Primjena komine jabuke i šljive za proizvodnju polihidroksialkanoata fermentacijom na čvrstom nosaču

https://doi.org/10.15255/KUI.2026.033
KUI-47/2026
Izvorni znanstveni rad
Prispjelo 15. lipnja 2026.
Prihvaćeno 26. srpnja 2026.

L. Jaklenec,[a] *K. Grgurević*,[a] *A. Rakas*,[a] *D. Bramberger*,[a] *L. Furač*,[a] *M. Cvetnić*,[a] *S. Jokić*,[b] *K. Aladić*,[b] *I. Strelec*,[b] *J. Ranilović*[c] i *D. Kučić Grgić*[a*]

[a] Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Trg Marka Marulića 19, 10 000 Zagreb

[b] Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Franje Kuhača 18, 31 000 Osijek

[c] Podravka d. d., Ul. Ante Starčevića 32, 48 000 Koprivnica

Ovo djelo je dano na korištenje pod Creative Commons Attribution 4.0 International License

Sažetak

U ovom radu ispitana je mogućnost primjene komine jabuke i šljive kao supstrata za proizvodnju polihidroksialkanoata (PHA) fermentacijom na čvrstom nosaču (SSF). Otpadna komina najprije je podvrgnuta fizikalno-kemijskoj i mikrobiološkoj karakterizaciji, nakon čega je komina od jabuke odabrana kao pogodniji supstrat za daljnja istraživanja. U procesu fermentacije upotrijebljeni su bakterijski soj *Cupriavidus necator* i mješovita mikrobna kultura, pri čemu su tijekom fermentacije praćene promjene fizikalno-kemijskih i mikrobioloških svojstava sustava. Nakon fermentacije provedena je SoxRoc ekstrakcija PHA iz biomase stanica, dok su identifikacija i kvantifikacija proizvedenih PHA provedene metodom plinske kromatografije uz spektrometriju masa (GC-MS). GC-MS analizom utvrđene su najveće vrijednosti akumulacije PHA od 3,45 % za sterilizirani i 3,57 % za nesterilizirani sustav. Dobiveni rezultati potvrđuju da je komina od jabuke perspektivan supstrat za proizvodnju PHA SSF-om. Međutim, za postizanje većih prinosa potrebno je dodatno optimirati uvjete procesa i postupke predobrade komine.

Ključne riječi

Polihidroksialkanoat (PHA), komina jabuke, komina šljive, SSF, Cupriavidus necator, Soxhlet ekstrakcija, GC-MS

1. Uvod

Konvencionalni sintetski polimeri proizvedeni iz fosilnih sirovina među najzastupljenijim su materijalima u suvremenom društvu te imaju ključnu ulogu u brojnim industrijskim sektorima. Njihova široka primjena rezultat je povoljnih mehaničkih svojstava, kemijske stabilnosti, jednostavne prerade i relativno niskih troškova proizvodnje.[1] Zbog toga se upotrebljavaju u proizvodnji ambalaže, građevinskih materijala, medicinske opreme, tekstila, elektroničkih uređaja i brojnih drugih proizvoda. Međutim, većina konvencionalnih polimera pokazuje izrazito slabu biorazgradivost, što rezultira njihovom dugotrajnom akumulacijom u okolišu.[2] Posljedice uključuju onečišćenje tla, voda i zraka te stvaranje mikroplastike koja je potencijalna prijetnja ekosustavima i zdravlju živih organizama. Zbog rastuće zabrinutosti za okoliš i potrebe za razvojem održivijih tehnologija posljednjih se desetljeća intenzivno istražuju alternativni materijali koji bi mogli djelomično ili u potpunosti zamijeniti konvencionalnu plastiku. U tom se kontekstu posebno ističu biopolimeri dobiveni iz obnovljivih izvora sirovina.[3–5]

Među najznačajnijim skupinama biopolimera nalaze se polihidroksialkanoati (PHA), prirodni poliesteri koje sintetiziraju različiti mikroorganizmi kao unutarstanične pričuvne tvari ugljika i energije.[6] PHA se akumuliraju u obliku intracelularnih granula te se najčešće sintetiziraju u uvjetima viška ugljika uz ograničenu dostupnost drugih esencijalnih nutrijenata, poput dušika, fosfora ili magnezija.[7] PHA karakteriziraju biorazgradivost, biokompatibilnost i termoplastična svojstva, zbog čega predstavljaju perspektivnu alternativu sintetskim polimerima dobivenim iz fosilnih sirovina.[8] Njihova fizikalna i mehanička svojstva ovise o sastavu monomernih jedinica i duljini polimernog lanca. Na temelju duljine lanca razlikuju se polihidroksialkanoati kratkog lanca (engl. *short-chain-length*, scl-PHA) i polihidroksialkanoati srednje duljine lanca (engl. *medium-chain-length*, mcl-PHA). scl-PHA odlikuju se većom kristalnošću, krutošću i višim talištem, dok mcl-PHA pokazuju veću elastičnost, manju kristalnost i niže talište.[9,10]

Među najistraživanijim predstavnicima PHA ističe se polihidroksibutirat (PHB) i njegov kopolimer poli(3-hidroksibutirat-co-3-hidroksivalerat) (PHBV), ponajprije zbog povoljnih me-

* Autor za dopisivanje: izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić
e-pošta: dkucic@fkit.unizg.hr

haničkih svojstava, biorazgradivosti i širokog spektra potencijalnih primjena. Zahvaljujući biokompatibilnosti i netoksičnosti, PHA se istražuju za primjenu u medicini, uključujući razvoj implantata, sustava za kontrolirano otpuštanje lijekova i materijala za tkivno inženjerstvo. Osim toga, njihova primjena istražuje se u proizvodnji ambalažnih materijala, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji te poljoprivredi.[11,12] Unatoč brojnim prednostima, njihova šira komercijalna primjena i dalje je ograničena visokim troškovima proizvodnje u usporedbi s konvencionalnim sintetskim polimerima.[13]

Sposobnost biosinteze PHA zabilježena je kod brojnih bakterija i arheja. Među najistraživanijim mikroorganizmima za industrijsku proizvodnju PHA ističe se bakterijski soj *C. necator* zbog visoke učinkovitosti akumulacije polimera i mogućnosti uporabe različitih izvora ugljika.[14] Taj gram-negativni mikroorganizam odlikuje se sposobnošću rasta u heterotrofnim i autotrofnim uvjetima te se može koristiti različitim organskim supstratima, ali i ugljikovim dioksidom kao izvorom ugljika.[15] Zbog navedenih karakteristika *C. necator* smatra se jednim od najperspektivnijih mikroorganizama za proizvodnju PHA u biotehnološkim procesima.

Visoki troškovi proizvodnje PHA predstavljaju jedno od glavnih ograničenja njihove šire industrijske primjene. Znatan udio ukupnih troškova odnosi se na izvor ugljika koji se upotrebljava tijekom fermentacijskog procesa. Stoga se posljednjih godina intenzivno istražuje mogućnost uporabe jeftinijih i održivijih sirovina, među kojima se posebno ističe agroindustrijski otpad.[16] Tijekom prerade voća, povrća, žitarica i drugih poljoprivrednih sirovina nastaju velike količine organskih ostataka koji se često nedovoljno iskorištavaju ili predstavljaju dodatni trošak zbrinjavanja. Zbog visokog udjela ugljikohidrata takvi ostaci predstavljaju potencijalno vrijedan izvor ugljika za mikrobnu biosintezu PHA. Njihova uporaba kao supstrata u biotehnološkim procesima omogućuje istodobnu valorizaciju otpada i smanjenje troškova proizvodnje, čime se doprinosi provedbi načela kružne ekonomije i održivog razvoja.[17]

Agroindustrijski otpad obuhvaća širok raspon nusproizvoda različitog kemijskog sastava. Dok se mnogi poljoprivredni ostaci, poput slame i drvne biomase, pretežito sastoje od lignocelulozne strukture (celuloza, hemiceluloza i lignin), voćni nusproizvodi, poput komine jabuke i šljive, sadrže značajne količine lako dostupnih topljivih šećera i pektina, uz određeni udio strukturnih polisaharida. Iako su zbog toga pogodniji za fermentacijske procese od tipične lignocelulozne biomase, odgovarajuća predobrada može dodatno povećati iskorištenje supstrata oslobađanjem fermentabilnih ugljikohidrata.[18] Cilj predobrade je povećanje dostupnosti jednostavnijih ugljikohidrata pogodnih za mikrobni rast i biosintezu PHA. U tu se svrhu primjenjuju fizikalne, kemijske i biološke metode predobrade.[18–24] Fizikalni postupci uključuju usitnjavanje i termičku obradu komine, dok se kemijske metode temelje na primjeni kiselina ili lužina radi djelomične razgradnje lignocelulozne strukture.[20,21] Biološke metode temelje se na primjeni mikroorganizama ili enzima te se smatraju okolišno prihvatljivijima zbog blažih procesnih uvjeta i manje potrošnje kemikalija.[22] Posebno se ističe enzimatska hidroliza, koja omogućuje učinkovitu razgradnju celuloze i hemiceluloze na jednostavnije šećere dostupne mikroorganizmima.[23,24] Dosadašnja istraživanja pokazala su da enzimatska hidroliza može omogućiti učinkovitiju konverziju lignoceluloze u jednostavnije ugljikohidrate (šećere) u usporedbi s pojedinim kemijskim metodama predobrade.[25]

Proizvodnja PHA najčešće se provodi submerznom fermentacijom (engl. *submerged fermentation*, SmF) ili fermentacijom na čvrstom nosaču (engl. *solid-state fermentation*, SSF). SmF podrazumijeva rast mikroorganizama u tekućem mediju, dok se kod SSF procesa mikroorganizmi razvijaju na površini krutog supstrata uz vrlo mali udio slobodne vode.[26] Posljednjih godina fermentacija na čvrstom nosaču (SSF) privlači značajnu pozornost zbog mogućnosti istodobne uporabe lignoceluloznog agroindustrijskog otpada kao izvora ugljika i čvrstog nosača za rast mikroorganizama, čime se doprinosi održivijem iskorištavanju otpadnih sirovina.[27] Prednosti tog pristupa uključuju manju potrošnju energije, smanjeno nastajanje otpadnih voda te mogućnost učinkovite valorizacije nusproizvoda prehrambene i poljoprivredne industrije. Međutim, uspješnost SSF procesa uvelike ovisi o karakteristikama supstrata i procesnim parametrima, uključujući temperaturu, pH vrijednost, sadržaj vlage, poroznost, veličinu čestica i dostupnost hranjivih tvari.[28–30]

Dosadašnja istraživanja potvrdila su mogućnost proizvodnje PHA primjenom različitih lignoceluloznih ostataka i agroindustrijskog otpada u SSF sustavima.[31,32] Među voćnim agroindustrijskim ostacima posebno se ističe komina jabuke i šljive koje nastaju u znatnim količinama tijekom prerade voća te sadrže visok udio fermentabilnih ugljikohidrata. Iako su rezultati dosadašnjih istraživanja obećavajući, učinkovitost procesa uvelike ovisi o sastavu komine, načinu provedbe fermentacije i odabranoj mikrobnoj kulturi. Podatci o primjeni komine jabuke i šljive za proizvodnju PHA fermentacijom na čvrstom nosaču i dalje su ograničeni. Dodatno, utjecaj vrste mikrobne kulture na učinkovitost biosinteze PHA pri uporabi navedenih supstrata nije dovoljno istražen, osobito u usporedbi čistih i mješovitih kultura mikroorganizama. Navedeno ukazuje na potrebu za daljnjim istraživanjima usmjerenima na procjenu potencijala voćnog agroindustrijskog otpada kao sirovine za održivu proizvodnju biopolimera.

Cilj ovog rada bio je procijeniti potencijal komine jabuke i šljive kao supstrata za proizvodnju polihidroksialkanoata primjenom fermentacije na čvrstom nosaču te utvrditi utjecaj vrste mikrobne kulture na učinkovitost biosinteze polimera.

2. Eksperimentalni dio

2.1. Materijali

2.1.1. Agroindustrijski otpad

Za potrebe provedbe SSF fermentacije upotrijebljena je otpadna komina šljiva i jabuka dobivena iz industrijskih procesa prerade u tvrtki Podravka d. d., Koprivnica, Hrvatska.

2.1.2. Radni mikroorganizmi

Za provedbu SSF fermentacije upotrijebljen je bakterijski soj *C. necator* H16 pribavljen iz DSMZ – Njemačke zbirke mikroorganizama i staničnih kultura GmbH, Njemačka. S obzirom na to da je fermentacija provedena na steriliziranoj i nesteriliziranoj komini, u uvjetima bez prethodne sterilizacije sinteza PHA odvijala se zajedničkim djelovanjem *C. necator* H16 i prirodno prisutnih mikroorganizama u komini.

2.1.3. Priprema hranjivih podloga

Hranjivi agar (HA) upotrijebljen je za uzgoj bakterijskih kultura, dok je sladni agar upotrijebljen za uzgoj kvasaca i plijesni. Podloge su pripremljene prema uputama proizvođača (Biolife Manual, Ingraf, Italija, 1991). Hranjivi agar pripravljen je otapanjem 8,00 g hranjivog bujona i 18,00 g tehničkog agara u 1000 ml deionizirane vode, dok je sladni agar pripravljen otapanjem 47,00 g podloge u 1000 ml demineralizirane vode. Pripremljene smjese ostavljene su 15 min radi bubrenja sastojaka te su potom tri puta zagrijane do vrenja uz povremeno miješanje. Nakon pripreme podloge su sterilizirane u autoklavu (Raypa AES, Raypa, Španjolska) pri 121 °C tijekom 15 min.

2.1.4. Priprema fiziološke otopine

Ukupan broj živih mikroorganizama određen je metodom decimalnih razrjeđenja, pri čemu je upotrijebljena sterilna fiziološka otopina natrijeva klorida koncentracije 0,9 % (w/v). Otopina je pripravljena otapanjem 9,0 g NaCl u 1000 ml deionizirane vode, raspodijeljena u epruvete te sterilizirana u autoklavu pri 121 °C tijekom 15 min. Rezultati su izraženi kao broj jedinica koje tvore kolonije (engl. *colony forming units*, CFU).

2.1.5. Priprema DNS reagensa

Koncentracija reducirajućih šećera određena je metodom s 3,5-dinitrosalicilnom kiselinom (DNS metoda). DNS reagens pripravljen je otapanjem 4,36 g 3,5-dinitrosalicilne kiseline u 160 ml otopine natrijeva hidroksida koncentracije 0,5 mol l^{-1} uz kontinuirano miješanje u vodenoj kupelji pri 70 °C. Nakon otapanja kiseline u smjesu je postupno dodano 60 g kalijeva natrijeva tartarata tetrahidrata uz nastavak miješanja pri istoj temperaturi. Dobiveni reagens ohlađen je na 25 °C te nadopunjen destiliranom vodom do konačnog volumena od 200 ml.

2.2. Metode rada

U polaznom istraživanju provedena je fizikalno-kemijska i mikrobiološka karakterizacija komine jabuke i šljive. Fizikalno-kemijska karakterizacija obuhvatila je određivanje udjela vlage i hlapljive tvari, pH vrijednosti, električne vodljivosti, koncentracije otopljenog kisika, koncentracije reducirajućih šećera, omjera ugljika i dušika (C/N) te koncentracije teških metala. Na temelju dobivenih rezultata odabrana je komina za daljnja istraživanja i proizvodnju PHA SSF-om. Fermentacijski proces provodio se tijekom 14 dana, pri čemu su praćene promjene fizikalno-kemijskih i mikrobioloških parametara te učinkovitost biosinteze PHA. Dodatno je ispitan utjecaj sterilizacije komine usporedbom proizvodnje PHA na steriliziranoj i nesteriliziranoj komini.

2.2.1. Određivanje sadržaja vlage i udjela suhe tvari (ST) u komini

Sadržaj vlage i udio suhe tvari određeni su gravimetrijskom metodom sušenjem 3 – 5 g uzorka u porculanskim lončićima pri 105 °C do postizanja konstantne mase. Na temelju mase uzorka prije i nakon sušenja izračunani su maseni udio vlage, maseni udio suhe tvari te masa suhe tvari prema jedn. (1) – (3):

$$w(\mathrm{H_2O}) = \frac{m(\mathrm{VT}) - m(\mathrm{ST})}{m(\mathrm{VT})} \tag{1}$$

U jedn. (1) $w(H_2O)$ predstavlja maseni udio vlage, m(VT) masu vlažne tvari, a m(ST) masu suhe tvar.

$$w(\mathrm{ST}) = 1 - w(\mathrm{H_2O}) \tag{2}$$

U jedn. (2) w(ST) predstavlja maseni udio suhe tvari, a $w(H_2O)$ maseni udio vlage.

$$m(\mathrm{ST}) = m(\mathrm{VT}) \cdot w(\mathrm{ST}) \tag{3}$$

U jedn. (3) m(ST) predstavlja masu suhog supstrata, m(VT) masu vlažnog supstrata, a w(ST) predstavlja maseni udio suhe tvari u supstratu.

2.2.2. Određivanje sadržaja hlapljive tvari i ugljika u komini

Sadržaj hlapljive tvari i procijenjeni sadržaj ugljika u komini određeni su žarenjem osušenog uzorka. Nakon sušenja uzorci su u porculanskim lončićima spaljeni na plameniku, nakon čega su žareni u mufolnoj peći (Demiterm Easy, Elektrosanitarij, Hrvatska) pri 550 °C tijekom 2 h, odnosno do postizanja konstantne mase uzorka. Udio hlapljive tvari u supstratu, *w*(HT), izračunat je prema jedn. (4). Udio ugljika procijenjen je empirijskim izrazom prikazanim jedn. (5), dok je masa hlapljive tvari izračunata prema jedn. (6).

$$w(\mathrm{HT}) = \frac{m(\mathrm{ST}) - m(\mathrm{pepeo})}{m(\mathrm{ST})} \quad (4)$$

U jedn. (4) *w*(HT) predstavlja maseni udio hlapljive tvari, *m*(ST) masu suhe tvari, a m(pepeo) masu pepela nakon žarenja.

$$w(\mathrm{C}) = w(\mathrm{HT}) / 1{,}8 \quad (5)$$

U jedn. (5) *w*(C) predstavlja maseni udio ugljika u otpadnoj biomasi, a *w*(HT) maseni udio hlapljive tvari.

$$m(\mathrm{HT}) = m(\mathrm{ST}) \cdot w(\mathrm{HT}) \quad (6)$$

U jedn. (6) *m*(HT) predstavlja masu hlapljive tvari, *m*(ST) masu suhe tvari, a *w*(HT) maseni udio hlapljive tvari.

2.2.3. Određivanje pH vrijednosti, električne vodljivosti i koncentracije otopljenoga kisika

pH vrijednost, električna vodljivost i koncentracija otopljenog kisika određeni su u suspenziji pripremljenoj od 10 g suhe tvari uzorka i 100 ml deionizirane vode. Masa vlažne tvari potrebna za pripremu suspenzije izračunata je na temelju prethodno određenog udjela vlage prema jedn. (7).

$$m(\mathrm{VT}) = \frac{m(\mathrm{ST})}{1 - w(\mathrm{H_2O})} \quad (7)$$

U jedn. (7) *m*(VT) predstavlja masu vlažne tvari, *m*(ST) masu suhe tvari, a $w(H_2O)$ maseni udio vlage.

Nakon pripreme suspenzije uzorci su homogenizirani na tresilici pri 160 o min^{-1} tijekom 30 min pri sobnoj temperaturi. pH vrijednost određena je elektrodom SenTix®, električna vodljivost elektrodom TetraCon® 925, a koncentracija otopljenog kisika elektrodom FDO® 925. Mjerenja su provedena pomoću prijenosnog multiparametarskog instrumenta WTW Multi 3430 (Xylem Analytics, SAD).

2.2.4. Određivanje koncentracije reducirajućih šećera

Koncentracija reducirajućih šećera u komini jabuke i šljive određena je DNS metodom. Suspenzija je pripremljena od 10 g suhe tvari uzorka i 100 ml destilirane vode te inkubirana u termostatu (CALDERA 250, POL-EKO-APARATURA, Poljska) pri 35 °C tijekom 40 min. Nakon inkubacije uzorci su centrifugirani pri 4200 o min^{-1} tijekom 10 min (Sigma 6-15H, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Njemačka), a za analizu je upotrijebljen dobiveni supernatant.

Za određivanje koncentracije reducirajućih šećera u kivetu je preneseno 1 ml supernatanta kojemu je dodano 1,5 ml DNS reagensa. Slijepa proba pripremljena je dodatkom 1 ml demineralizirane vode u 1,5 ml DNS reagensa. Reakcijske smjese zagrijavane su u vodenoj kupelji pri 100 °C tijekom 15 min, a zatim hlađene u hladnoj vodenoj kupelji tijekom jednakog vremenskog intervala. Apsorbancija ohlađenih uzoraka izmjerena je spektrofotometrom (Hach Lange GmbH, SAD) pri valnoj duljini od 575 nm.

2.2.5. Određivanje kemijske potrošnje kisika

Kemijska potrošnja kisika (KPK) određena je kolorimetrijskom metodom prema normi HRN ISO 15705:2003. Analiza je provedena tijekom fizikalno-kemijske karakterizacije komine te tijekom praćenja ukupnog organskog opterećenja za vrijeme SSF fermentacije. U standardiziranu kivetu dodano je 2 ml supernatanta i 3 ml KPK reagensa. Prema potrebi, uzorci su prije analize razrijeđeni demineraliziranom vodom. Za svaki uzorak provedena su dva usporedna mjerenja.

Radi uklanjanja mogućih interferencija uzrokovanih prisutnošću kloridnih iona (Cl^-) u reakcijsku smjesu dodana je mala količina živina(II) sulfata. Slijepa proba sadržavala je 2 ml demineralizirane vode, 3 ml KPK reagensa i živin(II) sulfat. Pripremljene kivete digestirane su u termobloku (COD Reactor, HACH, Austrija) pri 150 °C tijekom 2 h. Nakon digestije uzorci su ohlađeni na sobnu temperaturu, a apsorbancija je izmjerena spektrofotometrom DR3900 (HACH, SAD) pri valnoj duljini od 600 nm.

2.2.6. Određivanje C/N omjera

Udio dušika određen je Kjeldahlovom metodom, koja obuhvaća digestiju uzorka i destilaciju oslobođenog amonijaka. U epruvete za digestiju odvagano je 0,5 – 1,5 g suhe i usitnjene komine, uz dodatak dviju tableta katalizatora ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$ i K_2SO_4) te 12 ml koncentrirane sulfatne kiseline (H_2SO_4). Uzorci su digestirani u termobloku (FOSS Digestor 2006, Gerber Instruments, Švicarska) pri 420 °C tijekom 60 min. Za svaki uzorak provedena su dva usporedna mjerenja.

Nakon digestije uzorci su ohlađeni na sobnu temperaturu te je dodano 75 ml demineralizirane vode. Destilacija je provedena na uređaju Kjeltec™ 2100 (FOSS, Danska), pri čemu je oslobođeni amonijak prihvaćen u 30 ml 4 %-tne otopine borne kiseline s indikatorima. Dobiveni destilat titriran je 0,1 mol l^{-1} otopinom klorovodične kiseline (HCl), a maseni udio dušika izračunat je prema jedn. (8):

$$w(\mathrm{N}) = \frac{\left(V(\mathrm{HCl,uzorak}) - V(\mathrm{HCl,sp})\right) \cdot c(\mathrm{HCl}) \cdot 14{,}007 \cdot 100}{m(\mathrm{ST})} \quad (8)$$

U jedn. (8) w(N) predstavlja maseni udio dušika u biomasi, V(HCl,uzorak) volumen otopine HCl utrošene za titraciju destilata uzorka, V(HCl,sp) volumen otopine HCl utrošene za titraciju slijepe probe, c(HCl) koncentraciju otopine HCl, a m(ST) masu suhe tvari uzorka.

2.2.7. Određivanje koncentracije teških metala

Za određivanje koncentracije teških metala u teflonske posude za digestiju odvagano je 0,50 g suhe tvari uzorka te dodano 9 ml ultračiste dušične kiseline (67 %, HNO_3) i 1 ml 30 %-tne otopine vodikova peroksida (H_2O_2). Za svaki uzorak pripremljena su tri usporedna mjerenja. Slijepa proba sadržavala je 9 ml ultračiste dušične kiseline i 1 ml otopine vodikova peroksida bez dodatka uzorka.

Digestija je provedena u mikrovalnom digestoru ETHOS 1600 (Milestone™ Srl, Italija) prema sljedećem programu: 250 W tijekom 2 min, 0 W tijekom 2 min, 350 W tijekom 6 min, 400 W tijekom 5 min i 550 W tijekom 8 min, nakon čega je uslijedila ventilacija sustava tijekom 8 min. Nakon digestije uzorci su razrijeđeni demineraliziranom vodom u omjeru 1 : 10, a koncentracije teških metala određene su metodom masene spektrometrije s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS) na uređaju ICP-MS-2030LF (Shimadzu, Japan).

2.2.8. Određivanje CFU

Broj mikroorganizama određen je metodom nasađivanja na hranjive podloge nakon pripreme niza decimalnih razrjeđenja suspenzije mikroorganizama (10^{-1} – 10^{-7}) prema postupku opisanom u poglavlju 2.2.3. Iz svakog razrjeđenja preneseno je 1 ml suspenzije u sterilne Petrijeve zdjelice, nakon čega su dodani hranjivi agar (HA) i sladni agar (SA). Pripremljene podloge inkubirane su pri 37 °C tijekom 24 – 48 h za određivanje broja bakterija odnosno pri 28 °C tijekom 3 – 5 dana za određivanje broja gljiva. Nakon inkubacije prebrojene su izrasle kolonije, a CFU vrijednosti izračunate su prema jedn. (9):

$$\mathrm{CFU} = \frac{\text{broj izraslih kolonija}}{V(\text{upotrijebljenog uzorka})} \cdot \frac{1}{\text{razrjeđenje}} \quad (9)$$

gdje je CFU broj jedinica koje formiraju mikrobne kolonije, a V(upotrijebljenog uzorka) volumen suspenzije dodan u Petrijevu zdjelicu.

2.2.9. Određivanje koncentracije suspendiranih tvari

Koncentracija suspendiranih tvari (engl. *mixed liquor suspended solids*, MLSS) određena je tijekom praćenja promjena mikrobne biomase za vrijeme SSF fermentacije. Za analizu je pripremljena suspenzija supstrata i demineralizirane vode u omjeru 1 : 10 (w/v), koja je inkubirana pri 35 °C tijekom 30 min uz miješanje pri 150 min^{-1} u rotacijskom inkubatoru. Oko 7 ml suspenzije profiltrirano je kroz membranski filtar veličine pora 0,43 μm. Filtri s izdvojenom biomasom sušeni su u sušioniku pri 50 °C tijekom 1,5 h, a zatim vagani. Na temelju razlike mase prije i nakon filtracije izračunata je masena koncentracija suspendiranih tvari (MLSS) prema jedn. (10):

$$MLSS = \frac{m(\text{biomase})}{V(\text{uzorak}) \cdot 1000} \quad (10)$$

U jedn. (10) MLSS predstavlja masenu koncentraciju suspendiranih tvari, m(biomase) masu suhe biomase zadržane na filtru, a V(uzorak) volumen profiltrirane suspenzije.

2.2.10. SSF fermentacija na otpadnoj biomasi

Fermentacija na čvrstom nosaču provedena je na komini odabranoj na temelju fizikalno-kemijskih i mikrobioloških svojstava. Upotrijebljena je sterilizirana i nesterilizirana komina, pri čemu je pH vrijednost podešena na 6 – 7 dodatkom odgovarajuće količine natrijeva hidrogenkarbonata ($NaHCO_3$). Sadržaj vlage podešen je na 60 %, pri čemu je u ukupni udio vlage uključena i voda unesena dodatkom bakterijske suspenzije. Inokulum bakterijske kulture *C. necator* pripremljen je suspendiranjem izraslih kolonija u hranjivom bujonu obogaćenom s 2 % (w/v) glukoze. Fermentacija je provedena tijekom 14 dana, pri čemu je uspoređivana biosinteza PHA na sterilnoj i nesterilnoj komini. SSF provedena je u četiri neovisna fermentacijska pokusa za svaki ispitivani uvjet, odnosno za steriliziranu i nesterilizirani kominu. Uzorci su prikupljani 0., 3., 7., 10. i 14. dana fermentacije, a svaka fizikalno-kemijska i mikrobiološka analiza provedena je u dvije analitičke paralele na uzorcima iz svakog pojedinog fermentacijskog pokusa.

Tijekom fermentacije praćene su promjene fizikalno-kemijskih i mikrobioloških parametara, uključujući sadržaj vlage, udio suhe i hlapljive tvari, pH vrijednost, električnu

vodljivost, broj mikroorganizama (CFU), koncentraciju reducirajućih šećera, kemijsku potrošnju kisika (KPK) te omjer ugljika i dušika (C/N). Analize su provedene 0., 3., 7., 10. i 14. dana fermentacije. Koncentracija suspendiranih tvari (MLSS) određena je 7., 10. i 14. dana fermentacije.

2.2.11. Priprema uzoraka i ekstrakcija PHA

Nakon završetka fermentacije provedena je priprema uzoraka za ekstrakciju polihidroksialkanoata (PHA). Postupak je proveden na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku. Prije ekstrakcije određen je sadržaj vlage prema postupku opisanom u poglavlju 2.2.1. te udio proteina Kjeldahlovom metodom opisanom u poglavlju 2.2.6. Slobodne masti uklonjene su ekstrakcijom u SoxRoc ekstraktoru uz primjenu petroletera kao otapala. Za ekstrakciju je upotrijebljeno 1 g uzorka i 90 ml petroletera. Nakon uklanjanja slobodnih masti provedena je ekstrakcija PHA u SoxRoc ekstraktoru primjenom kloroforma kao otapala. Za svaki uzorak ekstrakcija je provedena na 1 g biomase uz 90 ml kloroforma kao otapala. Analize su provedene u tri usporedna mjerenja.

2.2.12. Karakterizacija PHA

Karakterizacija PHA provedena je na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku. Za određivanje količine sintetiziranog PHA uzorci su usitnjeni te je 4 mg biomase preneseno u staklene epruvete s čepom. U svaku epruvetu dodano je 1 ml 15 %-tne otopine H_2SO_4 u metanolu i 1 ml kloroforma koji je sadržavao interni standard poznate koncentracije. Uzorci su podvrgnuti metanolizi tijekom 3 h radi razgradnje i derivatizacije prisutnih biopolimera. Nakon završetka reakcije uzorci su neutralizirani 2 mol l^{-1} otopinom KOH do pH 7 te centrifugirani radi odvajanja faza. Organska faza prenesena je u vijale volumena 2 ml i analizirana metodom plinske kromatografije sa spektrometrijom masa (GC-MS). Analiza je provedena na plinskom kromatografu Agilent 7890A spojenom na maseni detektor 5975C. Za razdvajanje spojeva upotrijebljena je kapilarna kolona HP-5MS UI (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm) sa stacionarnom fazom od 5 %-tnog fenil-metilpolisiloksana. Kao plin nosilac upotrijebljen je helij pri protoku od 1 ml min^{-1}, a temperatura injektora bila je 250 °C. Temperaturni program pećnice uključivao je izotermni korak pri 70 °C tijekom 2 min, nakon čega je temperatura povećavana do 200 °C brzinom od 3 °C min^{-1}, uz završni izotermni korak pri 200 °C tijekom 15 min. Omjer dijeljenja uzorka iznosio je 1 : 20, volumen injekcije 4 μl, energija ionizacije 70 eV, temperatura ionskog izvora 230 °C, a temperatura kvadrupola 150 °C.

3. Rezultati i rasprava

3.1. Fizikalno-kemijska karakterizacija

Fizikalno-kemijska karakterizacija komine jabuke i šljive provedena je s ciljem procjene njihove prikladnosti kao supstrata za proizvodnju PHA fermentacijom na čvrstom nosaču. U tu svrhu određeni su sadržaj vlage, udio suhe i hlapljive tvari, pH vrijednost, električna vodljivost, koncentracija reducirajućih šećera te omjer ugljika i dušika. Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 1 te su poslužili za procjenu nutritivnog potencijala komine i njihove prikladnosti za provedbu fermentacijskog procesa.

Tablica 1 – Udjeli vlage, suhe te hlapljive tvari u otpadnoj biomasi jabuke i šljive

Table 1 – Moisture, dry matter, and volatile matter contents of waste apple and plum biomass

Komina Pomace	*w*(vlage) / % *w*(moisture) / %	*w*(ST) / %	*w*(HT) / %
jabuka apple	79,68	20,32	97,86
šljiva plum	59,72	40,28	98,63

Komina jabuke sadržavala je veći udio vlage (79,68 %) u odnosu na šljivu (59,72 %), dok je udio suhe tvari bio veći kod komine šljive. Sadržaj vlage jedan je od ključnih parametara u procesima fermentacije jer izravno utječe na dostupnost hranjivih tvari i intenzitet mikrobiološke aktivnosti. Visok sadržaj vlage komine predstavlja prednost za provedbu SSF procesa jer omogućuje učinkovit prijenos hranjivih tvari i metabolita te doprinosi održavanju uvjeta pogodnih za rast i metaboličku aktivnost mikroorganizama. Istodobno, prekomjeran sadržaj vlage može smanjiti poroznost supstrata i ograničiti prijenos kisika kroz sustav, što je osobito važno u procesima fermentacije na čvrstom nosaču.[33] Kod obje komine utvrđen je vrlo visok udio hlapljive tvari, koji je iznosio 97,86 % za jabuku i 98,63 % za šljivu.

Visok udio hlapljive tvari ukazuje na dominantnu prisutnost organske tvari i nizak sadržaj anorganskih komponenti, što je karakteristično za voćni agroindustrijski otpad.[33,34] Budući da organska tvar predstavlja glavni izvor ugljika i energije za rast mikroorganizama, dobiveni rezultati potvrđuju da obje biomase posjeduju povoljan sastav za primjenu u procesima fermentacije na čvrstom nosaču te potencijal za biosintezu PHA.

Ostali određivani fizikalno-kemijski parametri važni za procjenu prikladnosti komine kao fermentacijskog supstrata prikazani su u tablici 2.

Tablica 2 – Vrijednosti ostalih određivanih fizikalno-kemijskih parametara
Table 2 – Values of other determined physicochemical parameters

Komina Pomace	pH-vrijednost / – pH-value / –	$\varkappa$ / μS cm^{-1}	w(glukoze) / mg g_{ST}^{-1} w(glucose) / mg g_{ST}^{-1}	C/N omjer / – C/N ratio / –
jabuka apple	3,903	463,0	290,51	–
šljiva plum	3,783	550,0	1077,93	145,71

pH vrijednost jabuke iznosila 3,90, a šljive 3,78. Dobivene vrijednosti u skladu su s literaturnim podatcima za voćnu kominu te se mogu povezati s prisutnošću organskih kiselina karakterističnih za voće.[35–37] Budući da većina mikroorganizama koji sintetiziraju PHA optimalno raste pri približno neutralnim pH vrijednostima, prije početka fermentacije bilo je potrebno provesti korekciju pH vrijednosti supstrata. Električna vodljivost iznosila je 463 μS cm^{-1} za jabuku i 550 μS cm^{-1} za šljivu, što ukazuje na prisutnost otopljenih mineralnih tvari u obje komine. Iako vodljivost nije primarni pokazatelj prikladnosti supstrata za proizvodnju PHA, može poslužiti kao pokazatelj ukupnog sadržaja iona dostupnih mikroorganizmima tijekom fermentacije.[38,39]

Razlike u sastavu između analiziranih komina uočene su u sadržaju reducirajućih šećera. Komina šljive sadržavala je gotovo četiri puta veću koncentraciju reducirajućih šećera od komine jabuke. Budući da reducirajući šećeri predstavljaju neposredno dostupan izvor ugljika za rast mikroorganizama i biosintezu PHA, veći sadržaj šećera ukazuje na potencijalno povoljnije uvjete za proizvodnju biopolimera. Međutim, dostupnost reducirajućih šećera nije jedini čimbenik koji određuje uspješnost fermentacijskog procesa jer na rast mikroorganizama i akumulaciju PHA utječu i sadržaj vlage, dostupnost drugih hranjivih tvari, sastav organske tvari te fiziološke karakteristike upotrijebljenog mikroorganizma.[40,41]

Omjer ugljika i dušika (C/N) jedan je od najvažnijih parametara za akumulaciju PHA u stanicama mikroorganizama. Poznato je da se biosinteza PHA intenzivira u uvjetima viška ugljika uz istodobno ograničenu dostupnost dušika, pri čemu dolazi do preusmjeravanja metabolizma prema sintezi pričuvnih polimera.[3,5] U komini šljive utvrđen je visok C/N omjer (145,71), što ukazuje na ograničenu dostupnost dušika i potencijalno povoljne uvjete za akumulaciju PHA. U komini jabuke dušik nije detektiran primijenjenom metodom, zbog čega C/N omjer nije bilo moguće izračunati. Takav rezultat upućuje na vrlo nizak sadržaj dušika, međutim bez dodatnih analiza nije moguće preciznije procijeniti njegov utjecaj na biosintezu PHA.

Koncentracije elemenata određene ICP-MS metodom prikazane su u tablici 3.

U obje analizirane komine najzastupljeniji su bili makroelementi kalij, kalcij, fosfor i magnezij, dok su mikroelementi bili prisutni u znatno nižim koncentracijama. Veće koncentracije kalija, kalcija, fosfora i magnezija zabilježene su u komini jabuke u odnosu na šljivu. Navedeni elementi imaju važnu ulogu u metabolizmu mikroorganizama jer sudjeluju u održavanju osmotske ravnoteže, stabilizaciji staničnih struktura te brojnim enzimskim reakcijama povezanim s rastom i sintezom metabolita.[43–45] Njihova prisutnost stoga može pozitivno utjecati na mikrobiološku aktivnost tijekom fermentacijskog procesa. S druge strane, prisutnost teških metala predstavlja potencijalni ograničavajući čimbenik u bioprocesima jer povišene koncentracije mogu inhibirati rast mikroorganizama i narušiti biosintezu PHA.[46–48]

U analiziranim uzorcima većina ispitivanih teških metala nije detektirana ili je bila prisutna u vrlo niskim koncentracijama. U komini šljive utvrđena je prisutnost olova, dok je u komini jabuke njegova koncentracija bila ispod granice detekcije. Dobiveni rezultati ukazuju na to da analizirane komine ne sadrže koncentracije teških metala koje bi mogle znatno ograničiti rast mikroorganizama ili provedbu fermentacijskog procesa. Istodobno, prisutnost esencijalnih mineralnih elemenata potvrđuje prikladnost obje komine za primjenu u procesima proizvodnje PHA.

Tablica 3 – Koncentracija metala u pojedinom supstratu
Table 3 – Metal concentration in individual substrates

Uzorak Sample	Šljiva (Plum) / μg g^{-1} uzorka	Jabuka (Apple) / μg g^{-1} uzorka
K	794,4573	1608,6727
Ca	339,1620	383,5508
Mg	60,4421	149,7957
P	148,1359	267,5629
Fe	0,6559	3,2819
Mn	0,4500	0,6432
Zn	0,5767	0,6063
Pb	0,4345	<LOD
Cd	<LOD	<LOD
Cr	<LOD	<LOD
Cu	<LOD	<LOD
Ni	<LOD	<LOD

3.2. Mikrobiološka karakterizacija

Mikrobiološka karakterizacija provedena je s ciljem procjene prisutnosti i brojnosti autohtonih mikroorganizama u analiziranim kominama. Budući da mikrobiološka populacija može znatno utjecati na tijek fermentacijskih procesa, određen je CFU broj bakterija i gljiva. Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 4.

Tablica 4 – Rezultati mikrobiološke karakterizacije
Table 4 – Results of microbiological characterisation

Komina Pomace	Hranjiva podloga Nutrient medium	CFU / st g_{ST}^{-1}	log CFU / –
jabuka apple	hranjivi agar sladni agar	$1{,}02 \cdot 10^7$ $1{,}17 \cdot 10^8$	7,01 8,07
šljiva plum	hranjivi agar sladni agar	$9{,}18 \cdot 10^7$ $5{,}20 \cdot 10^7$	7,96 7,72

Mikrobiološkom karakterizacijom utvrđena je prisutnost bakterija i gljiva u obje analizirane komine. Broj bakterija kretao se od $1{,}02 \cdot 10^7$ do $9{,}18 \cdot 10^7$ CFU g_{ST}^{-1}, dok je broj gljiva iznosio od $5{,}20 \cdot 10^7$ do $1{,}17 \cdot 10^8$ CFU g_{ST}^{-1}.

U komini šljive utvrđen je veći broj bakterija ($9{,}18 \cdot 10^7$ CFU g_{ST}^{-1}) u odnosu na jabuku ($1{,}02 \cdot 10^7$ CFU g_{ST}^{-1}), dok je komina jabuke sadržavala veći broj gljiva ($1{,}17 \cdot 10^8$ CFU g_{ST}^{-1}) u odnosu na šljivu ($5{,}20 \cdot 10^7$ CFU g_{ST}^{-1}). Uočene razlike mogu se povezati s razlikama u sastavu komine, dostupnosti hranjivih tvari te uvjetima skladištenja prije provedbe analiza.[47,48] Iako je komina šljive sadržavala veću koncentraciju reducirajućih šećera, komina jabuke odabrana je za daljnja istraživanja zbog povoljnijeg ukupnog sastava, većeg sadržaja vlage, viših koncentracija esencijalnih mineralnih elemenata te veće prisutnosti autohtone mikrobne populacije. Uzimajući u obzir rezultate fizikalno-kemijske i mikrobiološke karakterizacije, za daljnje istraživanje proizvodnje polihidroksialkanoata fermentacijom na čvrstom nosaču odabrana je komina jabuke.

3.3. SSF fermentacija

3.3.1. Praćenje promjene udjela vlage, suhe tvari i hlapljive tvari

Promjene udjela vlage, suhe i hlapljive tvari tijekom SSF fermentacije prikazane su u tablici 5. U oba sustava zabilježeno je postupno smanjenje sadržaja vlage uz istodobno povećanje udjela suhe tvari. Takav trend očekivan je tijekom fermentacije na čvrstom nosaču zbog isparavanja vode pri temperaturi 35 °C te njezina sudjelovanja u metaboličkim procesima mikroorganizama.[49]

Sadržaj vlage predstavlja jedan od ključnih parametara u SSF procesima jer izravno utječe na dostupnost hranjivih tvari, mikrobnu aktivnost i prijenos kisika kroz supstrat. Nedovoljna količina vode može ograničiti rast mikroorganizama i intenzitet metabolizma, dok prekomjerna vlažnost smanjuje poroznost sustava i otežava difuziju kisika.[50] Zbog toga je tijekom fermentacije provedena periodična nadoknada vode da bi se sadržaj vlage održao unutar raspona pogodnog za rast mikroorganizama.

U steriliziranoj komini promjene sadržaja vlage bile su manje izražene nego u nesterileziranoj komini. Nasuprot tome, kod nesterilizirane komine zabilježen je kontinuiran pad sadržaja vlage tijekom fermentacije, pri čemu je najizraženije smanjenje utvrđeno 14. dana procesa. Takav trend može biti posljedica kombiniranog djelovanja mikrobne aktivnosti, isparavanja vode te uzorkovanja tijekom fermentacije. Povećanje udjela suhe tvari tijekom procesa odgovara zabilježenom smanjenju sadržaja vlage, a najizraženije je uočeno kod nesterilizirane komine. Istodobno, udio hlapljive tvari tijekom cijelog procesa ostao je relativno stabilan i kretao se oko 90 %.

Tablica 5 – Promjena vlage, suhe i hlapljive tvari tijekom SSF-a u nesterileziranoj i steriliziranoj komini
Table 5 – Changes in moisture, dry matter, and volatile matter content during solid-state fermentation (SSF) in non-sterilised and sterilised pomace

t / dan *t* / day	Komina Pomace	*w*(vlage) / % *w*(moisture) / %	*w*(ST) / %	*w*(HT) / %
0	JABUKA (nesterilno)	64,29	35,71	91,73
	JABUKA (sterilno)	59,90	40,10	92,39
3	JABUKA (nesterilno)	63,86	36,14	88,87
	JABUKA (sterilno)	58,11	41,89	93,68
7	JABUKA (nesterilno)	55,45	44,55	90,63
	JABUKA (sterilno)	58,44	41,56	92,35
10	JABUKA (nesterilno)	50,77	49,23	88,22
	JABUKA (sterilno)	52,04	47,96	92,40
14	JABUKA (nesterilno)	11,77	88,23	90,80
	JABUKA (sterilno)	55,96	44,04	91,21

Relativno male promjene udjela hlapljive tvari ukazuju na to da tijekom promatranog razdoblja nije došlo do znatnijih promjena u omjeru organske i anorganske komponente komine, unatoč odvijanju mikrobnih procesa i potrošnji dostupnih organskih spojeva.

3.3.2. *Praćenje promjene pH vrijednosti i električne vodljivosti*

Tijekom SSF fermentacije praćene su promjene pH vrijednosti i električne vodljivosti kao pokazatelji metaboličke aktivnosti mikroorganizama i promjena u sastavu komine. Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 6.

Tablica 6 – pH vrijednost i električna vodljivost nesterilizirane i sterilizirane komine

Table 6 – pH value and conductivity of non-sterilised and sterilised pomace

t/dan *t*/day	Komina Pomace	pH-vrijednost/– pH-value/–	$\varkappa$/mS cm^{-1}
0	JABUKA (nesterilno)	6,337	2,13
	JABUKA (sterilno)	5,329	2,73
3	JABUKA (nesterilno)	4,666	2,47
	JABUKA (sterilno	4,721	2,57
7	JABUKA (nesterilno)	7,193	3,59
	JABUKA (sterilno	5,062	3,14
10	JABUKA (nesterilno)	8,240	3,44
	JABUKA (sterilno	5,093	2,65
14	JABUKA (nesterilno)	5,173	1,71
	JABUKA (sterilno)	5,152	0,93

Prije početka procesa pH vrijednost supstrata podešena je u raspon od 6 do 7, što odgovara uvjetima pogodnim za rast bakterije *C. necator* i biosintezu PHA.[51]

Tijekom fermentacije u oba sustava zabilježene su promjene pH vrijednosti, što upućuje na intenzivnu metaboličku aktivnost mikroorganizama. Trećeg dana fermentacije uočen je pad pH vrijednosti u steriliziranoj i nesterilizirani komini, pri čemu je promjena bila izraženija u nesterilizirani sustavu. Smanjenje pH vrijednosti može se povezati s nastankom organskih kiselina i drugih kiselih metabolita tijekom razgradnje lako dostupnih organskih spojeva.[52,53]

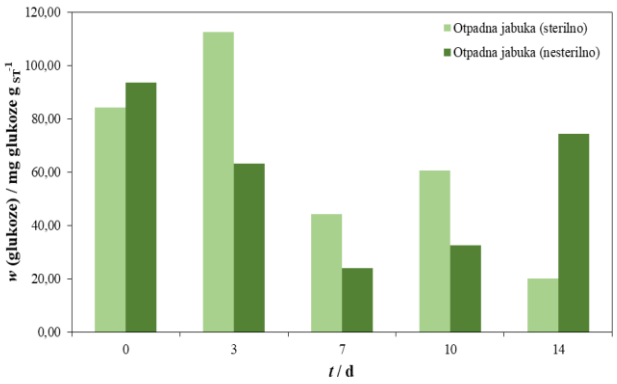
Nakon početnog pada u nesterilizirani komini zabilježen je porast pH vrijednosti, koja je desetog dana fermentacije dosegnula vrijednost.[8,24] Takva promjena može se povezati s daljnjom razgradnjom organskih spojeva i promjenama u sastavu mikrobne zajednice tijekom fermentacije. Povećanje pH vrijednosti može biti posljedica razgradnje dušikovih spojeva uz nastanak amonijaka, ali i potrošnje prethodno nastalih organskih kiselina od mikroorganizama.[37,53] Nasuprot tome, u steriliziranoj komini promjene pH vrijednosti bile su znatno manje izražene nego u nesterilizirani komini te su se nakon početnog pada vrijednosti stabilizirale u rasponu od 5,0 do 5,2, što upućuje na manje izražene promjene u kemijskom sastavu sustava.

Električna vodljivost tijekom fermentacije uglavnom se kretala između 2 i 4 mS cm^{-1}, što ukazuje na prisutnost otopljenih iona i mineralnih tvari dostupnih mikroorganizmima. U oba sustava najveće vrijednosti zabilježene su tijekom sredine fermentacijskog procesa, nakon čega je uslijedio pad vodljivosti. Povećanje vodljivosti tijekom fermentacije može se povezati s oslobađanjem iona uslijed razgradnje organskih spojeva, dok se njezino smanjenje prema kraju procesa može pripisati iskorištavanju hranjivih tvari i promjenama u sastavu otopljenih tvari uzrokovanim mikrobnom aktivnošću.[38,39]

Dobiveni rezultati potvrđuju da su tijekom fermentacije u oba sustava nastupile promjene kemijskih svojstava komine, pri čemu su promjene bile izraženije u nesterilizirani komini zbog prisutnosti autohtone mikrobne zajednice.

3.3.3. *Praćenje promjene koncentracije reducirajućih šećera i organskog opterećenja*

Koncentracija reducirajućih šećera tijekom SSF fermentacije praćena je kao pokazatelj dostupnosti ugljika za rast mikroorganizama i biosintezu PHA. Promjene koncentracije reducirajućih šećera tijekom procesa prikazane su na slici 1.



Slika 1 – Promjena koncentracije reducirajućih šećera tijekom procesa fermentacije

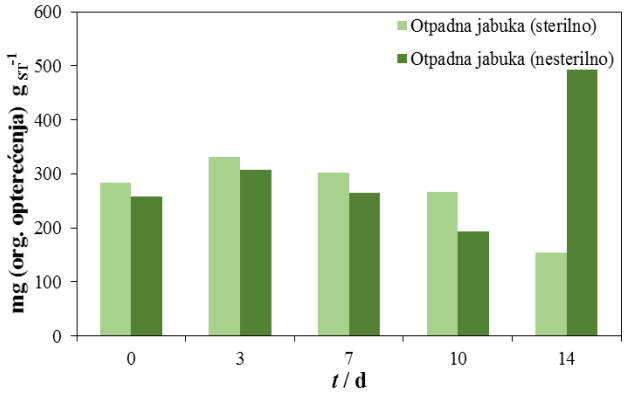
Fig. 1 – Change in reducing sugar concentration during the fermentation process

Početna koncentracija reducirajućih šećera iznosila je 93,50 mg g_{ST}^{-1} u nesterilizirani odnosno 84,30 mg g_{ST}^{-1} u steriliziranoj komini. Dobivene vrijednosti bile su niže od onih utvrđenih tijekom početne fizikalno-kemijske karakterizacije komine, što se može povezati s heterogenošću

komine i prirodnom varijabilnošću sastava uzoraka. U nesteriliziranoj komini koncentracija reducirajućih šećera postupno se smanjivala tijekom prvih sedam dana fermentacije, pri čemu je najniža vrijednost zabilježena sedmog dana procesa. Takav trend ukazuje na intenzivno iskorištavanje lako dostupnih ugljikohidrata za rast mikroorganizama i metaboličku aktivnost. Nakon sedmog dana zabilježeno je ponovno povećanje koncentracije reducirajućih šećera, što se može povezati s postupnom razgradnjom složenijih organskih komponenti biomase i oslobađanjem novih fermentabilnih ugljikohidrata.[40,54]

U steriliziranoj komini zabilježen je drugačiji trend, pri čemu je tijekom prva tri dana fermentacije došlo do povećanja koncentracije reducirajućih šećera, nakon čega je uslijedilo njihovo smanjenje te ponovno povećanje prema kraju procesa. Razlike između steriliziranog i nesteriliziranog sustava ukazuju na različitu dinamiku razgradnje organske tvari i iskorištavanja ugljika tijekom fermentacije. Uočeni trendovi u skladu su i s promjenama pH vrijednosti prikazanim u tablici 6, pri čemu je smanjenje koncentracije reducirajućih šećera tijekom početne faze fermentacije bilo praćeno padom pH vrijednosti, što upućuje na intenzivnu mikrobnu aktivnost i nastanak metaboličkih produkata.

Ukupno organsko opterećenje tijekom fermentacije procijenjeno je određivanjem kemijske potrošnje kisika (KPK), a dobiveni rezultati prikazani su na slici 2.



Slika 2 – Promjena količine ukupnog organskog opterećenja po gramu suhe tvari tijekom procesa fermentacije

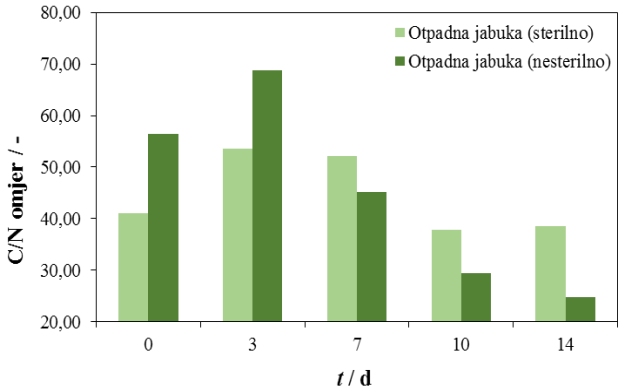
Fig. 2 – Change in total organic load *per* gram of dry matter during the fermentation process

Kemijska potrošnja kisika (KPK) predstavlja pokazatelj ukupnog organskog opterećenja sustava te omogućuje praćenje promjena u sadržaju organske tvari tijekom fermentacije.[55] Tijekom prvih deset dana fermentacije sterilizirana komina pokazivala je nešto više vrijednosti KPK u odnosu na nesteriliziranu kominu, iako su razlike bile relativno male. Promjene KPK uglavnom su pratile promjene koncentracije reducirajućih šećera, što potvrđuje povezanost između dostupnosti organskih supstrata i ukupnog organskog opterećenja sustava. Međutim, KPK ne ovisi isključivo o koncentraciji glukoze, već i o prisutnosti drugih organskih spojeva, uključujući organske kiseline, produkte mikrobnog metabolizma i strukturne komponente biomase.[55] Povećanje vrijednosti KPK u završnoj fazi fermentacije nesteriliziranog sustava može se povezati s oslobađanjem i akumulacijom organskih međuprodukata nastalih tijekom razgradnje komine.

Dobiveni rezultati ukazuju na to da se tijekom cijelog fermentacijskog procesa kontinuirano mijenjao sastav organske tvari dostupne mikroorganizmima, što je utjecalo na dinamiku rasta mikrobne zajednice i dostupnost ugljika za biosintezu PHA.

3.3.4. Praćenje promjene C/N omjera

Promjene C/N omjera tijekom SSF fermentacije praćene su radi procjene dostupnosti ugljika i dušika tijekom procesa te njihove povezanosti s biosintezom PHA. Dobiveni rezultati prikazani su na slici 3.



Slika 3 – Promjena C/N omjera tijekom procesa fermentacije

Fig. 3 – Change in C/N ratio during the fermentation process

Omjer ugljika i dušika jedan je od ključnih parametara koji utječu na rast mikroorganizama i biosintezu polihidroksialkanoata. Poznato je da se akumulacija PHA potiče u uvjetima viška ugljika i ograničene dostupnosti dušika, pri čemu dolazi do preusmjeravanja metabolizma prema sintezi pričuvnih polimera.[56,57] U oba sustava tijekom početne faze fermentacije zabilježeno je povećanje C/N omjera, pri čemu su najveće vrijednosti postignute trećeg dana procesa. Maksimalni C/N omjer iznosio je 68,82 u nesteriliziranom te 53,55 u steriliziranom supstratu. Porast C/N o

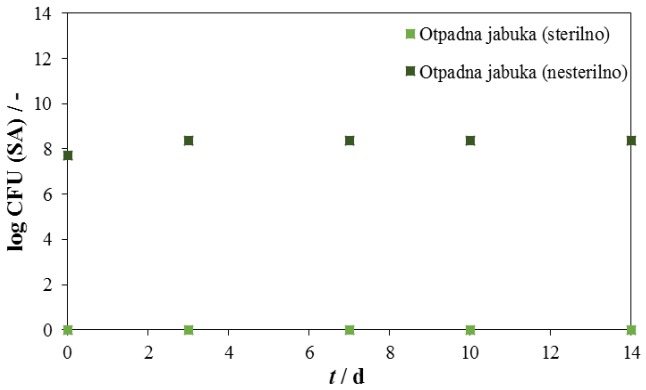
jera upućuje na promjene u dostupnosti ugljika i dušika tijekom fermentacije te na uspostavljanje uvjeta pogodnih za akumulaciju PHA.

Tijekom nastavka procesa u nesteriliziranoj komini zabilježene su izraženije promjene C/N omjera nego u steriliziranoj komini. Vrijednosti su se kretale između 24,75 i 68,82, dok su u steriliziranom sustavu varirale u užem rasponu, od 38,50 do 53,55. Veće oscilacije u nesteriliziranom supstratu mogu se povezati s prisutnošću autohtonih mikroorganizama koji dodatno utječu na dinamiku iskorištavanja ugljika i dušika tijekom fermentacije.

Dobiveni rezultati potvrđuju da su tijekom fermentacije postojali uvjeti ograničene dostupnosti dušika, koji se smatraju povoljnima za biosintezu i akumulaciju PHA.[56]

3.3.5. Praćenje promjene broja mikroorganizama

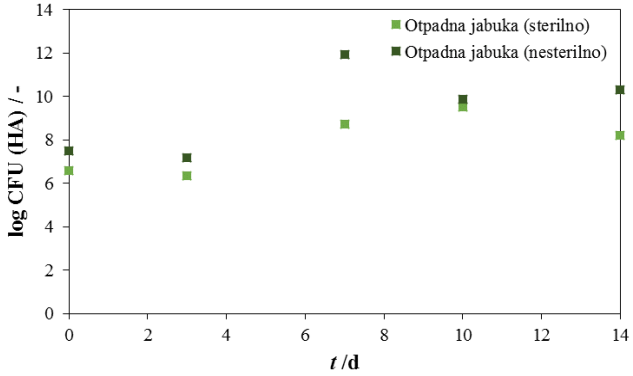
Tijekom SSF fermentacije praćene su promjene broja bakterija i gljiva da bi se procijenila dinamika mikrobne populacije tijekom procesa te njezina povezanost s promjenama fizikalno-kemijskih parametara i biosintezom PHA. Dobiveni rezultati prikazani su na slikama 4 i 5.



Slika 4 – Promjena logCFU vrijednosti gljiva u steriliziranoj i nesteriliziranoj komini

Fig. 4 – Change in fungal logCFU values in sterilised and non-sterilised pomace

Rezultati prikazani na slici 4 pokazuju da je broj gljiva u nesteriliziranoj komini tijekom fermentacije ostao relativno stabilan. U steriliziranom uzorku nije zabilježen znatniji rast gljiva, što je očekivano s obzirom na provedeni postupak sterilizacije prije inokulacije bakterijske kulture *C. necator*. Promjene broja bakterija tijekom fermentacije prikazane su na slici 5. U oba sustava zabilježene su oscilacije broja bakterijskih stanica tijekom procesa, pri čemu su vrijednosti u nesteriliziranoj komini uglavnom bile više nego u steriliziranom. Takav rezultat očekivan jer nesterilizirani sustav, uz inokuliranu kulturu *C. necator*, sadrži i autohtonu mikrobnu populaciju prisutnu u komini.



Slika 5 – Promjena logCFU vrijednosti bakterija u steriliziranoj i nesteriliziranoj komini

Fig. 5 – Change in bacterial logCFU values in sterilised and non-sterilised pomace

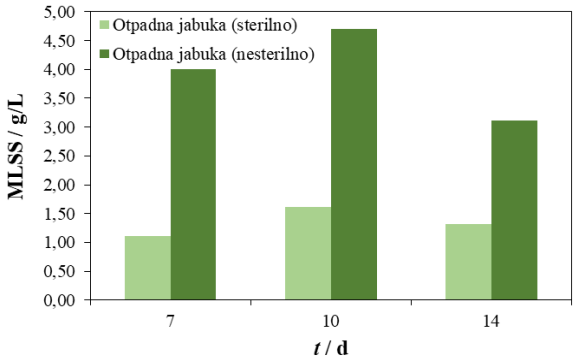
Najizraženije promjene broja bakterija zabilježene su tijekom prvih sedam dana fermentacije, što upućuje na intenzivnu prilagodbu mikroorganizama uvjetima u sustavu i dostupnosti hranjivih tvari. Početno smanjenje broja bakterija može se povezati s padom pH vrijednosti i promjenama u dostupnosti reducirajućih šećera, dok je naknadni porast broja stanica tijekom sredine fermentacije bio praćen povećanjem pH vrijednosti i promjenama u koncentraciji dostupnog ugljika. U kasnijim fazama procesa broj bakterija pokazivao je manje promjene, što upućuje na postupno uspostavljanje stabilnije mikrobne populacije.

Dobiveni rezultati potvrđuju da je tijekom cijelog procesa fermentacije održana mikrobna aktivnost u oba sustava, pri čemu su promjene bile izraženije u nesteriliziranom supstratu zbog prisutnosti autohtone mikrobne zajednice. Uočeni trendovi u skladu su s promjenama pH vrijednosti, koncentracije reducirajućih šećera i C/N omjera te potvrđuju međusobnu povezanost mikrobne aktivnosti i promjena kemijskog sastava supstrata tijekom fermentacije.

3.3.6. Praćenje promjene koncentracije suspendiranih tvari (MLSS)

Promjene koncentracije suspendiranih tvari tijekom fermentacije prikazane su na slici 6. Vrijednosti MLSS praćene su sedmog, desetog i četrnaestog dana procesa kao pokazatelj promjene količine mikrobne biomase u sustavu.

U oba sustava zabilježen je porast vrijednosti MLSS između sedmog i desetog dana fermentacije, što upućuje na povećanje količine biomase tijekom aktivne faze rasta mikroorganizama. Takav trend u skladu je s rezultatima mikrobiološke analize, koja je tijekom istog razdoblja pokazala povećanje broja bakterijskih stanica u sustavu.



Slika 6 – Promjena vrijednosti MLSS tijekom procesa fermentacije

Fig. 6 – Change in MLSS values during the fermentation process

Nakon desetog dana fermentacije zabilježeno je smanjenje vrijednosti MLSS, što može upućivati na usporavanje mikrobne aktivnosti uslijed postupnog iscrpljivanja dostupnih hranjivih tvari i promjena uvjeta u supstratu. Istodobno, tijekom završne faze fermentacije zabilježene su promjene koncentracije reducirajućih šećera, pH vrijednosti i C/N omjera, što dodatno potvrđuje da je došlo do promjena u dostupnosti supstrata za mikrobni rast.

Tijekom cijelog fermentacijskog procesa vrijednosti *MLSS* bile su više u nesterilizirano nego u steriliziranoj komini. Takav rezultat očekivan je s obzirom na prisutnost autohtone mikrobne populacije u nesterilizirano komini uz inokuliranu kulturu *C. necator*. Veće vrijednosti MLSS u nesterilizirano komini ukazuju na intenzivniji razvoj biomase i veću ukupnu biološku aktivnost tijekom fermentacije.

Dobiveni rezultati potvrđuju da je prisutnost autohtone mikrobne zajednice znatno utjecala na dinamiku razvoja biomase tijekom SSF procesa te doprinijela izraženijim promjenama fizikalno-kemijskih i mikrobioloških parametara u odnosu na sterilizirani sustav.

3.4. Karakterizacija dobivenog PHA

Kemijski sastav dobivene biomase te rezultati karakterizacije sintetiziranog PHA određeni su nakon trećeg dana fermentacije, za koji je provedena detaljna karakterizacija dobivenog polimera. Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 7.

Dobiveni PHA je ekstrahiran primjenom Soxhlet/SoxRoc ekstrakcije te kvantificiran GC-MS analizom, čime su određeni udio sintetiziranog polimera, njegova čistoća te prisutnost odabranih intermedijera biosinteze. Rezultati su pokazali da je u oba sustava došlo do akumulacije PHA, pri čemu su više vrijednosti zabilježene u nesterilizirano supstratu. Udio PHA određen ekstrakcijom iznosio je 9,71 % u nesterilizirano te 7,54 % u steriliziranom sustavu, dok su vrijednosti dobivene GC-MS analizom iznosile 3,57 %, odnosno 3,45 %. Uočena razlika između gravimetrijski određenog udjela ekstrahiranog materijala (7,5 – 9,7 %) i sadržaja PHA utvrđenog GC-MS analizom (3,4 – 3,5 %) ukazuje na to da gravimetrijskom ekstrakcijom nisu izolirani isključivo PHA polimeri. Naime, primijenjeno otapalo može istodobno ekstrahirati i druge lipofilne komponente prisutne u biomasi, poput biljnih voskova, lipida, pigmenata i drugih hidrofobnih spojeva karakterističnih za voćne komine.

Zbog toga gravimetrijska metoda odražava ukupnu masu ekstrahiranog materijala, dok GC-MS analiza nakon metanolize selektivno određuje sadržaj PHA monomera te pruža pouzdaniju procjenu stvarnog udjela polimera u biomasi.

Tablica 7 – Kemijski sastav biomase i udio PHA trećeg dana fermentacije

Table 7 – Chemical composition of biomass and PHA content on the third day of fermentation.

Kemijski sastav Chemical composition	Smjesa biomase *C. necator* i čvrste podloge na bazi otpada jabuke Mixture of *C. necator* biomass and solid media based on apple waste	
	Sterilna Sterilised	Nesterilna Non-sterilised
w(vlaga)/%	4,38 ± 0,09	4,95 ± 0,07
w(proteini)/%	13,50 ± 7,00	12,09 ± 0,23
w(slobodne masti)/%	3,46 ± 0,05	3,70 ± 0,03
w(PHA 1)/%[1]	7,54 ± 0,14	9,71 ± 0,12
w (PHA 2)/% [2]	3,45 ± 0,05	3,57 ± 0,11
Čistoća PHA/%	7,30 ± 0,65	7,37 ± 0,01
w(intermedijara biosinteze PHV (3-oxovalerat))/%	3,15 ± 1,22	0,78 ± 0,14

[1] Udio PHA određen ekstrakcijom sa SoxRoc ekstraktoru uz kloroform kao otapalo; 1 g/90 ml, analiza provođena u 3 paralele

[2] Udio PHA određen pomoću GC-MS uz kvantitativnu analizu, analiza provođena u 3 paralele

Dobiveni rezultati stoga upućuju na potrebu dodatnog pročišćavanja ekstrakta ili primjene selektivnijih postupaka ekstrakcije da bi se povećala čistoća izoliranog PHA. Nadalje, veća akumulacija PHA u nesteriliziranom sustavu može se povezati s većom mikrobnom aktivnošću zabilježenom tijekom fermentacije, što potvrđuju rezultati mikrobiološke analize i određivanja MLSS vrijednosti. Prisutnost autohtone mikrobne zajednice mogla je doprinijeti učinkovitijoj razgradnji organskih komponenti biomase te povećati dostupnost ugljikovih izvora potrebnih za biosintezu polimera. Sličan pozitivan učinak mješovitih mikrobnih zajednica na proizvodnju PHA opisan je u istraživanjima *Costa i sur*.[40] te *Martínez-Ávila i sur*.[30], koji navode da raznolikost mikrobne zajednice može povećati učinkovitost iskorištavanja složenih organskih supstrata i posljedično doprinijeti akumulaciji PHA.

Relativno nizak udio akumuliranog PHA u usporedbi s vrijednostima koje se navode u literaturi može se povezati s više čimbenika. Tijekom fermentacije zabilježene su relativno niske koncentracije reducirajućih šećera, kao i izražene promjene njihove dostupnosti tijekom procesa, što upućuje na ograničenu raspoloživost lako pristupačnih izvora ugljika. Istodobno, dobivene vrijednosti C/N omjera ukazuju na to da uvjeti fermentacije vjerojatno nisu bili optimalni za intenzivniju akumulaciju polimera. *Costa i sur*.[40] te *Liu i sur*.[41] navode da dostupnost fermentabilnih ugljikohidrata i sastav supstrata znatno utječu na prinos PHA dobivenih iz voćnog otpada. Također, *Oliveira i sur*.[31] pokazali su da se veće akumulacije PHA mogu postići optimiranjem sastava supstrata i procesnih uvjeta tijekom fermentacije na čvrstom nosaču. Poznato je da učinkovita biosinteza PHA zahtijeva odgovarajući višak ugljika uz istodobno ograničenje dušika, pri čemu i sastav supstrata te dostupnost fermentabilnih ugljikohidrata imaju važnu ulogu.[56,58–60] Stoga dobiveni rezultati upućuju na mogućnost dodatne optimizacije procesa, primjerice predobradom biomase, prilagodbom sastava hranjivih tvari ili optimiranjem uvjeta fermentacije.

Analizom je također potvrđena prisutnost 3-oksovalerata, intermedijara biosinteze polihidroksivalerata (PHV). Njegova prisutnost ukazuje na mogućnost sinteze kopolimernih oblika PHA, uključujući poli(3-hidroksibutirat-co-3-hidroksivalerat) (PHBV), što predstavlja zanimljiv smjer za daljnju optimizaciju procesa i istraživanje svojstava dobivenih biopolimera.[61,62]

4. Zaključak

Provedenim istraživanjem ispitana je mogućnost primjene otpadne komine jabuke i šljive kao sirovine za proizvodnju polihidroksialkanoata (PHA) fermentacijom na čvrstom nosaču primjenom bakterijske kulture *C. necator*. Fizikalnokemijska i mikrobiološka karakterizacija pokazala je da obje komine posjeduju svojstva pogodna za razvoj mikroorganizama i provedbu fermentacijskog procesa. Na temelju rezultata karakterizacije za daljnja istraživanja odabrana je otpadna komina jabuke.

Tijekom SSF fermentacije praćene su promjene sadržaja vlage, pH vrijednosti, električne vodljivosti, koncentracije reducirajućih šećera, C/N omjera, broja mikroorganizama i koncentracije suspendiranih tvari. U nesteriliziranom sustavu zabilježene su izraženije promjene promatranih parametara te veća mikrobna aktivnost u odnosu na sterilizirani sustav, što ukazuje na značajan utjecaj autohtone mikrobne zajednice na dinamiku fermentacijskog procesa.

Karakterizacijom dobivenog PHA potvrđena je biosinteza polimera u oba sustava, pri čemu je nesterilizirani sustav pokazao veću učinkovitost akumulacije. Najveća akumulacija PHA utvrđena je trećeg dana fermentacije, pri čemu je nesterilizirani sustav pokazao veći udio sintetiziranog polimera u odnosu na sterilizirani. Takav rezultat može se povezati s intenzivnijom mikrobnom aktivnošću i učinkovitijim iskorištavanjem organskih komponenti biomase. Analizom je također potvrđena prisutnost intermedijara biosinteze polihidroksivalerata, što upućuje na mogućnost sinteze kopolimernih oblika PHA.

Iako ostvareni prinosi PHA nisu bili visoki, rezultati istraživanja potvrđuju potencijal otpadne komine jabuke kao obnovljive sirovine za proizvodnju biorazgradivih polimera fermentacijom na čvrstom nosaču. Dobiveni rezultati predstavljaju osnovu za daljnju optimizaciju procesa, pri čemu bi buduća istraživanja trebala biti usmjerena na predobradu komine, optimizaciju sastava supstrata i procesnih uvjeta te povećanje dostupnosti izvora ugljika s ciljem postizanja većih prinosa PHA.

ZAHVALA

Ovo istraživanje provedeno je u sklopu projekta "Proizvodnja i razvoj kompostabilne ambalaže iz otpadne biomase za pakiranje industrijski prerađenih prehrambenih proizvoda" (NPOO.C3.2.R3-I1.04.0059) financiranog iz Nacionalnog plana oporavka i otpornosti (financiranog od strane Europske unije, NextGeneration EU).

Popis kratica i simbola
List of abbreviations and symbols

PHA – polihidroksialkanoat
– polyhydroxyalkanoate
PHB – polihidroksibutirat
– polihydroxybutyrate
PHBV – poli(3-hidroksibutirat-co-3-hidroksivalerat)
– poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)

scl-PHA – kratkolančani PHA
– short-chain-length PHA
mcl-PHA – srednjelančani PHA
– medium-chain-length PHA
SSF – fermentacija na čvrstom nosaču
– solid-state fermentation
SmF – submerzna fermentacija
– submerged fermentation
GC-MS – plinska kromatografija sa spektrometrijom masa
– gas chromatography–mass spectrometry
HA –hranjivi agar
– nutrient agar
SA – sladni agar
– malt agar
DNS – 3,5-dinitrosalicilna kiselina
– 3,5-dinitrosalicylic acid
KPK – kemijska potrošnja kisika
– chemical oxygen demand
CFU – ukupni broj živih stanica mikroorganizama, stanice g^{-1}
– colony forming units, cells g^{-1}
ST – suha tvar
– dry matter
VT – vlažna tvar
– moist matter
HT – hlapljiva tvar
– volatile matter
w – maseni udio, %
– mass fraction, %
m – masa, g
– mass, g
C/N omjer – omjer ugljika i dušika u supstratu
– carbon and nitrogen ratio in the substrate
$\varkappa$ – električna vodljivost, μS cm^{-1}
– conductivity, μS cm^{-1}
MLSS – ukupna suspendirana biomasa, g l^{-1}
– mixed liquor suspended solids, g l^{-1}
PHV – polihidroksivalerat
– polyhydroxyvalerate

Literatura
References

1. *P. Basnett, S. Ravi, I. Roy*, Science and Principles of Biodegradable and Bioresorbable Medical Polymers, u X. Zhang (ur.), Science and Principles of Biodegradable and Bioresorbable Medical Polymers: Materials and Properties. Vol. 1, Woodhead Publishing, Amsterdam, 2017, 257–277, doi: https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100691-7.00011-9.
2. *S. Huang, Q. Dong, S. Che, R. Li, K. H. D. Tang,* Bioplastics and biodegradable plastics: A review of recent advances, feasibility and cleaner production, Sci. Total Environ. **969** (2025) 178911, doi: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2025.178911.
3. *R. Singh, S. Gautam, B. Sharma, P. Jain, K. D. Chauhan*, Biopolymers and their classifications, u S. Thomas, S. Gopi, A. Amalraj (ur.), Biopolymers and their industrial applications. Vol. 1, Elsevier, Amsterdam, 2021, str. 21–44.
4. *M. C. Upadhye, M. C. Kuchekar, R. R. Pujari, N. U. Sable*, Biopolymers: A comprehensive review, Open Access Res. J. Sci. Technol. **4** (2022) 13–18, doi: https://doi.org/10.53022/oarjst.2022.4.1.0070.
5. *A. Arumugam, T. S. Anudakshaini, R. Shruthi, K. Jeyavishnu, S. S. Harini, J. S. Sharad,* Low-cost production of PHA using cashew apple (*Anacardium occidentale L.*) juice as potential substrate: Optimization and characterization, Biomass Convers. Biorefin. **10** (2020) 1167–1178, doi: https://doi.org/10.1007/s13399-019-00502-5.
6. *H. A. Alhafiz, K. Longus, R. A. J. Verlinden, V. Lambauer, A. Kruschitz, R. Kratzer*, Cultivation of *Cupriavidus necator* strains on hydrolyzed lignocellulosic feedstocks widely available in Europe, Biotechnol. Rep. **47** (2025) e00899, doi: https://doi.org/10.1016/j.btre.2025.e00899.
7. *M. S. Morlino, R. Serna García, F. Savio, G. Zampieri, T. Morosinotto, L. Treu, S. Campanaro*, *Cupriavidus necator* as a platform for polyhydroxyalkanoate production: An overview of strains, metabolism, and modeling approaches, Biotechnol. Adv. **69** (2023) 108264, doi: https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108264.
8. *D. H. Vu, S. Wainaina, M. J. Taherzadeh, D. Åkesson, J. A. Ferreira*, Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by *Bacillus megaterium* using food waste acidogenic fermentation-derived volatile fatty acids, Bioengineered **12** (2021) 2480–2498, doi: https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1935524.
9. *M. J. Quintero-Silva, S. J. Suárez-Rodríguez, M. A. Gamboa-Suárez, C. Blanco-Tirado, M. Y. Combariza,* Polyhydroxyalkanoates Production from Cacao Fruit Liquid Residues Using a Native *Bacillus megaterium* Strain: Preliminary Study, J. Polym. Environ. **32** (2024) 1289–1303, doi: https://doi.org/10.1007/s10924-023-03018-2.
10. *R. P. Mahato, S. Kumar, P. Singh,* Optimization of Growth Conditions to Produce Sustainable Polyhydroxyalkanoate Bioplastic by *Pseudomonas aeruginosa* EO1, Front. Microbiol. **12** (2021) 711588, doi: https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.711588.
11. *S. Kumalaningsih, N. Hidayat, N. Aini,* Optimization of Polyhydroxyalkanoates (PHA) Production from Liquid Bean Curd Waste by *Alcaligenes latus* Bacteria, J. Agric. Food Tech. **1** (2011) 63–67.
12. *E. R. Oliveira-Filho, J. G. P. Silva, M. Arjona de Macedo, M. K. Taciro, J. G. C. Gomez, L. F. Silva,* Investigating Nutrient Limitation Role on Improvement of Growth and Poly(3-Hydroxybutyrate) Accumulation by *Burkholderia sacchari* LMG 19450 from Xylose as the Sole Carbon Source, Front. Bioeng. Biotechnol. **7** (2020) 416, doi: https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00416.
13. *K. Wang, R. Zhang,* Production of Polyhydroxyalkanoates (PHA) by *Haloferax mediterranei* from Food Waste Derived Nutrients for Biodegradable Plastic Applications, J. Microbiol. Biotechnol. **31** (2021) 338–347, doi: https://doi.org/10.4014/jmb.2008.08057.
14. *D. Alsafadi, J. S. Aljariri Alhesan, A. Mansoura, S. Oqdeha,* Production of polyhydroxyalkanoate from sesame seed wastewater by sequencing batch reactor cultivation process of *Haloferax mediterranei*, Arab. J. Chem. **16** (2023) 104584, doi: https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2023.104584.
15. *S. P. Rodge, M. J. Dhanavade, S. C. Kajale, N. P. Patil,* A polyhydroxyalkanoate synthesized by halophilic archaeon *Natrialba swarupiae*, Environ. Sci.: Adv. **2** (2023) 990–1000, doi: https://doi.org/10.1039/d3va00091e.
16. *A. Pramanik, A. Mitra, M. Arumugam, A. Bhattacharyya, S. Sadhukhan, A. Ray, S. Haldar, U. K. Mukhopadhyay, J. Mukher-*

jee, Utilization of vinasse for the production of polyhydroxybutyrate by *Haloarcula marismortui*, Folia Microbiologica **57** (2012) 71–79, doi: https://doi.org/10.1007/s12223-011-0092-3.
17. *T. R. Harrison, V. K. Gupta, P. Alam, A. W. Perriman, F. Scarpa, V. K. Thakur*, From trash to treasure: Sourcing high-value, sustainable cellulosic materials from living bioreactor waste streams, Int. J. Biol. Macromol. **233** (2023) 123511, doi: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123511.
18. *P. Xu, L. Shu, Y. Li, S. Zhou, G. Zhang, Y. Wu, Z. Yang*, Pretreatment and composting technology of agricultural organic waste for sustainable agricultural development, Heliyon **9** (2023) e16311, doi: https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e16311.
19. *O. Awogbemi, D. V. Von Kallon,* Pretreatment techniques for agricultural waste, Case Stud. Chem. Environ. Eng. **6** (2022) 100229, doi: https://doi.org/10.1016/j.cscee.2022.100229.
20. *R. S. Kumar Sachan, Sachan, I. Devgon, V. Sharma, K. Pereen, N. A. Bukhari, J. A. Alsulami, V. Singh Jadon, D. C. Suyal, A. Karnwal,* Investigating chemical pre-treatment methods: Valorization of wheat straw to enhance polyhydroxyalkanoate (PHA) production with novel isolate Bacillus paranthracis RSKS-3, Heliyon **10** (2024) e31572, doi: https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e31572.
21. *V. Gowda, S. Shivakumar,* Agrowaste-based Polyhydroxyalkanoate (PHA) production using hydrolytic potential of *Bacillus thuringiensis* IAM 12077, Braz. Arch. Biol. Tech. **57** (2014) 55–61, doi: https://doi.org/10.1590/S1516-89132014000100009.
22. *B. K. Tello-Cruzado, M. Azañedo-Vargas, C. E. Quiñones-Cerna, A. Fuentes-Olivera, J. C. Rodríguez-Soto, M. A. Quezada-Alvarez, J. A. Cruz-Monzon,* Use of Enzymatic Hydrolysate from Agroindustrial Asparagus Waste as Substrate for the Production of Polyhydroxyalkanoate by *Bacillus thuringiensis*, Environ. Res. Eng. Manag. **80** (2024) 8–16, doi: https://doi.org/10.5755/j01.erem.80.2.34237.
23. *R. Andler, C. Valdés, V. Urtuvia, C. Andreeßen, A. Díaz-Barrera*, Fruit residues as a sustainable feedstock for the production of bacterial polyhydroxyalkanoates, J. Clean. Prod. **307** (2021) 127236, doi: https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.127236.
24. *A. L. Woiciechowski, S. G. Karp, K. Sobral, J. C. de Carvalho, L. A. Junior Letti, V. T. Soccol, C. R. Soccol,* Pretreatment Strategies to Enhance Value Addition of Agro-industrial wastes, u S. K. Brar, G. S. Dhillon, C. R. Soccol (ur.), Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals, Vol. 1, Springer, New York, 2014, 29–49.
25. *G. O. Locatelli, L. Finkler, C. L. L. Finkler,* Comparison of acid and enzymatic hydrolysis of pectin, as inexpensive source to cell growth of *Cupriavidus necator*, An. Acad. Bras. Cienc. **91** (2019) e20180333, doi: https://doi.org/10.1590/0001-3765201920180333.
26. *M. Koller*, A Review on Established and Emerging Fermentation Schemes for Microbial Production of Polyhydroxyalkanoate (PHA) Biopolyesters, Fermentation, **4** (2018) 1–30, doi: https://doi.org/10.3390/fermentation4020030.
27. *S. Rodríguez-Couto, M. A. Sanromán*, Application of solid-state fermentation to food industry – A review, J. Food Eng. **76** (2006) 291–302, doi: https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.05.022.
28. *O. Martínez-Avila, J. Llimós, S. Ponsá*, Integrated solid-state enzymatic hydrolysis and solid-state fermentation for producing sustainable polyhydroxyalkanoates f low-cost agro-industrial residues, Food Bioprod. Process. **126** (2021) 334–344, doi: https://doi.org/10.1016/j.fbp.2021.01.015.
29. *R. Sindhu, A. Pandey, P. Binod*, Solid-state Fermentation for the Production of Poly(hydroxyalkanoates), Chem. Biochem. Eng. Q. **29** (2015) 173–181, doi: https://doi.org/10.15255/CABEQ.2014.2256.
30. *O. Martínez-Ávila, L. Llenas, S. Ponsá*, Sustainable polyhydroxyalkanoates production via solid-state fermentation: Influence of the operational parameters and scaling up of the process, Food Bioprod. Process. **132** (2022) 13–22, doi: https://doi.org/10.1016/j.fbp.2021.12.002.
31. *S. Saeed, S. Firyal, M. Tayyab, M. Irfan, A. Mohy Ud Din, T. Mehmood*, Bioconversion of apple peels (*Malus domestica*) to polyhydroxybutyrate using statistical design to optimize process parameters through *Bacillus thuringiensis* via solid-state fermentation, Biomass Conv. Bioref. **14** (2024) 4273–4281, doi: https://doi.org/10.1007/s13399-022-02762-0.
32. *F. C. Oliveira, D. M. G. Freire, L. R. Castilho,* Production of poly(3-hydroxybutyrate) by solid-state fermentation with *Ralstonia eutropha*, Biotechnol. Lett. **26** (2004) 1851–1855, doi: https://doi.org/10.1007/s10529-004-5315-0.
33. *J. W. Palmer, F. R. Harker, D. S. Tustin, J. Johnston*, Fruit dry matter concentration: a new quality metric for apples, J. Sci. Food Agric. **90** (2010) 2586–2594, doi: https://doi.org/10.1002/jsfa.4125.
34. *L. Guardia, L. Suárez, N. Querejeta, R. Rodríguez Madrera, B. Suárez, T. A. Centeno*, Apple Waste: A Sustainable Source of Carbon Materials and Valuable Compounds, ACS Sustain. Chem. Eng. **7** (2019) 17335–17343, doi: https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b04266.
35. *Z. Nasreen, J. I. Qazi*, Lab scale composting of fruits and vegetable waste at elevated temperature and forced aeration, Pak. J. Zool. **44** (2012) 1285–1290.
36. *K. Muzaffar, S. A. Sofi, S. A. Mir* (Eds.), Handbook of Fruit Wastes and By-Products Chemistry, Processing Technology, and Utilization, CRC Press, Boca Raton, 2023, str. 209–223.
37. *V. R. Preedy, R. R. Watson, V. B. Patel* (Eds.), Flour and Breads and Their Fortification in Health and Disease Prevention, Academic Press, Cambridge, 2011., 395–405.
38. *C. Ghinea, L. C. Apostol, A. E. Prisacaru, A. Leahu*, Development of a model for food waste composting, Environ. Sci. Pollut. Res. **26** (2019) 4056–4069, doi: https://doi.org/10.1007/s11356-018-3939-1.
39. *R. P. Feliciano, C. Antunes, A. Ramos, A. T. Serra, M. E. Figueira, C. M. M. Duarte, A. de Carvalho, M. R. Bronze*, Characterization of traditional and exotic apple varieties from Portugal. Part 1 – Nutritional, phytochemical and sensory evaluation, J. Funct. Food. **2** (2010) 35–45, doi: https://doi.org/10.1016/j.jff.2009.12.004.
40. *P. Costa, M. Basaglia, S. Casella, L. Favaro*, Polyhydroxyalkanoate Production from Fruit and Vegetable Waste Processing, Polymers **14** (2022) 5529, doi: https://doi.org/10.3390/polym14245529.
41. *H. Liu, V. Kumar, L. Jia, S. Sarsaiya, D. Kumar, A. Juneja, Z. Zhang, R. Sindhu, P. Binod, S. K. Bhatia, M. K. Awasthi*, Biopolymer poly-hydroxyalkanoates (PHA) production from apple industrial waste residues: A review, Chemosphere **284** (2021) 131427, doi: https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131427.

42. *G. Mawari, N. Kumar, S. Sarkar, M. K. Daga, M. M. Singh, T. K. Joshi, N. A. Khan*, Heavy Metal Accumulation in Fruits and Vegetables and Human Health Risk Assessment: Findings From Maharashtra, India, Environ. Health Insights **16** (2022) 1–15, doi: https://doi.org/10.1177/11786302221119151.
43. *H. Zhou, Y.-Y. Hu, Z.-X. Tang, Z.-B. Jiang, J. Huang, T. Zhang, H.-Y. Shen, X.-P. Ye, X.-Y. Huang, X. Wang, T. Zhou, X.-L. Bai, Q. Zhu, L.-E. Shi*, Calcium Transport and Enrichment in Microorganisms: A Review, Foods **13** (2024) 3612, doi: https://doi.org/10.3390/foods13223612.
44. *J. Stautz, Y. Hellmich, M. F. Fuss, J. M. Silberberg, J. R. Devlin, R. B. Stockbridge, I. Hänelt,* Molecular Mechanisms for Bacterial Potassium Homeostasis. J. Mol. Biol. **433** (2021) 166968–166992, doi: https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.166968.
45. *D. Bayo, O. Adeniyi, A. Adeniyi, O. Ariwoola*, Heavy Metal Concentration and Health Risk Assessment of Selected Fruits Sold in Jos Metropolis, Adv. Chem. Res. **3** (2021) 1–15, doi: https://doi.org/10.21926/acr.2102013.
46. *Y. Bösch, E. Britt, S. Perren, A. Naef, J. E. Frey, A. Bühlmann*, Dynamics of the Apple Fruit Microbiome after Harvest and Implications for Fruit Quality, Microorganisms **9** (2021) 272, doi: https://doi.org/10.3390/microorganisms9020272.
47. *A. Abdelfattah, S. Freilich, R. Bartuv, V. Y. Zhimo, A. Kumar, A. Biasi, S. Salim, O. Feygenberg, E. Burchard, C. Dardick, J. Liu, A. Khan, W. Ellouze, S. Ali, D. Spadaro, R. Torres, N. Teixido, O. Ozkaya, A. Buehlmann, S. Vero, P. Mondino, G. Berg, M. Wisniewski, S. Droby*, Global analysis of the apple fruit microbiome: are all apples the same?, Environ. Microbiol. **23** (2021) 6038–6055, doi: https://doi.org/10.1111/1462-2920.15469.
48. *L. F. Diaz, M. De Bertoldi, W. Bidlingmier, E. Stentiford*, Compost Science and Technology, Elsevier, Amsterdam, 2007, str. 25–48.
49. *J. E. Hallsworth,* Water is a preservative of microbes, Microb. Biotechnol. **15** (2022) 191–214, doi: https://doi.org/10.1111/1751-7915.13980.
50. *G. Y. Lee, W. Li, U. M. Chirwa, J. Shi,* Effect of Substrate Characteristics on the Growth and Sporulation of Two Biocontrol Microorganisms during Solid State Cultivation, Fermentation **6** (2020) 69, doi: https://doi.org/10.3390/fermentation6030069.
51. *A. Amer, Y. Kim,* Minimizing the Lag Phase of *Cupriavidus necator* Growth under Autotrophic, Heterotrophic, and Mixotrophic Conditions, Appl. Environ. Microbiol. **89** (2023) e02007-22, doi: https://doi.org/10.1128/aem.02007-22.
52. *P. M. Doran,* Bioprocess Engineering Principles, Elsevier, Amsterdam, 1995., str. 344–347.
53. *J. M. Jay, M. J. Loessner, D. A. Golden,* Modern Food Microbiology, Springer, New York, 2005, str. 39–56.
54. *D. H. Vu, A. Mahboubi, A. Root, I. Heinmaa, M. J. Taherzadeh, D. Åkesson,* Thorough Investigation of the Effects of Cultivation Factors on Polyhydroalkanoates (PHAs) Production by Cupriavidus necator from Food Waste-Derived Volatile Fatty Acids, Fermentation **8** (2022) 603, doi: https://doi.org/10.3390/fermentation8110605.
55. *Metcalf, Eddy, Inc.,* Wastewater Engineering, Treatment and Reuse, McGraw-Hill Companies Inc., New York, 2003., str. 93–95.
56. *W. Zhou, D. I. Colpa, B. Geurkink, G. J. W. Euverink, J. Krooneman,* The impact of carbon to nitrogen ratios and pH on the microbial prevalence and polyhydroxybutyrate production levels using a mixed microbial starter culture, Sci. Total Environ. **811** (2022) 152341, doi: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152341.
57. *L. Urbina, P. Wongsirichot, M. Á. Corcuera, N. Gabilondo, A. Eceiza, J. Winterburn, A. Retegi,* Application of cider by-products for medium chain length polyhydroxyalkanoate production by *Pseudomonas putida* KT2440, Eur. Polym. J. **108** (2018) 1–9, doi: https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.08.020.
58. *N. J. Russell, G. W. Gould*, Food Preservatives, Springer, New York, 2003, 300–303.
59. *N. K. Singh, A. Chattopadhyay, E. Lichtfouse*, Sustainable Agriculture Reviews 60, Microbial Processes in Agriculture, Springer, London, 2023., str. 47–440.
60. *G. Kutralam-Muniasamy, F. Pérez-Guevara,* Genome characteristics dictate poly-R-(3)- hydroxyalkanoate production in *Cupriavidus necator* H16, World J Microbiol Biotechnol. **34** (2018) 1–23, doi: https://doi.org/10.1007/s11274-018-2460-5.
61. *T. Abate, C. Amabile, R. Muñoz, S. Chianese, D. Musmarra*, Polyhydroxyalkanoate recovery overview: properties, characterizations, and extraction strategies, Chemosphere **356** (2024) 141950, doi: https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.141950.
62. *H. Al Battashi, S. Al-Kindi, V. K. Gupta, N. Sivakumar*, Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production Using Volatile Fatty Acids Derived from the Anaerobic Digestion of Waste Paper, J. Polym. Environ. **29** (2021) 250–259, doi: https://doi.org/10.1007/s10924-020-01870-0.

SUMMARY

Utilisation of Waste Apple and Plum Pomace for Polyhydroxyalkanoate Production by Solid-State Fermentation

Laura Jaklenec,[a] *Karlo Grgurević*,[a] *Anja Rakas*,[a] *Dora Bramberger*,[a] *Lidija Furač*,[a] *Matija Cvetnić*,[a] *Stela Jokić*,[b] *Krunoslav Aladić*,[b] *Ivica Strelec*,[b] *Jasmina Ranilović*,[c] and *Dajana Kučić Grgić*[a]*

This study investigated the potential application of waste apple and plum pomace as substrates for the production of polyhydroxyalkanoates (PHAs). The waste pomace was first subjected to physicochemical and microbiological characterisation, after which apple pomace was selected as the more suitable substrate for further investigation. Fermentation experiments were conducted using the bacterial strain *Cupriavidus necator* and a mixed microbial culture, while changes in the physicochemical and microbiological properties of the system were monitored throughout the process. Following fermentation, PHAs were extracted using a SoxRoc extraction procedure, and the extracted polymers were subsequently identified and quantified by gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS). The highest PHA accumulation during the fermentation process was observed after three days. GC-MS analysis revealed maximum PHA contents of 3.45 and 3.57 % in the sterilised and non-sterilised systems, respectively. These results confirm that waste apple pomace represents a promising substrate for PHA production via solid-state fermentation. However, further optimisation of process conditions and pomace pretreatment is required to achieve higher PHA yields.

Keywords

Polyhydroxyalkanoate (PHA), apple pomace, plum pomace, SSF, Cupriavidus necator, Soxhlet extraction, GC-MS

[a] *University of Zagreb Faculty of Chemical Engineering and Technology, Trg Marka Marulića 19, Zagreb, Croatia*
[b] *J. J. Strossmayer University of Osijeku, Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 18, 31 000 Osijek, Croatia*
[c] *Podravka d. d., Ul. Ante Starčevića 32, 48 000 Koprivnica, Croatia*

Original scientific paper
Received June 15, 2026
Accepted July 26, 2026