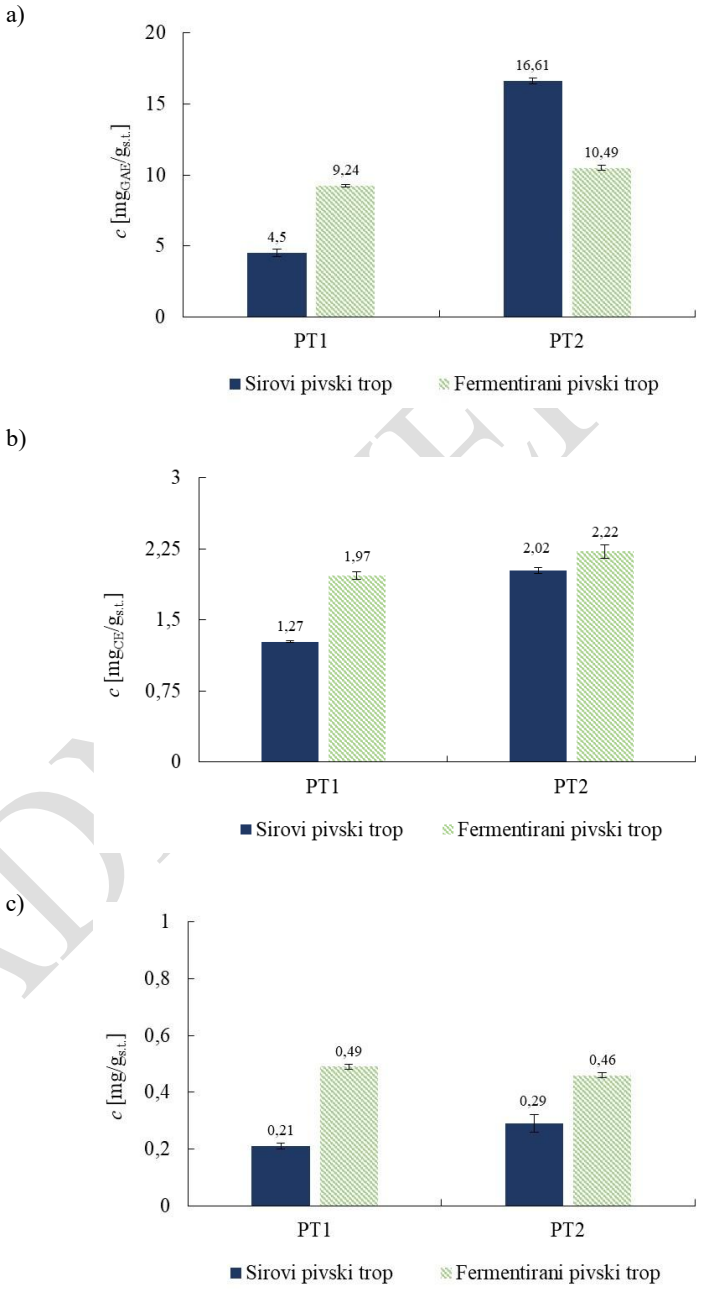
Porast TOC-a nakon SSF-a upućuje na povećanje koncentracije u vodi topivih organskih spojeva, što se može povezati s enzimskom razgradnjom i solubilizacijom organskih komponenti pivskog tropa. Sličnu povezanost između djelovanja hidrolaza, razgradnje lignoceluloznog supstrata i promjena TOC-a u ekstraktu tijekom SSF-a opisali su Bastos i Ribeiro (2020). Ovakva interpretacija u skladu je i s promjenama koncentracija reducirajućih i pojedinačnih šećera utvrđenima u ovom istraživanju, koje dodatno ukazuju na transformaciju ugljikohidratnih komponenti pivskog tropa tijekom SSF-a. Porast TN-a u vodenim ekstraktima nakon SSF-a upućuje na povećanje koncentracije u vodi topivih dušičnih spojeva. Ova promjena može se povezati s razgradnjom i solubilizacijom proteinskih komponenti pivskog tropa tijekom fermentacije. Canedo i sur. (2016) također su tijekom fermentacije pivskog tropa s *R. oligosporus* utvrdili povećanje koncentracije topljivih proteina, što podupire mogućnost prijelaza dijela dušičnih komponenti u topljivije oblike tijekom fermentacije. Različit intenzitet promjena TN-a između supstrata PT1 i PT2 može se povezati s razlikama u njihovom početnom sastavu i posljedično različitom dostupnošću dušičnih komponenti tijekom SSF-a. TN određen u ovom dijelu istraživanja odnosi se na ukupni dušik prisutan u vodenom ekstraktu, preračunat na masu suhe tvari uzorka, te ga je potrebno razlikovati od udjela sirovih proteina određenog Kjeldahlovom metodom. Više vrijednosti TN-a u ekstraktima fermentiranih uzoraka upućuju na veću zastupljenost u vodi ekstrahiranih dušikovih spojeva nakon SSF-a, što se može povezati s promjenama topljivosti i ekstraktabilnosti dušikovih sastavnica tijekom fermentacije. Budući da pojedinačne dušikove frakcije nisu zasebno određivane, izmjereni TN ne može se izravno poistovjetiti sa koncentracijom topljivih proteina.

4.1.4.5. Fenolni spojevi

Nakon 15 dana SSF-a s *T. versicolor* utvrđene su različite promjene koncentracija ukupnih polifenola, flavonoida i proantocijanidina u supstratima PT1 i PT2 (**Slika 21**). U supstratu PT1 koncentracija ukupnih polifenola povećala se s 4,50 ± 0,27 na 16,61 ± 0,20 $mg_{GAE}/g_{s.t.}$, odnosno 3,69 puta (p = 0,017). koncentracija ukupnih flavonoida povećala se s 1,27 ± 0,02 na 2,02 ± 0,02 $mg_{CE}/g_{s.t.}$, odnosno 1,59 puta (p = 0,002). Koncentracija proantocijanidina povećala se s 0,21 ± 0,01 na 0,29 ± 0,03 $mg/g_{s.t.}$, odnosno 1,38 puta (p = 0,137).

RADNA VERZIJA

U supstratu PT2 koncentracija ukupnih polifenola povećala se s 9,24 ± 0,07 na 10,49 ± 0,18 $mg_{GAE}/g_{s.t.}$, odnosno 1,14 puta (p = 0,088), dok se koncentracija ukupnih flavonoida povećala s 1,97 ± 0,04 na 2,22 ± 0,07 $mg_{CE}/g_{s.t.}$, odnosno 1,13 puta (p = 0,198). Za razliku od ukupnih polifenola i flavonoida, koncentracija proantocijanidina se smanjila, s 0,49 ± 0,01 na 0,46 ± 0,01 $mg/g_{s.t.}$, (p = 0,212). Navedene promjene u supstratu PT2 nisu bile statistički značajne.



Slika 21 Koncentracija ukupnih polifenola (a), ukupnih flavonoida (b) i proantocijanidina (c) tijekom uzgoja *Trametes versicolor* na pivskom tropu PT1 i PT2 prije fermentacije (sirovi) i nakon 15 dana fermentacije (fermentirani)

Dobiveni rezultati ukupnih polifenolnih spojeva za PT1 usporedivi su s rezultatima Tišme i sur. (2018), koji su tijekom 14 dana SSF-a pivskog tropa s *T. versicolor* utvrdili povećanje koncentracije ekstrahiranih ukupnih polifenola s 2,5 na 8,7 mg/$g_{s.t.}$, odnosno 3,4 puta. Povećanje koncentracije fenolnih spojeva tijekom SSF-a može se povezati s promjenama njihove ekstraktabilnosti uslijed enzimske modifikacije lignocelulozne matrice. Dio fenolnih spojeva biljne biomase nalazi se u vezanom obliku, pri čemu mogu biti povezani s ligninom i drugim sastavnicama stanične stijenke esterskim i eterskim vezama. Enzimska razgradnja strukturnih sastavnica tijekom SSF-a može pridonijeti oslobađanju dijela tih spojeva i povećanju njihove topljivosti i ekstraktabilnosti (Silva i sur., 2024). Maia i sur. (2020) tijekom SSF-a pivskog tropa eksperimentalno su utvrdili smanjenje omjera vezanih i slobodnih fenolnih spojeva, koje su povezali s oslobađanjem fenolnih sastavnica iz lignocelulozne matrice djelovanjem enzima, uz istodobnu biotransformaciju pojedinih hidroksicimetnih kiselina. Stoga povećanje koncentracije ukupnih polifenola utvrđeno u supstratu PT1 ne mora predstavljati povećanje njihove ukupne količine u biomasi, već može odražavati povećanje ekstraktabilne fenolne frakcije i promjene fenolnog profila tijekom SSF-a. Učinak SSF-a pritom se razlikovao između supstrata PT1 i PT2. Sirovi PT2 je sadržavao približno dvostruko više ukupnih polifenola od sirovog PT1, ali je nakon SSF-a zabilježeno statistički neznačajno povećanje, dok je u fermentiranom PT1 porast bio izražen i statistički značajan. Razlika između dvaju supstrata može biti povezana s njihovim različitim početnim sastavom te zastupljenošću, kemijskim oblikom i dostupnošću fenolnih spojeva u lignoceluloznoj matrici, premda vezanost pojedinačnih fenolnih spojeva u ovom istraživanju nije izravno određivana. Ovisnost promjena fenolnog profila o svojstvima početnog materijala podupiru Maia i sur. (2020), koji su tijekom SSF-a različitih tipova pivskog tropa pokazali da početni supstrat utječe na oslobađanje i transformaciju fenolnih spojeva. Osim sastava supstrata, na intenzitet oslobađanja fenolnih spojeva mogu utjecati i procesni uvjeti SSF-a. Silva i sur. (2024) tijekom SSF-a pivskog tropa s *Rhizopus oryzae* pokazali su značajan utjecaj vlažnosti i veličine čestica na koncentraciju topljivih fenolnih spojeva u metanolu, pri čemu je u optimiranim uvjetima zabilježeno njihovo izrazito povećanje u odnosu na nefermentirani materijal.

Različite promjene ukupnih flavonoida i proantocijanidina mogu odražavati složene procese oslobađanja i transformacije fenolnih spojeva tijekom SSF-a. Maia i sur. (2020) pokazali su da oslobađanje vezane fenolne frakcije pivskog tropa nije nužno praćeno povećanjem svih fenolnih sastavnica, budući da se istodobno mogu odvijati njihove biotransformacije. Stoga

RADNA VERZIJA

povećanje ekstraktabilnosti ukupne fenolne frakcije ne podrazumijeva nužno istosmjerne promjene pojedinih skupina fenolnih spojeva.

Složenost takvih promjena potvrđuju i Šelo i sur. (2024), koji su tijekom 15-dnevnog SSF-a tropa grožđa s *T. versicolor* utvrdili različite obrasce promjena pojedinačnih fenolnih spojeva, pri čemu povećanje njihove ekstraktabilnosti nije zabilježeno za sve analizirane sastavnice. Iako je istraživanje provedeno na drugom lignoceluloznom supstratu, rezultati pokazuju da biološka obrada s *T. versicolor* može različito utjecati na koncentracije pojedinačnih fenolnih spojeva i ukupni sadržaj fenola. Analiza pojedinačnih fenolnih spojeva omogućila je detaljniji uvid u promjene fenolnog profila PT1 i PT2 nakon SSF-a (**Tablica 8**). Fenolnu frakciju pivskog tropa čine različite hidroksicimetne i hidroksibenzojeve kiseline te flavonoidi, pri čemu se ferulinska i *p*-kumarinska kiselina u literaturi najčešće izdvajaju kao dominantne fenolne kiseline, dok su siringinska, vanilinska, *p*-hidroksibenzojeva i 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina te katehin prisutni u manjim koncentracijama (Zeko-Pivač i sur., 2022). Maia i sur. (2020) također su u analiziranim uzorcima pivskog tropa među najzastupljenijim fenolnim spojevima utvrdili ferulinsku, *p*-kumarinsku i kafeinsku kiselinu.

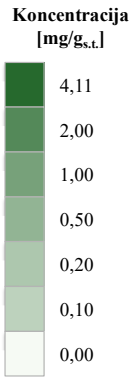
U ovom istraživanju posebno je značajna usklađenost promjena u PT1 i PT2, unatoč razlikama u početnim koncentracijama pojedinačnih spojeva. U oba supstrata nakon SSF-a značajno su se povećale koncentracije siringinske i 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline te katehina, dok se koncentracija *p*-hidroksibenzojeve kiseline značajno smanjila. Slične promjene fenolnog profila opisane su tijekom SSF-a tropa grožđa s *T. versicolor*. Šelo i sur. (2024) utvrdili su povećanje ekstraktabilnosti za više pojedinačnih fenolnih spojeva, ali ne za sve analizirane sastavnice, što potvrđuje selektivan učinak biološke obrade na pojedine sastavnice fenolne frakcije (Šelo i sur., 2024). Razlike između istraživanja potvrđuju da promjene pojedinačnih fenolnih spojeva tijekom SSF-a treba razmatrati u kontekstu primijenjenog lignoceluloznog supstrata i njegovih početnih svojstava.

Tablica 8 Koncentracije pojedinačnih fenolnih spojeva u sirovom pivskom tropu PT1 i PT2 te nakon 15 dana fermentacije na čvrstim nosačima (SSF) s *Trametes versicolor*. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD), u mg $g^{-1}_{s.t.}$. Vrijednosti označene

RADNA VERZIJA

zvjezdicom (*) statistički se značajno razlikuju od odgovarajućeg sirovog uzorka ($p < 0,05$). – nije detektirano primijenjenom analitičkom metodom.

Fenolni spoj	PT1		PT2	
	Sirovi	Fermentirani	Sirovi	Fermentirani
Hidroksibenzojeve kiseline				
p-hidroksibenzojeva kiselina	0,02 ± 0,00	**0,01 ± 0,00***	0,22 ± 0,02	**0,00 ± 0,00***
siringinska kiselina	0,03 ± 0,00	**0,22 ± 0,00***	0,01 ± 0,00	**0,64 ± 0,00***
3,4-dihidroksibenzojeva kiselina	0,46 ± 0,00	**4,11 ± 0,01***	0,02 ± 0,00	**0,13 ± 0,00***
vanilinska kiselina	–	–	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,00
Flavan-3-oli				
katehin	0,15 ± 0,01	**1,30 ± 0,03***	0,19 ± 0,01	**0,90 ± 0,02***
epikatehin	0,09 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,06 ± 0,00
Hidroksicimetne kiseline				
p-kumarinska kiselina	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,00 ± 0,00	**0,01 ± 0,00***
o-kumarinska kiselina	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
Flavonoli				
kaempferol	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,00	–	–



4.1.5. Procjena analiziranih pokazatelja sigurnosti pivskog tropa nakon fermentacije s *Trametes versicolor* za potencijalnu primjenu u hranidbi životinja

Pivski trop predstavlja nutritivno vrijedan nusproizvod pivarske industrije, ponajprije zbog udjela proteina, vlakana i mineralnih elemenata, što omogućuje njegovo razmatranje kao potencijalne komponente hrane za životinje (Lynch i sur., 2016). Međutim, procjena prikladnosti pivskog tropa za ovu namjenu, uz karakterizaciju njegova nutritivnog sastava, zahtijeva i utvrđivanje prisutnosti nepoželjnih tvari koje mogu ograničiti njegovu primjenu. Među njima su osobito relevantni mikotoksini, čija prisutnost može biti povezana s kontaminacijom ječma i slada te uvjetima skladištenja ovog mikrobiološki nestabilnog nusproizvoda (Bianco i sur., 2020). Mineralni sastav predstavlja dodatni kriterij u procjeni kvalitete pivskog tropa kao potencijalnog krmiva. Dok pojedini mineralni elementi imaju esencijalne fiziološke funkcije, elementi poput arsena, kadmija i olova nemaju dokazanu biološku funkciju te se njihova prisutnost u hrani za životinje razmatra prvenstveno sa sigurnosnog aspekta (Hejna i sur., 2018). Stoga je u sirovim i fermentiranim uzorcima PT1 i PT2 provedeno određivanje mineralnih elemenata, metala i metaloida te ciljana analiza nepoželjnih tvari koja je obuhvatila mikotoksine, PCB-e, PAH-ove, ergot alkaloide i tropan

RADNA VE

alkaloide. Dobiveni rezultati razmatrani su u kontekstu procjene sigurnosti pivskog tropa nakon SSF-a s *T. versicolor* i njegove potencijalne primjene u hranidbi životinja.

4.1.5.1. Mineralni elementi, metali i metaloidi

Rezultati koncentracije mineralnih elemenata, metala i metaloida u sirovim i fermentiranim uzorcima PT1 i PT2 prikazani su u **Tablici 9**. Nakon 15 dana SSF-a s *T. versicolor* u oba je supstrata zabilježeno povećanje udjela fosfora te koncentracije kalcija i željeza. Koncentracija kalija smanjila se u supstratu PT1, dok je u supstratu PT2 nakon fermentacije bila viša u odnosu na sirovi uzorak. Nakon SSF-a u oba su supstrata utvrđene više koncentracije olova, kadmija i arsena.

Tablica 9 Maseni udjeli odabranih elemenata u uzorcima pivskog tropa PT1 i PT2 prije i nakon 15 dana SSF-a s *Trametes versicolor*

Element	Sirovi PT1	Fermentirani PT1	Sirovi PT2	Fermentirani PT2
Fosfor [%]	0,48	0,60	0,66	0,80
Kalcij [mg/kg]	2073	2456	2763	2994
Kalij [mg/kg]	586	499	722	936
Željezo [mg/kg]	173	220	103	113
Olovo [mg/kg]	0,049	0,064	0,025	0,033
Kadmij [mg/kg]	0,039	0,048	0,044	0,057
Arsen [mg/kg]	0,032	0,039	< 0,010	0,013

Povećanje udjela fosfora, kalcija i željeza nakon SSF-a može se povezati s relativnim obogaćivanjem mineralne frakcije uslijed smanjenja mase organske tvari tijekom fermentacije. Metaboličkim iskorištavanjem organskih komponenti supstrata dio ugljika gubi se respiracijom u obliku CO_2, čime se smanjuje ukupna suha masa, dok se mineralni elementi posljedično koncentriraju u preostalom fermentiranom materijalu (Abbasi i sur., 2026). Navedeno je u skladu s prethodno utvrđenim gubitkom mase PT1 i PT2 tijekom SSF-a s *T. versicolor*. Različit smjer promjene koncentracije kalija u PT1 i PT2 može se povezati s razlikama u početnom sastavu supstrata i iskorištavanju mineralnih elemenata tijekom metaboličke aktivnosti gljive.

RADNA VERZIJA

Sa sigurnosnog aspekta, koncentracije olova, kadmija i arsena u sirovim i fermentiranim uzorcima bile su znatno niže od maksimalnih razina propisanih Direktivom 2002/32/EC o nepoželjnim tvarima u hrani za životinje. Propisane maksimalne razine iznose 10 mg/kg za olovo, 1 mg/kg za kadmij u krmivima biljnog podrijetla i 2 mg/kg za arsen, uz vrijednosti izražene za krmivo s 12 % udjela vlage (Directive 2002/32/EC). Najviše koncentracije utvrđene u ovom istraživanju iznosile su 0,064 mg/kg za olovo, 0,057 mg/kg za kadmij i 0,039 mg/kg za arsen. Stoga maseni udio analiziranih metala i metaloida, prema navedenim regulatornim kriterijima, nije predstavljao ograničavajući čimbenik za potencijalnu primjenu fermentiranog pivskog tropa u hranidbi životinja.

4.1.5.2. Nepoželjne tvari

Rezultati određivanja nepoželjnih tvari u sirovim i fermentiranim uzorcima PT1 i PT2 prikazani su u **Tablici 10**. Koncentracije analiziranih mikotoksina bile su ispod granica kvantifikacije (LOQ) primijenjenih analitičkih metoda, osim ukupnih aflatoksina u sirovom uzorku PT2, čija je koncentracija iznosila 0,003 mg/kg. Nakon 15 dana koncentracija ukupnih aflatoksina u fermentiranom PT2 bila je ispod LOQ-a (< 0,003 mg/kg). U fermentiranim uzorcima PT1 i PT2 koncentracije svih analiziranih mikotoksina bile su ispod odgovarajućih LOQ vrijednosti. Koncentracije analiziranih PCB-a i PAH-ova bile su ispod odgovarajućih granica kvantifikacije u sirovim i fermentiranim uzorcima PT1 i PT2. Isti je rezultat utvrđen za pojedinačne ergot alkaloide i njihove ukupne koncentracije te za tropan alkaloide atropin i skopolamin.

Nakon 15 dana SSF-a s *T. versicolor* koncentracije svih analiziranih nepoželjnih tvari u fermentiranim uzorcima PT1 i PT2 bile su ispod granica kvantifikacije primijenjenih analitičkih metoda.

RADNA VERZIJA

Tablica 10 Nepoželjne tvari u sirovim uzorcima PT1 i PT2 te nakon 15 dana SSF-a s *Trametes versicolor*

RADNA VERZIJA

Nepoželjna tvar	Sirovi PT1	Fermentirani PT1	Sirovi PT2	Fermentirani PT2
NITRATI I NITRITI [mg/kg]				
Nitrati	< 50	< 50	59,5	< 50
Nitriti	< 50	< 50	< 50	< 50
MIKOTOKSINI [mg/kg]				
Aflatoksin B_1	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Aflatoksin B_2	< 0,0005	< 0,0005	< 0,0005	< 0,0005
Aflatoksin G_1	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Aflatoksin G_2	< 0,0005	< 0,0005	< 0,0005	< 0,0005
Ukupni aflatoksini	< 0,003	< 0,003	0,003	< 0,003
Deoksinivalenol	< 0,20	< 0,20	< 0,20	< 0,20
Fumonizin B_1	< 0,15	< 0,15	< 0,15	< 0,15
Fumonizin B_2	< 0,15	< 0,15	< 0,15	< 0,15
Ukupni fumonizini	< 0,30	< 0,30	< 0,30	< 0,30
Zearalenon	< 0,030	< 0,030	< 0,030	< 0,030
Okratoksin A	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
MIKOTOKSINI [µg/kg]				
T-2 toksin	< 10	< 10	< 10	< 10
HT-2 toksin	< 10	< 10	< 10	< 10
T-2 + HT-2 toksini	< 20	< 20	< 20	< 20
POLIKLORIRANI BIFENILI (PCB) [mg/kg]				
Ukupni PCB	< 0,0050	< 0,035	< 0,035	< 0,035
PCB 28	< 0,0050	< 0,0050	< 0,0050	< 0,0050
PCB 52	< 0,0050	< 0,0050	< 0,0050	< 0,0050
PCB 101	< 0,0050	< 0,0050	< 0,0050	< 0,0050
PCB 118	< 0,0050	< 0,0050	< 0,0050	< 0,0050
PCB 138	< 0,0050	< 0,0050	< 0,0050	< 0,0050

RADNA VERZIJA

PCB 153	< 0,0050	< 0,0050	< 0,0050	< 0,0050
PCB 180	< 0,0050	< 0,0050	< 0,0050	< 0,0050
POLICIKLIČKI AROMATSKI UGLJIKOVODICI (PAH) [mg/kg]				
Benzo(a)antracen	< 0,0050	< 0,0050	< 0,0050	< 0,0050
Benzo(a)piren	< 0,0050	< 0,0050	< 0,0050	< 0,0050
Krizen	< 0,0050	< 0,0050	< 0,0050	< 0,0050
Benzo(b)fluoranten	< 0,0050	< 0,0050	< 0,0050	< 0,0050
Zbroj PAH-ova	< 0,020	< 0,020	< 0,020	< 0,020
ERGOT ALKALOIDI [µg/kg]				
Ergokristinin	< 10	< 10	< 10	< 10
Ergokristin	< 10	< 10	< 10	< 10
Ergotaminin	< 10	< 10	< 10	< 10
Ergotamin	< 10	< 10	< 10	< 10
Ergokriptinin	< 10	< 10	< 10	< 10
α-Ergokriptin	< 10	< 10	< 10	< 10
Ergokorninin	< 10	< 10	< 10	< 10
Ergokornin	< 10	< 10	< 10	< 10
Ergozinin	< 10	< 10	< 10	< 10
Ergozin	< 10	< 10	< 10	< 10
Ergometrinin	< 10	< 10	< 10	< 10
Ergometrin	< 10	< 10	< 10	< 10
Ukupni ergot alkaloidi	< 120	< 120	< 120	< 120
TROPAN ALKALOIDI [µg/kg]				
Atropin	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
Skopolamin	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0

RADNA VERZIJA

Koncentracije nitrata su u supstratu PT1 prije i nakon fermentacije bile ispod granice kvantifikacije (< 50 mg/kg), dok se u supstratu PT2 koncentracija smanjila s 59,5 mg/kg u sirovom uzorku na vrijednost ispod granice kvantifikacije. Koncentracije nitrita u svim uzorcima bile su ispod granice kvantifikacije (< 50 mg/kg). Direktiva 2002/32/EC propisuje maksimalnu koncentraciju nitrita od 15 mg/kg za potpune krmne smjese, ali ne definira odgovarajuću maksimalnu razinu za pivski trop kao pojedinačno krmivo. Za nitrate također nije propisana maksimalna razina primjenjiva na pivski trop. Stoga rezultati nitrata i nitrita nisu izravno uspoređivani s regulatornim graničnim vrijednostima. Prisutnost mikotoksina u pivskom tropu relevantna je za procjenu njegove sigurnosti kao potencijalnog krmiva, pri čemu regulatorni okvir Europske unije razlikuje maksimalne dopuštene razine od orijentacijskih i indikativnih vrijednosti. Direktiva 2002/32/EC propisuje maksimalnu koncentraciju aflatoksina B_1 od 0,02 mg/kg za krmiva, izraženo za krmivo s 12 % udjela vlage (Directive 2002/32/EC). U svim sirovim i fermentiranim uzorcima PT1 i PT2 koncentracija aflatoksina B_1 bila je < 0,001 mg/kg, odnosno ispod propisane dozvoljene koncentracije. U sirovom PT2 utvrđeno je 0,003 mg/kg ukupnih aflatoksina, dok je nakon SSF-a njihova koncentracija bila < 0,003 mg/kg. Budući da Direktiva 2002/32/EZ za krmiva propisuje najveću dopuštenu koncentraciju aflatoksina B_1 od 20 µg/kg pri udjelu vlage od 12 %, procjena usklađenosti s tom graničnom vrijednošću temelji se na koncentraciji aflatoksina B_1, a ne na zbroju koncentracija analiziranih aflatoksina.

Za deoksinivalenol, zearalenon i okratoksin A preporuka Komisije 2006/576/EC utvrđuje orijentacijske vrijednosti za žitarice i proizvode od žitarica namijenjene hranidbi životinja od 8 mg/kg, 2 mg/kg i 0,25 mg/kg, izraženo za krmivo s 12 % udjela vlage (Commission Recommendation 2006/576/EC). Pivski trop kao proizvod dobiven preradom žitarica obuhvaćen je širim pojmom proizvoda od žitarica prema ovoj Preporuci, koja dodatno naglašava potrebu praćenja mikotoksina u nusproizvodima i koproizvodima proizvodnje hrane namijenjenima hranidbi životinja. Koncentracije sva tri mikotoksina u PT1 i PT2 bile su ispod granica kvantifikacije primijenjenih metoda.

U svim uzorcima zbroj koncentracija toksina T-2 i HT-2 bio je manji od 20 µg/kg. Preporuka Komisije 2013/165/EU za ostale proizvode od žitarica namijenjene hranidbi životinja navodi indikativnu vrijednost od 500 µg/kg, također pri 12 % udjela vlage (Commission Recommendation 2013/165/EU).

RADNA VERZIJA

Direktiva 2002/32/EZ za krmiva biljnog podrijetla propisuje maksimalnu koncentraciju od 10 µg/kg za zbroj PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 i PCB 180, izraženo za krmivo s 12 % udjela vlage (Directive 2002/32/EC). Koncentracije svih analiziranih pojedinačnih PCB-a bile su ispod granice kvantifikacije primijenjene analitičke metode. Međutim, ta je granica bila previsoka za pouzdanu procjenu njihove ukupne koncentracije u odnosu na primjenjive regulatorne kriterije. Stoga na temelju dobivenih rezultata nije moguće donijeti konačan zaključak o sukladnosti s propisanom graničnom vrijednošću za ukupnu koncentraciju PCB-a. Koncentracije analiziranih PAH-ova, ergot alkaloida te tropan alkaloida atropina i skopolamina bile su ispod granica kvantifikacije primijenjenih metoda u svim sirovim i fermentiranim uzorcima. Budući da za navedene pojedinačne spojeve u pivskom tropu nisu utvrđene izravno primjenjive maksimalne razine u Direktivi 2002/32/EC, njihovi rezultati nisu korišteni za izravnu regulatornu usporedbu.

Uzimajući u obzir dobivene rezultate i primjenjive regulatorne kriterije Europske unije, u fermentiranim uzorcima PT1 i PT2 nisu utvrđene koncentracije analiziranih nepoželjnih tvari koje bi, prema razmatranim parametrima, ograničavale potencijalnu primjenu PT-a u hranidbi životinja.

4.2. Biološka obrada pivskog tropa gljivom *Thermomyces lanuginosus*

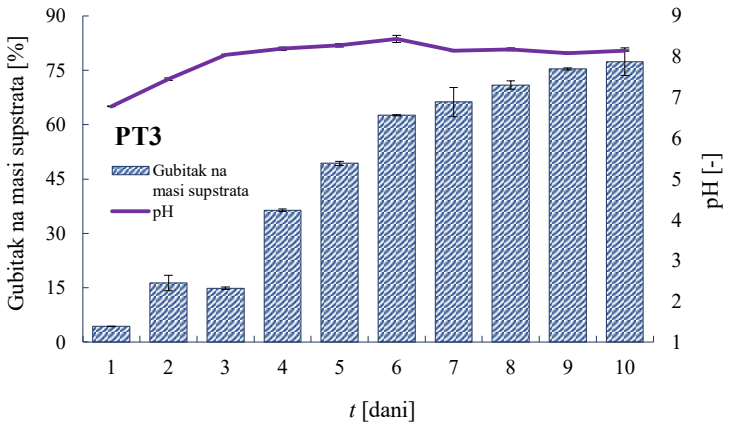
Biološka obrada pivskog tropa s *T. lanuginosus* temelji se na sposobnosti gljive da sintetizira ekstracelularne hidrolitičke enzime koji kataliziraju hidrolizu strukturnih polisaharida. Takva obrada rezultira fermentiranim pivskim tropom izmijenjenog kemijskog sastava i strukturnih svojstava koji može imati povećanu dostupnost hranjivih tvari, poboljšanu probavljivost ili veću podložnost daljnjoj (bio)konverziji. Navedene promjene mogu povećati potencijal primjene pivskog tropa u hranidbi životinja ili kao sirovine za proizvodnju prehrambenih dodataka, biogoriva, biognojiva i platformnih kemikalija.

Stoga je u prvom dijelu ovog istraživanja učinkovitost biološke obrade pivskog tropa s *T. lanuginosus* analizirana praćenjem gubitka mase te promjenom udjela suhe tvari i pH supstrata tijekom vremena **(4.2.1.)**. Dodatno, mjerena je aktivnost hidrolitičkih (ksilanaza i β-glukozidaza) **(4.2.2.)** kako bi se procijenio potencijal gljive za proizvodnju enzima visoke aktivnosti od interesa za daljnju biotehnološku primjenu.

RADNA VERZIJA

4.2.1. Promjena mase i pH tijekom fermentacije na čvrstim nosačima s *Thermomyces lanuginosus*

Promjene gubitka mase i pH prikazane su na **Slici 22**. Tijekom fermentacije zabilježen je izražen trend gubitka mase supstrata, s 4,35 ± 0,05 % prvog dana na 77,42 ± 3,82 % desetog dana fermentacije. pH je tijekom prva tri dana porastao s 6,79 ± 0,01 na 8,05 ± 0,01, dok je najveća vrijednost od 8,44 ± 0,08 utvrđena šestog dana. Nakon toga pH se nije znatnije mijenjao te je desetog dana iznosio 8,15 ± 0,01.

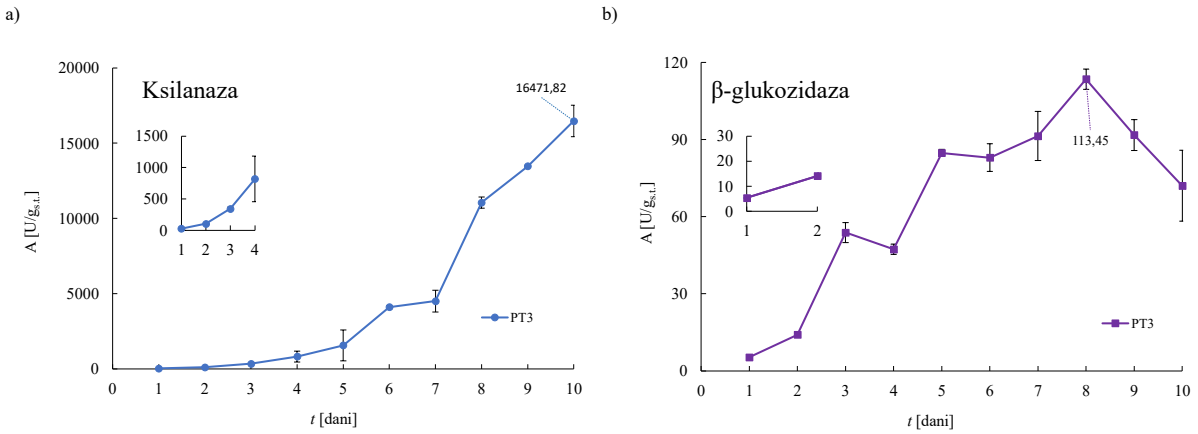


Slika 22 Gubitak na masi i pH-vrijednost tijekom uzgoja *Thermomyces lanuginosus* na pivskom tropu PT 3. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

Kontinuirano smanjenje mokre mase, uz znatno manju promjenu apsolutne mase suhe tvari, upućuje na to da je najveći dio gubitka ukupne mase tijekom fermentacije bio povezan s gubitkom vode. Takav je učinak i očekivan u ventiliranom sustavu pri 45 °C, u kojem dolazi do isparavanje vode. Stoga se gubitak mase supstrata ne može izravno poistovjetiti s razgradnjom organske tvari jer, osim promjena povezanih s metaboličkom aktivnošću gljive, uključujući respiracijske gubitke ugljika u obliku CO_2, obuhvaća i gubitak vode.

4.2.2. Aktivnost hidrolitičkih enzima iz *Thermomyces lanuginosus*

Rezultati aktivnosti ksilanaze i β-glukozidaze prikazani su na **Slici 23**. Aktivnost ksilanaze povećavala se tijekom vremena te je najveća vrijednost od 16 471,82 ± 1 044,61 U/$g_{s.t.}$. zabilježena desetog dana. Aktivnost β-glukozidaze također je rasla tijekom vremena, a najveća vrijednost od 113,45 ± 3,94 U/$g_{s.t.}$. utvrđena je osmog dana. Nakon toga se smanjivala te je desetog dana iznosila 72,03 ± 13,83 U/$g_{s.t.}$.



Slika 23 Aktivnosti hidrolitičkih enzima tijekom uzgoja *Thermomyces lanuginosus* na pivskom tropu PT3: (a) ksilanaza i (b) β-glukozidaza. Umetnuti grafikoni prikazuju aktivnosti enzima tijekom početnog razdoblja fermentacije radi jasnijeg prikaza nižih vrijednosti aktivnosti. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD) (*n* = 2)

Ksilanaza katalizira hidrolizu hemicelulozne frakcije lignocelulozne biomase i to hidrolizu unutarnjih β-1,4-glikozidnih veza u glavnom lancu ksilana, pri čemu nastaju kraći ksilooligosaharidi. Razgradnja strukturno heterogenih ksilana uključuje i djelovanje pomoćnih enzima koji uklanjaju supstituente s glavnog polisaharidnog lanca (Raheja i sur., 2025; Samantaray i sur., 2024). S obzirom na zastupljenost arabinoksilana u hemiceluloznoj frakciji pivskog tropa, sastav ovog supstrata osigurava odgovarajuću ugljikohidratnu osnovu za proizvodnju ksilanolitičkih enzima. Proizvodnja ksilanaze s *T. lanuginosus* tijekom SSF-a istraživana je na različitim lignoceluloznim supstratima. Christopher i sur., (2005) istraživali su proizvodnji ksilanze tijekom uzgoja na pulpi bagase. Gaffney i sur. (2009) na pšeničnim mekinjama pri 45 °C nakon 40 h fermentacije navode aktivnost od 2 335 U/g, dok u radu Fan (2012) tijekom SSF-a s *T. lanuginosus* CAU44 na smjesi kukuruznih oklasaka i pšeničnih mekinja (4:6), pri 50 °C, nakon sedam dana postignuta aktivnost od 20 343 U/g suhog supstrata. Proizvodnja ksilanaze na pivskom tropu istraživana je i primjenom drugih vrsta filamentoznih gljiva. Morán-Aguilar i sur. (2021) navode 1 400,80 U/$g_{s.t.}$ za *Aspergillus niger* na pivskom tropu, dok su Liguori i sur. (2021) s *A. niger* LPB-334 utvrdili 1 315,15 ± 37,5 U/$g_{s.t.}$. Za *Mucor* sp. na prethodno obrađenom pivskom tropu zabilježena je aktivnost od 67 U/$g_{s.t.}$ (Hassan i sur., 2020).

RADNA VERZIJA

β-glukozidaza katalizira završni korak hidroliuze celuloze, katalizira hidrolizu celobioze i kratkih celooligosaharida do glukoze. Proizvodnju β-glukozidaze s *T. lanuginosus* tijekom SSF-a na različitim lignoceluloznim supstratima ispitivao je Ulian (2016). Na pšeničnim mekinjama, pri 70 % početne vlage i temperaturi od 45 °C, nakon 192 h fermentacije utvrđena je aktivnost od 117,1 ± 2,5 U/g suhog supstrata. U radu Lojananan i sur. (2024) primjenom *Trichoderma* sp. na pivskom tropu primjenom SSF-a i SmF-a utvrđena je aktivnost od 16,97 ± 0,77 U/g pivskog tropa.

Praćenjem aktivnosti hidrolitičkih i ligninolitičkih enzima tijekom SSF-a utvrđene su razlike u njihovim aktivnostima ovisno o primijenjenoj gljivi i uzorku pivskog tropa. S obzirom na visoku aktivnost ksilanaze utvrđenu tijekom SSF-a PT3 s *T. lanuginosus* ksilanaza je odabrana za djelomično pročišćavanje (**4.2.3.**), karakterizaciju (**4.2.4.**) i istraživanje u hidrolizi lignoceluloznih supstrata (**4.2.5.**).

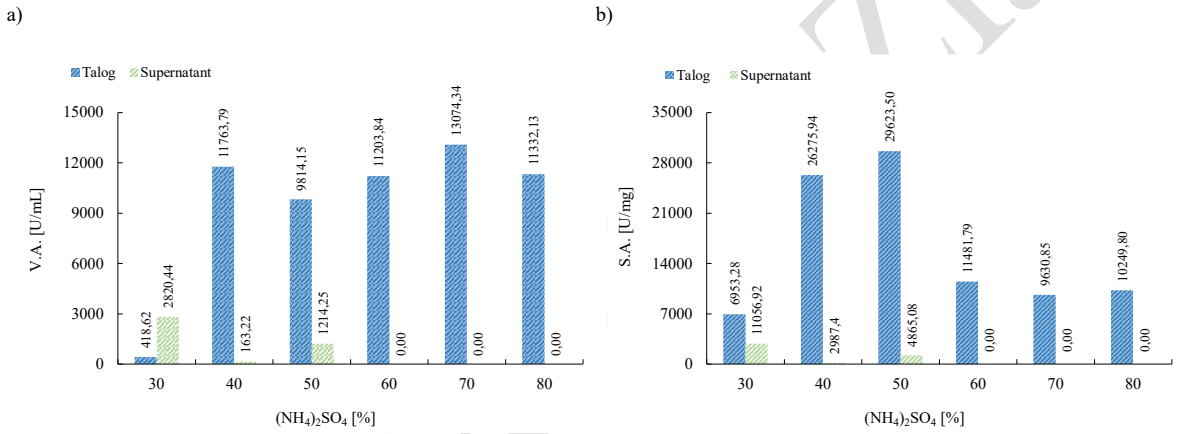
4.2.3. Djelomično pročišćavanje ksilanaze iz *Thermomyces lanuginosus*

Na temelju visokih aktivnosti postignutih u prethodnim istraživanjima, ksilanaza je među svim ispitivanim enzimima prepoznata kao enzim s najvećim potencijalom za komercijalnu primjenu te je odabrana za pročišćavanje. U tu je svrhu provedena nova fermentacija supstrata PT3 s T. lanuginosus prema postupku opisanom u poglavlju 3.3.4.1.Ekstrakcijomfermentiranog supstrata dobiven je sirovi enzimski ekstrakt koji je liofiliziran radi skladištenja i daljnjeg djelomičnog pročišćavanja. Liofilizacijom 100 mL sirovog enzimskog ekstrakta dobiveno je 3,22 g liofilizata. Aktivnost ksilanaze prije liofilizacije iznosila je 3568,94 U/mL, dok je nakon rekonstitucije odgovarajuće količine liofilizata izmjerena vrijednost od 3964,93 U/mL, što je približno 11,1 % više u odnosu na početnu vrijednost. Rekonstituirani pripravak korišten je kao SE u daljnjem postupku djelomičnog pročišćavanja.

Taloženje amonijevim sulfatom primijenjeno je kao početni korak djelomičnog pročišćavanja ksilanaze. Taloženje amonijevim sulfatom temelji se na promjeni topljivosti proteina pri povećanjem ionske jakosti otopine. Povećanjem koncentracije amonijeva sulfata smanjuje se dostupnost molekula vode koje potrebnih zaodržavanju hidratacijskog sloja proteina, što dovodi do smanjenja njihove topljivosti i taloženja (engl. *salting-out*). Razlike u topljivosti pojedinih proteina pri određenim koncentracijamasoli, omogućuju njihovo frakcioniranje postupnim povećanjem zasićenja amonijevim sulfatom te koncentriranje ciljnog proteina iz sirovog enzimskog ekstrakta (Akyüz, 2024). U prethodnim istraživanjima pročišćavanja ksilanaze

RADNA VERZIJA

primijenjeno je frakcioniranje kroz više stupnjeva zasićenja amonijevim sulfatom. Dhaver i sur. (2022) ispitali su raspon od 20 do 80 %, pri čemu je za daljnje pročišćavanje odabrana frakcija s najvećom izmjerenom aktivnošću ksilanaze. Abena i Simachew (2024) primijenili su uzastopne intervale zasićenja amonijevim sulfatom do 80 %, dok su Zhang i sur. (2023b) ispitali pojedinačne stupnjeve zasićenja od 20 do 90 %, uz praćenje raspodjele enzimske aktivnosti između taloga i supernatanta. U ovom su istraživanju ispitani stupnjevi zasićenja amonijevim sulfatom od 30, 40, 50, 60, 70 i 80 %, pri čemu jeodređena je u talogu i supernatantu radi odabira odgovarajućeg stupnja zasićenja za daljnje djelomično pročišćavanje (**Slika 24**).



Slika 24 Volumna (a) i specifična aktivnost (b) ksilanaze u proteinskom talogu i supernatantu pri različitim stupnjevima zasićenja amonijevim sulfatom tijekom djelomičnog pročišćavanja ksilanaze iz *Thermomyces lanuginosus*

Učinkovitost frakcioniranja ksilanaze procijenjena je na temelju faktora pročišćavanja i prinosa pri različitim stupnjevima zasićenja amonijevim sulfatom (**Tablica 11**). Najveći faktor pročišćavanja u početnom ispitivanju, 2,81, postignut je pri 50 % zasićenja, uz prinos od 37,13 %. Pri višim stupnjevima zasićenja postignut je veći prinos, ali uz niže faktore pročišćavanja, što je u skladu s prethodno utvrđenim smanjenjemspecifične aktivnosti zbog taloženja većeg udjela ukupnih proteina. Na temelju postignutih vrijednosti specifične aktivnosti i faktora pročišćavanja, za nastavak postupka odabrano je taloženje ksilanaze amonijevim sulfatom pri zasićenju od 50 %. Nakon dijalize faktor pročišćavanja iznosio je 2,91, a prinos 39,48 %, uz minimalnu promjenu u odnosu na frakciju prije dijalize. Budući da se specifična aktivnost nakon dijalize nije znatnije promijenila, dijalizom je omogućeno uklanjanje amonijeva sulfata

RADNA VERZIJA

i drugih niskomolekularnih komponenti iz enzimskog pripravka, uz očuvanje aktivnosti ksilanaze. Sličan stupanj pročišćavanja zabilježili su Kocabaş i sur. (2015) za ksilanazu iz *Scytalidium thermophilum*, pri čemu je taloženjem pri 50 % zasićenja amonijevim sulfatom postignuto 2,5-struko povećanje specifične aktivnosti uz 52 % prinosa. Pal i Khanum (2011) frakcijskim su taloženjem ksilanaze iz *A. niger* DFR-5 pri zasićenju amonijevim sulfatom od 30–65 % postigli 3,76-struko pročišćavanje uz prinos od 81,9 %. Razlike u faktoru pročišćavanja i prinosu mogu proizlaziti iz svojstava ksilanaze, sastava početnog enzimskog ekstrakta te primijenjenih uvjeta frakcioniranja.

Tablica 11 Parametri djelomičnog pročišćavanja ksilanaze iz *Thermomyces lanuginosus* pri različitim stupnjevima zasićenja amonijevim sulfatom i nakon dijalize

Korak pročišćavanja	Faktor pročišćavanja	Prinos [%]	Faktor koncentriranja
30 % amonijeva sulfata	0,66	1,58	6,67
40 % amonijeva sulfata	2,49	44,50	6,67
50 % amonijeva sulfata	**2,81**	**37,13**	**6,67**
60 % amonijeva sulfata	1,09	42,39	6,67
70 % amonijeva sulfata	0,91	49,46	6,67
80 % amonijeva sulfata	0,97	42,87	6,67
50 % amonijeva sulfata – ponovljeni postupak	**2,92**	**40,68**	**6,67**
Dijaliza	2,91	39,48	6,67

4.2.4. Karakterizacija sirovog i djelomično pročišćenog pripravka ksilanaze iz *Thermomyces lanuginosus*

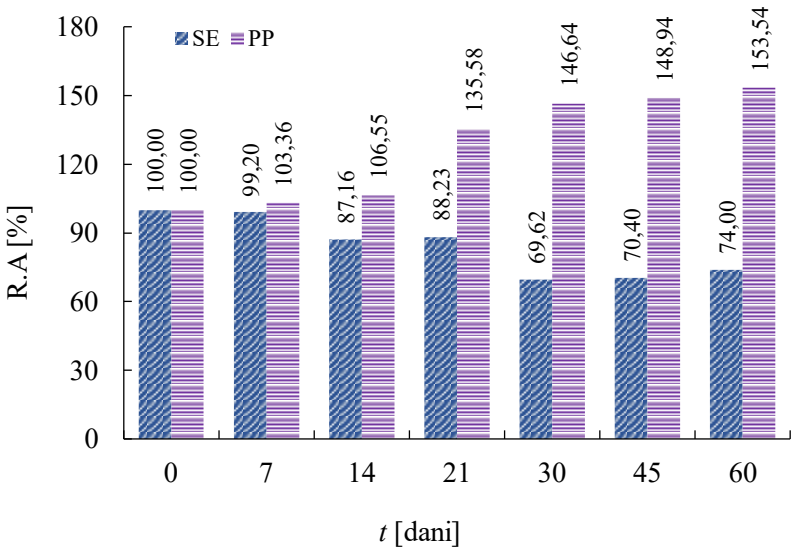
Karakterizacija enzimskih pripravaka omogućuje određivanje njihovih katalitičkih svojstava i stabilnosti u različitim uvjetima te procjenu prikladnosti za daljnju primjenu. Aktivnost i stabilnost ksilanaza pri različitim temperaturama i pH-vrijednostima mogu utjecati na mogućnosti njihove primjene u biotehnološkim procesima (Mu i sur., 2024; Liu i sur., 2024). Stoga su u ovom istraživanju karakterizirani SE i PP dobiveni nakon SSF-a pivskog tropa s *T. lanuginosus*. Karakterizacija je obuhvatila određivanjestabilnosti enzimskih pripravaka tijekom skladištenja (**4.2.4.1.**), ispitivanje ovisnosti aktivnosti ksilanaznih pripravaka o različitim

RADNA VERZIJA

temperaturama i pH (**4.2.4.2.**), određivanje temperaturne i pH-stabilnosti (**4.2.4.3.**) te analizu proteinskog profila primjenom SDS-PAGE elektroforeze (**4.2.4.4.**).

4.2.4.1. Stabilnost sirovog i djelomično pročišćenog pripravka ksilanaze tijekom skladištenja

Stabilnost SE i PP ksilanaze tijekom 60 dana skladištenja prikazana je na Slici **25**. Relativna aktivnost izražena je u odnosu na početnu aktivnost svakog pripravka, koja je definirana kao 100 %. Tijekom 60 dana skladištenja relativna aktivnost SE smanjivala se uz manje oscilacije. Nakon 7 dana zadržano je 99,20 % početne aktivnosti, dok je nakon 30 dana relativna aktivnost iznosila 69,62 %. Nakon 60 dana izmjerena je relativna aktivnost od 74,00 %. Za razliku od SE, relativna aktivnost PP tijekom skladištenja nije se smanjila ispod početne vrijednosti, pri čemu su izmjerene relativne aktivnosti veće od 100 %. Nakon 21 dana relativna aktivnost PP iznosila je 135,58 %, a nakon 60 dana 153,54 %.



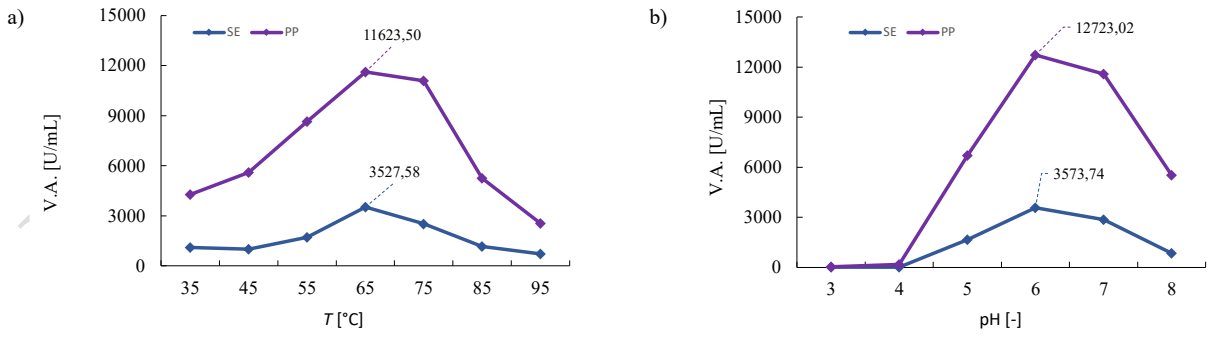
Slika 25 Stabilnost sirovog enzimskog ekstrakta (SE) i djelomično pročišćenog pripravka (PP) ksilanaze tijekom 60 dana skladištenja pri −20 °C. Relativna aktivnost (R.A.) izražena je u odnosu na početnu aktivnost odgovarajućeg enzimskog pripravka određenu 0. dana i definiranu kao 100 %.

Vrijednosti relativne aktivnosti PP veće od 100 % ne označavaju povećanje količine enzima tijekom skladištenja, nego povećanje izmjerene katalitičke aktivnostiu odnosu na početno mjerenje. Aktivnost enzima ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima, a promjene ionske jakosti i interakcije proteina s ionima mogu utjecati na konformacijsku stabilnost i katalitičko ponašanje enzima (Ait Braham i sur., 2021). Navedeno je relevantno za PP pripravak u ovom

istraživanju jer je djelomično pročišćavanje provedeno taloženjem amonijevim sulfatom i naknadnom dijalizom. Taloženje amonijevim sulfatom primjenjuje se za koncentriranje i stabilizaciju proteina uz očuvanje biološke aktivnosti, pri čemu uvjeti taloženja mogu utjecati na oporavak aktivnosti ksilanaze (Farinas i sur., 2011). Razlike u sastavu i fizikalno-kemijskim svojstvima enzimskog pripravka nakon djelomičnog pročišćavanja mogle su pridonijeti razlikama u njegovoj stabilnosti tijekom skladištenja. Visoka stabilnost tijekom skladištenja opisana je i za pročišćenu ksilanazu iz *A. niger* DFR-5, pri čemu je pri 4 °C zabilježeno potpuno očuvanje početne enzimske aktivnosti tijekom prvih 15 dana skladištenja (Pal i Khanum, 2011). Navedeni rezultati pokazuju da se katalitička aktivnost pročišćenih ksilanaza može očuvati tijekom skladištenja pri odgovarajućim uvjetima.

4.2.4.2. Ovisnost aktivnosti sirovog i djelomično pročišćenog pripravka ksilanaze o temperaturi i pH

Ovisnost volumne aktivnosti SE i PP o temperaturi i pH prikazana je na **Slici 26**. U ispitivanom temperaturnom rasponu od 35 do 95 °C aktivnost oba pripravka povećavala se do 65 °C, pri kojoj su izmjerene najveće vrijednosti od 3527,58 U/mL za SE i 11 623,50 U/mL za PP. Pri višim temperaturama aktivnost se postupno smanjivala, a pri 75 °C za PP je izmjerena aktivnost od 11 087,53 U/mL.. Ovisnost aktivnosti o pH-vrijednosti ispitana je u rasponu od 3 do 8.. Najveća aktivnost oba pripravka izmjerena je pri pH 6 i iznosila je 3573,74 U/mL za SE i 12 723,02 U/mL za PP. Pri pH-vrijednostima nižima i višima od 6 aktivnost se smanjivala, a najniže vrijednosti izmjerene su pri pH 3.



Slika 26 Ovisnost aktivnosti sirovog enzimskog ekstrakta (SE) i djelomično pročišćenog pripravka (PP) ksilanaze iz *T. lanuginosus* o a) temperaturi i b) pH vrijednosti

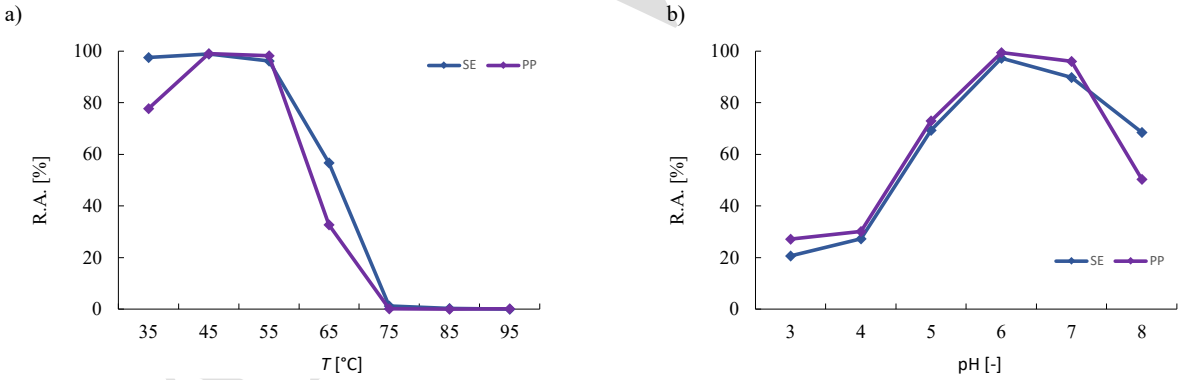
Dobiveni rezultati usporedivi su s prethodno opisanim katalitičkim svojstvima ksilanaza iz *T. lanuginosus*. Khucharoenphaisan i sur. (2010) utvrdili su da pročišćena ksilanaza soja *T. lanuginosus* THKU-49 postiže najveću aktivnost pri 70 °C, uz optimalno područje pH od 5,0

do 7,0. Della Torre i sur. (2023) navode visoku katalitičku aktivnost za ksilanazu iz *T. lanuginosus* PC7S1T pri 75 °C i pH 6,5. U ovom je najveća aktivnost oba enzimska pripravka, SE i PP, izmjerena pri 65 °C i pH 6, što potvrđuje aktivnost ksilanaze *T. lanuginosus* pri povišenim temperaturama i blago kiselim uvjetima.

4.2.4.3. Stabilnost sirovog i djelomično pročišćenog pripravka ksilanaze pri različitim temperaturama i pH

Stabilnost SE i PP pri različitim temperaturama i pH vrijednostima prikazana je na Slici **27**. Oba pripravka zadržala su više od 96 % početne aktivnosti u temperaturnom rasponu od 45 do 55 °C. Pri 65 °C relativna aktivnost smanjila se na 56,77 % za SE i 32,68 % za PP, dok je pri temperaturama ≥ 75 °C aktivnost oba pripravka bila gotovo potpuno izgubljena.

Oba pripravka zadržala su najveći udio početne aktivnosti pri pH 6, odnosno 97,27 % za SE i 99,46 % za PP. Pri pH 7 zadržano je 89,77 % početne aktivnosti SE i 96,02 % početne aktivnosti PP.. Pri nižim pH vrijednostima aktivnost se smanjivala, dok je pri pH 8 SE zadržao 68,51 %, a PP 50,37 % početne aktivnosti.



Slika 27 Stabilnost sirovog enzimskog ekstrakta (SE) i djelomično pročišćenog pripravka (PP) ksilanaze iz *Thermomyces lanuginosus* nakon 60 min predinkubacije pri različitim a) temperaturama i b) pH vrijednostima

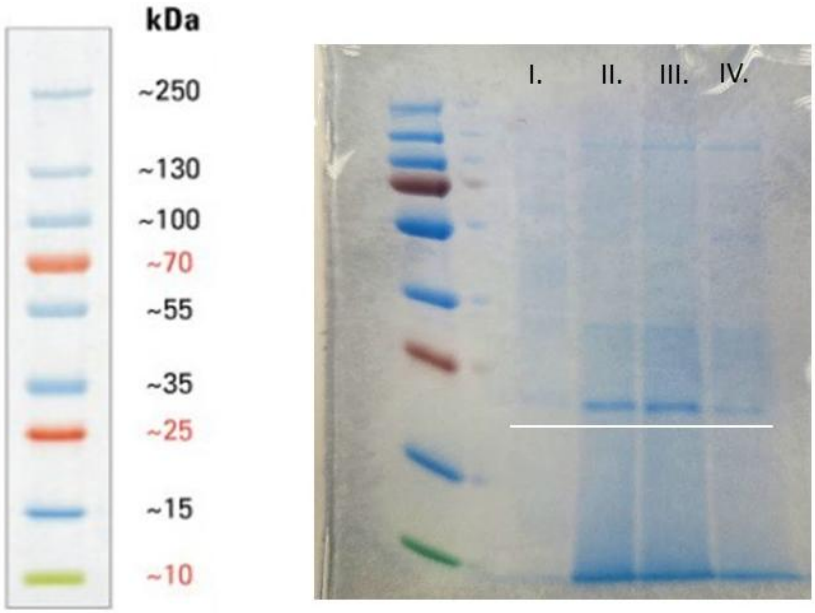
Utvrđena termostabilnost i pH-stabilnost enzimskih pripravakausporedive su s literaturnim podacima za ksilanaze iz *T. lanuginosus*. Khucharoenphaisan i sur. (2010) utvrdili su da je pročišćena ksilanaza soja THKU-49 stabilna do 60 °C pri pH 6,0 te u rasponu pH vrijednosti od 3,5 do 8,0. Za ksilanazu soja PC7S1T također je opisana stabilnost u širokom rasponu pH vrijednosti i pri povišenim temperaturama (Della Torre i sur., 2023). Razlike u stabilnosti ksilanaza iz *T. lanuginosus* mogu biti povezane sa svojstvima pojedinih sojeva i enzimskih

RADNA VERZIJA

pripravaka te uvjetima inkubacije primijenjenima pri određivanju zaostale aktivnosti. Singh i sur. (2003) utvrdili su razlike u temperaturnoj i pH stabilnosti ksilanaza između različitih sojeva *T. lanuginosus*, pri čemu je u pojedinim ispitivanjima sirovi enzimski pripravak pokazao veću termostabilnost od pročišćene ksilanaze.. Autori pretpostavljaju da prisutnost pojedinih sastavnica sirovog ekstrakta može pridonijeti stabilnosti enzima.

4.2.4.4. SDS-PAGE analiza

Rezultati SDS-PAGE analize proteinskog profila enzimskih pripravaka tijekom djelomičnog pročišćavanja prikazani su na **Slici 28**. U SE uočeno je više proteinskih traka, što upućuje na prisutnost proteina različitih molekulskih masa. Nakon taloženja amonijevim sulfatom i dijalize, smanjili su se broj i intenzitet vidljivih proteinskih traka, dok je pri približnoj molekulskoj masi od 22 kDa uočena je izraženija proteinska traka. Promjene proteinskog profila u skladu su s prethodno utvrđenim povećanjem specifične aktivnosti ksilanaze tijekom djelomičnog pročišćavanja.

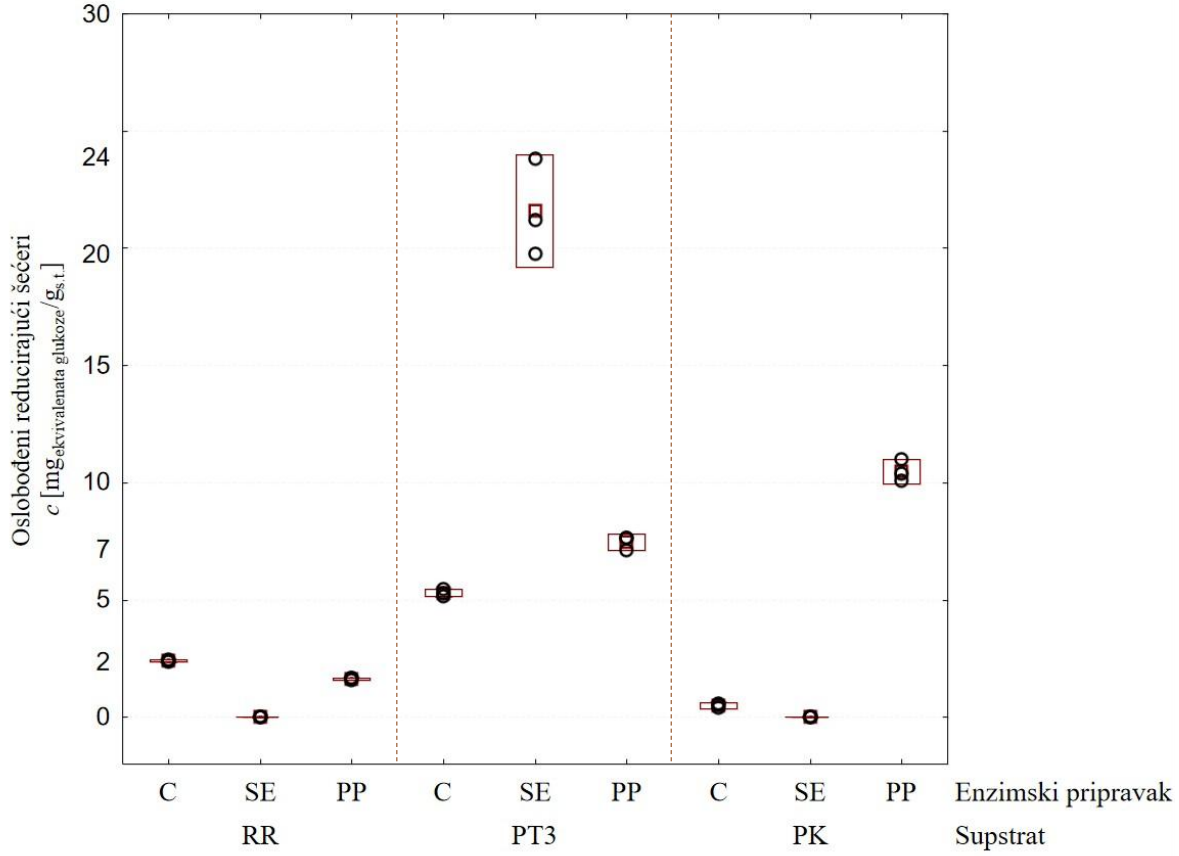


Slika 28 SDS-PAGE analiza enzimskih pripravaka tijekom djelomičnog pročišćavanja ksilanaze iz *Thermomyces lanuginosus*: lijevo – proteinski standard molekulskih masa 10–250 kDa; I – komercijalna ksilanaza (C); II – proteinska frakcija nakon precipitacije amonijevim sulfatom prije dijalize; III – djelomično pročišćeni pripravak nakon dijalize (PP); IV – sirovi enzimski ekstrakt (SE).

Procijenjena molekulska masa trake od približno 22 kDa usporediva je s molekulskim masama ksilanaza iz *T. lanuginosus* opisanima u literaturi. Shrivastava i sur. (2011) za pročišćenu ekstracelularnu ksilanazu soja *T. lanuginosus* SS-8 odredili su molekulsku masu od 23,79 kDa primjenom SDS-PAGE. Mathibe i sur. (2020) utvrdili su molekulsku masu od približno 20 kDa za pročišćenu endo-1,4-β-ksilanazu XynA iz soja *T. lanuginosus* VAPS-24,, pri čemu je identitet proteina dodatno ispitan masenom spektrometrijom. Prethodna istraživanja različitih sojeva *T. lanuginosus* opisuju ksilanaze molekulskih masa približno 23–29 kDa (Singh i sur., 2003). Položaj izraženije proteinske trake u PP odgovara području molekulskih masa prethodno opisanih ksilanaza iz *T. lanuginosus*.

4.2.5. Primjena ksilanaznih pripravaka u hidrolizi lignoceluloznih supstrata

Učinkovitost SE i PP u hidrolizi lignocelulozne biomase ispitana je na repinim rezancima (RR), pivskom tropu (PT3) i pogači konoplje (PK), uz komercijalnu ksilanazu (C) kao referentni pripravak. Učinkovitost hidrolize procijenjena je na temelju neto količine oslobođenih reducirajućih šećera (**Slika 29**).



Slika 29 Neto oslobađanje reducirajućih šećera nakon 24 h hidrolize repinih rezanaca (RR), pivskog tropa (PT3) i pogače konoplje (PK) primjenom komercijalne ksilanaze (C), sirovog enzimskog pripravka (SE) i djelomično pročišćenog pripravka (PP). Za svaku kombinaciju supstrata i enzimskog pripravka provedene su tri neovisne reakcije (n = 3).

Dvofaktorska analiza varijance pokazala je statistički značajan utjecaj vrste supstrata ($F_{(2,18)}$ = 492,95; p < 0,001), enzimskog pripravka ($F_{(2,18)}$ = 101,84; p < 0,001) te njihove interakcije ($F_{(4,18)}$ = 285,06; p < 0,001) na neto oslobađanje reducirajućih šećera. Najveći udio u ukupnoj varijabilnosti rezultata, bez uključivanja presjeka modela, pripisuje se interakciji vrste supstrata i enzimskog pripravka (48,60 %), zatim vrsti supstrata (42,00 %), dok je udio enzimskog pripravka iznosio 8,70 %. Rezidualna varijabilnost iznosila je manje od 1 %. Utvrđena interakcija pokazuje da je učinkovitost pojedinog enzimskog pripravka ovisila o vrsti lignoceluloznog supstrata. S obzirom na statistički značajnu interakciju , razlike između pojedinih kombinacija supstrata i enzimskih pripravaka dodatno su analizirane Tukeyjevim HSD testom.

Najveća srednja vrijednost neto oslobođenih reducirajućih šećera iz RR utvrđena je primjenom C i iznosila je 2,40 ± 0,04 $mg_{ekvivalenata\ glukoze}/g_{s.t.}$. Primjenom PP oslobođeno je 1,64 ± 0,04 mg ekvivalenata glukoze/$g_{s.t.}$, dok primjenom SE nije utvrđeno neto oslobađanje reducirajućih šećera. Tukeyjev HSD test pokazao je da je vrijednost dobivena primjenom C bila statistički značajno veća u odnosu na SE, dok se PP nije statistički značajno razlikovao ni od C ni od SE. Razlika između vrijednosti dobivenih primjenom C i PP na RR nije bila statistički značajna pri primijenjenoj razini značajnosti. Pri hidrolizi PT3 utvrđene su razlike u učinkovitosti primijenjenih enzimskih pripravaka. Najveća koncentracija reducirajućih šećera oslobođena je primjenom SE (21,59 ± 2,07 mg $_{ekvivalenata\ glukoze}/g_{s.t.}$), dok su primjenom PP i C dobivene vrijednosti od 7,47 i 5,31 mg $_{ekvivalenata\ glukoze}/g_{s.t.}$. Sve tri kombinacije pripadale su različitim homogenim skupinama Tukeyjeva HSD testa, što pokazuje da su se međusobno statistički značajno razlikovale. Primjenom SE na PT3 oslobođena je statistički značajno veća količina reducirajućih šećera nego primjenom PP i C, dok je primjenom PP oslobođena statistički značajno veća količina u odnosu na C.

Najveća koncentracija reducirajućih šećera iz PK oslobođena je primjenom PP i iznosila je 10,49 ± 0,46 mg $_{ekvivalenata\ glukoze}/g_{s.t.}$. Ova je vrijednost bila statistički značajno veća od vrijednosti dobivenih primjenom C i SE. Primjenom komercijalne ksilanaze oslobođeno je 0,50

RADNA VERZIJA

mg $_{\text{ekvivalenata glukoze}}$/$g_{\text{s.t.}}$, dok primjenom SE nije utvrđeno neto oslobađanje reducirajućih šećera. Između C i SE nije utvrđena statistički značajna razlika. Rezultati su pokazali razlike u učinkovitosti enzimskih pripravaka ovisno o vrsti supstrata. Na RR najveća srednja vrijednost utvrđena je primjenom C, bez statistički značajne razlike u odnosu na PP, dok je na PT3 najveća količina reducirajućih šećera oslobođena primjenom SE, a na PK primjenom PP. Utvrđene razlike u skladu su sa statistički značajnom interakcijom vrste supstrata i enzimskog pripravka Interakcija pokazuje da je učinkovitost hidrolize ovisila o kombinaciji enzimskog pripravka i lignoceluloznog supstrata. Učinkovitost enzimske hidrolize, osim o katalitičkim svojstvima enzima, ovisi o kemijskom sastavu biomase, strukturnoj organizaciji stanične stijenke te dostupnosti polisaharidnih frakcija enzimskom djelovanju (Hu i sur., 2023). Aktivnost ksilanaze određena primjenom standardnog supstrata stoga nije dovoljna za predviđanje učinkovitosti enzimskog pripravka u hidrolizi lignocelulozne biomase. Veća učinkovitost SE u hidrolizi pivskog tropa može biti povezana s njegovim složenijim enzimskim sastavom. SE je ekstracelularni enzimski ekstrakt dobiven nakon SSF-a pivskog tropa koji, osim ksilanaze, može sadržavati i druge hidrolitičke i pomoćne enzime uključene u razgradnju lignocelulozne matrice. Schmitz i sur. (2022) pokazali su da kombinirano djelovanje ksilanaza i pomoćnih enzima može rezultirati sinergijskim učinkom, čiji intenzitet ovisi o svojstvima lignoceluloznog supstrata. Wang i sur. (2022) također su pokazali da kombinirano djelovanje ksilanazne i feruloil-esterazne aktivnosti s celulazom može povećati učinkovitost hidrolize lignoceluloze. Budući da aktivnosti drugih hidrolitičkih i pomoćnih enzima u SE i PP nisu zasebno određivane, njihov doprinos većoj učinkovitosti SE na pivskom tropu nije moguće potvrditi na temelju provedenih analiza. Učinkovitost PP razlikovala se ovisno o vrsti lignoceluloznog supstrata. PP je bio najučinkovitiji u hidrolizi pogače konoplje, dok je pri hidrolizi pivskog tropa statistički značajno veća učinkovitost utvrđena primjenom SE. Djelomično pročišćavanje mijenja sastav proteinske frakcije pripravka i relativnu zastupljenost pojedinih enzimskih komponenti, dok svojstva ciljnog supstrata istodobno određuju dostupnost hemicelulozne frakcije ksilanazi. Veća specifična aktivnost ksilanaze u PP ne mora rezultirati proporcionalnim povećanjem koncentracije oslobođenih reducirajućih šećera iz pojedinih lignocelulloznih supstrata. Rezultati enzimske hidrolize pokazali su da je neto oslobađanje reducirajućih šećera primjenom ispitivanih enzimskih pripravaka ovisilo o vrsti lignoceluloznog supstrata. SE je najveću učinkovitost pokazao na pivskom tropu, dok je PP najveći učinak ostvario na pogači konoplje. Učinkovitost enzimskog pripravka ne može se pouzdano predvidjeti samo na temelju aktivnosti

RADNA VERZIJA

ksilanaze određene standardnim enzimskim testom, već je potrebno uzeti u obzir i svojstva lignocelulozno supstrata.

4.2.6. Promjene kemijskog sastava pivskog tropa nakon fermentacije na čvrstim nosačima s *Thermomyces lanuginosus*

4.2.6.1. Osnovni kemijski i lignocelulozni sastav

Analiza osnovnog kemijskog sastava i lignocelulozne strukture pivskog tropa PT3 prije i nakon 10 dana SSF-a s *T. lanuginosus* prikazana je u **Tablici 12**.

Tablica 12 Kemijski sastav PT3 prije i nakon 10 dana fermentacije na čvrstim nosačima s *Thermomyces lanuginosus*

Sastavnica [$\%_{s.t.}$]	Sirovi PT3	Fermentirani PT3
Hemiceluloza	$38,00 \pm 0,71^a$	$39,30 \pm 0,37^a$
Celuloza	$20,36 \pm 2,55^a$	$28,29 \pm 0,86^b$
Lignin	$11,29 \pm 1,78^a$	$7,29 \pm 0,53^b$
Sirovi proteini	$23,15 \pm 0,28^a$	$30,84 \pm 0,11^b$
Masti	$7,27 \pm 0,20^a$	$1,67 \pm 0,17^b$
Pepeo	$5,63 \pm 0,02^a$	$5,71 \pm 0,13^a$

Nakon 10 dana SSF-a udio hemiceluloze povećao se s 38,00 ± 0,71 na 39,30 ± 0,37 $\%_{s.t.}$, ali razlika nije bila statistički značajn (p = 0,116). Udio celuloze statistički se značajno povećao 1,39 puta, s 20,36 ± 2,55 na 28,29 ± 0,86 $\%_{s.t.}$ (p = 0,023), dok se udio lignina statistički značajno smanjio 1,55 puta, s 11,29 ± 1,78 na 7,29 ± 0,53 $\%_{s.t.}$ (p = 0,035). Povećanje relativnog udjela celuloze može se objasniti iskorištavanjem drugih organskih sastavnica supstrata tijekom fermentacije. Izostanak značajne promjene udjela hemiceluloze ne isključuje mogućnost njezine transfromacije tijekom SSF-a. Tijekom fermentacije supstrata PT3 utvrđena je proizvodnja ksilanaze koja katalizira hidrolizu ksilanske frakcije hemiceluloze, dok konačni udio hemiceluloze ovisi o relativnoj zastupljenosti ostalih sastavnica preostale suhe tvari. Parlov Vuković i sur. (2026) također su utvrdili promjene lignocelulozne matrice tijekom SSF-a pogače konoplje s *T. lanuginosus*. NMR analizom utvrdili su promjene celulozne i hemicelulozne frakcije te kemijske promjene lignina, što potvrđuje djelovanje *T. lanuginosus* na lignocelulozne biopolimere tijekom SSF-a. Udio sirovih proteina statistički se značajno

RADNA VERZIJA

povećao 1,33 puta, s 23,15 ± 0,28 na 30,84 ± 0,11 $\%_{s.t.}$ (p = 0,001). Povećanje relativnog udjela proteina tijekom SSF-a može se povezati s iskorištavanjem drugih organskih sastavnica supstrata i doprinosom nastale gljivične biomase. Rusbjerg-Weberskov i sur. (2025) tijekom SSF-a pivskog tropa s *Rhizopus oryzae* utvrdili su povećanje udjela proteina sa 16,8 na 23,3 %, pri čemu je analizom proteinske frakcije utvrđen značajan doprinos gljivičnih proteina fermentiranoj biomasi. Sličan porast udjela proteina zabilježili su Silva i sur. (2026) nakon SSF-a na pivskom tropu s *R. oryzae* i *Trichoderma virens*. Udio lipida statistički se značajno smanjio 4,35 puta, sa 7,27 ± 0,20 na 1,67 ± 0,17 $\%_{s.t.}$ (p = 0,030). Smanjenje udjela lipida može se povezati s njihovom hidrolizom i iskorištavanjem tijekom rasta i metabolizma gljive. *T. lanuginosus* proizvodi ekstracelularne lipaze, pri čemu je njihova proizvodnja tijekom SSF-a utvrđena na različitim biljnim supstratima (Šibalić i sur., 2020). Parlov Vuković i sur. (2026) tijekom SSF-a na pogači konoplje s *T. lanuginosus* utvrdili su smanjenje mono-, di- i triglicerida te promjene udjela glicerola i slobodnih masnih kiselina, što potvrđuje transformaciju lipidne frakcije djelovanjem ove gljive. S obzirom na to da aktivnost lipaze u ovom istraživanju nije određivana, njezin doprinos smanjenju udjela lipida u PT3 nije moguće zasebno procijeniti.

Udio pepela nakon 10 dana SSF-a nije se statistički značajno promijenio te je iznosio 5,63 ± 0,02 $\%_{s.t.}$ u sirovom i 5,71 ± 0,13 $\%_{s.t.}$ u fermentiranom PT3 (p = 0,460). Tijekom desetodnevne fermentacije nije utvrđena statistički značajna promjena relativnog udjela ukupne mineralne frakcije u suhoj tvari PT3.

4.2.6.2. Aminokiselinski sastav

Tijekom uzgoja *T. lanuginosus* na pivskom tropu došlo je do promjena u profilu esencijalnih i neesencijalnih aminokiselina supstrata PT3 (**Slike 30** i **31**). Nakon fermentacije koncentracije svih analiziranih esencijalnih aminokiselina bile su niže u odnosu na sirovi PT3. Među esencijalnim aminokiselinama , najzastupljeniji je bio histidin, čija se koncentracija smanjila s 89,99 na 80,92 $mg/g_{s.t.}$. Veće smanjenje koncentracije utvrđeno je za treonin, valin, izoleucin, leucin i fenilalanin, dok se koncentracija metionina smanjila s 2,63 na 1,83 $mg/g_{s.t.}$ Smanjenje koncentracija utvrđeno je i za većinu neesencijalnih aminokiselina. Među neesencijalnim aminokiselinama najzastupljenija je bila glutaminska kiselina, čija se koncentracija smanjila s 27,43 na 14,03 $mg/g_{s.t.}$, dok se koncentracija tirozina, za razliku od ostalih analiziranih aminokiselina, povećala s 2,46 na 4,89 $mg/g_{s.t.}$.

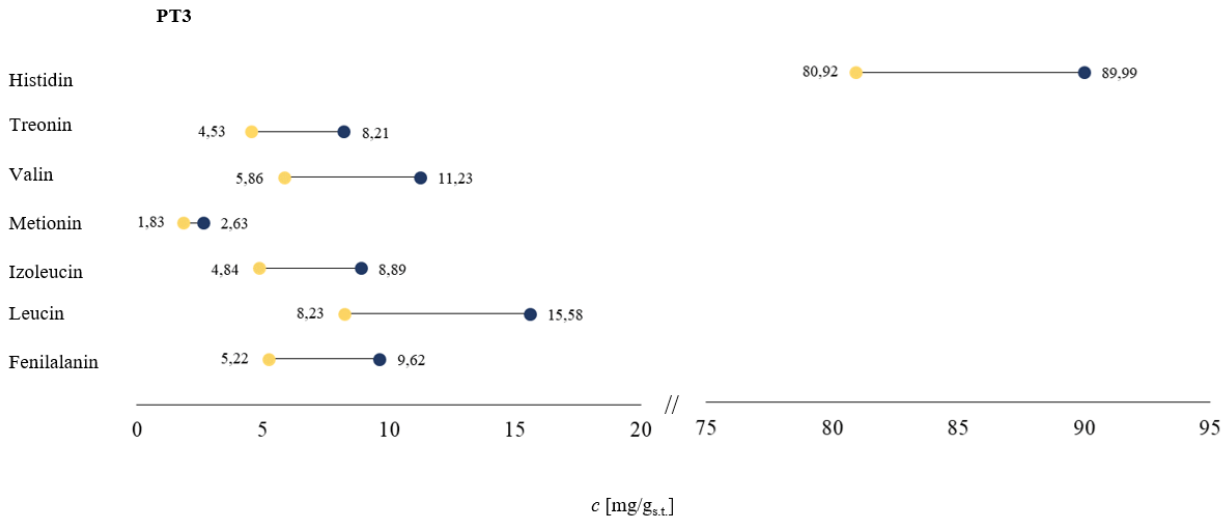
RADNA VERZIJA

Promjene aminokiselinskog sastava tijekom SSF-a mogu biti povezane s rastom gljivične biomase i iskorištavanjem dostupnih izvora dušika. Mchunu i sur. (2013) utvrdili su da *T. lanuginosus* može iskorištavati različite aminokiseline, uključujući alanin, prolin, asparagin i glutaminsku kiselinu, pri čemu se njihov doprinos rastu biomase razlikovao. Smanjenje koncentracije alanina, prolina i glutaminske kiseline utvrđeno u supstratu PT3 može se povezati s njihovim iskorištavanjem tijekom rasta *T. lanuginosus*, iako se na temelju završnog aminokiselinskog profila ne može odrediti u kojoj su mjeri pojedine aminokiseline izravno iskorištene tijekom fermentacije.

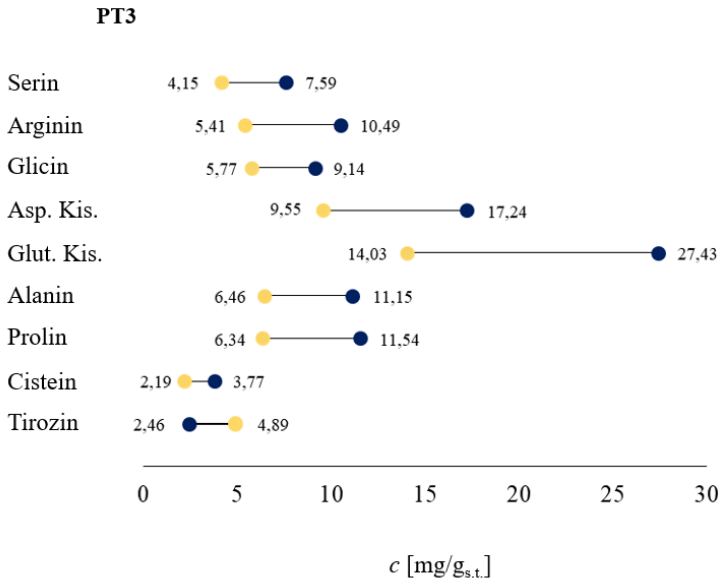
Sandoval i sur. (2024) također su utvrdili da promjena udjela sirovih proteina tijekom SSF-a ne mora biti proporcionalna promjeni aminokiselinske frakcije. Tijekom SSF-a s *Rhizopus oligosporus* su utvrdili povećanje ukupnog udjela aminokiselina, dok se omjer ukupnih aminokiselina i sirovih proteina smanjio sa 76,49 na 67,65 g/100 g. Navedenu promjenu povezali su s metaboličkom transformacijom proteinske frakcije i ugradnjom dijela dušika u hitin gljivične biomase.

Smanjenje koncentracije aminokiselina u supstratu PT3 nije pratilo povećanje udjela sirovih proteina utvrđeno nakon SSF-a. Navedeno je potrebno razmatrati s obzirom na različitu analitičku osnovu ovih dvaju pokazatelja, budući da se udio sirovih proteina procjenjuje na temelju ukupnog dušika, dok je aminokiselinski sastav određen nakon kisele hidrolize i kvantifikacije pojedinačnih aminokiselina. Stoga se promjene udjela sirovih proteina ne mogu izravno poistovjetiti s promjenama koncentracija pojedinačnih aminokiselina.

RADNA VERZIJA



Slika 30 Profil esencijalnih aminokiselina ● sirovog i ● fermentiranog pivskog tropa (PT3) nakon 10 dana fermentacije na čvrstim nosačima s *Thermomyces lanuginosus*. Koncentracije aminokiselina izražene su kao mg/g suhe tvari

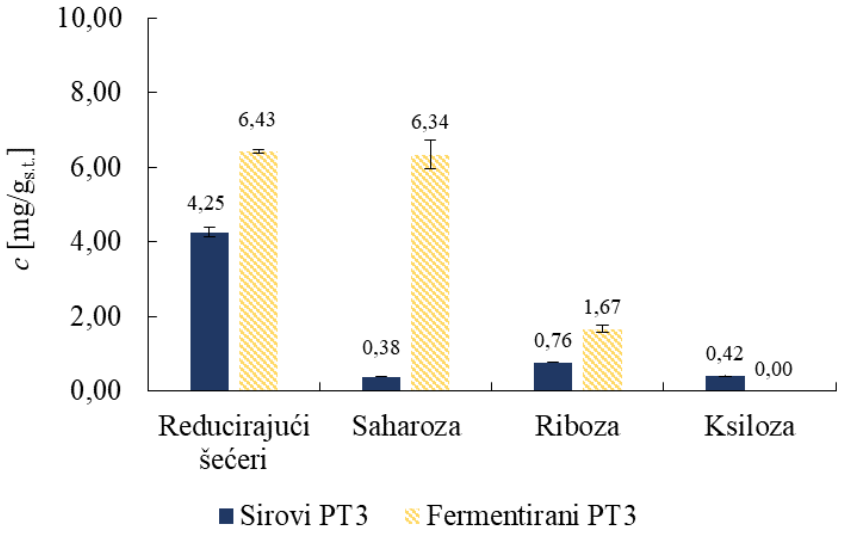


Slika 31 Profil neesencijalnih aminokiselina ● sirovog i ● fermentiranog pivskog tropa (PT3) nakon 10 dana fermentacije na čvrstim nosačima s *Thermomyces lanuginosus*. Koncentracije aminokiselina izražene su kao mg/g suhe tvari

4.2.6.3. Topljivi ugljikohidrati

Primjena SSF-a s *T. lanuginosus* rezultirala je promjenama koncentracije reducirajućih i pojedinačnih šećera u supstratu PT3 (**Slika 32**). Koncentracija ukupnih reducirajućih šećera statistički se značajno povećala s 4,25 ± 0,13 na 6,43 ± 0,04 $mg_{GE}/g_{s.t.}$, odnosno 1,51 puta (p = 0,019).

Razlike su utvrđene i u sastavu pojedinačnih šećera. Koncentracija saharoze statistički se značajno povećala s 0,38 ± 0,00 na 6,34 ± 0,39 $mg/g_{s.t.}$ (p = 0,029), a koncentracija riboze s 0,76 ± 0,00 na 1,67 ± 0,09 $mg/g_{s.t.}$ (p = 0,043). Ksiloza je u sirovom PT3 određena u koncentraciji 0,42 ± 0,02 mg $g^{-1}_{s.t.}$, dok nakon fermentacije nije bila detektirana.



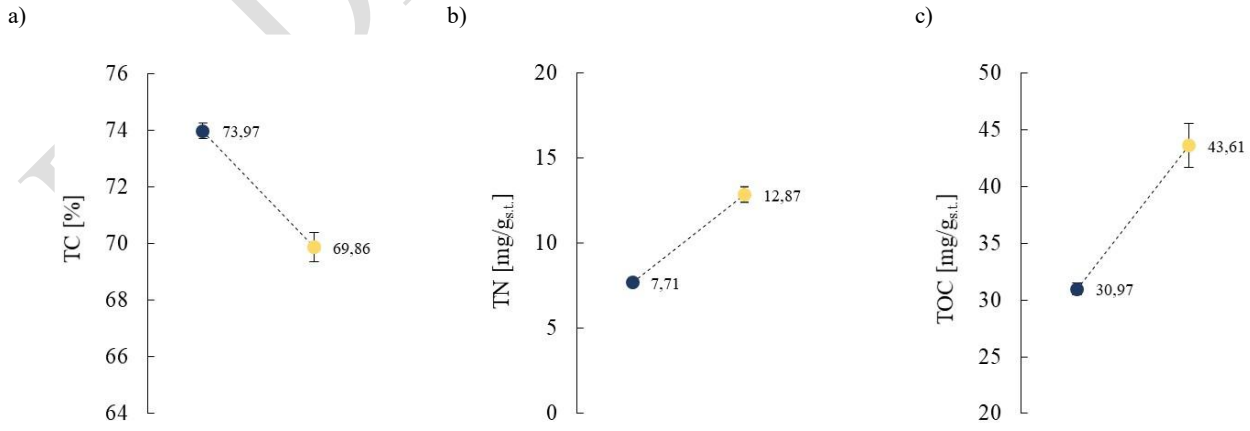
Slika 32 Promjene koncentracija reducirajućih i pojedinačnih šećera u supstratu PT3 nakon 10 dana SSF-a s *Thermomyces lanuginosus*. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± SD. Reducirajući šećeri izraženi su kao mg ekvivalenata glukoze/g suhe tvari, a pojedinačni šećeri kao mg/g suhe tvari

Povećanje koncentracije reducirajućih šećera nakon SSF-a može se povezati s oslobađanjem topljivih šećera uslijed enzimskom hidrolizom ugljikohidratnih sastavnica supstrata. Koncentracija topljivih šećera tijekom SSF-a ovisi o njihovu istodobnom oslobađanju enzimskom hidrolizom i iskorištavanju kao izvora ugljika za rast i metabolizam gljive. Sandoval i sur. (2024) tijekom SSF-a zabilježili su početno povećanje koncentracije slobodnih šećera povezano s razgradnjom ugljikohidrata, nakon čega se koncentracija smanjivala zbog metaboličkog iskorištavanja oslobođenih monosaharida. Promjene pojedinačnih šećera dodatno

mogu se povezati s njihovim iskorištavanjem tijekom rasta *T. lanuginosus*. Suryawanshi i sur. (2022) utvrdili su da *T. lanuginosus* može koristiti različite šećere kao izvore ugljika te da njihov obrazac iskorištavanja ovisi o njihovoj koncentraciji i dostupnosti pojedinih šećera. Pri nižim koncentracijama utvrđeno je istodobno korištenje više šećera, dok je pri višim koncentracijama njihovo iskorištavanje bilo preferencijalno. Shi i sur. (2019) utvrdili su da ksilanolitički sustav *T. lanuginosus* uključuje GH11 ksilanazu i GH43 β-ksilozidazu te da tijekom razgradnje ksilana mogu nastajati i supstituirani ksilooligosaharidi, bez njegove potpune konverzije do slobodne ksiloze. Izostanak detekcije ksiloze u fermentiranom PT3 nije u suprotnosti s utvrđenom aktivnošću ksilanaze. Budući da u ovom istraživanju nisu određivani ksilooligosaharidi, nije moguće utvrditi u kojoj su mjeri pojedini procesi pridonijeli konačnom sastavu topljivih ugljikohidrata.

4.2.6.4. Ugljik i dušik

Primjena SSF-a s *T. lanuginosus* rezultirala je promjenama udjela ukupnog ugljika (TC) te koncentracija ukupnog organskog ugljika (TOC) i ukupnog dušika (TN) u supstratu PT3 (**Slika 33**). Udio TC-a statistički se značajno smanjio sa 73,97 ± 0,28 na 69,86 ± 0,52 %, odnosno 1,06 puta (p = 0,010). Koncentracija TOC-a povećala se s 30,97 ± 0,52 na 43,61 ± 1,91 mg/$g_{s.t.}$, odnosno 1,41 puta, pri čemu razlika nije bila statistički značajna (p = 0,050). Koncentracija TN-a statistički se značajno povećala sa 7,71 ± 0,08 na 12,87 ± 0,47 mg/$g_{s.t.}$, odnosno 1,67 puta (p = 0,033).



Slika 33 Promjene ukupnog ugljika (TC) u čvrstim uzorcima te ukupnog dušika (TN) i ukupnog organskog ugljika (TOC) u vodenim ekstraktima ● sirovog i ● fermentiranog pivskog tropa nakon 10 dana fermentacije na čvrstim nosačima (SSF) s *Thermomyces*

lanuginosus: (a) TC; (b) TN; (c) TOC. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD)

Smanjenje TC-a može se povezati s razgradnjom i metaboličkim iskorištavanjem organskih sastavnica pivskog tropa tijekom SSF-a s *T. lanuginosus*. Tijekom SSF-a organska tvar supstrata predstavlja izvor ugljika i energije za rast gljive, pri čemu se enzimskim i metaboličkim djelovanjem mijenja sastav preostale biomase. Navedeno je tumačenje u skladu s prethodno utvrđenim promjenama lignocelulozних sastavnica i lipida supstrata PT3. Parlov Vuković i sur. (2026) također su tijekom SSF-a pogače konoplje s *T. lanuginosus* utvrdili značajne strukturne i sastavne promjene biopolimera i lipidne frakcije supstrata. Za razliku od TC-a, nakon fermentacije zabilježeno je povećanje TOC-a. Promjene koncentracije TOC-a tijekom SSF-a mogu se povezati s razgradnjom i transformacijom organskih sastavnica supstrata. Šelo i sur. (2024) također su pratili promjene TOC-a i TN-a tijekom SSF-a tropa grožđa s *T. versicolor* te ih povezali s promjenama kemijskog sastava fermentirane biomase. Povećanje koncentracije TOC-a u supstratu PT3 nakon fermentacije ne podrazumijeva povećanje apsolutne količine organskog ugljika. Budući da nije provedena bilanca ugljika, nije moguće kvantificirati raspodjelu ugljika između preostalog supstrata, nastale gljivične biomase i produkata metabolizma. S obzirom na različite analitičke postupke i način izražavanja rezultata, vrijednosti TC-a i TOC-a nije opravdano izravno kvantitativno uspoređivati. IC nije detektiran ni prije ni nakon fermentacije, odnosno primijenjenom metodom nije utvrđena mjerljiva anorganska frakcija ugljika u analiziranim uzorcima. Promjene sastava ugljika u supstratu PT3 nakon SSF-a stoga se prvenstveno odnose na njegovu organsku frakciju.

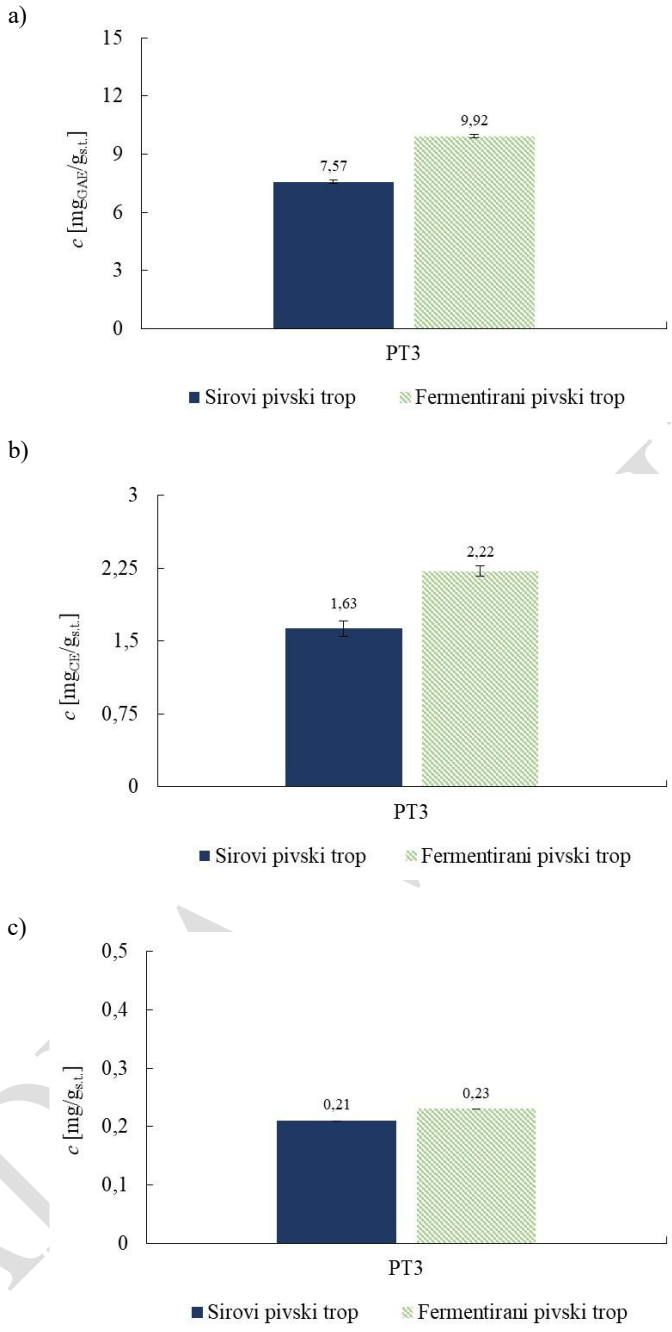
Povećanje koncentracije TN-a nakon SSF-a u skladu je s prethodno utvrđenim povećanjem udjela sirovih proteina u supstratu PT3. Slične promjene udjela proteina tijekom SSF-a s filamentoznim gljivama zabilježili su Filipe i sur. (2023). Nakon SSF-a smjese biljnih krmiva s gljivama roda *Aspergillus* udio proteina povećao se za približno 5 %, dok se udio celuloze smanjio za 9–11 %, a hemiceluloze za 21–34 %. Navedene promjene pokazuju da povećanje relativnog udjela proteinske frakcije može biti praćeno razgradnjom drugih sastavnica supstrata tijekom SSF-a. Povećanje koncentracije TN-a u supstratu PT3 može se povezati s promjenama dušičnih sastavnica tijekom fermentacije, što je u skladu s istodobno utvrđenim povećanjem udjela sirovih proteina.

RADNA VERZIJA

4.2.6.5. Fenolni spojevi

Nakon 10 dana SSF-a s *T. lanuginosus* utvrđene su promjene koncentracija ukupnih polifenola, flavonoida i proantocijanidina u susptratu PT3 (**Slika 34**). Koncentracija ukupnih polifenola povećala se sa 7,57 ± 0,09 na 9,92 ± 0,08 $mg_{GAE}/g_{s.t.}$ (p = 0,018). Koncentracija ukupnih flavonoida povećala se s 1,63 ± 0,08 na 2,22 ± 0,05 $mg_{CE}/g_{s.t.}$, ali utvrđena razlika nije bila statistički značajna (p = 0,108). Koncentracija proantocijanidina povećala se s 0,21 ± 0,00 na 0,23 ± 0,00 $mg/g_{s.t.}$, uz statistički značajnu razliku (p = 0,042).

RADNA VERZIJA



Slika 34 Koncentracija a) ukupnih polifenola, b) flavonoida i c) proantocijanidina u sirovom pivskom tropu (PT3) i nakon 10 dana fermentacije na čvrstim nosačima (SSF) s *Thermomyces lanuginosus*

Mogući mehanizmi promjene ekstraktabilnosti i transformacije fenolnih spojeva tijekom SSF-a prethodno su razmotreni u **poglavlju 4.1.4.5.** Povećanje koncentracije ukupnih polifenola tijekom SSF-a s *T. lanuginosus* u skladu su s rezultatima Šibalić (2023), koji je tijekom SSF-a

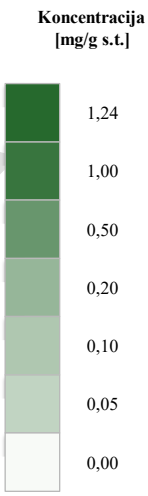
bučine pogače s *T. lanuginosus* također utvrdio povećanje koncentracije ukupnih polifenola. U laboratorijskim staklenkama koncentracija ukupnih polifenola povećala se 4,46 puta do sedmog dana, dok je u bioreaktoru s pliticama maksimalno povećanje od 3,05 puta utvrđeno petog dana fermentacije. U istom istraživanju koncentracija ukupnih flavonoida u laboratorijskim staklenkama povećavala se do drugog dana fermentacije, nakon čega je zabilježeno njezino smanjenje. Rezultati pokazuju da SSF s *T. lanuginosus* može povećati koncentraciju ekstraktabilnih polifenola u supstratu PT3, pri čemu promjene koncentracija pojedinih skupina fenolnih spojeva nisu bile jednake.

Analiza pojedinačnih fenolnih spojeva omogućila je detaljniji uvid u promjene fenolnog profila supstrata PT3 nakon SSF-a s *T. lanuginosus* (**Tablica 13**). Nakon SSF-a statistički su se značajno povećale koncentracije procijanidina B1, siringinske i *p*-kumarinske kiseline, dok se koncentracija ferulinske kiseline statistički značajno smanjila ($p < 0,05$). Promjene koncentracija galne i *p*-hidroksibenzojeve kiseline, katehina i epigalokatehina nisu bile statistički značajne ($p > 0,05$). Promjene koncentracija pojedinačnih fenolnih spojeva tijekom SSF-a s *T. lanuginosus* opisane su i pri obradi drugih lignoceluloznih supstrata. Šibalić (2023) tijekom biološke obrade bučine pogače utvrdio je promjene koncentracija *p*-hidroksibenzojeve, *p*-kumarinske, ferulinske, vanilinske i elaginske kiseline. Promjene koncentracija pojedinačnih fenolnih spojeva autori povezuju se s djelovanjem enzima koje proizvodi *T. lanuginosus*, a koji hidrolizom veza između fenolnih spojeva i drugih sastavnica biljne matrice mogu povećati njihovu ekstraktabilnost.

RADNA VERZIJA

Tablica 13 Koncentracije pojedinačnih fenolnih spojeva u sirovom pivskom tropu PT3 te nakon 10 dana fermentacije na čvrstim nosačima (SSF) s *Thermomyces lanuginosus*. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD). Podebljane *p*-vrijednosti označavaju statistički značajne razlike između sirovog i fermentiranog uzorka ($p < 0,05$)

Fenolni spoj	PT3	
	Sirovi	Fermentirani
Hidroksibenzojeve kiseline		
galna kiselina	1,10 ± 0,01	1,24 ± 0,03
p-hidroksibenzojeva kiselina	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,00
siringinska kiselina	0,06 ± 0,00	**0,12 ± 0,00***
Flavan-3-oli		
procijanidin B1	0,43 ± 0,02	**0,87 ± 0,00***
katehin	0,09 ± 0,01	0,05 ± 0,00
epigalokatehin	0,20 ± 0,04	0,52 ± 0,00
Hidroksicimetne kiseline		
p-kumarinska kiselina	0,01 ± 0,00	**0,03 ± 0,00***
ferulinska kiselina	0,12 ± 0,00	**0,07 ± 0,00***



4.2.7. Procjena analiziranih pokazatelja sigurnosti pivskog tropa nakon fermentacije s *Thermomyces lanuginosus* za potencijalnu primjenu u hranidbi životinja

Procjena mogućnosti primjene fermentiranog pivskog tropa u hranidbi životinja, osim karakterizacije njegova kemijskog sastava, zahtijeva i analizu pokazatelja sigurnosti. Mogući izvori nepoželjnih tvari u pivskom tropu i odgovarajući regulatorni kriteriji prethodno su razmotreni u poglavlju **4.1.5**. U ovom su poglavlju analizirani pokazatelji sigurnosti pivskog tropa PT3 nakon 10 dana SSF-a s *T. lanuginosus*. Analiza je obuhvatila određivanje mineralnih elemenata, metala i metaloida te odabranih nepoželjnih tvari, uključujući nitrate i nitrite, mikotoksine, PCB-ove, PAH-ove, ergot alkaloide i tropan alkaloide. Rezultati su uspoređeni s odgovarajućim regulatornim vrijednostima za hranu za životinje, gdje su one primjenjive.

RADNA

4.2.7.1. Mineralni elementi, metali i metaloidi

Rezultati određivanja masenih udjela i koncentracija mineralnih elemenata, metala i metaloida u sirovom i fermentiranom supstratu PT3 prikazani su u **Tablici 14**. Nakon 10 dana SSF-a udio fosfora nije se promijenio, dok su koncentracije kalcija, kalija i željeza bile više u odnosu na sirovi PT3. Koncentracija kalcija povećala se s 2553 na 2696 mg/kg, a željeza s 126 na 170 mg/kg. Najveće povećanje koncentracije utvrđeno je za kalij, čija se koncentracija povećala s 251 na 968 mg/kg, odnosno 3,86 puta.

Tablica 14 Sadržaj mineralnih elemenata, metala i metaloida u sirovom PT3 i nakon 10 dana SSF-a s *Thermomyces lanuginosus*

Element	Sirovi PT3	Fermentirani PT3
Fosfor [%]	0,57	0,57
Kalcij [mg/kg]	2553	2696
Kalij [mg/kg]	251	968
Željezo [mg/kg]	126	170
Olovo [mg/kg]	0,043	0,055
Kadmij [mg/kg]	0,033	0,033
Arsen [mg/kg]	0,022	0,012

Promjene koncentracija mineralnih elemenata tijekom SSF-a zabilježene su i na drugim agroindustrijskim supstratima. Cui i sur. (2021) nakon 14 dana SSF-a ostatka čaja s *A. niger* i *Trichoderma koningii* utvrdili su statistički značajno povećanje koncentracija svih analiziranih mineralnih elemenata, uključujući kalcij, fosfor, kalij i željezo. Promjene mineralnog sastava PT3 usporedive su s rezultatima navedenog istraživanja, osim udjela fosfora koji se nakon fermentacije nije promijenio. Razgradnja i metaboličko iskorištavanje organskih sastavnica tijekom fermentacije mogu uzrokovati relativno povećanje udjela anorganske frakcije u preostaloj biomasi. U skladu s time, povećanje udjela pepela nakon SSF-a zabilježeno je na različitim lignoceluloznim supstratima (Arapoglou i sur., 2024).

Nakon fermentacije koncentracije analiziranih metala i metaloida bile su niže od odgovarajućih najvećih dopuštenih vrijednosti propisanih Direktivom 2002/32/EZ. Koncentracija olova iznosila je 0,043 mg/kg u sirovom na 0,055 mg/kg u fermentiranom PT3, koncentracija kadmija

RADNA VERZIJA

ostala je nepromijenjena i iznosila 0,033 mg/kg, dok se koncentracija arsena smanjila s 0,022 na 0,012 mg/kg. Najveće dopuštene količine iznose 10 mg/kg za olovo, 2 mg/kg za arsen i 1 mg/kg za kadmij u krmivima biljnog podrijetla, pri čemu se vrijednosti odnose na krmivo s 12 % udjela vlage (Direktiva 2002/32/EZ). Stoga koncentracije analiziranih metala i metaloida, prema navedenim regulatornim kriterijima, nisu predstavljale ograničavajući čimbenik za potencijalnu primjenu fermentiranog PT3 u hranidbi životinja.

4.2.7.2. Nepoželjne tvari

Rezultati određivanja nitrata, nitrita, mikotoksina, PCB-a, PAH-ova, ergot alkaloida i tropan alkaloida u sirovom PT3 i fermentiranom PT3 prikazani su u **Tablici 15.**

RADNA VERZIJA

Tablica 15 Nepoželjne tvari u sirovom PT3 i nakon 10 dana SSF-a s *Thermomyces lanuginosus*

Nepoželjna tvar	Sirovi PT3	Fermentirani PT3
NITRATI I NITRITI [mg/kg]		
Nitrati	128	< 50
Nitriti	< 50	< 50
MIKOTOKSINI [mg/kg]		
Aflatoksin B_1	< 0,001	< 0,001
Aflatoksin B_2	< 0,0005	< 0,0005
Aflatoksin G_1	< 0,001	< 0,001
Aflatoksin G_2	< 0,0005	< 0,0005
Ukupni aflatoksini	< 0,003	< 0,003
Deoksinivalenol	< 0,20	< 0,20
Fumonizin B_1	< 0,15	< 0,15
Fumonizin B_2	< 0,15	< 0,15
Ukupni fumonizini	< 0,30	< 0,30
Zearalenon	< 0,030	< 0,030
Okratoksin A	< 0,001	< 0,001
MIKOTOKSINI [µg/kg]		
T-2 toksin	< 10	< 10
HT-2 toksin	< 10	< 10
T-2 + HT-2 toksini	< 20	< 20
POLIKLORIRANI BIFENILI (PCB) [mg/kg]		
Ukupni PCB	< 0,035	< 0,035
PCB 28	< 0,005	< 0,005
PCB 52	< 0,005	< 0,005
PCB 101	< 0,005	< 0,005
PCB 118	< 0,005	< 0,005

RADNA VERZIJA

PCB 138	< 0,005	< 0,005
PCB 153	< 0,005	< 0,005
PCB 180	< 0,005	< 0,005
POLICIKLIČKI AROMATSKI UGLJIKOVODICI (PAH) [mg/kg]		
Benzo(a)antracen	< 0,005	< 0,005
Benzo(a)piren	< 0,005	< 0,005
Benzo(b)fluoranten	< 0,005	< 0,005
Krizen	< 0,005	< 0,005
Zbroj PAH-ova	< 0,020	< 0,020
ERGOT ALKALOIDI [µg/kg]		
Ergokristinin	< 10	< 10
Ergokristin	< 10	< 10
Ergotaminin	< 10	< 10
Ergotamin	< 10	< 10
Ergokriptinin	< 10	< 10
α-Ergokriptin	< 10	< 10
Ergokorninin	< 10	< 10
Ergokornin	< 10	< 10
Ergozinin	< 10	< 10
Ergozin	< 10	< 10
Ergometrinin	< 10	< 10
Ergometrin	< 10	< 10
Ukupni ergot alkaloidi	< 120	< 120
TROPAN ALKALOIDI [µg/kg]		
Atropin	< 1,0	< 1,0
Skopolamin	< 1,0	< 1,0

RADNA VERZIJA

Koncentracija nitrata u sirovom PT3 iznosila je 128 mg/kg, dok je nakon 10 dana SSF-a bila ispod granice kvantifikacije (< 50 mg/kg). Koncentracije nitrita bile su ispod granice kvantifikacije u sirovom i fermentiranom PT3. Smanjenje koncentracije nitrata upućuje na promjene dušične frakcije tijekom fermentacije, pri čemu na temelju provedenih analiza nije moguće odrediti mehanizam niti put njihove transformacije.

Koncentracije svih analiziranih mikotoksina bile su ispod odgovarajućih granica kvantifikacije u sirovom i fermentiranom PT3. Koncentracije analiziranih mikotoksina bile su niže od odgovarajućih najvećih dopuštenih odnosno preporučenih vrijednosti za krmiva, navedenih u poglavlju **4.1.5.2**. Budući da koncentracije mikotoksina nisu bile iznad granica kvantifikacije ni u sirovom uzorku, na temelju provedenih analiza nije moguće utvrditi njihovu eventualnu razgradnju tijekom SSF-a s *T. lanuginosus*. ui i sur. (2021) također nisu utvrdili proizvodnju analiziranih mikotoksina tijekom SSF-a ostatka čaja s *A. niger* i *T. koningii*.

Koncentracije analiziranih PCB-a, PAH-ova, ergot alkaloida i tropan alkaloida bile su ispod odgovarajućih granica kvantifikacije u sirovom i fermentiranom PT3. Nakon SSF-a s *T. lanuginosus* nisu utvrđene nepovoljne promjene analiziranih pokazatelja sigurnosti supstrata PT3. Zbog granica kvantifikacije primijenjenih analitičkih metoda nije bilo moguće provesti konačnu regulatornu procjenu ukupne koncentracije PCB-ova. Rezultati provedenih analiza omogućuju daljnje razmatranje fermentiranog PT3 za primjenu u hranidbi životinja, uz potrebu za procjenom ostalih relevantnih pokazatelja sigurnosti i hranidbene vrijednosti.

4.3. Procjena nutritivnog potencijala biološki obrađenog pivskog tropa za primjenu u hranidbi životinja

Promjene kemijskog sastava supstrata PT1 i PT2 nakon SSF-a s *T. versicolor* te PT3 nakon SSF-a s *T. lanuginosus* pokazuju da biološka obrada može utjecati na nutritivni sastav pivskog tropa i mogućnosti njegove primjene u hranidbi životinja. Učinak fermentacije razlikovao se između triju ispitivanih supstrata, što upućuje na ovisnost promjena kemijskog sastava o početnim svojstvima supstrata i primijenjenom mikroorganizmu. Procjena nutritivnog potencijala fermentiranog pivskog tropa stoga zahtijeva razmatranje promjena proteinske i aminokiselinske frakcije, lignocelulozno sastava, udjela lipida, mineralnih i fenolnih sastavnica te energetskog potencijala. Pritom je potrebno razlikovati promjene relativnih udjela pojedinih sastavnica u suhoj tvari od promjena njihovih apsolutnih količina te kemijski sastav

RADNA VERZIJA

materijala od njegove probavljivosti i raspoloživosti životinji. Pri usporednoj interpretaciji rezultata potrebno je uzeti u obzir da su se provedene fermentacije, osim prema primijenjenom mikroorganizmu, međusobno razlikovale prema početnim svojstvima pivskog tropa i uvjetima provedbe. Razlike između uzoraka fermentiranih s *T. versicolor* i *T. lanuginosus* ne mogu pripisati isključivo vrsti primijenjene gljive, već ih je potrebno razmatrati u kontekstu početnih svojstava supstrata i procesnih uvjeta.

Promjene proteinske frakcije jasno su pokazale različit odgovor triju ispitivanih supstrata na SSF. U PT2 i PT3 nakon fermentacije utvrđeno je povećanje udjela sirovih proteina, dok je u PT1 njihov udio bio niži u odnosu na nefermentirani uzorak Povećanje udjela sirovih proteina tijekom fermentacije potrebno je razmatrati uz istodobne promjene ostalih sastavnica suhe tvari. Tijekom rasta filamentoznih gljiva dolazi do razgradnje i respiracijskog gubitka dijela organske tvari, zbog čega se manje razgradive sastavnice mogu relativno koncentrirati u preostaloj suhoj tvari. Povećanje udjela sirovih proteina stoga može biti posljedica promjena proteinske frakcije, stvaranja mikrobne biomase i smanjenja udjela drugih sastavnica supstrata, bez proporcionalnog povećanja apsolutne količine nutritivno raspoloživih proteina.

Procjena hranidbene vrijednosti proteinske frakcije obuhvaća i aminokiselinski sastav te probavljivost pojedinih aminokiselina. U supstratu PT3 povećanje udjela sirovih proteina nakon SSF-a s *T. lanuginosus* nije bilo praćeno povećanjem koncentracija većine analiziranih aminokiselina. Povećanje udjela sirovih proteina stoga se ne može izravno poistovjetiti s poboljšanjem kvalitete proteinske frakcije. Cai i sur. (2025) analizom deset uzoraka pivskog tropa utvrdili su razlike u kemijskom sastavu, probavljivoj i metaboličkoj energiji te standardiziranoj ilealnoj probavljivosti aminokiselina. Veći udio vlaknaste frakcije bio je negativno povezan s probavljivošću pojedinih aminokiselina, dok su razlike u kemijskom sastavu bile povezane i s energetskim iskorištenjem pivskog tropa. Navedeni rezultati pokazuju da hranidbena vrijednost proteinske frakcije, osim o udjelu sirovih proteina, ovisi o aminokiselinskom sastavu, probavljivosti i dostupnosti proteina u strukturi pivskog tropa.

Promjene lignoceluloznog sastava važne su za procjenu hranidbene vrijednosti pivskog tropa jer visok udio strukturnih ugljikohidrata ograničava njegovo iskorištavanje, osobito u hranidbi monogastričnih životinja (Huang i sur., 2025). Promjene udjela hemiceluloze, celuloze i lignina razlikovale su se između supstrata PT1, PT2 i PT3, što pokazuje da učinak SSF-a ovisi o svojstvima primijenjenog supstrata. Budući da su rezultati analize lignoceluloznih sastavnica

RADNA VERZIJA

izraženi kao udjeli u suhoj tvari, njihove relativne promjene ne odražavaju nužno jednak stupanj apsolutne razgradnje tijekom fermentacije.

Cai i sur. (2025) utvrdili su da veći udio vlakana u pivskom tropu može biti povezan s nižom probavljivom i metaboličkom energijom te smanjenom ilealnom probavljivošću pojedinih aminokiselina. Estevão-Rodrigues i sur. (2024) nakon SSF-a pivskog tropa s *Aspergillus ibericus* utvrdili su povećanje udjela proteina i smanjenje udjela vlaknaste frakcije. Primjena fermentiranog pivskog tropa u hranidbi rezultirala je većom probavljivošću suhe tvari, proteina, pojedinih aminokiselina, lipida i energije u odnosu na nefermentirani materijal. Navedeni rezultati pokazuju da SSF može utjecati na hranidbenu vrijednost biomase promjenom njezina kemijskog sastava i strukture, što može povećati dostupnost hranjivih tvari tijekom probave.

Nakon SSF-a u sva tri ispitivana supstrata utvrđeno je smanjenje udjela lipida, što je potrebno razmotriti u kontekstu promjena energetske vrijednosti fermentirane biomase. Budući da lipidi imaju visoku energetsku vrijednost, njihovo smanjenje može pridonijeti smanjenju bruto energije fermentiranog materijala. Međutim, ukupni udio lipida ne određuje samostalno količinu energije koju životinja može iskoristiti. Cai i sur. (2025) utvrdili su povezanost energetskog iskorištenja pivskog tropa s njegovim kemijskim sastavom, uključujući udjele lipida i vlakana. Estevão-Rodrigues i sur. (2024) utvrdili su veću probavljivost lipida i energije fermentiranog pivskog tropa u odnosu na nefermentirani, unatoč smanjenju udjela lipida nakon SSF-a. Smanjenje udjela lipida nakon fermentacije stoga ne mora biti praćeno proporcionalnim smanjenjem metabolički iskoristive energije ako se istodobno poveća probavljivost ostalih hranjivih sastavnica.

Za procjenu nutritivnog potencijala fermentiranog pivskog tropa potrebno je razmotriti i promjene mineralnog sastava. Povećanje koncentracije pojedinih mineralnih elemenata nakon SSF-a ne mora označavati povećanje njihove apsolutne količine, već može biti povezano s razgradnjom organske tvari i relativnim povećanjem udjela mineralne frakcije u preostaloj biomasi. Ukupna koncentracija mineralnog elementa ne mora odgovarati količini dostupnoj za apsorpciju u gastrointestinalnom sustavu. Fărcaș i sur. (2022) utvrdili su razlike u *in vitro* biodostupnosti mineralnih elemenata između različitih uzoraka pivskog tropa, pri čemu je najveća biodostupnost kalcija iznosila 16,03 %, a željeza 30,03 %. Navedeni rezultati pokazuju da se mineralni sastav pivskog tropa ne može izravno poistovjetiti s nutritivnom raspoloživošću mineralnih elemenata. Promjene koncentracija elemenata utvrđene u supstratima PT1, PT2 i

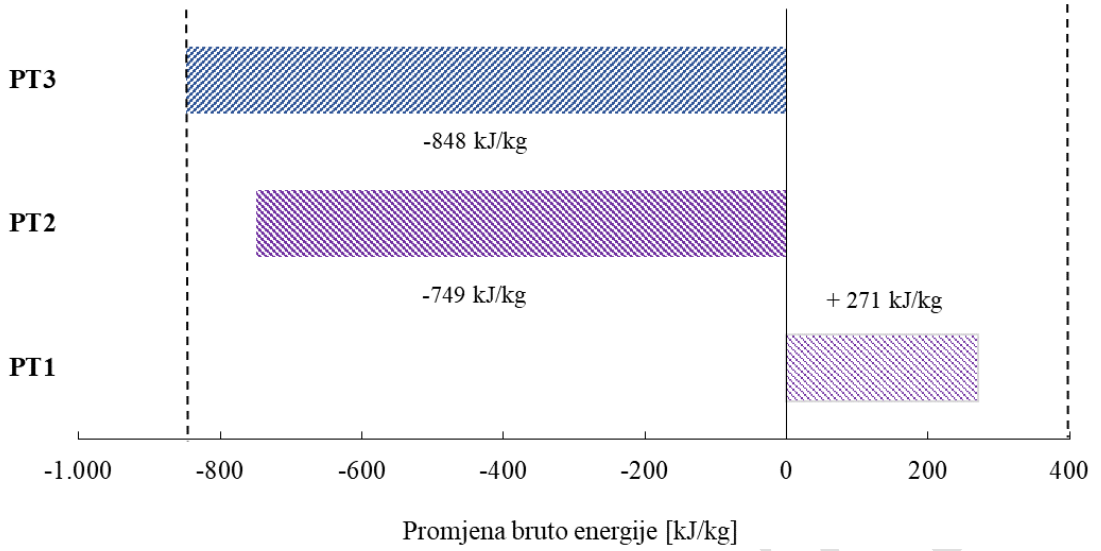
RADNA VERZIJA

PT3 stoga upućuju na promjene mineralnog sastava, dok bi za potvrdu njihove nutritivne vrijednosti bilo potrebno dodatno odrediti biodostupnost i bioraspoloživost kod pojedinih životinja.

Nakon biološke obrade utvrđene su i promjene koncentracija fenolnih spojeva, koje su se razlikovale između ispitivanih supstrata. Nakon SSF-a s *T. versicolor* u supstratu PT1 utvrđeno je statistički značajno povećanje koncentracije ukupnih polifenola i flavonoida, dok promjene u susptartu PT2 nisu bile statistički značajne. U susptratu PT3 nakon SSF-a s *T. lanuginosus* statistički su se značajno povećale koncentracije ukupnih polifenola i proantocijanidina, dok povećanje ukupnih flavonoida nije bilo statistički značajno. Razlike između supstrata PT1 i PT2 nakon fermentacije s *T. versicolor* upućuju na povezanost početnih svojstava pivskog tropa s promjenama fenolnog sastava tijekom SSF-a. Povećanje koncentracije fenolnih spojeva pridonijeti funkcionalnoj vrijednosti fermentiranog pivskog tropa zbog mogućeg antioksidacijskog i protuupalnog djelovanja polifenola u hranidbi životinja (Gessner i sur., 2017). Međutim, povećanje njihove ukupne koncentracije ne podrazumijeva i povećanje njihova biološkog učinka. Bioraspoloživost polifenola ovisi o kemijskoj strukturi pojedinog spoja, njegovu oslobađanju iz matrice, apsorpciji, metabolizmu i transformacijama u gastrointestinalnom sustavu, uključujući interakcije s crijevnom mikrobiotom (Bešlo i sur., 2023). Stoga rezultati ovog istraživanja upućuju na povećanje bioaktivnog potencijala pojedinih fermentiranih uzoraka, dok bi potvrda njihove funkcionalne vrijednosti u hranidbi životinja zahtijevala dodatna ispitivanja biodostupnosti, bioraspoloživosti i *in vivo* bioloških učinaka.

Promjene bruto energije pivskog tropa tijekom SSF-a određene su radi procjene energetskog potencijala fermentirane biomase. Nakon fermentacije bruto energija PT1 povećala se s 20 187 na 20 458 kJ/kg, odnosno za 1,34 %, dok se u PT2 smanjila s 19 622 na 18 873 kJ/kg, odnosno za 3,82 %. U supstratu PT3 bruto energija nakon 10 dana SSF-a s *T. lanuginosus* smanjila se s19 091 na 18 243 kJ/kg, odnosno za 4,44 %. Vrijednosti bruto energije supstrata PT1, PT2 i PT3 prije i nakon SSF-a prikazane su na **Slici 35**.

RADNA VERZIJA



Slika 35 Promjena bruto energije pivskog tropa PT1 i PT2 nakon 15 dana fermentacije na čvrstim nosačima (SSF) s *Trametes versicolor* te PT3 nakon 10 dana SSF-a s *Thermomyces lanuginosus*. Pozitivna vrijednost označava povećanje, a negativna vrijednost smanjenje bruto energije nakon fermentacije u odnosu na odgovarajući sirovi pivski trop.

Nakon fermentacije utvrđene su različite promjene bruto energije, pri čemu se njezina vrijednost u supstratu PT1 povećala, dok se u supstratima PT2 i PT3 smanjila. Promjene bruto energije mogu se povezati s razgradnjom i metaboličkim iskorištavanjem organskih sastavnica supstrata te gubitkom dijela organske tvari respiracijom tijekom fermentacije. Smjer promjene bruto energije stoga treba promatrati u kontekstu istodobnih promjena udjela lipida, proteina i lignoceluloznih sastavnica. Bruto energija označava ukupnu količinu energije oslobođenu potpunim izgaranjem materijala, ali nije izravna mjera energije koju životinja može iskoristiti. Probavljiva energija predstavlja dio bruto energije umanjen za energiju izgubljenu fecesom, dok se metabolička energija dobiva dodatnim umanjenjem za energiju izgubljenu urinom i plinovitim produktima metabolizma. Cai i sur. (2025) utvrdili su razlike u probavljivoj i metaboličkoj energiji između uzoraka pivskog tropa te njihovu povezanost s kemijskim sastavom, osobito udjelom vlaknaste frakcije. Estevão-Rodrigues i sur. (2024) utvrdili su veću probavljivost energije fermentiranog u odnosu na nefermentirani pivski trop. Stoga se smanjenje bruto energije utvrđeno u PT2 i PT3 ne može izravno tumačiti kao proporcionalno smanjenje njihove hranidbene energetske vrijednosti. Za procjenu energije raspoložive životinji

RADNA VERZ

potrebno je odrediti probavljivu i metaboličku energiju primjenom odgovarajućeg in vivo modela.

Mogućnost primjene fermentiranog pivskog tropa u hranidbi životinja, osim o nutritivnom sastavu i energetskom potencijalu, ovisi i o njegovoj sigurnosti. Primjena fermentiranog pivskog tropa u hranidbi životinja zahtijeva da biološka obrada ne bude praćena pojavom ili povećanjem koncentracija spojeva koji mogu predstavljati rizik za zdravlje životinja. Uz analizu kemijskog sastava supstrata PT1, PT2 i PT3 provedeno je određivanje odabranih nepoželjnih tvari, uključujući mikotoksine. Na temelju analiziranih pokazatelja nisu utvrđene nepovoljne promjene sigurnosnih svojstava supstrata PT1 i PT2 nakon SSF-a s *T. versicolor* te PT3 nakon SSF-a s *T. lanuginosus* u primijenjenim eksperimentalnim uvjetima.

Sigurnost pivskog tropa potrebno je razmatrati s obzirom na njegovo podrijetlo iz žitarica i visoku kvarljivost. Nepoželjne tvari prisutne u hrani za životinje mogu izazvati hepatotoksične, nefrotoksične, neurotoksične, genotoksične i imunosupresivne učinke, ovisno o vrsti spoja, njegovoj koncentraciji i trajanju izloženosti (Abdallah i sur., 2022). Mikotoksini mogu potjecati iz ulaznih žitarica, dok visoka vlažnost svježeg pivskog tropa i neodgovarajući uvjeti skladištenja pogoduju mikrobiološkom kvarenju i razvoju plijesni. Penagos-Tabares i sur. (2022) utvrdili su istodobnu prisutnost mikotoksina i drugih gljivičnih metabolita u pivskom tropu namijenjenom hranidbi mliječnih krava te istaknuli potrebu za procjenom višestruke i dugotrajne izloženosti tim spojevima.

Procjena mogućnosti primjene fermentiranog pivskog tropa u hranidbi životinja ne može se temeljiti isključivo na promjenama nutritivnog sastava. Izostanak nepovoljnih promjena analiziranih pokazatelja sigurnosti tijekom SSF-a s *T. versicolor* i *T. lanuginosus* omogućuje daljnje razmatranje primjene fermentirane biomase u hranidbi životinja. Prisutnost nepoželjnih tvari u konačnom proizvodu ovisi o kvaliteti ulazne sirovine, uvjetima fermentacije, higijeni procesa, načinu konzerviranja, uvjetima skladištenja i rukovanju materijalom. Provedena analiza odabranih kemijskih pokazatelja ne predstavlja cjelovitu procjenu sigurnosti fermentiranog pivskog tropa kao krmiva. Za potpunu procjenu njegove prikladnosti za primjenu u hranidbi životinja bila bi potrebna dodatna ispitivanja mikrobiološke ispravnosti, stabilnosti tijekom skladištenja i prisutnosti drugih potencijalno relevantnih kontaminanata koji nisu bili obuhvaćeni provedenim analizama.

RADNA VERZIJA

Rezultati nutritivne, energetske i sigurnosne karakterizacije pokazali su da su promjene svojstava pivskog tropa tijekom SSF-a ovisile o početnim svojstvima supstrata i primijenjenom mikroorganizmu. Nakon fermentacije u pojedinim su uzorcima utvrđeni povećanje udjela sirovih proteina, promjene lignocelulozno i mineralnog sastava te povećanje koncentracija pojedinih fenolnih spojeva, uz istodobne promjene udjela lipida i bruto energije. Razlike između supstrata PT1 i PT2, unatoč primjeni iste gljive, *T. versicolor*, upućuju na utjecaj početnog kemijskog sastava i drugih svojstava supstrata na ishod fermentacije. U supstratu PT3 povećanje udjela sirovih proteina nakon SSF-a s *T. lanuginosus* nije bilo praćeno povećanjem koncentracija većine analiziranih aminokiselina, dok se bruto energija smanjila.

Navedeni rezultati pokazuju da procjena nutritivnog potencijala fermentiranog pivskog tropa zahtijeva razmatranje promjena kemijskog sastava, aminokiselinskog profila, energetskog potencijala i analiziranih pokazatelja sigurnosti. Povećanje udjela pojedinih hranjivih ili bioaktivnih sastavnica ne podrazumijeva nužno povećanje njihove apsolutne količine, probavljivosti ili bioraspoloživosti, kao što se ni smanjenje bruto energije ne može izravno poistovjetiti s proporcionalnim smanjenjem metabolički iskoristive energije. Odabir mikroorganizma i uvjeta SSF-a stoga treba temeljiti na početnim svojstvima supstrata i predviđenoj primjeni fermentirane biomase.

U okviru koncepta biorafinerije, SSF pivskog tropa omogućuje proizvodnju ekstracelularnih enzima uz istodobnu biološku modifikaciju preostale biomase, čime se otvara mogućnost njezine daljnje valorizacije. Promjene kemijskog sastava i analizirani pokazatelji sigurnosti fermentiranog pivskog tropa omogućuju razmatranje njegove moguće primjene u hranidbi životinja. Budući da hranidbena vrijednost čvrstog ostatka nakon ekstrakcije enzimskog pripravka nije izravno ispitivana, povezivanje proizvodnje enzima i daljnjeg iskorištavanja preostale biomase zahtijeva dodatna istraživanja. Takav bi pristup omogućio dobivanje više proizvoda iz iste početne sirovine i povećanje ukupnog stupnja iskorištenja pivskog tropa.

4.4. Rezultati LCA analize integriranog procesa biološke valorizacije pivskog tropa

LCA analizom procijenjeni su potencijalni okolišni utjecaji proizvodnje djelomično pročišćenog ksilanaznog pripravka i fermentirane biomase namijenjene mogućoj primjeni u hranidbi životinja. Za referentnu količinu od 0,015 kg djelomično pročišćenog ksilanaznog

RADNA VERZIJA

pripravka rezultat kategorije klimatskih promjena iznosio je 50,81 kg CO_2-eq[7], uporabe neobnovljivih energetskih resursa 751,50 MJ, uporabe vode 44,65 m^3 world eq deprived[8], ekotoksičnosti slatkih voda 174,56 CTUe[9], a zakiseljavanja 0,591 mol H^+-eq[10]. Za referentnu količinu od 0,200 kg fermentirane biomase rezultati istih kategorija utjecaja iznosili su 81,14 kg CO_2-eq, 1200,21 MJ, 72,25 m^3 world eq deprived, 268,02 CTUe i 0,944 mol H^+-eq (**Tablica 16**).

Tablica 16 Odabrane kategorije utjecaja za dva proizvodna toka biološke valorizacije pivskog tropa

Kategorija utjecaja	**Djelomično pročišćeni ksilanazni pripravak 0,015 kg**	**Fermentirani bivski trop 0,200 kg**
Klimatske promjene (kg CO_2 eq)	50,81	81,14
Neobnovljivi energetski resursi (MJ)	751,50	1200,21
Uporaba vode (m^3 world eq deprived)	44,65	72,25
Ekotoksičnost slatkih voda (CTUe)	174,56	268,02
Zakiseljavanje (mol H^+ eq)	0,591	0,944

Rezultati pojedinačnih proizvodnih tokova nisu izravno usporedivi jer se odnose na različite referentne količine i proizvode različite namjene. Prikazani rezultati omogućuju zasebnu procjenu okolišnih utjecaja pojedinih proizvodnih tokova prije analize integriranog sustava. Okolišni utjecaji proizvodnje ksilanaznog pripravka može se povezati s energetskim zahtjevima SSF-a i naknadne obrade enzimskog pripravka. Singh i sur. (2022) tijekom proizvodnje

[7] eq – ekvivalent (engl. *equivalent*); oznaka koja se u LCA koristi za izražavanje rezultata kategorije utjecaja u odnosu na referentnu tvar ili referentni učinak.

[8] m^3 world eq deprived – kubični metar svjetskog ekvivalenta uskraćene vode; karakterizacijska jedinica metode EF kojom se izražava potencijal uporabe vode uzimajući u obzir relativnu oskudicu vode na mjestu njezina korištenja.

[9] CTUe – usporedna toksična jedinica za ekosustave (eng. *Comparative Toxic Unit for ecosystems*); karakterizacijska jedinica koja se koristi za izražavanje potencijalne ekotoksičnosti za ekosustave.

[10] H^+ eq – ekvivalent vodikovih iona; referentna jedinica za izražavanje potencijala zakiseljavanja u LCA analizi.

RADNA VERZIJA

djelomično pročišćene ksilanaze iz rižine slame primjenom SSF-a utvrdili su da je potrošnja električne energije činila 92,84 % procijenjenog okolišnog opterećenja, dok se dodatnih 6,17 % odnosilo na primjenu amonijeva sulfata. Catalán i sur. (2019) tijekom LCA analize proizvodnje celulaze iz ljuske kave primjenom SSF-a utvrdili su da je naknadna obrada predstavljala okolišno najzahtjevniji dio proizvodnje, dok je liofilizacija bila energetski najzahtjevnija operacija. Navedeni rezultati pokazuju da okolišni utjecaji proizvodnje enzima, osim o fermentaciji, ovise i o postupcima izdvajanja, koncentriranja i pročišćavanja konačnog proizvoda.

4.4.1. Okolišni profil osnovnog integriranog procesa

Za osnovni integrirani model, pri referentnom toku od 1,000 kg valoriziranog pivskog tropa, rezultat kategorije klimatskih promjena iznosio je 105,56 kg CO_2 eq. Rezultati ostalih kategorija utjecaja iznosili su 1 561,37 MJ za uporabu neobnovljivih energetskih resursa, 93,52 m^3 world eq deprived za uporabu vode, 354,07 CTUe za ekotoksičnost slatkih voda i 1,228 mol H^+ eq za zakiseljavanje. Od ukupnog rezultata kategorije klimatskih promjena 105,37 kg CO_2 eq odnosilo se na fosilnu komponentu, što predstavlja približno 99,8 % ukupne vrijednosti, dok su doprinosi biogene komponente i promjene uporabe zemljišta bili manji. Fosilni emisijski tokovi stoga su činili gotovo cjelokupan rezultat kategorije klimatskih promjena u osnovnom modelu.

Analizirana je i potrošnja električne energije pojedinih laboratorijskih operacija kako bi se utvrdio njihov doprinos ukupnoj potrošnji. Ukupna evidentirana potrošnja električne energije osnovnog procesa iznosila je približno 247,89 kWh. Najveći udio potrošnje električne energije odnosio se na desetodnevni SSF (168 kWh), što je činilo 67,8 % ukupne potrošnje. Na liofilizaciju se odnosilo 49,68 kWh (20,0 %), na dijalizu 15,84 kWh (6,4 %), a na sterilizaciju 8,33 kWh (3,4 %) ukupne potrošnje. SSF i liofilizacija zajedno su tako činili približno 87,8 % ukupne potrošnje električne energije osnovnog laboratorijskog procesa.

Najveći udio SSF-a u potrošnji električne energije povezan je s desetodnevnim održavanjem procesa pri 45 °C. Slični rezultati utvrđeni su u LCA proizvodnje mikrobnog proteina iz nusproizvoda prerade zobi, pri čemu je fermentacija imala najveći doprinos kategorijama klimatskih promjena, eutrofikacije slatkih voda i uporabe vode. Električna energija potrebna za miješanje, aeraciju i hlađenje tijekom fermentacije činila je 68 % rezultata kategorije klimatskih promjena i 66 % eutrofikacije slatkih voda, dok je voda za hlađenje činila 55 % rezultata kategorije uporabe vode (Kobayashi i sur., 2023). U laboratorijskom mjerilu dugotrajan rad

RADNA VERZIJA

opreme povezan je s većom potrošnjom energije po jedinici proizvoda zbog relativno malih proizvodnih količina. Hren i sur. (2023) utvrdili su da je pri laboratorijskoj proizvodnji bioaktivnog ekstrakta liofilizacija činila čak 98,23 % potrošnje električne energije. U predloženom pilot-mjerilu promijenila se struktura potrošnje električne energije, pri čemu je najveći udio od 68,96 % zabilježen za uparavanje. Navedeni rezultati pokazuju da iskorištenje kapaciteta opreme i odabir tehnoloških operacija mogu utjecati na strukturu potrošnje električne energije.

Rezultati osnovnog modela pokazuju da primjena otpadne lignocelulozne sirovine ne podrazumijeva nužno nizak okolišni utjecaj procesa. U laboratorijskom mjerilu okolišni utjecaji procesa povezani su s trajanjem SSF-a, kontinuiranim radom opreme i energetskim zahtjevima naknadne obrade proizvoda. Navedeni procesni parametri razmotreni su u alternativnim scenarijima prikazanima u **poglavlju 4.4.2.**

4.4.2. Utjecaj procesnih i energetskih scenarija

U svim alternativnim procesnim i energetskim scenarijima utvrđeno je smanjenje rezultata pet analiziranih kategorija okolišnih utjecaja u odnosu na osnovni model (**Tablica 17**).

Tablica 17 Odabrani karakterizacijski rezultati osnovnog modela i alternativnih scenarija S1–S5

Model	Klimatske promjene (kg CO_2 eq)	Uporaba neobnovljivih energetskih resursa (MJ)	Uporaba vode (m^3 world eq deprived)	Ekotoksičnost slatkih voda (CTUe)	Zakiseljavanje (mol H^+ eq)
Osnovni model	105,56	1 561,37	93,52	354,07	1,228
S1	62,24	920,60	55,51	209,72	0,724
S2	76,43	1 130,47	67,71	256,93	0,889
S3	55,18	816,19	49,07	186,76	0,642
S4	55,55	821,60	49,49	187,96	0,646
S5	**40,56**	**599,97**	**36,35**	**138,47**	**0,472**

U scenariju S1 rezultat kategorije klimatskih promjena smanjio se sa 105,56 na 62,24 kg CO_2 eq, odnosno za 41,04 %. U odnosu na osnovni model, rezultat kategorije uporabe neobnovljivih

RADNA VERZIJA

energetskih resursa smanjio se za 41,04 %, uporabe vode za 40,65 %, ekotoksičnosti slatkih voda za 40,77 %, a zakiseljavanja za 41,03 %. Smanjenje okolišnih utjecaja u scenariju S1 povezano je s manjom potrošnjom energije autoklava i inkubatora te prilagodbom potrošnje liofilizatora iskorištenju njegova kapaciteta. Hren i sur. (2023) također su utvrdili da je veća potrošnja električne energije po jedinici proizvoda bila jedan od glavnih uzroka većih okolišnih utjecaja laboratorijskog procesa u odnosu na predloženo pilot-mjerilo. Pri povećanju mjerila procesnog mjerila primjena opreme većeg kapaciteta omogućila je smanjenje potrošnje električne energije po jedinici proizvoda.

U scenariju S2 rezultat kategorije klimatskih promjena iznosio je 76,43 kg CO_2 eq, odnosno 27,60 % manje u odnosu na osnovni model. Rezultati kategorija uporabe neobnovljivih energetskih resursa i uporabe vode smanjili su se za približno 27,60 %, ekotoksičnosti slatkih voda za 27,43 %, a zakiseljavanja za 27,60 %. Scenarij S2 temeljio se na potpunijem iskorištenju kapaciteta autoklava i inkubatora te izostavljanju liofilizacije. U scenariju S3 rezultat kategorije klimatskih promjena iznosio je 55,18 kg CO_2 eq, odnosno 47,72 % manje u odnosu na osnovni model. Rezultat kategorije uporabe neobnovljivih energetskih resursa smanjio se za 47,73 %, uporabe vode za 47,53 %, ekotoksičnosti slatkih voda za 47,25 %, a zakiseljavanja za 47,72 %.

U scenariju S4, u kojem je trajanje SSF-a skraćeno s deset na sedam dana, utvrđeni su rezultati okolišnih utjecaja usporedivi sa scenarijem S3. Rezultat kategorije klimatskih promjena iznosio je 55,55 kg CO_2 eq, odnosno 47,38 % manje u odnosu na osnovni model. U odnosu na S3 rezultat je bio viši za 0,37 kg CO_2 eq, približno 0,66 %. Usporedivi rezultati scenarija S3 i S4 utvrđeni su i za uporabu neobnovljivih energetskih resursa, uporabu vode, ekotoksičnost slatkih voda i zakiseljavanje.

Rezultati scenarija S3 i S4 pokazuju da se usporedivo smanjenje okolišnih utjecaja može postići različitim procesnim promjenama, uključujući smanjenje energetskih zahtjeva opreme i skraćivanje trajanja fermentacije. Trajanje SSF-a, osim što utječe na proizvodnju enzima i svojstva fermentirane biomase, određuje i trajanje rada inkubatora te povezanu potrošnju električne energije. Rezultati scenarijske analize mogu se razmatrati u okviru koncepta integriranih biorafinerija, koji se temelji na iskorištavanju nusproizvoda i bočnih tokova za proizvodnju više proizvoda dodane vrijednosti. Zahović i sur. (2026) navode višestruku valorizaciju nusproizvoda kao jedno od temeljnih obilježja integriranih biorafinerijskih sustava

RADNA VERZIJA

te potrebu za povezivanjem razvoja procesa s tehno-ekonomskom procjenom i procjenom životnog ciklusa. Istodobna proizvodnja djelomično pročišćenog ksilanaznog pripravka i fermentirane biomase iz pivskog tropa predstavlja pristup kaskadnoj valorizaciji, pri čemu LCA analiza omogućuje prepoznavanje procesnih koraka s potencijalom za smanjenje okolišnih utjecaja integriranog sustava. Kobayashi i sur. (2023) utvrdili su da produljenje fermentacije povećava okolišne utjecaje zbog dulje potrošnje električne energije. Potrošnju električne energije tijekom fermentacije izdvojili su kao jedan od važnih čimbenika za daljnju optimizaciju procesa.

Najniži rezultati svih pet analiziranih kategorija okolišnih utjecaja utvrđeni su u scenariju S5, koji je uključivao skraćivanje SSF-a na sedam dana, potpunije iskorištenje kapaciteta opreme, izostavljanje liofilizacije te smanjenje energetskih zahtjeva autoklava i inkubatora. U scenariju S5 rezultat kategorije klimatskih promjena smanjen je sa 105,56 na 40,56 kg CO_2 eq, odnosno za 61,57 % u odnosu na osnovni model. Rezultat kategorije uporabe neobnovljivih energetskih resursa smanjio se s 1 561,37 na 599,97 MJ (61,57 %), uporaba vode s 93,52 na 36,35 m^3 world eq deprived (61,13 %), ekotoksičnost slatkih voda s 354,07 na 138,47 CTUe (60,89 %), a zakiseljavanje s 1,228 na 0,472 mol H^+ eq (61,57 %).

U scenariju S5 utvrđene su niže vrijednosti svih analiziranih kategorija i potkategorija okolišnih utjecaja metode EF v3.1 u odnosu na osnovni model, uz relativna smanjenja od približno 49,8 do 61,6 %. Cjeloviti karakterizacijski rezultati osnovnog modela i scenarija S1–S5 prikazani su u **Prilogu 1**. Da Fonseca i sur. (2024) analizirali su četiri tehnološke konfiguracije valorizacije pivskog tropa te utvrdili da odabir procesnog puta može utjecati na rezultate okolišnih utjecaja. U tehnološkoj konfiguraciji usmjerenoj na proizvodnju proteina rezultat kategorije klimatskih promjena iznosio je 2,4 kg CO^2 eq u kategoriji klimatskih promjena, dok je u konfiguraciji koja je uključivala zamjenu izolata sojinih proteina iznosio −53,9 kg CO^2 eq. Rezultati navedenog istraživanja nisu izravno usporedivi s rezultatima ovog rada zbog razlika u proizvodima, granicama sustava i načinu modeliranja. Međutim, upućuju na utjecaj odabira procesne konfiguracije i načina valorizacije pojedinih proizvodnih tokova na rezultate okolišnih utjecaja (da Fonseca i sur., 2024). Okolišni utjecaji valorizacije pivskog tropa ovise i o namjeni dobivenog proizvoda. Davison i sur. (2026) usporedili su uporabu pivskog tropa kao stočne hrane s njegovim usmjeravanjem u anaerobnu digestiju. U analiziranom sustavu Ujedinjenog Kraljevstva preusmjeravanje pivskog tropa u anaerobnu digestiju rezultiralo je povećanjem emisija za 39 kt CO^2 eq kada je izgubljena funkcija krmiva nadomještena sojom, dok je

RADNA VERZIJA

primjena boba kao zamjenskog krmiva rezultirala smanjenjem emisija za 27 kt CO^2 eq. Navedeni rezultati pokazuju da okolišni utjecaji ovise o postupku obrade pivskog tropa, namjeni dobivenog proizvoda i njegovoj funkciji u analiziranom sustavu.

Rezultati LCA analize pokazali su da su okolišni utjecaji razvijenog laboratorijskog procesa povezani s energetskim zahtjevima SSF-a i naknadne obrade proizvoda. U osnovnom modelu na SSF i liofilizaciju odnosilo se približno 87,8 % evidentirane potrošnje električne energije. Scenarijska analiza pokazala je da se skraćivanjem trajanja fermentacije, potpunijim iskorištenjem kapaciteta opreme i promjenama energetski zahtjevnih operacija mogu smanjiti okolišni utjecaji procesa. Najniže vrijednosti analiziranih kategorija okolišnih utjecaja utvrđene su u scenariju S5, uz smanjenje rezultata kategorije klimatskih promjena za 61,57 % te usporediva smanjenja rezultata uporabe neobnovljivih energetskih resursa, uporabe vode, ekotoksičnosti slatkih voda i zakiseljavanja. Daljnji razvoj kaskadne valorizacije pivskog tropa stoga treba usmjeriti na iskorištavanje različitih proizvodnih tokova i optimizaciju procesnih operacija s najvećim doprinosom okolišnim utjecajima.

RADNA VERZIJA

RADNA VERZIJA

5. Zaključci

Na osnovi provedenog istraživanja izvedeni su sljedeći zaključci:

- **Fermentacijom pivskog tropa na čvrstim nosačima s *T. versicolor* i *T. lanuginosus* ostvarena je proizvodnja enzima uz promjene kemijskog sastava supstrata, čime je potvrđen potencijal pivskog tropa za biotehnološku valorizaciju.** Dokazano je da razlike u promjenama mase, pH, enzimskih aktivnosti i kemijskog sastava proizlaze iz međudjelovanja početnih svojstava supstrata, metaboličkih svojstava primijenjene gljive i procesnih uvjeta. Stoga je odabir mikroorganizma i uvjeta fermentacije potrebno uskladiti sa svojstvima pojedinog uzorka pivskog tropa te ciljanim ishodom procesa, odnosno proizvodnjom određenih enzima ili fermentiranog proizvoda postizanjem željenih promjena sastava fermentirane biomase.
- **Obrada pivskog tropa s *T. versicolor* rezultirala je različitim promjenama kemijskog i nutritivnog sastava PT1 i PT2.** U PT1 udio sirovih proteina smanjio se s 26,09 na 20,38 $\%_{s.t.}$, dok se u PT2 povećao s 19,18 na 27,07 $\%_{s.t.}$ Udio lipida smanjio se u oba supstrata, dok su se promjene udjela lignoceluloznih sastavnica razlikovale između PT1 i PT2. Dobiveni rezultati upućuju na važan utjecaj početnog sastava pivskog tropa za proizvodnju proteinski obogaćene fermentirane biomase. Pritom povećanje udjela sirovih proteina treba razmatrati zajedno s gubitkom suhe tvari tijekom fermentacije kako bi se razlikovalo relativno povećanje njihova udjela od stvarnog povećanja ukupne količine proteina.
- **Razlike u promjenama aminokiselinskog profila i koncentracije ukupnih reducirajućih šećera dodatno upućuju na važnost svojstava polaznog supstrata za ishod SSF-a.** U eksperimentu s PT1 nakon fermentacije smanjene su koncentracije većine esencijalnih i neesencijalnih aminokiselina, dok je u eksperimentu s PT2 postignuto povećanje koncentracije većine analiziranih aminokiselina. Istodobno se sadržaj ukupnih Nakon SSF-a s *T. versicolor* utvrđene su promjene koncentracija fenolnih spojeva, koje su bile izraženije u supstratu PT1. U PT1 koncentracija ukupnih polifenola povećala se 3,69 puta, a ukupnih flavonoida 1,59 puta, pri čemu su obje promjene bile statistički značajne. U PT2 promjene koncentracija ukupnih polifenola, flavonoida i proantocijanidina nisu bile statistički značajne.
- **Od svih ispitanih enzima, ksilanaza je odabrana za daljnje pročišćavanje i karakterizaciju zbog postignute visoke aktivnsoti tijekom uzgoja T. lanuginosus na PT3. Naime,** najveća aktivnost ksilanaze iznosila je 16 471,82 ± 1 044,61 $U/g_{s.t.}$ i

RADNA VERZIJA

postignuta je nakon 10. dana. Taloženjem amonijevim sulfatom pri zasićenju od 50 % i naknadnom dijalizom ostvaren je faktor pročišćavanja ksilanaze od 2,91 uz prinos aktivnosti od 39,48 %. Sirovi enzimski ekstrakt i djelomično pročišćeni pripravak pokazali su najveću aktivnost pri 65 °C i pH 6 te zadržali više od 96 % početne aktivnosti nakon predinkubacije pri 45–55 °C, dok se stabilnost pri 65 °C i višim temperaturama smanjila. Nakon 60 dana skladištenja u ispitivanim uvjetima sirovi ekstrakt zadržao je 74 % početne aktivnosti, dok u djelomično pročišćenom pripravku nije zabilježen gubitak aktivnosti. SDS-PAGE analizom utvrđen je manji broj proteinskih traka nakon pročišćavanja, uz izraženiju traku koja odgovara proteinu procijenjene molekulske mase od približno 22 kDa.

- **Ksilanaza je testirana kao biokatalizator u hidrolizi različitih lignoceluloznih supstr**ata. Ispitivani ksilanazni pripravci omogućili su neto oslobađanje reducirajućih šećera iz različitih lignoceluloznih supstrata, pri čemu je njihov hidrolitički učinak ovisio o vrsti biomase. Dvofaktorskom ANOVA-om utvrđen je statistički značajan učinak vrste supstrata, enzimskog pripravka i njihove interakcije ($p < 0,001$). SE je najveći učinak ostvario na pivskom tropu, uz 21,59 ± 2,07 mg ekvivalenata glukoze/gs.t., dok je PP bio najučinkovitiji na pogači konoplje, uz 10,49 ± 0,46 mg ekvivalenata glukoze/gs.t. Na repinim rezancima najveći učinak ostvarila je komercijalna ksilanaza, ali se njezin učinak nije statistički značajno razlikovao od PP. Rezultati pokazuju da veća specifična aktivnost ksilanaze ne podrazumijeva nužno i veći hidrolitički učinak na složenoj lignoceluloznoj biomasi te da učinkovitost pripravka ovisi o njegovu međudjelovanju s konkretnim supstratom.

- **SSF s *T. lanuginosus* uzrokovao je promjene kemijskog i nutritivnog sastava PT3, uključujući povećanje udjela sirovih proteina i celuloze te smanjenje udjela lignina i lipida.** Udio sirovih proteina povećao se s 23,15 na 30,84 %$_{s.t.}$, a celuloze s 20,36 na 28,29 %$_{s.t.}$, dok su se udjeli lignina i lipida smanjili s 11,29 na 7,29 %$_{s.\,t.}$, odnosno sa 7,27 na 1,67 %$_{s.t.}$. Udjeli hemiceluloze i pepela nisu se statistički značajno promijenili. Unatoč povećanju udjela sirovih proteina, nakon fermentacije utvrđene su niže koncentracije svih analiziranih esencijalnih i većine neesencijalnih aminokiselina u odnosu na sirovi PT3.

- **SSF s *T. lanuginosus* doveo je do promjena topljive ugljikohidratne, dušične i fenolne frakcije PT3, pri čemu su najizraženije promjene utvrđene u sadržaju**

RADNA VERZIJA

reducirajućih šećera i ukupnih polifenola. Sadržaj ukupnih reducirajućih šećera povećao se 1,51 puta, uz statistički značajno povećanje koncentracija saharoze i riboze. Udio ukupnog ugljika smanjio se, dok se sadržaj ukupnog dušika u vodenom ekstraktu povećao. Sadržaj ukupnih polifenola povećao se sa 7,57 na 9,92 $mg_{GAE}/g_{s.t.}$, a proantocijanidina s 0,21 na 0,23 $mg/g_{s.t.}$, uz statistički značajne razlike, dok promjena sadržaja ukupnih flavonoida nije bila statistički značajna.

- **U okviru provedenih analiza SSF s *T. versicolor* i *T. lanuginosus* nije doveo do nepovoljnih promjena analiziranih pokazatelja sigurnosti fermentiranog pivskog tropa.** U fermentiranim PT1 i PT2 analizirani mikotoksini, PCB-ovi, PAH-ovi te ergot i tropanski alkaloidi bili su ispod granica kvantifikacije, dok su koncentracije Pb, Cd i As ostale znatno ispod relevantnih regulatornih vrijednosti za krmiva. Sličan je obrazac utvrđen i u PT3, u kojem navedene skupine nepoželjnih tvari nisu bile kvantificirane ni nakon fermentacije, a koncentracije analiziranih metala i metaloida ostale su niske. Dobiveni rezultati podupiru daljnje razmatranje fermentirane biomase za primjenu u hranidbi životinja, uz potrebu za dodatnom procjenom sigurnosti konačnog krmiva u stvarnim uvjetima proizvodnje i skladištenja.
- **Promjene nutritivnog i energetskog profila fermentirane biomase nisu bile jednoznačne, što potvrđuje potrebu za integriranom procjenom njezina nutritivnog potencijala.** Povećanje udjela sirovih proteina, bioaktivnih spojeva ili pojedinih mineralnih elemenata nije samo po sebi dovoljno za zaključak o poboljšanoj hranidbenoj vrijednosti, kao što ni smanjenje bruto energije ne znači nužno proporcionalno smanjenje metabolički iskoristive energije. Za konačnu potvrdu hranidbene vrijednosti fermentirane biomase potrebna su dodatna ispitivanja probavljivosti, biodostupnosti, bioraspoloživosti i *in vivo* učinaka.
- **LCA analizom kvantificiran je okolišni profil pojedinačnih proizvodnih tokova i integriranog procesa valorizacije pivskog tropa.** Za 0,015 kg djelomično pročišćenog ksilanaznog pripravka rezultat za klimatske promjene iznosio je 50,81 kg CO2 eq, a za 0,200 kg fermentirane biomase 81,14 kg CO_2 eq. Budući da se radi o različitim proizvodima i referentnim količinama, navedene vrijednosti ne predstavljaju izravnu usporedbu niti se mogu zbrajati.

RADNA VERZIJA

- **U osnovnom integriranom modelu, pri referentnom toku od 1,00 kg valoriziranog pivskog tropa, rezultat za klimatske promjene iznosio je 105,56 kg CO_2 eq, uporabu neobnovljivih energetskih resursa 1 561,37 MJ, uporabu vode 93,52 m^3 world eq deprived, ekotoksičnost slatkih voda 354,07 CTUe, a zakiseljavanje 1,23 mol H^+ eq.** Fosilna komponenta činila je približno 99,80 % ukupnog rezultata kategorije klimatskih promjena.
- **SSF i liofilizacija identificirani su kao energetski najzahtjevnije procesne operacije, što upućuje na njihov značajan potencijal za optimizaciju ukupne potrošnje električne energije.** Navedene operacije zajedno su činile 87,80 % ukupno evidentirane potrošnje električne energije. Mogućnosti optimizacije uključuju skraćivanje trajanja fermentacije, bolje iskorištenje kapaciteta opreme i smanjenje energetskih zahtjeva naknadne obrade, uz očuvanje željenih svojstava proizvoda.
- **Među analiziranim alternativnim procesnim i energetskim scenarijima najpovoljniji okolišni profil ostvaren je scenarijem S5, kojim je procijenjeno znatno smanjenje potencijalnih utjecaja integriranog procesa valorizacije pivskog tropa na okoliš.** Scenarij S5 obuhvatio je skraćivanje trajanja SSF-a na sedam dana, bolje iskorištenje kapaciteta opreme, izostavljanje liofilizacije te smanjenje energetskih zahtjeva autoklava i inkubatora. U odnosu na osnovni integrirani model rezultat u kategoriji klimatskih promjena smanjen je za 61,57 %, uporabe vode za 61,13 %, ekotoksičnosti slatkih voda za 60,89 %, a zakiseljavanja i uporabe neobnovljivih energetskih resursa za približno 61,57 %. Rezultati potvrđuju da optimizacija procesnih uvjeta i energetski zahtjevnih operacija predstavlja važan preduvjet za poboljšanje okolišne učinkovitosti kaskadne valorizacije pivskog tropa.

RADNA VERZIJA

RADNA VERZIJA

6. Literatura

1. Abbasi, V., Sar, T., Agnihotri, S. i Mahboubi, A., 2026. Valorization of Stale Bread Through Solid State Fermentation Using *Neurospora intermedia*. *Waste and Biomass Valorization*, pp.1-13.
2. Abdallah, M.F., Xu, W. i Abdeen, A., 2022. Environmental contaminants and animal health: Analysis, toxicity, and mitigation. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, p.1102836.
3. Abena, T. i Simachew, A., 2024. Production and characterization of acidophilic xylanase from wood degrading white rot fungus by solid-state fermentation of wheat straw. *Heliyon*, 10(15).
4. Adney, B. i Baker, J., 2008. Measurement of Cellulase Activities. Laboratory Analytical Procedure (LAP), Technical Report NREL/TP-510-42628. National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO. NREL Docs
5. Ahlgren, S., Björklund, A., Ekman, A., Karlsson, H., Berlin, J., Börjesson, P., Ekvall, T., Finnveden, G., Janssen, M. i Strid, I., 2015. Review of methodological choices in LCA of biorefinery systems – key issues and recommendations. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 9(5), pp.606–619.
6. Ahmad, M.I., Farooq, S., Alhamoud, Y., Li, C. i Zhang, H., 2022. A review on mycoprotein: History, nutritional composition, production methods, and health benefits. *Trends in Food Science & Technology*, 121, pp.14–29.
7. Ahmed, A. i Makkawi, Y., 2025. The biorefinery paradigm: Technologies, feedstocks, and retrofitting for future sustainable energy. *Energies*, 18(22), p.5919.
8. Ait Braham, S., Siar, E.H., Arana-Peña, S., Carballares, D., Morellon-Sterling, R., Bavandi, H., de Andrades, D., Kornecki, J.F. i Fernandez-Lafuente, R., 2021. Effect of concentrated salts solutions on the stability of immobilized enzymes: Influence of inactivation conditions and immobilization protocol. *Molecules*, 26(4), p.968.
9. Akyüz, A., Tekin, İ., Aksoy, Z. i Ersus, S., 2024. Plant protein resources, novel extraction and precipitation methods: A review. *Journal of Food Process Engineering*, 47(10), p.e14758.

RADNA VERZIJA

10. Amoah, K.O., Asiedu, P., Wallace, P., Bumbie, G.Z. i Rhule, S.W.A., 2017. The performance of pigs at different phases of growth on sun-dried brewers spent grain. *Livestock Research for Rural Development*, 29(5), p.90.

11. Andlar, M., Rezić, T., Marđetko, N., Kracher, D., Ludwig, R. i Šantek, B., 2018. Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. *Engineering in Life Sciences*, 18(11), pp.768–778.

12. Aniza, R., Petrissans, A. i Petrissans, M., 2026. Polymers and chemical composition of hardwood and softwood (bark, sapwood, and heartwood) for biofuel production: A comprehensive review. *Polymers*, 18(11), p.1340.

13. AOAC International, 1995a. AOAC Official Method 994.12: Amino acids in feeds. In: Official Methods of Analysis of AOAC International. 16th ed. Arlington, VA: AOAC International. OUP Academic

14. AOAC International, 1995b. AOAC Official Method 942.05: Ash of animal feed. U: Cunniff, P. (ed.), *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 16th ed. Arlington, VA: AOAC International.

15. AOAC International, 2005a. AOAC Official Method 2001.11: Protein (crude) in animal feed, forage (plant tissue), grain, and oilseeds. In: Official Methods of Analysis of AOAC International. 18th ed. Gaithersburg, MD: AOAC International. DOI.org

16. AOAC International, 2005b. AOAC Official Method 945.16: Oil in cereal adjuncts. U: Official Methods of Analysis of AOAC International. 18th ed. Gaithersburg, MD: AOAC International.

17. Aradwad, P., Raut, S., Abdelfattah, A., Rauh, C. i Sturm, B., 2025. Brewer's spent grain: Unveiling innovative applications in the food and packaging industry. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 24(3), p.e70150.

18. Arapoglou, D., Eliopoulos, C., Markou, G., Langousi, I., Saxami, G. i Haroutounian, S.A., 2024. Nutritional upgrade of olive mill stone waste, walnut shell and their mixtures by applying solid state fermentation initiated by *Pleurotus ostreatus*. *Scientific Reports*, 14, p.13446.

19. Aryanfar, Y., Castellanos, H.G., Hammoodi, K.A., Farifteh, M., Keçebaş, A., Ghasemlou, S.M., Mammadova, A., Yengejeh, E.A. i Neghabi, Z.H., 2024. Cleaner and sustainable circular economy approaches for bio-based product recovery from industrial

RADNA VERZIJA

effluents in a biorefinery. Environmental Progress & Sustainable Energy, 43(6), p.e14483.

20. Azad, K., Halim, M.A. i Hossain, F., 2013. Optimization of culture conditions for the production of xylanase by two thermophilic fungi under solid state fermentation. *Journal of the Asiatic Society of Bangladesh, Science*, 39(1), pp.43–51.
21. Bailey, M.J., Biely, P. i Poutanen, K., 1992. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology*, 23(3), pp.257–270.
22. Baker, P.W. i Charlton, A., 2023. Establishing experimental conditions to produce lignin-degrading enzymes on wheat bran by *Trametes versicolor* CM13 using solid state fermentation. *Waste*, 1(3), pp.711–723.
23. Barrera-León, M., Terán-Cabanillas, E., Avena-Bustillos, R.J., Cárdenas-Torres, F.I., Amézquita-López, B.A., Gómez-Favela, M.A., Alemán-Hidalgo, D.M. i Arias-Gastélum, M., 2025. Transformation of brewer's spent grain through solid-state fermentation: Implications for nutrition and health. *Recycling*, 10(5), p.170.
24. Bastos, R.G. i Ribeiro, H.C., 2020. Citric acid production by the solid-state cultivation consortium of *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei* from sugarcane bagasse. *The Open Biotechnology Journal*, 14, pp.32–41.
25. Bešlo, D., Golubić, N., Rastija, V., Agić, D., Karnaš, M., Šubarić, D. i Lučić, B., 2023. Antioxidant activity, metabolism, and bioavailability of polyphenols in the diet of animals. *Antioxidants*, 12(6), p.1141.
26. Betchem, G., Monto, A.R., Lu, F., Billong, L.F. i Ma, H., 2024. Prospects and Application of Solid-State Fermentation in Animal Feed Production – A Review. *Annals of Animal Science*, 24(4), pp.1123–1137.
27. Bianco, A., Budroni, M., Zara, S., Mannazzu, I., Fancello, F. i Zara, G., 2020. The role of microorganisms on biotransformation of brewers' spent grain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(20), pp.8661–8678.
28. Błaszak, B., Demir, İ.E., Długosz, A., Kołaczyk, P., Bąk, M., Gozdecka, G., Kaniewski, W. i Szulc, J., 2025. Sustainable processing of brewers' spent grain for plant-based yogurt alternatives. *Sustainability*, 17(9), p.4087.
29. Boardman, K., Sun, X., Yao, D., Chen, C., van Lierop, L. i Hu, B., 2025. Increasing the nutritional value of camelina meal via *Trametes versicolor* solid-state fermentation with various co-substrates. *Fermentation*, 11(2), p.77.

RADNA VERZIJA

30. Božinović, M., Sokač, T., Šalić, A., Dukarić, A.M., Tišma, M., Planinić, M. i Zelić, B., 2023. Standardization of 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) assay for measuring xylanase activity: Detecting and solving problems. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 15(2), pp.151–162.
31. Bucić-Kojić, A., Šelo, G., Zelić, B., Planinić, M. and Tišma, M., 2017. Recovery of phenolic acid and enzyme production from corn silage biologically treated by *Trametes versicolor*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 181(3), pp.948-960.
32. Cai, J., He, Y., Yu, X., Banks, S.W., Yang, Y., Zhang, X., Yu, Y., Liu, R. i Bridgwater, A.V., 2017. Review of physicochemical properties and analytical characterization of lignocellulosic biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 76, pp.309–322.
33. Cai, Z., Wang, Y., Qin, X., Huang, D., Cao, N. i Li, J., 2025. Determination and prediction of the energy content and amino acid digestibility of brewer's spent grain for growing pigs. *Journal of Animal Science*, 103, p.skaf070.
34. Canedo, M.S., de Paula, F.G., da Silva, F.A. i Vendruscolo, F., 2016. Protein enrichment of brewery spent grain from *Rhizopus oligosporus* by solid-state fermentation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 39(7), pp.1105–1113.
35. Capolupo, L. i Faraco, V., 2016. Green methods of lignocellulose pretreatment for biorefinery development. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(22), pp.9451–9467.
36. Capolupo, L. i Faraco, V., 2016. Green methods of lignocellulose pretreatment for biorefinery development. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(22), pp.9451–9467.
37. Carella, A. i Lamacchia, C., 2025. Drying techniques for the valorization of brewer's spent grains: Impacts on nutritional quality, sensory properties, and process efficiency. A review. *Applied Food Research*, 5(2), p.101429.
38. Caroca, E., Elorrieta, M., Palma, C., Navia, D., Lebrero, R. i Carvajal, A., 2022. Lignocellulosic residue valorization in a sequential process of solid-state fermentation and solid substrate anaerobic digestion. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 97(6), pp.1575–1584.
39. Carrillo-Nieves, D., Saldarriaga-Hernández, S., Gutiérrez-Soto, G., Rostro-Alanis, M., Hernández-Luna, C.E., Alvarez, A.J., Iqbal, H.M.N. i Parra-Saldívar, R., 2022.

RADNA VERZIJA

Biotransformation of agro-industrial waste to produce lignocellulolytic enzymes and bioethanol with a zero waste. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 12(2), pp.253–264.

40. Catalán, E., Komilis, D. i Sánchez, A., 2019. Environmental impact of cellulase production from coffee husks by solid-state fermentation: A life-cycle assessment. *Journal of Cleaner Production*, 233, pp.954–962.
41. Chojnacka K, 2023. Valorization of biorefinery residues for sustainable fertilizer production: A comprehensive review. *Biomass Conversion and Biorefinery* 13, pp.14359–14388.
42. Christopher, L., Bissoon, S., Singh, S., Szendefy, J. i Szakacs, G., 2005. Bleach-enhancing abilities of *Thermomyces lanuginosus* xylanases produced by solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 40(10), pp.3230–3235.
43. Conteratto, C., Artuzo, F.D., Santos, O.I.B. i Talamini, E., 2021. Biorefinery: A comprehensive concept for the sociotechnical transition toward bioeconomy. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 151, p.111527.
44. Cooray, S.T. i Chen, W.N., 2018. Valorization of brewer's spent grain using fungi solid-state fermentation to enhance nutritional value. *Journal of Functional Foods*, 42, pp.85–94.
45. Costa, D., Quinteiro, P. i Dias, A.C., 2019. A systematic review of life cycle sustainability assessment: Current state, methodological challenges, and implementation issues. *Science of the Total Environment*, 686, pp.774–787.
46. Cui, Y., Li, J., Deng, D., Lu, H., Tian, Z., Liu, Z. i Ma, X., 2021. Solid-state fermentation by *Aspergillus niger* and *Trichoderma koningii* improves the quality of tea dregs for use as feed additives. *PLoS ONE*, 16(11), p.e0260045.
47. da Costa Maia, I., dos Santos D'Almeida, C.T., Freire, D.M.G., Cavalcanti, E.D.A.C., Cameron, L.C., Dias, J.F. i Ferreira, M.S.L., 2020. Effect of solid-state fermentation over the release of phenolic compounds from brewer's spent grain revealed by UPLC-MS^{e}. *LWT*, 133, p.110136.
48. da Rosa Almeida, A., Geraldo, M.R.F., Ribeiro, L.F., Silva, M.V., Maciel, M.V.O.B. i Haminiuk, C.W.I., 2017. Bioactive compounds from brewer's spent grain: Phenolic compounds, fatty acids and in vitro antioxidant capacity. *Acta Scientiarum. Technology*, 39(3), pp.269–277.

RADNA VERZIJA

49. da Silva, L.R.I., de Andrade, C.J., de Oliveira, D. i Lerin, L.A., 2021. Solid-state fermentation in brewer's spent grains by *Fusarium fujikuroi* for gibberellic acid production. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 11(5), pp.13042–13052.
50. Dancker, P., Glas, K. i Gastl, M., 2025. Potential utilisation methods for brewer's spent grain: A review. *International Journal of Food Science & Technology*, 60(1), p.vvae022.
51. Davison, N., Christodoulou, C., Humphries, D., Kliem, K., Stergiadis, S. i Smith, L., 2026. Environmental and economic impacts of using brewers spent grains for animal feed and anaerobic digestion. *Journal of Cleaner Production*, 538, p.147365.
52. De Bhowmick, G., Sarmah, A.K. i Sen, R., 2018. Lignocellulosic biorefinery as a model for sustainable development of biofuels and value added products. *Bioresource Technology*, 247, pp.1144–1154.
53. Della Torre, C.L., Silva-Lucca, R.A., Ferreira, R.D., Andrade Luz, L., Oliva, M.L.V. i Kadowaki, M.K., 2023. Correlation of the conformational structure and catalytic activity of the highly thermostable xylanase of *Thermomyces lanuginosus* PC7S1T. *Biocatalysis and Biotransformation*, 41(2), pp.81–92.
54. Dhaver, P., Pletschke, B., Sithole, B. i Govinden, R., 2022. Optimization, purification, and characterization of xylanase production by a newly isolated *Trichoderma harzianum* strain by a two-step statistical experimental design strategy. *Scientific Reports*, 12, p.17791.
55. Dixit, M., Chhabra, D. i Shukla, P., 2023. Optimization of endoglucanase-lipase-amylase enzyme consortium from *Thermomyces lanuginosus* VAPS25 using Multi-Objective genetic algorithm and their bio-deinking applications. *Bioresource Technology*, 370, p.128467.
56. Eche, V., Emenike, C.U. i Rupasinghe, H.P.V., 2025. Nutritional value of brewer's spent grain and consumer acceptance of its value-added food products. *Foods*, 14(16), p.2900.
57. Eliopoulos, C., Arapoglou, D., Chorianopoulos, N., Markou, G. i Haroutounian, S.A., 2022. Conversion of brewers' spent grain into proteinaceous animal feed using solid state fermentation. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(20), pp.29562–29569.
58. Enawgaw, H., Tesfaye, T., Yilma, K.T. i Limeneh, D.Y., 2023. Multiple utilization ways of corn by-products for biomaterial production with bio-refinery concept: A review. *Materials Circular Economy*, 5(1), p.7.

RADNA VERZIJA

59. Esparza-Vasquez, A., Saldarriaga-Hernandez, S., González-Díaz, R.L., García-Cayuela, T. i Carrillo-Nieves, D., 2026. Valorization of brewer's spent grains via *Aspergillus oryzae* solid-state fermentation: Production of lignocellulolytic enzymes for biorefinery applications. *Fermentation*, 12(4), p.197.
60. Estevão-Rodrigues, T., Fernandes, H., Moutinho, S., Couto, A., Belo, I., Castro, C., Pousão, P., Salgado, J.M., Oliva-Teles, A. i Peres, H., 2025b. Fermented brewer's spent grain as a sustainable feed ingredient impacts meagre (*Argyrosomus regius*) growth, intermediary metabolism, digestive enzymes, oxidative stress, and intestinal histology. *Animal Feed Science and Technology*, 326, p.116388.
61. Estevão-Rodrigues, T., Fernandes, H., Moutinho, S., Ferreira, M., Castro, C., Belo, I., Salgado, J.M., Oliva-Teles, A. i Peres, H., 2025a. Effect of Solid-Fermented Brewer's Spent Grain on Growth, Metabolism, and Oxidative Status of European Seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Fishes*, 10(2), p.49.
62. Estevão-Rodrigues, T., Fernandes, H., Moutinho, S., Filipe, D., Fontinha, F., Magalhães, R., Couto, A., Ferreira, M., Gamboa, M., Castro, C., Belo, I., Salgado, J., Oliva-Teles, A. i Peres, H., 2024. Effect of solid-state fermentation of brewer's spent grain on digestibility and digestive function of European seabass juveniles. *Animal Feed Science and Technology*, 315, p.116018.
63. European Commission, 2006. Commission Recommendation 2006/576/EC of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding. *Official Journal of the European Union*, L229, pp.7–9.
64. European Commission, 2013. Commission Recommendation 2013/165/EU of 27 March 2013 on the presence of T-2 and HT-2 toxin in cereals and cereal products. *Official Journal of the European Union*, L91, pp.12–15.
65. European Commission, Directorate-General for Research and Innovation, E4tech, BTG, ICONS, FNR i WUR, 2021. *EU biorefinery outlook to 2030: Studies on support to research and innovation policy in the area of bio-based products and services*. Luxembourg: Publications Office of the European Union.
66. European Commission, n.d. Community Research and Development Information Service (CORDIS). Dostupno na: https://cordis.europa.eu (pristupljeno 15. svibnja 2026).

RADNA VERZIJA

67. European Parliament and Council of the European Union, 2002. Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council of 7 May 2002 on undesirable substances in animal feed. *Official Journal of the European Communities*, L140, pp.10–22.
68. European Patent Office, n.d. Espacenet database of patent applications and publications. Dostupno na: https://worldwide.espacenet.com (pristupljeno 19. svibnja 2026).
69. Eurostat, n.d. Glossary: Tonne of oil equivalent (toe). Dostupno na: https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/ (pristupljeno 17. veljače 2026).
70. Evaristo, R.B.W., Costa, A.A., Nascimento, P.G.B.D. i Ghesti, G.F., 2023. Biorefinery development based on brewers' spent grain (BSG) conversion: A forecasting technology study in the Brazilian scenario. *Biomass*, 3(3), pp.217–237.
71. Faccenda, A., Zambom, M.A., Castagnara, D.D., Avila, A.S., Fernandes, T., Eckstein, E.I., Anschau, F.A. i Schneider, C.R., 2017. Use of dried brewers' grains instead of soybean meal to feed lactating cows. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 46(1), pp.39–46.
72. Fan, G.S., Yang, S.Q., Yan, Q.J., Yan, Y. i Jiang, Z.Q., 2013. Optimization of xylanase production from *Thermomyces lanuginosus* CAU44 by solid-state fermentation. *Science and Technology of Food Industry*, 33, pp.219–224.
73. Fărcaş, A., Tofană, M., Socaci, S., Mudura, E., Scrob, S., Salanţă, L. i Mureşan, V., 2014. Brewers' spent grain – A new potential ingredient for functional foods. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 20(2), pp.137–141.
74. Fărcaş, A., Tofana, M., Socaci, S., Scrob, S., Salanta, L. i Pop, C., 2013. Analysis of flavonoids in malt and brewer's spent grain by UV-VIS spectrophotometry using different extraction technologies. *Analele Universităţii din Oradea, Fascicula: Ecotoxicologie, Zootehnie şi Tehnologii de Industrie Alimentară*, 12(B), pp.205–212.
75. Fărcaș, A.C., Socaci, S.A., Chiș, M.S., Martínez-Monzó, J., García-Segovia, P., Becze, A., Török, A.I., Cadar, O., Coldea, T.E. i Igual, M., 2022. In vitro digestibility of minerals and B group vitamins from different brewers' spent grains. *Nutrients*, 14(17), p.3512.
76. Fernandes, H., Moyano, F., Castro, C., Salgado, J., Martínez, F., Aznar, M., Fernandes, N., Ferreira, P., Gonçalves, M., Belo, I., Oliva-Teles, A. i Peres, H., 2021. Solid-state fermented brewer's spent grain enzymatic extract increases in vitro and in vivo feed digestibility in European seabass. *Scientific Reports*, 11, p.22946.

RADNA VERZIJA

77. Fiala, M. i Nonini, L., 2018. Biomass and biofuels. *EPJ Web of Conferences*, 189, p.00006.
78. Field, J.A., Vledder, R.H., van Zeist, J.G. i Rulkens, W.H., 1996. The tolerance of lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase to miscible solvents and the in vitro oxidation of anthracene in solvent: Water mixtures. *Enzyme and Microbial Technology*, 18(4), pp.300–308.
79. Filipe, D., Vieira, L., Ferreira, M., Oliva-Teles, A., Salgado, J., Belo, I. i Peres, H., 2023. Enrichment of a plant feedstuff mixture's nutritional value through solid-state fermentation. *Animals*, 13(18), p.2883.
80. Finkbeiner, M., Schau, E.M., Lehmann, A. i Traverso, M., 2010. Towards life cycle sustainability assessment. *Sustainability*, 2(10), pp.3309–3322.
81. Gaffey, J., Collins, M.N. i Styles, D., 2024. Review of methodological decisions in life cycle assessment (LCA) of biorefinery systems across feedstock categories. *Journal of Environmental Management*, 358, p.120813.
82. Gaffney, M., Doyle, S. i Murphy, R., 2009. Optimization of xylanase production by *Thermomyces lanuginosus* in solid state fermentation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73(12), pp.2640–2644.
83. Gandam, P.K., Chinta, M.L., Pabbathi, N.P.P., Velidandi, A., Sharma, M., Kuhad, R.C., Tabatabaei, M., Aghbashlo, M., Baadhe, R.R. i Gupta, V.K., 2022. Corncob-based biorefinery: A comprehensive review of pretreatment methodologies, and biorefinery platforms. *Journal of the Energy Institute*, 101, pp.290–308.
84. Gessner, D.K., Ringseis, R. i Eder, K., 2017. Potential of plant polyphenols to combat oxidative stress and inflammatory processes in farm animals. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 101(4), pp.605–628.
85. Ghose, T.K., 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, 59(2), pp.257–268.
86. Gil-Montenegro, A.A., Arocha-Morales, J.S., Rojas-Pérez, L.C. i Narváez-Rincón, P.C., 2019. Process simulation for xylitol production from brewer's spent grain in a Colombian biorefinery. Part 1: Xylose production from arabinoxilans extracted by the alkaline pretreatment of BSG. *Ingeniería e Investigación*, 39(1), pp.15–23.

RADNA VERZIJA

87. Goering, H.K. i Van Soest, P.J., 1970. *Forage Fiber Analyses: Apparatus, Reagents, Procedures, and Some Applications*. Agriculture Handbook No. 379. Washington, DC: U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service.
88. Green, A.A. i Hughes, W.L., 1955. Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents. *Methods in Enzymology*, 1, pp.67–90.
89. Gregori, A., 2014. Cordycepin production by *Cordyceps militaris* cultivation on spent brewery grains. *Acta Biologica Slovenica*, 57(2), pp.45–52.
90. Guimarães, A., Mota, A.C., Pereira, A.S., Fernandes, A.M., Lopes, M. i Belo, I., 2024. Rice husk, brewer's spent grain, and vine shoot trimmings as raw materials for sustainable enzyme production. *Materials*, 17(4), p.935.
91. Hann, A.J., Dong, M., Zhang, Y., Tomes, O., Zhang, H., Bilotti, E., Mitchell, E.J. i Papageorgiou, D.G., 2026. Upcycling brewers' spent grain into high-performance protein nanofibers for sustainable non-woven textiles. *Advanced Sustainable Systems*, 10(3), p.e01718.
92. Hassan, S.S., Tiwari, B.K., Williams, G.A. i Jaiswal, A.K., 2020. Bioprocessing of brewers' spent grain for production of xylanopectinolytic enzymes by *Mucor* sp. *Bioresource Technology Reports*, 9, p.100371.
93. Hassan, S.S., Williams, G.A. i Jaiswal, A.K., 2018. Emerging technologies for the pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 262, pp.310–318.
94. He, F., 2011. Bradford protein assay. *Bio-protocol*, 1(6), p.e45.
95. He, Q., Peng, H., Sheng, M., Hu, S., Qiu, J. i Gu, J., 2019. Humidity control strategies for solid-state fermentation: Capillary water supply by water-retention materials and negative-pressure auto-controlled irrigation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, p.263.
96. Hejna, M., Gottardo, D., Baldi, A., Dell'Orto, V., Cheli, F., Zaninelli, M. i Rossi, L., 2018. Review: Nutritional ecology of heavy metals. *Animal*, 12(10), pp.2156–2170.
97. Hingsamer, M. i Jungmeier, G., 2019. Biorefineries. U: Lago, C., Caldés, N. i Lechón, Y. (eds.), *The Role of Bioenergy in the Bioeconomy*, pp.179–222. Academic Press.
98. Hren, R., Naumoska, K., Jug, U., Čuček, L., Likozar, B., Novak, U. i Vujanović, A., 2023. Life cycle assessment of pilot-scale bio-refining of invasive Japanese knotweed alien plant towards bio-based bioactive compounds. *Processes*, 11(5), p.1393.

RADNA VERZIJA

99. Hrvatski sabor, 2026. Strategija biogospodarstva do 2035. Narodne novine, 74/2026, br. Dostupno na: https://narodnenovine.nn.hr/clanci/sluzbeni/full/2026_07_74_877.ht [pristupljeno 6. listopada 2026.]
100. Hu, J., Lu, W., Wang, C., Zhu, R. i Qiao, J., 2008. Characteristics of Solid-state Fermented Feed and its Effects on Performance and Nutrient Digestibility in Growing-finishing Pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 21(11), pp.1635–1641.
101. Hu, Y., Priya, A., Chen, C., Liang, C., Wang, W., Wang, Q., Lin, C.S.K. i Qi, W., 2023. Recent advances in substrate-enzyme interactions facilitating efficient biodegradation of lignocellulosic biomass: A review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 180, p.105594.
102. Huang, M.Y., Smieska, L.M. i Tako, E., 2025. Intestinal effects of brewers' spent grain extract in ovo (*Gallus gallus*)—A pilot study. *Animals*, 15(3), p.303.
103. Iandolo, D., Piscitelli, A., Sannia, G. i Faraco, V., 2011. Enzyme production by solid substrate fermentation of Pleurotus ostreatus and *Trametes versicolor* on tomato pomace. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 163(1), pp.40–51.
104. IEA Bioenergy Task 42, n.d. Biorefining in a Circular Economy. Dostupno na: https://task42.ieabioenergy.com (pristupljeno 20. svibnja 2026).
105. Ikram, S., Huang, L., Zhang, H., Wang, J. i Yin, M., 2017. Composition and nutrient value proposition of brewers spent grain. *Journal of Food Science*, 82(10), pp.2232–2242.
106. Iqbal, H.M.N., Asgher, M. i Bhatti, H.N., 2011. Optimization of physical and nutritional factors for synthesis of lignin degrading enzymes by a novel strain of *Trametes versicolor*. *BioResources*, 6(2), pp.1273–1287.
107. Jain, A., Jain, R. i Jain, S., 2020. Quantitative analysis of reducing sugars by 3,5-dinitrosalicylic acid (DNSA method). U: Basic Techniques in Biochemistry, Microbiology and Molecular Biology, pp.181–183. New York, NY: Humana, Springer Protocols Handbooks. Frontiers
108. Javadi, N., Khodadadi Tirkolaei, H., Hamdan, N. i Kavazanjian, E. Jr., 2021. Longevity of raw and lyophilized crude urease extracts. *Sustainable Chemistry*, 2(2), pp.325–334.
109. Johnson, P., Paliwal, J. i Cenkowski, S., 2010. Issues with utilisation of brewers' spent grain. *Stewart Postharvest Review*, 6(4), pp.1–8.

RADNA VERZIJA

110. Kabir, M.F., Ovi, A.Q. i Ju, L.K., 2025. Real-time pH and temperature monitoring in solid-state fermentation reveals culture physiology and optimizes enzyme harvesting for tailored applications. *Microbial Cell Factories*, 24, p.188.
111. Kalak, T., 2026. Sustainable utilization of brewer's spent grains for energy production: Technologies, challenges, and development prospects. *Energies*, 19(8), p.1828.
112. Karpe, A.V., Dhamale, V.V., Morrison, P.D., Beale, D.J., Harding, I.H. i Palombo, E.A., 2016. Winery biomass waste degradation by sequential sonication and mixed fungal enzyme treatments. *Fungal Genetics and Biology*, 102, pp.22–30.
113. Kavalopoulos, M., Stoumpou, V., Christofi, A., Mai, S., Barampouti, E.M., Moustakas, K., Malamis, D. i Loizidou, M., 2021. Sustainable valorisation pathways mitigating environmental pollution from brewers' spent grains. *Environmental Pollution*, 270, p.116069.
114. Khakimova, N., Tanurdžić, M. i Mišan, A., 2025. Global perspective of biorefinery—Historical development and evolution of biorefinery concepts. In: Tiwari, B.K., Pojić, M. i Zhu, X. (eds.), *Innovative Biorefinery Processes for Agri-Food Value Chains*, pp.33–48. London: Academic Press.
115. Khalasi, Y., Prakash, P., Chuphal, N., Malik, M.A. i Mohanta, K.N., 2026. Mycoprotein for circular and sustainable aquaculture growth. *Discover Food*, 6, p.188.
116. Khidzir, K.M., Abdullah, N. i Agamuthu, P., 2010. Brewery spent grain: Chemical characteristics and utilization as an enzyme substrate. *Malaysian Journal of Science*, 29(1), pp.41–51.
117. Khucharoenphaisan, K., Tokuyama, S. i Kitpreechavanich, V., 2010. Purification and characterization of a high-thermostable β-xylanase from newly isolated *Thermomyces lanuginosus* THKU-49. *Mycoscience*, 51(6), pp.405–410.
118. Kielkopf, C.L., Bauer, W. i Urbatsch, I.L., 2020. Bradford assay for determining protein concentration. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2020(4), p.pdb.prot102269.
119. Kobayashi, Y., El-Wali, M., Guðmundsson, H., Guðmundsdóttir, E.E., Friðjónsson, Ó.H., Nordberg Karlsson, E., Roitto, M. i Tuomisto, H.L., 2023. Life-cycle assessment of yeast-based single-cell protein production with oat processing side-stream. *Science of the Total Environment*, 873, p.162318.

RADNA VERZIJA

120. Kocabaş, D., Güder, S. i Özben, N., 2015. Purification strategies and properties of a low-molecular weight xylanase and its application in agricultural waste biomass hydrolysis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 115, pp.66–75.
121. Kumar, B. i Verma, P., 2021. Life cycle assessment: Blazing a trail for bioresources management. *Energy Conversion and Management: X*, 10, p.100063.
122. Lao, E.J., Dimoso, N., Raymond, J. i Mbega, E.R., 2020. The prebiotic potential of brewers' spent grain on livestock's health: A review. *Tropical Animal Health and Production*, 52(2), pp.461–472.
123. Li, S., Tasnady, D., Cruz, K., Nguyen, N. i Trejo, H.X., 2026. Lignocellulosic municipal waste valorization for energy recovery and circular bioeconomy. *Academia Green Energy*, 3(1).
124. Liguori, R., Pennacchio, A., Vandenberghe, L.P.S., De Chiaro, A., Birolo, L., Soccol, C.R. i Faraco, V., 2021. Screening of fungal strains for cellulolytic and xylanolytic activities production and evaluation of brewers' spent grain as substrate for enzyme production by selected fungi. *Energies*, 14(15), p.4443.
125. Liu, D., Guo, Y., Yolandani i Ma, H., 2023. Production of value-added peptides from agro-industrial residues by solid-state fermentation with a new thermophilic protease-producing strain. *Food Bioscience*, 53, p.102534.
126. Liu, J., Liu, B., Zhan, L., Wang, P., Ju, M. i Wu, W., 2017. Solid-state fermentation of ammoniated corn straw to animal feed by *Pleurotus ostreatus* Pl-5. *BioResources*, 12(1), pp.1723–1736.
127. Llimós, J., Martínez-Avila, O., Marti, E., Corchado-Lopo, C., Llenas, L., Gea, T. i Ponsá, S., 2022. Brewer's spent grain biotransformation to produce lignocellulolytic enzymes and polyhydroxyalkanoates in a two-stage valorization scheme. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 12(9), pp.3921–3932.
128. Lojananan, N., Cheirsilp, B., Intasit, R., Billateh, A., Srinuanpan, S., Suyotha, W. i Boonsawang, P., 2024. Successive process for efficient biovalorization of brewers' spent grain to lignocellulolytic enzymes and lactic acid production through simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresource Technology*, 397, p.130490.
129. Lordan, R., O'Keeffe, E., Tsoupras, A. i Zabetakis, I., 2019. Total, neutral, and polar lipids of brewing ingredients, by-products and beer: Evaluation of antithrombotic activities. *Foods*, 8(5), p.171.

RADNA VERZIJA

130. Lorente, A., Remón, J., Salgado, M., Huertas-Alonso, A.J., Sánchez-Verdú, P., Moreno, A. i Clark, J.H., 2020. Sustainable production of solid biofuels and biomaterials by microwave-assisted, hydrothermal carbonization of brewers' spent grain. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(51), pp.18982–18991.
131. Lu, X., Li, X. i Zhao, J., 2024. Improving enzymatic efficiency of β-glucosidases in cellulase system by altering its binding behavior to the insoluble substrate during bioconversion of lignocellulose. *Bioresource Technology*, 391, p.129974.
132. Lueangjaroenkit, P., Kunitake, E., Sakka, M., Kimura, T., Teerapatsakul, C., Sakka, K. and Chitradon, L., 2020. Light regulation of two new manganese peroxidase-encoding genes in *Trametes polyzona* KU-RNW027. *Microorganisms*, 8(6), p.852.
133. Lynch, K.M., Steffen, E.J. i Arendt, E.K., 2016. Brewers' spent grain: A review with an emphasis on food and health. *Journal of the Institute of Brewing*, 122(4), pp.553–568.
134. Majumder, R., Miatur, S., Saha, A. i Hossain, S., 2024. Mycoprotein: production and nutritional aspects: a review. *Sustainable Food Technology*, 2, pp.81–91.
135. Makepa, D.C. i Chihobo, C.H., 2024. Barriers to commercial deployment of biorefineries: A multi-faceted review of obstacles across the innovation chain. *Heliyon*, 10(12), p.e32649.
136. Mankar, A.R., Pandey, A., Modak, A. i Pant, K.K., 2021. Pretreatment of lignocellulosic biomass: A review on recent advances. *Bioresource Technology*, 334, p.125235.
137. Margetić, A. i Vujčić, Z., 2017. Comparative study of stability of soluble and cell wall invertase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 47(3), pp.305–311.
138. Marinho, G.O., Nogueira, E.A., Pasin, T.M., Oliveira, T.B., Roa, J.P.B., Nelson, D.L. i Benassi, V.M., 2023. An environmentally safe production of xylanases by *Fusarium* sp. EA 1.3.1 using agroindustrial residues: Biochemical characterization and potential applications. *Asian Journal of Biochemistry, Genetics and Molecular Biology*, 14(4), pp.11–26.
139. Martinović, J., Lukinac, J., Jukić, M., Ambrus, R., Planinić, M., Šelo, G., Klarić, A.M., Perković, G. i Bucić-Kojić, A., 2023. Physicochemical characterization and evaluation of gastrointestinal in vitro behavior of alginate-based microbeads with encapsulated grape pomace extracts. *Pharmaceutics*, 15(3), p.980.

RADNA VERZIJA

140. Mata, T.M., Tavares, T.F., Meireles, S. i Caetano, N.S., 2015. Bioethanol from brewers' spent grain: Pentose fermentation. *Chemical Engineering Transactions*, 43, pp.241–246.
141. Mathew, A.K., Abraham, A., Mallapureddy, K.K. i Sukumaran, R.K., 2018. Lignocellulosic biorefinery wastes, or resources? U: *Waste Biorefinery: Potential and Perspectives*, pp.267–297. Elsevier.
142. Mathibe, B.N., Malgas, S., Radosavljevic, L., Kumar, V., Shukla, P. i Pletschke, B.I., 2020. Tryptic mapping based structural insights of endo-1,4-β-xylanase from *Thermomyces lanuginosus* VAPS-24. *Indian Journal of Microbiology*, 60(3), pp.392–395.
143. Mathur, S., Kumar, D., Kumar, V., Azmi, W. i Verma, R., 2025. Enzyme-free pretreatment of brewer's spent grain for xylose recovery for potential xylitol production. *Biotechnology for Sustainable Materials*, 2, p.14.
144. McCarthy, A.L., O'Callaghan, Y.C., Piggott, C.O., FitzGerald, R.J. i O'Brien, N.M., 2013. Brewers' spent grain; bioactivity of phenolic component, its role in animal nutrition and potential for incorporation in functional foods: A review. *Proceedings of the Nutrition Society*, 72(1), pp.117–125.
145. Mchunu, N.P., Permaul, K., Alam, M. i Singh, S., 2013. Carbon utilization profile of a thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus* using phenotypic microarray. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 4(9A), pp.24–32.
146. Mehta, P. i Chelike, D.K., 2024. Utilizing fungal biodegradation for valorisation of lignocellulosic waste biomass and its diverse applications. *Applied Research*, 3(4), p.e202300119.
147. Mendonça, M., Barroca, M. i Collins, T., 2023. Endo-1,4-β-xylanase-containing glycoside hydrolase families: characteristics, singularities and similarities. *Biotechnology Advances*, 65, p.108148.
148. Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), pp.426–428.
149. Mohammad, I.E., Syed, S., Darukamalli, M.R. i Alapati, K.S., 2023. Review on thermozymes produced by thermophilic fungi: A gold mine for industrial applications. *European Journal of Biology and Biotechnology*, 4(1), pp.1–5.
150. Montoya Barreto, S., Patiño Marín, Y.A. i Sánchez Toro, Ó.J., 2020. Diseño eficiente de medios para la producción de lacasa, manganeso peroxidasa y endoxilanasa de

RADNA VERZIJA

Trametes versicolor cultivado sobre residuos agroindustriales, mediante modelamiento matemático. *Investigación e Innovación en Ingenierías*, 8(2), pp.106–136.

151. Montoya, S., Patiño, Y.A. i Sánchez, Ó.J., 2021. Production of lignocellulolytic enzymes and biomass of *Trametes versicolor* from agro-industrial residues in a novel fixed-bed bioreactor with natural convection and forced aeration at pilot scale. *Processes*, 9(2), p.397.
152. Montoya, S., Sánchez, Ó.J. i Levin, L., 2015. Production of lignocellulolytic enzymes from three white-rot fungi by solid-state fermentation and mathematical modeling. *African Journal of Biotechnology*, 14(15), pp.1304–1317.
153. Moran-Aguilar, M.G., Costa-Trigo, I., Calderón-Santoyo, M., Domínguez, J.M. i Aguilar-Uscanga, M.G., 2021. Production of cellulases and xylanases in solid-state fermentation by different strains of *Aspergillus niger* using sugarcane bagasse and brewery spent grain. *Biochemical Engineering Journal*, 172, p.108060.
154. Moretti, M.M.S., Bocchini-Martins, D.A., Silva, R.D., Rodrigues, A., Sette, L.D. i Gomes, E., 2012. Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(3), pp.1062–1071.
155. Mussatto, S.I., Dragone, G. i Roberto, I.C., 2006. Brewers' spent grain: Generation, characteristics and potential applications. *Journal of Cereal Science*, 43(1), pp.1–14.
156. Naik, A.S., Brugiere, M., Dunne, K., Sorohan, M., Grasa, L. i Javed, B., 2024. Protease hydrolysed brewers' spent grain bioactive extracts for applications in human health. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, 4(3), pp.1062–1075.
157. Nitzsche, R., Gröngröft, A., Köchermann, J., Meisel, K., Etzold, H., Verges, M., Leschinsky, M., Torkler, S., Patzsch, K., Rößiger, B., Pufky-Heinrich, D., Unkelbach, G., Bachmann, J. i Saake, B., 2021. Platform and fine chemicals from woody biomass: Demonstration and assessment of a novel biorefinery. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 11, pp.2369–2385.
158. Ocaña-Romo, E., Rodríguez-Nava, C.O. i Sánchez, C., 2024. Oxidases production by *Trametes versicolor* grown on green waste and on polyurethane foam in solid-state fermentation: A comparative study. *Mexican Journal of Biotechnology*, 9(2), pp.51–64

RADNA VERZIJA

159. Okolie, J.A., Mukherjee, A., Nanda, S., Dalai, A.K. i Kozinski, J.A., 2021. Next-generation biofuels and platform biochemicals from lignocellulosic biomass. *International Journal of Energy Research*, 45(10), pp.14145–14169.
160. Olukomaiya, O., Fernando, C., Mereddy, R., Li, X. i Sultanbawa, Y., 2019. Solid-state fermented plant protein sources in the diets of broiler chickens: A review. *Animal Nutrition*, 5(4), pp.319–330.
161. Ortigueira, J. i Lopes, T.F., 2025. Bridging gaps in biorefineries: The unexplored role of social dimension in life cycle assessment research. *Sustainable Futures*, 9, p.100818.
162. Osman, A.I., Mehta, N., Elgarahy, A.M., Al-Hinai, A., Al-Muhtaseb, A.H. i Rooney, D.W., 2021. Conversion of biomass to biofuels and life cycle assessment: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 19, pp.4075–4118.
163. Outeiriño, D., Costa-Trigo, I., Ochogavias, A., de Souza Oliveira, R.P., Guerra, N.P., Salgado, J.M. i Domínguez, J.M., 2024. Biorefinery of brewery spent grain to obtain bioproducts with high value-added in the market. *New Biotechnology*, 79, pp.111–119.
164. Pal, A. i Khanum, F., 2011. Purification of xylanase from *Aspergillus niger* DFR-5: Individual and interactive effect of temperature and pH on its stability. *Process Biochemistry*, 46(4), pp.879–887.
165. Pandey, A. i Sharma, Y.C., 2024. Advancements in biomass valorization in integrated biorefinery systems. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 18(6), pp.2078–2090.
166. Pandey, A., Verma, N., Jain, S., Bose, S.K. i Yadava, P., 2025. Valorisation of lignocellulosic biomass: A new generation in biorefinery and biomaterials. *Biotechnology for Sustainable Materials*, 2, p.20.
167. Parlov Vuković, J., Jednačak, T., Novak, P., Bjedov, D. i Tišma, M., 2026. NMR characterisation of biopolymers and lipids from hemp pomace treated with *Thermomyces lanuginosus*. *Scientific Reports*, 16, p.13345.
168. Pathania, S., Sharma, S. i Kumari, K., 2018. Solid state fermentation of BSG for citric acid production. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 9(1), pp.70–74.
169. Paz Cedeno, F.R., Petrielli, G.P., Medeiros, S.R., Berndt, A., Hernandes, T.A.D., Bonomi, A. i Driemeier, C., 2025. Biorefining lignocellulose into feed and food: The case of sugarcane and a technology outlook. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 13, p.1653367.

RADNA VERZIJA

170. Penagos-Tabares, F., Sulyok, M., Nagl, V., Faas, J., Krska, R., Khiaosa-Ard, R. i Zebeli, Q., 2022. Mixtures of mycotoxins, phytoestrogens and pesticides co-occurring in wet spent brewery grains intended for dairy cattle feeding in Austria. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 39(11), pp.1855–1877.
171. Petridis, L. i Smith, J.C., 2018. Molecular-level driving forces in lignocellulosic biomass deconstruction for bioenergy. *Nature Reviews Chemistry*, 2(11), pp.382–389.
172. Poskart, A., Skrzyniarz, M., Sajdak, M., Zajemska, M. i Skibiński, A., 2021. Management of lignocellulosic waste towards energy recovery by pyrolysis in the framework of circular economy strategy. *Energies*, 14(18), p.5864.
173. Qiu, L., Li, J.J., Li, Z. i Wang, J.J., 2019. Production and characterization of biocontrol fertilizer from brewer's spent grain via solid-state fermentation. *Scientific Reports*, 9, p.480.
174. Radzik-Rant, A., Rant, W., Niżnikowski, R., Świątek, M., Szymańska, Ż., Ślęzak, M. i Niemiec, T., 2018. The effect of the addition of wet brewers grain to the diet of lambs on body weight gain, slaughter value and meat quality. *Archives Animal Breeding*, 61, pp.245–251.
175. Raheja, Y., Gaur, P., Islam, T., Chaurasia, A.K., Gaur, V.K. i Chadha, B.S., 2025. Advancement in lignocellulolytic enzyme production: Tailored strategies to overcome challenges in biomass hydrolysis. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, 5(3), pp.948–968.
176. Robertson, J.A., I'Anson, K.J.A., Brocklehurst, T.F., Faulds, C.B. i Waldron, K.W., 2010. Effect of storage conditions on the microbial ecology and biochemical stability of cell wall components in brewers' spent grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(12), pp.7266–7272.
177. Roy, R., Rahman, M.S. i Raynie, D.E., 2020. Recent advances of greener pretreatment technologies of lignocellulose. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, 3, p.100035.
178. Rusbjerg-Weberskov, C.E., Foley, J.D., Yang, L., Terp, M., Gregersen Echers, S., Orlien, V. i Lübeck, M., 2025. Combined *Rhizopus oryzae* fermentation and protein extraction of brewer's spent grain improves protein functionality. *Food and Bioprocess Technology*, 18(11), pp.9574–9593.

RADNA VERZIJA

179. Sachs, J.D., Lafortune, G., Fuller, G. i Iablonovski, G., 2025. *Financing Sustainable Development to 2030 and Mid-Century: Sustainable Development Report 2025*. Paris: Sustainable Development Solutions Network; Dublin: Dublin University Press.

180. Samantaray, B., Behera, R.R., Mishra, R.R. i Thatoi, H., 2024. In silico studies of fungal xylanase enzymes: Structural and functional insight towards efficient biodegradation of lignocellulosic biomass. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, 4(3), pp.1174–1192.

181. Sánchez, Ó.J. i Montoya, S., 2020. Assessment of polysaccharide and biomass production from three white-rot fungi by solid-state fermentation using wood and agro-industrial residues: A kinetic approach. *Forests*, 11(10), p.1055.

182. Sandoval, J.F., Gallagher, J., Rodriguez-Garcia, J., Whiteside, K. i Bryant, D.N., 2024. Improved nutritional value of surplus bread and perennial ryegrass via solid-state fermentation with *Rhizopus oligosporus*. *npj Science of Food*, 8, p.95.

183. Schmidt, A.R., Dresch, A.P., Alves Junior, S.L., Bender, J.P. i Treichel, H., 2023. Applications of brewer's spent grain hemicelluloses in biorefineries: Extraction and value-added product obtention. *Catalysts*, 13(4), p.755.

184. Schmitz, E., Leontakianakou, S., Norlander, S., Nordberg Karlsson, E. i Adlercreutz, P., 2022. Lignocellulose degradation for the bioeconomy: The potential of enzyme synergies between xylanases, ferulic acid esterase and laccase for the production of arabinoxylo-oligosaccharides. *Bioresource Technology*, 343, p.126114.

185. Scordia, D. i Cosentino, S.L., 2019. Perennial energy grasses: Resilient crops in a changing European agriculture. *Agriculture*, 9(8), p.169.

186. Shah, S., Venkatramanan, V. i Prasad, R., 2021. Biorefinery: Potential and prospects for utilisation of biogenic waste. U: *Bio-valorization of Waste: Trends and Perspectives*, pp.315–325. Singapore: Springer.

187. Shi, H., Yang, E., Li, Y., Chen, X. i Zhang, J., 2021. Effect of solid-state fermentation on nutritional quality of leaf flour of the drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.). *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, p.626628.

188. Shi, Z., Gong, W., Zhang, L., Dai, L., Chen, G. i Wang, L., 2019. Integrated functional-omics analysis of *Thermomyces lanuginosus* reveals its potential for simultaneous production of xylanase and substituted xylooligosaccharides. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 187(4), pp.1515–1538.

RADNA VERZIJA

189. Shi, Z., Han, C., Zhang, X., Tian, L. i Wang, L., 2020. Novel synergistic mechanism for lignocellulose degradation by a thermophilic filamentous fungus and a thermophilic actinobacterium based on functional proteomics. *Frontiers in Microbiology*, 11, p.539438.

190. Shrivastava, S., Shukla, P. i Mukhopadhyay, K., 2011. Purification and preliminary characterization of a xylanase from *Thermomyces lanuginosus* strain SS-8. *3 Biotech*, 1(4), pp.255–259.

191. Silva, L.C., de Castro França, I.A., Kupski, L., Barros, B.C.B. i Madrona, G.S., 2026. Mixed-strain fermentation enhances protein content, phenolic composition, antioxidant capacity, and free amino acid content in brewer's spent grain. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 76, p.104178.

192. Silva, L.C., Kupski, L., Beserra da Silva de Souza, S. i Bolanho, B.C., 2024. Influence of fermentation conditions by *Rhizopus oryzae* on the release of phenolic compounds, composition, and properties of brewer's spent grain. *Food Bioscience*, 61, p.104591.

193. Singh nee' Nigam, P. i Pandey, A., 2009. Solid-state fermentation technology for bioconversion of biomass and agricultural residues. U: Nigam, P. i Pandey, A. (eds.), *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation: Utilisation of Agro-Residues*, pp.197–221. Dordrecht: Springer.

194. Singh, G., Samuchiwal, S., Hariprasad, P. i Sharma, S., 2022. Melioration of paddy straw to produce cellulase-free xylanase and bioactives under solid state fermentation and deciphering its impact by life cycle assessment. *Bioresource Technology*, 360, p.127493.

195. Singh, S., Madlala, A.M. i Prior, B.A., 2003. *Thermomyces lanuginosus*: Properties of strains and their hemicellulases. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(1), pp.3–16.

196. Soto-Maldonado, C., Espinosa, A., Bucarey, J.L. i Fuentes, L., 2026. Functional benefits of brewer's spent grain and the challenge of developing food ingredients for human health. *Antioxidants*, 15(2), p.247.

197. Sreelatha, B., Rao, V.K., Kumar, R.R., Girisham, S. i Reddy, S.M., 2017. Culture conditions for the production of thermostable lipase by *Thermomyces lanuginosus*. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 6(1), pp.87–95.

198. Srivastava, N., Srivastava, M., Ramteke, P.W. i Mishra, P.K., 2019. Solid-state fermentation strategy for microbial metabolites production: An overview. In: *New and*

RADNA VERZIJA

Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Secondary Metabolites Biochemistry and Applications, pp.345–354. Elsevier.

199. Statista, 2024. Volume of beer production in Croatia. Dostupno na: https://www.statista.com/statistics/446627/volume-beer-production-croatia/ (pristupljeno 18. svibnja 2026).
200. Statista, 2025a. Beer production worldwide from 1998 to 2024 (in billion hectoliters). Dostupno na: https://www.statista.com/statistics/270275/worldwide-beer-production/ (pristupljeno 3. lipnja 2026).
201. Statista, 2025b. Beer production worldwide from 2008 to 2023, by region (in million hectoliters). Dostupno na: https://www.statista.com/statistics/270270/worldwide-beer-production-by-region/ (pristupljeno 18. svibnja 2026).
202. Suryadi, H., Judono, J.J., Putri, M.R., Eclessia, A.D., Ulhaq, J.M., Agustina, D.N. i Sumiati, T., 2022. Biodelignification of lignocellulose using ligninolytic enzymes from white-rot fungi. *Heliyon*, 8(2), p.e08865.
203. Suryawanshi, N., Seenivasan, A. i Jujjawarapu, S.E., 2022. New insights of carbon catabolite repression and kinetics modeling for the growth of *Thermomyces lanuginosus*. *Chemical Engineering & Technology*, 45(11), pp.1926–1933.
204. Šelo, G., Planinić, M., Tišma, M., Grgić, J., Perković, G., Koceva Komlenić, D. i Bucić-Kojić, A., 2022. A comparative study of the influence of various fungal-based pretreatments of grape pomace on phenolic compounds recovery. *Foods*, 11(11), p.1665.
205. Šelo, G., Planinić, M., Tišma, M., Klarić, A.M. i Bucić-Kojić, A., 2024. Effects of fungal solid-state fermentation on the profile of phenolic compounds and on the nutritional properties of grape pomace. *Microorganisms*, 12(7), p.1310.
206. Šelo, G., Planinić, M., Tišma, M., Tomas, S., Koceva Komlenić, D. i Bucić-Kojić, A., 2021. A comprehensive review on valorization of agro-food industrial residues by solid-state fermentation. *Foods*, 10(5), p.927.
207. Šibalić, D., 2023. *Development of a process for biological treatment of pumpkin seed cake in the production of bioproducts – the biorefinery concept*. Doctoral thesis. Osijek: Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Food Technology Osijek.
208. Šibalić, D., Šalić, A., Tušek, A.J., Sokač, T., Brekalo, K., Zelić, B., Tran, N.N., Hessel, V. i Tišma, M., 2020. Sustainable production of lipase from *Thermomyces lanuginosus*:

RADNA VERZIJA

Process optimization and enzyme characterization. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 59(48), pp.21144–21154.

209. Tan, Y.X., Mok, W.K., Lee, J., Kim, J. i Chen, W.N., 2019. Solid state fermentation of brewers' spent grains for improved nutritional profile using *Bacillus subtilis* WX-17. *Fermentation*, 5(3), p.52.
210. Terefe, G., 2022. Preservation techniques and their effect on nutritional values and microbial population of brewer's spent grain: A review. *CABI Agriculture and Bioscience*, 3, p.51.
211. Terrasan, C.R.F. i Carmona, E.C., 2015. Solid-state fermentation of brewer's spent grain for xylanolytic enzymes production by *Penicillium janczewskii* and analyses of the fermented substrate. *Bioscience Journal*, 31(6), pp.1826–1836.
212. Tian, S.Q., Zhao, R.Y. i Chen, Z.C., 2018. Review of the pretreatment and bioconversion of lignocellulosic biomass from wheat straw materials. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 91, pp.483–489.
213. Tišma, M., Bucić-Kojić, A. i Planinić, M., 2021a. Bio-based products from lignocellulosic waste biomass: A state of the art. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 35(2), pp.139–156.
214. Tišma, M., Jurić, A., Bucić-Kojić, A., Panjičko, M. i Planinić, M., 2018. Biovalorization of brewers' spent grain for the production of laccase and polyphenols. *Journal of the Institute of Brewing*, 124, pp.182–186.
215. Tišma, M., Parlov Vuković, J., Jednačak, T. i sur., 2026. Sequential solid-state fermentation and hydrothermal carbonization of hempseed oil pomace for the sustainable production of enzymes and hydrochar. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*.
216. Tišma, M., Sudar, M., Vasić-Racki, Đ. i Zelić, B., 2010. Mathematical model for *Trametes versicolor* growth in submerged cultivation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 33(6), pp.749–758.
217. Tišma, M., Tadić, T., Budžaki, S., Ostojčić, M., Šalić, A., Zelić, B., Tran, N.N., Ngothai, Y. i Hessel, V., 2019. Lipase production by solid-state cultivation of *Thermomyces lanuginosus* on by-products from cold-pressing oil production. *Processes*, 7(7), p.465.
218. Tišma, M., Žnidaršič-Plazl, P., Šelo, G., Tolj, I., Šperanda, M., Bucić-Kojić, A. i Planinić, M., 2021b. *Trametes versicolor* in lignocellulose-based bioeconomy: State of the art, challenges and opportunities. *Bioresource Technology*, 330, p.124997.

RADNA VERZIJA

219. Tišma, M., Žnidaršič-Plazl, P., Vasić-Rački, Đ. i sur., 2012. Optimization of laccase production by *Trametes versicolor* cultivated on industrial waste. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166, pp.36–46.

220. Tojang, D., Saparuddin, S., Alimuddin, A. i Arham, Z., 2021. Effects of pretreatment and solid-state fermentation on tempeh protein content. *Oriental Journal of Chemistry*, 37(1), pp.53–57.

221. Ubando, A.T., Del Rosario, A.J.R., Chen, W.H. i Culaba, A.B., 2021. A state-of-the-art review of biowaste biorefinery. *Environmental Pollution*, 269, p.116149.

222. Ulian, G.T.A., 2016. *Produção de celulases e hemicelulases por fermentação em estado sólido do fungo Thermomyces lanuginosus em resíduos agroindustriais*. Trabalho de Conclusão de Curso. Dourados: Universidade Federal da Grande Dourados.

223. Upcraft, T., Tu, W.C., Johnson, R., Finnigan, T., Hung, N.V., Hallett, J. i Guo, M., 2021. Protein from renewable resources: mycoprotein production from agricultural residues. *Green Chemistry*, 23, pp.5150–5165.

224. Valášková, V. i Baldrian, P., 2006. Estimation of bound and free fractions of lignocellulose-degrading enzymes of wood-rotting fungi *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* and *Piptoporus betulinus*. *Research in Microbiology*, 157(2), pp.119–124.

225. Valdez-Vazquez, I., Güereca, L.P., Molina-Guerrero, C.E., Padilla-Rivera, A. i Ruiz, H.A., 2024. Evolution of the biorefinery concept and tools for its evaluation toward a circular bioeconomy. In: *Wastewater Exploitation: From Microbiological Activity to Energy*, pp.349–371. Cham: Springer.

226. Valdivia, S., Backes, J.G., Traverso, M., Sonnemann, G., Cucurachi, S., Guinée, J.B., Schaubroeck, T., Finkbeiner, M., Leroy-Parmentier, N., Ugaya, C., Peña, C., Zamagni, A., Inaba, A., Amaral, M., Berger, M., Dvarioniene, J., Vakhitova, T., Benoit-Norris, C., Prox, M., Foolmaun, R. i Goedkoop, M., 2021. Principles for the application of life cycle sustainability assessment. *The International Journal of Life Cycle Assessment*, 26, pp.1900–1905.

227. van Kuijk, S.J.A., Sonnenberg, A.S.M., Baars, J.J.P., Hendriks, W.H. i Cone, J.W., 2015. Fungal treated lignocellulosic biomass as ruminant feed ingredient: A review. *Biotechnology Advances*, 33(1), pp.191–202.

RADNA VERZIJA

228. Vanreppelen, K., Vanderheyden, S., Kuppens, T., Schreurs, S., Yperman, J. i Carleer, R., 2014. Activated carbon from pyrolysis of brewer's spent grain: Production and adsorption properties. *Waste Management & Research*, 32(7), pp.634–645.

229. Velidandi, A., Gandam, P.K., Chinta, M.L., Konakanchi, S., Bhavanam, A.R., Baadhe, R.R., Sharma, M., Gaffey, J., Nguyen, Q.D. i Gupta, V.K., 2023. State-of-the-art and future directions of machine learning for biomass characterization and for sustainable biorefinery. *Journal of Energy Chemistry*, 81, pp.42–63.

230. Velvizhi, G., Balakumar, K., Shetti, N.P., Ahmad, E., Pant, K.K. i Aminabhavi, T.M., 2022. Integrated biorefinery processes for conversion of lignocellulosic biomass to value added materials: Paving a path towards circular economy. *Bioresource Technology*, 343, p.126151.

231. Vickram, S., Infant, S.S., Balamurugan, B.S., Jayanthi, P. i Sivasubramanian, M., 2025. Techno-economic and life cycle analysis of biorefineries: Assessing sustainability and scalability in the bioeconomy. *Environmental Quality Management*, 34(4), p.e70077.

232. Wang, H., Qi, X., Gao, S., Zhang, Y. i An, Y., 2022. Biochemical characterization of an engineered bifunctional xylanase/feruloyl esterase and its synergistic effects with cellulase on lignocellulose hydrolysis. *Bioresource Technology*, 355, p.127244.

233. Wang, J., Huang, Z., Jiang, Q., Roubik, H., Xu, Q., Gharsallaoui, A., Cai, M., Yang, K. and Sun, P., 2023. Fungal solid-state fermentation of crops and their by-products to obtain protein resources: The next frontier of food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 138, pp.628-644.

RADNA VERZIJA

234. Wenger, J. i Stern, T., 2019. Reflection on the research on and implementation of biorefinery systems – a systematic literature review with a focus on feedstock. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 13(5), pp.1347–1364.

235. Yafetto, L., Odamtten, G.T. i Wiafe-Kwagyan, M., 2023. Valorization of agro-industrial wastes into animal feed through microbial fermentation: A review of the global and Ghanaian case. *Heliyon*, 9(4), p.e14814.

236. Yan, J., Oyedeji, O., Leal, J.H., Donohoe, B.S., Semelsberger, T.A., Li, C., Hoover, A.N., Webb, E., Bose, E.A., Zeng, Y., Williams, C.L., Schaller, K.D., Sun, N., Ray, A.E. i Tanjore, D., 2020. Characterizing variability in lignocellulosic biomass: A review. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(22), pp.8059–8085.

237. Yan, Q., Datsomor, O., Zhao, W., Chen, W., Wei, C., Wei, D., Gao, X., Qin, C., Gu, Q., Zou, C. i Lin, B., 2025. Enhancing Agricultural Sustainability by Improving the Efficiency of Lignocellulosic Biomass Utilization in the Ruminant Diet via Solid-State Fermentation with White-Rot Fungi: A Review. *Microorganisms*, 13(7), p.1708.

238. Yfanti, S. i Sakkas, N., 2024. Technology Readiness Levels (TRLs) in the Era of Co-Creation. *Applied System Innovation*, 7(2), p.32.

239. Zahović, I., Parlov Vuković, J., Čuček, L., Petrovič, A. i Tišma, M., 2026. From vegetable oil production to integrated biorefineries: Global trends, by-product and side-stream valorization, and green extraction technology deployment. *Processes*, 14(14), p.2330.

240. Zamora Zamora, H.D., Silva, T.A.L., Varão, L.H.R., Baffi, M.A. i Pasquini, D., 2021. Simultaneous production of cellulases, hemicellulases, and reducing sugars by *Pleurotus ostreatus* growth in one-pot solid state fermentation using *Alstroemeria* sp. waste. *Biomass Conversion and Biorefinery*.

241. Zayed, A., El-Seadawy, H.M., Attia, E.Z., Rushdi, M.I. i Abdelmohsen, U.R., 2024. Adopting biorefinery and a circular bioeconomy for extracting and isolating natural products from marine algae. *Frontiers in Natural Products*, 3, p.1425242.

242. Zeko-Pivač, A., Bošnjaković, A., Planinić, M., Parlov Vuković, J., Novak, P., Jednačak, T. i Tišma, M., 2022b. Improvement of the nutraceutical profile of brewer's spent grain after treatment with *Trametes versicolor*. *Microorganisms*, 10(11), p.2295.

243. Zeko-Pivač, A., Tišma, M., Žnidaršič-Plazl, P., Kulisic, B., Sakellaris, G., Hao, J. i Planinić, M., 2022a. The potential of brewer's spent grain in the circular bioeconomy:

RADNA VERZIJA

State of the art and future perspectives. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, p.870744.

244. Zhang, G., Li, Z., Chen, G., Zhang, L., Cai, W., Deng, S., Zhang, H., Wu, L., Li, H. i Liu, H., 2023b. Purification and characterization of the low molecular weight xylanase from *Bacillus cereus* L-1. *Brazilian Journal of Microbiology*, 54(4), pp.2951–2959.

245. Zhang, J., Perez-Gavilan, A. i Neves, A.C., 2023a. Biotransformation of brewing by-products to reduce the current food waste and relieve associated environmental pollution. In: *Proceedings of the 9th World Congress on New Technologies (NewTech'23)*.

246. Zhou, Z., Jiang, H. i Qin, L., 2007. Life cycle sustainability assessment of fuels. *Fuel*, 86(1–2), pp.256–263.

RADNA VERZIJA

RADNA VERZIJA

7. Prilozi

Prilog 1 Karakterizacijski rezultati LCA analize osnovnog modela i scenarija S1–S5 prema metodi EF v3.1

Kategorija utjecaja	Jedinica	Osnovni model	S1	S2	S3	S4	S5
Zakiseljavanje	mol H^+ eq	1,228	0,724	0,889	0,642	0,646	0,472
Klimatske promjene	kg CO_2 eq	105,562	62,242	76,429	55,183	55,548	40,565
Klimatske promjene – biogena komponenta	kg CO_2 eq	0,158980	0,094	0,115	0,083	0,084	0,061
Klimatske promjene – fosilna komponenta	kg CO_2 eq	105,365	62,126	76,287	55,080	55,445	40,489
Klimatske promjene – uporaba zemljišta i promjena uporabe zemljišta	kg CO_2 eq	0,038	0,022	0,027	0,020	0,020	0,014
Ekotoksičnost slatkih voda	CTUe	354,068	209,725	256,933	186,755	187,962	138,472
Ekotoksičnost slatkih voda – anorganske tvari	CTUe	349,106	206,567	253,197	183,755	184,950	135,979
Ekotoksičnost slatkih voda – organske tvari	CTUe	4,962	3,158	3,736	3,000	3,012	2,493
Uporaba neobnovljivih energetskih resursa	MJ (neto ogrjevna vrijednost)	1 561,368	920,602	1 130,466	816,189	821,597	599,966
Eutrofikacija slatkih voda	kg P eq	0,132	0,078	0,095	0,069	0,069	0,051
Eutrofikacija morskih voda	kg N eq	0,118	0,070	0,086	0,062	0,062	0,046
Terestrička eutrofikacija	mol N eq	1,022	0,603	0,740	0,535	0,538	0,393

RADNA VERZIJA

Toksičnost za ljude – kancerogeni učinci	CTUh	$3{,}086 \times 10^{-8}$	$1{,}821 \times 10^{-8}$	$2{,}235 \times 10^{-8}$	$1{,}615 \times 10^{-8}$	$1{,}626 \times 10^{-8}$	$1{,}189 \times 10^{-8}$
Toksičnost za ljude – kancerogeni učinci, anorganske tvari	CTUh	$2{,}186 \times 10^{-8}$	$1{,}289 \times 10^{-8}$	$1{,}583 \times 10^{-8}$	$1{,}143 \times 10^{-8}$	$1{,}150 \times 10^{-8}$	$8{,}402 \times 10^{-9}$
Toksičnost za ljude – kancerogeni učinci, organske tvari	CTUh	$9{,}008 \times 10^{-9}$	$5{,}321 \times 10^{-9}$	$6{,}526 \times 10^{-9}$	$4{,}724 \times 10^{-9}$	$4{,}755 \times 10^{-9}$	$3{,}484 \times 10^{-9}$
Toksičnost za ljude – nekancerogeni učinci	CTUh	$1{,}539 \times 10^{-6}$	$9{,}077 \times 10^{-7}$	$1{,}115 \times 10^{-6}$	$8{,}048 \times 10^{-7}$	$8{,}102 \times 10^{-7}$	$5{,}918 \times 10^{-7}$
Toksičnost za ljude – nekancerogeni učinci, anorganske tvari	CTUh	$1{,}486 \times 10^{-6}$	$8{,}762 \times 10^{-7}$	$1{,}076 \times 10^{-6}$	$7{,}769 \times 10^{-7}$	$7{,}821 \times 10^{-7}$	$5{,}712 \times 10^{-7}$
Toksičnost za ljude – nekancerogeni učinci, organske tvari	CTUh	$5{,}339 \times 10^{-8}$	$3{,}150 \times 10^{-8}$	$3{,}867 \times 10^{-8}$	$2{,}794 \times 10^{-8}$	$2{,}812 \times 10^{-8}$	$2{,}056 \times 10^{-8}$
Ionizirajuće zračenje – zdravlje ljudi	kBq U-235 eq	22,258	13,122	16,114	11,633	11,710	8,549
Uporaba zemljišta	bezdimenzijska	398,20	234,92	288,354	208,353	209,729	153,311
Uporaba mineralnih i metalnih resursa	kg Sb eq	$9{,}055 \times 10^{-4}$	$5{,}342 \times 10^{-4}$	$6{,}557 \times 10^{-4}$	$4{,}737 \times 10^{-4}$	$4{,}769 \times 10^{-4}$	$3{,}485 \times 10^{-4}$
Oštećenje ozonskog sloja	kg CFC-11 eq	$1{,}518 \times 10^{-6}$	$8{,}953 \times 10^{-7}$	$1{,}099 \times 10^{-6}$	$7{,}939 \times 10^{-7}$	$7{,}991 \times 10^{-7}$	$5{,}839 \times 10^{-7}$

RADNA VERZIJA

Čestične tvari	incidencija bolesti	$2{,}731 \times 10^{-6}$	$1{,}611 \times 10^{-6}$	$1{,}977 \times 10^{-6}$	$1{,}429 \times 10^{-6}$	$1{,}438 \times 10^{-6}$	$1{,}051 \times 10^{-6}$
Fotokemijsko stvaranje oksidansa – zdravlje ljudi	kg NMVOC eq	0,344	0,203	0,249	0,180	0,181	0,132
Uporaba vode	m^3 world eq deprived	93,521	55,505	67,711	49,073	49,493	36,349

RADNA VERZIJA