

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

Smjer: Inženjerstvo u zaštiti okoliša

Miroslava Radečić

**RAZVOJ KINETIČKOG MODELA RASTA**  
***Trametes versicolor* NA SAHAROZI**

**DIPLOMSKI RAD**

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

Članovi povjerenstva: Dr. sc. Bruno Zelić, izv. prof.  
Dr. sc. Vanja Kosar, docent  
Dr. sc. Nenad Bolf, docent

Zagreb, lipanj 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 velikoj pomoći i strpljivosti pri izradi ovog diplomskog rada.*

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

*Zahvaljujem svojim kolegama, a posebno Tajani uz koju su mi svi problemi postajali lakši. Hvala im svima na lijepim trenucima i iskrenom prijateljstvu.*

*Na kraju, ali najvažnije, veliko hvala mojim roditeljima na velikoj podršci, bodrenju i razumijevanju, koje su mi pružili tijekom studiranja.*

---

## 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 ovom je radu proveden proces uzgoja gljive *Trametes versicolor* na saharozi, glukozi i fruktozi u svrhu razvoja matematičkog modela procesa. Pokusi su provedeni šaržno u tikvicama na tresilici. U svrhu ispitivanja kinetike rasta provedeni su pokusi uzgoja biomase na glukozi i fruktozi, te su procijenjeni parametri matematičkog modela procesa vezani uz rast,  $\mu_{\text{MAX}}^{\text{G}} = 9,31 \cdot 10^{-2} \text{ h}^{-1}$  i  $K_{\text{S}}^{\text{G}} = 2,72 \text{ g dm}^{-3}$ ,  $\mu_{\text{MAX}}^{\text{F}} = 0,12 \text{ h}^{-1}$  i  $K_{\text{S}}^{\text{F}} = 12,53 \text{ g dm}^{-3}$  u uvjetima šaržnog uzgoja. Isto tako procijenjeni su parametri matematičkog modela procesa vezani uz biotransformaciju saharoze na glukozu i fruktozu pomoću enzima invertaze  $V_{\text{MAX}} = 0,5 \text{ g dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ ,  $K_{\text{m}}^{\text{S}} = 1,7 \text{ g dm}^{-3}$  i  $K_{\text{I}} = 0,2 \text{ g dm}^{-3}$ .

Provedena je usporedba rezultata pokusa sa rezultatima simulacije procesa pomoću pretpostavljenog matematičkog modela, te je dobiveno zadovoljavajuće slaganje u uskom području početnih koncentracija biomase od  $0,08 \text{ g dm}^{-3}$ . Za pokuse provedene pri nižim početnim koncentracijam biomase od  $0,008 \text{ g dm}^{-3}$  model nije mogao kvantitativno opisati dinamičku promjenu koncentracije komponenata reakcijske smjese.

**Ključne riječi:** matematički model procesa, *Trametes versicolor*, kinetički model rasta biomase, kinetički model biotransformacija, ocjena valjanosti modela

---

## 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-rot fungi that produce ligninolytic enzyme laccase.

In this work process of cultivation of *Trametes versicolor* on sucrose and fructose was conducted. The aim of the work was development of the mathematical model of the process. Experiments were carried out conducted in batch conditions on a rotary shaker. In order to explore growth kinetics, experiments were performed on glucose and sucrose and model parameters related to growth were estimated;  $\mu_{\text{MAX}}^{\text{G}} = 9,31 \cdot 10^{-2} \text{ h}^{-1}$  i  $K_{\text{S}}^{\text{G}} = 2,72 \text{ g dm}^{-3}$ ,  $\mu_{\text{MAX}}^{\text{F}} = 0,12 \text{ h}^{-1}$  i  $K_{\text{S}}^{\text{F}} = 12,53 \text{ g dm}^{-3}$ . Parameters of the model related to the biotransformation of sucrose on glucose and fructose by enzyme invertase,  $V_{\text{MAX}} = 0,5 \text{ g dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ ,  $K_{\text{m}}^{\text{S}} = 1,7 \text{ g dm}^{-3}$  i  $K_{\text{I}} = 0,2 \text{ g dm}^{-3}$ , were estimated in the experiments carried out with sucrose.

Results of experiments were compared with model prediction results, and there was satisfying analogy for the experiments carried out with initial concentrations of biomass  $c_{\text{X}} = 0,08 \text{ g dm}^{-3}$ . For the experiments conducted on lower initial concentrations of biomass  $c_{\text{X}} = 0,008 \text{ g dm}^{-3}$ , model was not able to describe dynamic change of concentrations in batch conditions.

**Key words:** mathematical model of process, *Trametes Versicolor*, kinetic model of biomass growth, kinetic model of biotransformation, model validation

---

<b>1.UVOD</b> .....	1
<b>2. OPĆI DIO</b> .....	<b>Error! Bookmark not defined.3</b>
2.1. Biološki sustavi .....	3
2.1.1. Biološki materijal .....	3
2.1.2. Biološki procesi.....	3
2.1.2.1.Podjela bioprocesa.....	3
2.1.3. Bioreaktori.....	4
2.2. SVIJET MIKROORGANIZAMA	4
2.3. Klasifikacija mikroorganizama	5
2.4. Gljive.....	6
2.4.1. Morfologija i sistematika .....	6
2.4.2. Ishrana i metabolizam .....	7
2.4.3.Razmnožavanje .....	7
2.4.4.Klasifikacija gljiva .....	8
2.4.5. Gljive bijelog truljenja .....	9
2.4.5.1. <i>Trametes Versicolor</i> .....	10
2.5..Enzimi .....	10
2.5.1. Struktura enzima .....	11
2.5.2. Nomenkultura i podjela enzima	11
2.5.3. Lakaze	12
2.5.3.1. Rasprostranjenost i fiziološka svojstva lakaza	12
2.5.3.2. Struktura lakaza i specifični supstrati	12
2.5.3.3. Primjena lakaza	13
2.6. Mikrobni procesi	14
2.6.1. Hranjiva podloga	15
2.6.2. Rast biomase u uvjetima šaržnog uzgoja	15
2.6.3. Matematički model mikrobnog procesa	17
2.6.3.1. Kinetički model rasta biomase	18
2.6.3.2. Kinetički model biotransformacija	19
2.6.3.3. Bilanca tvari mikrobnog procesa u kotlastom reaktoru	20
2.7. MATEMATIČKI MODEL RASTA <i>Trametes versicolor</i> NA SAHAROZI	21
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>23</b>
3.1. Materijali .....	23

---

3.1.1. Mikroorganizam .....	23
3.1.2. Kemikalije .....	23
3.1.3. Priprema krute hranjive podloge za čuvanje gljive .....	23
3.1.4. Priprema i sterilizacija hranjive podloge za pripremu inokuluma .....	24
3.1.5. Priprema hranjive podloge za uzgoj micelijskih peleta .....	24
3.1.6. Priprema ostalih otopina.....	25
3.2. Aparature.....	25
3.2.1. Kapljevinski kromatograf visokog učinka(HPLC) .....	25
3.2.2. Tresilica.....	26
3.2.3. Centrifuga.....	26
3.2.4. Autoklav .....	27
3.3. Analitičke metode .....	27
3.3.1. Određivanje koncentracije saharoze, fruktoze i glukoze .....	27
3.3.2. Određivanje koncentracije biomase .....	27
3.4. Provedba pokusa .....	28
3.5. Obrada podataka.....	29
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>30</b>
4.1. Procjena parametara matematičkog modela za proces rata <i>Trametes versicolor</i> na glukozi .....	30
4.2. Procjena parametara matematičkog modela za proces rata <i>Trametes versicolor</i> na fruktozi .....	32
4.3. Procjena parametara matematičkog modela za biotransformaciju saharoze na glukozi i fruktozu kataliziranu invertazom iz <i>Trametes versicolor</i> .....	35
.....	.....
<b>5. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>38</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>39</b>
<b>7. POPIS SIMBOLA I SKRAĆENICA.....</b>	<b>41</b>
7.1. Simboli .....	41
7.1.1. Grčki simboli.....	41
7.2. Skraćenice .....	42
<b>8. PRILOZI.....</b>	<b>43</b>
<b>ŽIVOTOPIS</b>	

## 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 enzimске 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 ligninolitičkim 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 načine razgradnje.

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 ligninolitička 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 provedena je serija eksperimenata pri različitim početnim koncentracijama saharoze, fruktoze, glukoze i biomase u svrhu ocjene valjanosti pretpostavljenog matematičkog modela procesa rasta *Trametes versicolor* na saharozi. Na temelju eksperimentalnih podataka koji su dobiveni kao ovisnost koncentracije biomase i glukoze te fruktoze, procijenjeni su parametri matematičkog modela procesa vezabi uz rast biomase ( $\mu_{MAX}^G$ ,  $\mu_{MAX}^F$  i  $K_S^F, K_S^G$ ). Iz pokusa provedenog uzgojem *Trametes versicolor* na saharozi procijenjeni su parametri biotransformacije saharoze na glukozu i fruktozu pomoću enzima invertaze ( $V_{MAX}$ ,  $K_m^S$  i  $K_I$ ). Na kraju je provedena ocjena valjanosti modela pri čemu je ustanovljeno njegovo dobro slaganje sa eksperimentalnim rezultatima.



## 2. OPĆI DIO

### 2.1. BIOLOŠKI SUSTAVI

Biološki sustavi su vrlo složeni, a njihova se posebnost očituje u značajkama biološkog materijala koji nastaje u biološkim procesima ili pomoću kojega se u tim procesima prerađuju druge tvari. Temeljna značajka biološkog sustava je prisustvo biološkog materijala; mikroorganizama, staničnih kultura biljnog i životinjskog porijekla i s njima povezanih bioloških procesa.

#### 2.1.1. Biološki materijal

Biološki materijal je stabilan u fiziološkim uvjetima. Pod fiziološkim uvjetima se podrazumijevaju normalni tlak, temperatura od 20 do 50 °C, pH od 4,0 do 9,0, razrijeđene vodene otopine u kojima se postiže mala produktivnost. Prednost ovih uvjeta je manja potrošnja energije za postizanje radnih uvjeta nego u klasičnim kemijskim procesima.

#### 2.1.2. Biološki procesi

Bioproceni su glavni dio biotehnološkog proizvodnog postupka u kojem se sirovine djelovanjem biokatalizatora kemijski transformiraju u proizvod. Pod biokatalizatorom se podrazumijevaju biljne i životinjske stanice te tkiva, mikroorganizmi i enzimi.

##### 2.1.2.1. Podjela bioprocena

Bioproceni se mogu promatrati kao skup pojedinačnih bioprocena (biotehnologije) ili kao jedan proces. Prema tome bioproceni se mogu podijeliti na nekoliko načina.

Ako se bioproceni razmatraju pojedinačno, onda se mogu promatrati sa stanovišta veze između potrošnje supstrata (izvora ugljika) i nastalog produkta (biomasa ili metabolit):

- između potrošnje supstrata i nastajanja produkta postoji stehiometrijska veza (rast biomase pri uzgoju kvasca u aerobnim uvjetima);

- između potrošnje supstrata i nastajanja produkta postoji indirektna veza, supstrat osigurava energiju za rast biomase, ali se troši i na nastajanje nekih drugih produkata (biosinteza limunske kiseline i nekih aminokiselina);

- između potrošnje supstrata i nastajanja produkta ne postoji neposredna veza, nema ovisnosti brzine potrošnje supstrata i brzine nastajanja produkta (biosinteza vitamina, enzima).

Nadalje, bioprocesi se mogu podijeliti prema načinu provođenja bioreakcija na:

- jednostavne reakcije – supstrat se prevodi u produkt bez akumulacije intermedijera;

- paralelne reakcije - supstrat se prevodi u produkt u različitim stehiometrijskim odnosima bez akumulacije intermedijera, a brzina nastajanja produkta ovisi o koncentraciji supstrata;

- slijedne reakcije – supstrat se preko intermedijera prevodi u produkt;

- selektivno-slijedne reakcije – supstrat se potpuno prevodi u intermedijer, a zatim intermedijer prelazi u produkt, ako postoje dva supstrata mikroorganizam prvo troši jedan, a zatim drugi supstrat.

Uobičajeno se bioprocesi dijele na aerobne i anaerobne. Bioprocesi koji se provode u prisustvu kisika nazivaju se aerobni, a oni koji se provode u uvjetima limitacije kisikom ili bez kisika nazivaju se anaerobni.

### **2.1.3. Bioreaktori**

Bioreaktori su uređaji u kojima se provode bioprocesi. Najčešće se upotrebljavaju kotlasti ili protočno kotlasti reaktor koji se u biotehnologiji naziva kemostat. Prema tipu reakcija koje se u njima provode mogu se podijeliti na:

- enzimске reaktore u kojima se provode reakcije katalizirane enzimima;

- mikrobiološke reaktore u kojima se koriste živi mikroorganizmi;

- reaktore za uzgoj tkiva u kojima se bioprocesi provode u prisustvu kultura tkiva;

- sterilizatore u kojima se uništava biološki materijal vodenom parom pri visokom tlaku i temperaturi ili kemijskim sredstvima.

## **2.2. 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.

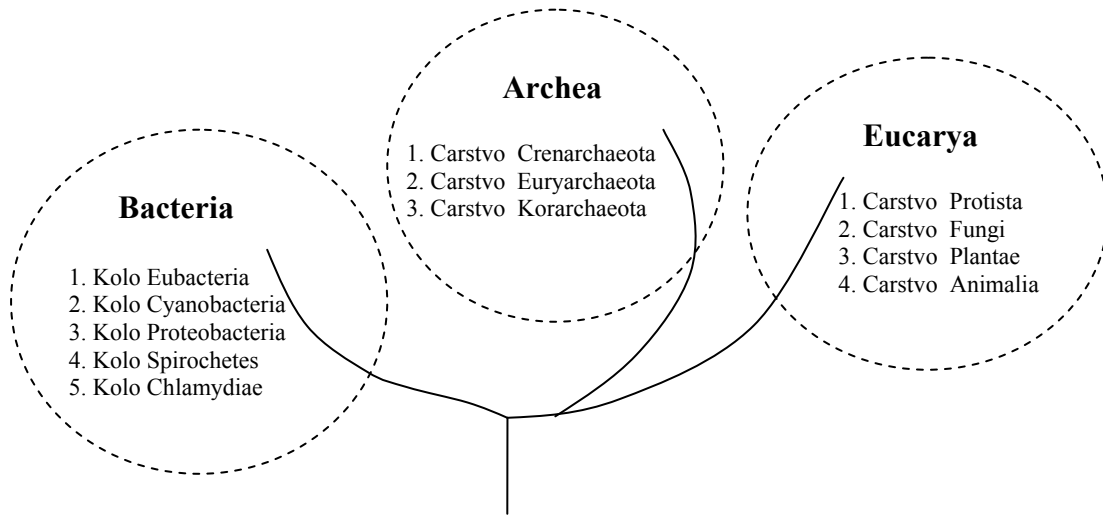
Više biljke i životinje imaju uglavnom nepromjenjivu količinu enzima u stanicama pa su ograničene što se tiče fiziološke prilagodljivosti. U mikroorganizama je fiziološka prilagodljivost mnogo veća, što je povezano s njihovim malim dimenzijama [11].

## 2.3. 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

## 2.4. GLJIVE

### 2.4.1. 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 stjenkom 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 stjenka	glukani, manani, hitin
Spore	proizvode ih velik broj (spolnih i nespolnih)
Metabolizam	ograničen na heterotrofan (aeroban i fakultativno anaeroban)

#### 2.4.2. 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].

#### 2.4.3. 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 stjenke),
- b. Klamidiospore su stanice koje su prije odvajanja okružene debelom stjenkom,
- 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.

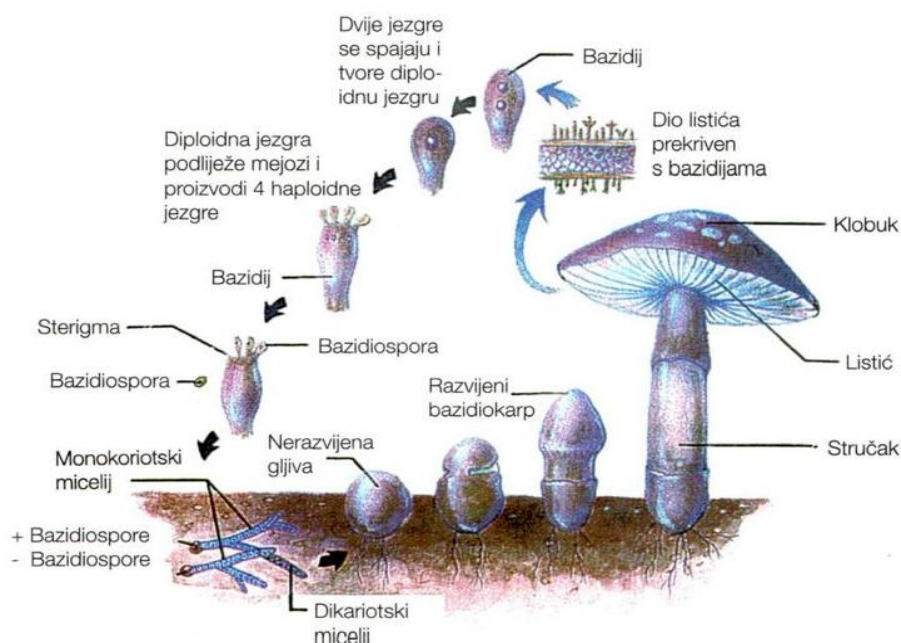
Spolno razmnožavanje u gljiva uključuje spajanje primjerenih jezgara. Neke vrste gljiva su samooplodive i tvore kompatibilne gamete na istom miceliju. Druge vrste zahtijevaju vanjsko križanje između različitih, ali spolno skladnih micelija. Spolno razmnožavanje također može dovesti do tvorbe spora jer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

#### 2.4.4. 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.).



Slika 2.2. Tipična mesnata gljiva i spolne bazidiospore

*Basidiomycetes* je ime dano zbog karakteristične strukture njihove stanice, bazidiuma, 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].

#### **2.4.5. 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].

### 2.4.5.1. *Trametes versicolor*

*Trametes versicolor* (Slika 2.3.) 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].



Slika 2.3. *Trametes versicolor*

## 2.5. 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].

### **2.5.1. 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].

### **2.5.2. 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:

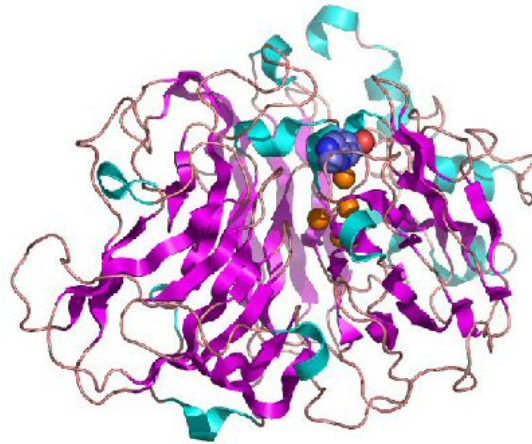
- oksidoreduktaze ubrzavaju reakcije oksidacije i redukcije,

- transferaze sudjeluju u prijenosu raznih atomskih grupa,
- hidrolaze sudjeluju u reakcijama hidrolize,
- liaze sudjeluju u stvaranju i cijepanju dvostrukih veza,
- izomeraze prevode izomere iz jednog oblika u drugi,
- ligaze sudjeluju u reakcijama sinteze pri čemu se troši energija pohranjena u obliku adenozin – trifosfata (ATP) [14].

### 2.5.3. Lakaze

#### 2.5.3.1. Rasprostranjenost i fiziološka svojstva lakaza

Lakaze su enzimi iz skupine oksidoreduktaza (Slika 2.4.). 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 2.4.** Pojednostavljeni prikaz strukture lakaze porijeklom iz *Trametes versicolor*

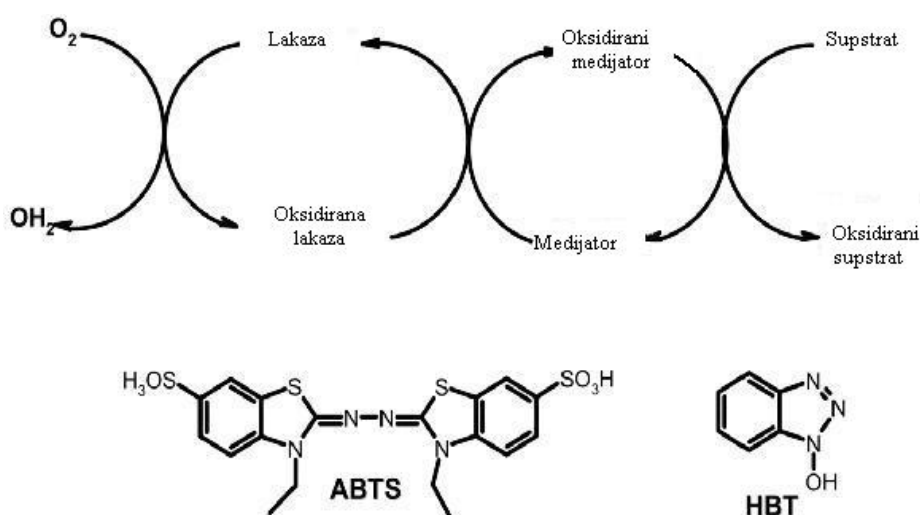
Fiziološka funkcija lakaza je brojna. Poznato je da sudjeluju u morfogenezi mikroorganizama domaćina, primjerice u razvoju spora kod gljiva, te u procesu nastajanja melanina, oksidaciji voća i povrća, zaštiti biljaka protiv kukaca i mikroorganizama. Nadalje, lakaze kataliziraju biorazgradnju lignina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

### 2.5.3.2. 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 2.5.). 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 2.5.** Pojednostavljeni prikaz mehanizma razgradnje podjedinica lignina lakazom i strukture uobičajenih medijatora ABTS-a i HBT-a

### 2.5.3.3. 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 lakaza 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].

## 2.6. MIKROBNI PROCESI

Bioprocesi u kojima se uzgajaju mikroorganizmi zovu se mikrobnim procesima. Tijekom mikrobnog procesa dolazi do rasta biomase koji se izražava:

- nastalom masom mikroorganizama;
- mogućim formiranjem produkata metabolizma mikroorganizama;
- transformacijom supstrata pomoću mikroorganizama ;
- čišćenjem otapala pomoću mikroorganizama ;

Za rast i razvoj mikroorganizama potrebno je prisustvo različitih hranjivih tvari, te odgovarajuća temperatura i pH. Najvažniji kemijski elementi za rast i razvoj mikroorganizama su ugljik, kisik, dušik, sumpor i fosfor. Isto tako, ne manje važna je i voda, kojom se provodi transport i dobava kisika i vodika.

Mikrobni procesi provode se u vodenom mediju (submerzni uzgoj) ili na čvrstim podlogama u kojima su otopljene ili suspendirane različite hranjive tvari neophodne za rast i razvoj mikroorganizama. Takav medij naziva se hranjiva podloga.

### **2.6.1. Hranjiva podloga**

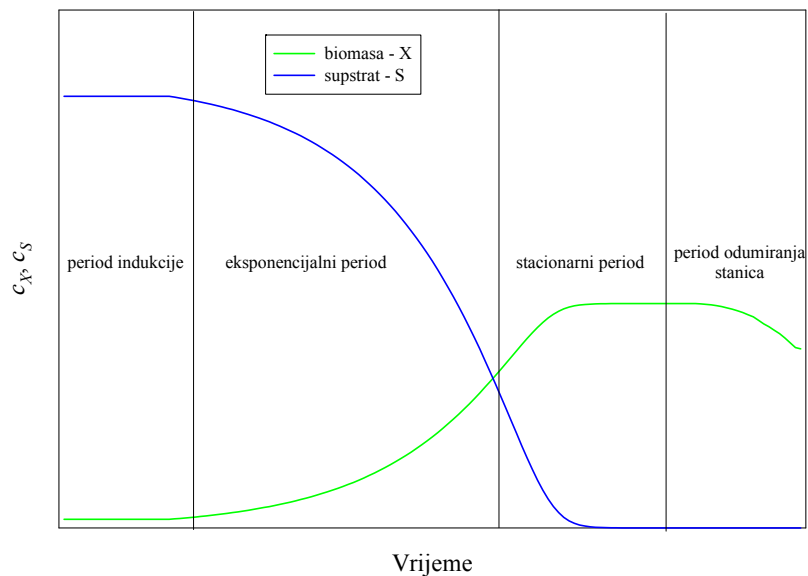
Osnovni zahtjev pri pripremi hranjive podloge je osigurati dobar rast mikroorganizama i/ili veliku brzinu nastajanja produkata. Ukoliko je velika koncentracija neke od komponenata podloge, to može izazvati inhibiciju i /ili zaustaviti rast. Isto tako, prevelika koncentracija pojedinih komponenata podloge uzrokuje suviše intenzivan rast mikroorganizama, pa dolazi do akumulacije produkata, koji vrlo često mogu izmijeniti uobičajene biološke procese u stanici. Zbog toga je uobičajeno pri izboru i optimiranju hranjive podloge ograničiti količinu komponenata neophodnih za rast. Hranjiva podloga se može podijeliti, prema svom sastavu na sintetsku i kompleksnu hranjivu podlogu.

Sintetska podloga je podloga u kojoj je sastav komponenata koji ju čine poznat. Takva podloga sadrži poznate količine izvora ugljika, dušika, fosfora, vitamina, proteina, elemenata u tragovima odnosno svih komponenata neophodnih za održavanje normalnih funkcija mikroorganizama.

Kompleksna podloga je podloga u kojoj je sastav komponenata djelomično nepoznat zbog prisustva tvari u tragovima. Takve podloge su one koje sadržavaju primjerice kvasni ekstrakt ili pepton.

### **2.6.2. Rast biomase u uvjetima šaržnog uzgoja**

Biološki procesi rasta mikroorganizama odvijaju se pretežito u uvjetima šaržnog uzgoja. Nakon dodavanja kulture mikroorganizama (inokuluma) u hranjivu podlogu biomasa prolazi kroz četiri različite faze rasta. Promjena broja živih stanica mikroorganizama s vremenom može se prikazati slikom 2.6.



**Slika 2.6.** Prikaz promjene broja živih stanica mikroorganizma s vremenom

Prvi period koji se javlja, a u kojem se ne mijenja broj stanica biomase, naziva se period indukcije. U tom periodu stanice mikroorganizama se prilagođavaju novonastalim uvjetima. Period indukcije može biti kratak, ali može i trajati što ovisi o nekoliko čimbenika kao što su:

- sastav hranjive podloge na kojoj je mikroorganizam prethodno rastao;
- sastav nove hranjive podloge;
- vrsta i starost populacije naciijepljenog mikroorganizma;
- broj stanica;
- uvjeti provedbe bioprocesa (pH, temperatura);
- vrsta produkata metabolizma mikroorganizama.

Sljedeći period je eksponencijalni rast stanice, u kojemu stanice dostižu maksimalnu brzinu rasta, a njihov kemijski sastav se više ne mijenja. Taj period traje toliko dugo dok mikroorganizmi imaju dovoljno hranjivih tvari.

Tijekom stacionarnog perioda stanice poprimaju maksimalnu veličinu i volumen populacije je najveći. Taj period nastupa kada koncentracija neke od komponente neophodne za rast dostigne takvu razinu koja više ne može podržati maksimalnu brzinu rasta.

Period odumiranja stanica može imati različito vrijeme trajanja, koje ovisi o uvjetima provedbe mikrobnog procesa i vrsti mikroorganizama. Ovaj period počinje kada pojedine stanice biomase liziraju (dolazi do pucanja stanične stijenke) pa unutar stanične komponente iz takvih stanica (šećeri, vitamini) služe za održavanje životnih funkcija preostalih stanica.

Svaki od navedenih perioda važan je za mikrobiološki proces koji se provodi, pa je poznavanje zakonitosti zbivanja u svakom periodu od velike važnosti. Osnova svakog dobrog oblikovanja procesa je smanjiti vrijeme trajanja perioda indukcije i što više produžiti vrijeme trajanja eksponencijalnog rasta.

### **2.6.3. Matematički model mikrobnog procesa**

Postoji cijeli niz različitih izvedbi bioreaktora za provedbu bioprocesa, ali se izbor, u principu, može provesti između tri različita tipa reaktora: kotlasti (šaržni), kotlasti protočni i kolonski i to najčešće s nepokretnim slojem katalizatora.

Prema tome bioprocese je moguće provoditi s topljivim enzimima ili stanicama u suspenziji u kotlastom reaktoru, s topljivo imobiliziranim enzimima ili stanicama u kolonskom reaktoru s nepokretnim slojem katalizatora, u reaktoru s fluidiziranim slojem ili u reaktoru s membranskim modulom.

U industriji se danas najčešće upotrebljava kotlasti (šaržni) reaktor s ili bez dovoda supstrata i kolonski s nepokretnim slojem biokatalizatora. Kotlasti protočni reaktor se upotrebljava kao kaskada i to najčešće dva reaktora kada kinetika to određuje (kada je proces inhibiran produktom).

S matematičkim modelima mikrobnih procesa potrebno je upoznati se prije razmatranja o kinetici i složenijim sustavima realnih reaktora s ciljem da se dobiju osnovne predodžbe o bitnim svojstvima reaktorskog sustava. Jednostavnost matematičkih modela postiže se jednostavnom fizikalnom predodžbom o reaktorskom sustavu. Pretpostavljaju se idealizirana stanja i procesi u reaktoru koji se tada mogu lakše matematički formulirati. Prilikom postavljanja matematičkog modela bioprocesa najčešće se uzimaju u obzir slijedeće pretpostavke:

1. Pretpostavka o idealnom miješanju/idealnom strujanju
2. Pretpostavka o nepostojanju difuzijskog prijenosa tvari i topline
3. Pretpostavka o izotermnom radu reaktora

uvjetima praktički zanemarivi ova pretpostavka ne mora se posebno razmatrati.

4. Pretpostavka o stacionarnom radu

Osnova svakog matematičkog modela, pomoću kojega se izračunava veličina reaktora i druge karakteristike je bilanca tvari i energije. Budući da su toplinski učinci u laboratorijskoj izvedbi reaktora neznatni, bioprocesi se u njima mogu provoditi izotermno, pa se matematički modeli takvih bioprocasa izvode samo na osnovu bilance tvari.

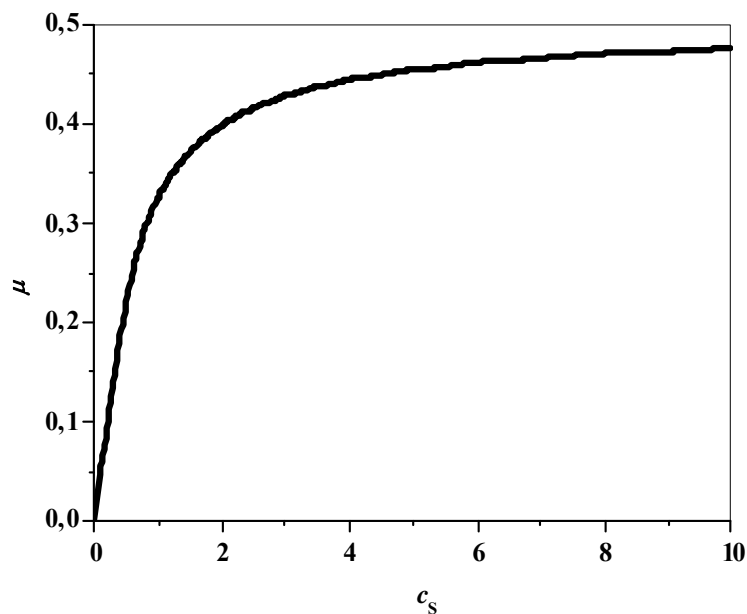
### 2.6.3.1. Kinetički model rasta biomase

Modeli rasta biomase mogu se podijeliti u dvije osnovne grupe: strukturni i ne strukturni modeli. Nestrukturni modeli promatraju stanicu biomase kao crnu kutiju i ne uzimaju u obzir fiziološke promjene koje se odvijaju u samoj stanici već pretpostavljaju da je populacija stanica biomase homogena po svim svojstvima

Jedan od najpoznatijih ne strukturnih modela definirao je Monod (jednadžba 2.1). Njegov model daje funkcionalnu ovisnost specifične brzine rasta biomase,  $\mu$  o koncentraciji supstrata,  $c_s$ , a dan je izrazom:

$$\mu = \mu_{\text{MAX}} \cdot \frac{c_s}{K_s + c_s} \quad 2.1$$

gdje je  $\mu_{\text{MAX}}$  maksimalna specifična brzina rasta biomase, a  $K_s$  konstanta zasićenja supstratom. Konstanta zasićenja supstratom,  $K_s$ , je jednaka koncentraciji supstrata kada je specifična brzina rasta biomase jednaka polovini maksimalne specifične brzine rasta biomase (Slika 2.6.).



Slika 2.6. Grafički prikaz Monodovog izraza



Monodov model ima brojne nedostatke, primjerice ne može opisati period indukcije zbog toga što je konstanta zasićenja,  $K_S$ , po svojoj vrijednosti u većini procesa puno manja od koncentracije supstrata,  $c_S$ , pa praktički odmah po inokulaciji, prema ovome modelu, počinje period eksponencijalnog rasta. Isto vrijedi i za period odumiranja stanica koji ovaj model bez uvođenja novih parametara ne može opisati.

### 2.6.3.2. Kinetički modeli biotransformacija

Kinetika biotransformacija određuje tip procesa (diskontinuirani-kontinuirani) i tip reaktora (kotlast, kotlasti-protočni, cijevni). Kinetička mjerenja moraju biti provedena pri uvjetima u kojima će se u industriji provoditi biotransformacija, a to znači pri visokim koncentracijama supstrata (reaktanta) i produkta, optimalnoj temperaturi i pH.

Najjednostavniji kinetički model ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji supstrata (reaktanta) se može prikazati Michaelis-Mentenovim izrazom (jednadžba 2.2).

$$r_s = V_{\text{MAX}} \cdot \frac{c_S}{K_m^S + c_S} \quad 2.2$$

gdje je  $r_s$  brzina reakcije,  $c_S$  koncentracija supstrata,  $V_{\text{MAX}}$  maksimalna brzina reakcije, a  $K_m^S$  Michaelis-Mentenova konstanta koja odgovara koncentraciji supstrata kada je brzina reakcije jednaka polovici maksimalne brzine reakcije.

Ovaj kinetički izraz proširen je u slučaju da postoji inhibicija supstratom, pa se ovisnost brzine reakcije o koncentraciji supstrata može prikazati modificiranim Michaelis-Mentenovim izrazom (jednadžba 2.3):

$$r_s = V_{\text{MAX}} \cdot \frac{c_S}{K_m^S + c_S + \frac{c_S^2}{K_{IS}}} \quad 2.3$$

gdje je  $K_{IS}$  konstanta inhibicije supstratom. Uz to je potrebni ispitati utjecaj ostalih sudionika u reakciji na brzinu reakcije. Naime, produkt često djeluje kao inhibitor, pri čemu vrijedi slijedeći izraz (jednadžba 2.4):

$$r_s = V_{\text{MAX}} \cdot \frac{c_S}{K_m^S \cdot \left(1 + \frac{c_P}{K_{IP}}\right) + c_S} \quad 2.4$$

gdje je  $K_{IP}$  konstanta inhibicije produktom, a  $c_P$  koncentracija produkta.

Linearizacijom kinetičkog izraza, 2.2 iz parova eksperimentalnih podataka koncentracija supstrata - brzina reakcije, moguće je napraviti prvu procjenu kinetičkih parametara  $V_{MAX}$  i  $K_m^S$ .

$$\frac{1}{r_S} = \frac{K_m^S}{V_{MAX}} \cdot \frac{1}{c_S} + \frac{1}{V_{MAX}} \quad 2.5$$

Na temelju te prve procjene kinetičkih parametara nelinearnom regresijskom analizom se pomoću navedenih izraza iz parova eksperimentalnih podataka koncentracija – brzina procjenjuju stvarni kinetički parametri. Ovi parametri se zatim koriste u bilančnim jednadžbama najčešće za kotlasti reaktor.

### 2.6.3.3. Bilanca tvari mikrobnog procesa u kotlastom reaktoru

U najjednostavnijem slučaju, mikrobnom rastu u kotlastom bioreaktoru, kada se biomasa unosi u reaktor prije početka provedbe biokemijskog procesa, uz pretpostavku idealnog miješanja i konstantnog volumena reakcijske smjese, bilanca tvari za biomasu se općenito može prikazati kao funkcionalna ovisnost brzine promjene koncentracije živih stanica o koncentraciji stanica, odnosno u uobičajenijem obliku kao funkcionalna ovisnost brzine promjene koncentracije biomase o samoj koncentraciji biomase,  $c_X$  (jednadžba 2.6):

$$\frac{dc_X}{dt} = \mu \cdot c_X \quad 2.6$$

Brzina promjene koncentracije supstrata,  $c_S$ , u procesu provedenom u kotlastom reaktoru, odnosno bilanca tvari za supstrat u kotlastom reaktoru se najjednostavnije može prikazati kao (jednadžba 2.7.):

$$\frac{dc_S}{dt} = -r_S \cdot c_X \quad 2.7$$

pri čemu je  $r_S$  specifična brzina nestajanja supstrata S. Ako se supstrat koristi isključivo za rast stanica biomase, odnosno ako nema biokonverzije supstrata u primarne produkte metabolizma, tada je bilanca tvari za supstrat (jednadžba 2.8):

$$\frac{dc_S}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \mu \cdot c_X \quad 2.8$$

pri čemu je  $Y_{X/S}$  [g g<sup>-1</sup>] iskorištenje biomase na supstratu, i predstavlja omjer između prirasta koncentracije biomase,  $\Delta c_X$ , i potrošnje supstrata,  $\Delta c_S$ , tijekom provedbe mikrobiološkog procesa (jednadžba 2.9).

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta c_X}{\Delta c_S} \quad 2.9$$

U mikrobiološkim procesima je uobičajeno da se osim za rast i održavanje stanica biomase, supstrat troši i za nastajanje produkata u reakcijama biotransformacija. U tom slučaju je bilanca tvari za supstrat (jednadžba 2.10):

$$\frac{dc_S}{dt} = \frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \mu \cdot c_X - r_S \cdot c_X \quad 2.10$$

## 2.7. MATEMATIČKI MODEL RASTA *Trametes versicolor* NA SAHAROZI

Na temelju raspoloživih literaturnih podataka i saznanja prikupljenih pokusima u kotlastom reaktoru postavljen je matematički model rasta *Trametes versicolor* na saharozi. Pretpostavljeno je da se saharoza, S, djelovanjem enzima invertaze razgrađuje na glukozu, G, i fruktozu, F, te da je ova biotransformacija inhibirana produktom - glukozom. Stoga je kinetika enzimatske razgradnje saharoze enzimom invertazom (jednadžba 2.11) opisana modificiranim Michaelis-Mentenovim izrazom za inhibiciju produktom (jednadžba 2.4). Nadalje je pretpostavljeno da se rast biomase, X, može opisati Monodovim kinetičkim modelom rasta (jednadžba 2.1). te da biomasa ne raste na saharozi. Iz preliminarnih eksperimentalnih istraživanja je poznato da biomasa prvo raste na glukozu (jednadžba 2.12), a tek pošto njena koncentracija padne na nulu dolazi do metaboliziranja fruktoze od strane stanica biomase (jednadžba 2.13). Pojednostavljena reakcijska shema ovoga procesa prikazana je jednadžbama 2.11, 2.12 i 2.13 pri čemu je  $X_0$  početna biomasa odnosno inokulum.



Uzevši u obzir uobičajene pretpostavke za mikrobne procese koji se odvijaju u kotlastom reaktoru postavljen je sljedeći matematički model procesa rasta *Trametes versicolor* na saharozi koji se sastoji od kinetičkih jednadžbi za biotransformaciju saharoze (jednadžba 2.14), rasta biomase na glukozu (jednadžba 2.15), rasta biomase na fruktozi (jednadžba 2.16), te bilanci tvari za biomasu, saharozu, glukozu i fruktozu (jednadžbe 2.18 - 2.21).

Pretpostavljeno je da je ukupna brzina rasta biomase jednaka sumi brzine rasta biomase na glukozi i brzine rasta biomase na fruktozi (jednadžba 2.17).

$$r_S = V_{\text{MAX}} \cdot \frac{c_S}{K_m^S \left( 1 + \frac{c_G}{K_I} \right) + c_S} \quad 2.14$$

$$\mu_G = \mu_{G,\text{MAX}} \cdot \frac{c_G}{K_S^G + c_G} \quad 2.15$$

$$\mu_F = \mu_{F,\text{MAX}} \cdot \frac{c_F}{K_S^F + c_F} \quad 2.16$$

$$\mu = \mu_G + \mu_F \quad 2.17$$

$$\frac{dc_X}{dt} = \mu \cdot c_X \quad 2.18$$

$$\frac{dc_S}{dt} = -r_S \cdot c_X \quad 2.19$$

$$\frac{dc_G}{dt} = r_S \cdot c_X - \frac{1}{Y_{X/G}} \cdot \mu_G \cdot c_X \quad 2.20$$

$$\frac{dc_F}{dt} = r_S \cdot c_X - \frac{1}{Y_{X/F}} \cdot \mu_F \cdot c_X \quad 2.21$$

pri čemu su  $c_S$ , koncentracija saharoze,  $c_G$ , koncentracija glukoze,  $c_F$ , koncentracija fruktoze,  $Y_{X/G}$ , iskorištenje biomase na glukozi i  $Y_{X/F}$ , iskorištenje biomase na fruktozi.

### 3. MATERIJALI I METODE

Proizvodnja gljive bijelog truljenja *Trametes versicolor* provedena je u anaerobnim uvjetima u šaržnim pokusima na tresilici. Pokus je trajao 3 dana. Kao osnovni elementi hranjive podloge korištene su saharoza i fruktoza. Praćene su promjene koncentracije saharoze, glukoze i fruktoze, koje su određivane pomoću kapljevinske kromatografije visokog učinka.

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Mikroorganizam

U pokusima je korištena gljiva *Trametes versicolor* iz mikrobiološke zbirke Culture 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 svaki tjedan.

##### 3.1.2. Kemikalije

Korištene su slijedeće kemikalije: agar sladnog ekstrakta (Sigma – Aldrich), agar – agar (Kemika), glukoza (Riedel – de Haën), saharoza (Kandit), fruktoza (Sigma – Aldrich), pepton (Pliva), kvašćev ekstrakt (Pliva),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Sigma -Aldrich),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Kemika),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Pliva),  $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Merck), limunska kiselina (Kemika).

##### 3.1.3. Priprema krute hranjive podloge za čuvanje gljive

Čista kultura gljive *Trametes versicolor* čuvana je na kosim krutim podlogama (Slika 3.1.). Otopljeno je 2 g agara sladnog ekstrakta i 2 g agar-agara u  $100\text{ cm}^3$  vode. Oko  $5\text{ cm}^3$  otopine stavljeno je u epruvetu i sterilizirano u autoklavu 20 minuta pri  $T = 121\text{ }^{\circ}\text{C}$  i tlaku  $p = 0,6\text{--}0,8\text{ bar}$ . Nakon sterilizacije, podloge su ohlađene na sobnu temperaturi kako bi se želirale. Kultura se sterilno precjepljivala na krutu podlogu svaki tjedan i čuvala pri  $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



**Slika 3.1.** Kultura gljiva *Trametes versicolor* na krutoj kosoj podlozi

### 3.1.4. Priprema i sterilizacija hranjive podloge za pripremu inokuluma

Pripremljeno je 50 cm<sup>3</sup> hranjive podloge (Tablica 3.1.) u tikvicama volumena 500 cm<sup>3</sup>. Tikvice su sterilizirane u autoklavu 30 minuta pri  $T = 121$  °C i tlaku  $p = 0,6 - 0,8$  bar.

**Tablica 3.1.** Sastav hranjive podloge za pripremu inokuluma

Komponenta	$\gamma$ [g dm <sup>-3</sup> ]
Glukoza	5
Pepton	0,8
Kvašćev ekstrakt	2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,6
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,4
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1
CaCl <sub>2</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,1
Limunska kiselina	0,3

### 3.1.5. Priprema hranjive podloge za uzgoj micelijskih peleta

Pripremljeno je 50 cm<sup>3</sup> hranjive podloge u Erlenmeyerovim tikvicama ( $V = 500$  cm<sup>3</sup>) i sterilizirano 30 minuta pri temperaturi  $T = 121$  °C i tlaku  $p = 0,6-0,8$  bar. Provedena su četiri pokusa, a sastav hranjivih podloga, kao i količina inokuluma dodana u svakom pokusu su dani u Tablici 3.2.

**Tablica 3.2.** Sastav hranjive podloge za uzgoj micelijskih peleta

<b>Komponenta</b>	1. pokus	2. pokus	3. pokus	4. pokus
Saharoza [g dm <sup>-3</sup> ]	-	-	-	20
Glukoza [g dm <sup>-3</sup> ]	10	-	-	-
Fruktoza [g dm <sup>-3</sup> ]	-	10	5	-
Biomasa [g dm <sup>-3</sup> ]	0,08	0,08	0,008	0,08
Pepton [g dm <sup>-3</sup> ]	2	2	2	2
Kvaščev ekstrakt [g dm <sup>-3</sup> ]	0,8	0,8	0,8	0,8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> [g dm <sup>-3</sup> ]	0,8	0,8	0,8	0,8
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> [g dm <sup>-3</sup> ]	0,2	0,2	0,2	0,2
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O [g dm <sup>-3</sup> ]	0,5	0,5	0,5	0,5

### 3.1.6. Priprema ostalih otopina

Pripremljene su:

- otopine fruktoze koncentracije  $\gamma = 5 \text{ g dm}^{-3}$  i  $10 \text{ g dm}^{-3}$  koje su korištene za određivanje baždarnog pravca,
- otopine saharoze koncentracije  $\gamma = 10 \text{ g dm}^{-3}$  i  $20 \text{ g dm}^{-3}$  koje su korištene za određivanje baždarnog pravca,
- otopine glukoze koncentracije  $\gamma = 10 \text{ g dm}^{-3}$  i  $20 \text{ g dm}^{-3}$  koje su korištene za određivanje baždarnog pravca.

## 3.2. APARATUE

### 3.2.1. Kapljevinski kromatograf visokog učinka (HPLC)

Određivanje koncentracije saharoze, glukoze i fruktoze je provedeno na kapljevinskom kromatografu visokog učinka (LC-20 AT, Shimadzu) na koloni Carbohydrate Ca<sup>2+</sup> (300 · 6,5 mm, CS- Chromatographie service GmbH) uz RI detektor (Slika 3.2.).



**Slika 3.2.** Kapljevinski kromatograf visokog učinka

### 3.2.2. Tresilica

Proces uzgoja gljive *Trametes versicolor* je proveden na laboratorijskoj tresilici (Innova 4330 New Brunswick Scientific, SAD, Slika 3.3.).



**Slika 3.3.** Laboratorijska tresilica

### 3.2.3. Centrifuga

Uzorci su centrifugirani na stojećoj, horizontalnoj centrifugi Centric 150 proizvođača TEHTNICA (Slovenija) pri  $n = 9000 \text{ min}^{-1}$ .



### 3.2.4. Autoklav

Za sterilizaciju 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  $p = 0,6 - 0,8$  bara u trajanju od 30 minuta.

## 3.3. Analitičke metode

Tijekom provedbe procesa praćene su promjene koncentracije biomase, saharoze, glukoze i fruktoze. Koncentracija biomase je određivana gravimetrijski, a koncentracije saharoze, glukoze i fruktoze su određivane pomoću kapljevinske kromatografije visokog učinka.

### 3.3.1. Određivanje koncentracije saharoze, glukoze i fruktoze

Koncentracija saharoze, glukoze i fruktoze je određivana pomoću HPLC spojenog na RI detektor. Analiza je provedena na temperaturi od  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  s protokom mobilne faze, redestilirane vode, od  $0,5\text{ cm}^3\text{ min}^{-1}$  na koloni  $\text{C}_{18}$ -Carbohydrate  $\text{Ca}^{2+}$  ( $300 \cdot 6,5\text{ mm}$ , CS-Chromatographie service GmbH). Vrijeme zadržavanja za saharozu je bilo 3,6 minuta, za glukoze 5,3 minuta, dok je za fruktozu bilo 4,6 minuta. Prije analize uzoraka iz reaktora bilo je potrebno profiltrirati uzorke, a za filtriranje se koristio filter veličine pora od  $0,2\text{ }\mu\text{m}$  (Gruppo Linea Bea Sas, Italija). Koncentracija saharoze, glukoze i fruktoze u nepoznatom uzorku se određivala iz vremena zadržavanja ovih komponenata i pripadajućih baždarnih pravaca (Prilozi 1., 2. i 3.).

### 3.3.2. Određivanje koncentracije biomase

Koncentracija mokre biomase u reakcijskoj smijesi je određivana gravimetrijski. Uzorak je profiltriran kroz filter papir (kvantitavni filter papir plava vrpca,  $\text{Ø} = 110\text{ mm}$ , Munktell, Njemačka) te je mokra biomasa izvagana na analitičkoj vagi.

### 3.4. PROVEDBA POKUSA

Prije početka pokusa uzgojena je gljiva *Trametes versicolor* na prethodno opisanoj hranjivoj podlozi. Kulture gljive su precijepljene sa krute podloge za čuvanje na hranjivu podlogu za uzgoj. Uzgoj gljive je proveden na tresilici pri temperaturi  $T = 27\text{ °C}$  i broju okretaja tresilice  $n = 140\text{ min}^{-1}$  i trajao je 3 dana. Uzgojeni micelijski peleti gljive (Slika 3.4.) su profiltrirani na filter papiru, izvagani na analitičkoj vagi, te kao takvi korišteni za uzgoj gljive na glukozi. Pokusi su provedeni za različite početne koncentracije biomase, saharoze, glukoze i fruktoze prema planu pokusa prikazanom u tablici 3.2.



**Slika 3.4.** Peleti gljive *Trametes versicolor* nakon filtracije

Pripremljeno je  $50\text{ cm}^3$  hranjive podloge i sterilizirano u autoklavu 30 minuta pri  $T = 121\text{ °C}$  i tlaku  $p = 0,6 - 0,8\text{ bar}$ . Profiltrirani peleti su prema planu pokusa kvantitativno preneseni u svaku tikvicu, a početak pokusa aproksimiran je njihovim dodatkom. Za svaku točku plana pokusa provedena su dva paralelna pokusa, a svaki pokus je proveden paralelno u 7 tikvica.

Uzorci za određivanje koncentracije saharoze, glukoze i fruktoze su uzimani svaka 4 sata, u sterilnim uvjetima, injekcijom kroz septum tikvice (Slika 3.5.). Nakon uzimanja, uzorci su centrifugirani, a iz kapljevinskog ostatka je određivana koncentracija glukoze.



**Slika 3.5.** Postupak sterilnog uzimanja uzoraka

Uzorci za određivanje koncentracije biomase uzimani su u nepravilnim vremenskim intervalima koji su ovisili o dinamici potrošnje saharoze, glukoze i fruktoze. Koncentracija biomase je određivana tako da je pokus u jednoj od tikvica prekidan, te je cjelokupni sadržaj tikvice filtriran, a mokra biomasa nakon filtracije vagana.

### 3.5. OBRADA PODATAKA

Na temelju eksperimentalnih podataka koji su dobiveni kao ovisnost koncentracije biomase i glukoze procijenjeni su parametri matematičkog modela procesa.

Parametri modela su procijenjeni nelinearnom regresijom koristeći simpleks metodu koja je sadržana u programskom paketu SCIENTIST. Rezultati dobiveni pomoću matematičkog modela su uspoređeni sa eksperimentalnim podacima, ponovno proračunati u optimizacijskom potprogramu sve dok nije postignuta minimalna pogreška između eksperimentalnih i procijenjenih vrijednosti. Razlika između vrijednosti eksperimentalnih podataka i onih proračunatih pomoću modela je dana kao suma kvadrata pogreške. Za simulacije procesa pomoću matematičkog modela je korišten *Episode* algoritam za rješavanje krutih diferencijalnih jednadžbi koji je sastavni dio programskog paketa SCIENTIST.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu je prikazan matematički model procesa rasta biomase i potrošnje supstrata, tijekom šaržnog uzgoja *Trametes versicolor* na tresilici. Za opis kinetike rasta peleta pretpostavljen je Monodov model rasta biomase. Parametri kinetičkog modela za rasta su procijenjeni iz pokusa šaržnog uzgoja *Trametes versicolor* provedenih na glukozu ili na fruktozi. Parametri kinetičkog modela biotransformacije saharoze na glukozu i fruktozu su procijenjeni iz pokusa šaržnog uzgoja *Trametes versicolor* provedenih na saharozu.

### 4.1. Procjena parametara matematičkog modela za proces rasta *Trametes versicolor* na glukozu

Parametri matematičkog modela procesa su procijenjeni iz pokusa provedenog pri početnoj koncentraciji glukoze  $c_{G,0} = 10 \text{ g dm}^{-3}$  i početnoj koncentraciji biomase  $c_{X,0} = 8 \cdot 10^{-2} \text{ g dm}^{-3}$  (1. pokus). Rezultati pokusa su prikazani u Tablici 4.1.

**Tablica 4.1.** Rezultati pokusa uzgoja *Trametes versicolor* na glukozu pri početnoj koncentraciji glukoze,  $c_{G,0} = 10 \text{ g dm}^{-3}$ , i početnoj koncentraciji biomase,  $c_{X,0} = 8 \cdot 10^{-2} \text{ g dm}^{-3}$

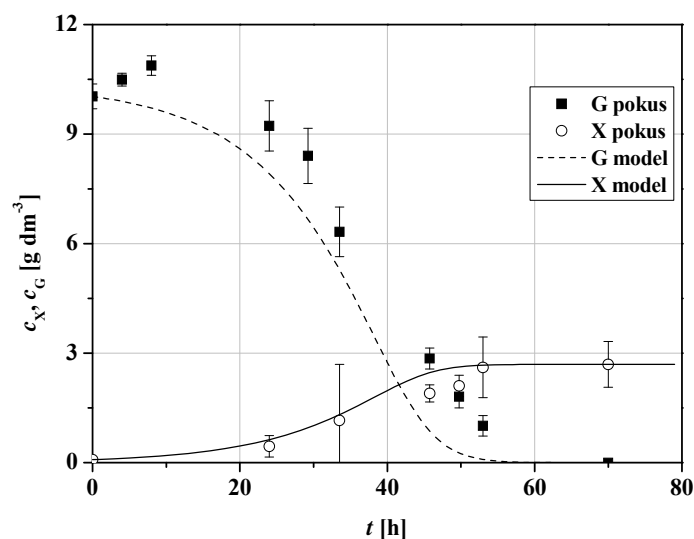
$t$ [h]	$c_X$ [ $\text{g dm}^{-3}$ ]	$c_G$ [ $\text{g dm}^{-3}$ ]
0	0,08	10,03
4,00	-	10,49
8,00	-	10,88
24,00	0,45	9,23
29,25		8,41
33,50	1,15	6,32
45,75	1,81	2,85
49,75	2,10	1,80
53,00	2,61	1,01
70,00	2,69	0

Iz rezultata pokusa izračunato je iskorištenje biomase na glukozu,  $Y_{X/G}$  (jednadžba 2.9), dok su preostali parametri matematičkog modela procesa (jednadžbe 2.14 – 2.21), za rast na glukozu  $\mu_{MAX}^G$  i  $K_S^G$ , procijenjeni iz eksperimentalnih rezultata nelinearnom regresijom koristeći simpleks metodu koja je sadržana u programskom paketu SCIENTIST. Osim procijenjenih vrijednosti parametara modela dan je i interval pouzdanosti za svaki procijenjeni parametar (procjena uz nivo signifikantnosti 0,05). U tablici 4.2. prikazane su vrijednosti izračunatih i procijenjenih parametara modela procesa rasta *Trametes versicolor* na glukozu.

**Tablica 4.2.** Procijenjeni i izračunati parametri matematičkog modela rasta *Trametes versicolor* na glukozi

$\mu_{MAX}^G$ [h <sup>-1</sup> ]	$9,31 \cdot 10^{-2} \pm 1,67 \cdot 10^{-2}$
$K_S^G$ [g dm <sup>-3</sup> ]	$2,72 \pm 1,78$
$Y_{X/G}$ [g g <sup>-1</sup> ]	0,26

Temeljem ovako procijenjenih i izračunatih parametara matematičkog modela rasta *Trametes versicolor* na glukozi provedena je usporedba rezultata pokusa i rezultata simulacije matematičkog modela procesa. Ova usporedba je prikazana na slici 4.1. Pokusi su provedeni paralelno te je za svaku izmjerenu koncentraciju biomase i glukoze prikazan i interval pouzdanosti eksperimentalnih rezultata.



**Slika 4.1.** Usporedba rezultata pokusa i rezultata simulacije matematičkog modela procesa rasta *Trametes versicolor* na glukozi pri početnoj koncentraciji glukoze,  $c_{G,0} = 10 \text{ g dm}^{-3}$ , i početnoj koncentraciji biomase,  $c_{X,0} = 8 \cdot 10^{-2} \text{ g dm}^{-3}$

Iz ove usporedbe je vidljivo da pretpostavljeni jednostavni matematički model procesa rasta *Trametes versicolor* na glukozi dobro opisuje eksperimentalne rezultate, te da su pokusi provedeni uz zadovoljavajuću ponovljivost.

#### 4.2. Procjena parametara matematičkog modela za proces rasta *Trametes versicolor* na fruktozi

Parametri matematičkog modela procesa su procijenjeni iz pokusa provedenog pri početnoj koncentraciji fruktoze  $c_{F,0} = 10 \text{ g dm}^{-3}$  i početnoj koncentraciji biomase  $c_{X,0} = 8 \cdot 10^{-2} \text{ g dm}^{-3}$  (2. pokus). Rezultati pokusa su prikazani u Tablici 4.3.

**Tablica 4.3.** Rezultati pokusa uzgoja *Trametes versicolor* na fruktozi pri početnoj koncentraciji fruktoze,  $c_{F,0} = 10 \text{ g dm}^{-3}$ , i početnoj koncentraciji biomase,  $c_{X,0} = 8 \cdot 10^{-2} \text{ g dm}^{-3}$

$t$ [h]	$c_X$ [ $\text{g dm}^{-3}$ ]	$c_F$ [ $\text{g dm}^{-3}$ ]
0	0,07	10,50
8	-	10,53
24	0,53	9,91
32	1,34	9,67
48	2,46	7,26
56	3,06	7,00
72	2,81	5,29
76	2,37	5,22
80	2,78	5,93

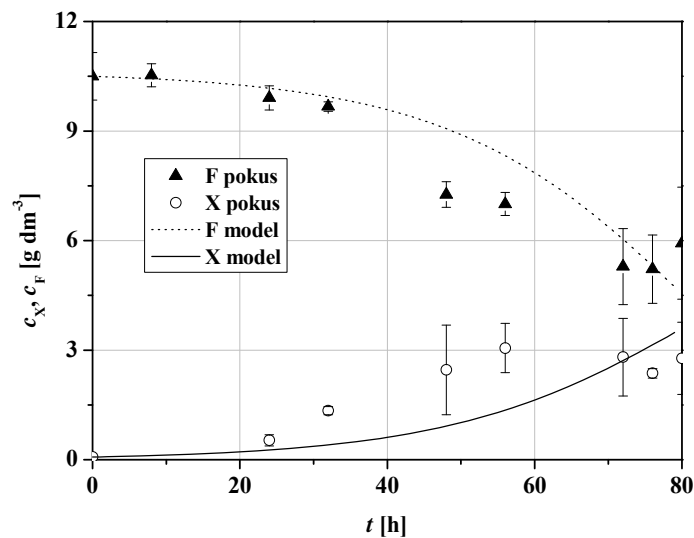
Iz rezultata pokusa izračunato je iskorištenje biomase na fruktozi,  $Y_{X/F}$  (jednadžba 2.9), dok su preostali parametri matematičkog modela procesa (jednadžbe 2.14 – 2.21) za rast na fruktozi,  $\mu_{\text{MAX}}^F$  i  $K_S^F$ , procijenjeni iz eksperimentalnih rezultata nelinearnom regresijom koristeći simpleks metodu koja je sadržana u programskom paketu SCIENTIST. Osim procijenjenih vrijednosti parametara modela dan je i interval pouzdanosti za svaki procijenjeni parametar (procjena uz nivo signifikantnosti 0,05). U tablici 4.4. prikazane su vrijednosti izračunatih i procijenjenih parametara modela procesa rasta *Trametes versicolor* na fruktozi.

**Tablica 4.4.** Procijenjeni i izračunati parametri matematičkog modela rasta *Trametes versicolor* na fruktozi

$\mu_{\text{MAX}}^F$ [ $\text{h}^{-1}$ ]	$0,12 \pm 0,01$
$K_S^F$ [ $\text{g dm}^{-3}$ ]	$12,53 \pm 2,14$
$Y_{X/F}$ [ $\text{g g}^{-1}$ ]	0,59

Temeljem ovako procijenjenih i izračunatih parametara matematičkog modela rasta *Trametes versicolor* na fruktozi je provedena usporedba rezultata pokusa i rezultata simulacije matematičkog modela procesa. Ova usporedba je prikazana na slici 4.2. Pokusi su provedeni

paralelno te je za svaku izmjerenu koncentraciju biomase i fruktoze prikazan i interval pouzdanosti eksperimentalnih rezultata.



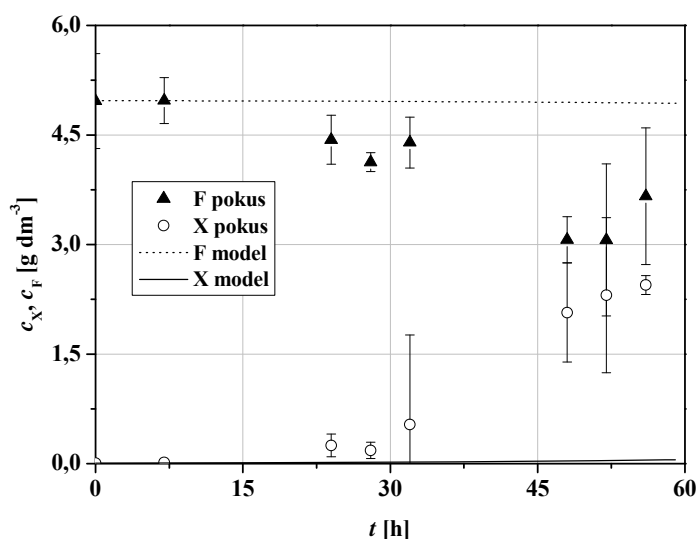
**Slika 4.2.** Usporedba rezultata pokusa i rezultata simulacije matematičkog modela procesa rasta *Trametes versicolor* na glukozi pri početnoj koncentraciji glukoze,  $c_{F,0} = 10 \text{ g dm}^{-3}$ , i početnoj koncentraciji biomase,  $c_{X,0} = 8 \cdot 10^{-2} \text{ g dm}^{-3}$

Iz ove usporedbe je vidljivo da pretpostavljeni jednostavni matematički model procesa rasta *Trametes versicolor* na fruktozi dobro opisuje eksperimentalne rezultate, te da su pokusi provedeni uz zadovoljavajuću ponovljivost.

Prema planu pokusa (tablica 3.2.) provedena je eksperiment (3. pokus) pri različitoj početnoj koncentraciji biomase i fruktoze u svrhu ocjene valjanosti pretpostavljenog matematičkog modela procesa rasta *Trametes versicolor* na fruktozi. Pokus je proveden pri nižoj početnoj koncentraciji fruktoze ( $5 \text{ g dm}^{-3}$ ) i nižoj početnoj koncentraciji biomase ( $8 \cdot 10^{-3} \text{ g dm}^{-3}$ ) kako bi se utvrdila primjenjivost pretpostavljenog modela procesa rasta na fruktozi. U tablici 4.5. su prikazani rezultati ovog pokusa. Usporedba rezultata pokusa sa rezultatima simulacije procesa pomoću pretpostavljenog matematičkog modela prikazana je na slici 4.3. Iskorištenje biomase na fruktozi je izračunato za provedeni pokus i upotrijebljeno pri simulaciji procesa pomoću matematičkog modela.

**Tablica 4.5.** Rezultati pokusa uzgoja *Trametes versicolor* na fruktozi pri početnoj koncentraciji fruktoze,  $c_{F,0} = 5 \text{ g dm}^{-3}$ , i početnoj koncentraciji biomase,  $c_{X,0} = 8 \cdot 10^{-3} \text{ g dm}^{-3}$  ( $Y_{X/G} = 1,28 \text{ g g}^{-1}$ )

$t$ [h]	$c_X$ [ $\text{g dm}^{-3}$ ]	$c_G$ [ $\text{g dm}^{-3}$ ]
0	$8 \cdot 10^{-3}$	4,97
7	0,02	4,97
24	0,25	4,43
28	0,18	4,13
32	0,54	4,40
48	2,07	3,07
52	2,30	3,06
56	2,44	3,66



**Slika 4.3.** Usporedba rezultata pokusa i rezultata simulacije matematičkog modela procesa rasta *Trametes versicolor* na fruktozi pri početnoj koncentraciji fruktoze,  $c_{F,0} = 5 \text{ g dm}^{-3}$ , i početnoj koncentraciji biomase,  $c_{X,0} = 8 \cdot 10^{-3} \text{ g dm}^{-3}$  ( $Y_{X/G} = 1,28 \text{ g g}^{-1}$ )

U ovom pokus nije dobiveno zadovoljavajuće slaganje eksperimentalnih rezultata sa rezultatima simulacije matematičkog modela procesa, unatoč visokoj ponovljivosti rezultata mjerenja dobivenoj u ovom eksperimentu. Razloge prije svega treba tražiti u jednostavnosti matematičkog modela procesa koji ne uzima u obzir nikakve inhibicije (reaktantnom ili produktom) niti uzima u obzir možebitnu proizvodnju primarnih produkata metabolizma. Isto tako model ne predviđa potrošnju supstrata za održavanje metaboličkih funkcija biomase. Stoga su potreban daljnja istraživanja rasta *Trametes versicolor* na fruktozi u širem području



početnih koncentracija biomase, te provedba uzgoja u različitim tipovima bioreaktora kako bi se utvrdila prava kinetika rasta i istražile moguće različite inhibicije.

#### 4.3. Procjena parametara matematičkog modela za biotransformaciju saharoze na glukozu i fruktozu kataliziranu invertazom iz *Trametes versicolor*

Parametri matematičkog modela procesa za biotransformaciju saharoze na glukozu i fruktozu kataliziranu invertazom iz *Trametes versicolor* su procijenjeni iz pokusa provedenog pri početnoj koncentraciji saharoze  $c_{S,0} = 20 \text{ g dm}^{-3}$  i početnoj koncentraciji biomase  $c_{X,0} = 8 \cdot 10^{-2} \text{ g dm}^{-3}$  (4. pokus). Rezultati pokusa su prikazani u Tablici 4.6.

**Tablica 4.6.** Rezultati pokusa uzgoja *Trametes versicolor* na saharozi pri početnoj koncentraciji saharoze,  $c_{S,0} = 20 \text{ g dm}^{-3}$ , i početnoj koncentraciji biomase,  $c_{X,0} = 8 \cdot 10^{-2} \text{ g dm}^{-3}$

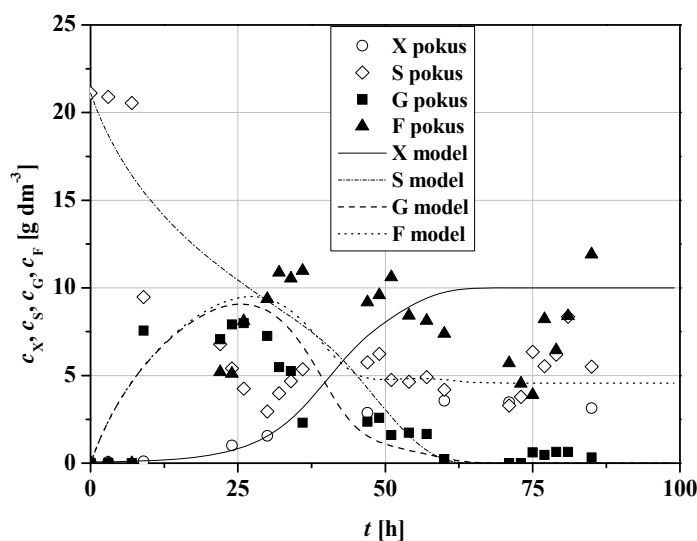
$t$ [h]	$c_X$ [ $\text{g dm}^{-3}$ ]	$c_S$ [ $\text{g dm}^{-3}$ ]	$c_G$ [ $\text{g dm}^{-3}$ ]	$c_F$ [ $\text{g dm}^{-3}$ ]
0	0,07	21,12	0	0
3	0,08	20,90	0	0
7	-	20,55	0	0
9	0,10	9,47	7,56	
22	-	6,79	7,07	5,20
24	1,01	5,40	7,91	5,11
26	-	4,25	7,99	8,11
30	1,56	2,95	7,26	9,37
32	-	3,98	5,48	10,88
34	-	4,67	5,25	10,54
36	-	5,36	2,31	10,98
47	2,87	5,76	2,37	9,19
49	-	6,24	2,58	9,59
51	-	4,75	1,61	10,61
54	-	4,65	1,74	8,43
57	-	4,91	1,66	8,14
60	3,56	4,19	0,24	7,39
71	3,48	3,29	0	5,71
73	-	3,78	0	4,54
75	-	6,35	0,62	3,90
77	-	5,53	0,47	8,22
79	-	6,19	0,64	6,46
81	-	8,35	0,64	8,40
85	3,14	5,51	0,32	11,92

Iz rezultata pokusa provedenog uzgojem *Trametes versicolor* na saharozi procijenjeni su parametri procesa biotransformacije saharoze na glukozu i fruktozu pomoću enzima invertaze (Tablica 4.7.).

**Tablica 4.7.** Procijenjeni i izračunati parametri procesa biotransformacije saharoze na glukozu i fruktozu pomoću enzima invertaze

$V_{MAX}$ [ $\text{g dm}^{-3} \text{h}^{-1}$ ]	0,5
$K_m^S$ [ $\text{g dm}^{-3}$ ]	1,7
$K_I$ [ $\text{g dm}^{-3}$ ]	0,2

Na temelju tako procijenjenih parametara, te prethodno procijenjenih parametara modela vezanih za rast biomase na glukozu i g fruktozi, provedena je ocjena valjanosti matematičkog modela procesa (jednadžbe 2.14 – 2.21). Usporedba rezultata pokusa i rezultata simulacije procesa pomoću pretpostavljenog matematičkog modela su prikazani na slici 4.4.



**Slika 4.4.** Usporedba rezultata pokusa i rezultata simulacije matematičkog modela procesa rasta *Trametes versicolor* na saharozi pri početnoj koncentraciji saharoze,  $c_{S,0} = 20 \text{ g dm}^{-3}$ , i početnoj koncentraciji biomase,  $c_{X,0} = 8 \cdot 10^{-2} \text{ g dm}^{-3}$

Iz ove usporedbe je vidljivo da pretpostavljeni jednostavni matematički model procesa može dobro opisati dinamiku procesa razgradnje saharoze, rasta na glukozu i rasta na fruktozi tijekom uzgoja gljive *Trametes versicolor*. Dodatni pokusi u različitim tipovima reaktora su nužni kako bi se ispitale možebitne inhibicije biotransformacije i rasta na različitim

supstratima reaktantima i produktima u ovome procesu. Potrebno je napomenuti da prilikom postavljanja matematičkog modela procesa nije uzeto u obzir nastajanje različitih produkata primarnog i sekundarnog metabolizma stanica *Trametes versicolor* (aminokiseline, organske kiseline, enzimi), te je to sigurno jedan od razloga nemogućnosti kvantitativnog opisiivanja dinamike promatranog procesa.

## 5. ZAKLJUČAK

Proučavan je rast gljive *Trametes versicolor* na saharozi, glukozu i fruktozu u svrhu razvoja matematičkog modela procesa. Na temelju literaturnih podataka i provedenih eksperimenata šaržnog uzgoja postavljen je matematički model rasta gljive *Trametes versicolor* na saharozi, glukozu i fruktozu.

Iz eksperimentalnih rezultata u uvjetima šaržnog uzgoja procijenjeni su parametri matematičkog modela procesa za rast na glukozu  $\mu_{\text{MAX}}^{\text{G}} = 9,31 \cdot 10^{-2} \text{ h}^{-1}$  i  $K_{\text{S}}^{\text{G}} = 2,72 \text{ g dm}^{-3}$ .

Primjenom iste metodologije procijenjeni su parametri matematičkog modela procesa za rast na glukozu  $\mu_{\text{MAX}}^{\text{F}} = 0,12 \text{ h}^{-1}$  i  $K_{\text{S}}^{\text{F}} = 12,53 \text{ g dm}^{-3}$  u uvjetima šaržnog uzgoja.

Iz pokusa provedenog uzgojem *Trametes versicolor* na saharozi procijenjeni su parametri biotransformacije saharoze na glukozu i fruktozu pomoću enzima invertaze  $V_{\text{MAX}} = 0,5 \text{ g dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ ,  $K_{\text{m}}^{\text{S}} = 1,7 \text{ g dm}^{-3}$  i  $K_{\text{I}} = 0,2 \text{ g dm}^{-3}$ .

Provedena je usporedba rezultata pokusa sa rezultatima simulacije procesa pomoću pretpostavljenog matematičkog modela, te je dobiveno dobro slaganje u uskom području početnih koncentracija biomase od  $0,08 \text{ g dm}^{-3}$ . Za pokuse provedene pri nižim početnim koncentracijama biomase od  $0,008 \text{ g dm}^{-3}$  model nije mogao kvantitativno opisati dinamičku promjenu koncentracije komponenata reakcijske smjese.

U svim provedenim pokusima dobivena je visoka ponovljivost eksperimentalnih rezultata u provedenim paralelnim pokusima.

## 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](http://www.pharma.hr)
15. **Pušelja D.:** [www.puseljadejan.com/lignin](http://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
25. **Zelić B.:** Razvoj kinetičkog modela biokonverzije glukoze u 2,5 –diketo-D-glukonsku kiselinu. magistarski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 1999
26. **Pilaš J.:** Proizvodnja lakaze uzgojem *Trametes versicolor* na otpadu industrije pulpe i papira, diplomski rad, Zagreb, 2009

## 7. POPIS SIMBOLA I SKRAĆENICA

### 7.1. Simboli

$c$	koncentracija, $\text{g dm}^{-3}$
$c_x$	koncentracija biomase, $\text{g dm}^{-3}$
$c_S$	koncentracija supstrata, $\text{g dm}^{-3}$
$c_G$	koncentracija glukoze, $\text{g dm}^{-3}$
$c_F$	koncentracija fruktoze, $\text{g dm}^{-3}$
$c_{X0}$	početna koncentracija biomase, $\text{g dm}^{-3}$
$c_{S0}$	početna koncentracija saharoze, $\text{g dm}^{-3}$
$c_{G0}$	početna koncentracija glukoze, $\text{g dm}^{-3}$
$c_{F0}$	početna koncentracija fruktoze, $\text{g dm}^{-3}$
$p$	tlak, bar
$t$	vrijeme, h
$T$	temperatura, $^{\circ}\text{C}$
$r_A$	brzina reakcije, $\text{m s}^{-1}$
$K_m^S$	Michealis Mentenčina konstanta, $\text{g dm}^{-3}$
$K_I^S$	konstanta inhibicije supstratom, $\text{g dm}^{-3}$
$K_I^P$	konstanta inhibicije produktom, $\text{g dm}^{-3}$
$V_{MAX}$	maksimalna brzina reakcije, $\text{g dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$
$Y_{X/G}$	iskorištenje biomase na glukozi, $\text{g g}^{-1}$
$Y_{X/F}$	iskorištenje biomase na fruktozi, $\text{g g}^{-1}$

#### 7.1.1. Grčki simboli

$\gamma$	masena koncentracija, $\text{g dm}^{-3}$
$\mu$	specifična brzina reakcije, $\text{h}^{-1}$
$\mu_G$	specifična brzina rasta biomase na glukozi, $\text{h}^{-1}$
$\mu_F$	specifična brzina rasta biomase na fruktozi, $\text{h}^{-1}$
$\mu_{max}^F$	specifična maksimalna brzina rasta biomase na fruktozi, $\text{h}^{-1}$
$\mu_{max}^G$	specifična maksimalna brzina rasta biomase na glukozi, $\text{h}^{-1}$

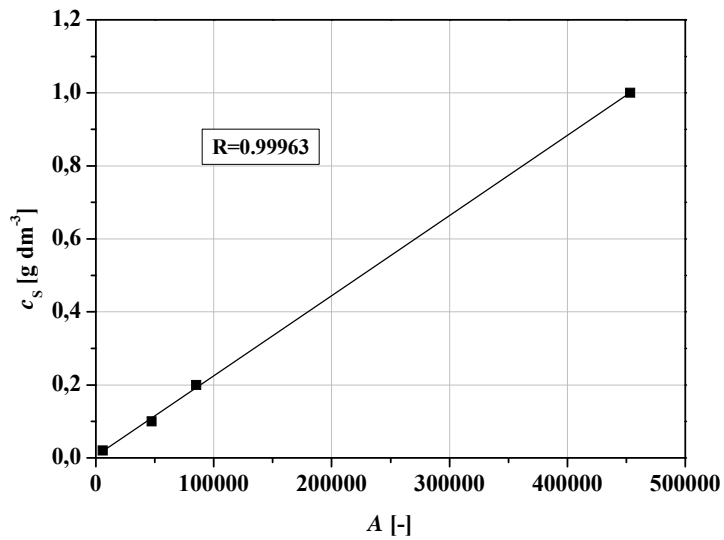
**7.1.2. Skraćenice**

G	glukoza
F	fruktoza
S	saharoza
X	biomasa



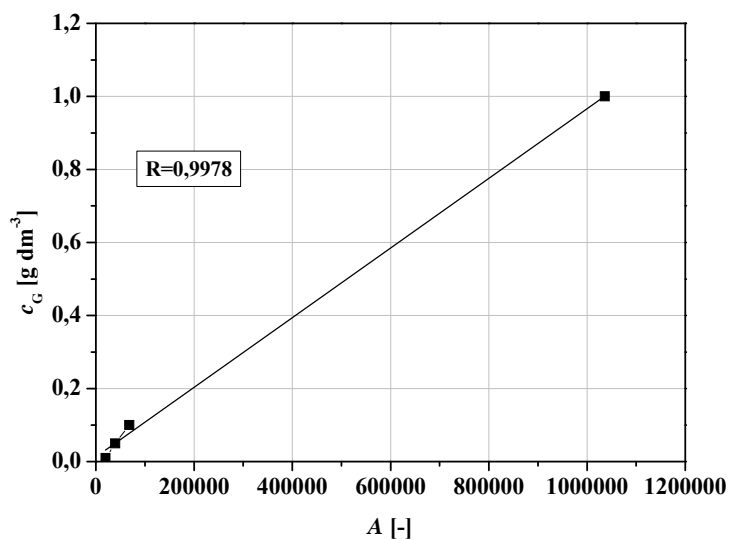
## 8.PRILOZI

Prilog 1.



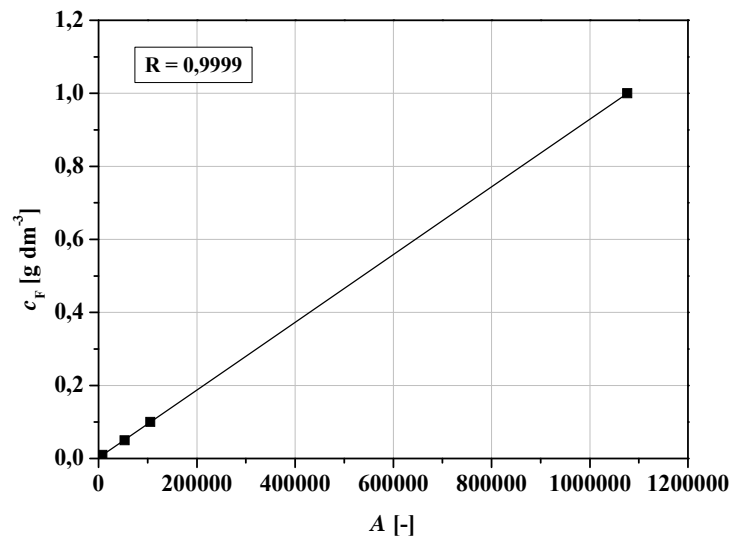
Slika 8.1. Baždarni pravac za određivanje koncentracije saharoze

Prilog 2.



Slika 8.2. Baždarni pravac za određivanje koncentracije glukoze

## Prilog 3.



Slika 8.3. Baždarni pravac za određivanje koncentracije fruktoze

## ŽIVOTOPIS

Miroslava Radečić rođena je 22.07.1985. u Karlovcu. Osnovnu školu "Slava Raškaj" završava u Oslju 1999. godine. U Karlovcu je završila Opću Gimnaziju. 2003. godine upisuje Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije. Sudjelovala je sa temom "Optimiranje enzimatskog procesa likvefakcije i saharifikacije škroba" na susretu studenata i profesora na temu "Primjenjena biokataliza" u Zagrebu. U Mariboru sudjeluje na susretu profesora i studenata na temu "Primjenjena biokataliza" sa temom "Razvoj kinetičkog modela rasta *Trametes versicolor* na glukozi i saharozi". Govori engleski, njemački i talijanski jezik. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije završava 2009. godine.