

# Submerzni uzgoj gljive bijelog truljenja *Dichomitus squalens* na otpadnim drvnim ostacima lipe i hrasta

---

**Kastner, Klara**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2019**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:566966>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-05**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

**Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Klara Kastner**

7383/BT

**Submerzni uzgoj gljive bijelog truljenja  
*Dichomitus squalens* na otpadnim drvnim  
ostacima lipe i hrasta**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Biotehnologija 3

**Mentor:** Prof. dr. sc. *Tonči Rezić*

**Zagreb, 2019.**

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

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

*Zahvaljujem se svom mentoru prof.dr.sc. Tončju Reziću na suradnji, pomoći i savjetima prilikom izrade ovog rada i dr.sc. Martini Andlar na strpljenju i pomoći prilikom rada u laboratoriju. Također se zahvaljujem svim djelatnicima Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada na korisnim savjetima i pomoći.*

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

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

---

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

**Submerzni uzgoj gljive bijelog truljenja *Dichomitus squalens* na otpadnim drvnim ostacima lipe i hrasta**

***Klara Kastner, 7383/BT***

**Sažetak:** Velika količina lignoceluloznog otpada, kojeg čine uglavnom celuloza, hemiceluloza i lignin, nastaju u šumarstvu, poljoprivredi i prehrambenoj industriji. Lignoceluloza je kompleksna obnovljiva sirovina koja se može prevesti u razne visokovrijedne biotehnološke proizvode kao što su bioetanol, bioplin i biogoriva, ali se može koristiti i za proizvodnju mikrobnog biomase te lignocelulolitičkih enzima koji su od sve veće industrijske važnosti. U ovom radu provedena je proizvodnja lignocelulolitičkih enzima uzgojem gljive bijelog truljenja *Dichomitus squalens* na otpadnim drvnim ostacima mekog (lipa) i tvrdog (hrast) drva te su izmjerene enzimске aktivnosti proizvedenih ekstracelularnih enzima i izračunate koncentracije razgradnih produkata nakon provedenog uzgoja. Izmjerene su i uspoređene aktivnosti enzima lakaze, mangan peroksidaze, celobioza dehidrogenaze, ksilanaze, arabinaze, celulaze, karboksimetil celulaze te pektinaze. Cilj eksperimenta bio je utvrditi utjecaj različitih izvora ugljika na uzgoj *Dichomitus squalens* za postizanje maksimalne aktivnosti enzima.

**Ključne riječi:** *enzimi, lignocelulozni otpad, gljiva bijelog truljenja, ekstracelularni lignocelulolitički enzimi*

**Rad sadrži:** 35 stranica, 12 slika, 5 tablica, 53 literaturnih navoda, 5 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici  
Prehrambenobiotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000  
Zagreb**

**Mentor:** Prof. dr. sc. Tonči Rezić

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

**Datum obrane:**

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

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

**Department of Biochemical Engineering**  
**Laboratory for Biochemical Engineering, Industrial Microbiology and Brewing**

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

**Submerge cultivation of white-rot fungi *Dichomitus squalens* on waste wood residues of linden and oak**

**Klara Kastner, 7383/BT**

**Abstract:** Huge amounts of lignocellulosic waste, consisting mainly of cellulose, hemicellulose and lignin, are generated through forestry, agriculture and food industry. Lignocellulose is the complex renewable raw material that can potentially be converted into various valuable biotechnological products such as bioethanol, biogas and biofuels, but it can also be used to produce microbial biomass and lignocellulolytic enzymes that are growing in industrial importance. In this research, the production of lignocellulolytic enzymes was performed by growing the white-rot fungus *Dichomitus squalens* on waste wood residues of soft (linden) and hard (oak) wood, and the enzymatic activities of the produced extracellular enzymes together with the concentrations of degradation products were measured. The activities of the enzymes laccase, manganese peroxidase, cellobiose dehydrogenase, xylanase, arabinase, cellulase, carboxymethyl cellulase and pectinase were measured and afterwards compared. The aim of this study was to determine the influence of different carbon sources on the cultivation of *Dichomitus squalens* for maximum enzyme activity.

**Keywords:** *enzymes, lignocellulosic waste, white-rot fungus, extracellular lignocellulolytic enzymes*

**Thesis contains:** 35 pages, 12 figures, 5 tables, 53 references, 5 supplements

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** Prof. dr. sc. Tonči Rezić

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

**Defence date:**

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1. Lignocelulozna sirovina</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1.1. Sastav lignocelulozne sirovine</b> .....	<b>2</b>
2.1.1.1. Celuloza.....	2
2.1.1.2. Hemiceluloza .....	3
2.1.1.3. Lignin.....	4
<b>2.1.2. Otpadna drvena biomasa</b> .....	<b>5</b>
2.1.2.1. Otpadni materijal.....	5
2.1.2.2. Lipa.....	5
2.1.2.3. Hrast.....	5
<b>2.2 Gljive bijelog truljenja</b> .....	<b>5</b>
<b>2.2.1 <i>Dichomitus squalens</i></b> .....	<b>6</b>
<b>2.3 Lignocelulitički enzimi</b> .....	<b>7</b>
<b>2.3.1 Nomenklatura i klasifikacija</b> .....	<b>7</b>
<b>2.3.2 Lignolitički enzimi</b> .....	<b>8</b>
2.3.2.1. Lignin peroksidaza .....	8
2.3.2.2. Mangan peroksidaza .....	8
2.3.2.3. Lakaza.....	9
<b>2.3.3 Celulolitički i hemicelulolitički enzimi</b> .....	<b>9</b>
2.3.3.1. Celobioza dehidrogenaza .....	9
2.3.3.2. Endoksilanaze .....	10
2.3.3.3. Endoglukanaze .....	10
2.3.3.4. Pektinaze.....	10
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>11</b>
<b>3.1 Materijali</b> .....	<b>11</b>
<b>3.1.1. Radni mikroorganizmi</b> .....	<b>11</b>
<b>3.1.2. Sirovine za pripremu hranjivih podloga</b> .....	<b>11</b>
<b>3.1.3. Kemikalije i enzimi</b> .....	<b>11</b>
<b>3.1.4. Hranjive podloge za održavanje, čuvanje i uzgoj gljive bijelog truljenja</b> .....	<b>12</b>
<b>3.1.5. Oprema i aparatura</b> .....	<b>13</b>
3.1.5.1. Uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti.....	13
3.1.5.2. UV-Vis spektrofotometar .....	14
<b>3.2. Metode rada</b> .....	<b>15</b>
<b>3.2.1. Priprema podloga za submerzni uzgoj i proizvodnju celulolitičkih i hemicelulolitičkih enzima</b> .....	<b>15</b>
<b>3.2.2. Analitičke metode</b> .....	<b>16</b>
3.2.2.1. Određivanje celulolitičke i hemicelulolitičke aktivnosti enzima.....	16
3.2.2.1.1. Priprema reagensa i otopina za analizu.....	16
3.2.2.1.2. Mjerenje aktivnosti enzima lakaza .....	17
3.2.2.1.3. Mjerenje aktivnosti enzima mangan peroksidaza .....	17
3.2.2.1.4. Mjerenje aktivnosti enzima celobioza dehidrogenaza .....	18
3.2.2.1.5. Mjerenje celulolitičke i hemicelulolitičke aktivnosti enzima DNSA metodom.....	18
3.2.2.1.5.1. Priprema reagensa i otopina za DNSA analizu .....	19
3.2.2.1.5.2. Postupak provođenja DNSA analize .....	19
3.2.2.2. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu.....	21

3.2.2.3. Određivanje koncentracije šećera pomoću tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC) .....	21
3.2.2.3.1. Priprema uzoraka za HPLC analizu .....	21
3.2.2.3.2. HPLC analiza .....	22
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>23</b>
4.1. Ukupna koncentracija proteina.....	23
4.2. Enzimska aktivnost lakaze .....	24
4.3. Enzimska aktivnost mangan peroksidaze.....	25
4.4. Enzimska aktivnost celobioza dehidrogenaze .....	26
4.5. Enzimске aktivnosti celulolitičkih i hemicelulolitičkih enzima.....	26
4.6. Razgradni produkti.....	29
<b>5. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>30</b>
<b>6. POPIS LITERATURE .....</b>	<b>31</b>
<b>7. PRILOZI .....</b>	<b>36</b>



# 1. UVOD

Lignocelulozne sirovine predstavljaju obnovljivi izvor energije iz biomase (Kricka i sur., 2015). Biomasa koja se koristi u biotehnološkoj proizvodnji nastaje kao sekundarni proizvod drvne, poljoprivredne i prehrambene industrije (Sun i Cheng, 2002). Mogućnosti za njihovo iskorištenje su brojne, pa se u današnje vrijeme najviše istraživanja provodi u svrhu optimizacije procesa iskorištenja takvih sirovina za proizvodnju biogoriva, bioplina, bioetanola, organskih kiselina, enzima i mikrobne biomase kao i za mnoge druge biotehnološke procese (Alriksson, 2006).

Biotehnološka važnost lignocelulolitičkih enzima dovela je do nagle i sve veće potrebe za njihovom proizvodnjom. No, unatoč velikim zahtjevima industrije njihova proizvodnja pomoću mikrobnih stanica je skupa te se kao jedno od rješenja smanjenja takvih troškova pronalazi u korištenju jeftinog otpadnog materijala iz prehrambene i drveno-prerađivačke industrije. Optimiranje procesa proizvodnje lignocelulolitičkih enzima na čvrstoj podlozi pokazuje potencijal u daljnjem smanjenju troškova proizvodnje. Mnoga istraživanja potvrđuju da su dostupne velike količine lignoceluloznog otpada na svjetskoj razini koje se mogu iskoristiti za proizvodnju lignocelulolitičkih enzima. Posljednjih godina sve je izraženiji trend iskorištavanja poljoprivrednog otpada za proizvodnju lignocelulolitičkih enzima s ciljem njihove jeftinije proizvodnje (Singh i sur., 2016).

Skupini lignocelulolitičkih enzima pripadaju lakaze, lignin i mangan peroksidaze te celulolitički i hemicelulolitički enzimi. Najpoznatiji izvori tih enzima su gljive bijelog truljenja koje razgrađuju lignin u drvu te pospješuju oslobađanje hemiceluloze i celuloze iz kompleksnog lignoceluloznog matriksa (Singh i sur., 2016).

U ovome radu je proveden proces proizvodnje ekstracelularnih lignocelulolitičkih enzima uzgojem gljive bijelog truljenja *Dichomitus squalens* na otpadnim drvnim ostacima mekog (lipa) i tvrdog (hrast) drva. Proizvodnja je provedena u podlogama sa različitim izvorima ugljika (glukoza (kontrola), lipa, hrast te kombinacija lipe i glukoze i hrasta i glukoze) te su izmjerene aktivnosti proizvedenih ekstracelularnih enzima.

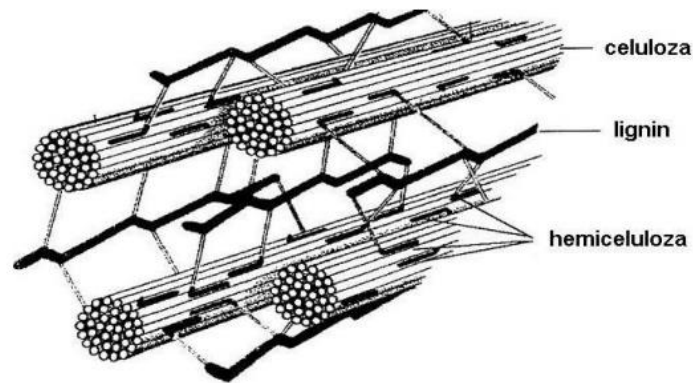
Cilj ovog rada bio je izmjeriti i usporediti aktivnosti proizvedenih ekstracelularnih lignolitičkih, celulolitičkih i hemicelulolitičkih enzima s obzirom na sastav hranjive podloge.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Lignocelulozna sirovina

#### 2.1.1. Sastav lignocelulozne sirovine

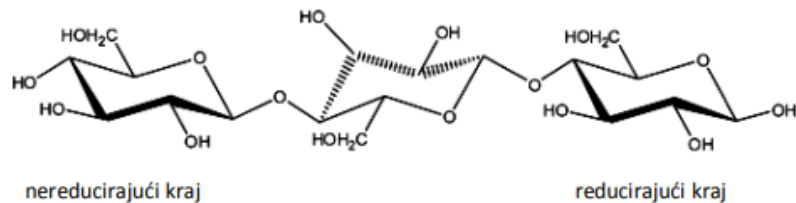
Lignocelulozna biomasa sastoji se od celuloze (40-50%), hemiceluloze (25-35%), lignina (15-20%), pektina, proteina i anorganskih tvari. Udio tih komponenti ovisi o sirovini iz koje potječe. Lignoceluloznu biomasu možemo podijeliti na tri velike skupine: poljoprivredni ostaci, šumarski ostaci te kruti komunalni otpad (Janušić i sur., 2008). Sastav stanične stjenke biljaka prikazan je na slici 1.



Slika 1. Shematski prikaz stanične stjenke biljke (Janušić i sur., 2008)

##### 2.1.1.1. Celuloza

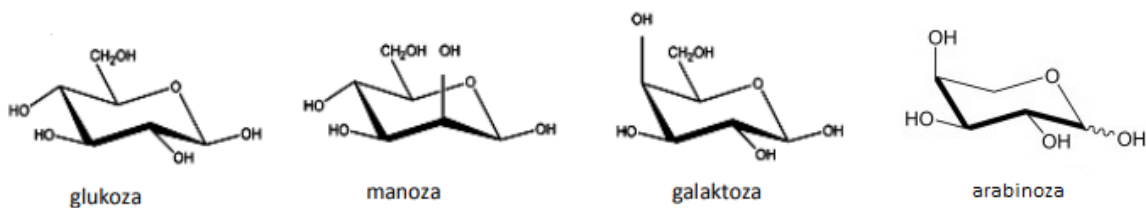
Celuloza ( $(C_6H_{10}O_5)_n$ ) je polisaharid koji se sastoji od glukočnih jedinica linearno povezanih  $\beta$ -1,4-glikozidnim vezama (Updegraff, 1969). Celuloza nema boju i miris, netopiva je u vodi i većini organskih otapala, ali je biorazgradiva (Bishop, 2007). Hidroksilne grupe jednog lanca formiraju vodikove veze s atomima kisika susjednog lanca pri čemu nastaje čvrstu strukturu. Mnoga svojstva celuloze ovise o duljini lanca i stupnju polimerizacije (Deguchi i sur., 2006). Celuloza sadrži 44.44% ugljika 6.17% vodika i 49.39% kisika (Chen, 2014). U biljkama se sintetizira na citoplazmatskoj membrani pomoću enzimskog kompleksa koji sadrži celuloza sintetazne enzime. Ti enzimi koriste UDP-glukozu kako bi stvorili  $\beta$ -1,4-glikozidne veze (Richmond i Somerville, 2000). Dio strukture celuloze prikazana je na slici 2.



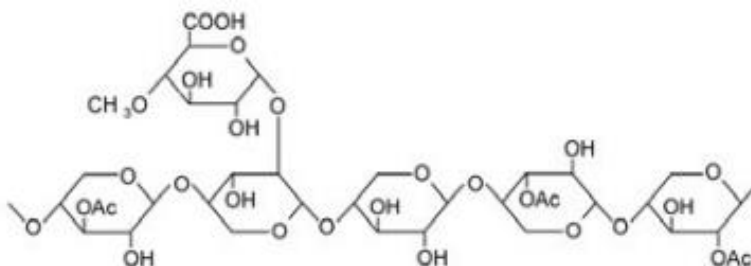
Slika 2. Struktura celuloze (Preeti i Parag, 2013)

### 2.1.1.2. Hemiceluloza

Za razliku od celuloze, hemiceluloza većini slučajeva sadrži različite monomere šećera (prikazane na slici 3), glukoze, manoze, galaktoze i arabinoze prikazane na slici 3. Najčešće sadrži D-pentoze, a u nekim slučajevima i L-pentoze (Van Dyk i Pletschke, 2012). Hemicelulozni lanci u pravilu su kraći od celuloznih. Sadrže 500-3000 povezanih šećernih monomera koji se mogu granati, dok celuloza sadrži u prosjeku 7000-15000 povezanih šećernih monomera koji se ne granaju (Gibson, 2013). Hemiceluloza se sintetizira na Golgijevom tijelu pomoću transmembranskih proteina (Pauly i sur., 2013). Struktura hemiceluloze prikazana je na slici 4.



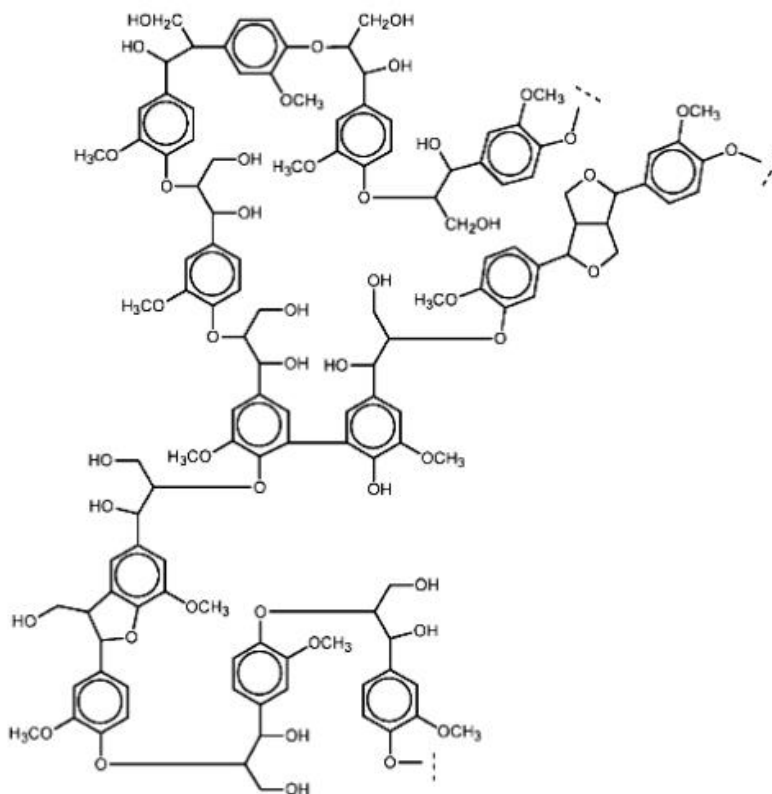
Slika 3. Monomeri hemiceluloze (Preeti i Parag, 2013; Langan i sur., 2014)



Slika 4. Struktura hemiceluloze (San Miguel i sur., 2011)

### 2.1.1.3. Lignin

Lignin se sastoji od nekoliko fenilpropanskih jedinica: p-kumaril alkohol, koniferil alkohol, gvajacil alkohol, siringil alkohol i sinapil alkohol međusobno povezanih alkil-aril, alkil-alkil i aril-aril vezama (Van Dyk i Pletschke, 2012). Lignin poboljšava čvrstoću i hidrofobna svojstva biljne stanične stjenke te potpomaže u prijenosu minerala kroz žilni sustav biljaka (Schuetz i sur., 2014). Također, predstavlja barijeru koja štiti biljke od nametnika i patogenih mikroorganizama (Ithal i sur., 2007). U stanici, biosinteza lignina započinje u citosolu (Samuels i sur., 2002). U drvenastim biljkama udio lignina je 27%-32% (Chen, 2014). Struktura lignina prikazana je na slici 5.



Slika 5. Struktura lignina (Pérez, 2002)

### **2.1.2. Otpadna drvena biomasa**

Pojam otpadne drvene biomase odnosi se na industrijske drvene ostatke i ponovno uporabljeno drvo. Otpadno drvo se može podijeliti na četiri kategorije (A I - A IV), od drva neznatno onečišćenog stranim materijalima do otpadnog drva tretiranog toksičnim sredstvima za zaštitu drva. Danas se takva biomasa koristi za drvnu sječku, blanjevinu ili iverje u proizvodnji drvnih kompozitnih materijala, za dobivanje sintetskog plina (syngas) te za kemijsko iskorištavanje do proizvodnje aktivnog ugljena (Antonović i sur., 2011).

#### *2.1.2.1. Lipa (Tilia)*

Lipa je rod listopadnih stabala visokih do 40 metara, srcolikih listova koji, iako osušeni, na stablu ostaju sve do kraja zime. U prirodi često rastu kao dio listopadnih šuma, a u urbanom šumarstvu drvo lipe se koristi za uređenje parkova. Rod lipa sadrži 30 vrsta od kojih su na našim područjima značajnije velelisna lipa (*Tilia platyphyllos*), sitnolisna lipa (*Tilia cordata*) i srebrnolisna lipa (*Tilia tomentosa*) (Šimić, 1980). Drvo lipe je meko, lako obradivo te gustoće u prosjeku 560 g/m<sup>3</sup> (Kurowska i Kozakiewicz, 2016).

#### *2.1.2.2. Hrast (Quercus)*

Hrast pripada porodici bukovki (*Fagaceae*) koje uglavnom rastu kao krupno drveće visine u prosjeku 40 metara. Raste kao dio hrastovih šuma kojima prijeti izumiranje zbog intenzivnog krčenja šuma za potrebe poljoprivrede i stočarstva. Zbog visokog udjela tanina otporno je na insekte i gljive (Sunset Western Garden Book, 1995). Rod *Quercus* sadrži oko 600 vrsta od kojih su na našim područjima najzastupljeniji hrast lužnjak (*Quercus robur*) i hrast kitnjak (*Quercus petraea*). Drvo hrasta je tvrdo i gustoće u prosjeku 750 g/m<sup>3</sup> (Baugh, 1965).

### **2.2. Gljive bijelog truljenja**

Ova skupina gljiva ima sposobnost razgrađivanja lignina u lignoceluloznim sirovinama. Njihovo ime potječe iz izgleda drveta obraslog ovim gljivama, kod kojih, uslijed uklanjanja lignina, dolazi do ispoljavanja bijele boje. Većina gljiva bijelog truljenja pripada razredu bazidiomicetama, iako ima i nekoliko vrsta koje pripadaju razredu askomiceta. Primarna karakteristika gljiva i drugih organizama je sposobnost razgradnje celuloze i hemiceluloze čija razgradnja se odvija u različitim

okolišnim uvjetima. Lignin je teže razgradiv i mineralizira se u obligatnim aerobnim oksidativnim procesima, koje provode isključivo gljive bijelog truljenja. Razgradnjom lignina ne dobiva se energija, stoga lignin nije primarni izvor ugljika za gljive bijelog truljenja, nego se njegova razgradnja odvija tijekom sekundarnog metabolizma kako bi se olakšao pristup polisaharidima u ligno-ugljikohidratnom kompleksu (Jeffries, 1990). Gljive bijelog truljenja sintetiziraju jedan ili više enzima (lakaze, lignin i mangan peroksidaze) važnih za razgradnju lignina, koji u kombinaciji s drugim procesima razgradnje pospješuju demineralizaciju lignina. Takve enzime nazivamo lignin-modificirajući enzimi (Janusz i sur.,2017).

### **2.2.1. *Dichomitus squalens***

*Dichomitus squalens* je gljiva bijelog truljenja koja se u industriji najčešće koristi za obezbojenje bojila (Gill i sur., 2007). Proizvodi enzime lakazu i mangan peroksidazu (Babič i sur., 2012). Za razliku od drugih gljiva bijelog truljenja kojima je razgradnja lignina posljedica sekundarnog metabolizma te se odvija u uvjetima bez prisustva ugljika ili dušika, ova gljiva proizvodi mangan peroksidazu u uvjetima kada je u podlozi dovoljna koncentracija dušika, ali uz prisutnost  $Mn^{2+}$  iona (Reddy i sur., 1997). Na slici 6 prikazano je plodno tijelo *D. squalens* izraslo na kori drveta.



Slika 6. *Dichomitus squalens* na kori drveta (Otto Miettinen, University of Helsinki)

### **2.3. Lignocelulolitički enzimi**

Enzimi su makromolekulski biokatalizatori koji ubrzavaju kemijske reakcije  $10^7$ - $10^{12}$  puta. Prema kemijskoj strukturi enzimi su proteini. Sudjeluju u metaboličkim reakcijama, staničnom disanju te u sintezi različitih staničnih molekula. Smanjenjem energije aktivacije i pravilnom orijentacijom reaktanata enzimi ubrzavaju reakcije pritom ne utječući na kemijsku ravnotežu. Enzimi sadrže aktivno mjesto tj. mjesto za vezanje supstrata. Specifičnost vezanja supstrata uvelike ovisi o rasporedu atoma u aktivnom mjestu, a kod nekih enzima vezanje supstrata uzrokuje promjenu aktivnog mjesta. Danas je poznato i opisano više od dvije tisuće enzima od kojih svaki provodi katalizu specifične reakcije. Upravo iz tog razloga specifični enzimi služe kao način određivanja specifične biološke aktivnosti i funkcija koje obavlja stanica (Berg i sur., 1996).

#### **2.3.1. Nomenklatura i klasifikacija enzima**

Enzimi najčešće dobivaju ime prema supstratu na koji djeluju, no osim toga i prema vrsti reakcije koju kataliziraju. Nastavak *-aza* označava imena svih enzima. Enzimi se najčešće klasificiraju u šest skupina (NC-IUBMB):

- Oksidoreduktaze – kataliziraju reakcije oksidacije i redukcije
- Transferaze – sudjeluju u prijenosu raznih atomskih skupina
- Hidrolaze – sudjeluju u reakcijama hidrolize
- Liaze – sudjeluju u stvaranju i cijepanju dvostrukih veza
- Izomeraze – prevode izomere iz jednog oblika u drugi
- Ligaze – sudjeluju u reakcijama sinteze pri čemu koriste energiju pohranjenu u adenozin-trifosfatu (ATP).

#### **2.3.2. Lignolitički enzimi**

Lignolitički enzimi je naziv za veliku skupinu enzima koja katalizira oksidacijsku depolimerizaciju lignina. U prirodi je ova grupa enzima vrlo raznolika te upravo iz tog razloga nalazi primjenu u širokom spektru industrija.

### 2.3.2.1. Lignin peroksidaza (LiP)

Lignin peroksidaza (EC 1.11.1.14.) je enzim koji pripada skupini oksidoreduktaza, a koji sintetiziraju neke gljive bijelog truljenja kao što je *Phanerochaete chrysosporium*, *Mucor racemosus*, *Aspergillus sclerotiorum* i *Cladosporium cladosporioides* (Andlar i sur., 2018). Za djelovanje lignin peroksidaza potrebna su još dva sekundarna metabolita koje sama gljiva proizvodi, a to su vodikov peroksid i veratril alkohol. Ovaj enzim ima sposobnost djelovanja na podlogama s dodatkom reducensa te se s toga koristi za smanjenje organskih onečišćenja (Linko i sur., 1996).

### 2.3.2.2. Mangan peroksidaza (MnP)

Mangan peroksidaza (EC 1.11.1.13.) je enzim oksidoreduktaza koji provodi reakciju oksidacije  $Mn^{2+}$  u  $Mn^{3+}$  koji se otpušta s površine enzima i oksidira fenolne supstrate, uključujući lignin i organska onečišćenja. Također, MnP se pokazao kao promotor peroksidacije nezasićenih masnih kiselina bez prisustva  $H_2O_2$ . Produkti djelovanja MnP i LiP su vrlo slični, no vidljive su specifične razlike u njihovim sekvencama DNA izoliranim iz gljiva bijelog truljenja (Hofrichter, 2002).

### 2.3.2.3. Lakaze (Lacc)

Lakaze (EC 1.10.3.2.) također pripadaju skupini oksidoreduktaza te kataliziraju oksidaciju širokog raspona fenolnih spojeva uz redukciju molekularnog kisika u vodu. Njihova enzimska aktivnost dodatno se može povećati dodatkom niskomolarnog medijatora koji ubrzava prijenos elektrona između enzima i supstrata tako da medijator formira oksidirani međuprodukt koji potom reagira sa supstratom (Mate i Alcalde, 2017). U svojoj strukturi sadrže četiri atoma bakra: T1, na koji se veže reducirajući supstrat, i T2/T3 grupe s tri atoma bakra koji vežu molekularni kisik. Enzimska kataliza započinje reduciranjem bakrovog atoma tipa 1 (T1) reducirajućim supstratom koji je potom oksidiran. Elektron se potom prenosi iz T1 bakra na T2/T3 grupu na kojoj je vezana molekula kisika. Lakaza oksidira četiri molekule reducirajućeg supstrata po jednoj molekuli kisika (Desai i Nityanand, 2011). Mnogim biljke, gljive i mikroorganizmi sintetiziraju enzim lakazu. Neke lakaze sudjeluju u sintezi lignina, dok one dobivene iz gljiva sudjeluju u njegovoj razgradnji (Solomon i sur., 1996).



### **2.3.3. Celulolitički i hemicelulolitički enzimi**

Celulolitički i hemicelulolitički enzimi je naziv za skupinu enzima koji razgrađuju celulozu i hemicelulozu. Za potpunu enzimsku razgradnju celuloze potrebno je sinergističko djelovanje tri grupe enzima: endoglukanaze (E.C. 3.2.1.4.), egzoglukanaze (E.C. 3.2.1.91.) i  $\beta$ -glukozidaze (E.C. 3.2.1.21.) (Singh i sur., 2019). Za razgradnju hemiceluloze potrebno je sinergističko djelovanje enzima kojim se omogućuje hidroliza polimernih lanaca hemiceluloze i bočnih supstituenata. Enzimi koji cijepaju glavni lanac hemiceluloze su:  $\beta$ -D-ksilanaze,  $\beta$ -D-mananaze i  $\beta$ -D-galaktanaze, imaju specifične supstrate i najčešće endohidrolitičku aktivnost kojom se smanjuje stupanj polimerizacije i ubrzava hidroliza hemiceluloze (Dekker, 1985).

#### *2.3.3.1. Celobioza dehidrogenaza (CDH)*

Celobioza dehidrogenaza (EC 1.1.99.18.) je ekstracelularni enzim koji proizvode gljive kako bi razgradili lignocelulozni materijal. Pripada skupini egzocelohidriobiolaza koje zajedno s  $\beta$ -glukozidazom pripadaju grupi egzoglukanaza (Pérez i sur., 2002). Celobioza dehidrogenaza cijepa celobiozni dimer sa ne reducirajućeg kraja mikrokristalične celuloze (Paul i Genescà, 2013). Struktura enzima sastoji se od katalitički aktivne domene koja sadrži flavin, a koja je povezana s hem domenom. Hem domena od velike je važnosti u primjeni ovog enzima u proizvodnji biosenzora jer služi kao baza za izravan prijenos elektrona na površinu elektrode (Harreither, 2010).

#### *2.3.3.2. Endoksilanaze*

Endoksilanaze pripadaju skupini enzima koji degradiraju ksilan do ksiloze te na taj način razgrađuju hemicelulozu u biljnoj staničnoj stjeci (Beg i sur., 2001). Glavni proizvođači endoksilanaza su gljive, bakterije, kvasci, morske alge i insekti (Polizeli i sur., 2005). U industriji se najčešće koriste pri izbjeljivanju pulpe drveta prilikom izrade papira (Gulzar, 2004). Osim u industriji papira, koriste se još i kao aditivi u mesnoj industriji te kao dodatci za poboljšanje kvalitete tijesta u pekarstvu (Beg i sur., 2001).

#### *2.3.3.3. Endoglukanaze*

Endoglukanaze su skupina enzima koje nasumično hidroliziraju  $\beta$ -1,4-glikozidne veze u celuloznim lancima, a kao rezultat imaju smanjenje duljine lanca i sporo povećanje reducirajućih krajeva. Imaju veći afinitet za celulozu, ali mogu razgrađivati ksilan te  $\beta$ -(1-3,1-4)-glukana (Cheng i Wang, 2017).

#### *2.3.3.4. Pektinaze*

Pektinaze su skupina enzima koji razgrađuju pektin. U industriji se najčešće koriste za ubrzavanje ekstrakcije soka iz voća, proizvodnju čaja, čokolade, ekstrakciju ulja (Mojsov, 2016).

## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Radni mikroorganizam

Korišteni radni mikroorganizam je gljiva bijelog truljenja *Dichomitus squalens*.

#### 3.1.2. Sirovine za pripremu hranjivih podloga

Sirovine korištene za pripremu hranjive podloge su lipa (*Tilia*), hrast (*Quercus*) i glukoza.

#### 3.1.3. Kemikalije i enzimi

Korištene kemikalije navedene su u tablici 1.

**Tablica 1.** Vrsta, čistoća i proizvođači kemikalija korištenih za provedbu eksperimenta

Kemikalije	Čistoća	Proizvođač
2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonična kiselina (ABTS)	p.a	BioChemica
2,6-dikloroindofenol (DCIP)	p.a	Sigma-Aldrich, Austria
2,6-dimetoksi fenol (siringol)	p.a	Sigma-Aldrich, Austria
3,5-dinitrosalicilna kiselina (DNSA)	p.a	Sigma-Aldrich, Austria
Arabinan		Sigma-Aldrich, Austria
Bovin serum albumin (BSA)	p.a	Sigma-Aldrich, Austria
Celuloza		Merck, Njemačka
Coomasie brilliant blue G		Sigma-Aldrich, Austria
Etanol	96%	Gram-mol d.o.o., Zagreb
Fosforna kiselina	p.a	T.T.T., Sveta nedjelja
Karboksimetil celuloza		Sigma-Aldrich, Austria
Ksilan		Sigma-Aldrich, Austria
Laktoza		Kemika, Zagreb
Manganov (II) sulfat	p.a	Kefo d.o.o., Sisak
Metanol	p.a	J.T. Baker
Natrijev fluorid	p.a	Sigma-Aldrich, Austria
Natrijev sulfit	p.a	Riedel, Honeywell Fluka Chemie
Pektin iz kore citrusa		Sigma-Aldrich, Austria
Vinska kiselina	p.a	Kemika, Zagreb

Enzimi kojima su određivane aktivnosti navedeni su u tablici 2.

**Tablica 2.** Enzimi kojima je određivana aktivnost u ovom istraživanju

<b>NAZIV</b>
Lakaze (Lacc)
Mangan peroksidaze (MnP)
Celobiazije dehidrogenaze (CDH)
Endoksilanaze
Endoarabinaze
Endoglukanaze
Egzoglukanaze
Pektinaze

### 3.1.4. Hranjive podloge za održavanje, čuvanje i uzgoj gljive bijelog truljenja

Za submerzni uzgoj gljive bijelog truljenja na laboratorijskoj tresilici korištena je tekuća hranjiva podloga čiji je sastav naveden u tablici 3.

**Tablica 3.** Sastav hranjive podloge

	<b>Koncentracija</b>	
<b>Izvor ugljika (C)</b>	a) Glukoza	10 g/L
	b) Lipa	10 g/L
	c) Hrast	10 g/L
	d) Lipa + glukoza	5 g/L + 5 g/L
	e) Hrast + glukoza	5 g/L + 5 g/L
<b>Izvor dušika (N)</b>	Pepton	5 g/L
<b>Izvor kalija (K) i fosfora (P)</b>	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.5 g/L
<b>Izvor magnezija (Mg)</b>	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.5 g/L
	$\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1 g/L
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.3 g/L
	$\text{H}_3\text{BO}_3$	3 g/L
<b>Elementi u tragovima</b>	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2 g/L
	$\text{CuSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.1 g/L
	$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.2 g/L
	$\text{H}_2\text{SO}_4$ conc.	4 mL/L

### 3.1.5. Oprema i aparatura

Oprema korištena pri ovom istraživanju navedena je u tablici 4.

**Tablica 4.** Popis opreme i proizvođača

<b>Oprema</b>	<b>Proizvođač</b>
<b>Analitička vaga</b>	Sartorius, Njemačka
<b>Autoklav</b>	Sutjeska, Beograd, Jugoslavija
<b>Centrifuga</b>	Tehtnica železniki
<b>HPLC</b>	Shimadzu, Japan
<b>Laboratorijska tresilica</b>	RM 71 B. Braun Biotech. International, Sartorius group, Njemačka
<b>Magnetska mješalica</b>	VWR
<b>pH-metar</b>	Hanna
<b>Sušionik</b>	Termo-medicinski aparati
<b>Tehnička vaga</b>	Technica ET-1111, Slovenija
<b>Termomikser</b>	Biosan
<b>UV-Vis spektrofotometar</b>	Agilent Technologies

#### *3.1.5.1. Uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC)*

Koncentracija ugljikohidrata, kiselina i alkohola (glukoza, galakturonska kiselina, mliječna kiselina, octena kiselina, etanol, glicerol) u supernatantima (tekuća faza) uzoraka izuzetih tijekom enzimske hidrolize (poglavlje 3.2.1.1.1.) određena je pomoću uređaja za tekućinsku kromatografiju Shimadzu CLASS-VP LC-10AVP (Shimadzu; Kyoto, Japan) prikazanog na slici 7.

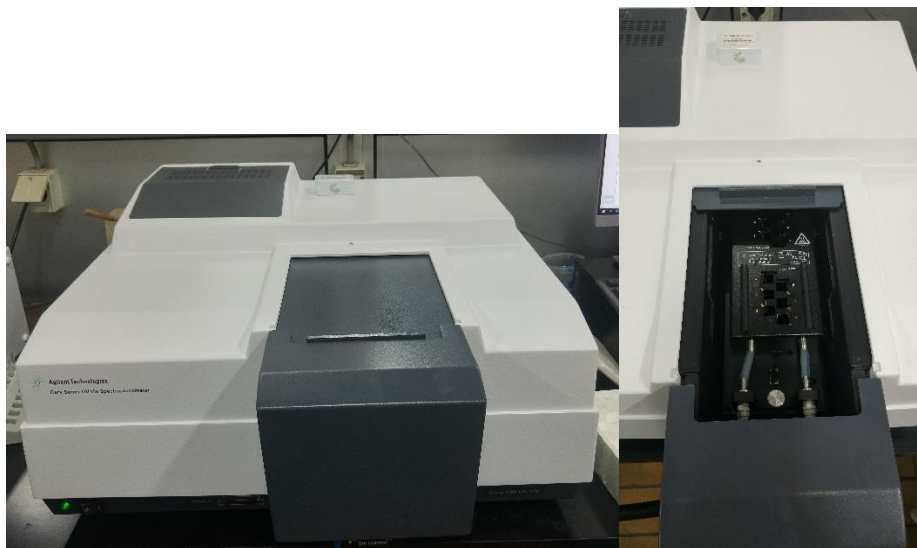


Slika 7. Shimadzu CLASS-VP LC-10AVP sustav za kromatografiju (Shimadzu, Kyoto, Japan)  
(vlastita fotografija)

Uređaj se sastoji od crpke (LC-10ADVP), otplinjača (DGU-14A), automatskog uzorkivača (SIL-10ADVP), uređaja za grijanje kolone (CTO-10AVP), analitičke kolone (ionsko-izmjenjivačka kolona Supelcogel™ C-610H; 30 cm x 7,8 mm i.d., 9  $\mu$ m; Sigma-Aldrich Co. (LLC), St. Louis, SAD) s predkolonom (Supelcogel™ H; 5 cm x 4,6 mm i.d., 9  $\mu$ m; Sigma-Aldrich Co. (LLC), St. Louis, SAD), detektora indeksa loma (RID-10A), modula za kontrolu sustava (SCL-10AVP) i računalnog programa za kromatografiju (CLASS-VP v6.10).

#### *3.1.5.2. UV-Vis spektrofotometar*

Pomoću UV-Vis spektrofotometra Cary Series mjerene su apsorbancije pri 595 nm za određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu (poglavlje 3.2.2.2.) i apsorbancije pri 575 nm za određivanje koncentracije reducirajućih šećera DNSA metodom na temelju koje je određena celulolitička i hemicelulolitička enzimska aktivnost (poglavlje 3.2.2.1.3.). Spektrofotometrijski je praćena i aktivnost enzima lakaza pri 420 nm, mangan peroksidaza pri 469 nm i celobioza dehidrogenaza pri 520 nm. Za tu svrhu korištene su plastične kivete promjera 10 mm (Hellma Optik GmbH, Jena, Njemačka). Kao referentna vrijednost uzeta je apsorbancija prema zraku.



Slika 8. UV-Vis spektrofotometra Cary Series (Agilent Technologies) (vlastita fotografija)

## 3.2. Metode rada

### 3.2.1. Priprema podloga za submerzni uzgoj i proizvodnju lignocelulolitičkih enzima

Obzirom na izvor ugljika u eksperimentu je korišteno pet različitih hranjivih podloga. Podloge su pripremljene tako da su u laboratorijsku čašu volumena 500 mL odvagani pepton (5 g/L), kalijev dihidrogenfosfat (0.5 g/L) i magnezijev sulfat (1.5 g/L) te je sve zajedno otopljeno u 400 mL deionizirane vode. Zatim su dodani elementi u tragovima (0.3 mL/L). pH vrijednost otopine podešen je na 5.5 dodatkom 1M NaOH. Tako pripremljena otopina prebačena je u menzuru te nadopunjena deioniziranom vodom do volumena 1.5 L. Budući da su izvori ugljika čvrsti supstrati dodavani su direktno vaganjem u Erlenmeyerove tikvice od 300 mL. Volumen podloge korištene u ovom istraživanju bio je 150 mL. Tikvice sa hranjivim podlogama, koja su sadržavale različite izvore ugljika (a-e, tablica 3), izvore dušika i elemente u tragovima, sterilizirane su u autoklavu pri 121 °C tijekom 20 min i tlaku od 1,5 – 2 bar. Nakon hlađenja, hranjive podloge su u sterilnim uvjetima naciepljene sa micelijem čiste kulture gljive *D. squalens* koja je uzgojena na kosom agaru. Šaržni uzgoj gljive i proizvodnja lignocelulolitičkih enzima provedena je na tresilici pri 28°C i 120 o/min. Vrijeme uzgoja u hranjivim podlogama iznosilo je 18 dana pri čemu su uzorci uzimani nakon 4, 7, 11, 13, 15 i 18 dana uzgoja. Nakon provedenog uzgoja sadržaj tikvica prebačen u sterilne boce te je centrifugiran. Izdvojeni supernatant je pohranjen u sterilne plastične boce od 100 mL i čuvan u frižideru do daljnjih analiza.

## **3.2.2. Analitičke metode**

### **3.2.2.1. Određivanje lignolitičkih, celulolitičke i hemicelulolitičke aktivnosti enzima**

#### *3.2.2.1.1. Priprema reagensa i otopina za analizu*

Otopina ABTS-a pripremljena je na način da se u 2 mL destilirane vode otopi 10.3 mg ABTS-a.

Otopina siringola pripremljena je otapanjem 154 mg 2,6-dimetoksifenola u 100 mL destilirane vode uz konstantno miješanje i bez zagrijavanja.

Otopina  $MnSO_4$  pripremljena je otapanjem 84.5 mg  $MgSO_4$  u 100 mL destilirane vode.

Otopina  $H_2O_2$  pripremljena je razrjeđenjem 20.3  $\mu L$  vodikovog peroksida u 20 mL destilirane vode uz miješanje.

Otopina DCIP-a pripremljena je dodatkom 87.03 mg DCIP-a u 10 mL 96% etanola uz miješanje 30 min pri 50°C. Nakon potpunog otapanja dodano je destilirane vode do volumena od 100 mL.

Otopina laktoze je pripremljena otapanjem 10.81 g laktoze u 100 mL vode uz zagrijavanje i miješanje na laboratorijskoj miješalici.

Otopina DNSA pripremljena je otapanjem 10.0 g DNSA, 0.5 g natrijevog sulfita, 10g natrijevog hidroksida i 2 mL fenola u 998 mL destilirane vode uz jako miješanje na 4°C 48 sati.

Otopina K-Na tartarata pripremljena je otapanjem 40 g K-Na tartarata u 100 mL destilirane vode.

Citratni pufer pripremljen je otapanjem 4.80 g octene kiseline u 400 mL destilirane vode te je otopina titrirana sviježe pripremljenim NaOH (4 M) do pH 5, nakon čega je dodano destilirane vode do volumena od 500 mL.

Na-acetatni pufer pripremljen je dodatkom 2.86 mL octene kiseline (99%) u 400 mL destilirane vode te je otopina titrirana sviježe pripremljenim NaOH do pH 4, nakon čega je dodano destilirane vode do volumena od 500 mL.

Na-tartaratni pufer pripremljen je dodatkom 3.75 g vinske kiseline u 400 mL destilirane vode te je otopina titrirana sviježe pripremljenim NaOH do pH 4.5, nakon čega je dodano destilirane vode do volumena od 500 mL.



### 3.2.2.1.2. Mjerenje aktivnosti enzima lakaza

Aktivnost enzima lakaza (Lacc) je mjerena spektrofotometrijski pri 420 nm i temperaturi od 30°C u plastičnoj kiveti promjera 10 mm. Mjerenja su provedena u plastičnoj kiveti volumena 1 cm<sup>3</sup>, u koju je dodano 880 µL acetatnog pufera pH 4.0 (100mM) i 100 µL otopine ABTS (10 mM) prethodno termostatiranih minimalno 20 minuta pri 30 °C. Reakcija je započeta dodatkom 20 µL uzorka i praćenjem odvijanja reakcije oksidacije 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonične kiseline) (ABTS) tijekom 180 s. Ova spektrofotometrijska metoda bazira se na kolorimetrijskoj reakciji promjene apsorbancije tijekom vremena nakon početka inicijalne reakcije pri čemu dolazi do linearnog rasta apsorbancije o vremenu koja je u proporcionalnom odnosu s enzimskom aktivnosti. Tijekom 180 s, pri λ = 420 nm, mjerena je promjena apsorbancije u vremenu (ΔA/Δt) te je iz dobivenih promjena apsorbancija izračunata volumna aktivnost enzima lakaze prema jednadžbi (1):

$$\text{Volumna enzimska aktivnost } \left(\frac{U}{L}\right) = \frac{t_2 - t_1}{Abs_2 - Abs_1} * EF \quad (1)$$

t1 – početno vrijeme (min) mjerenja promjene apsorbancije

t2 – vrijeme završetka (min) mjerenja promjene apsorbancije

Abs1 – početna razlika u apsorbanciji

Abs2 – konačna razlika u apsorbanciji

EF – enzimski faktor

$$EF = \frac{\text{volumen kivete} * \text{faktor razrjeđenja uzorka}}{\text{volumen uzorka} * \epsilon} \quad (2)$$

ε<sub>420</sub> – molekularni apsorpcijski koeficijent ABTS-a = 36 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>

### 3.2.2.1.3. Mjerenje aktivnosti enzima mangan peroksidaza

Aktivnost enzima mangan peroksidaze (MnP) je mjerena spektrofotometrijski pri 469 nm i temperaturi od 30°C u plastičnoj kiveti promjera 10 mm. Prije početka mjerenja aktivnosti MnP u kivetu je dodan Na-tartarat pufer pH 4.5 (50 mM), otopina siringola (10 mM), MnSO<sub>4</sub> (5 mM), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mM) i NaF te je kiveta termostatirana minimalno 20 minuta pri 30 °C. Aktivnost određivana je mjerenjem brzine enzimске reakcije pri kojoj se uz vodikov peroksid kao oksidans, manganov (II) kation oksidira u manganov (III) kation koji potom oksidira siringol pri čemu nastaje smeđe-crveno obojenje oksidiranog siringola. Ova kolorimetrijska metoda bazira se na

promjeni apsorbancije tijekom vremena od 5 minuta nakon početka inicijalne reakcije pri čemu dolazi do linearnog rasta apsorbancije o vremenu koja je u proporcionalnom odnosu s enzimskom aktivnosti. Iz dobivenih promjena apsorbancija izračunata volumna aktivnost enzima MnP prema jednadžbi (1). Molekularni apsorpcijski koeficijent za mjerenje aktivnosti MnP pri 469 nm iznosi  $\epsilon_{469}=27.5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

#### *3.2.2.1.4. Mjerenje aktivnosti enzima celobioza dehidrogenaza*

Aktivnost celobioza dehidrogenaza (CDH) je određivana mjerenjem brzine enzimске reakcije redukcije DCIP-a (elektron akceptor) pomoću laktoze (elektron donor) nakon koje dolazi do obezbojenja plave boje DCIP-a. Ova spektrofotometrijska metoda bazira se na promjeni apsorbancije pri 520 nm, nakon početka inicijalne reakcije, pri čemu dolazi do linearnog pada apsorbancije o vremenu koja je u proporcionalnom odnosu s enzimskom aktivnosti. Mjerenja su provedena u plastičnoj kivetu volumena  $1 \text{ cm}^3$ , u koju je dodano 760  $\mu\text{L}$  acetatnog pufera pH 4.0 (100mM), 100  $\mu\text{L}$  otopine DCIP (3 mM), 100  $\mu\text{L}$  otopine laktoze (300 mM) i 20  $\mu\text{L}$  NaF (200 mM). Kivete su termostahirane minimalno 20 minuta pri 30 °C. Reakcija je započeta dodatkom 20  $\mu\text{L}$  uzorka i praćenjem odvijanja reakcije pri 520 nm u vremenu od 180 s. Iz dobivenih promjena apsorbancija izračunata volumna aktivnost enzima CDH prema jednadžbi (1). Molekularni apsorpcijski koeficijent za mjerenje aktivnosti CDH enzima pri 520 nm iznosi  $\epsilon_{469}=6.9 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

#### *3.2.2.1.5. Mjerenje celulolitičke i hemicelulolitičke aktivnosti enzima DNSA metodom*

Aktivnost celulolitičkih i hemicelulolitičke enzima određivana je spektrofotometrijski na osnovi određivanja koncentracije reducirajućih šećera oslobođenih tijekom razgradnje supstrata upotrebom 3,5-dinitrosalicilne kiseline (engl. *3,5-dinitrosalicylic acid assay*, DNSA) (Miller, 1959). Karbonilna skupina šećera oksidira u karboksilnu, a 3,5-dinitrosalicilna kiselina reducira u 3-amino-5-nitrosalicilnu kiselinu. Jedan mol šećera reagira s jednim molom DNSA kiseline. Kao rezultat kemijske reakcije, DNSA reagens mijenja boju s prvotne svjetlo žute u krajnju crveno – smeđu boju. Koncentracija nastale 3-amino-5-nitrosalicilne kiseline određuje se spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini 575 nm. U tablici 5 navedena su nazivi enzima, EC-brojevi enzima, supstrati i odgovarajući šećeri čija je koncentracija mjerena sa ciljem određivanja enzimске aktivnosti DNSA metodom.

Tablica 5. Supstrati i odgovarajući šećeri za izračun celulolitičke i hemicelulolitičke aktivnosti enzima DNSA metodom

<b>ENZIM</b>	<b>EC-BROJ</b>	<b>SUPSTRAT</b>	<b>ODGOVARAJUĆI ŠEĆER</b>
<b>Endoksilanaze</b>	3.2.1.8	ksilan	D-ksiloza
<b>Endoarabinaze</b>	3.2.1.99	arabinan	L-arabinoza
<b>Endoglukanaze</b>	3.2.1.4	celuloza	D-glukoza
<b>Egzoglukanaze</b>	3.2.1.74	karboksimetil celuloza	D-glukoza
<b>Pektinaze</b>	3.2.1.15	pektin	galakturonska kiselina

#### *3.2.2.1.5.1. Priprema reagensa i otopina za DNSA analizu*

Za pripravu DNSA reagensa izvagano je 10 g 3,5-dinitrosalicilne kiseline, 0.5 g natrijevog sulfita i 10 g natrijevog hidroksida koji su otopljeni u 998 mL demineralizirane vode. Nakon otapanja dodano je 2 mL fenola te se pripremljeni reagens pohranio u tamnoj boci. Rochellove soli sadržavale su 40 g natrij, kalij tartarata otopljenog u demineraliziranoj vodi u odmjernoj tikvici od 100 mL. Također, otopljeno je 4.8 g citratne kiseline u 400 mL demineralizirane vode u Erlenmayerovoj tikvici od 500 mL te se pH vrijednost dobivenog citratnog pufera podesila na 5.0 dodatkom 2 M natrijeve lužine. Otopine šećera za izradu baždarnih dijagrama pripremljenu su na način da je u 200 mL demineralizirane vode otopljeno je 2 g odgovarajućeg šećera (ksiloza, glukoza, galakturonska kiselina, arabinoza) te su pripremljena različita razrjeđenja otopina šećera za izradu baždarnih dijagrama (prilog 7.2.).

#### *3.2.2.1.5.2. Postupak provođenja DNSA analize*

U epruvete od 1.5 mL odvagano je ~10 mg odgovarajućeg supstrata (ksilan, arabinan, celuloza, karboksimetil celuloza i pektin). Nakon centrifugiranja prevrele podloge lignocelulozne sirovine iz izdvojenog supernatanta je odpipetirano 0.5 mL uzorka i preneseno u epruvetu sa supstratom. U tako pripremljeni nerazrijeđeni uzorak enzima dodano je 0.5 mL citratnog pufera (50 mM; pH vrijednost 5.0) te su uzorci termostatirani na 40°C kroz 30 minuta pri 1000 rpm na Eppendorf

termomikseru (Eppendorf, Germany). Proba s enzimom nije sadržavala supstrat, dok je kontrola supstrata i kontrola reagensa sadržavala samo 1 mL citratnog pufera. Nakon provedene reakcije, uzorci su centrifugirani pri 10000 x g kroz 10 min te je tako dobiveni supernatan korišten za kvantifikaciju reducirajućih šećera. Iz supernatanta je izdvojeno 600 µL uzorka kojem je dodano 600 µL DNSA reagensa te su uzorci inkubirani 15 min pri 95°C, nakon čega je dodano 200 µL Rochellove soli zbog stabilizacije boje uzorka. Nakon hlađenja uzoraka mjerena je apsorbancija pri 575 nm.

Koncentracije produkata izračunate su iz baždarnih dijagrama (prilog 7.2.). Jedna enzimska jedinica aktivnosti definira se kao količina enzima potrebna da se otpusti 1 µmol reducirajućeg šećera po minuti pri specifičnim uvjetima. Za izračun celulozitičke i hemicelulozitičke aktivnosti koristi se metoda izračuna koncentracije oslobođenog šećera pomoću baždarnog dijagrama te jednadžbi (3):

$$\text{Enzimska aktivnost} \left( \frac{U}{mL} \right) = \frac{\text{Oslobodena koncentracija šećera} [\mu\text{mol}]}{\text{Vrijeme inkubacije} [\text{min}] * 1 \text{ mL}} * \text{faktor razrjeđenja} \quad (3)$$

Za prevođenje jedinica iz mg u µmol korišteni su slijedeći omjeri :

Glukoza: 1 mg = 5.5506 µmol

Manoza: 1 mg = 5.5506 µmol

Galaktoza: 1 mg = 5.5507 µmol

Ksiloza: 1 mg = 6.6609 µmol

Arabinoza: 1 mg = 6.6609 µmol

Galakturonska kiselina: 1mg = 5.1509 µmol

Izračun se provodio prema jednadžbi (4):

$$\text{Množina tvari} [\mu\text{mol}] = \frac{\text{masa oslobođenog šećera} [\text{mg}] * \text{množina 1 mg tog šećera} [\mu\text{mol}]}{1 \text{ mg}} \quad (4)$$

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

#### *3.2.2.2.1. Postupak provođenja analize*

Bradford reagens se pripremi na način da se 100 mg Comassie Brilliant Blue G-250 otopi u 50 mL 95% etanola te se doda 100 mL 85% (w/v) fosforne kiseline. Nakon što se boja u potpunosti otopi, otopina se razrjedi s 1 L deionizirane vode, te se prije korištenja profiltrira. Za određivanje koncentracije proteina pripremi se serija proteinskih standarda BSA u koncentracijama od 0.1 do 1.5 mg/mL na način da je konačni volumen 0.1 mL. Nepoznati uzorci se pripreme na sličan način tako da je konačni volumen 0.1 mL. U svaki standard i nepoznati uzorak dodaje se 3 mL Bradford reagensa, strese, a zatim termostatira na sobnoj temperaturi 5 min. Apsorbancija se mjeri pri 595 nm. Pomoću dobivene apsorbancije standarda izradi se baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji proteina, a iz jednadžbe pravca odredi nepoznata koncentracija uzorka.

### **3.2.2.3. Određivanje koncentracije šećera pomoću tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC)**

Shimadzu CLASS-VP LC-10AVP kromatograf (Japan) korišten je za određivanje koncentracije razgradnih produkata u uzorcima tijekom enzimske hidrolize mekog i tvrdog drva kao sirovine. Dijelovi sustava opisani su u poglavlju 3.1.5.1.

#### *3.2.1.1.1. Priprema uzoraka za HPLC analizu*

Iz svake tikvice prilikom enzimske hidrolize izuzeto je po 1 mL smjese u Eppendorf epruvete i zamrznuto na -20 °C. Denaturacija proteina izvršena je s pomoću ZnSO<sub>4</sub> (100 g/L) tijekom 20 min. Zatim je izvršeno centrifugiranje pri 10 000 o min<sup>-1</sup> tijekom 10 min. Za određivanje koncentracije razgradnih produkata HPLC analizom priređeno je odgovarajuće razrjeđenje dobivenog supernatanta ovisno o početnoj koncentraciji supstrata i vremenu enzimske reakcije. Uzorci su prije analize profiltrirani kroz filter s porama od 0,2 µm (Chromafil®Xtra PA(NY) – 20 µm/25 mm; Macherey-Nagel GmbH CoKG, Düren, Njemačka).

#### *3.2.1.1.2. HPLC analiza*

Za pripremu otopina korištena je redestilirana voda čija je vodljivost iznosila manje od 1  $\mu\text{S}$ . Kao mobilna faza korištena je otopina  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (0,1 % vol/vol) u vodi. Po 20  $\mu\text{L}$  svakog uzorka injektirano je i propušteno kroz kolonu pri temperaturi od 30  $^\circ\text{C}$  i brzini protoka mobilne faze od 0,5 mL/min.

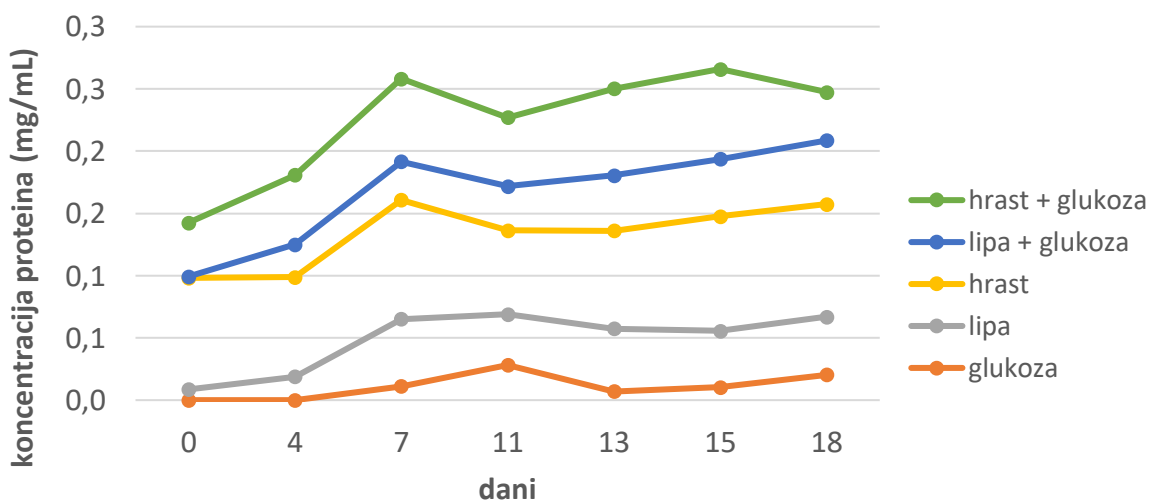
Nakon kromatografske analize integracija dobivenih dijagrama se izvršila pomoću računalnog programa CLASS.VP verzija 6.10. Koncentracija produkata u uzorcima određena je iz baždarnih dijagrama za standarde šećera. Baždarni dijagrami i jednadžbe pravaca za standarde glukoze, galakturonske, mliječne i octene kiseline, etanola i glicerola prikazani su u prilogu 7.4.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je izmjeriti i usporediti aktivnosti proizvedenih ekstracelularnih lignolitičkih, celulolitičkih i hemicelulolitičkih enzima gljive bijelog truljenja *Dichomitus squalens* s obzirom na sastav hranjive podloge. S tim ciljem korištene su podloge s različitim izvorima ugljika: glukoza, lipa, hrast, kombinacija lipe i glukoze te hrasta i glukoze. Submerzni uzgoj *D. squalens* trajao je 18 dana, a svakih nekoliko dana se uzimao uzorak tekuće hranjive podloge kako bi se odredila ukupna koncentracija proteina te izmjerile koncentracije ekstracelularnih oksidoreduktaza enzima lakaze, mangan peroksidaze, celobioza dehidrogenaze te celulolitičkih i hemicelulolitičkih enzima (ksilanaze, arabinaze, pektinaze, celulaze i karboksimetil celulaze).

### 4.1. Ukupna koncentracija proteina

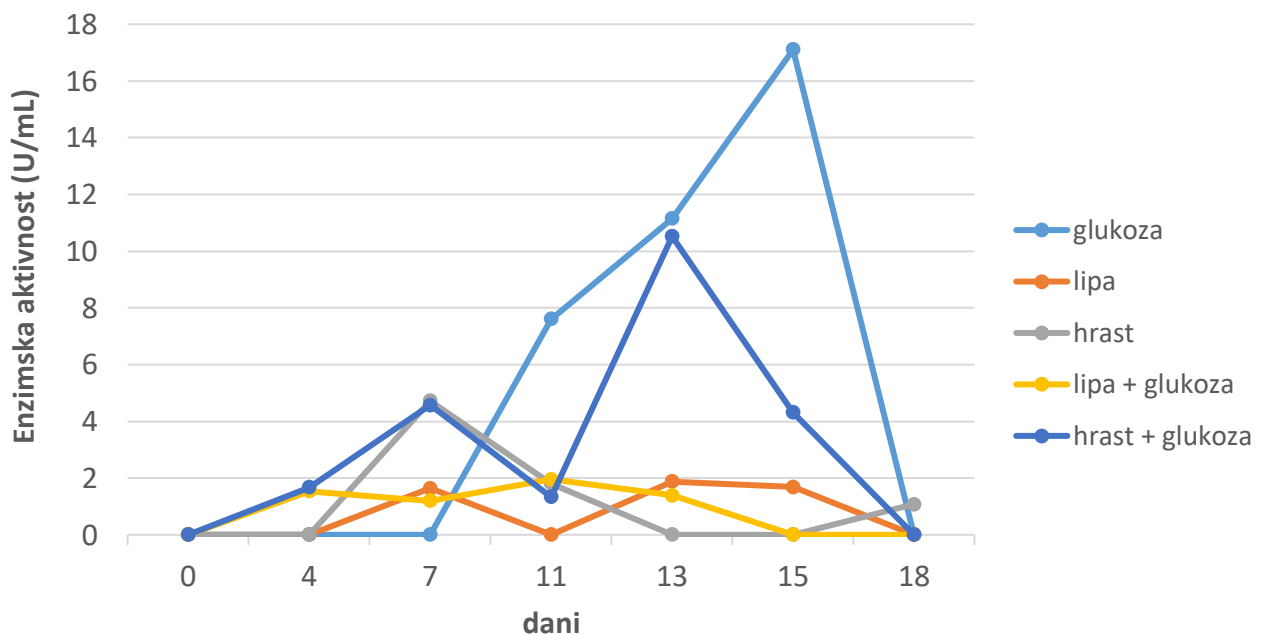
Koncentraciju ukupnih proteina u podlogama s različitim izvorom ugljika određivali smo metodom po Bradfordu (prethodno opisana 3.2.2.2). Najveća koncentracija proteina izmjerena je u podlozi s hrastom i glukozom kao izvorom ugljika 7. dana uzgoja. Najmanja koncentracija proteina izmjerena je u podlogama s glukozom kao izvorom ugljika. Izmjerene koncentracije ukupnih proteina prikazane su na slici 9.



Slika 9. Koncentracije proteina u podlogama s različitim izvorima ugljika određene metodom po Bradfordu

## 4.2. Enzimski aktivnost lakaze

Na slici 10 je vidljivo da tek nakon 7. dana uzgoja u podlozi s glukozom gljiva *D. squalens* sintetizira enzim lakazu, te je 15. dana uzgoja izmjerena aktivnost lakaze bila 17 U/mL što je ujedno i najviše izmjerena aktivnost u usporedbi sa drugim podlogama. Između 7. i 11. dana primijećen je značajan porast u aktivnosti lakaza u toj podlozi u odnosu na aktivnost lakaze u podlogama s drugim izvorima ugljika. U pravilu najveća proizvodnja lakaza odvija se u idiofazi rasta mikroorganizma u povoljnim uvjetima gdje je rast statičan zbog sve manje koncentracije ugljika (Lorenzo i sur. 2002), što je jasno vidljivo iz enzimski aktivnosti lakaze u podlozi s glukozom prikazane na slici 10. U ostalim podlogama vidljiva je aktivnost lakaze tijekom gotovo svih dana uzgoja. Već 4. dana uzgoja zabilježena je aktivnost u podlogama s lipom i glukozom te hrastom i glukozom, a nakon 7. dana u svim podlogama (osim podloge s glukozom).

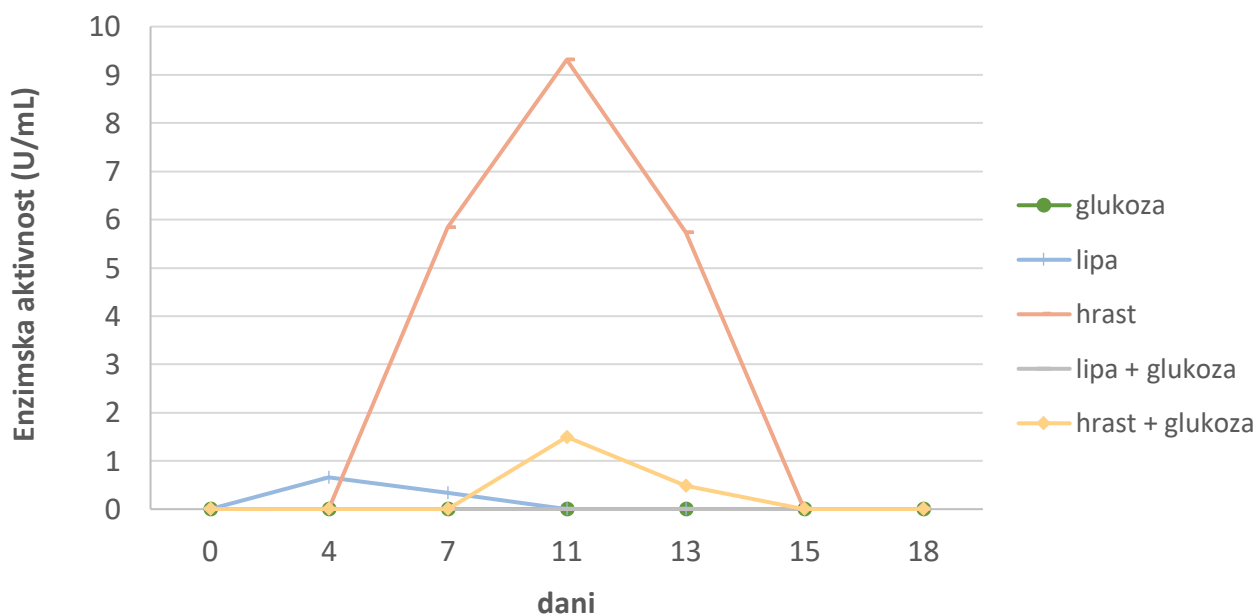


Slika 10. Prikaz enzimski aktivnosti lakaze u podlogama s različitim izvorima ugljika



### 4.3. Enzimska aktivnost mangan peroksidaze

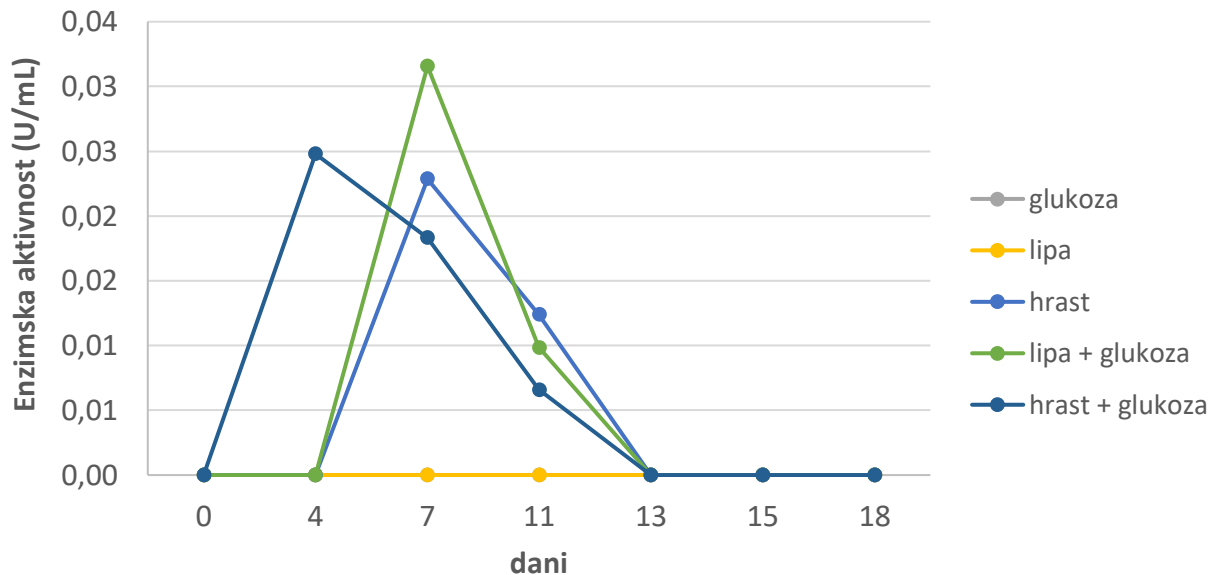
Na slici 11 prikazane su izmjerene aktivnosti enzima mangan peroksidaze (MnP) u različitim podlogama. U podlozi koja je sadržavala glukozu kao izvor ugljika nije zabilježena aktivnost MnP što je u skladu s očekivanjima jer taj enzim prvenstveno služi za razgradnju lignina. Najveće enzimske aktivnosti ovog enzima izmjerene su 7., 11. i 13. dan u podlozi koja je sadržavala hrast kao izvor ugljika, dok je u podlozi koja je sadržavala lipu izmjerena aktivnost 4. i 7. dan uzgoja, a u podlozi koja je sadržavala hrast i glukozu 11. i 13. dana uzgoja. U podlozi koja je sadržavala lipu i glukozu kao izvor ugljika nije detektirana enzimska aktivnost mangan peroksidaze niti jedan dan uzgoja. Maksimalna aktivnost MnP enzima izmjerena je nakon 11 dana uzgoja u hranjivoj podlozi sa hrastom.



Slika 11. Prikaz enzimske aktivnosti mangan peroksidaze u podlogama s različitim izvorima ugljika

#### 4.4. Enzimska aktivnost celobioze dehidrogenaze (CDH)

Na slici 12 prikazana je enzimska aktivnost celobioza dehidrogenaze u različitim podlogama. Značajnija aktivnost određena je 7. dana uzgoja u podlozi koja je sadržavala lipu i glukozu kao izvor ugljika, dok je manja aktivnost određena u podlozi koja je sadržavala hrast te hrast i glukozu kao izvore ugljika. U podlozi koja je sadržavala hrast kao izvor ugljika određene su aktivnosti 7. i 11. dana uzgoja.

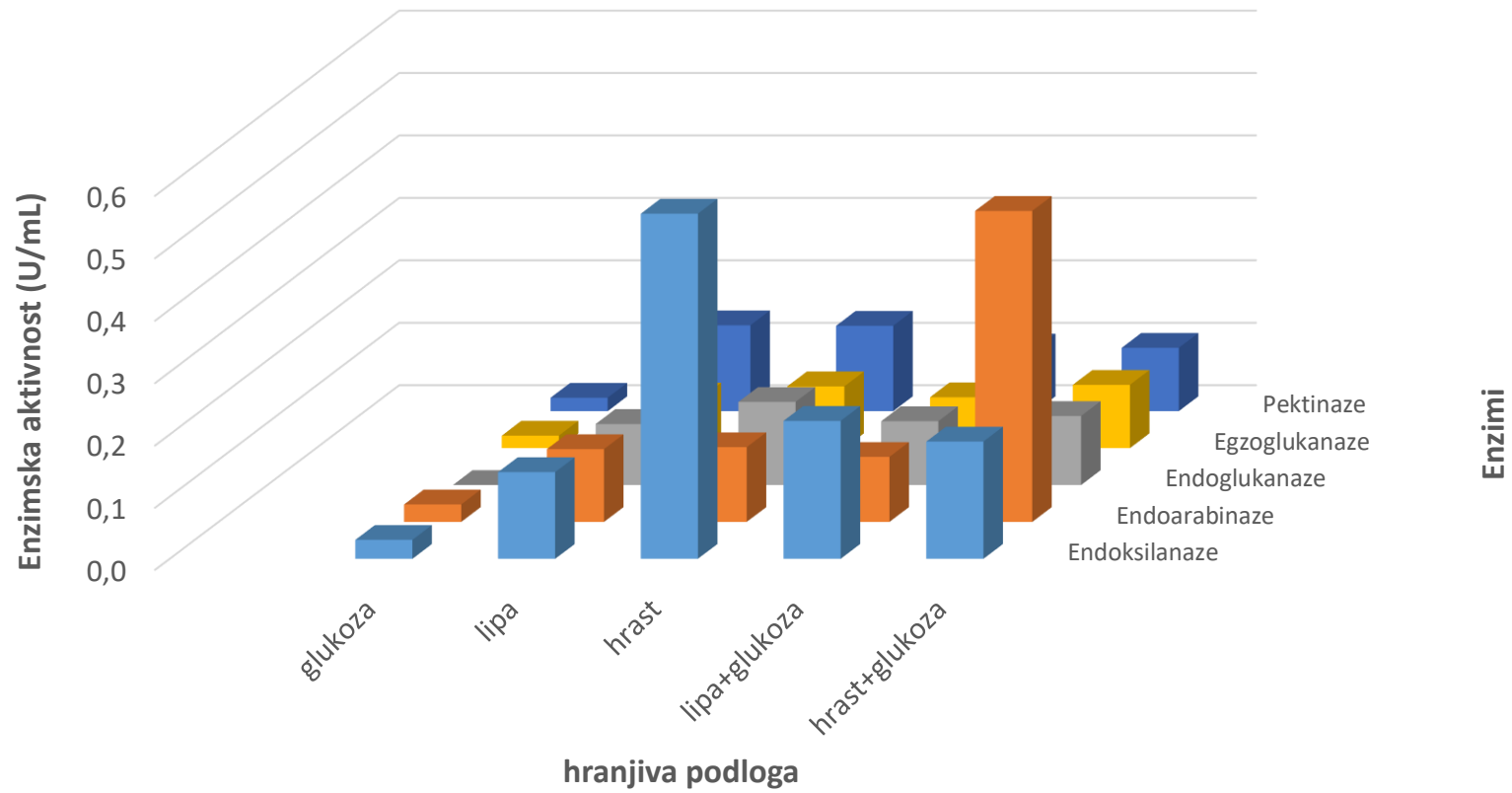


Slika 12. Prikaz enzimske aktivnosti celobioza dehidrogenaze na podlogama s različitim izvorima ugljika

#### 4.5. Enzimske aktivnosti celulolitičkih i hemicelulolitičkih enzima

U tablici 6 (prilog 7.3) prikazane su izmjerene enzimske aktivnosti za celulolitičke i hemicelulolitičke enzima: ksilanaze, arabinaze, celulaze, karboksimetil celulaze i pektinaze. Niske enzimske aktivnosti zabilježene su u podlozi s glukozom. Enzime celulaze možemo podijeliti na inducibilne i konstitutivne enzime (Payne, 2015). Dokazano je da neki „ne-celulozni“ supstrati (uključujući glukozu, laktozu i hidrolizate škroba) induciraju proizvodnju celulolitičkih enzima u niskim koncentracijama (Nakari-Setälä i Penttilä, 1995; Chen i Wayman, 1992). U ostalim podlogama zabilježene su nešto veće aktivnosti celulolitičkih i hemicelulolitičkih enzima. Najveće aktivnosti

ksilanaza i celulaza zabilježene su u podlozi s hrastom, arabinaza u podlozi s glukozom, karboksimetil celulaza u podlozi s hrastom i glukozom, a pektinaza u podlozi s lipom. Izmjerene vrijednosti aktivnosti ovih enzima u podlogama s različitim izvorima ugljika prikazane su na slici 12. U prilogu 7.3 brojčano su prikazane vrijednosti aktivnosti celulozitičkih i hemicelulozitičkih enzima.



Slika 12. Prikaz enzimске aktivnosti celulolitičkih i hemicelulolitičkih enzima na podlogama s različitim izvorima ugljika

#### **4.6. Razgradni produkti**

Koncentracije razgradnih produkata u uzorcima uzimanih tijekom submerznog uzgoja *D. squalens* na otpadnim drvnim ostacima mekog (lipa) i tvrdog (hrast) određene su pomoću tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC). Rezultati analize su prikazani u prilogu 7.5.

## 5. ZAKLJUČCI

Na osnovi ovog istraživanja može se zaključiti:

1. Kompleksne hranjive podloge s dodatkom otpadnih ostataka hrasta i lipe imaju utjecaj na sintezu lignocelulolitičkih, hemicelulolitičkih i celulolitičkih enzima gljive bijelog truljenja *Dichomitus squalens*.
2. Proizvodnja enzima lakaze usko je povezana uz faze rasta gljive bijelog truljenja *D. squalens* i limitaciju izvorom ugljika. Nakon 7. dana uzgoja u podlozi s glukozom, gljiva *D. squalens* proizvodi enzim lakazu, te je 15. dana uzgoja u toj podlozi izmjerena najviša aktivnost lakaze koja je iznosila 17 U/mL.
3. U podlozi s glukozom izmjerene su vrlo niske koncentracije celulolitičkih i hemicelulolitičkih enzima. Dodatak hrasta u hranjivu podlogu inducirao je proizvodnju enzima ksilanaza i arabinaza te je u toj podlozi povećana njihova aktivnost.

## 6. POPIS LITERATURE

1. Alriksson B. (2006) Ethanol from lignocellulose: Alkali detoxification of dilute-acid spruce hydrolysates (Licentiate dissertation). Faculty of Technology and ScienceBiochemistry, Karlstad University, Karlstad, Sweden.
2. Andlar M., Rezić T., Marđetko N., Kracher D., Ludwig R., Šantek B. (2018) Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. *Engineering in Life Sciences* **18**: 1980-2019.
3. Anonymus (2019) Priroda i biljke. <<https://www.plantea.com.hr/lipa/>> Pristupljeno 20. lipnja 2019.
4. Antonović A., Jambrečković V., Ištvanić J., Španić N. (2011) Zbrinjavanje uporabljenog drva i njegova daljnja primjena, Zbrinjavanje otpada - norme, novosti i praksa, Hrvatska udruga za zdravo radno mjesto. str. 25-29.
5. Babič J., Likozar B. i Pavko A. (2012) Optimization of Ligninolytic Enzyme Activity and Production Rate with *Ceriporiopsis subvermispora* for Application in Bioremediation by Varying Submerged Media Composition and Growth Immobilization Support. *International Journal of Molecular Sciences* **13**(9): 2000-2019.
6. Baugh D.A. (1965) British Naval Administration in the Age of Walpole. Princeton University Press., str. 242
7. Beg Q.K., Kapoor M., Mahajan L., Hoondal G.S. (2001) Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology* **56** (3–4): 1975-2019.
8. Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L. (2004) Biochemistry, 5.izd, W.H. Freeman i company. str 301.
9. Bishop C.A. (2007) Vacuum deposition onto webs, films, and foils., 2. izd., Elsevier. str. 165.
10. Chen H. (2014) Biotechnology of Lignocellulose: Theory and Practice, 1. izd., Springer. str. 25-71.
11. Chen H., Wang L. (2017) Technologies for Biochemical Conversion of Biomass, 1. izd., Academic press. str. 65-99.

12. Chen S., Wayman M. (1992) Novel inducers derived from starch for cellulase production by *Trichoderma reesei*. *Process Biochem* **27**: 2000-2019.
13. Deguchi S, Tsujii K., Horikoshi K. (2006) Cooking cellulose in hot and compressed water. *Chemical Communications* **31**: 1989-2019.
14. Dekker R. (1985) *Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components*, 1. izd, Academic Press. str. 505-533.
15. Desai S. i Nityanand C. (2011) Microbial Laccases and their Applications: A Review. *Asian Journal of Biotechnology* **3**(2): 2017-2019.
16. Gibson LJ. (2012) The hierarchical structure and mechanics of plant materials. *Journal of the Royal Society Interface* **9**(76), 2004-2019.
17. Gill P., Arora D. i Chander M.J. (2002) Involvement of lignin peroxidase and laccase in degradation and selective lignolysis of wheat straw. *International biodeterioration and biodegradation* **50**: 115-120.
18. Gulzar (2004) Production and partial purification of Xylanase from *Trichoderma longibrachiatum*. Published in international conference on biotechnology and neurosciences. CUSAT, 2004.
19. Harreither DI Wolfgang (2010) Biochemical and electrochemical characterisation of cellobiose dehydrogenase for its application in biosensors and biofuel cell, Dissertation, Vienna.
20. Hofrichter M. (2002) Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology* **30**(4): 1979-2019.
21. Ithal N., Recknor J., Nettleton D., Maier T., Baum T.J., Mitchum M.G. (2007). Developmental transcript profiling of cyst nematode feeding cells in soybean roots. *Mol. Plant Microbe Interact* **20**: 1997-2019.
22. Janusz G., Pawlik A., Sulej J., Świdorska-Burek U., Jarosz-Wilkołazka A. i Paszczyński A. (2017) Lignin degradation: microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution. *FEMS Microbiol Rev.* **41**(6): 1985-2019.
23. Janušić V., Čurić D., Krička T., Voća N. i Matin A. (2008) Predtretmani u proizvodnji bioetanola iz lignocelulozne biomase. *Poljoprivreda* **14** (1): 1995-2019.



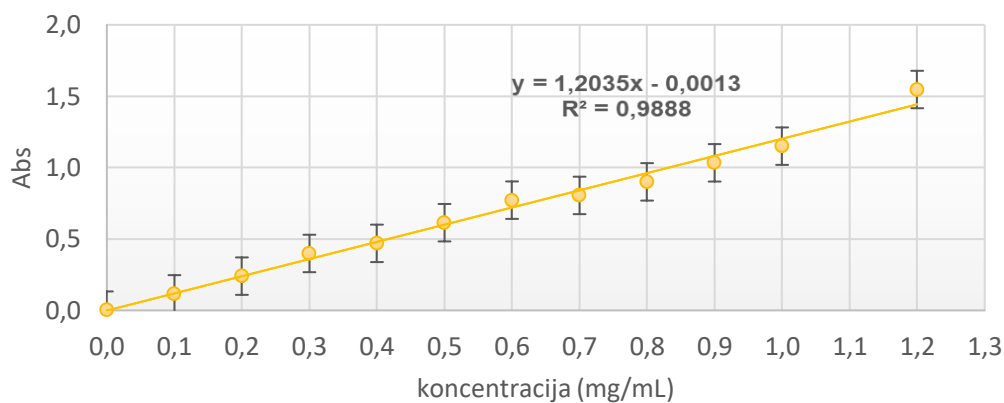
24. Jeffries T.W. (1990) Biodegradation of lignin-carbohydrate complexes. *Biodegradation* **1**: 1990-2019.
25. Langan P., Sangha A.K., Wymore T., Parks J., KooYang Z., LeifHanson B., Fisher Z., Mason S. A., Blakeley M. P., Forsyth V.T., Glusker J. P., Carrell H. L., Smith J. C., Keen D.A., Graham D.E., Kovalevsky A. (2014) L-Arabinose Binding, Isomerization, and Epimerization by D-Xylose Isomerase: X-Ray/Neutron Crystallographic and Molecular Simulation Study. *Structure* **22**: 1993-2019.
26. Linko S., Haapala R., Zhu Y. (1996) *Progress in Biotechnology*, 11. izd., Elsevier. str. 592-599.
27. Lorenzo M., Moldes D., Rodríguez Couto S., Sanromán A. (2002) Improving laccase production by employing different lignocellulosic wastes in submerged cultures of *Trametes versicolor*. *Bioresource Technology* **82**(2): 1991-2019.
28. Kricka W., Fitzpatrick J., Bond U. (2015) *Advances in Applied Microbiology*, 1. izd., Elsevier. str. 89.
29. Kurowska A., Kozakiewicz P. (2016) Determination of the wettability of European lime wood (*Tilia cordata* Mill.) as sculptures and painting supports material. *Forestry and Wood Technology* **93**: 1953-2019.
30. Mate D.M., Alcalde M. (2017) Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology. *Microbial Biotechnology* **10**: 2008-2019.
31. Miller, G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.* **31**: 1929-2019.
32. Mojsov K.D. (2016) *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Aspergillus System Properties and Applications*, 1. izd., Elsevier. str. 215-222.
33. Nakari-Setälä T., Penttilä M. (1995) Production of *Trichoderma reesei* cellulases on glucose-containing media. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 1953-2019.
34. NC-IUBMB (2019) International union of biochemistry and molecular biology. NC-IUBMB - **Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology**, <<https://www.enzyme-database.org/class.php>> Pristupljeno 23. lipnja 2019.

35. Paul R., Genescà E. (2013) The use of enzymatic techniques in the finishing of technical textiles. U: *Advances in the Dyeing and Finishing of Technical Textiles*, 1 izd., Gulrajani M.L., Elsevier inc., str. 177-198.
36. Pauly M., Gille S., Liu L., Mansoori N., de Souza A., Schultink A., Xiong G. (2012) Hemicellulose biosynthesis. *Planta* **238**(4), 1925-2019.
37. Payne C. M., Knott B.C., Mayes B.C., Hansson H., Himmel M.E., Sandgren M., Ståhlberg J., Beckham G.T. (2015) Fungal cellulases. *Chemical Reviews* **115**: 1924-2019.
38. Pérez J., Muñoz-Dorado J., T. de la Rubia, Martínez J. (2002) Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int. Microbiol.* **5**: 1998-2019.
39. Peralta R.M., da Silva, Côrrea R.C.G., Kato C.G., Seixas F.A.V., Bracht A. (2017) Biotechnology of microbial enzymes, 1. izd, 5. poglavlje, Academic press. str. 119-149.
40. Polizeli M.L., Rizzatti A.C., Monti R., Terenzi H.F., Jorge J.A., Amorim D.S. (2005) Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* **67** (5): 1975-2019.
41. Preeti B.S., Parag R.G. (2013) Intensification of Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulose Using Ultrasound for Efficient Bioethanol Production: A Review. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **52**: 1987-2019.
42. Reddy V.B., Joshi D.K., Gold M.H. (1997) Degradation of chlorophenoxyacetic acids by the lignin-degrading fungus *Dichorhynchus squalens* G. *Microbiology* **143**: 1947-2019.
43. Richmond T.A., Somerville C.R. (2000) The Cellulose Synthase Superfamily. *Plant Physiology* **124** (2): 1926-2019.
44. Samuels A.L., Rensing K.H., Douglas C.J., Mansfield S.D., Dharmawardhana D.P., Ellis B.E. (2002) Cellular machinery of wood production: differentiation of secondary xylem in *Pinus contorta* var. *latifolia*. *Planta* **216** (1): 1925-2019.
45. San Miguel G., Makibar J., Fernandez-Akarregi A.R. (2011) Conversion of wood into liquid fuels: a review of the science and technology behind the fast pyrolysis of biomass. U: *Biomass Crops: Production, Energy and the Environment*. (Alfred P. Haggerty, ured.) str. 1- 88.

46. Schuetz M., Benske A., Smith R.A., Watanabe Y., Tobimatsu Y., Ralph J., Demura T., Ellis B., Samuels A.L. (2014). Laccases direct lignification in the discrete secondary cell wall domains of protoxylem. *Plant Physiology* **166**(2): 1926-2019.
47. Singh R., Kumar M., Mittal A. i Mehta Praveen K. (2019) Lignocellulolytic enzymes: Biomass to biofuel. *International Journal of Advanced Research* **4**: 1960-2019.
48. Skjoet M., Kauppinen S., Kofod L.V., Fuglsang C.C., Pauly M., Dalboege H., Andersen L.N. (2001) Functional cloning of an endo-arabinanase from *Aspergillus aculeatus* and its heterologous expression in *A. oryzae* and tobacco. *Molecular Genetics and Genomics* **265**: 1908-2019.
49. Solomon EI, Sundaram UM, Machonkin TE (1996) Multicopper Oxidases and Oxygenases. *Chemical Reviews* **96**(7): 1924-2019.
50. Sun Y., Cheng J. (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review, *Bioresource Technol.* **83**: 1991-2019.
51. Sunset (1995) Western Garden Book, 6. izd, Sunset Pub. Corp.. str. 447-449.
- Updegraff D.M. (1969) Semimicro determination of cellulose in biological materials. *Analytical Biochemistry.* **32** (3): 1960-2019.
52. Van Dyk J. S., Pletschke B. I. (2012) A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnol. Adv.* **30**: 1983-2019.
53. Xavier A.M.R.B., Evtuguin D.V., Ferreira R.M.P., Amado F.L. (2001) Laccase production for lignin oxidase activity. Proceedings 8th Int. Conf. Biotechnol , Helsinki, Finland

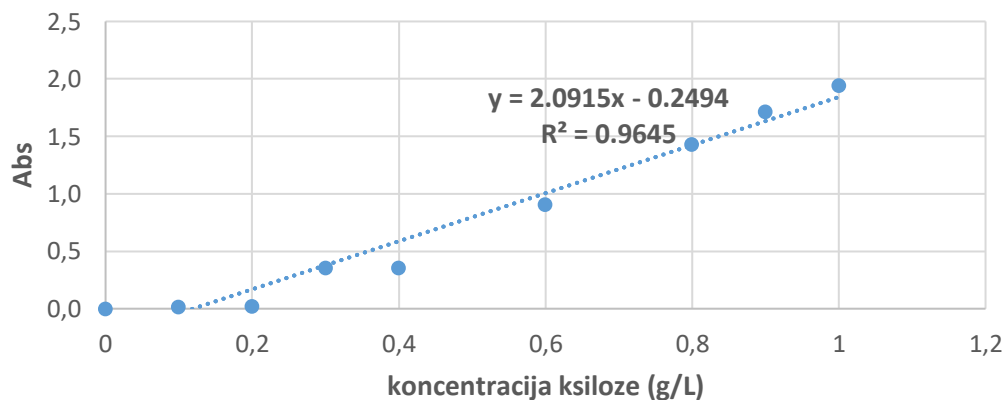
## 7. PRILOZI

### Prilog 7.1.

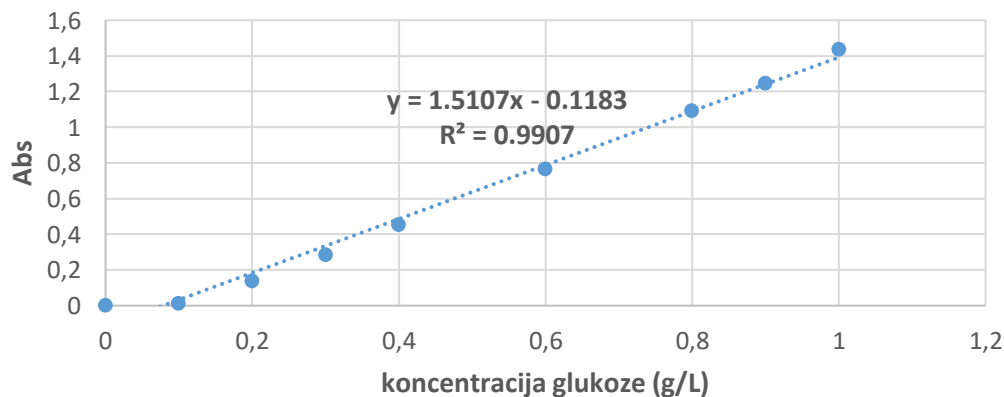


Slika 13. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu

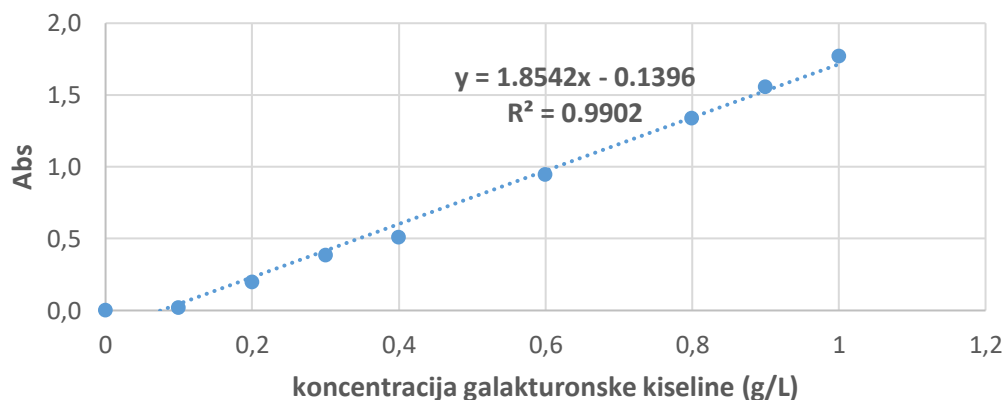
### Prilog 7.2.



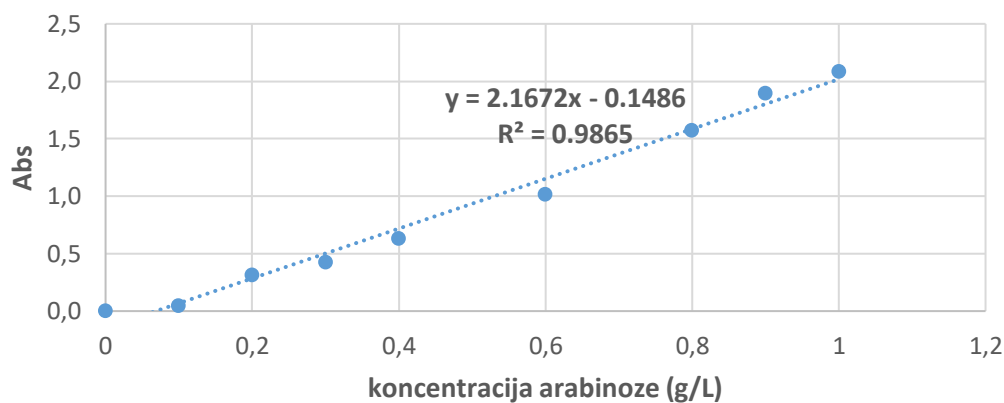
Slika 14. Baždarni dijagram za određivanje aktivnosti enzima ksilanaze DNSA metodom



Slika 15. Baždarni dijagram za određivanje aktivnosti enzima celulaze DNSA metodom



Slika 16. Baždarni dijagram za određivanje aktivnosti enzima pektinaze DNSA metodom



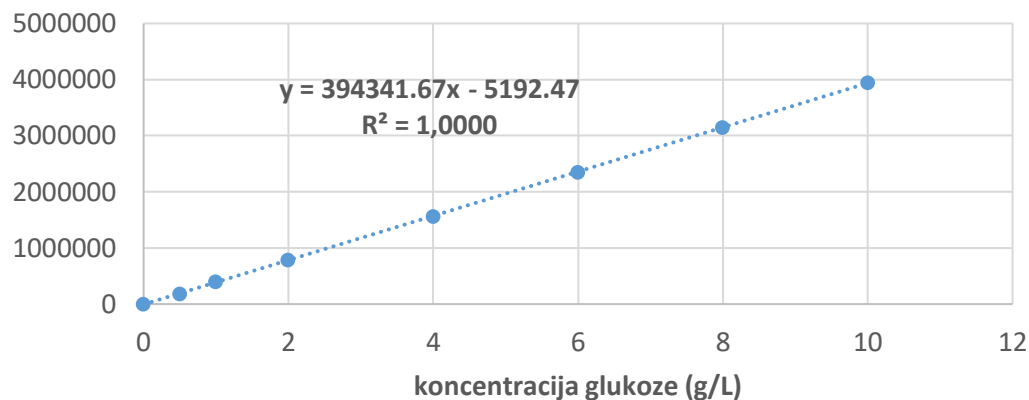
Slika 17. Baždarni dijagram za određivanje aktivnosti enzima arabinaze DNSA metodom

### Prilog 7.3.

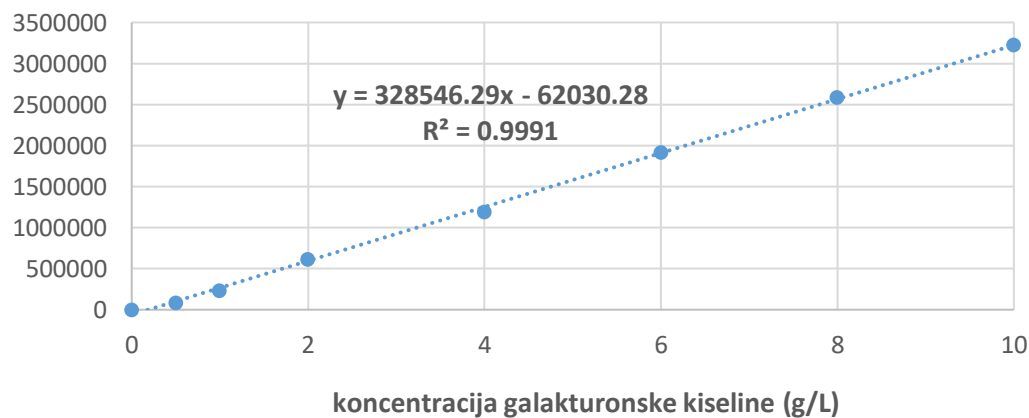
Tablica 6. Prikaz vrijednosti enzimске aktivnosti celulolitičkih i hemicelulolitičkih enzima

<b>AKTIVOST ENZIMA [U/ML]</b>	<b>GLUKOZA</b>	<b>LIPA</b>	<b>HRAST</b>	<b>LIPA+GLUKOZA</b>	<b>HRAST+GLUKOZA</b>
<b>KSILANAZE</b>	0.0305	0.1394	0.5536	0.2217	0.1886
<b>ARABINAZE</b>	0.0281	0.1170	0.1202	0.1046	0.4987
<b>ENDOGLUKANAZE</b>	0.0000	0.0981	0.1334	0.1025	0.1109
<b>EGZOGLUKANAZE</b>	0.0201	0.0810	0.0990	0.0816	0.1014
<b>PEKTINAZE</b>	0.0125	0.1375	0.1367	0.1002	0.1014

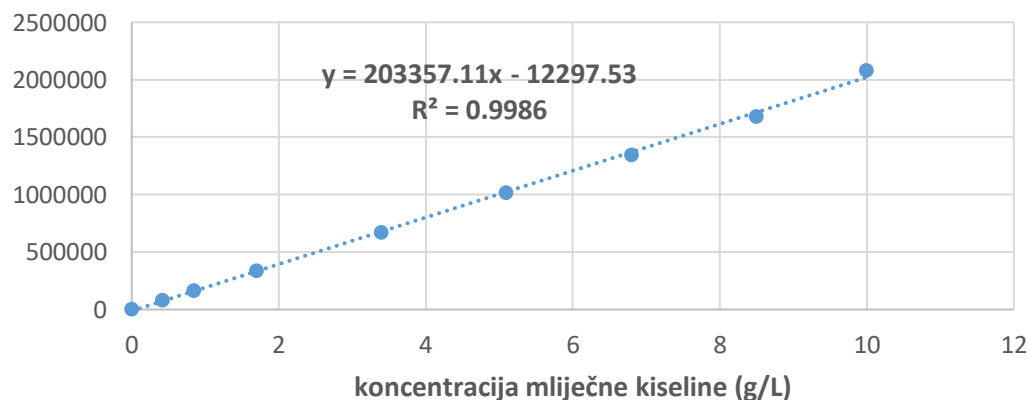
### Prilog 7.4.



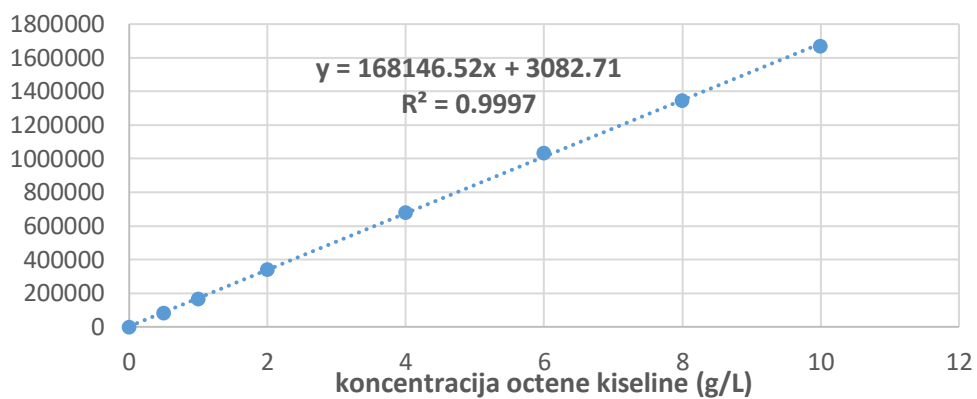
Slika 18. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije glukoze HPLC metodom



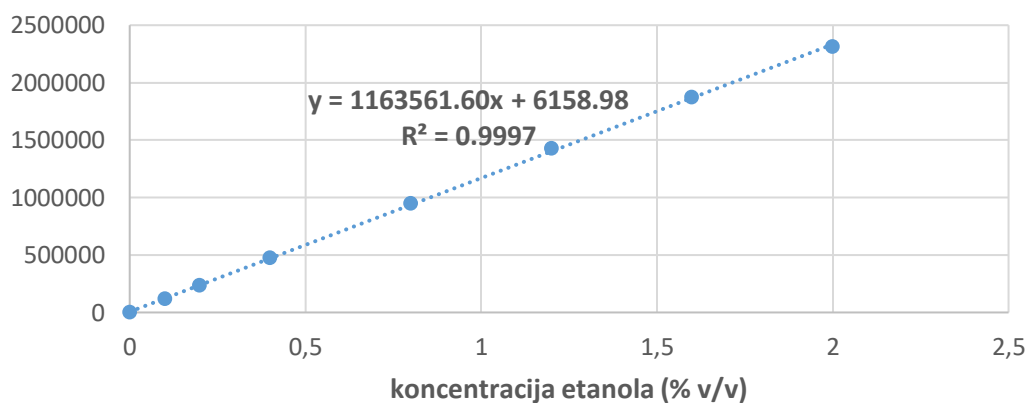
Slika 19. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije galakturonske kiseline HPLC metodom



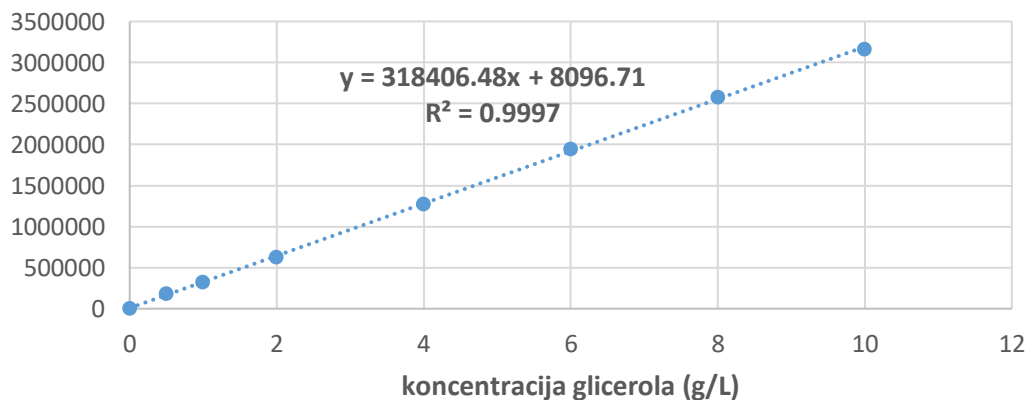
Slika 20. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije mliječne kiseline HPLC metodom



Slika 21. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije octene kiseline HPLC metodom



Slika 22. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije etanola HPLC metodom



Slika 23. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije glicerola HPLC metodom

## Prilog 7.5.

Tablica 7. Razgradni produkti određeni HPLC metodom nakon uzgoja *D. squalens* u podlozi sa glukozom

dan uzgoja	n.a. (g/L)	Glukoza (g/L)	Glicerol (g/L)	Octena kiselina (g/L)	Etanol (g/L)	Mravlja kiselina (g/L)	Arabinoza (g/L)	Ksilitol (g/L)	Mliječna kiselina (g/L)	Limunska kiselina (g/L)
<b>0.</b>	4.1363	8.7474	n.d.	0.0163	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>4.</b>	3.7768	9.3317	0.0119	0.0133	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>7.</b>	4.0894	9.1724	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>11.</b>	3.7679	9.4318	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>13.</b>	n.d.	n.d.	n.d.	0.0224	n.d.	n.d.	0.7244	n.d.	0.0732	0.41112
<b>15.</b>	9.0172	4.6096	n.d.	0.0324	0.0816	n.d.	n.d.	0.0290	n.d.	n.d.
<b>18.</b>	n.d.	4.4043	n.d.	n.d.	n.d.	0.0101	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Tablica 8. Razgradni produkti određeni HPLC metodom nakon uzgoja *D. squalens* u podlozi sa lipom

dan uzgoja	n.a. (g/L)	Glukoza (g/L)	Glicerol (g/L)	Octena kiselina (g/L)	Ksilitol (g/L)	Mliječna kiselina (g/L)	Levulinska kiselina (g/L)
<b>0.</b>	4.7174	n.d.	0.0261	0.0285	n.d.	n.d.	n.d.
<b>4.</b>	4.7465	n.d.	0.0594	0.0384	n.d.	0.1939	n.d.
<b>7.</b>	4.8346	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>11.</b>	4.6889	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>13.</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.0084	0.0483
<b>15.</b>	8.0428	5.3584	n.d.	n.d.	0.0028	0.0451	n.d.
<b>18.</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.0297	n.d.





Tablica 11. Razgradni produkti određeni HPLC metodom nakon uzgoja *D. squalens* u podlozi sa hrastom i glukozom

<b>dan uzgoja</b>	<b>n.a. (g/L)</b>	<b>Glukoza (g/L)</b>	<b>Glicerol (g/L)</b>	<b>Octena kiselina (g/L)</b>	<b>Manoza (g/L)</b>	<b>Ksiloza (g/L)</b>	<b>Arabinoza (g/L)</b>	<b>Mliječna kiselina (g/L)</b>	<b>Celobioza (g/L)</b>
<b>0.</b>	4.2142	4.5889	n.d.	0.0213	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>4.</b>	3.7738	5.3836	0.0071	0.0250	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>7.</b>	4.2347	5.1528	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>11.</b>	3.8151	4.8967	n.d.	0.0324	n.d.	n.d.	n.d.	0.1626	n.d.
<b>13.</b>	8.0828	4.3473	n.d.	n.d.	n.d.	3.9530	0.4092	0.0373	n.d.
<b>15.</b>	n.d.	0.7634	n.d.	n.d.	1.29403	n.d.	n.d.	n.d.	0.5870
<b>18.</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.6170

\* n.a. – nepoznat analit

\*\* n.d. – nije detektirano

## Izjava o izvornosti

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

*Klara Kostur*

ime i prezime studenta