

# Proizvodnja ekstracelularnih enzima pomoću gljive *Trametes versicolor*

---

**Dobrotić, Dominik**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2019**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:053886>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-21**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Dominik Dobrotić**  
7326/BT

**Proizvodnja ekstracelularnih enzima pomoću gljive**  
***Trametes versicolor***

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Biotehnologija 3

**Naziv znanstveno-istraživačkog ili stručnog projekta:** Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina

**Mentor:** prof.dr.sc. Tonči Rezić

**Zagreb, 2019.**

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za Biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju  
piva i slada

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

## Proizvodnja ekstracelularnih enzima pomoću gljive *Trametes versicolor*

**Dominik Dobrotić, 0058209559**

**Sažetak:** Proveden je šaržni uzgoj gljive *T. versicolor* u tekućoj hranjivoj podlozi s ciljem optimiziranja proizvodnje ekstracelularnih lignocelulolitičkih enzima. Uzgoj se provodio u pet različitih hranjivih podloga sa tri različita izvora ugljika: glukoza, lipa i hrast. Izvori ugljika bili su sami u podlozi ili u kombinaciji s glukozom u ekvivalentnom masenom odnosu (lipa i glukoza; hrast i glukoza). Tijek biosinteze enzima pratio se mjerenjem enzimске aktivnosti lakaza, mangan peroksidaza i celobioza dehidrogenaza metodom mjerenja promjene apsorbancije o vremenu za određeni supstrat pri određenoj valnoj duljini. Hemicelulazna i celulazna aktivnost mjerila se u 18. danu uzgoja DNSA metodom. Hrast se pokazao kao dobar induktor sinteze lignolitičkih i hemicelulolitičkih enzima. Najoptimalnija hranjiva podloga za proizvodnju ekstracelularnih enzima bila je podloga sa kombiniranim izvorom ugljika, hrastom i glukozom, u kojoj je u 18. danu uzgoja dobivena lakazna aktivnost iznosila 0,658 U/mL, mangan peroksidazna aktivnosti iznosila 0,073 U/mL, ksilanazna aktivnost iznosila 1,635 U/mL, pektinazna aktivnost iznosila je 0,503 U/mL i arabinazna aktivnost iznosila je 0,689 U/mL.

**Ključne riječi:** ekstracelularni enzimi, *Trametes versicolor*, hranjive podloge, šaržni uzgoj

**Rad sadrži:** 28 stranica, 14 slika, 11 tablica, 45 literaturnih navoda, 3 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici**

**Prehrambenobiotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000  
Zagreb**

**Mentor:** prof.dr.sc. Tonči Rezić

**Pomoć pri izradi:** dr.sc. Martina Andlar

**Datum obrane:** 09.Srpnja.2019

## BASIC DOCUMENTATION CARD

**Bachelor thesis**

**University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
University undergraduate study Biotechnology**

**Department of Biochemical engineering  
Laboratory for Biochemical engineering, industrial microbiology and technology  
of beer and malt**

**Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Biotechnology**

### **Production of extracellular enzymes using fungus *Trametes versicolor***

**Dominik Dobrotić, 0058209559**

**Abstract:** Batch cultivation of fungus *T. versicolor* was conducted in the liquid growth medium in order to optimise the production of extracellular lignocelulolytic enzymes. Cultivation was conducted in five different growth medium with three different carbon sources: glucose, lime tree and oak. Carbon sources were either the only carbon source or in combination with glucose in equivalent mass ratio (lime and glucose; oak and glucose). The course of enzyme biosynthesis was monitored by measuring the enzyme activity of laccases, manganese peroxidases and cellobiose dehydrogenases by measuring the slope of the absorption of specified substrate at a specified wavelength. Hemicellulase and cellulase activity was measured during the 18<sup>th</sup> day of cultivation using the DNSA assay. Oak was shown to be a good inductor of lignolytic and hemicellulolytic enzyme synthesis. The most optimal growth medium was the medium with the combined carbon sources, oak and glucose, at which during the 18<sup>th</sup> day of cultivation the obtained laccase activity was 0.658 U/ml, manganese peroxidase activity was 0.073 U/ml, xylanase activity was 1.635 U/ml, pectinase activity was 0.503 U/ml and arabinase activity was 0.689 U/ml.

**Keywords:** extracellular enzymes, *Trametes versicolor*, growth medium, batch cultivation

**Thesis contains:** 28 pages, 11 figures, 11 tables, 45 references, 3 supplements

**Original in:** Croatian

**Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** prof.dr.sc. Tonči Rezić

**Technical support and assistance:** dr.sc. Martina Andlar

**Defence date:** July 09<sup>th</sup> 2019

*Rad je izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Tončija Rezića te uz pomoć dr. sc. Martine Andlar, stručne suradnice na HRZZ projektu.*

*Završni rad je izrađen u okviru HRZZ projekta „Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina“ (šifra projekta 9717).*

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1. Gljive</b> .....	<b>2</b>
2.1.1. Razgradnja drveta .....	2
2.1.1.1. Smeđe truljenje .....	2
2.1.1.1. Bijelo truljenje.....	2
2.1.2. <i>Trametes versicolor</i> .....	3
<b>2.2. Lignoceluloza</b> .....	<b>3</b>
2.2.1. Lignin .....	4
2.2.2. Celuloza .....	5
2.2.3. Hemiceluloza .....	6
2.2.4. Pektin .....	6
<b>2.3. Enzimska razgradnja lignoceluloze</b> .....	<b>6</b>
2.3.1. Biodegradacija lignina .....	7
2.2.1.1. Lakaze .....	7
2.2.1.1.1. Mehanizam djelovanja .....	7
2.2.1.1.2. Moguća upotreba.....	8
2.2.1.2. Lignolitičke peroksidaze.....	8
2.3.2. Biodegradacija celuloze .....	8
2.3.3. Biodegradacija hemiceluloze .....	9
2.3.4. Biodegradacija pektina .....	9
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>10</b>
<b>3.1. Materijali</b> .....	<b>10</b>
3.1.1. Radni mikroorganizam.....	10
3.1.2. Sirovine za pripremu hranjivih podloga .....	10
3.1.3. Kemikalije .....	10
3.1.4. Hranjive podloge za održavanje, čuvanje i uzgoj gljive <i>Trametes versicolor</i> .....	11
3.1.4.1. <i>Submerzni uzgoj gljive Trametes versicolor u tikvicama</i> .....	11
3.1.5. Oprema i aparatura .....	12
3.1.5.1. <i>Spektrofotometar</i> .....	12
3.1.6. Ostala oprema i aparatura .....	13
<b>3.2. Metode rada</b> .....	<b>13</b>
3.2.1. Priprema inokuluma .....	13
3.2.2. Priprema podloga za submerzni uzgoj i proizvodnju celulolitičkih i hemicelulolitičkih enzima .....	13
3.2.3. Analitičke metode.....	14
3.2.3.1. <i>Određivanje lignocelulolitičke aktivnosti enzima</i> .....	14
3.2.3.1.1. <i>Određivanje lakaznih, mangan peroksidaznih i celobioza dehidrogenaznih aktivnosti mjerenjem brzine enzimske reakcije</i> .....	14
3.2.3.1.1.1. <i>Priprema reagensa i otopina za mjerenje brzine enzimske reakcije</i> .....	15
3.2.3.1.1.2. <i>Postupak provođenja analize metodom mjerenja brzine enzimske reakcije</i> .....	15
3.2.3.1.1.3. <i>Izračun enzimske aktivnosti lakaza, mangan peroksidaza i celobioza dehidrogenaza</i> .....	16

3.2.3.1.2. <i>Određivanje celulolitičkih i hemicelulolitičkih aktivnosti korištenjem metode 3,5-dinitrosalicilne kiseline (DNSA metoda)</i> .....	16
3.2.3.1.2.1. <i>Priprema reagensa i otopina za DNSA metodu</i> .....	17
3.2.3.1.2.2. <i>Postupak provođenja analize DNSA metode</i> .....	17
3.2.3.1.2.3. <i>Izračun celulolitičke i hemicelulolitičke aktivnosti kod DNSA metode</i> .....	18
3.2.3.2. <i>Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu</i> .....	18
3.2.3.2.1. <i>Postupak provođenja analize metodom po Bradfordu</i> .....	18
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>19</b>
<b>4.1. Rast biomase na različitom izvoru ugljika</b> .....	<b>19</b>
<b>4.2. Praćenje enzimske aktivnosti lakaze, mangan peroksidaze i celobioza dehidrogenaze tijekom uzgoja</b> .....	<b>19</b>
<b>4.3. Praćenje koncentracije proteina tijekom uzgoja biomase</b> .....	<b>21</b>
<b>4.4. Celulolitička i hemicelulolitička aktivnost nakon uzgoja</b> .....	<b>22</b>
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>25</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>26</b>

## 1. UVOD

Lignoceluloza je jeftina sirovina dobivena od drvnih i poljoprivrednih ostataka. Bogata je celulozom, dugačkim polimerom sastavljenim od glukoznih jedinica koje nakon hidrolize mogu služiti kao izvor ugljika mikroorganizmima i time dobiti vrijedne proizvode. Primjena lignoceluloznih sirovina najviše se istražuje u svrhu proizvodnje bioetanola druge generacije. Prednost ovakve proizvodnje je u tome što se ne koriste škrobne ili šećerne sirovine te se ne utječe na promijenu cijene prehrambenih sirovina (Jönsson i sur., 2013). Uz proizvodnju bioetanola, jedna od mogućih primjena lignoceluloznih sirovina je u proizvodnji vrijednih kemikalija poput organskih kiselina dobivenih fermentacijom šećera, nakon hidrolize celulozne i hemicelulozne komponente lignoceluloze. Također, lignocelulozna sirovina ima potencijal za proizvodnju proteina jednostaničnih mikroorganizma koji se mogu koristiti u prehrani za životinje. Iz ksilanskog polimera, najzastupljenijeg polisaharida u strukturi hemiceluloze, moguće je dobiti ksilitol, zaslađivača sa slatkoćom sličnoj saharozi. Preostali lignin, koji umjesto da se baca ili koristi za grijanje, mogao bi se, zbog svoje aromatske strukture, koristiti za proizvodnju aromatskih spojeva (Kumar i sur., 2016).

Prisustvo lignina otežava hidrolizu polimera hemiceluloze i celuloze (Kumar i sur., 2016) pa ga je potrebno ukloniti. Mikroorganizmi koji razgrađuju lignocelulozu se koriste za biološki proces delignifikacije lignoceluloze. Prednost biološke delignifikacije u usporedbi s fizikalno-kemijskim metodama je u tome što nema potrebe za korištenje koncentriranih kemikalija. Najveći nedostatak biološke razgradnje lignina je spora reakcija razgradnje lignoceluloznih supstrata. Ipak, prednost je jeftiniji proces zbog blagih reakcijskih uvjeta i manjeg utroška energije (Dionisi i sur., 2014).

Također, lignolitički enzimi ili gljive mogu se koristiti za detoksifikaciju medija nakon fizikalnog-kemijskog predtretmana lignocelulozne sirovine pri kojima nastaje mnoštvo spojeva, poput fenolnih spojeva iz lignina koji mogu inhibirati hidrolitičke enzime ili radne mikroorganizme koji provode fermentaciju hidrolizirane sirovine (Plácido i Capareda, 2015).

U ovom radu proveden je uzgoj gljive bijele truleži *Trametes versicolor* na različitim izvorima ugljika s ciljem dobivanja ekstracelularnih lignocelulolitičkih enzima koji bi se koristili u biorafinerijama. Pratila se promjena aktivnosti enzima na pet različitih hranjivih podloga koje se razlikuju prema vrsti i koncentraciji izvora ugljika te je na osnovu rezultata donesen zaključak o najpogodnijoj hranjivoj podlozi za dobivanje ekstracelularnih enzima.



## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Gljive

Pod pojmom gljive spadaju eukariotski, nefotosintetski organizmi koji se dijele na plijesni, kvasce i makroskopske organizme. Zajedničko ima je da njihova stanična stijenka sastavljena od polimera N-acetilglukozamina, poznatim kao hitin (Duraković, 2003). Gljive razgrađuju mnoštvo organskih tvari od jednostavnih šećera do složenih polimera poput celuloze i lignina te su time gljive važni razgrađivači poljoprivredne i drvne biomase (Maier i Pepper, 2000).

#### 2.1.1. Razgradnja drveta

Drva se u prirodi razgrađuju od strane bakterija i gljiva. Razgradnja drva se dijeli na „meko“ truljenje, koje uzrokuju gljive koljena *Askomiceta*, te na bijelo i smeđe truljenje, koje uzrokuju gljive koljena *Bazidomiceta*. Bijelo i smeđe truljenje drva od strane *Bazidomiceta* puno je agresivnije od bakterijske razgradnje i razgradnje od strane *Askomiceta* (Kim i Singh., 2000; Alexopoulos i sur., 1996).

##### 2.1.1.1. Smeđe truljenje

Smeđe truljenje je proces razgradnje drva u prirodi, specifično po razgradnji celuloznih i hemiceluloznih komponenti drva i minimalnoj modifikaciji i razgradnji lignina u drvu. Produkt njihove razgradnje su drveni ostaci kubične građe (Alexopoulos i sur., 1996) i smeđe boje zaostalog ligninskog ostatka (Kim i Singh, 2000)

##### 2.1.1.1. Bijelo truljenje

Bijelo truljenje je proces razgradnje drva pri čemu dolazi do podjednake razgradnje ligninske, celulozne i hemiceluloznih komponenta drva pri čemu razgrađeno drvo prelazi u oblik bijelih, tankih i lakolomljivih niti sve do potpune razgradnje od strane gljiva bijele truleži (Alexopoulos i sur., 1996). Dolazi do izbjeljivanja boje drveta. Također, kod nekih vrsta gljiva može doći do selektivne razgradnje lignina i hemiceluloze i minimalne razgradnje celuloze. Tvrd drva (Kritosjemenjače) su podložnija ovoj vrsti biološke razgradnje od mekih drva (Golosjemenjače) (Kim i sur., 2000).

### 2.1.2. *Trametes versicolor*

*T. versicolor* (Šarena tvrdokoška) je gljiva bijele truleži koja se tradicionalno koristila u Kini i Japanu u narodnoj medicini (Usčuplić, 2012). Gljive roda *Trametes* prepoznaju se kao izvor enzima lakaze. Enzimi lakaza i mangan peroksidaza razgrađuju ligninsku komponentu drva pri čemu ih *T. versicolor* ekstracelularno izlučuje (Stoilova i sur., 2010). U prirodi razgrađuje primarno tvrda drva, a rijetko meka te kod drva istovremeno razgrađuje celulozne, hemicelulozne i ligninske komponente drva (Martinez i sur., 2005).

## 2.2. Lignoceluloza

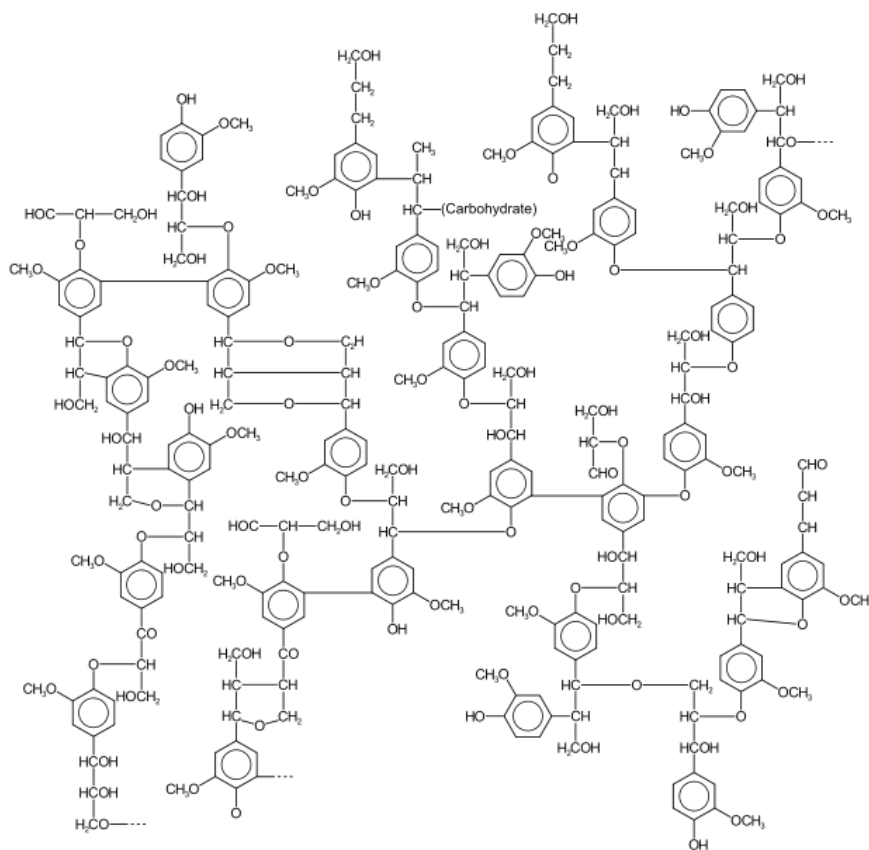
Lignoceluloza je sirovina sastavljena primarno od lignina, hemiceluloze i celuloze (Martínez i sur., 2005). Pod lignoceluloznim sirovinama ubrajamo šumsku biomasu i poljoprivredne ostatke (Isikgor i Becer, 2015). Količina pojedine komponente drva razlikuje se od vrste do vrste pa čak i unutar same biljke, različiti dijelovi biljke imaju različitu količinu hemiceluloze, celuloze i lignina koje se mijenjaju kroz faze rasta biljke (Jeffries, 1994). Otpornost lignoceluloze na razgradnju proizlazi iz čvrsto uklopljene celuloze u lignin-hemicelulozni matriks, iz hidrofobnosti lignina i stupnja kristalčnosti celuloze (Isikgor i Becer, 2015).

Tablica 1. Prikaz količine pojedinog polimera u različitim lignoceluloznim sirovinama (Adaptirano iz Howard i sur, 2003.)

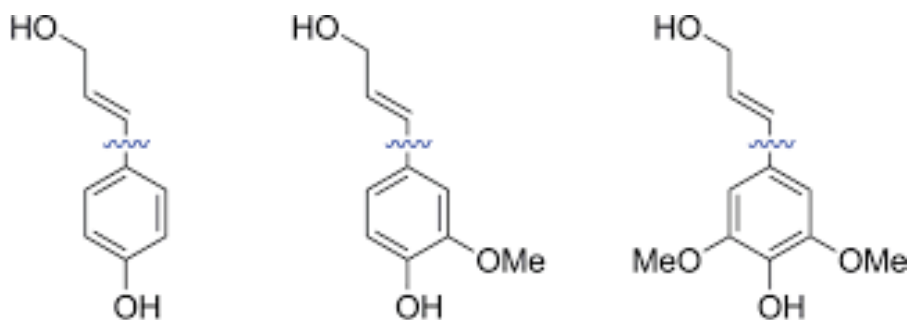
<b>Lignocelulozna sirovina</b>	<b>Celuloza (%w/w)</b>	<b>Hemiceluloza (%w/w)</b>	<b>Lignin (%w/w)</b>
<b>Tvrda drva</b>	40-55	24-40	18-25
<b>Meka Drva</b>	45-50	25-35	25-35
<b>Kukuruzni klipovi</b>	45	35	15
<b>Pšenična slama</b>	30	50	15
<b>Rižina slama</b>	32.1	24	18
<b>Lišće</b>	15-20	80-85	0
<b>Novinski papir</b>	40-55	25-40	18-30

### 2.2.1. Lignin

Lignin je kopolimer, sastavljenih od fenolnih monomera međusobno povezanih eterim (R-O-R') i ugljik-ugljik vezama. Također, dolazi do direktnog ili indirektnog povezivanja fenolnih monomera sa ugljikohidratim skupinama u hemicelulozi i celulozi time otežavajući razgradnju lignina (Jeffries, 1994; Martínez i sur., 2005). Analiza razgradnih produkata lignina ukazala je da se struktura lignina sastoji od tri različita hidroksifenilpropanskih spojeva sinapila, koniferila i p-kumarila (Suteera, 2008). Primjer moguće strukture i veza u ligninu prikazano je u slici 1. a prekursori lignina i odgovarajuće strukturne jedinice u ligninu prikazane su u slici 2.



Slika 1. Primjer moguće strukture lignina (Glazer i Nikaido, 1995).



p-kumaril alkohol  
p-hidroksifenil(H)

Koniferil alkohol  
Gvajacil (G)

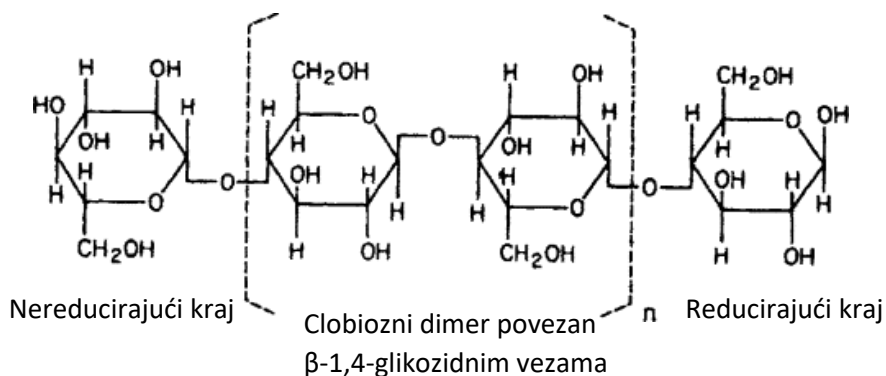
Sinapil alkohol  
Siringilil (S)

Slika 2. Primarni monomeri lignina i odgovarajuće strukturne jedinice u ligninu, gdje su odgovarajuće strukture odvojene plavom crtom (adaptirano iz Pinkert i sur., 2011.)

Udio lignina razlikuje se između tvrdih i mekih drva. Lignin u tvrdim drvima sadrži najviše gvajacilnih i siringirilnih podjedinica dok u mekim drvima lignin sadrži najviše gvajacilnih podjedinica te su te jedinice unakrsnije povezane nego u tvrdim drvima (Couturier i sur. 2015).

### 2.2.2. Celuloza

Celuloza je najzastupljeniji polimer u lignoceluloznoj biomasi (Isikgor i Becer, 2015.). Sastoji se od dugačkih lanca D-glukoze povezanih  $\beta$ -1,4-glikozidnim vezama. Polimerni lanci celuloze međusobno su povezani s vodikovim i van der Waalsovima koje otežavaju hidrolizu lanaca. Prostorno organizirane strukture čine kristaličnu celulozu, uz kristaličnu celulozu, određeni udio čini amorfnu celulozu, koja se lakše hidrolizira enzimskom razgradnjom (Pérez i sur., 2002).



Slika 3. Struktura celuloze (Adaptirano iz Young, 2002)

### 2.2.3. Hemiceluloza

Hemiceluloza učvršćuje celulozu unutar hemiceluloznog matriksa. Hemicelulozni polimer sastoji se od glavnog lanca polisaharida koji je razgranat monosaharidnim jedinicama različitog sastava. Zbog razgranate strukture i amorfne građe i podložniji su hidrolizi od celuloze. Hemicelulozni polisaharidi nazivaju se prema monomernim jedinicama u najduljem, glavnom, polimernom lancu. Ksilan je tako dobio ime po monosaharidnim jedinicama ksiloze, manan od manoze, arabinan od arabinoze i ksiloglukani od glukoze (Viikari i sur., 2009). Kod tvrdih drva najzastupljenija komponenta hemiceluloze je glukoronoksilan, koji se sastoji od glavnog lanca  $\beta$ -1,4-D-ksilana sa  $\alpha$ -1,2-4-O-metil-D-glukoronskom kiselinom supstituiranom na otprilike 10% ksiloznih ostataka. Kod mekih drva najzastupljeniji je glukomanan, polimer koji je u glavnom lancu sastavljen od D-glukopiranoznih i D-manopiranoznih jedinica povezanih  $\beta$ -1,4-glikozidnom vezom (Jeffries, 1994.).

### 2.2.4. Pektin

Pektin je jedna od komponenta stanične stijenke viših bilja pa se s time nalazi i u lignoceluloznim sirovinama. Drvna tkiva ga sadrže oko 5%, trave 2-10%, a voće i povrće može sadržavati i puno veću količinu. Pektin je heteropolisaharid koji se sastoji od glavnog polimernog lanca galakturonske kiseline povezane  $\alpha$ -1,4-glikozidnim vezama s bočnim lancima, koji mogu biti sastavljeni od monomera L-ramnoze, arabinoze, galaktoze i ksiloze. Otkrivene su mnoge pektinske strukture od kojih je najzastupljeniji homogalakturonan, koji se sastoji od glavnog lanca galakturonske kiseline povezanih  $\alpha$ -1,4-vezama pri čemu galakturonske kiseline mogu biti metil esterificirane na 6. ugljikovom atomu i/ili O-acetilirane na 2. ili 3. ugljikovom atomu (Kashyap i sur., 2001; Voragen i sur., 2009).

## 2.3. Enzimska razgradnja lignoceluloze

Zbog svoje strukture i netopljivosti mikroorganizmi nisu u mogućnosti direktno koristiti lignocelulozne supstrate. Kako bi došlo do razgradnje lignoceluloze, mikroorganizmi koriste ekstracelularne enzime. Za razgradnju lignoceluloze mikroorganizmi luče dva tipa ekstracelularnih enzima: hidrolitičke enzime, koji hidroliziraju celulozu i hemicelulozu u fermentabilne šećere, i oksidativne enzime koji čine oksidativni ekstracelularni lignolitički sistem koji depolimerizira lignin (Pérez i sur., 2002.).

### 2.3.1. Biodegradacija lignina

Lakaze, mangan peroksidaze i lignin peroksidaze su tri obitelji enzima koji sudjeluju u biološkoj degradaciji lignina (Jeffries, 1994). Kod gljiva, razgradnja lignina u fenilpropenske skupine odvija se isključivo u prisutnosti kisika (Maier, 2000).

#### 2.2.1.1. Lakaze

Lakaze (EC 1.10.3.2.) imaju mogućnost katalize oksidacije širokog raspona fenolnih spojeva uz redukciju molekularnog kisika u vodu. Njihova enzimska aktivnost dodatno se može povećati dodatkom niskomolarnog medijatora koji služi kao prenositelj elektrona između enzima i supstrata tako da medijator formira oksidirani međuprodukt koji potom reagira sa supstratom (Suteera, 2008).

Ovi enzimi zastupljeni su među gljivama koje uzrokuju truljenje drva. Također se nalaze u bakterijama, insektima i biljkama. U gljivama lakaze služe za razgradnju lignina, obrani od stresa i detoksifikaciji (Wellington, 2012).

##### 2.2.1.1.1. Mehanizam djelovanja

U degradaciji lignina lakaze imaju dovoljan redoks potencijal da oksidiraju samostalno fenolne fragmente lignina dok za nefenolne fragmente im je potreban medijator kako bi preko njega oksidirali nefenolne komponente lignina. U tom slučaju sam medijator bi trebao imati veći redoks potencijal od lakaze (>900mV). Medijator je mala molekula koja djeluje kao nosač elektrona između enzima i krajnjeg supstrata koja ima veći redoks potencijal i može oksidirati nefenolne supstrate (Desai i Nityanand, 2011).

Aktivno mjesto lakaza sadrži četiri bakrova atoma: T1, na koji se veže reducirajući supstrat, i T2/T3 grupe s tri bakrova atoma koji vežu molekularni kisik. Enzimska kataliza započinje reduciranjem tipa 1 (T1) bakrovog atoma reducirajućim supstratom koji je potom oksidiran. Elektron se potom prenosi iz T1 bakra na T2/T3 grupu na kojoj je vezana molekula kisika. Pošto je potrebno četiri elektrona za potpunu redukciju kisika a oksidacijom supstrata dobije se jedan elektron, pretpostavlja se da lakaza djeluje kao „baterija“ koja pohranjuje elektrone od individualne reakcije sve dok nema dovoljno da potpuno reducira kisik, tj. lakaza oksidira četiri molekule reducirajućeg supstrata po jednoj molekuli kisika (Desai i Nityanand, 2011).

#### 2.2.1.1.2. Moguća upotreba

Lakaze imaju potencijal u primjeni u papirnoj industriji gdje se koriste za razgradnju lignina s ili bez dodatka mangan i lignin peroksidaza. Također se koriste u tekstilnoj industriji za izbjeljivanje tekstila i razgradnji boja u otpadnim vodama tekstilnih industrija. Mogu se koristiti i u prehrambenoj industriji za poboljšavanje kvalitete različitih pića, poput voćnih sokova, vina i piva, tako da uklanjaju nepoželjne fenole. (Wellington, 2012)

#### 2.2.1.2. Lignolitičke peroksidaze

Ostali značajni lignolitički enzimi su mangan peroksidaza (EC 1.11.1.13) i lignin peroksidaza (EC 1.11.1.14). Objema je zajednička prostetička skupina protoporfirin IX (Janusz i sur., 2017). Njihova katalitička aktivnost bazira se na tome da se nativni enzim oksidira sa vodikovim peroksidom pri čemu se tvori željezov(IV) oksidni porfirinski radikalni kationski međuprodukt čime se potom oksidiraju dvije molekule elektron donorskog supstrata koji služi kao niskomolarni medijator između enzima i lignina (Janusz i sur., 2017). Kod lignin peroksidaza niskomolekularni donor elektrona su najčešće nefenolni aromatski supstrati (Falade i sur., 2016) dok kod mangan peroksidaza donor elektrona je Mn(II) kation koji se oksidira u Mn(III) kation koji služi kao niskomolarni medijator koji prodire u gustu strukturu lignina kojeg potom oksidira (Janusz i sur., 2017).

#### 2.3.2. Biodegradacija celuloze

U biološkim sustavima mikroorganizmi produciraju celulolitičke enzime koje imaju sposobnost hidrolize  $\beta$ -1,4-glikozidnih veza u molekuli celuloze. Za potpunu enzimsku razgradnju celuloze potrebno je sinergističko djelovanje tri grupe enzima: endoglukanaza (E.C. 3.2.1.4), egzocelobiohidrolaza (E.C. 3.2.1.74) i  $\beta$ -glukozidaza (E.C. 3.2.1.21). Endoglukanaze nasumično hidroliziraju najpristupačnije dijelove celuloznih lanca, amorfne dijelove, čime se oslobađaju novi nereducirajući krajevi i smanjuje se stupanj polimerizacije celuloznog lanca, čime se ubrza njegova hidroliza. Egzocelobiohidrolaze cijepaju celobiozni dimer sa nereducirajućeg kraja kristalične molekule celuloze, dok  $\beta$ -glukozidaze hidroliziraju nastalu celobiozu u dvije molekule glukoze. Egzocelobiohidrolaza i  $\beta$ -glukozidaza se zajedno grupiraju pod egzoglukanaze (Singh i sur., 2019; Paul i Genescà, 2013; Pérez i sur., 2002).

Indukcija sinteze celulaza nije potpuno poznata. Smatra se da mikroorganizam konstitutivno proizvodi malu količinu enzima koji potom hidroliziraju celulozu u topljive hidrolizate koji ulaze u stanicu mikroorganizma i time u stanici induciraju proizvodnju celulaza (Husaini i sur, 2012).

### 2.3.3. Biodegradacija hemiceluloze

Zbog toga što se hemiceluloza u drvu sastoji od mnoštva različitih razgranatih homo i heteropolisaharida za uspješnu razgradnju hemicelulozne komponente drva potrebno je kroz sinergističko enzimsko djelovanje uspješno hidrolizirati glavni polimerni lanac hemiceluloze i bočne supstituente sa glavnog polimernog lanca. Enzimi koji cijepaju glavni lanac hemiceluloze su:  $\beta$ -D-ksilanaze,  $\beta$ -D-manaze i  $\beta$ -D-galaktanaze, supstratno su specifični i najčešće imaju endohidrolitičku aktivnost čijom aktivnošću smanjuje se stupanj polimerizacije i ubrzava hidroliza hemiceluloze. Za potpunu razgradnju hemiceluloze potrebni su i enzimi egzoglikozidaze, poput  $\beta$ -D-ksilozidaza i  $\alpha$ -L-arabinozidaza, koji cijepaju glikozidne krajeve na kratkolančanim lancima hemiceluloze, oslobađajući monosaharide. Također još cijepaju kratkolančane i monosaharidne bočne lance polimera hemiceluloze kako bi se mogao kompletno hidrolizirati glavni polisaharidni lanac (Dekker, 1985).

Aktivnost pojedinih hemicelulaza određuju se mjerenjem brzine kojim se reducirajući monosaharidi hidroliziraju s kemijski definiranih polimernih supstrata (Jeffries, 1994.)

### 2.3.4. Biodegradacija pektina

Pektin se razgrađuje od strane pektinaza, skupine enzima koji razgrađuju pektinske tvari te se ti enzimi dijele na pektinesteraze, enzime koji cijepaju metil esternu vezu u pektinu, hidrolitičke enzime, koji hidroliziraju  $\alpha$ -1,4-veze u pektinu, i na enzime koji cijepaju  $\alpha$ -1,4-glikozidnu vezu trans-eliminacijom (Kashyap i sur., 2001).



### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Radni mikroorganizam

Radni mikroorganizam za proizvodnju enzima je bila gljiva *Trametes versicolor* DSM6401 izolirana iz ilovače u Novom Brunswick, N.J., SAD.

##### 3.1.2. Sirovine za pripremu hranjivih podloga

Sirovine koje su se koristile za pripremu hranjivih podloga navedene su u tablici 2. Sirovina je predhodno mehanički usitnjena.

Tablica 2. Sirovine za pripremu hranjivih podloga

Sirovina	Podrijetlo
Drvo hrasta	Bjelovar
Drvo lipe	Bjelovar

##### 3.1.3. Kemikalije

Popis kemikalija koje su se koristile za pripremu hranjive podloge nalaze se u tablici 3.

Tablica 3. Kemikalije za pripremu hranjive podloge

Kemikalija	Proizvođač
Glukoza	Gram-mol d.o.o. Zagreb
Pepton	Fisher Bioreagents, USA
Kalijev dihidrogenfosfat	Kemika, Zagreb
Magnezijev sulfat	Kemika, Zagreb
Limunska kiselina	Gram-mol d.o.o. Zagreb
Natrij hidroksid	T.T.T. d.o.o., Sveta nedjelja
<b>Elementi u tragovima:</b>	
Cinkov sulfat monohidrat	Gram-mol d.o.o. Zagreb
Manganov(II) klorid tetrahidrat	Kemika, Zagreb
Borna kiselina	Honeywell Fluka Chemie, Austria
Kobaltov (II) klorid heksahidrat	Sigma-Aldrich, Austria
Bakrov(II) sulfat pentahidrat	Honeywell Fluka Chemie, Austria
Niklov klorid heksahidrat	
Sulfatna kiselina	Riedel, Honeywell Fluka Chemie

Dodatne kemikalije koje su se koristile u svrhu analize enzimskih aktivnosti su navedene u tablici 4.

Tablica 4. Kemikalije za analizu

<b>Kemikalija</b>	<b>Proizvođač</b>
<b>Ksilan</b>	Sigma-Aldrich, Austria
<b>Arabinan</b>	Sigma-Aldrich, Austria
<b>Celuloza</b>	Merck
<b>Karboksimetil celuloza</b>	
<b>Pektin</b>	
<b>ABTS</b>	BioChemica
<b>DCIP</b>	Sigma-Aldrich, Austria
<b>Coomasie brilliant blue G</b>	Sigma-Aldrich, Austria
<b>DNSA</b>	Sigma-Aldrich, Austria
<b>Laktoza</b>	Kemika, Zagreb
<b>Siringol</b>	
<b>Natrijev fluorid</b>	
<b>Etanol (96%)</b>	Gram-mol d.o.o., Zagreb
<b>Manganov (II) sulfat</b>	Kefo d.o.o., Sisak
<b>Vinska kiselina</b>	Kemika, Zagreb
<b>Bovin serum albumin (BSA)</b>	Sigma-Aldrich, Austria
<b>Fosforna kiselina</b>	T.T.T. d.o.o., Sveta nedjelja
<b>Metanol</b>	J.T. Baker
<b>Natrijev sulfat</b>	Riedel, Honeywell Fluka Chemie
<b>Fenol</b>	Sigma-Aldrich, Austria
<b>Kalij natrij tartarat</b>	Kemika, Zagreb
<b>Arabinoza</b>	Acros organics
<b>Vodik peroksid</b>	Pliva, Zagreb
<b>Galakturonska kiselina</b>	Fluka, Slovačka

### 3.1.4. Hranjive podloge za održavanje, čuvanje i uzgoj gljive *Trametes versicolor*

Za čuvanje čiste kulture gljive *T. versicolor* koristile su se za to pripadajuće agar hranjive podloge.

#### 3.1.4.1. Submerzni uzgoj gljive *Trametes versicolor* u tikvicama

Za submerzni uzgoj gljive *T. versicolor* koristio se saržni postupak uzgoja u tikvicama volumena 500mL sa volumenom hranjive podloge od 150mL. Hranjive podloge međusobno su se razlikovale po izvoru ugljika u koncentracijama navedenim u tablici 5. Uzgoj gljive u svakom izvoru ugljika obavljen je u dvije paralele. Svi ostali sastojci hranjivih podloga navedeni su u tablici 6. i tablici 7.

Tablica 5. Koncentracije izvora ugljika u pojedinim ispitivanim podlogama:

Hranjiva podloga	Izvor ugljika		
	lipa (g/L)	hrast (g/L)	glukoza (g/L)
Lipa	10	-	-
Hrast	-	10	-
lipa + glukoza	5	-	5
hrast + glukoza	-	5	5
glukoza	-	-	10

Tablica 6. Ostale koncentracije sastojaka u hranjivim podlogama bez obzira na izvor ugljika

Pepton	5 g/L
Kalijev dihidrogenfosfat	0.5 g/L
Magnezijev sulfat	1.5 g/L
Elementi u tragovima	0.3 mL/L
Pufer	Na-citrat 50mM, pH=5.5

Tablica 7. Koncentracije soli otopine elemenata u tragovima

Cinkov sulfat monohidrat	1 g/L
Magnezijev klorid tetrahidrat	0.3 g/L
Borna kiselina	3 g/L
Kobaltov (II) klorid heksahidrat	2 g/L
Bakrov (II) sulfat heksahidrat	0.1 g/L
Niklov (II) klorid heksahidrat	0.2 g/L
Sumporna kiselina (konc.)	4 mL/L

### 3.1.5. Oprema i aparatura

#### 3.1.5.1. Spektrofotometar

Pri mjerenju enzimskih aktivnosti korištene su kolorimetrijske metode pri kojima je krajnji produkt reakcije bio mjerljiv pri nekoj od valnih duljina na spektrofotometru. Za analizu korišten je Cary 100 UV-Vis spektrofotometar od proizvođača Agilent Technologies sa pripadajućim temperaturnim kontrolerom istog proizvođača.



Slika 4. Cary 100 UV-Vis spektrofotometra

### 3.1.6. Ostala oprema i aparatura

Ostala oprema i aparatura prikazana je u tablici 8.

Tablica 8. Ostala oprema i aparature

Oprema	Priozvođač	Model
Tresilica	B.Braun Biotech international	CERTOMAT RM
Centrifuga	Tehtnica Železniki	HC-240
pH metar	HANNA	HI9125 Ph/ORP meter
Termo mikser	Biosan	TS-100
Autoklav	Sutjeska, Beograd	-
Analitička vaga	Acculabs Sartorius	ALC-210.4

Također, za potrebe istraživanja korišteni su sušionik, vortex mikser, magnetna miješalica te ostali laboratorijski pribor.

## 3.2. Metode rada

### 3.2.1. Priprema inokuluma

Inokulum se uzimao direktno iz agar ploče tako da se bušila površina ploče u male diskove koji su se koristili za inokulaciju.

### 3.2.2. Priprema podloga za submerzni uzgoj i proizvodnju celulolitičkih i hemicelulolitičkih enzima

Priprema hranjive podloge započeta je pripremom 1.5L homogene otopine u demineraliziranoj vodi prema omjerima navedeni u tablici 6. U čašu od 500mL odvagane su se sve soli iz tablice 6. te su otopljene u 400mL demineralizirane vode. Nakon toga dodani su elementi u tragovima. U tablici 7. navedene su koncentracije soli otopine elemenata u tragovima potrebnih za pripremu puferske otopine. pH otopine podesio se titriranjem 1M otopine NaOH uz istovremeno mjerenje pH, pH metrom, nakon čega se otopina prelila u menzuru od 1.5L uz ispiranje čaše kako ne bi došlo do gubitaka. Konačno, menzura se nadopunila do 1.5L demineraliziranom vodom.

Izvor ugljika dodavao se u Erlenmeyerove tikvice za svaku različitu podlogu prema tablici 5., gdje su izvori ugljika prikazani u masenim koncentracijama. Izvor ugljika je direktno vagan u tikvicama za svaku pojedinu podlogu prema korištenom volumenu podloge. U našem slučaju dodani volumen podloge iznosio je 150mL te se potrebna masa izvora ugljika dobila množenjem volumena podloge sa masenom koncentracijom navedenih u tablici 5. Nakon dodatka izvora ugljika i 150mL puferske otopine u Erlenmeyerovu tikvicu, dobivena hranjiva podloga sterilizirana je u autoklavu 30 minuta pri 121°C. Nakon hlađenja, u sterilnu

hranjivu podlogu naci jepljeni su po četiri diska kulture gljive sa agara. Uzgoj se provodio na tresilici pri 28°C i 120 o min<sup>-1</sup>. Za analizu se uzimao 1mL uzoraka svake hranjive podloge i centrifugirao. Nakon centrifuge supernatant se čuvao na 4°C do analize a talog se odbacio. Uzorak se uzimao prije naci jepljivanja hranjive podloge radnim mikroorganizmom te tokom uzgoja u 4., 7., 11., 13., 15. i 18. danu uzgoja. Uzgoj je završen 18. dana uzgoja. Na kraju uzgoja dobivena podloga filtrirala se vakuum filtracijom preko Bürchnerovog lijevka, supernatant se punio u plastične boce od 100mL i čuvao na temperaturi od 0°C a talog se odbacio.

### 3.2.3. Analitičke metode

#### *3.2.3.1. Određivanje lignocelulolitičke aktivnosti enzima*

Određivane su lakazne, mangan peroksidazne i celobioza dehidrogenazne aktivnosti enzima pomoću mjerenja brzine enzimske reakcije. Također su se mjerile i enzimske aktivnosti ksilanaza, arabinaza, endo-glukanaza, egzo-glukanaza i pektinaza koristeći DNSA metodu.

##### *3.2.3.1.1. Određivanje lakaznih, mangan peroksidaznih i celobioza dehidrogenaznih aktivnosti mjerenjem brzine enzimske reakcije*

Ova kolorimetrijska metoda bazira se na promjeni apsorbancije tijekom vremena nakon početka inicijalne reakcije pri čemu dolazi do linearnog rasta apsorbancije o vremenu (u slučaju reakcije sa DCIP dolazi do pada apsorbancije zbog obezbojenja uzrokovanog reakcijom) koja je u proporcionalnom odnosu s enzimskom aktivnosti. Određivanje lakaznih aktivnosti bazira se na reakciji ABTS-a s kisikom pri čemu se ABTS oksidira u ABTS kationski radikal koji ima zeleno obojenje. Određivanje mangan peroksidazne aktivnosti bazira se na enzimskoj reakciji pri kojoj se enzimskom aktivnošću, uz vodikov peroksid kao oksidans, manganov (II) kation oksidira u manganov (III) kation koji potom oksidira siringol pri čemu se tvori smeđe-crveno obojenje oksidiranog siringola. Određivanje celobioze dehidrogenazne aktivnosti koristeći DCIP bazira se na enzimskoj redukciji DCIP (elektron akceptor) pomoću laktoze nakon koje se DCIP obezboji.

### 3.2.3.1.1.1. Priprema reagensa i otopina za mjerenje brzine enzimskih reakcija

Većina reagensa za analizu pripremali su se otapanjem određene mase reagensa u demineraliziranoj vodi prema tablici 9.

Tablica 9. Reagensi za provođenje analiza

Otopina	Masa reagensa	Volumen vode	Uvjeti otapanja	Skladištenje
ABTS	10.3mg	2mL	Miješanje	Do 12h pri 4°C
Siringol	154mg	100mL	Miješanje	Do 2 tjedna u mraku
MnSO <sub>4</sub>	84.5mg	100mL	Miješanje	Na 4°C
Laktoza	10.81g	100mL	Miješanje	Do 1 mjesec na 4°C
NaF	84mg	10mL	Miješanje	Do nekoliko godina

Otopina vodikovog peroksida dobila se decimalnim razrjeđivanjem 30%-tne otopine demineraliziranom vodom. Ta je otopina uvijek bila svježije pripremljena prije analize. DCIP reagens dobio se otapanjem 87.03mg DCIP u 10mL 96% etanola uz polusatno miješanje pri 50°C. Nakon potpunog otapanja otopina se premijestila u odmjernu tikvicu od 100mL i nadopunila do oznake. Otopina DCIP se čuvala u mraku pri 4°C do nekoliko tjedana. Natrij acetatni pufer pripremao se razrjeđivanjem 2.86ml octene kiseline (99%) u 400mL demineralizirane vode, zatim se dobivena otopina podesila na pH 4.00 titriranjem sa 1M NaOH i nadopunila demineraliziranom vodom do 500mL-ske oznake. Na-tartaratni pufer dobio se otapanjem 3.75g vinske kiseline u 400mL demineraliziranoj te se dobivena otopina podesila na pH od 4.50 titriranjem 1M otopine NaOH. Uzorak se pripremao centrifugiranjem pri čemu se supernatant čuvao u Eppendorf epurvetama od 1.5mL dok se talog odbacio.

### 3.2.3.1.1.2. Postupak provođenja analize metodom mjerenja brzine enzimske reakcije

U kivete za spektrofotometriju pipetiralo se prema tablici 10.

Tablica 10. Protokol pipetiranja u kivete za pojedinu metodu mjerenja enzimske aktivnosti:

<b>Lakaze pomoću ABTS-a</b>	<b>Mangan peroksidaze pomoću siringola</b>	<b>Celobioza dehidrogenaze pomoću DCIP</b>
100 µL otopine ABTS	100 µL otopine siringola	100 µL otopine DCIP
880 µL Na-acetata	100 µL otopine MnSO <sub>4</sub>	100 µL otopine laktoze
	10 µL otopine H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	20 µL otopine NaF
	20 µL NaF	760 µL Na- acetata
	750 µL Na- tartarata	

Nakon pipetiranja u kivete dobivene otopine termostahirane su 20 minuta pri 30°C. Dobivne kivete s otopinom postavljene su u spektrofotometar nakon čega je otpipetirano 20 µL uzorka u njih započevši time reakciju i što prije se krenulo s mjerenjem. Mjerila se promjena apsorbancije uzoraka o vremenu 5 minuta pri određenoj valnoj duljini. Za lakaze se mjerila apsorbancija pri 420 nm, za mangan peroksidaze pri 469nm te za celobiozu dehidrogenazu pri 520nm. Ako reakcija teče presporo može se dodati više od 20 µL uzorka a da se pri tome smanji količina dodanog pufera tako da konačni volumen reakcijske smjese bude 1 mL. U slučaju prebrze reakcije, uzorak se može razrijediti demineraliziranom vodom po potrebi i pri računanju pomnožiti sa faktorom razrijeđenja.

### 3.2.3.1.1.3. *Izračun enzimskih aktivnosti lakaza, mangan peroksidaza i celobioza dehidrogenaza*

Enzimska aktivnost pojedinog enzima računa se prema ovoj jednadžbi:

$$EA = \Delta E * EF \text{ [U/mL]} \quad [1]$$

Gdje je  $\Delta E$ -promjena iz apsorbancije u vremenu nakon započete reakcije dodavanjem otopine enzima ( $\Delta E = \Delta \text{Abs} / \Delta t$ ), a EF-enzimski faktor koji se računa prema sljedećoj jednadžbi:

$$EF = \frac{V_t}{\epsilon * d * V_s} \quad [2]$$

Gdje je  $V_t$  ukupni volumen reakcijske smjese u kiveti (1mL),  $\epsilon$  – molarni apsorpcijski koeficijent obojenog reagensa pri određenoj valnoj duljini [ $M^{-1}cm^{-1}$ ], d-duljina puta kojom svjetlost prolazi kroz kivetu (1cm) i  $V_s$  – početni volumen enzima (0,02mL)

Molarni apsorpcijski koeficijent za ABTS pri 420nm je  $36 \text{ mM}^{-1}cm^{-1}$ , za siringol pri 469nm je  $27,5 \text{ mM}^{-1}cm^{-1}$ , a za DCIP pri 520nm je  $6,9 \text{ mM}^{-1}cm^{-1}$ . Za 20 µL uzorka dobiveni enzimski faktori pri zadanim valnim duljinama su za ABTS 1,3889, za siringol 1,8181, a za DCIP 7,25.

### 3.2.3.1.2. *Određivanje celulolitičkih i hemicelulolitičkih aktivnosti korištenjem metode 3,5-dinitrosalicilne kiseline (DNSA metoda)*

Ova kolorimetrijska metoda bazira se na reakciji reducirajućih šećera s 3,5-dinitrosalicilnom kiselinom (DNS) koja se reducira u 3-amino-5-nitrosalicilnu kiselinu te kao rezultat dolazi do promjene obojenja iz svjetlo-žutog u crveno-smeđe obojenje koje ima maksimum apsorpcijskog spektra pri 575nm. Sama enzimska reakcija je bazirana na brzini hidrolize monosaharida sa celuloznog i hemiceluloznog supstrata čemu nastaju određeni reducirajući šećeri. Skupine enzima koje su se mjerile ovom metodom, zajedno sa pojedinim

hemiceluloznim i celuloznim supstratom te time pripadajućim oslobođenim šećerom kao produkt enzimske reakcije navedene su u tablici 11.

Tablica 11. Supstrati i produkti reakcije različitih enzimskih aktivnosti u uzorku

<b>Ime skupine enzimske aktivnosti</b>	<b>Supstrat</b>	<b>Odgovarajući monosaharid</b>
Ksilanazna	Ksilan	D-ksiloza
Arabinazna	Arabinan	L-arabinoza
Endo-glukanazna	Celuloza	D-glukoza
Egzo-glukanazna	Karboksimetil celuloza	D-glukoza
Pektinazna	Pektin	Galakturonska kiselina

#### 3.2.3.1.2.1. Priprema reagensa i otopina za DNSA metodu

DNS reagens pripremljen je tako da se miješanjem otopilo 10 g DNS, 10 g natrijevog hidroksida, 0.5 g natrijevog sulfita i 2 mL fenola u 998mL demineralizirane vode. Nakon otapanja otopina se čuvala u boci zaštićenoj od svjetlosti. Otopina Rochell-ove soli pripremljena je otapanjem 40 g kalij-natrij tartarata u 100mL demineralizirane vode na magnetnoj miješalici. Za baždarni pravac pripremljene su otopine odgovarajućeg monosaharida navedenih u tablici 11. u koncentracijama od 1, 0,9, 0,8, 0,6, 0,4, 0,3, 0,2 i 0,1 mg/mL.

#### 3.2.3.1.2.2. Postupak provođenja analize DNSA metode

Ova analiza bila je provedena samo sa uzorcima pri završetku uzgoja. U Eppendorf epurveti odvagano je 5-10 mg supstrata navedenih pod tablicom 11. Nakon toga dodano je 1.000 mL otopine uzorka određenog razrjeđenja (razrijeđenog demineraliziranom vodom), i dobro promiješalo. Uzorak se inkubira 30 minuta na termo mikseru pri 1000 o min<sup>-1</sup> i pri 40°C. Nakon inkubacije uzoak se centrifugirao 10 minuta pri 5000 rpm. Centrifugom se izdvojio neizreagirani supstrat. Nakon toga u novu Eppendorf epurvetu preneseno je 600 µL supernatanta uzorka te se pomiješa sa 600 µL otopine DNS. Dobivena mješavina inkubirala se 15 minuta pri 95°C. Potom je mješavinu dodano 200 µL Rochell-ove soli kako bi se stabilizirala boja. Dobivena otopina hladila se na ledu 5 minuta nakon koje je izmjerena apsorbancija pri 575 nm. Slijepa proba supstrata provodila se kao analiza uzorka samo što se supstrat umjesto u otopini uzorka, otopio u demineraliziranoj vodi. Slijepa proba DNS pripremala se miješanjem 600 µL demineralizirane vode sa 600 µL otopine DNS koja je potom inkubirana 15 minuta na 95°C te se dalje postupak provodio kao i za uzorak. Postupak kojim su se analizirale otopine šećera koje su se koristile za pripravu baždarnog



pravca provodile su se kao i slijepa proba DNS-a, samo umjesto demineralizirane vode, koristila se otopina šećera zadane koncentracije.

#### 3.2.3.1.2.3. *Izračun celulolitičke i hemicelulolitičke aktivnosti* kod DNSA metode

Od izmjerenih apsorbanci koncentracija određenog šećera napravi se baždarni pravac, ovisnost apsorbancije pri 575 nm o koncentraciji šećera [mg/mL], iz kojeg se odredi jednadžba linearnog pravca metodom najmanjih kvadrata. Apsorbancija uzorka oduzme se od slijepe probe supstrata i izračuna se koncentracija šećera iz jednadžbe baždarnog pravca. Baždarni pravci korišteni za izračunavanje koncentracije oslobođenog šećera navedeni su u prilogu 7.2. Enzimska aktivnost (EA) mjeri se prema:

$$EA = \frac{c}{t} * R \quad [U mL^{-1}] \quad [3]$$

Gdje je c - molarna koncentracija oslobođenog šećera [ $\mu$ mol/mL], t - vrijeme inkubacije [30min] i R- razrijeđenje

Kako bi se preračunala masena koncentracija oslobođenog šećera u molarnu koncentraciju potrebno je znati da 1 mg glukoze je jednak 5,5506  $\mu$ mol, 1mg ksiloze ili arabinoze je jednako 6,6609  $\mu$ mol i 1mg galakturonske kiseline je jednak 5,1509  $\mu$ mol.

#### 3.2.3.2. *Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu*

Metoda se bazira na reakciji boje Coomasie Brilliant Blue G-250 (CBB) sa proteinima pri čemu apsorpcijski maksimum boje prelazi iz 465nm u 595nm. Povećanje apsorbancije pri 595nm je u linearnom odnosu sa koncentracijom proteina.

##### 3.2.3.2.1. *Postupak provođenja analize metodom po Bradfordu*

Analiza se može provoditi sa već komercijalno dostupnim preparatom boje CBB (Bradfordov reagens) ili se može dobiti otapanjem 100mg CBB u 50mL 96% etanola te dodavanjem 100mL 85% (w/v) fosforne kiseline. Nakon otapanja dobivena otopina razrijedi se demineraliziranom vodom do volumena od 1L.

Mjerenje se provodilo miješanjem 750  $\mu$ L bradfordovog reagensa sa 15  $\mu$ L dobivenog uzorka. Tako pripremljen uzorak inkubirao se 15 minuta na sobnoj temperaturi te nakon inkubacije mjerila se apsorbancija uzorka na 595nm. Kako bi se izračunala koncentracija dobivenog proteina, napravljen je baždarni dijagram poznate koncentracije otopine bovin serum albumina (BSA) u seriji razrjeđenja od 0,1 mg/mL do 1,2 mg/mL sa odmacima od 0,1mg/mL. Iz dobivene jednadžbe pravca izračunata je koncentracija proteina. Korišteni baždarni dijagram za mjerenja naveden je u prilogu 7.1.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

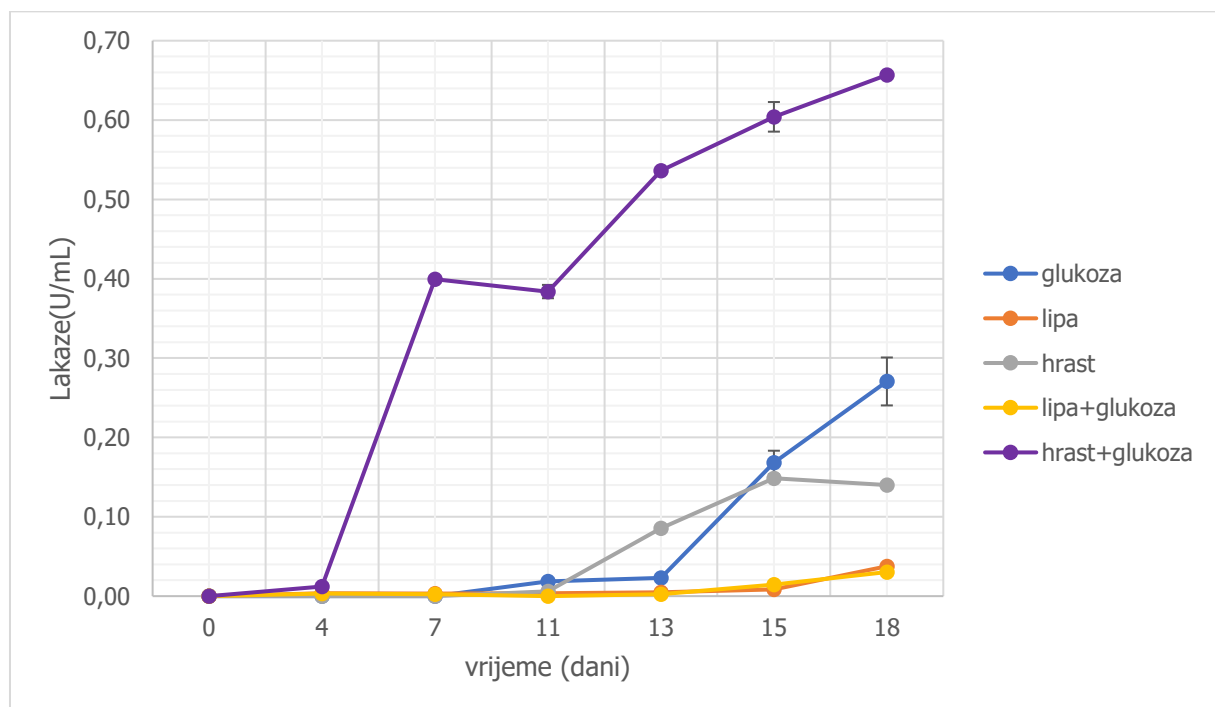
### 4.1. Rast biomase na različitom izvoru ugljika

U prilogu 7.3. su postavljene slike saržno uzgojene biomase *T. versicolor* u tikvicama nakon 18. dana uzgoja. Kod uzgoja biomase s glukozom rast je bio isključivo globularan. Kod uzgoja biomase s ostalim kombinacijama izvora ugljika rast je bio podijeljen na rast u globulama i rast na stijenkama gdje je biomasa djelomično bila izložena hranjivoj podlozi. Ta činjenica može ukazati na to da je rast na stijenkama bio preferiran, vjerojatno zato jer je gljiva bila u boljem kontaktu s kisikom što bi pomoglo u razgradnji lignoceluloze.

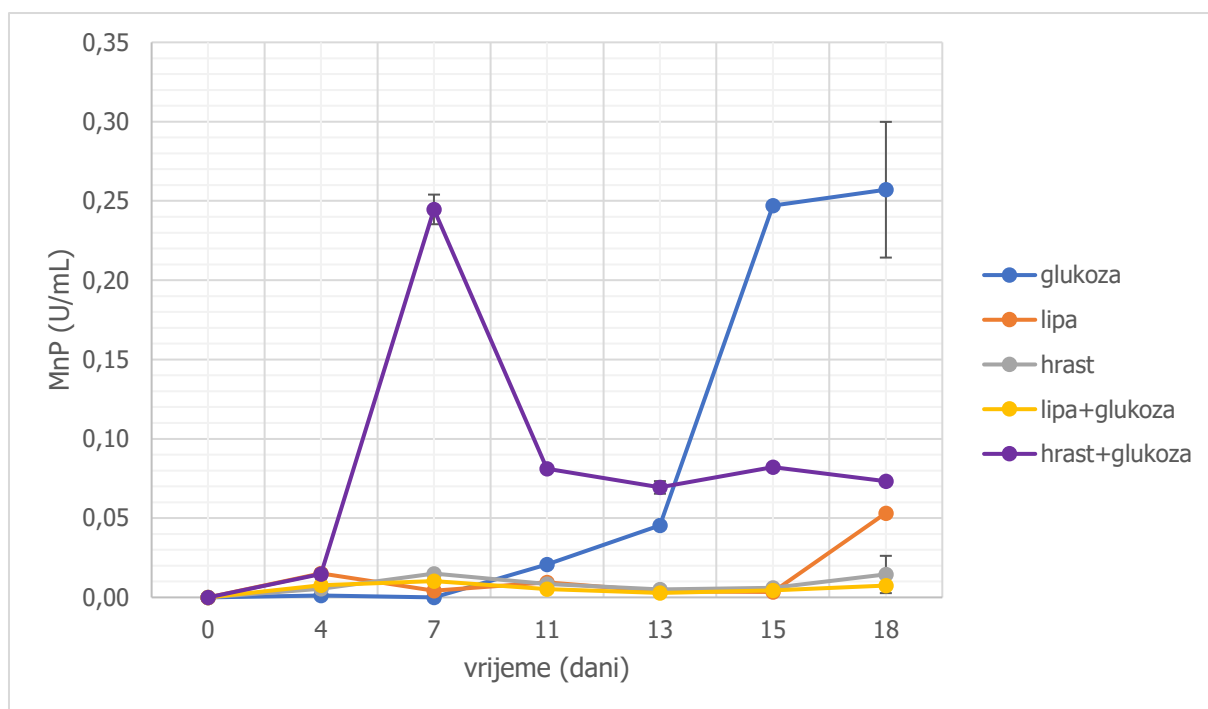
### 4.2. Praćenje enzimske aktivnosti lakaze, mangan peroksidaze i celobioza dehidrogenaze tijekom uzgoja

Tijekom saržnog postupka biosinteze enzima praćene su enzimske aktivnosti lakaze, mangan peroksidaze (MnP) i celobioze dehidrogenaze (CDH) kroz 4., 7., 11., 13., 15. i 18. dan. U svim uzorcima nije bila mjerljiva aktivnost celobioze dehidrogenaze redukcijom DCIP-a.

Promjena enzimskih aktivnosti lakaza i mangan peroksidaza tijekom uzgoja na različitim podlogama obogaćenim mekim (lipa) i tvrdim (hrast) drvom prikazane su u slici 4. i slici 5.



Slika 5. Enzimska aktivnost lakaza tijekom uzgoja na različitim podlogama obogaćenim mekim (lipa) i tvrdim (hrast) drvom



Slika 6. Enzimsko aktivnost mangan peroksidaza (MnP) tijekom uzgoja na različitim podlogama obogaćenim mekim (lipa) i tvrdim (hrast) drvom

Primjećen je indukcijski učinak sinteze lakaza i mangan peroksidaza između 4. i 7. dana pri uzgoju gljive *T. versicolor* u hranjivoj podlozi s kombiniranim lako asimilirajućim izvorom ugljika (glukozom) i teško asimilirajućim izvorom ugljika (hrastom). Vjerojatno dolazi do prijelaza iz primarnog metabolizma u sekundarni nakon potrošnje glukoze u podlozi što je također primijećeno u istraživanju od Lorenzo i sur. 2002, gdje je došlo do značajnog rasta proizvodnje lakaze i mangan peroksidaze, u podlogama obogaćenim ječmenim mekinjama, stabljikama ili košticama grožđa, kada je potrošnja glukoze značajno pala. U istraživanju, Lorenzo i sur. 2002, nakon početnog rasta aktivnosti MnP, aktivnost enzima naglo pada nakon 12. dana u kontrolnoj podlozi (dodatak glukoze) i u podlozi sa dodatkom ječmenih mekinja. Tijekom našeg uzgoja dolazi do naglog rasta i pada aktivnosti između 4. i 11. dana u podlozi sa hrastom i glukozom kao izvorom ugljika.

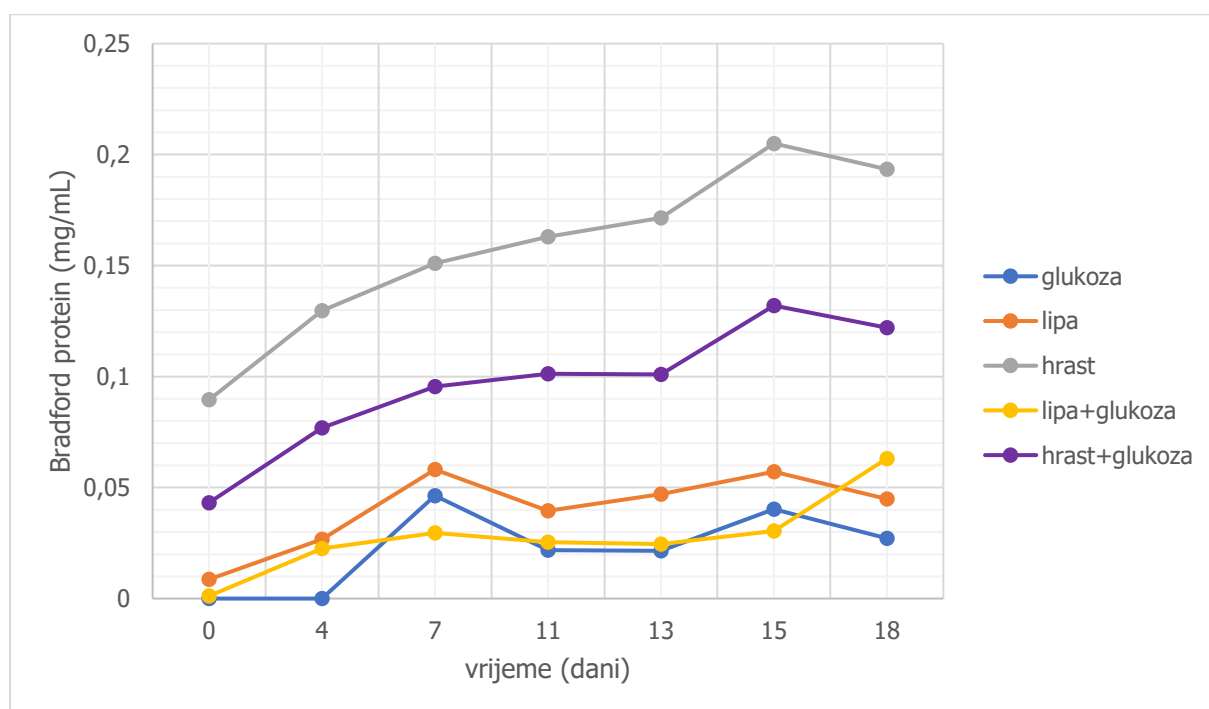
U glukoznoj podlozi nakon 13. dana uzgoja dolazi do značajnog povećanja enzimsko aktivnosti lakaza i peroksidaza, moguće je da dolazi do indukcije sinteze lakaza i mangan peroksidaza pošto je vjerojatno mikroorganizam utrošio svu slobodnu glukozu za svoj rast i prješao u sekundarni metabolizam. Pošto je rast bio globularan, također je moguće da je došlo do nedovoljne difuzije glukoze unutar globule, inducirajući sekundarni metabolizam.

Poznato da kod gljiva bijelih truleži dolazi do indukcije sinteze lakaza uoči nedostatka glukoze u sirovini te je također potvrđeno za *Trametes versicolor* (Haili i sur., 2009).

U podlozi sa lipom kao jedini izvor ugljika nije došlo do značajne proizvodnje lakaza i mangan peroksidaza sve do kraja uzgoja što ukazuje da nije bilo značajne degradacije lignina ali pošto je došlo do rasta biomase (prilog 7.3., C-D) znači da je došlo do hidrolize polisaharida iz lipine biomase bez značajne degradacije lignina.

U podlozi samo sa hrastom kao izvorom ugljika došlo je do relativno male indukcije proizvodnje lakaze, vjerojatno zato zbog nedovoljnog rasta biomase na hranjivoj podlozi zbog teškoće asimiliranja izvora ugljika iz podloge.

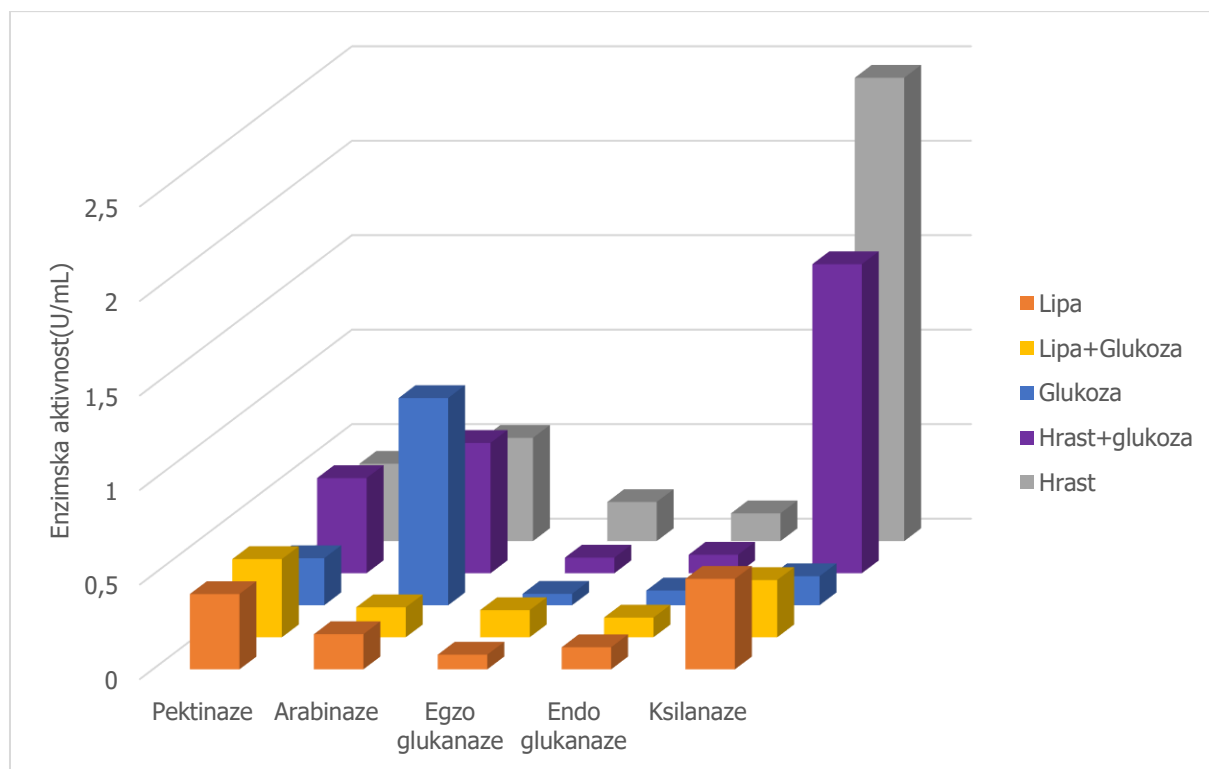
### 4.3. Praćenje koncentracije proteina tijekom uzgoja biomase



Slika 7. Koncentracija proteina tokom uzgoja na različitim podlogama obogaćenim mekim (lipa) i tvrdim (hrast) drvom

Iz grafa se jasno vidi da početna koncentracija proteina uzgojena na hranjivim podlogama, pri kojima su izvori ugljika hrast, puno veća nego u ostalim sirovinama. Time koncentracija ukupnih proteina je nepogodna za preračunavanje u specifičnu aktivnost enzima bez da se izgubi kontekst. Ta nam metoda ne daje na pregled koji protein proizlazi iz izvora ugljika (hrasta), koje sam radni mikroorganizam luči ekstracelularno i one koje mikroorganizam asimilira iz podloge. Također tokom mikrobne razgradnje postoji mogućnost oslobađanja proteina iz lignocelulozne strukture piljevine hrasta i lipe koji nisu prethodno mogli slobodno difundirati u tekući medij.

#### 4.4. Celulolitička i hemicelulolitička aktivnost nakon uzgoja



Slika 8. Celulolitička i hemicelulolitička aktivnost nakon uzgoja na različitim podlogama obogaćenim mekim (lipa) i tvrdim (hrast) drvo

Iz grafa možemo zaključiti da je hrast dobar induktor hemicelulolitičkih i celulolitičkih enzima pošto je u podlogama sa hrastom uočena najviša aktivnost ekstracelularnih enzima. Najviše je inducirana aktivnost ksilanaza što ne bi trebalo biti iznenađujuće, pošto je najzastupljeniji polimer u hemicelulozi hrasta ksilan. Također je uočeno značajno povećanje aktivnosti pektinaza, endo i egzo glukanaza. Uzgoj *T. versicolor* na hrastu proizvodi enzime potrebne za degradaciju gotovo svih polisaharidnih komponenti drva hrasta. Kod uzgoja isključivo na hrastu dolazi i do znatnog povećanja aktivnosti egzo i endo glukanaza, iako je još i dalje vrlo niska aktivnost tih enzima.

Kod mjerenja aktivnosti arabinaze uočeno je da ne dolazi do povećane aktivnosti arabinaze s obzirom na kontrolnu hranjivu podlogu (glukoza) što ukazuje na to da arabinazna aktivnost nije inducirana isključivo sa sastojcima drva hrasta ili lipe, nego je također inducirana nekim drugim faktorima.

Uzgoj na lipi, sa i bez dodatka glukoze u podlogu, slabo inducira sintezu hemicelulolitičkih enzima s obzirom na indukciju koja se dobije induciranjem

hemicelulolitičkih enzima s uzgojem na hrastu. Vjerojatno zato što gljive bijelog truljenja preferiraju rast na tvrdim drvima.

Prema prikazanim rezultatima podloga sa kombiniranim izvorom ugljika hrastovih strugotina sa glukozom bila je podloga sa najvećim prinosom lignolitičkih enzima, zadovoljavajućim prinosom hemicelulolitičkih enzima i znatno manjom proizvodnjom celulolitičkih enzima na kraju uzgoja. U 18. danu uzgoja lakazna aktivnost bila je 0,657 U/mL, mangan peroksidazna aktivnost 0,073 U/mL, ksilanazna aktivnost 1,635 U/mL, arabinazna aktivnost 0,689 U/mL, pektinazna aktivnost 1,635 U/mL, egzo glukanazna aktivnost 0,082 U/mL i endo glukanazna aktivnost 0,098 U/mL.

Hranjiva podloga s dodatkom hrastovih strugotina (bez glukoze) inducirala je najveću proizvodnju hemicelulolitičkih i celulolitičkih enzima sa puno manjom indukcijom lignolitičkih enzima u usporedbi sa podlogom sa kombiniranim izvorom ugljika hrasta i glukoze. U 18. danu uzgoja lakazna aktivnost iznosila je 0,140 U/mL, mangan peroksidazna aktivnost iznosila je 0,075 U/mL, ksilanazna aktivnost iznosila je 2,452 U/mL, arabinazna aktivnost iznosila je 0,546 U/mL i pektinazna aktivnost iznosila je 0,409 U/mL. Celulolitička aktivnost je i dalje značajno manja od hemicelulolitičkih aktivnosti, ali je puno veća nego kod podloge sa hrastom i glukozom. U 18. danu uzgoja dobivena egzoglukanazana aktivnost iznosila je 0,207 U/mL i endoglukanaza aktivnost iznosila je 0,147 U/mL.

Dobivena maksimalna ksilanazna aktivnost kod našeg mjerenja je za duplo manja nego kod istraživanja Irbe i sur. 2014, gdje su korištene pšenične mekinje kao izvor ugljika te je time, u submerznom uzgoju, dobivena ksilanazna aktivnost iznosila 5,2 U/mL u 21. danu uzgoja. Veća dobivena ksilanazna aktivnost kod Irbe i sur. 2014. može biti zbog vrste i koncentracije korištenog izvora ugljika (40g/L), duljem trajanju uzgoja, samom soju *T. versicolor* (koristio se soj CTB 863A), dodatku ekstrakta kvasca koji služe kao izvor faktora rasta ili u inokulumu koji se dodao u podlogu u obliku homogenizirane suspenzije (Irbe i sur. 2014.), a ne u obliku agar diskova kao u našem istraživanju.

Hrast se pokazao kao dobar induktor sinteze hemicelulolitičkih i lignolitičkih enzima, stoga bi podloga sa dodatkom hrsta bila pogodna za proizvodnju enzimskih otopina sirovih ekstrakta i primjeni u uklanjanju lignina i hemiceluloze kako bi se obavio predtretman lignoceluloze. Korištena istraživana gljiva koristi hrast kao izvor ugljika bez potrebe za glukozom za primarni rast. Pošto je proizvodnja mnogih enzima direktno povezana sa rastom biomase, dodatak glukoze u podlogu, kao izvor lako asimilirajućeg ugljika, ubrzao bi sintezu biomase a i time proizvodnju enzima.

Proizvodnja ekstracelularnih enzima mogla bi se dalje optimirati sa povećanjem udjela hrasta u odnosu na glukozu, umjesto da se koriste u ekvivalentnom masenom odnosu kao za ovo istraživanje. Moguće je da bi došlo do manje potrebe za glukozom, skupim supstratom, što bi bilo dobro za ekonomičnost sinteze enzima. Također, bilo bi korisno ponoviti istraživanje sa duljim trajanjem uzgoja i praćenjem aktivnosti celulaza i hemicelulaza kroz cijeli proces uzgoja zbog mogućnosti veće sinteze ksilanaza kao i ostalih enzima u kombiniranoj hranjivoj podlozi sa glukozom i hrastom kao izvorom ugljika.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Hrast se u istraživanju pokazao kao dobar induktor proizvodnje lignolitičkih i hemicelulolitičkih enzima dok nije bilo značajne indukcije sinteze celulolitičkih enzima. Tako dobiveni enzimi mogli bi se koristiti za predtretman lignoceluloznih sirovina pri čemu bi se uklonili lignin i hemiceluloza, ostavljajući time nerazgrađenu celulozu.
2. U tekućoj hranjivoj podlozi sa kombiniranim izvorom ugljika, hrastom i glukozom, tijekom saržnog uzgoja proizveden je najoptimalniji omjer lignolitičkih i hemicelulolitičkih enzima. U 18. danu uzgoja najznačajnije dobivene enzimске aktivnosti su lakazna aktivnost koja iznosila je 0,658 U/mL, mangan peroksidazna aktivnost iznosila je 0,073U/mL, ksilanazna aktivnost iznosila je 1,635 U/mL, pektinazna aktivnosti iznosila je 0,503 U/mL i arabinazna aktivnost iznosila je 0,689 U/mL.
3. U tekućoj hranjivoj podlozi sa hrastom kao jedini izvor ugljika izmjerena je najviša aktivnost hemicelulolitičkih i celulolitičkih enzima tijekom 18. dana uzgoja. Ksilanazna aktivnost iznosila je 2,452 U/mL, pektinazna aktivnost iznosila je 0,409 U/mL, egzo glukanazna aktivnost iznosila je 0,207 U/mL i endo glukanazna aktivnost iznosila je 0,147 U/mL.
4. Povećavanjem koncentracije hrasta u odnosu na glukozu kod uzgoja u podlozi sa kombiniranim izvorom ugljika, mogao bi se dalje optimirati proces kako bi se poboljšala sinteza ksilana i koristilo manje glukoze za uzgoj, što bi pridonijelo ekonomičnosti procesa.



## 6. LITERATURA

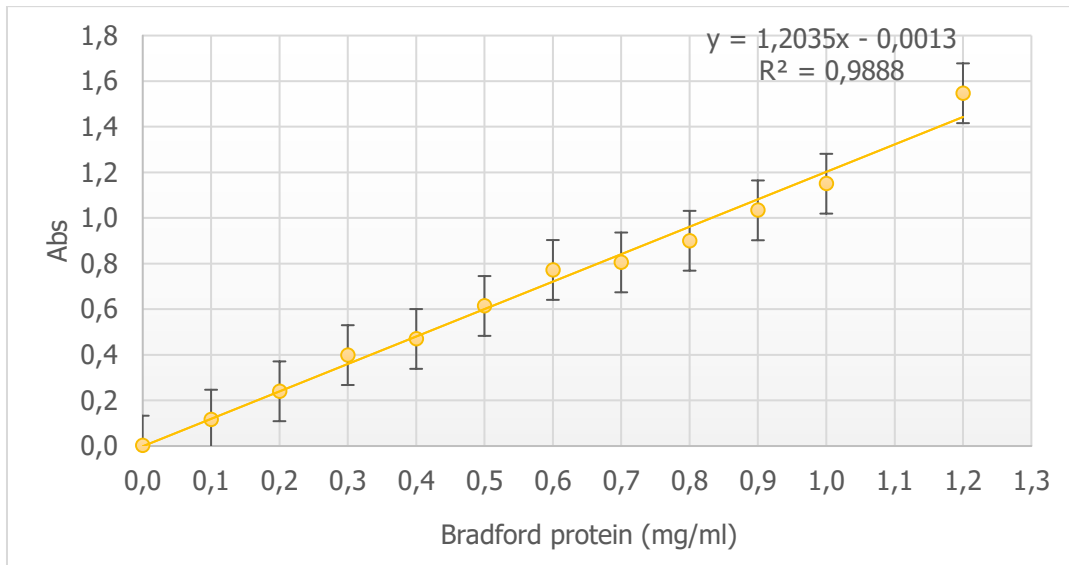
1. Alexopoulos, C., Mims, C. and Blackwell, M. (1996). *Introductory mycology*. 4th ed. New York: Wiley, pp.569-574.
2. Brijwani, K., Rigdon, A. and Vadlani, P. (2010). *Fungal Laccases: Production, Function, and Applications in Food Processing*. *Enzyme Research*, 2010, pp.1-10.
3. Couturier, M., Navarro, D., Chevret, D., Henrissat, B., Piumi, F., Ruiz-Dueñas, F., Martinez, A., Grigoriev, I., Riley, R., Lipzen, A., Berrin, J., Master, E. and Rosso, M. (2015). Enhanced degradation of softwood versus hardwood by the white-rot fungus *Pycnoporus coccineus*. *Biotechnology for Biofuels*, 8(1). doi: 10.1186/s13068-015-0407-8
4. Dekker, R. F. H. (1985). *Biodegradation of the Hemicelluloses U: Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components*, Edition: 1, Chapter: 18, Academic Press, T. Higuchi, pp.505-533
5. Desai, S. and Nityanand, C. (2011). *Microbial Laccases and their Applications: A Review*. *Asian Journal of Biotechnology*, 3(2), pp.98-124.
6. Dionisi, D., Anderson, J., Aulenta, F., McCue, A. and Paton, G. (2014). The potential of microbial processes for lignocellulosic biomass conversion to ethanol: a review. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 90(3), pp.366-383.
7. Duraković, S. and Duraković, L. (2003). *Mikologija u biotehnologiji*. Zagreb: Kugler, pp.5-8, 34.
8. Falade, A., Nwodo, U., Iweriebor, B., Green, E., Mabinya, L. and Okoh, A. (2016). Lignin peroxidase functionalities and prospective applications. *MicrobiologyOpen*, 6(1), p.e00394.
9. Glazer, A. W., and Nikaido, H. (1995). *Microbial Biotechnology: fundamentals of applied microbiology*. San Francisco: W. H. Freeman, p. 340.
10. Hailei, W., Guangli, Y., Ping, L., Yanchang, G., Jun, L., Guosheng, L., & Jianming, Y. (2009). Overproduction of *Trametes versicolor* laccase by making glucose starvation using yeast. *Enzyme And Microbial Technology*, 45(2), 146-149. doi: 10.1016/j.enzmictec.2009.04.003
11. Hildén, L., Johansson, G., Pettersson, G., Li, J., Ljungquist, P. and Henriksson, G. (2000). Do the extracellular enzymes cellobiose dehydrogenase and manganese peroxidase form a pathway in lignin biodegradation?. *FEBS Letters*, 477(1-2), pp.79-83.
12. Howard, R., Abotsi, E., Jansen, v. and Howard, S. (2003). Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology*, 2(12), pp.602-619.
13. Husaini, A., Fisol, F.A., Yun, L.C., Hussain, M.H., & Roslan, H.A. (2011). Lignocellulolytic enzymes produced by tropical white rot fungi during biopulping of *Acacia mangium* wood chips. *Journal of Biochemical Technology*. 3. 245-250.
14. Iqbal, H., Kyazze, G. and Keshavarz, T. (2013). Advances in the Valorization of Lignocellulosic Materials by Biotechnology: An Overview. *BioResources*, 3157-3176
15. Irbe, I., Elisashvili, V., Asatiani, M., Janberga, A., Anderson, I., & Andersons, B. et al. (2014). Lignocellulolytic activity of *Coniophora puteana* and *Trametes versicolor* in fermentation of wheat bran and decay of hydrothermally modified hardwoods. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 86, 71-78
16. Isikgor, F. i Becer, C. (2015). Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polymer Chemistry*, 6(25), pp.4497-4559.

17. Janusz, G., Pawlik, A., Sulej, J., Świdarska-Burek, U., Jarosz-Wilkolażka, A. and Paszczyński, A. (2017). Lignin degradation: microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(6), pp.941-962.
18. Jeffries T.W., (1994) Biodegradation of lignin and hemicelluloses. U: *Biochemistry of microbial degradation* Collin R., Kluwer academic publishers, Str. 233-277
19. Jönsson, L., Alriksson, B. i Nilvebrant, N. (2013). Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), p.16.
20. Kashyap, D., Vohra, P., Chopra, S. and Tewari, R. (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology*, 77(3), pp.215-227.
21. Kim, Y. and Singh, A. (2000). Micromorphological characteristics of Wood Biodegradation in Wet Enviroments: A Review. *IAWA Journal*, 21(2), pp.135-155.
22. Kracher, D., Oros, D., Yao, W., Preims, M., Rezac, I., & Haltrich, D. et al. (2014). Fungal secretomes enhance sugar beet pulp hydrolysis. *Biotechnology Journal*, 9(4), 483-492. doi: 10.1002/biot.201300214
23. Kumar, A., Gautam, A. i Dutt, D. (2016). Biotechnological Transformation of Lignocellulosic Biomass in to Industrial Products: An Overview. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 07(03), pp.149-168.
24. Lorenzo, M., Moldes, D., Rodríguez Couto, S., & Sanromán, A. (2002). Improving laccase production by employing different lignocellulosic wastes in submerged cultures of *Trametes versicolor*. *Bioresource Technology*, 82(2), 109-113. doi: 10.1016/s0960-8524(01)00176-6
25. Maier R.M., (2000)Biogeochemical cycling. U: *Enviromental Microbiology*, Maier R.M., Pepper I.L., Gerba C.P., str 319-346
26. Maier R.M., Pepper I.L. (2000)Terrestrial enviroments. U: *Enviromental Microbiology*, Maier R.M., Pepper I.L., Gerba C.P., str 80-81
27. Mäkelä, M., Marinović, M., Nousiainen, P., Liwanag, A., Benoit, I., Sipilä, J., Hatakka, A., de Vries, R. and Hildén, K. (2015). Aromatic Metabolism of Filamentous Fungi in Relation to the Presence of Aromatic Compounds in Plant Biomass. U: *Advances in Applied Microbiology*, Sariaslani S. i Gadd G. M., Volume 91, pp.63-137.
28. Mansfield, S. D., De Jong, E., & Saddler, J. N. (1997). Cellobiose dehydrogenase, an active agent in cellulose depolymerization. *Applied and environmental microbiology*, 63(10), 3804–3809.
29. Martínez Á.T., Speranza M., Ruiz-Dueñas F.J., Ferreira P., Camarero S., Guillén F., Martínez M.J., Gutiérrez A., Río J.C. (2005) Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International microbiology* (2005) 8:195-204
30. Paice, M. G., Reid, I. D., Bourbonnais, R., Archibald, F. S., & Jurasek, L. (1993). Manganese Peroxidase, Produced by *Trametes versicolor* during Pulp Bleaching, Demethylates and Delignifies Kraft Pulp. *Applied and environmental microbiology*, 59(1), 260–265.
31. Paul, R. and Genescà, E. (2013). The use of enzymatic techniques in the finishing of technical textiles. U: *Advances in the Dyeing and Finishing of Technical Textiles*, 1st izd., Gulrajani M.L., Elsevier inc., pp.177-198.
32. Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., de la Rubia, T. and Martínez, J. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology*, 5(2), pp.53-63.
33. Pinkert, A., Goeke, D., Marsh, K., & Pang, S. (2011). Extracting wood lignin without dissolving or degrading cellulose: investigations on the use of food additive-derived ionic liquids. *Green Chemistry*, 13(11), 3124. doi: 10.1039/c1gc15671c

34. Plácido, J. and Capareda, S. (2015). Ligninolytic enzymes: a biotechnological alternative for bioethanol production. *Bioresources and Bioprocessing*, 2(1).
35. Sánchez, C. (2009). Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, 27(2), pp.185-194.
36. Shahzadi, T. , Mehmood, S. , Irshad, M. , Anwar, Z. , Afroz, A. , Zeeshan, N. , Rashid, U. and Sughra, K. (2014) Advances in lignocellulosic biotechnology: A brief review on lignocellulosic biomass and cellulases. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 5, 246-251. doi: 10.4236/abb.2014.53031.
37. Singh, R., Singh, T. and Pandey, A. (2019). Microbial Enzymes—An Overview. *Advances in Enzyme Technology*, pp.1-40.
38. Smith C.J. (1999) Carbohydrate Biochemistry. U: Plant Biochemistry and Molecular Biology, 2. izd., Lea P.J., Leegood R.C., John Wiley & Sons, str 82-118
39. Stoilova, I., Krastanov, A. and Stanchev, V. (2010). Properties of crude laccase from *Trametes versicolor* produced by solid-substrate fermentation. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 01(03), pp.208-215.
40. Usčuplić, M. (2012). Više gljive-macromycetes. 2nd ed. Sarajevo: Akademija nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine, pp.16-22, 24-25, 236.
41. Viikari, L., Suurnäkki, A., Grönqvist, S., Raaska, L. and Ragauskas, A. (2009). Forest Products: Biotechnology in Pulp and Paper Processing. U: Encyclopedia of Microbiology, Schaechter M., Elsevier inc., pp.80-94.
42. Voragen, A., Coenen, G., Verhoef, R. and Schols, H. (2009). Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Structural Chemistry*, 20(2), pp.263-275.
43. Wellington, K. (2012). Applications of Laccases in Organic Synthesis: a review. U: R. Luque, ed., Green Chemistry. Nova Science Publishers, Inc., pp.167-211.
44. Witayakran, S. (2008). Laccase in organic synthesis and its applications. A dissertation., Georgia Institute of Technology. Str. 64, 93, 124, 241
45. Young, R. (2002). Cross-Linked Cellulose and Cellulose Derivatives U: Absorbent Technology, volume 13, Chatterjee, P.K., Gupta, B.S. pp.233-281.

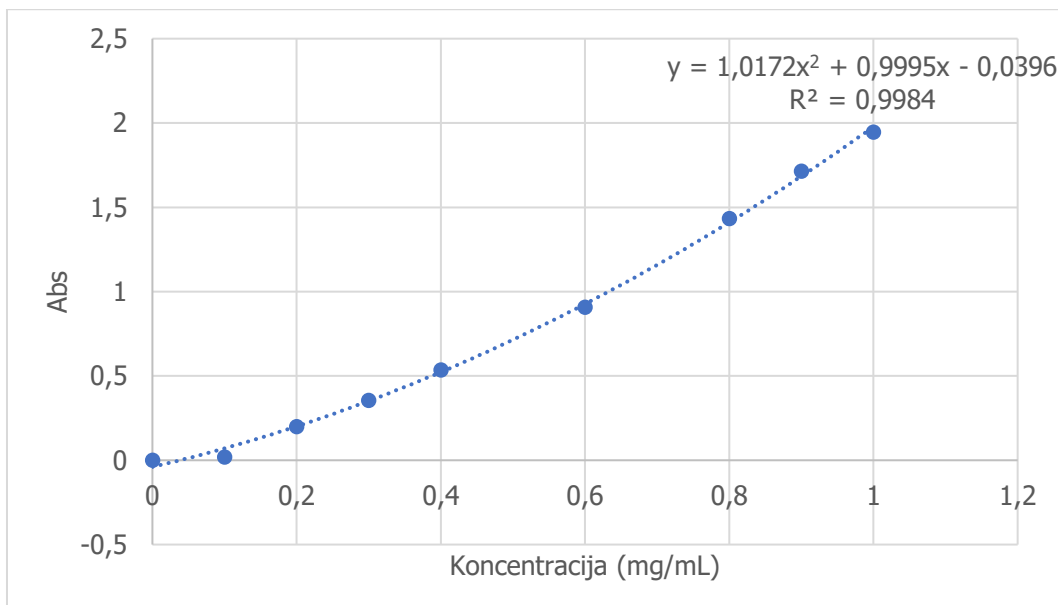
## 7. PRILOZI

### 7.1. Baždarni pravac za Bradfordovu metodu mjerenja koncentracije proteina

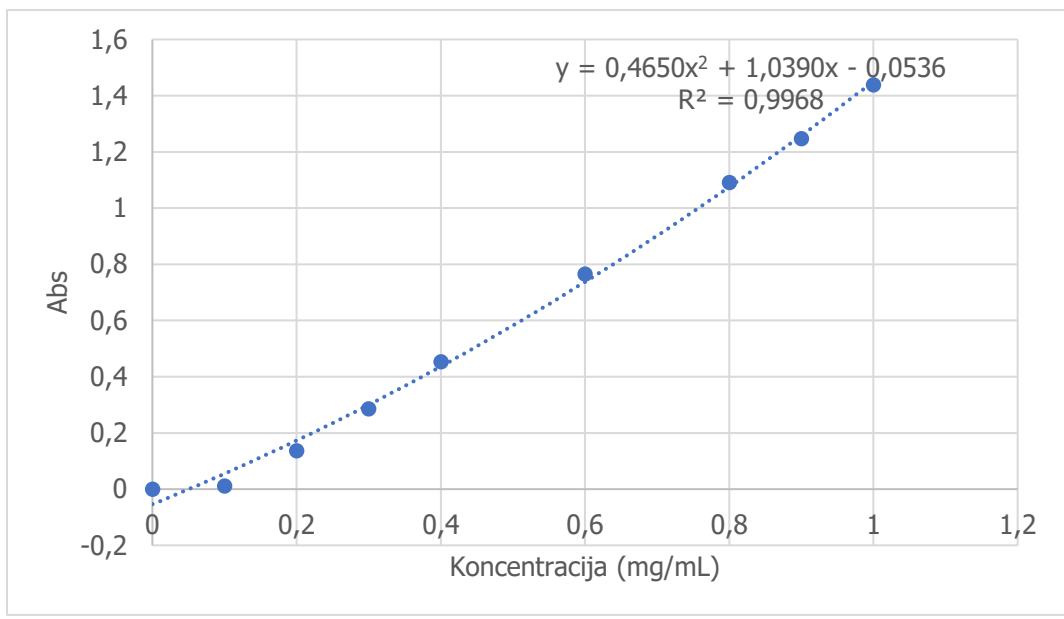


Slika 9. Baždarni pravac za Bradfordovu metodu određivanja koncentracije proteina

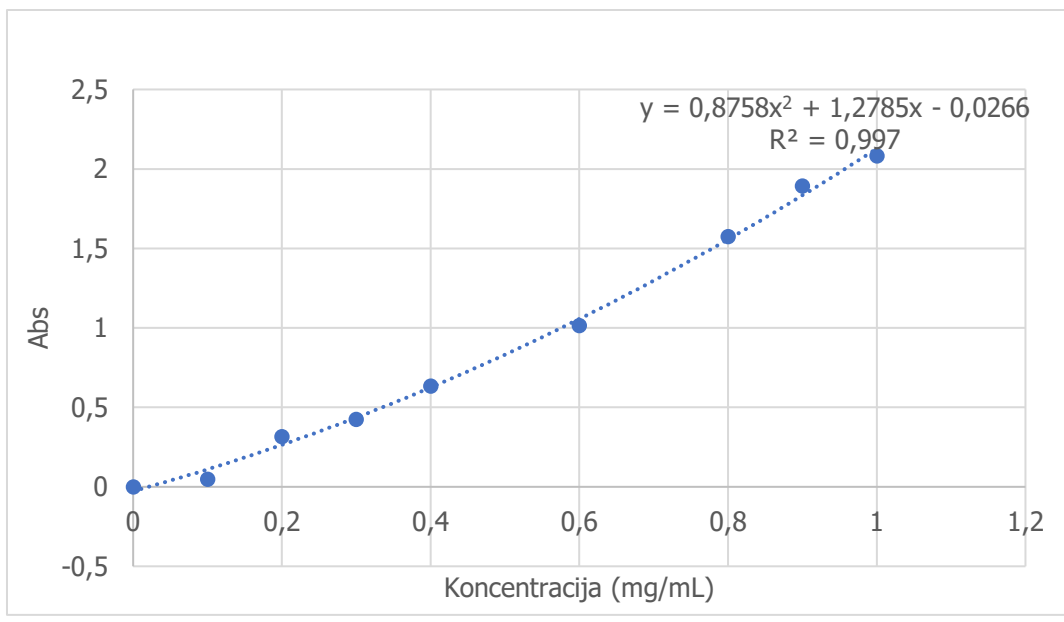
### 7.2. Baždarni pravci za DNSA metodu po pojedinom supstratu



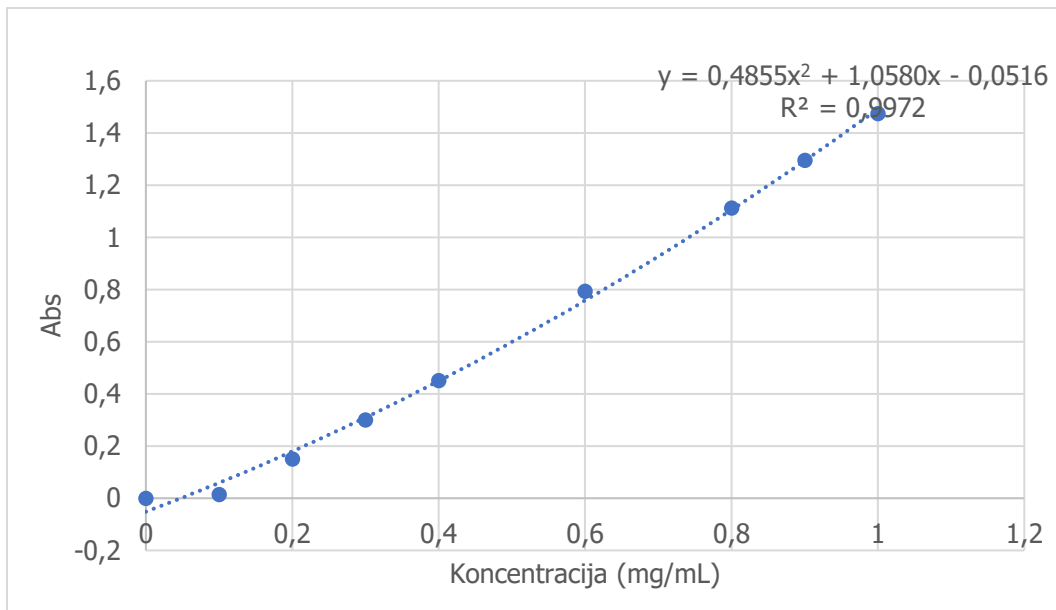
Slika 10. Baždarni pravac za ksilozu



Slika 11. Baždarni pravac za glukozu

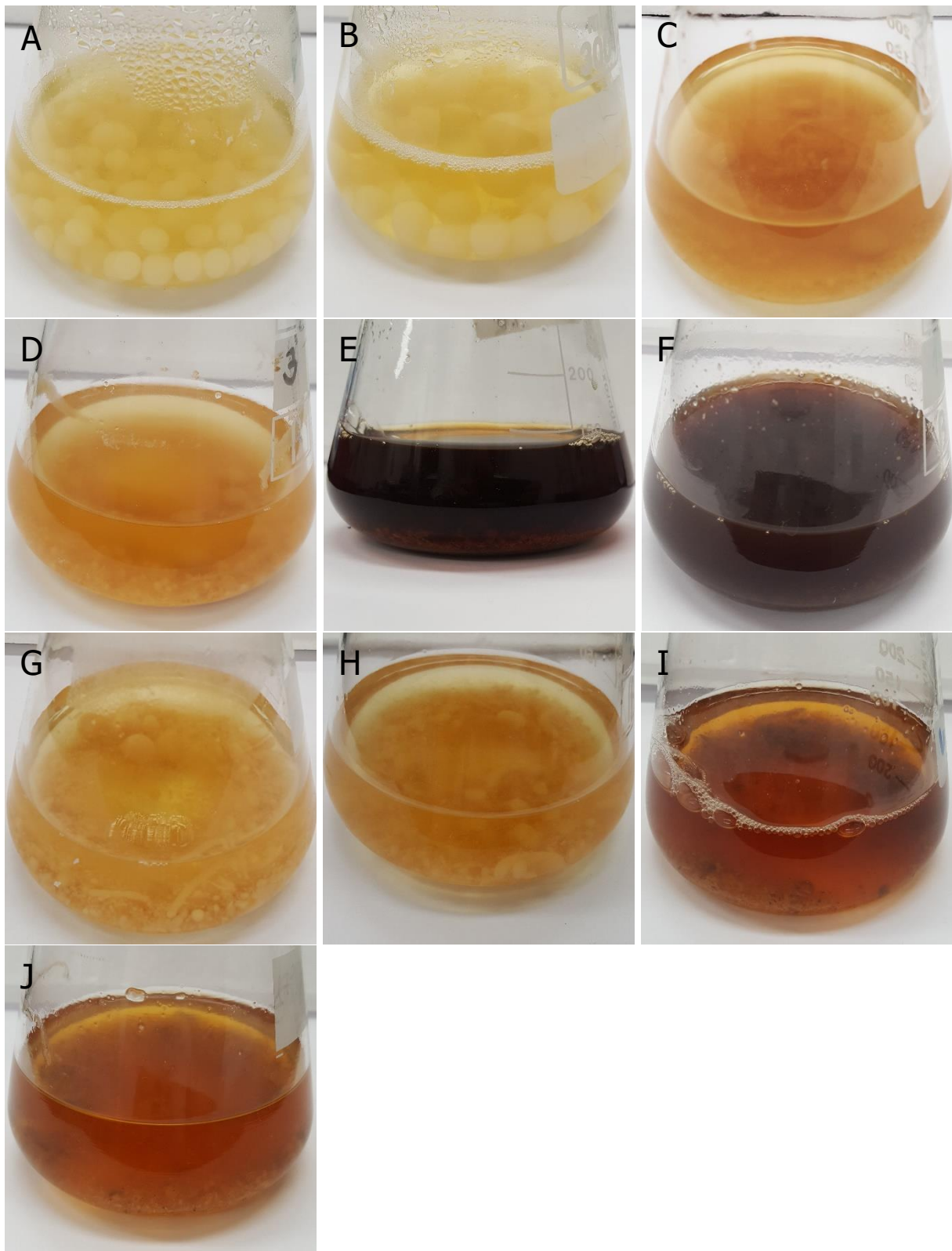


Slika 12. Baždarni pravac za arabinozu



Slika 13. Baždarni pravac za galakturonsku kiselinu

### 7.3. Kulture gljive *T. versicolor* na kraju uzgoja



Slika 14. Makroskopski izgled gljive *T. versicolor* na kraju uzgoja u različitim hranjivim podlogama: glukoza (A i B), lipa (C i D), hrast (E i F), lipa i glukoza (G i H), hrast i glukoza (I i J)

## Izjava o izvornosti

*Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.*

Dominik Dobrotić

ime i prezime studenta