

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

Smjer: Inženjerstvo u zaštiti okoliša

Krešimir Janeš

Rast *Trametes versicolor* u uvjetima submerznog uzgoja

DIPLOMSKI RAD

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

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

Dr. sc. Đurđa Vasić-Rački, red. prof

Dr. sc. Felicita Briški, red. prof.

Zagreb, rujan 2009.

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

Također se zahvaljujem mr. sc. Marini Tišmi na velikoj pomoći i brojnim savjetima pri provedbi pokusa.

Zahvaljujem se kolegici Jeleni Pilaš s kojom sam proveo mnoge sate rada u laboratoriju u ugodnoj i konstruktivnoj zajedničkoj suradnji.

Najtoplije se zahvaljujem svojim roditeljima koji su me bodrili i pomagali tijekom cijelog studija.

Zahvaljujem svim svojim kolegicama i kolegama s kojima sam proveo ove studentske dane koji su mi pružili pomoć i korisne savjete tijekom studiranja.

SAŽETAK

Gljive bijelog truljenja su prirodni razgrađivači lignoceluloznog materijala te luče različite lignolitičke enzime, a submerznim uzgojem gljiva moguća je proizvodnja i korištenje tih enzima u mnogobrojne svrhe. *Trametes versicolor* je gljiva bijelog truljenja iz skupine Basidiomycota za koju je poznato da proizvodi enzim lakazu. Lakaze (benzendiol: kisik oksidoreduktaze, EC 1.10.3.2.) su metaloproteini s četiri atoma bakra na aktivnom mjestu a imaju važnu ulogu u fiziološkim procesima kao što je sporulacija, proizvodnja pigmenata, biljna patogeneza, delignifikacija, stvaranje humusa i morfogeneza mikroorganizma domaćina. Lakaze se uspješno primjenjuju u zaštiti okoliša, u analitici, u dijagnostici, te u prehrambenoj i ostalim industrijama, primjerice industriji pulpe i papira.

U ovom radu provedena su istraživanja utjecaja procesnih parametara na potrošnju supstrata i aktivnost enzima lakaze. Ispitivani su utjecaji početne koncentracije supstrata, početne koncentracije micelijskih peleta, koncentracije peptona i kvašćevog ekstrakta, induktora guaiacola, Tweena 80, te vremena dodatka induktora.

Pokusi su provedeni na tresilici s glukozom i saharozom kao izvorom ugljika, te u bioreaktoru pri čemu je kao izvor ugljika korištena saharoza. U svim pokusima postignute su izrazito male aktivnosti enzima lakaze ($< 10 \text{ U dm}^{-3}$). Pokazalo se da u pokusima sa saharozom kao izvorom ugljika *Trametes versicolor* razgrađuje saharozu pomoću unutarstaničnog enzima invertaze na glukozu i fruktozu, te da za svoj rast i održavanje prvo koristi glukozu, a nakon toga fruktozu.

Ključne riječi: lakaza, gljive bijelog truljenja, *Trametes versicolor*, enzimska aktivnost, potrošnja supstrata

SUMMARY

White rot fungi are natural lignocelluloses material decomposers and they are known to excrete different lignolytic enzymes. Submerged cultivation of these fungi allows production of these enzymes and their usage in many different fields of application. *Trametes versicolor* is a white rot fungi that produces enzyme laccase. Laccases (benzenediol: oxygen oxidoreductase, EC 1.10.3.2.) are multi copper blue oxidases with usually four copper atoms placed at three different active sites. They play an important role in physiological processes such are sporulation, pigment production, plant pathogenesis, delignification, humus production and microorganism host morphology. Laccases are widely spread in environmental applications, analytics, diagnostics, in food industry and in many other industries, particularly in pulp and paper industry.

The effect of process parameters on substrate consumption and laccase activity was observed. Substrate initial concentrations, mycelial pellets initial concentrations, peptone and yeast extract, inductor guaiacol and Tween 80 initial concentrations and inductor addition time were investigated.

The experiments in shaker with glucose and sucrose as sole carbon source were carried out, while the experiment in bioreactor with sucrose as sole carbon source was also carried out. In each experiment observed enzyme activity was extremely low ($< 10 \text{ U dm}^{-3}$). It has been observed that in experiments with sucrose as sole carbon source, *Trametes versicolor* degrades sucrose with help of intercellular enzyme invertase to glucose and fructose. The fungi uses glucose as primary carbon source for growth and maintenance after which consumption of fructose follows.

Key words: laccase, white rot fungi, *Trametes versicolor*, enzyme activity, substrate consumption

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO.....	3
2.1. Mikrobiologija i mikroorganizmi	3
2.2. Klasifikacija mikroorganizama.....	4
2.3. Gljive	5
2.3.1. Morfologija	5
2.3.2. Ishrana i metabolizam	6
2.3.3. Razmnožavanje	7
2.3.4. Klasifikacija gljiva	12
2.3.5. Gljive bijelog truljenja	13
2.3.5.1. <i>Trametes versicolor</i>	14
2.4. Enzimi.....	16
2.4.1. Struktura enzima	17
2.4.2. Nomenklatura i podjela enzima	18
2.4.3. Lignolitički enzimi gljiva Basidiomycota.....	19
2.4.3.1. Lignin	19
2.4.3.2. Lignolitički enzimi	21
2.4.4. Lakaze	22
2.4.4.1. Rasprostranjenost i fiziološka svojstva lakaza	22
2.4.4.2. Struktura lakaza i specifični supstrati.....	23
2.4.4.3. Primjena lakaza	24
3. MATERIJALI I METODE	26
3.1. Materijali	26
3.1.1. Mikroorganizam.....	26
3.1.2. Kemikalije.....	26
3.1.3. Priprema krute hranjive podloge za čuvanje gljive.....	27
3.1.4. Priprema hranjive podloge za uzgoj inokuluma	27
3.1.5. Priprema podloge za rast <i>Trametes versicolor</i> u submerzinm uvjetima.....	28
3.1.6. Priprema ostalih otopina	29
3.2. Aparature	30
3.2.1. Tresilica.....	30
3.2.2. Bioreaktor	30

3.2.3. Centrifuga	30
3.2.4. Autoklav.....	30
3.2.5. Spektrofotometar.....	30
3.2.6. Kapljevinski kromatograf visoke djelotvornosti (HPLC).....	31
3.3. Analitičke metode.....	31
3.3.1. Određivanje aktivnosti enzima lakaze	31
3.3.2. Određivanje koncentracije biomase	32
3.3.3. Određivanje koncentracije glukoze.....	33
3.3.4. Određivanje koncentracije glukoze, fruktoze i saharoze	34
3.4. Provedba pokusa.....	35
3.4.1. Rast <i>Trametes versicolor</i> na tresilici uzgojem na glukozi i saharozi kao izvorima ugljika	35
3.4.2. Rast <i>Trametes versicolor</i> u bioreaktoru uzgojem na saharozi kao izvoru ugljika ..	37
4. REZULTATI I RASPRAVA	38
4.1. Rast <i>Trametes versicolor</i> na tresilici submerznim uzgojem na glukozi	38
4.1.2. Utjecaj početne koncentracije micelijskih peleta.....	40
4.1.3. Utjecaj induktora.....	41
4.1.4. Utjecaj peptona i kvašćevog ekstrakta na potrošnju supstrata, rast biomase i aktivnost enzima lakaze	43
4.1.5. Utjecaj potrošnje supstrata na enzimsku aktivnost	45
4.2. Rast <i>Trametes versicolor</i> na tresilici submerznim uzgojem na saharozi.....	47
4.3. Rast <i>Trametes versicolor</i> u bioreaktoru.....	50
5. ZAKLJUČAK	54
6. LITERATURA.....	56
7. POPIS SIMBOLA I SKRAĆENICA	59
7.1. Simboli.....	59
7.1.1. Grčki simboli	59
7.2. Skraćenice.....	60
8. PRILOZI.....	61
ŽIVOTOPIS	

1. UVOD

Svijet u kojem živimo postaje sve manji, sve napućeniji i sve zagađeniji. Način života na koji smo navikli uvjetuje široku potrošnju i proizvodnju svakodnevnih predmeta a mehanizmi proizvodnje nisu prilagođeni današnjim potrebama očuvanja okoliša. Energetski neučinkoviti procesi proizvodnje mogu se opisati motom „zagrij, oblikuj, tretiraj“ (engl. *heat, beat, treat*) u kojim se od ukupne količine energije i materijala otprilike dobiva 4 % produkta i 96 % ostatka. Uzimajući sve to u obzir, postoji potreba za novim energetski i materijalno učinkovitim procesima. No, postavlja se pitanje kako to ostvariti i gdje naći primjere. Odgovor je svuda oko nas: u prirodi. 3,8 milijardi godina istraživanja i razvoja u velikom laboratoriju prirode čini ju savršenim kandidatom za istraživanje i preuzimanje principa koji će omogućiti i slijedećim generacijama normalne uvjete za život.

Enzimске tehnologije igraju važnu ulogu u toj viziji jer provode kemijske procese na puno ekonomičniji i energetski i okolišu prihvatljiviji način, a u isto vrijeme su industrijski prihvatljive. Jedan od važnih enzima koji odgovara ovim standardima su lakaze. Najpoznatiji i najvažniji izvor lakaza su gljive, pogotovo gljive bijelog truljenja,¹ pa je za ovaj rad provedeno istraživanje na gljivi *Trametes versicolor*.

Gljive truljenja su najrasprostranjeniji razgrađivači drva i sposobne su razgraditi lignocelulozne supstrate. Luče učinkovitu ekstracelularnu kombinaciju enzima koja je u mogućnosti razgraditi prirodni polimer lignin i druge aromatske spojeve u molekule manje molekularne mase.²

Gljiva *Trametes versicolor* ili šarena tvrdokoška je gljiva bijelog truljenja iz skupine Basidiomycota za koju je ustanovljeno da luči lignolitičke enzime, točnij enzim lakazu koja ima sposobnost razgradnje lignina. Lignolitički enzimi sudjeluju u razgradnji složenog i otpornog prirodnog polimera lignina. Ta grupa enzima široko je rasprostranjena u prirodi i pronašla je primjenu u raznim industrijskim granama. U posljednje vrijeme je došlo do velike potražnje tih enzima zbog njihove velike biotehnološke važnosti.

Za razliku od većine ostalih enzima koji posjeduju specifično svojstvo samo prema određenom supstratu, lakaze djeluju na širok spektar različitih supstrata. Uz pomoć kisika lakaze kataliziraju oksidaciju *o* – , *p* – difenola, aminofenola, polifenola, poliamina, lignina, nekih anorganskih iona, aromatskih amina i različitih nefenolnih supstrata.³

Mogućnost da katalizira veliki broj kemijskih reakcija kao i prihvatljivost u ekološkom smislu čini lakaze vrlo zanimljivim biokatalizatorima za različita istraživanja i industrijsku primjenu. Lakaze se uspješno primjenjuju u zaštiti okoliša, u analitici, u dijagnostici, te u prehrambenoj i ostalim industrijama.⁴

U ovom radu je provedeno istraživanje rasta gljive *Trametes versicolor*. Probedeni su anaerobni pokusi u tresilici s glukozom i saharozom kao izvorima ugljika i aerobni pokus u bioreaktoru sa saharozom kao izvorom ugljika. Promatran je utjecaj različitih procesnih parametara: početne koncentracije supstrata, početne koncentracije micelijskih peleta, omjera C:N, koncentracije peptona, kvašćevog ekstrakta, induktora guaiacola i Tweena 80 na dinamičku promjenu koncentracije supstrata i aktivnost enzima.

2. OPĆI DIO

2.1. Mikrobiologija i mikroorganizmi

Mikrobiologija se definira kao područje biologije koje se bavi proučavanjem organizama koji su najčešće premali da bi se uočili golim okom. Takvi organizmi nazivaju se mikroorganizmi (grč. *mikros* – malen ; *organismos* – organizam), katkad i mikrobi. Mikrobiologija je jedna od najširih bioloških znanosti koja se bavi različitim disciplinama koje proučavaju međusobno međudjelovanje čovjek – mikroorganizam, te okoliš – mikroorganizam. Ta su međudjelovanja mnogobrojna i očituju se kroz genetiku, metabolizme, infekcije, bolesti, razvoj lijekova, imunologiju, genetski inženjering, industriju, poljoprivredu, ekologiju i mnoge druge.⁵

Službena povijest mikrobiologije počinje 1673. godine kada Antony van Leeuwenhoek, nizozemski trgovac, opisuje mikroorganizme koje je proučavao na mikroskopu vlastite proizvodnje. Sama primjena mikroorganizama seže puno više u prošlost. Najranija upotreba mikroorganizama vezana je uz fermentaciju i proizvodnju piva i vina. Povijest piva seže i do sedmog tisućljeća prije Krista kada su ratarske zajednice na području današnje Kine proizvodile pivu slično alkoholno piće. Skoro svaka žitarica koja sadrži ugljikohidrate mogla je u kontaktu s kvascima iz zraka pokrenuti proces spontane fermentacije i taj se recept koristio u mnogim kulturama Mezopotamije, Egipta, Rima i ostalim narodima starog vijeka.

Razvojem mikroskopa otvorene su nove mogućnosti u području istraživanja koje su obilježili svojim radom Louis Pasteur, Joseph Lister, Robert Koch i mnogi drugi. Početkom 20. stoljeća došlo je do naglog razvoja mikrobiologije. Jedan od razloga je i razvoj genetike i biokemije, te otkriće DNK (Kirk, Watson, 1953.).

Najčešći predstavnici mikroorganizama su virusi, bakterije, alge, fungi i protozoe. Rasprostranjenost mikroorganizama je iznimno široka, te naseljavaju svaki dio biosfere gdje je prisutna tekuća voda. Nađeni su u dubokim naftnim bušotinama, na dnu oceana, u vrelin izvorima, pustinjama, špiljama, te uz vruće vulkanske izvore vrele vode na dnu oceana. Podnose velike temperaturne razlike pa se u tom smislu mogu podijeliti na termofile, mezofile i psihrofile.

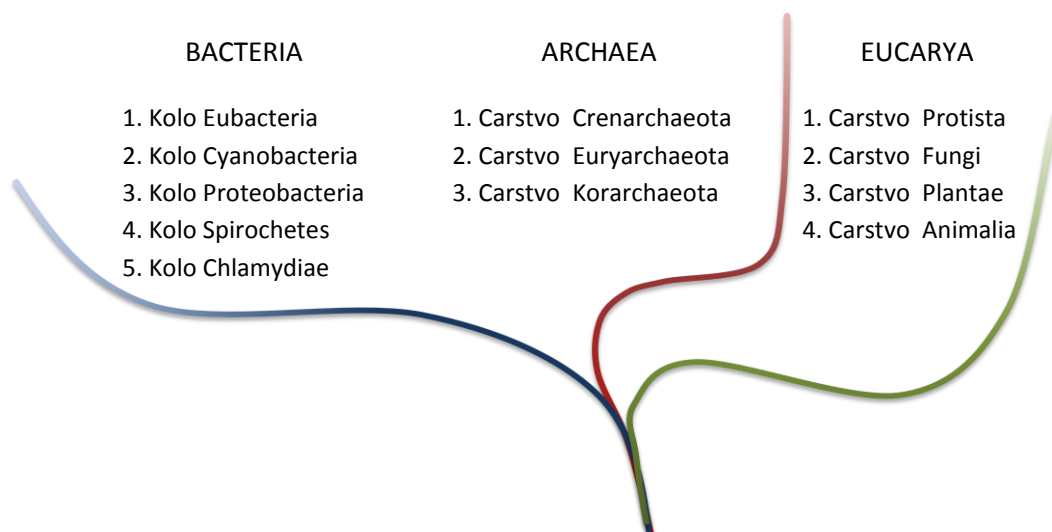
Stanište mikroorganizama usko je vezano i uz čovjeka. Broj ljudskih stanica od kojih se čovjek sastoji iznosi otprilike jedan trilijun. Kada bi se pobrojale bakterijske stanice u bilo kojem trenutku koje se nalaze u ili na čovjeku, taj bi broj iznosio oko deset trilijuna. Uloga mikroorganizama na ili u ljudskom tijelu je raznolika: pomažu u probavi, prekrivaju kožu i štite od štetnih utjecaja, uče imunološki sustav, ali mogu imati i patogena svojstva.

Danas se mikrobiologija i njene grane razvijaju tempom kao nikada do sada. Sinergistički učinak razvoja informacijskih i računalnih tehnologija i biotehnoloških znanosti omogućuje široku primjenu mikroorganizama u raznim ljudskim djelatnostima. Medicina, biokemija i biokemijsko inženjerstvo, virologija, genetika, ekologija, biomimikrija, ekoinženjerstvo, prehrambena, farmaceutska, tekstilna, papirna industrija i poljoprivreda samo su neke od grana ljudske djelatnosti koje su doživjele snažan zamah zahvaljujući modernoj tehnološkoj revoluciji.

2.2. Klasifikacija mikroorganizama

Klasifikacijom se organizmi dijele u grupe kako bi se uočile njihove sličnosti i razlike. Organizmi se klasificiraju prema morfološkim, fiziološkim, metaboličkim i ekološkim karakteristikama.⁶

Danas je prihvaćena klasifikacija koju su predložili Carl Woese i George Fox koja obuhvaća sva živa bića u tri domene (*Slika 2.1.*). Svaku domenu opisuje drugačija vrsta stanične stijenke.⁵



Slika 2.1. Taksonomska podjela organizama u tri domene

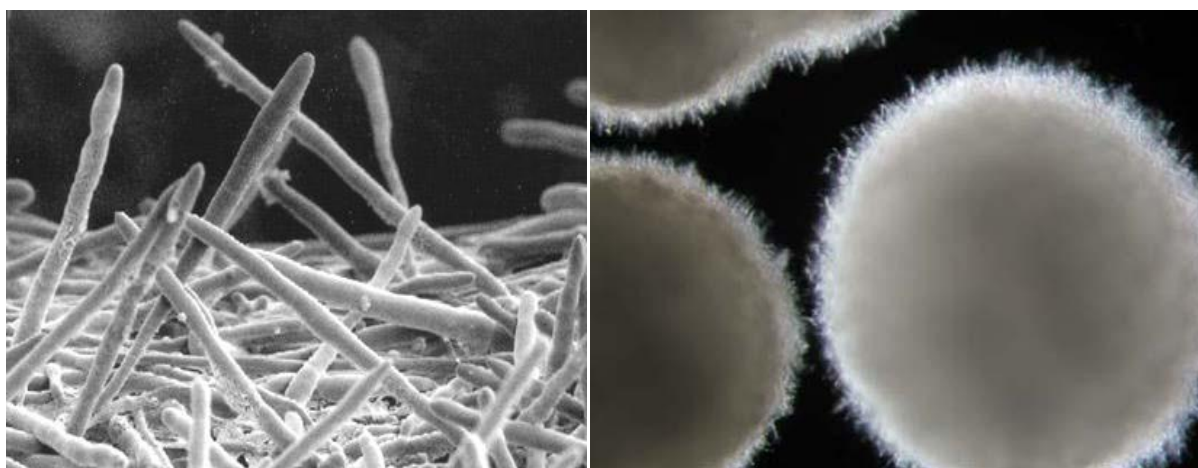
2.3. Gljive

2.3.1. Morfologija

Disciplina unutar mikrobiologije koja se bavi proučavanjem gljiva naziva se mikologija. Gljive su heterotrofni organizmi koji sadrže polisaharid hitin u staničnoj stijenci. Gljive mogu biti jednostanični mikroorganizmi, npr. kvasci, višestanični mikroorganizmi, npr. plijesni i makroskopske ili više gljive.

Kvasci su jednostanične gljive i razmnožavaju se nespolno stvaranjem pupa, ili spolno tvorbom spora. Njihove su stanice veće od bakterijskih i posjeduju većinu eukariotskih organela.

Plijesni i većina gljiva rastu kao stanične tvorevine u obliku nitastih isprepletenih filamenata, hifa koje tvore micelium. Kada se gljive uzgajaju u submerznoj kulturi, dolazi do rasta hifa koje tvore različite morfološke oblike koji mogu varirati od disperznih micelijskih filamenata do čvrsto isprepletenih micelijskih tvorevina peleta (*Slika 2.2.*).



(a)

(b)

Slika 2.2. a) disperzni micelijski filamenti b) micelijski peleti

Prilikom korištenja disperznih micelijskih filamenata u industriji dolazi do određenih problema. Takve su otopine viskoznije te dolazi do smanjenog prijenosa topline, kisika i hranjivih tvari, a rast biomase uzrokuje pokrivanje stijenki bioreaktora te ostale opreme.⁷

Korištenjem micelijskih peleta takvi se problemi izbjegavaju, kapljevine pokazuju nižu viskoznost i približavaju se tečenju Newtonovskih kapljevine, a filtriranje takvih kapljevine je olakšano. Općenito se smatra da je korištenje micelijskih peleta preduvjet za uspješan biokemijski proces proizvodnje nekih metabolita kao što su enzimi.

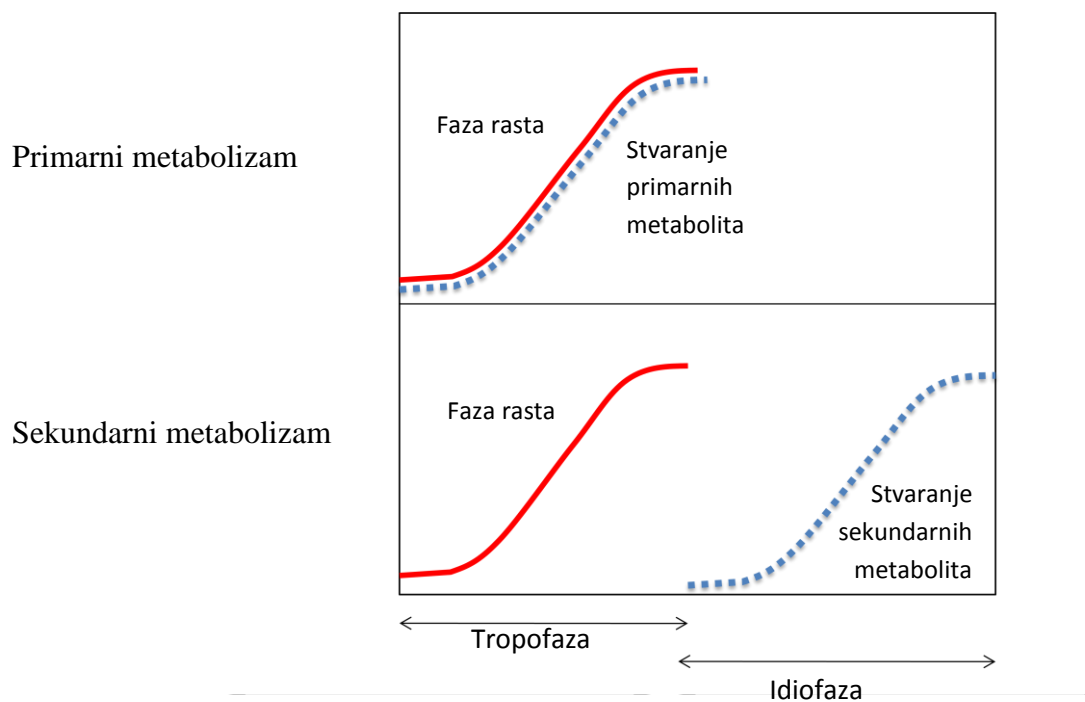
2.3.2. Ishrana i metabolizam

Sve su gljive heterotrofi, odnosno dobivaju energiju iz ugljika organskog porijekla. Većina gljiva su saprofiti, što znači da koriste izvore ugljika iz mrtvih biljaka ili životinja, te iz tla ili vode, odnosno to su gljive truljenja. Parazitske gljive koriste žive domaćine, biljke ili životinje kao izvor ugljika.

Općenito, gljive koriste ugljik iz supstrata lučeći enzime koji razgrađuju molekule supstrata u manje molekule koje stanica tada može absorbirati. Gljive luče cijeli niz enzima koji razgrađuju razne vrste supstrata kao što su perje, kosa, celuloza, derivati nafte, drvo, guma i dr. Gljive mogu razgraditi gotovo sve prirodne materijale.⁵

Ovisno o izvoru ugljika u supstratu, metabolizam mikroorganizama, pa tako i gljiva se može podijeliti na dva tipa: primarni i sekundarni metabolizam (*Slika 2.3.*). Ako su izvor ugljika u supstratu jednostavni ugljikohidrati (glukoza, fruktoza, saharoza, škrob), metabolizam je prvog tipa. Stanice koriste ugljikohidrate kao izvor energije za rast, razvoj i održavanje. Transportni mehanizmi za prijenos glukoze i nižih šećera koriste najmanju količinu energije. Primarni metaboliti su takve molekule koje omogućuju rast stanice, odnosno potiču fazu rasta, tj. tropofazu i to su najčešće molekule poput etanola, organskih kiselina i nekih enzima.

Koriste li se složenije molekule kao izvor ugljika u supstratu (celuloza, lignin, guaiacol ili neki drugi prirodni polimer), nastupa sekundarni metabolizam. Sekundarni metaboliti nisu vezani uz rast stanica i obično nastaju u vremenu nakon faze rasta i ta faza se naziva idiofaza. Sekundarni metaboliti mogu biti enzimi koji razgrađuju složene molekule supstrata u jednostavnije. Najčešći sekundarni metaboliti su antibiotici, mikotoksini, imunosupresivi, hipokolesterolni, antitumorski i antiparazitski agensi, te bioinsekticidi.⁸



Slika 2.3. Primarni i sekundarni metabolizam mikroorganizama

Mnogo biotehnoških procesa se temelji upravo na ovim principima, odnosno mikroorganizmi se uzgajaju na supstratima koji sadrže kompliciranije molekule kao izvor ugljika i time se potiče proizvodnja veće količine željenih sekundarnih metabolita. Primjeri takvih procesa su proizvodnja penicilina ili proizvodnja lakaze.

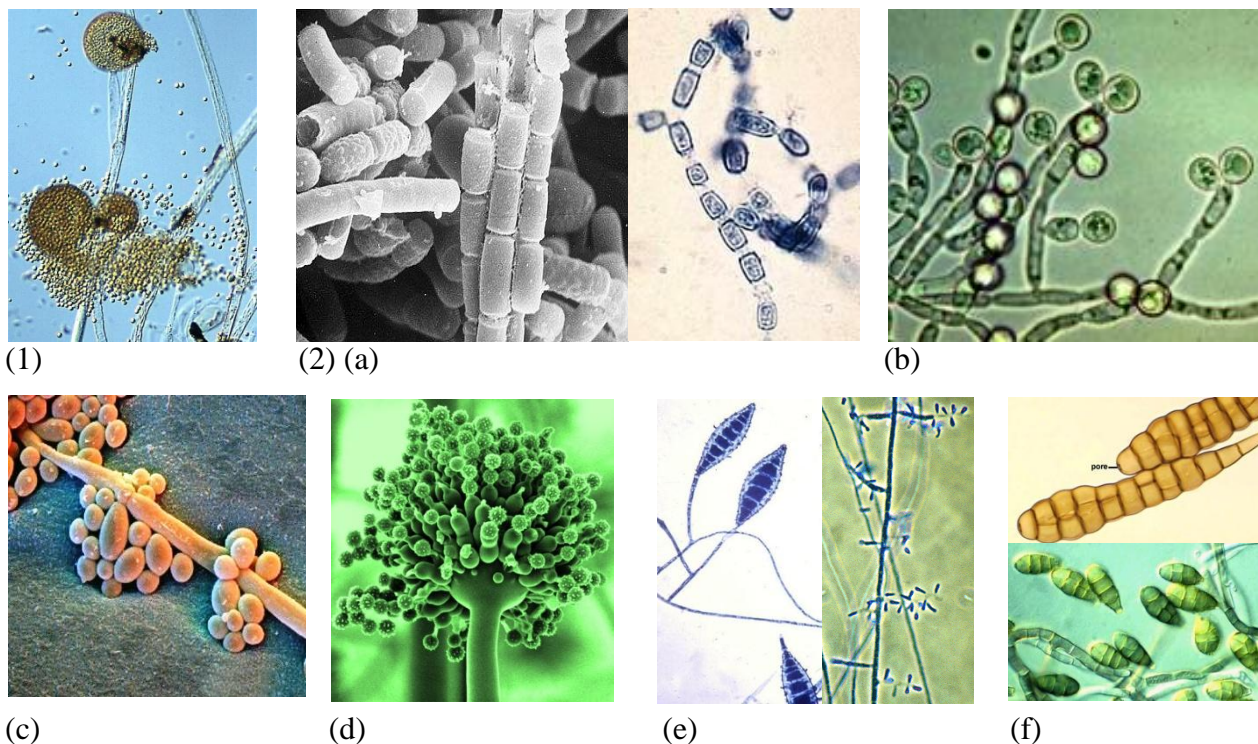
2.3.3. Razmnožavanje

Način na koji se gljive razmnožavaju je raznolik i uspješan. Većina se gljiva može razmnožavati vegetativno, rastom postojećih hifa u svim smjerovima šireći područje koje okupiraju ili dijeljenjem, tj. fragmentacijom gdje otrgnuti komadić micelija može stvoriti novu koloniju. Vegetativno razmnožavanje je bitno, ali je ipak osnovni način razmnožavanja stvaranje različitih vrsta spora. Zbog njihove kompaktnosti i male mase, spore su raspršene u velikom broju u okolišu. Zbog velike raznolikosti stvaranja spora gljive se uglavnom klasificiraju i identificiraju prema svojim sporama i strukturama koje formiraju spore. Najčešća podjela spora je prema načinu nastanka i spore se u tom smislu dijele na nespolne i spolne.

Nespolno razmnožavanje:

S obzirom na izgled reproducirajućih hifa i izvor nastajanja spora, postoje dvije vrste nespolnih spora (*Slika 2.4.*):

1. Sporangiospore nastaju u sporangiju ili mješnici, nespolnom organu vrećastog oblika. Ogranak hife koji nosi sporangij naziva se sporangiofor. Sporangiospore se nalaze zatvorene unutar sporangija i odlaze u okoliš nakon pucanja sporangija
2. Konidiospore (konidia) su slobodne spore koje nisu zatvorene nikakvim vrećastim tvorevinama. Razmnožavaju se tako da se otkinu s vrha rasplodne hife ili se otkidaju dijelovi postojeće vegetativne hife. Konidiospore su najčešće nespolne spore i pojavljuju se u različitim oblicima:
 - a) Artrospore – četvrtaste spore koje nastaju kada se hifa cijepa na više dijelova
 - b) Klamidiospore – okrugle spore koje se formiraju zadebljanjem stanica hifa. Otkidaju se kada okolne stanice hifa napuknu.
 - c) Blastospore – spore koje nastaju pupanjem iz matične stanice koja može biti kvasac ili druga konidija
 - d) Fialospore – konidije koje pupaju na vrhu stanice u obliku vaze koja se zove fialida ili sterigma
 - e) Mikrokonidije i makrokonidije – manje i veće konidije koje tvori ista gljiva pod različitim uvjetima. Mikrokonidije su jednostanične a makrokonidije imaju dvije ili više stanica
 - f) Porospore – konidije koje rastu kroz male pore u posebnim stanicama koje nose spore

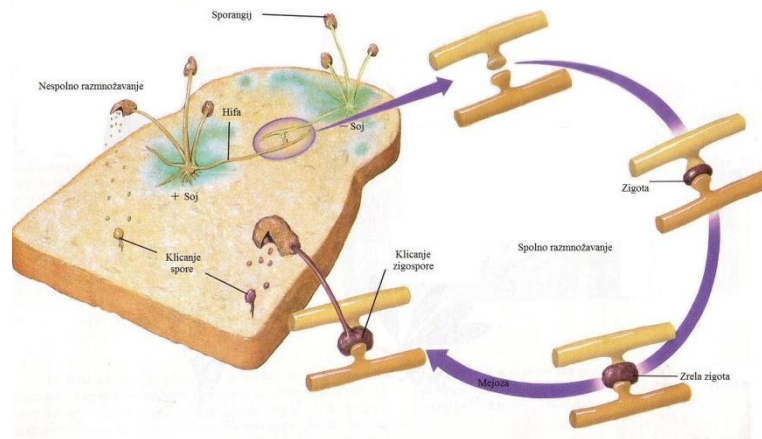


Slika 2.4. Vrste nespolnih spora: (1) sporangiospore; (2) konidiospore: (a) artrospore, (b) klamidiospore, (c) blastospore, (d) fialospore, (e) makrokonidije, mikrokonidije, (f) porospore

Spolno razmnožavanje:

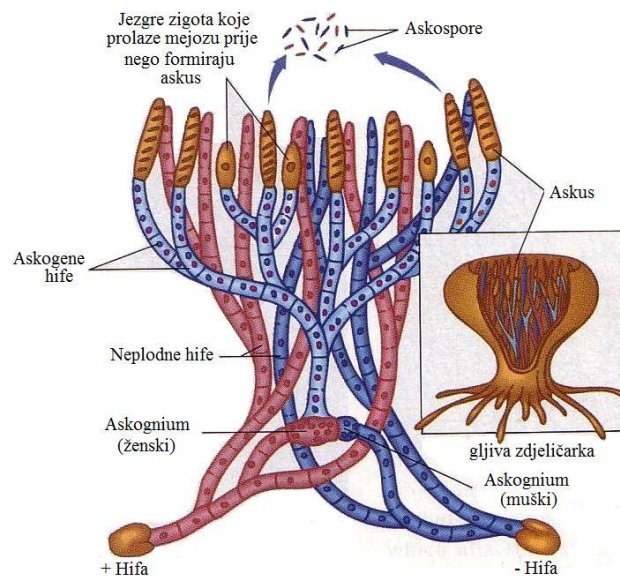
Iako se gljive sasvim uspješno razmnožavaju nespolnim putem, postoji razlog spolnom razmnožavanju. Prilikom spolnog razmnožavanja dolazi do izmjene genetskog materijala koji rezultira nastankom nove jedinice koja ima manje varijacije oblika i funkcije od svojih roditelja te se na takav način može bolje prilagoditi mijenjajućem okolišu osiguravajući time opstanak vrste. Najpoznatije spolne spore su: zigospore, askospore i bazidiospore.

Zigospore su otporne diploidne spore koje se formiraju prilikom dodira hifa dviju nasuprotnih sojeva (plus i minus soj). Hife se spajaju i stvaraju diploidnu zigotu koja bubri te je zaštićena čvrstom staničnom stijenkom. Kada stijenka popusti, a okolišni uvjeti to dopuste, zigospore klija i stvara sporangij (Slika 2.5.).



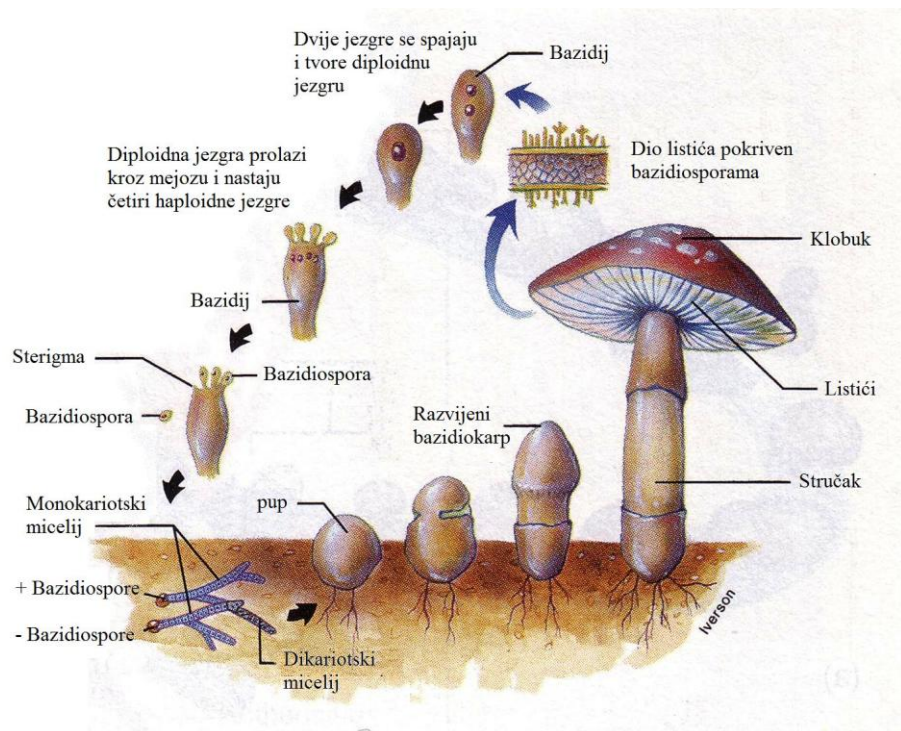
Slika 2.5. Nastanak zigospora kod *Rhizopus stolonifer*

Askospore su haploidne spore koje nastaju u specijalnim vrećastim tvorevinama, askusu. Kod većine gljiva muški spolni organ se spaja sa ženskim spolnim organom što rezultira stvaranjem rubnih stanica hifa koje sadrže diploidnu jezgru. Svaka od tih stanica raste kako bi formirala askus, a njezina diploidna jezgra prolazi kroz proces mejoze, a često nakon toga i mitoze tvoreći četiri do osam haploidnih jezgri koje će kasnije sazrijeti u askospore (Slika 2.6.).



Slika 2.6. Nastanak askospora kod gljiva zdjeličarki

Bazidiospore su haploidne spolne spore koje se formiraju na vanjskoj strani posebnih oh, isstanica stapki ili bazidija. Spore se spajaju tvoreći rubne stanice s diploidnom jezgrom. Svaka od tih stanica postaje bazidija. Procesom mejoze nastaju četiri haploidne jezgre koje se istiskuju na vrh bazidija gdje zriju u bazidiospore (Slika 2.7.).



Slika 2.7. Nastanak bazidiospora kod mesnatih gljiva

Spore gljiva su vrlo važne zbog nekoliko razloga. Veličina, oblik, boja i broj spora korisni su pri identifikaciji vrsta gljiva. Spore su uglavnom male i lagane i mogu ostati suspendirane u zraku jako dugo vremena što im je omogućilo rasijavanje po cijeloj biosferi. Spore se također rasprostranjuju tako da se prihvate na tijela kukaca i životinja. Široka rasprostranjenost gljiva posljedica je uspješnog sustava razmnožavanja i rasijavanja bez kojeg cijeli biljni i životinjski svijet ne bi bio toliko uspješan kao što je danas.

2.3.4. Klasifikacija gljiva

Klasifikacija gljiva je od početka bila vezana za spolno razmnožavanje. Sve gljive koje nisu posjedovale sustav spolnog razmnožavanja nazivale su se nesavršenim i tako su dobile naziv Fungi Imperfecti ili Deuteromycota. Naknadno su mnogim gljivama koje su spadale u tu kategoriju pronađene spolne spore i pripisane su taksonomskim skupinama koje ih najbolje opisuju. Postoje četiri taksonomska razreda gljiva:

Gljive koje proizvode spolne i nespodne spore (Fungi perfecti)

Phylum I – Zygomycota

Spolno razmnožavanje: zigospore; nespolno razmnožavanje: uglavnom sporangiospore, ponekad konidiospore. Većina vrsta su saprofiti, neke su životinjski paraziti. Primjeri: *Rhizopus*, *Mucor*, *Syncephalastrum*

Phylum II – Ascomycota

Spolno razmnožavanje: tvorba askusa i askospora; nespolno razmnožavanje: više vrsta konidiospora formiranih na vrhu konidiofora. Primjeri: *Penicillium* – proizvodnja antibiotika, *Saccharomyces* – proizvodnja piva i kruha. Većina vrsta su plijesni ili kvasci

Phylum III – Basidiomycota

Spolno razmnožavanje: rast bazidija i bazidiospora; nespolno razmnožavanje: konidiospore. Gljive kao što su više ili mesnate gljive, puhare, smrčci, biljni patogeni hrđe i snijeti

Gljive koje proizvode nespodne spore (Fungi imperfecti)

Phylum IV – Deuteromycota

Nespolno razmnožavanje: različite vrste konidiospora. U ovu skupinu spadaju većina kvasaca i plijesni. Uglavnom su saprofiti, a neke vrste su paraziti. Primjeri: *Coccidioides immitis*, *Candida albicans*, *Cladosporium*

2.3.5. Gljive bijelog truljenja

Drvo se od davnina koristilo kao građevni i uporabni materijal a tome su pridonijele njegove karakteristike lake obrade, dugog vijeka trajanja i široke rasprostranjenosti. U isto vrijeme, uočeni su problemi održavanja drveta koje bi se odmah po njegovoj smrti počelo prirodno raspadati, ponajviše djelovanjem gljiva truljenja, različitih kukaca i plijesni. Postoje zapisi stari četiri tisuće godina koji opisuju kako su Egipćani štitili drvo premazujući ga prirodnim uljima. Asirci, Kinezi i ostali narodi starog vijeka su također razvili slične metode koje su se upotrebljavale sve do modernog doba.

Gljive truljenja su najrasprostranjeniji razgrađivači drva i mogu se podijeliti u tri osnovne grupe: gljive bijelog truljenja, gljive smeđeg truljenja i gljive mekog truljenja.⁹

Gljive bijelog truljenja uključuju razrede Basidiomycota i Ascomycota i sposobne su razgraditi lignocelulozne supstrate. Luče učinkovitu ekstracelularnu kombinaciju enzima koja je u mogućnosti razgraditi prirodni polimer lignin u molekule manje molekularne mase. Prilikom tog procesa, supstrat se obezboji po čemu su te gljive dobile naziv (*Slika 2.8.*).



Slika 2.8. Razgradnja i obezbojenje drva gljivama bijelog truljenja

Gljive bijelog truljenja su široko rasprostranjene u prirodi. Rastu na trulom drveću i drvenom materijalu te ga razgrađuju. Iako razgrađuju lignin, ne mogu ga koristiti kao izvor ugljika za rast i razvoj nego im je potreban neki drugi izvor ugljika kao što je celuloza. Izvanstaničnim enzimima razgrađuju lignin u lignoceluloznom supstratu i dolaze do celuloze.¹⁰

Gljive bijelog truljenja su otporni organizmi, a enzimi koje luče su izvanstanični pa nema potrebe za transportom supstrata unutar stanice. Ti izvanstanični enzimi omogućuju gljivama bijelog truljenja podnošenje nepogodnih i toksičnih uvjeta što ih čini savršenima za bioremedijacijske procese. Također podnose više temperature, te širi raspon pH.¹¹

Postoje tri glavna enzima koje luče gljive bijelog truljenja i koji su odgovorni za razgradnju lignina: lakaza (Lac), lignin peroksidaza (LiP) i mangan peroksidaza (MnP). Neke gljive luče sva tri enzima dok je kod nekih uočena proizvodnja jednog ili dva enzima. S obzirom na enzime koje luče, gljive bijelog truljenja mogu se podijeliti na tri osnovne grupe:¹²

- a) Gljive koje proizvode lignin peroksidazu (LiP) i mangan peroksidazu (MnP)
- b) Gljive koje proizvode lakazu i mangan peroksidazu (MnP)
- c) Gljive koje proizvode lignin peroksidazu (LiP) i lakazu

U posljednje vrijeme intenzivirana su istraživanja u svrhu proizvodnje lignolitičkih enzima. Ti izvanstanični enzimi nisu selektivni te se upotrebljavaju u mnogobrojne svrhe kao što su bioremedijacija (biodegradacija halogeniranih organskih molekula, npr. DDT ili polokloriranih bifenila, PCB),¹³ biološko izbjeljivanje u tekstilnoj industriji i proizvodnji boja, prehrambena industrija, kozmetika, medicina, analitička biokemija ili proizvodnja enzima.¹⁴

2.3.5.1. *Trametes versicolor*

Trametes versicolor ili šarena tvrdokoška je gljiva bijelog truljenja razreda Basidiomycota koja raste u nakupinama, redovima ili preklapajućim formacijama na deblima, stabljikama i otpalim granama mrtvog i raspadajućeg, a ponekad i na ranama živog drveća. Uzrokuje delignifikaciju drveta te je široko rasprostranjena u prirodi (*Slika 2.9.*).



Slika 2.9. *Trametes versicolor*

Trametes versicolor proizvodi izvanstanične enzime lakazu, mangan peroksidazu, lignin peroksidazu, celulazu i avicelazu,¹⁵ i uspješno razgrađuje lignin, policikličke aromatske ugljikovodike, mješavine različitih polikloriranih bifenila i brojne sintetičke boje.¹⁶

Reguliranje metabolizma vrlo je važno prilikom uzgajanja i proizvodnje enzima. Primijećeno je da dodatkom različitih induktora može doći do povećane proizvodnje lignolitičkih enzima, a ti induktori mogu biti ksilidin, ferulična kiselina, pirogalol, veratilni alkohol, brojni aromatski spojevi,¹⁵ bakar te različite smjese fenolnih spojeva¹⁶. Mnogobrojni induktori opisani su u literaturi, a sam mehanizam nije još u potpunosti objašnjen i potrebna su daljnja istraživanja.

U industriji *Tametes versicolor* ima najveću primjenu u industriji pulpe i papira. Gljiva uspješno obavlja delignifikaciju, izbjeljivanje i omekšavanje kraft pulpe, te obezbojava izlazne tokove nastale izbjeljivanjem pulpe. Na ovaj način izbjegnuto je korištenje jakih organskih ili anorganskih kiselina, te kemikalija nepogodnih po okoliš, a sam proces proveden je na mnogo nižoj temperaturi i energetski je povoljniji.¹⁷

2.4. Enzimi

Život ovisi o skladno uređenim skupinama kemijskih reakcija. Mnoge od tih reakcija, međutim samostalno teku presporo da bi podržavale život. Zbog toga je priroda oblikovala katalizatore koji ubrzavaju takve reakcije a nazivaju se enzimi. Katalitička svojstva enzima omogućavaju životne procese u gotovo svim oblicima života, od virusa do čovjeka. Mnogi enzimi zadržavaju svoje katalitičko djelovanje čak i nakon ekstrakcije iz živog organizma pa im je upotreba raznolika a povijest korištenja bogata. Najstarije spominjanje enzima vezano je uz proizvodnju sira, kruha, alkoholnih pića i omekšavanje mesa. Jedan takav primjer je i opis proizvodnje vina u Hamurabijevom zakoniku (oko 2100. p.n.e.).

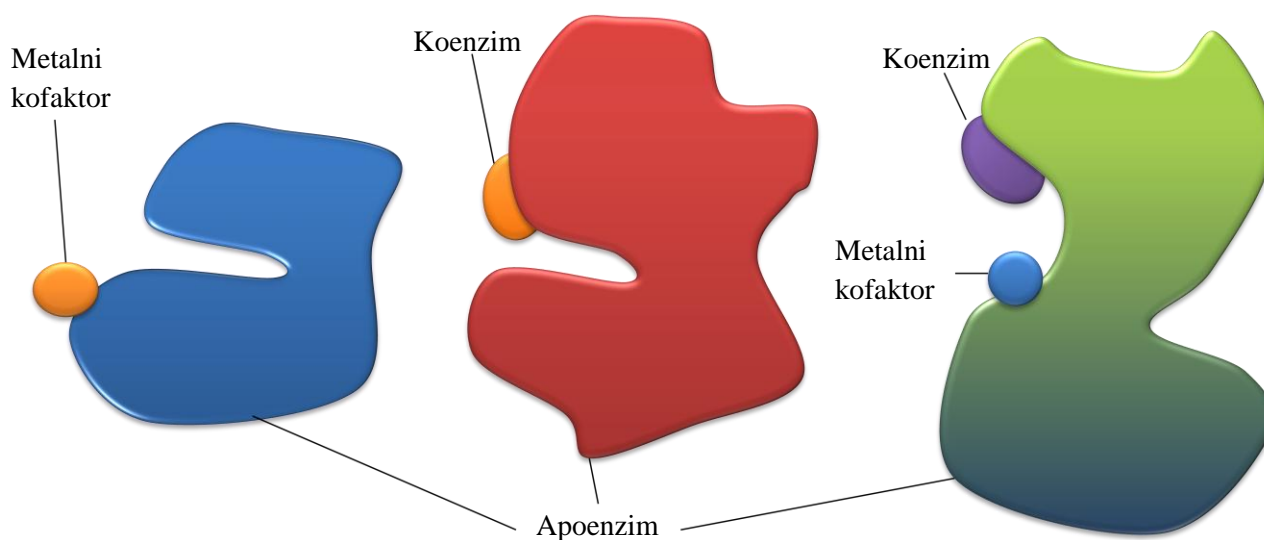
Danas enzimi igraju važnu ulogu u procesima proizvodnje hrane i pića, sastojci su različitih proizvoda kao što su detergentski (koji pomoću proteolitičkih enzima razgrađuju proteinske nečistoće). Veliki se naglasak stavlja i na farmaceutska istraživanja enzima jer mnoge se bolesti mogu pripisati poremećenom ponašanju jednog ili više enzima.¹⁸ Intenzivirana se istraživanja provode i u području starenja gdje se istražuju enzimi i njihovi mehanizmi razgradnje molekula (toksina) koje stanice nisu sposobne samostalno razgraditi a čijom akumulacijom dolazi do degenerativnih promjena, odnosno starenja i do bolesti poput Alzheimerove, Parkinsonove i sličnih.¹⁹

Tijekom kemijske reakcije, reaktanti prelaze u produkte stvaranjem novih i razaranjem starih kemijskih veza. Za svako kidanje i stvaranje nove veze potrebna je određena količina energije koja ograničava brzinu pretvorbe. Ta energija koja se mora savladati da bi došlo do konverzije reaktanata u produkte je mjerljiva i naziva se energijom aktivacije. U laboratorijskim uvjetima savladavanje te energetske barijere može se postići na nekoliko načina: povećanjem toplinske energije sustava (grijanje), povećanjem koncentracije reaktanata i dodatkom katalizatora. U živim stanicama prva dva načina nisu moguća tako da preostaje samo ubrzavanje reakcije katalizatorom a enzimi upotpunjavaju te potrebe.

Na molekularnoj razini, enzimi promoviraju reakciju na način da služe kao mjesta na kojima se jedna ili više molekula reaktanata (supstrata) učvršćuju. Takva molekula supstrata se orijentira u prostoru za energetski najpovoljniju interakciju. Iako enzim postaje pričvršćen s molekulom supstrata i direktno sudjeluje u vezanju, ne postaje dijelom produkta, nije potrošen reakcijom i može djelovati nakon toga mnogo puta. Pokazano je da samo jedna molekula enzima može katalizirati reakciju preko nekoliko milijuna molekula supstrata.

2.4.1. Struktura enzima

Enzimi se mogu klasificirati u dvije grupe: jednostavni i konjugirani. Jednostavni enzimi se sastoje samo od proteina dok se konjugirani enzimi sastoje od proteinskog dijela i ostalih neproteinskih dijelova. Konjugirani enzimi, ponekad zvani i holoenzimi, su kombinacija proteinskog dijela apoenzima i jednog ili više kofaktora. Kofaktori mogu biti organske molekule, koenzimi, ili anorganske komponente (metalni ioni) (Slika 2.10.).



Slika 2.10. Strukture konjugiranih enzima

Apoenzimi variraju u veličini od malih polipeptida s oko stotinjak aminokiselina i molekularnom masom oko $120\ 000\ \text{g mol}^{-1}$ do velikih polipeptidnih konglomerata koji sadržavaju preko tisuću aminokiselina i s molekularnom masom preko milijun g mol^{-1} . Kao i svaki protein, apoenzimi pokazuju strukturalnu složenost koja se naziva primarna, sekundarna, tercijarna, a kod većih enzima i kvarтерна struktura. Prva tri stupnja strukture proizlaze iz polipeptidnog lanca koji je prošao procese savijanja i učvršćivanja formirajući vodikove i disulfidne veze. Slaganjem polipeptidnog lanca u energetski stabilnije strukture nastaje trodimenzionalno tijelo apoenzima. Zbog toga se apoenzim svakog enzima razlikuje u primarnoj strukturi (redoslijed aminokiselina). Nijanse u slaganju polipeptidnog lanca stvaraju različite trodimenzionalne strukture (tercijarna struktura), a površinske osobine tercijarne strukture osiguravaju jedinstveno i specifično mjesto za vezanje molekule supstrata koje se zove aktivno ili katalitičko mjesto.

Metalni kofaktori kao što su željezo, bakar, magnezij, mangan, cink, kobalt, selen i mnogi drugi sudjeluju u preciznom sudjelovanju enzima i supstrata. Općenito, metali aktiviraju enzime, pomažu približavanju aktivnog mjesta i supstrata i direktno sudjeluju u kemijskim reakcijama s kompleksom enzim-supstrat.

Koenzimi su organske komponente koje djeluju zajedno s apoenzimom kako bi napravile potrebne promjene supstrata. Općenita funkcija koenzima je oduzimanje funkcionalne grupe jedne molekule supstrata i dodavanje drugoj, odnosno kao transportni sustav određene funkcionalne grupe. Koenzimi su vitamini ili sadrže vitamine te se iz toga može zaključiti važnost vitamina u prehrani i njihova potrebitost pri rastu i razvoju živih bića.

2.4.2. Nomenklatura i podjela enzima

Prihvaćeni sustavi za sistematizaciju i nomenklaturu enzima obuhvaćaju tri osnovna principa:²⁰

- imena enzima, pogotovo onih koji završavaju na –aza se daju samo pojedinačnim enzimima, odnosno ne bi se trebali davati sustavima koji sadržavaju više od jednog enzima
- enzim se klasificira i naziva po reakciji koju katalizira. Reakcija mora biti kompletno istražena, a mehanizam dobro opisan. Intermedijarni koenzimi i različite grupe koje sudjeluju u mehanizmu se ne dodaju u naziv enzima
- enzim se klasificira po tipu katalizirane reakcije i numerira se četveroznamenkastim kodom (*Enzyme Commission*) radi neupitne identifikacije

Enzimi su podijeljeni je u šest klasa (Tablica 2.1.):^{21,22}

Tablica 2.1. Klasifikacija enzima

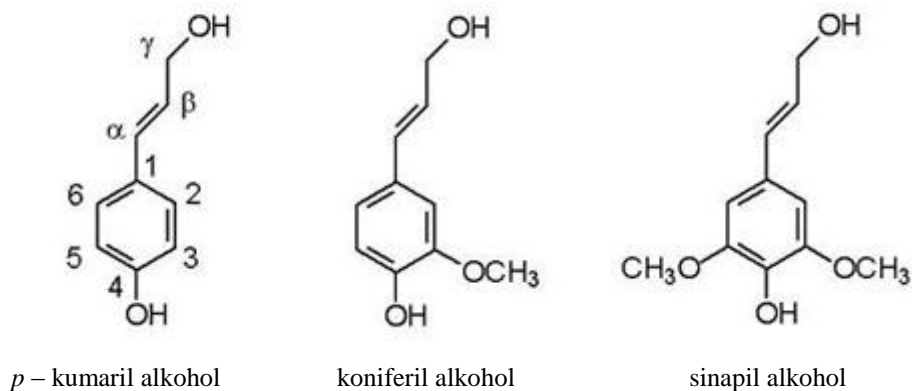
Klasa	Ime	Vrsta katalizirane reakcije	Primjer
1.	Oksidoreduktaze	Oksidacija – redukcija. Vodik ili elektron, donor je iz supstrata	dehidrogenaze, reduktaze, oksidaze, peroksidaze, katalaze
2.	Transferaze	Prijenos kemijskih grupa u općem obliku: $A - X + B \rightarrow A + B - X$	kinaze, fosfomutaze
3.	Hidrozale	Hidrolitičko cijepanje C-C, C-N, C-O i drugih veza	fosfataze, tiolaze, fosfolipaze, deaminaze, ribonukleaze, esteraze
4.	Liaze	Cijepanje (nehidrolitičko) C-C, C-N, C-O i drugih veza ostavljajući dvostruke veze; alternativno: adicija grupa na dvostruke veze	dekarboksilaze, aldolaze, hidrataze, dehidrataze, sintetaze, liaze
5.	Izomeraze	Promjena geometrijskog (prostornog) rasporeda u molekuli	izomeraze, mutaze (ne sve)
6.	Ligaze	Spajanje dviju molekula nakon čega slijedi hidroliza molekule koja ima veliki ΔG	sintetaze, karboksilaze

2.4.3. Lignolitički enzimi gljiva Basidiomycota

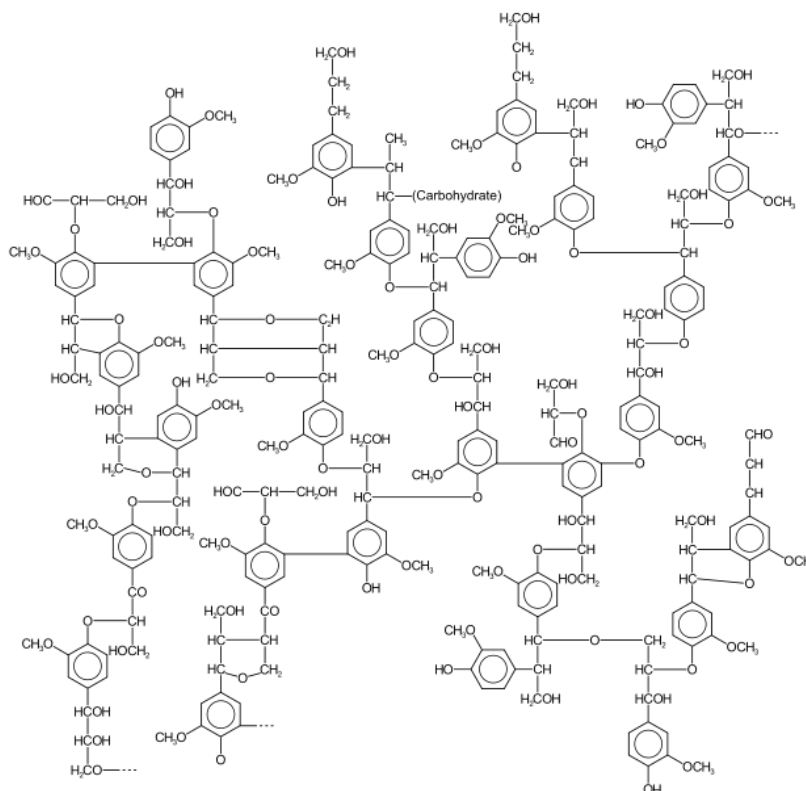
2.4.3.1. Lignin

Lignin je jedan od rijetkih prirodnih polimera koji se može razgraditi samo uz pomoć molekularnog kisika izlučenog iz oksidativnih enzima. To je najrasprostranjeniji aromatski prirodni polimer, odnosno po rasprostranjenosti drugi polimer. Nalazi se u stijenkama stanica viših biljaka koje se sastoje od celuloznih niti, hemiceluloze i lignina i daju izdržljivost i čvrstoću biljkama. Celulozne niti su međusobno priljubljene i okružuju stanice u pravilnim paralelnim strukturama ili mrežastim slojevima. Niti celuloze i hemiceluloze su međusobno povezane i učvršćene trodimenzionalnom strukturom lignina koja je vrlo otporna na biološku razgradnju.

Lignin je ekstremno kompleksni polimer koji nastaje polimerizacijom slobodnih radikala supstituiranih cinamil alkoholnih prekursora. Sastoji se od fenilpropanskih sastavnih jedinica ili monolignola: *p* – kumaril, koniferil i sinapil alkohola (Slika 2.11.).²³



Slika 2.11. Strukturni prikaz tri osnovna tipa monolignola



Slika 2.12. Primjer moguće strukture lignina

Lignin je vrlo otporan na biološko razgrađivanje što je posljedica njegove iznimno komplicirane i stabilne strukture. Do sada nije pronađen niti jedan organizam koji bi koristio lignin kao jedini izvor ugljika.²⁴ Zanimljivo je spomenuti da sadrži 1,5 puta više ugljika od celuloze²⁵ i da mu je omjer C/N vrlo visok.

Pri takvim limitirajućim uvjetima (manjak dušika), višak ugljika se mora razgraditi oksidacijom ili proizvodnjom sekundarnih metabolita dok se dušik koristi za rast i razvoj stanica. Iako je struktura lignina složena (Slika 2.12. i Slika 2.13.), postoje organizmi koji ga razgrađuju. To su više gljive, razreda Basidiomycota, odnosno gljive bijelog truljenja, a među najistraživanijima su *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Phlebia radiata* i *Pleurotus ostreatus*.



Slika 2.13. Slika dobivena skenirajućom elektronskom mikroskopijom koja prikazuje ispreplitanje lignina s celuloznim nitima i stanicama drveta (traheide)

2.4.3.2. Lignolitički enzimi

Lignolitički enzimi sudjeluju u razgradnji složenog i otpornog prirodnog polimera lignina. Ta grupa enzima široko je rasprostranjena u prirodi i pronašla je primjenu u raznim industrijskim granama. U posljednje vrijeme je došlo do velike potražnje tih enzima zbog njihove velike biotehnološke važnosti. Proizvodnja enzima, odnosno metabolita iz mikrobnih izvora je skup proces i jedan od načina smanjenja troškova je korištenje jeftinih prirodnih sirovina kao što su otpaci nekih industrija, primjerice papirne industrije. Istraživanja su pokazala da postoje velike količine lignoceluloznog otpada raznih industrija koji bi se mogao koristiti u svrhu proizvodnje lignolitičkih enzima.²⁶

U lignolitičke enzime spadaju tri vrste oksidativnih enzima: lignin peroksidaza (LiP), mangan peroksidaza (MnP) i lakaza (Tablica 2.2.).

Tablica 2.2. Lignolitički enzimi i njihove najvažnije reakcije

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

Lignolitički enzimi su izvanstanični i neselektivni, te se kao takvi mogu koristiti pri razgradnji boja, fenola i ostalih ksenobiotika. Također razgrađuju lignin u podjedinice manje molekularne mase koje se mogu transportirati u stanicu i dalje razgraditi.

2.4.4. Lakaze

2.4.4.1. Rasprostranjenost i fiziološka svojstva lakaza

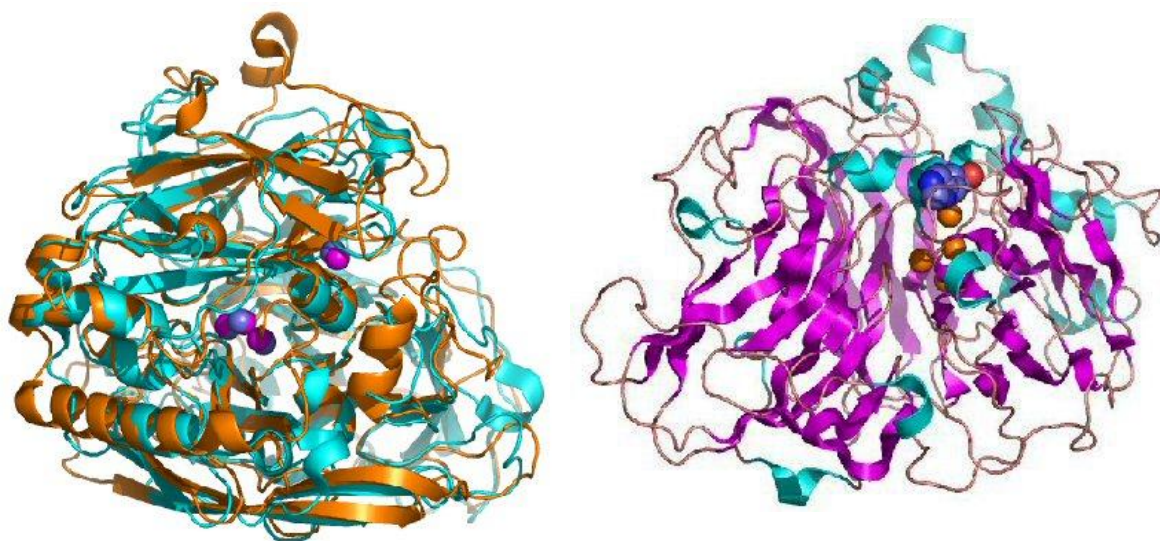
Lakaza je poznata preko sto godina i jedan je od najstarijih poznatih enzima. Prvi put je izolirana 1883. godine (Yoshida) iz mliječnog soka urushu istoimenog drveta urushu, odnosno japanskog lak drveta, *Rhus vernicifera*. Lakaze se mogu podijeliti u dvije grupe: lakaze koje potječu od viših biljaka i lakaze koje potječu od gljiva. Lakaze porijeklom iz viših biljaka pronađene su uglavnom u ksilemu dvosupnica, primjerice *Pinus taeda*, *Acer pseudoplatanus*, *Rhus vernicifera*, a ponekad i u ostalom tkivu biljke primjerice u lišću *Aesculus parviflora*, čajevca ili breskve. Svrha lakaze u višim biljkama nije sasvim razjašnjena, ali se zna da igra ulogu u zacijeljivanju rana drveća koja luče mliječne sokove.

Lakaza je pronađena u mnogim gljivama kao što su gljive Basidiomycota: *Polyporus* (među koje spada i *Trametes versicolor*), *Pleurotis*, *Pholiota*, *Agaricus* i *Phlebia* te gljive Ascomycota: *Neurospora*, *Podospora* i *Aspergillus*. Enzim može biti unutarstaničan kao kod *Podospora*, ali biotehnošku važnost imaju izvanstanični enzimi koje luče gljive bijelog truljenja za razgradnju lignina.

Lakaza igra važnu ulogu u fiziološkim procesima kao što je sporulacija, proizvodnja pigmentata, biljna patogeneza, delignifikacija, stvaranje humusa i morfogeneza mikroorganizma domaćina.²⁷

2.4.4.2. Struktura lakaza i specifični supstrati

Lakaze (benzendiol: kisik oksidoreduktaze, EC 1.10.3.2.) su metaloproteini s četiri atoma bakra na aktivnom mjestu (Slika 2.14.). Mogu biti monomerni ili polimerni glikoproteini i pokazuju različita odstupanja u strukturi zbog različitog sastava ugljikohidrata i različitog broja atoma bakra. Lakaza izolirana iz gljiva *Polyporus* sadrži oko 10 % dok *Rhus* lakaza sadrži oko 45 % ugljikohidrata. Enzim se sastoji od oko petstotinjak jedinica aminokiselina u jednom polipeptidnom lancu. Molekularna masa fungalnih lakaza varira od 65.000 do 85.000 g mol⁻¹. Molekulska masa *Rhus* lakaze je nešto veća zbog većeg udjela ugljikohidrata i iznosi od 110.000 do 140.000 g mol⁻¹.



Slika 2.14. Pojednostavljeni prikazi lakaze izolirane iz *Trametes versicolor*

Lakaze najčešće sadrže četiri atoma bakra razmještena na tri funkcionalna mjesta prema kojima se i dijele:²⁸

- tip 1: paramagnetski „plavi“ bakar koji apsorbira pri $\lambda = 610$ nm
- tip 2: paramagnetski „ne plavi“ bakar koji ne apsorbira u vidljivom dijelu spektra
- tip 3: dijamagnetski par bakar – bakar koji apsorbira pri $\lambda = 330$ nm.

Funkcionalna mjesta služe za transport elektrona sa supstrata na molekulu kisika, odnosno pri oksidaciji supstrata. Tada dolazi do stvaranja slobodnih radikala koji mogu sudjelovati u reakcijama neenzimske polimerizacije (primjerice pri stvaranju zaštitnog pokrova na ranama viših biljaka), razgradnji polimera (delignifikacija) ili cijepanju aromatskih prstena (bioremedijacija).

Za razliku od većine ostalih enzima koji posjeduju specifično svojstvo samo prema određenom supstratu, lakaze djeluju na širok spektar različitih supstrata. Uz pomoć kisika lakaze kataliziraju oksidaciju *o* – , *p* – difenola, aminofenola, polifenola, poliamina, lignina, nekih anorganskih iona, aromatskih amina i različitih nefenolnih supstrata.

Lakaza također razgrađuje fenolne podjedinice lignina koji čine 10 – 15 % lignina, no za nefenolne podjedinice, lakaza djeluje pomoću medijatora kao što su 1 – hidrosibenzotriazol (HBT), 3 – hidrosiantranilat (HAA) i 2,2' – azino – bis – (3 – etilbenzotiazolin – 6 – sulfonska kiselina) (ABTS). 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 ligninolitčkih enzima. Upravo je u tome prednost lakaze što ona može samostalno, bez mangan peroksidaze (MnP) i lignin peroksidaze (LiP) razgraditi lignocelulozni materijal.²⁹

2.4.4.3. Primjena lakaza

Mogućnost da katalizira veliki broj kemijskih reakcija kao i prihvatljivost u ekološkom smislu čini lakaze vrlo zanimljivim biokatalizatorima za različita istraživanja i industrijsku primjenu. Lakaze se uspješno primjenjuju u zaštiti okoliša, u analitici, u dijagnostici, te u prehrambenoj i ostalim industrijama.

Na primjer, upotreba lakaze u procesima izbjeljivanja pulpe u industriji papira predstavlja ekološki daleko prihvatljivije rješenje u odnosu na standardne postupke izbjeljivanja pomoću kemikalija na bazi klora i pri visokim temperaturama.

Lakaze se također 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.

Lakaze nalaze sve širu primjenu u sintezi organskih spojeva, upravo zbog velikog broja supstrata na koje mogu djelovati, te zbog toga što djeluje na supstrat sve do nastanka nestabilnog slobodnog radikala (kationa) nakon čega slijede reakcije polimerizacije ili hidratacije.

U prehrambenoj industriji lakaze se upotrebljavaju za sprječavanje neželjenih promjena kao što su gubitak boje, promjene okusa i mirisa hrane i pića, te produljenje roka trajanja hrane na način da uklanjaju neke štetne spojeve.

3. MATERIJALI I METODE

Praćenje potrošnje glukoze provedeno je uzgojem gljive bijelog truljenja *Trametes versicolor* u anaerobnim uvjetima u šaržnim pokusima na tresilici. Pokus je trajao 15 dana. Proveden je i pokus u bioreaktoru u aerobnim uvjetima. Kao izvor ugljika u hranjivoj podlozi korištene su glukoza i saharoza. Praćene su promjene aktivnosti enzima lakaze koje su određivane spektrofotometrijski i koncentracije glukoze, saharoze i fruktoze koje su određivane HPLC-om.

3.1. Materijali

3.1.1. Mikroorganizam

Za proizvodnju enzima lakaze korištena je kultura gljive *Trametes versicolor* dobivena 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 svaka 4 tjedna.

3.1.2. Kemikalije

Korištene su slijedeće kemikalije: agar sladnog ekstrakta (Sigma – Aldrich), agar – agar (Kemika), glukoza (Riedel – de Haën), saharoza (Kandit), pepton (Aldrich), kvašćev ekstrakt (Aldrich), KH_2PO_4 (Merck), Na_2HPO_4 (Kemika), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{ H}_2\text{O}$ (Merck), $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{ H}_2\text{O}$ (Merck), limunska kiselina (Kemika), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{ H}_2\text{O}$ (Kemika), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{ H}_2\text{O}$ (Kemika), KI (Kemika), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{ H}_2\text{O}$ (Kemika), Tween 80 (Fluka Chemie), 2,2'-azinodi-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (Sigma – Aldrich), etanol (Merck), 2-metoksifenol (Fluka Chemie), alkali lignin (Aldrich), 4-alil-2-metoksifenol (Fluka Chemie), 3,4-dimetoksi benzil alkohol (Aldrich), glicin (Merck), NaCl (Kemika), HCl (Kemika), PAP – reagens (Herbos – dijagnostika).

3.1.3. 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 cm³ vode. Oko 5 cm³ otopine stavljeno je u epruvetu i sterilizirano u autoklavu 20 minuta pri $T = 121$ °C i tlaku $p = 0,6-0,8$ bar. Nakon sterilizacije, podloge su ohlađene na sobnu temperaturi kako bi se želirale. Kultura se sterilno precjeppljivala na krutu podlogu svakih 4 do 5 tjedana i čuvala pri $T = 4$ °C.



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

3.1.4. Priprema hranjive podloge za uzgoj inokuluma

Pripremljeno je 50 cm³ hranjive podloge (Tablica 3.1.) u Erlenmeyerovim tikvicama ($V = 500$ cm³) i sterilizirano 30 minuta pri temperaturi $T = 121$ °C i tlaku $p = 0,6 - 0,8$ bar.

Tablica 3.1. Sastav hranjive podloge za uzgoj gljive

Komponenta	Koncentracija, γ [g dm ⁻³]
Glukoza	10
Pepton	0,4
Kvašćev ekstrakt	0,6
KH ₂ PO ₄	1,2
Na ₂ HPO ₄	0,4
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	1

Kulture gljive su precijepljene s 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 2-3 dana. Uzgojeni micelijski peleti gljive su profiltrirani te izvagani i korišteni za uzgoj gljive na glukozu i saharozu u svrhu proizvodnje enzima lakaze.

3.1.5. Priprema podloge za rast *Trametes versicolor* u submerzinm uvjetima

Pripremljene podloge su sterilizirane u autoklavu 30 minuta pri $t = 121\text{ °C}$ i tlaku $p = 0,6-0,8\text{ bar}$. Hranjiva podloga sastoji se od dvije otopine:

- otopina A koja je sadržavala izvor ugljika (glukozu ili saharozu), pepton i kvašćev ekstrakt čije su koncentracije mijenjane u svakom pokusu i prikazane su u poglavlju 4. Rezultati i rasprava
- otopina B čiji sastav je prikazan u tablici 3.2.

Tablica 3.2. Sastav otopine B

Komponenta	
γ (KH_2PO_4) [g dm^{-3}]	0,8
γ (Na_2HPO_4) [g dm^{-3}]	0,2
γ ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{ H}_2\text{O}$) [g dm^{-3}]	0,5
γ (CaCl_2) [g dm^{-3}]	0,05
γ (limunska kiselina) [g dm^{-3}]	0,15

3.1.6. Priprema ostalih otopina

Pripremljene su:

- otopina glukoze koncentracije $\gamma = 25 \text{ g dm}^{-3}$ koja je korištena za izradu baždarnog pravca spektrofotometrijskom određivanjem koncentracije glukoze. Otopina je pripremljena otapanjem glukoze u redestiliranoj vodi,
- otopine saharoze koncentracija $\gamma = 10 \text{ g dm}^{-3}$ i 20 g dm^{-3} koje su korištene za izradu baždarnog pravca pri određivanju koncentracije saharoze kapljevinskom kromatografijom
- otopine glukoze koncentracija $\gamma = 10 \text{ g dm}^{-3}$ i 20 g dm^{-3} koje su korištene za izradu baždarnog pravca pri određivanju koncentracije glukoze kapljevinskom kromatografijom
- otopine fruktoze koncentracije $\gamma = 5 \text{ g dm}^{-3}$ i 10 g dm^{-3} koje su korištene za izradu baždarnog pravca pri određivanju koncentracije fruktoze kapljevinskom kromatografijom
- otopina induktora guaiakola koncentracije $\gamma = 20 \text{ g dm}^{-3}$. Otopina je pripremljena otapanjem 2-metoksifenola u vodenoj otopini etanola, $w = 50 \%$,
- otopina glicin/HCl pufera $\text{pH} = 3,0$ ³⁰,
- otopina ABTS-a koncentracije $c = 3 \text{ mmol dm}^{-3}$. Otopina je pripremljena otapanjem ABTS-a u glicin/HCl puferu $\text{pH} = 3,0$.
- 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, $5,56 \text{ mmol dm}^{-3}$

3.2. Aparature

3.2.1. Tresilica

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

3.2.2. Bioreaktor

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

3.2.3. Centrifuga

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

3.2.4. Autoklav

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

3.2.5. Spektrofotometar

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

3.2.6. Kapljevinski kromatograf visoke djelotvornosti (HPLC)

Određivanje koncentracije saharoze, glukoze i fruktoze provedeno je na kapljevinskom kromatografu visoke djelotvornosti (LC – 20 AT, Shimadzu) na koloni C₁₈-Carbohydrate Ca²⁺ (300 · 6,5 mm, CS-Chromatographie service GmbH) uz RI detektor.

3.3. Analitičke metode

Tijekom provedbe procesa praćena je aktivnost enzima lakaze i koncentracije biomase, glukoze, fruktoze i saharoze. Aktivnost enzima se određivala spektrofotometrijskom metodom. Koncentracija biomase je određivana gravimetrijski, a koncentracije glukoze, fruktoze i saharoze su određivane pomoću kapljevinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC). Dodatno je koncentracija glukoze određivana spektrofotometrijskom metodom.

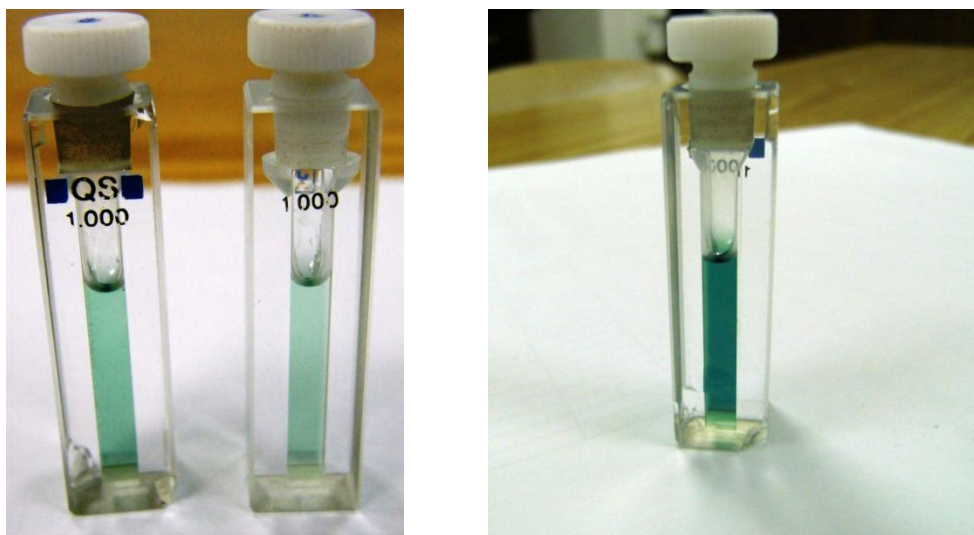
3.3.1. Određivanje aktivnosti enzima lakaze

Aktivnost enzima lakaze je određivana spektrofotometrijski metodom početnih brzina. Metoda se temelji na reakciji oksidacije ABTS-a lakazom pri čemu nastaje stabilan radikal kation ABTS^{•+}. Radikal kation je specifične tamnozeleno boje (*Slika 3.2.*) koji apsorbira pri $\lambda = 420 \text{ nm}$ i stabilan je u području pH = 3 – 11.³¹

Mjerenja apsorbancije su provedena u kvarcnoj kiveti volumena 1 cm³, a reagens ABTS je prethodno termostatiran 5 minuta pri $T = 25 \text{ °C}$. 0,1 cm³ uzorka dodavano je u 0,9 cm³ otopine ABTS-a, čime je aproksimiran početak reakcije. Svako mjerenje je trajalo 100 sekundi pri čemu su dobivene dinamičke promjene apsorbancije (Prilog 5.) iz kojih je izračunata volumna aktivnost enzima lakaze prema jednadžbi (3.1):

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

gdje su V_r ukupni volumen uzorka u kiveti (cm^3), V_E volumen dodanog uzorka koji sadrži enzim (cm^3), ε ekstincijski koeficijent ($\varepsilon_{420} = 0,036 \text{ dm}^3 \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), d širina kivete ($d = 1 \text{ cm}$), $\frac{\Delta A}{\Delta t}$ promjena apsorbancije u vremenu (nagib pravca) (min^{-1}), V.A. volumna aktivnost enzima (U cm^{-3}), pri čemu 1 U predstavlja jedinicu enzimске aktivnosti, odnosno onu aktivnost enzima koja je potrebna da se oksidira $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ supstrata u minuti.³²



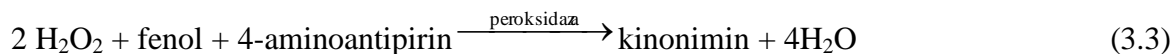
Slika 3.2. Obojenje nastalo oksidacijom ABTS-a lakazom

3.3.2. Određivanje koncentracije biomase

Koncentracija mokre biomase u reakcijskoj smjesi je određivana gravimetrijski. Uzorak je profiltriran kroz filter papir (kvantitativni filter papir plava vrpca, $\varnothing = 110 \text{ mm}$, Munktell, Njemačka) te je mokra biomasa sušena 24 h na $80 \text{ }^\circ\text{C}$ izvagana na analitičkoj vagi.

3.3.3. Određivanje koncentracije glukoze

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



Kinonimin daje obojenje otopini koje apsorbira svjetlo u vidljivom području spektra na valnoj duljini $\lambda = 500 \text{ nm}$ (Slika 3.3.). Količina apsorbiranog svjetla proporcionalna je koncentraciji glukoze u otopini. Uzorak je prije mjerenja centrifugiran 5 minuta pri $n = 5000 \text{ min}^{-1}$ u svrhu odvajanja biomase. Kapljevinski ostatak je korišten za određivanje koncentracije glukoze.



Slika 3.3. Kinonimin nastao spektrofotometrijskim određivanjem koncentracije glukoze PAP metodom

Mjerenje je provedeno spektrofotometrijski na valnoj duljini $\lambda = 500 \text{ nm}$ 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 kiveti prilikom spektrofotometrijskog određivanja koncentracije glukoze PAP metodom

Materijal	Slijepa proba V [cm ³]	Standard V [cm ³]	Nepoznati uzorak V [cm ³]
Standard	-	0,01	-
Uzorak	-	-	0,01
Otopina reagensa	1,00	1,00	1,00

Koncentracija glukoze je izračunata prema jednadžbi 3.4:

$$c_{glukoza} = \frac{A_0}{A_s} \cdot 5,56 \quad (3.4)$$

pri čemu su c koncentracija glukoze u mmol dm⁻³, A_0 apsorbancija slijepe probe, a A_s apsorbancija nepoznatog uzorka³³. Koncentracija glukoze određivala se i iz pripadajućeg baždarnog pravca (Prilog 1.)

3.3.4. Određivanje koncentracije glukoze, fruktoze i saharoze

Koncentracija glukoze, fruktoze i saharoze određivana je pomoću HPLC-a spojenog na RI detektor. Analiza je provedena na temperaturi od 80 °C s protokom mobilne faze, redestilirane vode od 0,5 cm³min⁻¹ na koloni C₁₈-Carbohydrate Ca²⁺ (300 · 6,5 mm, CS-Chromatographie service GmbH). Vrijeme zadržavanja za glukozu bilo je 5,3 minute, za fruktozu 4,6 minuta, a za saharozu 3,6 minuta. Prije analize uzorka iz reaktora bilo je potrebno profiltrirati uzorke, a za filtriranje se koristio filter veličine pora od 0,2 μm (Grupo Linea Bea Sas, Italija).

Koncentracija glukoze, fruktoze i saharoze u nepoznatom uzorku se određivala iz vremena zadržavanja navedenih komponenata i pripadajućih baždarnih pravaca (Prilozi 2, 3 i 4).

3.4. Provedba pokusa

3.4.1. Rast *Trametes versicolor* na tresilici uzgojem na glukozu i saharozu kao izvorima ugljika

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

Prije početka pokusa uzgojene su micelijske peleti gljive *Trametes versicolor* na prethodno opisanoj hranjivoj podlozi (poglavlje 3.1.4.). Uzgojeni micelijski peleti gljive profiltrirani su na filter papiru (kvantitativni filter papir plava vrpca, $\text{Ø} = 110\text{ mm}$, Munktell, Njemačka), izvagani na analitičkoj vagi, te korišteni za rast u uvjetima submerznog uzgoja.

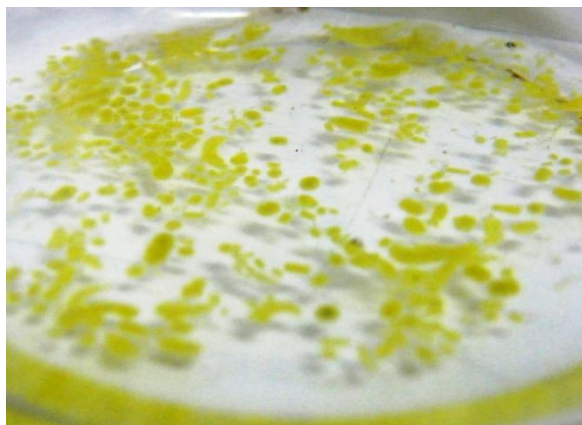
Pripremljeno je 100 cm^3 hranjive podloge (poglavlje 3.1.4.) i sterilizirano u autoklavu 30 minuta pri $T = 121\text{ }^{\circ}\text{C}$ i tlaku $p = 0,6\text{--}0,8\text{ bar}$. Profiltrirane peleti su kvantitativno prenesene u svaku tikvicu i početak pokusa je definiran njihovim dodatkom. Za svaki sastav hranjive podloge provedena su dva pokusa zbog kontrole, potvrde rezultata i statističke obrade.



Slika 3.4. Postupak sterilnog uzimanja uzorka

Uzorci za određivanje koncentracija glukoze i aktivnosti enzima uzimani su svaka 24 sata. Uzorci su uzimani u sterilnim uvjetima injekcijom kroz septum tikvice (Slika 3.4.).

Nakon uzorkovanja, uzorci su centrifugirani a iz kapljevinskog ostatka je određivana koncentracija glukoze u pokusu s glukozom kao izvorom ugljika i koncentracije glukoze, fruktoze i saharoze u pokusu sa saharozom kao izvorom ugljika. Aktivnost enzima mjerena je u oba pokusa.



(a)



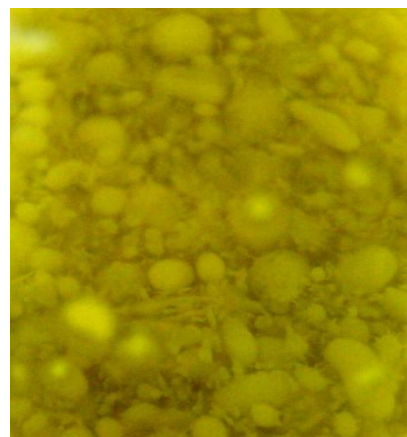
(b)



(c)



(d)



(e)

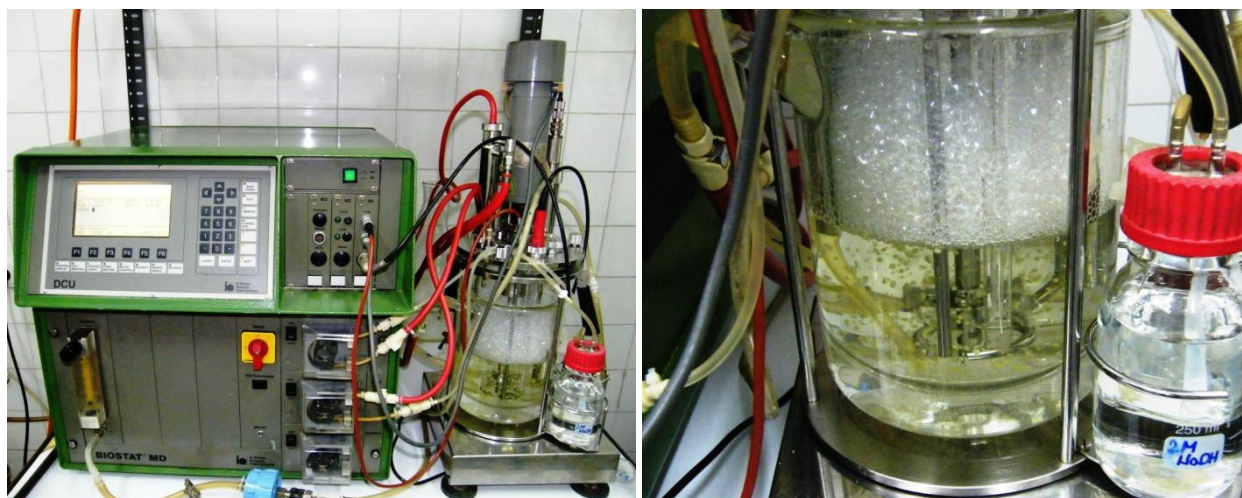
Slika 3.4. (a) Uzgoj micelijskih peleta *Trametes versicolor*; (b) Micelijski peleti na filter papiru; (c) Peleti nakon filtracije; (d) Micelijski peleti *Trametes versicolor* nakon petnaestodnevnog uzgoja na glukozu; (e) Micelijski peleti *Trametes versicolor* nakon petnaestodnevnog uzgoja na saharozu

Na kraju pokusa biomasa je profiltrirana kroz filter papir i izvagana na analitičkoj vagi. Nakon toga biomasa je sušena u sušioniku na 80 °C do konstantne mase.

3.4.2. Rast *Trametes versicolor* u bioreaktoru uzgojem na saharozi kao izvoru ugljika

Proveden je jedan pokus uzgoja *Trametes versicolor* u bioreaktoru (Slika 3.5.) tijekom 10 dana pri temperaturi 27 °C, aeracijom zraka od $q_V = 0,5 \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$ i broju okretaja mješala $n = 100 \text{ min}^{-1}$ kroz prva tri dana provedbe pokusa. Nakon toga koncentracija kisika je automatski regulirana promjenom broja okretaja miješala uz konstantnu aeraciju zrakom.

Bioreaktor je napunjen s 500 cm³ hranjive podloge (Tablica 4.6., Pokus 2) i steriliziran u autoklavu 30 minuta pri $T = 121 \text{ °C}$ i tlaku $p = 0,6 - 0,8 \text{ bar}$. U bioreaktor su preneseni micelijski peleti gljive dobiveni na prethodno opisan način čime je aproksimiran početak pokusa. Pokrenuto je miješanje, te sustavi za regulaciju temperature i regulaciju broja okretaja miješala. Hranjiva podloga je na početku zasićena kisikom iz zraka ($p_{O_2} = 100 \%$). Uzorci za određivanje koncentracija glukoze, fruktoze i saharoze, te aktivnosti enzima lakaze uzimani su svaka 24 sata. Uzorci su uzimani sterilno pomoću sustava za uzorkovanje. Ovako uzeti uzorci su centrifugirani, a iz kapljevinskog ostatka su određivane koncentracije prethodno navedenih šećera i aktivnost enzima lakaze. Tijekom pokusa praćene su promjene pH vrijednosti i koncentracije otopljenog kisika.



Slika 3.5. Bioreaktor Biostat MD, B. Braun Biotech

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu je provedeno istraživanje rasta *Trametes versicolor* u uvjetima submerznog uzgoja. Ispitan je utjecaj različitih komponenata hranjive podloge na rast i potrošnju supstrata te na dinamičku promjenu aktivnosti enzima lakaze. U pokusima s glukozom kao izvorom ugljika ispitan je utjecaj pojedinih procesnih parametara na potrošnju supstrata kao što su omjer C:N, početna koncentracija micelijskih peleta, induktora, peptona i kvašćevog ekstrakta te utjecaj potrošnje supstrata na enzimsku aktivnost. U pokusima sa saharozom kao izvorom ugljika ispitani su utjecaji svih procesnih parametara na enzimsku aktivnost te analizirana potrošnja saharoze i nastajanje i potrošnja glukoze i fruktoze, kao i pojavljivanje specifičnog trenda enzimске aktivnosti koja je u direktnom odnosu s potrošnjom supstrata.

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

Proveden je pokus u bioreaktoru kako bi se ispitao rast biomase na saharozi i proizvodnja enzima lakaze te su analizirani učinci broja okretaja i vrsta miješala na rast biomase.

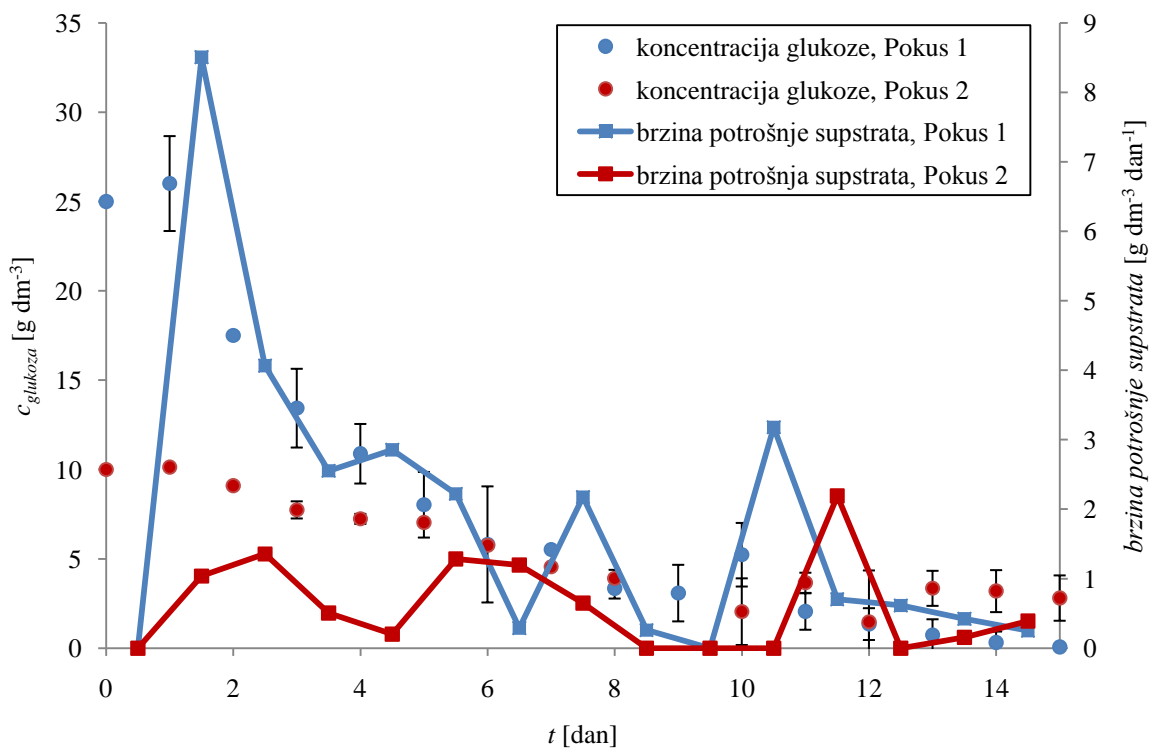
4.1. Rast *Trametes versicolor* na tresilici submerznim uzgojem na glukozu

4.1.1. Utjecaj početne koncentracije glukoze

Provedena su dva pokusa (Pokus 1 i 2) s različitim početnim koncentracijama glukoze kako bi se ispitao utjecaj početne koncentracije glukoze na brzinu potrošnje supstrata. U tablici 4.1. je prikazan sastav podloga korištenih pri ispitivanju utjecaja početne koncentracije glukoze na potrošnju supstrata. Na slici 4.1. je prikazana promjena koncentracije glukoze i brzina potrošnje supstrata pri kojima se određivao utjecaj početne koncentracije glukoze.

Tablica 4.1. Sastav hranjive podloge u pokusu ispitivanja utjecaja početne koncentracije glukoze na brzinu potrošnje supstrata

Sastav podloge	Pokus 1	Pokus 2
γ (glukoza) [g dm ⁻³]	25	10
γ (pepton) [g dm ⁻³]	0,4	0,4
γ (kvašćev ekstrakt) [g dm ⁻³]	1	0
V (Tween 80) [cm ³]	0	0
γ (induktor) [g dm ⁻³]	0	0
γ (micelijski peleti) [g dm ⁻³]	3	3
Otopina B	da	da



Slika 4.1. Promjena koncentracija glukoze i brzina potrošnje supstrata u pokusima ispitivanja utjecaja početne koncentracije glukoze na brzinu potrošnje supstrata

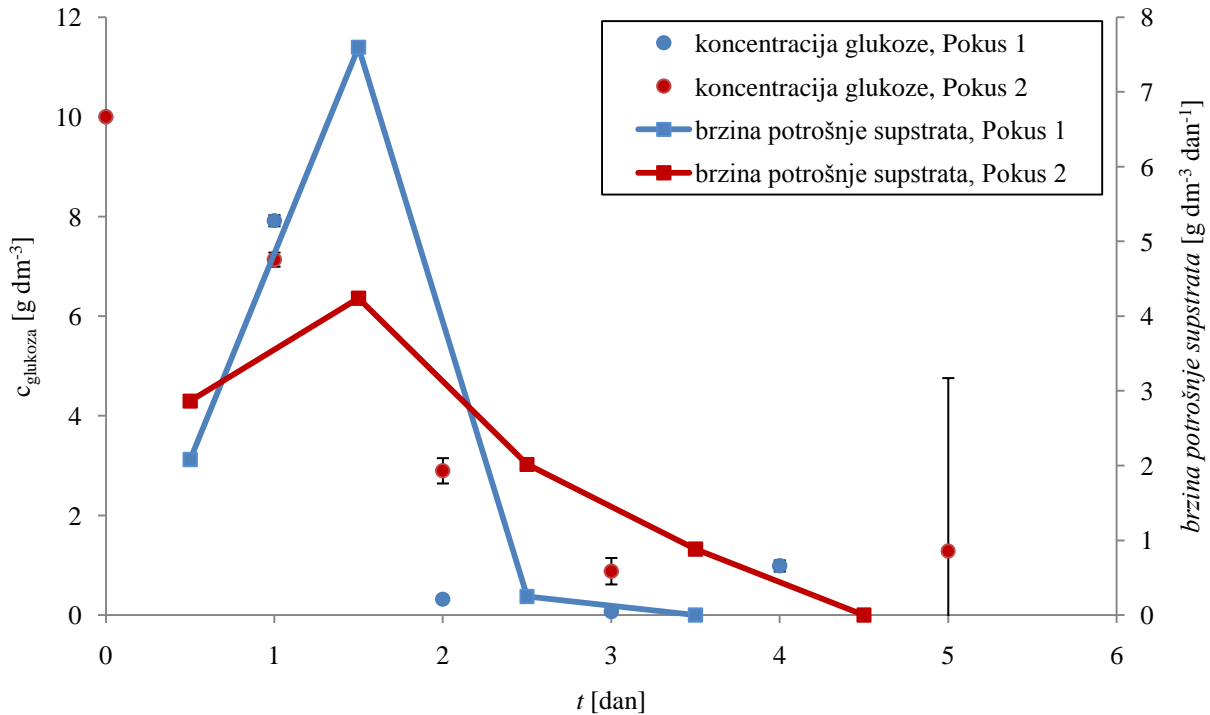
Gljivama je za rast i razvoj potreban i ugljik i dušik. Nepovoljan omjer komponenata supstrata koje sadržavaju te elemente uzrokovao je slabiji rast gljive koji se manifestirao manjom brzinom potrošnje supstrata u Pokusu 2. Iz rezultata pokusa (*Slika 4.1.*) je vidljivo da je brzina potrošnje glukoze veća u pokusu provedenom pri većoj početnoj koncentraciji glukoze i uz korištenje kvašćevog ekstrakta kao izvora dušika.

4.1.2. Utjecaj početne koncentracije micelijskih peleta

Utjecaj početne koncentracije biomase na brzinu potrošnje supstrata proveden je u pokusima za koje je početni sastav komponenata hranjivog medija prikazan u Tablici 4.2. Pokus 1 i Pokus 2 provedeni su pri istim početnim uvjetima, ali je koncentracija micelijskih peleta bila različita, te je za Pokus 1 iznosila $\gamma = 3 \text{ g dm}^{-3}$, a za Pokus 2 $\gamma = 30 \text{ g dm}^{-3}$. Rezultati pokusa, koncentracija glukoze i brzina potrošnje supstrata su prikazani na slici 4.2.

Tablica 4.2. Sastav hranjive podloge u pokusu ispitivanja utjecaja početne koncentracije micelijskih peleta

Sastav podloge	Pokus 1	Pokus 2
γ (glukoza) [g dm^{-3}]	10	10
γ (pepton) [g dm^{-3}]	0,4	0,4
γ (kvašćev ekstrakt) [g dm^{-3}]	1	1
V (Tween 80) [cm^3]	0,02	0,02
γ (induktor) [g dm^{-3}]	0	0
γ (micelijski peleti) [g dm^{-3}]	3	30
Otopina B	da	da



Slika 4.2. Promjena koncentracija glukoze i brzina potrošnje supstrata ispitivanja utjecaja početne koncentracije micelijskih peleta

Iz rezultata pokusa je vidljivo da je brzina potrošnje supstrata praktički neovisna o početnoj koncentraciji micelijskih peleta, odnosno da početna koncentracija micelijskih peleta nema utjecaja na brzinu potrošnje glukoze. Ovo ponašanje nije u skladu s očekivanjima jer bi veća početna koncentracija micelijskih peleta trebala rezultirati većom brzinom potrošnje supstrata uz pretpostavku da rast biomase u ovim pokusima nije bio limitiran nekom od komponenata hranjive podloge bitnom za rast biomase. U ovom pokusu postoji premali broj točaka pokusa kako bi se realno procijenio utjecaj početne koncentracije micelijskih peleta na promjenu koncentracije glukoze i brzinu potrošnje supstrata.

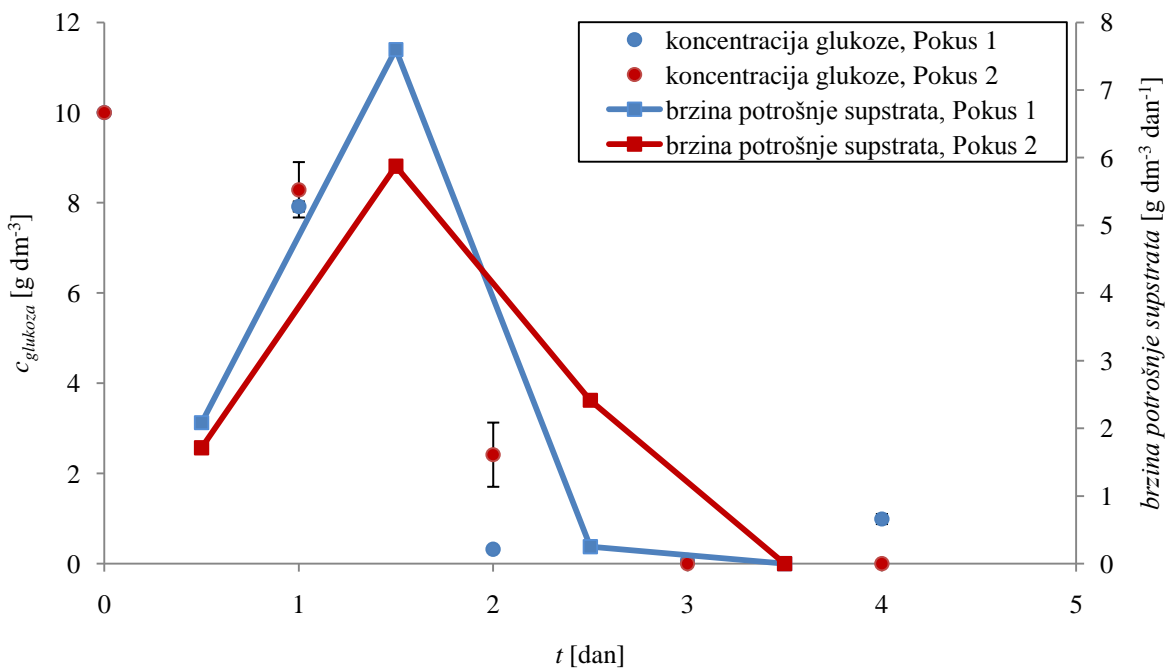
4.1.3. Utjecaj induktora

Utjecaj induktora guaiacola na potrošnju supstrata analiziran je u pokusima na hranjivoj podlozi čiji je sastav prikazan u tablici 4.3. Rezultati ovog pokusa prikazani su grafički (Slika 4.3.) kao vremenska ovisnost promjene koncentracije glukoze i brzine potrošnje supstrata.

Tablica 4.3. Sastav hranjive podloge u pokusu ispitivanja utjecaja induktora guaiacola

Sastav podloge	Pokus 1	Pokus 2
γ (glukoza) [g dm ⁻³]	10	10
γ (pepton) [g dm ⁻³]	0,4	0,4
γ (kvašćev ekstrakt) [g dm ⁻³]	1	1
V (Tween 80) [cm ³]	0,02	0,02
γ (induktor) [g dm ⁻³]	0	0,4
γ (micelijski peleti) [g dm ⁻³]	3	3
Otopina B	da	da

Na temelju rezultata pokusa (Slika 4.3.) vidljivo je da dodatak induktora ne utječe na brzinu potrošnje supstrata. Ovo je u skladu s literaturnim podacima prema kojima guaiacol utječe samo na proizvodnju enzima, odnosno na sekundarni metabolizam *T. versicolor*. U ovim pokusima aktivnost enzima lakaze je bila zanemariva. Utjecaj induktora na primarni metabolizam nije od velike biotehnoške važnosti, a ovim pokusom je pokazano da dodatak induktora ne utječe značajnije na brzinu potrošnje primarnog supstrata.



Slika 4.3. Promjena koncentracija glukoze i brzina potrošnje supstrata u pokusima ispitivanja utjecaja induktora guaiacola

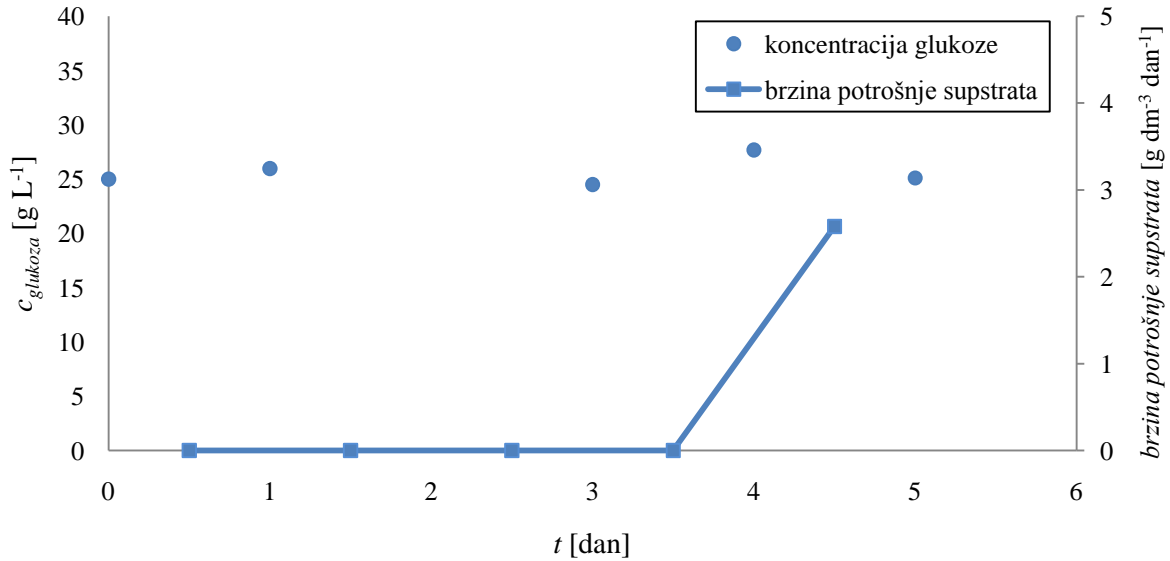
4.1.4. Utjecaj peptona i kvašćevog ekstrakta na potrošnju supstrata, rast biomase i aktivnost enzima lakaze

Utjecaj peptona i kvašćevog ekstrakta na potrošnju glukoze i rast biomase analiziran je u pokusu (Pokus 1) provedenom na hranjivoj podlozi koja je sadržavala uz glukozu kao izvor ugljika i komponente u koncentracijama prikazanim u tablici (*Tablica 4.4.*). Pepton i kvašćev ekstrakt predstavljaju osnovni izvor dušika potrebnog za rast, razvoj i održavanje staničnih funkcija gljive *Trametes versicolor*.³⁴

Tablica 4.4. Sastav hranjive podloge u pokusu ispitivanja utjecaja peptona i kvašćevog ekstrakta na potrošnju glukoze

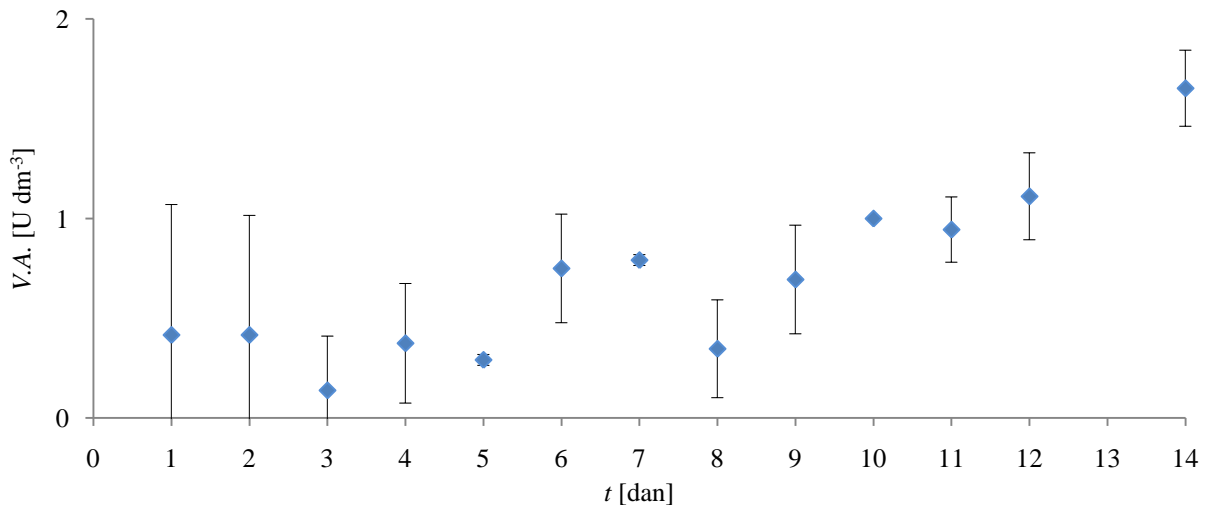
Sastav podloge	Pokus 1
γ (glukoza) [g dm ⁻³]	25
γ (pepton) [g dm ⁻³]	0
γ (kvašćev ekstrakt) [g dm ⁻³]	0
V (Tween 80) [cm ³]	0,08
γ (induktor) [g dm ⁻³]	0,6
γ (micelijski peleti) [g dm ⁻³]	3
Otopina B	da

U ovom pokusu, pepton i kvašćev ekstrakt koji služe kao glavni izvor dušika, nisu bili dodani u hranjivu podlogu. Da bi došlo do rasta biomase, omjer C/N mora biti povoljan, odnosno u hranjivoj podlozi osim izvora ugljika mora postojati i izvor dušika.³⁵



Slika 4.4. Promjena koncentracija glukoze i brzina potrošnje supstrata u pokusima ispitivanja utjecaja peptona i kvašćevog ekstrakta

Iz slike 4.4. je vidljivo da u ovom pokusu nije došlo do potrošnje glukoze, a samim tim ni do rasta biomase. Iako je supstrat sadržavao ugljik, nedostatak dušika onemogućio je njegovo korištenje za rast i razvoj. Hranjiva podloga mora sadržavati izvor ugljika i izvor dušika kako bi se pokrenuo primarni metabolizam gljive, odnosno njen rast i razvoj.



Slika 4.5. Promjena aktivnosti enzima lakaze u pokusu ispitivanja utjecaja peptona i kvašćevog ekstrakta na potrošnju supstrata i rast biomase

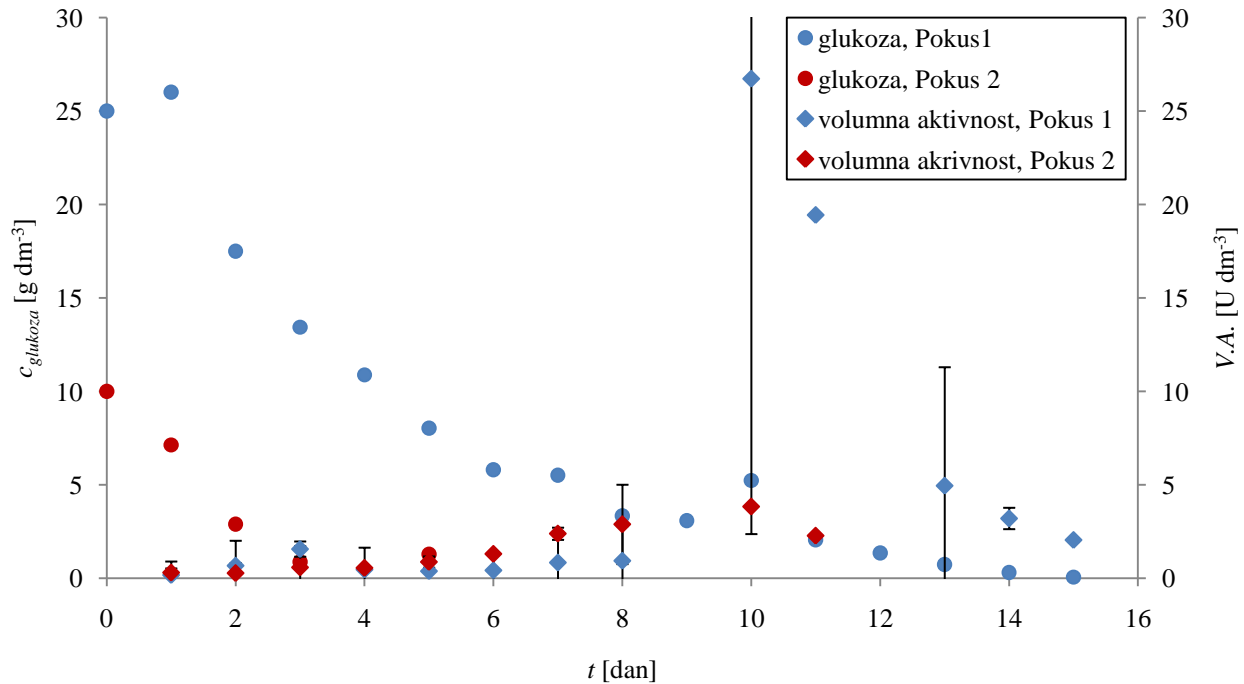
U ovom pokusu mjerena je i promjena aktivnosti enzima lakaze (*Slika 4.5.*). Iako je došlo do značajnijeg porasta aktivnosti enzima lakaze između 12. i 14. dana uzgoja, vjerojatno uzrokovanog aktiviranjem sekundarnog metabolizma, izmjerene aktivnosti enzima lakaze izrazito su male te se praktički mogu zanemariti.

4.1.5. Utjecaj potrošnje supstrata na enzimsku aktivnost

Provedena su dva pokusa u svrhu određivanja utjecaja brzine potrošnje supstrata na aktivnost lakaze. Sastav hranjive podloge u ovim pokusima je dan u tablici 4.5., a rezultati pokusa su prikazani na slici 4.6. (promjena koncentracije glukoze i aktivnosti enzima lakaze).

Tablica 4.5. Sastav hranjive podloge u pokusu ispitivanja utjecaja brzine potrošnje supstrata na enzimsku aktivnost

Sastav podloge	Pokus 1	Pokus 2
γ (glukoza) [g dm ⁻³]	25	10
γ (pepton) [g dm ⁻³]	0,4	0,4
γ (kvašćev ekstrakt) [g dm ⁻³]	1	1
V (Tween 80) [cm ³]	0	0,02
γ (induktor) [g dm ⁻³]	0	0
γ (micelijski peleti) [g dm ⁻³]	3	3
Otopina B	da	da



Slika 4.6. Promjena koncentracije glukoze i aktivnosti enzima lakaze u pokusu ispitivanja utjecaja brzine potrošnje supstrata na enzimsku aktivnost

Iz rezultata pokusa (Slika 4.6.) je vidljivo da do mjerljivog povećanja aktivnosti enzima lakaze dolazi kada koncentracija glukoze padne ispod 5 g dm^{-3} . U oba pokusa, provedena pri različitim početnim uvjetima maksimalna enzimska aktivnost se postiže u isto vrijeme (deseti dan).

Prikazan rast enzimске aktivnosti tumači se promjenom metabolizma *T. versicolor* s tipa I na tip II, odnosno prelaskom iz tropofaze u idiofazu. Kada koncentracija glukoze padne na dovoljno nisku razinu, gljiva pojačano luči lignolitički enzim lakazu kako bi razgradila eventualne lignocelulozne supstrate i osigurala dodatni izvor ugljika. Ukoliko takvi supstrati ne postoje u hranjivoj podlozi, prestaje lučenje enzima i dolazi do pada enzimске aktivnosti što je vidljivo iz rezultata pokusa (Slika 4.6.).

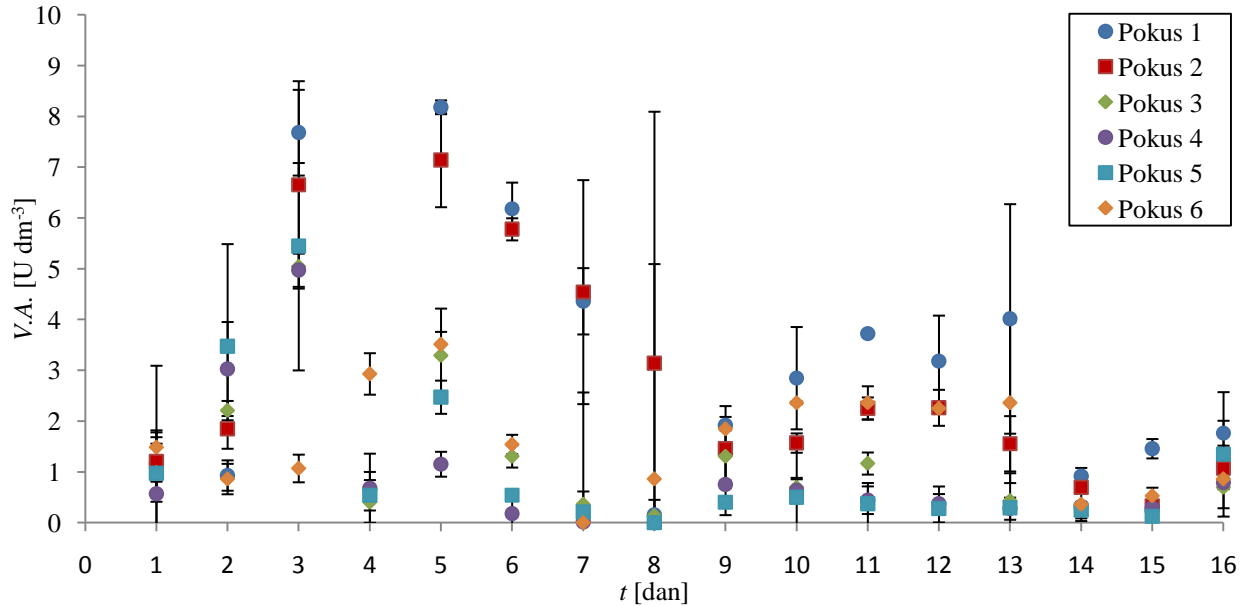
4.2. Rast *Trametes versicolor* na tresilici submerznim uzgojem na saharozi

Provedeno je šest pokusa na tresilici s različitim koncentracijama saharoze kao izvora ugljika i pri različitim koncentracijama komponenata hranjive podloge. Sastav komponenata hranjive podloge dan je u tablici 4.6. a rezultati pokusa, dinamička promjena aktivnosti enzima, su prikazani na slici 4.7.

Tablica 4.6. Sastav hranjivih podloga u pokusima sa saharozom kao izvorom ugljika

Sastav podloge	Pokus 1	Pokus 2	Pokus 3	Pokus 4	Pokus 5	Pokus 6
γ (glukoza) [g dm ⁻³]	10	20	30	40	50	20
γ (pepton) [g dm ⁻³]	0,1	0,3	0,6	0,9	1,2	0,3
γ (kvašćev ekstrakt) [g dm ⁻³]	0,5	1	1,5	2	2,5	0,5
V (Tween 80) [cm ³]	0	0,01	0,02	0,03	0,04	0,02
γ (induktor) [g dm ⁻³]	0,2	0,4	0,6	0,8	1	0,4
γ (micelijski peleti) [g dm ⁻³]	2	3	4	5	6	3
Otopina B	da	da	da	da	da	da

U pokusima je praćena promjena koncentracija saharoze, glukoze i fruktoze, te je mjerena aktivnost enzima lakaze pri čemu su u svim pokusima postignute izrazito male vrijednosti aktivnosti. Bez obzira na navedeno, uočeni su određeni trendovi s obzirom na sastav hranjive podloge.



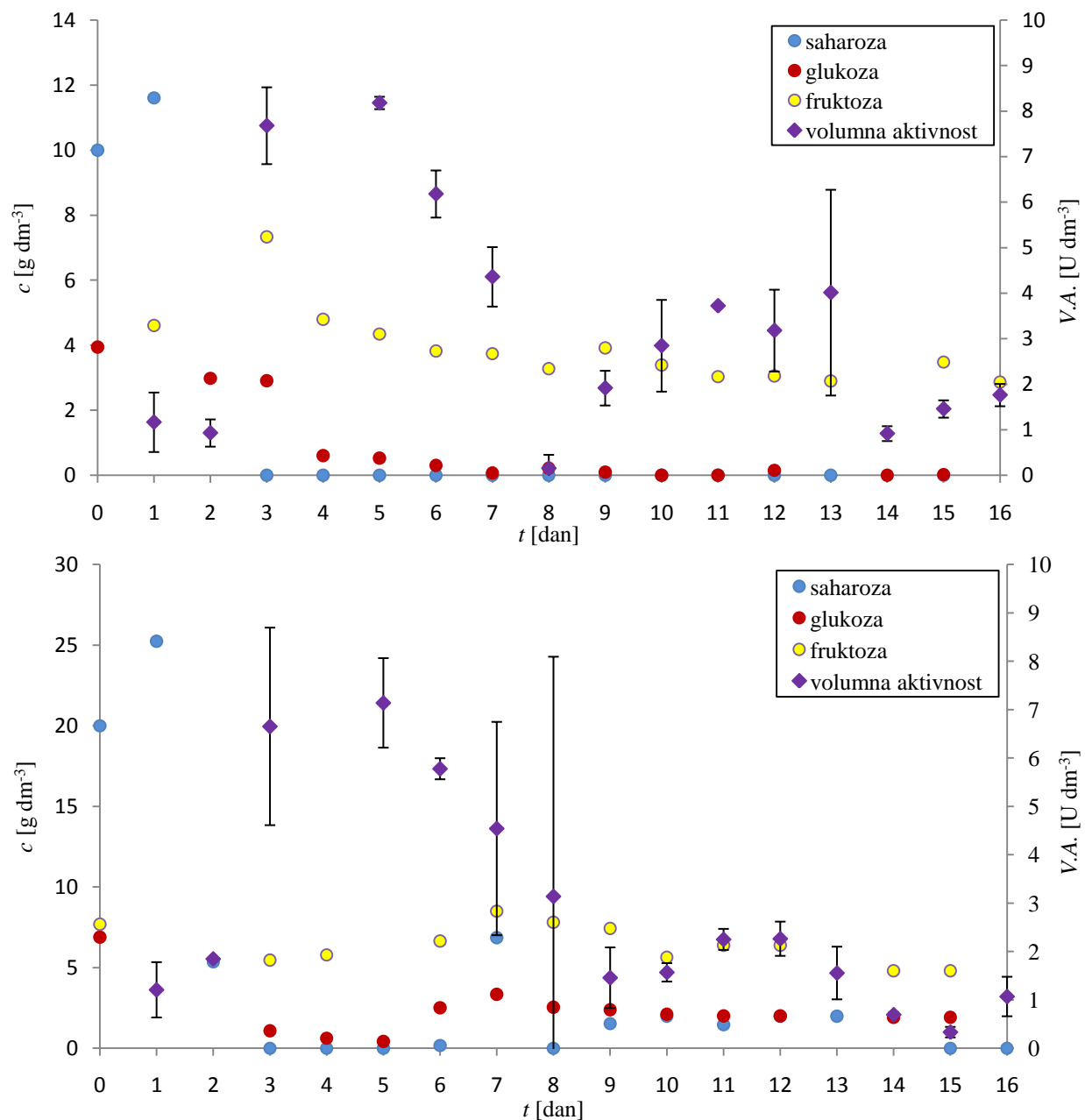
Slika 4.7. Dinamička promjena aktivnosti enzima lakaze u pokusima sa saharozom kao izvorom ugljika

Pozitivni učinak niže početne koncentracije supstrata na aktivnost enzima vidljiv je u Pokusu 1 i Pokusu 2 u kojima su početne koncentracije saharoze bile $\gamma = 10 \text{ g dm}^{-3}$ i $\gamma = 20 \text{ g dm}^{-3}$ (Tablica 4.6.). U ova dva pokusa je zabilježena najveća volumna aktivnost enzima, za Pokus 1 $V.A. = 8,18 \text{ U dm}^{-3}$ i za Pokus 2 $V.A. = 7,14 \text{ U dm}^{-3}$ i to u oba pokusa u petom danu provedbe procesa. Relativno visoka aktivnost direktno je povezana s početnom koncentracijom supstrata i opada s povećanjem početne koncentracije saharoze. Manje količine saharoze gljiva brže razgrađuje te nastaje manje monosaharida, glukoze i fruktoze. Do aktiviranja sekundarnog metabolizma dolazi kada gljiva potroši sav ugljik. Pri većim početnim koncentracijama saharoze nastaje i više monosaharida pa je aktivnost enzima lakaze u ovim pokusima manja.

Utjecaj ostalih procesnih parametara na aktivnost enzima lakaze kao što su početna koncentracija micelijskih peleta, peptona, kvašćevog ekstrakta, Tweena 80, induktora i vremena dodavanja induktora nije opažen.

Kontinuirano povećanje početnih koncentracija komponenata hranjive podloge, koji prema literaturnim podacima povećavaju proizvodnju enzima lakaze (guaiacol, Tween 80, koncentracija biomase), kroz Pokuse 1-5 ne rezultira povećanjem aktivnosti enzima lakaze.

To se može objasniti sastavom podloge koja sadržava jednostavne supstrate za čiju razgradnju nije potrebna lakaza, te stoga ne dolazi niti do značajnije indukcije proizvodnje enzima lakaze u ovim uvjetima.



Slika 4.8. Promjena aktivnosti enzima lakaze i koncentracija saharoze, glukoze i fruktoze u Pokusima 1 i 2

Na slici 4.8. su prikazane promjene aktivnosti enzima lakaze i koncentracija saharoze, glukoze i fruktoze u Pokusima 1 i 2. Iz rezultata je vidljivo da je saharoza razgrađena na glukozu i fruktozu. Ova biotransformacija je vjerojatno katalizirana unutarstaničnim enzimom invertazom koji razgrađuje saharozu na glukozu i fruktozu. Nakon što je saharoza razgrađena, gljiva prvo koristi glukozu kao izvor ugljika što je vidljivo iz pada koncentracije glukoze pri čemu koncentracija fruktoze ostaje praktički nepromjenjena. Po potrošnji glukoze gljiva se prilagođava fruktozi kao novom izvoru ugljika. Nakon prilagodbe gljiva bi najvjerojatnije trošila fruktozu ali taj podatak nije potvrđen jer pokus nije praćen dovoljno dugo.

Sukladno s promjenom koncentracija saharoze, glukoze i fruktoze uočen je karakterističan trend u promjeni aktivnosti enzima lakaze. Nakon što gljiva razgradi saharozu na njene monosaharide, dolazi do naglog pada koncentracije saharoze u podlozi što uzrokuje porast aktivnosti enzima. Povećanjem koncentracija glukoze i saharoze naglo opada aktivnost enzima koja ponovo raste nakon što se koncentracija glukoze značajno smanji.

Do naglog porasta enzimske aktivnosti dolazi svaki put kada se koncentracija određenog šećera približi nuli. Gljiva tada mijenja tip metabolizma iz tropofaze u idiofazu kako bi osigurala potencijalne izvore ugljika, a kada se poveća koncentracija šećera, aktivnost enzima opada i dolazi do ponovne promjene tipa metabolizma. Do pada aktivnosti dolazi jer je izvor ugljika u supstratu relativno jednostavan te nije potrebno koristiti izvanstanične enzime kao što je lakaza za njegovu razgradnju. Usporedbom rezultata oba pokusa (*Slika 4.8.*) vidljivo je da do oba maksimuma i do minimuma enzimske aktivnosti dolazi otprilike u isto vrijeme, odnosno dinamičko vladanje enzimske aktivnosti slično je za oba pokusa. Ovaj se trend ponavlja kroz sve pokuse (*Slika 4.7.*) ali je najizraženiji u Pokusu 1 i Pokusu 2.

4.3. Rast *Trametes versicolor* u bioreaktoru

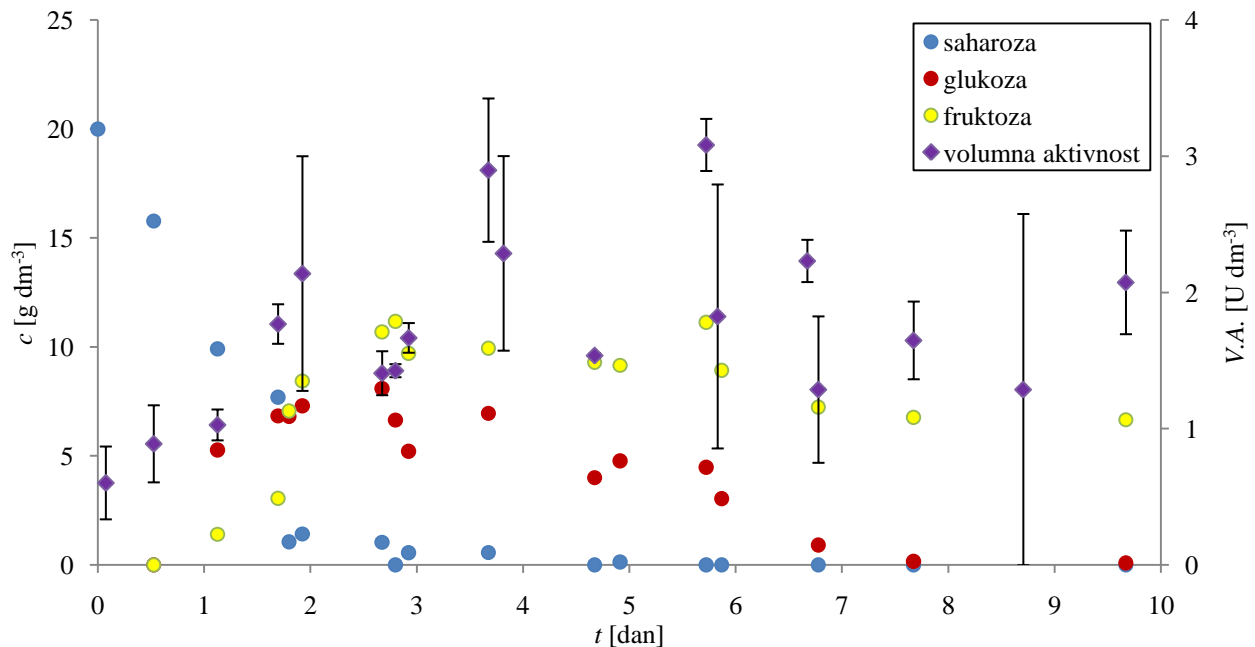
Praćenje rasta biomase i potrošnje supstrata provedeno je i u bioreaktoru. Cilj ovog pokusa je bio promatranje ponašanja rasta gljive u aerobnim uvjetima i u uvećanom mjerilu. Pokus je proveden pri $T = 27\text{ }^{\circ}\text{C}$ i početnom broju okretaja $n = 100\text{ min}^{-1}$.

Sastav hranjive podloge prikazan je u tablici 4.7. Vrijednost pH regulirana je na 5,5 dodatkom NaOH,¹⁴ a tijekom cijelog pokusa praćeni su broj okretaja mješala i koncentracija otopljenog kisika (Slika 4.11.).

Tablica 4.7. Sastav hranjive podloge za pokus proveden u bioreaktoru

Sastav podloge	Pokus 1
γ (glukoza) [g dm ⁻³]	20
γ (pepton) [g dm ⁻³]	0,3
γ (kvašćev ekstrakt) [g dm ⁻³]	1
V (Tween 80) [cm ³]	0,01
γ (induktor) [g dm ⁻³]	0,4
γ (micelijski peleti) [g dm ⁻³]	3
Otopina B	da

Hranjiva podloga je sadržavala saharozu kao izvor ugljika, a tijekom pokusa je praćena potrošnja saharoze, proizvodnja i potrošnja glukoze i fruktoze, te promjena aktivnosti enzima (Slika 4.9.)



Slika 4.9. Promjena koncentracije saharoze, glukoze i fruktoze te aktivnosti enzima lakaze u pokusu provedenom u bioreaktoru

Kao i u pokusima provedenim na tresilici, uočena je razgradnja saharoze na glukozu i fruktozu katalizirana enzimskom razgradnjom pomoću unutarstaničnog enzima invertaze. Tijekom provedbe pokusa došlo je do potrošnje glukoze za rast i razvoj gljive što se moglo uočiti velikim vizualnim prirastom biomase (*Slika 4.10.*). Iz rezultata pokusa je vidljivo da se za rast prvo koristi glukoza. Koncentracija fruktoze pri tome ostaje nepromijenjena jer se metabolizam *T. versicolor* prilagođavao novom izvoru ugljika. Nakon prilagodbe metabolizma, gljiva bi najvjerojatnije koristila fruktozu kao izvor ugljika i potrošila je do kraja, kao što je to slučaj bio s glukozom. Da se dokaže ova hipoteza, potrebno je dodatno istraživanje, odnosno potrebno je pokus provoditi dulje vrijeme.



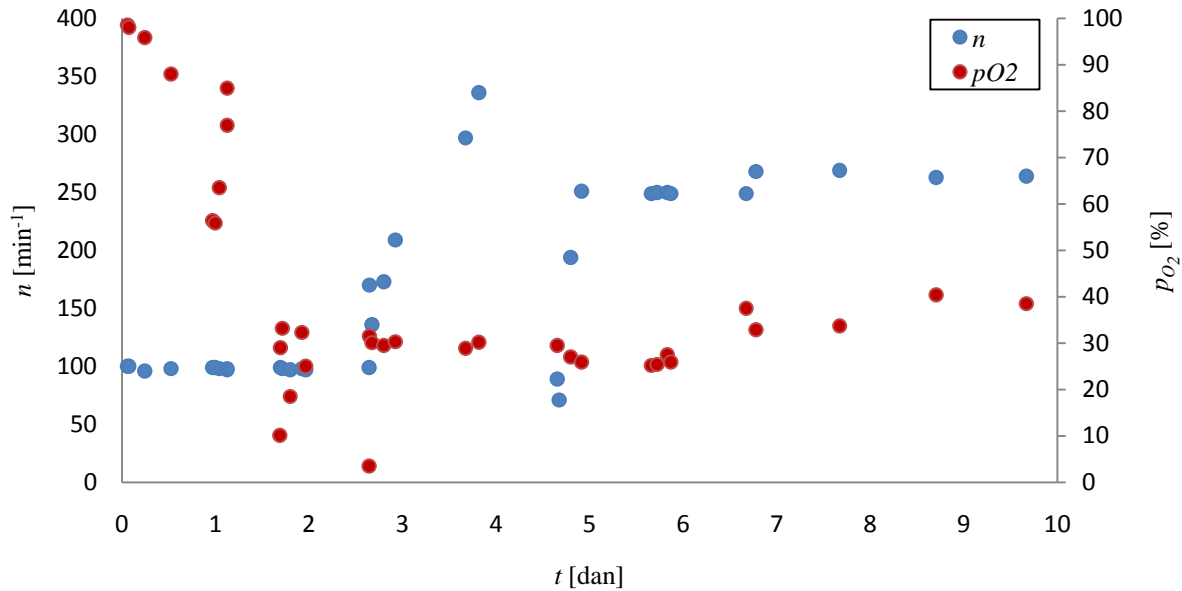
(a)

(b)

Slika 4.10. Rast biomase u bioreaktoru: (a) na početku pokusa u trenutku dodavanja inokuluma u hranjivu podlogu; (b) deseti dan pokusa

Tijekom provedbe pokusa pratila se i aktivnost enzima, ali je kao i u prethodnim pokusima ona izrazito mala i praktički zanemariva (*Slika 4.9.*). Trend promjene aktivnosti enzima lakaze nije jednak onome postignutom u pokusima na tresilici sa saharozom kao izvorom ugljika i maksimalna postignuta volumna aktivnost je dva puta manja u pokusu provedenom u bioreaktoru. Pretpostavlja se da je to rezultat negativnog djelovanja velike brzine miješanja i neprikladnog izbora miješala (Rushtonove turbine).

Pokus je proveden u aerobnim uvjetima pri konstantnoj aeraciji zrakom ($q_V = 0,5 \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$) i početnom broju okretaja $n = 100 \text{ min}^{-1}$. Nakon tri dana provedbe pokusa je uočen pad koncentracije otopljenog kisika pa je sustav podešen na automatsku regulaciju brzine miješanja kako bi se postigla zadovoljavajuća aeracija. ($p_{O_2} = 20 - 40 \%$) (Slika 4.11.)



Slika 4.11. Promjena broja okretaja i zasićenosti kisikom u bioreaktoru

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu provedeni su pokusi uzgoja *Trametes versicolor* na tresilici u kojima su kao izvor ugljika korišteni glukoza i saharoza, te u bioreaktoru gdje je kao izvor ugljika korištena saharoza. Proučavan je utjecaj slijedećih procesnih parametara: početna koncentracija supstrata, početna koncentracija micelijskih peleti, koncentracija induktora guaiacola, Tweena 80, peptona i kvašćevog ekstrakta na potrošnju supstrata i promjenu aktivnosti enzima lakaze, te utjecaj potrošnje supstrata na enzimsku aktivnost.

U pokusima na tresilici gdje je kao izvor ugljika korištena glukoza uočen je pozitivan utjecaj veće početne koncentracije glukoze na brzinu potrošnje supstrata. Veća početna koncentracija micelijskih peleta i induktora ne utječe na brzinu potrošnje supstrata i metabolizma *Trametes versicolor*.

Nedostatak dušika ispitan u pokusu provedenom bez prisustva peptona i kvašćevog ekstrakta rezultirao je izostankom rasta, a brzina potrošnje glukoze bila je zanemariva. Niti u jednom od provedenih pokusa na tresilici u kojima je glukoza korištena kao izvor ugljika, nije došlo do postizanja značajnije aktivnosti enzima lakaze. Kada se koncentracija glukoze približi nuli, dolazi do neznatnog povećanja aktivnosti enzima uzrokovanog prelaskom metabolizma tip I na metabolizam tipa II.

U pokusima provedenim na tresilici sa saharozom kao izvorom ugljika ispitani su slijedeći utjecaji: početna koncentracija supstrata, početna koncentracija micelijskih peleti, peptona i kvašćevog ekstrakta, Tweena 80, induktora guaiacola, kao i vremena dodavanja induktora na aktivnost enzima lakaze. Uočeno je da najveći utjecaj na enzimsku aktivnost ima početna koncentracija supstrata te da je enzimska aktivnost veća što je početna koncentracija saharoze bila manja. Mjerljiv utjecaj ostalih proučavanih procesnih parametara na enzimsku aktivnost nije uočen.

U svim pokusima provedenim na tresilici sa saharozom kao izvorom ugljika postoji trend porasta enzimске aktivnosti povezan s promjenom koncentracija saharoze, glukoze i fruktoze. Padom koncentracija saharoze i glukoze dolazi do rasta aktivnosti enzima što se tumači prilagođavanjem gljive na okolinu bez jednostavnih izvora ugljika i njen prelazak u idiofazu, odnosno na sekundarni metabolizam.

U pokusu provedenom u bioreaktoru praćen je utjecaj aerobnih uvjeta i uvećanog mjerila na aktivnost enzima lakaze. Dinamika promjene koncentracija saharoze, glukoze i fruktoze je istovjetna onoj dobivenoj na tresilici, ali je volumna aktivnost enzima lakaze u ovom pokusu značajno manja od one u pokusima provedenim na tresilici što je vjerojatno uzrokovano negativnim djelovanjem velike brzine miješanja i neprikladnim izborom tipa miješala (Rushtonove turbine).

U svim pokusima postignuta enzimaska aktivnost relativno je niska i rijetko je veća od 10 U dm^{-3} . Razlog tome je u jednostavnim šećerima korištenim u pokusima koje ne treba tretirati lakazom. Ovakvi supstrati se ne mogu primjenjivati u biotehnološkim procesima proizvodnje enzima za razliku od lignoceluloznih supstrata (otpad industrije pulpe i papira) gdje enzimaska aktivnost može postići vrijednosti i do 1000 U dm^{-3} .³⁶

6. LITERATURA

1. **Oliver R. P., Schweizer M.:** Molecular fungal biology, Press Syndicate of the University of Cambridge, 1999., 284.-288.
2. **Ander P., Eriksson K. E.:** Methanol formation during lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*, Appl. Microbiol. Biotechnol 21, 1985., 96.-102.
3. **Kahraman S. S., Gurdal I. H.:** Effect of synthetic and natural culture media on laccase production by white rot fungi, Bioresource Technology 82, 2002., 215.-217.
4. **Mayer A. M., Staples R. C.:** Laccase: new functions for an old enzyme, Phytochemistry 60, 2002., 551.-565.
5. **Thalero K., Thalero A.** Foundations in microbiology: Wm. C. Brown Publishers, 1996.
6. **Prescott L. M., Harley J. P., Klein D. A.:** Microbiology, Wm. C. Brown Publishers, 1996.
7. **Borrás E., Blànzeq P., Sàrra M., Caminal G., Vicent T.:** *Trametes versicolor* pellets production: Low-cost medium and scale-up, Biochemical Engineering Journal 42, 2008., 61.-66.
8. **Barredo J. L.:** Microbial Enzymes and Biotransformations, Human Press, 2005.
9. **Bruce A., Palfreyman J. W.:** Forest products biotechnology, Taylor & Francis LTD., 1998.
10. **Gadd G.M.:** Fungi in bioremediation, Press Syndicate of the University of Cambridge, 2001.
11. **Walter M., Boul L., Chong R., Ford C.:** Growth substrate selection and biodegradation of PCP by New Zeland white-rot fungi, Journal of Environmental Management 71, 2004., 361.-369.
12. **Altman A.:** Agricultural biotechnology, Marcel Dekker, Inc., 1998.
13. **Skidar S.K., Irvine R.L.:** Biodegradation Technology Developments: Principles and Practice; Volume II, Technomic Publishing Company, Inc, 1998.
14. **Elisashvili V., Rebhun M.:** Wood-rotting Basidiomycetes for production of lignolytic enzymes, WO 2006/114787

15. **Tavares A.M.P., Coelho M.A.Z., Coutinho J.A.P., Xavier A.M.R.B.**, Laccase improvement in submerged cultivation: induced production and kinetic modelling, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 80, 2005., 669.-676.
16. **Xavier A.M.R.B., Tavares A.M.P., Ferreira R., Amado F.**: *Trametes versicolor* growth and laccase induction with by-products of pulp and paper industry, *Electronic Journal of Biotechnology* 10, 2007., 444. – 451.
17. **Young R.A., Masood A.**: Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry, Wiley, John & Sons, Inc., 1998.
18. **Copeland R. A.**: Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis, Wiley – VCH, Inc., 2000.
19. **de Grey A.D.N.J., Alvarez P.J.J., Brady R.O., Cuervo A.M., Jerome W.G., McCarty P.L., Nixon R.A., Rittmann B.E., Sparrow J.R.**: Medical bioremediation: prospects for the application of microbial catabolic diversity to aging and several major age-related diseases. *Ageing Res Rev* 2005.
20. **Aehle W.**: Enzymes in industry, production and applications, Wiley – VCH, 2007.
21. **Kuchel P.W., Ralston G.B.**: Biochemistry, The McGraw – Hill Companies, Inc. 1998.
22. **Houston M. E.**: Biochemistry premier for exercise science, Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, 2006.
23. **Lengeler J.W., Drews G., Schlegel H.G.**: Biology of Prokaryotes, Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, 1999.
24. **Farell R., Kirk T., Tien M.**: Novel enzymes for degradation of lignin, WO 87/00550
25. **Kirk T.K., Chang H.M.**: Potential applications of bio-lignolytic systems, *Enzyme Microb. Technol.*, 1981., Vol.3, July
26. **Mamma D., Kourtoglu E., Christakopoulos P.**: Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry: *Bioresource Technology* 99, 2008., 2372.-2383.
27. **Saparrat M. C. N., Arambarri A. M., Balatti P. A.**: Growth and extracellular laccase production of *Minimidochuim parvum* LPSC # 548 strain; *Bol. Soc. Argent. Bot.* 42 (1-2): 2007., 39. – 44.

28. **Cambria M. T., Cambria A., Ragusa S., Rizzarelli E.:** Production, Purification nad Properties of an Extracellular Laccase from *Rigidosporus lignosus*; Protein Expression and Purification 18, 2000., 141. – 147.
29. **Couto S. R., Herrera J. L. T.:** Industrial and biotechnological applications of laccases: A review; Biotechnology Advances 24, 2006., 500. – 513.
30. **Rauscher K., Voigt J., Wilke I., Wilke K.T.:** Chemische Tabellen und Rechentafeln für die Analytische Praxis, VEP, Leipzig 1972., 143.-145.
31. **Henriquez C., Lissi E.:** Evaluation of the extinction coefficient of the ABTS derived radical cation, Bol Soc Chi. Quím, 47, 2002.
32. **Tišma M.:** Oksidacija fenolnih spojeva lakazom iz *Trametes versicolor* u različitim tipovima reaktora, magistarski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2008.
33. **Richter M., Tietz U.J.:** Automated enzymatic determination of glucose, maltose and starch on microtitier plates, Starch-Starke, 46, 1994., 81.-85.
34. **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.
35. **Levin L., Forchiassin F., Ramos A. M.:** Copper induction of lignin-modifying enzymes in the white-rot fungus *Trametes roggii*; Mycologia, 94(3), 2002., 377.-383.
36. **Pilaš J.:** Proizvodnja lakaze uzgojem *Trametes versicolor* na otpadu industrije pulpe i papira, diplomski rad, 2009.

7. POPIS SIMBOLA I SKRAĆENICA

7.1. Simboli

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

7.1.1. Grčki simboli

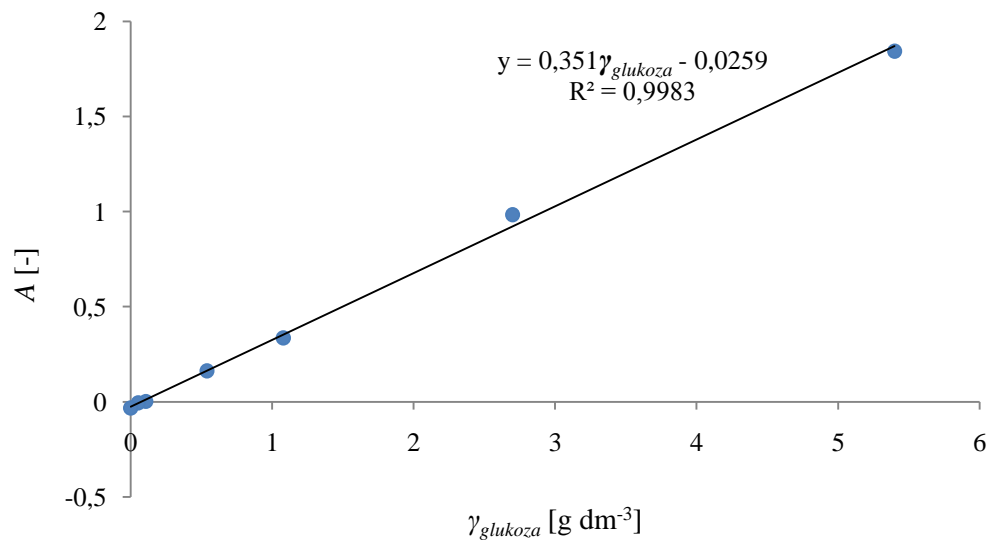
α	nagib pravca, °
γ	masena koncentracija, g dm ⁻³
ϵ_{420}	apsorpcijski koeficijent, dm ³ μ mol ⁻¹ cm ⁻¹
λ	valna duljina, nm

7.2. Skraćenice

ABTS	2,2'-azinodi-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)
ABTS ⁺	2,2'-azinodi-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) radikal
GOD	glukoza oksidaza
HAA	3-hidroksiantranilat
HBT	1-hidroksibenzotriazol
HPLC	(High Pressure Liquid Chromatography) kapljevinska kromatografija visoke djelotvornosti
LiP	lignin peroksidaza
MnP	mangan peroksidaza
PAP	peroksidaza antiperoksidaza
POD	peroksidaza
U	internacionalna jedinica katalitičke aktivnosti enzimaska, $1 \text{ U} = 1 \mu\text{mol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$
kat	SI jedinica katalitičke aktivnosti enzima, $1 \text{ kat} = 1 \text{ mol s}^{-1}$

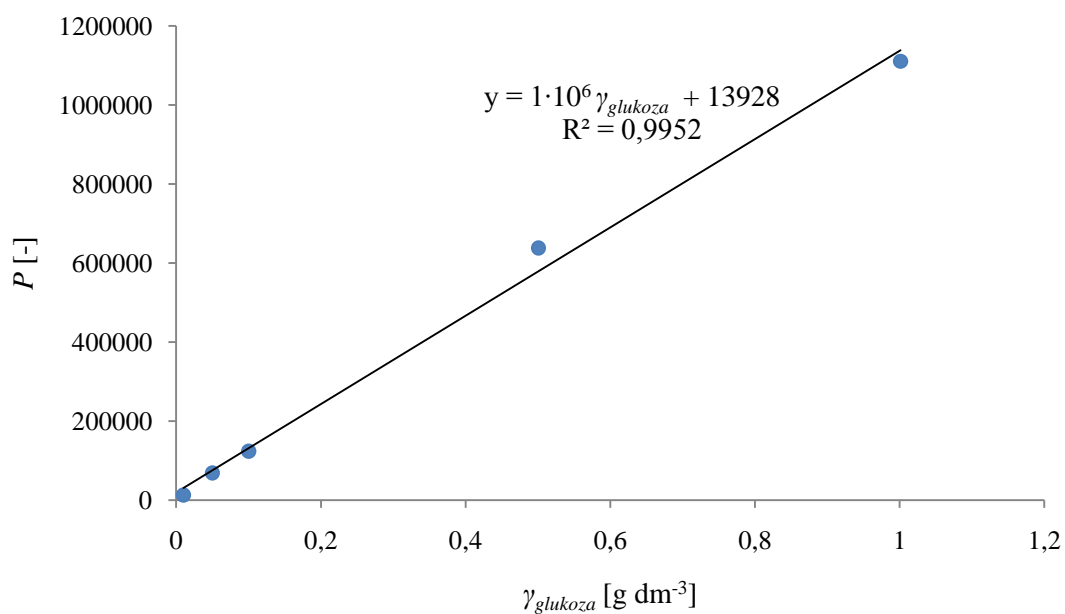
8. PRILOZI

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



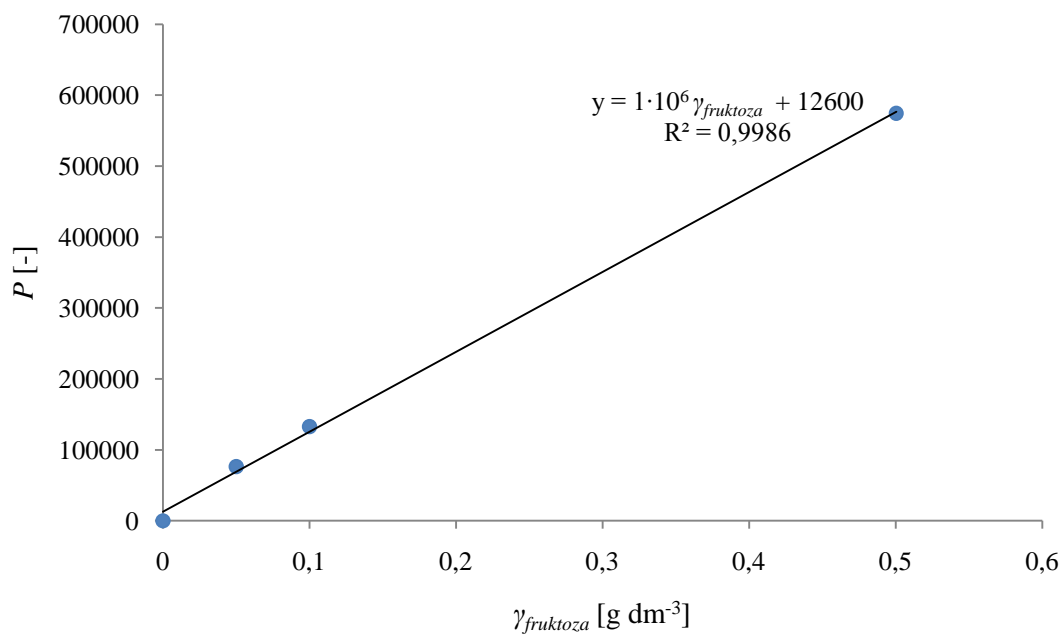
Slika 8.1. Baždarni pravac za određivanje koncentracije glukoze PAP testom

PRILOG 2.: Baždarni pravac za određivanje koncentracije glukoze HPLC-om (Slika 8.2.).



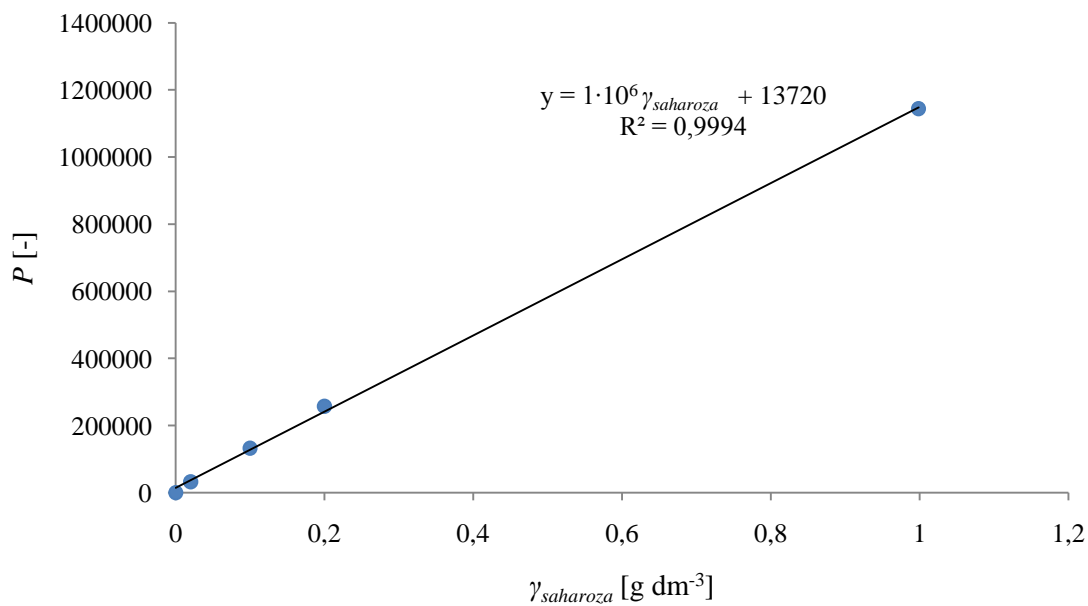
Slika 8.2.: Baždarni pravac za određivanje koncentracije glukoze HPLC-om

PRILOG 3.: Baždarni pravac za određivanje koncentracije fruktoze HPLC-om (Slika 8.3.).



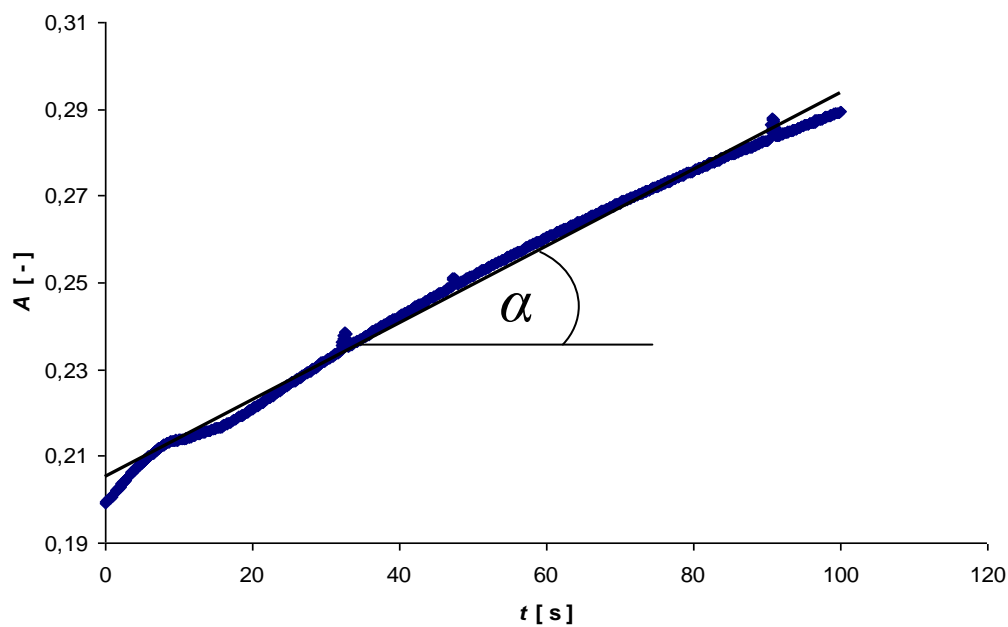
Slika 8.3.: Baždarni pravac za određivanje koncentracije fruktoze HPLC-om

PRILOG 4.: Baždarni pravac za određivanje koncentracije saharoze HPLC-om (Slika 8.4.).



Slika 8.4. Baždarni pravac za određivanje koncentracije saharoze HPLC-om

PRILOG 5.: Dinamička promjena apsorbancije u mjerenju aktivnosti enzima lakaze pomoću ABTS-a (Slika 8.5.).



Slika 8.5. Dinamička promjena apsorbancije tijekom mjerenja aktivnosti enzima lakaze na spektrofotometru. Kut α jednak je promjeni apsorbancije s vremenom $\frac{\Delta A}{\Delta t}$ koja se koristi pri računanju volumne aktivnosti enzima (jednadžba 3.1.).

ŽIVOTOPIS

Krešimir Janeš rođen je 12. listopada 1983. godine u Sisku. Završio je opću gimnaziju Sisak s odličnim uspjehom. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije upisuje 2002. godine. Tijekom studija bio je demonstrator na kolegijima Bilanca tvari i energije, Biokemijsko inženjerstvo, Mikrobiologija i Zaštita okoliša. Sudjelovao u organizaciji „XX. skupa hrvatskih kemičara i kemijskih inženjera“ (2007.) i u organizaciji „Drugog internacionalnog simpozija o upravljanju okolišem“ (2007.)

Sudjelovao je na projektu "Optimiranje sastava medija za proizvodnju bioetanolu upotrebom genetskog algoritma". S ovim projektom je sudjelovao na „Trećem susretu studenata i profesora“ na temu: "Primijenjena biokataliza" na Sveučilištu u Mariboru (2007) kao i na 11. Tehnologijadi u Rovinju (2007). Na ovu temu održao je i predavanje u Zagrebu na poziv Društva diplomiranih inženjera i prijatelja kemijsko tehnološkog studija (AMACIZ) i Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije. Sudjelovao je na „Petom susretu studenata i profesora: Primijenjena biokataliza“ na sveučilištu u Mariboru (2009.) s temom predavanja „Study of *Trametes versicolor* growth in submerged cultivation“.

2006. upisuje studij sinologije na Filozofskom fakultetu, a 2008. godine odlazi na stručnu praksu u Dansku u kompaniju Haldor Topsøe, jednog od najvećih svjetskih proizvođača katalizatora, te stječe nova saznanja. Kao posebno područje interesa izdvaja biokemijsko inženjerstvo i biokemiju, zaštitu okoliša, mikrobiologiju, biologiju, biomimikriju, astronomiju, robotiku i jezike. Od stranih jezika se služi engleskim, njemačkim i kineskim. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije završava 2009. godine.