

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

Smjer: Inženjerstvo u zaštiti okoliša

Tajana Mlinarek

RAZVOJ KINETIČKOG MODELA RASTA
Trametes versicolor NA GLUKOZI

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 se svom mentoru dr.sc. Bruni Zeliću koji mi je svojim stručnim znanjem, brojnim savjetima i velikoj pomoći omogućio izradu ovoga rada.

Posebno se zahvaljujem mr.sc. Marini Tišmi na velikoj pomoći prilikom izvođenja eksperimenta te obrade rezultata.

Najveća zahvala ide mojim roditeljima i bratu Davoru za svu pomoć i podršku pruženu tijekom školovanja.

Zahvaljujem se svojim kolegama na ugodnom prijateljstvu i kolegici Miroslavi Radečić na prijateljstvu i pomoći tijekom izrade ovoga rada.

SAŽETAK

Trametes versicolor je gljiva bijelog truljenja, poznata kao producent lignolitičkih enzima. Iako postoji veliki interes za industrijsku primjenu ovih enzima i različitih gljiva koje ih proizvode, u literaturi nema mnogo podataka kinetike rasta producenata lignolitičkih enzima.

U ovom je radu proveden proces uzgoja gljive *Trametes versicolor* na glukozi, u svrhu razvoja matematičkog modela procesa rasta. Cilj provedenih pokusa bio je ispitati utjecaj različitih procesnih uvjeta, početne koncentracije glukoze i početne koncentracije biomase, na kinetiku rasta *Trametes versicolor*. U svakoj točki plana pokusa provedeni su paralelni eksperimenti kako bi se utvrdila ponovljivost eksperimentalnih rezultata.

Postavljen je jednostavni matematički model procesa koji se sastojao od Monodovog kinetičkog modela rasta biomase i bilance tvari za biomasu i glukozu. Iz eksperimentalnih rezultata procijenjeni su parametri matematičkog modela procesa $\mu_{\text{MAX}} = 9,31 \cdot 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ i $K_S = 2,72 \text{ g dm}^{-3}$. Ocjene valjanosti pretpostavljenog matematičkog modela procesa je provedena pri različitim početnim koncentracijama biomase i glukoze, te je ustanovljeno da model zadovoljavajuće opisuje dinamiku procesa za različite početne uvjete. U svim pokusima postignuta je visoka ponovljivost eksperimentalnih rezultata.

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

SUMMARY

Trametes versicolor is white-rot fungi, known as a producer of lignolytic enzymes. Although there is a huge interest for industrial application of this fungus and its enzymes, there is not many literature data about the kinetic of growth of *Trametes versicolor* and enzyme production.

In this work the process of growing mushrooms *Trametes versicolor* on glucose was carried out. The main goal was to develop mathematical model of biomass growth. The aim of conducted experiments was to examine the influence of different process conditions, the initial concentration of glucose and the initial concentration of biomass, respectively, on the growth kinetics of *Trametes versicolor*. In each point of the experimental plan parallel experiments were carried out in order to determine reproducibility of experimental results.

Simple mathematical model of the process, consisted of Monod kinetic model for biomass growth and material balances for biomass and glucose, was developed. From the experimental results model parameters $\mu_{MAX} = 9,31 \cdot 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ i $K_S = 2,72 \text{ g dm}^{-3}$ were estimated. Validation of mathematical model of the process was conducted at different initial concentrations of biomass and glucose, and it is found that the model satisfactorily describes the dynamics of the process for different initial conditions.

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

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	3
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 gljiva	6
2.4.2. Ishrana i metabolizam gljiva	7
2.4.3. Razmnožavanje gljiva	7
2.4.4. Klasifikacija gljiva	8
2.4.5. Gljive bijelog truljenja	9
2.4.5.1. <i>Trametes versicolor</i>	9
2.5. Enzimi	10
2.5.1. Struktura enzima	11
2.5.2. Nomenklatura i podjela enzima	11
2.5.3. Lakaze	11
2.5.3.1. Rasprostranjenost i fiziološka svojstva lakaza	11
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	14
2.6.2. Rast biomase u uvjetima šaržnog uzgoja	15
2.6.3. Matematički mode mikrobnog procesa	16
2.6.3.1. Kinetički model rasta biomase	17
2.6.3.2. Bilanca tvari mikrobnog procesa u kotlastom reaktoru	18
2.7. Matematički model rasta <i>Tramete versicolor</i> na glukozi	19
3. MATERIJALI I METODE	21
3.1. Materijali	21

3.1.1. Mikroorganizam	21
3.1.2. Kemikalije	21
3.1.3. Priprema krute hranjive podloge za čuvanje gljive	21
3.1.4. Priprema i sterilizacija hranjive podloge za pripremu inokuluma	22
3.1.5. Priprema hranjive podloge za uzgoj micelijskih peleta	22
3.1.6. Priprema ostalih otopina.....	23
3.2. Aparature.....	23
3.2.1. Spektrofotometar.....	23
3.2.2. Tresilica.....	24
3.2.3. Centrifuga.....	24
3.2.4. Autoklav	25
3.3. Analitičke metode	25
3.3.1. Određivanje koncentracije glukoze.....	25
3.3.2. Određivanje koncentracije biomase	27
3.4. Provedba pokusa	27
3.5. Obrada podataka.....	29
4. REZULTATI I RASPRAVA	30
4.1. Procjena parametra matematičkog modela procesa rasta <i>Trametes versicolor</i> na glukozi.....	30
4.2. Ocjena valjanosti matematičkog modela procesa rasta <i>Trametes versicolor</i>	32
5. ZAKLJUČAK.....	38
6. LITERATURA.....	39
7. POPIS SIMBOLA.....	41
7.1. Simboli.....	41
7.1.1. Grčki simboli.....	41
7.2. Skraćenice.....	41
8. PRILOZI.....	43

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 alternative (referenca?).

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.

Rast svih mikroorganizama te stoga i gljiva podijeljen je u nekoliko faza. Period indukcije (*lag phase*) predstavlja period tijekom kojeg se gljivične stanice i njene spore prilagođavaju novoj sredini. Privikavanje uključuje formiranje enzima i intermedijera za podržavanje rasta. Dužina ove faze ne ovisi samo o fiziološkom stanju gljive nego o morfologiji i stupnju inokuluma. Slijedi eksponencijalni rast stanice (*exponential growth*), 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 (*stationary phase*) stanice poprimaju maksimalnu veličinu i volumen populacije je najveći. Stacionarna faza može biti definirana kao ravnoteža između smanjenja i povećanja mase.

U ovom radu je provedena serija eksperimenata pri različitim početnim koncentracijama biomase i glukoze u svrhu ocjene valjanosti pretpostavljenog matematičkog modela procesa rasta *Trametes versicolor* na glukozi. Ispitivano je široko područje početnih koncentracija glukoze i početnih koncentracija biomase kako bi se utvrdila primjenjivost pretpostavljenog jednostavnog modela procesa. Uspoređeni su rezultati pokusa sa rezultatima simulacije procesa pomoću pretpostavljenog matematičkog modela. Izračunato je iskorištenje biomase na glukozi za svaki od provedenih pokusa i upotrijebljeno pri simulaciji procesa pomoću matematičkog modela. Na temelju eksperimentalnih podataka koji su dobiveni kao ovisnost koncentracije biomase i glukoze procijenjeni su parametri matematičkog modela procesa (μ_{MAX} i K_S).

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

Bioproces je 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 bioprocasa

Bioprocesi se mogu promatrati kao skup pojedinačnih bioprocasa (biotehnologije) ili kao jedan proces. Prema tome postoji bioprocasa je moguće podijeliti na nekoliko načina.

Ako se bioprocesi 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.

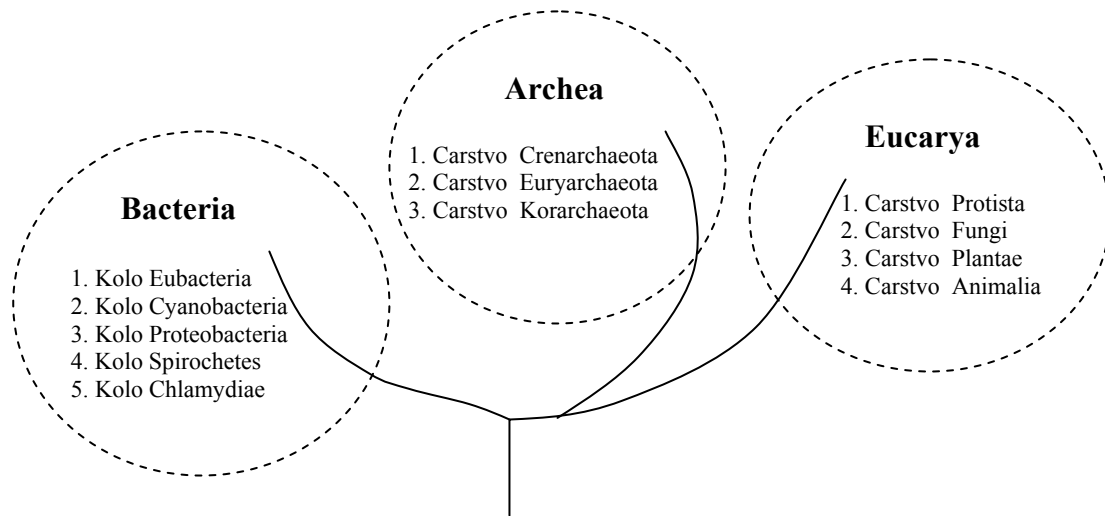
U tako malih organizama odnos između površine i volumena stanice je vrlo velik zbog čega je i velika naizmjenična reakcija s okolišem, što je i osnova za veliku brzinu izmjene tvari u mikroorganizama. Naime, što je stanica manja, to je njezina površina veća u usporedbi s masom, a time je i brža apsorpcija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

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 gljiva

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 gljiva

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.

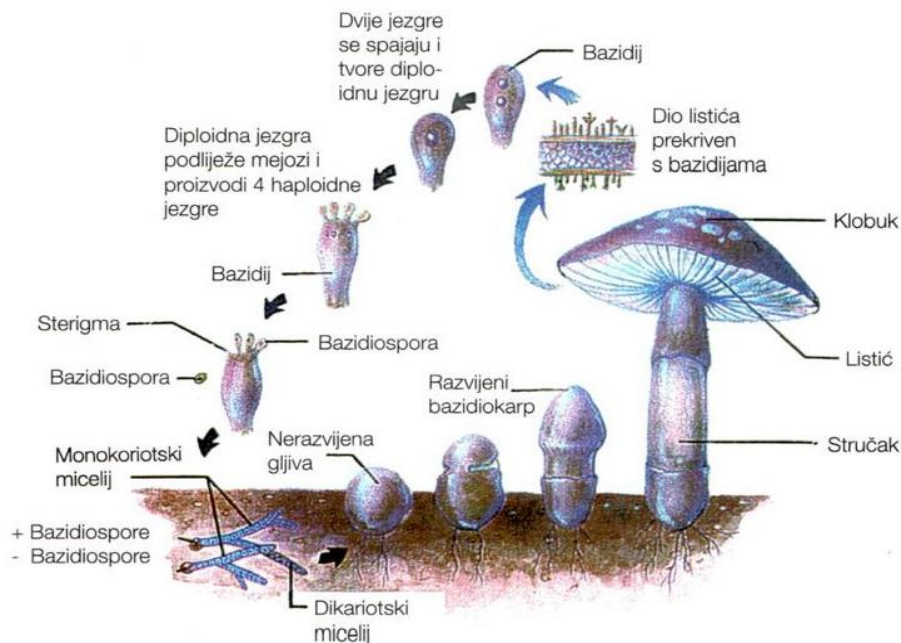
Spolno razmnožavanje u gljiva uključuje spajanje primjerenih jezgara. Neke vrste gljiva su samooplodive i tvore kompatibilne gamete na istom miceliju. Druge vrste zahtijevaju vanjsko križanje između različitih, ali spolno skladnih micelija. Spolno razmnožavanje također može dovesti do tvorbe spora jer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

2.5. 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 ne promijenjeni 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:

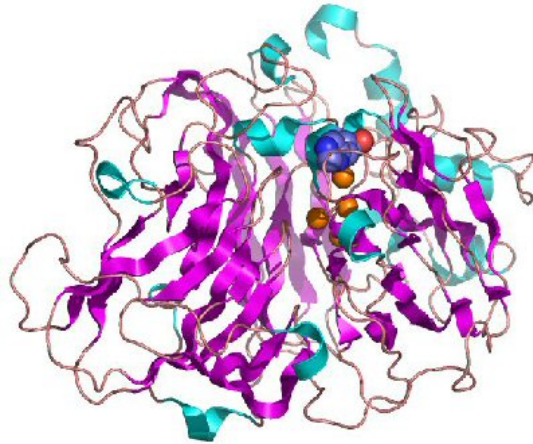
- oksidoreduktaze ubrzavaju reakcije oksidacije i redukcije,
- transferaze sudjeluju u prijenosu raznih atomskih grupa,
- hidrolaze sudjeluju u reakcijama hidrolize,
- liaze sudjeluju u stvaranju i cijepanju dvostrukih veza,
- izomeraze prevode izomere iz jednog oblika u drugi,
- ligaze sudjeluju u reakcijama 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 2.3.). 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 2.3. Pojednostavljeni prikaz strukture lakaze porijeklom iz *Trametes versicolor*

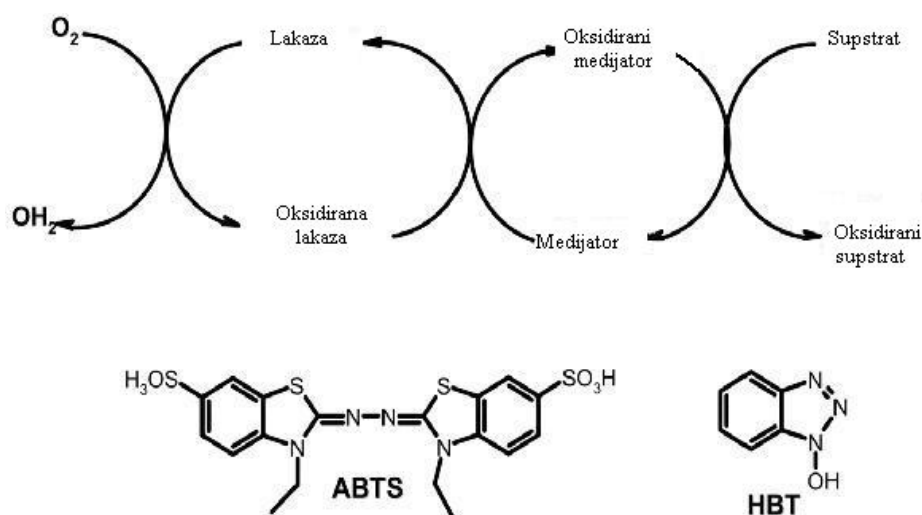
Fiziološka funkcija lakaza je brojna. Poznato je da sudjeluju u morfogenezi mikroorganizama domaćina, primjerice u razvoju spora kod gljiva, te u procesu nastajanja melanina, oksidaciji voća i povrća, zaštiti biljaka protiv kukaca i mikroorganizama. Nadalje, lakaze kataliziraju biorazgradnju lignina 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 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)specifičnosti prema točno određenom supstratu, lakaze ne pokazuju to svojstvo, već) (Slika 2.4.). 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 2.4. 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

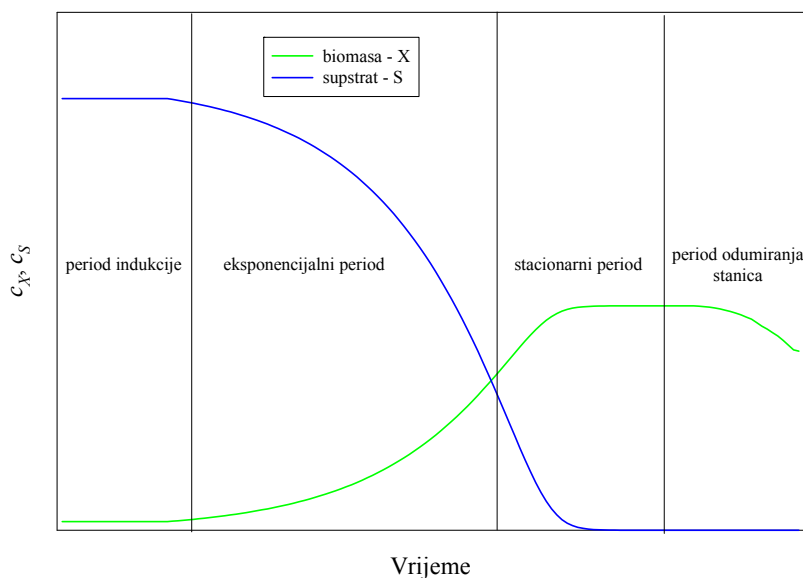
hranjive podloge ograničiti količinu komponenata neophodnih za rast. Hranjiva podloga se može podijeliti, prema svom sastavu na sintetsku i kompleksnu hranjivu podlogu.

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 2.5.



Slika 2.5. Uobičajene faze rasta biomase u uvjetima šaržnog uzgoja

Prvi period koji se javlja, a u kojem se ne mijenja broj stanica biomase, naziva se period indukcije (*lag phase*). 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 nacijspljenog mikroorganizma;
- broj stanica;
- uvjeti provedbe bioprocesa (pH, temperatura);
- vrsta produkata metabolizma mikroorganizama.

Sljedeći period je eksponencijalni rast stanice (*exponential growth*), 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 (*stationary phase*) stanice poprimaju maksimalnu veličinu i volumen populacije je najveći. Taj period nastupa kada koncentracija neke od komponenata neophodnih 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. Priliko postavljanja matematičkog modela bioprocesa najčešće se uzimaju u obzir sljedeće 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 bioprocesa izvode samo na osnovu bilance tvari.

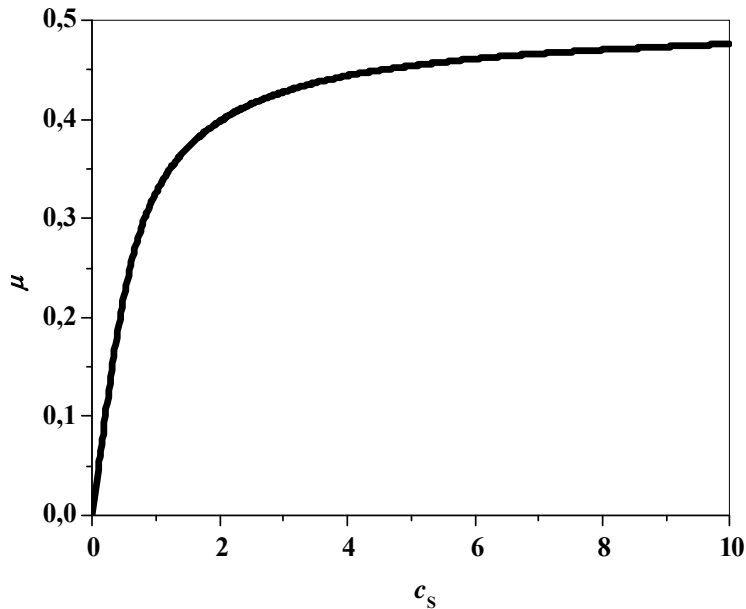
2.6.3.1. Kinetički model rasta biomase

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 svojim svojstvima

Jedan od najpoznatijih ne strukturnih modela definirao je Monod (jednadžba 2.1). Njegov model daje funkcionalnu ovisnost specifične brzine rasta biomase (μ [h^{-1}]) o koncentracije supstrata (c_S [g dm^{-3}]), a dan je izrazom:

$$\mu = \mu_{\text{MAX}} \cdot \frac{c_S}{K_S + c_S} \quad 2.1$$

gdje je μ_{MAX} maksimalna specifična brzina rasta biomase [h^{-1}], a K_S konstanta zasićenja supstratom [$g\ dm^{-3}$]. 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. 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 [$g\ dm^{-3}$] (jednadžba 2.2):

$$\frac{dc_X}{dt} = \mu \cdot c_X \quad 2.2$$

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 2.3.):

$$\frac{dc_S}{dt} = -r_S \cdot c_X \quad 2.3$$

pri čemu je r_S [h^{-1}] 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 2.4):

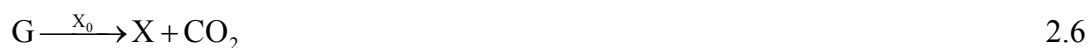
$$\frac{dc_S}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \mu \cdot c_X \quad 2.4$$

pri čemu je $Y_{X/S}$ [g g^{-1}] iskorištenje biomase na supstratu, i predstavlja omjer između prirasta koncentracije biomase i potrošnje supstrata tijekom provedbe mikrobiološkog procesa (jednadžba 2.5).

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta c_X}{\Delta c_S} \quad 2.5$$

2.7. MATEMATIČKI MODEL RASTA *TRAMETES VERSICOLOR* NA GLUKOZI

Na temelju raspoloživih literaturnih podataka i saznanja prikupljenih pokusima u kotlastom reaktoru postavljen je matematički model rasta *Trametes versicolor* na glukozi. Pretpostavljeno je da se rast biomase, X, može opisati Monodovim kinetičkim modelom rasta (jednadžba 2.7), te da se supstrat, glukoza, G, troši isključivo za rasta stanica biomase, pri čemu ne dolazi do nastajanja niti jednog produkta primarnog metabolizma stanica biomase osim ugljičnog dioksida. Pojednostavljena reakcijska shema ovoga procesa prikazana je jednadžbom 2.6 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 glukozi (jednadžbe 2.7 - 2.9):

$$\mu = \mu_{\text{MAX}} \cdot \frac{c_G}{K_S + c_G} \quad 2.7$$

$$\frac{dc_X}{dt} = \mu \cdot c_X \quad 2.8$$

$$\frac{dc_G}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/G}} \cdot \mu \cdot c_X \quad 2.9$$

pri čemu su c_G , koncentracija glukoze [g dm^{-3}] i $Y_{X/G}$ iskorištenje biomase na glukozi [g g^{-1}].

3. MATERIJALI I METODE

Proizvodnja gljive bijelog truljenja *Trametes versicolor* provedena je u anaerobnim uvjetima u šaržnim pokusima na tresilici. Pokus je trajao tri dana. Kao osnovni element hranjive podloge i izvor ugljika korištena je glukoza. Praćene su promjene koncentracije glukoze (spektrofotometrijski) i biomase.

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), pepton (Pliva), kvašćev ekstrakt (Pliva), KH_2PO_4 (Sigma -Aldrich), Na_2HPO_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 cm^3 vode. Oko 5 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 cm³ hranjive podloge (Tablica 3.1.) u tikvicama volumena 500 cm³. 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	Koncentracija, γ [g dm ⁻³]
Glukoza	5
Pepton	0,8
Kvašćev ekstrakt	2
KH ₂ PO ₄	1,6
Na ₂ HPO ₄	0,4
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	1
CaCl ₂ * 7H ₂ O	0,1
Limunska kiselina	0,3

3.1.5. Priprema hranjive podloge za uzgoj micelijskih peleta

Pripremljeno je 100 cm³ hranjive podloge (Tablica 3.2.) u Erlenmeyerovim tikvicama ($V = 500$ cm³) i sterilizirano 30 minuta pri temperaturi $T = 121$ °C i tlaku $p = 0,6-0,8$ bar.

Tablica 3.2. Sastav hranjive podloge za uzgoj micelijskih peleta

Komponenta	Koncentracija, γ [g dm ⁻³]
Pepton	0,2
Kvašćev ekstrakt	0,3
KH ₂ PO ₄	0,8
Na ₂ HPO ₄	0,2
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,5

Pokusi su provedeni pri tri različite početne koncentracije glukoze 5, 10 i 20 g dm⁻³.

3.1.6. Priprema ostalih otopina

Pripremljene su:

- otopine glukoze koncentracije $\gamma = 5$ g dm⁻³, 10 g dm⁻³ i 20 g dm⁻³ koje su korištene za izradu baždarnog pravca pomoću kojeg su određivane nepoznate koncentracije glukoze u uzorcima.

3.2. APARATURE

3.2.1. Spektrofotometar

Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije glukoze je provedeno na dvozračnom spektrofotometru (UV-1800, Shimadzu, Kyoto, Japan, Slika 3.2.).



Slika 3.2. Spektrofotometar

3.2.2. Tresilica

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



Slika 3.3. Tresilica

3.2.3. Centrifuga

Uzorci su centrifugirani na stojećoj, horizontalnoj centrifugi Centric 150 proizvođača TEHNICA (Slovenija) pri $n = 9000 \text{ min}^{-1}$ (Slika 3.4.).



Slika 3.4. Centrifuga

3.2.4. Autoklav

Za sterilizaciju Erlenmeyerovih tikvica, potrebnog laboratorijskog posuđa i hranjivih podloga korišten je autoklav (Sutjeska, Slika 3.5.). Sterilizacija je provođena suhim vrućim zrakom pri $T = 121\text{ }^{\circ}\text{C}$, tlaku $p = 0,6 - 0,8\text{ bara}$ u trajanju od 30 minuta.



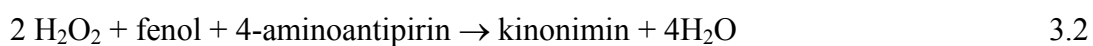
Slika 3.5. Autoklav

3.3. ANALITIČKE METODE

Tijekom procesa proizvodnje uzgoja gljive *Trametes versicolor* su praćene koncentracija glukoze i biomase. Koncentracija glukoze je određivana spektrofotometrijski.

3.3.1. Određivanje koncentracije glukoze

Glukoza u uzorcima je određivana primjenom kolorencijske (PAP) metode koja se temelji na slijedećim reakcijama (jednadžbe 3.1 i 3.2):



Kinonimin daje crveno obojenje otopini koje apsorbira svjetlo u vidljivom području spektra na valnoj duljini $\lambda = 500 \text{ nm}$ (Slika 3.6.). 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. Tako dobiveni kapljevinski ostatak je korišten za određivanje koncentracije glukoze.



Slika 3.6. 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 $t = 20 - 25 \text{ }^\circ\text{C}$. 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.

Tablica 3.3. Sastav otopine u kivetu 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

Po dodatku svih komponenata spektrofotometrijskog PAP testa u kivetu, sadržaj kivete se promiješa na vorteksu i ostavi inkubirati 30 min na sobnoj temperaturi, nakon čega se izmjeri apsorbancija. Koncentracija nepoznatog uzorka se određuje pomoću baždarnog pravca (Prilog 1.) kojega je potrebno napraviti prije svakog određivanja koncentracije glukoze u nepoznatom uzorku.

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, $\varnothing = 110$ 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 $T = 27$ °C i broju okretaja tresilice $n = 140 \text{ min}^{-1}$ i trajao je 3 dana. Uzgojeni micelijski peleti gljive 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, $c_{X,0}$, i glukoze, $c_{G,0}$ prema planu pokusa prikazanom u tablici 3.4.

Tablica 3.4. Početne koncentracije biomase i glukoze u pokusima analize rasta *Trametes versicolor* na glukozi

Pokus	$c_{X,0}$ [g dm ⁻³]	$c_{G,0}$ [g dm ⁻³]
1	$8 \cdot 10^{-2}$	10,0
2	$8 \cdot 10^{-2}$	20,0
3	$1 \cdot 10^{-1}$	2,5
4	$5 \cdot 10^{-3}$	10,0
5	$1 \cdot 10^{-3}$	10,0

Pripremljeno je 50 cm³ hranjive podloge i sterilizirano u autoklavu 30 minuta pri $T = 121$ °C i tlaku $p = 0,6 - 0,8$ 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 glukoze uzimani su svaka 4 sata, u sterilnim uvjetima, injekcijom kroz septum tikvice (Slika 3.7.). Nakon uzimanja, uzorci su centrifugirani, a iz kapljevinog ostatka je određivana koncentracija glukoze.



Slika 3.7. Postupak sterilnog uzimanja uzoraka

Uzorci za određivanje koncentracije biomase uzimani su u nepravilnim vremenskim intervalima koji su ovisili o dinamici potrošnje glukoze. 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 prikazan je 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 matematičkog modela procesa su procijenjeni iz pokusa provedenog pri početnoj koncentraciji glukoze, $c_{G,0} = 10 \text{ g dm}^{-3}$, i početnoj koncentraciji biomase $c_{X,0} = 8 \cdot 10^{-2} \text{ g dm}^{-3}$. Ocjena valjanosti procijenjenih parametara matematičkog modela procesa je provedena u pokusima provedenim pri različitim početnim koncentracijama glukoze, te za različite početne koncentracije biomase, prema planu pokusa danom u tablici 3.4.

4.1. PROCJENA PARAMETARA MATEMATIČKOG MODELA PROCESA RASTA *Trametes versicolor* NA GLUKOZI

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 $c_{X,0} = 8 \cdot 10^{-2} \text{ g dm}^{-3}$ (Pokus 1). Rezultati pokusa su prikazani u Tablici 4.1.

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

t [h]	c_X [g dm ⁻³]	c_G [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

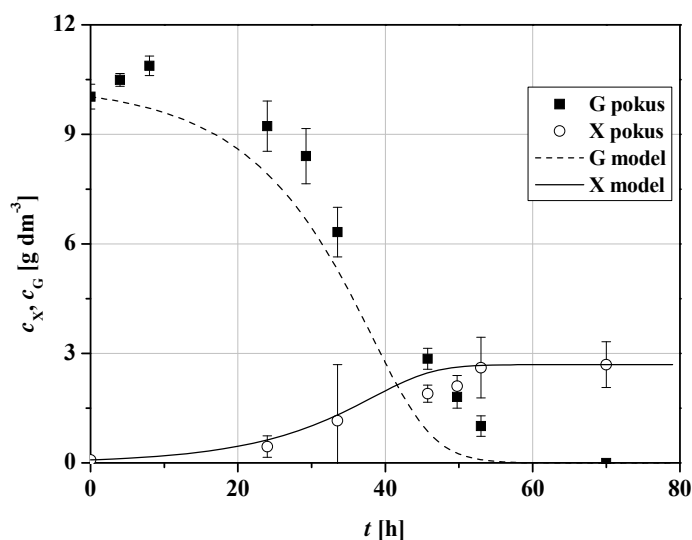
Iz rezultata pokusa izračunato je iskorištenje biomase na glukozi, $Y_{X/G}$ (jednadžba 2.5), dok su preostali parametri matematičkog modela procesa (jednadžbe 2.7 – 2.9), μ_{MAX} i K_S , procijenjeni iz eksperimentalnih rezultata nelinearnom regresijom koristeći simpleks metodu

koja je sadržana u programskom paketu SCIENTIST. Osim procijenjenih vrijednosti parametara modela dan je i interval pouzdanosti za svaki procijenjeni parametar (procijena uz nivo signifikantnosti 0,05). U tablici 4.2. prikazane su vrijednosti izračunatih i procijenjenih parametara modela procesa rasta *Trametes versicolor* na glukozi.

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

μ_{MAX} [h ⁻¹]	$9,31 \cdot 10^{-2} \pm 1,67 \cdot 10^{-2}$
K_S [g dm ⁻³]	$2,72 \pm 1,78$
$Y_{X/S}$ [g g ⁻¹]	0,26

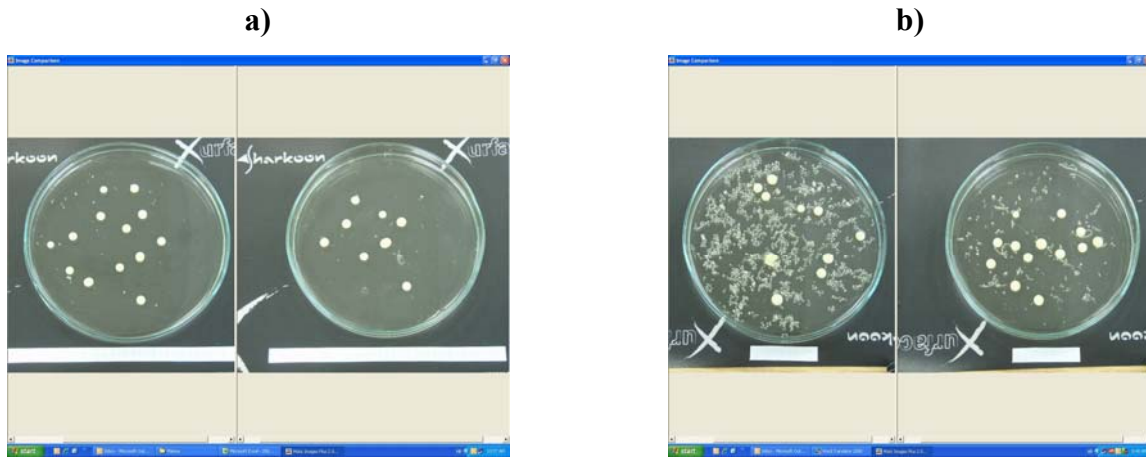
Temeljem ovako procijenjenih i izračunatih parametara matematičkog modela rasta *Trametes versicolor* na glukozi provedena je usporedba rezultata pokusa i rezultata simulacije matematičkog modela procesa. Ova usporedba je prikazana na slici 4.1. Pokusi su provedeni paralelno te je za svaku izmjerenu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

Na slikama 4.2.a i 4.2.b su prikazane i slike biomase u različitim fazama rasta (nakon 24 i 48 h sati uzgoja). Vidljivo je povećanje broja micelijskih peleta, odnosno rast biomase u paralelnim pokusima, te široka distribucija veličina micelijskih peleta.



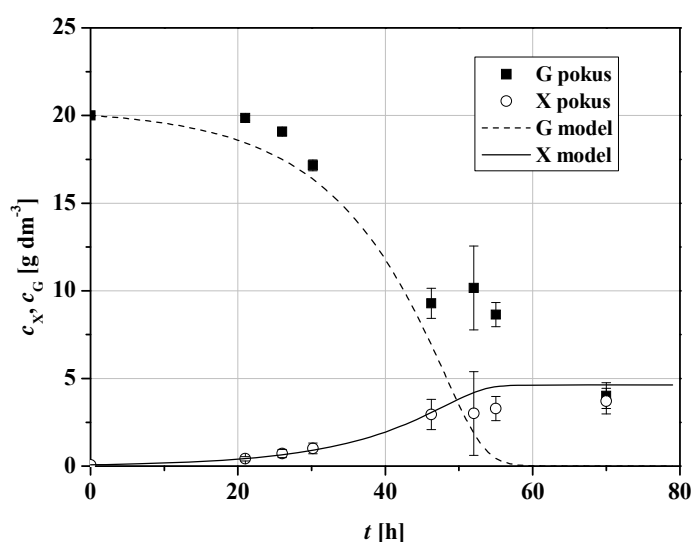
Slika 4.2. Biomasa u različitim fazama rasta; a) nakon 24 sata uzgoja i b) nakon 48 sati uzgoja

4.2. OCJENA VALJANOSTI MATEMATIČKOG MODELA PROCESA RASTA *Trametes versicolor* NA GLUKOZI

Prema planu pokusa (tablica 3.4.) provedena je serija eksperimenata pri različitim početnim koncentracijama biomase i glukoze u svrhu ocjene valjanosti pretpostavljenog matematičkog modela procesa rasta *Trametes versicolor* na glukozi. Ispitivano je široko područje početnih koncentracija glukoze ($2,5 - 20 \text{ g dm}^{-3}$) i početnih koncentracija biomase ($1 \cdot 10^{-3} - 1 \cdot 10^{-1} \text{ g dm}^{-3}$) kako bi se utvrdila primjenjivost pretpostavljenog jednostavnog modela procesa. U tablicama 4.3. – 4.6. su prikazani rezultati ovih pokusa. Usporedba rezultata pokusa sa rezultatima simulacije procesa pomoću pretpostavljenog matematičkog modela prikazana je na slikama 4.3. – 4.6. Iskorištenje biomase na glukozi izračunato je za svaki od provedenih pokusa i upotrijebljeno pri simulaciji procesa pomoću matematičkog modela.

Tablica 4.3. Rezultati pokusa uzgoja *Trametes versicolor* na glukozi pri početnoj koncentraciji glukoze, $c_{G,0} = 20 \text{ g dm}^{-3}$, i početnoj koncentraciji biomase, $c_{X,0} = 8 \cdot 10^{-2} \text{ g dm}^{-3}$ ($Y_{X/G} = 0,23 \text{ g g}^{-1}$)

t [h]	c_X [g dm^{-3}]	c_G [g dm^{-3}]
0,00	0,08	20,00
21,00	0,41	19,86
26,00	0,71	19,08
30,17	1,00	17,16
46,25	2,94	9,29
52,00	3,00	10,16
55,00	3,28	8,65
70,00	3,71	4,02



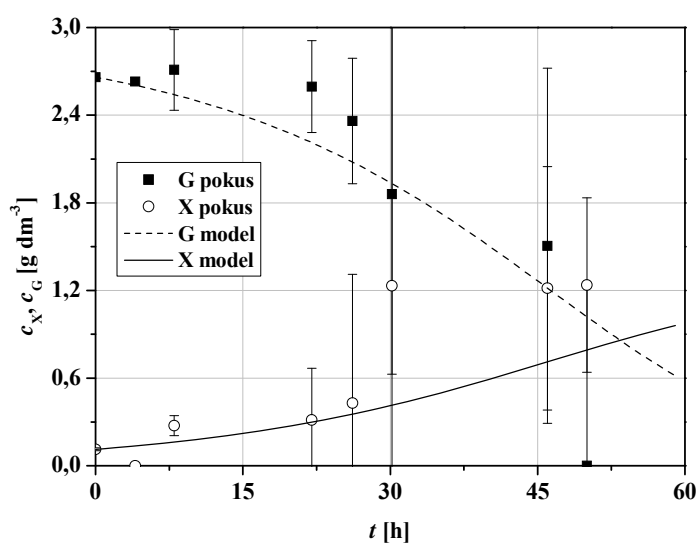
Slika 4.3. Usporedba rezultata pokusa i rezultata simulacije matematičkog modela procesa rasta *Trametes versicolor* na glukozi pri početnoj koncentraciji glukoze, $c_{G,0} = 20 \text{ g dm}^{-3}$, i početnoj koncentraciji biomase, $c_{X,0} = 8 \cdot 10^{-2} \text{ g dm}^{-3}$ ($Y_{X/G} = 0,23 \text{ g g}^{-1}$)

Iz rezultata pokusa provedenog pri početnoj koncentraciji glukoze, $c_{G,0} = 20 \text{ g dm}^{-3}$, i početnoj koncentraciji biomase, $c_{X,0} = 8 \cdot 10^{-2} \text{ g dm}^{-3}$ (Tablica 4.3.) izračunato je iskorištenje biomase na glukozi od $Y_{X/G} = 0,23 \text{ g g}^{-1}$. Vidljivo je da pretpostavljeni matematički model procesa pri ovim procesnim uvjetima dobro opisuje i promjenu koncentracije glukoze i promjenu koncentracije biomase kada se u ovo razmatranje uzmu izračunati intervali pouzdanosti (Slika 4.3.). Model ne može zadovoljavajuće opisati promjenu koncentracije glukoze u drugom djelu provedbe pokusa ($t > 50 \text{ h}$) zbog iz rezultata opažene inhibicije rasta visokom koncentracijom

glukoze koja nije uključena u jednostavni pretpostavljeni matematički model procesa. Pri provedbi ovoga pokusa dobivena je visoka ponovljivost eksperimentalnih rezultata.

Tablica 4.4. Rezultati pokusa uzgoja *Trametes versicolor* na glukozi pri početnoj koncentraciji glukoze, $c_{G,0} = 2,5 \text{ g dm}^{-3}$, i početnoj koncentraciji biomase, $c_{X,0} = 1 \cdot 10^{-1} \text{ g dm}^{-3}$ ($Y_{X/G} = 0,41 \text{ g g}^{-1}$)

t [h]	c_X [g dm^{-3}]	c_G [g dm^{-3}]
0,00	0,11	2,66
4,03	-	2,63
8,00	0,27	2,71
22,00	0,31	2,60
26,17	0,43	2,36
30,17	1,23	1,86
46,00	1,21	1,50
50,00	1,24	0



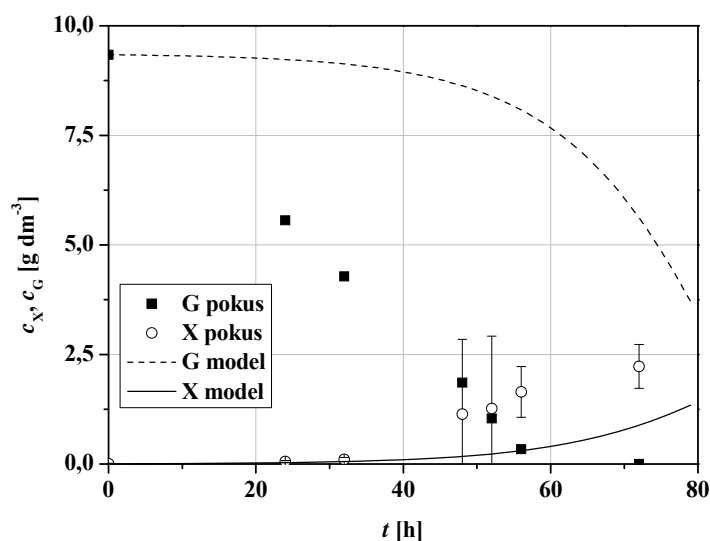
Slika 4.4. Usporedba rezultata pokusa i rezultata simulacije matematičkog modela procesa rasta *Trametes versicolor* na glukozi pri početnoj koncentraciji glukoze, $c_{G,0} = 2,5 \text{ g dm}^{-3}$, i početnoj koncentraciji biomase, $c_{X,0} = 1 \cdot 10^{-1} \text{ g dm}^{-3}$ ($Y_{X/G} = 0,41 \text{ g g}^{-1}$)

U pokusu provedenom pri početnoj koncentraciji glukoze, $c_{G,0} = 2,5 \text{ g dm}^{-3}$, i početnoj koncentraciji biomase, $c_{X,0} = 1 \cdot 10^{-1} \text{ g dm}^{-3}$ (Tablica 4.4. i Slika 4.4.) nije postignuta zadovoljavajuća ponovljivost eksperimentalnih rezultata provedenih u dva paralelna pokusa. U ovome pokusu izračunato je iskorištenje biomase na glukozi od $Y_{X/G} = 0,41 \text{ g g}^{-1}$.

Dobiveno je dobro slaganje eksperimentalnih rezultata sa rezultatima simulacije procesa pomoću modela u cijelom području provedbe pokusa i za biomasu i za glukozu. Može se zaključiti da za početne koncentracije biomase u području od $1 \cdot 10^{-1} \text{ g dm}^{-3}$ do $8 \cdot 10^{-2} \text{ g dm}^{-3}$, te za široko područje početnih koncentracija glukoze od $2,5 - 20 \text{ g dm}^{-3}$ pretpostavljeni matematički model procesa dobro opisuje eksperimentalne rezultate.

Tablica 4.5. Rezultati pokusa uzgoja *Trametes versicolor* na glukozu pri početnoj koncentraciji glukoze, $c_{G,0} = 10 \text{ g dm}^{-3}$, i početnoj koncentraciji biomase, $c_{X,0} = 5 \cdot 10^{-3} \text{ g dm}^{-3}$ ($Y_{X/G} = 0,24 \text{ g g}^{-1}$)

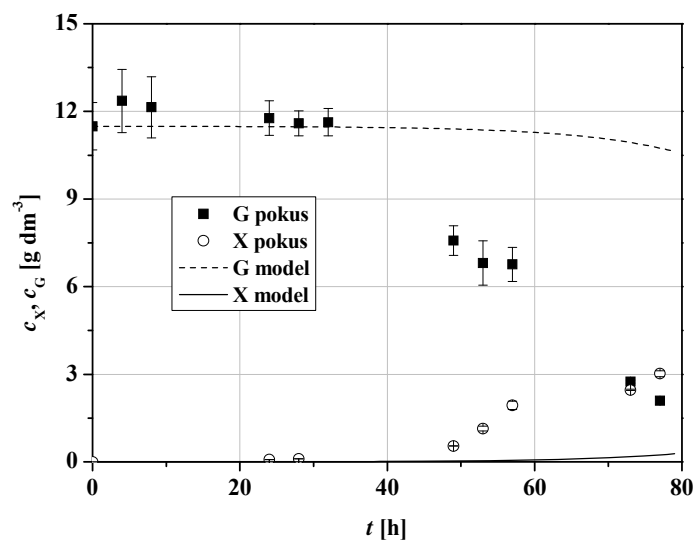
t [h]	c_X [g dm^{-3}]	c_G [g dm^{-3}]
0	$5 \cdot 10^{-3}$	9,34
24,00	0,06	5,56
32,00	0,10	4,28
48,00	1,14	1,86
52,00	1,26	1,04
56,00	1,65	0,34
72,00	2,22	0



Slika 4.5. Usporedba rezultata pokusa i rezultata simulacije matematičkog modela procesa rasta *Trametes versicolor* na glukozu pri početnoj koncentraciji glukoze, $c_{G,0} = 10 \text{ g dm}^{-3}$, i početnoj koncentraciji biomase, $c_{X,0} = 5 \cdot 10^{-3} \text{ g dm}^{-3}$ ($Y_{X/G} = 0,24 \text{ g g}^{-1}$)

Tablica 4.6. Rezultati pokusa uzgoja *Trametes versicolor* na glukozu pri početnoj koncentraciji glukoze, $c_{G,0} = 10 \text{ g dm}^{-3}$, i početnoj koncentraciji biomase, $c_{X,0} = 1 \cdot 10^{-3} \text{ g dm}^{-3}$ ($Y_{X/G} = 0,32 \text{ g g}^{-1}$)

t [h]	c_X [g dm^{-3}]	c_G [g dm^{-3}]
0	$1 \cdot 10^{-3}$	11,49
4,00	-	12,36
8,00	-	12,14
24,00	0,08	11,77
28,00	0,11	11,59
32,00	-	11,63
49,00	0,55	7,58
53,00	1,14	6,81
57,00	1,94	6,76
73,00	2,47	2,75
77,00	3,02	2,09



Slika 4.6. Usporedba rezultata pokusa i rezultata simulacije matematičkog modela procesa rasta *Trametes versicolor* na glukozu pri početnoj koncentraciji glukoze, $c_{G,0} = 10 \text{ g dm}^{-3}$, i početnoj koncentraciji biomase, $c_{X,0} = 1 \cdot 10^{-3} \text{ g dm}^{-3}$ ($Y_{X/G} = 0,32 \text{ g g}^{-1}$)

Ocjena valjanosti matematičkog modela procesa je provedena i za niže početne koncentracije biomase od $5 \cdot 10^{-3} \text{ g dm}^{-3}$ (Tablica 4.5. i Slika 4.5.) i $1 \cdot 10^{-3} \text{ g dm}^{-3}$ (Tablica 4.6. i Slika 4.6.). U ovim pokusima nije dobiveno zadovoljavajuće slaganje eksperimentalnih rezultata sa rezultatima simulacije matematičkog modela procesa, unatoč visokoj ponovljivosti rezultata mjerenja dobivenoj u ovim eksperimentima. 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. Stoga su potreban daljnja istraživanja rasta *Trametes versicolor* na glukozi 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.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju literaturnih podataka i provedenih eksperimenata šaržnog uzgoja postavljen je matematički model rasta gljive *Trametes versicolor* na glukozi. Iz eksperimentalnih rezultata procijenjeni su parametri matematičkog modela procesa $\mu_{MAX} = 9,31 \cdot 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ i $K_S = 2,72 \text{ g dm}^{-3}$. Provedena je serija pokusa pri različitim početnim koncentracijama glukoze u svrhu provedbe ocjene valjanosti pretpostavljenog matematičkog modela procesa. Pokazalo se da ovaj jednostavni model može zadovoljavajuće opisati eksperimentalne rezultate u uskom području početnih koncentracija glukoze od $1 \cdot 10^{-1} \text{ g dm}^{-3}$ do $8 \cdot 10^{-2} \text{ g dm}^{-3}$, te za široko područje početnih koncentracija glukoze od $2,5 - 20 \text{ g dm}^{-3}$. U slučaju kada je početna koncentracija glukoze bila značajno niža u području od $1 \cdot 10^{-3}$ do $5 \cdot 10^{-3} \text{ g dm}^{-3}$ model nije mogao kvantitativno opisati dinamičku promjenu koncentracije biomase i glukoze. 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
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
25. **Zelić B.:** Razvoj kinetičkog modela biokonverzije glukoze u 2,5 –diketo-D-glukonsku kiselinu. magistarski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 1999

7. POPIS SIMBOLA

7.1. SIMBOLI

$c_{G,0}$	početna koncentracija glukoze, g dm^{-3}
$c_{X,0}$	početna koncentracija biomase, g dm^{-3}
c	koncentracija, g dm^{-3}
c_S	koncentracija supstrata, g dm^{-3}
c_G	koncentracija glukoze, g dm^{-3}
p	tlak, bar
V	volumen, cm^3
h	vrijeme, h
T	temperatura, $^{\circ}\text{C}$
r_A	brzina reakcije, m s^{-1}
r_S	specifična brzina nestajanja supstrata, m s^{-1}
$Y_{X/G}$	iskorištenje biomase na glukozi, g g^{-1}
K_S	konstanta zasićenja supstratom, g dm^{-3}

7.1.1. Grčki simboli

γ	masena koncentracija, g dm^{-3}
μ	specifična brzina reakcije, h^{-1}
μ_G	specifična brzina rasta biomase na glukozi, h^{-1}
μ_{MAX}	maksimalna specifična brzina rasta biomase, h^{-1}

7.2. SKRAĆENICE

X	-biomasa
S	-supstrat
G	-glukoza
ADP	-adenozin – difosfat
AMP	-adenozin – monofosfat
ATP	-adenozin – trifosfat

GOD -glukoza oksidaza

HAA -3-hidroksiantranilat

HBT -1-hidroksibenzotriazol

LiP -lignin peroksidaza

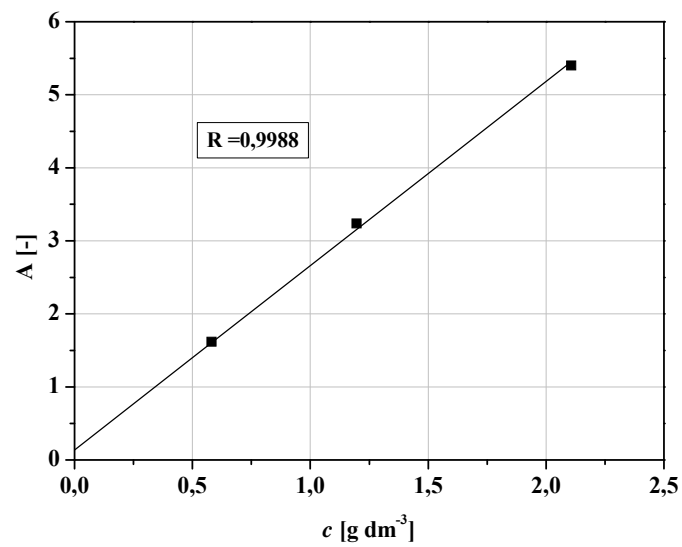
MnP -mangan peroksidaza

PAP -peroksidaza antiperoksidaza

POD -peroksidaza

Kat -SI jedinica katalitičke aktivnosti enzima, $1 \text{ kat} = 1 \text{ mol s}^{-1}$

8. PRILOZI



Slika 8.1. Baždarni pravac za određivanje koncentracije glukoze

ŽIVOTOPIS

Tajana Mlinarek je rođena 11. studenog 1984. godine u Zagrebu. Nakon završene osnovne škole u Vrbovcu upisuje program opće gimnazije u Srednjoj školi Vrbovec. 2003. godine upisuje Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu. Sudjelovala je na 1st Conference on Applied Biocatalysis and 5th Meeting of students and university professors from Maribor and Zagreb. 2009. godine završava Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije.