

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Studij: Ekoinženjerstvo

Mladen Franjo

Proizvodnja lignolitičkih enzima porijeklom iz *Phanerochaete chrysosporium*

ZAVRŠNI RAD

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

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

Dr. sc. Vanja Kosar, docent

Dr. sc. Dinko Vujević

Zagreb, rujan 2009.

SAŽETAK

U današnje vrijeme, sve više pažnje posvećeno je okolišu, te njegovom očuvanju i održivom razvoju. Među najveće zagađivače okoliša ubrajaju se razne industrije, a među njima i drvna, te papirna industrija. Mnoge industrije za razgradnju tvari koriste opasne kemikalije, kao što je primjer industrije papira kod razgradnje lignina. Zbog toga, ali i zbog trendova u svijetu, te se industrije okreću alternativnim procesima, a primjer je razgradnja lignina pomoću gljiva bijelog truljenja koje proizvode lignolitičke enzime.

U ovome radu je proveden proces proizvodnje lignolitičkih enzima uzgojem gljive *Phanerochaete chrysosporium* na otpadu drvne industrije, te industrije papira. U lignolitičke enzime ubrajaju se lignin peroksidaza, mangan peroksidaza i lakaza. Cilj pokusa bio je utvrditi utjecaj različitih supstrata za uzgoj *Phanerochaete chrysosporium* za postizanje maksimalne aktivnosti enzima. Pokus je proveden šaržno u tikvicama na tresilici i u kolonskom reaktoru s mjehurićima. Volumna aktivnost enzima je mjerena spektrofotometrijski.

U pokusu provedenom u kolonskom reaktoru s mjehurićima nije zabilježena značajnija aktivnost nijednog lignolitičkog enzima što je vjerojatno uzrokovano karakteristikama upotrijebljenog reaktora.

Crni lug, otpad papirne industrije, je pokazao najveći potencijal za proizvodnju lignolitičkih enzima, ali su za postizanje značajnijih aktivnosti potrebna daljnja istraživanja i optimiranje procesnih uvjeta, prvenstveno sastava reakcijske smjese.

Ključne riječi: mangan peroksidaza, lignin peroksidaza, lakaza, gljive bijelog truljenja, *Phanerochaete chrysosporium*

ABSTRACT

More and more attention nowadays is paid to the environment, its preservation and sustainable development. Various industries are one of the greatest environmental pollutants, especially wood and paper industry. Many industries use dangerous chemicals for degradation of substances, such as paper industry in the process of lignin degradation. Due to these facts as well as world trends, these industries search alternative processes and example of this is lignin degradation by white rot fungi that produce lignolytic enzymes.

This work presents a process of production of lignolytic enzymes by cultivation of the *Phanerochaete chrysosporium* fungi at the wood and paper industry waste. Lignolytic enzymes include lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase. The goal of the experiment was to define the influence of various substrates on the cultivation of *Phanerochaete chrysosporium* in order to achieve maximum enzyme activity. The experiment was carried out in flasks and in the column reactor with bubbles. The enzyme volume activity is measured spectrophotometrically.

In the experiment that was carried out in the column reactor with bubbles there was not recorded any significant activity of none of the lignolytic enzymes which is probably caused by the characteristics of this reactor.

Black grove, the waste from the paper industry, has shown the greatest potential for the production of lignolytic enzymes, but further research and optimization of process conditions, primarily of the reactive compound composition, are necessary to achieve more significant activities.

Key words: manganese peroxidase, lignin peroxidase, laccase, white rot fungi, *Phanerochaete chrysosporium*

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	3
2.1. Mikroorganizmi.....	3
2.2. Gljive.....	4
2.2.1. Morfologija i sistematika	4
2.2.2. Metabolizam.....	5
2.2.3. Razmnožavanje gljiva	5
2.2.4. Klasifikacija gljiva	6
2.2.5. Gljive bijelog truljenja	7
2.2.5.1. <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	7
2.3. Enzimi	9
2.3.1. Struktura enzima	9
2.3.2. Nomenklatura i podjela enzima.....	10
2.3.3. Lignolitički enzimi	10
2.3.3.1. Lignin peroksidaza	11
2.3.3.2. Mangan peroksidaza.....	11
2.3.3.3. Lakaza	12
2.4. Lignin	13
3. MATERIJALI I METODE	15
3.1. Materijali	15
3.1.1. Mikroorganizam	15
3.1.2. Supstrat.....	15
3.1.3. Kemikalije	15
3.1.4. Priprema otopina	16
3.2. Aparatura	17
3.2.1. Tresilica.....	17
3.2.2. Centrifuga.....	18
3.2.3. Autoklav	18
3.2.4. Kolonski reaktor s mjehurićima	18

3.2.5. Spektrofotometar	19
3.3. Metode.....	20
3.3.1. Određivanje aktivnosti enzima lignin peroksidaze	20
3.3.2. Određivanje aktivnosti enzima mangan peroksidaze.....	21
3.3.3. Određivanje aktivnosti enzima lakaze.....	21
3.4. Provedba pokusa	21
3.4.1. Pokusi na alkali ligninu u kolonskom reaktoru s mjehurićima	22
3.4.2. Pokusi u tresilici s piljevinom kao supstratom.....	23
3.4.3. Pokusi u tresilici s alkali ligninom kao supstratom.....	23
3.4.3. Pokusi u tresilici sa crnim lugom kao supstratom.....	24
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	25
4.1. Proizvodnja lignolitičkih enzima u kolonskom reaktoru s mjehurićima s alkali ligninom kao supstratom	25
4.2. Proizvodnja lignolitičkih enzima u tresilici s piljevinom kao supstratom	27
4.3. Proizvodnja lignolitičkih enzima u tresilici s alkali ligninom kao supstratom	30
4.4. Proizvodnja lignolitičkih enzima u tresilici sa crnim lugom kao supstratom	32
5. ZAKLJUČAK.....	35
6. LITERATURA	36
7. POPIS SIMBOLA I SKRAĆENICA.....	37
7.1. Simboli	37
7.1.1. Grčki simboli.....	37
7.2. Skraćenice	37
ŽIVOTOPIS	

1. UVOD

Biološka razgradnja biljne stanične stjenke postaje sve važnija tema istraživanja stručnjaka, te budućnost bioekonomije ovisi o opskrbi biomase i sirovina za proizvodnju bioenergije i ostalih bioprodukata¹. Biokataliza se može smatrati temeljem takvih tehnologija za proizvodnju bioprodukata, obzirom da se enzimске reakcije katalizirane pročišćenim enzimima i cijelim stanicama mikroorganizama mogu provoditi u vodenim otopinama, pri sobnim temperaturama i neutralnom pH, bez upotrebe visokih tlakova i ekstremnih uvjeta, te uz minimalan utrošak energije². Uz ove prednosti enzima, interes za enzimskim biotransformacijama je velik i zahvaljujući novim biokemijskim i analitičkim metodama pomoću kojih je moguće razumjeti mehanizam djelovanja enzima i identificirati nove enzime, te genetičkom inženjerstvu pomoću kojeg je moguće proizvesti točno željeni enzim potrebnih značajki³.

Lignolitički enzimi je zajednički naziv za skupinu enzima koji kataliziraju oksidacijsku depolimerizaciju, tj. razgradnju lignina⁴. U tu skupinu enzima ubrajaju se lakaza, lignin – peroksidaza i mangan – peroksidaza. Najpoznatiji i najvažniji izvor takvih enzima su gljive bijelog truljenja. Lignolitički enzimi sudjeluju u razgradnji lignina. Lignin je čvrsti fenilpropanski polimer koji se razvija u biljkama kao strukturna stabilnost i zaštita. Trodimenzionalni je polimer koji se sintetizira iz koniferil, *p* – kumaril i sinapil alkohola. U industriji pulpe i papira ti se spojevi moraju ukloniti modificiranjem njihove strukture pri čemu moraju biti izloženi oštrim fizikalno-kemijskim uvjetima. Kemikalije koje se koriste prilikom izbjeljivanja imaju nepovoljan utjecaj na okoliš, stoga su industrije takvog tipa primorane razmotriti ekološki prihvatljivije alternative.

Gljive bijelog truljenja jedini su poznati mikroorganizmi koji su razvili kompleksan enzimatski sustav koji im omogućava da razgrade lignin⁵. Jedna od takvih gljiva je *Phanerochaete chrysosporium*, gljiva bijelog truljenja iz razreda Basidiomycetes koja proizvodi tri navedena lignolitička enzima i učinkovito razgrađuje lignin.

U ovom radu je proveden proces proizvodnje lignolitičkih enzima uzgojem *Phanerochaete chrysosporium* na otpadu iz različitih industrija. Pokusi su provedeni šaržno na tresilici i u kolonskom reaktoru s mjehurićima.

Cilj pokusa je bio proizvesti enzime lakazu, lignin – peroksidazu i mangan - peroksidazu uz postizanje maksimalne volumne aktivnosti. Kao supstrat korišteni su lignin, crni lug i piljevina različitog drveća. Praćen je utjecaj različitih čimbenika na aktivnost

1. Uvod

enzima kao što su koncentracija supstrata, početna koncentracija micelijskih peleta, Tweena 80, veratril-alkohola, soli, peptona i kvašćevog ekstrakta. U kolonskom reaktoru s mjehurićima dodatno su praćeni pH i koncentracija otopljenog kisika.

2. OPĆI DIO

2.1. Mikroorganizmi

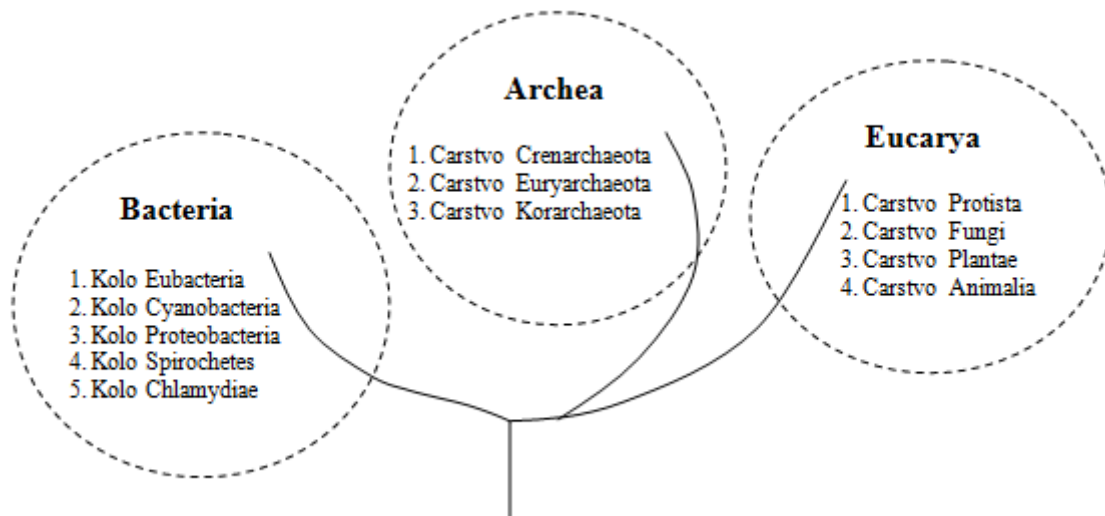
Mikroorganizmi (grč. *mikros* – malen; *organismos* – organizam) ili mikrobi skupni je naziv za bakterije, arheje, gljive i protiste. To su organizmi mikroskopske veličine, najčešće premaleni da bi se vidjeli golim okom. Znanost koja ih proučava naziva se mikrobiologija, a započinje otkrićem Antona van Leeuwenhoek 1675. godine koji je proučavao mikroorganizme mikroskopom vlastite izrade. Prema međudjelovanju s organizmom-domaćinom, tj. sa čovjekom, životinjom ili biljkom, mikroorganizmi se svrstavaju u nekoliko skupina: simbioti („korisni“), paraziti („štetni“), te komenzali („slobodnoživući“).

Mikroorganizmi žive u svim dijelovima biosfere gdje je prisutna tekuća voda, uključujući vruće izvore, dna oceana, visoke dijelove atmosfere te duboke stjenovite predjele unutar Zemljine kore⁶. Kao razgrađivači, mikroorganizmi imaju odlučujuću ulogu u biogeokemijskom ciklusu u koji pritječu hranjive tvari (nutrijenti) iz prirodne mreže hrane. Jednostavne anorganske hranjive tvari pretvaraju se u složene organske spojeve pomoću fotosintetskih organizama koji su konačan izvor hrane za sve životinjske potrošače. Te se hranjive tvari nalaze u tijelima uginulih životinja i biljaka koje mikroorganizmi prerađuju razgradnjom složenih sastavnih dijelova uginulih organizama u jednostavne kemijske spojeve koje ponovo koriste fotosintetski organizmi. Tako se na Zemlji stalno odvijaju procesi razgradnje i sinteze u kojima se tvari prevode iz jednog oblika u drugi pri čemu mikroorganizmi imaju neprocjenjivu ulogu.

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

Radi boljeg razumijevanja odnosa mikroorganizama, njihove funkcije i aktivnosti, stvoren je sustav klasifikacije u kojem se vide razlike, sličnosti i odnosi među organizmima. Iako je gore spomenuta osnovna podjela mikroorganizama, danas je službeno prihvaćena klasifikacija koja se temelji na sustavu tri domene. Taj je sustav predložio 1990. godine Carl R. Woese⁶. Prema tom sustavu, mikroorganizmi se dijele u tri domene; Bacteria, Archea i Eucarya, koje se unutar sebe dijele na carstva ili kola (Slika 1).

2. Opći dio



Slika 1. Shematski prikaz klasifikacije mikroorganizama unutar tri domene

2.2. Gljive

2.2.1. Morfologija i sistematika

Gljive (lat. *fungi*) spadaju u najrasprostranjenije žive organizme na Zemlji. Znanost koja se bavi proučavanjem gljiva naziva se mikologija (grč. *myko* – gljiva, *logos* – znanost), a utemeljiteljem te znanosti smatra se Aristotel, koji je dao prve opise gljiva. Gljive ili fungi uključuju kvasce i plijesni te skupinu makroskopskih organizama, često zvanih mesnatim gljivama, a na svijetu je poznato približno 250 tisuća vrsta tih organizama.

Gljive su eukarioti, nefotosintetički organizmi, stanica obavijenih staničnom stjenkom koja je sastavljena od polisaharida hitina. Većina ih je višestanična iako mogu biti i jednostanične. Za većinu su gljiva karakteristične vlaknaste, cjevaste stanice koje se nazivaju hife koje tvore isprepletenu masu nalik na tkivo, micelij⁷.

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

2. Opći dio

2.2.2. Metabolizam

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

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

U pravilu su aerobni organizmi, međutim neki su kvasci fakultativni anaerobi i mogu proizvoditi energiju fermentacijom, primjerice proizvodnjom etanola iz glukoze⁷.

2.2.3. Razmnožavanje gljiva

Razmnožavanje gljiva može biti spolno i nesporno. Najčešći postupak nespolnog razmnožavanja gljiva svakako je tvorba spora do koje dolazi tijekom mitoze i staničnog dijeljenja. Postoji nekoliko tipova nespolnih spora:

- a) Artrospore – nastaju cijepanjem hife u pojedinačne dijelove.
- b) Klamidiospore – nastaju fragmentacijom micelija, to su trajne spore, te služe za održavanje parazita tijekom nepovoljnih uvjeta.
- c) Sporangiospore – endogene spore, nastaju unutar stanica sporangija, a oslobađaju se nakon njegovog pucanja.
- d) Konidiospore – najčešće su i najraširenije nespolne spore kod gljiva, stvaraju se u velikom broju, a klijavost gube relativno brzo.
- e) Blasospore – proizvode se pupanjem, od vegetativne stanice majke.

Spolno razmnožavanje gljiva uključuje spajanje primjerenih jezgara. Neke vrste gljiva su samooplodive i tvore kompatibilne gamete na istom miceliju. Druge vrste zahtijevaju vanjsko križanje između različitih, ali spolno skladnih micelija. Tipovi spolnih spora su:

- a) Zimski sporangij – nastaje spajanjem + i – zoospore
- b) Zigospore – nastaju spajanjem istovjetnih spolnih stanica. Obično su tamne, te imaju debelu stjenku.

2. Opći dio

c) Oospore – nastaju spajanjem dva morfološki različita organa, oogonija i anteridija.

d) Askospore – nastaju u mješinstoj stanici, askusu, obično po osam askospora.

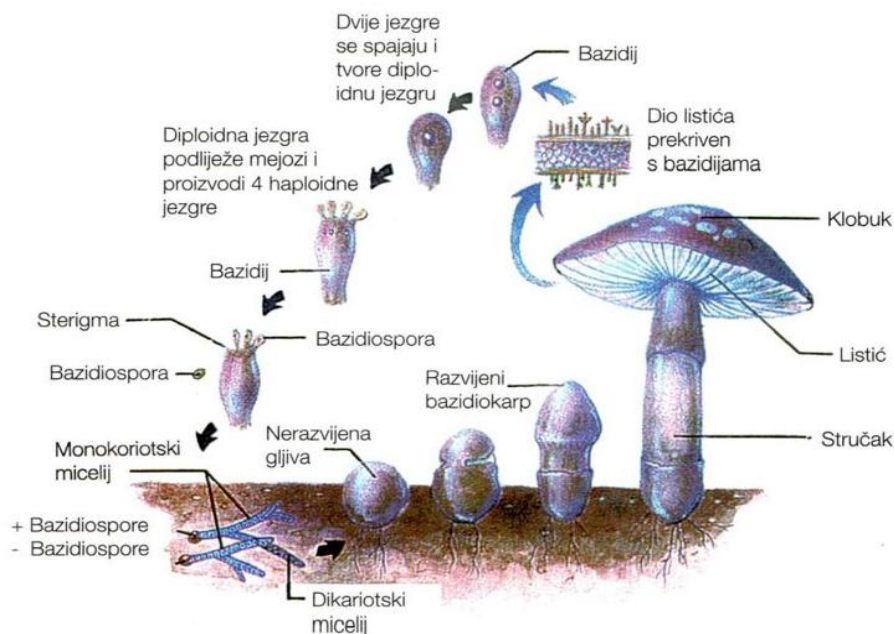
e) Bazidiospore – nastaju na stapci, te su karakteristične za gljive stapčarke.

Spore su važne zbog puno razloga. Veličina, oblik, boja i broj spora pomažu u identifikaciji vrste gljiva. Često su male i bezbojne i mogu ostati suspendirane u zraku dugi period. Tako pomažu u širenju gljiva, što je bitan parametar za široko rasprostiranje velikog broja vrsta gljiva⁷.

2.2.4. Klasifikacija gljiva

Svaka gljiva pripada jednoj od pet taksonomskih skupina koje se međusobno razlikuju na osnovi tipa spora te po morfologiji hifa i spolnom ciklusu. Te skupine su: Deuteromycetes, Zygomycetes, Ascomycetes, Basidiomycetes i Oomycetes.

Razred Basidiomycotina sadrži gljive nazvane Basidiomycetes, općenito poznate kao gljive klobučarke. Njima pripadaju gljive koje rastu na drveću, jestive gljive, gljive puhare, hrđe, snijeti i otrovne gljive (Slika 2).



Slika 2. Tipična mesnata gljiva i spolne bazidiospore

Basidiomycetes je ime dano zbog karakteristične strukture njihove stanice, bazidiuma, koji je uključen u spolni način razmnožavanja. Bazidium (grč. *basidion* - mala baza) se

2. Opći dio

proizvodi na tipičnoj hifi i uobičajeno je oblika klobuka. Bazidiospore se proizvode u bazidijumu, a bazidiji mogu biti zatvoreni unutar plodonosnih tijela nazvanih bazidiokarpi.

Najveći broj bazidiomiceta žive kao saprofiti i razgrađuju biljni materijal, posebno celulozu i lignin⁷.

2.2.5. Gljive bijelog truljenja

Gljive bijelog truljenja su jedini dosad poznati organizmi koji uspješno razgrađuju lignin, a u prirodi se nastanjuju na mrtvom ili živom drvetu. Smatra se da su i gljive smeđog, te gljive blagog truljenja sposobne razgraditi lignin, međutim one ne proizvode enzime ključne za istraživanje uklanjanja onečišćenja⁸. Nazivaju se gljive bijelog truljenja, jer proces razgradnje rezultira izbjeljivanjem drvenog supstrata.

Gljive bijelog truljenja napadaju lignin dok celulozu i hemicelulozu manje oštećuju. Takve gljive koje razgrađuju lignin radije nego celulozu nazivaju se selektivni razgrađivači. Selektivni razgrađivači lignina posebno su zanimljivi sa stajališta primjene u biotehnologiji, obzirom da uklanjaju lignin, a vrijednu celulozu ostavljaju neoštećenom. Razgradnja lignina pomoću ovih gljiva odvija se tijekom njihovog sekundarnog metabolizma i obično u uvjetima u kojima ima malo dušika.

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

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

Najzastupljenije su gljive bijelog truljenja koje proizvode MnP i Lacc⁹.

Gljive bijelog truljenja proizvode različite lakaze relativno niskih koncentracija kada su uzgojene submerzno ili na drvetu. Više koncentracije mogu se postići dodatkom različitih aromatskih spojeva, induktora, kao što su ksilidin ili guaiakol⁵.

2.2.5.1. *Phanerochaete chrysosporium*

2. Opći dio

Phanerochaete chrysosporium (Slika 3) je gljiva bijelog truljenja. Ova gljiva može se pronaći u šumama Sjeverne Amerike pa sve do dijelova Europe i Irana, zahvaljujući svojoj optimalnoj temperaturi djelovanja od 40 °C. Ova visoka temperatura omogućuje joj rast na kompostnim hrpama drveta što pruža neke nove mogućnosti u biotehnologiji¹⁰. Njena najvažnija uloga je uloga razgradnje lignina iz različitih drveća i drugih biljaka čime pomaže kruženju tvari u prirodi kao jedan od razgrađivača.

Također, otkrivena je i povezanost *Phanerochaete chrysosporium* s bakterijom *Agrobacterium radiobacter* koja koegzistira s ovom gljivom i vrlo ju je teško odvojiti, ali još nije poznato kako utječu jedna na drugu¹¹.

U sekundarnoj fazi metabolizma, *Phanerochaete chrysosporium* razgrađuje lignin i druge aromatske zagađivače koji se mogu naći u materijalima zagađenim eksplozivom, pesticidima i otpadnim vodama. *Phanerochaete chrysosporium* izlučuje dvije glavne vrste enzima koji razgrađuju lignin, lignin peroksidazu (LiP) i mangan peroksidazu (MnP).

Peroksidaze i oksidaze koje proizvodi *Phanerochaete chrysosporium* djeluju na nespecifičan način stvarajući slobodne radikale lignina koji se potom spontano raspadaju.

Ovaj nespecifičan način razgradnje i oksidativni potencijal enzima koje izlučuje *Phanerochaete chrysosporium* otvaraju nove mogućnosti za upotrebu u bioprocima poput razgradnje organskih zagađivača i u izbjeljivanju tkanina.

Kako *Phanerochaete chrysosporium* ima specijalizirane mogućnosti razgradnje, istraživanje se usmjerava u proučavanje mehanizama te razgradnje kako bi se poboljšala biorazgradnja velikog raspona zagađivača pa je ovo prva gljiva iz skupine Basidiomyceta kojoj je određena cjelokupna genomska struktura.

Koliko je poznato, gljiva nije patogena za ljude i životinje.



Slika 3. *Phanerochaete chrysosporium*

2. Opći dio

2.3. Enzimi

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

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

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

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

Po kemijskoj strukturi enzimi su proteini. Sudjeluju u metaboličkim reakcijama, respiraciji, pretvorbi i prenošenju energije između živih sustava i u sintezi različitih makromolekula i staničnih sastojaka. Poznato je i opisano više od dvije tisuće različitih enzima od kojih svaki može katalizirati specifičnu reakciju. Stoga su specifični enzimi, sintetizirani u stanici, najvažniji čimbenik tijekom određivanja bioloških aktivnosti i funkcija koje obavlja stanica¹².

2.3.1. Struktura enzima

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

Svaki enzim ima optimalnu pH – vrijednost i temperaturu djelovanja jer brzina enzimskih reakcija ovisi najvećim dijelom o tim čimbenicima. Temperatura i pH ne utječu samo na privlačne sile između pojedinih aminokiselinskih ostataka u molekuli enzima nego i

2. Opći dio

na reakcije između enzima i tvari (supstrata) na koju enzim djeluje i koja se, djelovanjem enzima, kemijski mijenja.

Enzimi su nepromijenjeni nakon procesa koje kataliziraju. Neki od njih su posve specifični, pa kataliziraju samo određenu reakciju¹².

2.3.2. Nomenklatura i podjela enzima

Nazivi enzima često se daju prema supstratu na koji djeluju. Osim toga, imenuju se na osnovi njihovog zajedničkog djelovanja. Nastavak *-aza* na kraju imena označava imena svih enzima¹².

Enzimi su podijeljeni u šest klasa:

- Oksidoreduktaze su enzimi koji ubrzavaju reakcije oksidacije i redukcije.
- Transferaze su enzimi koji sudjeluju u prijenosu raznih atomskih grupa.
- Hidrolaze sudjeluju u reakcijama hidrolize.
- Liaze sudjeluju u stvaranju i cijepanju dvostrukih veza.
- Izomeraze su enzimi koji prevode izomere iz jednog oblika u drugi
- Ligaze sudjeluju u reakcijama sinteze pri čemu se troši energija pohranjena u obliku adenozin – trifosfata (ATP)¹³.

2.3.3. Lignolitički enzimi

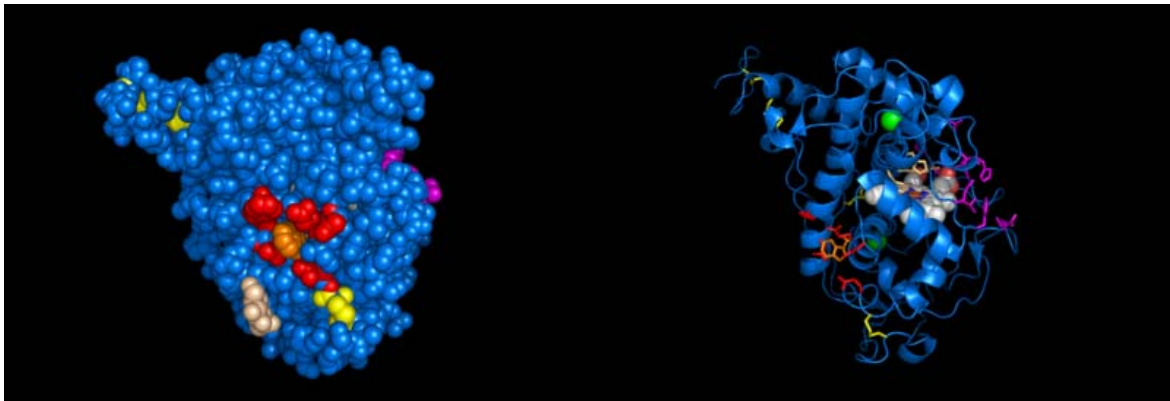
Do razlaganja lignina dolazi zbog djelovanja lignolitičkih enzima. Osnovni izvanstanični enzimi koji sudjeluju u razgradnji lignina su: peroksidaze koje sadrže željezo – lignin peroksidaza (LiP) i mangan peroksidaza (MnP) te oksidaza lakaza.

Dosad poznati lignolitički enzimi su izvanstanični i nespecifični, sudjeluju u različitim oksidacijskim reakcijama u kojima se razbija aromatska struktura lignina kao i veze između njegovih osnovnih podjedinica. Nastali spojevi manje molekulske mase se tada mogu transportirati unutar stanice i dalje razgraditi⁹.

2. Opći dio

2.3.3.1 Lignin peroksidaza

Ne proizvode sve gljive bijelog truljenja enzim LiP, međutim on je ključna komponenta gljiva koje se proučavaju u svrhu primjene. Za funkcioniranje su mu potrebna još dva metabolita koje gljiva sama proizvodi, a to su vodikov peroksid i veratril alkohol, koji se koristi kao posrednik za redoks reakcije. LiP (Slika 4) može djelovati na podlogama s visokim redoks potencijalom, te je zbog toga ključan enzim za razgradnju organskih onečišćenja.

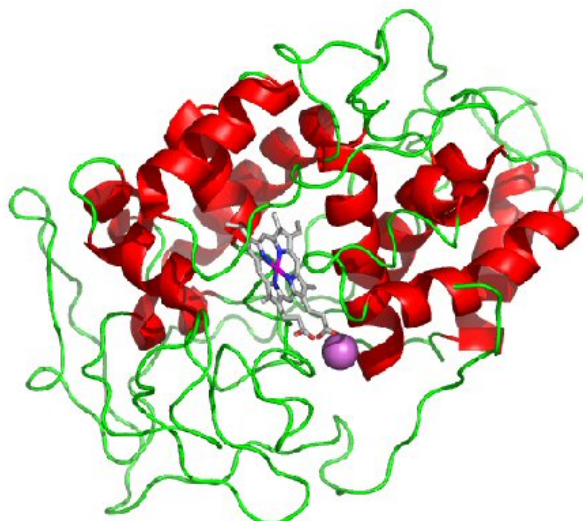


Slika 4. Lignin peroksidaza

2.3.3.2. Mangan peroksidaza

MnP (Slika 5) je enzim koji je po svom mehanizmu djelovanja sličan lignin peroksidazi, ali nema sposobnost djelovanja na podlogama s visokim redoks potencijalom. Koristi H_2O_2 za katalizu oksidacije Mn^{2+} do Mn^{3+} . Dakle, MnP proizvodi Mn^{3+} oksalate koji su dovoljno mali da difundiraju u područje nedostupno ostalim enzimima, što pomaže kod razgradnje organskih onečišćenja zakopanih duboko u tlu⁸.

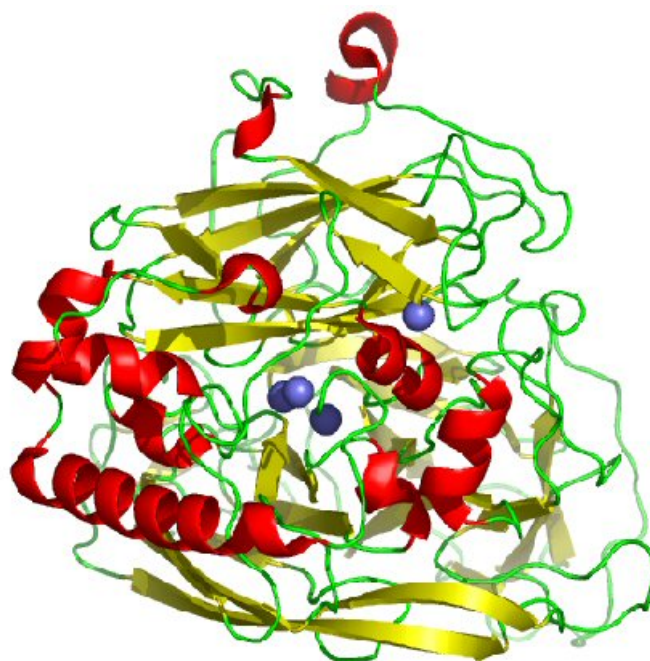
2. Opći dio



Slika 5. Mangan peroksidaza

2.3.3.3. Lakaza

Lakaze (Slika 6) su enzimi iz skupine oksidoreduktaza. Obzirom na porijeklo, mogu se podijeliti u dvije glavne skupine: lakaze porijeklom iz viših biljaka i lakaze porijeklom iz gljiva koje predstavljaju zastupljeniju skupinu. Najveći broj ih je izoliran iz gljiva bijelog truljenja koje su poznate kao dobri razgrađivači lignina. Osim iz ova dva izvora, nedavno su izolirane i okarakterizirane lakaze iz bakterija i kukaca.



Slika 6. Lakaza

2. Opći dio

U tablici 1 nabrojani su lignolitički enzimi, te njihova glavna svojstva.

Tablica 1. Ligninolitički enzimi i njihova najvažnija svojstva

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; Lacc	O ₂	Fenoli, medijatori poput hidroksibenzotriazola ili ABTS-a	Oksidacija fenola

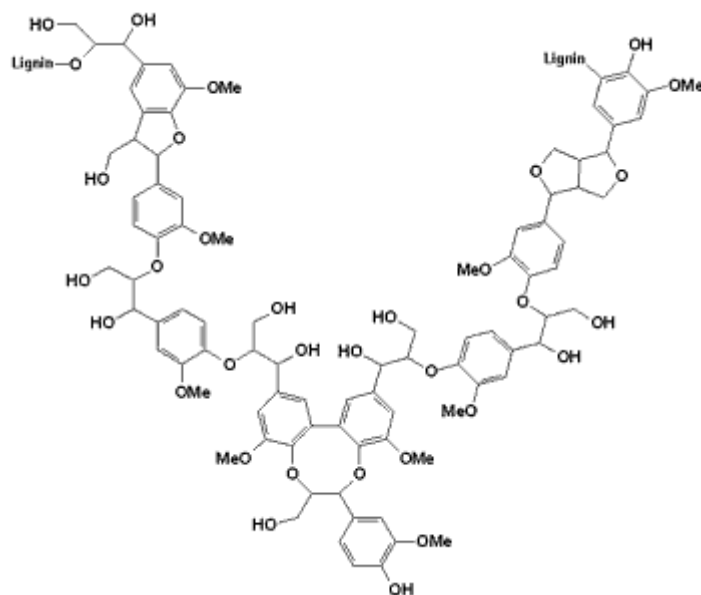
2.4. Lignin

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

Lignocelulozni biljni materijal sadržava tri osnovne komponente: celulozu, hemicelulozu i lignin. Celuloza je linearni homopolimer koji se sastoji od glukoznih podjedinica povezanih β – 1,4 – glikozidnim vezama. Hemiceluloza je heteropolisaharid koji sadržava kratke račvaste lance heksoze.

Nakon celuloze, lignin (Slika 7) je drugi najobilniji obnovljivi biopolimer u prirodi. Osnovni je dio biljne stanične stijenke, daje joj tvrdoću i štiti lako razgradivu celulozu od napada patogenih organizama. Sintetizira se u višim biljkama i to polimerizacijom fenilpropanskih derivata koji se još nazivaju i monolignoli. Postoje tri tipa monolignola: *p* – kumaril alkohol, koniferilni alkohol i sinapil alkohol⁹.

2. Opći dio



Slika 7. Struktura sintetskog lignina

Lignin u sebi sadrži slijedeće grupe: metoksilnu, acetilnu, formil grupu, aromatske grupe, kao i heterociklične grupe furanskog i piranskog tipa. Lignin je amorfan sa razvijenom unutrašnjom strukturom, radi čega ima izraženu adsorpcijsku sposobnost¹⁴.

Zbog svoje složene strukture i veza koje se ne mogu hidrolizirati, lignin je mnogo teže razgradiv nego celuloza i hemiceluloza. Molekularna masa lignina je veća od 100 kg mol^{-1} , što sprječava transport lignina u unutrašnjost mikrobnog stanice⁹.

3. MATERIJALI I METODE

Proizvodnja lignolitičkih enzima provedena je uzgojem gljive bijelog truljenja *Phanerochaete chrysosporium* u anaerobnim uvjetima u šaržnim pokusima na tresilici. Pokus je trajao 14 dana. Provedeni su i pokusi u kolonskom reaktoru s mjehurićima. Kao supstrati korišteni su alkali lignin, crni lug, te piljevina različitog drveća. Praćene su promjene aktivnosti enzima lignin peroksidaze, mangan peroksidaze i lakaze, koje su određivane spektrofotometrijski.

3.1. Materijali

3.1.1. Mikroorganizam

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

3.1.2. Supstrat

U pokusima je korištena piljevina, kao otpad iz drvne industrije, crni lug – otpad iz tvornice papira (Belišće d.d.), te alkali lignin (Sigma – Aldrich).

3.1.3. Kemikalije

Tijekom provedbe pokusa korištene su sljedeće kemikalije:

- 3,4-dimetoksifenilmetil alkohol (veratril alkohol) (Sigma – Aldrich)
- ABTS (Sigma – Aldrich)
- agar-agar (Kemika)

3. Materijali i metode

- amonijev tartarat (Sigma)
- $\text{CaCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck)
- glikokol (Kemika)
- glukoza (Sigma – Aldrich)
- H_2O_2
- HCl
- KH_2PO_4 (Sigma – Aldrich)
- kvašćev ekstrakt (Aldrich)
- malt-agar (Sigma-Aldrich)
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck)
- MnSO_4 (Sigma – Aldrich)
- Na_2HPO_4 (Kemika)
- NaCl
- natrijev malonat (Sigma – Aldrich)
- natrijev tartarat (Sigma – Aldrich)
- pepton (Aldrich)
- Tween80 (Fluka Chemie)
- vitamin B1 (Fluka Chemie)

3.1.4. Priprema otopina

Hranjiva kruta podloga za uzgoj i čuvanje gljive je pripremljena otapanjem 1 g agar-agar i 1 g malt-agar u 50 cm^3 destilirane vode.

Za uzgoj peleta u submerznoj kulturi su korištene tri otopine. Otopina glukoze (otopina A) pripremljena je otapanjem 10 g glukoze u 500 cm^3 destilirane vode. Otopina B1 je pripremljena otapanjem 0,055 g amonijevog tartarata, 0,05 g KH_2PO_4 , 0,0125 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ i 0,0025 g CaCl_2 u 500 cm^3 destilirane vode, dok je otopina B2 pripremljena otapanjem 0,2 g KH_2PO_4 , 0,125 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05 g Na_2HPO_4 , 0,05 g peptona i 0,075 g kvašćevog ekstrakta u 500 cm^3 destilirane vode.

Pufer natrijev tartarat je pripremljen otapanjem 8,62 g natrijevog tartarata u 250 cm^3 destilirane vode i zakiseljen sa 1 mol dm^{-3} otopinom HCl na $\text{pH} = 3,0$.

3. Materijali i metode

Otopina veratril alkohol korištena u mjerenju aktivnosti LiP je pripravljena otapanjem 0,042 g veratril alkohola u 100 cm³ pufera natrijevog tartarata. Otopina H₂O₂ korištena u mjerenju aktivnosti LiP je pripravljena otapanjem 0,2315 cm³ H₂O₂ u 250 cm³ destilirane vode.

Pufer natrijev malonat je pripravljen otapanjem 1,85 g natrijevog malonata u 250 cm³ destilirane vode i zakiseljen sa 1 mol dm⁻³ otopinom HCl na pH = 4,5. Otopina ABTS korištena u mjerenju aktivnosti MnP je pripravljena otapanjem 0,0392 g ABTS u 100 cm³ pufera natrijevog malonata. Otopina H₂O₂ korištena u mjerenju aktivnosti MnP je pripravljena otapanjem 0,069 cm³ H₂O₂ u 250 cm³ destilirane vode.

Otopina ABTS za mjerenje aktivnosti Lacc je pripravljena otapanjem 0,7505 g glikokola i 0,585 g NaCl u 100 cm³ destilirane vode, i zakiseljen sa 1 mol dm⁻³ otopinom HCl na pH = 4,5. Zatim je u 100 cm³ ovako pripravljene otopine otopljeno 0,1646 g ABTS.

Otopina MnSO₄ pripravljena je otapanjem 0,025 g MnSO₄ u 50 cm³ destilirane vode.

Otopina elemenata u tragovima pripravljena je otapanjem 0,35 g FeSO₄·7H₂O, 0,07 g MnSO₄·H₂O, 0,11 g ZnSO₄·7H₂O, 0,02 g H₃BO₃, 0,0035 g KI, te 0,01 g CuSO₄·5H₂O u 1 dm³ destilirane vode.

3.2. Aparatura

3.2.1. Tresilica

Proces uzgoja gljive *Phanerochaete chrysosporium* i proizvodnja lignolitičkih enzima su provedeni na laboratorijskoj tresilici (Innova 4330 New Brunswick Scientific, SAD) (Slika 8).

3. Materijali i metode



Slika 8. Tresilica Innova 4330

3.2.2. Centrifuga

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

3.2.3. Autoklav

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

3.2.4. Kolonski reaktor s mjehurićima

U svrhu proizvodnje lignolitičkih enzima je korišten kolonski reaktor s mjehurićima (Slika 9). Kolonski reaktor s mjehurićima ima sinter pri dnu, te je opremljen otvorom za dovod zraka iz vanjskog kompresora preko regulacijskog ventila, pH i $p\text{O}_2$ elektrodama,

3. Materijali i metode

otvorima za odzračivanje i uzimanje uzorka, te dvostrukim plaštem za regulaciju temperature pomoću vanjskog termostata.



Slika 9. Kolonski reaktor s mjehurićima

3.2.5. Spektrofotometar

Mjerenje aktivnosti enzima lakaze, mangan-peroksidaze i lignin peroksidaze je provedeno upotrebom spektrofotometrijskih metoda na dvozračnom spektrofotometru (UV-1800, SHIMADZU) (Slika 10).

3. Materijali i metode



Slika 10. Dvoznačni spektrofotometar, Shimadzu UV-1800

3.3. Metode

Tijekom provedbe pokusa, praćena je volumna aktivnost enzima LiP, MnP i Lacc. Aktivnosti enzima određivane su spektrofotometrijskim metodama.

3.3.1. Određivanje aktivnosti enzima lignin peroksidaze

Aktivnost enzima lignin-peroksidaze je određivana spektrofotometrijski metodom početnih brzina. Mjerenja su provedena u kvarčnoj kiveti volumena 1 cm^3 , a otopina veratril alkohola u puferu natrijevom tartaratu je prethodno termostatirana pri $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$. $0,1 \text{ cm}^3$ uzorka dodavano je u $0,8 \text{ cm}^3$ otopine veratril alkohola, a početak mjerenja je aproksimiran dodatkom $0,1 \text{ cm}^3$ otopine H_2O_2 . Svako mjerenje je provođeno 60 sekundi pri $\lambda = 310 \text{ nm}$, pri čemu su iz izmjerenih dinamičkih promjena apsorbancije izračunate volumne aktivnosti enzima lignin peroksidaze prema jednadžbi (3.1):

3. Materijali i metode

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

gdje su V_r ukupni volumen uzorka u kiveti (cm^3), V_E volumen dodanog uzorka koji sadrži enzim (cm^3), ε ekstincijski koeficijent ($\varepsilon_{310} = 0,0093 \text{ dm}^3 \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 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 minuti¹⁵.

3.3.2. Određivanje aktivnosti enzima mangan peroksidaze

Aktivnost enzima mangan peroksidaze je određivana spektrofotometrijski pri $\lambda = 420 \text{ nm}$. U kivetu je dodavano $0,1 \text{ cm}^3$ otopine MnSO_4 , $0,1 \text{ cm}^3$ uzorka, $0,7 \text{ cm}^3$ otopine ABTS u puferu natrijevom malonatu, a početak reakcije je aproksimiran dodatkom $0,1 \text{ cm}^3$ otopine H_2O_2 . Mjerenja su provođena 60 sekundi, pri čemu su dobivene dinamičke promjene apsorbancije korištene za izračunavanje volumne aktivnosti enzima lignin-peroksidaze prema jednadžbi (3.1) korištenjem ekstincijskog koeficijenta $\varepsilon_{420} = 0,036 \text{ dm}^3 \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.3.3. Određivanje aktivnosti enzima lakaze

Aktivnost enzima lakaze je određivana spektrofotometrijski pri $\lambda = 420 \text{ nm}$. U kivetu je dodano $0,1 \text{ cm}^3$ uzorka i $0,9 \text{ cm}^3$ otopine ABTS, prethodno termostahirane na $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. Svako mjerenje je trajalo 60 sekundi pri čemu su dobivene dinamičke promjene apsorbancije korištene za izračunavanje volumne aktivnosti enzima lakaze prema jednadžbi (3.1) korištenjem ekstincijskog koeficijenta $\varepsilon_{420} = 0,036 \text{ dm}^3 \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.4. Provedba pokusa

Hranjiva podlogu za uzgoj peleta pripremljena je miješanjem 25 cm^3 otopine A sa 25 cm^3 otopine B1 ili B2. U tu otopinu sterilnom tehnikom rada su nacijepljene spore gljive

3. Materijali i metode

Phanerochaete chrysosporium. Uzgoj peleta je proveden na tresilici u tikvicama kroz 5 dana, pri $T = 27\text{ °C}$ i $n = 140\text{ min}^{-1}$.

Nakon 5 dana uzgoja, peleti (Slika 11) su odvojeni filtracijom (kvantitavni filter papir plava vrpca, $\text{Ø} = 110\text{ mm}$, Munktell, Njemačka) i korišteni za proizvodnju enzima.



Slika 11. Peleti nakon 5 dana rasta na hranjivoj podlozi

3.4.1. Pokusi na alkali ligninu u kolonskom reaktoru s mjehurićima

Volumen reakcijske smjese je bio 500 cm^3 , a reakcijska smjesa je sadržavala 250 cm^3 otopine A, 200 cm^3 otopine B1, 50 cm^3 otopine elemenata u tragovima, $0,32\text{ g dm}^{-3}$ veratril alkohola, $2,24\text{ g dm}^{-3}$ peleta i 1 g dm^{-3} alkali lignina. Pokus je proveden pri konstantnom protoku zraka $q = 0,5\text{ dm}^3\text{ min}^{-1}$, a reaktor je termostetiran pri $T = 27\text{ °C}$. Pokus je trajao 5 dana, uz stalno praćenje vrijednosti pH i koncentracije otopljenog kisika u reaktoru, a uzorci za određivanje aktivnosti lignolitičkih enzima su uzimani svaka 24 sata.

3. Materijali i metode

3.4.2. Pokusi u tresilici s piljevinom kao supstratom

Volumen reakcijske smjese za pokuse 1, 2, 3 i 4 bio je 60 cm^3 (10 cm^3 otopine B1 i 50 cm^3 otopine B2), dok je za pokus 5 volumen reakcijske smjese, koja se sastojala samo od otopine B1, iznosio 100 cm^3 . U svaki pokus dodano je 5 cm^3 otopine elemenata u tragovima, 1 cm^3 otopine MnSO_4 , te ostale komponente hranjive podloge čije su koncentracije prikazane u tablici 2.

Tablica 2. Sastav komponenata reakcijske smjese u tikvicama za pokuse s piljevinom kao supstratom

pokus	biomasa [g/dm ³]	supstrat	γ supstrata [g/dm ³]	vitamin B1 [g/dm ³]	veratril alkohol [g/dm ³]
1	7,14	grab	14,29	0,4	0,4
2	7,14	hrast	14,29	0,4	0,4
3	7,14	joha	14,29	0,4	0,4
4	7,14	bukva	14,29	0,4	0,4
5	4,55	bukva	9,09	0,24	0,24

Pokusi su provedeni šaržno u tresilici pri $T = 27 \text{ }^\circ\text{C}$ i $n = 140 \text{ min}^{-1}$. Uzorci za određivanje aktivnosti lignolitičkih enzima su uzimani svakodnevno, sterilnom tehnikom rada, pri čemu je svaki pokus proveden 14 dana.

3.4.3. Pokusi u tresilici s alkali ligninom kao supstratom

Volumen reakcijske smjese je bio 50 cm^3 (sastava prikazanog u tablici 3), a reakcijska smjesa je sadržavala još i $0,4 \text{ g dm}^{-3}$ veratril alkohola, $0,25 \text{ g dm}^{-3}$ Tween 80, te $0,4 \text{ g dm}^{-3}$ vitamina B1.

3. Materijali i metode

Tablica 3. Sastav komponenata reakcijske smjese u tikvicama za pokuse s alkali ligninom kao supstratom

pokus	biomasa [g/dm³]	otopina A [cm³]	otopina B [cm³]	lignin alkali [g/dm³]
1	6	10	40	1
2	10	25	25	1
3	10	25	25	2
4	12		50	1

Pokusi su provedeni šaržno u tresilici pri $T = 27\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $n = 140\text{ min}^{-1}$. Uzorci za određivanje aktivnosti lignolitičkih enzima su uzimani svakodnevno, sterilnom tehnikom rada, pri čemu je svaki pokus proveden 14 dana.

3.4.3. Pokusi u tresilici sa crnim lugom kao supstratom

Volumen reakcijske smjese je bio 50 cm^3 , a reakcijska smjesa je sadržavala 25 cm^3 crnog luga, 25 cm^3 otopine B2, $0,4\text{ g dm}^{-3}$ veratril alkohola, $0,25\text{ g dm}^{-3}$ Tween 80 i $0,4\text{ g dm}^{-3}$ vitamina B1. U 1. pokusu koncentracija biomase je bila 4 g dm^{-3} , a u drugom pokusu 3 g dm^{-3} . Pokusi su provedeni šaržno u tresilici pri $T = 27\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $n = 140\text{ min}^{-1}$. Uzorci za određivanje aktivnosti lignolitičkih enzima su uzimani svakodnevno, sterilnom tehnikom rada, pri čemu je svaki pokus proveden 10 dana.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu je proveden uzgoj gljive *Phanerochaete chrysosporium* u svrhu proizvodnje lignolitičkih enzima na različitim supstratima; alkali ligninu, piljevini različitog drveća i crnom lugu, te u različitim tipovima reaktora; šaržno u tresilici i u kolonskom reaktoru s mjehurićima.

4.1. Proizvodnja lignolitičkih enzima u kolonskom reaktoru s mjehurićima s alkali ligninom kao supstratom

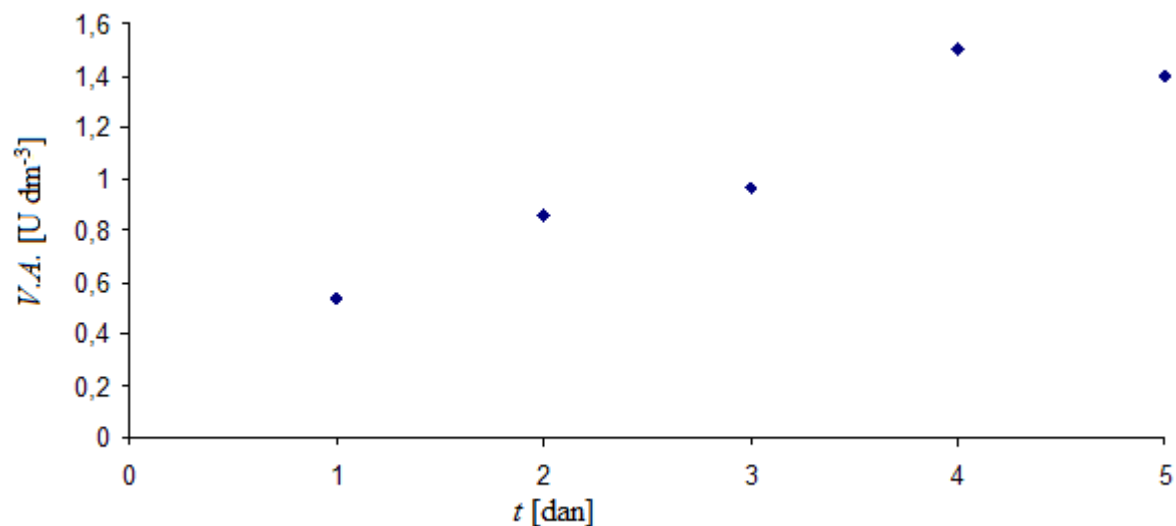
Proizvodnja lignolitičkih enzima u kolonskom reaktoru s mjehurićima je provedena s alkali ligninom kao supstratom. Tijekom pokusa praćene su promjena pH i koncentracije otopljenog kisika (Tablica 4), kao i volumne aktivnosti enzima lignin peroksidaze (Slika 12) i mangan peroksidaze (Slika 13).

Tablica 4. Vrijednosti pH i koncentracija otopljenog kisika u kolonskom reaktoru s mjehurićima za pokus s alkali ligninom

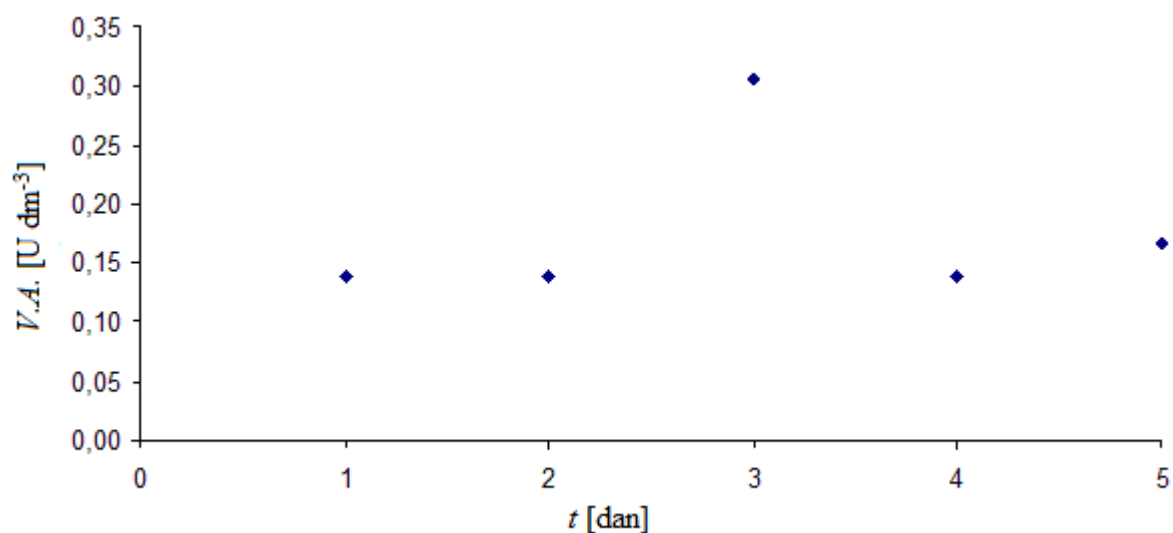
<i>t</i> [d]	pH -	<i>pO</i> ₂ [%]
1	4,31	44,7
2	5,24	52,7
3	4,19	56,8
4	4,28	58
5	4,27	63,5

Iz rezultata pokusa je vidljivo da se tijekom procesa proizvodnje pH ne mijenja značajno, te da je proces proveden u aerobnim uvjetima. Izmjerene volumne aktivnosti enzima lignin peroksidaze (Slika 12) i mangan peroksidaze (Slika 13) su izrazito niske, što ukazuje na neprimjerenost korištenog tipa reaktora i konstantnu aeraciju u proizvodnji lignolitičkih enzima

4. Rezultati i rasprava



Slika 12. Promjena aktivnosti enzima LiP u pokusu s alkali ligninom u kolonskom reaktoru s mjehurićima

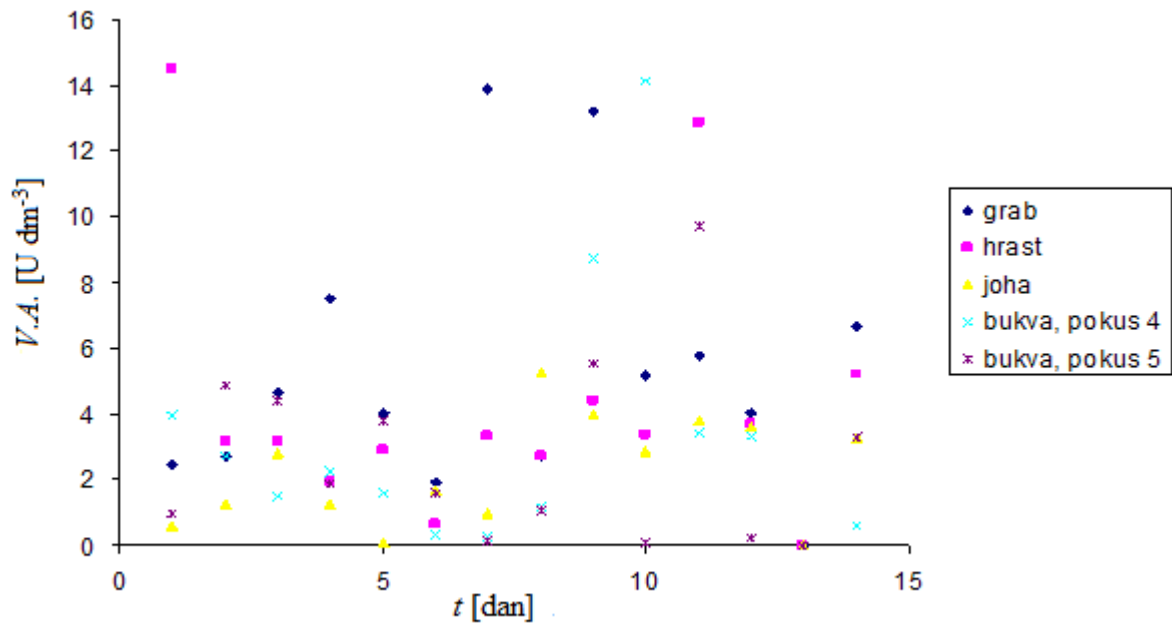


Slika 13. Promjena aktivnosti enzima MnP u pokusu s alkali ligninom u kolonskom reaktoru s mjehurićima

4. Rezultati i rasprava

4.2. Proizvodnja lignolitičkih enzima u tresilici s piljevinom kao supstratom

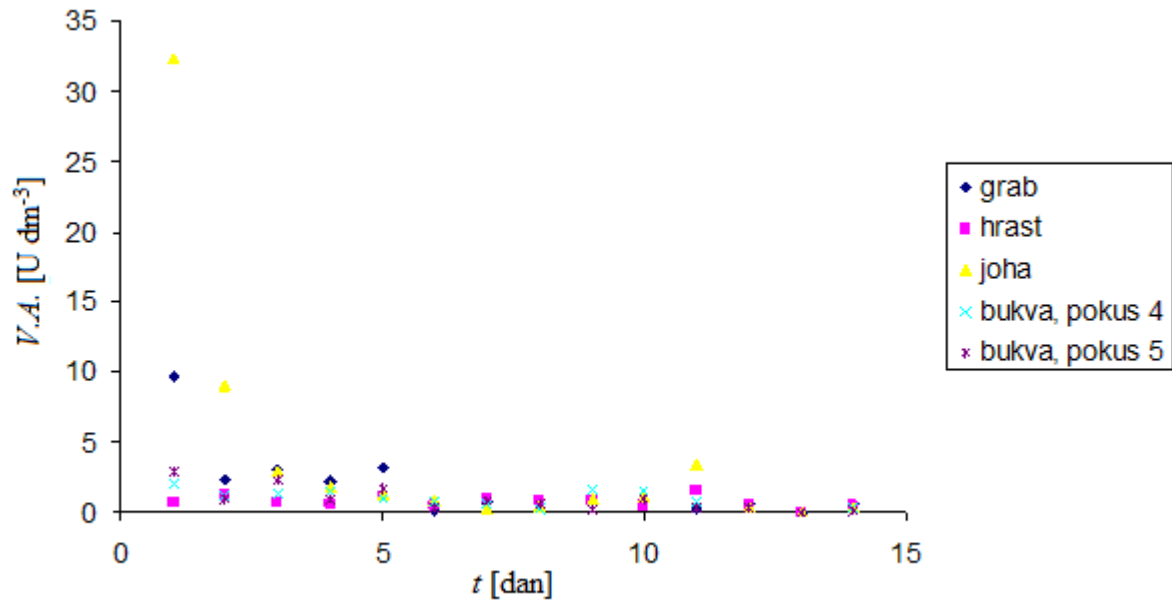
Proizvodnja lignolitičkih enzima u tresilici s piljevinom različitih vrsta drveća kao supstratom je provedena kroz 14 dana. U pokusima je korištena piljevina graba, hrasta, johe i bukve. Rezultati pokusa, promjena volumne aktivnosti enzima lignin peroksidaze, mangan peroksidaze i lakaze su prikazani na slikama 14, 15 i 16.



Slika 14. Promjena aktivnosti enzima LiP u pokusima s piljevinom različitog drveća kao supstratom

U 14 dana provedbe pokusa nije zabilježena značajnija aktivnost enzima LiP u pokusima s piljevinom različitog drveća kao supstratom (Slika 14). Najveća aktivnost dobivena je 1. dan u pokusu 2, s piljevinom hrasta kao supstratom i iznosi 14,52 U dm⁻³.

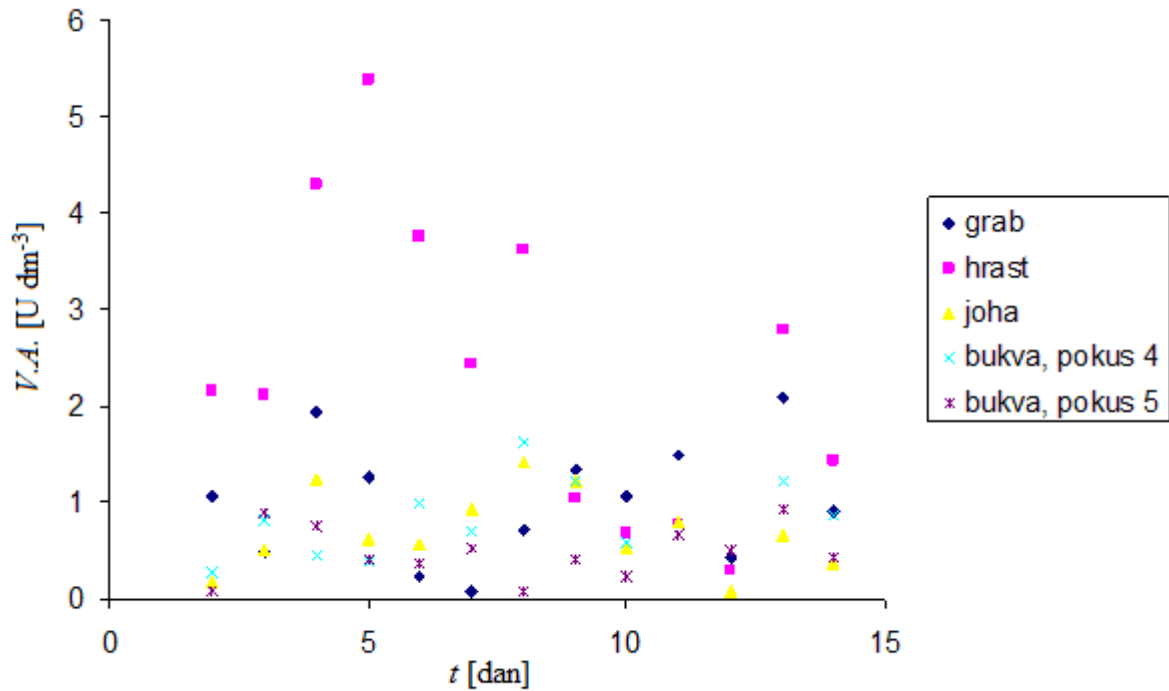
4. Rezultati i rasprava



Slika 15. Promjena aktivnosti enzima MnP u pokusima s piljevinom različitog drveća kao supstratom

Najveća aktivnost enzima MnP je postignuta prvi dan provedbe pokusa s piljevinom joha kao supstratom i iznosi $32,36 \text{ U dm}^{-3}$. Značajnija aktivnost (10 U dm^{-3}) je ostvarena i u pokusu sa piljevinom graba kao supstratom, dok su za piljevine drugih vrsta drveća postignute izrazito niske vrijednosti aktivnosti enzima MnP (Slika 15).

4. Rezultati i rasprava



Slika 16. Promjena aktivnosti enzima lakaze u pokusima s piljevinom različitog drveća kao supstratom

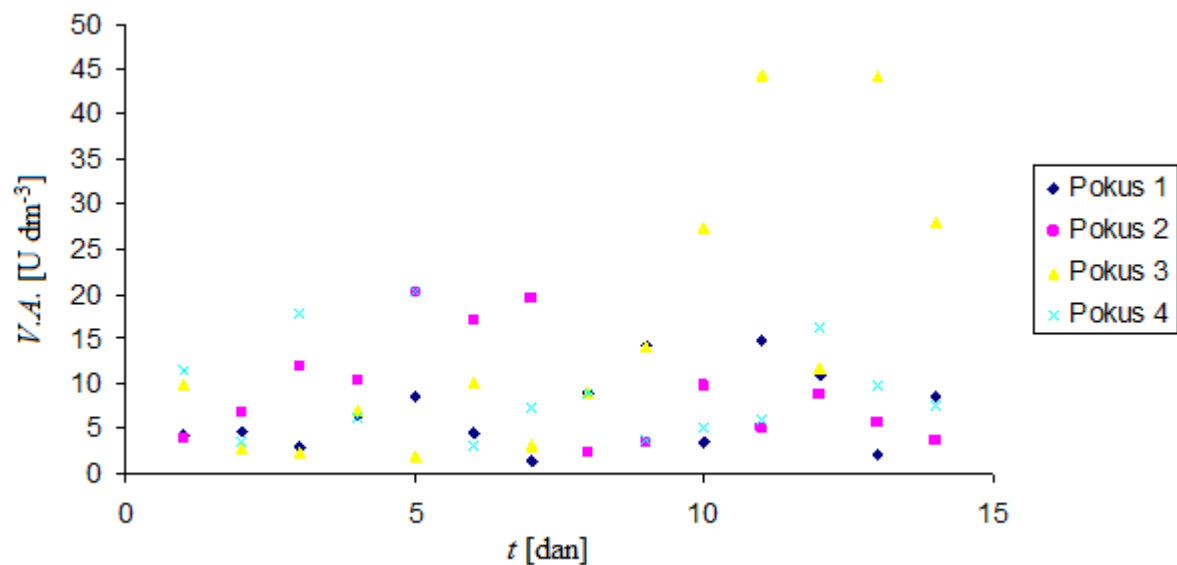
Najveća volumna aktivnost enzima lakaze je zabilježena u pokusima s piljevinom hrasta kao supstratom ($5,38 \text{ U dm}^{-3}$), dok je za piljevine ostalog vrsta drveća aktivnost lakaze bila manja od 2 U dm^{-3} (Slika 16).

Promatrajući rezultate pokusa s otpadom iz drvne industrije, odnosno piljevinom različitih vrsta drveća, može se zaključiti kako *Phanerochaete chrysosporium* nije pogodna za razgradnju istih, jer je tijekom vremena provedbe pokusa aktivnost lignolitičkih enzima zanemariva.

4. Rezultati i rasprava

4.3. Proizvodnja lignolitičkih enzima u tresilici s alkali ligninom kao supstratom

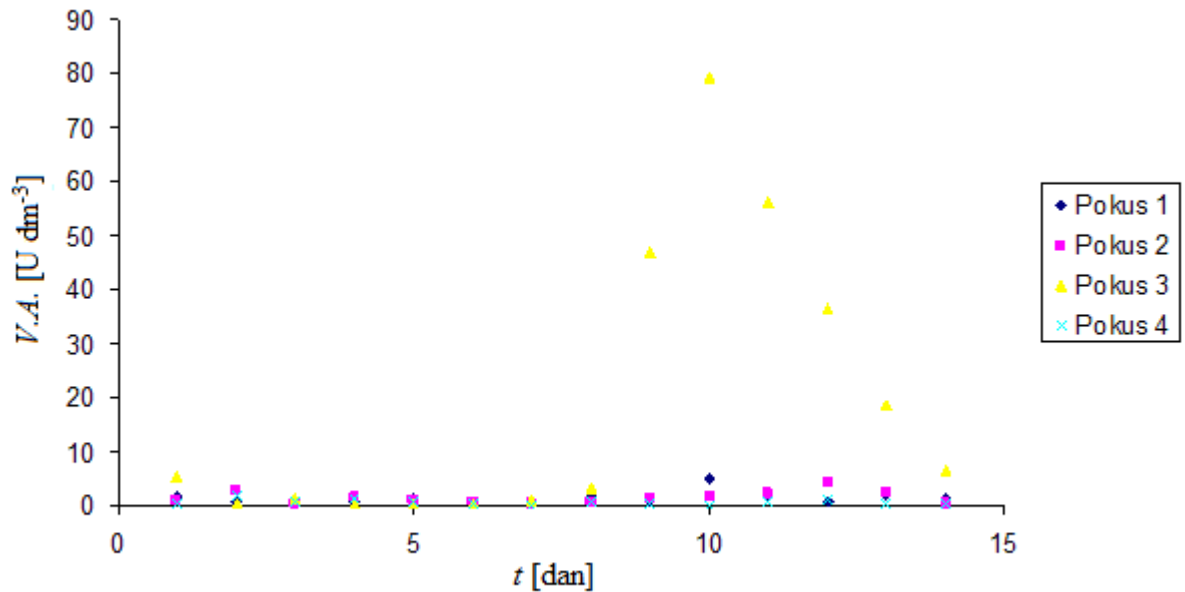
Proizvodnja lignolitičkih enzima u tresilici s alkali ligninom kao supstratom je provedena kroz 14 dana. Sastav reakcijske smjese u pokusima 1, 2, 3 i 4 je dan u poglavlju 3. Materijali i metode. Rezultati pokusa, promjena volumne aktivnosti enzima lignin peroksidaze, mangan peroksidaze i lakaze su prikazani na slikama 17, 18 i 19.



Slika 17. Promjena aktivnosti enzima LiP u pokusima s alkali ligninom

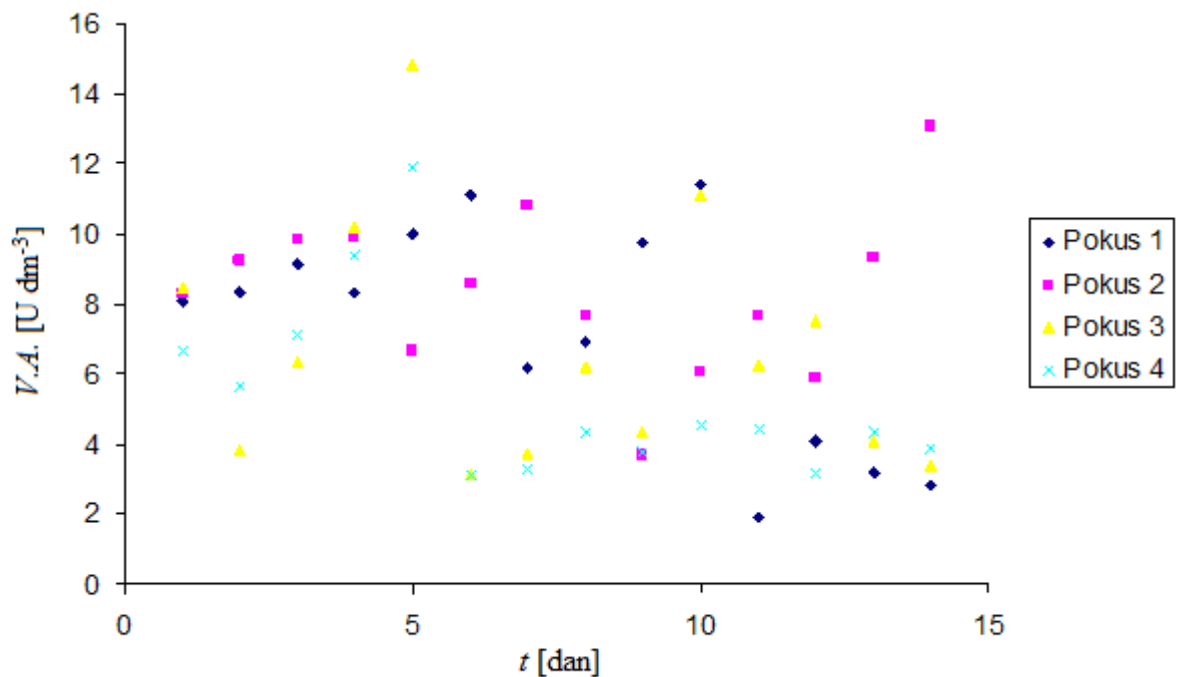
U pokusima s alkali ligninom kao supstratom, najveća aktivnost enzima LiP dobivena je u pokusu 3 u kojem je koncentracija alkali lignina bila dvostruko veća nego u ostalim pokusima. Najveća aktivnost enzima LiP je zabilježena 11. dan i iznosila je $44,25 \text{ U dm}^{-3}$ (Slika 17).

4. Rezultati i rasprava



Slika 18. Promjena aktivnosti enzima MnP u pokusima s alkali ligninom

Najveća volumna aktivnost enzima MnP je postignuta u Pokusu 3 u kojemu je koncentracija alkali lignina bila dvostruko veća u odnosu na ostale pokuse. Najveća ostvarena volumna aktivnost je postignuta 10. dan provedbe pokusa i iznosila je 79,13 U dm⁻³ (Slika 18).



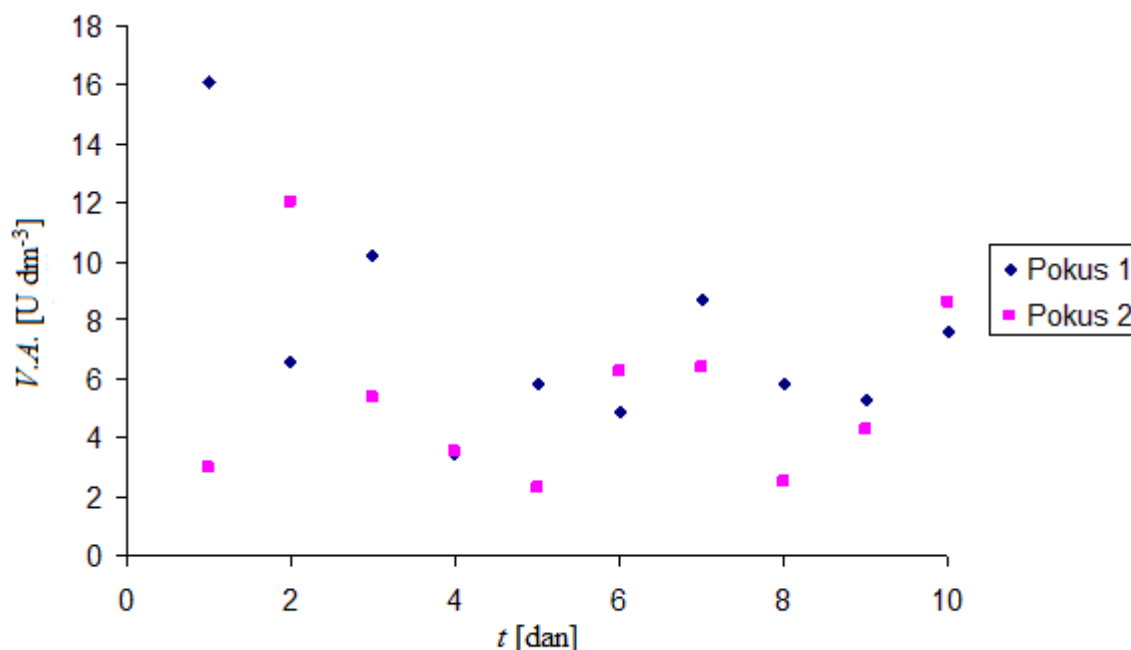
Slika 19. Promjena aktivnosti enzima lakaze u pokusima s alkali ligninom

4. Rezultati i rasprava

Promjena sastava reakcijskog medija nije značajnije utjecala na volumnu aktivnost enzima lakaze u pokusima sa alkali ligninom kao supstratom. Najveća aktivnost je zabilježena peti dan u pokusu 3 i iznosila je $14,82 \text{ U dm}^{-3}$ (slika 19).

4.4. Proizvodnja lignolitičkih enzima u tresilici sa crnim lugom kao supstratom

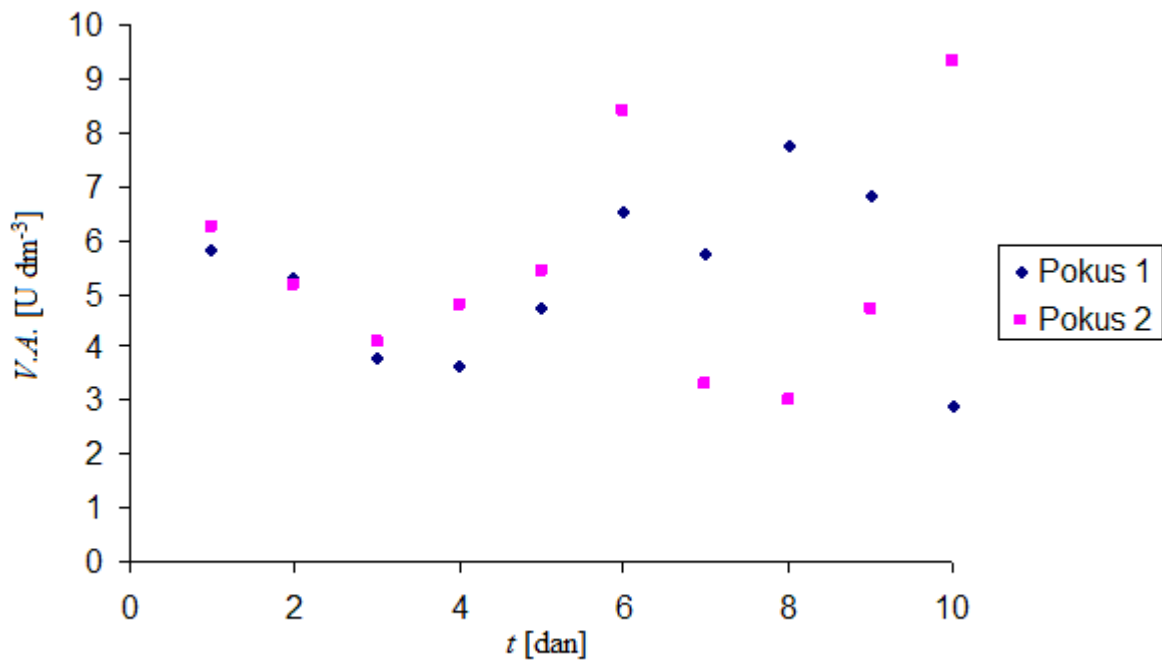
Proizvodnja lignolitičkih enzima u tresilici sa crnim lugom kao supstratom je provedena kroz 10 dana za dvije različite početne koncentracije peleta. Sastav reakcijske smjese u pokusima 1 i 2 je dan u poglavlju 3. Materijali i metode. Rezultati pokusa, promjena volumne aktivnosti enzima lignin peroksidaze, mangan peroksidaze i lakaze su prikazani na slikama 20, 21 i 22.



Slika 20. Promjena aktivnosti enzima LiP u pokusima sa crnim lugom

U pokusima sa crnim lugom kao supstratom nisu postignute značajnije aktivnosti enzima LiP kroz 10 dana provedbe pokusa. Najveća aktivnost je zabilježena prvog dana provedbe pokusa u pokusu 1 i iznosila je $16,13 \text{ U dm}^{-3}$ (Slika 20).

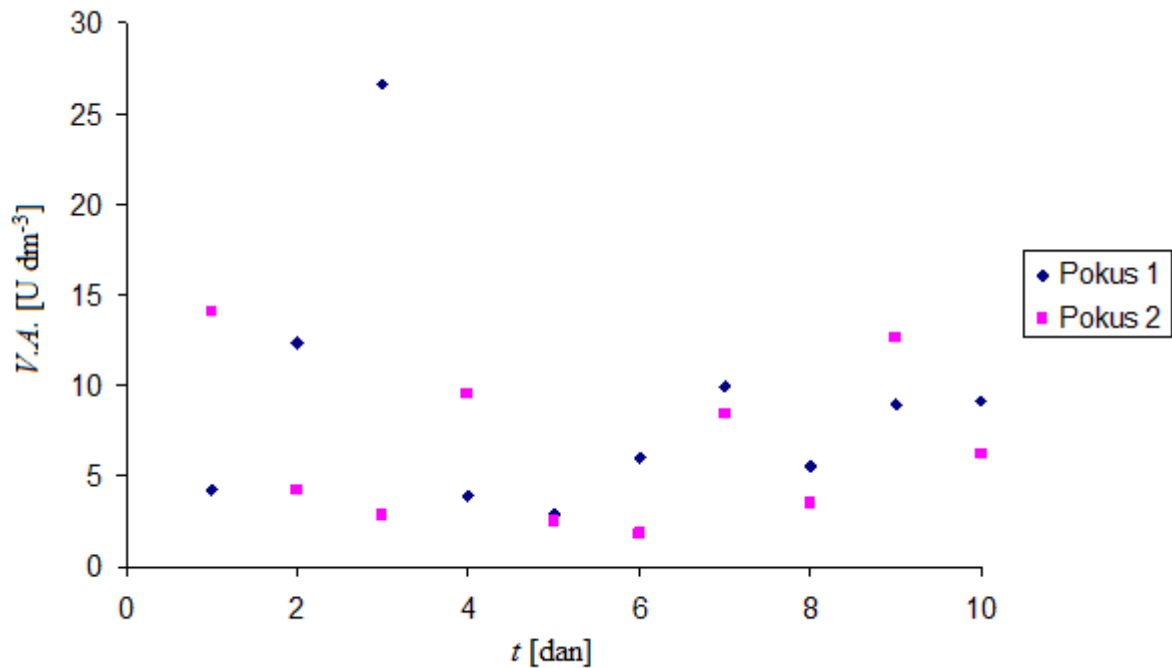
4. Rezultati i rasprava



Slika 21. Promjena aktivnosti enzima MnP u pokusima sa crnim lugom

Kao i kod enzima LiP, aktivnosti enzima MnP u pokusima sa crnim lugom su neovisne o početnim uvjetima provedbe pokusa (koncentraciji peleta), a najveća aktivnost enzima MnP zabilježena je desetog dana provedbe pokusa u pokusu 2 i iznosila je 9,33 U dm⁻³ (Slika 21).

4. Rezultati i rasprava



Slika 22. Promjena aktivnosti enzima lakaze u pokusima sa crnim lugom

Najveće aktivnosti enzima lakaze su postignute u pokusima sa crnim lugom kao supstratom. Najveća aktivnost je zabilježena trećeg dana u pokusu 1 i iznosila je 26,63 U dm⁻³ (Slika 22). U pokusima sa crnim lugom kao supstratom dobivene su razmjerno najveće aktivnosti sva tri enzima, odnosno crni lug se pokazao kao potencijalno najprimjenjiviji supstrat. Kako bi se postigle veće aktivnosti, odnosno koncentracije enzima, u pokusima sa crnim lugom potrebna su daljnja optimiranja procesnih uvjeta, prvenstveno sastava hranjive podloge.

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu provedeni su šaržni pokusi u tikvicama na tresilici i u kolonskom reaktoru s mjehurićima u cilju proizvodnje lignolitičkih enzima lakaze, mangan-peroksidaze i lignin-peroksidaze. Proučavan je utjecaj različitih supstrata i sastava hranjive podloge na aktivnost lignolitičkih enzima. Supstrati koji su korišteni u pokusima su alkali lignin, piljevina različitog drveća, te crni lug.

U pokusu provedenom u kolonskom reaktoru s mjehurićima na alkali ligninu kao supstratu nije zabilježena značajnija aktivnost niti jednog lignolitičkog enzima.

U pokusima provedenim na tresilici sa piljevinom različitog drveća kao supstratom nije zabilježena značajnija aktivnost lignolitičkih enzima osim u pokusu sa piljevinom johe za enzim mangan-peroksidazu gdje je postignuta najveća aktivnost od $32,36 \text{ U dm}^{-3}$.

U usporedbi sa ostalim supstratima u pokusima s alkali-ligninom kao supstratom postignute su najveće aktivnosti na enzimima lignin peroksidazi od $44,25 \text{ U dm}^{-3}$ i mangan peroksidazi od $79,13 \text{ U dm}^{-3}$.

Crni lug je pokazao najveći potencijal kao supstrat za indukciju proizvodnje lignolitičkih enzima jer je u pokusima provedenim sa crnim lugom kao supstratom postignuta značajnija aktivnost sva tri lignolitička enzima ($16,13 \text{ U dm}^{-3}$ za lignin peroksidazu, $9,33 \text{ U dm}^{-3}$ za mangan-peroksidazu i $26,63 \text{ U dm}^{-3}$ za lakazu). Za postizanje većih aktivnosti potrebna su dodatna istraživanja i optimiranja procesnih uvjeta.

6. LITERATURA

1. **Chen, S.; Singh, D.:** The white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: conditions for the production of lignin-degrading enzymes, *Appl Microbiol Biotechnol* (2008) 81:399–417
2. **Vasić–Rački Đ.:** History of Industrial Biotransformation – Dreams and Realities; Liese A., Seelbach K., Wandrey C., *Industrial Biotransformation*, Wiley - VCH, Weinheim (2006) 1 – 36
3. **Petersen S.B.:** Protein engineering: design and engineering on the nano scale; Straathof A.J.J., Patrick A., *Applied Biocatalysts*, Harwood Academic Publishers (1994) 229 – 267
4. **Kirk, T.K.; Tien, M.:** Lignin Peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*, San Diego, CA: Academic Press, (1988) Inc.: 238-249. Vol. 161
5. **Merwe van der J.J.:** Production of laccase by the white – rott fungus *Pycnoporus sanguineus*, MSc thesis, Faculty of Natural and Agricultural Sciences, Bloemfontein (South Africa), 2002
6. **Nester E.W., Anderson D.G., Roberts Evans Jr. C., Pearsall N.N., Nester M.T.:** Microbiology – A Human Perspective, McGraw-Hill, 2004
7. **Duraković S., Duraković L.:** Mikologija u biotehnologiji, Kugler, Zagreb (2003) 5-41
8. http://www.world-of-fungi.org/Mostly_Mycology/Lucy_Goodeve-Docker_bioremediation_website/whiterotfungi.htm
9. **Lankinen P.:** Ligninolytic enzymes of the basidiomycetous fungi *Agaricus bisporus* and *Phlebia radiata* on lignocellulose containing media, Academic Dissertation in Microbiology, Helsinki, 2004
10. <http://genome.jgi-psf.org/whiterot1/whiterot1.home.html>
11. <http://mibr.asm.org/cgi/content/abstract/57/3/605>
12. **Duraković S.:** Opća mikrobiologija, Prehrambeno tehnološki inženjering, Zagreb, 1996
13. **Dumić J.:** Biološka kemija – enzimi, www.pharma.hr
14. **Pušelja D.:** www.puseljadejan.com/lignin
15. **Tišma M.:** Oksidacija fenolnih spojeva lakazom iz *Trametes versicolor* u različitim tipovima reaktora, magistarski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2008

7. POPIS SIMBOLA I SKRAĆENICA

7.1. Simboli

d	širina kivete spektrofotometra, cm
n	broj okretaja tresilice, min^{-1}
p	tlak
q	protok, $\text{dm}^3 \text{s}^{-1}$
T	temperatura, $^{\circ}\text{C}$
t	vrijeme, dan
V	volumen, cm^3
$V.A.$	volumna aktivnost, U dm^{-3}
V_E	volumen uzorka koji sadrži enzim, cm^3
V_r	ukupni volumen uzorka, cm^3

7.1.1. Grčki simboli

ε	ekstincijski koeficijent, $\text{dm}^3 \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$
λ	valna duljina, nm

7.2. Skraćenice

ABTS	2,2'-azinodi-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)
ATP	adenozin – trifosfat
Lacc	lakaza
LiP	lignin - peroksidaza
MnP	mangan - peroksidaza

7. Popis simbola i skraćenica

U internacionalna jedinica katalitičke aktivnosti enzimska, $1 \text{ U} = 1 \mu\text{mol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$

ŽIVOTOPIS

Mladen Franjo rođen je 3. travnja 1987. godine u Koprivnici. Osnovnu školu završava u Virju, a maturirao je 2005. godine u Gimnaziji „Fran Galović“ u Koprivnici (prirodoslovno-matematički smjer). Iste godine upisuje sveučilišni preddiplomski studij, smjer ekoinženjerstvo, na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu, koji završava 2009. godine.