

MATERIJALNA OPORABA MULJA S UREĐAJA ZA PROČIŠĆAVANJE OTPADNIH VODA

dr. sc. Stanka Zrnčević red. prof. u miru
Sveučilište u Zagrebu
Fakultet kemijjskog
inženjerstva i tehnologije,
Marulićev trg 19, Zagreb, Hrvatska
szrnce@fkit.hr

Komunalni mulj nastao tijekom pročišćavanja otpadnih voda predstavlja značajan, još uvijek nedovoljno iskorišten potencijal kao sirovina u kružnom gospodarstvu. Prikladnim biorafinerijskim pristupom moguće je potaknuti oporavak različitih biospojeva konvertirajući mulj u vrijedan resurs što je u skladu s globalnom tendencijom očuvanja okoliša i pretvaranja otpada u korisne proizvode koji mogu naći svoju primjenu u različitim industrijskim granama.

Oporaba hlapivih masnih kiselina, plastike, proteina, enzima i pesticida samo su neki od mogućih načina materijalne valorizacije mulja. Stoga su u radu prikazana istraživanja vezana uz njihovu proizvodnju i moguću primjenu te su navedeni čimbenici o kojima ovisi učinkovitost procesa. Također je donesen pregled njihova sastava i svojstava te ograničenja i perspektive vezane za proizvodnju spomenutih biospojeva. Detaljno su opisane značajke različitih procesa materijalne uporabe mulja te su navedeni podaci o njihovoj učinkovitosti, izvedivosti te trenutnom statusu. Cilj je ukazati na nova saznanja vezana uz razvoj održivih praksi gospodarenja muljem te promicanju principa kružne bioekonomije u području obrade otpadnih voda.

Ključne riječi: mulj; biorafinerija; oporavak biospojeva; VFA; bioplastika; proteini; enzimi; biopesticidi

1. UVOD

Obrada i zbrinjavanje viška mulja koji nastaje tijekom pročišćavanja otpadnih voda sve je aktualniji problem današnjice zbog ekoloških, ekonomskih i regulatornih razloga. Uz sve intenzivniju izgradnju uređaja za pročišćavanje otpadnih voda (UPOV-a) proizvodnja mulja kao sporednog proizvoda sve se više povećava, a mulj je sve složenijeg sastava (Vouk i dr. 2011; Sellier i dr. 2022; Mazzeo i dr. 2023). Premda u literaturi ne postoji suglasnost o globalnoj proizvodnji mulja, procjenjuje se da će ona u budućnosti rasti s današnjih ~ 53 MT s.t. do ~ 160 MT s.t. ako će se proizvedena otpadna voda obrađivati do istog nivoa kao u EU-27 (Feng i dr. 2023). Također se navodi da je gospodarenje otpadnom vodom i muljem odgovorno za emisiju 257 Mt CO₂-eq što približno iznosi 1,3 % globalne emisije stakleničkih

plinova (Lambiasi i dr. 2024). Troškovi obrade i zbrinjavanja mulja također su visoki i mogu iznositi između 20 i 60 % ukupnih operativnih troškova UPOV-a (Fiori i dr. 2023). Procijenjeno je da su u 2022. godini troškovi gospodarenja muljem na globalnoj razini iznosili 15,5 milijardi USD te da će narednih godina i nadalje rasti (GWI 2023). Očito je, da proizvodnja velikih količina mulja te visoki troškovi obrade i zbrinjavanja postaju problem kojeg treba riješiti u skladu s principima hijerarhije otpada i kružnog gospodarstva kako bi se nadvladali problemi vezani uz zaštitu okoliša te proizvela energija i drugi vrijedni resursi (Gusiatin i dr. 2024). Valorizacija mulja kao sirovine može značajno doprinijeti smanjenju emisija stakleničkih plinova te poboljšati ekonomsku učinkovitost UPOV-a. Ovakvo gospodarenje muljem u skladu je sa Zelenim planom

europske komisije koji postavlja okvir za postizanje klimatske neutralnosti u EU do 2050. godine te za poticanje zelene tranzicije i gospodarskog rasta odvojenog od korištenja prirodnih resursa (EC 2019). Mulj koji se generira na UPOV-u nastaje kao nusprodukt akumulacije krutih tvari tijekom fizikalnih, bioloških i kemijskih procesa pročišćavanja otpadnih voda. Obično se sastoji od šest grupa tvari: (1) netoksičnih ugljikovih spojeva (~ 60 % s.t.) uključujući izvanstanične proteine i polisaharide bilo u čistom obliku ili vezane s drugim spojevima kao što su glikoproteini, ramnolipidi, Kjeldahl-lipoproteini te spojeve koji sadrže fosfor; (2) teških metala poput Zn, Pb, Cu, Cr, Ni, Cd, Hg i As (~ 0,5–2,0 % TS); (3) toksičnih organskih spojeva primjerice PCBs, PAHs, dioksina, pesticida, endokrinih disruptora, linearnih alkil sulfonata i dr.; (4) bakterija i drugih viših organizama, patogenih mikroorganizma te pridruženih mikrobnih metabolita; (5) anorganskih spojeva poput silikata, aluminata te spojeva kalcija i magnezija te (6) vode od nekoliko postotaka do > 95 %. Konačne značajke proizvedenog mulja ovise o sastav i tipu ulazne otpadne vode koja značajno ovisi o geografskom položaju, priključenosti i navikama stanovništva, kao i o priključku i vrstama industrijskih i drugih djelatnosti te o stupnju pročišćavanja vode.

Premda sadrži različita onečišćenja, zbog visokog sadržaja vrijednih organskih i anorganskih tvari, mulj se može smatrati potencijalnom sirovinom za proizvodnju energije i bioprodukata transformirajući UPOV u biorafineriju (Zhang i dr. 2018; Cecconet i Capodaglio 2022). Procesi koji se najčešće koriste za valorizaciju mulja usredotočeni su uglavnom na potpunu oksidaciju mulja i proizvodnju biogoriva (Bora i dr. 2020; Liu i dr. 2020; Yadav 2020; Zrnčević 2023). Međutim, takav pristup dovodi do gubitka visokovrijednih biospojeva prisutnih u mulju. Prikladnim biorafinerijskim pristupom u kojem ekstrakcija i proizvodnja biospojeva ima veći prioritet nego proizvodnja bioenergije može se omogućiti oporavak različitih spojeva poput hlapivih masnih kiselina, bioplastike, proteina, enzima, lipida ili biopesticida konvertirajući mulj u vrijedan resurs (Raheem i dr. 2018; Cecconet i Capodaglio 2022; Núñez i dr. 2022). Da je njihovo izdvajanje ekonomski interesantno i bitno za održivo gospodarenje muljem ukazuje i njihova tržišna vrijednost koja je u 2020. godini iznosila 200 milijardi USD. Predviđa se da će u narednim godinama veličina tržišta biospojeva i nadalje rasti zbog njihove velike primjene u prehrambenoj, farmaceutskoj, medicinskoj, kozmetičkoj i drugim industrijama. Izdvajanjem biospojeva iz mulja može se povećati održivost i profitabilnost poslovanja UPOV-a transformirajući ga u uređaj za proizvodnju visokovrijednih spojeva - biorafineriju (Pott i dr. 2018; Furness i dr. 2021; Lebonnois i dr. 2022).

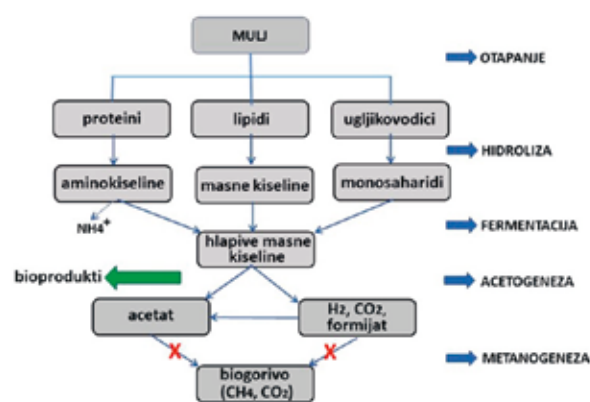
Stoga je glavni cilj ovoga rada ukazati na vrijednost mulja nastalog pročišćavanjem otpadnih voda kao vrijedne sirovine za proizvodnju različitih korisnih biospojeva, dati pregled njihovog sastava i svojstava,

prikazati istraživanja vezana uz njihovu proizvodnju i primjenu u različitim industrijskim granama te na taj način doprinijeti razvoju održivog gospodarenja muljem i promoviranju principa kružne bioekonomije u području obrade otpadnih voda.

2. IZDVAJANJE BIOSPOJEVA IZ MULJA

2.1. Hlapive masne kiseline

Anaerobna digestija smatra se učinkovitim rješenjem za upravljanje velikim količinama mulja smanjujući njegov volumen te omogućavajući proizvodnju metana (i/ili vodika) pridonoseći održivom energetsom portfelju EU (Capodaglio i dr., 2016; IEA, 2023; Zrnčević 2023). Međutim, proces koji se odvija u četiri koraka ne mora u konačnici završiti proizvodnjom bioplina/CH₄ (slika 1).



Slika 1: Anaerobna digestija mulja kojom se proizvodi VFAs umjesto bioplina (modificirano prema Capodaglio i dr., 2016).

Inhibicijom završnog koraka (metanogeneze) kao konačni produkt procesa nastaje smjesa hlapivih masnih kiselina (VFA, engl. Volatile Fatty Acid) koje uključuju octenu, propionsku, maslačnu, kaprionsku te valerijansku kiselinu koje su ključni prekursori u konceptu biorafinerije (Kleerebezem i dr. 2015; Janesch i dr. 2021). Spomenute kiseline i njihovi derivati igraju značajnu ulogu u medicini, poljoprivredi, prehrambenoj, farmaceutskoj i drugim industrijama. Mogu se primjerice koristiti kao prekursori za proizvodnju biopolimera, premaza, ljepila i lijekova, kao otapala, dodaci hrani te antimikrobna i aromatizirajuća sredstva (Al Battashi i dr. 2021; Patel i dr. 2021; Szacherska i dr. 2021; Agnifotri i dr. 2023). Također mogu poslužiti kao jeftin (za razliku od kemijski proizvedenih VFAs iz fosilnih goriva) vanjski izvori ugljika za biološko uklanjanje hranjivih tvari iz otpadnih voda (Parchami i dr., 2020; Salamah i Randall, 2020). Radi visokog omjera O:C (u rasponu 1:1 – 2:5) te male gustoće energije, VFAs su neprikladne kao gorivo, međutim, mogu poslužiti kao prekursori za proizvodnju biogoriva, primjerice bioetanola, biobutanola i vodika (Agnihotri i dr. 2022). Da je proizvodnja VFAs iz mulja ekonomski isplativija od proizvodnje metana ukazuje i profit koji u prvom slučaju iznosi 296 USD t⁻¹ VS dok je u drugom slučaju znatno manji i iznosi svega 19 USD t⁻¹ VS (Veluswamy i dr. 2021; Owusu-Agyeman i dr. 2023).

Tablica 1: Predobrada mulja za porast iskorištenja na VFA

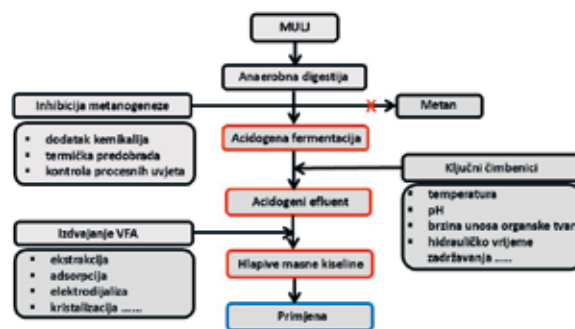
Vrsta predobrade	Uvjeti	Rezultat	Literatura
Kationska izmjena (KI)	$c(KI) = 1,75 \text{ g / g mulja}$, $t = 4 \text{ d}$, uklanjanje (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} itd.) iz mulja	$I = 334,5 \text{ mg KPK/g VSS}$ (porast iskorištenja za 230 %)	(Pang i dr. 2021)
K_2FeO_4	$c(Fe(VI)) = 0,2 \text{ g / g TSS}$, HRT = 5 d	$I = 4823 \text{ mg KPK/dm}^3$ (porast iskorištenja 28,3 x veći nego bez predobrade)	(Qiao i dr. 2022)
Na citrat + temperatura	$c(Na\text{-citrata}) = 0,3 \text{ g / g TSS}$, $T = 121 \text{ }^\circ\text{C}$, $t = 30 \text{ min}$	$I = 354,5 \text{ mg KPK / g VSS}$ (16,4 x veće nego bez predobrade)	(Fang i dr. 2022)
Urea – H_2O_2 (UHP)	$c(UHP) = 4 \text{ mmol / g VSS}$, $t = 1 \text{ h}$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$	$c(VFA) = 7527,3 \text{ mg / dm}^3$ (porast konc. 7 x)	(Wang i dr. 2023)
$KMnO_4$	$c(KMnO_4) = 0,1 \text{ g / g TSS}$, $pH = 10$, $t = 13 \text{ d}$	$I = 1083 \text{ mg KPK / dm}^3$ (porast iskorištenja 45200%)	(Mineo i dr. 2024)
N,N-bis (karboksimetil)-L-glumat (GLDA)	$c(GELDA) = 200 \text{ mmol / kg VSS}$ $T = 35 \text{ }^\circ\text{C}$, $t = 16 \text{ d}$	$I = 2391 \text{ mg KPK / dm}^3$ (porast iskorištenja 64 %)	(Liu i dr. 2024)

Na acidogenu fermentaciju kojom nastaju kratkolančane VFAs utječu različiti čimbenici poput pH, temperature, tipa inokuluma, hidrauličkog vremena zadržavanja (HRT, engl. Hydraulic Retention Time) i brzine unosa organske tvari (OLR, engl. Organic Loading Rate) o kojima ovisi iskorištenje na VFAs i raspodjela tekućih metabolita (Sanchez-Ledesma i dr. 2023). Ti se čimbenici moraju optimirati kako bi se u znatnoj mjeri poboljšala učinkovitost fermentacije te postigla selektivna proizvodnja specifičnih masnih kiselina uz istovremeno smanjenje cijene procesa i utroška energije (Parchami i dr. 2020). Kako se vidi iz tablice 1 odgovarajućom predobradom mulja može se povećati iskorištenje na VFAs. Također se poboljšava odvodnjavanje mulja čime se smanjuju operativni troškovi UPOV-a za naknadno odlaganje ovog otpadnog materijala. Nadalje, akumulacijom VFAs u digestoru smanjuje se pH fermentacijske juhe te se na taj način inhibira proces metanogeneze čime se povećava iskorištenje na kiselinama (Ramos-Suarez i dr. 2021; Al-Sulaimi i dr. 2022). Korištenjem inhibitora poput 2-bromometansulfonata (BES) i 2-merkaptotetansulfonata (MES) također je moguće inhibirati stupanj metanogeneze te na taj način pospješiti proizvodnju VFAs (Lukitawesa i dr. 2019).

Premda se u većini radova acidogena fermentacija mulja izučava u laboratorijskim reaktorima iz tablice 2 se može vidjeti da se obećavajuće iskorištenje na VFAs može postići i provođenjem procesa u pilotnom reaktoru (engl. pilot scale reactor) kao i u reaktoru punog mjerila (engl. full scale reactor).

Izazovi vezani uz izdvajanje VFA iz mulja uključuju: trošak obrade VFA koja iznosi približno 30 – 40 % ukupnih troškova njihove proizvodnje, složenost smjese fermentacijske juhe te niska koncentracija VFA u juhi (Yesil i dr. 2020). Nadalje, prisutnost suspendiranih krutina uključujući stanice mikroorganizama (MO) i anorganske precipitate može utjecati na koeficijent prijenosa tvari u koraku oporavka VFA. Stoga, je iz juhe potrebno ukloniti čvrste tvari kako bi se poboljšala učinkovitost oporavka (Aghapour i dr. 2020). Pritom se za izdvajanje VFA iz juhe

koriste različite tehnike poput ekstrakcije, adsorpcije, elektrodijalize, membranske pervaporacije te izdvajanje korištenjem membranskog kontraktora i anaerobnog membranskog reaktora. Među spomenutim tehnikama, membranske metode pokazale su se kao obećavajuće budući mogu ublažiti inhibirajući efekt nastao zbog akumulacije VFA u reaktoru, smanjiti broj operativnih koraka, učiniti acidogeni fermentacijski proces mnogo stabilnijim te na ta način povećati iskorištenje na VFA (Aghapour Aktij i dr. 2020; Sukphun i dr. 2021). Na slici 2 dan je prikaz oporavka VFA iz mulja acidogenom fermentacijom.



Slika 2: Izdvajanje hlapivih masnih kiselina acidogenom fermentacijom mulja.

2.2. Polihidroksialkanoati

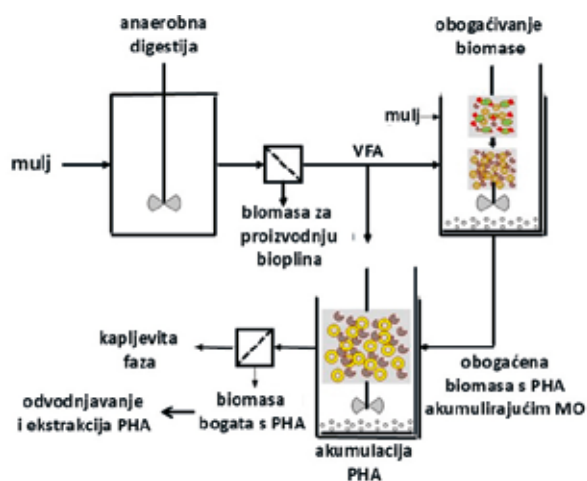
Polihidroksialkanoati (PHA) su grupa prirodnih poliestara koje bakterije obično akumuliraju u uvjetima nutritivnog stresa kao što je suvišak ugljika te nedostatak drugih vitalnih nutrijenata poput kisika, dušika ili fosfora (Minneo i dr. 2023). U odnosu na druge plastike odlikuje ih brža biorazgradivost (prilikom razgradnje količina oslobođenog CO_2 može biti i do 70 % niža u odnosu na plastiku proizvedenu iz nafte), biokompatibilnost, netoksičnost, termoplastičnost, a za njihovu proizvodnju rabe se obnovljivi izvori biološkog podrijetla. Koriste se u prehrambenoj, poljoprivrednoj i farmaceutskoj industriji te u medicini kao materijal za pakiranje, folije za zaštitu usjeva, inkapsulaciju sjemena i gnojiva, kao biomedicinski implantacijski materijali u

Tablica 2: Proizvodnja VFA u laboratorijskom, pilotnom i punom mjerilu.

Skala/Mulj	Uvjeti	Proizvodnja VFA	Sastav kiselina, %				Literatura
			Octena	Propionska	Maslačna	Valerijanska	
laboratorijski CSTR/ primarni	pH = 5, $T = 24^{\circ}\text{C}$, HRT = 4 d	$I = 168 \text{ mg KPK}_{\text{VFAs}}/\text{g VSS}$	30	28	17	11	(Kurniawan i dr. 2016)
laboratorijski šaržni reaktori/primarni	$T = 20^{\circ}\text{C}$, $t = 10 \text{ d}$, pH = 10 (0,4 M NaOH/dm ³)	$I = 1134 \text{ mg KPK}_{\text{VFAs}}/\text{dm}^3\text{VSS}$	40	10	9	11	(Duan i dr. 2020)
		$I = 2258 \text{ mg KPK}_{\text{VFAs}}/\text{dm}^3\text{VSS}$ (uz predobradu)	51	11	18	10	
laboratorijski šaržni reaktor/primarni	$T = 35^{\circ}\text{C}$, $t = 10 \text{ d}$, pH = 9,5 (500 mg Na ₂ SO ₃ /dm ³)	$I = 50 \text{ mg KPK}_{\text{VFAs}}/\text{g VSS}$	32	30	12	15	(Liu i dr. 2020)
		$I = 324,8 \text{ mg KPK}_{\text{VFAs}}/\text{g VSS}$ (uz predobradu)	52	20	13	7	
laboratorijski šaržni reaktor/sekundarni	$t = 1 \text{ d}$, $T = 25^{\circ}\text{C}$ (4 mmol urea+ H ₂ O ₂ /g VSS)	$I = 520 \text{ mg KPK}_{\text{VFAs}}/\text{dm}^3\text{VSS}$	38	32	5	18	(Wang i dr. 2023)
		$I = 3520 \text{ mg KPK}_{\text{VFAs}}/\text{dm}^3\text{VSS}$ (uz predobradu)	49	15	8	5	
pilotni polu-kontinuirani reaktor/ primarni + sekundarni	pH = 10, HRT = 5 d, SRT = 5 d, $T = 35^{\circ}\text{C}$	$I = 325 \text{ mg KPK}_{\text{VFAs}}/\text{g TVS}$ $c_{\text{VFA}} = 3184 \text{ mg KPK}_{\text{VFAs}}/\text{dm}^3$	50	10	16	8	(Longo i dr. 2016)
pilotni sekvenc.šaržni reaktor/primarni	pH = 6,6, HRT = 6 d, $T = 37^{\circ}\text{C}$	$I = 781 \text{ mg KPK}_{\text{VFAs}}/\text{g VSS}$	29	51			(Da Ros i dr. 2020)
pilotni šaržni reaktor/primarni	HRT = 5 d, pH = 6 $T = 16 - 19^{\circ}\text{C}$	$I = 242 \text{ mg KPK}_{\text{VFAs}}/\text{g VSS}$ $c_{\text{VFA}} = 8060 \text{ mg KPK}/\text{dm}^3$	27	42	14	9	(Ossiansson i dr. 2023)
puno mjerilo šaržni reaktor/ primarni + sekundarni	pH = 10 – 11, $T = 35^{\circ}\text{C}$	$I = 261 \text{ mg COD}/\text{g VSS}$	58	7	-	35 (ostalo)	(Liu i dr. 2018)
puno mjerilo šaržni reaktor/ primarni	SRT = 5 d, $t = 15 \text{ d}$, $T = 30^{\circ}\text{C}$, $O_R = 2 : 2$	$c_{\text{VFA}} = 3810 \text{ mg}/\text{dm}^3$ $I = 0,31 \text{ mg KPK}_{\text{VFAs}}/\text{mg VSS}$	43	22	13	7	(Yang i dr. 2022)

tkivnom inženjerstvu te za proizvodnju mikro- ili nano-kapsula koje omogućavaju kontrolirano otpuštanje lijeka u organizmu produžavajući njegovo djelovanje. PHA također može služiti kao sirovina za proizvodnju biogoriva (3 - hidroksibutirat metil ester (HAME)) ili specifičnih kemikalija poput akrilata i propena (Raiz i dr. 2021). Međutim, široka primjena bioplastike je za sada ograničena zbog relativno visoke proizvodne cijene koja u usporedbi s cijenom konvencionalna plastike (1 - 3 USD po kg) iznosi 2,5 - 15 USD po kg (Zhang i dr. 2024). Premda ne postoji komercijalna proizvodnja PHA iz mulja, Veolia grupacija radi na razvoju industrijske proizvodnje PHA u punom mjerilu, a pilot postrojenje već radi u Briselu (Belgiji) u kojem se proizvodi 1 kg bioplastike tjedno (Werker i dr. 2018; Veolia PHA 2025). Kako bi proces bio ekonomski isplativ koncentracija PHA u biomasi mora iznositi više od 0,40 g PHA/g VSS (Bengtsson i dr., 2017; Van Leeuwen i dr., 2018).

Mulj nastao pročišćavanjem otpadnih voda predstavlja atraktivan izvor PHA jer sadrži miješanu kulturu mikroorganizama (MKM) od kojih brojni poput *Azoarcus sp.*, *Thauera sp.*, *Paracoccus sp.*, *Zoogloea* i *Plasticicunulans* su identificirani kao primarni pridonositelji u proizvodnji PHA (Zhang i dr. 2024). Spomenuti MO mogu akumulirati PHA u koncentraciji od 0,3 - 22,7 mg PHA/g mulja. Budući da nije potreban sterilni supstrat te sterilni uvjeti rada proizvodnja PHA korištenjem MKM može biti i do 50 % jeftinija od proizvodnje PHA korištenjem čistih kultura mikroorganizama (ČKM) te skupih supstrata poput šećera ili lipida. Nadalje, pokazalo se da MKM ima širok metabolički potencijal u odnosu na ČKM te da su dobro prilagođeni upotrebi kompleksnih izvora ugljika prisutnih u mulju. Također posjeduju visoku stabilnost i funkcionalnost kojom mogu izdržati oscilacije okoline te promjene uvjeta u reaktoru (Werker i dr. 2022). Ove značajke mikroorganizama rezultiraju manjim utroškom energije jeftinijom konstrukcijom fermentora te potrebom za manjom kontrolom procesa čime se smanjuju troškovi proizvodnje kao i cijena opreme (Mannina i dr. 2020; Pagliano i dr. 2021; Gautam i dr. 2024).



Slika 3: Proces proizvodnje PHA iz mulja (modificirano prema Pittmann i Steinmetz, 2017)

Kako je prikazano na slici 3, proizvodnja PHA iz mulja obično se provodi u tri slijedna koraka nakon čega slijedi ekstrakcija, separacija te izolacija PHA iz otapala. U prvom koraku mulj se podvrgava acidogenoj fermentaciji kako bi se proizvele hlapive masne kiseline koje služe kao izvor ugljika za MKM. Pri tom sastav masnih kiselina direktno utječe na sastav i značajke PHA. Primjerice VFA s parnim brojem C atoma (octena, maslačna, izomaslačna, kapronska kislina) imaju tendenciju stvaranja poli-β-hidroksibutirata (PHB), a s neparnim brojem C atoma (propionska i valerijanska kislina) poli-hidroksi-valerat (PHV). Iz tog razloga potrebno je tijekom fermentacije mulja podesiti sastav VFA kako bi se potaknulo stvaranje PHA željenih značajki (Zhang i dr. 2018). U drugom koraku provodi se obogaćivanje biomase s PHA-akumulirajućim MO. U trećem koraku obogaćenoj biomasi dodaju se VFA iz prvog koraka kako bi se maksimizirala akumulacija PHA u stanicama MO. Ekstrakcija je slijedeći korak u proizvodnji PHA, što se postiže razbijanjem stanica MO i oslobađanja PHA ili otapanjem intracelularnog PHA nakon čega slijedi separacija ekstrahirane preostale biomase te izolacija PHA iz otapala (Mannina i dr. 2020; Pagliano i dr. 2021; Kumar i dr. 2021; Lorini i dr. 2022; Minneo i dr. 2023).

Kako se vidi iz tablice 3 na proizvodnju PHA utječu različiti čimbenici poput sastava supstrata, ORL, HRT, SRT, pH, prozračivanja i temperature (Ahuja i dr. 2024; Trego i dr. 2024; Zhang i dr. 2024).

Međutim, ključni čimbenik za uspješnu proizvodnju PHA ovisi o obogaćivanju biomase PHA-proizvodnim MO što se postiže različitim fermentacijskim tehnikama kao primjerice, naizmjeničnim izlaganjem MO anaerobnim i aerobnim uvjetima, pulsnom hranjenju MO te odvojenom hranjenju MO ugljikom i dušikom. Svaki postupak osigurava različite radne uvjete potrebne za rast različitih PHA-akumulirajućih MO. Pri tom je najčešće korištena i najučinkovitija metoda pulsno hranjenje MO s ponovljenim periodima dostupnosti i nedostupnosti izvora nutrijenata prvenstveno ugljika i dušika ili fosfora (engl. feast/famine, F/F), koja se može kombinirati s naizmjeničnim izlaganjem MO anaerobnim ili aerobnim uvjetima. Primjenom pulsnog režima VFA-hranjenja moguće je smanjiti utjecaj značajne promjene pH medija uzrokovane dodatkom VFA kao i favorizirati održavanje populacije PHA-akumulirajućih MO nad neakumulirajućim tijekom razdoblja gladovanja. Ova metoda također stimulira PHA-akumulirajuće MO da gomilaju biopolimer unutar stanica za vrijeme više uzastopnih F/F ciklusa (de Souza Reis i dr. 2020; Pei i dr. 2022; Uhrig i dr. 2022).

Ekstrakcija PHA iz biomase je drugi izazov vezan uz njihovu proizvodnju budući da ovaj postupak čini gotovo 50 % od ukupne cijene njihove proizvodnje te o njoj ovisi čistoća i kakvoća biopolimera. Pri odabiru odgovarajuće metode oporavka u obzir se mora uzeti sastav i tip biopolimera, krajnja upotreba i čistoća materijala, cijena te utjecaj na okoliš. Premda postoje različite metode ekstrakcije PHA, najčešće korištena metoda je

Tablica 3: Proizvodnja PHA iz mulja.

Supstrat	Predobrada	Procesni uvjeti	Skala	Sadržaj PHA	Iskorištenje PHA	Literatura
Fermentirani AM, acetat	separacija čvrsto/kapljevito	$T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$; OLR = 3 g KPK/dm ³ d; HRT = 3 h; SRT = 1-2 d; BC = 12; F/F	400 dm ³	35 %	0,38 g PHA/g supstrata	(Morgan-Sagastume i dr. 2014)
PM + fermentirani AM	separacija čvrsto/kapljevito	$T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$; pH = 7; HRT = SRT = 1 d; TC = 24 h; F/F = 524/916 min; $c_{\text{VFA}} = 1200\text{ mg/dm}^3$	15 dm ³	28 %	-	(Pittman i Steinmetz 2017)
Fermentirani AM, OFČKO	zgušnjavanje mulja, gnječenje OFČKO, filtracija	$T = 16 - 33\text{ }^{\circ}\text{C}$; pH = 8-9; F/F; OLR = 2,0 – 4,4 g KPK/dm ³ d; HRT = SRT = 1 d; TC = 6 h	70 dm ³	36 - 48 %	1,02 - 1,82 g PHA/dm ³ d	(Valentino i dr. 2020)
Fermentirani AM (termička predobrada 78 °C, 48 h)	zgušnjavanje mulja, filtracija	$T = 23\text{ }^{\circ}\text{C}$; HRT = 2 d; OLR = 2 g KPK/dm ³ d; F/F	90 dm ³	53 %	5,6 g PHA/kg VSS	(Lorini i dr. 2022)
Fermentirani AM s i bez dodatka glukoze	mljevenje, filtracija	$T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$; pH = 6; $t = 96\text{ h}$; $v_m = 120\text{ o/min}$:	2 dm ³ l	30,1 % (bez glukoze) 49,9 % (s glukozom)	55,7 mg PHA/dm ³ (bez glukoze) 474 mg PHA /dm ³ (s glukozom)	(Chang i dr.2023)
Fermentirani AM, octena kiselina	centrifugiranje, filtriranje	$T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$; pH = 5; $t = 27\text{ h}$; $v_m = 230\text{ o/min}$; F/F	400 dm ³	-	0,48 g PHA/g VSS	(Pei i dr. 2023)
Fermentirani AM, acetat	centrifugiranje	$T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$; pH = 8; BC = 4; TC = 12 h; F/F = 0,2-0,4	4 l dm ³	16,9 %	0,6 mol PHA/mol supstrata	(Ren i dr. 2024)

Napomena: AM – aktivni mulj; BC- broj ciklusa; OFČKO- organska frakcija čvrstog komunalnog otpada v_m – brzina miješanja; PM - primarni mulj; TC -trajanje ciklusa .

ekstrakcija otapalima s ili bez prethodne predobrade kako bi se povećalo iskorištenje na PHA (de Souza Reis i dr. 2020.; Pagliano i dr. 2021; Salvatori i dr. 2023). Otapala koja se najčešće koriste su klorirani ugljikovodici koji osiguravaju visoku čistoću i iskorištenje na biopolimeru, ne uzrokuju njihovu degradaciju premda neka otapala mogu razoriti morfologiju PHA granula. Međutim, korištenje organskih otapala može biti štetno za ljudsko zdravlje i okoliš, a za njihov oporavak troše se velike količine energije. Kako bi se smanjio pritisak na okoliš

i cijenu postupka traže se pogodnija otapala poput: linearnih i cikličkih karbonata, alkohola, etil acetata i estera, biootapala poput dihidroleovoglukozenona (ciren) i 2,2,5,5-tetrametiloksolana (TMO) te ionskih i superkritičnih kapljevina (Mannina i dr. 2019; de Souza Reis i dr. 2020.; Pagliano i dr. 2021; Elhami i dr. 2022; Persiani i dr. 2022; Didion i dr. 2024). U tablici 4 navedene su prednosti i nedostaci nekih od otapala korištenih za ekstrakciju PHA.

Tablica 4: Prednosti i nedostaci različitih otapala za ekstrakciju PHA.

Vrsta otapala	Primjer	Prednosti	Nedostaci
Halogena otapala	kloroform, di-klormetan, 1,2-dikloetan, 1,1,2,2-tetrakloetan	mogu se ekstrahirati PHA visoke molekularne mase (1,2 MDa); ekstrahiran PHA je visoke čistoće	veliki rizik za onečišćenje okoliša i ljudsko zdravlje
Alkani	heptan, oktan i heksadekan	oporavljeni PHA visoke čistoće	nisko iskorištenje na PHA, tijekom oporavka dolazi do degradacije polimera
Alkoholi	metanol, etanol, n- propanol izo.propanol	mogu se oporaviti polimeri kratkih i srednje dugih lanaca, čistoća PHA vrlo visoka	pre-polarni za oporavak polimera dugih lanaca, stoga je iskorištenje nisko
Karbonati	dietil karbonat, propilen karbonat i etil acetat	ekološki prihvatljiva otapala , minimalna toksičnost	niska stabilnost na temperaturu
Biootapala	dihidroleovoglukozenona (ciren) i 2,2,5,5-tetrametiloksolana	netoksična, zelenija i održiva otapala	dugo vrijeme ekstrakcije, niska selektivnost i iskorištenje

2.3. Izvanstanične polimerne tvari

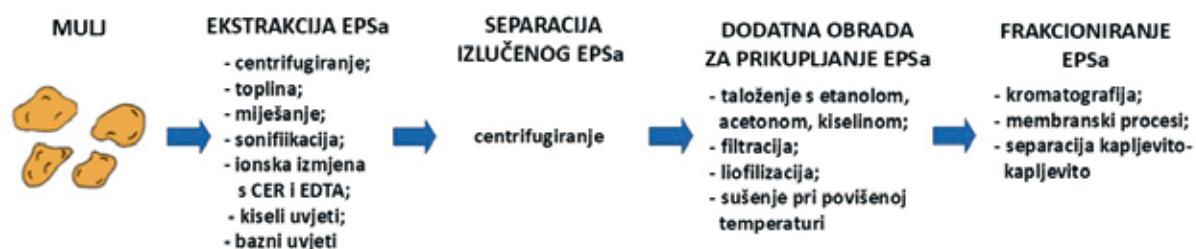
Izvanstanične polimerne tvari (engl. Extracellular Polymeric Substances, EPS) složena su mješavina polimera velike molekulske mase koje izlučuju različiti mikroorganizmi uglavnom bakterije. EPS se nalazi na vanjskoj površini stanica MO, a njihova proizvodnja i sastav kontrolirani su različitim procesima kao što su razaranje stanica MO, lučenje, ispuštanje materijala sa staničnih površina i apsorpcija tvari iz okoliša (Duque i dr. 2021). Uloga EPS-a je u stvaranju trodimenzionalne matrice u koju se bakterije mogu ugraditi, te na taj način prilagoditi okolišnim uvjetima. Količina EPS-a u mulju (koji može biti slabo SV-EPS ili čvrsto vezan ČV-EPS uz površinu stanica ili otopljen T-EPS između stanica) iznosi 10 – 40 % suhe mase tvari, a sastoji se uglavnom od polisaharida i proteina te manjih količina nukleinskih kiselina, huminskih tvari, DNA i lipida koji čine 75 - 89 % od ukupne mase EPS-a. Pri tom su znatne razlike u koncentraciji i raspodjeli EPS-a (polisaharida i proteina) između flokuliranog aktivnog mulja (FAM) i aerobnog granuliranog mulja (AGS). AGS vrlo je bogat izvanstaničnim polimernim tvarima, čiji su važan sastojak alginatima slični egzopolimeri (ALE). Ovi polisaharidi, sastavljeni od β -D-manuronske i α -L-guluronske kiseline, dosad su dobivani isključivo iz smeđih algi. No budući da AGS sadrži i do 25% ALE-a u suhoj tvari, može postati njihov alternativni izvor. Izdvajanjem biopolimera iz flokuliranog ili glanuliranog mulja smanjuje se volumen mulja kojeg treba odložiti čime se smanjuju troškovi obrade, a zaostali mulj obično ima veću digestibilnost (Guo i dr. 2020).

Zbog svojstava poput netoksičnosti, biokompatibilnosti, biodegradabilnosti te sposobnosti geliranja, EPS iz mulja ima raznolike potencijalne primjene u farmaceutskoj, kozmetičkoj, prehrambenoj i drugim industrijama, kao i u medicini, zaštiti okoliša te poljoprivredi. Može se primjerice koristiti kao adsorbens za ione teških metala, materijal za sprječavanje gorenja, sredstvo za poboljšanje tla, kao emulgator, antioksidans, zgušnjivač i flokulant. Također ima široku primjenu u UPOV-ima kao sredstvo za flokulaciju, taloženje i odvodnjavanje mulja, za vezanje teških metala posebice Pb, Cd i Zn te uklanjanje toksičnih organskih spojeva iz vode. Treba istaknuti, da tako široka primjena EPS-a nije uvjetovana samo širokim rasponom njihovih fizikalno-kemijskih značajki nego i raznolikim oblicima njihove upotrebe: prašak, vlakno, film, granule te visoko viskozne otopine (Duque i dr. 2021; Kim i dr. 2020; Melo i dr. 2022).

EPS se može proizvoditi korištenjem ČKM ili MKM. Pri tom je korištenje ČKM uobičajeni način dobivanje visokokvalitetnih komercijalnih biopolimera, kao što su alginat, dekstran i ksantan. Međutim, uzgoj čistih kultura je znatno skuplji jer zahtijeva sterilne uvjete i korištenje skupih supstrata. S druge strane MKM dobro je prilagođena upotrebi kompleksnih izvora ugljika prisutnih u mulju što omogućuje valorizaciju otpada kao supstrata čime se smanjuju ukupni troškovi procesa (Cyzdik-Kwiatkowska 2021; Netrusov i dr. 2023; Antunes i dr. 2024).

Kako se vidi iz [tablice 5](#), proizvodnja i sastav EPS-a u mulju UPOV-a ovisi o vrsti mulja te o procesnim parametrima poput ozračivanja, OLR, HRT, temperature, saliniteta, miješanja, pH, C:N omjera, fazi rasta te prisutnosti toksičnih supstanci i metalnih iona (Km i dr. 2024). Tako primjerice dostupnost hranjivih tvari i izvora hrane, kao što su ugljik, dušik i fosfor značajno utječu na proizvodnju EPS-a. Kako bakterije reagiraju na prehrambeni stres stvaranjem više EPS-a, ograničena dostupnost hranjivih tvari može potaknuti proizvodnju EPS-a (Wu i dr. 2024). Okolišni uvjeti kao što su temperatura, pH, razina kisika i salinitet također utječu na proizvodnju. Primjerice, neke bakterije proizvode više EPS-a pri nižim temperaturama ili pri određenim pH uvjetima. Većina bakterija preferira nisku razinu sliniteta, dok blagi porast sliniteta može primorati bakterije na prilagodbu, u kojem slučaju mogu proizvesti više EPS-a (Hasan i dr. 2024). Proizvodnja EPS-a ovisi i o koncentraciji kisika budući da niske razine kisika mogu pomoći aerobno-fakultativnim bakterijama da proizvode više biopolimera. Prisutnost malih koncentracija toksičnih tvari i metala također mogu potaknuti bakterije na proizvodnju EPS-a kako bi preživjele. Viši OLR u ranom periodu granuliranja povećava proizvodnju EPS-a i utječe na stabilnost granula što je povezano s omjerom polisaharida i proteina (Joti i dr. 2024; Yadav i dr. 2024).

Proizvodnja EPS-a obično započinje odvajanjem biomase iz medija (filtracijom ili centrifugiranjem) nakon čega slijedi ekstrakcija, koncentriranje i frakcioniranje EPS-a ([slika 4](#)). Ekstrakcija ima za cilj odvajanje biopolimera iz matrice, a može se provesti različitim fizičkim (sonifikacija, zagrijavanje, centrifugiranje), kemijskim (NaOH, formaldehid, etilendiamitetraoctena kiselina (EDTA), kationsko izmjenjivačke smole – CER) ili biološkim postupcima (enzimi). Fizičke metode ekstrakcije obično koriste vanjske sile kako bi se potaknuo EPS da se odvoji od stanica i potom otopi



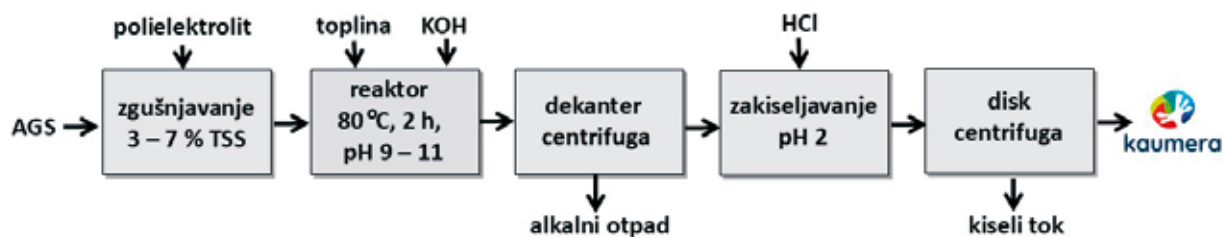
Slika 4: Shematski prikaz ekstrakcije EPS-a iz anaerobnog granuliranog mulja

Tablica 5: Proizvodnja EPS-a u punom, pilotnom i laboratorijskom mjerilu

Skala/mulj/ otpadna voda	Procesni uvjeti	Metoda ekstrakcije	Značajke polimera	Iskorištenje	Litera- tura
SBR puno mjerilo/AGS/ industrijska otpadna voda	Nereda™ proces (n.p.)	Na ₂ CO ₃ , T = 80 °C	Kaumera Nereda Gum ^{TS}	225 mg VSS _{EPS} / g VSS _{AGS}	(Van Leeuwen i dr. 2018)
SBR puno mjerilo/AGS/ komunalna otpadna voda	Nereda™ proces (n.p.)	Na ₂ CO ₃ , T = 80 °C	polisaharidi: 138 mg glukoze/g VSS _{EPS} ; proteini: 381 mg BSA/g VSS _{EPS} ; fenolni spojevi: 286 mg huminske kiseline/g VSS _{EPS}	282 mg VSS _{EPS} / g VSS _{AGS}	(Felz i dr. 2019)
SBR puno mjerilo/ AGS/ smjesa kućanske, pluvijalne i industrijske otpadne vode	Nereda™ proces (n.p.)	Na ₂ CO ₃ , T = 80 °C	polisaharidi: ≈ 10–15 mg glukoze/g VSS _{EPS} ; proteini: ≈ 60–80 mg BSA/g VSS _{EPS} ; huminske tvari: 317 mg huminske kiseline/g VSS _{EPS}	122–149 mg VSS _{EPS} / g VSS _{AGS}	(Oliviera i dr. 2020)
SBR puno mjerilo/AGS/ komunalna otpadna voda	Nereda® proces (n.p.)	40% KOH, T = 80 °C	Kaumera Nereda Gum ^{TS} : 168 mg polisaharida /g VS; 456 mg proteina/g VS	n.p.	(Velas- quez Posada, 2023)
CAS puno mjerilo//FM/ komunalna otpadna voda	n.p.	Na ₂ CO ₃ , T = 80 °C t = 30 min	polisaharidi: 183 mg glukoze/g VSS _{EPS} ; proteini: 386,5 mg BSA/g VSS _{EPS}	167 mg EPS /g VSS _{mulj}	(Li i dr. 2024)
CAS i MBR puno mjerilo/ FM/kućanska otpadna vode SBR pilotno mjerilo/ AGS/ kućanska otpadna voda	n.p.	Na ₂ CO ₃ , T = 80 °C	CAS: polisaharidi: 83 mg/g SS; proteini: 38 mg/g SS; MBR: polisaharidi: 12 mg/g SS; proteini: 31 mg/g SS; SBR: polisaharidi: 225 mg/g SS; proteini: 49 mg/g SS	CAS: <130 mg/g VSS _{mulj} MBR: 170 mg/g VSS _{mulj} SBR: 352 mg/ g VSS _{mulj}	(Rehman i dr. 2024)
SBR pilotno mjerilo / AGS / komunalna otpadna voda	VER = 60%; SRT = 10 d; KPK,ul = 1200 mg/dm ³ ; TN,ul = 450 mg/dm ³ ; TP,ul = 90 mg/ dm ³ ;	CER	polisaharidi: 136 mg glukoze/g VSS; proteini: ≈ 11 mg BSA/g VSS	n.p.	(Cetin i dr. 2018)
SBR pilotno mjerilo/ AGS/ komunalna otpadna voda	VER = 60%; SRT = 12–15 d; KPK,ul = 461 mg/dm ³ ; BPK5,ul = 148 mg/dm ³ ; TN,ul = 43 mg/dm ³ ; TP,ul = 5 mg/ dm ³ ;	Na ₂ CO ₃ , T = 80 °C	polisaharidi: 224-252 mg glukoze/g VSS _{EPS} ; proteini: 514 mg BSA/g VSS _{EPS}	219 mg VSS _{EPS} / g VSS _{AGS}	(de Sousa Rollem- berg i dr. 2020)

Skala/mulj/ otpadna voda	Procesni uvjeti	Metoda ekstrakcije	Značajke polimera	Iskorištenje	Litera- tura
SBR pilotno mjerilo/AGS/ VFA-sintetska otpadna voda	KPK = 582 mg/dm ³ ; VFA = 582 mg/dm ³ ; TN = 43 mg/dm ³ ; TP = 5,4 mg/ dm ³ ; ANF = 1,5 h; AF = 4 h; v (taloženja) = 1,7 m/h	NaOH i Na ₂ CO ₃ ; T = 80 °C	NaOH; polisaharidi: 75 mg /g VSS; proteini: 182 mg /g VSS huminske kiseline: 249 mg/g VSS Na ₂ CO ₃ ; polisaharidi: 100 mg /g VSS; proteini: 39 mg /g VSS; huminske kiseline: 152 mg /g VSS	NaOH: 700 mg VSS _{EPS} /g VSS _{AGS} Na ₂ CO ₃ : 410 mg VSS _{EPS} /g VSS _{AGS}	(Bou- Sarkis i dr. 2020)
SBR laboratorijsko mjerilo/FM/ komunalna otpadna voda	v (zraka) = 1,2 m/s; VER = 50 %; MLSS = 2,5 g/ dm ³ ; OLR = 2,4 kg KPK/m ³ d; TC = 4 h, BC = 4	CER (Dowex 50x8) i NaOH T = 80 °C	CER: polisaharidi: 26 mg /g VSS; proteini: 199 mg /g VSS NAOH: polisaharidi: 5 mg /g VSS; proteini: 39 mg /g VSS	CER: 35 mg TOC _{EPS} /g SS NaOH: 235 mg TOC _{EPS} /g SS	(McSwain i dr. 2015)
MBR laboratorijsko mjerilo/FM/ sintetska otpadna voda	T = 20 °C; pH = 7,5; SRT = 3 d; HRT = 7,3 h; c(O ₂) = 4 mg/ dm ³ ; t = 50 d; KPK (G/E) = 650 mg/dm ³ ; C/N = 16 g KPK/g TN; c (inokuluma, FM) = 180 mg/dm ³	CER	biopolimer = 97,10 %; huminske kiseline = 2,76 %; polisaharidi: 1,13 g glukoze/dm ³ ; proteini: 0,30 g BSA/dm ³	2,32 g/dm ³	(Ajao i dr. 2019)
SBR laboratorijsko mjerilo/ AGS/NaAc - sintetska otpadna voda	T = 25 °C; t(ciklusa) = 3 h; ANF = 60 min, AF = 12 min, T = 3 min, V = 5 min; t = 89 d dodatak NaCl = 1,4 g dm ³ . t = 6 d	Na ₂ CO ₃ , T = 80 °C	polisaharidi = 10 mg/g VSS _{EPS} proteini = 102 mg/g VSS _{EPS} huminske kiseline = 49 mg/g VSS _{EPS} NaCl: polisaharidi = 10 mg/g VSS _{EPS} proteini = 115 mg/g VSS _{EPS} huminske kiseline = 52 mg/g VSS _{EPS}	162 mg/g VSS _{EPS} NaCl: 181 mg/g VSS _{EPS}	(Oliviera i dr. 2021)
SBR laboratorijsko mjerilo/FM, AGS/ NaAc- sintetska otpadna voda	c (inokuluma FM, AGS) = 1,5 g VSS/dm ³ ; T = 18 °C; pH = 7,5; OLR (Ac) = 0,3 g KPK/dm ³ d; Q (Ac) = 0,080 dm ³ /min; t = 3 mjeseca	Na ₂ CO ₃ , T = 80 °C, pH = 10	detektirani proteini, glikoproteini, šećeri i aminošećeri	FM: 360 mg VSS _{EPS} /g VSS _{mulj} AGS: 420 mg VSS _{EPS} /g VSS _{mulj}	(Guima- rães i dr. 2023)

Napomena: AF-aerobna faza; AGS-aerobni granulirani mulj; ANF-anaerobno hranjenje; NaAc-natrijev acetat; BC-broj ciklusa; BSF-albumin govedeg seruma; CAS-proces s aktivnim muljem; CER-kationsko izmjenjivačka smola; C/N-omjer ugljika i dušika; FM-flokulirani mulj; G-glicerol; MBR-membranski bioreaktor; MLSS-miješana tekućina suspendiranih čestica; SBR-sekvencijalni šaržni reaktor; Q-protok; v-brzina taloženja mulja; TC-trajanje ciklusa; V-vađenje mulja iz SBR; VER-omjer izmjene volumena.



Slika 5: Proces proizvodnje EPS-a (Kaamera NeredaTM Gum) iz anaerobnog granuliranog mulja.

u mediju, dok kemijske metode uključuju dodavanje kemijskih spojeva kako bi se poremetila veza između EPS-a i stanica te se na taj način ubrzalo njegovo otapanje (Antunes i dr.2024). Pri tom je centrifugiranje najčešća metoda ekstrakcije za topivi EPS. Kako je SV-EPS slabo vezan za stanice mikroorganizama koriste se blage metode ekstrakcije kao što je centrifugiranje velikom brzinom ili zagrijavanje pri niskim temperaturama kako bi se spriječilo otpuštanje ČV-EPS-a. Osim fizičkih i kemijskih metoda za ekstrakciju ČV-EPS-a često se koriste i kombinirane metode poput CER + sonifikacija, alkalije + grijanje i formaldehid + grijanje. Međutim, separacija EPS-a natijevim karbonatom pri visokim temperaturama daje najbolje rezultate (Rehman i dr. 2024). Kako bi se koncentrirao izdvojeni EPS koriste se različiti postupci poput precipitacije s etanolom, acetonom i kiselinama, filtracija, liofilizacija te sušenje pri povišenoj temperaturi. Konačno, frakcioniranje ima za cilj odvajanje različitih biopolimera, primjerice odvajanje polisaharida od proteina. Pri tom se koriste različite separacijske tehnike poput kromatografije, ekstrakcije kapljevito-kapljevito, membranskih procesa, a izbor ovisi o biopolimeru koji se želi dobiti (Nouha i dr. 2018; Duque i dr. 2021; Huang i dr. 2022; Antunes i dr. 2024).

Proizvodnja EPS-a (ALE) iz mulja u punom mjerilu započela je 2019. u nizozemskom gradu Zutphenu, gdje je iz 80 kg AGS-a dobiveno 18 kg ALE-a, s očekivanom godišnjom proizvodnjom od 400 tona. Drugo postrojenje s kapacitetom od 50 do 100 tona godišnje otvoreno je 2020. u Epeu. ALE koji se prodaje pod nazivom Kaamera NeredaTM Gum, ekstrahiran je iz granuliranog mulja proizvedenog na NeredaTM postrojenju za pročišćavanje otpadnih voda. Pri tom je količina mulja kojeg treba obraditi smanjena za 20 – 35 %, čime se smanjuje utrošak energije i emisija CO₂ (Kaamera 2025). Procjenjuje se da će od 2030. godine proizvodnja EPS-a iz mulja dostići 85.000 tona godišnje čija će vrijednost ovisno o kakvoći iznositi cca. 170 milijuna eura (Van Leeuwen i dr. 2018.). Na slici 5 prikazan je proces ekstrakcije EPS-a (Kaamera) iz aerobnog granuliranog mulja u Epeu.

2.4. Proteini

Proteini predstavljaju glavnu organsku komponentu mulja. Visoki udio koji iznosi ~50 % - 60 % suhe težine mikrobnih stanica čini mulj vrlo prikladnim izvorom za njihov oporavak (Zhang i dr. 2018). Učinkovito izdvajanje proteina i načini ponovne upotrebe ovise

o vrsti mulja, prirodi prethodne obrade te metodi odvajanja i pročišćavanja budući da svi ovi čimbenici mogu modificirati značajke proteina poput primjerice molekulske mase, prostornog rasporeda atoma u proteinu (konformacije), vrste proteina itd. Oporavljeni proteini mogu se koristiti kao ljepila, pjena za gašenje požara, sredstvo za pjenjenje betona, inhibitori korozije, gnojiva ili stočna hrana ako ne sadrže teške metale, organske nečistoće i mikrobne toksine (Capodaglio 2023). Izdvajanjem proteina također se poboljšava odvodnjavanje mulja, smanjuje njegov volumen i sadržaj organskih tvari što u konačnici rezultira lakšom i jeftinijom daljnjom obradom mulja.

Izdvajanje proteina iz mulja započinje probirom (screening) mulja i predobradom kako bi se postigla hidroliza mulja, nakon čega slijedi filtracija, precipitacija, centrifugiranje te sušenje proteinskog proizvoda (sirovi protein). Najveći izazov je odabrati odgovarajući supstrat (mulj) te optimalne uvjete predobrade. U većini slučajeva kao supstrat odabire se sekundarni mulj zbog većeg sadržaja proteina i dušika, manje anorganskih krutina i masti što omogućava lakšu izolaciju, obogaćivanje i pročišćavanje proteina (Xiao i Zhou 2020).

Otapanje bakterijskih staničnih stjenki i oslobađanje vezanog EPS-a te poremećaj unutarstaničnog materijala (citoplazme) ključni su preduvjeti kako bi se proteini iz pahuljica mulja i mikrobnih stanica oslobodili u vodenu fazu. Pri tom se koriste različite fizikalne, kemijske i biološke metode te njihove kombinacije kako bi se postigla hidroliza mulja (tablica 6).

Fizikalne metode (mikrovalne, ultrazvučne, i dr.) općenito su učinkovite za izdvajanje proteina iz mulja. Mogu se kombinirati s kemijskim ili biološkim metodama kako bi se povećala učinkovitost ekstrakcije. Kiselinsko-termička metoda također je učinkovita. Međutim, pri niskom pH izlučeni proteini mogu se dalje hidrolizirati do aminokiselina čime se smanjuje iskorištenje na proteinu (Romero i dr. 2024). Osim toga spomenuta metoda uzrokuje jaču koroziju opreme. Pri alkalnoj ekstrakciji najčešće se koriste spojevi poput natrijevog, kalcijevog i kalijevog hidroksida koji uzrokuju otapanje membrane proteina, saponifikaciju membrane lipida te oštećenje mikrobnih stanica. Kako bi se smanjilo vrijeme alkalne ekstrakcije te povećalo iskorištenje, poboljšala čistoća i održala funkcionalnost proteina, ovaj tip ekstrakcije se koristi u kombinaciji s drugim metodama (Yang i dr. 2023). Tenzidi su također djelotvorni za ekstrakciju proteina, međutim, treba ih koristiti u velikim količinama

Tablica 6: Proizvodnja proteina iz mulja.

Metoda predobrade	Mulj	Uvjeti predobrade	Rezultati	Literatura
mikrovalna	aktivni mulj	$P = 800 \text{ W}$, $t = 3,5 \text{ min}$,	$c_p = 1000 \text{ mg/dm}^3$	(Appels i dr. 2013)
elektroliza (E)	aktivni mulj	E: $U = 20 \text{ V}$, $t = 15 \text{ min}$ EA: $U = 20 \text{ V}$, $\text{pH} = 11$, $t = 40 \text{ min}$	$c_p = 105 \text{ mg/dm}^3$ $c_p = 650 \text{ mg/dm}^3$	(Zhen i dr. 2014)
ozonizacija	aktivni mulj	$c(\text{O}_3) = 0,1 \text{ g/g}_{\text{TS}}$	$c_p = 45 \text{ mg/dm}^3$	(Pei i dr. 2016)
biološka	aktivni mulj	$T = 55 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 8$, $t = 4 \text{ h}$, doza proteaze = 2 %	$V_{\text{ekst}} = 58 \%$	(Qin i dr. 2018)
ultrazvučno-biološka	aktivni mulj	$P = 600 \text{ W/cm}^3$, $t = 20 \text{ min}$, $\text{pH} = 11$, $T = 60 \text{ }^\circ\text{C}$, doza enzima = 3500 U/g	$c_p = 195 \text{ mg/g VSS}$	(Yan i dr. 2020)
mikrovalna (M)	aktivni muljin	$P = 700 \text{ W}$, $t = 3 \text{ min}$, $\text{pH} = 3 \text{ s HCl}$	M: $c_p = 19,5 \text{ mg/dm}^3$ MK: $c_p = 11 \text{ mg/dm}^3$	(Zhang i dr. 2021)
termo-kiselinska	aktivni mulj	$\text{pH} = 0,5 \text{ s H}_2\text{SO}_4$, $T = 130 \text{ }^\circ\text{C}$, $t = 4 \text{ h}$	$c_p = 9499,6 \text{ mg/dm}^3$ $V_{\text{ekst}} = 91,4\%$	(Gao i dr. 2021)
alkalna (A)	zgušnjuti aktivni mulj ($\text{TS} = 12,2 \text{ g/dm}^3$)	A: $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol/dm}^3$, $\text{pH} = 12$; $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $t = 1 \text{ h}$:	A: $c_p = 1969 \text{ mg/dm}^3$; U: $c_p = 1121 \text{ mg/dm}^3$; T: $c_p = 1755 \text{ mg/dm}^3$; UA: $c_p = 1268 \text{ mg/dm}^3$; UT: $c_p = 2512 \text{ mg/dm}^3$; AT: $c_p = 2751 \text{ mg/dm}^3$; UAT: $c_p = 3112 \text{ mg/dm}^3$	(Babu i dr. 2021)
ultrazvučna (U)		U: $f = 35 \text{ kHz}$; $P = 140 \text{ W}$; $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $t = 1 \text{ h}$;		
termalna (T)		T: $T = 75 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7$, $t = 1 \text{ h}$		
i kombinacije: UA, UH, UT, AT, UAT	aktivni mulj	$c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol/dm}^3$; $\text{pH} = 12$; $T = 90 \text{ }^\circ\text{C}$, $t = 3 \text{ h}$	$c_p = 1712,23 \text{ mg/dm}^3$	(Hui i dr. 2022)
termo-alkalna		$P = 600 \text{ W}$, $\text{pH} = 12$, $t = 10 \text{ min}$	$c_p = 260 \text{ mg/g VSS}$ $V_{\text{ekst}} = 69 \%$	(Yan i dr. 2022)
ultrazvučno-alkalna	aktivni mulj		PM: $c_p = 1310 \text{ mg/dm}^3$, $V_{\text{ekst}} = 65 \%$; AM: $c_p = 1982 \text{ mg/dm}^3$, $V_{\text{ekst}} = 87 \%$; OM: $c_p = 1521 \text{ mg/dm}^3$, $V_{\text{ekst}} = 76 \%$	(Gao i dr. 2022)
termo-alkalna	primarni mulj (PM), aktivni mulj (AM), odvodnjeni mulj (OM)	$c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol/dm}^3$; $\text{pH} = 12$; $T = 130 \text{ }^\circ\text{C}$, $t = 4 \text{ h}$	PM: $I = 23,3 \%$ AM: $I = 18,5 \%$ DM: $I = 8,6 \%$	(Zarina i Mezule 2023)
ultrazvučna	primarni mulj (PM), aktivni mulj (AM), digestirani mulj (DM)	$f = 20 \text{ kHz}$, $P = 130 \text{ W}$, $t = 2 \text{ min}$, $\text{pH} = 7,4$		
termalna (T)	zgušnjuti aktivni mulj	T: $T = 140 \text{ }^\circ\text{C}$, $t = 1,5 \text{ h}$;	T: $I = 16,7 \%$	(Yang i dr. 2023)
alkalna (A)		A: $\text{pH} = 12$, $t = 1,5 \text{ h}$;	A: $I = 14,4 \%$	
ultrazvučna (U)		U: $P = 5 \text{ W/cm}^3$, $t = 30 \text{ min}$;	U: $I = 5,1 \%$	
kombinacije: TA, UA		TA: $T = 140 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 13$, $t = 1,5 \text{ h}$; UA: $P = 5 \text{ W/cm}^3$, $\text{pH} = 12$, $t = 30 \text{ min}$; B: $\text{pH} = 7$, $c(\text{lizozima}) = 200 \text{ g/kg}_{\text{TS}}$, $t = 6 \text{ h}$	TA: $I = 76,5 \%$ UA: $I = 15,8 \%$ B: $I = 4 \%$	
biološka (B)				
termo-alkalna	aktivni mulj	$c(\text{Ba}(\text{OH})_2) = 0,1 \text{ mol/dm}^3$, $T = 110 \text{ }^\circ\text{C}$, $t = 4 \text{ h}$	$c_p = 1106,11 \text{ mg/dm}^3$	(Hui i dr. 2023)
termička (T)	zgušnjuti aktivni mulj	$c(\text{SDS, SDBS}) = 150 \text{ mg/g VSS}$, $T = 121 \text{ }^\circ\text{C}$, $t = 4 \text{ h}$	T: $c_p = 3500 \text{ mg/dm}^3$; TK(SDS): $c_p = 6018 \text{ mg/dm}^3$; TK(SDBS): $c_p = 5321 \text{ mg/dm}^3$	(Romero i dr. 2024)
termo-kemijska (TK)				

Napomena: f – frekvencija, P – snaga, SDS- natrijev dodecil-sulfat; SDBS – natrijev dodecilbenzen; U - napon struje; V_{ekst} – brzina izdvajanja.

što ograničava opravdanost njihovog korištenja. Pri termičkoj ekstrakciji proteina, mulj se podvrgava kroz duže vrijeme visokoj temperaturi kako bi se otopile velike biomolekule (Xiao i Zhou 2020). Premda se postižu velika iskorištenja na proteinu nedostatak metode leži u velikom utrošku energije, striktnoj kontroli postupka, visokoj cijeni te nemogućnosti uklanjanja teških metala i nekih toksičnih spojeva prisutnih u mulju (Zhang i dr. 2018). U usporedbi s konvencionalnim grijanjem, mikrovalna ekstrakcija može brže zagrijati mulj, povećati brzinu reakcije, selektivno aktivirati ili potisnuti reakcijske putove te poboljšati energetska učinkovitost metode. Ozonizacija je učinkovita i ekološki prihvatljiva metoda ekstrakcije, međutim, zbog mineralizacije može doći do gubitka proteina (Xiao i Zhou, 2020). Premda je enzimska hidroliza ekološki prihvatljiva metoda koja ne uzrokuje onečišćenje i ne zahtjeva posebnu opremu, ekstrakcijska učinkovitost je vrlo niska, a cijena enzima visoka. Nadalje, korištenjem enzima (npr. proteaze i lipaze) može doći do razgradnje proteina u polipeptide i aminokiseline (Capodaglio 2023). Dugo vrijeme reakcije i visoka temperatura pri kojoj se provodi alkalno-termička hidroliza može uzrokovati neželjenu Maillardovu reakciju. Alkalno-ultrazvučnom ekstrakcijom postiže se slična učinkovitost kao kod alkalno-termičke hidrolize s time da je vrijeme reakcije 10 % kraće, a potrošnja energije manja za ~ 80 % (Gao i dr. 2021; Yang i dr. 2023).

Nakon otapanja slijedi odvajanje proteina od neproteinskih dijelova smjese i pročišćavanje. Princip za odvajanje proteina iz kompleksne smjese je poremetiti hidratacijsku ljusku proteina te ih istaložiti iz tekuće faze. Uobičajeni agensi za taloženje su klorovodična i sumporna kiselina, polietilenimin i amonijev sulfat, nakon čega slijedi odvajanje proteina od supernatanta centrifugiranjem. Nakon taloženja potrebno je daljnje analitičko pročišćavanje proteina. Najkorisnija metoda za detekciju i pročišćavanje proteina je kromatografija, a odabir metode ovisi o veličini proteina, njegovim fizičko-kemijskim značajkama te afinitetu vezivanja (Xiao i Zhou 2020.; Núñez i dr. 2022).

Trenutno se za izdvajanje proteina iz mulja koriste dvije patentirane tehnologije. U patentu Markhama i Reid (1988.) koristi se termička metoda za pretvorbu sekundarnog (biološkog) i primarnog plutajućeg mulja u proteinski dodatak za ishranu životinja. Rudolf i dr. (1993.) koriste kombinaciju termičke i mehaničke metode (homogenizator visokog tlaka) za izdvajanje proteina iz mulja. Međutim, osim spomenuta dva patenta, većina radova koji se bave izdvajanjem proteina iz mulja još su uvijek u laboratorijskoj fazi istraživanja.

2.5. ENZIMI

Komercijalni enzimi (biokatalizatori) se obično ekstrahiraju iz netoksične i nepatogene mikrobne biomase proistekle rastom i razmnožavanjem bakterija, gljiva uključujući kvasce i aktinomicete (Guerra-Rodríguez i dr. 2020). Kako bi se osigurali svi esencijalni

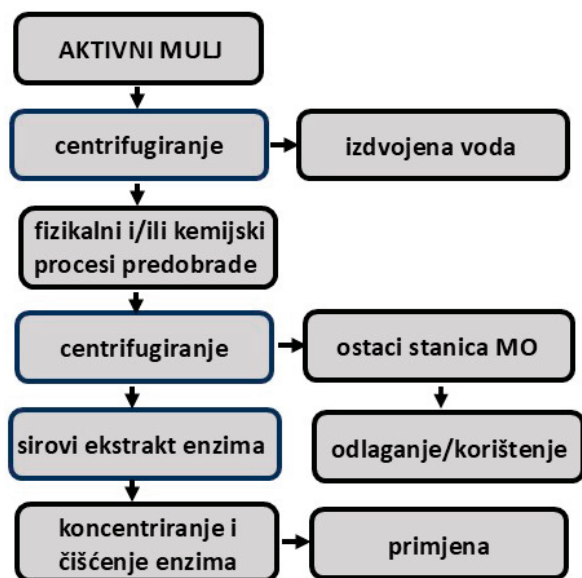
nutrijenti potrebni za rast MO koriste se pažljivo formulirani mediji (koji se obično sastoje od soje, ribljeg brašna, glukoze, ekstrakta kvasca, peptona i tragova drugih elemenata) čija cijena može iznositi i više od

40 % ukupnih troškova proizvodnje enzima. Stoga bi alternativni, isplativiji pristup proizvodnje mikrobne biomase u kom se izbjegava korištenje ČKM i sintetetskih medija, predstavljao značajnu komercijalnu prednost u proizvodnji enzima (Raheem i dr. 2018; Ceconet i Capodaglio 2022).

Mulj nastao tijekom obrade otpadnih voda mogao bi poslužiti kao jeftin, nutrijentima bogat supstrat čime bi se značajno poboljšao odnos troškova/koristi procesa proizvodnje industrijskih enzima. Veliki udio organske tvari u aktivnom mulju (30–85%) čine čestice veće od 0,1 µm koje MO ne mogu izravno asimilirati. Stoga MO proizvode različite hidrolitičke enzime (npr. proteaze, lipaze, glikozidaze, galaktozidaze, aminopeptidaze, dehidrogenaze, katalaze, peroksidaze, fosfataze, amilaze i glukozidaze) koji razgrađuju složene organske tvari tj. lipide, proteine i ugljikohidrate u manje molekule koje lakše asimiliraju (Liu i Smith, 2021; Vaithyanathan i Cabana 2021). Koncentrirani i pročišćeni enzimi dobiveni iz mulja mogli bi zamijeniti anorganske i/ili komercijalne bioenzimske katalizatore te se koristiti u različitim industrijskim granama poput farmaceutske, prehrambene i industriji finih kemikalija kako bi se povećala brzina reakcije i iskorištenje na produktu. Također se mogu koristiti u ishrani životinja, u proizvodnji biogoriva, papira i deterdženata te gospodarenju otpadom. Nadalje mogu poboljšati rad postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda zbog bolje razgradnje krutih tvari mulja, hidrolize organske tvari i biorazgradnje toksičnih zagađivača (Feng i dr. 2025).

Na proizvodnju enzima utječu različiti čimbenici poput vrste i koncentracije mulja, pH i temperature medija, prisutnost nutrijenata, sastav mikrobne zajednice te prisutnost inhibitora ili kofaktora (Karn i Kumar, 2019). Optimalni pH i temperaturni uvjeti ključni su za proizvodnju enzima. Fluktuacije ovih parametara mogu značajno utjecati na proizvodnju bilo usporavanjem ili potpunim inhibiranjem enzimskog procesa. Prisutnost potrebnih hranjivih tvari u mulju ključni su za rast MO i proizvodnju enzima, budući nedostatak esencijalnih hranjivih tvari može ograničiti sintezu enzima. Različite mikrobne vrste unutar mulja imaju različitu sposobnost za proizvodnju enzima, stoga će sastav mikrobne zajednice izravno utjecati na ukupni prinos enzima (Liu i Smith, 2021).

Na slici 6 prikazani su uobičajeni koraci u proizvodnji enzima iz mulja. U prvom koraku mulj se podvrgava centrifugiranju kako bi se uklonila vodena frakcija koja sadrži malo enzima. Kako je većina hidrolitičkih enzima u pahuljama mulja izvanstanično te su vezani na staničnu stjenku ionskim ili hidrofobnim interakcijama (ektoenzimi) ili se nalaze unutar različitih frakcija EPS-a (eksoenzimi), ekstrakcija enzima postiže se razbijanjem čvrste faze mulja različitim fizičkim i kemijskim postupcima pojedinačno ili u kombinaciji (tablica 7).



Slika 6: Proces proizvodnje enzima iz mulja

Od fizičkih procesa najčešće se koristi sonifikacija (sama ili u kombinaciji s kemijskim metodama) budući se može lako optimizirati podešavajući vrijeme trajanja postupka, frekvenciju ultrazvuka te količinu krutih tvari prisutnih u biomasi kako bi se maksimizirala učinkovitost razgradnje mulja i smanjio utrošak energije. Također može imati pozitivan učinak na aktivnost ekstrahiranih enzima ako se radi pri kontroliranim uvjetima (Liu i Smith, 2021). Kao kemijski agensi koriste se kationsko

izmjenjivačke smole (CER), etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) i natrijev tripolifosfat (STPP). Mehanizam ekstrakcije enzima je sličan za sva tri kemijska agensa i uključuje uklanjanje viševalentnih kationa (npr. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} i Al^{3+}) iz EPS-a kako bi se razorile pahuljice mulja. EDTA i STPP su helirajući agensi i stvaraju komplekse s metalnim ionima, dok je CER polimer i djeluje kao kationsko izmjenjivački medij koji se veže s viševalentnim kationima EPS-a što uzrokuje otpuštanje enzima. Osim spomenutih agensa za ekstrakciju enzima iz mulja mogu se koristiti i površinski aktivne tvari poput Tritona X100 ($\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$) i Twina 20 ($\text{C}_{26}\text{H}_{50}\text{O}_{10}$) koje mogu permeabilizirati bakterijske stanične membrane te posljedično poboljšati otpuštanje staničnih enzima iz MO (Karn i Kumar, 2019; Barman i dr. 2022).

Nakon ekstrakcije slijedi odvajanje sirovog enzima od ostataka stanica centrifugiranjem ili filtriranjem, a zatim se enzim koncentrira, čisti i stabilizira (Patel i dr. 2023). Metode koncentracije enzima uključuju ultrafiltraciju i precipitaciju. Ultrafiltracija je blaga metoda, što je čini pogodnom za enzime osjetljive na toplinu ili druge oštre uvjete. Precipitacija uključuje dodavanje sredstva za precipitaciju (poput amonijevog sulfata) u otopinu enzima, što dovodi do agregacije enzima i njihovog taloženja iz otopine, nakon čega slijedi izdvajanje enzima centrifugiranjem. Tehnike pročišćavanja uključuju odvajanje enzima na osnovi molekulske mase, naboja, afiniteta ili adsorpcije, često koristeći kromatografske metode. Stabilizacija enzima može se primjerice postići imobilizacijom enzima na

Tablica 7: Proizvodnja enzima iz mulja.

Supstrat/Predobrada	Procesni uvjeti	Enzim	Rezultati	Literatura
aktivni mulj/sonifikacija; CER, EDTA; formaldehid (F)	sonifikacija: $P=120 \text{ W/cm}^2$, $t=2 \text{ min}$; CER: 70 g/g VSS , $T=4 \text{ }^\circ\text{C}$, $t=1 \text{ h}$; EDTA: $10 \text{ cm}^3 \text{ 2 \%}$, $T=4 \text{ }^\circ\text{C}$, $t=3 \text{ h}$; F: $0,06 \text{ cm}^3 \text{ 36 \% F}$, $T=4 \text{ }^\circ\text{C}$, $t=1 \text{ h}$;	proteaza α -amilaza, α -glukozidaza	sonifikacija: proteaza 23 U/g VSS , α -amilaza 15 U/g VSS , α -glukozidaza 319 U/g VSS ; CER: proteaza 3 U/g VSS , α -amilaza 11 U/g VSS , α -glukozidaza 188 U/g VSS ; EDTA: proteaza 23 U/g VSS , α -amilaza 14 U/g VSS , α -glukozidaza 305 U/g VSS ; F: proteaza 28 U/g VSS , α -amilaza 10 U/g VSS , α -glukozidaza 225 U/g VSS ;	(Yu i dr. 2007)
aktivni mulj/sonifikacija; EDTA	sonifikacija: $f=20 \text{ kHz}$, $P=552 \text{ W/g TSS}$, $t=10 \text{ min}$ EDTA: $2 \text{ \%}$, $T=4 \text{ }^\circ\text{C}$, $t=3 \text{ h}$	proteaza, α -amilaza, ALP, KF	sonifikacija: proteaza 3 U/g VSS ; α -amilaza 21 U/g VSS ; ALP 8 U/g VSS ; KF 4 U/g VSS ; EDTA: α -amilaza 82 U/g VSS	(Guanghui i dr. 2009)
zgusnuti aktivni mulj/miješanje; sonifikacija + aditivi (CER, TX)	miješanje: $\text{pH}=7$; $0,48 \text{ g/cm}^3$ CER; $5 \text{ \% T}$; sonifikacija; sonifikacija + $2 \text{ \% (v/v) TX}$	proteaza	miješanje: $15,5 \text{ U/g VSS}$ sonifikacija bez aditiva: 21 U/g VSS sonifikacija + 2 \% T: 25 U/g VSS	(Nabarlatz i dr. 2010)
aktivni mulj/sonifikacija + TX	sonifikacija: $f=24 \text{ kHz}$, $P=3,9 \text{ W/cm}^2$, $t=30 \text{ min}$, $T=5 \text{ }^\circ\text{C}$, $0,1 - 2 \text{ \% (v/v) T}$	proteaza i lipaza	proteaza max. 52 U/g VSS lipaza max. $22,9 \text{ U/g VSS}$	(Nabarlatz i dr. 2012)

Supstrat/Predobra	Procesni uvjeti	Enzim	Rezultati	Literatura
aktivni mulj iz proizvodnje papira + aktivni mulj 5 : 75 / /sonifikacija; sonifikacija + aditivi (TX, AOT)	sonifikacija: $E_s = 27,027 \text{ kJ/kg TS}$, $t = 10 \text{ min}$, $T = 30^\circ \text{C}$; sonifikacija + 0,1-3% (v/v) TX; sonifikacija + 0,1 - 3% (v/v) AOT	proteaza, α -amilaza, lipaza,	sonifikacija bez aditiva: proteaza 7 U/g VSS, α -amilaza 42 U/g VSS, lipaza 19 U/g VSS; sonifikacija + TX: proteaza max. 42 U/g VSS, α -amilaza max.54 U/g VSS, lipaza max. 23 U/g VSS; sonifikacija + AOT: proteaza max. 22 U/g VSS, α -amilaza max. 38 U/g VSS, lipaza max. 16 U/g VSS	(Anbazhagan i Palani 2018)
sušeni aktivni mulj ($T=45^\circ \text{C}$, $t=7 \text{ d}$)/miješanje	miješanje: 100 cm^3 50 mM Na-acetata, $\text{pH}=4,8$, $T=28^\circ \text{C}$, $t=1 \text{ h}$	ksilanaza, egzo-celulaza	ksilanaza 227,97 U/g VSS, egzo-celulaza 135,25 U/g VSS	(Loureiro i dr. 2018)
zgusnuti aktivni mulj/ sonifikacija,; sonifikacija + TX	sonifikacija: $P = 872 \text{ W/dm}^3$, $t = 10 \text{ min}$; sonifikacija + 1% (v/v) TX	proteaza, α -amilaza, celulaza	sonifikacija bez aditiva: proteaza 2, 7 U/g VSS, α -amilaza 22,4 U/g VSS, celulaza 6,8 U/g VSS sonifikacija + TX: proteaza 5,6 U/g VSS, α -amilaza 24,6 U/g VSS, celulaza 7,7 U/g VSS	(Liu i Smith 2019)
aktivni mulj iz proizvodnje papira/ sonifikacija + aditivi (CER, TX)	sonifikacija: $f = 24 \text{ kHz}$, $P = 3,9 \text{ W/cm}^2$, $t = 30 \text{ min}$, $T = 5^\circ \text{C} + 0,1 - 3\% \text{ (v/v) TX}$; sonifikacija + 40-60 g CER/g VSS	proteaza, lipaza	sonifikacija + CER: proteaza max. 600 U/g VSS, lipaza max.182 U/g VSS; sonifikacija + TX: proteaza max. 3520 U/g VSS, lipaza max. 410 U/g VSS	(Karn i Kumar 2019)
mulj iz proizvodnje tekstila + aktivni mulj, 50: 50/ sonifikacija + SLS	sonifikacija: $f = 20 \text{ kHz}$, $t = 15 \text{ min}$, 5 g SLS	amilaza glukozidaza	amilaza 1326,56 U/g VSS glukozidaza 1174,16 U/g VSS	(Velusmay i dr. 2023)
zgusnuti mulj + aditivi (SDS, SDBS, CTAC, TAC)	$T = 125^\circ \text{C}$, $p = 20 \text{ bar}$, $t = 4 \text{ h}$, $c(\text{SDS, SDBS}) = 50 \text{ mg/g VSS}$, $c(\text{CTAC, TAC}) = 10 \text{ mg/g VSS}$ HM: $V = 50 \text{ cm}^3$, 10 % inokuluma, $T = 37^\circ \text{C}$, $t = 24 \text{ h}$	proteaza	bez aditiva: 450 U/cm ³ ; SDS: 501 U/cm ³ ; SDBS: 700 U/cm ³ ; CTAC: 678 U/cm ³ ; TAC: 456 U/cm ³	(Romero i dr. 2024)

Napomena: ALP - alkalna fosfataza, AOT - natrijeva sol dioktil sulfosukcinata CER - kationska izmjenjivačka smola; CTAC – cetil trimetil amonijev klorid E_s – specifična energija ultrazvuka; F - formaldehid; HM - hidrolizirani mulj; KF - kiselina fosfataza; SDS – natrijev dodecil sulfat; SDBS – natrijev dodecilbenzen sulfonat SLS – natrijev lauril sulfat; TAC – tetraetil amonijev klorid; TX – Triton X-100.

čvrsti nosač, kemijskom modifikacijom površine enzima umrežavanjem ili PEGilacijom (vezanje lanaca polietilen glikola za molekulu enzima) te dodavanjem aditiva poput krioprotektanata, inhibitora ili koenzima (Silva i dr. 2018; Liu i Smith, 2023).

2.6. Biopesticidi

Biopesticidi se mogu definirati kao biološke tvari, dobivene iz bakterija, enteropatogenih gljivica, biljaka, nematoda i virusa, koje djeluju protiv štetnika usjeva te se mogu koristiti za povećanje održive poljoprivredne produktivnosti. U usporedbi sa sintetičkim pesticidima nisu štetni za okolinu, ne ostavljaju toksične ostatke u zemljištu i biljkama, brzo se razgrađuju te su većinom veoma selektivni tj. utječu samo na onaj patogen kojem su namijenjeni (Ayilara i dr. 2023).

Mikrobne vrste izolirane iz rizosferskog tla i različitih ekoloških niša, kao što su *Trichoderma viride*, *Metarhizium anisopliae*, *Pseudomonas spp.*, *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *B.*

licheniformis, *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis*, *B. firmus* i *B. nakamurai* proizvode različite metabolite koji mogu suzbijati štetne patogene i štetnike u poljoprivredi, čime se smanjuje potreba za kemijskim pesticidima. Produkti metabolizma spomenutih MO su toksini, kristali, spore i antibiotici, koji štite biljke djelujući antagonistički na uzročnike bolesti, štetne insekte, nematode i korove, pri čemu su bezopasni za ljude i okoliš. Također, proizvode vitamine, enzime i biljne hormone koji mogu djelovati na imunološki sustav biljaka, povećavajući njihovu otpornost (Molina-Peñate i dr. 2023). Proizvodnja ovih entomopatogenih MO konvencionalno se provodi u sintetskom mediju koji sadrži ugljik, dušik, ekstrakte kvasca i izvore proteina (npr. sojino brašno, riblje brašno) glukozu, pepton i elemente u tragovima. Troškovi supstrata ovisno o proizvodnom kapacitetu postrojenja iznose 40 - 60 % ukupnih troškova proizvodnje. Stoga bi mulj nastao tijekom obrade otpadnih voda mogao poslužiti kao jeftin, nutrijentima bogat alternativni medij

za proizvodnju biopesticida. Za uspješnu proizvodnju, ključno je osigurati da mulj koji se koristi bude bez štetnih onečišćenja ili da se tijekom proizvodnog procesa onečišćenja učinkovito uklone. Primjerice, prisutnost toksičnih teških metala u mulju utječe na rast, sporulaciju i proizvodnju kristalnog toksina Bt stanica. Iako su mnogi metali esencijalni za žive sustave, ipak su u prekomjernim koncentracijama štetni za žive organizme. Nadalje, sastav i osobine mulja mogu varirati ovisno o postrojenju za pročišćavanje otpadnih voda i sezonskim promjenama, što može utjecati na prinos i kvalitetu biopesticida (Zhang i dr. 2018).

Biopesticidi na bazi *Bacillus thuringiensis* (Bt) su najpoznatiji i u svijetu najviše korišteni biološki agensi za selektivnu kontrolu štetnih insekata kako u agronomiji tako i šumarstvu te javnom zdravstvu. U nepovoljnim uvjetima za preživljavanje ovi organizmi sporuliraju i proizvode proteinske parasporalne kristalne inkluzije - endotoksine koji djeluju kao insekticidi na različite vrste kukaca. Proces proizvodnje Bt-a iz mulja sastoji se od tri ključne faze: fermentacije prethodno zgusnutog, odvođenog ili osušenog mulja, izdvajanja i pročišćavanja proizvoda te formulacije proizvoda. Ključni procesni parametri za proizvodnju Bt-a fermentacijom mulja uključuju pH, temperaturu, aeraciju, miješanje, veličinu i starost inokuluma, koncentraciju mulja i C/N omjer (Jallouli i dr. 2020). Optimiziranje ovih parametara ključni su za rast i sporulaciju Bt-a te postizanje visoke entomotoksičnosti (proizvodnje toksina) u konačnom proizvodu. Premda se Bt-a dobro razvija pri neutralnom pH, optimalni pH za rast i sporulaciju može varirati ovisno o specifičnom soju i sastavu medija. Temperatura oko 30 °C obično je pogodna za rast Bt-a, koju treba tijekom procesa pratiti kako bi se spriječio gubitak učinkovitosti. Dovoljno prozračivanje tijekom fermentacije ključno je za maksimiziranje rasta stanica, sporulaciju i proizvodnju δ -endotoksina od strane Bt-a, što istovremeno može uzrokovati jako pjenjenje ovisno o količini krutih tvari prisutnih u mulju (Boniolo i dr. 2012). Kako bi se spriječilo pjenjenje, mogu se koristiti sredstva protiv pjenjenja i/ili optimizirati procesne parametre primjerice, miješanje, prozračivanje, koncentraciju nutrijenata, temperaturu i pH. Kao sredstva protiv pjenjenja koriste se sintetska (npr. propilen glikol) ili prirodna sredstva poput maslinovog, kikirikijevog, sezamovog, sojinog i suncokretovog ulja. Međutim, sintetička sredstva protiv pjenjenja mogu negativno utjecati na respiratornu aktivnost i rast stanica utječući na transport hranjivih tvari i kisika kroz stanične stijenke. S druge strane, kontrola pjenjenja korištenjem prirodnih ulja pokazala se povoljnijom s manje ozbiljnim utjecajima na rast stanica i entomotoksičnost (Vidarthi i dr. 2000).

Kako bi se potaknuo rast Bt-a i maksimizirala sporulacija te formiranje kristala, mogu se koristiti različite metode predobrade mulja. Predobrada pomaže u otapanju i razgradnji složenih organskih tvari čineći ih dostupnijim za Bt-a. Primjerice, termo-alkalnom predobradom mulja postiže se i do 50 %-tno

poboljšanje entomotoksičnosti što se može pripisati boljem prijenosu kisika zbog smanjenja viskoznosti medija te poboljšanja dostupnosti hranjivih tvari zbog otapanja i biorazgradnje mulja (Yezza i dr. 2005; Barnabe i dr. 2006). Predobrada mulja kiselinama također poboljšava performanse mulja u održavanju rasta, sporulacije i proizvodnje endotoksina Bt-a (podvrsta kurstaki HD-1). Oksidansi poput Fentonovog reagensa utječu na poboljšanje filtrabilnosti i biorazgradivost mulja za ~ 50 %, čime se poboljšava dostupnost hranjivih tvari za rast Bt-a (Brar i dr. 2007). Alkalna i ultrazvučna metoda predobrade pospješuju rast i metabolizam Bt-a, pri čemu se ultrazvučna obrada pokazala učinkovitija u smislu veće proizvodnje δ -endotoksina i veće entomotoksičnosti (Chang i dr. 2007).

Kada se postigne željeni mikrobiološki rast i proizvodnja biopesticida, Bt stanice, kristali i spore izdvajaju se iz fermentacijske juhe centrifugiranjem ili ultrafiltracijom, a zatim se Bt-a čisti, koncentrira, stabilizira i formulira u upotrebljiv proizvod, uzimajući u obzir čimbenike poput metode primjene i okolišne uvjete (Jallouli i dr. 2020). Centrifugiranje je uobičajena metoda za odvajanje stanica i staničnih ostataka iz tekućeg medija. Pritom se sila i vrijeme centrifugiranja trebaju optimizirati kako bi se maksimizirao oporavak i iskorištenje na Bt-a te minimizirali gubici. Pri ultrafiltraciji kojom se također odvaja netopiva krutina od tekuće faze, potrebno je optimizirati transmembranski tlak i protok hranjive tvari kako bi se povećala entomotoksičnost Bt-a (Chang i dr. 2012; Rad i dr. 2016). Pročišćavanje Bt-a obično uključuje odvajanje insekticidnih kristalnih proteina od drugih staničnih komponenti prvenstveno od spora i staničnog otpada. Separaciju kristala od ostatka bakterijskih spora ometa sklonost spora da se grupiraju i zarobe kristale (Rahbani Mounsef i dr. 2014). Međutim, moguće ih je razdvojiti na osnovi razlika njihovih fizičkih značajki, prvenstveno gustoće i topljivosti. Kristali Bt-a, koji su gušći, mogu se odvojiti gradijentnim centrifugiranjem. Osim toga, njihova topljivost pri visokom pH omogućava selektivno otapanje kristala dok spore ostaju relativno netaknute. Primjerice, korištenjem heksana i male brzine centrifugiranja može se postići 99 %-tno iskorištenje na čistim proteinskim kristalima (Rahbani i dr. 2014). Korištenjem dvofaznog sustava polimer/sol (PEG 6000 2%/(NH₄)₂SO₄ 16%) integriranim s ekstrakcijom spora u PEG/dekstran sustavu, postignuto je 81,4 %-tno iskorištenje na kristalima, a uklanjanje spora bilo je veće od 90 % (Lin i dr. 2003). Primjenom mikrofiltracije s unakrsnim tokom iz fermentiranog mulja izdvojeno je 95 % kristala i 99 % spora (Chang i dr. 2012). Nakon odvajanja, kristali Bt-a mogu se dalje obrađivati kako bi se uklonile sve preostale spore i stanični ostaci. To se može postići raznim metodama poput centrifugiranja, flotacije ili kromatografije. Pročišćeni biopesticid kombinira se s drugim tvarima (adjuvanti, surfaktanti, nositelji) kako bi se poboljšala njegova stabilnost, učinkovitost i lakša primjena. Potonji moraju biti ekološki prihvatljivi

Tablica 8: Proizvodnja biopesticida (na bazi *Bacillus thuringiensis*)

Supstrat	Predobrada mulja	Uvjeti fermentacije	Br. stanica,	Br. spora,	Koncentracija ó-endotoksina	Entomotoksičnost	Literatura
OAM AM (TS=20 g/dm ³)	-	T = 30-37 °C, pH = 7, n = 300 o/min, c(l) = 2 % (v/v),	OAM: 3,9x10 ⁸ CFU/cm ³ AM: 3,1x10 ⁸ CFU/cm ³	OAM: 2,5x10 ⁸ CFU/cm ³ AM: 2,2 CFU/cm ³	-	OAM: 10,8 IU/cm ³ AM: 8,84 IU/cm ³	(Vidyarthi i dr. 2002)
AM (TS=25 g/dm ³)	-	T = 30 °C, pH = 7, n = 300 o/min, c(l) = 0,1% (v/v), t=24 h, Q=0,3 dm ³ zraka/dm ³ h	ŠR: 1,6x10 ⁸ CFU/cm ³ PKR: 9,0x10 ⁸ CFU/cm ³	ŠR: 5,62x10 ⁸ CFU/cm ³ PKR: 8,6x10 ⁸ CFU/cm ³	-	ŠR: 1,5 IU/cm ³ PKR: 2,3 IU/dm ³	(Yeza i dr. 2005)
AM (TS=20 g/dm ³)	Termo-alkalna: pH = 10, T = 140 °C, t = 30 min, n = 100 o/min; Kemijska: 0,2 % H ₂ O ₂ /g mulja, T = 70 °C, n = 100 o/min, t=2 h	T = 30 °C, pH=7, n = 300 o/min, c(l) = 0,1% (v/v), t=48 h, Q=0,3 dm ³ zraka/dm ³ min	BP: 0,5x10 ⁸ CFU/cm ³ TAP: 0,4x10 ⁸ CFU/cm ³ OP: 0,5x10 ⁸ CFU/cm ³	BP: 5,4x10 ⁸ CFU/cm ³ TAP: 7,9x10 ⁸ CFU/cm ³ OP: 5,8x10 ⁸ CFU/cm ³	-	BP: 12,3x10 ⁹ SBU/dm ³ TAP: 16,6x10 ⁹ SBU/dm ³ OP: 13,1x10 ⁹ SBU/dm ³	(Yeza i dr. 2006)
OAM (66,7 %) +PM (33,3 %) +PS (33,3 %)	-	T=30-37 °C, pH=7, c(l)=2 % (v/v), q(VZ)=100 cm ³ /min	OAM: 1,1x10 ¹⁰ CFU/g OAM+PM: 5,9x10 ¹⁰ CFU/g OAM+PS: 1,9x10 ¹⁰ CFU/g	OAM: 9,2x10 ⁹ CFU/g OAM+PM: 5,3x10 ¹⁰ CFU/g OAM+PS: 1,6x10 ¹⁰ CFU/g	OAM: 2,39 mg/g OAM+PM: 7,1 mg/g OAM+PS: 5,2 mg/g	OAM: 1595 IU/mg OAM+PM: 4758 IU/mg OAM+PS: 2659 IU/mg	(Zhuang i dr. 2011)
AM+MgSO ₄ (0,5 g/dm ³) + RS(5g/dm ³)	Termo-alkalna: pH = 10, T = 121 °C, t = 30 min	T=30 °C, pH=7, n = 200 o/min, c(l)=2 % (v/v), TS = 2 %, t=56 h	AM: 1,5x10 ⁸ CFU/cm ³ AM+M: 3,1x10 ⁸ CFU/cm ³ AM+RS: 5,1x10 ⁸ CFU/cm ³	AM: 1,3x10 ⁸ CFU/cm ³ AM+ M: 2,7x10 ⁸ CFU/cm ³ AM+RS: 4,8x10 ⁸ CFU/cm ³	AM: 420 mg/dm ³ AM+ M: 510 mg/dm ³ AM+RS: 509 mg/dm ³	-	(Hoa i dr. 2014)
AM	-	T=30 °C, pH=7, n = 300 o/min, q(Z)= 2,5 dm ³ /min, V(l) = 60 cm ³ , t=48 h	3,5x10 ⁸ CFU/cm ³	2,8x10 ⁸ CFU/cm ³	350 mg/g	14,5 IU/cm ³	(Nadao i dr. 2021)
AM (50 %) + DKO (25 %)	-	T=30 °C, pH=7, q(Z)= 3,7 dm ³ /g _{st} h, n =150 o/min, c(l)= 10 ⁸ CFU/ cm ³ , t=72 h	1,1x10 ⁹ CFU/cm ³	6,4x10 ⁸ CFU/cm ³	-	-	(Molina-Peñate i dr. 2023)
OAM (70 %)+ ČD (30 %)	-	T= 30 °C, pH = 8, m(supstrata)=4,4 kg, V(l) =132 cm ³ q(VZ)=1g O ₂ /kg _{st} h, t = 72 h	5,1x10 ⁸ CFU/g	2,3x10 ⁸ CFU/g	-	-	(Font-Pomarol i dr. 2025)

Napomena: AM – aktivni mulj; BP – bez predobrade; C/N – omjer dušika i ugljika; ČD – čips drvca; DKO – digestat komunalnog otpada; I – inokulum; M - MgSO₄ x7 H₂O; n - broj okretaja miješalice; OAM – odvođeni aktivni mulj; OP - oksidacijska predobrada; PKR – polukontinuirani reaktor; PS – pšenične mekinje; PM – prašak od slame; q – protok; Q - brzina aertacije; RS – rižina slama; ŠR - šaržni reaktor; TAP – termo-alkalna predobrada; TSB - Triptikasein sojin bujon; VZ - vlažan zrak.

te inertni prema aktivnim sastojcima. Tijekom cijelog procesa, mjere kontrole kvalitete su ključne kako bi se osigurala sigurnost i učinkovitost konačnog proizvoda. To uključuje praćenje čistoće, učinkovitosti i stabilnosti biopesticida u svakoj fazi proizvodnog procesa kako bi se osigurala optimalna entomotoksičnost i fizikalne značajke biopesticida (Kariyanna i dr. 2024).

Većina radova koji se bave proizvodnjom biopesticida iz mulja još su uvijek u laboratorijskoj fazi istraživanja. Uvećanje proizvodnog procesa s laboratorijske ili pilotske razine na industrijsku razinu zahtijeva pažljivo optimiziranje procesnih parametara kako bi se osigurala dosljedna kvaliteta i prinos proizvoda. U [tablici 8](#) prikazan je utjecaj različitih supstrata, uvjeta fermentacije te predobrade mulja na broj živih stanica i spora te entomotoksičnost BT-a.

3. OGRANIČENJA I BUDUĆI IZGLEDI ZA PROIZVODNJU BIOSPOJEVA

Iako korištenje mulja kao resursa u kružnom gospodarstvu nudi značajne mogućnosti za oporavak različitih biomolekula, postoje i neki izazovi koje treba riješiti kako bi se u potpunosti iskoristio njegov potencijal. Glavna ograničenja vezana uz proizvodnju VFA, PHA, EPS, proteina, enzima i posticida te izgledi za daljnja istraživanja navedena su u [tablici 9](#).

Rješavanjem ovih ograničenja i istraživanjem potencijala inovativnih tehnologija moguće je osloboditi značajan potencijal mulja kao vrijednog resursa za proizvodnju biomolekula te doprinijeti održivijem i kružnijem biogospodarstvu u području obrade otpadnih voda.

Tablica 9: Ograničenja i izgledi za oporavak biomolekula iz mulja.

Biomolekule	Ograničenja	Izgledi
Hlapive masne kiseline (VFA)	- Procesi fermentacije često daju niske konc. VFA, što otežava odvajanje i pročišćavanje te utječe na ukupnu ekonomičnost procesa. - Proizvedene masne kiseline se često proizvode kao smjesa, što zbog sličnih kemijskih svojstava zahtijeva složene i skupe tehnike odvajanja. - Potreba za predobradom mulja kako bi se poboljšala njegova topljivost i učinilo ga pogodnijim za proizvodnju VFA. - Visoke koncentracije VFA mogu inhibirati mikrobnu aktivnost u procesu fermentacije, smanjujući brzinu hidrolize i proizvodnje kiseline. - Iako obećavajuća, tehnologija za proizvodnju VFA iz mulja još nije u potpunosti optimizirana za isplativu provedbu velikih razmjera.	- Istraživanje novih metoda predobrade, poput termičke hidrolize, ultrazvučne i enzimске hidrolize, može poboljšati razgradnju i solubilizaciju mulja, što dovodi do većeg prinosa VFA. - Kodigestija mulja s drugim organskim otpadom (npr. otpadom od hrane, poljoprivrednim ostacima) može poboljšati proizvodnju VFA uravnoteženjem omjera C/N i povećanjem mikrobne aktivnosti. - Razvoj učinkovitih i isplativih metoda za odvajanje i pročišćavanje pojedinačnih VFA iz fermentacijske juhe ključan je za daljnje primjene. - Istraživanja mikrobnih konzorcija i korištenje specifičnih metanogenih sojeva mogu optimizirati proizvodnju VFA i poboljšati učinkovitost procesa. - Integriranje proizvodnje VFA s drugim procesima, poput proizvodnje PHA može stvoriti održiviji i integriraniji pristup biorafineriji. - Razvoj odgovarajućih regulatornih okvira i smjernica za proizvodnju VFA iz mulja nužan je za promicanje njihove široke primjene.
Polihidroksialkanoati (PHA)	- Visoka cijena u usporedbi s konvencionalnim plastikama. - Na niske prinose PHA utječu čimbenici poput dostupnosti supstrata, sastava mikrobne zajednice i procesnih parametara. - Potreba za predobradom mulja. - Ekstrakcija i pročišćavanje PHA iz složene matrice mulja može biti energetski intenzivna i skupa. - Topinska nestabilnost i krhkost PHA onemogućava njihovu široku primjenu. - Optimalni uvjeti (kao što su idealne koncentracije dušika i fosfora, temperatura i razine kisika) ključni su za proces te se moraju pažljivo kontrolirati za učinkovitu akumulaciju PHA. - Uvećanje laboratorijskih procesa proizvodnje PHA na industrijsku razinu je složeno i zahtijeva robusne i isplative tehnologije.	- Razvoj učinkovitih metoda predobrade mulja kako bi se poboljšalo otapanje supstrata, povećao prinos PHA i smanjila potrošnja energije. - Identificiranje i korištenje mikroorganizama s visokim potencijalom akumulacije PHA i optimizacija njihovih metaboličkih putova ključni su za poboljšanje učinkovitosti proizvodnje. - Optimizacija uvjeta fermentacije, poput dostupnosti hranjivih tvari, pH-vrijednosti i temperature, može značajno utjecati na proizvodnju PHA. - Istraživanje inovativnog dizajna reaktora, poput SBR-reaktora s ciklusima hranjenja i gladi, može poboljšati selekciju bakterija koje akumuliraju PHA. - Razvoj učinkovitijih i isplativijih metoda za ekstrakciju i pročišćavanje PHA bit će ključan za komercijalizaciju. - Integriranje proizvodnje PHA s drugim procesima obrade mulja, poput proizvodnje bioplina, može poboljšati ukupnu ekonomsku isplativost procesa.

Izvanstanične polimerne tvari (EPS)	• Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se optimizirali radni parametri (npr. brzina organskog opterećenja, COD/N, vrijeme zadržavanja) radi maksimiziranja iskorištenja. • Optimizacija i standardizacija metoda ekstrakcije nužni su za maksimiziranje prinosa i kvalitete oporavljenog biopolimera ne samo u laboratorijskoj/pilotnoj mjeri već i u punoj mjeri. • Nizak prinos EPS-a, što proces čini ekonomski neisplativim za primjenu u velikim razmjerima. • Potrebna daljnja karakterizacija oporavljenog EPS-a kako bi se osigurala njihova kvaliteta i prikladnost za različite primjene (farmaceutska, ekološka, poljoprivredna itd.). • Oporavak EPS-a može biti složen, budući da na proces utječu čimbenici poput vrste EPS-a, karakteristika mulja i metoda ekstrakcije. • Nedostatak standardiziranih metoda za ekstrakciju i analizu EPS-a dovodi do varijabilnosti u rezultatima istraživanja, što otežava usporedbu i repliciranje studija. • Troškovi povezani s ekstrakcijom, pročišćavanjem i obradom EPS-a mogu biti značajni, što ometa široku primjenu.	• Istraživačke napore nužno je usmjeriti na optimizaciju proizvodnje EPS-a identifikiranjem učinkovitih mikrobnih sojeva, razvojem prikladnih uvjeta uzgoja i povećanjem prinosa EPS-a putem genetskog i metaboličkog inženjeringa. • Potrebna su daljnja istraživanja budući da EPS ima potencijalnu široku primjenu u raznim područjima, uključujući pročišćavanje otpadnih voda (flokulacija, odvodnjavanje), proizvodnju bioenergije, bioremedijaciju i razvoj novih materijala. • Buduća istraživanja treba usredotočiti na proizvodnju EPS-a sa specifičnim svojstvima (molekularna težina, sastav itd.) za ciljane primjene. • Istraživanje integracije proizvodnje EPS-a s postojećim procesima obrade otpadnih voda (npr. aktivni mulj, membranski bioreaktori) može poboljšati oporavak resursa i održivost. • U tijeku su istraživanja za smanjenje troškova proizvodnje i poboljšanje prinosa EPS-a optimizacijom procesa, poboljšanjem soja i razvojem učinkovitih metoda oporavka. • Uspostavljanje standardiziranih protokola za ekstrakciju, analizu i karakterizaciju EPS-a ključno je za napredak istraživanja i olakšavanje usporedbe rezultata.
Proteini	• Otpadni mulj sadrži teške metale, patogene i druge organske zagađivače koji se mogu koncentrirati tijekom procesa obrade te predstavljaju rizik ako se dobiveni protein koristi u stočnoj ili ljudskoj hrani. • Složena struktura mulja ometa učinkovitu razgradnju organske tvari i oslobađanje proteina. • Otežano razbijanje složenih staničnih stijenki mikroba kako bi se oslobodili proteini. • Mulj sadrži druge složene biopolimere poput lipida, ugljikohidrata i nukleinskih kiselina, koji mogu ometati oslobađanje proteina i učinkovitost ekstrakcije. • Metode predobrade poput sonikacije, alkalne obrade ili termalnih procesa mogu biti skupe i zahtijevati značajan unos energije. • Potreba za učinkovitim procesima ekstrakcije i pročišćavanja. • Anaerobna digestija može biti spora i neučinkovita za oporavak proteina, pri čemu značajan dio organske tvari ostaje u digestatu.	• Istražiti i optimizirati kombinirane fizičke (npr. ultrazvuk, toplina) i kemijske (npr. enzimatske, alkalne) metode kako bi se maksimizirala učinkovitost ekstrakcije proteina uz minimiziranje troškova i utjecaja na okoliš. • Razvijati strategije za regulaciju mikrobiološke aktivnosti i sekrecije enzima za ciljanu razgradnju otpornih proteina u mulju. • Karakterizirati funkcionalna svojstva ekstrahiranih proteina kako bi se odredila njihova prikladnost za specifične primjene, npr. za stočnu hranu, dodatke prehrani ili sredstva za pjenjenje. • Istraživanje novih metoda za odvajanje i pročišćavanje proteina, poput membranske filtracije, kromatografije ili selektivnog taloženja. • Kombiniranje mulja s drugim organskim otpadom (npr. otpadom od hrane) može potencijalno poboljšati oporavak proteina. • Istraživanje potencijala tehnologije rekombinantne DNA za proizvodnju specifičnih proteina iz mulja.

Enzimi	• Složen fizički i kemijski sastav mulja može otežati procese ekstrakcije i pročišćavanja enzima. • Enzimi su često imobilizirani na ili unutar matrice EPS-a, što otežava njihovo otpuštanje bez izazivanja inaktivacije. • Mulj često sadrži metale i druga onečišćenja koji mogu • kontaminirati izdvojene enzime ili otežati procese ekstrakcije i pročišćavanja. • Neke metode ekstrakcije mogu dovesti do djelomične ili potpune inaktivacije enzima. • Neke metode ekstrakcije mogu uzrokovati koroziju ili zahtijevati visok unos energije, što predstavlja izazove za okoliš i opremu. • Procesi ekstrakcije mogu utjecati na performanse filtracije mulja, a dugi vremenski period ekstrakcije može dovesti do daljnje hidrolize proteina u manje korisne aminokiseline. • Visoki troškovi povezani s proizvodnjom i oporavkom enzima ograničavaju široku primjenu ove tehnologije.	• Daljnje istraživanje optimizacije procesnih parametara poput temperature, pH vrijednosti i doze enzima kako bi se maksimizirala učinkovitost ekstrakcije enzima i čistoća. • Istraživanje učinaka specifičnih mikrobioloških konzorcija i bioloških metoda na predobradu mulja kako bi se poboljšala razgradnja biomase i oporavak enzima. • Istraživanja vezana za identifikaciju i izolaciju specifičnih enzima, poput lipaze, proteaze ili celulaze, s visokim biotehnološkim potencijalom za razne industrijske primjene. • Istraživanje potencijala formuliranja mješavina oporavljenih enzima (poput amilaze, glukozidaze, fosfataze) u komercijalno održive proizvode za razne industrije. • Imobilizacija enzima na nanomaterijalima može poboljšati njihovu stabilnost i aktivnost, omogućujući ponovnu upotrebu i smanjujući potrebu za čestim dodavanjem enzima. • Istraživanje upotrebe oporavljenih enzima za razgradnju postojanih zagađivača, poput masti, ulja, farmaceutika i proizvoda za osobnu njegu, u procesima pročišćavanja otpadnih voda.
Biopesticidi	• Proizvodnja biopesticida može biti skuplja od tradicionalnih kemijskih pesticida zbog troškova predobrade mulja i nižih prinosa. • Karakteristike mulja mogu se značajno promijeniti zbog sezonskih varijacija, što izravno utječe na konzistenciju prinosa i kvalitete biopesticida. • Mulj može sadržavati razne mikroorganizme ili inhibicijske tvari koje mogu utjecati na rast ili aktivnost željenog mikroba koji proizvodi biopesticid. • Visoka koncentracija čvrstih tvari u mulju može ograničiti prijenos kisika u fermentoru, što negativno utječe na rast i aktivnosti mikroba. • Promjene u sastavu mulja i procesnim parametrima mogu rezultirati nedosljednom snagom biopesticida, što utječe na njegova pouzdanost i učinkovitost u kontroli štetnika. • Biopesticidi mogu biti osjetljivi na uvjete okoline (temperaturu, vlažnost, UV zračenje), a njihova učinkovitost može varirati ovisno o specifičnom štetniku i uvjetima primjene.	• Istražiti specifične mikrobiološke sojeve unutar mulja koji proizvode poznate insekticide, fungicide ili nematicide. Istraživanje se treba usredotočiti na identifikaciju proteina, metabolita ili sekundarnih metabolita odgovornih za željenu aktivnost. • Korištenje genetskog inženjeringa i metaboličkog inženjeringa za poboljšanje proizvodnje biopesticida, specifične toksičnosti za štetnike. • Optimizacija procesa fermentacije i razvoj učinkovitih tehnika naknadne obrade radi smanjenja troškova proizvodnje. • Razvoj i optimiziranje učinkovitog i ekonomičanog načina za ekstrakciju biopesticida iz mulja. • Razvoj naprednih formulacija koje poboljšavaju stabilnost, učinkovitost i primjenu biopesticida u različitim uvjetima okoliša. • Integriranje biopesticida u šire integrirane strategije suzbijanja štetočina, uz druge metode suzbijanja, kako bi se maksimizirala njihova učinkovitost i smanjila ovisnost o kemijskim pesticidima • Pronalaženje novih primjena izvan poljoprivrede, kao što su suzbijanje vektora i javno zdravstvo

ZAKLJUČAK

Obrada i zbrinjavanje mulja predstavlja usko grlo svakog UPOV-a. Tradicionalne metode zbrinjavanja, poput odlaganja i kompostiranja, sve se češće zamjenjuju alternativnim pristupima koji se fokusiraju na oporabu vrijednih bioproizvoda iz mulja koji potencijalno mogu pronaći primjenu kao održive alternative zelenim proizvodima u vrijeme kada čovječanstvo sve više gleda prema budućnosti kružnog gospodarstva. Nažalost, mnoge mogućnosti uporabe mulja prikazane u ovom radu daleko su od ostvarenja.

Komercijalna proizvodnja polihidroksialkanoata (PHA) iz mulja još uvijek nije u potpunosti ostvarena. Međutim, postignut je značajan napredak kroz pilot i demonstracijske projekte, poput PHARIO projekta u Nizozemskoj. Dok su projekti pokazali izvedivost i dosljednost proizvodnje visokokvalitetnog PHA (na razini kilograma), prijelaz na industrijsku provedbu je u tijeku, pri čemu su trenutna istraživanja fokusirana na prevladavanje preostalih tehničkih i ekonomskih prepreka poput visokih troškova proizvodnje i potrebe za daljnjom optimizacijom procesa.

Proizvodnja hlapivih masnih kiselina (VFA) iz mulja implementirana je u UPOV u punom mjerilu (najmanje jedan projekt), pokazujući uspješnu stabilnu proizvodnju VFA kao vanjskog izvora ugljika za uklanjanje hranjivih tvari u postrojenjima za pročišćavanje otpadnih voda. Ova tehnologija integrira toplinsko-alkalnu predobradu mulja i anaerobnu fermentaciju kako bi se povećao prinos VFA, smanjio volumen mulja te poboljšao učinak uklanjanja dušika i fosfora potvrđujući njezinu tehničku i ekonomsku isplativost. Kako bi se postigao daljnji napredak potrebno je poraditi na optimizaciji reakcijskih parametara te odabiru netoksičnih MO.

Proizvodnja ekstracelularnih polimernih tvari (EPS) iz otpadnog mulja razvijena je u punoj mjeri s prvim procesom instaliranim u nizozemskom vodoopskrbnom sektoru. Tehnologija poput ekstrakcije Kaumere iz granuliranog mulja pokazuje da se EPS može oporaviti iz postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda. Međutim, potrebno je daljnje optimiziranje procesa kako bi se osigurali dosljedni prinosi i čistoća proizvoda čime se omogućava šira industrijska upotreba.

Izdvajanje proteina i enzima iz mulja još je uvijek skuplje u usporedbi s proizvodnjom iz zelenog otpada, a moguća prisutnost patogena i toksičnosti metala, predstavlja opasnost za zdravlje životinja što koči razvoj u ovom području. Proizvodnja proteina iako tehnički izvediva još uvijek nije razvijena u punoj mjeri. Treba riješiti značajne izazove koji uključuju visoku potrošnju energije, visoke proizvodne troškove i potrebu za skalabilnim i ekonomski isplativim metodama ekstrakcije. Trenutna istraživanja fokusirana su na razvoj i optimizaciju tih procesa te na procjenu njihove ekonomske održivosti. Proizvodnja enzima također nije razvijena do komercijalne razine, međutim, na osnovi dobivenih rezultata laboratorijskih istraživanja potvrđena je njena tehnička izvedivost. Kako bi se to ostvarilo potrebno je riješiti čitav niz izazova vezanih uz prinos, stabilnost i pročišćavanje enzima te optimizaciju metoda ekstrakcije i razvoj integriranih procesa kako bi se ekonomski opravdala uporaba enzima iz mulja.

Iako je tehnička izvedivost i potencijalna ekonomska održivost proizvodnje biopesticida iz mulja potvrđena u laboratorijskim i pilotnim istraživanjima, povećanje na punu industrijsku proizvodnju suočava se s izazovima vezanim uz dosljednost procesa, ekonomsku održivost te sigurno uklanjanje kontaminanata iz mulja.

Da bi ove tehnologije postale komercijalno održive, potrebna su daljnja istraživanja i unaprjeđenja na znanstvenoj, ekonomskoj i regulatornoj razini. Budući istraživački i inovacijski naponi trebali bi se usredotočiti na prevladavanje izazova vezanih uz promjenljivost sastava mulja, prisutnost različitih onečišćenja, iznalaženja prikladnih metoda pretretmana mulja te odvajanja i pročišćavanja specifičnih biomolekula iz složene mješavine mulja kao i na razvoj inovativnih tehnologija. Nadalje, treba istražiti ekološke i ekonomske utjecaje različitih strategija obrade i valorizacije mulja koristeći LCA analizu te procijeniti tehničku izvedivost, rizike,

troškove i koristi kako bi se utvrdila održivost svakog od procesa. Daljnja istraživanja trebaju se provesti u većim mjerilima (pilot-projekt i na kraju u punoj veličini) kako bi se optimizirao svaki proces proizvodnje biomolekula te u potpunosti istražile i razumjele tehnološko-ekonomske performanse procesa. Izvodljivost procesa također ovisi o kvaliteti proizvoda, njihovoj tržišnoj vrijednosti te prevladavanju regulatornih prepreka kao i negativnog javnog mišljenja o proizvodima dobivenih iz mulja.

Ipak, prvi korak je uvijek osvijestiti problem i raditi na optimizaciji rješenja kako bi se došlo do željenog cilja.

LITERATURA

Aghapour Aktij, S.; Zirehpour, A.; Mollahosseini, A.; Taherzadeh, M.J.; Tiraferri, A.; Rahimpour, A. 2020. Feasibility of membrane processes for the recovery and purification of bio-based volatile fatty acids: A comprehensive review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 81: 24–40.

Agnihotri, S.; Yin D-M.; Mahboubi, A.; Sapmaz, T.; Varjani, S.; Wei, Q.; Koseoglu-Imer, D.Y.; Taherzadeh, M.J. 2023. A glimpse of the world of volatile fatty acids production and application: A review. *Bioengineered*. 13: 1249-1275.

Ahuja, V.; Singh, P.K.; Mahata, C.; Jeon, J-M.; Kumar, G.; Yang, Y-H.; Bhatia, S.K. 2024. A review on microbes mediated resource recovery and bioplastic (polyhydroxyalkanoates) production from wastewater. *Microbial Cell Factories*. 23: 1-22.

Ajao, V.; Millah, S.; Gagliano, M.C.; Bruning, H.; Rijnaarts, H.; Temmink, H. 2019. Valorisation of glycerol/ethanol-rich wastewater to biofloculants: recovery, properties, and performance. *Journal of Hazardous Materials*. 375: 273–280.

Al-Battashi, H.; Al-Kindi, S.; Gupta, V.K.; Sivakumar, N. 2021. Polyhydroxyalkanoate (PHA) production using volatile fatty acids derived from the anaerobic digestion of waste paper. *Journal of Polymers and Environment*. 29: 250–259.

Al-Sulaimi, I.N.; Nayak, J.K.; Alhimali, H.; Sana, A.; Al-Mamun, A. 2022. Effect of volatile fatty acids accumulation on biogas production by sludge-feeding thermophilic anaerobic digester and predicting process parameters. *Fermentation*. 8: 1-14

Anbazhagan, S.; Palani, S. 2018. Extraction of consortium of hydrolytic enzymes from waste activated sludge using ultrasonication and stirring with surfactants. *Ultrasonics – Sonochemistry*. 40: 874-880.

Antunes, E.C.; Cintra, B.; Bredel, M.; Temmink, H.; Schuur, B. 2024. Fractionation of extracellular polymeric substances by aqueous three-phase partitioning systems. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 63: 10748–10760.

Appels, L.; Houtmeyers, S.; Degreè, J.; Van Impe, J.; Dewil, R. 2013. Influence of microwave pre-treatment on sludge solubilization and pilot scale semi-continuous

- anaerobic digestion. *Bioresource Technology*. 128: 598-603.
- Ayilara, M.S.; Adeleke, B.S.; Akinola, S.A.; Fayose, C.A.; Adeyemi, U.T.; Gbadegesin, L.A.; Omole, R.K.; Johnson, R.M.; Uthman, Q.O.; Babalola, O.O. 2023. Biopesticides as a promising alternative to synthetic pesticides: A case for microbial pesticides, phytopesticides, and nanobiopesticides. *Frontiers in Microbiology*. 14: 1-16.
- Babu, R.; Capannelli, G.; Comite, A. 2021. Effect of different pretreatments on sludge solubilization and estimation of bioenergy potential. *Processes*. 9: 1-13.
- Barman, I.; Hazarika, S.; Gogoi, J.; Talukdar, N. 2022. Systematic Review on Enzyme Extraction from Organic Wastes and its Application. *Journal of Biochemical Technology*. 13: 32-37.
- Barnabe, S.; Verma, M.; Tyagi, R.D.; Valero, J.R. 2006. Culture media for increasing biopesticide producing microorganisms' pesticidal activity, methods of producing same, biopesticide producing microorganisms so produced. Google Patents WO2006089388A1, 31 August 2006.
- Bengtsson, S.; Werker, A.; Visser, C.; Korving, L. 2017. PHARIO - Stepping stone to a sustainable value chain for PHA bioplastic using municipal activated sludge. Technical report. Report number: STOWA 2017-15, pp. 1-93.
- Boniolo, F.S.; Rodrigues, R.C.; Prata, A.M.R.; López, M.L.; Jacinto, T.; da Silveira, M.M.; Berbert-Molina, M.A. 2012. Oxygen supply in *Bacillus thuringiensis* fermentations: bringing new insights on their impact on sporulation and δ -endotoxin production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 94: 625-636.
- Bora, R.R.; Richardson, R.E.; You, F. 2020. Resource recovery and waste-to-energy from wastewater sludge via thermochemical conversion technologies in support of circular economy: a comprehensive review. *BMC Chemical Engineering*. 2: 1-6.
- Bou-Sarkis, A.; Pagliaccia, B.; Ric, A.; Derlon, N.; Paul, E.; Bessiere, Y.; Girbal-Neuhausser, E. 2022. Effects of alkaline solvents and heating temperatures on the solubilization and degradation of gel-forming extracellular polymeric substances (EPS) extracted from aerobic granular sludge. *Biochemical Engineering Journal*. 185: 1-12.
- Brar, S.K.; Verma, M.; Tyagi, R.D.; Valéro, J.R.; Surampalli, R.Y. 2006. Efficient centrifugal recovery of *Bacillus thuringiensis* biopesticides from fermented wastewater and wastewater sludge. *Water Research*. 40: 1310-1320.
- Brar, S.K.; Verma, M.; Tyagi, R.D.; Valéro, J.R.; Surampalli, R.Y. 2007. *Bacillus thuringiensis* fermentation of hydrolyzed sludge – Rheology and formulation studies. *Chemosphere*. 67: 674-683.
- Cadoret, A.; Conrad, A.; Block, J.C. 2002. Availability of low and high molecular weight substrates to extracellular enzymes in whole and dispersed activated sludges. *Enzyme and Microbial Technology*. 31: 179-186.
- Cao, D.-Q.; Liu, X.-D.; Han, J.-L.; Zhang, W.-Y.; Hao, X.-D.; Iritani, E.; Katagiri, N. 2023. Recovery of extracellular polymeric substances from excess sludge using high-flux electrospun nanofiber membranes. *Membranes*. 13: 1-20.
- Capodaglio, A.G.; Callegari, A.; Lopez, M.V. 2016. European framework for the diffusion of biogas uses: Emerging technologies, acceptance, incentive strategies and institutional-regulatory support. *Sustainability*. 8: 1-18.
- Capodaglio A.G. 2023. Biorefinery of sewage sludge: Overview of possible value-added products and applicable process technologies. *Water*. 15: 1-23.
- Cecconet, D.; Capodaglio, A.G. 2022. Sewage sludge biorefinery for circular economy. *Sustainability*. 14: 1-17.
- Cetin, E.; Karakas, E.; Dulekgurgen, E.; Ovez, S.; Kolukirik, M.; Yilmaz, G. 2018. Effects of high-concentration influent suspended solids on aerobic granulation in pilot-scale sequencing batch reactors treating real domestic wastewater. *Water Research*. 131: 74-89.
- Chang, M.; Zhou, S.-G.; Lu, H.A.; Ni, J.-R. 2007. Enhanced *Bacillus thuringiensis* production from sewage sludge with alkaline and ultrasonic pretreatments. *Water Air and Soil Pollution*. 186: 75-84.
- Chang, M.; Zhou, S.; Sun, Q.; Li, T.; Ni, J. 2012. Recovery of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides from fermented sludge by cross-flow microfiltration. *Desalination and Water Treatment*. 43: 17-28.
- Chang, Y.-C.; M. Reddy, V.; Tsukiori, Y.; Mawatari, Y.; Choi D.B. 2023. Production of polyhydroxyalkanoates using sewage and cheese whey. *Heliyon*. 9: 1-12.
- Chrispim, M.; Scholz, M.; Nolasco, M.A. 2019. Phosphorus recovery from municipal wastewater treatment: Critical review of challenges and opportunities for developing countries. *Journal of Environmental Management*. 248: 1-20.
- Cydzik-Kwiatkowska, A. 2021. Biopolymers in aerobic granular sludge - Their role in wastewater treatment and possibilities of re-use in line with circular economy. *Energies*. 14: 1-17.
- Da Ros, C.; Conca, V.; Eusebi, A.L.; Frison, N.; Fatone, F. 2020. Sieving of municipal wastewater and recovery of bio-based volatile fatty acids at pilot-scale. *Water Research*. 174: 115633.
- de Souza Reis, G.A.; Michels, M.H.A.; Fajardo, G.L.; Lamot, I.; de Best J.H. 2020. Optimization of green extraction and purification of PHA produced by mixed microbial cultures from sludge. *Water*. 12: 1-12.
- de Sousa Rollemberg, L.S.; Queiroz de Oliveira, L.; Nascimento de Barros, A.; Igor Milen Firmimo, P.; Bezerra dos Santos, A. 2020. Pilot-scale aerobic granular sludge in the treatment of municipal wastewater: Optimizations in the start-up, methodology of sludge discharge, and evaluation of resource recovery. *Bioresource Technology*. 311: 1-10.
- Didion, Y.P.; Vargas, M.V.G.A.; Tjaslma, T.G.; Woodley, J.; Nikel, P.I.; Malankowska, M.; Su, Z.; Pinelo, N. 2024. A novel strategy for extraction of intracellular poly(3-hydroxybutyrate) from engineered *Pseudomonas putida* using deep eutectic solvents: Comparison with

traditional biobased organic solvents. *Separation and Purification Technology*. 338: 1-14.

Duan, Y.; Zhou, A.; Yue, X.; Zhang, Z.; Gao, Y.; Luo, Y. 2020. Intensification of short chain fatty acid production during the alkaline pretreatment of fine-sieving fractions. *Energies*. 13: 1-12

Duque, A.F.; Campo, R.; Val del Rio, A.; Amorim, C.L. 2021. Wastewater valorization: Practice around the world at pilot- and full-Scale. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 18: 1-28.

EC, 2019. European Green Deal. https://commission.europa.eu/strategy-and-policy/priorities-2019-2024/european-green-deal_en

Elhami V.; van de Beek, N.; Wang, L.; Picken, S.J.; Tamis J.; João A.B.; Sousa A.B.; Hempenius, M.A.; Schuur, B. 2022. Extraction of low molecular weight polyhydroxyalkanoates from mixed microbial cultures using bio-based solvents. *Separation and Purification Technology*. 299: 1-14.

Fang, W.; Yang, Y.; Wang, C.; Zhang. 2022. Enhanced volatile fatty acid production from anaerobic fermentation of waste activated sludge by combined sodium citrate and heat pretreatment. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 10: 1-12.

Felz, S.; Vermeulen, P.; van Loosdrecht, M.C.M.; Lin, Y.M. 2019. Chemical characterization methods for the analysis of structural extracellular polymeric substances (EPS). *Water Research*. 157: 201–208.

Feng, J.; Burke, I.T.; Chen, X.; Stewart, D.I. 2023. Assessing metal contamination and speciation in sewage sludge: implications for soil application and environmental risk. *Reviews of Environmental Science and Bio/Technology*. 22: 1037–1058.

Feng, S.; Guo, W.; Ding, A.; Parsa, S.M.; Pan, J.; Cheng, D.; Tung, T.V.; Ngo, H.H. 2025. Enzyme sources in wastewater treatment: Their influence on enzymatic bioremediation and large-scale applications. *Chemical Engineering Journal*. 510: 1-14.

Fiori, L.; Andreottola, G. 2023. Full-scale sewage sludge reduction technologies: A review with a focus on energy consumption. *Water*. 15: 1-20.

Font-Pomarol, J.; Kaal, J.; Molina-Peñate, E.; Sánchez, A.; Artola, A. 2025. Bench-scale solid-state fermentation of digested sewage sludge to produce *Bacillus thuringiensis* as biopesticide agent: influence of digestate characteristics determined by 3 pyrolysis gas chromatography-mass spectrometry. *bioRxiv* doi: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1974348/v1> or <https://ssrn.com/abstract=5257840>

Furness, M.; Bello-Mendoza, R.; Dassonville, J.; Chamy-Maggi, R. 2021. Building the 'Bio-factory': A bibliometric analysis of circular economies and life cycle sustainability assessment in wastewater treatment. *Journal of Cleaner Production*. 323: 1-12.

Gao, J.; Wang, Q.; Yan, Y.; Li, Z.; Weng, W. 2021. Protein extraction from excess sludge by thermal-acid pretreatment. *Desalination and Water Treatment*. 209: 48-57.

Gao, J.; Li, T.; Yan Y.; Geng, G.; Li, Z. 2022. Protein extraction from different sludge types by alkaline-thermal hydrolysis. *Desalination and Water Treatment*. 262: 283–289.

Gautam, S.; Gautam, A.; Pawaday, J.; Kanzariya, R.K.; Yao, Z. 2024. Current status and challenges in the commercial production of polyhydroxyalkanoate-based bioplastic: A review. *Processes*. 12: 1-36.

Guanghui, Y.U.; Pinjing, H.P.; Liming, S.H.A.O.; Yishu, Z.H.U. 2009. Enzyme extraction by ultrasound from sludge flocs. *Journal of Environmental Sciences*. 21: 204–210.

Guerra-Rodríguez, S.; Oulego, P.; Rodríguez, E.; Singh, D.N.; Rodríguez-Chueca, J. 2020. Towards the implementation of circular economy in the wastewater sector: Challenges and opportunities. *Water*. 12: 1-52.

Guimarães, L.B.; Gubser, N.R.; Lin, Y.; Zlópas, J.; Felz, S.; Tomás-Martínez, S.; Pronk, M.; Neu, T.R.; Dueholm, M.K.D.; Albertsen, M.; da Costa, R.H.J.R.; Nielsen, P.H.; van Loosdrecht, M.C.M.; Weissbrodt, D.G. 2023. Production of extracellular polymeric substances in granular sludge under selection for *Accumulibacter* and *Competibacter*. *bioRxiv* 10.1101/2023.03.24.534144

Guo, H.; Felz, S.; Lin, Y.; van Lier, J.B.; de Kreuk, M. 2020. Structural extracellular polymeric substances determine the difference in digestibility between waste activated sludge and aerobic granules. *Water Research*. 181: 1-10.

Gusiatin, M.Z.; Kulikowska, D.; Bernat, K. Municipal sewage sludge as a resource in the circular economy. *Energies*. 17: 1-25.

GW I -The Green Will Initiative. 2023. Capturing circular economy value with sludge biorefineries.

Hasan, H.A.; Rahim, N.F.M.; Alias, J.; Ahmad, J.; Said, N.S.M.; Ramli, N.N.; Buhari, J.; Abdullah, S.R.S.; Othman, A.R.; Jusoh, H.H.W.; Juahir, H.; Kurniawan, S.B. 2024. A Review on the roles of extracellular polymeric substances (EPSs) in wastewater treatment: Source, mechanism study, bioproducts, limitations, and future challenges. *Water*. 16: 1-19.

Hoa, N.G.; Chinh, T.T.; Anh, D.T.M.; Binh, N.D.; Thanh L.T.M. 2014. Optimization of fermentation medium compositions from dewatered wastewater sludge of beer manufactory for *Bacillus thuringiensis* delta endotoxin production. *American Journal of Agriculture and Forestry*. 2: 219-225.

Huang, L.; Jin, Y.; Zhou, D.; Liu, L.; Huang, S.; Zhao, Y.; Chen, Y. A. 2022. Review of the role of extracellular polymeric Substances (EPS) in wastewater treatment systems. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 19: 1-14.

Hui, W.; Zhou, J.; Jin, R. 2022. Kinetics of protein extraction from excess sludge by thermal alkaline treatment. *Research Square*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1974348/v1>

Hui, W.; Zohu, J.; Jin, R. 2023. Protein extraction from excess sludge by barium hydroxide hydrolysis process. *Research Square*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2660918/v1>

- IEA – International Energy Agency. 2023. Scaling up biomethane in the European Union: Background paper.
- Janesch, E.; Pereira, J.; Neubauer, P.; Junne, S. 2021. Phase separation in anaerobic digestion: A potential for easier process combination? *Frontiers in Chemical Engineering*. 3: 1-16.
- Jallouli, W.; Driss, F.; Fillaudeau, L.; Rouis, S. 2020. Review on biopesticide production by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* since 1990: Focus on bioprocess parameters. *Process Biochemistry*. 98: 224-232.
- Jyoti, K.; Soni, K.; Chandra, R. 2024. Optimization of the production of exopolysaccharide (EPS) from biofilm-forming bacterial consortium using different parameters. *The Microbe*. 4: 1-9.
- Karn, S. K.; Kumar, P. 2019. Protease, lipase and amylase extraction and optimization from activated sludge of pulp and paper industry. *Indian Journal of Experimental Biology*. 57: 201-205.
- Karn, S.K.; Kumar, A. 2019. Sludge: next paradigm for enzyme extraction and energy generation. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 49: 105-116.
- Kariyanna, B.; Sushma, R.; Panda, S.; Sainath, G. 2024. Formulations of biopesticides: Techniques, applications, challenges and future prospects. *Hexapoda*. 31: 1-17.
- Kaumera. Available online: <https://kaumera.com/english/> (accessed on 5 March 2025).
- Kim, N.K.; Mao, N.; Lin, R.; Bhattacharyya, D.; van Loosdrecht, M.C.M.; Lin, Y. 2020. Flame retardant property of flax fabrics coated by extracellular polymeric substances recovered from both activated sludge and aerobic granular sludge. *Water Research*. 170: 1-8.
- Kleerebezem, R.; Joosse, B.; Rozendal, R.; Loosdrecht, M.C.M. 2015. Anaerobic digestion without biogas? *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. 14: 787-801.
- Km, J.; Soni, K.; Ram Chandra, R. 2024. Optimization of the production of Exopolysaccharide (EPS) from biofilm-forming bacterial consortium using different parameters. *The Microbe*. 4: 1-9.
- Kumar, V.; Srivastava, S.; Thakur, I.S. 2021. Enhanced recovery of polyhydroxyalkanoates from secondary wastewater sludge of sewage treatment plant: analysis and process parameters optimisation. *Bioresource Technology Reports*. 15: 1-8.
- Kurniawan, A.; Kwon, S.Y.; Shin, J-H.; Hur, J.; Cho, J. 2016. Acid fermentation process combined with post denitrification for the treatment of primary sludge and wastewater with high strength nitrate. *Water*. 8: 1-11.
- Lambiasi, L.; Ddiba, D.; Andersson, K.; Parvage, M.; Dickin, S. 2024. Greenhouse gas emissions from sanitation and wastewater management systems: a review. *Journal of Water and Climate Change*. 15: 1-23.
- Lebonnois, D.; Judenne, E.; Perroy, L.; Vanden Bossche, H.; Grau, G. 2022. Pau Case study: From a wastewater treatment plant to a biofactory. *Environment Sciences Proceedings*. 21: 1-6.
- Li, J.; Hao, X.; Persiani, R.; vanLoosdrecht, M.C.M.; Li, Y. 2024. Reinvestigating the composition of alginate-like exopolymers extracted from activated sludge. *ACS EST Water*. 4: 3007–3015.
- Lin, D-Q.; Yao, S-H.; Mei, L-H.; Zhu, Z-Q. 2003. Collection and purification of parasporal crystals from *Bacillus thuringiensis* by aqueous two-phase extraction. *Separation Science and Technology*. 38: 1665-1680.
- Liu H.; Han P.; Liu H.; Zhou G.; Fu B.; Zheng Z. (2018.): Full-scale production of VFAs from sewage sludge by anaerobic alkaline fermentation to improve biological nutrients removal in domestic wastewater. *Bioresource Technology*. 260: 105–114.
- Liu, Z.; Smith, S.R. 2019. Enzyme activity of waste activated sludge extracts. *Water Science and Technology*. 80: 1861–1869.
- Liu, W.; Yang, H.; Ye, J.; Luo, J.; Yi, L-L.; Liu, J. 2020. Short-chain fatty acids recovery from sewage sludge via acidogenic fermentation as a carbon source for denitrification: A review. *Bioresource Technology*. 311: 1-15.
- Liu, Z.; Smith, S.R. 2021. Enzyme recovery from biological wastewater treatment. *Waste and Biomass Valorization*. 12: 4185–4211.
- Liu X.; Zhu F.; Zhang R.; Zhao L.; Qi J. (2021.): Recent progress on biodiesel production from municipal sewage sludge. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 135: 1-14.
- Liu, Z.; Smith, S.R. 2023. Cross-linked enzyme aggregate (CLEA) preparation from waste activated sludge. *Microorganisms*. 11: 1-21.
- Liu, C.; Li, L.; Xu, L.; Zhang, T.; He, Q.; Xin, X. 2024. Enhancing volatile fatty acids production from waste activated sludge: The role of pretreatment by N,N-bis(carboxymethyl)-L-glutamate (GLDA). *Environmental Science and Ecotechnology*. 21: 1-9.
- Longo, S.; Katsou, E.; Malamis, S.; Frison, N.; Renzi, D.; Fatone, F. 2015. Recovery of volatile fatty acids from fermentation of sewage sludge in municipal wastewater treatment plants. *Bioresource Technology*. 175: 436–444.
- Lorini, L.; Salvatori, G.; Tayou, L.N.; Valentino, F.; Villano, M. 2022. Innovative strategy for polyhydroxyalkanoates recovery from mixed microbial cultures: effects of aqueous phase and solvent extraction on polymer properties. *Chemical Engineering Transaction*. 92: 529–534.
- Lorini, L.; Munarin G.; Salvatori, G.; Alfano, S.; Pavan P.; Mauro, M.; Valentino, F. 2022. Sewage sludge as carbon source for polyhydroxyalkanoates: a holistic approach at pilot scale level. *Journal of Cleaner Production*. 354: 1-12.
- Loureiro, C.B.; Gasparotto, J.M.; Rabuscke, C.M.; Baldoni, D.B.; Guedes, J.V.C.; Mazutti, M.A.; Jacques, R.J.S. 2018. Production of different cellulolytic enzymes by *Gelatoporia Subvermispora* using different substrates. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 35: 459- 466.
- Lukitawesa, S.W.; Awasthi, M.K.; Taherzadeh, M.J. 2019) Bioengineering of anaerobic digestion for volatile

fatty acids, hydrogen or methane production: A critical review. *Bioengineered*. 10: 437-458.

Mannina, G.; Presti, D.; Montiel-Jarillo, G.; Carrera, J.; Suárez-Ojeda, M.E. 2020. Recovery of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from wastewater: a review. *Bioresource Technology*. 297: 1-21.

MM (Marcet and Marcet) 2025 Industrial enzymes market by type (carbohydrases, proteases, lipases, polymerases and nucleases), application (food and beverages, bioethanol, feed, detergents, wastewater, soil, and oil treatment), source, formulation and region - Global forecast to 2030 <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/industrial-enzymes-market>

Markham, W.M.; Reid, J.H. 1988. Conversion of biological sludge and primary float sludge to animal protein supplement. U.S. Patent No 4,728,517.

Mazzeo, D.E.C.; Dombrowski, A.; Oliveira, F.A.; Levy, C.E.; Oehlmann, J.; Marchi M.R.R. 2023. Endocrine disrupting activity in sewage sludge: Screening method, microbial succession and cost-effective strategy for detoxification. *Journal of Environmental Management*. 15: 1-18.

McSwain, B.S.; Irvine, R.L.; Hausner, M.; Wilderer, P.A. 2015. Composition and distribution of extracellular polymeric substances in aerobic flocs and granular sludge. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 1051-1057.

Mehta, C.M.; Khunjar, W.O.; Nguyen, V.; Tait, S.; Batstone, D.J. 2015. Technologies to recover nutrients from waste streams: A critical review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 45: 385-427.

Melo, A.; Quintelas, C.; Ferreira, E.C.; Mesquita, D.P. 2022. The role of extracellular polymeric substances in micropollutant removal. *Frontier in Chemical Engineering*. 4: 1-13.

Mineo, A.; Isern-Cazorla, L.; Rizzo, C.; Piccionello, A.P.; Suárez-Ojeda, M.E.; Maninna, G. 2023. Polyhydroxyalkanoates production by an advanced food-on-demand strategy: The effect of operational conditions. *Chemical Engineering Journal*. 472: 1-9.

Mineo, A.; Di Leto, Y.; Cosenza, A.; Capri, F.C.; Gallo, G.; Alduina, R.; Ni, B.-J.; Mannina, G. 2024. Enhancing volatile fatty acid production from sewage sludge in batch fermentation tests. *Chemosphere*. 349: 1-8.

Molina-Peñate, E.; Arenòs, N.; Sánchez, A.; Artola, A. 2023. *Bacillus thuringiensis* production through solid-state fermentation using organic fraction of municipal solid waste (OFMSW) enzymatic hydrolysate. *Waste and Biomass Valorization*. 14: 1433-1445.

Morgan-Sagastume, F.; Valentino, F.; Hjort, M.; Cirne, D.; Karabegovic, L.; Gerardin, F.; Johansson, P.; Karlsson, A.; Magnusson, P.; Alexandersson, T.; Bengtsson, S.; Majone, M.; Werker, A. 2014. Polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sludge and municipal wastewater treatment. *Water Science and Technology*. 69: 177-184.

Muys, M.; Phukan, R.; Brader, G.; Samad, A.; Moretti, M.; Haiden, B.; Pluchon, S.; Roest, K.; Vlaeminck, S.E.; Spiller, M. 2021. A systematic comparison of commercially produced struvite: quantities; qualities and soil-maize phosphorus availability. *Science of The Total Environment*. 756: 1-12.

Nabarlitz, D.; Vondrysova, J.; Jenicek, P.; Stüber, F.; Font, J.; Fortuny, A.; Fabregat, A.; Bengoa, C. 2010. Hydrolytic enzymes in activated sludge: Extraction of protease and lipase by stirring and ultrasonication. *Ultrasonic Sonochemistry*. 17: 923-931.

Nabarlitz, D.; Stüber, F.; Font, J.; Fortuny, A.; Fabregat, A.; Bengoa, C. 2012. Extraction and purification of hydrolytic enzymes from activated sludge. *Resources, Conservation and Recycling*. 59: 9-13.

Ndao, A.; Sellamuthu, B.; Kumar, L.R.; Tyagi, R.D.; Valéro, J.R. 2021. Biopesticide production using *Bacillus thuringiensis kurstaki* by valorization of starch industry wastewater and effluent from aerobic, anaerobic digestion. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*. 1: 494-504.

Netrusov, A.I.; Liyaskina, E.V.; Kurgaeva, I.V.; Liyaskina, A.U.; Yang, G.; Revin, V.V. 2023. Exopolysaccharides producing bacteria: A review. *Microorganisms*. 11: 1-31.

Nouha, K.; Kumar, R.S.; Balasubramanian, S.; Tyagi, R.D. 2018. Critical review of EPS production, synthesis and composition for sludge flocculation. *Journal of Environmental Sciences*. 66: 225-245.

Núñez, D.; Oulego, O.; Collado, S.; Riera, F.A.; Díaz, M. 2022. Separation and purification techniques for the recovery of added-value biocompounds from waste activate sludge. A review. *Resources, Conservation and Recycling*. 182: 1-25.

Oliveira, A.S.; Amorim, C.L.; Ramos, M.A.; Mesquita, D.P.; Inocêncio, P.; Ferreira, E.C.; van Loosdrecht, M.; Castro, P.M.L. 2020. Variability in the composition of extracellular polymeric substances from a full-scale aerobic granular sludge reactor treating urban wastewater. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 8: 1-9.

Oliveira, A.S.; Amorim, C.L.; Mesquita, D.P.; Ferreira, E.C.; van Loosdrecht, M.; Castro, P.M.L. 2021. Increased extracellular polymeric substances production contributes for the robustness of aerobic granular sludge during long-term intermittent exposure to 2-fluorophenol in saline wastewater. *Journal of Water Process Engineering*. 40: 1-10.

Ossiansson, E.; Persson, F.; Bengtsson, S.; Cimbritz, M.; Gustavsson, D.J.J. 2023. Seasonal variations in acidogenic fermentation of filter primary sludge. *Water Research*. 242: 1-10.

Owusu-Agyeman, I.; Bedaso, B.; Laumeyer, C.; Pan, C.; Malovanyy, A.; Baresel, C.; Plaza, E.; Cetecioglu, Z. 2023. Volatile fatty acids production from municipal waste streams and use as a carbon source for denitrification: The journey towards full-scale application and revealing key microbial players. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 175: 1-13.

- Pagliano, G.; Galletti, P.; Samorì, C.; Zaghini, A.; Torri C. 2021. Recovery of polyhydroxyalkanoates from single and mixed microbial cultures: A review. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 9: 1-28.
- Pang, H.; He, J.; Ma, Y.; Pan, X.; Zheng, Y.; Yu, H.; Yan, Z.; Nan, J. 2021. Enhancing volatile fatty acids production from waste activated sludge by a novel cation-exchange resin assistant strategy. *Journal of Cleaner Production*. 278: 1-14.
- Parchami, M.; Wainaina, S.; Mahboubi, A.; l'Ons, D.; Taherzadeh, M.J. 2020. MBR-assisted VFAs production from excess sewage sludge and food waste slurry for sustainable wastewater treatment. *Applied Science*. 10: 1-20.
- Patel, A.; Mahboubi, A.; Horváth, I.S.; Taherzadeh, M.J.; Rova, U.; Christakopoulos, P.; Matsakas, L. 2021. Volatile fatty acids (VFAs) generated by anaerobic digestion serve as feedstock for freshwater and marine oleaginous microorganisms to produce biodiesel and added-value compounds. *Frontiers in Microbiology*. 12: 1-17.
- Patel, A.K.; Dong, C.D.; Chen, C.W.; Pandey, A.; Singhanian, R.R. 2023. Production, purification, and application of microbial enzymes. In *Biotechnology of microbial enzymes*. Academic Press, pp. 25-57.
- Pei, J.; Yao, H.; Wang, H.; Ren, J.; Yu, X. 2016. Comparison of ozone and thermal hydrolysis combined with anaerobic digestion for municipal and pharmaceutical waste sludge with tetracycline resistance genes. *Water Research*. 99: 122-128.
- Pei, R.; Estévez-Alonso, A.; Ortiz-Seco, L.; van Loosdrecht, M.C.M.; Kleerebezem, R.; Werker, A. 2022. Exploring the limits of polyhydroxyalkanoate production by municipal activated sludge. *Environmental Science and Technology*. 56: 11729–11738.
- Pei, P.; Vicente-Venegas, G.; Tomaszewska-Porada, A.; Van Loosdrecht, M.C.M.; Kleerebezem, R.; Werker, A. 2023. Visualization of polyhydroxyalkanoate accumulated in waste activated sludge. *Environmental Science and Technology*. 57: 11108–11121.
- Persiani, R.; Raingue, A.; Michels, M.; Best, J. de; Lebouteiller, G. (2022): Optimisation of PHA extraction from mixed microbial cultures and PHA characterisation. Project report WOWI, Interreg North-West Europe.
- Pittmann T.; Steinmetz H. 2017. Polyhydroxyalkanoate production on wastewater treatment plants: Process scheme, operating conditions and potential analysis for German and European municipal wastewater treatment plants. *Bioengineering*. 4: 1-24.
- Pott, R., Johnstone-Robertson, M., Verster, B., Rumjeet, S., Nkadimeng, L., Raper, T., Rademeyer, S.; Harrison, S.T.L. 2018, Wastewater biorefineries: Integrating water treatment and value recovery: u The Nexus: Energy, Environment and Climate Change. Eds. Filho, W.L.; Surroop D., Springer, pp. 289-302.
- Qiao, Z.; Xu, S.; Zhang, W.; Shi, S.; Zhang, W.; Liu, H. 2022. Potassium ferrate pretreatment promotes short chain fatty acids yield and antibiotics reduction in acidogenic fermentation of sewage sludge. *Journal of Environmental Sciences*. 120: 41-52.
- Qin, L.; Yan, Y.X.; Gao, J.L.; Miao, C.Y. 2018. Extraction of protein from excess sludge by enzymatic hydrolysis. IOP Conf. Series: *Earth and Environmental Science*. 191: 1-7.
- Rad, S.N.; Shirazi, M.M.A.; Kargari, A.; Marzban, R. 2016. Application of membrane separation technology in downstream processing of *Bacillus thuringiensis* biopesticide: A Review. *Journal of Membrane Science and Research*. 2: 66-77.
- Rahbani, J.; Salameh, D.; Kallassy Awad, M.; Chamy, L.; Brandam, C.; Lteif, R. 2014. A simple method for the separation of *Bacillus thuringiensis* spores and crystals. *Journal of Microbiological Methods*. 107: 147–149.
- Raheem, A.; Sikarwar, V.S.; He, J.; Dastyar, W.; Dionysiou, D.D.; Wang, W.; Zhao, M. 2018. Opportunities and challenges in sustainable treatment and resource reuse of sewage sludge: A review. *Chemical Engineering Journal*. 337: 616-64.
- Ramos-Suarez, M.; Zhang, Y.; Outram, V. 2021. Current perspectives on acidogenic fermentation to produce volatile fatty acids from waste. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. 20: 439-478.
- Rehman, Z.U.; Ghaani, M.; Mohamed, A.Y.A.; Gallagher, J.; Saikaly, P.E.; Ali, M. 2024. Alginate-like exopolysaccharides extracted from different waste sludges exhibit varying physicochemical and material properties. *Frontiers in Microbiology*. 15: 1-12.
- Ren, Y.; Inoue, D.; Ike, M. 2024. Potential of activated sludge-derived mixed microbial culture enriched on acetate to produce polyhydroxyalkanoates from various substrates. *Journal of Material Cycles and Waste Management*. 26: 2355–2365.
- Riaz, S.; Rhee, K.Y.; Park, S.J. 2021. Polyhydroxyalkanoates (PHAs): Biopolymers for biofuel and biorefineries. *Polymers*. 13: 1-21.
- Romero, L.; Moreno, J.F.; Oulego, P.; Collado, S.; Díaz, M. 2024. Surfactant-assisted thermal hydrolysis of sewage sludge: Biomolecule extraction and its potential for protease production. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 12: 1-13.
- Rudolf, P.; Szabo, B.; Janko, F.; Neszmelyi, E.; Illes, J.; Takacs, I.; Havas, F.; Bende, G. 1993. Process and apparatus for extraction of solid matter containing fat and/or protein from sludge. US Patent 5200085A.
- Salamah, S.K.; Randall, A.A. 2020. Optimization of sludge fermentation for volatile fatty acids production. *International Journal of Low-Carbon Technologies*. 15: 149–154.
- Salvatori, G.; Alfano, S.; Martinelli, A.; Gottardo, M.; Villano, M.; Ferreira, B.S.; Valentino, F.; Lorini, L. 2023. Chlorine-free extractions of mixed-culture polyhydroxyalkanoates produced from fermented sewage sludge at pilot scale. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 62: 17400–17407.
- Sanchez-Ledesma, L.M.; Ramírez-Malule, H.; Rodríguez-Victoria, J.A. 2023. Volatile fatty acids

production by acidogenic fermentation of wastewater: A bibliometric analysis. *Sustainability*. 15: 1-24.

Sellier, A.; Khaska, S.; Le Gal La Salle, C. 2022. Assessment of the occurrence of 455 pharmaceutical compounds in sludge according to their physical and chemical properties: A review. *Journal of Hazardous Materials*. 426: 1-23.

Siciliano, A.; Limonti, C.; Curcio, G.M.; Molinari, R. 2020. Advances in struvite precipitation technologies for nutrients removal and recovery from aqueous waste and wastewater. *Sustainability*. 12: 1-36.

Silva, C.; Martins, M.; Jing, S.; Fuc, J.; Cavaco-Pauloa, A. 2018. Practical insights on enzyme stabilization. *Critical Reviews in Biotechnology*. 38: 335–350.

Sukphun, P.; Sittijunda, S.; Reungsang, A. 2021. Volatile Fatty Acid Production from organic waste with the emphasis on membrane-based recovery. *Fermentation*. 7: 1-23.

Szacherska, K.; Oleskowicz-Popiel, P.; Ciesielski, S.; Mozejko-Ciesielska, J. 2021. Volatile fatty acids as carbon sources for polyhydroxyalkanoates production. *Polymers*. 13: 1-19.

Trego, A.; Palmeiro-Sánchez, T.; Graham, A.; Ijaz, U.Z.; O'Flaherty, V. 2024. First evidence for temperature's influence on the enrichment, assembly, and activity of polyhydroxyalkanoate-synthesizing mixed microbial communities. *Frontiers in System Biology*. 4: 1-17.

Tyagi, V.K.; Lo, S.L.; Appels, L.; Dewil, R. 2014. Ultrasonic treatment of waste sludge: A review on mechanisms and applications. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 44: 1220-1288.

Uhrig, T.; Zimmer, J.; Bornemann, C.; Steinmetz, H. 2022. Report on optimised PHA production process layout. Project report W OW! Interreg North-West Europe

Vaithyanathan, V.K.; Cabana, H. 2021. Integrated biotechnology management of biosolids: Sustainable ways to produce value—added products. *Frontiers in Water*. 3: 1-30.

Valentino, F.; Lorini, L.; Gottardo, M.; Pavan, P.; Majone M. 2020. Effect of the temperature in a mixed culture pilot scale aerobic process for food waste and sewage sludge conversion into polyhydroxyalkanoates. *Journal of Biotechnology*. 323: 54-61.

Van Leeuwen, K.; De Vries, E.; Roest, K.; Koop, S. 2018. The energy and raw materials factory: Role and potential contribution to the circular economy of the Netherlands. *Environmental Management*. 61: 786–795.

Velasquez Posada S. 2023. Extracellular polymeric substances from aerobic granular sludge: Implication for agricultural use in foliar fertilization. doktorski rad, Faculty of Civil Engineering and Geosciences, TU Delft, NL.

Velusamy, S.; Kandasamy, K.; Ayyasamy, S.; Nagarajan, D.B.; Sekara, H.; Durairaj, K.; Maniraja, A.P. 2023. Surfactant assisted ultrasonication for enzyme extraction from lignocellulosic biomass: Box–Behnken

design optimization. *Desalination and Water Treatment*. 310: 59–67.

Veolia PHA. Pilot- and full-scale production from domestic wastewater. Available online: <http://www.veolia.com> (accessed on 10 August 2025).

Veluswamy, G.K.; Shah, K.; Ball, A.S.; Guwy, A.J.; Dinsdale, R.M. 2021. A techno-economic case for volatile fatty acid production for increased sustainability in the wastewater treatment industry. *Environmental Science: Water Research and Technology*. 7: 927-941.

Vidarthi, A.; Desrosiers, M.; Tyagi, R.; Valero, J. 2000. Foam control in biopesticide production from sewage sludge. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 25: 86–92.

Vidarthi, A.; Tyagi, R.; Valero, J.; Surampalli, R. 2002. Studies on the production of *B. thuringiensis* based biopesticides using wastewater sludge as a raw material. *Water Research*. 36: 4850–4860.

Vouk, D.; Malus, D.; Tedeschi, S. 2011. Muljevi s komunalnih uređaja za pročišćavanje otpadnih voda. *Građevinar*. 63: 341-349.

Wang S.; Jiang T.; Chen X.; Xiong K.; Wang Y. 2023. Enhanced volatile fatty acid production from waste activated sludge by urea hydrogen peroxide: performance and mechanisms. *RSC Advances*. 13: 15714-15722.

Werker, A.; Bengtsson, S.; Korving, L.; Hjort, M.; Anterrieu, S.; Alexandersson, T.; Johansson, P.; Karlsson, A.; Karabegovic, L.; Magnusson, P.; Morgan-Sagastume, F.; Sijstermans, L.; Tietema, M.; Visser, C.; Wypkema, E.; van der Kooij, Y.; Deeke, A.; Uijterlinde, C. 2018. Consistent production of high quality PHA using activated sludge harvested from full scale municipal wastewater treatment – PHARIO. *Water Science and Technology*. 78: 256-2269.

Werker, A.; Lorini, L.; Villano, M.; Valentino, F.; Majone, M. 2022. Modelling mixed microbial culture polyhydroxyalkanoate accumulation bioprocess towards novel methods for polymer production using dilute volatile fatty acid rich feedstocks. *Bioengineering*. 9: 1-26.

Wu, J.; Wu, Z.; Pan, Y.; Luo, D.; Zhong, Q. 2024. Effects of different stress conditions on the production, bioactivities, physicochemical and structural characteristics of exopolysaccharides synthesized by *Schleiferilactobacillus harbinensis* Z171. *International Journal of Biological Macromolecules*. 257: 1-9.

Xiao, K.; Zhou, Y. 2020. Protein recovery from sludge: A review. *Journal of Cleaner Production*. 249: 1-19.

Yadav, A. 2020. Production of biofuels by sewage sludge. *International Journal of Scientific Research and Engineering Development*. 3: 1334-1341.

Yadav, M.K.; Song, J.H.; Vasquez, R.; Lee, J.S.; Kim, I.H.; Kang, D.-K. 2024. Methods for detection, extraction, purification, and characterization of exopolysaccharides of lactic acid bacteria—A systematic review. *Foods*. 13: 1-30.

- Yan, Y.; Liu, F.; Gao, J.; Wan, J.; Ding J. 2020. Enhancing enzyme activity via low-intensity ultrasound for protein extraction from excess sludge. *Environmental Science and Pollution Research*. 27: 1-15.
- Yan, Y.; Zhang, Y.; Wan, J.; Gao, J.; Liu, F. 2022. Optimization of protein recovery from sewage sludge via controlled and energy-saving Ultrasonic-alkali hydrolysis. <https://ssrn.com/abstract=4309523>
- Yang, Y.; Zhao, G.; Zhang, X.; Du, J.; Dong, L.; Li, W. 2022. Application of primary sludge fermentation for the production of carbon source for full-scale biological nutrients removal. *Polish Journal of Environmental Studies*. 31: 4935-4942.
- Yang, B.; Pan, Q.; Liu, Q.; Pan X. 2023. Damage mechanisms of sludge flocs and cell structures by different pretreatment methods. *Environmental Technology and Innovation*. 30: 1-12.
- Yao, S.; Ma, F.; Liang, B.; Wang, Y.; Xie, Y.; Hao, L.; Zhu, T. 2021. Mechanism investigation of excess sludge disintegration by stirred ball mill - Utilized transmission electron microscope observation and peptidoglycan concentration determination. *Waste and Biomass Valorisation*. 12: 6543-6554.
- Yesil, H.; Taner, H.; Ugur Nigiz, F.; Hilmioglu, N.; Tugtas, A.E. 2020. Pervaporative separation of mixed volatile fatty acids: A study towards integrated VFA production and separation. *Waste Biomass Valorization*. 11: 1737-1753.
- Yezza, A.; Tyagi, R.D.; Valéro, J.R.; Surampalli, R.Y. 2006. Wastewater sludge pre-treatment for enhancing entomotoxicity produced by *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 21: 1165-1174.
- Yezza, A.; Tyagi, R.D.; Valéro, J.R.; Surampalli, R.Y. 2005. Bioconversion of industrial wastewater and wastewater sludge into *Bacillus thuringiensis* based biopesticides in pilot fermentor. *Bioresource Technology*. 97: 1850-1857.
- Yu, G-H.; He, P-J.; Shao, L-M.; Lee, D-J. 2007. Enzyme activities in activated sludge flocs. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 77: 605-612.
- Zarina, R.; Mezule L. 2023. Opportunities for resource recovery from Latvian municipal sewage sludge. *Heliyon*. 9: 1-11.
- Zhang, W.; Alvarez-Gaitan, J.P.; Dastyar, W.; Saint, C.P.; Zhao, M.; Short, M.D. 2018. Value-added products derived from waste activated sludge: A biorefinery perspective. *Water*. 10: 1-20.
- Zhang, Z.; Wang, Y.; Wang, X.; Zhang, Y.; Zhu, T., Peng, L.; Xu, Y.; Chen, X.; Wang, D.; Ni, B-J.; Liu, Y. 2024. Towards scaling-up implementation of polyhydroxyalkanoate (PHA) production from activated sludge: Progress and challenges. *Journal of Cleaner Production*. 447: 1-17.
- Zhen, G.; Lu, X.; Li, Y.-Y.; Zhao, Y. 2014. Combined electrical-alkali pretreatment to increase the anaerobic hydrolysis rate of waste activated sludge during anaerobic digestion. *Applied Energy*. 128: 93-102.
- Zhuang, L.; Zhou, S.; Wang, Y.; Liu, Z.; Xu, R. 2011. Cost-effective production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides by solid-state fermentation using wastewater sludge: Effects of heavy metals. *Bioresource Technology*. 102: 4820-4826.
- Zrnčević, S. 2023. Smanjenje proizvodnje mulja na liniji mulja uređaja za pročišćavanje otpadnih voda. *Hrvatske vode*. 132: 35-54.

MATERIAL RECOVERY FROM SLUDGE GENERATED DURING WASTEWATER TREATMENT

Abstract. Urban sludge generated during wastewater treatment is an important, although still underused potential raw material in circular economy. A more appropriate biorefinery approach can facilitate the recovery of various biocompounds, thus converting sludge into a valuable resource aligned with the global tendency of environmental protection and waste conversion into useful products that can find their application in different industries.

The recovery of volatile fatty acids, plastics, proteins, enzymes and pesticides presents only some potential ways of valorising sludge as raw material, and, for this reason, the paper presents the research related to their production and potential application. The factors affecting the process efficiency are listed. An overview of their composition and characteristics, as well as the limitations and future prospects of biocompound production are also included. The characteristics of different processes of material recovery from sludge are described in detail, with data on their efficiency, feasibility and present status included as well. The objective is to draw attention to new insights into the development of sustainable sludge management practices and the promotion of circular bioeconomy principles in the field of wastewater treatment.

Key words: sludge, biorefinery, recovery of biocompounds; VFAs; bioplastics; proteins; enzymes; biopesticides

MATERIALRÜCKGEWINNUNG AUS KLÄRSCHLAMM

Zusammenfassung. In der Kreislaufwirtschaft stellt kommunaler Klärschlamm, der bei der Abwasserreinigung entsteht, ein bedeutendes, bisher ungenutztes Potenzial als Rohstoff dar. Mit einem geeigneten Bioraffinerie-Ansatz ist es möglich, die Rückgewinnung verschiedener Biokomponenten zu fördern, indem Klärschlamm in eine wertvolle Ressource umgewandelt wird. Dies entspricht dem globalen Trend im Umweltschutz in Bezug auf die Umwandlung von Abfällen in nützliche Produkte, die in verschiedenen Industriezweigen Anwendung finden können.

Die Rückgewinnung von flüchtigen Fettsäuren, Kunststoffen, Proteinen, Enzymen und Pestiziden ist nur einer der möglichen Wege zur Verwertung von Klärschlamm. In diesem Beitrag werden Forschungsergebnisse im Bereichen Herstellung und mögliche Anwendung dieser Komponenten vorgestellt und die Faktoren aufgelistet, von denen die Effizienz der Verfahren abhängt. Es wird auch ein Überblick über die Zusammensetzung und Eigenschaften sowie über die Grenzen und Zukunftsperspektiven im Zusammenhang mit der Herstellung der vorgenannten Biokomponenten gegeben. Die Eigenschaften verschiedener Schlammverwertungsverfahren werden detailliert beschrieben, und es werden Daten zu ihrer Effizienz und Durchführbarkeit sowie zu ihrem aktuellen Stand bereitgestellt. Das Ziel ist, neue Erkenntnisse im Zusammenhang mit der Entwicklung nachhaltiger Schlammbewirtschaftungspraktiken und der Förderung von Prinzipien der zirkulären Bioökonomie im Bereich der Abwasserbehandlung hervorzuheben.

Schlüsselwörter: Schlamm, Bioraffinerie, Rückgewinnung von Bioverbindungen, flüchtige Fettsäuren (VFA), Biokunststoffe, Proteine, Enzyme, Biopestizide