

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO – TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Darijo Šibalić

**Utjecaj uvjeta kruto-tekuće ekstrakcije na ekstraktibilnost šećera iz
kukuruzne silaže**

Diplomski rad

U Osijeku, listopad, 2016.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za procesno inženjerstvo
Katedra za tehnološke operacije
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet: Jedinične operacije u prehrambenom inženjerstvu
Tema rada je prihvaćena na VIII. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća
Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2015./2016.
održanoj 31. 5. 2016.
Mentor: izv. prof. dr. sc. Ana Bucić-Kojić

Utjecaj uvjeta kruto-tekuće ekstrakcije na ekstraktibilnost šećera iz kukuruzne silaže

Darijo Šibalić, 275-DI

Sažetak:

U prvom dijelu ovog rada ispitan utjecaj temperature ekstrakcije ($T = 27 - 47\text{ }^{\circ}\text{C}$), omjera kruto-tekuće ($L/S = 15 - 25\text{ mL/g}$), broja okretaja tresilice ($n = 100 - 200\text{ rpm}$) i vremena trajanja ekstrakcije ($t = 30 - 90\text{ min}$) na ekstraktibilnost šećera iz kukuruzne silaže metodom odzivnih površina prema Box-Bhenkenovom planu pokusa. Ekstrakcija je provedena u vodenoj kupelji s tresilicom, a kao otapalo je korištena voda. Masena koncentracija šećera u ekstraktima kukuruzne silaže, određivana UHPLC metodom, kretala se u rasponu $9,21 - 15,47\text{ mg/g}_{\text{s.t.}}$ za fruktozu; $6,86 - 9,37\text{ mg/g}_{\text{s.t.}}$ za glukozu; $0,33 - 3,82\text{ mg/g}_{\text{s.t.}}$ saharozu; te $0,06 - 0,87\text{ mg/g}_{\text{s.t.}}$ za maltozu. Proces ekstrakcije fruktoze u ispitivanim uvjetima najbolje je opisivao kvadratni model ($R > 0,91$), a za glukozu linearni model ($R > 0,66$). Temperatura ekstrakcije i broj okretaja tresilice imali su najveći utjecaj na ekstrakciju šećera (potvrđeno statistički značajnim članovima ($p < 0,05$)). Određeni optimalni uvjeti ekstrakcije metodom odzivnih površina su $t = 30\text{ min}$; omjer $L/S = 25\text{ mL/g}$; $n = 170\text{ rpm}$ i $T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Eksperimentalni rezultati dobiveni pri navedenim optimalnim uvjetima ($C_{\text{glu}} = 8,28\text{ mg/g}_{\text{s.t.}}$; $C_{\text{fru}} = 12,09\text{ mg/g}_{\text{s.t.}}$) ekstrakcije pokazali su dobra slaganja s podacima predviđenim modelom ($C_{\text{glu}} = 8,75\text{ mg/g}_{\text{s.t.}}$; $C_{\text{fru}} = 14,38\text{ mg/g}_{\text{s.t.}}$). U drugom dijelu rada provedena je kruto-tekuća ekstrakcija šećera, pri utvrđenim optimalnim uvjetima, iz biološki obrađene kukuruzne silaže uz pomoć gljive bijelog truljenja *Trametes versicolor* u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima.

Ključne riječi: kukuruzna silaža, ekstrakcija šećera, metoda odzivnih površina, *T. versicolor*

Rad sadrži: 58 stranica
21 slika
5 tablica
24 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

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

1. doc. dr. sc. Marina Tišma	predsjednik
2. izv. prof. dr. sc. Ana Bucić-Kojić	član-mentor
3. Izv. prof. dr. sc. Mirela Planinić	član
4. Izv. prof. dr. sc. Sandra Budžaki	zamjena člana

Datum obrane: 10. listopada 2016.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Process engineering
Subdepartment of Unit operations
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Graduate program Food engineering

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Course title: Unit Operations in Food Engineering
Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. VIII held on May 31, 2016.

Mentor: Ana Bucić-Kojić, PhD, associate prof.

Influence of solid-liquid extraction conditions on extractability of sugars from corn silage

Darijo Šibalić, 275-DI

Summary:

The effects of extraction temperature ($T = 27 - 47\text{ °C}$), solid-liquid ratio ($L/S = 15 - 25\text{ mL/g}$), the speed shakers ($n = 100 - 200\text{ rpm}$) and the duration of the extraction ($t = 30 - 90\text{ min}$) such as their interaction on extractability of sugars from corn silage were examined in the first part of this study. Extractions were performed by water using a shaking water bath. Content of sugars in the silage extracts was determined by UHPLC method and ranged from 9.21 to 15.47 mg/g_{s.t.} fructose, 6.86 to 9.37 mg/g_{s.t.} glucose, 0.33 to 3.82 mg/g_{s.t.} sucrose, and 0.06 to 0.87 mg/g_{s.t.} maltose. Extraction temperature and the speed shakers had the greatest influence on the extraction of sugars (confirmed by statistically significant p value ($p < 0.05$)) from corn silage. The optimal conditions for the sugar extraction were determined by response surface methodology ($t = 30\text{ min}$; the ratio $L/S = 25\text{ mL/g}$; $n = 170\text{ rpm}$ and $T = 30\text{ °C}$) based on Box-Bhenken experimental design. The experimental results obtained under the above optimum extraction conditions ($C_{\text{glu}} = 8.28\text{ mg/g}_{\text{s.t.}}$; $C_{\text{fru}} = 12.09\text{ mg/g}_{\text{s.t.}}$) showed good agreement with the data provided by linear model ($R > 0.66$) for glucose ($C_{\text{glu}} = 8.75\text{ mg/g}_{\text{s.t.}}$) and quadratic model ($R > 0.91$) for fructose ($C_{\text{fru}} = 14.38\text{ mg/g}_{\text{s.t.}}$).

In the second part of the work, solid-liquid extractions of sugars from biologically treated corn silage in solid-state conditions with *Trametes versicolor* were performed under determined optimal extraction conditions.

Key words: corn silage, sugar extraction, response surface methodology, *T. versicolor*

Thesis contains: 58 pages
21 figures
5 tables
24 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|--|--------------|
| 1. Marina Tišma, PhD, assistant prof. | chair person |
| 2. Ana Bucić-Kojić, PhD, associate prof. | supervisor |
| 3. Mirela Planinić, PhD, associate prof. | member |
| 4. Sandra Budžaki, PhD, associate prof. | stand-in |

Defense date: 10th October 2016

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

Ovom prilikom se želim zahvaliti mentorici izv. prof. dr. sc. Ani Bucić-Kojić koja mi je pružila priliku izrade diplomskog rada. Veliko hvala na posvećenom vremenu i prenesenom znanju!

Hvala i stručnim suradnicima u labosu Meliti Kuzmanović, Gordani Šelo i naravno Ivanu Čubel. Bez vas troje bilo bi teško odraditi 164 ekstrakcije!

Hvala i mojim prijateljima koji su bili uz mene kroz studij. Uz vas je bilo puno lakše odraditi sve obaveze kroz ovih šest godina studiranja!

I na kraju, od srca hvala roditeljima i sestrama što su mi sve pružili kako bih s velikim zadovoljstvom prošao kroz sve izazove akademskog obrazovanja. Hvala vam što se bili uz mene i što ste mi velika potpora!

Ovaj rad je izrađen na projektu „ProBioTech“ koji je sufinancirala Europska unija iz Europskog Fonda za regionalni razvoj (EFRR) pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Marine Tišma, veliko Vam hvala na svemu!



Ministarstvo
znanosti,
obrazovanja
i sporta



Ulaganje u budućnost!
Europska unija

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. Ekstrakcija.....	4
2.1.1. Kruto-tekuća ekstrakcija.....	4
2.2. Kromatografske metode analize uzorka.....	7
2.3. Fermentacija na čvrstim nosačima.....	9
2.4. Optimiranje procesnih uvjeta metodom odzivnih površina.....	11
2.4.1. Box-Behnken dizajn	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. Zadatak	16
3.2. Materijali i metode.....	16
3.2.1. Materijali	16
3.2.2. Priprema svježe kukuruzne silaže.....	17
3.2.3. Biološka obrada svježe kukuruzne silaže.....	17
3.2.4. Određivanje suhe tvari	18
3.2.5. Kruto-tekuća ekstrakcija šećera iz kukuruzovine	19
3.2.6. Priprema ekstrakta za analizu	20
3.2.7. Određivanje koncentracije šećera u ekstraktima kukuruzne silaže	20
3.2.8. Box-Behnkenov plan pokusa i obrada podataka metodom odzivnih površina.....	23
4. REZULTATI.....	26
4.1. Rezultati.....	27
4.2. Određivanje suhe tvari	27
4.3. Kalibracijska krivulja za određivanje masene koncentracije fruktoze.....	28
4.4. Kalibracijska krivulja za određivanje masene koncentracije glukoze.....	29
4.5. Kalibracijska krivulja za određivanje masene koncentracije saharoze.....	30

4.6. Kalibracijska krivulja za određivanje masene koncentracije maltoze	31
4.7. Kalibracijska krivulja za određivanje masene koncentracije maltotrioze	32
4.8. Izračunavanje masenog udjela pojedinačnih šećera u ekstraktima	33
4.9. Utjecaj procesnih uvjeta ekstrakcije na ekstraktibilnost šećera iz svježe kukuruzne silaže te određivanje optimalnih uvjeta ekstrakcije metodom odzivnih površina.....	33
4.9.1. Modeliranje procesa ekstrakcije šećera.....	35
4.9.2. Optimiranje procesa ekstrakcije.....	37
4.10. Maseni udio pojedinačnih šećera u ekstraktima biološki obrađene kukuruzne silaže	38
4.10.1. Maseni udio fruktoze.....	38
4.10.2. Maseni udio glukoze.....	39
4.10.3. Maseni udio saharoze.....	39
4.10.4. Maseni udio maltoze	40
4.10.5. Maseni udio maltotrioze	40
5. RASPRAVA.....	41
6. ZAKLJUČCI	47
7. LITERATURA.....	49

Popis oznaka, kratica i simbola

OZNAKE:

β_0 – konstanta jednadžbe odzivnog polinoma

β_{ij} – koeficijent člana interakcije jednadžbe odzivnog polinoma

β_j – koeficijent linearnog člana jednadžbe odzivnog polinoma

β_{jj} – koeficijent kvadratnog člana jednadžbe odzivnog polinoma

c – masena koncentracija analizirane tvari u ekstraktu (mg/mL)

C – maseni udio analizirane tvari u ekstraktu (mg/g_{s.t.})

c_p – broj ponavljanja eksperimenata u centralnoj točki

k – broj faktora

L/S – omjer kruto-tekuće (mL/g)

m_{uz} – masa uzorka (g)

n – broj okretaja tresilice (rpm)

p – razina signifikantnosti

R – indeks korelacije

T – temperatura ekstrakcije (°C)

t – vrijeme ekstrakcije (min)

V_e – ukupni volumen dobivenog ekstrakta (mL)

$w_{s.t.}$ – udio suhe tvari u uzorku (%)

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

Y – modelom predviđena odzivna funkcija

KRATICE:

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

LC – tekućinska kromatografija (eng. Liquid Chromatography)

RSM – metoda odzivnih površina (eng. Response surface methodology)

SSF – fermentacija na čvrstim nosačima (eng. Solid State Fermentation)

1. UVOD

Kruto-tekuća ekstrakcija ili ekstrakcija otapalom je najčešće korištena operacija izolacije aktivnih supstanci iz biljnog materijala. Poznato je da je difuzija glavni mehanizam prijenosa tvari, međutim, specifičnost svakog pojedinog ekstrakcijskog sustava (otapalo-materijal) čine proces kruto-tekuće ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz biljnog materijala vrlo složenim i zasad još nedovoljno razjašnjenim i teško predvidivim (Bucić-Kojić, 2008).

S obzirom na to da svaki tehnološki proces ovisi o brojnim procesnim parametrima, praćenjem i mijenjanjem samo jednog parametra uz ostale konstantne parametre neće dati stvarnu sliku njihovih utjecaja na promatrani proces. Međutim, u novije vrijeme sve se više u optimizaciji procesa koriste multivarijantne statističke tehnike koje uzimaju u razmatranje i interakciju ispitivanih parametara procesa, a jedna od njih je i metoda odzivnih površina, eng. Response surface methodology, RSM (Liyana-Pathirana i Shahidi, 2005).

Poljoprivreda, industrija i šumarstvo danas predstavljaju glavne izvore lignoceluloznog materijala odnosno biomase kao obnovljivog izvora energije koji doprinosi svojim ekonomskim, ekološkim i strateškim prednostima. Konverzija lignoceluloznog materijala u fermentabilne šećere i dalje predstavlja tehnološki i ekonomski problem u proizvodnji biogoriva ili drugih visoko vrijednih produkata. Budući da je razgradnja lignoceluloznog materijala danas ograničena gotovo samo na kiselinsku ili enzimsku hidrolizu veliki broj studija se temelji na istraživanju i optimiranju novih tehnoloških i ekonomski isplativih procesa (Viikari i sur., 2012).

Opsežna istraživanja su pokazala da se primjenom biološke predobrade pomoću mikroorganizama lignocelulozni materijal može na prirodan način razgraditi. Nadalje, dokazano je da gljive bijelog truljenja imaju veliku sposobnost delignifikacije biomase što značajno poboljšava enzimsku hidrolizu celuloze i hemiceluloze na fermentabilne šećere (Sindhu i sur., 2016).

Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj procesnih uvjeta kruto-tekuće ekstrakcije (temperatura ekstrakcije, vrijeme ekstrakcije, omjer kruto-tekuće i broj okretaja tresilice) na ekstraktibilnost šećera iz svježe kukuruzne silaže, procjena optimalnih uvjeta ekstrakcije metodom odzivnih površina te ispitivanje koncentracije šećera u ekstraktima biološki obrađene kukuruzne silaže uz pomoć gljive bijelog truljenja (*Trametes versicolor*) u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Ekstrakcija

Ekstrakcija je jedinična operacija potpunog ili djelomičnog odjeljivanja smjese tvari koje imaju različitu topivost u različitim otapalima. Smjesa koja se odjeljuje obrađuje se selektivnim otapalom tj. otapalom u kojem se otapa komponenta koja se želi izdvojiti. Ovisno o polaznoj fazi iz koje se tvar ekstrahira, ekstrakcija se općenito dijeli na:

- ekstrakciju kruto-tekuće (ekstrakcija otapalom) – prijenos tvari odvija se iz krute u tekuću fazu, a ako se provodi otapalom koje nije lako hlapljivo često se naziva i izluživanje,
- ekstrakciju tekuće-tekuće - prijenos tvari odvija se iz tekuće u tekuću fazu. Taj tip ekstrakcije obično označava ekstrakciju u užem smislu (Floros i sur., 1999).

Nakon procesa ekstrakcije otapalo se može odvojiti od ekstrahirane tvari različitim jediničnim operacijama (retifikacija, otparavanje, kristalizacija, ekstrakcija drugim otapalom). Na taj način se otapalo reciklira odnosno može se vratiti nazad u proces ekstrakcije (Gamse, 2006).

Konvecionalne tehnike ekstrakcije uključuju ekstrakciju po Soxhletu, maceraciju, perkolaciju. Novije tehnike ekstrakcije su ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, ultrazvučnim valovima ili enzimima, ekstrakcija pulsirajućim električnim poljem, ekstrakcija superkritičnim fluidima, ekstrakcija pri povišenim tlakom i dr. (Alcázar-Alay i sur., 2015).

2.1.1. Kruto-tekuća ekstrakcija

Kruto-tekuća ekstrakcija podrazumijeva ekstrakciju topive krute komponente iz materijala pomoću otapala. Komponenta koja se ekstrahira se može nalaziti u krutom ili tekućem stanju unutar matriksa materijala. Može biti uklopljen unutar stanica kao što je ulje u sjemenkama uljarica ili kao disperzna faza u krutoj tvari kao što je kofein u kavi (Gamse, 2006).

Kruto-tekuća ekstrakcija je jedna od najčešće korištenih operacija za izolaciju aktivnih komponenti iz biljnog materijala. Najčešće se provodi kao maceracija ili perkolacija. Maceracija se provodi u suspenziji, kao šaržni proces, tako što se kruti materijal potapa u otapalo, a perkolacija polušaržno, tako što kroz nepokretan sloj čvrstog materijala

kontinuirano protječe otapalo. Fino usitnjeni materijal, koji se može lako držati suspendiran u otapalu, podvrgava se maceraciji, dok se ekstrakcija iz komadnog materijala vrši perkolacijom (Veljković i Milenović, 2002).

Ekstrakcija topive komponente iz krutog materijala pomoću pogodnog otapala provodi se u nekoliko osnovnih koraka: ulazak otapala u krutu tvar, otapanje komponenti, transport otapala s otopljenom tvari na površinu krute tvari, transport otopine s površine krute tvari u glavnu masu otopine, razdvajanje ekstrakta i krutog ostatka uzorka, te uklanjanje otapala iz ekstrakta (Mujić, 2006).

Uslijed razlike koncentracije između dvije faze koje su u kontaktu, dolazi do prijenosa tvari koji se odvija u smjeru uspostavljanja ravnoteže. Pri kontaktu neke tvari ili čestice s tekućinom koja ga otapa, pretpostavlja se da se na njegovoj površini vrlo brzo stvara sloj zasićene otopine (faza ispiranja ili brza ekstrakcija). Kada se taj sloj ne bi uklonio prestalo bi daljnje otapanje, a time i ekstrakcija. Uklanjanje topljivog materijala iz graničnog sloja u glavnu masu otopine zbiva se redovito kombinacijom molekularne i konvekcijske difuzije (Chalermchat i sur., 2004).

Prilikom provedbe kruto-tekuće ekstrakcije osim pripreme materijala, potrebno je provesti odabir odgovarajućeg otapala za ekstrakciju:

- selektivnost: ekstrakcija točno određene komponente iz smjese zahtjeva veliku selektivnost otapala,
- razlika u gustoći: nakon ekstrakcije, dvije faze se moraju separirati u separatoru, prema tome velika razlika u gustoći je poželjna,
- optimalna površinska napetost: ukoliko je površinska napetost mala, potrebno je dovesti manje energije u sustav kako bih se uzorak bolje homogenizirao što poboljšava prijenos tvari i energije,
- otapalo se mora lako odvojiti od ekstrakta kako bi se moglo ponovo koristiti,
- otapalo ne smije biti korozivno (što ima utjecaj na cijenu konstrukcije uređaja),
- niska cijena otapala,
- otapalo ne smije biti toksično,
- otapalo ne smije biti zapaljivo, odnosno temperatura izgaranja otapala mora biti 25 °C viša od procesne temperature,

- viskoznost otapala – poželjna je manja viskoznost otapala budući da je u tome slučaju bolji prijenos tvari i topline,
- otapalo mora biti kemijski i termički stabilno (Gamse, 2006).

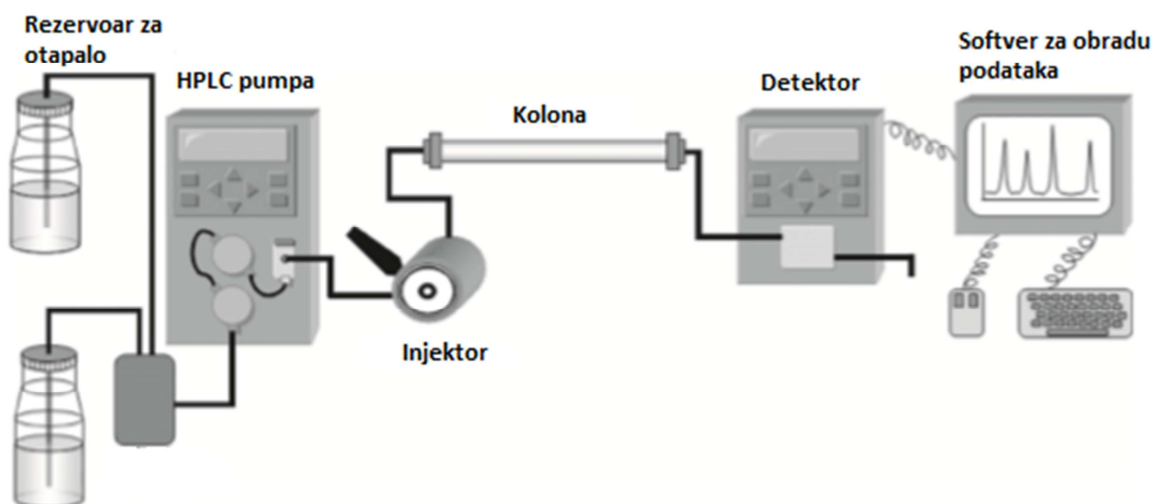
Ekonomičnost procesa ovisi o sljedećim čimbenicima:

- materijal za ekstrakciju se mora pripremiti na način da se tvar koju ekstrahiramo otopi u što kraćem vremenu. Materijal se priprema usitnjavanjem (mljevenjem rezanjem, sjeckanjem i sl.),
- ekstrakcija samo željene komponente se postiže odabirom odgovarajućeg otapala i optimalne temperature,
- ekstrakt treba sadržavati što veću koncentraciju ekstrahirane komponente. To je i razlog sve veće primjene protustrujnog postrojenja za ekstrakciju (Gamse, 2006).

2.2. Kromatografske metode analize uzorka

Suvremena tekućinska kromatografija (eng. liquid chromatography, LC) temelji se na eksperimentima koje je davne 1903. godine Tsweet provodio za separaciju pigmenata pomoću filter papira, te je kasnije primijenio kolonu ispunjenu adsorbensima. Pojam „kromatografija“ definirali su Sakodynskii and Chmutov, 1972 godine. LC je tehnika koja se primjenjuje za separaciju komponenti iz smjese između dvije faze, mobilne i stacionarne. Stacionarna faza se može nanositi u tankom sloju na ravnu inertnu ploču (tankoslojna kromatografija) ili u obliku granula ispunjava kolonu, dok odgovarajuća tekućina predstavlja mobilnu fazu. Tekućinska kromatografija se može podijeliti u dvije osnovne grupe u ovisnosti o svojstvima mobilne faze. Primjenom kromatografije normalnih faza stacionarna faza ima veću polarnost nego mobilna faza za razliku od kromatografije obrnutih faza kod kojih se primjenjuje mobilna faza veće polarnosti s obzirom na stacionarnu fazu (Nollet i Toldrá, 2013).

Slika 1 prikazuje osnovne dijelove HPLC sustava. Mobilna faza koja se koristi za eluiranje komponenti u sustav se dovodi pomoću sustava pumpi. Ovisno o tipu primijenjene kromatografske metode, može se koristiti izokratna ili gradijentna metoda eluiranja. Osim filtracije, iz mobilne faze je bitno ukloniti mjehuriće zraka koji mogu utjecati na osjetljivost primijenjenog detektora. Komponente koje se analiziraju separiraju se prolaskom uzorka kroz kolonu. Kolone koje se koriste za LC mogu biti izrađene od različitih materijala (staklo, nehrđajući čelik), dužine u rasponu od 5-25 cm te unutarnjeg promjera od nekoliko mikrometara do nekoliko milimetara. U ovisnosti o unutarnjem promjeru, duljini te u promjeru čestica stacionarne faze u koloni, volumni protok mobilne faze se kreće u rasponu od nL – mL/min sa relativno visokim tlakom (do 18 000 bar), tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (UHPLC). Nakon separacije pojedine komponente zajedno s mobilnom fazom dolaze do detektora koji daje odgovarajući odaziv u ovisnosti o vremenu zadržavanja komponente u koloni te koncentraciji. Odaziv se bilježi na pisaču (računalu) u obliku kromatografskog pika koji čini kromatogram (Nollet i Toldrá, 2013).



Slika 1. Shematski prikaz HPLC sustava (Nollet i Toldrá, 2013)

2.3. Fermentacija na čvrstim nosačima

Fermentacija na čvrstim nosačima (eng. Solid State Fermentation, SSF) se sve više primjenjuje za unaprjeđenje potencijala industrijskih procesa. SSF podrazumijeva uzgoj mikroorganizama na čvrstim supstratima bez slobodne vode te opisuje fermentacije koje se spontano odvijaju u prirodi. Submerzni uzgoj (eng. Submerged Fermentation, SmF) kao i SSF odvija se u prisutnosti kisika (aerobni uvjeti) iz zraka, ali za razliku od SmF, SSF se odvija u uvjetima sa malim udjelom slobodne vode te (Raghava Rao i sur., 1993).

Prilikom fermentacije dolazi do potrošnje kisika te do produkcije ugljikovog dioksida i energije tijekom biokemijskih reakcija. Zbog razgradnje materijala (supstrata) i oslobađanja energije tijekom vođenja procesa SSF potrebno je kontrolirati temperaturu procesa (Raghava Rao i sur., 1993).

Prilikom vođenja SSF potrebno je voditi računa o granulacijskom sastavu supstrata. Male čestice imaju veću površinu na kojoj mikroorganizmi rastu ali ako su presitne može doći do aglomeracije supstrata što će prouzrokovati slabiji rast mikroorganizma. U suprotnom, kod velikih čestica bolja je aeracija ali je ograničena površina supstrata za djelovanje mikroorganizama. Prema tome, bitno je odrediti optimalni granulacijski sastav supstrata za uzgoj pojedinog mikroorganizma (Couto i Sanromán 2006).

Osim za biološku predobradu, SSF se primjenjuje za proizvodnju visokovrijednih produkata u industrijskom mjerilu iz različitih supstrata. Određene vrste bakterija i gljiva koje su pogodne za uzgoj na čvrstim nosačima imaju mogućnost sinteze različitih spojeva (nositelja) arome (različite voćne arome kao što je aroma ananasa), enzime (termostabilna α -amilaza za proizvodnju šećernih sirupa; lipaze za hidrolizu netopljivih estera masnih kiselina; pektinaze za razgradnju pektina i izbistravanje voćnih sokova), organske kiseline (mliječna kiselina, limunska kiselina), ksantan gume (primjena u prehrambenoj, tekstilnoj i farmaceutskoj industriji) (Couto i Sanromán 2006).

Veliki broj čvrstih nosača koji se koriste za SSF mogu se podijeliti u dvije osnovne grupe: inertni materijal, koji se koristi isključivo kao nosač za mikroorganizme, te materijal čija funkcija nije samo nosača za mikroorganizme nego i izvor potrebnih mikro- i makronutrijenata za rast i razvoj. Takvi materijali su najčešće škrobnog ili lignoceluloznog sastava a nastaju kao nusprodukti prerade prehrambene ili poljoprivredne industrije. Osim

potrebnih nutrijenata za rast i razvoj mikroorganizama, navedeni supstrati najčešće sadrže određene komponente, induktore, koji potiču proizvodnju izvanstaničnih enzima. Na primjer, ukoliko se provodi obrada materijala s visokim udjelom lignina dolazi do veće produkcije enzima lignin peroksidaze. Supstrati bogati celulozom će utjecati na veću proizvodnju lakaze dok će škrobni supstrati biti dobri induktori za proizvodnju amilaze (Couto i Sanromán 2005).

Lignocelulozni materijal je biopolimer koji je najrašireniji u prirodi te se uglavnom sastoji od celuloze, hemiceluloze i lignina. Lignin je polimerna molekula otporna na kemijsku i biokemijsku razgradnju zbog svoje strukture u kojoj polifenolni spojevi formiraju kompleks trodimenzionalne strukture stvarajući međumolekularne eterske veze ili veze između ugljikovih atoma. Veliki broj mikroorganizama kao što su gljive mogu razgraditi lignocelulozni materijal (Daâssi i sur., 2016).

Gljive bijelog truljenja imaju sposobnost razgradnje širokog raspona kompleksnih spojeva zbog njihove sposobnosti da proizvode vrlo specifične izvanstanične enzime. Zbog toga gljive bijelog truljenja imaju veliku sposobnost razgradnje glavnih komponenata staničnih stijenki biljnog materijala kao što su celuloza, hemiceluloza i lignin (Hadda i sur., 2015).

Osim razgradnje lignoceluloznog materijala, gljive bijelog truljenja imaju sposobnost razgradnje specifičnih aromatskih spojeva koji zagađuju okoliš kao što su ksenobiotici, policiklički aromatski ugljikovodici, pesticidi, dioksini te industrijska bojila. Lignolitički enzimi su lignin peroksidaza (LiP), mangan peroksidaza (MnP) i lakaza (Lac). Potpuna razgradnja lignoceluloznog supstrata zahtjeva hidrolizu strukturalnog polisaharidnog staničnog zida djelovanjem različitih enzima kao što su celulaze i hemicelulaze. Osim navedenog, za potpunu razgradnju materijala gljive bijelog truljenja produciraju i druge enzime kao što su esteraze/lipaze ili proteaze kako bi se materijal potpuno razgradio te da bi bio pogodan za daljnju biotehnološku preradu u hranu za životinje, različite visokovrijedne produkte i/ili biogorivo (Daâssi i sur., 2016).

2.4. Optimiranje procesnih uvjeta metodom odzivnih površina

Optimiranje procesnih uvjeta podrazumjeva poboljšanje svojstava nekog sustava, procesa ili proizvoda uz postizanje maksimalnog prinosa uz što manje troškove. Ranije se optimiranje procesa provodilo na način da se ispita utjecaj jedne varijable na izlaznu veličinu, odnosno na odaziv procesa. Takva tehnika se zove „jedna varijabla u vremenu“. Primjenom navedene tehnike ne možemo dobiti podatak o međusobnom utjecaju drugih nezavisnih varijabli u procesu na izlaznu veličinu, dok bi samo optimiranje takvog procesa zahtijevalo veliki broj eksperimenata, veliki utrošak materijala i kemikalija, što sveukupno utječe na cijenu procesa. U novije vrijeme, za optimiranje procesa se koriste multivarijantne tehnike kao što je metoda odzivnih površina (eng. Response surface methodology, RSM). Provedbom prethodno definiranih eksperimenata određuje se međusobni utjecaj ulaznih varijabli (nezavisne varijable) na odaziv procesa, odnosno na izlaznu varijablu (Bezerra i sur., 2008).

Termini u metodi odzivnih površina

- *eksperimentalna domena* - predstavlja područje ispitivanja odnosno raspon minimalnih i maksimalnih vrijednosti ispitivanih varijabli (uvjeta, parametara)
- *dizajn eksperimenta (plan pokusa)* - predstavlja set eksperimenata određenih matricom koja nastaje različitim kombinacijama ispitivanih varijabli
- *faktori ili nezavisne varijable* – varijable koje se mogu mijenjati nezavisno jedne od drugih i koje se kontroliraju tijekom procesa (npr. temperatura, vrijeme, protok, itd.)
- *razina varijabli* – različite vrijednosti varijabli pri kojima će se eksperiment provesti (npr. varijabla temperatura na 3 razine: 30, 50 i 70 °C) da bi se optimizirao neki proces
- *odziv ili zavisne varijable* – predstavljaju izmjerene vrijednosti eksperimenta (npr. koncentracija)
- *ostatak (engl. residual)* – predstavlja razliku između izračunatih i eksperimentalno određenih podataka odnosno onaj dio varijabilnosti koji nije moguće objasniti modelom. Dobra aproksimacija eksperimentalnih podataka matematičkim modelom predstavljena je niskim vrijednostima ostataka. (Bezerra i sur., 2008)

Metoda odzivnih površina (eng. Response surface methodology, RSM) predstavlja skup matematičkih i statističkih alata koji se primjenjuju u svrhu modeliranja i optimiranja određenih procesnih uvjeta u svrhu dobivanja odgovarajućeg odaziva kao funkcije ulaznih nezavisnih varijabli prikazano izrazom:

$$y = f(x_1, x_2) + e \quad (1)$$

gdje su x_1, x_2 nezavisne varijable koje utječu na odaziv y .

Prilikom definiranja odaziva, funkcija f je nepoznata zbog međusobnog utjecaja nezavisnih varijabli na odaziv što predstavlja glavni problem metode odzivnih površina. Kako bih se definirao odgovarajući model potrebno je provesti odgovarajuću aproksimaciju eksperimentalnih podataka funkcije f . U početnim fazama istraživanja, znanstvenici najčešće koriste polinome nižeg stupnja u uskom području ispitivanja. Ukoliko se odaziv može definirati kao linearna funkcija nezavisnih varijabli, tada je aproksimacija funkcija modela prvog reda. Model prvog reda s dvije nezavisne varijable može se definirati izrazom:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + e \quad (2)$$

Ukoliko prilikom linearne aproksimacije eksperimentalnih podataka funkcije f s dvije nezavisne varijable dolazi do velike statističke pogreške, tada se primjenjuje model drugog reda kako je prikazano izrazom:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{12} x_1 x_2 + e \quad (3)$$

Kod svakog modela, razina pojedinog faktora (varijable) je nezavisna u odnosu na razinu drugih faktora. U nastojanju da se dobije statistički značajni model prilikom aproksimacije eksperimentalnih podataka modelom višeg reda (polinom) sa što manjom statističkom pogreškom modela potrebno je definirati plan (matricu) eksperimenata u nastojanju da se prikupi što je više moguće značajnih eksperimentalnih podataka. Nakon provedenih eksperimenata primjenjuje se model najmanjih kvadrata u svrhu procjene parametara polinoma (Bradley, 2007).

Odnos između odaziva y i nezavisnih varijabli često je nepoznat. Model koji definira odaziv funkcije f je polinom nižeg stupnja koji se često primjenjuje za aproksimaciju podataka ukoliko je ispitivano područje podataka malo. Prilikom aproksimacije funkcije f model prvog stupnja se primjenjuje kad se odaziv nezavisnih varijabli može opisati

linearnom funkcijom. Međutim, u većini slučajeva odziv modela se ne može opisati linearnom funkcijom zbog velikog nedostatka modela (eng. *lack of fit of the first-order model*). Model drugog reda bolje aproksimira eksperimentalne podatke parabolom. Model drugog reda osim kvadratnih članova, obuhvaća sve članove modela prvog reda. Prilikom definiranja modela drugog reda, najčešće su primjenjivani centralni kompozitni dizajn te Box-Behnken dizajn (Bradley, 2007).

2.4.1. Box-Behnken dizajn

Box-Behnkenov dizajn (**Slika 2**) predlaže kako odabrati točke eksperimenta kada je potrebno ispitati utjecaj više faktora na tri razine uz mogućnost efikasne procjene koeficijenata matematičkih modela prvog i drugog reda. Ovaj dizajn je puno učinkovitiji i efikasniji od trofaktorijskog dizajna (3^k) uglavnom zbog mogućnosti ispitivanja više varijabli i to od 3 do 10 dok je trofaktorijski dizajn primjenjiv za ispitivanje do 4 varijable i zahtjeva puno više pokusa. (Bezerra i sur., 2008)

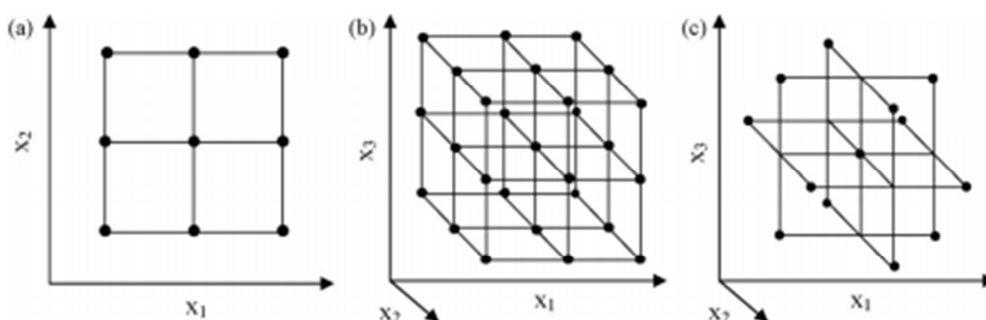
Osnovne karakteristike ovoga dizajna su:

a) zahtjeva broj eksperimenata definiran prema sljedećem izrazu:

$$N = 2^k(k - 1) + c_p \quad (4)$$

gdje je k broj faktora, a c_p broj ponavljanja eksperimenata u centralnoj točki

b) sve razine faktora moraju se svesti na tri razine (-1, 0, 1) s jednakim intervalom između razina



Slika 2. Trofaktorijski dizajn za optimizaciju a) dvije varijable b) tri varijable c) Box-Behnken dizajn za tri varijable sa 13 eksperimentalnih točaka

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Zadatak

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj procesnih uvjeta kruto-tekuće ekstrakcije na ekstraktibilnost šećera iz svježe kukuruzne silaže, procjena optimalnih uvjeta ekstrakcije, provesti ekstrakcije šećera pri prethodno dobivenim optimalnim uvjetima te izmjeriti koncentracije pojedinačnih šećera u ekstraktima biološki obrađene kukuruzne silaže pomoću *T. versicolor* u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima.

U prvom dijelu eksperimentalnog rada provedeno je ispitivanje utjecaja temperature (27 – 47 °C), omjera kruto-tekuće (15 – 25 mL/g), broja okretaja tresilice (100 – 200 rpm) te vremena ekstrakcije (30 – 90 min) prema Box-Behnkenovom planu pokusa na ekstraktibilnost šećera (fruktoza, glukoza, saharoza, maltoza) u ekstraktima svježe kukuruzne silaže. Procjena utjecaja ispitivanih uvjeta ekstrakcije i njihove interakcije na ekstraktibilnost šećera te njihovo optimiranje provedeno je metodom odzivnih površina (eng. Response surface methodology) na osnovi eksperimentalnih podataka, uz primjenu programa Design Expert 9.0.5. U drugom dijelu eksperimentalnog rada provedena je kruto-tekuća ekstrakcija šećera, pri utvrđenim optimalnim uvjetima, iz biološki obrađene kukuruzne silaže uz pomoć gljive bijelog truljenja *Trametes versicolor* u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima.

3.2. Materijali i metode

3.2.1. Materijali

Istraživanja su provedena na svježoj kukuruznoj silaži dobivenoj iz lokalnog bioplinskog postrojenja (Tvrtka Bovis d.o.o., Ivankovo). Svježa kukuruzna silaža je do provedbe eksperimenata čuvana u zamrzivaču na -20 °C.

Biološka obrada svježe kukuruzne silaže provedena je u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima (eng. solid state fermentation, SSF) uz pomoć gljive bijelog truljenja *Trametes versicolor* TV-6 (MZKI, Ljubljana, Slovenija). Kultura je uzgajana na krumpirovom agaru (Biolife Italiana Sr. L. Viale Monza, Milan, Italija) sedam dana pri 27 °C.

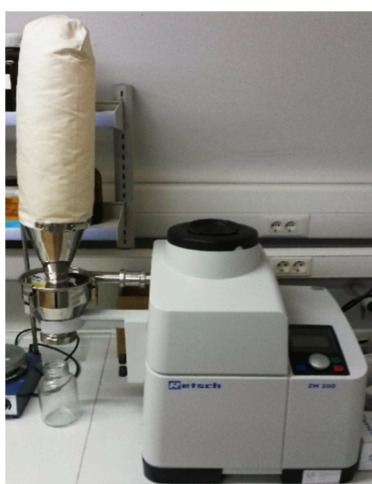
3.2.2. Priprema svježe kukuruzne silaže

Neposredno prije provedbe ekstrakcije svježa kukuruzna silaža je sterilizirana u autoklavu (TIP 7510945, Sutjeska, Beograd) na temperaturi 121 °C u trajanju od 20 minuta (**Slika 4**). Sterilizirana svježa kukuruzna silaža je ohlađena i osušena na zraku tijekom 48h te je fino usitnjena na ultracentrifugalnom mlinu do veličine čestica od 1 mm (Retsch ZM200) (**Slika 3**).

3.2.3. Biološka obrada svježe kukuruzne silaže

Oko 50 grama svježe kukuruzne silaže (supstrat) odvagano je u laboratorijske teglice, dodano je 100 mL destilirane vode, sterilizirano u autoklavu (121 °C / 20 min) te ohlađeno na sobnu temperaturu tijekom 24 sata. Nakon toga, supstrat u svakoj teglici nacjepljen je s pet micelijskih diskova *T. versicolor* TV-6 (Ø 1 cm) (**Slika 5**) suspendiranih u 10 mL destilirane vode i inkubiran pri 27 °C u inkubatoru (BINDER GmbH, KB 115) s ventilacijom postavljenom na 10 %. Prvo uzorkovanje je provedeno nakon 8 sati inkubacije, zatim svakodnevno tijekom sedam dana inkubacije u 08:00 h i 18:00 h, u dvije paralelne probe. Kako bi se zaustavio rast *T. versicolor* nakon definiranog perioda inkubacije uzorci su sterilizirani u autoklavu.

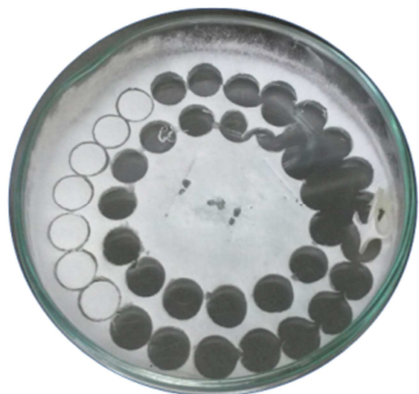
Nakon sterilizacije uzorci su osušeni na zraku tijekom 48h, fino usitnjeni na ultracentrifugalnom mlinu do veličine čestica 1 mm, određen je udio suhe tvari te je provedena ekstrakcija prema prethodno definiranim optimalnim uvjetima.



Slika 3. Ultracentrifugalni mlin Retsch ZM200



Slika 4. Autoklav TIP 7510945, Sutjeska, Beograd



Slika 6. Prikaz micelijskih diskova *T. versicolor* TV-6



Slika 5. Prikaz porasta micelija *T. versicolor* na kukuruznoj silaži nakon 6 dana fermentacije u uvjetima na čvrstim nosačima



3.2.4. Određivanje suhe tvari

Udio suhe tvari određen je u svim osušenim uzorcima (svježoj i biološki obrađenoj silaži) prije početka ekstrakcije, termogravimetrijskom metodom na uređaju za radijacijsko-infracrveno sušenje (HR-73, Mettler Toledo) (**Slika 7**). Na aluminijsku pliticu postavljenu na integriranu vagu uređaja odvagano je 2 g usitnjenog uzorka te je sušenje provedeno brzom metodom. Uvjeti sušenja su: standardna metoda, temperatura sušenja 105 °C i kriterij završetka procesa (eng. switch-off 3: gubitak mase od 1 g u 50 s) (Planinić i sur. 2004). Tijekom sušenja instrument kontinuirano određuje masu uzorka, a sušenje je provedeno do konstantne mase. Određivanje suhe tvari za sve uzorke provedeno je u jednoj probi.



Slika 7. HR-73, Mettler Toledo

3.2.5. Kruto-tekuća ekstrakcija šećera iz kukuruzovine

Ekstrakcija je provedena u vodenoj kupelji s tresilicom (Julabo SW-23, Njemačka) (**Slika 8**) koja je namijenjena za laboratorijsku upotrebu i ima mogućnost podešavanja temperature (od 20 do 99,9 °C), vremena trešnje (od 1 min do 10 h) te frekvencije trešnje (od 20 do 200 rpm).



Slika 8. Julabo SW-23, Njemačka

Provedba kruto-tekuće ekstrakcije šećera iz svježe kukuruzne silaže

Staklene tikvice u koje je odvagano 1 g usitnjenog uzorka te dodan određeni volumen otapala (voda) postavljene su u vodenu kupelj gdje su parametri ekstrakcije (temperatura, broj okretaja tresilice i vrijeme) podešeni prema Box-Behnkenovom planu pokusa (**Tablica 2**).

Provedba kruto-tekuće ekstrakcije šećera iz biološki obrađene kukuruzne silaže

Ekstrakcija šećera iz biološki obrađene kukuruzne silaže pomoću *T. versicolor* provedena je pri optimalnim uvjetima ekstrakcije šećera ($L/S = 25 \text{ mL/g}$; $t = 30 \text{ min}$; $T = 30 \text{ °C}$; $n = 170 \text{ rpm}$) koji su utvrđeni metodom odzivnih površina na osnovi eksperimentalnih podataka dobivenih ekstrakcijom šećera iz svježe kukuruzne silaže prema Box-Behnkenovom planu pokusa. Za provedbu ekstrakcija šećera kao otapalo korištena je voda.

3.2.6. Priprema ekstrakta za analizu

Nakon provedene ekstrakcije suspenzija uzorka i otopine je centrifugirana (Multifuge 3L-R Centrifuge, Heareus) pri 10 000 g tijekom 10 minuta. Dobiveni supernatant je korišten za određivanje koncentracije šećera tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti.

3.2.7. Određivanje koncentracije šećera u ekstraktima kukuruzne silaže

Određivanje koncentracije šećera u prethodno pripremljenom supernatantu je provedeno tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti (Nexera XR UHPLC, Shimadzu) (**Slika 9**). Uređaj se sastoji od vakuum otplinjača (DGU-20A_{5R}), dvije binarne pumpe (A & B) (LC-20ADXR), automatskog uzorkivača (SIL-20ACXR), kolonske pećnice (CTO-20AC), PDA detektora (SPD-M20A), detektora indeksa loma (RID-20A), kontrolera (CBM-20A) te PC-a i odgovarajućeg softvera za upravljanje i obradu podataka (LabSolution).



Slika 9. Nexera XR UHPLC, Shimadzu

Koncentracije pojedinačnih šećera u uzorcima su analizirani izokratnom metodom, kromatografijom normalnih faza prema navedenim uvjetima:

- Kolona InertSustain NH₂
- Mobilna faza acetonitril : voda = 75 : 25
- Vrijeme analize 20 min
- Tlak 40 bar
- Temperatura kolonske pećnice 40 °C
- Protok mobilne faze 1 mL/min
- Volumen injektiranja uzorka 10 µL
- Detektor detektor indeksa refrakcije (RID – A)

Prije provedene analize šećera uzorci su profiltrirani na membranskom filteru promjera 0,22 µm u viala koje su potom stavljene u automatski uzorkivač. Za otplinjavanje mobilne faze korištena je ultrazvučna kupelj (Elmasonic P 120 H, Elma).

Dobiveni kromatogrami korišteni su za kvalitativnu i kvantitativnu analizu šećera u uzorcima. Kvalitativna analiza (identifikacija komponenti) je provedena usporedbom retencijskih vremena pojedinačnih šećera u uzorku s retencijskim vremenima nakon injektiranja poznatog standarda šećera određene koncentracije u uzorku. Kvantitativna analiza šećera u uzorcima provedena je pomoću odgovarajućeg softvera za obradu podataka (*LabSolution*), određivanjem površine ispod pikova na temelju prethodno izrađenih kalibracijskih krivulja. Kvalitativna i kvantitativna analiza pojedinačnih šećera određena je u dva ponavljanja.

Postupak izrade kalibracijskih krivulja za kvantitativnu analizu pojedinačnih šećera u uzorku

Za izradu kalibracijskih krivulja pripremljene su temeljne otopine standarda za šećere (fruktoza, glukoza, saharoza, maltoza, maltotrioza) u koncentraciji 10 mg/mL (500 mg standarda otopljeno u 50 mL redestilirane vode). Od temeljnih otopina pripremljene su sljedeće koncentracije otopina za pojedinačne šećere:

- fruktoza, glukoza i maltoza: 0,10 mg/mL; 0,20 mg/mL; 0,30 mg/mL; 0,40 mg/mL; 0,50 mg/mL
- saharoza: 0,10 mg/mL; 0,30 mg/mL; 0,50 mg/mL; 0,70 mg/mL; 1,00 mg/mL
- maltotrioza: 0,10 mg/mL; 0,20 mg/mL; 0,30 mg/mL; 0,40 mg/mL; 0,50 mg/mL; 0,70 mg/mL; 1,00 mg/mL

Nakon provedene tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti određena je površina ispod pikova na dobivenim kromatogramima. Linearna ovisnost površine ispod pikova o promjeni koncentracije određenog šećera procijenjena je linearnom regresijskom analizom pomoću regresijskog modela najmanjih kvadrata.

3.2.8. Box-Behnkenov plan pokusa i obrada podataka metodom odzivnih površina

U ovom radu metoda odzivnih površina korištena je za procjenu utjecaja i optimiranje procesnih uvjeta kruto-tekuće ekstrakcije šećera iz svježe kukuruzne silaže s obzirom na maksimalni udio analiziranih šećera. Box-Behnkenov dizajn korišten je za definiranje uvjeta ekstrakcije i procjenu utjecaja ispitivanih procesnih uvjeta kao i njihovog međusobnog utjecaja na ekstraktibilnost šećera. Prema prethodno definiranoj jednadžbi (4) za izračun broja eksperimenata predložen je Box-Behnkenov plan pokusa s tri ponavljanja u centralnoj točki ispitivanog eksperimentalnog područja (**Tablica 2**).

Četiri ispitivane varijable u tri razine (**Tablica 1**) su prevedene u kodirane varijable prema izrazu:

$$X = \frac{x - \frac{(x_{max} + x_{min})}{2}}{\frac{(x_{max} - x_{min})}{2}} \quad (5)$$

Tablica 1. Faktori utjecaja i područje eksperimentalnog ispitivanja u tri razine za ekstrakciju šećera iz svježe kukuruzne silaže

Faktor (varijabla)	Simbol	Kodirana varijabla		
		-1	0	+1
Temperatura (°C)	X_1	27	37	47
Omjer kruto-tekuće (mL/g)	X_2	15	20	25
Broj okretaja tresilice (rpm)	X_3	100	150	200
Vrijeme ekstrakcije (min)	X_4	30	60	90

Tablica 2. Box-Behnkenov plan pokusa (eksperimentalna matrica)

br. eksperimenta	t (min)	L/S (mL/g)	n (rpm)	T (°C)
1	60	25	150	47
2	30	20	150	47
3	60	25	100	37
4	90	25	150	37
5	30	20	200	37
6	30	15	150	37
7	60	20	150	37
8	60	20	200	27
9	90	20	200	37
10	60	15	200	37
11	60	20	150	37
12	60	20	100	47
13	90	20	150	27
14	90	15	150	37
15	90	20	100	37
16	60	15	150	47
17	60	15	150	27
18	30	25	150	37
19	30	20	100	37
20	60	15	100	37
21	60	25	150	27
22	30	20	150	27
23	60	20	200	47
24	60	25	200	37
25	90	20	150	47
26	60	20	150	37
27	60	20	100	27

t – vrijeme ekstrakcije (min), L/S - omjer kruto-tekuće (mL/g),
 n - broj okretaja tresilice (rpm), T – temperatura ekstrakcije (°C)

Za aproksimaciju eksperimentalnih podataka korišten je kvadratni polinom:

$$Y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j X_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} X_j^2 + \sum_{j=1}^{k-1} \sum_{i=1}^k \beta_{ij} X_i X_j \quad (6)$$

gdje je:

Y - modelom predviđena odzivna funkcija;

β_0 - konstanta jednadžbe odzivnog polinoma;

β_j - koeficijent linearnog člana jednadžbe odzivnog polinoma;

β_{jj} - koeficijent kvadratnog člana jednadžbe odzivnog polinoma;

β_{ij} - koeficijent člana interakcije jednadžbe odzivnog polinoma;

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

k – broj varijabli

Na osnovi dobivenog matematičkog modela (polinoma) konstruirana je odzivna površina koja omogućava vizualni prikaz utjecaja ispitivanih parametara na promatrane modele. Odzivna površina može se prikazati kao površina u 3D prostoru ili pomoću kontura odzivnih površina.

Procjena koeficijenata modela nelinearnom regresijskom analizom, statistička analiza (ANOVA) značajnosti ispitivanih parametara na promatrane procese te numerička optimizacija ispitivanih procesnih parametara provedena je primjenom softverskog paketa Design Expert 9.0.5.

Provjera uspješnosti optimiranja procesa ekstrakcije šećera iz svježe kukuruzne silaže provedena je usporedbom rezultata dobivenih metodom odzivnih površina i eksperimentalno dobivenih rezultata pri utvrđenim optimalnim uvjetima ekstrakcije.

4. REZULTATI

4.1. Rezultati

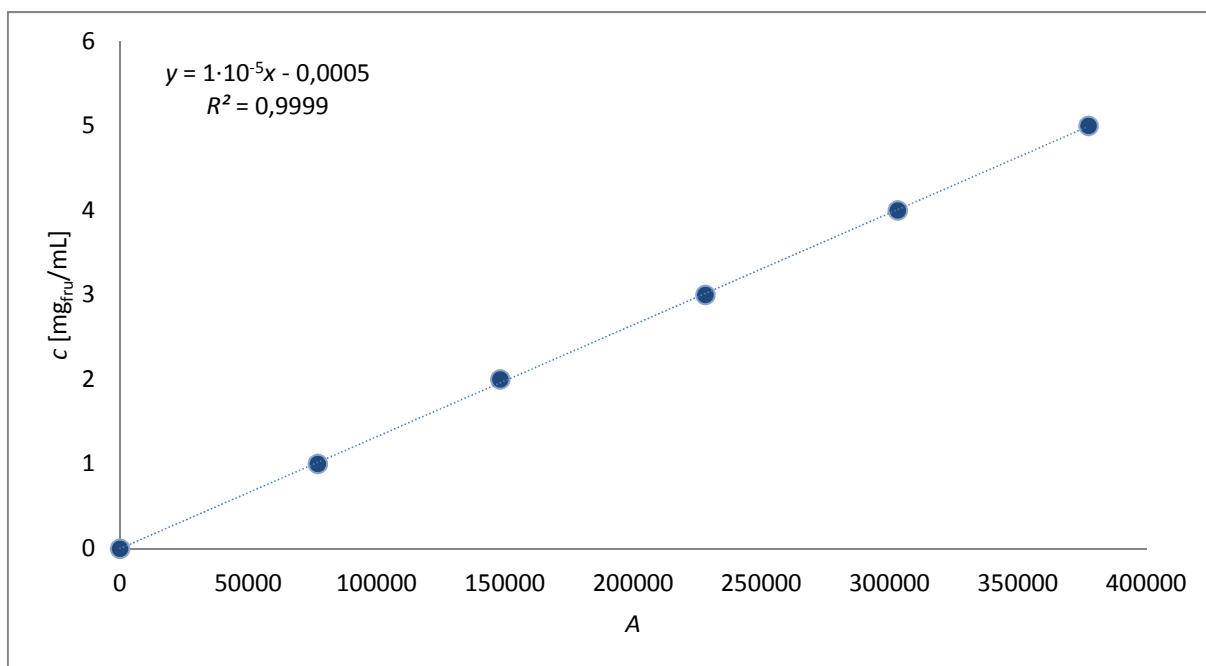
Eksperimentalno dobiveni podaci i rezultati njihove obrade prikazani su u tablicama i dijagramima. Dizajn eksperimenta kao i statistička obrada dobivenih podataka u ispitivanom procesu provedeni su pomoću programskog paketa Design Expert 9.0.5., a korištena je Box-Behnken metoda odzivnih površina.

4.2. Određivanje suhe tvari

Nakon sušenja uzorka u trajanju od 48 h na zraku određena je suha tvar. Udio suhe tvari u svježoj kukuruznoj silaži kretao se u rasponu od 92,85% do 94,46%.

Udio suhe tvari u biološki obrađenoj kukuruznoj silaži kretao se u rasponu od 91,63% do 93,64%.

4.3. Kalibracijska krivulja za određivanje masene koncentracije fruktoze



Slika 10. Kalibracijska krivulja za izračunavanje masene koncentracije fruktoze u ekstraktima kukuruzne silaže

Metodom linearne regresije dobivena je jednadžba:

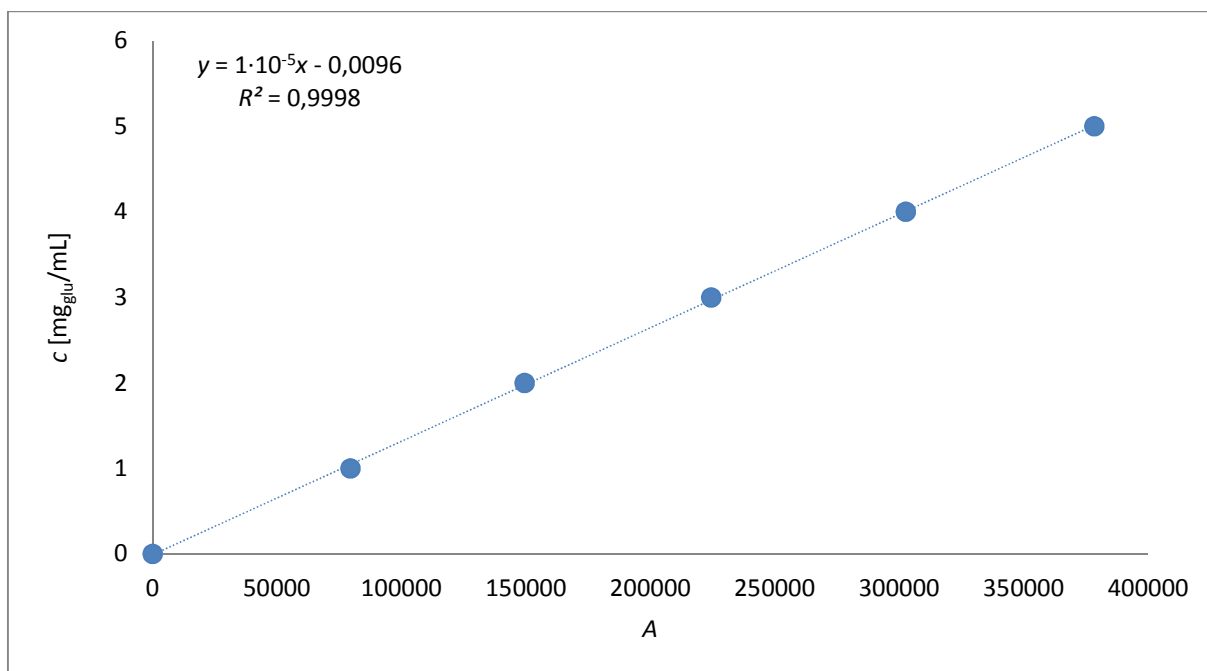
$$y = 1 \cdot 10^{-5}x - 0,0005 \quad (7)$$

odnosno:

$$c(\text{fruktoza}) = y = 1 \cdot 10^{-5} \cdot A - 0,0005 \text{ [mg/mL]} \quad (8)$$

koja je korištena za izračunavanje masene koncentracije fruktoze u ekstraktima kukuruzne silaže.

4.4. Kalibracijska krivulja za određivanje masene koncentracije glukoze



Slika 11. Kalibracijska krivulja za izračunavanje masene koncentracije glukoze u ekstraktima kukuruzne silaže

Metodom linearne regresije dobivena je jednadžba:

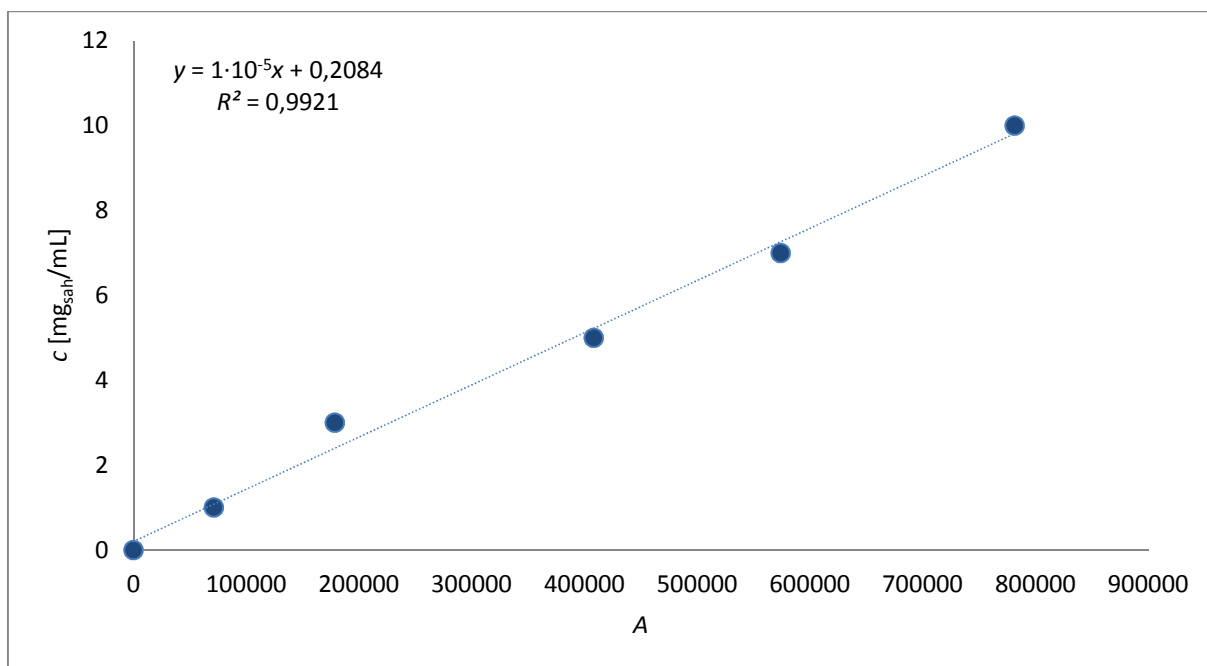
$$y = 1 \cdot 10^{-5}x - 0,0096 \quad (9)$$

odnosno:

$$c (\text{glukoza}) = y = 1 \cdot 10^{-5} \cdot A - 0,0096 \text{ [mg/mL]} \quad (10)$$

koja je korištena za izračunavanje masene koncentracije glukoze u ekstraktima kukuruzne silaže.

4.5. Kalibracijska krivulja za određivanje masene koncentracije saharoze



Slika 12. Kalibracijska krivulja za izračunavanje masene koncentracije saharoze u ekstraktima kukuruzne silaže

Metodom linearne regresije dobivena je jednadžba:

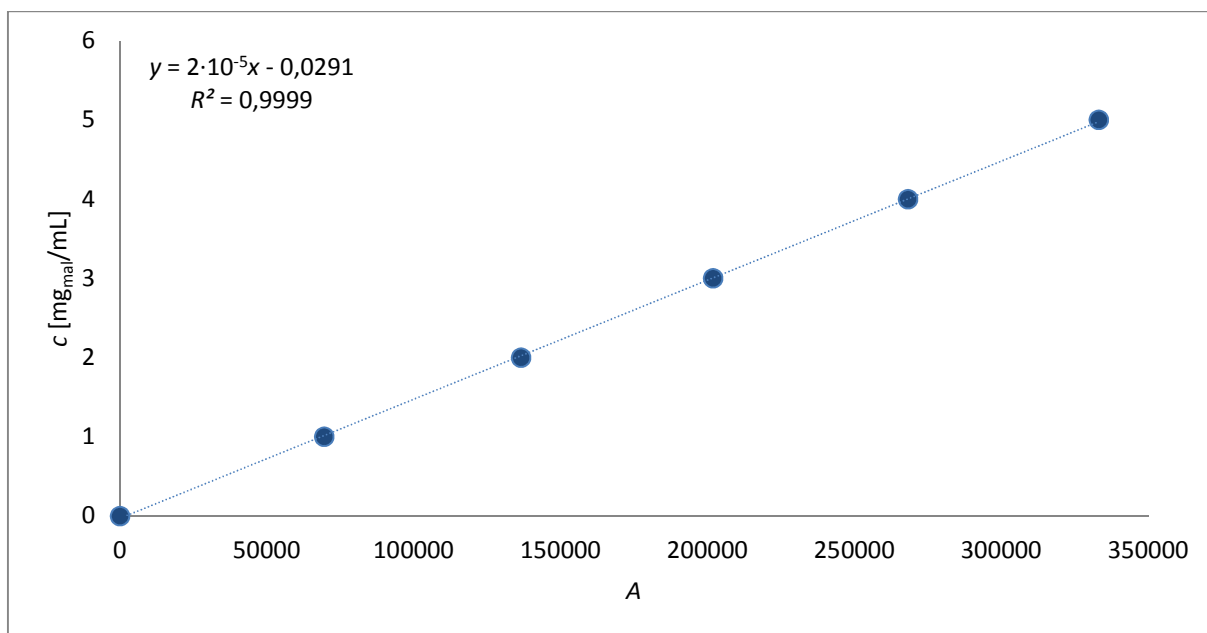
$$y = 1 \cdot 10^{-5}x + 0,2084 \quad (11)$$

odnosno:

$$c(\text{saharoz}) = y = 1 \cdot 10^{-5} \cdot A + 0,2084 \text{ [mg/mL]} \quad (12)$$

koja je korištena za izračunavanje masene koncentracije saharoze u ekstraktima kukuruzne silaže.

4.6. Kalibracijska krivulja za određivanje masene koncentracije maltoze



Slika 13. Kalibracijska krivulja za izračunavanje masene koncentracije maltoze u ekstraktima kukuruzne silaže

Metodom linearne regresije dobivena je jednačba:

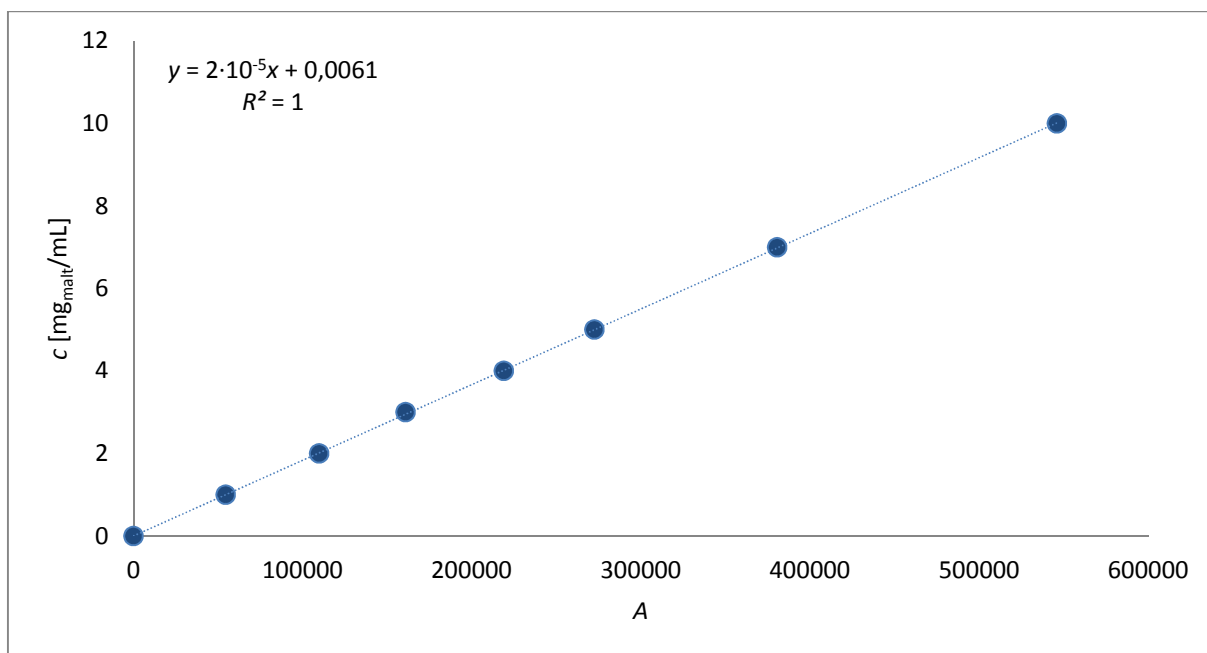
$$y = 2 \cdot 10^{-5}x - 0,0291 \quad (13)$$

odnosno:

$$c(\text{maltoza}) = y = 2 \cdot 10^{-5} \cdot A - 0,0291 \text{ [mg/mL]} \quad (14)$$

koja je korištena za izračunavanje masene koncentracije maltoze u ekstraktima kukuruzne silaže.

4.7. Kalibracijska krivulja za određivanje masene koncentracije maltotrioze



Slika 14. Kalibracijska krivulja za izračunavanje masene koncentracije maltotrioze u ekstraktima kukuruzne silaže

Metodom linearne regresije dobivena je jednađžba:

$$y = 2 \cdot 10^{-5}x + 0,0061 \quad (15)$$

odnosno:

$$c(\text{maltotrioza}) = y = 2 \cdot 10^{-5} \cdot A + 0,0061 \text{ [mg/mL]} \quad (16)$$

koja je korištena za izračunavanje masene koncentracije maltotrioze u ekstraktima kukuruzne silaže.

4.8. Izračunavanje masenog udjela pojedinačnih šećera u ekstraktima kukuruzne silaže

Prema jednadžbama (8, 10, 12, 14, 16) dobivenih metodom linearne regresije izračunate su koncentracije pojedinačnih šećera u ekstraktu svježe i biološki obrađene kukuruzne silaže koje su preračunate na suhu tvar uzorka prema navedenom izrazu:

$$C = \frac{c \cdot V_e}{m_{uz} \cdot w_{s.t.}} \cdot 100 \quad (17)$$

C – maseni udio analizirane tvari u ekstraktu (mg/g_{s.t.})

c – masena koncentracija analizirane tvari u ekstraktu (mg/mL)

V_e – ukupni volumen dobivenog ekstrakta (mL)

m_{uz} – masa uzorka (g)

$w_{s.t.}$ – udio suhe tvari u uzorku (%)

4.9. Utjecaj procesnih uvjeta ekstrakcije na ekstraktibilnost šećera iz svježe kukuruzne silaže te određivanje optimalnih uvjeta ekstrakcije metodom odzivnih površina

Eksperimentalno je ispitan utjecaj četiri procesna uvjeta (faktora) ekstrakcije u tri razine (temperatura (27 – 47 °C), omjer kruto-tekuće (15 – 25 mL/g), broja okretaja tresilice (100 - 200 rpm), vrijeme ekstrakcije (30 – 90 min)) te njihove interakcije na ekstraktibilnost šećera iz svježe kukuruzne silaže.

Tablica 3. Srednje vrijednosti masenih udjela šećera glukoze, fruktoze, maltoze i saharoze u ekstraktima svježe kukuruzne silaže dobivenim pri ispitivanju različitih procesnih uvjeta ekstrakcije prema Box-Behnkenovom dizajnu (eksperimentalna matrica)

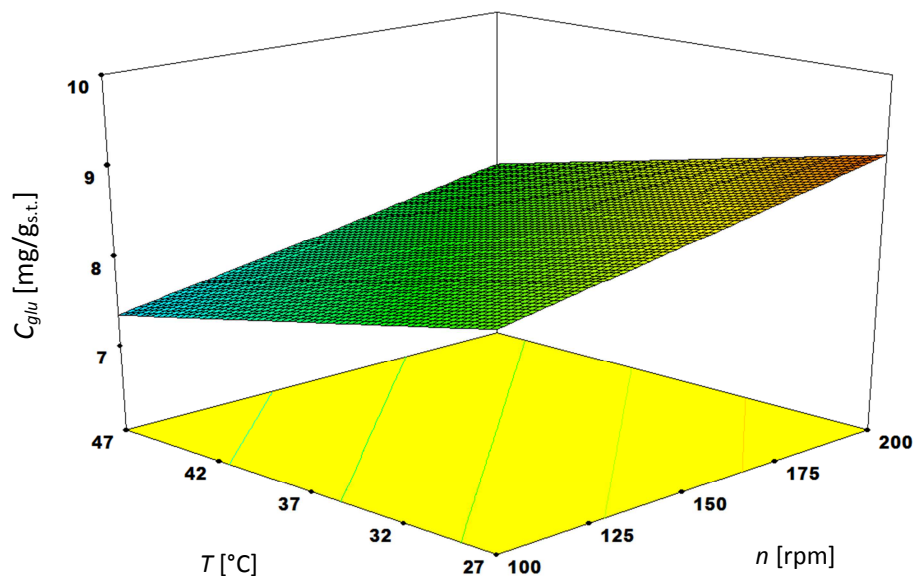
r.br.	Faktor X_1	Faktor X_2	Faktor X_3	Faktor X_4	Odaziv 1	Odaziv 2	Odaziv 3	Odaziv 4
	t [min]	L/S [mL/g]	n [rpm]	T [°C]	$C_{glukoza}$	$C_{fruktoza}$	$C_{maltoza}$	$C_{saharaza}$
					[mg/g _{s.t.}]			
1	60	15	200	37	8,94	10,66	0,41	1,84
2	90	15	150	37	8,33	14,62	0,32	2,71
3	60	25	100	37	8,38	10,75	0,57	0,65
4	30	20	200	37	8,93	9,87	0,51	1,94
5	60	15	100	37	6,99	12,15	0,44	1,35
6	60	20	150	37	8,28	14,45	0,55	2,66
7	30	20	150	27	8,33	14,39	0,22	2,72
8	30	20	100	37	8,56	10,70	0,63	3,20
9	60	20	200	47	7,61	9,81	0,13	3,82
10	60	20	200	27	7,84	9,67	0,44	3,59
11	90	25	150	37	7,82	13,97	0,08	2,40
12	30	20	150	47	6,99	12,27	0,46	1,31
13	60	15	150	47	6,87	12,65	0,54	2,18
14	30	25	150	37	7,99	14,14	0,09	2,38
15	60	20	150	37	7,95	13,80	0,28	2,50
16	60	20	100	27	7,75	9,45	0,31	3,64
17	60	25	150	27	8,80	14,89	0,32	2,53
18	30	15	150	37	8,29	14,69	0,06	2,30
19	90	20	150	27	8,22	14,43	0,37	2,41
20	90	20	100	37	7,41	12,34	0,31	1,33
21	60	25	200	37	8,98	14,74	0,30	1,99
22	60	20	150	37	7,97	14,05	0,20	2,53
23	90	20	150	47	6,86	12,23	0,12	0,33
24	60	20	100	47	7,70	9,21	0,12	3,62
25	60	15	150	27	8,23	14,49	0,40	2,63
26	60	25	150	47	7,27	11,84	0,09	1,27
27	90	20	200	37	9,37	15,47	0,87	2,28

t – vrijeme ekstrakcije (min), L/S – omjer kruto-tekuće (mL/g),
 n – broj okretaja tresilice (rpm), T – temperatura ekstrakcije (°C)

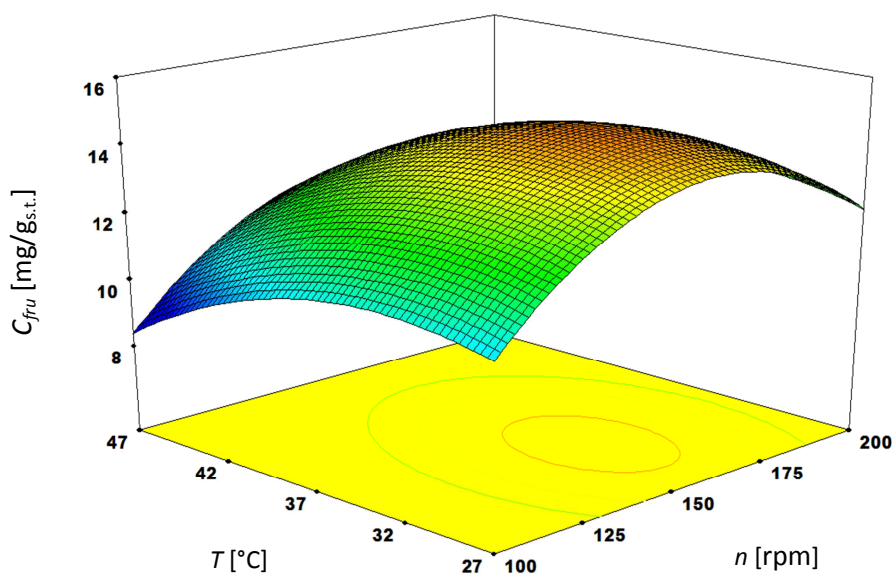
4.9.1. Modeliranje procesa ekstrakcije šećera

Tablica 4. Regresijski koeficijenti za statističke značajne članove modela ($p < 0,05$), koeficijent korelacije (R), p vrijednost za nedostatak modela (kvadratnog polinoma ili linearnog modela) korištenog za aproksimaciju eksperimentalnih vrijednosti udjela glukoze i fruktoze u ekstraktima kukuruzne silaže

Koeficijenti	Glukoza	Fruktoza
β_0	8,02	14,10
β_1 - vrijeme	-	-
β_2 - omjer kruto-tekuće	-	-
β_3 - broj okretaja	0,41	-
β_4 - temperatura ekstrakcije	-0,49	-0,78
$\beta_1\beta_2$	-	-
$\beta_1\beta_3$	-	-
$\beta_1\beta_4$	-	-
$\beta_2\beta_3$	-	1,37
$\beta_2\beta_4$	-	-
$\beta_3\beta_4$	-	-
β_1^2	-	-
β_2^2	-	-
β_3^2	-	-2,68
β_4^2	-	-1,36
R	0,66	0,91
p -vrijednost za nedostatak modela	0,098	0,056



Slika 15. Trodimenzionalni dijagram odzivne površine za udio šećera glukoze (C_{glu}) u ekstraktima kukuruzne silaže u ovisnosti o broju okretaja tresilice (n) i temperaturi ekstrakcije (T) pri konstantnom vremenu ekstrakcije (30 min) i konstantnom omjeru kruto teku tekuće (25 mL/g)



Slika 16. Trodimenzionalni dijagram odzivne površine za udio šećera fruktoze (C_{fru}) u ekstraktima kukuruzne silaže u ovisnosti o broju okretaja tresilice (n) i temperaturi ekstrakcije (T) pri konstantnom vremenu ekstrakcije (30 min) i konstantnom omjeru kruto-tekuće (25 mL/g)

4.9.2. Optimiranje procesa ekstrakcije

Aproksimacijom dobivenih eksperimentalnih podataka matematičkim modelom prema jednažbi (6) dobivena je odzivna funkcija odnosno funkcionalna ovisnost masene koncentracije šećera glukoze (linearni model) i fruktoze (kvadratni model) o ispitivanim procesnim uvjetima i o njihovoj interakciji kako slijedi:

$$Y_{glu} = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 = 8,02 + 0,41 X_3 - 0,49 X_4 \quad (18)$$

$$\begin{aligned} Y_{fru} = & \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_1^2 X_1^2 + \beta_2^2 X_2^2 + \beta_3^2 X_3^2 + \beta_4^2 X_4^2 + \beta_1 \beta_2 X_1 X_2 \\ & + \beta_1 \beta_3 X_1 X_3 + \beta_1 \beta_4 X_1 X_4 + \beta_2 \beta_3 X_2 X_3 + \beta_2 \beta_4 X_2 X_4 + \beta_3 \beta_4 X_3 X_4 \\ = & 14,10 - 0,78 X_4 - 2,68 X_3^2 - 1,36 X_4^2 + 1,37 X_2 X_3 \end{aligned} \quad (19)$$

Provjera uspješnosti optimiranja ekstrakcije

Nakon određenih optimalnih uvjeta ekstrakcije šećera iz svježe kukuruzne silaže metodom odzivnih površina ($t = 30$ min; omjer $L/S = 25$ mL/g; $n = 170$ rpm i $T = 30$ °C), provedena je ponovno ekstrakcija šećera pri utvrđenim optimalnim uvjetima radi provjere uspješnosti optimiranja ekstrakcije a rezultati su prikazani u **Tablici 5**.

Tablica 5. Provjera uspješnosti optimiranja ekstrakcije metodom odzivnih površina usporedbom eksperimentalno dobivenih podataka s modelom predviđenim vrijednostima nakon provedene ekstrakcije prema definiranim optimalnim uvjetima

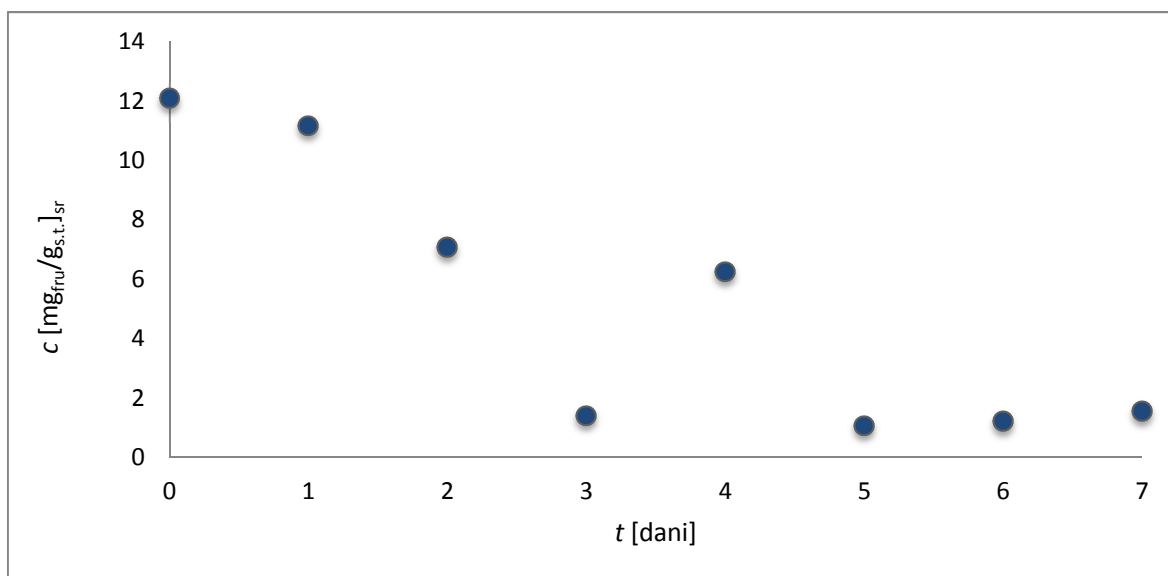
MASENI UDIO ŠEĆERA			
Eksperimentalno određeno		Modelom predviđeno	
Glukoza	Fruktoza	Glukoza	Fruktoza
$C_{glu} = 8,28$ mg/g _{s.t.}	$C_{fru} = 12,09$ mg/g _{s.t.}	$C_{glu} = 8,75$ mg/g _{s.t.}	$C_{fru} = 14,38$ mg/g _{s.t.}

4.10. Maseni udio pojedinačnih šećera u ekstraktima biološki obrađene kukuruzne silaže

U ovom poglavlju prikazane su srednje vrijednosti koncentracija pojedinačnih šećera (fruktoza, glukoza, saharoza, maltoza i maltotrioza) u ekstraktima dobivenih nakon provedene kruto-tekuće ekstrakcije šećera, pri utvrđenim optimalnim uvjetima, iz biološki obrađene kukuruzne silaže uz pomoć gljive bijelog truljenja *Trametes versicolor* u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima.

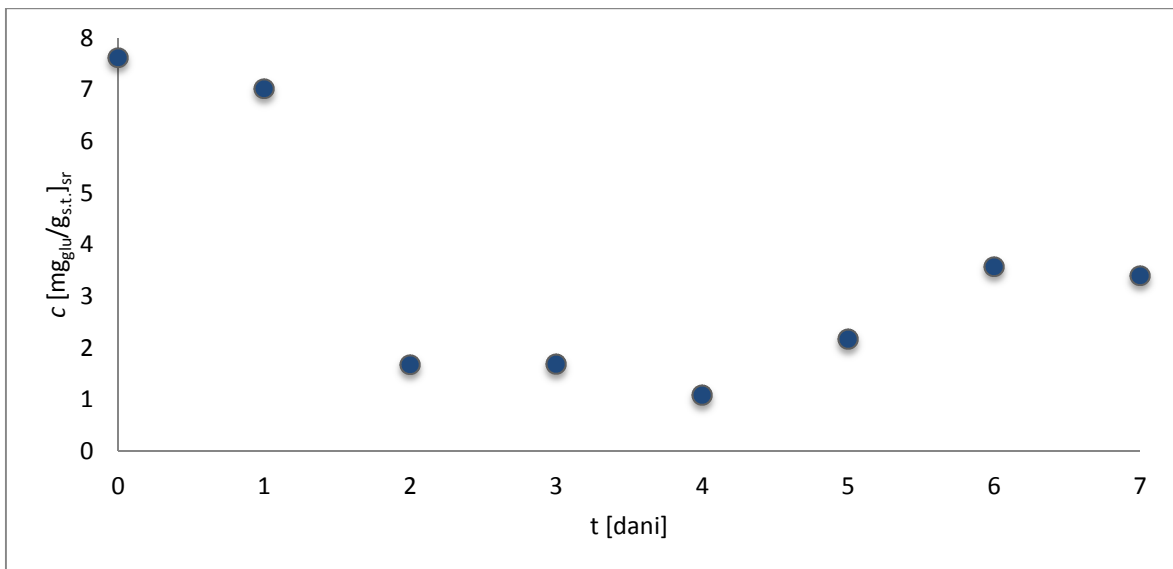
Biološka obrada kukuruzne silaže provedena je tijekom sedam dana fermentacije. Prvo uzorkovanje je provedeno osam sati nakon od nacjepljivanja te svaki dan u 08:00 h i 18:00 h u dvije paralele.

4.10.1. Maseni udio fruktoze



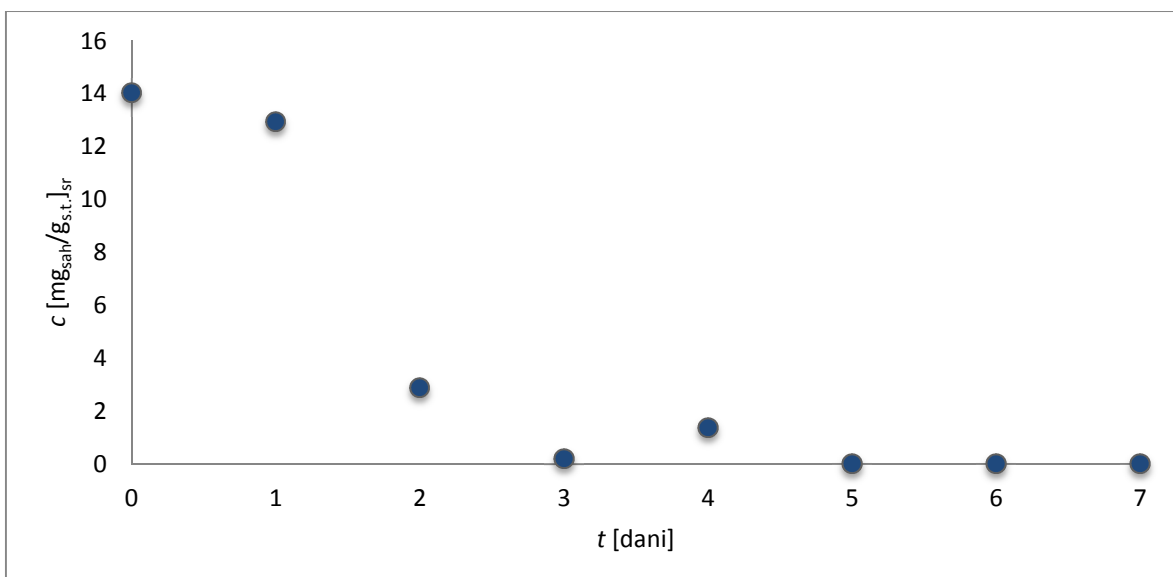
Slika 17. Srednje vrijednosti masenog udjela fruktoze ($\text{mg}_{\text{fru}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$) u ekstraktima biološki obrađene kukuruzne silaže u ovisnosti o vremenu fermentacije (t)

4.10.2. Maseni udio glukoze



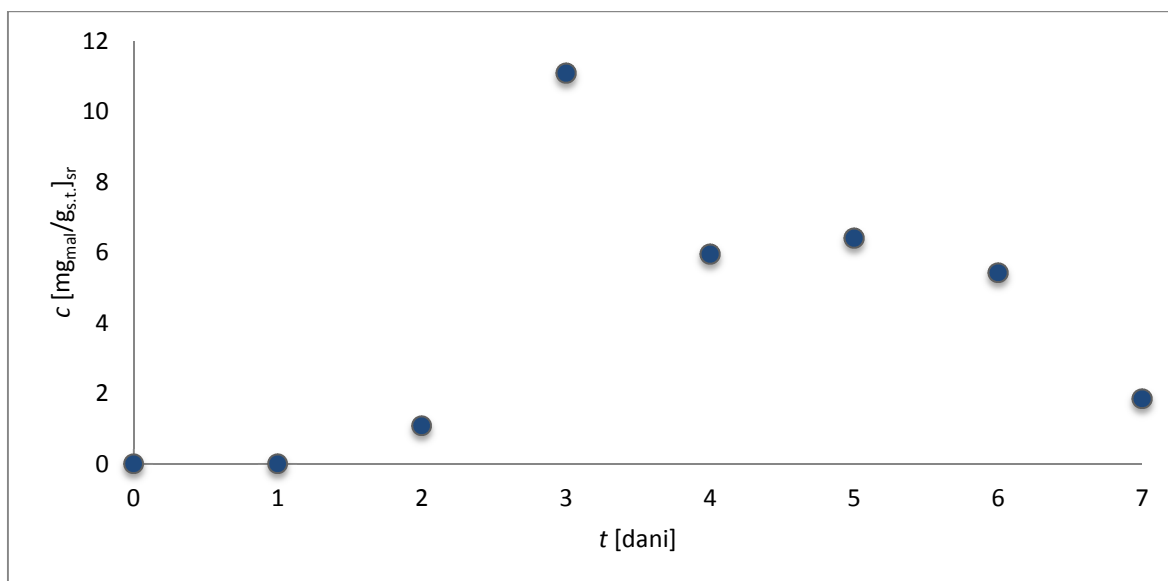
Slika 18. Srednje vrijednosti masenog udjela glukoze ($\text{mg}_{\text{glu}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$) u ekstraktima biološki obrađene kukuruzne silaže u ovisnosti o vremenu fermentacije (t)

4.10.3. Maseni udio saharoze



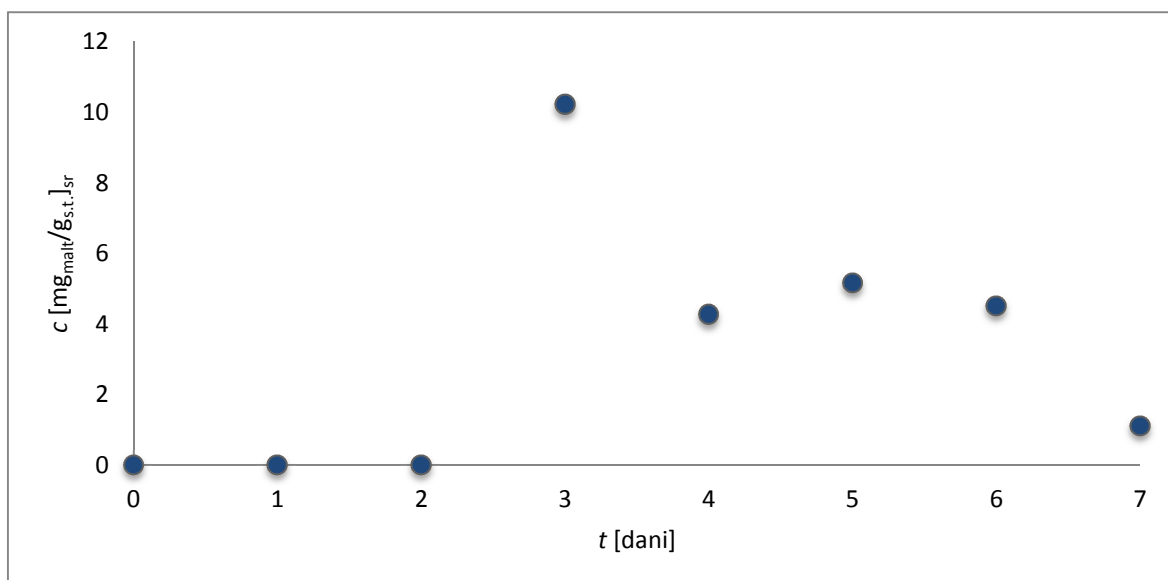
Slika 19. Srednje vrijednosti masenog udjela saharoze ($\text{mg}_{\text{sah}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$) u ekstraktima biološki obrađene kukuruzne silaže u ovisnosti o vremenu fermentacije (t)

4.10.4. Maseni udio maltoze



Slika 20. Srednje vrijednosti masenog udjela maltoze ($\text{mg}_{\text{mal}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$) u ekstraktima biološki obrađene kukuruzne silaže u ovisnosti o vremenu fermentacije (t)

4.10.5. Maseni udio maltotrioze



Slika 21. Srednje vrijednosti masenog udjela maltotrioze ($\text{mg}_{\text{malt}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$) u ekstraktima biološki obrađene kukuruzne silaže u ovisnosti o vremenu fermentacije (t)

5. RASPRAVA

Optimiranje procesa podrazumijeva definiranje optimalnih procesnih uvjeta uzimajući u obzir sve prednosti procesa, uz što manji broj eksperimenata koje je potrebno provesti kako bih se definirali statistički značajni faktori, što manju potrošnju bilo sirovina ili kemikalija te uz što manje uloženog rada i vremena. Optimiranje određenog procesa najčešće zahtjeva ispitivanje nekoliko faktora koji značajno utječu na sam proces kao i na međusobnu interakciju pojedinih faktora. Kako bih se odredili optimalni procesni uvjeti potrebno je definirati odgovarajući matematički model pomoću određenog kompleksnog eksperimentalnog dizajna kao što su Doehlert matrix, centralni kompozitni dizajn ili Box-Behnken dizajn. (Ferreira i sur., 2007).

Ekstrakcija predstavlja ključan korak u procesu izolacije i identifikacije pojedinih aktivnih spojeva. Osim odabira optimalnog procesa ekstrakcije, bitno je odrediti te definirati optimalne procesne uvjete ekstrakcije. Mnogi autori su definirali kinetički model za ekstrakciju pojedinih aktivnih spojeva kao što su polifenoli (Bucić-Kojić i sur., 2007) i tanini (Simeonov i sur., 1999).

U ovom radu ispitan je utjecaj uvjeta kruto-tekuće ekstrakcije na ekstraktibilnost šećera iz kukuruzne silaže. Plan pokusa kao i statistička obrada dobivenih podataka te određivanje optimalnih uvjeta u ispitivanom procesu provedeni su pomoću programskog paketa Design - Expert 9.0.5., a korištena je Box-Behnken metoda odzivnih površina. Svi eksperimentalno određeni i izračunati podaci prema primijenjenom matematičkom modelu prikazani su u tablicama i dijagramima.

Prvi dio eksperimentalnog rada odnosio se na ispitivanje utjecaja četiri procesna uvjeta ekstrakcije u tri razine (temperatura (27 – 47 °C), omjer kruto-tekuće (15 – 25 mL/g), broj okretaja tresilice (100 – 200 rpm), vrijeme ekstrakcije (30 – 90 min)) na ekstraktibilnost šećera (fruktoza, glukoza, saharoza, maltoza) u ekstraktima svježe kukuruzne silaže (**Tablica 1**). Primjenom programskog paketa Design Expert 9.0.5. definiran je Box-Behnkenov plan pokusa (eksperimentalna matrica) (**Tablica 2**).

Prema Box-Behnkenovom planu pokusa provedeno je 27 eksperimenata s tri ponavljanja u centralnoj točki ispitivanog eksperimentalnog područja, u dvije paralelne probe. Nakon provedenih ekstrakcija, koncentracija pojedinačnih šećera u ekstraktima svježe kukuruzne silaže određena je HPLC metodom. Kalibracijske krivulje (**Slike 10 – 14**) za izračunavanje pojedinačnih šećera dobivene su iz vrijednosti koncentracija standardne otopine šećera i

površina ispod pikova na dobivenom kromatogramu. Iz tako izrađenih kalibracijskih krivulja dobivene su regresijske jednadžbe za fruktozu (jednadžbe 7 i 8), glukozu (jednadžbe 9 i 10), saharozu (jednadžbe 11 i 12), maltozu (jednadžbe 13 i 14), te za maltotriozu (jednadžbe 15 i 16) na temelju kojih je izračunata masena koncentracija pojedinih šećera. Na temelju masenih koncentracija šećera izračunat je maseni udio pojedinačnih šećera u ekstraktima svježe kukuruzne silaže prema jednadžbi (17), čije su srednje vrijednosti prikazane u **Tablici 3**. Maseni udio fruktoze kretao se u rasponu od 9,21 do 15,47 mg/g_{s.t.}, glukoze od 6,86 do 9,37 mg/g_{s.t.}, saharoze od 0,33 do 3,82 mg/g_{s.t.} te maltoze od 0,06 do 0,87 mg/g_{s.t.}.

Kako bi se procijenio utjecaj nezavisnih varijabli ekstrakcije i njihove interakcije (temperatura, omjer kruto-tekuće, broj okretaja i vrijeme ekstrakcije) na zavisnu varijablu (ekstraktibilnost šećera) te provjerila uspješnost optimiranja procesa ekstrakcije šećera iz svježe kukuruzne silaže, provedena je aproksimacija eksperimentalnih podataka matematičkim modelom tj. polinomom drugog reda prema jednadžbi (6) koja se sastoji od linearnog i kvadratnog člana te člana koji predstavlja interakciju ispitivanih varijabli. Prema tome model može biti linearan, kvadratni ili srednja vrijednost ukoliko nema značajnog utjecaja istraživanih faktora.

Statistička analiza prikladnosti aproksimacije eksperimentalnih podataka ekstraktibilnosti šećera u ekstraktima svježe silaže prikazana je u **Tablici 4** za glukozu i fruktozu. Najprihvatljiviji model određen je na temelju maksimalne vrijednosti koeficijenta korelacije (R), koji je pokazatelj slaganja eksperimentalnih i modelom predviđenih podataka i u idealnom slučaju iznosi 1. Za proces ekstrakcije glukoze u ispitivanim uvjetima najprihvatljiviji se pokazao linearni model ($R > 0,66$) prikazan jednadžbom (18), a za fruktozu najbolje je opisivao kvadratni model ($R > 0,91$) prikazan jednadžbom (19). Nadalje, iz tablice se mogu očitati regresijski koeficijenti za statistički značajne članove modela. Prema tome, temperatura ekstrakcije i broj okretaja tresilice imali su najveći utjecaj na ekstrakciju glukoze i fruktoze što je potvrđeno statističkim značajnim ($p < 0,05$) članovima dok vrijeme ekstrakcije i omjer kruto-tekuće nisu imali statistički značajni utjecaj na proces ekstrakcije navedenih šećera.

Utjecaj statistički značajnih članova na ekstraktibilnost glukoze i fruktoze te njihova međusobna interakcija vizualno je opisana 3D grafovima. **Slika 15** predstavlja dijagram odzivne površine za maseni udio šećera glukoze u ekstraktima svježe kukuruzne silaže. Iz

dijagrama je vidljivo da linearnim porastom temperature ekstrakcije i broja okretaja tresilice uz konstantno vrijeme i omjer kruto-tekuće dolazi do linearnog porasta udjela glukoze.

Iz dijagrama odzivne površine za kvadratni model koji je dobro opisivao proces ekstrakcije fruktoze pri eksperimentalnim uvjetima (**Slika 16**) može se vidjeti da porastom temperature ekstrakcije i broja okretaja tresilice uz konstantno vrijeme i omjer kruto-tekuće dolazi do povećanja prinosa fruktoze sve do određene maksimalne vrijednosti. Nakon toga, daljnjim povećanjem statistički značajnih faktora dolazi do smanjenja masenog udjela fruktoze.

Za opisivanje procesa ekstrakcije saharoze i maltoze, metoda odzivnih površina nije se pokazala prihvatljivom.

Numeričkom optimizacijom pomoću programa Design Expert 9.0.5. te prema jednadžbama (18 i 19) dobivenih metodom odzivne površine izračunato je da su optimalni uvjeti ekstrakcije za ispitivano eksperimentalno područje šećera iz svježe kukuruzne silaže: $t = 30$ min; omjer $L/S = 25$ mL/g; $n = 170$ rpm i $T = 30$ °C.

Prema izračunatim optimalnim uvjetima ekstrakcije provedena je ekstrakcija pri određenim optimalnim uvjetima radi provjere uspješnosti modeliranja i optimiranja procesa ekstrakcije šećera. Eksperimentalni rezultati dobiveni pri navedenim optimalnim uvjetima ekstrakcije pokazali su dobra slaganja s podacima predviđenim modelom što je prikazano u **Tablici 5**.

U drugom dijelu eksperimentalnog rada provedena je kruto-tekuća ekstrakcija šećera, pri utvrđenim optimalnim uvjetima, iz biološki obrađene kukuruzne silaže uz pomoć gljive bijelog truljenja *Trametes versicolor* u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima. Kukuruzna silaža je biološki ligno-celulozni materijal čije su osnovne građevne jedinice: lignin, celuloza i hemiceluloza. Celuloza je glavni građevni polisaharid biljaka sastavljena od D-glukoznih monosaharidnih jedinica koje su međusobno povezane β -1,4-glikozidnim vezama. Hemiceluloza je heteropolisaharid čije su građevne jedinice različiti monosaharidi (glukoza, manoz, galaktoza, ksiloza, riboza) (Koyani i Rajput, 2015).

Veliki broj istraživanja su pokazala da gljive bijelog truljenja imaju sposobnost razgradnje materijala s velikim udjelom lignina djelovanjem izvanstaničnih enzima, produkcijom metabolita niske molekularne mase uz prisutnost oksidirajućih tvari (activated oxygen species) (Daâssi i sur., 2016).

U ovom radu ispitana je promjena masene koncentracije pojedinačnih šećera (fruktoza, glukoza, saharoza, maltoza i maltotrioza) (**Slike 17 – 21**) tijekom SSF u trajanju od 7 dana.

Na početku SSF inokulum se miješa sa supstratom koji sadrži uglavnom krute čestice škroba, celuloze, minerala i drugih mikro i makro nutrijenata. Suspenzija spora i micelija mikroorganizma u početku se nalazi na vanjskoj površini supstrata, polako se razmnožavaju te prodiru u makro- i mikropore supstrata. Dolazi do razgradnje dostupnih energetskih izvora iz škrobnih hidrolizata (jednostavni šećeri) (Raghava Rao i sur., 1993).

Prvo uzorkovanje provedeno je nakon 8 sati od naciepljivanja sterilizirane kukuruzne silaže, te nakon provedene ekstrakcije pri definiranim optimalnim uvjetima, provedena je HPLC analiza pojedinačnih šećera. Maseni udio fruktoze je iznosio 12,09 mg/g_{s.t.} (**Slika 17**), glukoze 7,61 mg/g_{s.t.} (**Slika 18**) i saharoze 14,03 mg/g_{s.t.} (**Slika 19**) (jednostavni šećeri). Maseni udio maltoze (**Slika 20**) i maltotrioze (**Slika 21**) nije bilo moguće izmjeriti. Tijekom prva tri dana fermentacije došlo je do potrošnje jednostavnih šećera.

Nakon potrošnje jednostavnih šećera dolazi do sekrecije enzima koji razgrađuju škrob i celulozu na jednostavnije ugljikohidrate koje mikroorganizam koristi za priskrbivanje energijom. Tijekom rasta mikroorganizama dolazi do balansirane razgradnje složenijih ugljikohidrata što je bitno za optimalnu aktivnost mikroorganizama. Velika enzimska razgradnja polisaharida bi utjecala na zaustavljanje aktivnosti mikroorganizama (inhibicija enzima supstratom) (Raghava Rao i sur., 1993). Nakon što je provedeno uzorkovanje biološki obrađene kukuruzne silaže u trajanju od tri dana, vidljivo je da se koncentracija jednostavnih šećera smanjila, odnosno maseni udio fruktoze je iznosio 1,93 mg/g_{s.t.}, glukoze 1,68 mg/g_{s.t.} i saharoze 0,19 mg/g_{s.t.} Djelovanjem ekstracelularnih enzima gljive bijelog truljenja došlo je do razgradnje polisaharida te je došlo i do porasta koncentracije složenijih šećera. Maseni udio maltoze je iznosio 11,08 mg/g_{s.t.} i maltotrioze 10,22 mg/g_{s.t.}

Tijekom petog, šestog i sedmog dana fermentacije došlo je do potpune razgradnje saharoze, te je maseni udio fruktoze na kraju procesa fermentacije iznosio 1,54 mg/g_{s.t.}, dok se maseni udio glukoze povećao na 3,39 mg/g_{s.t.}. Budući da su ranija ispitivanja pokazala da *T. versicolor* nema sposobnost razgradnje celuloze možemo pretpostaviti da je do povećanja masenog udjela glukoze došlo zbog razgradnje hemiceluloze, heteropolisaharida građen od jednostavnijih monosaharidnih jedinica (glukoza, manosa, galaktoza, riboza, ksiloza) (Planinić i sur., 2016).

Osim za razgradnju ili biološku predobradu materijala, SSF se sve više primjenjuje za komercijalnu proizvodnju određenih visoko-vrijednih produkata kao što su enzimi (polifenol oksidaza, mangan peroksidaza, pektinaza, amilaza), različiti organski spojevi (oksalna kiselina, glukonska kiselina, ferulična kiselina, vanilin, tvari arome – esteri, prirodni pigmenti) te mnogi drugi bioaktivni metaboliti. (Koyani i Rajput, 2015).

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobivenih eksperimentalnih podataka te statističke obrade istih doneseni su sljedeći zaključci:

- ✓ Maseni udio ekstrahiranih šećera iz svježe kukuruzne silaže kretao se u rasponu od 9,21 do 15,47 mg/g_{s.t.} za fruktozu, od 6,86 do 9,37 mg/g_{s.t.} glukozu, od 0,33 do 3,82 mg/g_{s.t.} saharozu, te maltozu od 0,06 do 0,87 mg/g_{s.t.}
- ✓ Proces ekstrakcije fruktoze u ispitivanim uvjetima najbolje je opisivao kvadratni model ($R > 0,91$), a za glukozu najprihvatljiviji se pokazao linearni model ($R > 0,66$).
- ✓ Za opisivanje procesa ekstrakcije saharoze i maltoze metoda odzivnih površina nije se pokazala prihvatljivom.
- ✓ Temperatura ekstrakcije i broj okretaja tresilice imali su najveći utjecaj na ekstrakciju glukoze i fruktoze što je potvrđeno statistički značajnim ($p < 0,05$) članovima (linearnim za glukozu te linearnim i kvadratnim za fruktozu).
- ✓ Metodom odzivnih površina utvrđeno je da vrijeme ekstrakcije te omjer kruto-tekuće kao i njihova interakcija nisu imali statistički značajni utjecaj na ekstraktibilnost glukoze i fruktoze.
- ✓ Određeni optimalni uvjeti ekstrakcije metodom odzivnih površina su $t = 30$ min; omjer $L/S = 25$ mL/g; $n = 170$ rpm i $T = 30$ °C.
- ✓ Eksperimentalni rezultati dobiveni pri navedenim optimalnim uvjetima ($C_{glu} = 8,28$ mg/g_{s.t.}; $C_{fru} = 12,09$ mg/g_{s.t.}) ekstrakcije pokazali su dobra slaganja s podacima predviđenim modelom ($C_{glu} = 8,75$ mg/g_{s.t.}; $C_{fru} = 14,38$ mg/g_{s.t.}).
- ✓ Promjena masenog udjela pojedinačnih šećera u ekstraktima biološki obrađene kukuruzne silaže ispitana je nakon provedene ekstrakcije prema prethodno utvrđenim optimalnim uvjetima ekstrakcije. Nakon osam sati inkubacije maseni udio fruktoze je iznosio 12,09 mg/g_{s.t.}, glukoze 7,61 mg/g_{s.t.} i saharoze 14,03 mg/g_{s.t.}. Masene udjele maltoze i maltotrioze nije bio moguće odrediti.
- ✓ Nakon trećeg dana inkubacije maseni udio fruktoze je iznosio 1,93 mg/g_{s.t.}, glukoze 1,68 mg/g_{s.t.}, saharoze 0,19 mg/g_{s.t.}, maltoze 11,08 mg/g_{s.t.} i maltotrioze 10,22 mg/g_{s.t.}. Prema tome možemo zaključiti da gljive bijelog truljenja (*Trametes versicolor*) imaju veliku sposobnost razgradnje biološkog materijala sekrecijom izvanstaničnih enzima fermentacijom u uvjetima na čvrstim nosačima.

7. LITERATURA

- Alcázar-Alay SC, Cardenas-Toro FP, Santos DT, Meireles MAA: Study of an Extraction Process as the Pretreatment Step for Sugar Production from Acid Hydrolysis. *Food and Public Health* 5(2): 47-55, 2015
- Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, Villar LS, Escaliera LA: Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* 76:965-977, 2008.
- Bradley N: *The response surface methodology; master of science in applied mathematics & computer science*. Department of Mathematical Sciences Indiana University of South Bend, 2007
- Bucić-Kojić A, Planinić M, Tomas S, Bilić M, Velić D: Study of solid–liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering* 81:236–242, 2007
- Bucić-Kojić A: Utjecaj procesnih uvjeta i načina kruto-tekuće ekstrakcije na ekstraktibilnost fenolnih tvari iz sjemenki grožđa. *Doktorski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2008
- Chalermchat Y, Fincan M, Dejmek P: Pulsed electric field treatment for solid-liquid extraction of red beetroot pigment: mathematical modelling of mass transfer. *Journal of Food Engineering* 64:229-236, 2004.
- Couto SR, Sanromán MA: Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochemical Engineering Journal* 22:211–219, 2005
- Couto SR, Sanromán MA: Application of solid-state fermentation to food industry—A review. *Journal of Food Engineering* 76:291–302, 2006
- Daâssi D, Zouari-Mechichi H, Belbahri L, Barriuso J, Martínez MJ, Mechichi MNT: Phylogenetic and metabolic diversity of Tunisian forest wood-degrading fungi: a wealth of novelties and opportunities for biotechnology. *3 Biotech* 6(1):46, 2016
- Ferreira SLC, Bruns RE, Ferreira HS, Matos GD, David JM, Brandão GC, Da Silva EGP, Portugal LA, Dos Reis PS, Souza AS, Dos Santos WNL: Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta* 597:179-186, 2007
- Floros JD, Rattray J, Liang H: *Mass transfer and diffusion in foods*. U Wiley Encyclopedia of Food Science and Technology. John Wiley and Sons, Inc., New York, 1999.
- Gamse T: *Extraction Department of Chemical Engineering and Environmental Technology*. Graz University of Technology, 2006
- Hadda M, Djamel C, Akila O: Screening of Extracellular Enzyme Activities of Ganoderma and Fomes Species Collected from North East Algeria. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* Page No. 1455, 2015
- Koyani RD, Rajput KS: Solid State Fermentation: Comprehensive Tool for Utilization of Lignocellulosic through Biotechnology. *Bioprocess Biotech* 5:10, 2015

- Liyana-Pathirana C i Shahidi F: Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chemistry* 93:47–56, 2005.
- Mujić I: *Ekstrakcija i ekstraktori biljnih materijala*. Biotehnički fakultet, Bihać, 2006
- Nollet ML, Toldrá L: *Food Analysis by HPLC Third Edition*. CRC Press Taylor & Francis Group, 2013
- Planinić M, Bucić A, Tomas S, Bilić M, Velić D, Koceva Komlenić D: Fast moisture determination methods in flour samples. *Proceedings of International Congress Flour-Bread'03 and 6. Croatian Congress of Cereal Technologists*, str. 102-108. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2004.
- Planinić M, Zelić B, Čubel I, Bucić-Kojić A, Tišma M: Corn forage biological pretreatment by *Trametes versicolor* in a tray bioreactor. *Waste Management & Research*, 34(8):802-809, 2016
- Raghava Rao KSMS, Gowthaman MK, Ghildyal NP, Karanth NG: A mathematical model for solid state fermentation in tray bioreactors. *Bioprocess Engineering* 8:255-262, 1993
- Simeonov E, Tsibranska I, Minchev A: Solid-liquid extraction from plants – experimental kinetics and modelling. *Chemical Engineering Journal* 73:255-259, 1999
- Sindhu R, Binod P, Pandey A: Biological pretreatment of lignocellulosic biomass – An overview. *Bioresource Technology* 199:76-82, 2016
- Veljković VB, Milenović DM: *Analiza ekstrakcije rezionida kantariona (Hypericum perforatum L.)*. Kemija u industriji 56:60-67, 2002.
- Viikari L, Vehmaanperä J, Koivula A: Lignocellulosic ethanol: From science to industry. *Biomass and bioenergy* 46:13-24, 2012