

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI STUDIJ KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Smjer: Inženjerstvo u zaštiti okoliša

Jelena Pilaš

Proizvodnja lakaze uzgojem *Trametes versicolor* na otpadu industrije
pulpe i papira

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: Dr.sc. Bruno Zelić, izv. prof.

Članovi stručnog povjerenstva: Dr. sc. Bruno Zelić, izv. prof.

Dr. sc. Đurđa Vasić-Rački, red. prof

Dr. sc. Stjepan Milardović, docent

Zagreb, siječanj 2009.

Zahvaljujem svojem mentoru dr.sc. Bruni Zeliću, izv. prof. koji mi je svojim stručnim vodstvom i pristupom omogućio izradu ovog rada. Zahvaljujem mu na iznimnoj pristupačnosti i strpljivosti u svakom trenutku kada mi je pomoć bila potrebna.

Hvala mr.sc. Marini Tišmi na neizmjernej pomoći pri provedbi pokusa, brojnim savjetima i ugodnoj suradnji.

Najtoplije se zahvaljujem svojoj obitelji i Draganu za svu pruženu pomoć i savjete tijekom školovanja. Hvala im na izuzetnom razumijevanju i podršci.

Zahvaljujem svojim kolegama uz koje su svi problemi postajali lakši. Hvala im na svim lijepim trenucima i iskrenom prijateljstvu.

Sažetak

U današnje vrijeme mnogo je pozornosti posvećeno očuvanju okoliša. Najveći zagađivači okoliša su svakako razne industrije, među njima i industrija pulpe i papira. U toj se industriji provodi razgradnja lignina koja uključuje između ostalog i procese izbjeljivanja i dekloriranja, pri čemu se koriste i štetne kemikalije. Takve se industrije stoga okreću alternativnim procesima kao što su razgradnja lignina pomoću gljiva bijelog truljenja koje proizvode ligninolitički enzim lakazu.

U ovome radu je proveden proces proizvodnje lakaze uzgojem gljive *Trametes versicolor* na otpadu industrije pulpe i papira. Cilj pokusa bio je utvrditi utjecaj različitih komponenata medija za uzgoj *Trametes versicolor* za postizanje maksimalne aktivnosti enzima lakaze. Pokus je proveden šaržno u tikvicama na treselici i u bioreaktoru. Aktivnost je praćena primjenom 2,2'-azinodi-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonata) (ABTS) kao supstrata.

Na aktivnost enzima lakaze ispitivan je utjecaj koncentracije industrijskog otpada i početne koncentracije micelijskih peleta te utjecaj različitih komponenata kao što su saharoza, induktor, Tween 80, soli, pepton i kvašćev ekstrakt. Utvrđeno je da je najveća aktivnost enzima lakaze nastala njenom proizvodnjom na podlozi s početnom koncentracijom micelijskih peleta od 30 g dm^{-3} i početnom koncentracijom industrijskog otpada 40 g dm^{-3} , a iznosila je $973,34 \text{ U dm}^{-3}$ nakon 10 dana provedbe procesa.

Zbog svoje geometrije i korištenih Rushtonovih turbina kao miješala bioreaktor se pokazao kao neprikladan tip reaktora za dobivanje lakaze visoke aktivnosti njenom proizvodnjom na industrijskom otpadu.

Ključne riječi: lakaza, razgradnja lignina, gljive bijelog truljenja, *Trametes versicolor*

Summary

Nowadays, many concerns have been devoted to environmental protection. The major environmental pollutants are certainly various industries, including pulp and paper industry. That sort of industry requires degradation of lignin which includes bleaching and dechlorinating processes, using harmful chemicals. Therefore, environmental concerns urge to replace conventional and polluting procedures for alternatives like lignin degradation by white-rott fungi that produce ligninolytic enzyme laccase.

In this work, laccase production process was carried out cultivating fungus *Trametes versicolor* on pulp and paper industry waste. Objective of the experiment was defining influences of various nutritive foundation components for cultivating *Trametes versicolor* for production of maximum laccase activity. Experiment was conducted as batch on a shaker and in a bioreactor. Laccase activity was monitored using 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) as a substrate.

On laccase activity were observed influences of industrial waste concentration and initial fungus concentration so as influence of various components such as sucrose, inducer, Tween 80, salts, peptone and yeast extract. Maximum laccase activity was achieved by laccase production in nutritive foundation with maximum initial fungus concentration of 40 g dm⁻³ and maximum industrial waste concentration of 30 g dm⁻³, amounting 973,34 U L⁻¹ after ten days of laccase production process.

Bioreactor appeared to be inappropriate reactor configuration for high activity laccase production as a result of its geometry and application of Rushton's turbines as an impeller.

Keywords: laccase, lignin degradation, white-rott fungi, *Trametes versicolor*

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	3
2.1. Svijet mikroorganizama	3
2.2. Klasifikacija mikroorganizama	4
2.3. Gljive	4
2.3.1. Morfologija i sistematika	4
2.3.2. Ishrana i metabolizam	5
2.3.3. Razmnožavanje	6
2.3.4. Klasifikacija gljiva	6
2.3.5. Gljive bijelog truljenja	7
2.3.5.1. <i>Trametes versicolor</i>	8
2.4. Enzimi	9
2.4.1. Struktura enzima	9
2.4.2. Nomenklatura i podjela enzima	10
2.4.3. Ligninolitički enzimi gljiva <i>Basidiomycetes</i>	10
2.4.3.1. Lignin	10
2.4.3.2. Ligninolitički enzimi	12
2.4.4. Lakaze	13
2.4.4.1. Rasprostranjenost i fiziološka svojstva lakaza	13
2.4.4.2. Struktura lakaza i specifični supstrati	13
2.4.4.3. Primjena lakaza	15
3. MATERIJALI I METODE	16
3.1. Materijali	16
3.1.1. Mikroorganizam	16
3.1.2. Industrijski otpad	16
3.1.3. Kemikalije	17
3.1.4. Priprema krute hranjive podloge za čuvanje gljive	18
3.1.5. Priprema hranjive podloge za uzgoj gljive	19
3.1.6. Priprema podloge za uzgoj gljive na industrijskom otpadu	19
3.1.7. Priprema ostalih otopina	20
3.2. Aparature	20

3.2.1. Tresilica.....	20
3.2.2. Bioreaktor.....	20
3.2.3. Centrifuga.....	21
3.2.4. Autoklav.....	21
3.2.5. Spektrofotometar.....	21
3.3. Analitičke metode.....	21
3.3.1. Određivanje aktivnosti enzima lakaze.....	21
3.3.2. Određivanje koncentracije glukoze.....	22
3.4. Provedba pokusa.....	24
3.4.1. Provedba proizvodnje enzima lakaze na tresilici uzgojem <i>Trametes versicolor</i> na industrijskom otpadu.....	24
3.4.2. Provedba proizvodnje enzima lakaze uzgojem <i>Trametes versicolor</i> na otpadu industrije pulpe i papira u bioreaktoru.....	26
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	27
4.1. Utjecaj početne koncentracije čvrstog otpada i početne koncentracije micelijskih peleta na proizvodnju enzima lakaze.....	27
4.2. Utjecaj saharoze na proizvodnju enzima lakaze.....	30
4.3. Utjecaj induktora na proizvodnju enzima lakaze.....	33
4.4. Utjecaj vremena dodavanja induktora na proizvodnju enzima lakaze.....	34
4.5. Utjecaj Tweena 80 na proizvodnju enzima lakaze.....	36
4.6. Utjecaj peptona, kvašćevog ekstrakta i soli na proizvodnju enzima lakaze.....	38
4.7. Utjecaj elemenata u tragovima na proizvodnju enzima lakaze.....	39
4.8. Proizvodnja enzima lakaze u bioreaktoru.....	41
5. ZAKLJUČAK.....	44
6. LITERATURA.....	45
7. POPIS SIMBOLA I SKRAĆENICA.....	47
7.1. Simboli.....	47
7.1.1. Grčki simboli.....	47
7.2. Skraćenice.....	48
8. PRILOZI.....	49
ŽIVOTOPIS	

1.UVOD

Danas se u svim područjima, od znanosti i tehnologije do gospodarstva, postavljaju zahtjevi za upotrebom ekološki prihvatljivih materijala i sirovina. Biokataliza se može smatrati temeljem jedne od takvih tehnologija, obzirom da se enzimske reakcije mogu provoditi u vodenim otopinama, pri sobnim temperaturama i neutralnom pH, bez upotrebe visokih tlakova i ekstremnih uvjeta, te uz minimalan utrošak energije [1]. Uz ove prednosti enzima, interes za enzimskim biotransformacijama je velik i zahvaljujući novim biokemijskim i analitičkim metodama pomoću kojih je moguće razumjeti mehanizam djelovanja enzima i identificirati nove enzime, te genetičkom inženjerstvu pomoću kojeg je moguće proizvesti točno željeni enzim posebnih značajki [2].

Jedni od najduže poznatih biokatalizatora su lakaze koje su do danas izolirane iz raznih izvora. Njihova velika prednost u odnosu na ostale biokatalizatore je da im je za katalitičku aktivnost potreban kisik, što ih čini ekološki prihvatljivim biokatalizatorima [3]. Lakaze su vrlo zanimljivi enzimi za industrijsku primjenu jer se odlikuju specifičnošću prema različitim supstratima: *o* – i *p* – difenolima, aminofenolima, poliaminima, anilinima, polifenolima, monofenolima [4]. Poznate su primjene lakaze u raznim industrijama kao što su tekstilna industrija, industrija pulpe i papira [5], zaštita okoliša, proizvodnja etanola iz obnovljivih izvora, razgradnja herbicida te prehrambena [6], kozmetička i farmaceutska industrija [7].

Najpoznatiji i najvažniji izvor lakaza su gljive. Zajedno s lignin – peroksidazama i mangan – peroksidazama, lakaze pripadaju ligninolitickim enzimima koji sudjeluju u razgradnji lignina. Razgradnja lignina je temeljni proces u proizvodnji pulpe i papira. Lignin je čvrsti fenilpropanski polimer koji se razvija u biljkama kao strukturna stabilnost i zaštita. Trodimenzionalni je polimer koji se sintetizira iz koniferil, *p* – kumaril i sinapil alkohola . U industriji pulpe i papira ti se spojevi moraju ukloniti modificiranjem njihove strukture pri čemu moraju biti izloženi oštrim fizikalno kemijskim uvjetima. Kemikalije koje se koriste u industriji izbjeljivanja imaju nepovoljan utjecaj na okoliš, stoga su industrije takvog tipa primorane razmotriti ekološki prihvatljivije alternative.

Gljive bijelog truljenja jedini su poznati mikroorganizmi koji su razvili kompleksan enzimatski sustav koji im omogućava da razgrade lignin [8]. Jedna od takvih gljiva je *Trametes versicolor*, gljiva bijelog truljenja iz razreda *Basidiomycetes* koja proizvodi tri ligninoliticka enzima i učinkovito razgrađuje lignin. *Trametes versicolor* provodi

delignifikaciju koja ne uključuje upotrebu štetnih kemikalija i time se postavlja kao iznimna baza za nove, okolišu prihvatljivije tehnologije u industriji pulpe i papira [9].

U ovom radu je proveden proces proizvodnje enzima lakaze uzgojem *Trametes versicolor* na otpadu iz industrije pulpe i papira. Pokusi su provedeni šaržno na tresilici i u bioreaktoru, bez dotoka kisika tijekom provedbe procesa.

Cilj pokusa je bio proizvesti enzim lakazu uz postizanje maksimalne volumne aktivnosti. Praćen je utjecaj različitih čimbenika na aktivnost enzima lakaze kao što su koncentracija industrijskog otpada, početna koncentracija micelijskih peleta, koncentracija saharoze, induktora, Tweena 80, soli, peptona i kvašćevog ekstrakta. Dodatno je u bioreaktoru ispitivan utjecaj broja okretaja miješala na proizvodnju i aktivnost enzima lakaze.

2. OPĆI DIO

2.1. Svijet mikroorganizama

Mikroorganizmi (grč. *mikros* – malen ; *organismos* – organizam) su organizmi koji su mikroskopski, najčešće premaleni da bi se vidjeli golim okom. Znanost koja proučava mikroorganizme naziva se mikrobiologija, a započinje otkrićem Antona van Leeuwenhoek 1675. godine koji je proučavao mikroorganizme mikroskopom vlastite izrade.

Mikroorganizmi su nevjerojatno raznoliki i uključuju bakterije, gljive i protiste, ali i neke mikroskopske biljke i životinje kao što su plankton ili praživotinje poput amebe.

Mikroorganizmi žive u svim dijelovima biosfere gdje je prisutna tekuća voda, uključujući vruće izvore, dna oceana, visoke dijelove atmosfere te duboke stjenovite predjele unutar Zemljine kore [10]. Kao razgrađivači, mikroorganizmi imaju odlučujuću ulogu u biogeokemijskom ciklusu u koji pritječu hranjive tvari (nutrijenti) iz prirodne mreže hrane. Jednostavne anorganske hranjive tvari pretvaraju se u složene organske spojeve pomoću fotosintetskih organizama koji su konačan izvor hrane za sve životinjske potrošače. Te se hranjive tvari nalaze u tijelima uginulih životinja i biljaka koje mikroorganizmi prerađuju razgradnjom složenih sastavnih dijelova uginulih organizama u jednostavne kemijske spojeve koje ponovo koriste fotosintetski organizmi. Tako se na Zemlji stalno odvijaju procesi razgradnje i sinteze u kojima se tvari prevode iz jednog oblika u drugi pri čemu mikroorganizmi imaju neprocjenjivu ulogu.

Osnovno je svojstvo mikroorganizama mala veličina njihovih stanica. Ona nije bila samo osnova za odvajanje mikroorganizama od životinja i biljaka nego je imala i značajne posljedice što se tiče morfologije, aktivnosti, prilagodljivosti, raširenosti i metaboličkih procesa koji se u mikroorganizmima odvijaju.

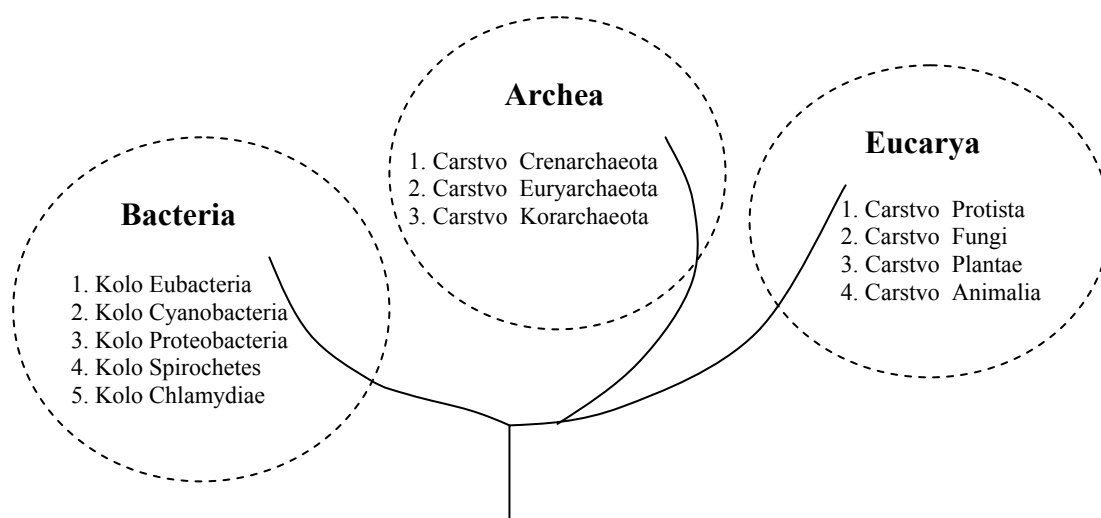
U tako malih organizama odnos između površine i volumena stanice je vrlo velik zbog čega je i velika naizmjenična reakcija s okolišem, što je i osnova za veliku brzinu izmjene tvari u mikroorganizama. Naime, što je stanica manja, to je njezina površina veća u usporedbi s masom, a time je i brža apsorpcija hrane kao i tijek ukupnih biokemijskih reakcija.

Više biljke i životinje imaju uglavnom nepromjenjivu količinu enzima u stanicama pa su ograničene što se tiče fiziološke prilagodljivosti. U mikroorganizama je fiziološka prilagodljivost mnogo veća, što je povezano s njihovim malim dimenzijama [11].

2.2. Klasifikacija mikroorganizama

Radi boljeg razumijevanja odnosa mikroorganizama, njihove funkcije i aktivnosti, stvoren je sustav klasifikacije u kojem se vide razlike, sličnosti i odnosi među organizmima.

Sa stajališta bioloških znanosti, klasifikacija je uređen poredak organizama sa sličnim fiziološkim osobinama ili biokemijskim i genetičkim značajkama unutar pojedinih skupina. Danas je prihvaćena klasifikacija koja se temelji na sustavu tri domene (Slika 2.1.). Taj je sustav predložio 1990. godine Carl R. Woese [10].



Slika 2.1. Shematski prikaz klasifikacije mikroorganizama unutar tri domene

2.3. Gljive

2.3.1. Morfologija i sistematika

Jedna od prvih mikrobioloških znanosti jest mikologija, znanost koja se bavi proučavanjem gljiva. Gljive ili fungi (Tablica 2.1.) uključuju kvasce i plijesni te skupinu makroskopskih organizama, često zvanih mesnatim gljivama. Posebna su skupina organizama koja obuhvaća približno 250 tisuća vrsta.

Budući da su izrazito biokemijski aktivne, mnoge gljive imaju iznimnu komercijalnu ulogu u proizvodnji piva, vina, fermentiranih mliječnih proizvoda i antibiotika. No, neke gljive uzrokuju infektivne bolesti sintetizirajući snažne toksine.

Gljive su eukarioti, nefotosintetički organizmi, stanica obavijenih staničnom stijenkom koja je sastavljena od polisaharida hitina. Većina ih je višestanična iako mogu biti i jednostanične. Za većinu su gljiva karakteristične vlaknaste, cjevaste stanice koje se nazivaju hife i tvore isprepletenu masu nalik na tkivo, micelij [12].

Tablica 2.1. Osnovne osobine gljiva

Tip stanice	eukarioti s jasno određenom jezgrenom membranom
Stanična stijenka	glukani, manani, hitin
Spore	proizvode ih velik broj (spolnih i nespolnih)
Metabolizam	ograničen na heterotrofan (aeroban i fakultativno anaeroban)

2.3.2. Ishrana i metabolizam

Gljive dobro rastu u tamnom, vlažnom okolišu, ali općenito i na svim mjestima gdje postoji iskoristiv organski materijal. Najveći broj gljiva su saprofiti, odnosno organizmi koji potrebne hranjive tvari dobivaju od mrtve organske tvari. Mogu izlučivati hidrolitičke enzime koji razgrađuju supstrate prisutne u okolišu, a zatim otopljene hranjive tvari apsorbiraju. Gljive su također i kemoorganoheterotrofi i upotrebljavaju organski materijal kao izvor ugljika, elektrona i energije.

Primarni polisaharid koji gljive pohranjuju je glikogen. Većina gljiva iskorištava ugljikohidrate (prvenstveno glukozu i maltozu) i dušične spojeve za sintezu njihovih vlastitih aminokiselina i proteina.

U pravilu su aerobni organizmi, međutim neki su kvasci fakultativni anaerobi i mogu proizvoditi energiju fermentacijom, primjerice proizvodnjom etanola iz glukoze [12].

2.3.3. Razmnožavanje

Razmnožavanje u gljiva može biti nespolno i spolno.

Najčešći postupak nespolnog razmnožavanja je tvorba spora do koje dolazi tijekom mitoze i staničnog dijeljenja. Nekoliko je tipova nespolnih spora:

- a. Artrospore nastaju cijepanjem hife u pojedinačne dijelove (odvajanje hife cijepanjem stanične stijenke),
- b. Klamidiospore su stanice koje su prije odvajanja okružene debelom stijenkom,
- c. Sporangiospore se stvaraju unutar mješnice (sporangium) na hifi,
- d. Konidiospore se proizvode na krajevima hifa,
- e. Blastospore se proizvode od vegetativne stanice majke pupanjem.

Spolno razmnožavanje u gljiva uključuje spajanje primjerenih jezgara. Neke vrste gljiva su samooplodive i tvore kompatibilne gamete na istom miceliju. Druge vrste zahtijevaju vanjsko križanje između različitih, ali spolno skladnih micelija. Spolno razmnožavanje također može dovesti do tvorbe spora jer se zigota katkada razvija u zigosporu, askosporu ili bazidiosporu.

Spore su važne zbog puno razloga. Veličina, oblik, boja i broj spora pomažu u identifikaciji vrste gljiva. Često su male i bezbojne i mogu ostati suspendirane u zraku dugi period. Tako pomažu u širenju gljiva, što je bitan parametar za široko rasprostiranje velikog broja vrsta gljiva [12].

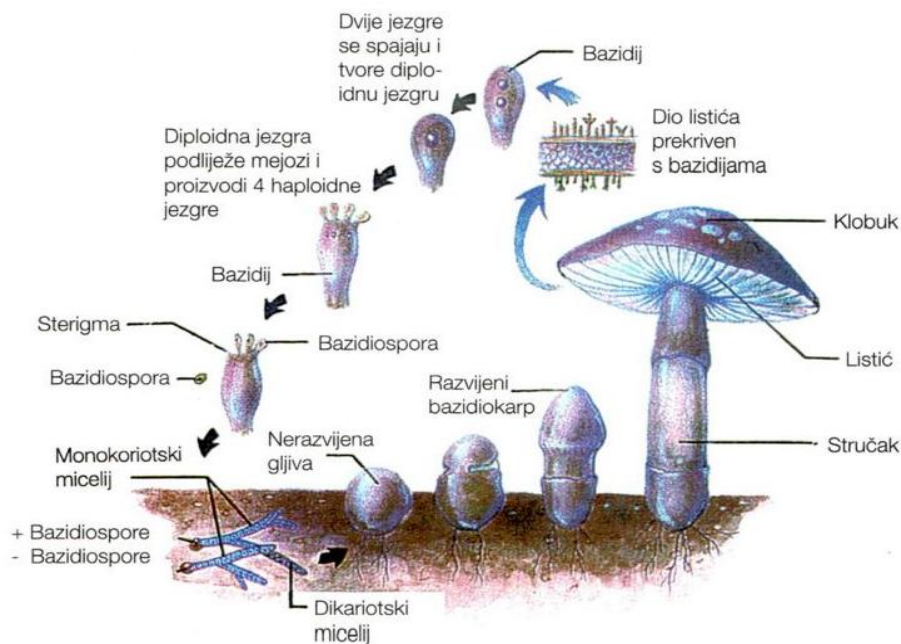
2.3.4. Klasifikacija gljiva

Svaka gljiva pripada jednoj od pet taksonomskih skupina koje se međusobno razlikuju na osnovi tipa spora te po morfologiji hifa i spolnom ciklusu. Te skupine su : *deuteromycetes*, *zygomycetes*, *ascomycetes*, *basidiomycetes* i *oomycetes*.

Razred *Basidiomycotina* sadrži gljive nazvane *basidiomycetes*, općenito poznate kao gljive klobučarke. Njima pripadaju gljive koje rastu na drveću, jestive gljive, gljive puhare, hrđe, snijeti i otrovne gljive (Slika 2.2.).

Basidiomycetes je ime dano zbog karakteristične strukture njihove stanice, bazidijuma, koji je uključen u spolni način razmnožavanja. Bazidium (grč. *basidion* = mala baza) se proizvodi na tipičnoj hifi i uobičajeno je oblika klobuka. Bazidiospore se proizvode u bazidiumu, a bazidiji mogu biti zatvoreni unutar plodonosnih tijela nazvanih bazidiokarpi.

Najveći broj bazidiomiceta žive kao saprofiti i razgrađuju biljni materijal, posebno celulozu i lignin [12].



Slika 2.2. Tipična mesnata gljiva i spolne bazidiospore

2.3.5. Gljive bijelog truljenja

Gljive bijelog truljenja su jedini dosad poznati organizmi koji uspješno razgrađuju lignin, a u prirodi se nastanjuju na mrtvom ili živom drvetu. Gljive koje razgrađuju drvo podijeljene su u tri skupine: gljive bijelog, smeđeg i blagog truljenja.

Gljive bijelog truljenja napadaju lignin dok celulozu i hemicelulozu manje oštećuju. Takve gljive koje razgrađuju lignin radije nego celulozu nazivaju se selektivni razgrađivači. Selektivni razgrađivači lignina posebno su zanimljivi sa stajališta primjene u biotehnologiji, obzirom da uklanjaju lignin, a vrijednu celulozu ostavljaju neoštećenom. Razgradnja lignina

pomoću ovih gljiva odvija se tijekom njihovog sekundarnog metabolizma i obično u uvjetima u kojima ima malo dušika.

Za razgradnju lignina važna je kombinacija izvanstaničnih ligninolitičkih enzima lignin peroksidaze (LiP), mangan peroksidaze (MnP) i lakaze. Prema ustrojstvu i proizvodnji ligninolitičkih enzima, gljive bijelog truljenja mogu se podijeliti u tri skupine:

1. gljive koje proizvode LiP, MnP i lakazu
2. gljive koje proizvode MnP i lakazu
3. gljive koje proizvode LiP i lakazu

Najzastupljenije su gljive bijelog truljenja koje proizvode MnP i lakazu [13].

Gljive bijelog truljenja proizvode različite lakaze relativno niskih koncentracija kada su uzgojene submerzno ili na drvetu. Više koncentracije mogu se postići dodatkom različitih aromatskih spojeva, induktora, kao što su ksilidin ili guaiakol [8].

2.3.5.1. *Trametes versicolor*

Trametes versicolor je gljiva bijelog truljenja iz razreda *Basidiomycetes* koja proizvodi tri ligninolitička enzima i učinkovito razgrađuje lignin, policiklične aromatske ugljikovodike, poliklorirane bifenilne smjese i brojna sintetska bojila.

Utvrđeno je da prisustvo induktora kao što su ksilidin, veratrilni alkohol i fenolne smjese povećava aktivnost ligninolitičkih enzima. Međutim, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se utvrdila najbolja eksperimentalna metodologija za postizanje optimalne ligninolitičke aktivnosti.

Trametes versicolor provodi delignifikaciju i izbjeljivanje kraft pulpe, a osim toga učinkovito obezbojuje izljeve nastale izbjeljivanjem pulpe. Time se primjena gljiva bijelog truljenja postavlja kao iznimna baza za nove, okolišu prihvatljivije tehnologije u industriji pulpe i papira [9].

2.4. Enzimi

Mikroorganizmi mogu provoditi različite procese za dobivanje energije i tvorbu staničnih sastojaka te za obnovu, razmnožavanje i pokretanje. Izrazita sličnost, opisana kao biokemijsko jedinstvo, može se primijeniti u niza različitih organizama.

U biološkom sustavu neprekidno se odvija velik broj promjena koje zahtijevaju brze kemijske reakcije za dobavu energije i oblikovanje stanica. Stoga biološki sustav zahtijeva katalizatore koji mogu funkcionirati u uvjetima koji su u suglasju sa životom. Odabranom kontrolom ubrzavanja specifičnih reakcija u određeno vrijeme, takvi biološki katalizatori (enzimi) djelotvorno funkcioniraju neovisno o promjenama koje mogu razoriti stanice.

Enzimi ubrzavaju kemijske reakcije smanjujući energiju aktivacije i pravilno orijentirajući molekule koje se sudaraju. Tako se, bez povećanja temperature ili tlaka, u stanici odvija vrlo velik broj kemijskih reakcija.

Enzimi su izvanredno djelotvorni. U optimalnim uvjetima mogu katalizirati reakcije koje su više od 10 milijardi puta brže od reakcija koje se odvijaju bez prisustva enzima.

Po kemijskoj strukturi enzimi su proteini. Sudjeluju u metaboličkim reakcijama, respiraciji, pretvorbi i prenošenju energije između živih sustava i u sintezi različitih makromolekula i staničnih sastojaka. Poznato je i opisano više od dvije tisuće različitih enzima od kojih svaki može katalizirati specifičnu reakciju. Stoga su specifični enzimi, sintetizirani u stanici, najvažniji čimbenik tijekom određivanja bioloških aktivnosti i funkcija koje obavlja stanica [11].

2.4.1. Struktura enzima

Mnogi su enzimi samo proteini i nazivaju se jednostavni enzimi. Za razliku od njih, enzimi koji sadržavaju i neproteinske skupine, nazivaju se konjugirani enzimi. Proteinski se dio naziva apoenzim, a neproteinski koenzim (kofaktor). Zajedno apoenzim i koenzim tvore potpuni enzim, holoenzim. Kad je kofaktor metalni ion (npr. magnezij, cink, željezo, bakar, mangan) govori se o aktivatoru.

Svaki enzim ima optimalnu pH – vrijednost i temperaturu djelovanja jer brzina enzimskih reakcija ovisi najvećim dijelom o tim čimbenicima. Temperatura i pH ne utječu

samo na privlačne sile između pojedinih aminokiselinskih ostataka u molekuli enzima nego i na reakcije između enzima i tvari (supstrata) na koju enzim djeluje i koja se, djelovanjem enzima, kemijski mijenja.

Enzimi su nepromijenjeni nakon procesa koje kataliziraju. Neki od njih su posve specifični, pa kataliziraju samo određenu reakciju [11].

2.4.2. Nomenklatura i podjela enzima

Nazivi enzima često se daju prema supstratu na koji djeluju. Osim toga, imenuju se na osnovi njihovog zajedničkog djelovanja. Nastavak *-aza* na kraju imena označava imena svih enzima [11].

Enzimi su podijeljeni u šest klasa:

- Oksidoreduktaze su enzimi koji ubrzavaju reakcije oksidacije i redukcije.
- Transferaze su enzimi koji sudjeluju u prijenosu raznih atomskih grupa.
- Hidrolaze sudjeluju u reakcijama hidrolize.
- Liaze sudjeluju u stvaranju i cijepanju dvostrukih veza.
- Izomeraze su enzimi koji prevode izomere iz jednog oblika u drugi
- Ligaze sudjeluju u reakcijama sinteze pri čemu se troši energija pohranjena u obliku adenozin – trifosfata (ATP) [14].

2.4.3. Ligninolitčki enzimi gljiva *Basidiomycetes*

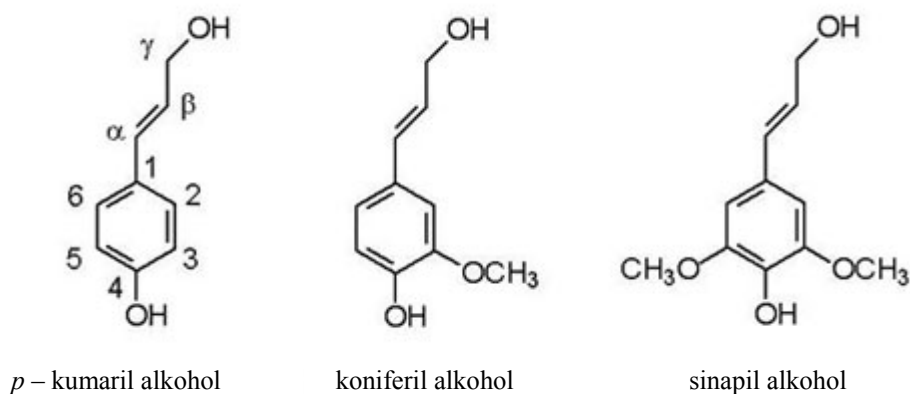
2.4.3.1. Lignin

Lignocelulozna biomasa iz biljaka je obnovljiv izvor hrane, energije i kemikalija. Uključuje preko 60 % ukupne proizvodnje biomase. Lignocelulozni otpadni materijal proizvodi se u velikim količinama u poljoprivredi, šumarstvu te u industriji papira i celuloze.

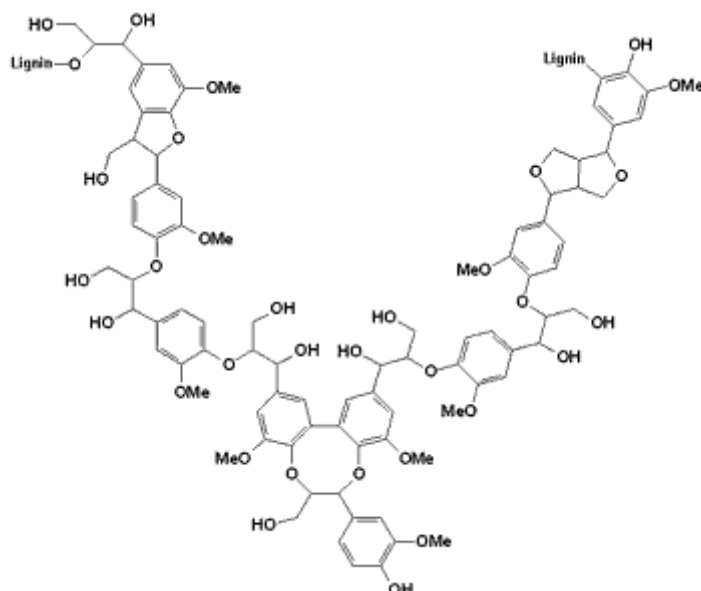
Lignocelulozni biljni materijal sadržava tri osnovne komponente: celulozu, hemicelulozu i lignin. Celuloza je linearni homopolimer koji se sastoji od glukoznih

podjedinica povezanih β – 1,4 – glikozidnim vezama. Hemiceluloza je heteropolisaharid koji sadržava kratke račvaste lance heksoze.

Nakon celuloze, lignin je drugi najobilniji obnovljivi biopolimer u prirodi. Osnovni je dio biljne stanične stijenke, daje joj tvrdoću i štiti lako razgradivu celulozu od napada patogenih organizama. Sintetizira se u višim biljkama i to polimerizacijom fenilpropanskih derivata koji se još nazivaju i monolignoli. Postoje tri tipa monolignola: *p* – kumaril alkohol, koniferilni alkohol i sinapil alkohol [13] (Slika 2.3.).



Slika 2.3. Strukturni prikaz tri osnovna tipa monolignola



Slika 2.4. Struktura lignina

Lignin u sebi sadrži slijedeće grupe: metoksilnu, acetilnu, formil grupu, aromatske grupe, kao i heterociklične grupe furanskog i piranskog tipa (Slika 2.4). Lignin je amorfan sa razvijenom unutrašnjom strukturom, radi čega ima izraženu adsorpcijsku sposobnost [15].

Zbog svoje složene strukture i veza koje se ne mogu hidrolizirati, lignin je mnogo teže razgradiv nego celuloza i hemiceluloza. Molekularna masa lignina je velika, oko 100 kg mol^{-1} i više, što sprječava unos lignina u unutrašnjost mikrobnog stanice [13].

2.4.3.2. Ligninolitički enzimi

Do razlaganja lignina dolazi zbog djelovanja ligninolitičkih enzima. Osnovni izvanstanični enzimi koji sudjeluju u razgradnji lignina su : peroksidaze koje sadrže željezo – lignin peroksidaza (LiP) i mangan peroksidaza (MnP) te oksidaza lakaza.

Dosad poznati ligninolitički enzimi su izvanstanični i nespecifični, sudjeluju u različitim oksidacijskim reakcijama u kojima se razbija aromatska struktura lignina kao i veze između njegovih osnovnih podjedinica. Nastali spojevi manje molekulske mase se tada mogu transportirati unutar stanice i dalje razgraditi [13].

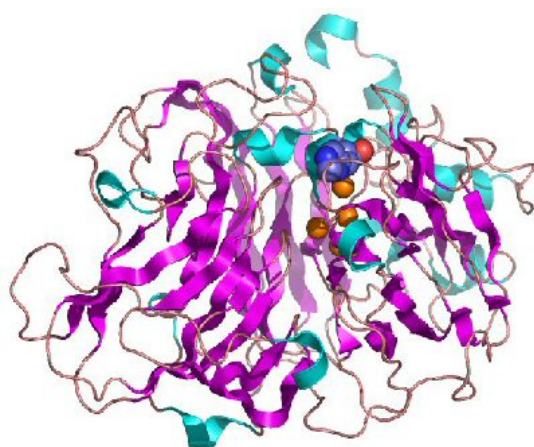
Tablica 2.2. Ligninolitički enzimi i njihove najvažnije reakcije

Enzim	Kofaktor	Supstrat	Reakcija
Lignin peroksidaza; LiP	H_2O_2	Veratrilni alkohol	Oksidacija aromatskog prstena do kationa
Mangan peroksidaza; MnP	H_2O_2	Mn, organske kiseline, nezasićene masne kiseline	Oksidacija Mn^{2+} do Mn^{3+} , oksidacija fenolnih spojeva
Lakaza	O_2	Fenoli, medijatori poput hidroksibenzotriazola ili ABTS-a	Oksidacija fenola

2.4.4. Lakaze

2.4.4.1. Rasprostranjenost i fiziološka svojstva lakaza

Lakaze su enzimi iz skupine oksidoreduktaza (Slika 2.5.). Obzirom na porijeklo, mogu se podijeliti u dvije glavne skupine: lakaze porijeklom iz viših biljaka i lakaze porijeklom iz gljiva koje predstavljaju zastupljeniju skupinu. Najveći broj ih je izoliran iz gljiva bijelog truljenja koje su poznate kao dobri razgrađivači lignina. Osim iz ova dva izvora, nedavno su izolirane i okarakterizirane lakaze iz bakterija i kukaca.



Slika 2.5. Pojednostavljeni prikaz strukture lakaze porijeklom iz *Trametes versicolor*

Fiziološka funkcija lakaza je brojna. Poznato je da sudjeluju u morfogenezi mikroorganizama domaćina, primjerice u razvoju spora kod gljiva, te u procesu nastajanja melanina, oksidaciji voća i povrća, zaštiti biljaka protiv kukaca i mikroorganizama. Nadalje, lakaze kataliziraju biorazgradnju lignina gdje uglavnom oksidiraju fenolne podjedinice lignina, ali sudjeluju i u biosintezi lignina [16].

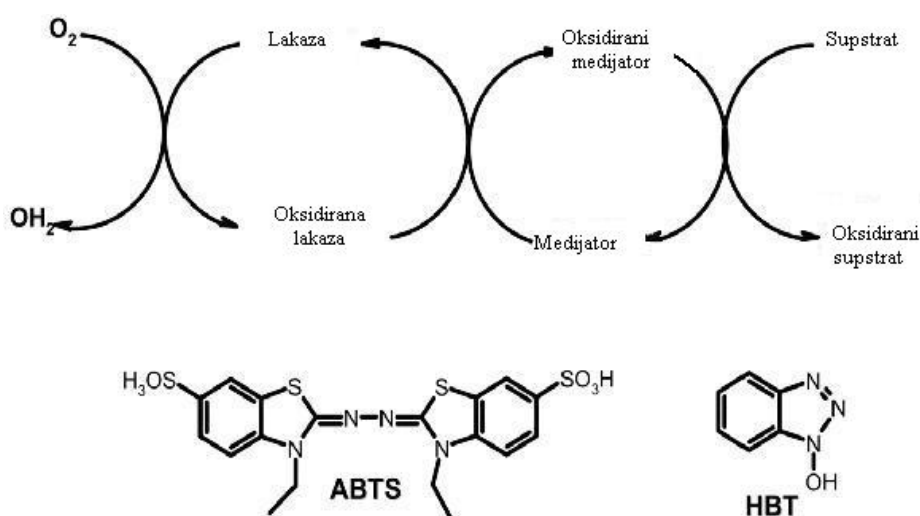
2.4.4.2. Struktura lakaza i specifični supstrati

Lakaze pripadaju skupini metaloenzima i za katalitičku aktivnost potrebna su im četiri atoma bakra po aktivnoj jedinici proteina koji se mogu podijeliti u tri skupine:

paramagnetski „plavi“ bakar (tip 1) koji apsorbira pri $\lambda = 610$ nm, paramagnetski „ne plavi“ bakar (tip 2) koji ne apsorbira u vidljivom dijelu spektra i dijamagnetski par bakar – bakar (tip 3) koji apsorbira pri $\lambda = 330$ nm. Ti različiti centri bakra prenose elektrone s reducirajućeg supstrata na molekulu kisika pri čemu nastaje voda. Oksidacija supstrata dovodi do nastanka reaktivnih radikala nakon čega može doći do jedne od tri reakcije: neenzimatsko povezivanje monomera, razgradnja polimera ili cijepanje aromatskog prstena.

Za razliku od većine enzima koji posjeduju svojstvo specifičnosti prema točno određenom supstratu, lakaze ne pokazuju to svojstvo, već djeluju na velik broj različitih supstrata. Uz pomoć kisika kataliziraju oksidaciju *o* – , *p* – difenola, aminofenola, polifenola, poliamina, lignina, nekih anorganskih iona, aromatskih amina i različitih nefenolnih supstrata.

Lakaza može razgraditi fenolne podjedinice lignina koji čine 10 – 15 % lignina, no za nefenolne podjedinice, lakaza djeluje pomoću medijatora kao što su 1 – hidroksibenzotriazol (HBT), 3 – hidroksiantranilat (HAA) i 2,2' – azino – bis – (3 – etilbenzotiazolin – 6 – sulfonska kiselina) (ABTS) (Slika 2.6.). U prirodi postoje prirodni medijatori koji potiču lakazu da oksidira nefenolne podjedinice lignina, pri čemu se tada čitav proces delignifikacije događa zahvaljujući lakazi, bez djelovanja drugih ligninolitičkih enzima [16].



Slika 2.6. Pojednostavljeni prikaz mehanizma razgradnje podjedinica lignina lakazom i strukture uobičajenih medijatora ABTS-a i HBT-a

2.4.4.3. Primjena lakaza

Sposobnost kataliziranja širokog spektra reakcija i ekološka prihvatljivost čine lakaze vrlo zanimljivim biokatalizatorima za istraživanje i industrijsku primjenu. Tako su lakaze našle primjenu u zaštiti okoliša, u analitici, posebice u dijagnostici, zatim u prehrambenoj i ostalim industrijama. Na primjer, upotreba lakaze u procesima izbjeljivanja pulpe u industriji papira i pulpe predstavlja ekološki prihvatljivije rješenje u odnosu na standardne postupke izbjeljivanja pomoću kemikalija na bazi klora.

Lakaze se primjenjuju kao biosenzori za detekciju raznih fenolnih spojeva što je osobito važno za zaštitu okoliša u brojnim industrijama kao što su industrija plastike, boja, lijekova, papira i pulpe.

Sve je veća primjena lakaze u sintezi organskih spojeva, upravo zbog velikog broja supstrata na koje lakaza može djelovati te zbog toga što djeluje na supstrat do nastanka nestabilnog slobodnog radikala (kationa) nakon čega slijede reakcije polimerizacije ili hidratacije.

U prehrambenoj industriji lakaze se mogu upotrebljavati za sprječavanje neželjenih promjena kao što su gubitak boje, promjene okusa i mirisa hrane i pića, produljenje roka trajanja hrane na način da uklanjaju neke spojeve kao što su kumarinska kiselina, flavani i antocijani [16].

3. MATERIJALI I METODE

Proizvodnja lakaze provedena je uzgojem gljive bijelog truljenja *Trametes versicolor* u anaerobnim uvjetima u šaržnim pokusima na tresilici. Pokus je trajao 15 dana. Provedeni su i pokusi u bioreaktoru s različitim brojem okretaja miješala. Kao osnovni element hranjive podloge korišten je otpad iz industrije pulpe i papira. Praćene su promjene aktivnosti enzima lakaze i koncentracije glukoze, koje su određivane spektrofotometrijski.

3.1. Materijali

3.1.1. Mikroorganizam

Za proizvodnju enzima lakaze korištena je kultura gljive *Trametes versicolor* dobivena iz mikrobiološke zbirke Culuture Collection of the National Institute of Chemistry u Ljubljani (Slovenija). Kultura je čuvana na 4 % sladnom agaru pri $t = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ i precjepljivana svaka 4 tjedna.

3.1.2. Industrijski otpad

U pokusima je korišten otpad iz tvornice papira Vevče (Slovenija) koji je dobiven nakon mehaničke i kemijske obrade otpadne vode (Slika 3.1.).

Ispitivanje svojstava ovog otpada te prisutnosti metala i ostalih limitirajućih tvari, provedeno je na Institutu za celulozu i papir u Ljubljani (Slovenija). Vrijednosti prikazane u Tablici 3.1. se odnose na sastav uzorka profiltriranog zamuljenog otpada i preračunate su na masu suhe tvari.



Slika 3.1. Dehidrirani otpad iz industrije pulpe i papira

Tablica 3.1. Vrijednosti dobivene analizom uzorka iz profiltriranog zamuljenog otpada

Parametar	Vrijednost
w(ostatak nakon žarenja) [%]	73,4
w (As) [mg kg ⁻¹ s.t.]	< 0,01
w (Ba) [mg kg ⁻¹ s.t.]	< 0,1
w (Cd) [mg kg ⁻¹ s.t.]	< 0,0005
w (Cr) (ukupni) [mg kg ⁻¹ s.t.]	0,024
w (Cu) [mg kg ⁻¹ s.t.]	0,008
w (Ag) [mg kg ⁻¹ s.t.]	< 0,001
w (Mo) [mg kg ⁻¹ s.t.]	< 0,1
w (Ni) [mg kg ⁻¹ s.t.]	1,24
w (Pb) [mg kg ⁻¹ s.t.]	< 0,005
w (Sb) [mg kg ⁻¹ s.t.]	< 0,01
w (Se) [mg kg ⁻¹ s.t.]	< 0,01
w (Zn) [mg kg ⁻¹ s.t.]	< 0,05
w (Cl ⁻) [mg kg ⁻¹ s.t.]	28,4
w (SO ₄ ²⁻) [mg kg ⁻¹ s.t.]	36,9

3.1.3. Kemikalije

Korištene su slijedeće kemikalije: agar sladnog ekstrakta (Sigma – Aldrich), agar – agar (Kemika), glukoza (Riedel – de Haën), saharoza (Kandit), pepton (Aldrich), kvašičev ekstrakt (Aldrich), KH₂PO₄ (Merck), Na₂HPO₄ (Kemika), MgSO₄ * 7 H₂O (Merck), CaCl₂ *

7 H₂O (Merck), limunska kiselina (Kemika), FeSO₄ * 7 H₂O (Kemika), MnSO₄ * H₂O (Merck), ZnSO₄* 7 H₂O (Kemika), KI (Kemika), CuSO₄ * 5 H₂O (Kemika), Tween 80 (Fluka Chemie), 2,2'-azinodi-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (Sigma – Aldrich), etanol (Merck), 2-metoksifenol (Fluka Chemie), alkali lignin (Aldrich), 4-alil-2-metoksifenol (Fluka Chemie), 3,4-dimetoksi benzil alkohol (Aldrich), glicin (Merck), NaCl (Kemika), HCl (Kemika), PAP – reagens (Herbos – dijagnostika).

3.1.4. Priprema krute hranjive podloge za čuvanje gljive

Čista kultura gljive *Trametes versicolor* čuvana je na kosim krutim podlogama (Slika 3.2.). Otopljeno je 2 g agara sladnog ekstrakta i 2 g agar-agara u 100 cm³ vode. Oko 5 cm³ otopine stavljeno je u epruvetu i sterilizirano u autoklavu 20 minuta pri $t = 121$ °C i tlaku $p = 0,6-0,8$ bar. Nakon sterilizacije, podloge su ohlađene na sobnu temperaturi kako bi se želirale. Kultura se sterilno preciepljivala na krutu podlogu svakih 4 do 5 tjedana i čuvala pri $t = 4$ °C.



Slika 3.2. Kultura gljiva *Trametes versicolor* na krutoj kosoj podlozi

3.1.5. Priprema hranjive podloge za uzgoj gljive

Pripremljeno je 50 cm³ hranjive podloge (Tablica 3.2.) u Erlenmeyerovim tikvicama ($V = 500 \text{ cm}^3$) i sterilizirano 30 minuta pri temperaturi $t = 121 \text{ }^\circ\text{C}$ i tlaku $p = 0,6\text{-}0,8 \text{ bar}$.

Tablica 3.2. Sastav hranjive podloge za uzgoj gljive

Komponenta	Koncentracija, $\gamma [\text{g dm}^{-3}]$
Glukoza	10
Pepton	0,4
Kvaščev ekstrakt	0,6
KH_2PO_4	1,2
Na_2HPO_4	0,4
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	1

Kulture gljive su precijepljene sa krute podloge za čuvanje na hranjivu podlogu za uzgoj. Uzgoj gljive je proveden na tresilici pri temperaturi $t = 27 \text{ }^\circ\text{C}$ i broju okretaja tresilce $n = 140 \text{ min}^{-1}$ i trajao je 2-3 dana. Uzgojeni micelijski peleti gljive su profiltrirani te izvagani i kao takvi korišteni za uzgoj gljive na krutom otpadu u svrhu proizvodnje enzima lakaze.

3.1.6. Priprema podloge za uzgoj gljive na industrijskom otpadu

Pripremljene podloge su sterilizirane u autoklavu 30 minuta pri $t = 121 \text{ }^\circ\text{C}$ i tlaku $p = 0,6\text{-}0,8 \text{ bar}$. Sastav hranjivih podloga razlikuje se za svaku točku pokusa i prikazan je u poglavlju 4. Rezultati i rasprava.

3.1.7. Priprema ostalih otopina

Pripremljene su:

- otopina glukoze koncentracije $\gamma = 25 \text{ g dm}^{-3}$ koja je korištena za određivanje baždarnog pravca pomoću kojeg su određivane nepoznate koncentracije glukoze u uzorcima. Otopina je pripremljena otapanjem glukoze u redestiliranoj vodi,
- otopina induktora (guaiakola) koncentracije $\gamma = 20 \text{ g dm}^{-3}$. Otopina je pripremljena otapanjem 2-metoksifenola u vodenoj otopini etanola, $w = 50 \%$,
- otopina glicin/HCl pufera pH = 3,0 [17],
- otopina ABTS-a koncentracije $c = 3 \text{ mmol dm}^{-3}$. Otopina je pripremljena otapanjem ABTS-a u glicin/HCl puferu pH = 3,0.

3.2. Aparature

3.2.1. Tresilica

Proces uzgoja gljive *Trametes versicolor* i proizvodnje lakaze na industrijskom otpadu je proveden na tresilici (Innova 4330 New Brunswick Scientific, SAD) .

3.2.2. Bioreaktor

Uzgoj gljiva je proveden u bioreaktoru $V = 2 \text{ dm}^3$ (Biostat MD, B. Braun Biotech, SAD). Bioreaktor je opremljen kisikovom elektrodom, pH elektrodom, sustavom za regulaciju temperature, miješalom, sustavom za regulaciju broja okretaja miješala, mjerачem protoka zraka (rotametar) i filtrom za sterilno dovođenje zraka.

3.2.3. Centrifuga

Uzorci su centrifugirani na stojećoj, horizontalnoj centrifugi Centric 150 proizvođača TEHTNICA (Slovenija) pri $n = 5000 \text{ min}^{-1}$.

3.2.4. Autoklav

Za sterilizaciju reaktora, Erlenmeyerovih tikvica, potrebnog laboratorijskog posuđa i hranjivih podloga korišten je autoklav (Sutjeska). Sterilizacija je provedena suhim vrućim zrakom pri $t = 121 \text{ }^\circ\text{C}$, tlaku $p = 0,6\text{-}0,8 \text{ bara}$ u trajanju od 30 minuta.

3.2.5. Spektrofotometar

Mjerenje koncentracije glukoze i aktivnosti enzima provedeno je upotrebom spektrofotometrijskih metoda na dvoznačnom spektrofotometru (UV-1601, SHIMADZU).

3.3. Analitičke metode

Tijekom procesa proizvodnje lakaze praćena je aktivnost enzima lakaze i koncentracija glukoze. Obje veličine su određene spektrofotometrijskim metodama.

3.3.1. Određivanje aktivnosti enzima lakaze

Aktivnost enzima lakaze je određivana spektrofotometrijski metodom početnih brzina. Metoda se temelji na reakciji oksidacije ABTS-a lakazom pri čemu nastaje stabilan radikal kation $\text{ABTS}^{+\bullet}$. Radikal kation je specifične tamnozeleno boje (Slika 3.3.) koji apsorbira pri $\lambda = 420 \text{ nm}$ i stabilan je u području $\text{pH} = 3 - 11$ [18].

Mjerenja apsorbancije su provedena u kvarcnoj kiveti volumena 1 cm^3 , a reagens ABTS je prethodno termostatiran 5 minuta pri $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. $100 \text{ }\mu\text{L}$ uzorka dodavano je u $900 \text{ }\mu\text{L}$ otopine ABTS-a, čime je aproksimiran početak reakcije. Svako mjerenje je trajalo 100 sekundi pri čemu su dobivene dinamičke promjene apsorbancije iz kojih je izračunata volumna aktivnost enzima lakaze prema jednadžbi (3.1):

$$V.A. = \frac{V_r}{\varepsilon \cdot d \cdot V_E} \cdot \frac{\Delta A}{\Delta t} \quad (3.1)$$

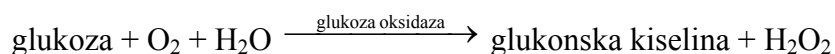
gdje su V_r ukupni volumen uzorka u kiveti (cm^3), V_E volumen dodanog uzorka koji sadrži enzim (cm^3), ε apsorpcijski koeficijent ($\varepsilon_{420} = 0,036 \text{ dm}^3 \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-2}$), d širina kivete ($d = 1 \text{ cm}$), $\frac{\Delta A}{\Delta t}$ promjena apsorbancije u vremenu (nagib pravca) (min^{-1}), $V.A.$ volumna aktivnost enzima (U cm^{-3}), pri čemu 1 U predstavlja jedinicu enzimске aktivnosti, odnosno onu aktivnost enzima koja je potrebna da se oksidira $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ supstrata u minuti [16].



Slika 3.3. Obojenje nastalo oksidacijom ABTS-a lakazom

3.3.2. Određivanje koncentracije glukoze

Glukoza u uzorcima je određivana primjenom kolorencijske (PAP) metode koja se temelji na slijedećim reakcijama:





Kinonimin daje obojenje otopini koje apsorbira svjetlo u vidljivom području spektra na valnoj duljini $\lambda = 500 \text{ nm}$ (Slika 3.4). Količina apsorbiranog svjetla proporcionalna je koncentraciji glukoze u otopini.

Po uzimanju uzorka a prije mjerenja isti je centrifugiran 5 minuta pri $n = 5000 \text{ min}^{-1}$ u svrhu odvajanja biomase. Kapljevinski ostatak je korišten za određivanje koncentracije glukoze.



Slika 3.4. Kinonimin nastao spektrofotometrijskm određivanjem koncentracije glukoze PAP metodom

Za određivanje glukoze PAP metodom korištene su slijedeće otopine:

R1 reagens:

4-aminoantipirin, $0,40 \text{ mmol dm}^{-3}$

glukoza oksidaza (GOD), $10\,000 \text{ U dm}^{-3}$

peroksidaza (POD), 700 U dm^{-3}

R2 pufer:

fosfatni pufer ($\text{pH} = 7,4 \pm 0,05$), 100 mmol dm^{-3}

fenol, 10 mmol dm^{-3}

R3 standard:

glukoza, $5,56 \text{ mmol dm}^{-3}$

Reagens R1 je otopljen u puferu R2, te je sadržaj nastale otopine vraćen u otopinu pufera.

Tako priređena otopina je stabilna 4 tjedna na temperaturi $t = 2 - 8 \text{ }^\circ\text{C}$.

Mjerenje je provedeno spektrofotometrijski na valnoj duljini $\lambda =$ od 500 nm i temperaturi $t = 20 - 25$ °C. Uzorci za mjerenje koncentracije glukoze su pripremani u plastičnim kivetama volumena 1 cm^3 . Način pripreme uzoraka za mjerenje je prikazan u tablici 3.3.

Koncentracija glukoze je izračunata prema jednadžbi 3.2:

$$c_{\text{glukoza}} = \frac{A_0}{A_S} \cdot 5,56 \quad (3.2)$$

pri čemu su c koncentracija glukoze u mmol dm^{-3} , A_0 apsorbancija slijepa probe, a A_S apsorbancija nepoznatog uzorka [19].

Tablica 3.3. Sastav otopine u kiveti prilikom spektrofotometrijskog određivanja koncentracije glukoze PAP metodom.

Materijal	Slijepa proba $V [\text{cm}^3]$	Standard $V [\text{cm}^3]$	Nepoznati uzorak $V [\text{cm}^3]$
Standard	-	0,01	-
Uzorak	-	-	0,01
Otopina reagensa	1,00	1,00	1,00

3.4. Provedba pokusa

3.4.1. Provedba proizvodnje enzima lakaze na tresilici uzgojem *Trametes versicolor* na industrijskom otpadu

Pokus je proveden šaržno, u tikvicama na tresilici tijekom 15 dana pri $t = 27$ °C i broju okretaja $n = 140 \text{ min}^{-1}$.

Prije početka pokusa uzgojena je gljiva *Trametes versicolor* na prethodno opisanoj hranjivoj podlozi (poglavlje 3.1.5). Uzgojeni micelijski peleti gljive su profiltrirani na filter papiru (kvantitavni filter papir plava vrpca, $\text{Ø} = 110$ mm, Munktell, Njemačka), izvagani, te korišteni za proizvodnju enzima lakaze na otpadu industrije pulpe i papira.



Slika 3.5. a) Uzgoj gljive *Trametes versicolor* na tresilici na tekućoj hranjivoj podlozi i b) peleti gljive *Trametes versicolor* nakon filtracije

Pripremljeno je 100 cm³ hranjive podloge (poglavlje 3.1.6) i sterilizirano u autoklavu 30 minuta pri $t = 121$ °C i tlaku $p = 0,6-0,8$ bar. Profiltrirani peleti su kvantitativno preneseni u svaku tikvicu, a početak pokusa aproksimiran je njihovim dodatkom. Za svaki sastav hranjive podloge koji je sadržavao otpad industrije pulpe i papira provedena su dva pokusa.

Uzorci za određivanje aktivnosti enzima lakaze i koncentracije glukoze uzimani su svaka 24 sata. Uzorci su uzimani u sterilnim uvjetima, injekcijom kroz septum tikvice (Slika 3.6.). Nakon uzimanja, uzorci su centrifugirani, a iz kapljevinskog ostatka je određivana aktivnost enzima lakaze i koncentracija glukoze.



Slika 3.6. Postupak sterilnog uzimanja uzoraka

3.4.2. Provedba proizvodnje enzima lakaze uzgojem *Trametes versicolor* na otpadu industrije pulpe i papira u bioreaktoru

Provedena su dva pokusa u bioreaktoru (Slika 3.7.) tijekom 9 i 11 dana pri temperaturi 27 °C te broju okretaja miješala $n = 100 \text{ min}^{-1}$ (kroz 9 dana) i $n = 50 \text{ min}^{-1}$ (kroz 11 dana).

Bioreaktor je napunjen s 500 cm³ hranjive podloge (poglavlje 3.1.6.) i steriliziran u autoklavu 30 minuta pri $t = 121 \text{ °C}$ i tlaku $p = 0,6 - 0,8 \text{ bar}$. U bioreaktor su preneseni micelijski peleti gljive dobiveni na prethodno opisan način. Pokrenuto je miješanje te sustavi za regulaciju temperature i regulaciju broja okretaja miješala. Hranjiva podloga je na početku zasićena kisikom iz zraka ($p_{O_2} = 100 \%$), a potom je dotok zraka isključen. Uzorci za određivanje aktivnosti enzima lakaze uzimani su pretežito svaka 24 sata, a ponekad i češće. Uzorci iz bioreaktora su sterilno uzimani pomoću sustava za uzorkovanje. Ovako uzeti uzorci su centrifugirani, a iz kapljevinskog ostatka je određivana aktivnost enzima lakaze. Tijekom pokusa praćene su promjene pH vrijednosti i koncentracije otopljenog kisika.



Slika 3.7. Proces proizvodnje lakaze u bioreaktoru

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu proveden je uzgoj gljive *Trametes versicolor* u svrhu proizvodnje enzima lakaze na otpadu industrije pulpe i papira. Ispitan je utjecaj različitih komponenata hranjive podloge u svrhu dobivanja maksimalne aktivnosti enzima lakaze tijekom petnaestodnevnog uzgoja na tresilici. Ispitani su učinci:

- koncentracije čvrstog otpada,
- početne koncentracije micelijskih peleta,
- saharoze,
- induktora,
- vremena dodavanja induktora,
- Tweena 80,
- peptona, kvašćevog ekstrakta i soli,
- elemenata u tragovima.

Svaki pokus proveden je dva puta, a svi rezultati su prikazani s intervalom pouzdanosti uz nivo signifikantnosti od 0,05.

Dodatno je u bioreaktoru proveden uzgoj gljive *Trametes versicolor* na dva različita broja okretaja miješala kako bi se ispitala mogućnost proizvodnje enzima lakaze u većem mjerilu.

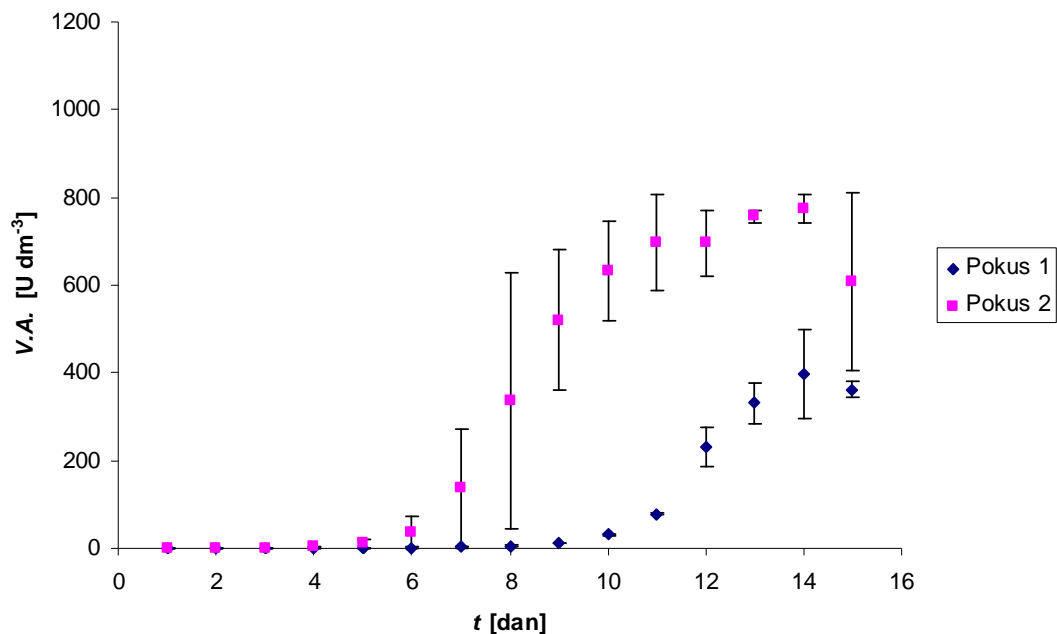
4.1. Utjecaj početne koncentracije čvrstog otpada i početne koncentracije micelijskih peleta na proizvodnju enzima lakaze

Utjecaj koncentracije čvrstog otpada na proizvodnju enzima lakaze analiziran je za dvije različite početne koncentracije industrijskog otpada ($\gamma = 20$ i 40 g dm^{-3}) i za dvije različite početne koncentracije micelijskih peleta ($\gamma = 3$ i 30 g dm^{-3}). U Tablici 4.1. prikazan je sastav podloge korištene pri ispitivanju utjecaja početne koncentracije micelijskih peleta na proizvodnju enzima lakaze uz početnu koncentraciju industrijskog otpada $\gamma = 20 \text{ g dm}^{-3}$, a u Tablici 4.2. prikazan je sastav podloge korištene pri ispitivanju utjecaja početne koncentracije micelijskih peleta na proizvodnju enzima lakaze uz početnu koncentraciju industrijskog otpada $\gamma = 40 \text{ g dm}^{-3}$. Rezultati ovih pokusa prikazani su na Slikama 4.1. i 4.2. Potrebno je

napomenuti da u ovim pokusima osim industrijskog otpada nisu dodavane nikakve komponente koje bi ubrzale produkciju enzima (induktori, Tween 80, elementi u tragovima) ili omogućile dodatan izvor ugljika za rast i održavanje staničnih funkcija korištene gljive (saharoza, pepton, kvašćev ekstrakt).

Tablica 4.1. Sastav hranjivih podloga za koncentraciju industrijskog otpada $\gamma = 20 \text{ g dm}^{-3}$

Sastav hranjive podloge,	Pokus 1	Pokus 2
γ (industrijski otpad) [g dm^{-3}]	20	20
γ (saharoza) [g dm^{-3}]	0	0
γ (dodani micelijski peleti) [g dm^{-3}]	3	30
γ (induktor) [g dm^{-3}]	0	0
dodatak induktora	0	0
w (Tween 80) [%]	0	0
γ (pepton) [g dm^{-3}]	0	0
γ (kvašćev ekstrakt) [g dm^{-3}]	0	0
dodatak soli	0	0
V (elem. u tragovima) = 10 cm^3	0	0



Slika 4.1. Promjena aktivnosti enzima lakaze za početnu koncentraciju industrijskog otpada $\gamma = 20 \text{ g dm}^{-3}$

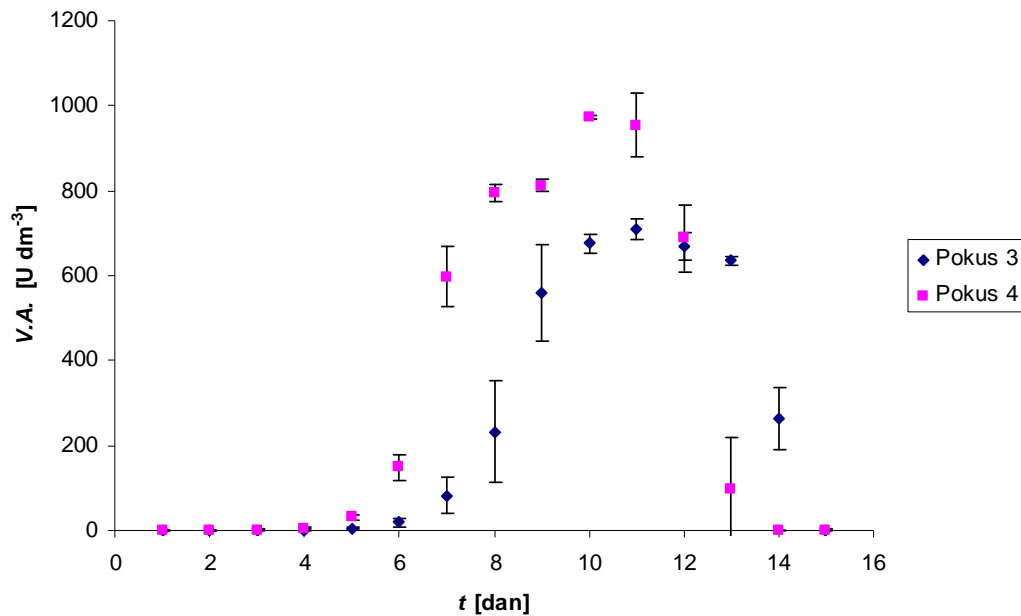
Iz rezultata pokusa provedenih za početnu koncentraciju industrijskog otpada $\gamma = 20 \text{ g dm}^{-3}$ vidljivo je da se maksimalna aktivnost enzima lakaze postiže nakon 14 dana provedbe pokusa. Iako je u 2. pokusu početna koncentracija micelijskih peleta 10 puta veća u odnosu na onu iz pokusa 1 ($30 \text{ prema } 3 \text{ g dm}^{-3}$) izmjerena maksimalna aktivnost enzima lakaze je svega 2 puta veća ($750 \text{ prema } 450 \text{ U dm}^{-3}$). Isto tako može se primijetiti da je u 2. pokusu do mjerljivog povećanja aktivnosti enzima lakaze došlo nakon 5 dana, a u 1. pokusu značajnije povećanje aktivnosti enzima je opaženo tek nakon 10 dana provedbe pokusa. Uzrok ovome prije svega treba tražiti u nedostatku uobičajenih komponenata hranjive podloge koje omogućuju normalne metaboličke funkcije gljive *Trametes versicolor*. Naime, tek nakon prilagodbe stanica gljive na nove uvjete u okolini, i prebacivanje metabolizma na raspoložive komponente u industrijskom otpadu može doći do povećane proizvodnje enzima lakaze. Za veće početne koncentracije micelijskih peleta ovo je vrijeme kraće. U oba pokusa postignuta je visoka ponovljivost rezultata eksperimenta.

Tablica 4.2. Sastav hranjivih podloga za koncentraciju industrijskog otpada $\gamma = 40 \text{ g dm}^{-3}$

Sastav hranjive podloge,	Pokus 3	Pokus 4
γ (industrijski otpad) [g dm^{-3}]	40	40
γ (saharoza) [g dm^{-3}]	0	0
γ (dodani micelijski peleti) [g dm^{-3}]	3	30
γ (induktor) [g dm^{-3}]	0	0
dodatak induktora	0	0
w (Tween 80) [%]	0	0
γ (pepton) [g dm^{-3}]	0	0
γ (kvašćev ekstrakt) [g dm^{-3}]	0	0
dodatak soli	0	0
V (elem. u tragovima) = 10 cm^3	0	0

U pokusima 3 i 4 u kojima je početna koncentracija industrijskog otpada bila 40 g dm^{-3} maksimalna aktivnost enzima lakaze od 700 i 1000 U dm^{-3} postignuta je nakon 10 odnosno 11 dana za iste početne koncentracije biomase kao i u pokusima 1 i 2. U oba pokusa mjerljivo povećanje aktivnosti enzima lakaze opaženo je u 5. danu provedbe pokusa. Ovo je prije svega uzrokovano većom raspoloživosti nutrijenata u pokusima provedenim pri većoj početnoj koncentraciji industrijskog otpada. Iako je u pokusu 4 koncentracija micelijskih peleta bila 10 puta veća od one u pokusu 3, maksimalna aktivnost enzima lakaze u pokusu 4 bila je svega 30 % veća. Treba napomenuti da je za pripravu 10 puta veće početne mase micelijskih peleta

potrebno potrošiti i 10 puta veći volumen hranjive podloge za pripremu inokuluma, pa je ovo neznatno povećanje aktivnosti enzima lakaze uz 10 puta veću početnu koncentraciju micelijskih peleta ekonomski neopravdano i može se kompenzirati kasnijom učinkovitom izolacijom i pročišćavanjem enzima lakaze.



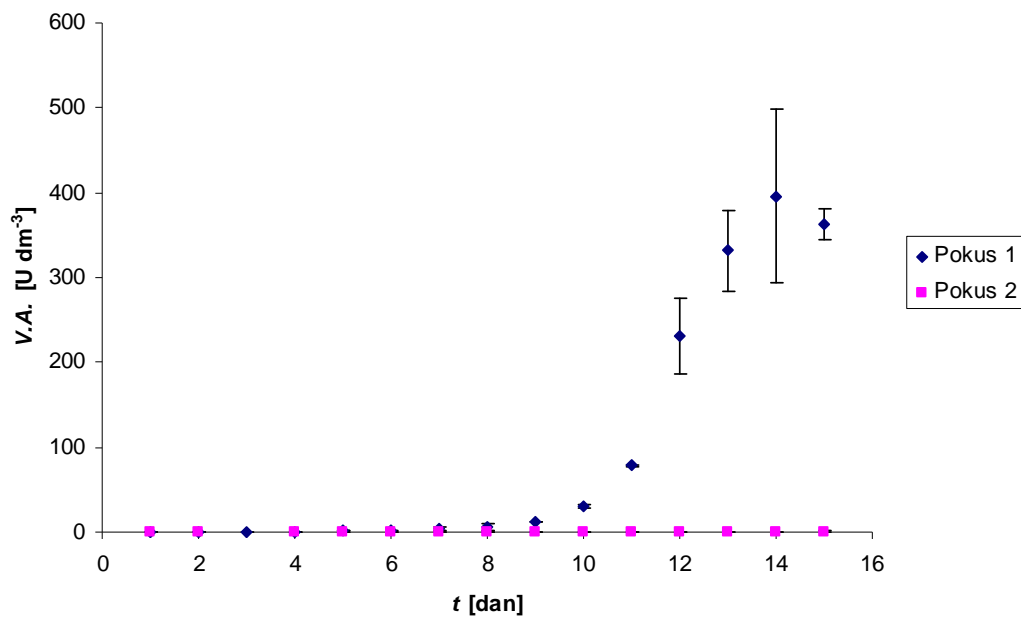
Slika 4.2. Promjena aktivnosti enzima lakaze za početnu koncentraciju industrijskog otpada $\gamma = 40 \text{ g dm}^{-3}$

4.2. Utjecaj saharoze na proizvodnju enzima lakaze

Utjecaj saharoze na proizvodnju enzima lakaze analiziran je u pokusima (Pokus 2) provedenim na hranjivoj podlozi koja je sadržavala uz industrijski otpad i saharozu koncentracije 10 g dm^{-3} . Kao referentni pokus korišten je onaj proveden samo na industrijskom otpadu ($\gamma = 20 \text{ g dm}^{-3}$) uz koncentraciju micelijskih peleta od $\gamma = 3 \text{ g dm}^{-3}$ (Pokus 1.). Rezultati ovog pokusa korišteni su kao referentna vrijednost u svim ostalim ispitivanjima utjecaja različitih analiziranih komponenata hranjive podloge. Sastav podloga u ovim pokusima dan je u Tablici 4.3. Na slici 4.3. prikazana je dinamička promjena aktivnosti enzima lakaze, a na slici 4.4. dinamička promjena koncentracije glukoze u ovim pokusima.

Tablica 4.3. Sastav hranjivih podloga u pokusima ispitivanja utjecaja saharoze na proizvodnju enzima lakaze

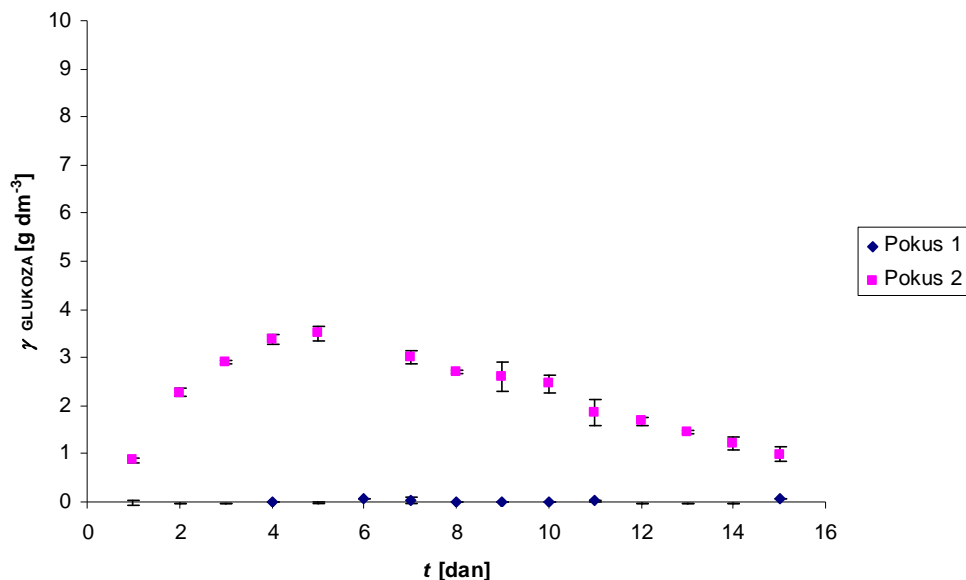
Sastav hranjive podloge,	Pokus 1	Pokus 2
γ (industrijski otpad) [g dm ⁻³]	20	20
γ (saharoza) [g dm ⁻³]	0	10
γ (dodani micelijski peleti) [g dm ⁻³]	3	3
γ (induktor) [g dm ⁻³]	0	0
dodatak induktora	0	0
w (Tween 80) [%]	0	0
γ (pepton) [g dm ⁻³]	0	0
γ (kvašćev ekstrakt) [g dm ⁻³]	0	0
dodatak soli	0	0
V (elem. u tragovima) = 10 cm ³	0	0



Slika 4.3. Promjena aktivnosti enzima lakaze u pokusima ispitivanja utjecaja saharoze na proizvodnju enzima lakaze

Saharoza je dodana u hranjivu podlogu kako bi se smanjilo vrijeme indukcije potrebno za početak proizvodnje enzima lakaze. Naime, niži šećeri kao su saharoza, fruktoza i glukoza lakše se transportiraju kroz staničnu stijenku i metaboliziraju što može imati za posljedicu

učinkovitiju i bržu produkciju izvanstaničnih enzima. Međutim, jasno je iz rezultata pokusa da su stanice *Trametes versicolor* metabolizirale saharozu i razgrađivale je do glukoze (Slika 4.4.), uz istovremenu potrošnju glukoze za rast i održavanje staničnih funkcija. Vidljivo je da pri tome nije došlo do proizvodnje enzima lakaze jer je dominantan mehanizam mikroorganizma primarni metabolizam pri čemu dolazi do rasta stanica i proizvodnje energije u obliku ATP-a, ADP-a i AMP-a [20]. Ovo je uzrokovano raspoloživošću organskog ugljika pri čemu stanica nije morala aktivirati kompleksne metaboličke puteve (sekundarni i tercijarni metabolizam) za korištenje kompleksne podloge kao što je industrijski otpad, pri čemu dolazi i do proizvodnje izvanstaničnih enzima kao što je lakaza. Stoga je aktivnost lakaze uz prisutnost saharoze u hranjivoj podlozi izrazito mala, s maksimalnom vrijednosti $V.A. = 1 \text{ U dm}^{-3}$ (Slika 4.3.).



Slika 4.4. Promjena koncentracije glukoze u ovisnosti o vremenu u pokusima ispitivanja utjecaja saharoze na proizvodnju enzima lakaze

Koncentracija glukoze u hranjivoj podlozi sa saharozom u početku raste razgradnjom saharoze na glukozu i fruktozu. U trenutku kad je sva saharoza razgrađena, glukozu mikroorganizam počinje koristiti kao osnovni metabolit stoga je logičan postepen pad koncentracije glukoze prema 15 danu provedbe procesa.

Koncentracija glukoze se u hranjivoj podlozi bez saharoze, dakle samo s industrijskim otpadom, gotovo uopće ne mijenja. Razlog tome je što je lignin previše složen spoj da bi ga

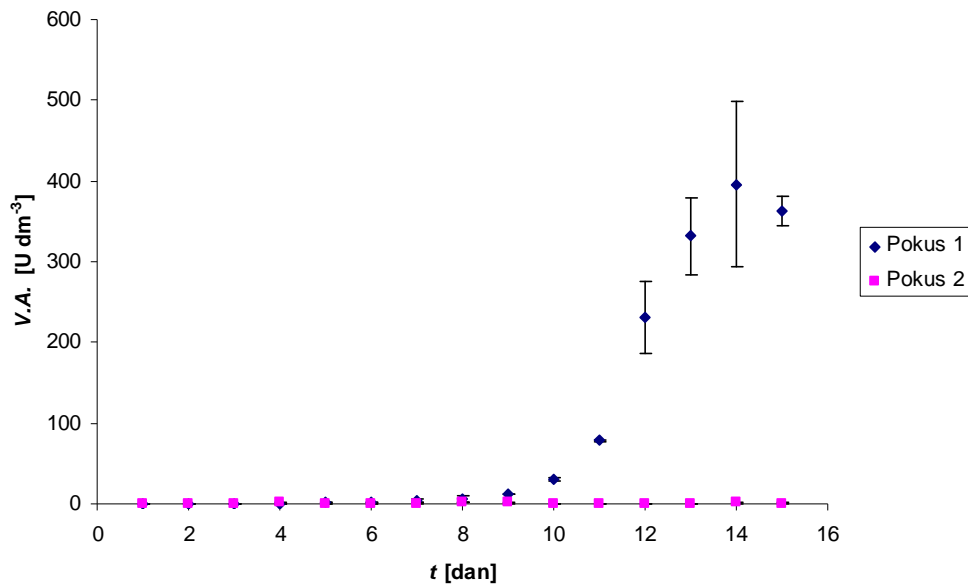
Trametes versicolor uspio razgraditi do glukoze u uvjetima u kojima je uzgajan. Za učinkovitu razgradnju lignina do glukoze potreban je cijeli niz enzima koje *Trametes versicolor* ne proizvodi.

4.3. Utjecaj induktora na proizvodnju enzima lakaze

Utjecaj induktora 2-metoksifenola na proizvodnju enzima lakaze analiziran je u pokusima (Pokus 2) provedenim na hranjivoj podlozi koja je sadržavala uz industrijski otpad i induktor 2-metoksifenol koncentracije $\gamma = 0,4 \text{ g dm}^{-3}$. Kao referentni pokus korišten je onaj proveden samo na industrijskom otpadu ($\gamma = 20 \text{ g dm}^{-3}$) uz koncentraciju micelijskih peleta od $\gamma = 3 \text{ g dm}^{-3}$ (Pokus 1.). Sastav podloga u ovim pokusima dan je u Tablici 4.4. Na slici 4.5. prikazana je dinamička promjena aktivnosti enzima lakaze u ovim pokusima. Induktor 2-metoksifenol je dodan kako bi se smanjilo vrijeme potrebno za induciranje proizvodnje enzima lakaze u *Trametes versicolor*. Prema literaturnim podacima, induktor 2-metoksifenol koncentracije $\gamma = 0,4 \text{ g dm}^{-3}$ inducira stvaranje lakaze u stanicama *Trametes versicolor* [21].

Tablica 4.4. Sastav hranjivih podloga u pokusima ispitivanja utjecaja induktora na proizvodnju enzima lakaze

Sastav hranjive podloge,	Pokus 1	Pokus 2
γ (industrijski otpad) [g dm^{-3}]	20	20
γ (saharoza) [g dm^{-3}]	0	0
γ (dodani micelijski peleti) [g dm^{-3}]	3	3
γ (induktor) [g dm^{-3}]	0	0,4
dodatak induktora	0	1.dan
w (Tween 80) [%]	0	0
γ (pepton) [g dm^{-3}]	0	0
γ (kvašćev ekstrakt) [g dm^{-3}]	0	0
dodatak soli	0	0
V (elem. u tragovima) = 10 cm^3	0	0



Slika 4.5. Promjena aktivnosti enzima lakaze u pokusima ispitivanja utjecaja induktora na proizvodnju enzima lakaze

U pokusu s induktorom (Pokus 2) ne dolazi do značajnih promjena aktivnosti lakaze, a postignute su vrijednosti aktivnosti vrlo male. Vidljivo je da dodatkom induktora nakon 1. dana provedbe pokusa nije postignuto očekivano inducirajuće djelovanje, već je došlo do potpune inhibicije proizvodnje enzima lakaze. Koncentracija i tip induktora uobičajeni su za indukciju proizvodnje enzima lakaze u *Trametes versicolor* te su provedena daljnja istraživanja kako bi se ispitaio utjecaj vremena dodatka induktora na produkciju. Ovo nije posljedica koncentracije induktora, stoga je potrebno daljnje istraživanje utjecaja primijenjenog induktora na korištenoj hranjivoj podlozi.

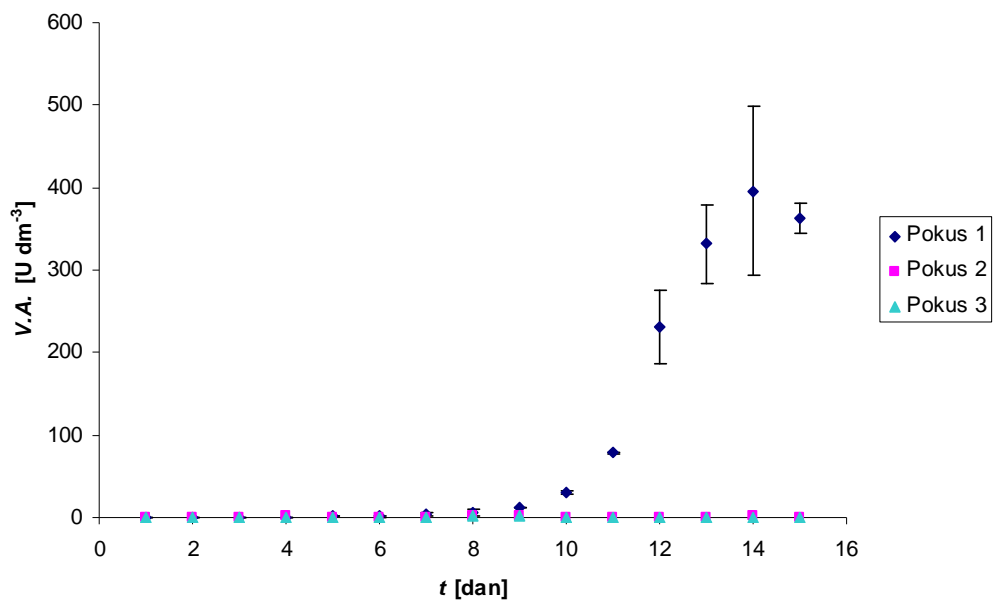
4.4. Utjecaj vremena dodavanja induktora na proizvodnju enzima lakaze

Utjecaj vremena dodavanja induktora 2-metoksifenola na proizvodnju enzima lakaze analiziran je u pokusima (Pokusi 2 i 3) provedenim na hranjivoj podlozi koja je sadržavala uz industrijski otpad i induktor 2-metoksifenol koncentracije $\gamma = 0,4 \text{ g dm}^{-3}$. Kao referentni pokus korišten je onaj proveden samo na industrijskom otpadu ($\gamma = 20 \text{ g dm}^{-3}$) uz koncentraciju micelijskih peleta od $\gamma = 3 \text{ g dm}^{-3}$ (Pokus 1.). U pokusu 2 induktor je dodan prvog dana, a u pokusu 3 drugog dana po početku procesa proizvodnje lakaze. Sastav podloga

u ovim pokusima dan je u Tablici 4.5. Na slici 4.6. prikazana je dinamička promjena aktivnosti enzima lakaze u ovim pokusima.

Tablica 4.5. Sastav hranjivih podloga u pokusima ispitivanja vremena dodavanja induktora na proizvodnju enzima lakaze

Sastav hranjive podloge,	Pokus 1	Pokus 2	Pokus 3
γ (industrijski otpad) [g dm ⁻³]	20	20	20
γ (saharoza) [g dm ⁻³]	0	0	0
γ (dodani micelijski peleti) [g dm ⁻³]	3	3	3
γ (induktor) [g dm ⁻³]	0	0,4	0,4
dodatak induktora	0	1.dan	2.dan
w (Tween 80) [%]	0	0	0
γ (pepton) [g dm ⁻³]	0	0	0
γ (kvašičev ekstrakt) [g dm ⁻³]	0	0	0
dodatak soli	0	0	0
V (elem. u tragovima) = 10 cm ³	0	0	0



Slika 4.6. Promjena aktivnosti enzima lakaze u pokusima ispitivanja vremena dodavanja induktora na proizvodnju enzima lakaze

Kao i u prethodnom pokusu u kojemu je ispitivan utjecaj dodavanja induktora nije opažena značajnija aktivnost enzima lakaze promjenom trenutka dodavanja induktora. Naime,

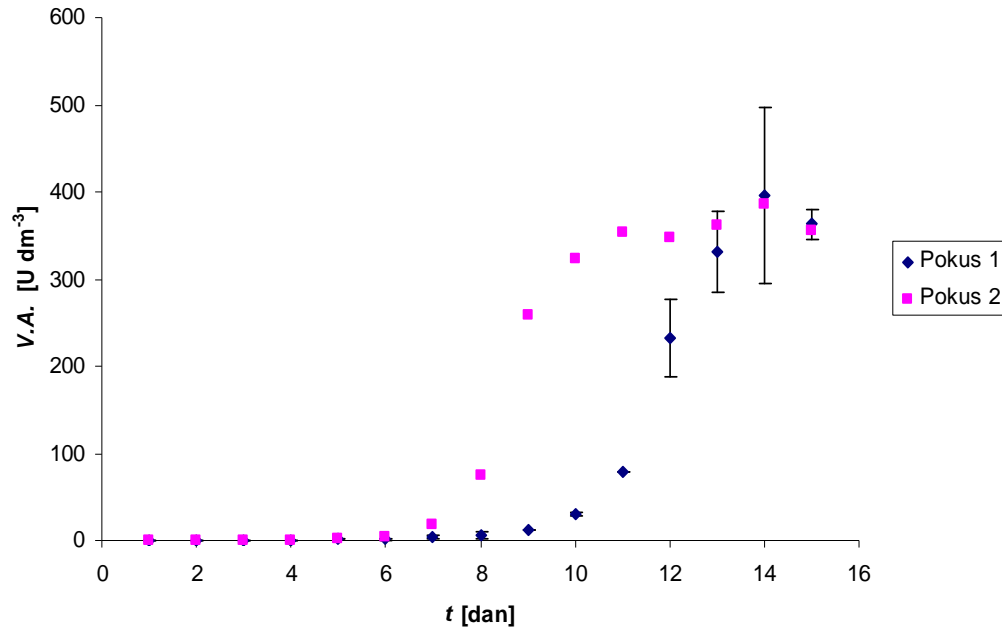
inducirajuće djelovanje nije postignuto niti nakon što je induktor dodan drugog dana procesa proizvodnje lakaze. Ovo je u suprotnosti sa literaturnim podacima prema kojima dolazi do značajnog povećanja aktivnosti i skraćanja vremena potrebnog za induciranje proizvodnje enzima lakaze dodatkom 2-metoksifenola kao induktora [21].

4.5. Utjecaj Tweena 80 na proizvodnju enzima lakaze

Utjecaj dodatka Tweena 80 na proizvodnju enzima lakaze analiziran je u pokusima (Pokus 2) provedenim na hranjivoj podlozi koja je sadržavala uz industrijski otpad i 0,2 % Tweena 80. Tween 80 je neionski, površinski aktivan spoj čija je namjena perforiranje stanične stijenke i smanjenje otpora prijenosu tvari. Takvo djelovanje rezultira većom izvanstaničnom enzimskom aktivnošću [9, 22, 23] i lakšim otpuštanjem enzima lakaze s površine periplazmatske membrane u reakcijsku smjesu. Kao referentni pokus korišten je onaj proveden samo na industrijskom otpadu ($\gamma = 20 \text{ g dm}^{-3}$) uz koncentraciju micelijskih peleta od $\gamma = 3 \text{ g dm}^{-3}$ (Pokus 1.). Sastav podloga u ovim pokusima dan je u Tablici 4.6. Na slici 4.7. prikazana je dinamička promjena aktivnosti enzima lakaze u ovim pokusima.

Tablica 4.6. Sastav hranjivih podloga u pokusima ispitivanja utjecaja Tweena 80 na proizvodnju enzima lakaze

Sastav hranjive podloge,	Pokus 1	Pokus 2
γ (industrijski otpad) [g dm^{-3}]	20	20
γ (saharoza) [g dm^{-3}]	0	0
γ (dodani micelijski peleti) [g dm^{-3}]	3	3
γ (induktor) [g dm^{-3}]	0	0
dodatak induktora	0	0
w (Tween 80) [%]	0	0,2
γ (pepton) [g dm^{-3}]	0	0
γ (kvašćev ekstrakt) [g dm^{-3}]	0	0
dodatak soli	0	0
V (elem. u tragovima) = 10 cm^3	0	0



Slika 4.7. Promjena aktivnosti enzima lakaze u pokusima ispitivanja utjecaja Tweena 80 na proizvodnju enzima lakaze

Aktivnost lakaze dobivena u pokusu s Tweenom 80 nije prikazana kao srednja vrijednost aktivnosti u tikvicama zbog velikog odstupanja u vrijednostima. Aktivnosti u jednoj od tikvica uopće nije bilo, kao posljedica različitih uvjeta pripreme micelijskih peleta.

Dodatak Tweena 80 nije utjecao na vrijeme indukcije proizvodnje enzima lakaze niti na njegovu maksimalnu aktivnost, ali je brzina proizvodnje bila znatno veća u odnosu na pokus proveden samo sa industrijskim otpadom. Ovo je upravo posljedica svojstava Tweena 80, odnosno njegove sposobnosti da perforira staničnu stjenku. Na ovaj način smanjuje se otpor prijenosu tvari i povećava brzina otpuštanja enzima lakaze sa površine periplazmatske membrane.

Dodatno, dodatak Tweena 80 imao je za posljedicu nepromijenjenu visoku aktivnost enzima lakaze u izvanstaničnom ekstraktu od oko 400 U dm⁻³ kroz pet dana. U ranijim pokusima je opaženo da po postizanju maksimalne aktivnosti enzima lakaze u vrlo kratkom vremenu dolazi do potpunog gubitka njegove aktivnosti (Slika 4.2.)

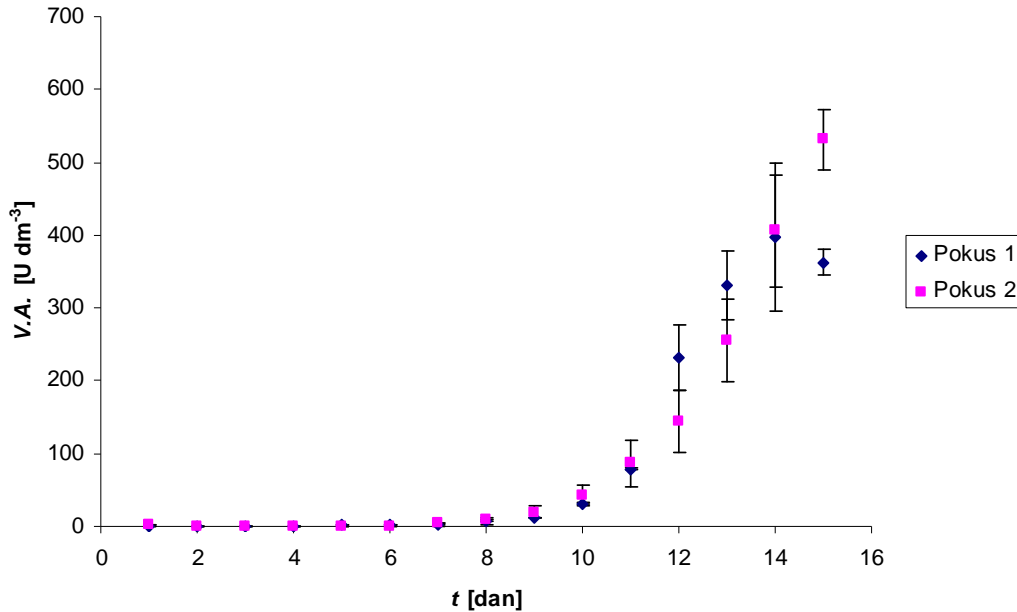
4.6. Utjecaj peptona, kvašćevog ekstrakta i soli na proizvodnju enzima lakaze

Utjecaj peptona, kvašćevog ekstrakta i soli na proizvodnju enzima lakaze analiziran je u pokusima (Pokus 2) provedenim na hranjivoj podlozi koja je sadržavala uz industrijski otpad i ove komponente u koncentracijama prikazanim u Tablici 4.7. Pod solima se podrazumijevaju KH_2PO_4 ($\gamma = 0,8 \text{ g dm}^{-3}$), Na_2HPO_4 ($\gamma = 0,2 \text{ g dm}^{-3}$), $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ ($\gamma = 0,5 \text{ g dm}^{-3}$), i $\text{CaCl}_2 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ ($\gamma = 0,05 \text{ g dm}^{-3}$). Pepton, kvašćev ekstrakt i gore navedene soli predstavljaju osnovni izvor dušika potrebnog za rast, razvoj i održavanje staničnih funkcija gljive *Trametes versicolor* [24]. Kao referentni pokus korišten je onaj proveden samo na industrijskom otpadu ($\gamma = 20 \text{ g dm}^{-3}$) uz koncentraciju micelijskih peleta od $\gamma = 3 \text{ g dm}^{-3}$ (Pokus 1.). Na slici 4.8. prikazana je dinamička promjena aktivnosti enzima lakaze u ovim pokusima.

Tablica 4.7. Sastav hranjivih podloga u pokusima ispitivanja utjecaja peptona, kvašćevog ekstrakta i soli na proizvodnju enzima lakaze

Sastav hranjive podloge,	Pokus 1	Pokus 2
γ (industrijski otpad) [g dm^{-3}]	20	20
γ (saharozu) [g dm^{-3}]	0	0
γ (dodani micelijski peleti) [g dm^{-3}]	3	3
γ (induktor) [g dm^{-3}]	0	0
dodatak induktora	0	0
w (Tween 80) [%]	0	0,2
γ (pepton) [g dm^{-3}]	0	0,3
γ (kvašćev ekstrakt) [g dm^{-3}]	0	0,5
dodatak soli	0	da
V (elem. u tragovima) = 10 cm^3	0	ne

U prisutnosti peptona, kvašćevog ekstrakta i soli, aktivnost lakaze mijenja se vrlo slično kao u podlozi koja ne sadrži ove elemente (Slika 4.8.). Ipak, zabilježen je kontinuiran porast aktivnosti enzima lakaze tijekom cijelog procesa, koja nastavlja rasti čak i u zadnjem danu pokusa. Na temelju ovoga pokazano je da dodatak izvora dušika i soli pozitivno utječe na proizvodnju enzima lakaze i produžuje vrijeme u kojemu ne dolazi do pada aktivnosti tijekom dugotrajnog uzgoja i proizvodnje.



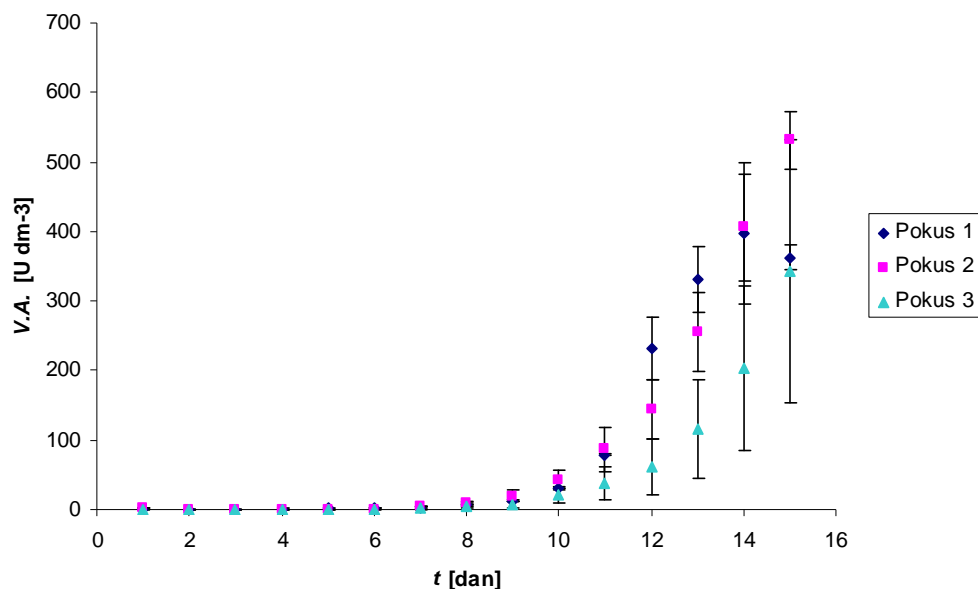
Slika 4.8. Promjena aktivnosti enzima lakaze u pokusima ispitivanja utjecaja peptona, kvašćevog ekstrakta i soli na proizvodnju enzima lakaze

4.7. Utjecaj elemenata u tragovima na proizvodnju enzima lakaze

Utjecaj elemenata u tragovima na proizvodnju enzima lakaze analiziran je u pokusima (Pokus 3) provedenim na hranjivoj podlozi koja je sadržavala uz industrijski otpad i elemente u tragovima. Kao elementi u tragovima su korišteni $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ($\gamma = 0,035 \text{ g dm}^{-3}$), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($\gamma = 0,010 \text{ g dm}^{-3}$), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ($\gamma = 0,011 \text{ g dm}^{-3}$), $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ($\gamma = 0,010 \text{ g dm}^{-3}$) i KI ($\gamma = 0,001 \text{ g dm}^{-3}$). Elementi u tragovima se koriste kao izvor minerala potrebnih za odvijanje ključnih unutarstaničnih reakcija u mikroorganizmu. Kao referentni pokusi korišteni su oni provedeni samo na industrijskom otpadu ($\gamma = 20 \text{ g dm}^{-3}$) uz koncentraciju micelijskih peleta od $\gamma = 3 \text{ g dm}^{-3}$ (Pokus 1) i pokus u kojemu su dodani pepton, kvašćev ekstrakt i soli (Pokus 2). Sastav podloga u ovim pokusima prikazan je u Tablici 4.8. Na slici 4.9. prikazana je dinamička promjena aktivnosti enzima lakaze u ovim pokusima.

Tablica 4.8. Sastav hranjivih podloga u pokusima ispitivanja utjecaja elemenata u tragovima na proizvodnju enzima lakaze

Sastav hranjive podloge,	Pokus 1	Pokus 2	Pokus 3
γ (industrijski otpad) [g dm ⁻³]	20	20	20
γ (saharoza) [g dm ⁻³]	0	0	0
γ (dodani micelijski peleti) [g dm ⁻³]	3	3	3
γ (induktor) [g dm ⁻³]	0	0	0
dodatak induktora	0	0	0
w (Tween 80) [%]	0	0,2	0,2
γ (pepton) [g dm ⁻³]	0	0,3	0,3
γ (kvašičev ekstrakt) [g dm ⁻³]	0	0,5	0,5
dodatak soli	0	da	da
V (elem. u tragovima) = 10 cm ³	0	ne	da



Slika 4.9. Promjena aktivnosti enzima lakaze u pokusima ispitivanja utjecaja elemenata u tragovima na proizvodnju enzima lakaze

U promatranom vremenu provedbe pokusa od 15 dana maksimalna aktivnost enzima lakaze u pokusu u kojemu su dodani elementi u tragovima bila je neznatno niža od one ostvarene u referentnom pokusu provedenom samo na industrijskom otpadu. S druge strane u 15-dnevnom razdoblju nije došlo do smanjenja aktivnosti enzima lakaze opažene u referentnom pokusu. Stoga bi ovaj pokus trebalo provesti kroz duže vremensko razdoblje

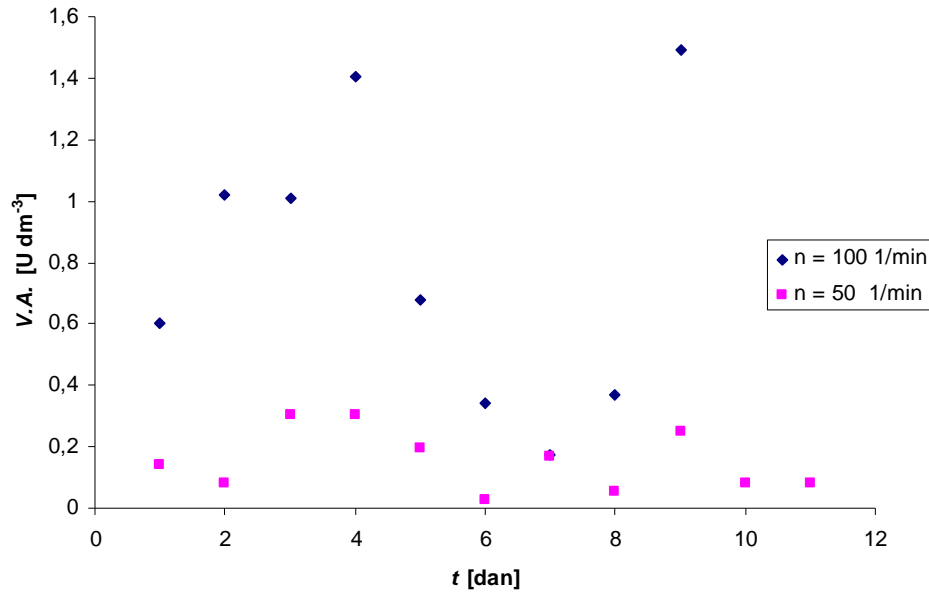
kako bi se mogao utvrditi mogući pozitivan utjecaj elemenata u tragovima na aktivnost enzima lakaze.

4.8. Proizvodnja enzima lakaze u bioreaktoru

Proces proizvodnje lakaze proveden je i u bioreaktoru. Cilj ovog pokusa bio je utvrditi utjecaj broja okretaja miješala na aktivnost lakaze. Provedena su dva pokusa s različitim brojem okretaja miješala. Pokusi su provedeni samo na industrijskom otpadu ($\gamma = 20 \text{ g dm}^{-3}$) uz koncentraciju micelijskih peleta od $\gamma = 30 \text{ g dm}^{-3}$ pri temperaturi $t = 27 \text{ }^\circ\text{C}$. Dodatno su praćene vrijednosti pH hranjive podloge i koncentracije kisika u bioreaktoru. Na početku pokusa bioreaktor je zasićen kisikom nakon čega je njegov dovod prekinut kako bi se simulirali uvjeti jednaki onima u tikvicama. Sastav podloga u ovim pokusima prikazan je u Tablici 4.9. Na slici 4.10. prikazana je dinamička promjena aktivnosti enzima lakaze u ovim pokusima.

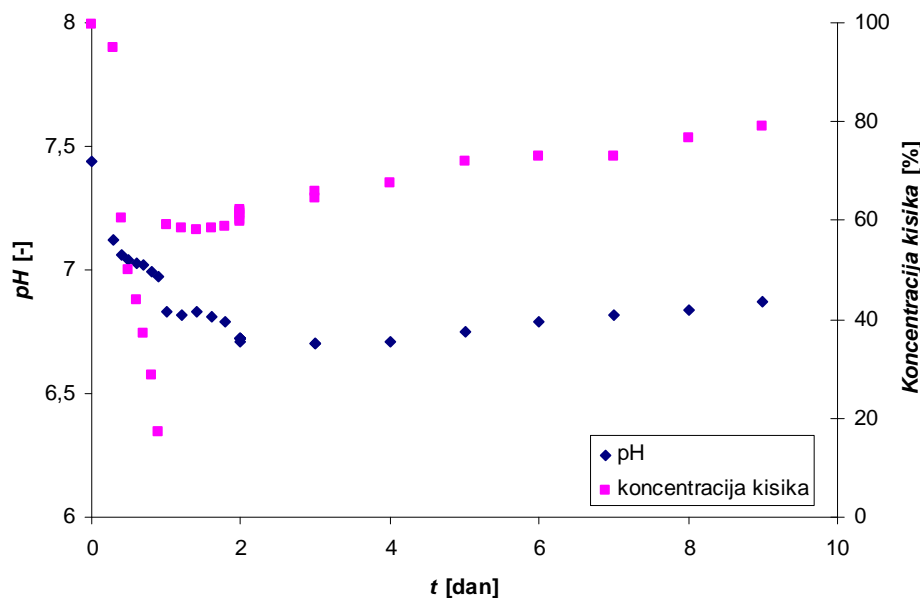
Tablica 4.9. Sastav hranjive podloge u bioreaktoru

Sastav hranjive podloge,	Bioreaktor 1	Bioreaktor 2
γ (industrijski otpad) [g dm^{-3}]	20	20
γ (dodani micelijski peleti) [g dm^{-3}]	30	30
n [min^{-1}]	100	50
t (trajanja pokusa) [dan]	9	11

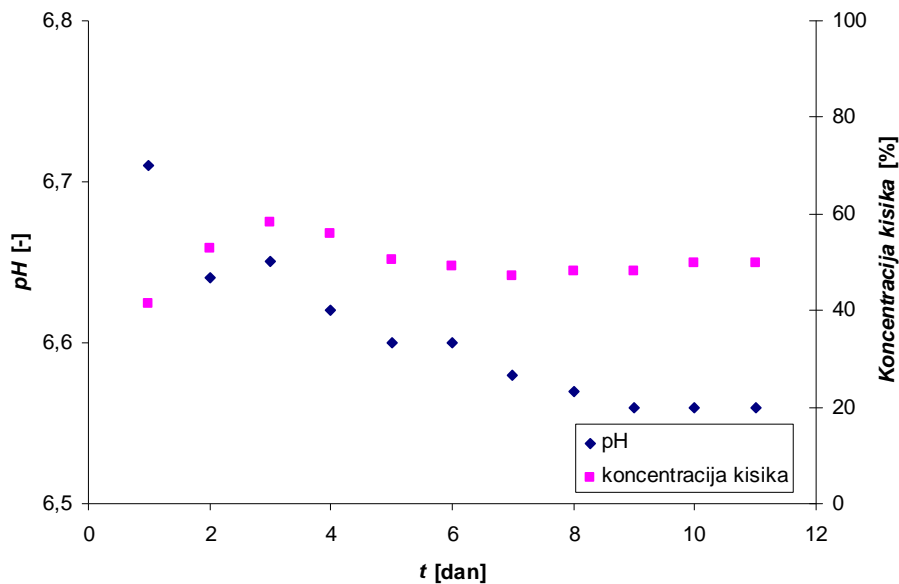


Slika 4.10. Promjena aktivnosti enzima lakaze u pokusima u bioreaktoru

Tijekom oba pokusa došlo je neznatne promjene aktivnosti enzima lakaze u bioreaktoru, a postignute maksimalne vrijednosti približno 300 puta manje od one u referentnom pokusu (poglavlje 4.1.). Suprotno očekivanjima pri većem broju okretaja miješala postignuta je veća aktivnost. Naime, kako je bioreaktor opremljen s miješalom koje čine tri Rushtonove turbine, manji broj okretaja miješala trebao bi rezultirati manjim smičnim stresom na micelijske pelete, što bi za posljedicu trebalo imati veću aktivnost enzima lakaze.

Slika 4.11. Promjena pH i koncentracije otopljenog kisika u bioreaktoru pri $n = 100 \text{ min}^{-1}$

S druge strane, ostvarene vrijednosti aktivnosti enzima lakaze su zanemarive i na granici mjernog područja, te se može zaključiti da promjena broja okretaja miješala u promatranom području ne utječe značajno na promjenu aktivnosti enzima lakaze. Korišteni tip miješala i geometrija bioreaktora, osnovni su razlozi minimlane produkcije enzima lakaze u ovim pokusima. Naime, sastav podloge bio je identičan onoj u referentnom pokusu provedenom u tikvici, a u oba pokusa nije došlo niti do značajnije promjene pH vrijednosti (pH optimum za produkciju enzima lakaze pomoću *Trametes versicolor* od 4-9) niti je uzgoj proveden u anaerobnim uvjetima (po2 veći od 20 % u oba pokusa) (Slike 4.11. i 4.12).



Slika 4.12. Promjena pH i koncentracije otopljenog kisika u bioreaktoru pri $n = 50 \text{ min}^{-1}$

5. ZAKLJUČAK

Proveden je proces proizvodnje lakaze uzgojem gljive *Trametes versicolor* na otpadu industrije pulpe i papira. Cilj pokusa bio je utvrditi utjecaj različitih komponenata hranjive podloge na proizvodnju enzima lakaze.

Povećanje početne koncentracije industrijskog otpada i početne koncentracije micelijskih peleta pozitivno utječu na proizvodnju enzima lakaze. Najveća aktivnost postignuta je u hranjivoj podlozi s najvećom promatranom koncentracijom micelijskih peleta od 30 g dm^{-3} i industrijskog otpada od 40 g dm^{-3} i iznosila je $973,34 \text{ U dm}^{-3}$.

Dodatak saharoze negativno utječe na proizvodnju enzima lakaze jer zbog njenog prisustva dolazi do aktiviranja primarnog metabolizma pri čemu dolazi do rasta stanica i proizvodnje energije u obliku ATP-a, ADP-a i AMP-a [20], a složeni metabolički putevi odgovorni za proizvodnju izvanstaničnih enzima su potisnuti. Prema tome, najveća aktivnost enzima lakaze dosegla je samo $0,93 \text{ U dm}^{-3}$.

Dodatak induktora 2-metoksifenola, kao i različita vremena dodatka induktora nisu pozitivno utjecala niti na maksimalnu aktivnost lakaze niti na vrijeme indukcije jer je maksimalna aktivnost enzima lakaze iznosila $1,29 \text{ U dm}^{-3}$.

Dodatak Tweena 80 nije utjecao na aktivnost enzima lakaze, ali je opažen pozitivan utjecaj na stabilnost enzima lakaze jer nakon postizanja maksimalne aktivnosti od $193,39 \text{ U dm}^{-3}$ ista ostaje nepromijenjena kroz nekoliko dana što nije bio slučaj u referentnom pokusu.

U prisutnosti peptona, kvašćevog ekstrakta i soli zabilježen je kontinuiran porast aktivnosti tijekom procesa proizvodnje lakaze. Na temelju tih opažanja, zaključuje se da dodatak peptona, kvašćevog ekstrakta i soli utječe na porast aktivnosti enzima lakaze čija maksimalna vrijednost iznosi $531,46 \text{ U dm}^{-3}$.

U hranjivoj podlozi s elementima u tragovima također je uočen kontinuiran rast aktivnosti, a najveća aktivnost enzima lakaze iznosila je $342,08 \text{ U dm}^{-3}$. Bez obzira što su vrijednosti aktivnosti enzima lakaze nešto niže nego bez prisutnosti elemenata u tragovima, vidljivo je da elementi u tragovima imaju pozitivan utjecaj na porast aktivnosti enzima lakaze.

Pri provedbi procesa proizvodnje enzima lakaze u bioreaktor u postignuta maksimalna aktivnost enzima lakaze 300 puta je manja od one u referentnom pokusu i iznosi $1,49 \text{ U dm}^{-3}$, što je prvenstveno uzrokovano nepovoljnom geometrijom bioreaktora i korištenjem Rushtonovih turbina kao miješala.

6. LITERATURA

1. **Vasić–Rački Đ.:** History of Industrial Biotransformation – Dreams and Realities; Liese A., Seelbach K., Wandrey C., Industrial Biotransformation, Wiley - VCH, Weinheim (2006) 1 - 36
2. **Petersen S.B.:** Protein engineering: design and engineering on the nano scale; Straathof A.J.J., Patrick A., Applied Biocatalysts, Harwood Academic Publishers (1994) 229 – 267
3. **Aktaş N, Tanyolaç A.:** Kinetics of laccase – catalyzed oxidative polymerization of catechol, *J Mol Catal B – Enzym*, **22** (2003) 61 - 69
4. **Burton S.G.:** Laccases and Phenol Oxidases in Organic Syntheses – A review, *Curr Org Chem*, **7** (2003) 1317 - 1331
5. **Rodriguez Couto S., Herrera Toca J.L.:** Industrial and biotechnological applications of laccases : A review, *Biotechnol Adv*, **24** (2006) 500 - 513
6. **Minussi R.C., Rossi M., Bologna L., Rotilio D., Pastore G.M., Durán N.:** Phenols removal in must: Strategy for wine stabilization by laccase, *J Mol Catal B – Enzym* **45** (2007) 102-107
7. **Mayer A.M., Staples R.C.:** Laccase: new function for an old enzyme, *Phytochemistry*, **60** (2002) 551 – 565
8. **Merwe van der J.J.:** Production of laccase by the white – rott fungus *Pycnoporus sanguineus*, MSc thesis, Faculty of Natural and Agricultural Sciences, Bloemfontein (South Africa), 2002
9. **Xavier Barreto Rebelo A.M., Tavares Mora A.P., Ferreira R., Amando F.:** *Trametes versicolor* growth and laccase induction with by-products of pulp and paper industry, *Electron J Biotechnol*, **10** (2007) 444 - 451
10. **Nester E.W., Anderson D.G., Roberts Evans Jr. C., Pearsall N.N., Nester M.T.:** Microbiology – A Human Perspective, McGraw-Hill, 2004
11. **Duraković S.:** Opća mikrobiologija, Prehrambeno tehnološki inženjering, Zagreb, 1996
12. **Duraković S., Duraković L.:** Mikologija u biotehnologiji, Kugler, Zagreb (2003) 5-41

13. **Lankinen P.:** Ligninolytic enzymes of the basidiomycetous fungi *Agaricus bisporus* and *Phlebia radiata* on lignocellulose containing media, Academic Dissertation in Microbiology, Helsinki, 2004
14. **Dumić J.:** Biološka kemija – enzimi, www.pharma.hr
15. **Pušelja D.:** www.puseljadejan.com/lignin
16. **Tišma M.:** Oksidacija fenolnih spojeva lakazom iz *Trametes versicolor* u različitim tipovima reaktora, magistarski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2008
17. **Rauscher K., Voigt J., Wilke I., Wilke K.T.:** Chemische Tabellen und Rechentafeln für die Analytische Praxis, VEP, Leipzig (1972) 143-145
18. **Henriquez C., Lissi E.:** Evaluation of the extinction coefficient of the ABTS derived radical cation, *Bol Soc Chi. Quím*, **47** (2002)
19. **Richter M., Tietz U.J.:** Automated enzymatic determination of glucose, maltose and starch on microtitier plates, *Starch-Starke*, **46** (1994) 81-85
20. **Demain A.D.:** Regulation of secondary metabolism in fungi, *Pure Appl Chem*, **58** (1986) 219-226
21. **Malarczyk E., Jarosz-Wilkolazka A., Kochmanska-Rdest J.:** Effect of low doses of guaiacol and ethanol on Enzymatic activity of fungal cultures, *Dose – Response: Internat J*, **1** (2007)
22. **Benett R.W., Weaver R.E.:** Bacteriological Analytical Manual, 8th ed., AOAC International, Gaithersburg (1995)
23. **Kamande G.M., Baah J., Cheng K.J., McAllister T.A., Shelford J.A.:** Effects of Tween 60 and Tween 80 on Protease Activity, Thiol Group, Protein Adsorption, and Cellulose Degradation by Rumen Microbial Enzymes, *J Dairy Sci*, **83** (2000) 536-542
24. **Dong J.L., Zhang Y.W., Zhang R.H., Huang W.Z., Zhang Y.Z.:** Influence of culture conditions on laccase production and isozyme patterns in the white-rott fungus *Trametes gallica*, *J Basic Microb*, **45** (2005) 190-198

7. POPIS SIMBOLA I SKRAĆENICA

7.1. Simboli

A	apsorbancija, -
A_0	apsorbancija slijepe probe, -
A_S	apsorbancija nepoznatog uzorka, -
c	množinska koncentracija, mmol dm^{-3}
d	širina kivete spektrofotometra, cm
m	masa, g
n	broj okretaja miješala, min^{-1}
p	tlak, bar
t	temperatura, $^{\circ}\text{C}$
t	vrijeme, dan
V	volumen, cm^3
$V.A.$	volumna aktivnost, U dm^{-3}
V_E	volumen uzorka koji sadrži enzim, cm^3
V_r	ukupni volumen uzorka, cm^3
w	maseni udio, -
\emptyset	promjer, mm

7.1.1. Grčki simboli

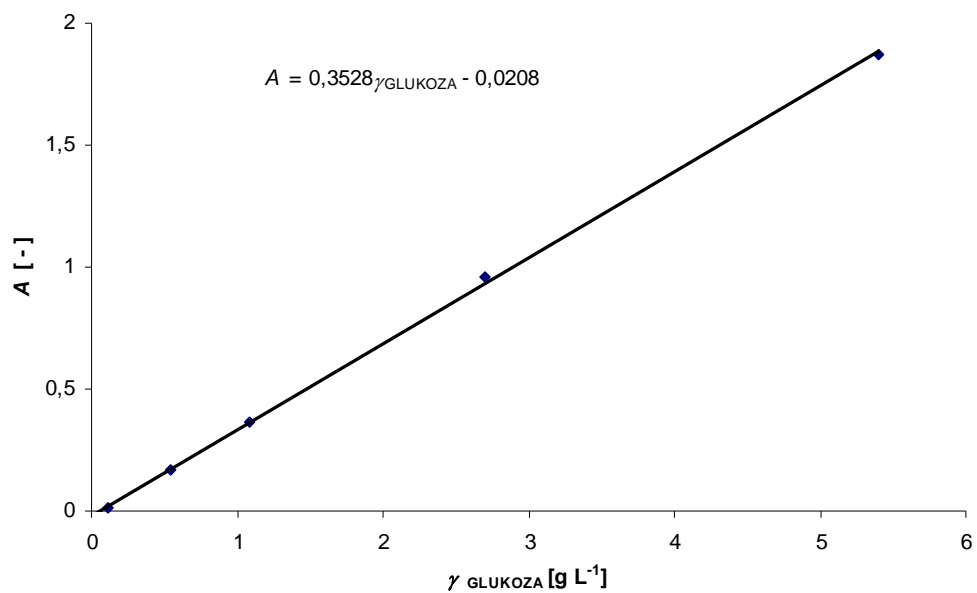
α	nagib pravca, $^{\circ}$
γ	masena koncentracija, g dm^{-3}
ϵ_{420}	apsorpcijski koeficijent, $\text{dm}^3 \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$
λ	valna duljina, nm

7.2. Skraćenice

ABTS	2,2'-azinodi-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)
ABTS ⁺	2,2'-azinodi-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) radikal
ADP	adenozin – difosfat
AMP	adenozin – monofosfat
ATP	adenozin – trifosfat
GOD	glukoza oksidaza
HAA	3-hidroksiantranilat
HBT	1-hidroksibenzotriazol
LiP	lignin peroksidaza
MnP	mangan peroksidaza
PAP	peroksidaza antiperoksidaza
POD	peroksidaza
U	internacionalna jedinica katalitičke aktivnosti enzimski, $1 \text{ U} = 1 \mu\text{mol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$
kat	SI jedinica katalitičke aktivnosti enzima, $1 \text{ kat} = 1 \text{ mol s}^{-1}$

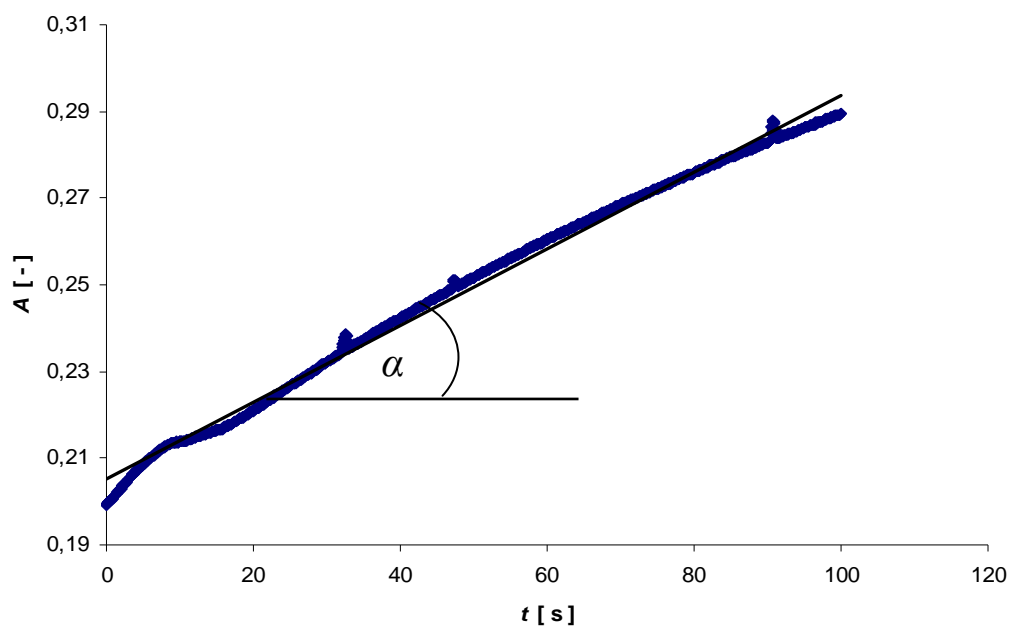
8. PRILOZI

PRILOG 1.: Baždarni pravac za određivanje koncentracije glukoze (Slika 8.1.).



Slika 8. 1. Baždarni pravac za određivanje koncentracije glukoze

PRILOG 2.: Dinamička promjena apsorbancije u mjerenju aktivnosti enzima lakaze pomoću ABTS testa (Slika 8.2.).



Slika 8.2. Dinamička promjena apsorbancije tijekom mjerenja aktivnosti enzima lakaze na spektrofotometru. Kut α jednak je promjeni apsorbancije s vremenom $\frac{\Delta A}{\Delta t}$ koja se koristi pri računanju volumne aktivnosti enzima (jednadžba 3.1.).

ŽIVOTOPIS

Jelena Pilaš rođena je 11. lipnja 1984. godine. U Zagrebu je završila opću gimnaziju Tituša Brezovačkog s odličnim uspjehom. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije upisuje 2002. godine. Tijekom studija bila je demonstrator na Zavodu za opću i anorgansku kemiju te na Zavodu za reakcijsko inženjerstvo i katalizu. Aktivno je sudjelovala u djelatnostima Studentskog zbora i organizaciji projekata Zbora, a bila je i predstavnik studenata u Fakultetskom Vijeću. Sudjelovala je na Tehnologijadi (tradicionalno znanstveno - sportsko natjecanje studenata tehnoloških fakulteta Republike Hrvatske) u sportskom i znanstvenom dijelu natjecanja kao i u organizaciji samog natjecanja.

Sudjelovala je na projektu "Optimiranje sastava medija za proizvodnju bioetanolu upotrebom genetskog algoritma". S ovim projektom je sudjelovala na Trećem susretu studenata i profesora na temu: "Primijenjena biokataliza" na Sveučilištu u Mariboru kao i na 11. Tehnologijadi u Rovinju. Na ovu temu održala je i predavanje u Zagrebu na poziv Društva diplomiranih inženjera i prijatelja kemijsko tehnološkog studija (AMACIZ) i Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije. Kao područja od posebnog interesa izdvaja biokemijsko inženjerstvo, naftna i biogoriva te projektiranje, a osim toga služi se slijedećim stranim jezicima: engleski, njemački, talijanski, švedski i slovenski. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije završava 2009. godine.