

Otpad iz industrije ulja kao supstrat za proizvodnju lipaze u sintezi biodizela

Krnić, Mija

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:300039>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

Mija Krnić

**OTPAD IZ INDUSTRIJE ULJA KAO SUPSTRAT ZA PROIZVODNJU
LIPAZE U SINTEZI BIODIZELA**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, listopad, 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za procesno inženjerstvo
Katedra za termodinamiku i reakcijsko inženjerstvo
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij Procesno inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Nastavni predmet: Energija i okoliš

Tema rada je prihvaćena na XI. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2016./2017. održanoj 25. rujna 2017.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Sandra Budžaki

Pomoć pri izradi: Goran Miljić, mag. ing. proc., asistent

Otpad iz industrije ulja kao supstrat za proizvodnju lipaze u sintezi biodizela

Mija Krnić, 357-DI

Sažetak:

Pogače, kao nusproizvod u proizvodnji hladno prešanog ulja bogat su izvor dušika i ugljika koji je potreban za rast mikroorganizama. U okviru ovoga rada provedena je biološka razgradnja pogače buče i lana u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima (eng. *Solid State Fermentations, SSF*) s ciljem proizvodnje lipaze. Za biološku razgradnju pogače buče i lana korištene su dvije gljive: *Trametes versicolor* (gljiva bijelog truljenja) i *Humicola grisea*. Gljive su uzgajane 20 dana pri čemu je tijekom fermentacije praćen i analiziran udio proteina te volumna i specifična aktivnost lipaze iz proizvedenog ekstrakta. Udio ekstraktibilnih proteina određen je metodom po Bradfordici, a aktivnost testom fiksnog vremena (eng. *end-point test*) uz supstrat *p*-nitrofenil palmitat. Najveća određena aktivnost lipaze iznosila je $2,622 \pm 2,198$ U/mL u ekstraktu nakon 15.-tog dana biološke obrade pogače lana s *Humicola grisea*. S obzirom na nisku aktivnost lipaze može se pretpostaviti da mikroorganizmi uzgojeni na navedenim pogačama nisu producirali značajnije količine lipaze.

Ključne riječi: pogača buče, pogača lana, fermentacija na čvrstim nosačima, lipaza

Rad sadrži: Stranica: 32
Slika: 9
Tablica: 4
Literaturnih referenci: 46

Jezik izvornika: Hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:

1. izv. prof. dr. sc. Marina Tišma	predsjednik
2. izv. prof. dr. sc. Sandra Budžaki	član-mentor
3. izv. prof. dr. sc. Ivica Strelec	član
4. izv. prof. dr. sc. Tihomir Moslavac	zamjena člana

Datum obrane: 13. listopada 2017.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of process engineering
Subdepartment of thermodynamic and engineering
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Graduate program Process engineering

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Biotechnology

Course title: Energy and Environment

Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. XI. held on September 25, 2017.

Mentor: *Sandra Budžaki*, PhD, associate prof.

Technical assistance: *Goran Miljić*, mag. ing. proc., asistent

Waste from the oil industry as a substrate for the production of lipase in the synthesis of biodiesel

Mija Krnić, 357-DI

Summary:

Oil seed cake, as a by-product in the production of cold pressed oil, are a good source of nitrogen and carbon that is needed for growth of microorganisms. Within this thesis, the biodegradation of pumpkin and flax oil cakes has been carried out under Solid State Fermentation (SSF) with the aim of producing lipase. Two types of fungus were used for the biodegradation of pumpkin and flax oil cakes: *Trametes versicolor* (white rotting fungus) and *Humicola grisea*. Fungi were cultured for 20 days during which fermentation was monitored and analyzed for protein content, volume and specific lipase activity from the produced extract. The amount of extractable proteins was determined by the Bradford method and the activity of produced lipase by the *end-point test* with the *p*-nitrophenyl palmitate as a substrate. The highest determined lipase activity was $2,622 \pm 2,198$ U / mL in the extract after the 15th day of biological treatment of flax oil cake with *Humicola grisea*. Due to the low lipase activity it can be assumed that the microorganisms, grown on mentioned oil cakes, did not produce significant amounts of lipase.

Key words: Pumpkin oil cake, flax oil cake, solid state fermentation, lipase

Thesis contains: Pages: 32
Figures: 9
Tables: 4
References: 46

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|---|--------------|
| 1. <i>Marina Tišma</i> , PhD, associate prof. | chair person |
| 2. <i>Sandra Budžaki</i> , PhD, associate prof. | supervisor |
| 3. <i>Ivica Strelec</i> , PhD, associate prof. | member |
| 4. <i>Tihomir Moslavac</i> , PhD, associate prof. | stand-in |

Defense date: October 13, 2017.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

Ovaj rad izrađen je u sklopu projekta *Razvoj integriranog mikrosustava za biokatalitičku proizvodnju biodizela* (DeMSy(BioPro)²; IP-2016-06-7993) koji je financiran sredstvima Hrvatske zaklade za znanost.

Zahvaljujem se mojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Sandri Budžaki na posvećenom vremenu i brojnim savjetima tijekom izrade ovog diplomskog rada. Veliko hvala na pristupačnosti i strpljenju.

Također bih se zahvalila izv. prof. dr. sc. Marini Tišmi i izv. prof. dr. sc. Ivici Strelecu na pomoći i korisnim savjetima prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela rada.

Veliko hvala mag. ing. proc. Goranu Miljiću na pomoći, korisnim savjetima i vremenu koje je odvojio za brojne sate provedene u laboratoriju.

Dragi prijatelji i kolege, Vama hvala za sve nezaboravne trenutke kroz ovaj period života.

Najveća hvala mojoj najvećoj podršci u životu, roditeljima i sestri, koji su mi omogućili studiranje te uvijek pružali neizmjernu ljubav i potporu.

Hvala Vam svima!

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. PROIZVODNJA ULJA I OTPAD IZ INDUSTRIJE ULJA	4
2.1.1. Pogače lana i buče nakon proizvodnje hladno prešanog ulja	5
2.2. FERMENTACIJA NA ČVRSTIM NOSAČIMA	7
2.2.1. <i>Trametes versicolor</i>	9
2.2.2. <i>Humicola grisea</i>	11
2.3. LIPAZE	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1. ZADATAK	14
3.2. MATERIJALI	14
3.2.1. Supstrat	14
3.2.2. Mikroorganizmi	14
3.2.3. Kemikalije	14
3.2.4. Aparatura	15
3.3. METODE	16
3.3.1. Priprema hranjive podloge za uzgoj mikroorganizama	16
3.3.2. Uzgoj mikroorganizama u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima	16
3.3.3. Ekstrakcija u puferu topljivih tvari iz pogača uljarica	17
3.3.4. Određivanje udjela proteina	18
3.3.5. Određivanje aktivnosti enzima lipaze iz <i>Trametes versicolor</i> i <i>Humicola grisea</i>	18
4. REZULTATI I RASPRAVA	21
4.1. BIOLOŠKA OBRADA POGAČA U STATIČKIM UVJETIMA I UVJETIMA SA TREŠNJOM	22
4.2. PROMJENA KOLIČINE EKSTRAKTIBILNIH PROTEINA U POGAČAMA TIJEKOM BIOLOŠKE OBRADE S <i>TRAMETES VERSICOLOR</i> I <i>HUMICOLA GRISEA</i>	23
4.3. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI LIPAZE <i>END-POINT</i> TESTOM	25
5. ZAKLJUČCI	27
6. LITERATURA	29

Popis oznaka, kratica i simbola

OZNAKE:

- d promjer kivete (cm)
- S.A. specifična aktivnost enzima (U mg^{-1})
- t vrijeme trajanja testa (min)
- V.A. volumna aktivnost enzima (U dm^{-3})
- V_{uk} ukupni volumen reakcijske smjese (mL)
- V_{uzorak} volumen uzorka dodanog u test (mL)

KRATICE:

- BSA eng. *Bovine serum albumin* ili goveđi serumski albumin
- DF eng. *dilution faktor* ili faktor razrjeđenja
- PB eng. *phosphate buffer* ili fosfatni pufer
- PDA eng. Potato dextrose agar krumpirov agar
- SmF eng. *Submerged fermentation* Submerzna fermentacija
- SSF eng. *Solid state fermentation* Fermentacija na čvrstim nosačima
- U međunarodna jedinica enzimске aktivnosti ($\mu\text{mol/min}$)

SIMBOLI:

- ϵ molarni apsorpcijski koeficijent ($\text{mL}/\mu\text{mol}\cdot\text{cm}$)

1. UVOD

Otpad iz prehrambene industrije najčešće se spaljuje i/ili se koristi za stočnu hranu te kao gnojivo. Otpad industrije ulja tj. nusproizvod koji zaostaje nakon proizvodnje ulja hladnim prešanjem naziva se pogača. Pogača se najčešće koristi kao stočna hrana ali se može iskoristiti i kao supstrat za proizvodnju enzima pa tako i lipaze koja kao biokatalizator sudjeluje u sintezi biodizela.

Trenutna industrijska proizvodnja biodizela temelji se na kemijski kataliziranoj reakciji transesterifikacije iz biljnih ulja, životinjskih masti, otpadnog ulja ili ulja algi pri čemu se generiraju velike količine otpadne vode koja se dalje mora zbrinuti. Kako bi se proizvodnju biodizela učinilo ekološki prihvatljivijom, iako za sada samo na laboratorijskom nivou, kemijski katalizatori zamjenjuju se biokatalizatorima tj. lipazama koje imaju sposobnost katalizirati reakcije hidrolize, esterifikacije i transesterifikacije. Osim što se lipaze mogu koristiti u procesu proizvodnje biodizela one se već dugi niz godina koriste i u drugim područjima kao što su medicina, biotehnologija, prehrambena i farmaceutska industrija.

Cilj ovog rada je proizvesti lipazu koristeći otpad iz industrije ulja kao supstrat za rast dva mikroorganizma u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima (*eng. Solid State Fermentation; SSF*). Biološka razgradnja pogače buče i lana provedena je s *Trametes versicolor* i *Humicola grisea* tijekom 20 dana pri čemu je uspješnost procesa procijenjena temeljem volumne i specifične aktivnosti lipaze iz proizvedenog sirovog ekstrakta. Eksperimentalni dio rada proveden je u Laboratoriju za procesno inženjerstvo i Laboratoriju za biokemiju na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu Osijek.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. PROIZVODNJA ULJA I OTPAD IZ INDUSTRIJE ULJA

Ulja pripadaju grupi spojeva lipida. To su u vodi netopljive tvari tekućeg agregatnog stanja. Ulja pretežno sadrže estere masnih kiselina i alkohola glicerola, uz manju količinu negliceridnih komponenata (karotenoidi, tokoferoli, steroli, pigmenti, voskovi, ugljikovodici, aldehidi, ketoni, fosfatidi) te se nazivaju triacilglicerolima (triglicerolima ili trigliceridima). Uzimajući u obzir strukturu i sastav biljnih ulja, prirodni lipidi se dijele na jednostavne, složene te derivate lipida (Rac, 1964.). U industriji ulja proizvodnja sirovog ulja iz uljarica se provodi na dva načina (Dimić, 2005.):

metodom prešanja - mehaničko izdvajanje ulja sa i bez primjene visokih tlakova, gdje kao produkt nastaje sirovo ulje i pogača, te

metodom ekstrakcije - izdvajanje ulja pomoću organskog otapala, gdje nastaje miscela te sačma kao ostatak.

Koji postupak će se primijeniti ovisi o vrsti, svojstvima i sastavu sirovine, količini ulja u sirovini, željenoj kvaliteti ulja i namjeni. Prešanje se provodi na hidrauličnim (pod utjecajem visokog tlaka) i pužnim prešama. Razlikuje se toplo i hladno prešano ulje. Kod toplog prešanja pripremljena sirovina se zagrijava, što uzrokuje različite veće ili manje nepoželjne promjene ulja kao i gubitak tvari arome, ali je veći prinos ulja. Za razliku od toplog prešanja, kod hladnog prešanja ulje je kvalitetnije, ali je prinos manji u odnosu na proces toplog prešanja. Temperature ulja kod procesa proizvodnje ulja hladnim prešanjem ne prelaze 50 °C. Hladno prešana ulja su intenzivnija po okusu, mirisu i boji, te su zbog toga hladno prešana ulja skuplja od toplo prešanih (Dimić, 2005.). Proizvodnja biljnog ulja postupkom hladnog prešanja osigurava i maksimalno zadržavanje aktivnih spojeva kao što su esencijalne masne kiseline, flavonoidi i tokoferoli (Moslavac i sur., 2014.).

Najveće količine biološkog otpada zaostaju nakon tehnoloških procesa u prehrambenoj industriji pri čemu se bilježi kontinuirani porast. Održivo upravljanje otpadom podrazumijeva sprječavanje i minimiziranje njegovog nastanka kao i zbrinjavanje i uporabu.

Nusproizvodi su do nedavno smatrani otpadom i najčešće su se spaljivali i/ili koristili za ishranu stoke i kao gnojivo. Neke grane prehrambene industrije, kao što su industrija ulja, šećera, piva, prerade voća i povrća, su svoje nusproizvode plasirali na tržište po vrlo niskim cijenama kao stočnu hranu. Znanstvena istraživanja su pokazala da u nusproizvodima prehrambene industrije (uljare, pivovare, šećerane, te industrije prerade voća i povrća)

zaostaje značajna količina nutritivno vrijednih sastojaka, kao što su vitamini, minerali i vlakna, koji doprinose poboljšanju probave (Jozinović i sur., 2014.). Upravo zbog toga u novije vrijeme raste trend iskorištavanja nusproizvoda u različite svrhe, kao što su upotreba u pekarstvu, konditorskoj (Jozinović, 2015.). i mliječnoj industriji (Le i sur., 2015.) u farmaceutskoj industriji gdje se upotrebljavaju kao zamjenska hrana i dodaci prehrani (Šuran, 2015.) zatim u proizvodnji biogoriva (Trevor M.Letcher, Elsevier, 2008.), visokovrijednih spojeva (Hou i sur., 2010.), enzima, što doprinosi smanjenju ukupne količine otpada (Yağcı i Göğüş 2010.).

2.1.1. Pogače lana i buče nakon proizvodnje hladno prešanog ulja

Bučina pogača

Buča ili uljana tikva (*Cucurbita pepo* L.) je jednogodišnja biljka koja se uzgaja za košticu bogatu uljem. Razlikuju se dvije vrste koštica: sa ljuskom i bez ljuske (golica). Oba tipa koštice su zastupljena u proizvodnji ulja, međutim, golica je pogodnija zbog većeg prinosa ulja pri čemu zaostaje pogača bolje kvalitete.

Buča ima višestruku primjenu. Sjemenke se koriste za proizvodnju visoko kvalitetnih ulja, a mesnati dio upotrebljava se u kulinarstvu (proizvodnja voćnih sokova, dječje hrane, priprema slastica), u farmaceutskoj industriji (različiti farmakološki pripravci) te u narodnoj medicini. Osim za ljudsku prehranu, mesnati dio se koristi i za ishranu stoke te u poljoprivredi za zelenu prihranu (Sito i sur., 1998.).

Nusproizvod koji zaostaje nakon proizvodnje bučinog ulja je visoko kvalitetna pogača. Na tržište se plasira u obliku prutića sjemene pogače te se koristi kao stočna hrana. Također se prerađuje u različite namaze i proteinsko brašno, koristi se u konditorskoj i tjesteničarskoj industriji kao bojilo i aromatična supstanca (Leder i Molnar, 1993.).

Ovisno o proizvodnoj opremi i uvjetima proizvodnje, pogača sadrži oko 12 % ulja. Izuzetno je bogata proteinima, po sastavu slična proteinima suncokreta, zatim vitaminima i mineralima, te se zbog toga koristi kao dodatak ljudskoj prehrani, no moguća je još i šira primjena (Brkan, 2013.).

Pogača, s obzirom na sastav (**Tablica 1.**), može se koristiti i u različite biotehnološke svrhe kao što je proizvodnja enzima (lipaze, α -amilaze, proteaze, fitaze, glutaminaze) pri čemu je pogača supstrat za rast različitih mikroorganizama, za proizvodnju vitamina, antibiotika,

aminokiselina, organskih kiselina, biološki aktivnih sekundarnih metabolita, itd. (Ramachandran i sur.; 2007.).

Kemijski sastav pogače se razlikuje, ovisno o količini ulja i udjelu ljuske. Sorte bez ljuske, tj. golice, imaju viši sadržaj proteina u odnosu na kultivare s ljuskom. Golice sadrže oko 49 % sirovih proteina te oko 7 % sirovih vlakana, uz mali udio suhe tvari (oko 10 %). Odlikuju se ugodnim mirisom i okusom, po hranidbenoj vrijednosti sličnoj stočnoj repi. S obzirom na aromu koristi se kao poboljšivač okusa kompletnih i dopunskih krmnih smjesa (Dumovski i Milas, 2004.). U hranidbi svinja i starije peradi koristi se krmivo proizvedeno od oljuštenog zrna, no unatoč velikoj količini bjelančevina, zbog manjka lizina, upotrebljava se uz ostala bjelančevinasta krmiva. Govedo ju koristi u sirovom stanju, isjeckanu na krupne komade, dok svinje mogu jesti dobro i sirovu i kuhanu pogaču (Zvekić i Popović 2005).

Tablica 1. Kemijski sastav bučine pogače – literaturne vrijednosti

Parametar	Literature reference				
	Zdunczyk i sur., 1999.	Peričin i sur., 2008.	Radočaj i sur., 2012.	Coeza i sur., 2016.	Bochkarev i sur., 2016
Suha tvar	6,99 %	-	3,5 %	-	5,5 - 8,2 %
Pepeo	9,09 % _{s.tv}	-	6,5 % _{s.tv}	-	8,1 – 8,7 % _{s.tv}
Proteini	59,80 % _{s.tv}	63,52 % _{s.tv}	50,2 % _{s.tv}	29,39 % _{s.tv}	45,6 – 52,3 % _{s.tv}
Sirova vlakna	3,17 % _{s.tv}	4,50 % _{s.tv}	-	-	2,2 – 4,8 % _{s.tv} *
Neutralna detergent vlakna (NDF)	10,51 % _{s.tv}	-	-	-	-
Ukupni ugljikohidrati	-	1,10 % _{s.tv} **	4,9 % _{s.tv}	15,88 % _{s.tv}	-
Masti	-	8,66 % _{s.tv}	-	5,92 % _{s.tv}	11,7 – 19,4 % _{s.tv}
Ulja	-	-	31,3 % _{s.tv}	-	-
Vitamini	B kompleksa, E - - -				
Minerali	Ca, Mg, Na, Mn, Fe, Zn, Cu, P, K - - -				

*celuloza

**topivi šećeri

Pogača lana

Lan (*Linum usitatissimum L.*) je biljka koja se uzgaja zbog primjene u tekstilnoj industriji kao tekstilni lan i služi samo za izradu vlakana, u prehrambenoj industriji kao uljani lan i upotrebljava se za ljudsku prehranu i proizvodnju ulja, te kombinirani, koji se koristi i za sjeme i za vlakno (Stanković, 1998.). Sjeme lana je bogato uljem i proteinima te je jedno od najvažnijih izvora sušivih ulja. Laneno ulje se uglavnom koristi za proizvodnju boja, lakova,

mekih sapuna i tiskarskih boja, služi za izradu farmaceutskih preparata te se upotrebljava kao laksativ (Dimić, 2005.).

Cijelo zrno lana se ne daje stoci, nego se koristi laneno brašno kao koncentrirana stočna hrana u krmnim smjesama, koje se dobiva od nusproizvoda koji zaostaje nakon proizvodnje ulja, tzv. uljne pogače ili uljnog kolača. Brašno sadrži oko 35% proteina, od kojeg je 85% probavljivo, što djeluje blago i regulativno na probavni sustav (Šimetić, 2008.). Ostatak poslije izdvajanja lanenog ulja, pogača koja zaostaje, koristi se kao stočna hrana bogata proteinima, u medicini i farmaceutskoj industriji (Šimetić, 2008.). U **Tablici 2.** dan je sastav pogače lana na temelju pregledane literature.

Tablica 2. Kemijski sastav pogače lana – literaturne vrijednosti

Parametar	Literature reference		
	Gutierrez i sur., 2010.	Bochkarev i sur., 2016	Coeza i sur., 2016.
Suha tvar	10,65 %	6,9 – 8,6 %	-
Pepeo	3,40 % _{s.tv}	4,8 – 5,0 % _{s.tv}	-
Proteini	27,78 % _{s.tv} *	32,6 – 38,1 % _{s.tv}	14,40 % _{s.tv}
Sirova vlakna	7,02 % _{s.tv}	5,7 – 7,4 % _{s.tv} **	-
Ukupni ugljikohidrati	-	-	16,26 % _{s.tv}
Masti	29,37 % _{s.tv}	10,9 – 19,0 % _{s.tv}	6,83 % _{s.tv}
Vitamini	B kompleksa, E		-
Minerali	Ca, K, Fe, P		-

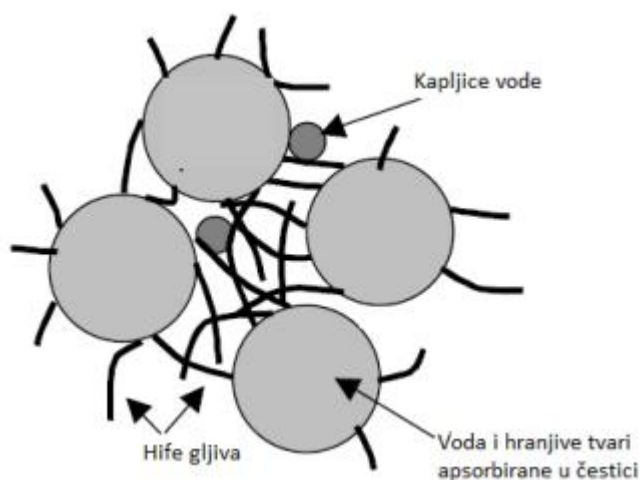
* N x 6,25

** sirova celuloza

2.2. FERMENTACIJA NA ČVRSTIM NOSAČIMA

Mikrobni procesi razgradnje organskih tvari odvijaju se submerzno, u tekućoj podlozi (eng. *Submerged fermentation*, SmF) te na čvrstoj podlozi (eng. *Solid state fermentation*, SSF). Glavna razlika između SmF i SSF očituje se u količini slobodne vode prisutne u supstratu. Fermentacije na čvrstim nosačima su šaržni procesi pri kojima mikroorganizmi rastu u odsutnosti slobodne vode na površini vlažnih nosača, koji ujedno mogu služiti i kao supstrat, tj. izvor hranjivih tvari za rast mikroorganizama (Durand, 2003.). U većini SSF procesa kao radni mikroorganizmi koriste se filamentozne gljive, budući da i u prirodi rastu u sličnim uvjetima, dok su bakterije i kvasci nešto rjeđe korišteni u ovakvim procesima. Mikroorganizmi imaju mogućnost rasti na površini supstrata, između dijelova supstrata te u

samom matriksu supstrata, tj. nosača (Mitchell i Berović, 2006.). Mikroorganizmi kao što su gljive rastu između dijelova supstrata, što je prikazano na **Slici 1**. Koristeći filamentozne gljive dobiva se velik broj različitih proizvoda, poput stočne hrane s povećanim udjelom proteina, različitih enzima, organskih kiselina, antibiotika, pigmenata, tvari aroma i dr., a također se razgrađuju pojedini štetni spojevi. Hifalni rast i fiziološka svojstva, od kojih se ističu rast u uvjetima niskog aktiviteta vode i niske pH-vrijednosti, proizvodnja brojnih hidrolitičkih enzima te produkcija spora omogućuju ovim organizmima idealnu primjenu u SSF procesima.



Slika 1. Rast filamentoznih mikroorganizama između dijelova supstrata u SSF sustavu
(Mitchell i sur., 2004.)

Fermentacije se odvijaju na dvije vrste nosača:

- inertni, koji služe samo kao nosač (vlakna, smole);
- neinertni, koji mogu biti i nosač i supstrat (biorazgradivi, lignocelulozni materijali)

U posljednjih nekoliko godina kao nosači koriste se otpadni produkti ili nusproizvodi iz poljoprivrede, šumarstva, prehrambene proizvodnje i sl., koji se prethodno minimalno obrađuju. Ovi se materijali odabiru obzirom na prikladnost za rast odabranog radnog mikroorganizma i proizvodnju ciljanog produkta, a pripadaju im mekinje pšenice i riže, kolač od prešanog ulja (pogača), komine jabuka i grožđa, kore banana, citrusa, ljuske kave, melasa šećerne repe itd. Ponekad su u upotrebi i visokovrijedni prehrambeni materijali, kao što su krmna repa, riža, manioka itd. (Mitchell i sur., 2006.). Korištenjem poljoprivrednog i

industrijskog otpada kao susprata/nosača u SSF procesima istovremeno se smanjuje količina takvog otpada i dobivaju korisni proizvodi (Pandey, 2008.).

SSF se može provesti u različitim tipovima bioreaktora kao što su bioreaktor s pliticama, bioreaktor s punilima, horizontalni rotirajući bioreaktor, bioreaktor s fluidizirajućim slojem i dr.

Prednosti SSF procesa u odnosu na SmF procese su jednostavnost izvedbe reaktora, relativna otpornost na kontaminaciju mikroorganizmima, veća produktivnost procesa, manja potrošnja energije za vođenje procesa, jednostavnija obrada otpada, korištenje ostatka nakon fermentacije kao stočne hrane ili gnojiva. Nedostatci ovih procesa su otežano miješanje čvrstog supstrata zbog heterogenosti, čime je otežan i prijenos tvari i topline, zatim teža kontrola temperature, automatizacije, poteškoće pri uvećanju mjerila (*scale-up* procesa) (Pejin, 2003.; Xiong, 2004, Couto i Sanroman, 2006.).

SSF procesi upotrebljavaju se za proizvodnju mnoštva važnih biotehnoloških produkata, poput goriva, krmiva, raznih kemijskih i farmaceutskih pripravaka. Ova tehnologija istraživana je i korištena stoljećima, a do sada je najveću primjenu našla u proizvodnji tradicionalnih prehrambenih proizvoda kao što su: *Tempeh* i *Koji*, proizvodi soje, zatim *Ang-kak*, tj. "crvena riža" (Mitchell i sur., 2006.). Posljednjih nekoliko desetljeća došlo je do povećane primjene SSF te posljedično do nastanka većeg broja proizvoda dobivenih ovim načinom fermentacije. Neki od tih proizvoda su: enzimi (amilaze, lipaze, proteaze, celulaze), pigmenti, tvari arome, organske kiseline, proteinizirana krmiva, antibiotici, biološki agensi (Mitchell i sur., 2006.). SSF se pokazala obećavajuća u razvoju više različitih bioloških procesa, bioremedijacije, razgradnje različitih onečišćujućih tvari, biološke detoksikacije poljoprivredno-industrijskih ostataka, biotransformacije bilja i ostataka usjeva za obogaćivanje prehrane, kompostiranje, zatim u zaštiti okoliša. Također, sve veću ulogu ima u području proizvodnje biogoriva i smanjenja troškova proizvodnje goriva (Pandey, 2002., Wang i sur., 2010.).

2.2.1. *Trametes versicolor*

Gljive koje imaju sposobnost razgradnje drveta nazivaju se gljive truležnice, a pripadaju razdjelima *Basidiomycota* i *Ascomycota*. Njima pripadaju gljive mekog truljenja, gljive smeđeg truljenja i gljive bijelog truljenja, a podjela se temelji na karakteristikama drveta i nastalim razgradnim produktima.

Zbog sposobnosti razgradnje i mineralizacije glavnih komponenti drveta: celuloze, hemiceluloze i lignina, gljive bijelog truljenja najčešće uzrokuju truljenje drveta. Ova skupina obuhvaća velik broj gljiva, uglavnom *Basidiomycota* te *Ascomycota*, a neki predstavnici su vrste *Trametes versicolor* i *Phanerochaete chrysosporium*, *Ceriporiopsis subvermispora* i *Dichomitus squalens*. Gljive bijelog truljenja karakterizira velika otpornost na više temperature i širi raspon pH. Izlučuju izvanstanične lignolitičke enzime, lignin peroksidaze (LiP), mangan peroksidaze (MnP) i lakaze, odgovorne su za razgradnju lignoceluloznih materijala. Ovi enzimi omogućuju gljivama podnošenje nepogodnih i toksičnih uvjeta (Gadd, 2001.; Webster i Weber, 2007.).

Gljive se upotrebljavaju u razgradnji širokog spektra organskih zagađenja okoliša, u obradi industrijskih otpadnih voda kao i u bioremedijaciji onečišćenog tla, te za povećanje hranjive vrijednosti krmiva (Isroi i sur., 2011).

Trametes versicolor, nazvana i *Coriolus versicolor* i *Polyporus versicolor*, je gljiva bijelog truljenja koja pripada koljenu *Basidiomycota*, razredu *Agariomycetes*, podrazredu *Porinae*, redu *Poriales*, porodici *Poriceae* i rodu *Trametes*. Poznata je pod imenom "šarena tvrdokoška" i "puranov rep". Široko je rasprostranjena u prirodi, a raste u nakupinama, redovima ili preklapajućim formacijama na deblima, stabljikama i otpalim granama mrtvog i raspadajućeg drveća, a ponekad i živog drveća (Tišma, 2010). Proizvodi enzime potrebne za razgradnju lignoceluloznih sastavnica, lakazu, lignin peroksidazu i mangan peroksidazu. Gljiva učinkovito razgrađuje lignin, policikličke aromatske ugljikovodike, poliklorirane bifenile i sintetičke boje (Xavier i sur., 2007.). *Trametes versicolor* ima veliku ulogu u medicini jer proizvodi polisaharid koji inhibira rast stanica raka i leukemijskih stanica, replikaciju virusa HIV-a, stimulira imunološki sustav, pomaže oporavku jetre od gama zračenja. Također, razgrađuje ili akumulira neke od današnjih najgorih onečišćivača okoliša poput antracena, dioksina i organofosfata, a koristi se i u bioremedijaciji onečišćenja tekstilnim bojama (Webster i Weber, 2007.). Kultura *T. versicolor* ili njezini lignolitički enzimi korišteni su kao biokatalizatori u različitim industrijskim procesima, poput pročišćavanja otpadnih voda, zatim u industriji pulpe i papira gdje uspješno provode delignifikaciju, izbjeljivanje i omekšavanje pulpe (Xavier i sur., 2007.). Zbog svoje korisne primjene, ali i zbog mogućnosti otkrivanja novih načina uporabe, *Trametes versicolor* vrlo se često pojavljuje kao predmet znanstvenih istraživanja, pogotovo za oksidaciju obnovljivih lignoceluloznih materijala.

2.2.2. *Humicola grisea*

Termofilni organizmi rastu i preživljavaju u temperaturnom rasponu od 30 °C do 121 °C. Gledajući prirodna staništa, rastu na geotermalnim i vulkanskim površinama te hidrotermalnim otvorima u dubokim morima. Termofili koji rastu pri nižim temperaturama pronađeni su u kiselim otpadnim vodama iz industrijskih postrojenja, zatim u biološkom otpadu i dr. Ovoj skupini mikroorganizama pripadaju termofilne gljive, poput *Humiocla grisea*, *Humicola insolens*, *Candida peltata*.

H. grisea (Slika 2.) predstavlja značajan potencijal u procesima biokonverzije poljoprivrednog otpada. Njezin hidrolitički sustav enzima (endoglukanaze, β -glukozidaze, glukoamilaze, trehaloze, ksilanaze) ima sposobnost provođenja procesa saharifikacije lignoceluloze na različitim supstratima, uključujući šećernu trsku, pšenične mekinje, slamu. Enzimi izolirani iz *H. grisea* uspješno su primjenjivani tijekom sulfatnog (kraft) procesa proizvodnje papira iz eukaliptusa u fazi izbjeljivanja pulpe.

Termostabilni enzimi dobiveni iz *H. grisea* pokazuju sve veći interes za njihovom primjenom u industriji (Satyanarayana i sur., 2013.).



Slika 2. *Humicola grisea* (Joao, 2011.)

2.3. LIPAZE

Lipaze (triacilglicerolester hidrolaze EC 3.1.1.3.) su enzimi koji kataliziraju reakcije hidrolize triacilglicerola na masne kiseline i glicerol, te esterifikacije i transesterifikacije (Lason,

Ogonovski, 2010.). Ovi enzimi mogu biti biljnog, životinjskog i mikrobiološkog podrijetla te su vrlo značajni za industrijsku primjenu.

Prema literaturi najčešće primjenjivane lipaze za razne sinteze izolirane su iz kvasaca i plijesni, kao što su *Candida rugosa*, *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus niger* i gljiva *Thermomyces lanuginosus* te mogu biti izolirane i iz bakterija. Veliki prinos tijekom proizvodnje lipaza iz različitih mikroorganizama na jeftinim hranjivim podlogama razlog su zašto se takve lipaze najviše koriste u različitim biotehnološkim procesima (Ognjanović i sur., 2010.).

Lipaze karakterizira selektivnost, na kojoj se zasniva njihova praktična primjena jer se pravim izborom enzima usmjerava odvijanje reakcija i dobiva se čisti produkt velikog prinosa, te specifičnost koja može biti u odnosu na ester, masne kiseline, položaj, kao i stehiometrijska specifičnost. Zbog svoje aktivnosti na granici faza, lipaze imaju specifičan mehanizam djelovanja. Molekula lipaze se postavlja u položaj otvorene konformacije pri kojoj je aktivni centar dostupan molekulama supstrata i gdje je omogućeno stvaranje kompleksa enzim-supstrat (Ognjenović i sur., 2009.).

Lipaze, kao i ostali enzimi, zbog svojih prednosti imaju široku primjenu. Lipaze djeluju u blagim reakcijskim uvjetima uz manji utrošak energije pri čemu nastaju visokokvalitetni proizvodi s većim prinosom te su prihvatljivije za okoliš. Produkti dobiveni enzimskim putem su čišći s manje primjesa što je osobito važno u kasnijim fazama proizvodnje tijekom izdvajanja produkata iz reakcijske smjese, pogotovo u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Ovi enzimi se koriste u industrijskim procesima kao biokatalizatori ili kao sastojci dobivenih proizvoda. Značajnu ulogu imaju u industriji masti i ulja, prehrambenoj industriji (modificiranje arome pojedinih namirnica), mliječnoj industriji (hidroliza mliječne masti), kožarskoj industriji (odmašćivanje kože), kozmetičkoj industriji, kemijskoj industriji (sinteza biodizela), u farmaceutskoj industriji za sintezu različitih kemikalija te kao dijagnostički alat u medicini (Ognjenović i sur., 2009.; Iso i sur., 2001.).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Cilj diplomskog rada je istražiti mogućnost proizvodnje lipaze koristeći otpad iz industrije ulja kao supstrat pomoću dva mikroorganizma u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima. U svrhu istraživanja provedena je biološka razgradnja pogače buče i lana pomoću *Trametes versicolor* i *Humicola grisea*.

Uspješnost procesa proizvodnje lipaze procijenjena je temeljem volumne i specifične aktivnosti lipaze iz proizvedenog sirovog ekstrakta.

3.2. MATERIJALI

3.2.1. Supstrat

Kao supstrat u proizvodnji lipaze korištene su pogače buče i lana s "Obiteljskog poljoprivrednog gospodarstva Lazić" (Vraneševci, Hrvatska), dobivene nakon proizvodnje hladno prešanog ulja.

3.2.2. Mikroorganizmi

Mikroorganizmi korišteni za biološku razgradnju pogača buče i lana u svrhu proizvodnje lipaze su gljiva bijelog truljenja *Trametes versicolor* TV-6 (MZKI, Ljubljana, Slovenija) i termofilna gljiva *Humicola grisea* (FKIT, Zagreb, Hrvatska). Kulture su uzgajane 7 do 10 dana na krumpirovom agaru (PDA) pri 27 °C. Micelijski diskovi promjera 6 mm korišteni su za pripremu inokuluma u eksperimentalnom dijelu ovoga rada.

3.2.3. Kemikalije

Tijekom eksperimentalnog dijela rada su korištene slijedeće kemikalije: potato dextrose agar (PDA; Biolife, Milano, Italija), kalijev hidrogenfosfat (K_2HPO_4 ; GRAM-MOL d.o.o., Zagreb, Hrvatska), kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4 ; Kemika, Zagreb, Hrvatska), fosfatna kiselina (H_3PO_4 ; T.T.T. d.o.o., Sv.Nedjelja, Hrvatska), Bradford reagens (BioRad, Njemačka), Tris baza (ACROS ORGANICS, SAD), klorovodična kiselina (HCl; CARLO ERBA Reagents, Rodano, Italija), arapska guma (ACROS ORGANICS, SAD), *p*-nitrofenil palmitat (Alfa Aesar, Njemačka), 2-propanol (ALKALOID, Skopje, Makedonija), kloroform (Carlo Erba, Francuska), izoamilni alkohol (Kemika, Zagreb, Hrvatska).

Priprema otopina:

Priprema otopine fosfatnog pufera - prvotno su pripremljene dvije otopine, 1 L otopine K_2HPO_4 , koncentracije 1 mol dm^{-3} , gdje je izvagano 174,18 g soli K_2HPO_4 , otopljeno u destiliranoj vodi, preneseno u odmjernu tikvicu i nadopunjeno do oznake destiliranom vodom, te isti postupak za 1 L otopine KH_2PO_4 , koncentracije 1 mol dm^{-3} , gdje je izvagano 136,09 g soli KH_2PO_4 .

1 L 1M fosfatnog pufera (PB) je pripravljena na način da je pomiješano 160 mL otopine KH_2PO_4 i 840 mL otopine K_2HPO_4 . pH otopine pufera iznosi 7,27.

Iz 1M PB pripremljen je 0,1M PB na način da je 100 mL 1M PB pomiješano s 900 mL destilirane vode, kojeg je potrebno podesiti na pH=7 dodatkom nekoliko kapi nerazrijeđene fosfatne kiseline. Otopine su čuvane u hladnjaku na $+4^\circ\text{C}$ te je otopina 0,1M PB korištena za daljnje analize.

Priprema otopine Tris-HCl pufera – za pripremu 100 mM otopine Tris-HCl pufera pomiješano je 10 mL 1M Tris baze i oko 70 mL destilirane vode. pH vrijednost podešena je klorovodičnom kiselinom na pH 8 te je odmijerna tikvica nadopunjena destiliranom vodom do 100 mL. Otopina je čuvana u hladnjaku na $+4^\circ\text{C}$.

Priprema Marmur otopine – za pripremu ove otopine pomiješani su kloroform i izoamilni alkohol u volumnom omjeru 24:1. Otopina je čuvana na sobnoj temperaturi (Palacios i sur., 2014).

Priprema otopine supstrata - 40 mL otopine supstrata pripravljeno je od 20 mL 100 mM otopine Tris-HCl u kojoj je otopljeno 0,1 % w/v arapske gume. U pripremljeni pufer s emulgatorom postepeno dodano 4 mL 10 mM otopine pNPP u 2-propanolu (kap po kap). Ostatak otopine je nadopunjen destiliranom vodom, a čini ju volumen od 16 mL (Palacios i sur., 2014.).

3.2.4. Aparatura

Za potrebe izvođenja eksperimenta korištena je slijedeća aparatura: autoklav (TIP 7510945, Sutjeska, Beograd), pH metar (Hanna Instruments 2211 pH/ORP Meter), Vortex miješalica (TEHTNICA Vibromix 10), centrifuga (HERMLE Z 326 K, Njemačka), vodena kupelj (Mettmert WNB 14), tehnička vaga (OHAUS, SAD), analitička vaga (CRYSTAL 200 CE, Gibertini, Italija), inkubator (Binder, Tuttlingen, Njemačka), spektrofotometar (ThermoSpectronic, Helios γ , Njemačka).

3.3. METODE

3.3.1. *Priprema hranjive podloge za uzgoj mikroorganizama*

Izvagano je 21 g krumpirovog agara i dodano je 500 mL destilirane vode, zagrijano do vrenja i sterilizirano u autoklavu pri 121 °C kroz 20 minuta pri tlaku od 1-2 bara. Podloga je ohlađena na temperaturu od 45 °C do 50 °C. Nakon hlađenja podloga je dobro promiješana te prelivena u prethodno sterilizirane Petrijeve zdjelice. Na podlogu su potom, u sterilnim uvjetima, naciepljeni mikroorganizmi. Inkubacija je trajala sedam dana pri 27 °C.

3.3.2. *Uzgoj mikroorganizama u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima*

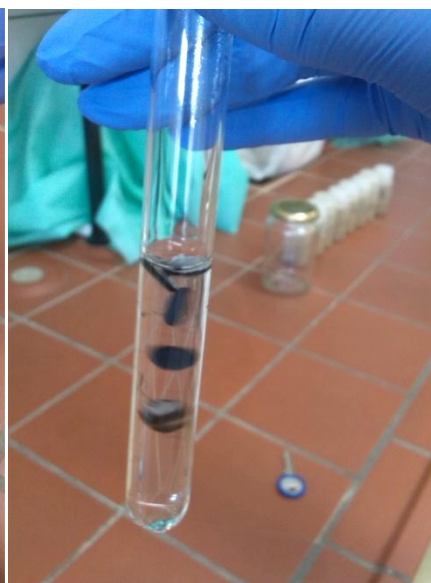
Dodavanje odgovarajućeg volumena vode na supstrat je potrebno za postizanje optimalne vlažnosti supstrata za rast biomase, koja se kreće od 60 do 80 %. U ovom radu potreban volumen je izračunat iz podataka o početnoj vlažnosti pogače buče i lana.

U laboratorijske staklenke je izvagano 50 g uzorka supstrata (pogače buče i lana), te dodano ukupno 63,2 mL destilirane vode za bučinu pogaču, od kojih je početno dodano 53,2 mL destilirane vode, a preostali volumen, tj. 10 mL je dodan nakon sterilizacije u sastavu inokuluma. Za pogaču lana je dodano ukupno 63,5 mL destilirane vode, na isti način kao i za bučinu pogaču. Razlika u dodanom volumenu je zbog različitih udjela suhe tvari u pogačama, koji za buču iznosi 93,07 %, dok je za lan taj udio od 92,09 %, a što je u skladu sa literaturnim podacima.

Prije naciepljivanja, pogače su sterilizirane su u autoklavu na 121 °C tijekom 20 min. Inokulacija je provedena s pet micelijskih plagova promjera 6 mm (izrezanih pomoću sterilnog bušača čepova), kulture gljiva *Trametes versicolor* i *Humicola grisea* pripremljenih u 10 mL sterilizirane destilirane vode (**Slika 3. i 4.**). Naciepljivanje je provedeno u prethodno sterilizirane laboratorijske staklenke u aseptičnim uvjetima rada.



Slika 3. Suspendirane spore
Trametes versicolor



Slika 4. Suspendirani spore
Humicola grisea

Poklopac svake staklenke je zamijenjen s listom papirnatog ručnika kako bi bili omogućeni aerobni uvjeti inkubacije. Označene laboratorijske staklenke s uzorcima stavljene su na inkubaciju u inkubator na 27 °C uz brzinu strujanja zraka od 10 %. Inkubacija je trajala 20 dana. Pokusi su provedeni u tri paralele. Uzorkovanje je izvršeno 10., 15. i 20.-ti dan uzgoja, u sterilnim uvjetima, bez previše manevriranja. Tijekom uzgoja u statičkim uvjetima praćene su promjene koje se zbivaju u teglicama, poput rasta bijelih nitastih kolonija mikroorganizama na površini, boje uzorka, konzistencije i pojave slobodne vode. Proveden je i pokus u kojemu su teglice bile podložne trešnji, te su također praćene promjene koje se događaju tijekom 20 dana inkubacije.

3.3.3. Ekstrakcija u puferu topljivih tvari iz pogača uljarica

Za vrijeme trajanja biološke obrade pogače buče i lana, 10., 15. i 20.-ti dan, provedeno je uzorkovanje u sterilnim uvjetima. U plastičnu epruvetu izvagan je 1 g uzorka, dodano 5 mL hladnog (+4 °C) 0,1M fosfatnog pufera (pH=7,0), te provedena ekstrakcija. Ekstrakcija je trajala 30 min, a miješanje suspenzije je provedeno na vortex miješalici 30 sekundi svakih 5 min. Uzorci su čuvani u hladnjaku na +4 °C tijekom ekstrakcije. Po završetku ekstrakcije, ekstrakti su izbistreni centrifugiranjem pri 15 000 g tijekom 10 min na +4 °C. Bistri ekstrakti odvojeni su od taloga i dodatno profiltrirani preko nabranog filter papira, nakon čega im je izmjeren volumen te su čuvani na +4 °C do analize.

3.3.4. Određivanje udjela proteina

Koncentracija proteina u filtratima nakon provedene inkubacije određena je metodom po Bradfordici (Bradford, 1976.). Metoda se temelji na nespecifičnom vezanju anionskog oblika boje Coomassie Brilliant Blue G-250 za bazične i aromatske bočne ogranke proteina, uslijed čega dolazi do stvaranja kompleksa protein-boja, koji u kiselom mediju pokazuje apsorpcijski maksimum pri 595 nm (Strelec i Kovač, 2014).

Za određivanje koncentracije proteina u dobivenim ekstraktima u kivete je otpipetirano 100 μL uzorka i dodano 2 cm^3 svježeg pripremljenog Bradfordičinog reagensa, razrijeđenog s destiliranom vodom u omjeru 1:4. Tako pripremljena reakcijska smjesa je ostavljena na sobnoj temperaturi 5 minuta, nakon čega je mjerena apsorbancija pri valnoj duljini od 595 nm. Uzorci su analizirani u tri paralele, a rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti. Koncentracija proteina u uzorcima određena je u odnosu na kalibracijsku krivulju, a ovisno o njoj te o količini proteina u ekstraktima, za određene uzorke je bilo potrebno prethodno pripremiti pripadajuća razrjeđenja. Dobiveni rezultati su korišteni za izračunavanje specifične aktivnosti enzima.

3.3.5. Određivanje aktivnosti enzima lipaze iz *Trametes versicolor* i *Humicola grisea*

Aktivnost proizvedene lipaze određena je testom fiksnog vremena (*end-point* testom) uz supstrat *p*-nitrofenil palmitat (Palacios i sur., 2013).

Apsorbancija supernatanta mjerena je na 410 nm. Molarni apsorpcijski koeficijent određen je mjerenjem apsorbancije otopine *p*-nitrofenola pripremljenog na isti način kao reakcijska smjesa za određivanje aktivnosti, ali bez dodane lipaze. Aktivnost lipaze izražena je u internacionalnim jedinicama za mjerenje aktivnosti enzima (U) pri čemu je jedna jedinica definirana kao ona količina lipaze koja razgradi 1 μmol para nitrofenil palmitata za 1 minutu. Mjerenje je provedeno u tri paralele.

Test je proveden na slijedeći način: za 240 mL otopine supstrata dodano je 120 mL 100 mM Tris-HCl-a u kojemu je otopljeno 0,1% w/v arapske gume (0,216 g). U pripremljeni pufer s emulgatorom postepeno je dodano 10 mM *p*NPP (izvagano 0,096 g *p*NPP) otopljenog u 24 mL 2-propanola (kap po kap), i naposljetku je dodano 96 mL destilirane vode. Otopina supstrata pripremljena je neposredno prije provođenja testa aktivnosti. Dobivena otopina korištena je za pripremu glavnih proba i kontrola raspada supstrata. Kontrola raspada

supstrata predstavlja slijepu probu. To je reakcijska smjesa bez dodatka ekstrakta. Kontrolu ekstrakta čini reakcijska smjesa sa dodanim ekstraktom bez prisutnosti supstrata, a koristi se za korekciju apsorbancije glavne probe. 100 mL otopine za kontrolu ekstrakta je pripravljeno na način da je u 50 mL 100 mM Tris-HCl-a otopljeno 0,1% w/v arapske gume (0,09 g) , dodano 10 mL 2-propanol te naposljetku 40 mL destilirane vode.

Za svaki ekstrakt pripremljene su tri glavne probe, kontrola supstrata i kontrola ekstrakta u plastične epruvete. U svaku epruvetu dodano je po 3,9 mL otopine. U prethodno zagrijanu vodenu kupelj na 40 °C stavljene su na termostatiranje (5 min) plastične epruvete s otopinom supstrata i otopinom za kontrolu ekstrakta. Nakon 5 min u epruvete je dodano po 100 µL ekstrakta (u glavne probe i kontrolu ekstrakta). U kontrolu supstrata dodano je 100 µL destilirane vode. Nakon dodatka ekstrakata, reakcijske smjese u epruvetama kratko su promiješane na vortex miješalici i termostatirane na 40 °C u vodenoj kupelji 30 min. Nakon 30 min reakcija je prekinuta na način da je u epruvete dodano 1,5 mL Marmur otopine, reakcijska smjesa kratko promiješana na vortex miješalici i centrifugirana na 15 000 g u trajanju od 5 min. Nakon centrifugiranja, u PMMA kivete volumena 1 cm³ je otpipetiran gornji sloj otopine te je izmjerena apsorbancija fenola na 410 nm na spektrofotometru.

Volumna aktivnost enzima izračunate je prema jednadžbi (1):

$$V.A. (U/mL) = \frac{(A_{GP, 410\text{ nm}} - A_{KRS, 410\text{ nm}} - A_{KE}) \cdot D_f \cdot V_{uk}}{t \cdot V_{uzorak} \cdot d \cdot \epsilon} \quad (1)$$

gdje su:

V.A. volumna aktivnost lipaze (U/mL)

$A_{GP, 410\text{ nm}}$ – apsorbancija glavne probe izmjerene na valnoj duljini od 410 nm

$A_{KRS, 410\text{ nm}}$ – apsorbancija kontrole raspada supstrata izmjerene na valnoj duljini od 410 nm

A_{KE} – apsorbancija kontrole ekstrakta izmjerene na valnoj duljini pri 410 nm

D_f – faktor razrjeđenja

V_{uk} – ukupni volumen reakcijske smjese (mL)

t – vrijeme trajanja testa (min)

V_{uzorak} – volumen uzorka dodanog u test (mL)

d – promjer kivete (cm) – 1 cm

ϵ - molarni apsorpcijski koeficijent p-nitrofenola (0,29866 ml/ μ mol·cm)

Specifična aktivnost izračunata je prema jednadžbi (2):

$$S.A. (U/mg) = \frac{V.A.}{m (proteina)} \quad (2)$$

gdje su:

S.A. specifična aktivnost enzima (U/mg)

V.A. volumna aktivnost enzima (U/mL)

m - masa proteina (mg)

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. BIOLOŠKA OBRADA POGAČA U STATIČKIM UVJETIMA I UVJETIMA SA TREŠNJOM

Tijekom uzgoja u statičkim uvjetima praćene su promjene koje se zbivaju u laboratorijskim teglicama, poput rasta bijelih nitastih micelija mikroorganizama na površini, boje uzorka, konzistencije i pojave slobodne vode. Proveden je i pokus u kojemu su teglice bile podložne trešnji, te su također praćene promjene koje se događaju tijekom 20-to dnevne inkubacije.

Za vrijeme uzgoja u statičkim uvjetima primijećen je značajniji rast bijelih nitastih micelija gljiva na površini supstrata (**Slika 5. i 6.**), u usporedbi s uzgojem u kojemu je provedena trešnja (**Slika 7.**) gdje je pojava bijelih nitastih micelija neznatna.



Slika 5. Rast *T. versicolor* na bučinoj pogači u statičkim uvjetima



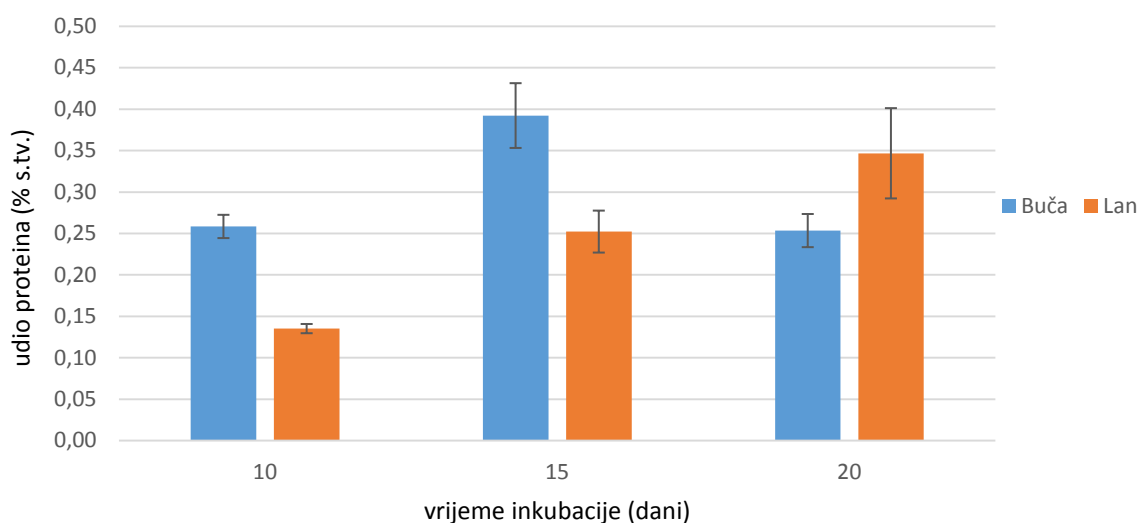
Slika 6. Rast *H. grisea* na pogači lana u statičkim uvjetima



Slika 7. Rast *T. versicolor* na bučinoj pogači u uvjetima trešnje

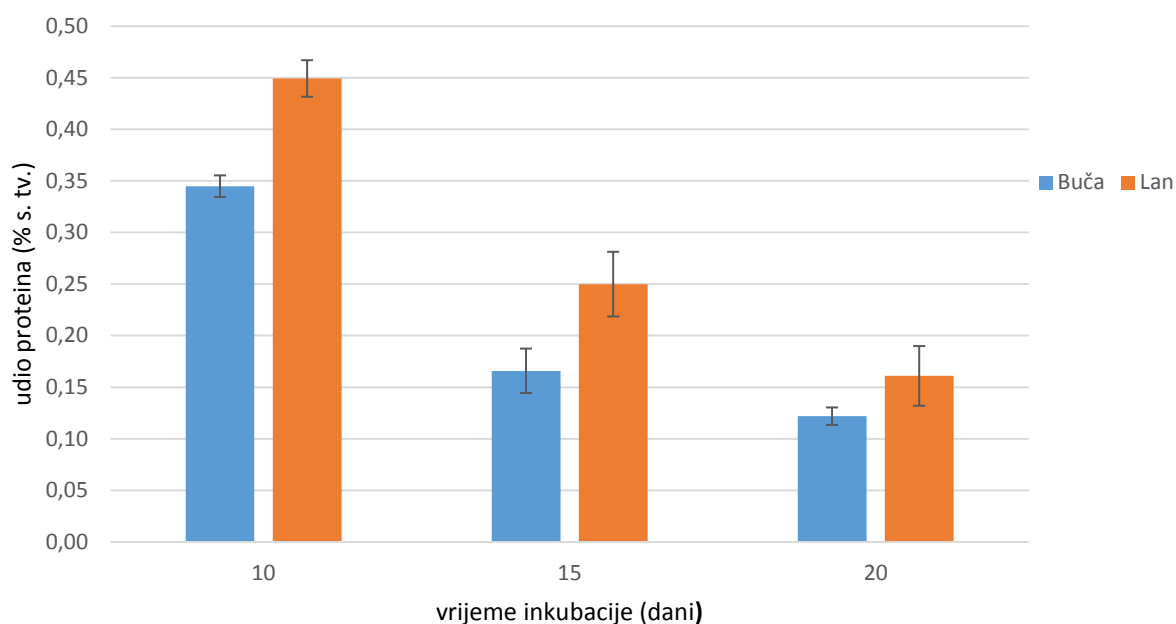
4.2. PROMJENA KOLIČINE EKSTRAKTIBILNIH PROTEINA U POGAČAMA TIJEKOM BIOLOŠKE OBRADJE S *TRAMETES VERSICOLOR* I *HUMICOLA GRISEA*

Udio proteina u ekstraktima nakon 10., 15. i 20. dan biološke obrade pogača buče i lana s *T. versicolor* i *H. grisea* određen je metodom po Bradfordici. Rezultati su prikazani na **Slikama 8. i 9.**



Slika 8. Udio ekstraktibilnih proteina u ovisnosti o vremenu inkubacije kod pogača nacijepljenih s gljivom bijelog truljenja *Trametes versicolor*

Iz **Slike 8.** vidljivo je kako je udio proteina na bučinoj pogači u porastu do 15. dana inkubacije ($0,39 \pm 0,04$ % s.tv.), a nakon toga opada ($0,25 \pm 0,02$ % s.tv.), dok je na pogači lana vidljiv porast proteina tijekom 20 dana inkubacije ($0,35 \pm 0,05$ % s.tv.). Najviši udio ekstraktibilnih proteina određen je na bučinoj pogači nakon 15.-tog dana biorazgradnje pomoću gljive bijelog truljenja.



Slika 9. Udio ekstraktibilnih proteina u ovisnosti o vremenu inkubacije kod pogača nacijspljenih gljivom *Humicola grisea*

Udio ekstraktibilnih proteina pri biorazgradnji pogača buče i lana pomoću gljive *H. grisea* je najveći nakon 10.-tog dana inkubacije nakon čega je vidljiv pad udjela ekstraktibilnih proteina na obje pogače. Iz dijagrama je vidljivo da je ukupni udio ekstraktibilnih proteina određen tijekom biorazgradnje pogače lana veći u odnosu na udio ekstraktibilnih proteina tijekom biorazgradnje pogače buče.

4.3. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI LIPAZE *END-POINT* TESTOM

Proizvodnja enzima lipaze kao produkta metabolizma gljive bijelog truljenja *Trametes versicolor* i gljive *Humicola grisea* provedena je u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima, pogačama buče i lana. Uzorci za analizu uzimani su tijekom biološke obrade u laboratorijskim teglicama 10., 15. i 20-ti dan. U ekstraktima je određena aktivnost enzima prema prije opisanoj metodi, *end-point* testom. Lipaza razgrađuje *p*-nitrofenil palmitat u *p*-nitrofenol, što se očituje po žutoj boji reakcijske smjese, čija je apsorbancija izmjerena na 410 nm i pomoću koje je izračunata aktivnost proizvedene lipaze prema jednadžbama (1) i (2).

Rezultati su prikazani u **Tablicama 3. i 4.**

Tablica 3. Aktivnost lipaze u ekstraktima ispitivanih pogača tijekom biološke obrade s *T.**versicolor*

Vrijeme inkubacije (dani)	Volumna aktivnost (V.A., U/mL)		Specifična aktivnost (S.A., U/mg)	
	Pogača buče	Pogača lana	Pogača buče	Pogača lana
10.	-	1,30±1,13	-	1,07±0,93
15.	-	-	-	-
20.	0,352±0,935	-	0,15±0,41	-

- nije detektirana aktivnost

Tablica 4. Aktivnost lipaze u ekstraktima ispitivanih pogača tijekom biološke obrade s *H.**grisea*

Vrijeme inkubacije (dani)	Volumna aktivnost (V.A., U/mL)		Specifična aktivnost (S.A., U/mg)	
	Pogača buče	Pogača lana	Pogača buče	Pogača lana
10.	1,791±1,93	-	0,57±0,62	-
15.	-	2,622±2,198	-	1,16±0,97
20.	-	-	-	-

Rezultati određivanja aktivnosti lipaze u ekstraktima dobivenim tijekom biorazgradnje pogača buče i lana pomoću *T. versicolor* i *H. grisea* pokazuju izrazito malu aktivnost. U ekstraktima nakon biološke obrade pogače buče (10. i 15.-ti dan) kao i nakon biološke obrade pogače lana (15. i 20.-ti dan) pomoću *T. versicolor* te nakon biološke obrade pogače buče (15. i 20.-ti dan) kao i nakon biološke obrade pogače lana (10. i 20.-ti dan) pomoću *H. grisea* navedenim testom nije bilo moguće odrediti aktivnost proizvedene lipaze. Najveća određena aktivnost proizvedene lipaze iznosi 2,622±2,198 U/mL u ekstraktu nakon 15.-tog dana biološke obrade pogače lana pomoću *H. grisea*. S obzirom na nisku aktivnost lipaze može se pretpostaviti da mikroorganizmi uzgojeni na navedenim pogačama nisu producirali značajnije količine lipaze.

5. ZAKLJUČCI

Na osnovi rezultata istraživanja provedenih u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Rast gljiva *Trametes versicolor* i *Humicola grisea* na pogačama buče i lana bolje uspijeva u statičkim uvjetima, odnosno uz minimalno manevriranje neposredno nakon naciepljivanja.
2. Najviši udio ekstraktibilnih proteina ($0,39 \pm 0,04$ % s.tv.) na bučinoj pogači određen je nakon 15.-tog dana biorazgradnje pomoću gljive bijelog truljenja, *Trametes versicolor*.
3. Najviši udio ekstraktibilnih proteina ($0,45 \pm 0,02$ % s.tv.) na pogači lana određen je nakon 10.-tog dana biorazgradnje pomoću gljive *Humicola grisea*.
4. Najviši udio ekstraktibilnih proteina određen tijekom biorazgradnje s *Trametes versicolor* i *Humicola grisea* na pogačama buče i lana zabilježen je 10. dan na pogači lana nakon biološke obrade s *Humicola grisea* i iznosi $0,45 \pm 0,02$ % s.tv.
5. Najveća određena aktivnost proizvedene lipaze iznosi $2,622 \pm 2,198$ U/mL u ekstraktu nakon 15.-tog dana biološke obrade pogače lana s *H. grisea*. S obzirom na nisku aktivnost lipaze može se pretpostaviti da mikroorganizmi uzgojeni na navedenim pogačama nisu producirali značajnije količine lipaze.

6. LITERATURA

- Bradford M.: A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding; *Analytical Biochemistry* 72, 248-254 (1976.)
- Brkan B.: Katalog bučinog ulja, Ivanić-Grad, 2013.
- Couto S R, Sanroman M A: Application of solid -state fermentation to food industry: a review. *Journal of Food Engineering* 76, 291–302, Elsevier, 2006.
- Dimić, E.: Hladno ceđena ulja, Tehnološki Fakultet, Novi Sad, 88-91, 2005.
- Dumovski, F., Milas, Z.: Priručnik o proizvodnji i upotrebi stočne hrane krme. Hrvatsko agronomsko društvo, Zagreb, 2004.
- Duraković S.: Opća mikrobiologija, Prehrambeno tehnološki inženjering, Zagreb, 1996.
- Durand A: Bioreactor designs for solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 13, 113–125, Elsevier, 2003.
- Gadd G M: Fungi in bioremediation. Press syndicate of the University of Cambridge, Cambridge, 2001.
- Hou L., Hhu Y.: Karakterizacija i dobivanje proteina modifikacijom nusprodukta meljave riže pomoću proteaza, *Food Technology and Biotechnology*, Vol 48. No1 2010.
- Iso M, Chen B, Eguchi M, Kudo T, Shrestha S: Production of biodiesel fuel from tryglycerides and alcohol using immobilized lipase. *Journal of Molecular Catalyses B: Enzymatic*, 16: 53-58, 2001.
- Isroi, Millati R, Syamsiah S, Niklasson C, Cahyanto MN, Lundquist K, Taherzadeh MJ: Biological pretreatment of lignocelluloses with white-rot fungi and its applications: A review *Bioresources*, 6:5224-5259, 2011.
- Joao: Producao do etanol Celulosico a Partir de enzimas fungicas, 2011.
- Jozinović A, Šubarić D, Ačkar Đ, Miličević B, Babić J, Jašić M, Valek Lendić K: Food industry by-products as raw materials in functional food production. *Hrana u zdravlju i bolesti, znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku*, 3(1):22-30, 2014.
- Jozinović: Svojstva kukuruznih snack proizvoda obogaćenih nusproizvodima prehrambene industrije, Doktorska disertacija, 2015.
- Lason E, Ogonovski J: Lipase-Characterization, Applications and Methods of Immobilization. *CHEMIK*, 64, 2: 97-10, 2010.

- Le T.T., Phan T.T.Q., Van Camp J., Dewettinck K.: Milk and Dairy Polar Lipids: Occurrence, Purification, and Nutritional and Technological Properties; Polar Lipids: Biology, Chemistry, and Technology, pp. 91-143, 2015.
- Leder F.-ne, Molnar, I., A nagy taperteku olajtokmag-presmaradek hasznositasi lehetosege, Gabonaipar, 1993.
- Markeš M.: Sirutka kao industrijska sirovina; Mljekarstvo: časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka, Vol.17 No 4. 1967.
- Mitchell, D. A., Berović, M., Krieger, N.: Overview of solid state bioprocessing. Biotechnol. Annu. Rev. 8, 183-225., 2002.
- Mitchell D. A., Berović, M. (2003) Solid state fermentations. U: Bioprocess engineering: doctoral/post-doctoral level course, (Berović, M., Kieran, P., ured.), Faculty of Chemistry and Chemical technology, Ljubljana, str. 202-230.
- Mitchell D., Berović M.: Solid state bioprocessing, Biochemical engineering principles, European federation on biotechnology, 204-236, 2006.
- Mitchell DA, Krieger N, Berović M: Solid State Fermentation Bioreactors Fundamentals of Design and Operation, Springer-Verlag, Berlin 2006.
- Moslavac T., Jokić S., Pozderović A., Pichler A., Škof B.: Proizvodnja i stabilizacija hladno prešanog bučinog ulja ; Glasnik zaštite bilja 6/2014.
- Ognjanović ND, Petrović SD; Bezbradica DI, Knežević-Jugović ZD: Lipaze kao biokatalizatori u sintezi biodizela. Hemijska industrija, 64: 1-8, 2010.
- Palacios D., Busto M., Ortega N.: Study of a new spectrophotometric end-point assay for lipase activity determination in aqueous media; LWT-Food Science and Technology 55 (2014) 536-542
- Pandey A: Solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal 13, 81–84, Elsevier, 2003.
- Pandey A, Soccol CR, Larroche C : Current Developments in Solid-state Fermentation. Asiatech Publishers Inc., New Delhi, 2008.
- Pejin D J: Industrijska mikrobiologija. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, 2003.
- Rac, M.: Ulja i mast, Privredni preged, Beograd, 1964.
- Raimbault M: General and microbiological aspects of solid-state fermentation. Electronic Journal of Biotechnology, Vol. 1, No. 3, 1998.
- Ramachandran et al.: Bioresource Technology 98 (2007) 2000-2009.

- Satyanarayana T., Littlechild J., Kawarabayasi Y.: *Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology*, 2013.
- Schyu D.J.H., J.T.C Tzen i C.L.Jeang: *Enzyme Activities.U Food Biochemistry and Food Processing*, Blackwell Publishing, USA, 2006.
- Sito S.; Barčić, J.; Ivančan, S. Utjecaj različitih temperatura radnog medija na trajanje procesa sušenja visoko vlažnih sjemenki buče nakon pranja (*Cucurbita pepo* L.). *Agriculturae conspectus scientificus/Poljoprivredna znanstvena smotra*, 63 (4), 285-290, 1998.
- Stanković, V., Petrović, R.: Biološka i produktivna svojstva perspektiv nih linija konzumnog i uljanog lana, 39. savetovanje industrije ulja: Proizvodnja i prerada uljarica, Zbornik radova, pp. 279-282, Budva, 1998.
- Šimetić S: Lan u proizvodnji i upotrebi, Zavod za sjeme i rasadničarstvo Osijek, 217 -220, 2008.
- Šuran J., Božić F.: *Farmakografija i oblici lijekova*, 2015.
- Trevor M. Letcher (Ed), Elsevier Ltd., 1. *Future energy: Improved, Sustainable and clean options For our planet*, Amsterdam 2008.
- Tišma M: Proizvodnja lakaze submerznim uzgojem *Trametes versicolor*. Doktorski rad, Zagreb, 2010.
- Wang E Q, Li S Z, Tao L, Geng X, Li T C: Modeling of rotating drum bioreactor for anaerobic solid-state fermentation. *Applied Energy* 87, 2839–2845, Elsevier, 2010.
- Webster J, Weber R W S: *Introduction to Fungi*. Cambridge University Press, 2007.
- Worsfold P., Townshend A., Poole C.: *Encyclopedia of Analytical Science*, Elsevier, Oxford, 2005.
- Yağcı S, Göğüş F: Effect of incorporation of various food by-products on some nutritional properties of rice-based extruded foods. *Food Science and Technology International*, 21:613-630, 2010.
- Xavier A. M. R. B., Tavares A. P. M., Ferreira R., Amado F.: *Trametes versicolor* and laccase induction with by-products of pulp and paper industry, *EJB*, 2007.
- Xiong H: Production and Characterization of *Trichoderma reesei* and *Thermomyces Lanuginosus* Xylanases, Disertacija, Helsinki University of Technology, Helsinki, 2004.
- Zvekić, D., Popović, J.: *Hranidba stoke na obiteljskom gospodarstvu*, Bjelovar, 2005.