

Utjecaj dodatka kukuruzovine na aktivnost lakaze tijekom submerznog uzgoja *Trametes versicolor*

Kolaković, Anita

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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:109:472632>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Anita Kolaković

**UTJECAJ DODATKA KUKURUZOVINE NA AKTIVNOST
LAKAZE TIJEKOM SUBMERZNOG UZGOJA *TRAMETES*
*VERSICOLOR***

DIPLOMSKI RAD

Osijek, srpanj 2015.

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: Kemijski i biokemijski reaktori

Tema rada je prihvaćena na VII. sjednici Fakultetskog vijeća

Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 28.4.2015.

Mentor: doc. dr. sc. Marina Tišma

UTJECAJ DODATKA KUKURUZOVINE NA AKTIVNOST LAKAZE TIJEKOM SUBMERZNOG UZGOJA *TRAMETES VERSICOLOR*

Anita Kolaković, 257 - DI

Sažetak:

Cilj rada bio je optimirati sastav hranjive podloge za proizvodnju enzima lakaze iz gljive bijelog truljenja *Trametes versicolor* AG 613 koristeći metodu odzivnih površina. Istraživan je utjecaj početne koncentracije biomase, glukoze, kukuruzne silaže i Calplexa H90 na volumnu aktivnost lakaze. Najveća aktivnost lakaze ($V.A. = 2345,9 \text{ U dm}^{-3}$) je postignuta treći dan fermentacije u pokusu s početnom koncentracijom inokuluma ($\gamma_{X,0} = 20 \text{ g dm}^{-3}$), glukoze ($\gamma_{\text{Glukoza}} = 10 \text{ g dm}^{-3}$), kukuruzne silaže ($\gamma_{\text{IND},0} = 40 \text{ g dm}^{-3}$) i Calplexa H90 ($\gamma_{\text{Calplex}} = 5 \text{ g dm}^{-3}$).

Ključne riječi: *Trametes versicolor*, lakaza, submerzna fermentacija, metoda odzivnih površina

Rad sadrži: Slika: 35
Stranica: 51
Tablica: 11
Priloga: 2
Literarnih referenci: 36

Jezik izvornika: Hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

- | | |
|---------------------------------------|---------------|
| 1. izv. prof. dr. sc. Mirela Planinić | Predsjednik |
| 2. doc. dr. sc. Marina Tišma | član-mentor |
| 3. izv. prof. dr. sc. Ana Bucić Kojić | Član |
| 4. doc. dr. sc. Sandra Budžaki | zamjena člana |

Datum obrane: 17. srpnja 2015.

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 Strossmaier in Osijeku
Faculty of Food Technology Osijek
Department of process engineering
Subdepartment of thermodynamic and reaction engineering
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Croatia

Scientific area: Biotechnical science

Scientific field: Biotechnology

Course title: Chemical and biochemical reactors

Thesis subject was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology Osijek at its session no. VII. held on July 17th, 2015.

Mentor: *Marina Tišma*, PhD, assistant prof.

**Influence of corn silage addition on laccase activity during submerge cultivation of
Trametes versicolor
Anita Kolaković, 257 - DI**

Summary:

The aim of this work was to optimize the nutrient media for the production of laccase from *Trametes versicolor* AG 614. The influence of initial concentration of inoculum, glucose, corn silage and Calplex H90 were investigated. The highest laccase activity ($2345,9 \text{ U dm}^{-3}$) was gained after three days of fermentation with the initial concentration of inoculum ($\gamma_{X,0} = 20 \text{ g dm}^{-3}$), glucose ($\gamma_{\text{Glukoza}} = 10 \text{ g dm}^{-3}$), corn silage ($\gamma_{\text{IND},0} = 40 \text{ g dm}^{-3}$) and Calplexa H90 ($\gamma_{\text{Calplex}} = 5 \text{ g dm}^{-3}$).

Key words: *Trametes versicolor*, laccase, submerged fermentation, response surface method

Thesis contains: Figures: 35
Pages: 51
Tables: 11
Supplements: 2
References: 36

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|--|--------------|
| 1. <i>Mirela Planinić</i> , PhD, associate prof. | chair person |
| 2. <i>Marina Tišma</i> , PhD, assistant prof. | supervisor |
| 3. <i>Ana Bucić Kojić</i> , PhD, associate prof. | member |
| 4. <i>Sandra Budžaki</i> , PhD, assistant prof. | stand-in |

Defense date: July 17, 2015.

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

Zahvaljujem se mojoj mentorici doc. dr. sc. Marini Tišmi na posvećenom vremenu, strpljenju i korisnim savjetima tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Suradnici i kolegici mag. ing. Gordani Šelo na korisnim savjetima i pomoći koju mi je pružala tijekom dugog rada u laboratoriju.

Također, hvala kolegici i prijateljici Dragani Kajić na bezuvjetnom prijateljstvu, potpori te korisnim savjetima.

Posebnu zahvalu posvećujem svojim roditeljima, baki Dragi te sestri Josipi koji su uvijek bili uz mene te mi pružali bezuvjetnu podršku i razumjevanje tijekom cijelog školovanja. Svoju diplomu posvećujem njima.

Ovaj rad izrađen je u sklopu "ProBioTech" projekta koji je sufinancirala Europska unija iz Europskog Fonda za regionalni razvoj (EFRR).



Ministarstvo
znanosti,
obrazovanja
i sporta



KONKURENTNA
HRVATSKA



STRUKTURNI INVESTICIJSKI
FONDOVI



Ulaganje u budućnost!

Europska unija

Sadržaj

1.	UVOD	1
2.	TEORIJSKI DIO.....	4
2.1.	GLJIVE	6
2.1.1.	Morfologija gljiva.....	6
2.1.2.	Ishrana gljiva	6
2.1.3.	Klasifikacija gljiva.....	7
2.2.	GLJIVE BIJELOG TRULJENJA	7
2.2.1.	<i>Trametes versicolor</i>	8
2.3.1.	Lakaze	9
2.3.2.	Utjecaj pH na proizvodnju i aktivnost lakaze	10
2.3.3.	Utjecaj temperature na proizvodnju i aktivnost lakaze	10
2.4.	PROIZVODNJA LAKAZE	10
2.4.1.	Utjecaj induktora na proizvodnju lakaze	11
2.4.1.1.	Kukuruzna silaža i mogućnosti njene uporabe kao induktora	11
2.4.2.	Primjena lakaze	12
2.5.	NAČINI UZGOJA GLJIVA BIJELOG TRULJENJA	13
2.5.1.	Submerzni uzgoj mikroorganizama	13
2.5.2.	Oblik i formiranje peleta.....	14
2.6.	Optimiranje sastava hranjive podloge primjenom metode odzivnih površina	14
3.	EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.3.	ZADATAK	18
3.4.	MATERIJALI I METODE	18
3.4.1.	Mikroorganizam	18
3.4.2.	Kukuruzovina.....	18
3.4.3.	Kemikalije	18
3.4.4.	Aparatura	19
3.4.5.	Uzgoj i čuvanje kulture	20
3.4.6.	Priprema tekuće hranjive podloge za uzgoj inokuluma.....	20
3.4.7.	Priprema hranjive podloge za proizvodnju enzima	21
3.5.	ANALITIČKE METODE	22
3.5.1.	Mjerenje aktivnosti enzima lakaza.....	22

3.5.2.	Određivanje koncentracije proteina Bradfordičinom metodom	23
4.	REZULTATI I RASPRAVA	25
4.1.	PROIZVODNJA ENZIMA LAKAZE	26
4.1.1.	Utjecaj početnih koncentracija biomase, induktora, glukoze i Calplexa H90 na proizvodnju lakaze iz <i>Trametes versicolor</i> AG 613.....	33
5.	ZAKLJUČCI	44
6.	LITERATURA	46
7.	PRILOZI.....	50

Popis kratica, oznaka i simbola

KRATICE:

ABTS	2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)
ADF	kisela detergent vlakna
BSA	goveđi serumski albumin
CCBAS	Mikrobiološka zbirka bazidiomiceta, Prag, Republika Češka
df	stupnjevi slobode
F	faktor koji pokazuje koliko je jedna varijanca veća od druge
FDA	eng. <i>Food and Drug Administration</i> ili Agencija za hranu i lijekove
HAA	3-hidroksiantranilat
HBT	1-hidroksibenzotriazol
LiP	lignin peroksidaza
MnP	mangan peroksidaza
MS	prosječno odstupanje varijanci od prosječne vrijednosti uzoraka
NDF	neutralna detergent vlakna
RSM	eng. <i>response surface methodology</i> ili metoda odzivnih površina
SmF	submerzna fermentacija
SSF	eng. <i>solid-state fermentation</i> ili fermentacija na čvrstim nosačima
SSM	eng. <i>solid sample module</i> ili modul za čvrste uzorke
TC	ukupni ugljik
TEMPO	2, 2, 6, 6-tetrametil piperidin-1-oksid radikal
TOC	eng. Total Organic Carbon ili analizator ugljika
U	međunarodna jedinica enzimске aktivnosti ($\mu\text{mol min}^{-1}$)

OZNAKE:

<i>c</i>	množinska koncentracija tvari (mM)
<i>d</i>	promjer kivete (cm)
<i>n</i>	broj okretaja (okr min^{-1})

$S.A.$	specifična aktivnost enzima (U mg^{-1})
T	temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
t	vrijeme (dan)
$V.A.$	volumna aktivnost enzima (U dm^{-3})
V_E	volumen dodanog uzorka koji sadrži enzim (cm^3)
V_r	ukupni volumen uzorka u kivetu (m^3)
γ_E	masena koncentracija enzima (mg cm^{-3})
$\gamma_{IND,O}$	početna koncentracija induktora (g dm^{-3})
$\gamma_{X,O}$	početna koncentracija biomase (g dm^{-3})
$\Delta A/\Delta t$	promjena apsorbancije u vremenu (min^{-1})

SIMBOLI:

Δ	promjena
λ	valna duljina (nm)
ε	ekstinkcijski koeficijent ($\text{dm}^{-3} \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

1.UVOD

U današnje vrijeme se u svim područjima, od znanosti i tehnologije pa do gospodarstva, postavljaju zahtjevi za upotrebom ekološki prihvatljivih materijala i sirovina. Razlog tomu je što svijet u kojem živimo postaje sve manji i zagađeniji. Način života na koji smo navikli živjeti uvjetuje široku potrošnju te proizvodnju svakodnevnih predmeta, a često mehanizmi proizvodnje nisu prilagođeni potrebama očuvanja okoliša. Postavlja se pitanje kako ostvariti energetske i materijalne učinkovite procese, a istovremeno zadovoljiti potrebe zaštite okoliša? Odgovor je jednostavan, nalazi se oko nas, nalazi se u prirodi. 3,8 milijardi godina istraživanja i razvoja u velikom laboratoriju prirode čini ju uistinu savršenim kandidatom za istraživanje te preuzimanje principa koji će omogućiti i slijedećim generacijama normalne uvjete za život (Janeš, 2009).

U toj viziji, važnu ulogu imaju enzimске tehnologije jer provode kemijske procese na puno ekonomičniji i energetski i okolišu prihvatljiviji način, a istovremeno su i industrijski vrlo prihvatljive. One se mogu provoditi u vodenim otopinama, pri sobnim temperaturama i neutralnom pH, bez upotrebe visokih tlakova i ekstremnih uvjeta te uz minimalan utrošak energije.. Zbog navedenih prednosti enzima, interes za enzimskim biotransformacijama je velik, a nove biokemijske i analitičke metode omogućavaju razumijevanje mehanizma djelovanja enzima te identificiranje novih enzima.. Primjenom genetičkog inženjerstva, moguće je proizvesti točno željeni enzim posebnih značajki (Pilaš, 2009).

Jedni od najduže proučavanih biokatalizatora su lakaze koje su do danas izolirane iz raznih izvora. U odnosu na druge biokatalizatore, njihova najveća prednost je da im je za katalitičku aktivnost potreban kisik, stoga se ubrajaju u ekološki prihvatljive biokatalizatore. Lakaze su vrlo zanimljive industrijskom sektoru jer se odlikuju specifičnošću prema različitim supstratima: *o*- i *p*-difenolima, aminofenolima, poliaminima, polifenolima, monofenolima. Lakaze se primjenjuju u raznim industrijama kao što su tekstilna industrija, industrija pulpe i papira, zaštita okoliša, prehrambena, kozmetička te farmaceutska industrija (Xavier i sur., 2007).

Najpoznatiji i najvažniji izvor lakaza su gljive, posebno gljive bijelog truljenja, jedini do sada poznati mikroorganizmi sa razvijenim kompleksnim enzimatskim sustavom koji omogućava razgradnju lignina i drugih aromatskih spojeva. Primjerice *Trametes versicolor*, gljiva bijelog truljenja iz razreda *Basidiomycetes*, proizvodi smjesu lignolitičkih enzima od kojih su najznačajniji lakaze, lignin peroksidaze i mangan peroksidaze.

Dostupnost hranjivih tvari i uvjeti provedbe procesa osnovni su čimbenici o kojima treba voditi računa pri samom uzgoju gljive, budući da značajno utječu na produktivnost enzima, a važnu ulogu ima dodatak induktora, čime se pospješuje proizvodnja enzima. U ovom radu je praćen utjecaj različite početne koncentracije induktora odnosno kukuruzne

siláže, glukoze, biomase te Calplexa H90 (otpad iz industrije papira) na aktivnost lakaze, a procesi uzgoja micelijskih peleta i proizvodnje enzima su provedeni submerzno. Sastav hranjive podloge je optimiran koristeći metodu odzivnih površina sa ciljem postizanja maksimalne aktivnosti lakaze.

2.TEORIJSKI DIO

Mikrobiologija je područje biologije koje proučava organizme koji nisu vidljivi golim okom. Jedna je od najširih bioloških znanosti. Bavi se različitim disciplinama koje proučavaju međudjelovanje čovjeka i mikroorganizama te okoliša i mikroorganizama. Ta se međudjelovanja očituju kroz genetiku, infekcije, bolesti, imunologiju, industriju, genetski inženjering, poljoprivredu, ekologiju i kroz još mnoge druge discipline. Povijest mikrobiologije počinje 1673. godine. Anthony van Leeuwenhoek, nizozemski trgovac, prvi puta opisuje mikroorganizme koje je proučavao na vlastitom mikroskopu. Međutim, sama primjena mikroorganizama seže puno više u prošlost. Najranija upotreba mikroorganizama se veže uz fermentaciju i proizvodnju piva i vina (Duraković, 1996).

Razvojem mikroskopa, otvorene su mnoge mogućnosti u području istraživanja koje su svojim radom obilježili Louis Pasteur, Robert Koch te mnogi drugi. Do naglog razvoja mikrobiologije je došlo početkom 20. stoljeća (Kirk, 1981).

Najčešći predstavnici mikroorganizama su virusi, bakterije, alge, fungi i protozoe. Njihova rasprostranjenost je veoma široka, naseljavaju svaki dio biosfere gdje je prisutna tekuća voda. Mogu se naći i u naftnim bušotinama, na dnu oceana, u vrelim izvorima, pustinjama te uz vulkanske izvore vrele vode na dnu oceana. Rastu u različitim temperaturnim uvjetima, pa se prema tome mogu podijeliti na termofile, mezofile i psihrofile (Kirk, 1981).

Stanište mikroorganizama je usko vezano i uz čovjeka. Njihova uloga u ljudskom tijelu je raznolika; pomažu u probavi, prekrivaju kožu i štite od štetnih utjecaja, ali mogu imati i patogena svojstva.

Osnovno obilježje mikroorganizama je mala veličina njihovih stanica. Budući da su mali organizmi, odnos između same površine i volumena stanice je vrlo velik, a posljedica toga je velika i naizmjenična reakcija s okolišem, upravo to predstavlja osnovu za veliku brzinu izmjene tvari u mikroorganizama. Može se reći, da što je stanica manja, njezina površina je veća u usporedbi s masom, a samim time je brža apsorpcija hrane te tijekom ukupnih biokemijskih reakcija. Kod viših biljaka i životinja količina enzima u stanicama je nepromjenjiva pa su fiziološki ograničeni, a mikroorganizmi pokazuju puno veću fiziološku prilagodljivost, što je posljedica njihove male dimenzije (Duraković, 1996).

Mikrobiologija i njezine grane se danas razvijaju brzim tempom. Povezanost razvoja informacijskih i računalnih tehnologija te biotehnoloških znanosti omogućuju široku primjenu mikroorganizama u ljudskim djelatnostima. Snažan razvoj zahvaljujući modernoj tehnološkoj revoluciji su doživjele medicina i biokemijsko inženjerstvo, genetika, virologija, ekologija, ekoinženjerstvo, prehrambena, farmaceutska, tekstilna te papirna industrija.

2.1. GLJIVE

2.1.1. Morfologija gljiva

Proučavanjem gljiva bavi se mikologija, jedna od prvih mikrobioloških znanosti. Gljive ili fungi uključuju kvasce, plijesni te mesnate gljive (skupina makroskopskih organizama).

Budući da su biokemijski aktivne, mnoge gljive imaju i iznimnu komercijalnu ulogu u proizvodnji piva, vina, antibiotika te fermentiranih mliječnih proizvoda. Međutim, neke gljive izazivaju infektivne bolesti sintetizirajući snažne toksine (Duraković, 1996).

Tablica 1 Osnovne karakteristike gljiva

Tip stanice	eukarioti s jasno određenom jezgrinom membranom
Stanična stjenka	građena od glukana, manana, hitina
Spore	proizvode velik broj spolnih i nespolnih spora
Metabolizam	heterotrofi (aeroban i fakultativno anaeroban)

2.1.2. Ishrana gljiva

Gljive dobro rastu u vlažnom i tamnom okolišu, ali i na svim mjestima gdje je dostupan organski materijal. Najveći broj gljiva su saprofiti, organizmi koji sve potrebne hranjive tvari dobivaju iz mrtve organske tvari. Mogu izlučivati hidrolitičke enzime koji razgrađuju supstrate prisutne u okolišu. Zatim otopljene hranjive tvari apsorbiraju. Gljive su i kemoorganoheterotrofi koji upotrebljavaju organski materijal kao izvor ugljika, elektrona i energije.

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

Gljive su u pravilu aerobni organizmi, ali neki kvasci mogu biti i fakultativni anaerobi te mogu proizvoditi energiju fermentacijom (Duraković, 1996).

2.1.3. Klasifikacija gljiva

Postoje pet taksonomskih skupina gljiva koje se međusobno razlikuju prema tipu spora, morfologiji hifa i spolnom ciklusu. Te skupine su:

- *basidiomicete*
- *oomicete*
- *deuteromicete*
- *zigomicete*
- *askomicete*

Gljive *Basidiomycetes*, koje su općenito poznate kao gljive klobučarke pripadaju razredu *Basidiomycotina*. Njima pripadaju sve gljive koje rastu na drveću, gljive puhare, jestive gljive, snijeti, hrđe i otrovne gljive. Ime su dobile po karakterističnoj strukturi njihove stanice, bazidiuma (grč. *basidion* – mala baza). Bazidium je uključen u spolni način razmnožavanja, a proizvodi se na tipičnoj hifi i najčešće je oblika klobuka. Bazidiospore se proizvode u bazidiumu, a bazidiji mogu biti zatvoreni unutar plodonosnih tijela koje se nazivaju bazidiokarpi. Ustanovljeno je da najveći broj bazidiomiceta žive kao saprofiti te razgrađuju biljni materijal, najviše celulozu i lignin (Duraković, 1996).

2.2. GLJIVE BIJELOG TRULJENJA

Još od davnina drvo se koristi kao građevni i uporabni materijal, a tome je svakako pridonijela njegova laka obrada, dug vijek trajanja te široka rasprostranjenost. U starim povijesnim zapisima je objašnjeno kako su Egipćani štitili drvo premazujući ga prirodnim uljima. Mnogi narodi, naročito Kinezi i Asirci, razvili su metode čuvanja drvenog materijala koje se koriste i danas (Janeš, 2009).

Gljive bijelog truljenja su jedini dosada poznati organizmi koji imaju sposobnost razgradnje lignina i nastanjuju se na mrtvom ili živom drvetu. Općenito, gljive koje razgrađuju drvo dijele se na gljive smeđeg, bijelog i blagog truljenja (Merwe, 2002).

Gljive bijelog truljenja uključuju razrede *Basydiomyceta* i *Ascomyceta*. Razgrađuju lignocelulozne supstrate tako što luče učinkovitu ekstracelularnu kombinaciju enzima čija mogućnost razgradnja prirodnog polimera lignina u molekule manje molekularne mase. Tijekom delignifikacije, supstrat se obezboji, upravo su po tome te gljive dobile naziv. Nalaze se svuda oko nas, a zbog svoje široke rasprostranjenosti u prirodi, vrlo su dostupne.

Kako bi se provela uspješna razgradnja lignina, neophodna je kombinacija izvanstaničnih lignolitičkih enzima kao što su lignin peroksidaze (LiP), mangan peroksidaze (MnP) i lakaze. S obzirom na proizvodnju lignolitičkih enzima, gljive bijelog truljenja se dijele u tri skupine:

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

Najzastupljenije su gljive bijelog truljenja koje proizvode MnP i lakazu (Lankinen, 2004). Kada su uzgojene submerzno ili na drvetu, gljive bijelog truljenja proizvode lakaze niskih koncentracija. Više koncentracije se postižu dodatkom različitih aromatskih spojeva, induktora (Merwe, 2002).

Mnoga su istraživanja provedena u posljednje vrijeme u cilju proizvodnje lignolitičkih enzima. Naime, ti enzimi nisu specifični i prema tome imaju široku primjenu. Posebnu primjenu nalaze i u industriji za proizvodnju tekstilnih boja. Upravo njihova upotreba polako zamjenjuje sintetske boje prisutne na tržištu (Wesenberg i sur., 2003.). Nakon što je svijet postao upoznat sa funkcijom lignolitičkih enzima, neki drugi znanstvenici su im pronašli primjenu i u bioremedijaciji. Njihova funkcija nije samo razgradnja lignina već i drugih onečišćujućih supstanci iz tla (Mester i Tien, 2000).

Unatoč brojnim istraživanjima o oksidativnom mehanizmu lignolitičkih enzima te o delignifikaciji, može se zaključiti da još uvijek nije potpuno jasan mehanizam razgradnje lignina, prema tome još uvijek ima mjesta napretku (Mester i Tien, 2000).

2.2.1. *Trametes versicolor*

Trametes versicolor je gljiva bijelog truljenja iz razreda *Basidiomycetes*, koja proizvodi tri lignolitička enzima te učinkovito razgrađuje lignin, policikličke aromatske ugljikovodike, poliklorirane bifenilne smjese i brojna sintetska bojila. Budući da proizvodi niže koncentracije lignolitičkih enzima, dokazano je da prisutnost induktora kao što su ksilidin, veratrilni alkohol i fenolne smjese povećavaju aktivnost.

Ova gljiva, kao što je već i prethodno rečeno, provodi delignifikaciju i izbjeljivanje kraft pulpe, učinkovito obezbojuje izljeve nastale izbjeljivanjem pulpe. Primjena gljive *Trametes versicolor* u različitim područjima izvrstan je temelj za razvoj brojnih tehnologija koje će biti ekološki prihvatljive (Xavier i sur., 2007).



Slika 1 *Trametes versicolor*

2.3.1. Lakaze

Lakaza, enzim koji dolazi iz skupine oksidoreduktaze, s obzirom na porijeklo može se podijeliti u dvije skupine: lakaza koja je porijeklom iz viših biljaka te na one koje su porijeklom iz gljiva. Međutim, istraživanja su pokazala da se ovaj enzim može izolirati i iz bakterija te kukaca (Lankinen, 2004).

Lakaze su većinom ekstracelularni glikoproteini sa molekularnom masom između 60 i 80 kDa (Merwe, 2002.). Pripadaju skupini metaloenzima, a sastoje se od četiri atoma bakra smještenih u aktivnom mjestu svake enzimске molekule, prema tome odgovorni su za katalitičku aktivnost lakaze. Oksidacijom supstrata nastaju reaktivni radikali nakon čega može doći do jedne od tri reakcije: neenzimsko povezivanje monomera, razgradnja polimera ili cijepanje aromatskog prstena. U prisutnosti posrednika, lakaze mogu katalizirati reakcije oksidacije kod bilo kojih komponenta koje posjeduju visoki redoks potencijal (0,5 – 0,8 mV) stoga, kataliziraju oksidaciju *o*-, *p*- difenola, aromatskih alkohola, polifenola, poliamina, aromatskih amina i različitih nefenolnih supstrata (Burton, 2003). Uloga posrednika u reakcijama oksidacije kataliziranih lakazom je proučavana u mnogim istraživanjima. Postoje različiti tipovi posrednika. Najučinkovitiji posrednik je TEMPO (2,2,6,6 tetrametil piperidin-1-oksiradikal) (Kulyis, Vidziuniute, 2005.). Za lakaze koje su izolirane iz gljiva bijelog truljenja, općenito se smatra da funkcioniraju u prirodi razgrađujući lignin te pri samom procesu delignifikacije oslobađa se ugljik (Burton, 2003).

Lakaza može razgraditi fenolne podjedinice lignina koje čine 10 – 15 % lignina, međutim za nefenolne podjedinice, lakaza djeluje pomoću posrednika 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6 sulfonska kiselina) (ABTS), 1-hidroksibenzotriazol (HBT) i 3-hidroksiantranilat (HAA) (Radečić, 2009).

2.3.2. Utjecaj pH na proizvodnju i aktivnost lakaze

Optimalni pH lakaze u visokoj mjeri ovisi o supstratu. Koristeći ABTS kao supstrat, optimalna pH vrijednost pri kojoj, lakaza nastala iz gljiva bijelog truljenja, postiže najveću aktivnost je u kiselom području, između pH 3 i pH 5 (Merwe, 2002; Madhavi i Lele, 2009). Na aktivnost lakaze može utjecati koncentracija supstrata, kisika i samog enzima. Najveću aktivnost lakaza iz *Trametes versicolor* postiže pri pH 2 do pH 6 (Madhavi i Lele, 2009).

2.3.3. Utjecaj temperature na proizvodnju i aktivnost lakaze

Brojna istraživanja su pokazala da se za optimalnu proizvodnju lakaze, gljive uzgajaju na temperaturi između 25 °C i 30 °C (Merwe, 2002). Ukoliko se uzgoj gljiva obavlja pri temperaturi višoj od 30 °C, može doći do smanjenja aktivnosti lakaze (Merwe, 2002).

Temperatura pri kojoj lakaza postiže najveću aktivnost ovisi o izvoru iz kojega je izolirana te se razlikuje za svaki pojedini soj mikroorganizama. Primjerice, lakaza izolirana iz *Marasimius quercophilus* je stabilna oko jedan sat pri temperaturi 60 °C. Istraživanja su pokazala da preinkubacijom enzima iz *Marasimius quercophilus* pri 40 °C i 50 °C može doći do povećanja aktivnosti lakaze (Merwe, 2002).

2.4. PROIZVODNJA LAKAZE

Bioprocesi u kojima se uzgajaju mikroorganizmi se nazivaju mikrobni procesi. Tijekom mikrobnog procesa dolazi do rasta biomase koji se izražava:

- nastalom masom mikroorganizama,
- mogućim formiranjem produkata metabolizma mikroorganizama,
- transformacijom otapala pomoću mikroorganizama (Mlinarek, 2009).

Gljive bijelog truljenja proizvode niže koncentracije lakaze tijekom submerznog uzgoja i tijekom uzgoja na čvrstim nosačima, a više koncentracije se mogu postići dodatkom raznih induktora o čemu će više govora biti u **Poglavlju 2.4.4.** (Merwe, 2002).

2.4.1. Utjecaj induktora na proizvodnju lakaze

Induktori su često sastavni dio složenih hranjivih podloga u submerznom uzgoju jer u velikoj mjeri pridonose produktivnosti enzima. Oni mogu biti poljoprivrednog porijekla poput kukuruzovine, sirka te sličnih žitarica, zatim mekinje, piljevina, stabljike grožđa, kora voća i povrća i slično. Najviše se upravo ovi induktori koriste prije svega zbog ekološke prihvatljivosti, ali i zbog niskih troškova jer su često nusproizvodi iz različitih industrija. Induktori također mogu biti sintetskog porijekla, kao što su ferulična kiselina, ksilidin, etanol, brojni aromatski spojevi, različite smjese fenolnih spojeva (Xavier i sur., 2007; Nityanand, 2011).

2.4.1.1. Kukuruzna silaža i mogućnosti njene uporabe kao induktora

Kukuruzna silaža je mješavina stabljike, listova i klipa (zrna) koja zaostaje nakon žetve kukuruza na oranicama. Kukuruzna silaža je glavno voluminozno krmivo obroka muznih krava i junadi u SAD-u i Europi. U odnosu na silaže drugih voluminoznih krmiva, kukuruznu silažu odlikuje laka i fleksibilna proizvodnja i spremanje te udio suhe tvari. Dobro pripremljena silaža može se uspješno čuvati duži niz godina, što je od velike važnosti za sigurnu i kontinuiranu hranidbu. Kukuruzna silaža ima svojstva voluminoznog krmiva zbog vlakana, a koncentratnog krmiva zbog škroba (Grbeša, 2008).

Na kvalitetu i sastav kukuruzne silaže (**Tablica 2**) utječu brojni faktori poput vremena siliranja, visine reza, suhe tvari, učešća zrna, lišća i stabljike u ukupnoj silažnoj masi (Nestor, 2010). Osim što se koristi u ishrani stoke zbog dobrih nutritivnih vrijednosti, u posljednje vrijeme primjenu pronalazi i u bioplinskim postrojenjima za proizvodnju bioplina procesom anaerobne digestije. Energetska vrijednost i sadržaj hranjivih tvari su biološki određeni omjerom stabljike, lista i klipa zrna u suhoj tvari hibrida. Određena je razinom gnojidbe, klimatskim uvjetima tijekom godine proizvodnje, stadijem zrelosti te tehnologijom siliranja, sadržajem i probavljivošću škroba i vlakana (Vranić i sur., 2004).

Tablica 2 Prosječni kemijski sastav kukuruzne silaže (Agiuar i sur., 2014; Mäkela, 2015)

Sastojci kukuruzne silaže	Vrijednosti
Suha tvar [g/kg]	292,7
Organske tvari [g/kg]	962,3
Proteini [g/kg]	72,7
NDF (neutralna detergent vlakna) [g/kg]	606,7
ADF (kisela detergent vlakna) [g/kg]	337,1
TC (ukupni ugljikohidrati) [g/kg]	856,2
Celuloza [%]	40 – 50
Hemiceluloza [%]	20 – 40
Lignin [%]	15 – 30

Poželjan udio suhe tvari kukuruza za siliranje je oko 35%, jer se tada postiže optimalan omjer između sadržaja škroba koji ima ulogu nositelja energetske vrijednosti i topljivih šećera koji su neophodni za proizvodnju potrebne količine mliječne kiseline, a pH kukuruzne silaže treba biti 3,65 (Grbeša, 2008).

U ovom radu kukuruzna silaža je korištena kao induktor u svrhu povećanja aktivnosti enzima lakaze proizvedene iz *Trametes versicolor* AG 613. Kukuruzna silaža u svom sastavu sadrži dosta škroba, čijom razgradnjom mikroorganizmi dobivaju energiju koju iskorištavaju za svoj rast i razvoj te za sintezu enzima.

Kukuruzna silaža se može koristiti kao stočna hrana za muzne krave, bez negativnih posljedica za zdravlje životinja, ali s dodacima mora osigurati potrebnu količinu proteina, fosfora i minerala u obroku (Vranić i sur., 2004).

Budući da je lignin sastavni dio kukuruzne silaže, za njegovu razgradnju koriste se različite metode s ciljem njezine daljnje upotrebe u proizvodnji bioplina. Razgradnjom lignina nastaju i polifenolni spojevi koji se u proizvodnji bioplina mogu ponašati kao inhibitori te smanjuju prinos procesa (Kuzmanović i sur., 2015).

2.4.2. Primjena lakaze

Ekološka prihvatljivost te sposobnost kataliziranja velikog broja kemijskih reakcija čine lakazu vrlo primamljivom za istraživanje i za industrijsku primjenu. Svoje mjesto je dosada pronašla u analitici, dijagnostici, medicini, zaštiti okoliša te u prehrambenoj i tekstilnoj, ali i brojnim drugim industrijama. Katalizirajući oksidaciju polifenolnih spojeva, lakaza je pronašla mjesto i u bioremedijaciji gdje se koristi za dekontaminaciju industrijskih otpadnih voda. Tijekom procesa dekontaminacije nastaju topljivi produkti koji se lako uklanjaju procesom filtracije ili sedimentacije. Selektivno uklanjanje polifenolnih derivata je poželjno i u prehrambenoj industriji pri stabilizaciji bezalkoholnih napitaka te vina. Važno je naglasiti da pri ovakvom načinu korištenja lakaze, ona mora biti u imobiliziranom stanju jer od strane FDA-a nije odobrena kao prehrambeni aditiv.

Očigledno je da lakaza pokazuje veliki potencijal u proizvodnim industrijama. Trenutno, najveću primjenu pronalazi za biološko izbjeljivanje u tekstilnoj industriji i proizvodnji boja. Međutim, interes za ovaj enzim pokazuju i organski kemičari, kojima je cilj proizvesti „idealni” medijator (posrednik) koji će povećati aktivnost lakaze (Riva, 2006).

U kozmetičkoj industriji se mogu primijeniti kao sastavni dio paste za zube radi boljeg izbjeljivanja zubi i u boji za kosu pri čemu se smanjuje iritacija kose. U odnosu na klasične

boje za kosu su prihvatljivije jer ne sadrže vodikov peroksid kao oksidirajuće sredstvo (Nityanand, 2011).

Lakaze se primjenjuju u enzimskim imuno testovima te se koriste kao biosenzori za detekciju raznih fenolnih spojeva. Mogu oksidirati katehine, to su molekule koje su kondenzirane strukturne jedinice tanina. Smatraju se važnim antioksidansima, a nalaze se u biljkama, povrću i čajevima. Katehini imaju sposobnost uklanjanja slobodnih radikala i upravo ih to čini važnima u sprječavanju karcinoma, upala i kardiovaskularnih bolesti.

2.5. NAČINI UZGOJA GLJIVA BIJELOG TRULJENJA

Postoje dva načina uzgoja gljiva bijelog truljenja:

- fermentacija na čvrstim nosačima (eng. *solid-state fermentation*, SSF),
- submerzna fermentacija (eng. *submerged fermentation*, SmF).

2.5.1. Submerzni uzgoj mikoorganizama

Submerzni uzgoj mikoorganizama podrazumijeva rast mikroorganizama u tekućoj hranjivoj podlozi pri čemu sam rast i razvoj ovise o fizikalnim i kemijskim uvjetima. Za rast biomase su od posebne važnosti su temperatura, pH te koncentracija hranjivih tvari. Ipak, jedan od ključnih bioprocesnih parametara je morfologija micelijskih peleta uzgojenih u submerznim uvjetima. Odgovarajuća fiziologija i tip morfologije ovisi o uvjetima u bioreaktoru pa samim time utječu na reološka svojstva smjese te učinkovitost bioreaktora (Žnidaršič i Pavko, 2001; Papagianni, 2004).

Industrijski procesi koji koriste filamentozne gljive, obuhvaćaju proizvodnju većine komercijalno značajnih produkata biotehnologije. Radi se uglavnom o procesima submerznog načina uzgoja mikroorganizama, gdje je prisutan dinamičan odnos između uvjeta uzgoja i rasta pojedinih mikroorganizama. Posebni uvjeti uzgoja utječu na različite fizikalno-kemijske i morfološke karakteristike hifa. Na mikroskopskoj razini se razlikuju vlaknasti oblik rasta, oblik peleta te kada su hife raspršene po hranjivoj podlozi. Tip morfologije je vrlo bitan za proizvodnju određenih metabolita te za potrošnju energije, a povezan je s odgovarajućim miješanjem i aeracijom. Bolje razumijevanje i kontrola bioprocasa omogućili su napredak u razumijevanju morfologije micelija gljive. Kako bi se učinkovito primijenile filamentozne gljive u industriji, neophodno je dobro poznavati dizajn reaktora u odnosu na rast, morfologiju i produktivnost mikroorganizama (Cui i sur., 1997; Žnidaršič i Pavko, 2001).

2.5.2. Oblik i formiranje peleta

Peleti su stabilne kuglaste ili ovalne nakupine koje se sastoje od razgranatih i isprepletenih mreža hifa. Zbog manje potrošnje energije uslijed prijenosa topline i tvari te ponovne upotrebe biomase i kontinuiranog odvijanja procesa, morfologija peleta u odnosu na rast u obliku filamenata ima prednost u industrijskim procesima. Primjenom peleta, spriječeni su problemi poput mogućnosti rasta gljive po stjenkama fermentora, oko rotora, na lopaticama miješala te začepljenja raspršivača zraka (Žnidaršič i Pavko, 2001).

Micelijski peleti su neujednačene stanične nakupine kod kojih ograničen prijenos tvari i topline dovodi do biokemijskih i strukturnih promjena zbog čega dolazi do nastanka različitih metaboličkih oblika. Postoje koagulativne i nekoagulativne formacije peleta. Koagulativne se formiraju u ranoj fazi, dok poslije peleti mogu nastati iz same spore. Na koagulaciju spora veliki utjecaj ima pH vrijednost hranjive podloge. Može se reći da pH hranjive podloge utječe na površinska svojstva spora. Za formiranje koagulativnih peleta potrebno je osigurati optimalnu trešnju jer ukoliko je prevelika ili premala brzina trešnje peleti se neće uspjeti formirati.

Budući da na formiranje peleta željene i ujednačene veličine utječe veliki broj čimbenika poput veličine i tipa inokuluma, brzine trešnje, sastava hranjive podloge, temperature i pH, predložene su neke tehnike poput niske koncentracije inokuluma, niža temperatura i hranjiva podloga s limitiranom koncentracijom dušika radi što boljeg željenog rezultata (Žnidaršič i sur., 1998; Žnidaršič i Pavko, 2001; Žmak 2006).

2.6. Optimiranje sastava hranjive podloge primjenom metode odzivnih površina

Metoda odzivnih površina (eng. *response surface methodology*, RSM) se često koristi u optimizaciji procesa. U posljednjih nekoliko godina postaje najpopularnija tehnika za kreiranje eksperimentalnog plana, modeliranje te opisivanje interakcija velikog broja faktora. Upravo iz tih razloga postaje prikladna za rješavanje optimizacijskih problema.

Budući da na mikrobiološku proizvodnju, utječe veliki broj faktora, u praksi nije jednostavno utvrditi koji od njih ima najveći utjecaj na samu proizvodnju. Prema tome, RSM metoda se sve više primjenjuje za optimizaciju biotehnoloških procesa.

Metodologiju eksperimentalnog dizajna čine četiri faze:

1. faza planiranja
2. faza dizajna

3. izvođenje eksperimenta
4. analiza dobivenih rezultata

U fazi planiranja treba točno definirati problem, odlučiti se za odzivne funkcije te izabrati parametre dizajna koji se mogu kontrolirati, odrediti njihove razine, broj te njihovu međusobnu interakciju. O izboru svih navedenih parametra, ovisit će veličina eksperimenta (Radočaj, 2011; Dodić i sur., 2015).

Pri određivanju optimalnih uvjeta procesa, neki se parametri procesa održavaju konstantnim, dok se drugi mijenjaju. RSM je skupina statističkih i matematičkih tehnika vrlo korisna u razvoju, poboljšanju i optimizaciji procesa, u kojoj je željena odzivna funkcija pod utjecajem više parametara. RSM ima važnu uporabu u dizajnu i formiranju novih proizvoda kao i u poboljšanju već postojećeg dizajna ili procesa. Model koji je korišten u RSM-u je kvadratna jednadžba (1) drugog stupnja:

$$Y(X) = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i x_i + \sum_{j=2}^k \sum_{i=1}^{j-1} b_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^k b_{ii} x_i^2 + e \quad (1)$$

U jednadžbi je: $Y(X)$ odzivna funkcija, x_i i x_j su ispitivane nezavisne varijable (procesni uvjeti), b_0 , b_i , b_{ii} i b_{ij} su koeficijenti regresije. Sustav jednadžbi se rješava metodom najmanjih kvadrata, a regresijska analiza se koristi kako bi se odredila međusobna ovisnost parametara. Svakoj funkciji je moguće pridružiti odgovarajući polinom te proračunati koeficijente jednadžbe. Odabir samog dizajna ovisi o tome kakvu odzivnu funkciju očekujemo. Za aproksimacije eksperimentalnih podataka koji se ne mogu opisati linearnom funkcijom, koristi se eksperimentalni dizajn za kvadratni odziv površine, odnosno dizajn za modele drugog reda (kvadratni polinom), kao što je Box-Behnken dizajn.

Box-Behnken dizajn predlaže kako odabrati točke eksperimenata. Koristi se kada je potrebno ispitati utjecaj više faktora na tri razine uz mogućnost efikasne procjene koeficijenata matematičkog modela prvog i drugog reda.

Osnovne karakteristike ovoga dizajna su:

- zahtjeva broj eksperimenata prema sljedećem izrazu (2):

$$N = 2k(k-1) + c_p \quad (2)$$

gdje je k broj faktora, a c_p broj ponavljanja eksperimenata u centralnoj točki

- sve razine faktora se moraju svesti na tri razine (-1, 0, 1) s jednakim intervalom između razina (Jakšetić, 2015).

Prednosti RSM metode, ali i drugih sličnih u usporedbi s klasičnim metodama optimizacije, su da pružaju veliki broj informacija iz malog broja eksperimenata te omogućavaju promatranje učinka interakcije između nezavisnih parametara na odziv (Shi i

sur, 2006; Radočaj, 2011). Kako bi eksperimenti bili statistički značajni, obično se rade dva ponavljanja.

U ovom radu je rađena optimizacija sastava hranjive podloge za proizvodnju enzima lakaze, gdje su optimirani procesni parametri početna koncentracija biomase, glukoze, kukuruzne silaže te Calplexa H90.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

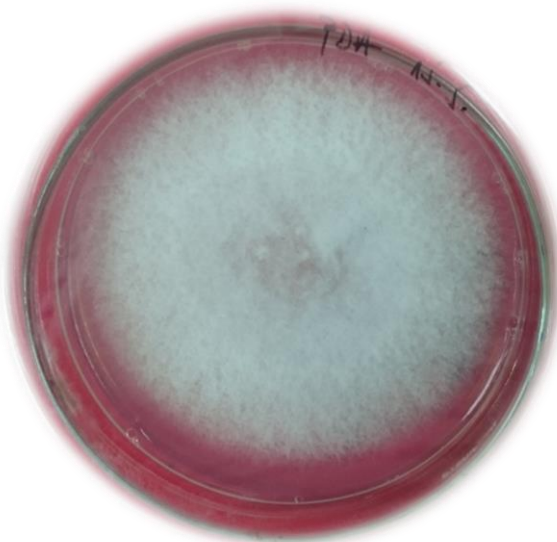
3.3. ZADATAK

Cilj diplomskog rada je bio optimirati sastav hranjive podloge za proizvodnju lakaze iz gljive bijelog truljenja *Trametes versicolor* AG 613 koristeći kukuruznu silažu kao induktor.

3.4. MATERIJALI I METODE

3.4.1. Mikroorganizam

U radu je korištena gljiva *Trametes versicolor* AG 613 (CCBAS, Prag, Češka Republika (**Slika 2**)).



Slika 2 *Trametes versicolor* AG 613

3.4.2. Kukuruzovina

Kukuruzovina odnosno svježa kukuruzna silaža nakon žetve, dobivena iz lokalne stočne farme iz bioplinskog postrojenja (Bovis d.o.o., Ivankovo) korištena je prilikom izrade ovog diplomskog rada kao induktor u svrhu povećanja aktivnosti enzima lakaze.

3.4.3. Kemikalije

U radu su korištene slijedeće kemikalije: 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina), KH_2PO_4 , NH_4NO_3 , Na_2HPO_4 (Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt, Njemačka), kvašćev ekstrakt (Torlak, Institut za imunobiologiju i virusologiju, Beograd), pepton (Biolife Italiana, Milano, Italija), limunska

kiselina monohidrat (E330) (AGZ d.o.o., Zagreb, Hrvatska), Calplex H90, elementi u tragovima ($0,035 \text{ g dm}^{-3} \text{ FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$, $0,007 \text{ g dm}^{-3} \text{ MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $0,011 \text{ g dm}^{-3} \text{ ZnSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$, $0,002 \text{ g dm}^{-3} \text{ H}_3\text{BO}_3$, $0,001 \text{ g dm}^{-3} \text{ CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$, $0,00035 \text{ g dm}^{-3} \text{ KI}$), K_2HPO_4 , glukoza (Kemika, Zagreb, Hrvatska), glicin (Acros Organics, New Jersey, USA), BSA otopina (goveđi serumski albumin), krumpirov agar (Biolife Italiana, Milano, Italija).

3.4.4. Aparatura

Spektrofotometar

Za mjerenje aktivnosti lakaze i koncentracije proteina korišten je spektrofotometar (Shimadzu, UV-1700, Kyoto, Japan).

Tresilica

Submerzni uzgoj gljive *Trametes versicolor* i proizvodnja lakaze su provođeni u Erlenmayerovim tikvicama, u vodenoj kupelji s trešnjom (SW22, Julabo, Seelbach, Njemačka) pri temperaturi 27°C i 120 okr min^{-1} .

Autoklav

Sterilizacija laboratorijskog posuđa, potrebnih otopina te pribora provođena je u autoklavu (TIP 7510945, Sutjeska, Beograd), dvadeset minuta pri temperaturi 121°C .

Vertikalni laminarni kabinet

Za pripremu hranjivih podloga i naciepljivanje uzoraka u sterilnim uvjetima, korišten je vertikalni laminarni kabinet (Telster, Tip AV100-CV100, Madrid, Španjolska).

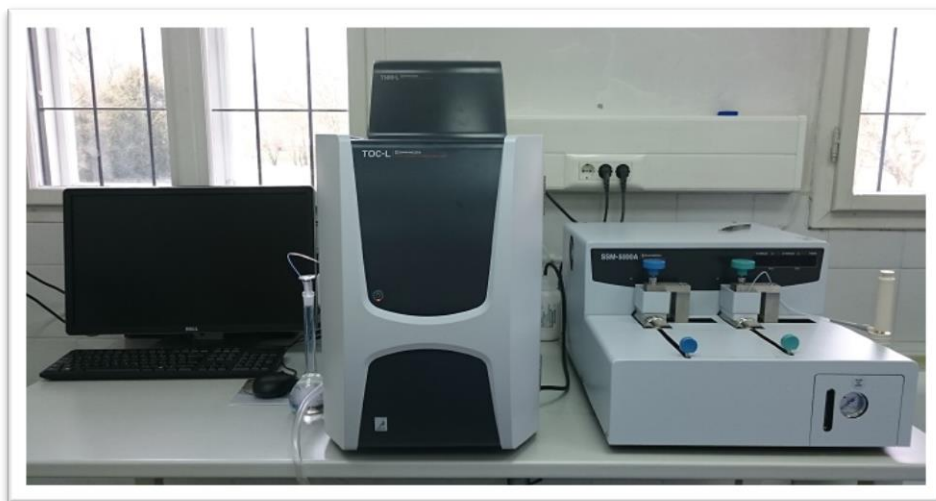
Centrifuga s hlađenjem

Prije analize na spektrofotometru, uzorci su centrifugirani pet minuta pri $13\,000 \text{ okr min}^{-1}$ na centrifugi (Heareus, *Multifuge 3 L-R*, Frankfurt, Njemačka).

pH-metar

Priprema otopine glicin-HCl pufera, pH vrijednosti 3,5, provođeno na pH-metru (Hanna Instruments 2211 pH/ORP Meter, Woonsocket, USA).

TOC-L_{CPH/CPN} analizator



Slika 3 TOC-LCPH/CPN analizator sa SSM – 5000A modulom

Udio ukupnog ugljika (TC) u Calplexu H90 određen je na TOC-L_{CPH/CPN} analizatoru (**Slika 3**) na SSM -5000A modulu za čvrste uzorke (Shimadzu, Kyoto, Japan).

3.4.5. Uzgoj i čuvanje kulture

Za uzgoj kulture je izvagano 42 g krumpirovog agara i dodano je 1000 cm³ destilirane vode, sve je zagrijano do vrenja te je sterilizirano u autoklavu pri 121 °C, petnaest minuta. Zatim je podloga ohlađena na temperaturu od 45 °C do 50 °C, dobro promiješana te prelivena u prethodno sterilizirane Petrijeve zdjelice. Nakon toga mikroorganizmi su naciepljeni, inkubacija je trajala sedam dana, pri 27 °C.

3.4.6. Priprema tekuće hranjive podloge za uzgoj inokuluma

Za uzgoj inokuluma pripremljena je otopina A koja je sadržavala 10 g dm⁻³ glukoze, 0,8 g dm⁻³ KH₂PO₄, 2 g dm⁻³ NH₄NO₃, 0,4 g dm⁻³ Na₂HPO₄, 0,5 g dm⁻³ MgSO₄·7H₂O i 2 g dm⁻³ kvašćevog ekstrakta. Pripremljena otopina je sterilizirana u autoklavu dvadeset minuta pri temperaturi 121 °C. U šest Erlenmayerovih tikvica volumena 250 cm³ je dodano 40 cm³ prethodno pripremljene i sterilizirane otopine A i 10 cm³ suspenzije spora. Suspenzija spora

je pripremljena homogeniziranjem pluga promjera 10 mm s krute hranjive podloge u 40 cm³ sterilizirane vode. Tikvice zatvorene vatenim čepovima su ostavljene na tresilici pet dana, pri 27 °C i 120 okr min⁻¹. Nakon pet dana uzgojena kultura je profiltrirana na filter papiru, isprana destiliranom vodom i kao takva korištena u daljnjem radu.



Slika 4 *Trametes versicolor* u obliku micelijskih peleta

3.4.7. Priprema hranjive podloge za proizvodnju enzima

Za pripremu hranjive podloge za proizvodnju enzima pripremljena je **otopina B**. Korišteni su sastojci navedeni u **Tablici 3** te slijedeće kemikalije: 0,3 g peptona, 0,5 g kvašćevog ekstrakta, 0,8 g dm⁻³ KH₂PO₄, 0,2 g dm⁻³ NaHPO₄, 0,05 g dm⁻³ CaCl₂ · H₂O, 0,5 g dm⁻³ MgSO₄ · 7 H₂O, 0,25 g dm⁻³ limunske kiseline i 10 cm³ elemenata u tragovima (0,035 g dm⁻³ FeSO₄ · 7 H₂O, 0,007 g dm⁻³ MnSO₄ · H₂O, 0,011 g dm⁻³ ZnSO₄ · 7 H₂O, 0,002 g dm⁻³ H₃BO₃, 0,00035 g dm⁻³ KI, 0,001 g dm⁻³ CuSO₄ · 5 H₂O). Nakon pripreme, podloga je sterilizirana u autoklavu dvadeset minuta pri temperaturi od 121° C. U Erlenmayerove tikvice volumena 300 cm³ je dodano 100 cm³ pripremljene i sterilizirane otopine B, odvagana je i dodana zadana količina inokuluma i induktora (**Tablica 3**). Tikvice su zatvorene vatenim čepovima te stavljene na tresilicu pri 27 °C i 120 okr min⁻¹.

Tablica 3 Sastav hranjive podloge za proizvodnju enzima

Broj pokusa	Otopina B	$\gamma_{X,0}$ [g dm ⁻³]	$\gamma_{\text{Calplex H90}}$ [g dm ⁻³]	$\gamma_{\text{IND},0}$ [g dm ⁻³]	γ_{Glukoza} [g dm ⁻³]
1	+	30	5	20	10
2	+	20	0	0	5
3	+	30	5	20	0
4	+	30	10	20	5
5	+	10	10	20	5
6	+	10	0	20	5
7	+	20	5	20	5
8	+	20	5	40	10
9	+	20	5	0	10
10	+	20	10	20	10
11	+	20	0	20	10
12	+	10	5	20	10
13	+	20	5	20	5
14	+	20	0	40	5
15	+	20	0	20	0
16	+	10	5	20	0
17	+	20	5	20	5
18	+	10	5	0	5
19	+	10	5	40	5
20	+	30	0	20	5
21	+	20	10	0	5
22	+	20	5	0	0
23	+	20	10	20	0
24	+	30	5	0	5
25	+	30	5	40	5
26	+	20	10	40	5
27	+	20	5	40	0

3.5. ANALITIČKE METODE

3.5.1. Mjerenje aktivnosti enzima lakaza

Aktivnost lakaze je mjerena spektrofotometrijski pri $\lambda = 420$ nm i temperaturi 25 °C kvarcnoj kiveti volumena 1 cm³. Kao supstrat je korišten ABTS.

Otopina ABTS-a ($c = 3$ mM) je pripravljana otapanjem u glicin-HCl puferu (pH = 3,5) i čuvana je u tikvici obloženoj aluminijskom folijom, u hladnjaku pri 4 °C.

Uzorci su uzimani svaka 24 sata, nakon čega su centrifugirani 5 minuta pri 13 000 okr min⁻¹, a za analizu na spektrofotometru korišten je tekućinski ostatak nakon centrifugiranja.

Postupak mjerenja aktivnosti lakaze

Prije početka mjerenja aktivnosti lakaze, otopina ABTS-a je termostatirana minimalno pet minuta pri 25 °C. Mjerenja su provedena u kvarcnoj kiveti volumena 1 cm³, gdje je 100 µL uzoraka dodavano u 500 µL otopine ABTS-a. Sadržaj kivete je ručno promiješan te kao takav stavljen u spektrofotometar. Tijekom 100 s, pri $\lambda = 420$ nm, mjerena je promjena apsorbancije u vremenu ($\Delta A/\Delta t$) te je iz dobivenih promjena apsorbancija izračunata volumna aktivnost enzima lakaze prema jednadžbi (3) :

$$V.A. = \frac{V_r}{\varepsilon \cdot d \cdot V_E} \cdot \frac{\Delta A}{\Delta t} \quad (3)$$

gdje je V_r ukupni volumen uzoraka u kiveti (cm³), V_E volumen dodanog uzorka koji sadrži enzim (cm³), ε ekstincijski koeficijent ($\varepsilon_{420} = 0,036$ dm³ µmol⁻¹ cm⁻¹), d promjer kivete ($d = 1$ cm), $\Delta A/\Delta t$ promjena apsorbancije u vremenu (nagib pravca) (min⁻¹), $V.A.$ volumna aktivnost enzima (U dm⁻³), pri čemu 1 U predstavlja jedinicu volumne aktivnosti, odnosno predstavlja onu aktivnost enzima koja je potrebna da se oksidira 1 µmol supstrata u minuti (Šelo, 2014.).

Specifična aktivnost enzima izračunata je prema jednadžbi (4):

$$S.A. = \frac{V.A.}{\gamma_E} \quad (4)$$

gdje je $S.A.$ specifična aktivnost enzima (U mg⁻¹), $V.A.$ volumna aktivnost enzima (U dm⁻³) i γ_E masena koncentracija enzima (mg cm⁻³).

3.5.2. Određivanje koncentracije proteina Bradfordičinom metodom

Izrada kalibracijske krivulje za određivanje koncentracije proteina

Iz otopine BSA masene koncentracije 1 mg cm⁻³ pripremljene su otopine standardnog niza (niz otopina poznate koncentracije) volumena 10 µL; 20 µL; 30 µL; 40 µL; 50 µL; 60 µL otopine BSA te nadopunjeno destiliranom vodom do 100 µL .

U kivete sa 100 µL standardnog niza je dodano 2 cm³ Bradfordičinog reagensa. Pripremljena reakcijska smjesa je ostavljena na sobnoj temperaturi 5 minuta te je nakon toga očitana apsorbancija pri valnoj duljini 595 nm. Na temelju dobivenih rezultata je izrađena krivulja ovisnosti vrijednosti apsorbancije o koncentraciji BSA, tj. kalibracijska krivulja.

Postupak određivanja koncentracije proteina u uzorcima

U kivete je otpipetirano 100 μL uzorka te je dodano 2 cm^3 Bradfordiĉnog reagensa, sveŹe pripremljenog (razrijeĊen s destiliranom vodom u omjeru 1 : 4). Pripremljena reakcijska smjesa je ostavljena na sobnoj temperaturi 5 minuta te je nakon toga oĉitana apsorbancija pri 595 nm. Mjerenja su provedena po tri puta, a rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti. Koncentracija proteina u uzorcima je izraĉunata preko prethodno napravljene kalibracijske krivulje. Dobiveni rezultati su korišteni za izraĉunavanje specifiĉne aktivnosti enzima.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. PROIZVODNJA ENZIMA LAKAZE

U ovom radu je provedeno dvadeset sedam pokusa proizvodnje lakaze iz gljive bijelog truljenja *Trametes versicolor* AG 613 u uvjetima submerznog uzgoja prema eksperimentalnom planu postavljenom prema Box-Behnken dizajnu. Ispitivan je utjecaj različitih komponenti hranjive podloge na proizvodnju lakaze te je provedeno optimiranje pojedinih procesnih parametara metodom odzivnih površina. Ispitivane komponente su početna koncentracija biomase ($\gamma_{X,0} = 10 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{X,0} = 20 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{X,0} = 30 \text{ g dm}^{-3}$), početna koncentracija glukoze ($\gamma_{X,0} = 0 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{X,0} = 5 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{X,0} = 10 \text{ g dm}^{-3}$), početna koncentracija kukuruzne silaže ($\gamma_{X,0} = 0 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{X,0} = 20 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{X,0} = 40 \text{ g dm}^{-3}$), te početna koncentracija Calplexa H90 ($\gamma_{X,0} = 0 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{X,0} = 5 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{X,0} = 10 \text{ g dm}^{-3}$).

4.1.1. Optimiranje sastava hranjive podloge za proizvodnju lakaze

U **Tablici 4** prikazana je volumna aktivnost lakaze, u dva paralelna pokusa, dobivena submerznim uzgojem *Trametes versicolor* AG 613 na hranjivim podlogama različitog sastava kombiniranim prema Box-Behnkenovom dizajnu, a **Tablice 5 i 6** prikazuju statističku analizu (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno određene volumne aktivnosti lakaze pokusa 1 i pokusa 2, polinomnim modelom primjenom višestruke regresije.

Tablica 4 Volumna aktivnost lakaze (V.A.), u dva paralelna pokusa, dobivena submerznim uzgojem *Trametes versicolor* AG 613 na podlogama različitog sastava ($\gamma_{X,0}$ – masena koncentracija biomase - peleta; $\gamma_{\text{CalplexH90}}$ – masena koncentracija Calplexa H90; $\gamma_{\text{IND},0}$ – masena koncentracija induktora-kukuruzne silaže; γ_{glukoza} – masena koncentracija glukoze) kombiniranim prema Box-Behnkenovom dizajnu (eksperimentalna matrica)

Broj eksperimenta	Faktor X_1 , $\gamma_{X,0}$ [g dm ⁻³]	Faktor X_2 , $\gamma_{\text{Calplex H90}}$ [g dm ⁻³]	Faktor X_3 , $\gamma_{\text{IND},0}$ [g dm ⁻³]	Faktor X_4 , γ_{glukoza} [g dm ⁻³]	V.A. ₁ , [U dm ⁻³]	V.A. ₂ , [U dm ⁻³]
1	20	10	40	5	192,8	413,4
2	20	0	20	10	208	164,9
3	30	10	20	5	599,8	263,4
4	30	5	20	0	105,2	148,5
5	10	0	20	5	288,5	329,4
6	30	5	40	5	868,9	867,8
7	20	0	20	0	255,3	125,5
8	30	0	20	5	194,2	276,5
9	20	5	20	5	780,7	845,2
10	20	0	40	5	489,1	449,2
11	20	10	0	5	1078,4	1056
12	20	5	20	5	431,3	642,4
13	20	5	20	5	664,4	661,8
14	20	10	20	0	8,7	218,9
15	20	0	0	5	146,4	153,2
16	10	10	20	5	65,5	528
17	30	5	0	5	69,3	45,4
18	20	5	0	10	229,6	248,9
19	20	5	40	10	1048,9	2345,9
20	10	5	20	10	1037,8	802,9
21	20	5	40	0	132,4	152,5
22	30	5	20	10	211,3	203
23	10	5	0	5	94,4	95,4
24	20	5	0	0	125,9	208,1
25	10	5	20	0	128,2	126,4
26	20	10	20	10	506,7	1184,8
27	10	5	40	5	852,1	932,7

Tablica 5 Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno određene volumne aktivnosti lakaze pokusa 1, polinomnim modelom primjenom višestruke regresije

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F vrijednost	Prob > F (p < 0,05)
Model	2067229,98	14	147659,28	1,81^{ns}	0,155
X ₁ - biomasa	14546,40	1	14546,40	0,18^{ns}	0,680
X ₂ - calplex	63133,01	1	63133,01	0,77^{ns}	0,397
X ₃ -kukuruzna silaža	282194,67	1	282194,67	3,46^{ns}	0,088
X ₄ - glukoza	515264,96	1	515264,96	6,31*	0,027
X ₁ X ₂	98784,49	1	98784,49	1,21^{ns}	0,293
X ₁ X ₃	438,90	1	438,90	0,01^{ns}	0,943
X ₁ X ₄	161403,06	1	161403,06	1,98^{ns}	0,185
X ₂ X ₃	377180,22	1	377180,22	4,62^{ns}	0,053
X ₂ X ₄	74338,02	1	74338,02	0,91^{ns}	0,359
X ₃ X ₄	165160,96	1	165160,96	2,02^{ns}	0,180
X ₁ ²	77730,80	1	77730,80	0,95^{ns}	0,349
X ₂ ²	174628,81	1	174628,81	2,14^{ns}	0,169
X ₃ ²	1945,65	1	1945,65	0,02^{ns}	0,880
X ₄ ²	183274,08	1	183274,08	2,24^{ns}	0,160
Ostatak	979933,75	12	81661,15		
Nedostatak modela	916619,86	10	91661,99	2,90^{ns}	0,284
Pogreška	63313,89	2	31656,94		
Ukupno	3047163,73	26			
R	0,82				

SS-suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df-stupnjevi slobode; MS-varijanca

* utjecaj faktora je statistički značajan uz p = 0,05

^{ns}utjecaj faktora nije statistički značajan

Tablica 6 Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno određene volumne aktivnosti lakaze pokusa 2 polinomnim modelom primjenom višestruke regresije

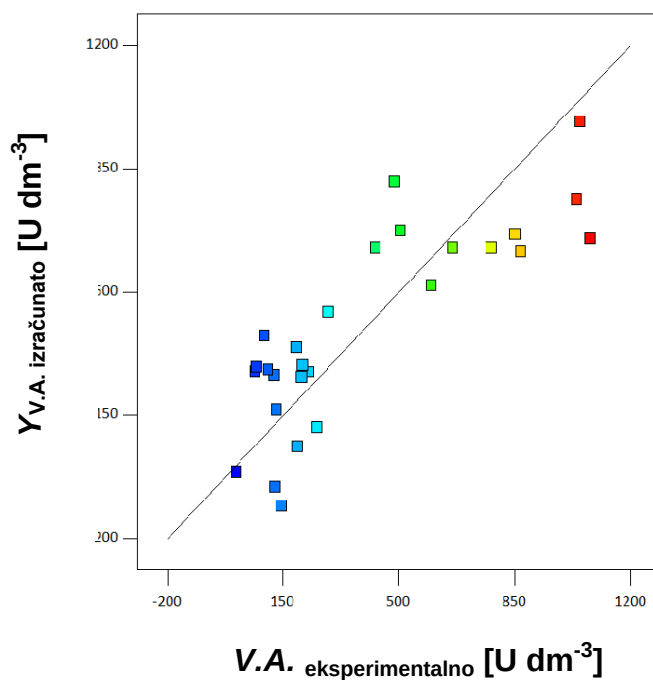
Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F vrijednost	Prob > F (p < 0,05)
Model	4976629,38	14	355473,53	3,10*	0,028
X ₁ - biomasa	85042,00	1	85042,00	0,74^{ns}	0,406
X ₂ - calplex	390890,80	1	390890,80	3,41^{ns}	0,090
X ₃ - kukuruzna silaža	937722,52	1	937722,52	8,17*	0,014
X ₄ - glukoza	1313739,19	1	1313739,19	11,45*	0,005
X ₁ X ₂	11204,22	1	11204,22	0,10^{ns}	0,760
X ₁ X ₃	55,50	1	55,50	0,00^{ns}	0,983
X ₁ X ₄	96721,00	1	96721,00	0,84^{ns}	0,377
X ₂ X ₃	220242,49	1	220242,49	1,92^{ns}	0,191
X ₂ X ₄	214600,56	1	214600,56	1,87^{ns}	0,197
X ₃ X ₄	1158421,69	1	1158421,69	10,09*	0,008
X ₁ ²	342292,74	1	342292,74	2,98^{ns}	0,110
X ₂ ²	183249,37	1	183249,37	1,60^{ns}	0,230
X ₃ ²	8661,81	1	8661,81	0,08^{ns}	0,788
X ₄ ²	42697,47	1	42697,47	0,37^{ns}	0,553
Ostatak	1377119,1	12	114759,92		
Nedostatak modela	1352072,51	10	135207,25	10,80^{ns}	0,088
Pogreška	25046,5867	2	12523,29		
Ukupno	6353748,48	26			
R	0,88				

SS-suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df-stupnjevi slobode; MS-varijanca

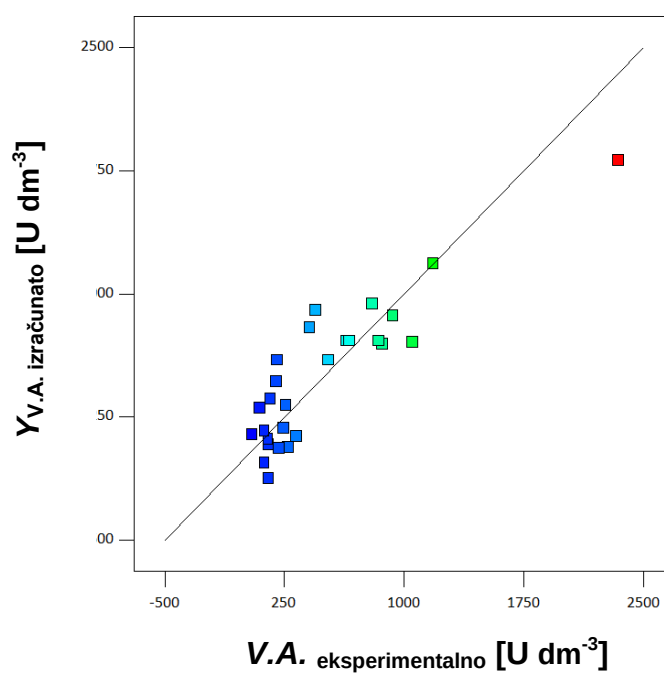
* utjecaj faktora je statistički značajan uz p = 0,05

^{ns} utjecaj faktora nije statistički značajan

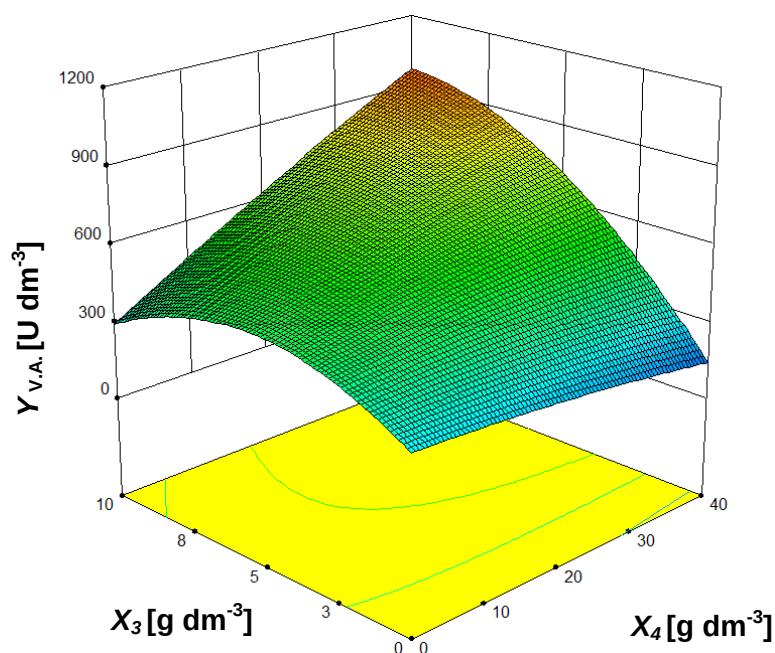
Na **Slikama 5 i 6** prikazane su međusobne ovisnosti svih eksperimentalno određenih volumnih aktivnosti lakaze ($Y_{V.A.}$) u pokusu 1 i pokusu 2 i izračunatih volumnih aktivnosti ($V.A.$) prema aproksimacijskom modelu tj. kvadratnom polinomu, a **Slike 7 i 8** prikazuju trodimenzionalni dijagram odzivne površine za volumnu aktivnost lakaze ($Y_{V.A.}$) u ovisnosti o koncentraciji glukoze (X_4) i koncentraciji induktora (kukuruzne silaže) (X_3) u hranjivoj podlozi za pokus 1 i pokus 2, pri konstantnoj koncentraciji Calplexa (5 g dm^{-3}) i biomase/peleta (20 g dm^{-3}).



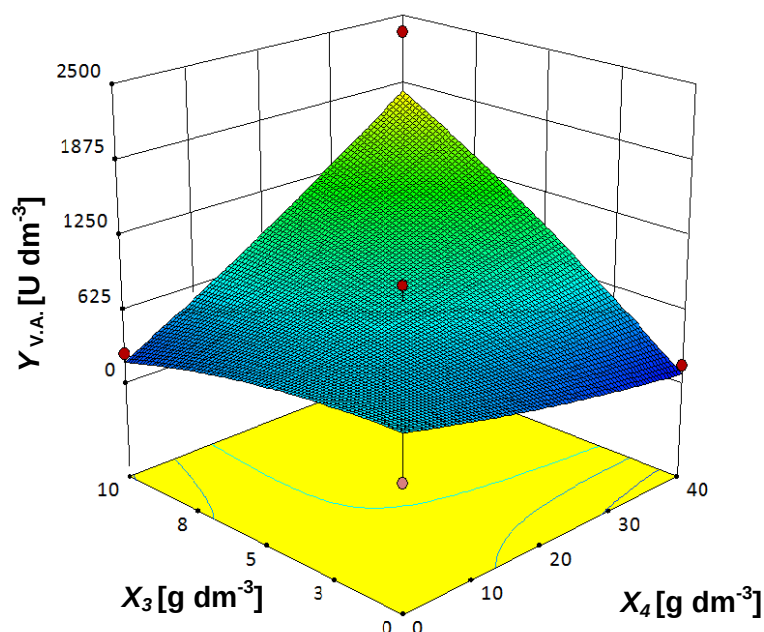
Slika 5 Međusobna ovisnost svih eksperimentalno određenih aktivnosti lakaze ($Y_{V.A.}$) u pokusu 1 i izračunatih ($V.A.$) prema aproksimacijskom modelu tj. kvadratnom polinomu



Slika 6 Međusobna ovisnost svih eksperimentalno određenih aktivnosti lakaze ($Y_{V.A.}$) u pokusu 2 i izračunatih ($V.A.$) prema aproksimacijskom modelu tj. kvadratnom polinomu



Slika 7 Trodimenzionalni dijagram odzivne površine za volumnu aktivnost lakaze ($Y_{V,A}$) u ovisnosti o koncentraciji glukoze (X_4) i koncentraciji induktora (kukuruzne silaže) (X_3) u hranjivoj podlozi za pokus 1, pri konstantnoj koncentraciji Calplexa (5 g dm^{-3}) i biomase/peleta (20 g dm^{-3})



Slika 8 Trodimenzionalni dijagram odzivne površine za volumnu aktivnost lakaze ($Y_{V,A}$) u ovisnosti o koncentraciji glukoze (X_4) i koncentraciji induktora (kukuruzne silaže) (X_3) u hranjivoj podlozi za pokus 2, pri konstantnoj koncentraciji Calplexa (5 g dm^{-3}) i biomase/peleta (20 g dm^{-3})

U **Tablici 7** prikazan je optimalni sastav hranjive podloge za submerzni uzgoj *Trametes versicolor* AG 613, s ciljem dobivanja maksimalne volumne aktivnosti lakaze.

Tablica 7 Optimalni sastav hranjive podloge za submerzni uzgoj *Trametes versicolor* AG 613 s ciljem dobivanja maksimalne volumne aktivnosti lakaze

	Faktor X_1 , $\gamma_{X,0}$ [g dm ⁻³]	Faktor X_2 Y (Calplex H90) [g dm ⁻³]	Faktor X_3 $\gamma_{IND,0}$ [g dm ⁻³]	Faktor X_4 Y (glukoza) [g dm ⁻³]	V.A. ₁ [U dm ⁻³]	Poželjnost
Pokus 1	11,68	3,09	38,62	9,69	1110,68	1,000
Pokus 2	14,63	7,76	40,00	10,00	1930,67	0,820

S ciljem ispitivanja utjecaja nezavisnih varijabli (koncentracija biomase, glukoze, Calplexa H90 i dodanog induktora-kukuruzne silaže) i njihove interakcije na zavisnu varijablu (volumnu aktivnost lakaze) te provjere prikladnosti primijenjenog Box-Behnkenovog plana pokusa u modeliranju i optimiranju procesa ekstrakcije, provedena je aproksimacija eksperimentalnih podataka matematičkim modelom tj. polinomom drugog reda prema izrazu (1).

Model i njegovi koeficijenti dobiveni su statističkom metodom nelinearne regresije eksperimentalnih podataka, a model daje funkcionalnu ovisnost između zavisne i nezavisnih varijabli. Sastoji se od linearnog i kvadratnog člana te člana koji predstavlja interakciju ispitivanih varijabli, pa prema tome model može biti linearan, kvadratni ili srednja vrijednost ukoliko nema značajnog utjecaja istraživanih faktora.

Najprihvatljiviji model određen je na temelju maksimalne vrijednosti koeficijenta korelacije (R) i statističkog parametra „nedostatka modela“, koji su pokazatelji slaganja eksperimentalnih i modelom predviđenih podataka i u idealnom slučaju R iznosi 1 a nedostatak modela je statistički neznačajan.

Dobivene vrijednosti aktivnosti lakaze u dva paralelna pokusa značajno su se razlikovale pa je analiza utjecaja ispitivanih parametara provedena posebno za svaki pokus.

Za slučaj ispitivanog procesa utvrđena je linearna ovisnost između zavisnih i nezavisne varijable ($R \geq 0,82$) **Tablice 5 i 6**, a slaganje eksperimentalnih i modelom predviđenih podataka prikazuju i **Slike 4 i 5**. Međutim, često odabrani model aproksimacije eksperimentalnih podataka ne opisuje u potpunosti ispitivano eksperimentalno područje. Zbog toga je osim koeficijenta korelacije provedena detaljnija statistička analiza (ANOVA) na osnovu koje se može preciznije utvrditi opravdanost primjenjivosti odabranog modela. Kada su vrijednosti " $Prob > F$ " za određene članove odzivnog polinoma manje od 0,05 (p -vrijednost) onda su ti članovi značajni (**Tablice 5-6**).

Nadalje, iz istih **Tablica 5 i 6** je vidljivo da je u pokusu 1 najveći utjecaj na volumnu aktivnost lakaze imala koncentracija glukoze u hranjivoj podlozi dok je u drugom pokusu uz glukozu utjecaj imala i koncentracija induktora odnosno dodane kukuruzne silaže kao i

njihova interakcija što se očitije kroz statistički značajne linearne članove modela i člana koji opisuje njihovu interakciju.

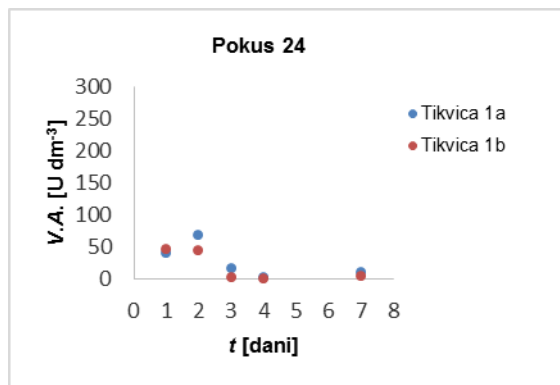
Vizualni prikaz parametra koji značajno utječu na volumnu aktivnost lakaze dan je 3D dijagramom odzivne površine (**Slika 7-8**) gdje odzivna površina predstavlja modelom predviđenu volumnu aktivnost za ispitane kombinacije koncentracije glukoze i koncentracije dodane kukuruzne silaže (induktora) pri konstantnoj koncentraciji calplexa i biomase/peleta. Iz dijagrama je vidljivo da porastom koncentracije glukoze i koncentracije induktora u hranjivoj podlozi dolazi do porasta volumne aktivnosti lakaze.

Numeričkom optimizacijom temeljenoj na funkciji poželjnosti pomoću programa Design Expert 9.0.5. izračunat je optimalan sastav hranjive podloge (za pokus 1 i pokus 2) za uzgoj *T. versicolor* s ciljem dobivanja maksimalne vrijednosti aktivnosti lakaze (**Tablica 7**). Obzirom na veliku razliku u rezultatima između paralelnih ponavljanja te posljedično dobivanja različitog optimalnog sastava hranjive podloge može se zaključiti da optimiranje metodom odzivnih površina nije prikladno za navedeni pokus te daljna provjera uspješnosti metode optimiranja nije provedena stoga.

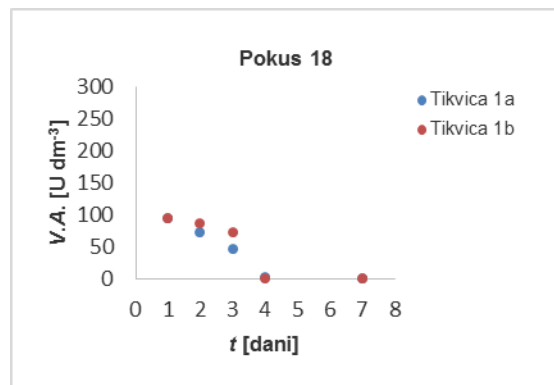
U daljnjem tekstu prikazani su rezultati svih provedenih pokusa te su analizirani utjecaji koncentracije biomase, induktora (kukuruzovina) i Calplexa H90.-

4.1.1. Utjecaj početnih koncentracija biomase, induktora, glukoze i Calplexa H90 na proizvodnju lakaze iz *Trametes versicolor* AG 613

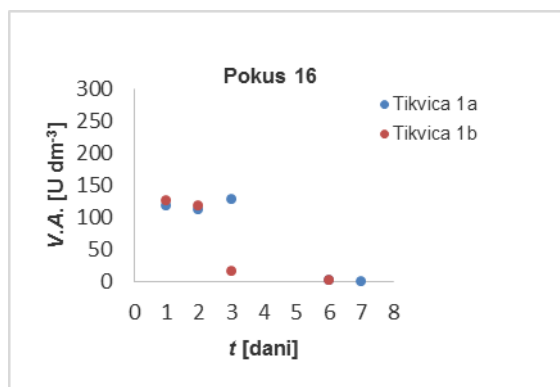
Kao što je već navedeno, micelijski peleti su nakon uzgoja profiltrirani i izvagani, a početna koncentracija biomase u proizvodnji enzima izražena je kao masena koncentracija, $Y_{X,0}$ ($g_{mokre\ biomase}/V_{hranjive\ podloge}$). Također, u svim pokusima svi procesni parametri ($T = 27^{\circ}C$, $n = 120\text{ okr min}^{-1}$) su bili jednaki kao i sastojci hranjive podloge odnosno *otopine B* čiji sastav je naveden u **Poglavlju 3.4.7**. Volumne aktivnosti lakaze tijekom sedam dana fermentacije u svim provedenim pokusima prikazane su na **Slikama 9–35**.



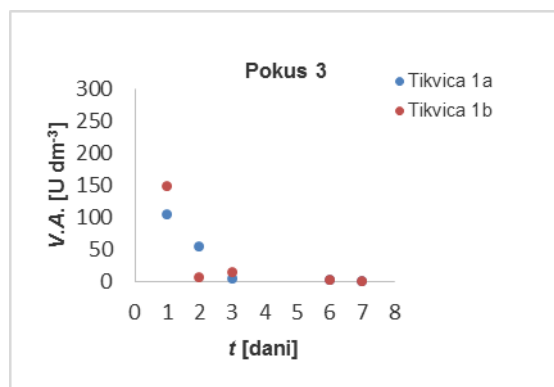
Slika 9 Volumna aktivnost lakaze u pokusu s početnim uvjetima $\gamma_{X,0} = 30 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{IND,0} = 0 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{Calplex H90} = 5 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{Glukoza} = 5 \text{ g dm}^{-3}$



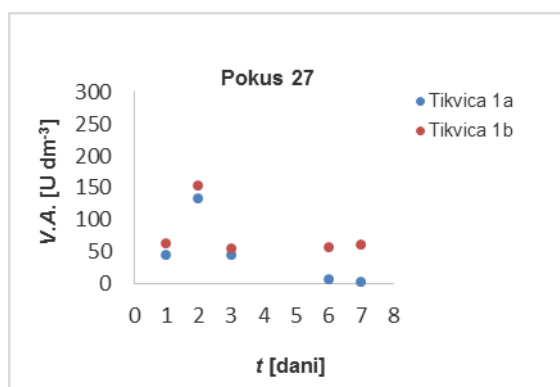
Slika 10 Volumna aktivnost lakaze u pokusu s početnim uvjetima $\gamma_{X,0} = 10 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{IND,0} = 0 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{Calplex H90} = 5 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{Glukoza} = 5 \text{ g dm}^{-3}$



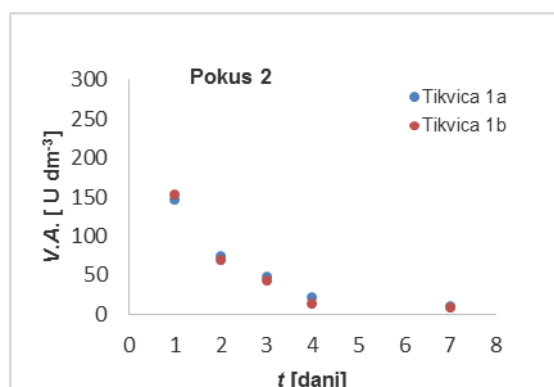
Slika 11 Volumna aktivnost lakaze u pokusu s početnim uvjetima $\gamma_{X,0} = 10 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{IND,0} = 20 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{Calplex H90} = 5 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{Glukoza} = 0 \text{ g dm}^{-3}$



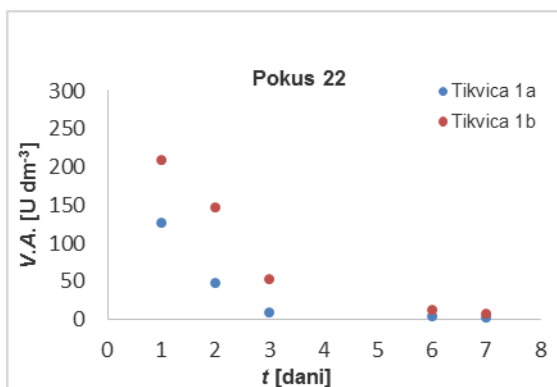
Slika 12 Volumna aktivnost lakaze u pokusu s početnim uvjetima $\gamma_{X,0} = 30 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{IND,0} = 20 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{Calplex H90} = 5 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{Glukoza} = 0 \text{ g dm}^{-3}$



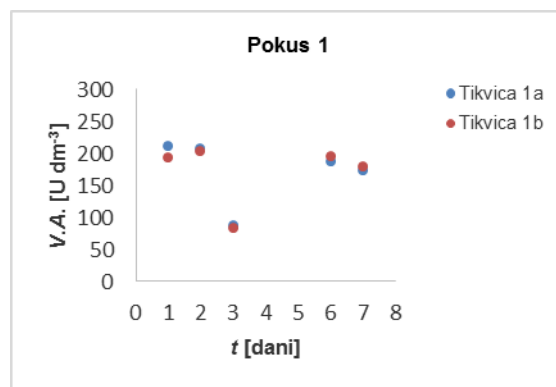
Slika 13 Volumna aktivnost lakaze u pokusu s početnim uvjetima $\gamma_{X,0} = 20 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{IND,0} = 40 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{Calplex H90} = 5 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{Glukoza} = 0 \text{ g dm}^{-3}$



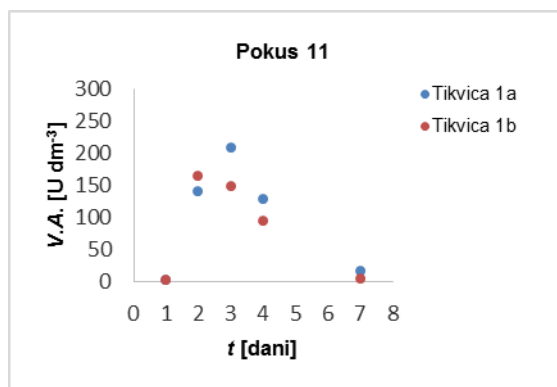
Slika 14 Volumna aktivnost lakaze u pokusu s početnim uvjetima $\gamma_{X,0} = 20 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{IND,0} = 0 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{Calplex H90} = 0 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{Glukoza} = 5 \text{ g dm}^{-3}$



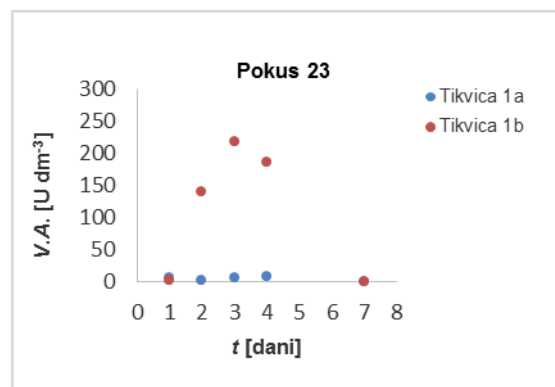
Slika 15 Volumna aktivnost lakaze u pokusu s početnim uvjetima $\gamma_{X,0} = 20 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{IND,0} = 0 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{Calplex H90} = 5 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{Glukoza} = 0 \text{ g dm}^{-3}$



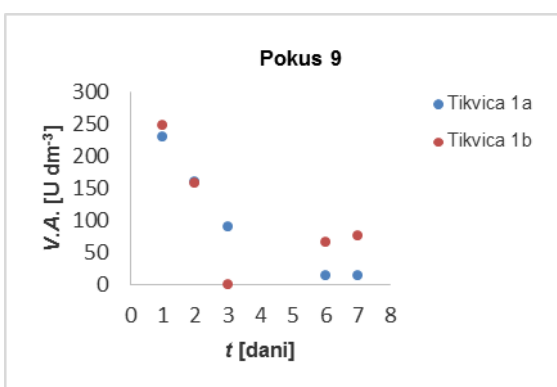
Slika 16 Volumna aktivnost lakaze u pokusu s početnim uvjetima $\gamma_{X,0} = 30 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{IND,0} = 20 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{Calplex H90} = 5 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{Glukoza} = 10 \text{ g dm}^{-3}$



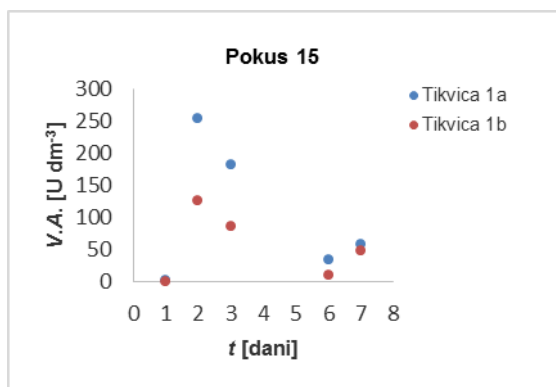
Slika 17 Volumna aktivnost lakaze u pokusu s početnim uvjetima $\gamma_{X,0} = 20 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{IND,0} = 20 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{Calplex H90} = 0 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{Glukoza} = 10 \text{ g dm}^{-3}$



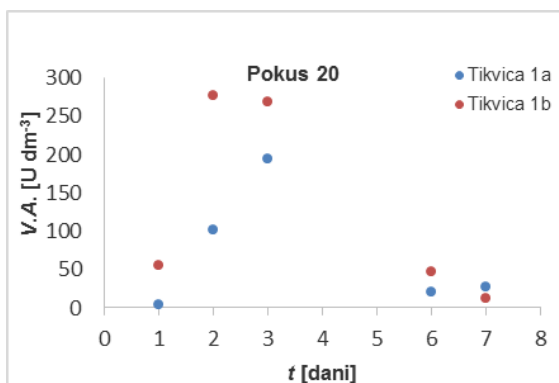
Slika 18 Volumna aktivnost lakaze u pokusu s početnim uvjetima $\gamma_{X,0} = 20 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{IND,0} = 20 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{Calplex H90} = 10 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{Glukoza} = 0 \text{ g dm}^{-3}$



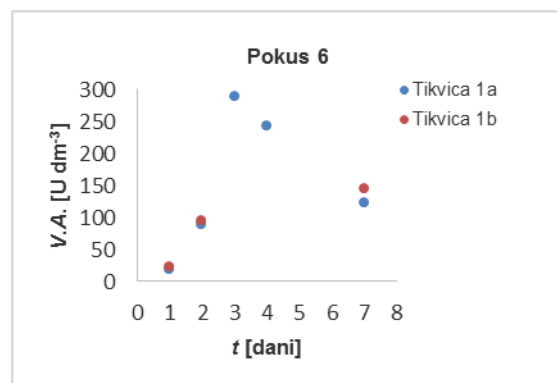
Slika 19 Volumna aktivnost lakaze u pokusu s početnim uvjetima $\gamma_{X,0} = 20 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{IND,0} = 0 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{Calplex H90} = 5 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{Glukoza} = 10 \text{ g dm}^{-3}$



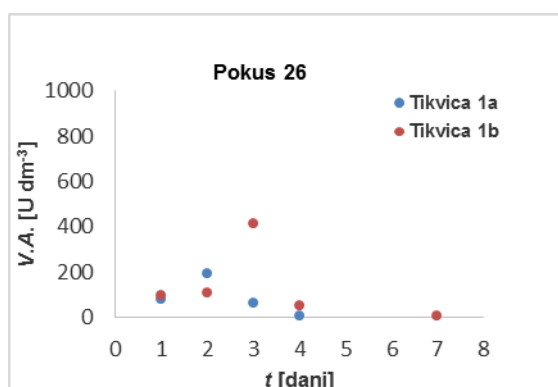
Slika 20 Volumna aktivnost lakaze u pokusu s početnim uvjetima $\gamma_{X,0} = 20 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{IND,0} = 20 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{Calplex H90} = 0 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{Glukoza} = 0 \text{ g dm}^{-3}$



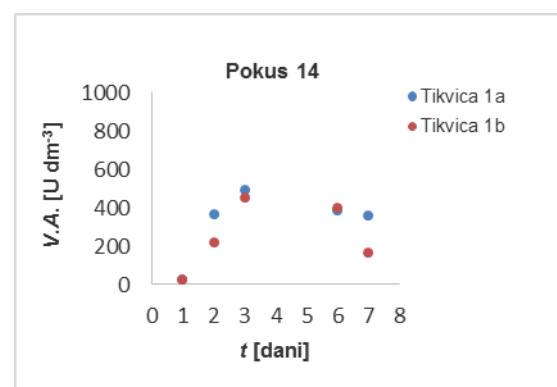
Slika 21 Volumna aktivnost lakaze u pokusu s početnim uvjetima $\gamma_{X,0} = 30 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{IND,0} = 20 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{Calplex H90} = 0 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{Glukoza} = 5 \text{ g dm}^{-3}$



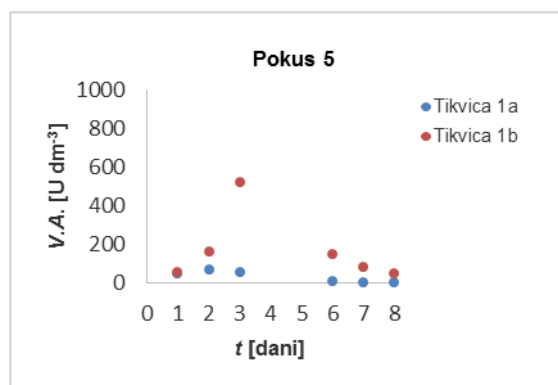
Slika 22 Volumna aktivnost lakaze u pokusu s početnim uvjetima $\gamma_{X,0} = 10 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{IND,0} = 20 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{Calplex H90} = 0 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{Glukoza} = 5 \text{ g dm}^{-3}$



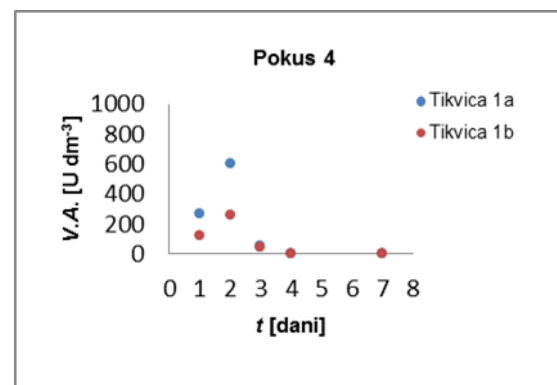
Slika 23 Volumna aktivnost lakaze u pokusu s početnim uvjetima $\gamma_{X,0} = 20 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{IND,0} = 40 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{Calplex H90} = 10 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{Glukoza} = 5 \text{ g dm}^{-3}$



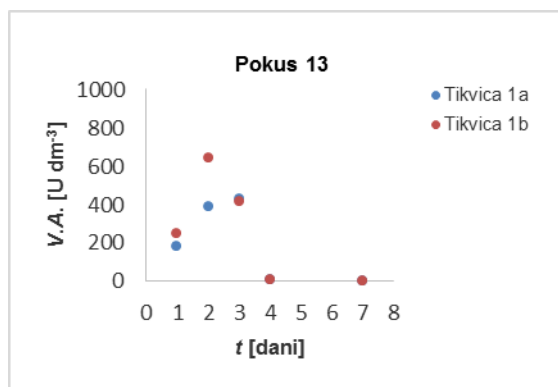
Slika 24 Volumna aktivnost lakaze u pokusu s početnim uvjetima $\gamma_{X,0} = 20 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{IND,0} = 40 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{Calplex H90} = 0 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{Glukoza} = 5 \text{ g dm}^{-3}$



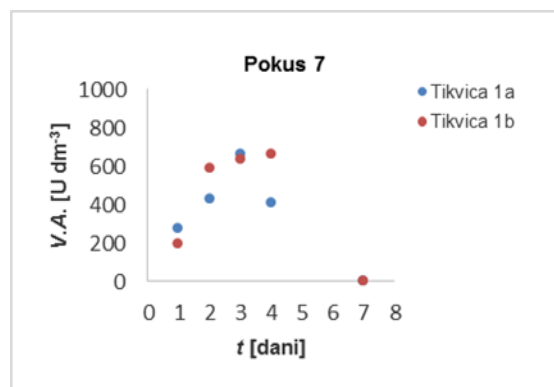
Slika 25 Volumna aktivnost lakaze u pokusu s početnim uvjetima $\gamma_{X,0} = 10 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{IND,0} = 20 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{Calplex H90} = 10 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{Glukoza} = 5 \text{ g dm}^{-3}$



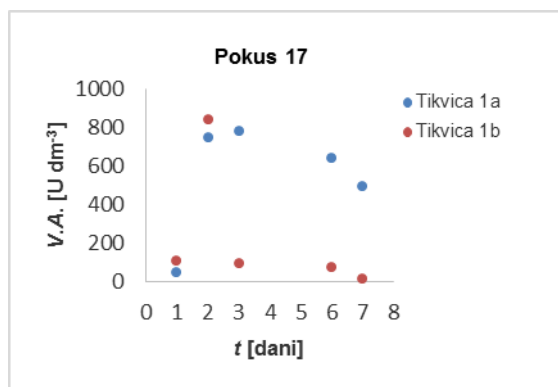
Slika 26 Volumna aktivnost lakaze u pokusu s početnim uvjetima $\gamma_{X,0} = 30 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{IND,0} = 20 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{Calplex H90} = 10 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{Glukoza} = 5 \text{ g dm}^{-3}$



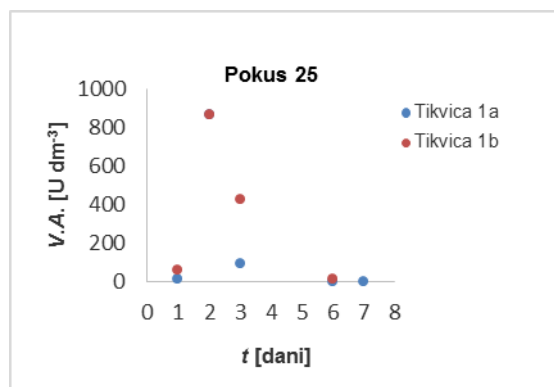
Slika 27 Volumna aktivnost lakaze u pokusu s početnim uvjetima $\gamma_{X,0} = 20 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{IND,0} = 20 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{Calplex H90} = 5 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{Glukoza} = 5 \text{ g dm}^{-3}$



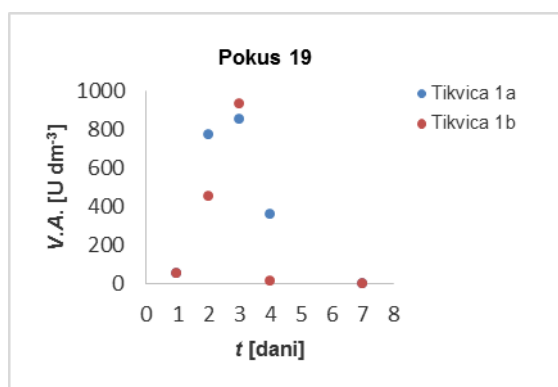
Slika 28 Volumna aktivnost lakaze u pokusu s početnim uvjetima $\gamma_{X,0} = 20 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{IND,0} = 20 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{Calplex H90} = 5 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{Glukoza} = 5 \text{ g dm}^{-3}$



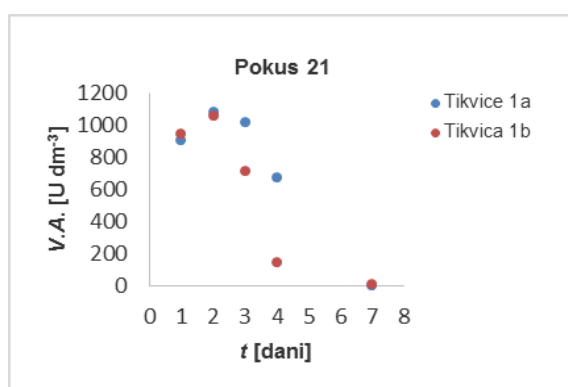
Slika 29 Volumna aktivnost lakaze u pokusu s početnim uvjetima $\gamma_{X,0} = 20 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{IND,0} = 20 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{Calplex H90} = 5 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{Glukoza} = 5 \text{ g dm}^{-3}$



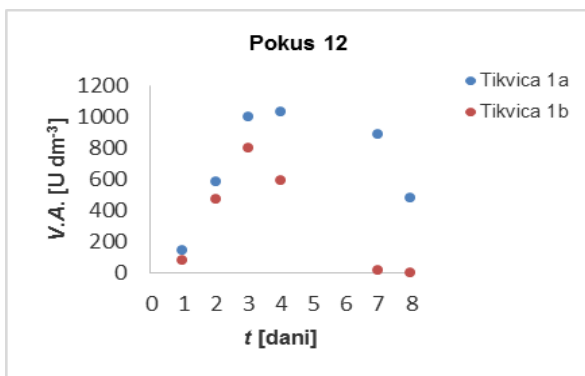
Slika 30 Volumna aktivnost lakaze u pokusu s početnim uvjetima $\gamma_{X,0} = 20 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{IND,0} = 40 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{Calplex H90} = 10 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{Glukoza} = 5 \text{ g dm}^{-3}$



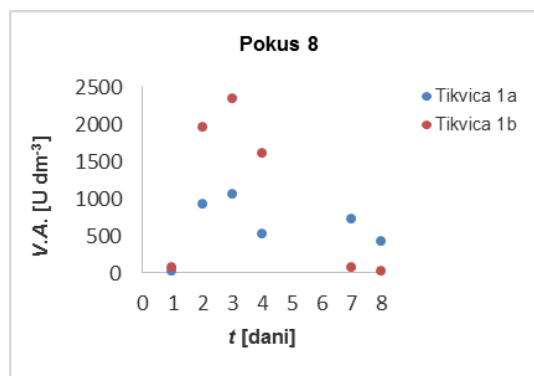
Slika 31 Volumna aktivnost lakaze u pokusu s početnim uvjetima $\gamma_{X,0} = 10 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{IND,0} = 40 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{Calplex H90} = 5 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{Glukoza} = 5 \text{ g dm}^{-3}$



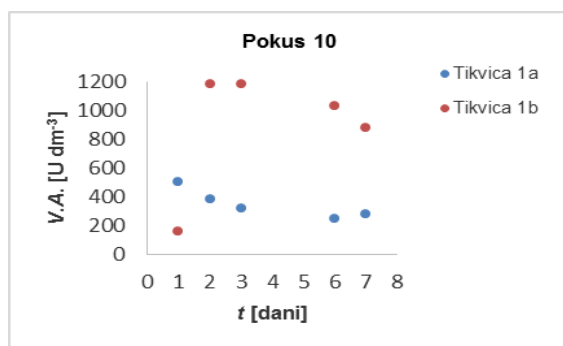
Slika 32 Volumna aktivnost lakaze u pokusu s početnim uvjetima $\gamma_{X,0} = 20 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{IND,0} = 0 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{Calplex H90} = 10 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{Glukoza} = 5 \text{ g dm}^{-3}$



Slika 33 Volumna aktivnost lakaze u pokusu s početnim uvjetima $\gamma_{X,0} = 10 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{IND,0} = 20 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{Calplex H90} = 5 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{Glukoza} = 10 \text{ g dm}^{-3}$



Slika 34 Volumna aktivnost lakaze u pokusu s početnim uvjetima $\gamma_{X,0} = 20 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{IND,0} = 20 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{Calplex H90} = 10 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{Glukoza} = 10 \text{ g dm}^{-3}$



Slika 35 Volumna aktivnost lakaze u pokusu s početnim uvjetima $\gamma_{X,0} = 20 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{IND,0} = 40 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{Calplex H90} = 5 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{Glukoza} = 10 \text{ g dm}^{-3}$

Tijekom sedam dana trajanja pokusa, svaka 24 sata iz tikvica su uzimani uzorci koji su centrifugirani te je iz tekućinskog ostatka mjerena aktivnost lakaze prema analitičkoj metodi opisanoj u **Poglavlju 3.5.1**.

Na temelju provedenih eksperimenata i obrađenih rezultata vidljivo je da je najveća volumna aktivnost lakaze postignuta u pokusu 8 (tikvica 1b) i iznosila je $2345,9 \text{ U dm}^{-3}$, što se može vidjeti na **Slici 34**. Maksimalna volumna aktivnost lakaze postignuta je treći dan fermentacije, nakon čega je počela opadati. U navedenom pokusu početna koncentracija biomase bila je $\gamma_{X,0} = 20 \text{ g dm}^{-3}$, početna koncentracija glukoze $\gamma_{Glukoza} = 10 \text{ g dm}^{-3}$, početna koncentracija kukuruzne silaže $\gamma_{IND,0} = 40 \text{ g dm}^{-3}$, a početna koncentracija Calplexa H90 $\gamma_{Calplex H90} = 5 \text{ g dm}^{-3}$. U paralelnom pokusu (tikvica 1a) došlo je do odstupanja tijekom proizvodnje enzima te je u ovom slučaju maksimalna volumna aktivnost također postignuta treći dan fermentacije, a iznosila je $1048,9 \text{ U dm}^{-3}$.

Prema literaturnim podacima, u pokusu proizvodnje lakaze iz istog soja gljive *Trametes versicolor* AG 613, u uvjetima submerznog uzgoja, gdje je kao induktor korišten sirak, također s početnom koncentracijom $\gamma_{\text{IND},0} = 40 \text{ g dm}^{-3}$ i početnom koncentracijom glukoze $\gamma_{\text{Glukoza}} = 10 \text{ g dm}^{-3}$ te s početnom koncentracijom biomase $\gamma_{\text{X},0} = 20 \text{ g dm}^{-3}$ i početnom koncentracijom Calplexa H90 $\gamma_{\text{Calplex H90}} = 5 \text{ g dm}^{-3}$, najveća volumna aktivnost lakaze postignuta je sedmi dan fermentacije, a iznosila je $1096,78 \text{ U dm}^{-3}$ (Šelo, 2014). Uspoređujući maksimalnu volumnu aktivnost postignutu u pokusu 8 (tikvica 1a), koja je iznosila $1048,9 \text{ U dm}^{-3}$, s maksimalnom volumnom aktivnosti ($1096,78 \text{ U dm}^{-3}$) postignutoj sedmi dan trajanja pokusa u diplomskom radu autorice Šelo (2014), može se reći da su vrijednosti približne te da je razlog tome vjerojatno upotreba induktora kukuruzne silaže i sirka, koji su slični po kemijskom sastavu te slični ostali procesni uvjeti u proizvodnji lakaze.

Na **Slici 14** prikazane su volumne aktivnosti lakaze, za pokus 2, tijekom sedam dana trajanja pokusa, gdje je početna koncentracija kukuruzne silaže bila $\gamma_{\text{IND},0} = 0 \text{ g dm}^{-3}$, kao i početna koncentracija Calplexa H90 ($\gamma_{\text{Calplex H90}} = 0 \text{ g dm}^{-3}$). Vidljivo je da je maksimalna volumna aktivnost (V.A. = $153,17 \text{ U dm}^{-3}$) postignuta prvi dan fermentacije, nakon čega je počela opadati. Postignuta volumna aktivnost je značajno manja u odnosu na postignutu u pokusima gdje su kukuruzna silaža i Calplex H90 dodavani kao induktori u hranjivu podlogu za proizvodnju lakaze. Calplex H90 je otpad iz industrije papira koji ima ulogu induktora. Nastao je iz prirodnog kalcij karbonata koji se odlikuje visokom kemijskom čistoćom, a koristi se kao pigment za premazivanje svih vrsta papira i kartona, što pridonosi ujednačenoj i glatkoj površini te većem sjaju. Fizikalna svojstva Calplexa H90 su udio suhe tvari 78%, pH vrijednost 9 i viskoznost $< 700 \text{ mPas}$. Na TOC analizatoru određen je udio ukupnog ugljika (TC) u Calplexu H90, iznosio je 11,52%.

U pokusima proizvodnje lakaze iz *Trametes versicolor* AG 613 određena je koncentracija proteina prema analitičkoj metodi opisanoj u **Poglavlju 3.5.2**. Kalibracijske krivulje za određivanje koncentracije proteina nalaze se u **Prilogu**. Dobiveni rezultati su prikazani u **Tablici 8 i 9** kao srednja vrijednost određivanja.

Tablica 8 Koncentracija proteina u pokusima proizvodnje lakaze

Pokus	Tikvica	Koncentracija proteina tijekom proizvodnje lakaze [mg cm ⁻³]						
		1. dan	2.dan	3.dan	4.dan	5.dan	6.dan	7.dan
1	1a	-	-	-	-	-	-	-
	1b	-	-	-	-	-	-	-
2	1a	0,016	0,074	0,061	0,054	-	-	0,029
	1b	0,038	0,065	0,055	0,028	-	-	0,032
3	1a	0,034	0,101	0,030	-	-	0,046	0,060
	1b	0,055	0,031	0,068	-	-	0,073	0,131
4	1a	0,096	0,133	0,164	0,160	-	-	0,159
	1b	0,064	0,139	0,140	0,158	-	-	0,154
5	1a	0,096	0,090	0,076	-	-	0,236	0,109
	1b	0,078	0,129	0,121	-	-	0,388	0,164
6	1a	0,016	0,074	0,061	0,054	-	-	0,029
	1b	0,038	0,065	0,055	0,028	-	-	0,032
7	1a	nd	nd	nd	-	-	nd	0,005
	1b	0,019	0,003	nd	-	-	nd	Nd
8	1a	0,079	0,110	0,101	-	-	0,075	0,111
	1b	0,044	0,046	0,030	-	-	0,028	0,062
9	1a	-	-	-	-	-	-	-
	1b	-	-	-	-	-	-	-
10	1a	-	-	-	-	-	-	-
	1b	-	-	-	-	-	-	-
11	1a	nd	0,029	0,012	0,001	-	-	0,032
	1b	nd	0,033	0,007	0,003	-	-	0,008
12	1a	nd	0,003	nd	nd	-	-	0,002
	1b	nd	nd	nd	nd	-	-	0,002
13	1a	nd	nd	nd	nd	-	-	0,010
	1b	nd	0,003	nd	nd	-	-	Nd
14	1a	nd	0,065	0,030	0,012	-	-	0,009
	1b	nd	0,082	0,084	0,027	-	-	0,029

nd – nije detektirano

- - nije mjerena koncentracija proteina

Tablica 9 Koncentracija proteina tijekom proizvodnje lakaze

Pokus	Tikvica	Koncentracija proteina tijekom proizvodnje lakaze [mg cm ⁻³]						
		1. dan	2.dan	3.dan	4.dan	5.dan	6.dan	7.dan
15	1a	nd	nd	nd	-	-	0,020	0,032
	1b	nd	nd	nd	-	-	0,025	0,039
16	1a	0,007	0,036	0,015	-	-	0,014	0,023
	1b	0,008	0,023	0,018	-	-	0,034	0,044
17	1a	0,007	0,004	0,013	-	-	0,033	0,055
	1b	0,031	0,031	nd	-	-	0,006	nd
18	1a	nd	nd	nd	-	-	nd	0,029
	1b	nd	0,003	nd	-	-	nd	0,012
19	1a	nd	0,058	0,028	-	-	nd	0,005
	1b	0,019	0,048	0,032	-	-	nd	nd
20	1a	nd	0,062	0,019	-	-	0,034	0,051
	1b	0,088	0,071	0,015	-	-	0,012	0,058
21	1a	nd	nd	nd	0,022	-	-	0,164
	1b	nd	0,022	nd	0,101	-	-	0,192
22	1a	nd	nd	nd	-	-	nd	nd
	1b	nd	0,003	nd	-	-	nd	nd
23	1a	0,016	0,008	nd	0,030	-	-	0,015
	1b	0,040	0,030	0,034	0,043	-	-	0,067
24	1a	nd	0,022	nd	nd	-	-	nd
	1b	0,011	0,028	nd	nd	-	-	nd
25	1a	0,006	0,044	0,053	-	-	0,190	0,084
	1b	0,022	0,032	0,020	-	-	0,062	0,056
26	1a	0,180	0,223	0,200	0,225	-	-	0,250
	1b	0,180	0,188	0,220	0,276	-	-	0,288
27	1a	0,046	0,052	0,028	-	-	0,097	0,163
	1b	0,068	0,044	0,040	-	-	0,097	0,130

nd – nije detektirano

- - nije mjerena koncentracija proteina

Rezultati koncentracije proteina su korišteni za izračunavanje specifične aktivnosti lakaze prema formuli navedenoj u **Poglavlju 3.5.1.** Maksimalne specifične aktivnosti lakaze prikazane su u **Tablici 10 i 11.** Iz dobivenih rezultata može se vidjeti da je maksimalna specifična aktivnost lakaze u većini pokusa, u dvije paralelne serije, postignuta isti dan fermentacije i to onda kada je volumna aktivnost lakaze maksimalna.

Tablica 10 Maksimalne specifične aktivnosti lakaze

<i>Pokus</i>	<i>Tikvica</i>	Dan fermentacije	S.A. _{MAX} [U mg ⁻¹]
1	1a	-	-
	1b	-	-
2	1a	1	9,86
	1b	1	4,35
3	1a	1	3,06
	1b	1	2,69
4	1a	2	4,49
	1b	1	1,97
5	1a	2	0,78
	1b	3	4,32
6	1a	3	4,72
	1b	4	12,10
7	1a	/	0
	1b	1	10,42
8	1a	3	10,39
	1b	2	42,23
9	1a	-	-
	1b	-	-
10	1a	-	-
	1b	-	-
11	1a	3	18,37
	1b	3	22,29
12	1a	/	0
	1b	/	0
13	1a	/	0
	1b	/	0
14	1a	3	16,32
	1b	7	5,79

- - nije mjerena koncentracija proteina

Tablica 11 Maksimalne specifične aktivnosti lakaze

<i>Pokus</i>	<i>Tikvica</i>	Dan fermentacije	S.A. _{MAX} [U mg ⁻¹]
15	1a	6	1,82
	1b	7	1,29
16	1a	3	8,52
	1b	2	5,30
17	1a	3	61,36
	1b	2	27,26
18	1a	7	0,014
	1b	7	0,034
19	1a	3	30,21
	1b	3	28,84
20	1a	3	10,79
	1b	3	18,28
21	1a	4	30,62
	1b	4	1,42
22	1a	/	0
	1b	/	0
23	1a	4	0,39
	1b	3	6,51
24	1a	2	3,19
	1b	2	4,06
25	1a	2	19,58
	1b	2	32,56
26	1a	2	0,86
	1b	3	1,88
27	1a	2	2,56
	1b	2	3,50

- - nije mjerena koncentracija proteina

5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih eksperimentalnih podataka, doneseni su sljedeći zaključci:

S obzirom na veliku razliku u rezultatima između paralelnih ponavljanja te posljedično dobivanja različitog optimalnog sastava hranjive podloge može se zaključiti da optimiranje metodom odzivnih površina nije prikladno za ovakav tip eksperimenata.

Analizom rezultata zaključeno je da je maksimalna aktivnost lakaze ($2345,9 \text{ U dm}^{-3}$) postignuta treći dan u pokusu s početnom koncentracijom biomase $\gamma_{X,0} = 20 \text{ g dm}^{-3}$, kukuruzne silaže $\gamma_{\text{IND},0} = 40 \text{ g dm}^{-3}$, Calplexa H90 $\gamma_{\text{Calplex}} = 5 \text{ g dm}^{-3}$, glukoze $\gamma_{\text{Glukoza}} = 10 \text{ g dm}^{-3}$.

Volumne aktivnosti lakaze bile su veće u svim pokusima u kojima su dodavani induktori (kukuruzovina i/ili Calplex H90) te se može zaključiti da dodatak induktora značajno utječe na proizvodnju lakaze.

U pokusu bez dodatka induktora (pokus 2, $\gamma_{\text{IND},0} = 0 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{\text{Calplex H90}} = 0 \text{ g dm}^{-3}$) maksimalna volumna aktivnost lakaze postignuta je prvi dan fermentacije te je iznosila $153,17 \text{ U dm}^{-3}$.

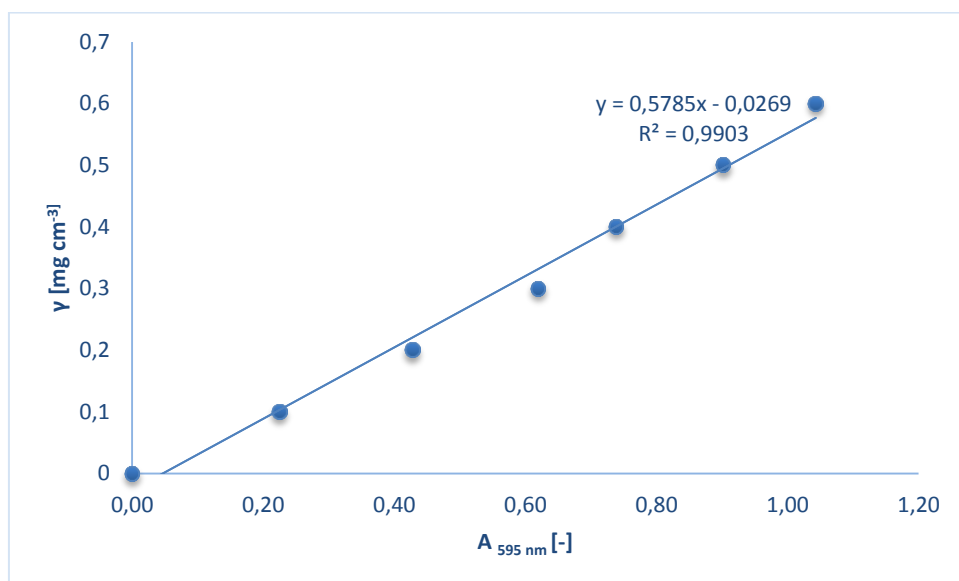
6. LITERATURA

- Alcalde M, Ferrer M, Plou FJ, Ballesteros A: Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes. *Trends in Biotechnology* 24:281-7, 2006.
- Asgher M, Iqbal HMN and Asad MJ: Kinetic Characterization of purified laccase produced from *Trametes versicolor* IBL-04 in solid state Bio-Processing of corncobs. *BioResources* 7:1, 2012.
- Bucić Kojić A: Utjecaj procesnih uvjeta i načina kruto-tekuće ekstrakcije na ekstraktibilnost fenolnih tvari iz sjemenki grožđa. *Doktorski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2008.
- Burton SG.: Laccases and Phenol Oxidases in Organic Syntheses. *Current Organic Chemistry* 7:13, 2003.
- Cui YQ, Lans van der RGJM, Luyben CAM: Effect of Agitation Intensities of Fungal Morphology of Submerged Fermentations. *Biotechnology and Bioengineering* 55:715–726, 1997.
- Desai SS, Nityanand C: Microbial Laccases and their Applications. *Asian Journal of Biotechnology* 3:98–124, 2011.
- Duraković S: Opća mikrobiologija, Prehrambeno tehnološki inženjering, Zagreb, 1996.
- Grbeša D: *Bc hibridi kukuruza u hranidbi životinja*: Bc Institut za oplemenjivanje i proizvodnju bilja d.d., Zagreb, 2008.
- Janeš K: Rast *Trametes versicolor* u uvjetima submerznog uzgoja. *Diplomski rad*. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2010.
- Jakšetić A: Optimiranje procesa kruto-tekuće ekstrakcije fenolnih tvari iz ječma metodom odzivnih površina. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2015.
- Kirk TK, Chang HM: Potential applications of bio-lignolytic systems. *Enzyme Microbial Technology* 3:3, 1981.
- Kulys J, Vidzianaitė R: Kinetics of laccase-catalysed TEMPO oxidation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 37:7–83, 2005.
- Kunamneni A, Camarero S, Garcia-Burgos C, Plou FJ, Ballesteros A, Alcalde M: Engineering and applications of fungal laccase for organic synthesis. *Microbial Cell Factories* 7:32, 2008.
- Kuzmanović M, Tišma M, Bucić-Kojić A, Casazza AA, Paini M, Aliakbarian B, Perego P: High – Pressure and Temperature Extraction of phenolic Compounds from Corn Silage. *The Italian Association of Chemical Engineering* 43:133–138, 2015.
- Lankinen P: Ligninolytic enzymes of the basidiomycetous fungi *Agaricus bisporus* and *Phlebia radiata* on lignocellulose containing media. *Disertation*. Faculty of Agriculture and Forestry of the University of Helsinki, Finland, 2004.
- Madhavi S, Revankar S, Lele SS: Enhanced production of laccases using a new isolate of white rot fungus WR-1. *Process Biochemistry* 41: 581–588, 2006.
- Madhavi V and Lele SS: Laccase: Properties and applications. *BioResources* 4:4, 2009.

- Mäkelä MR, Marinović M, Nousiainen P, Liwanag AJM, RP de Vries, Hildén KS: Aromatic Metabolism of Filamentous Fungi in Relation to Presence of Aromatic Compounds in Plant Biomass. *Advances in Applied Microbiology* 91:63-137, 2015.
- Merwe van der JJ: Production of laccase by the white – rot fungus *Pycnoporus sanguineus*. *Magister Scientiae*. Faculty of Natural and Agricultural Sciences, South Africa, 2002.
- Mester T, Tien M: Oxidation mechanism of ligninolytic enzymes involved in the degradation of environmental pollutants. *International Biodeterioration & Biodegradation* 46:51-59, 2000.
- Minussi RC, Rossi M, Bologna I, Rotilio D, Pastore GM, Duran N: Phenols removal in musts: Strategy for wine stabilization by laccase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 45:102-107, 2007.
- Mlinarek T: Razvoj kinetičkog modela rasta *Trametes versicolor* na glukozu. *Diplomski rad*. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2009.
- Papagianni M: Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology advances* 22:189-259, 2004.
- Pilaš J. : Proizvodnja lakaze uzgojem *Trametes versicolor* na otpadu industrije pulpe i papira. *Diplomski rad*. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2009.
- Radočaj O: Optimizacija tehnološkog procesa proizvodnje namaza sa visokim sadržajem omega masnih kiselina upotrebom pogače semena uljane tikve golice: *Doktorska disertacija*. Tehnološki fakultet, Novi Sad, 2011.
- Riva S: Laccases, blue enzymes for green chemistry. *Trends in Biotechnology* 24:219–226, 2006.
- Shi LE, Ying GQ, Zhang XY, Tang ZX, Chen JS, Xiong WY and Liu HZ: Optimization for 5'-Phosphodiesterase Production from *Penicillium citrinum* Using Response Surface Methodology. *Food Technology and Biotechnology* 45:126-133, 2007.
- Stoyanova M, Christoskova St, Georgieva M: Mixed Ni-Mn-oxide systems as catalysts for complete oxidation Part II. Kinetic study of liquid-phase oxidation of phenol. *Applied Catalyses* 249:295–302, 2003.
- SC de Aguiar, EM de Paula, Yoshimura, WBR dos Santos, Machado E, Valero MV, GT dos Santos, Zeoula LM: Effects of phenolic compounds in propolis on digestive and ruminal parameters in dairy cows. *Revista Brasileira de Zootecnia* 43:197-206, 2014.
- Šelo G: Utjecaj dodatka sirka na aktivnost lakaze tijekom submerznog uzgoja *Trametes versicolor*. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2014.
- Tavares APM, Coelho MAZ, Coutinho JAP and Xavier AMRB: Laccase improvement in submerged cultivation: induced production and kinetic modeling. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 80:669-676, 2005.
- Vranić M, Knežević M, Perčulija, Grbeša, Leto J, Bošnjak K, Rupiće I : Kvaliteta kukuruzne silaže na obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima. *Mljekarstvo* 54:175–186, 2004.

- Zavišek K: Razvoj računalnih programa za automatsko pronalaženje novih sekvencija sintetaza polipeptida i neribosomskih peptida. *Diplomski rad*. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2005.
- Žnidaršič P, Pavko A: The morphology of filamentous fungi in submerged cultivations as a bioprocess parameter. *Food Technology and Biotechnology* 39:237–252, 2001.
- Žmak PM, Podgornik A, podgornik H, Koloini T: Impact on pellet size on growth and lignin peroxidase activity of *Phanerochaete chrysosporium*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 22:1243–1249, 2006.
- Xavier AMRB, Tavers APM, Ferreira R, Amando F: *Trametes versicolor* growth and laccase induction with by-products of pulp and paper industry. *Electronic Journal of Biotechnology* 10:444-451, 2007.
- Wesenberg D, Kyriakides I, Agathos SN: White – rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances* 22:161-187, 2003.

7. PRILOZI

Prilog 1 Kalibracijska krivulja za određivanje koncentracije proteina (pokus 1 - 19)**Prilog 2** Kalibracijska krivulja za određivanje koncentracije proteina (pokus 20 - 27)