

Proizvodnja celulolitičkih enzima s plijesni *Trichoderma reesei* i optimizacija enzimske hidrolize kukuruznog oklaska

Zvonar, Ines

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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:159:333918>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2016.

Ines Zvonar

671/BPI

**PROIZVODNJA
CELULOLITIČKIH ENZIMA S
PLIJESNI *Trichoderma reesei* I
OPTIMIZACIJA ENZIMSKE
HIDROLIZE KUKURUZNOG
OKLASKA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Mirele Ivančić Šantek.

Zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Mireli Ivančić Šantek na izrazito ugodnoj suradnji i stručnoj pomoći te savjetima tijekom izrade diplomskog rada.

Također, zahvaljujem cijelom Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva, Prehrambeno – biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Hvala mojoj sestri na brizi i ljubavi tijekom svih 25 godina.

Najveće hvala mojim roditeljima koji su mi omogućili studiranje i podržavali me do samoga kraja. Ovaj rad posvećujem njima.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo,
industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

PROIZVODNJA CELULOLITIČKIH ENZIMA S PLIJESNI *Trichoderma reesei* I OPTIMIZACIJA ENZIMSKE HIDROLIZE KUKURUZNOG OKLASKA

Ines Zvonar, 671/BPI

Sažetak: Plijesan *Trichoderma reesei* korištena je za proizvodnju celulolitičkih enzima na polučvrstoj i čvrstoj podlozi s kukuruznim oklaskom kao izvorom ugljika. Kako bi se postigla maksimalna celulolitička aktivnost (FPA) izvršena je optimizacija hranjivih podloga. Primjenom filter papir testa, maksimalna FPA vrijednost od 6,2845 IU/g glukana dobivena je u 28. danu uzgoja plijesni na čvrstoj podlozi s neobrađenim kukuruznim oklaskom, pšeničnim mekinjama i 70 % vode. Na polučvrstoj podlozi, maksimalna FPA vrijednost od 5,3710 IU/g glukana, postignuta je u 9. danu uzgoja. Polučvrsta hranjiva podloga sadržavala je obrađen kukuruzni oklasak, pšenične mekinje, otopinu Tween 80 te liofilizirane celulaze iz *T. reesei*. Nadalje, istražen je učinak dodatka Tweena 80 na kinetiku enzimske hidrolize i hidrolizu strukturnih ugljikohidrata na podlogama s dvjema različitim koncentracijama supstrata, 10 g L⁻¹ glukana i 100 g L⁻¹ kukuruznog oklaska. Ispitano je sedam različitih koncentracija Tweena 80 (0, 1, 2, 4, 6, 12 i 20 g L⁻¹). Najveće koncentracije glukoze i ksiloze postignute su dodatkom 12 g L⁻¹ Tweena 80. Rezultati su pokazali da Tween 80 povećava brzinu enzimske hidrolize i učinkovitost procesa enzimske hidrolize strukturnih ugljikohidrata.

Ključne riječi: kukuruzni oklasak, celulaze, uzgoj na čvrstoj podlozi, submerzni uzgoj, Tween 80

Rad sadrži: 62 stranice, 24 slika, 14 tablica, 80 literaturna navoda, 3 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: izv. prof. dr. sc. Mirela Ivančić Šantek

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc., Tonči Rezić
2. izv. prof. dr. sc., Mirela Ivančić Šantek
3. izv. prof. dr. sc., Ksenija Markov
4. prof. dr. sc., Blaženka Kos (zamjena)

Datum obrane: 21. srpnja 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Biochemical Engineering,
Industrial Microbiology and Malting and Brewing Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

PRODUCTION OF CELLULASE BY FUNGUS *Trichoderma reesei* AND OPTIMIZATION OF ENZYMATIC HYDROLYSIS OF CORNCOBS

Ines Zvonar, 671/BPI

Abstract: Fungus *Trichoderma reesei* was used for the production of cellulolytic enzymes in the semi-solid and solid media with corncobs as carbon source. In order to achieve maximal cellulolytic activity (FPA), the nutrient composition of media was optimised. Using filter paper assay, maximal FPA of 6.2845 IU/g glucan was determined at the 28th day of the cultivation in the solid medium with raw corncobs, wheat bran and 70 % water. In semi-solid medium the maximal FPA of 5.3710 IU/g glucan media, was achieved after 9 days of cultivation. The semi-solid medium contained the pretreated corncobs, wheat bran, Tween 80 and lyophilized cellulases from *T. reesei*. Furthermore, the effect of Tween 80 concentration on kinetics of enzymatic hydrolysis and hydrolysis of structural carbohydrates was determined in media containing two different concentrations of substrate, 10 g L⁻¹ glucan and 100 g L⁻¹ corncobs. Seven Tween 80 concentrations (0, 1, 2, 4, 6, 12 and 20 g L⁻¹) were examined. The highest concentration of glucose and xylose was obtained at 12 g L⁻¹ Tween 80. The results showed that Tween 80 increased the hydrolysis rate and efficiency of enzymatic hydrolysis of structural carbohydrates.

Keywords: corncobs, cellulase, solid state fermentation, submerged fermentation, Tween 80

Thesis contains: 62 pages, 24 figures, 14 tables, 80 references, 3 supplements

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: PhD. Mirela Ivančić Šantek, Associate professor

Reviewers:

1. PhD. Tonči Rezić, Associate professor
2. PhD. Mirela Ivančić Šantek, Associate professor
3. PhD. Ksenija Markov, Associate professor
4. PhD. Blaženka Kos, Full professor (substitute)

Thesis defended: July 21th 2016

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2. 1. Lignocelulozna sirovina – sirovina za proizvodnju goriva druge generacije	2
2.1.1. Sastav lignocelulozne sirovine	2
2.1.1.1. Celuloza	3
2.1.1.2. Hemiceluloza	4
2.1.1.3. Lignin	4
2.2. Celulaze	4
2.2.1. Uloga otvorenog sustava u degradaciji celuloze	5
2.2.2. Plijesan <i>Trichoderma sp.</i> kao potencijalni kandidat za proizvodnju celulaza	7
2.2.2.1. Plijesan <i>Trichoderma reesei</i>	8
2.2.3. Regulacija sinteze celulaza	9
2.3. Tehnike i parametri uzgoja mikroorganizama tijekom proizvodnje celulaza	9
2.3.1. Usporedba SmF i SSF tehnike uzgoja	10
2.4. Enzimska hidroliza lignocelulozne sirovine	11
2.5. Proizvodnja bioetanol iz lignoceluloznih sirovina	12
2.5.1. Fermentacija uz prethodno ošećerenje	12
2.5.2. Istodobno ošećerenje i fermentacija	12
2.5.3. Istodobno ošećerenje i kofermentacija	14
2.5.4. Konsolidirani sustav	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. Materijali	15
3.1.1. Radni mikroorganizam	15
3.1.2. Sirovine za pripremu hranjivih podloga	15
3.1.3. Kemikalije i enzimi	16
3.1.4. Hranjive podloge za održavanje, čuvanje i uzgoj plijesni	18
3.1.4.1. Hranjiva podloga za SSF uzgoj u tikvicama	18
3.1.4.2. Hranjiva podloga za SmF uzgoj plijesni u tikvicama	19
3.1.4.3. Hranjiva podloga za uzgoj u bioreaktoru	20
3.1.4.4. Sastav podloge za enzimsku hidrolizu	21
3.1.5. Oprema i aparatura	21

3.1.5.1. Centrifuge	21
3.1.5.2. Bioreaktor s miješalom	22
3.1.5.3. Spektrofotometar	22
3.1.5.4. Uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC)	23
3.1.5.5. Sustav za elektroforezu u poliakrilamidnom gelu u prisustvu natrijevog dodecilsulfata (SDS-PAGE)	23
3.1.5.6. Ostala oprema i aparatura	24
3.2. Metode rada	25
3.2.1. Priprema inokuluma	25
3.2.1.1. Priprema kulture plijesni <i>T. reesei</i> uzgojene na kosom agaru	25
3.2.1.2. Priprema predkulture plijesni <i>T. reesei</i>	25
3.2.2. Priprema lignocelulozne sirovine	26
3.2.2.1. Predobrada kukuruznog oklaska natrijevom lužinom	26
3.2.3. Priprema podloga za SSF uzgoj i proizvodnju celulolitičkih enzima	27
3.2.4. Priprema podloga za SmF uzgoj i proizvodnju celulolitičkih enzima	27
3.2.5. Provedba šaržnog procesa proizvodnje celulolitičkih enzima u laboratorijskom bioreaktoru	28
3.2.6. Optimiranje procesa enzimske hidrolize kukuruznog oklaska	28
3.2.7. Analitičke metode	29
3.2.7.1. Određivanje celulolitičke aktivnosti enzima	29
3.2.7.1.1. Priprema reagensa i otopina za analizu	30
3.2.7.1.2. Postupak provođenja analize	30
3.2.7.1.3. Izračun celulolitičke aktivnosti	30
3.2.7.2. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu	31
3.2.7.2.1. Postupak provođenja analize	31
3.2.7.3. Određivanje koncentracije šećera pomoću tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC)	32
3.2.7.3.1. Priprema uzoraka za HPLC analizu	32
3.2.7.3.2. HPLC analiza	32
3.2.7.4. Razdvajanje proteina elektroforezom u poliakrilamidnom gelu u prisustvu natrijevog dodecilsulfata	32
3.2.7.4.1. Priprema gelova, otopina i pufera	33
3.2.7.4.2. Priprema uzoraka za analizu	33
3.2.7.4.3. SDS-PAGE metoda	34

3.2.7.5. Određivanje udjela vode u hranjivoj podlozi tijekom SSF uzgoja	34
3.2.7.6. Određivanje učinkovitosti procesa enzimske hidrolize lignocelulozne sirovine	35
3.2.7.7. Stupanj enzimske hidrolize strukturnih polisaharida	35
4. REZULTATI I RASPRAVA	36
4.1. SSF uzgoj plijesni <i>T. reesei</i> i proizvodnja celulolitičkih enzima	36
4.1.1. Optimiranje sastava hranjivih podloga za SSF uzgoj plijesni u tikvicama	36
4.1.2. Određivanje vremena uzgoja <i>T. reesei</i> za postizanje maksimalne celulolitičke aktivnosti enzima	38
4.2. SmF uzgoj plijesni <i>T. reesei</i> i proizvodnja celulolitičkih enzima u tikvicama	41
4.2.1. Optimiranje sastava hranjivih podloga za SmF uzgoj plijesni u tikvicama	42
4.2.2. SmF uzgoj plijesni u laboratorijskom bioreaktoru	45
4.3. Optimiranje procesa enzimske hidrolize kukuruznog oklaska	47
5. ZAKLJUČCI	55
6. LITERATURA	56
7. PRILOZI	
Prilog 7.1.	
Prilog 7.2.	
Prilog 7.3.	

1. UVOD

Različite vrste plijesni i bakterija koje nalazimo u prirodi sintetiziraju multienzimski kompleks celulaza odgovornih za reakciju hidrolize celuloze do fermentabilnih šećera. Najviše istraжена plijesan za proizvodnju celulolitičkih enzima je *Trichoderma reesei* koja se pokazala dobrim producentom, čijim se uzgojem postižu visoke celulolitičke aktivnosti (Kubicek i sur., 1990). Celulolitički kompleks čine tri vrste hidrolitičkih enzima različite supstratne specifičnosti: endoglukanaza (E.C.3.2.14), egzoglukanaza (E.C.3.2.1.91) i β -glukozidaza (E.C.3.2.1.21) (Sharada i sur., 2013). U proizvodnji celulolitičkih enzima s plijesni primjenjuju se dvije tehnike uzgoja, submerzni uzgoj i površinski uzgoj.

Primjena celulolitičkih enzima je višestruka, od tekstilne industrije do proizvodnje detergenata za pranje rublja, industrije papira i farmaceutske industrije (Kubicek i sur., 1990). Najveća pozornost usmjerena je na proizvodnju biogoriva. Naime, porast industrijske proizvodnje i demografska ekspanzija prouzročili su povećanje energetske potrebe u svijetu i potragu za alternativnim izvorima energije koje mogu zamijeniti fosilna goriva (plin, nafta, ugljen) i koji su jeftiniji, ekološki prihvatljivi i obnovljivi.

Kukuruzni oklasak je lignocelulozna sirovina koja, iako se smatra otpadom, sadrži visoke udjele celuloze i hemiceluloze te predstavlja visokovrijednu i jeftinu sirovinu za proizvodnju celulolitičkih enzima. Kukuruzni oklasak se razgrađuje predobradom i hidrolizira celulolitičkim enzimima u jednostavnije fermentabilne šećere koji mogu poslužiti kao izvor ugljika za rast mikroorganizama i sintezu proizvoda, npr. bioetanol.

Cilj ovog rada je optimirati sastav čvrste i polučvrste podloge za šaržni uzgoj plijesni *T. reesei* i odrediti optimalno vrijeme uzgoja za postizanje maksimalne celulolitičke aktivnosti. Nadalje, drugi cilj ovog rada je istražiti učinak Tweena 80 na brzinu enzimske hidrolize strukturnih ugljikohidrata u predobrađenom kukuruznom oklasku te učinak na prinos monosaharida (glukoza i ksiloza).

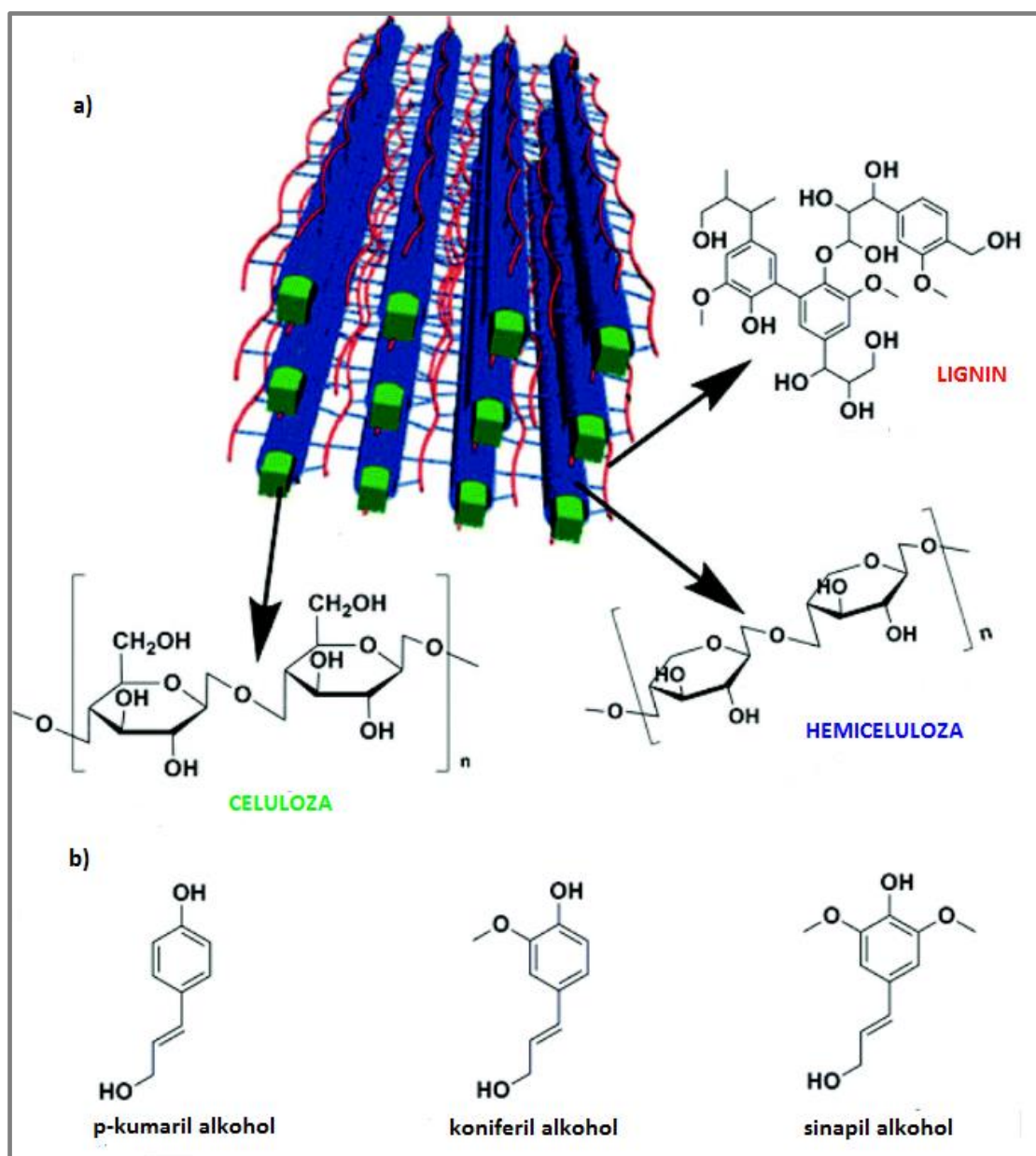
2. TEORIJSKI DIO

2. 1. Lignocelulozna sirovina – sirovina za proizvodnju goriva druge generacije

Lignocelulozna sirovina koristi se kao sirovina za proizvodnju druge generacije biogoriva. Za razliku od sirovina na bazi šećera i škroba (sirovine za proizvodnju goriva prve generacije), za koje treba osigurati odgovarajuće uvjete poljoprivredne proizvodnje, lignocelulozna biomasa ne zahtjeva ekstenzivnu pripremu zemlje za proizvodnju. Također, ne konkurira proizvodnji hrane i nije čimbenik u oscilaciji cijene prehrambenih proizvoda na tržištu (Sanchez i Cardona, 2008). Iako je značajno jeftinija od šećernih i škrobnih sirovina, korištenje lignocelulozne sirovine u proizvodnji biogoriva zahtjeva predhodnu predobradu ove sirovine zbog složenog kemijskog sastava i strukture. Zbog visokih troškova proizvodnje, druga generacija biogoriva još uvijek nije komercijalizirana, ali neke zemlje u velikoj mjeri ulažu u njihovo istraživanje i razvoj. Biogoriva koja se proizvode iz obnovljivih lignoceluloznih izvora pružaju nekoliko pogodnosti: niže cijene sirovina, povećanje raspoloživih obradivih površina predviđenih za poljoprivredne usjeve namijenjene prehrani ljudi i životinja, manji utrošak fosilnih goriva (Semenčenko i sur., 2011). Lignocelulozne sirovine obuhvaćaju poljoprivredne ostatke (otpaci šećerne trske, kukuruzovina, kukuruzni oklasak, slama pšenice, riže i ječma, koštice maslina), drvo (jasika, topola, omorika, smrča), celulozni otpad (stari papir, kaša recikliranog papira), biljnu biomasu (lucerna i ostalo krmno bilje) te čvrst komunalni otpad (Sanchez i Cardona, 2008).

2.1.1. Sastav lignocelulozne sirovine

Lignocelulozna sirovina sastoji se od celuloze, hemiceluloze i lignina. Udio tih komponenti u biomasi razlikuje se ovisno o vrsti sirovine. Za razliku od lignina, celuloza i hemiceluloza imaju mogućnost hidrolize do fermentabilnih šećera (Walker, 2010). Celulozne niti su međusobno priljubljene i okružuju stanice u pravilnim paralelnim strukturama ili mrežastim slojevima. U staničnoj stijenci lignocelulozne sirovine, lignin s hemicelulozom tvori čvrst matriks u koji su ugrađene celulozne niti (slika 1a). Na taj način je cjeloukupna struktura stanične stijenke ojačana i čini strukturu teško razgradivu biološkim, fizikalnim ili kemijskim metodama. Lignin, hemiceluloza i celuloza povezani su esterskim, eterskim i glikozidnim vezama. U usporedbi s esterskim vezama između lignina i polisaharida, eterske veze su stabilnije i čine lignin izuzetno otpornim prema kemijskoj i enzimskoj razgradnji. Mnoge gljive i aktinomicete mogu u potpunosti razgraditi lignoceluloznu sirovinu.



Slika 1. (a) struktura lignoceluloze; **(b)** fenolni alkoholi lignina (prema Liu i sur., 2015)

2.1.1.1. Celuloza

Celuloza čini 40 – 50 % suhe tvari drveta (slika 1a). To je homopolisaharid sastavljen od molekula β -D-glukoze linearno povezanih (1,4)-glikozidnim vezama. Broj jedinica glukoze u lancu kreće se oko 14 000 jedinica. Nativna celuloza pretežito je kristalične strukture bez međumolekulskih šupljina zbog mnogobrojnih vodikovih veza između

celuloznih lanaca gdje svaka monomerna jedinica (β -D-glukoza) formira dvije vodikove veze. Procesom predobrade smanjuje se stupanj kristalichnosti celuloze i povecava udio amorfne celuloze koja je najpogodnija za enzimsku hidrolizu (Demirbas, 2005).

2.1.1.2. Hemiceluloza

Hemiceluloza pripada grupi heteropolisaharida te cini 20 – 40 % suhe tvari drveta. Sastoji se od sećera pentoza (ksiloza i arabinoza), heksoza (glukoza, galaktoza, manaza) i malih količina glukuronske, metilglukuronske i galakturonske kiseline. Stupanj polimerizacije većine hemiceluloza je oko 200. Strukturna formula hemiceluloze prikazana je na slici 1a. Celuloza i hemiceluloza nisu topljive u vodi (Demirbas, 2005).

2.1.1.3. Lignin

Lignin je kompleksna makromolekula građena od tri umrežena fenolna alkohola: *p*-kumaril alkohol, koniferil alkohol i sinapil alkohol (slika 1b). Pripadaju skupini fenilpropanoida, koji na fenolnoj jezgri sadrže bočni lanac od 3 C atoma. Najzastupljeniji monomer je koniferil alkohol. Lignin fizički štiti strukturne polisaharide lignocelulozne sirovine od enzimske razgradnje tvoreći zaštitni polimerni sloj oko lanaca celuloze i hemiceluloze (slika 1a). Udio lignina u suhoj tvari drveta je 10 – 25 %. Vrlo je razgranata molekula i cini ključnu komponentu stanične stijenke (Juha'z i sur., 2005).

2.2. Celulaze

Celulaze pripadaju skupini hidrolitičkih enzima odgovornih za razgradnju celuloze. Celulolitičke enzime (celulaze) proizvode neke bakterije i plijesni (Lynd i sur., 2002), ali i organizmi koji pripadaju carstvu *Animalia* kao što su kukci, školjke, nematode (oblici) te protozoe (Watanabe i Tokuda, 2001). Celulaze kataliziraju reakciju cijepanja β -1,4 glikozidne veze u celulozi uz prisustvo molekule vode. Aerobni mikroorganizmi proizvode celulolitičke enzime različite supstratne specifičnosti koji sinergijskim djelovanjem hidroliziraju celulozu do glukoze. Plijesan *Trichoderma reesei* zahvaljujući svojim hifama prodire u strukturu lignocelulozne sirovine čime omogućuje učinkovitu razgradnju celuloze celulolitičkim enzimima duboko ispod površine lignocelulozne sirovine. Ovi celulolitički enzimi ne formiraju stabilne visokomolekularne komplekse već se ponašaju kao slobodni enzimi. Takav sustav enzima naziva se jednostavni celulolitički sustav (engl. *Free-Enzyme System*). Većina dosadašnjih istraživanja jednostavnih sustava slobodnih enzima bazira se na istraživanju ovih aerobnih i mezofilnih plijesni: *T. reesei* (Schuster i Schmoll, 2010), *Humicola insolens* (Schülein, 1997) i *Phanerochaete chrysosporium* (Broda i sur., 1994). Industrijski sojevi *T.*

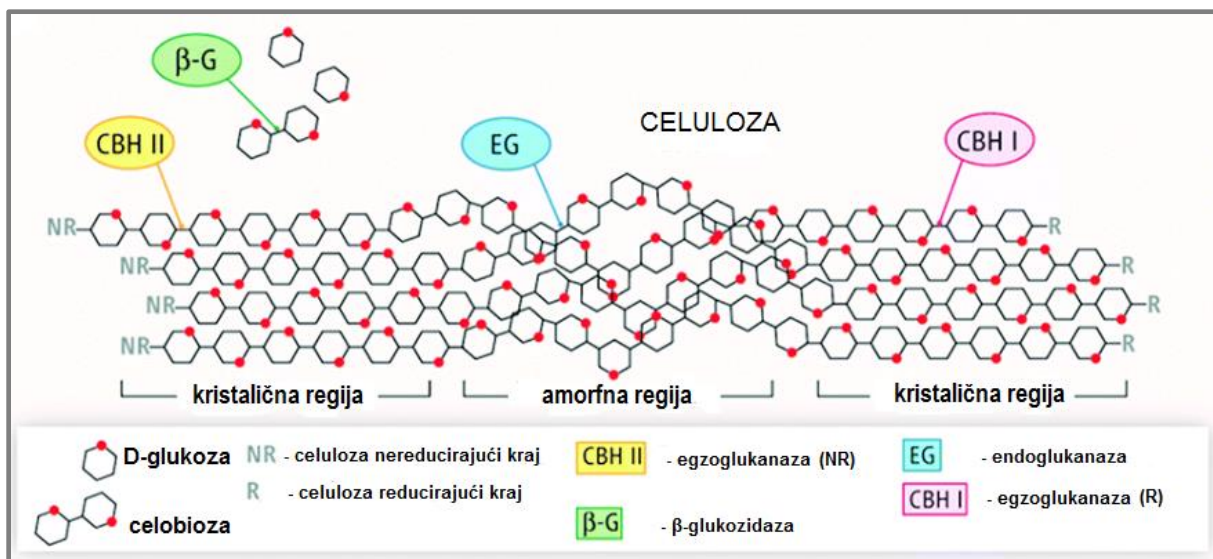
reesei su vrlo učinkoviti proizvođači enzima, prvenstveno celulaza, što je glavni razlog dominacije tih enzima na svjetskom tržištu celulaza. Genomska sekvenca plijesni *T. reesei* prvi je put objavljena 2008. godine. Otkriveno je da je raznovrsnost enzima koji razgrađuju staničnu stijenku plijesni *T. reesei* uvelike smanjena u usporedbi s ostalim plijesnima koje razgrađuju ugljikohidrate (Martinez i sur., 2008). Genom ove plijesni sadrži 26 gena koji kodiraju za celulaze ili hemicelulaze, dok primjerice genom *Magnaporthe grisea* sadrži 74 takvih gena (Martinez i sur., 2008).

Za razliku od aerobnih mikroorganizama, anaerobne bakterije imaju razvijene kompleksne enzimske sustave nazvani celulosomi. Sinergijom različitih celulaza vezanih na celulosomu postiže se velika celulolitička aktivnost (Lynd i sur., 2002). Hidrolitičke bakterije u prisustvu celuloznih supstrata, sintetiziraju celulosome koji su smješteni s vanjske strane stanične stijenke (Lynd i sur., 2002). Najviše istražen kompleksni celulazni sustav je celulosom anaerobne bakterije *Clostridium thermocellum* (Bayer i sur., 2004).

2.2.1. Uloga otvorenog sustava u degradaciji celuloze

Iako je celuloza homopolimer (nastala povezivanjem velikog broja molekula glukoze), za njezinu razgradnju do glukoze potrebno je djelovanje više celulolitičkih enzima različite supstratne specifičnosti. Klasični model koji opisuje djelovanje otvorenog enzimskog sustava uključuje tri vrste hidrolitičkih enzima različite supstratne specifičnosti:

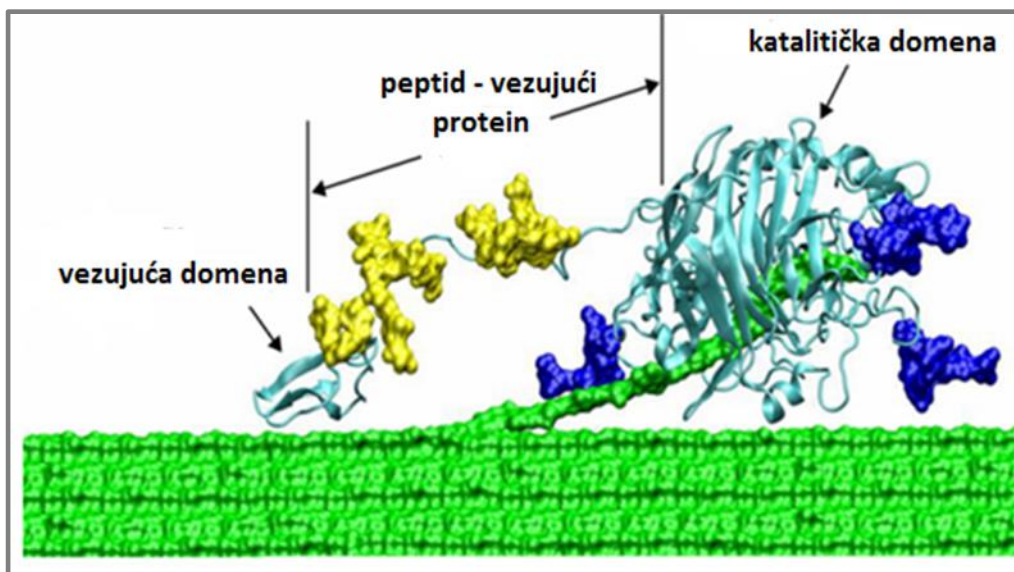
1. endoglukanaze (endo- β -1,4-glukanaza, endo- β -1,4-D-glukan-4-glukanohidrolaza ili EG, E.C.3.2.14);
2. egzoglukanaze ili celobiohidrolaze (egzo- β -1,4-D-glukan-4-celobiohidrolaza ili CBH, E.C.3.2.1.91);
3. celobioze ili β -glukozidaze (β -D-glukozid glukohidrolaza ili BG, E.C.3.2.1.21) (Sharada i sur., 2013).



Slika 2. Model razgradnje celuloze (prema Duttaa i Wu, 2014)

Djelujući sinergijski, ove tri vrste enzima hidroliziraju celulozu do glukoze (slika 2). Celobiohidrolaza ili egzoglukanaza (CBH) cijepa celulozne lance oslobađajući celobiozu kao glavni produkt (Teeri i Koivula, 1995). Endoglukanaze (EG) nasumično hidroliziraju β -1,4 glikozidnu vezu između molekula glukoze unutar celuloznih lanaca smanjujući stupanj polimerizacije lanaca. Pri tome nastaju nova mjesta za vezanje celobiohidrolaza koje odcjepljuju celobiozne jedinice (Kleman-Leyer i sur, 1996). Nadalje, uloga β -glukozidaze je razgradnja nastalih celooligomera, celobioze i celotetraoze, u glukozu. Egzoglukanaza je podložna inhibiciji celobiozom (produkt) čime se smanjuje ukupna brzina hidrolize celuloze. Sinergijskim djelovanjem mnogobrojnih enzima rezultira većom razinom razgradnje celuloze nego razgradnja pojedinim celulolitičkim enzimima. Dosad je razjašnjen sinergijski mehanizam između endoglukanaza i celobiohidrolaza kao što su TrCel7A (CBHI) i TrCel5A (EGII) i dva različita tipa celobiohidrolaza, TrCel7A (CBHI) i TrCel6A (CBHII).

Za razliku od ostalih hidrolitičkih enzima, celulaze imaju sposobnost hidrolize netopivog supstrata. Celobiohidrolaze i endoglukanaze sadrže celuloza vezujuću domenu (engl. *cellulose-binding module*, CBM), pomoću koje se ovi enzimi vežu za supstrat (celuloza) (slika 3). Uloga CBM domene nije katalitička već služi isključivo vezanju celuloze za supstrat. Pretpostavlja se da CBM pomoću hipotetičkog proteina (pričvršćen peptid – vezujući protein na vezivnoj domeni) mijenja strukturu celulaze. Različite CBM domene iniciraju hidrolizu celuloze s celulazama (Kristensen, 2009).



Slika 3. Mehanizam djelovanja celobiohidrolaza (Ivetić i Antov, 2013)

2.2.2. Plijesan *Trichoderma* sp. kao potencijalni kandidat za proizvodnju celulaza

Filamentozne gljive (plijesni) roda *Trichoderma* su aseksualni saprofiti čije je stanište tlo. Njihov teleomorfni stadij pripada redu *Hypocreales*, porodici *Hypocreaceae*. *Trichoderma* sp. se prvi put spominje 1794. godine kada je Persoon opisuje kao zelenu plijesan koja raste na granama i sličnim supstratima te imenuje četiri vrste plijesni unutar tog roda. Kasnije se pokazalo da je samo jedna od tih vrsta, *T. viride*, pripadala rodu *Trichoderma*. Dugo se smatralo da postoji samo ta jedna vrsta unutar roda, dok Rifai 1969. godine nije opisao 9 vrsta s obzirom na morfo-fiziološke karakteristike: sustav grananja konidiofora, raspored fialida te morfologiju konidija. Do 1990. godine je povećan broj kriterija za klasifikaciju baziranu na spomenutim morfološkim karakteristikama te je predložena nova podjela i klasifikacija plijesni *Trichoderma* sp. Uključene su i pojedine vrste roda *Gliocladium* te je 27 vrsta klasificirano u pet rodova: *Trichoderma*, *Pachibasium*, *Saturnisporum*, *Longibrachiatum* i *Hypocreanum* (Gams i Bissett, 1998). Razvojem molekularno-bioloških metoda baziranih na sekvenciranju DNA (Kindermann i sur., 1998) te istraživanja multigenske filogeneze (Kullnig-Gradinger i sur., 2002) i rodoslovne suglasnosti filogenetskih vrsta (Taylor i sur., 2000) obavljena je revizija taksonomije. Zasnovane su nove vrste te je do danas identificirano preko 100 filogenetski različitih vrsta plijesni roda *Trichoderma*.

Plijesni roda *Trichoderma* karakterizira antagonististički efekt prema velikom broju fitopatogenih organizama, sposobnost kompeticije za prostorom i hranjivima, mikoparazitizam i antibioza (Kubicek i Penttila, 1998). Umrežene hife – micelij tvore kolonije bijele boje koje nakon sporulacije poprimaju smaragdno zelenu boju. Konidiofore su uspravne, piramidalno razgranate i na vrhu završavaju jednom ili grupom fijalida. Fijalide su međusobno postavljene pod kutem od 90°, široke su u sredini i sužene u osnovi i na vrhu. Na vrhu fijalida nalaze se ovalne ili elipsoidne, zelene mikrokoniidije dimenzije 3 – 5 x 2 – 4 µm. Klamidospore su stanice loptastog oblika nastale iz micelija koje omogućuju preživljavanje u nepovoljnim okolišnim uvjetima (Seaby, 1989).

2.2.2.1. Plijesan *Trichoderma reesei*

Tijekom Drugog svjetskog rata plijesan *T. reesei* prouzročila je velike štete američkoj vojsci u južnom Pacifiku. Ta je plijesan, tada klasificirana kao *Trichoderma viride*, u povoljnim okolišnim uvjetima rasla na pamučnoj odori, rublju i šatorima vojnika djelovanjem celulolitičkih enzima koje je proizvodila. Reese i Mandels su prvi istraživali mogućnosti inhibicije aktivnosti celulaza, a poslije rata ovi su enzimi primjenjivani u industriji papira i za proizvodnju biogoriva. Kasnije je ustanovljeno da je istraživani izolat (QM6a) anamorf (aseksualna forma) vrste *Hypocrea jecorina* i dodijeljeno mu je ime *Trichoderma reesei* u čast istraživača koji su ga proučavali. Plijesan *T. reesei* primjenjuje se u industriji za proizvodnju celulolitičkih i hemicelulolitičkih enzima (Xu i sur., 2009).

T. reesei proizvodi dvije vrste celobiohidrolaza, Cel7A (CBHI) i Cel6A (CBHII) koje odcjepljuju celobiozne jedinice s krajeva celuloznog lanca (CBHI s reducirajućeg i CBHII s nereducirajućeg kraja celuloznog lanca) (slika 2). Sadrži oko pet različitih endoglukanaza (EG I-V, ili Cel7B, Cel5A, Cel12A, Cel61A i Cel45A), određen broj ksilanaza te jedan ili više enzima s β-ksilozidaznom aktivnošću (Rosgaard i sur., 2007). Iako proizvodi β-glukozidazu, veći dio tog enzima ostaje vezan za micelij te se ne može u dovoljnoj količini izdvojiti tijekom industrijske proizvodnje celulaza (Rosgaard i sur., 2007). U cilju poboljšanja proizvodnog soja, gen koji kodira za β-glukozidazu iz plijesni *Aspergillus oryzae* kloniran je u proizvodni soj *T. reesei* (Merino i Cherry, 2007). Unatoč poboljšanju proizvodnog soja, potrebno je celulolitičkim enzimima proizvedenim pomoću *T. reesei* dodati β-glukozidazu i to najčešće proizvedenu s plijesni *Aspergillus niger*. Dodavanjem β-glukozidaze osigurava se optimalno katalitičko djelovanje svih celulaza, smanjujući inhibicijski učinak celobioze na celobiohidrolazu i endoglukanazu.

2.2.3. Regulacija sinteze celulaza

Celulaze su inducibilni (adaptivni) enzimi koji se sintetiziraju kada je u podlozi prisutan njihov supstrat. Biosinteza celulaza regulirana je mehanizmima kataboličke represije i aktivacije. Kod *T. reesei*, biosinteza celulolitičkih enzima potaknuta je samo prisutnošću celuloze i reprimirana je pojavom jednostavnih šećera (glukoza). Disaharid soforoza (D-glukozido-2-D-glukoza) induktor je sinteze celulaza dobiven transglikozilacijskom aktivnošću bazalno eksprimirane β -glukozidaze. Celobioza, δ -celobioza-1-5 lakton i ostali produkti razgradnje celuloze također mogu biti induktori celulaza (Sukumaran i sur., 2005). Smatra se da zapravo transglikozilacijom glukoze dolazi do represije celulaza što uvelike nadjača indukciju i derepresiju celulaza. Promotorska regija celulaza posjeduju vezna mjesta za ugljik katabolički protein (CRE1) kao i mjesta vezanja transkripcijskih faktora uključujući aktivator ekspresije celulaze, protein II (ACEIII) (Sukumaran i sur., 2005).

2.3. Tehnike i parametri uzgoja mikroorganizama tijekom proizvodnje celulaza

Tijekom godina, proizvodnja celulolitičkih enzima, značajno je napredovala s ekonomskog, ekološkog i tehnološkog aspekta. U proizvodnji celulaza primjenjuju se dvije tehnike uzgoja mikroorganizama, dubinski tzv. submerzni uzgoj (*engl. Submerged Fermentation*, SmF) i uzgoj na čvrstoj podlozi (*engl. Solid State Fermentation*, SSF). Kod uzgoja na čvrstoj podlozi primjenjuju se čvrsti supstrati, kao što su pšenične mekinje i slama, bagasa, kukuruzni oklasak, brašno (riža, pšenica, kasava), papirna pulpa, nusprodukti prehrambene industrije i ostalo (Subramaniam i Vimala, 2012). Te sirovine, iako smatrane otpadom, bogate su hranjivim tvarima koje su potrebne za rast mikroorganizama i kao takve predstavljaju jeftin supstrat. SSF način uzgoja je najprikladniji za uzgoj plijesni i ostalih mikroorganizama koji ne zahtijevaju veliku količinu vode za svoj rast. Voda se nalazi apsorbirana ili vezana unutar čvrstog supstrata.

Međutim, za uzgoj mikroorganizama kojima je potrebna veća vlažnost, primjerice bakterije, koristi se SmF uzgoj. SmF uzgoj podrazumijeva rast mikroorganizama na podlozi koja sadrži slobodnu vodu. Nakon što je 1940. godine usavršena submerzna tehnika uzgoja plijesni, ovaj tip uzgoja u potpunosti je zamijenio SSF uzgoj u industrijskoj proizvodnji (Pandey, 2003). Iako se tradicionalno enzimi proizvode SmF tehnikom uzgoja, alternativa mu je SSF koji se do danas očuvao i primjenjuje u državama Dalekog istoka. Proizvodi dobiveni iz čvrstih i polučvrstih supstrata kao što su soja umak (shoyu) i sojina pasta (miso), koriste se tisućama godina u Kini, Japanu, Indoneziji. U Europi se ovim načinom proizvode delikatesni sirevi ili prerađuje otpad u svrhu dobivanja komposta i bioplina.

Proizvodnja celulaza aeroban je proces koji se provodi u aseptičnim uvjetima. Medij za rast sadrži sve potrebne nutrijente, soli, površinski aktivne tvari i induktore koji su potrebni plijesnima za rast. Za proizvodnju celulaza potrebni su ioni metala, željezo, kobalt, bakar, magnezij, kalcij, kalij i magnezij te amonijak kao izvor dušika. Izvor ugljika u podlozi osigurava rast micelija i regulira biosintezu celulaza (Tsiklauri i sur., 1999). Mikrobna kontaminacija, a time i značajni proizvodni gubitci, mogu se izbjeći korištenjem antibiotika i sterilizacijom opreme i podloge prije inokulacije (Du i sur., 2012). Sterilizacija parom vrši se pri 121 °C oko 20 minuta. Lignocelulozni supstrat se usitnjava sjeckanjem i meljenjem kako bi se smanjila veličina čestica te povećala površina supstrata dostupna za hidrolizu celulazama. Također, najčešće se koriste različite tehnike predobrade lignocelulozne sirovine kako bi se povećala dostupnost celuloze, odnosno hemiceluloze celulolitičkim i hemicelulolitičkim enzimima. Najveće kompanije za proizvodnju celulolitičkih enzima su Genencor International, Novozymes, DSM, Novo Nordisk, Rohm Finland (Jabasingh i Nachiyar, 2011).

2.3.1. Usporedba SmF i SSF tehnike uzgoja

Postupci izdvajanja i pročišćavanja celulaza nakon SSF uzgoja, jednostavniji su i jeftiniji. Osnovne prednosti SSF uzgoja su: mala potreba za vodom, niska potrošnja energije, smanjena količina otpada, visoka produktivnost (2 – 3 puta veća nego kod SmF), veća koncentracija celulolitičkih enzima (Zhuang, 2007). Katabolička represija i represija produktom značajno utječu na biosintezu celulaza u SmF procesu što se reflektira na isplativost procesa (Ryu i Mandels, 1980). Iskoristivost supstrata prilikom uzgoja na čvrstom supstratu je 20 – 30 %, za razliku od maksimalne 5 % iskoristivosti kod submerznog uzgoja (Pamment i sur., 1978). Kod SSF uzgoja priprema lignocelulozne sirovine kao podloge za uzgoj je jednostavnija. U nesterilnim uvjetima manja je mogućnost kontaminacije stranim mikroorganizmima zbog smanjenog udjela vode u podlozi. Smanjen udio vode omogućava uzgoj u bioreaktoru manjih dimenzija što smanjuje kapitalne troškove proizvodnje. No, zbog povećane mogućnosti kontrole procesa (regulacija pH vrijednosti, temperatura, pO_2) i jednostavnijeg prevođenja procesa u veće mjerilo, većina industrijskih celulaza se ipak proizvodi submerznim načinom uzgoja. Prinos proizvoda varira ovisno o korištenom supstratu te je stoga važno izabrati odgovarajuću podlogu i pravilno optimirati uvjete uzgoja (Limayem i Ricke, 2012).

2.4. Enzimaska hidroliza lignocelulozne sirovine

Cilj hidrolize lignocelulozne sirovine je proizvesti hidrolizat s većim prinosom fermentabilnih šećera (pentoze i heksoze). Celulozni i hemicelulozni polimeri hidroliziraju se enzimima, kiselinama i lužinama pri čemu nastaju fermentabilni šećeri (Meyer i sur., 2009). Prednost enzimske hidrolize pred kemijskom hidrolizom celuloze su blaži uvjeti u kojima se provodi enzimaska hidroliza: niža temperatura (40 – 50 °C), pH vrijednost 4 – 5 i atmosferski tlak. Sama suspenzija u kojoj se odvija hidroliza niske je korozivnosti za opremu. Tijekom enzimske hidrolize nastaje zanemariva količina inhibitora rasta mikroorganizama (Balat, 2011; Sarkar i sur., 2012). Nadalje, enzimskom hidrolizom postiže se relativno visok prinos reducirajućih šećera. Međutim, cijena samih enzima još uvijek je visoka što onemogućava da bioetanol proizveden iz lignoceluloze bude konkurentan fosilnom gorivu ili bioetanolu dobivenom iz šećernih ili škrobnih sirovina. Različiti čimbenici utječu na prinos produkata hidrolize (šećera) dobivene iz lignoceluloze: temperatura, pH vrijednost, brzina miješanja, koncentracija supstrata i enzima (Taherzadeh i Karimi, 2007). Sadržaj lignina, dostupna slobodna površina supstrata te kristaličnost celuloze ključni su parametri koji utječu na enzimsku hidrolizu. U praksi, lignocelulozna sirovina podvrgava se postupku predobrade u cilju poboljšanja enzimske hidrolize. Postupci predobrade su: fizikalni (mehaničko usitnjavanje, piroliza, radijacija), fizikalno – kemijski (ekspanzija pod utjecajem vodene pare, predtretman toplom vodom, ekspanzivna dekompozicija u prisustvu CO₂ te ekspanzivna dekompozicija u prisustvu amonijaka – AFEX), kemijski (kiselinska i alkalna hidroliza, ozonoliza, vlažna oksidacija, organosolv, tretman različitim otapalima) i biološki postupci (gljive bijelog i smeđeg truljenja). Predobradom lignocelulozne sirovine uklanja se lignin i hemiceluloza, povećava poroznost sirovine, smanjuje kristaličnost celuloze.

Enzimaska hidroliza sastoji se od tri ključna koraka: adsorpcija celulaze na površinu celuloze, hidrolize celuloze do glukoze i desorpcije celulaze. Brzina katalitičke reakcije se mijenja tijekom enzimske hidrolize. U kasnijim fazama hidrolize zaostaje kristalična celuloza. Hidroliza kristalične celuloze (enzimi celobiohidrolaze) značajno je sporija od hidrolize amorfne celuloze (enzimi endoglukanaze) (Lynd i sur., 2008). Iako su predloženi brojni kinetički modeli enzimske hidrolize, kinetika hidrolize nije razjašnjena što uvelike otežava određivanje optimalnih uvjeta enzimske hidrolize (Drissen i sur., 2007). Postojeći modeli enzimske hidrolize celuloze uključuju Michaelis-Menteninu kinetiku, koja je često kombinirana s kinetikom adsorpcije i uključuju poseban član u jednadžbi tzv. dostupni supstrat. Također, neki kinetički modeli definiraju inhibicijsko djelovanje celobioze i glukoze

na celulolitičke enzime. Osnova svakog modela enzimske hidrolize celuloze je kontakt enzima sa supstratom te nastajanje enzim – supstrat kompleksa kao međuprodukta reakcije prije nego što dođe do reakcije hidrolize supstrata u aktivnom mjestu enzima.

Učinak inhibicije enzima prduktima reakcije smanjuje se dodatkom veće količine celulaza i β -glukozidaza te uklanjanjem nastalih fermentabilnih šećera ultrafiltracijom. Provođenje istodobnog postupka ošećerenja i fermentacije također smanjuje učinak inhibicije produktima enzimske hidrolize. Vrste enzima i potrebne koncentracije te izbor odgovarajućih procesnih parametara ključni su za postizanje visokog prinosa fermentabilnih šećera. Zbog raznovrsnosti lignoceluloznih sirovina, vrsta enzima i njihovih koncentracija te odnosa u kojima se miješaju, odgovarajući procesni parametri za postizanje optimalne enzimske aktivnosti te određivanje koncentracije supstrata, za svaki se lignocelulozni supstrat trebaju pojedinačno optimirati

2.5. Proizvodnja bioetanola iz lignoceluloznih sirovina

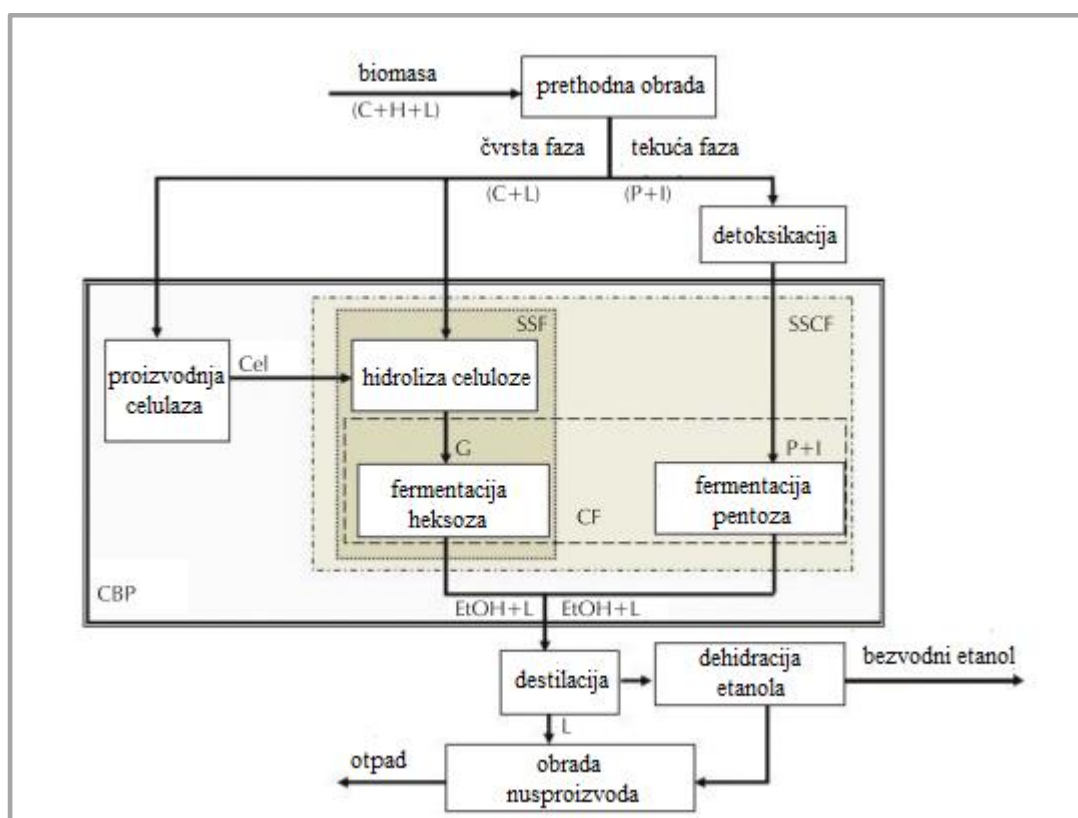
2.5.1. Fermentacija uz prethodno ošećerenje

U proizvodnji bioetanola najčešće se primjenjuje postupak tzv. fermentacije uz prethodno ošećerenje (engl. *Separate Hydrolysis And Fermentation*, SHF). Uzimajući u obzir da je optimalna temperatura enzimske hidrolize (40 – 50 °C) znatno viša od optimalne temperature za rast mikroorganizma (32 °C za kvasac *Saccharomyces cerevisiae*), ovaj postupak proizvodnje omogućuje provođenje oba koraka u optimalnim uvjetima. Nakon postupka predobrade lignocelulozne sirovine, čvrsti dio (filtarski kolač) sadrži zaostali lignin i celulozu, dok filtrat uz razgradne produkte lignina sadrži šećere uglavnom pentoze i nešto heksoze. Čvrsti dio se hidrolizira do glukoze uz pomoć celulolitičkih enzima, a zatim dobiveni hidrolizat fermentira u bioetanol uz pomoć odabranih sojeva kvasaca (Brethauer i Wyman, 2010).

2.5.2. Istodobno ošećerenje i fermentacija

Proizvodnjom bioetanola postupkom istodobnog ošećerenja i fermentacije (engl. *Simultaneous Saccharification and Fermentation*, SSF) smanjuje se inhibicijski učinak produkata enzimske hidrolize (celobioze i glukoze) (Talebna i sur., 2010). Naime, glukoza koja nastaje hidrolizom celuloze, istodobno se troši za rast kvasca i proizvodnju bioetanola čime se njena koncentracija održava vrlo malom (slika 4). Prednost SSF u odnosu na SHF su: veći prinosi proizvoda, tj. koncentracije bioetanola, povećana brzina enzimske hidrolize, kraće vrijeme procesa, manji volumeni reaktora što omogućava jednostavnije vođenje

bioprocesa i smanjenje kapitalnih troškova. Zahtjevi za sterilnošću su manji zbog vrlo male koncentracije glukoze koja se održava tijekom procesa (Erdei i sur., 2013). Zbog vođenja procesa kod temperatura znatno nižih (30 °C) od optimalne za celulaze (50 °C) smanjuje se aktivnost enzima. Da bi se ostvarila zadovoljavajuća produktivnost procesa, potrebno je dodatno povećati količinu enzima čime se značajno povećavaju i troškovi proizvodnje bioetanola (Balat i sur., 2008). Postupak istodobnog oštećenja i fermentacije traje 3 – 7 dana uz 90 – 95 % konverziju i koncentraciju etanola 40 – 50 g L⁻¹ (Šantek i sur., 2016). Umjesto komercijalnih celulaza, hidroliza celuloze može se provesti i primjenom nepročišćene prevrele podloge na kojoj je rasla plijesan *T. reesei*.



Slika 4. Proizvodnja bioetanola iz lignocelulozne sirovine;

CF – kofermentacija; SSF – istodobna saharifikacija i fermentacija; SSCF – isto-
dobna saharifikacija i kofermentacija; CBP – konsolidirani bioprocesni sustav; C –
celuloza; H – hemiceluloza; L – lignin; Cel – celulaze; G – glukoza; P – pentoze; I –
inhibitor; EtOH – etanol (prema Cardona i Sanchez, 2007)

2.5.3. Istodobno ošećerenje i kofermentacija

U posljednje vrijeme sve se više koristi postupak istodobnog ošećerenja i kofermentacije (engl. *Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation*, SSCF). Naime, radi se o postupku istodobne hidrolize strukturnih ugljikohidrata do glukoze i ksiloze i njihove kofermentacije u bioetanol u jednom bioreaktoru (Yu i sur., 2008) (slika 4). Navedeni je postupak ekonomski isplativiji, ali ujedno i tehnološki zahtjevniji od prethodno spomenutih. Brojna istraživanja provedena su u svrhu poboljšanja SSCF postupka. Naglasak se stavlja na pomno odabranim mikroorganizmima (kvasci, plijesni) koji rastu u jednakim uvjetima (temperatura bioprocesa, pH vrijednost podloge) čime se sužava izbor mikroorganizama. Najčešće korištena združena kultura je kultura kvasaca *Pichia stipitis* (fermentira pentoze) i *S. cerevisiae* (fermentira heksoze). Kao alternativa združenim kulturama primjenjuju se genetički modificirani mikroorganizmi.

2.5.4. Konsolidirani sustav

Konsolidirani bioprocesni sustav (engl. *Consolidated Bioprocessing*, CBP) je visokointegrirani proces proizvodnje bioetanola iz lignoceluloznih sirovina. U ovom postupku proizvodnje bioetanola radni mikroorganizam proizvodi celulolitičke i hemicelulolitičke enzime za hidrolizu strukturnih ugljikohidrata iz lignocelulozne sirovine, te prevodi jednostavne šećere (glukozu i ksilozu) u etanol (slika 4). Svi navedeni procesi provode se isodobno u jednom bioreaktoru (Talebni i sur., 2010; Balat, 2011). Iako bi ovaj proces bio ekonomski najisplativiji, zasada nije dostupan mikroorganizam zadovoljavajućih fizioloških karakteristika potrebnih za provođenje ovog tipa procesa. Zbog toga se primjenom genetičkog inženjerstva nastoje poboljšati svojstva mikroorganizama koji su se pokazali učinkovitima u proizvodnji celuloza i etanola. Pri tom se primjenjuju dva različita pristupa: mikroorganizmima s zadovoljavajućom celulaznom aktivnošću poboljšavaju se fermentacijska svojstva, a mikroorganizmima s zadovoljavajućim fermentacijskim karakteristikama poboljšava celulolitička i/ili hemicelulolitička aktivnost. Primjenom genetičkog inženjerstva geni za celulaze i hemicelulaze eksprimirani su u rekombinantnim sojevima bakterija *E. coli*, *K. oxytoca* i *Z. mobilis*, te u kvascu *S. cerevisiae* koji ima vrlo veliku produktivnost za etanol. Također, primjenom genetičkog inženjerstva termofilnoj anaerobnoj bakteriji *C. thermocellum* je s visokom celulolitičkom aktivnošću poboljšana produktivnost za etanol.

Konsolidirani bioproceni sustav vrlo je interesantan s ekonomskog stajališta. Naime smanjen je broj bioreaktora, pojednostavljen postupak proizvodnje, te se značajno smanjuju troškovi za enzime.

Nedostaci su smanjeni prinosi krajnjeg produkta (bioetanol) uzrokovano formiranjem laktata i acetata, niska tolerancija mikroorganizama na etanol i ograničen rast u lignoceluloznom hidrolizatu (Zaldívar i sur., 2001).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Radni mikroorganizam

Korišteni radni mikroorganizam za proizvodnju celulaza je kultura plijesni *Trichoderma reesei* iz zbirke organizama *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* (DSMZ; Braunschweig, Njemačka), soj QM 9414 (ATCC 26921, engl. *American Type Culture Collection*). Kultura je čuvana u hladnjaku na +4 °C.

3.1.2. Sirovine za pripremu hranjivih podloga

Za pripravu hranjive podloge korištene su sirovine navedene u tablici 1. Kukuruzni oklasak i pšenične mekinje usitnjavani su pomoću električnog mlinca. Prosječni kemijski sastav kukuruznog oklasaka naveden je u tablici 2. Sve sirovine termički su predobrađene u autoklavu na 121 °C (p = 1,5-2 bar) tijekom 20 min.

Tablica 1. Sirovine za pripremu hranjivih podloga

sirovina	čistoća	proizvođač
kukuruzni oklasak	za upotrebu u biotehnologiji	okolica Ludbrega
pšenične mekinje	konzumno	Advent d.o.o, Pazin, Hrvatska
kvašćev ekstrakt	za upotrebu u biotehnologiji	Carl Roth, Karlsruhe, Austrija
glukoza	p.a.	BD Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA
repičino ulje	konzumno	Zvijezda d.d., Zagreb, Hrvatska

Tablica 2. Prosječni udjeli strukturnih ugljikohidrata u kukuruznom oklasu (Sun i Cheng, 2002)

sastav	glukan [%]	ksilan [%]	lignin [%]
neobrađen kukuruzni oklasak	39,08	37,67	20,34
kukuruzni oklasak obrađen s 3 % NaOH	48,16	32,54	10,25

3.1.3. Kemikalije i enzimi

Tablica 3. Čistoća i podrijetlo korištenih kemikalija

kemikalija	čistoća	proizvođač
2-merkaptetanol	za elektroforezu	Sigma-Aldrich Co. (LLC), SAD
3,5- dinitrosalicilna kiselina (DNS)	p.a.	Sigma-Aldrich Co. (LLC), SAD
agar	tehnički	Biolife Italiana S.r.l., Italija
akrilamid	30 %	Sigma-Aldrich Co. (LLC), SAD
amonijak	p.a.	Kemika d.d., Hrvatska
amonijev persulfat (APS)	min. 99 %	Fisher Chemical, SAD
boja brom-fenol plavo	za elektroforezu	Sigma-Aldrich Co. (LLC), SAD
boja Coomassie Brilliant Blue R-250	za elektroforezu	Fischer Scientific, SAD
Bradford reagens	p.a.	Sigma-Aldrich Co. (LLC), SAD
cinkov sulfat heptahidrat	p.a.	Merck& Co., Inc., SAD
citratna kiselina	p.a.	Kemika d.d., Hrvatska
diamonijev sulfat	p.a.	Merck& Co., Inc., SAD
etanol (96 %)	p.a., 96 %	Kemika d.d., Hrvatska
etilendiaminotetraoctena kiselina (EDTA)	p.a.	Merck& Co., Inc., SAD
fenol	p.a.	Sigma-Aldrich Co. (LLC), SAD
fosforna kiselina	p.a., za HPLC	Sigma-Aldrich Co. (LLC), SAD

Tablica 3. Čistoća i podrijetlo korištenih kemikalija (nastavak)

kemikalija	čistoća	proizvođač
glicerol	p.a.	Kemika d.d., Hrvatska
glicin	p.a.	Fisher Chemical, SAD
glukoza monohidrat	p.a.	Merck& Co., Inc., SAD
kalcijev klorid dihidrat	p.a.	Kemika d.d., Hrvatska
kalij natrij tartarat	p.a.	Kemika d.d., Hrvatska
kalijev dihidrogen fosfat	p.a.	Kemika d.d., Hrvatska
kobalt klorid heksahidrat	p.a.	Merck& Co., Inc., SAD
N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin (TEMED)	99 %	Acros Organics, Belgija
natrijev dodecilsulfat (SDS)	p.a., ≤ 98,5 %	Sigma-Aldrich Co. (LLC), SAD
natrijev hidroksid	p.a.	Kemika d.d., Hrvatska
natrijev sulfit	p.a.	Kemika d.d., Hrvatska
octena kiselina	p.a.	Kemika d.d., Hrvatska
polioksietilen sorbitan monooleat	p.a.	Sigma-Aldrich Co. (LLC), SAD
sulfatna kiselina	p.a., 96 %	CARLO ERBA Reagents S.A.S., Italija
triklorooctena kiselina (TCA)	p.a.	Ferak Berlin GmbH, Njemačka
tris(hidroksimetil)aminometan (Tris)	p.a.	Kemika d.d., Hrvatska
Tween 80®	p.a.	Merck& Co., Inc., SAD
željezov sulfat heptahidrat	p.a.	Kemika d.d., Hrvatska
magnezijev sulfat heptahidrat	p.a.	Kemika d.d., Hrvatska
manganov sulfat monohidrat	p.a.	Kemika d.d., Hrvatska
metanol	p.a.	Kemika d.d., Hrvatska
monohidrat limunske kiseline	p.a.	Merck& Co., Inc., SAD

Tablica 4. Enzimski preparati korišteni u istraživanju

naziv	opis	proizvođač
Celluclast 1.5L	celulaze iz plijesni <i>T. reesei</i> ATCC 26921	Sigma-Aldrich Co. (LLC), SAD
Viscozyme L	enzimski preparat iz <i>Aspergillus sp.</i> koji sadrži arabanaze, celulaze, β -glukanaze, hemicelulaze i ksilanaze	Novozymes®, Danska
Cellulase from <i>Trichoderma reesei</i>	enzimski preparat iz <i>T. reesei</i> ATCC 26921 koji sadrži liofilizirane celulaze	Sigma-Aldrich Co. (LLC), SAD

3.1.4. Hranjive podloge za održavanje, čuvanje i uzgoj plijesni

Čista kultura plijesni *T. reesei* čuvana je i održavana na kosim agaroznim podlogama. Predkultura je uzgojena u PD bujonu (krumpirov bujon) koji je osim krumpirove podloge sadržavao 20 g L⁻¹ glukoze i 8 g L⁻¹ kvašćevog ekstrakta.

3.1.4.1. Hranjiva podloga za SSF uzgoj u tikvicama

Proizvodnja celuloitičkih enzima provedena je na čvrstoj podlozi s predobrađenim kukuruznim oklaskom kao izvorom ugljika i usitnjenim pšeničnim mekinjama kao izvorom dušika. Korišteno je 5 različitih čvrstih hranjivih podloga (tablica 5) ovisno o sastavu i količini čvrstog i tekućeg dijela (A, B, C, D, E i F). Čvrsti dio su činili izvori ugljika i dušika, a tekući dio biogeni elementi, mikroelementi i pomoćni faktori rasta (tablica 6). Početni udjeli vode za SSF uzgoj bili su 70 % (A), 75 % (B), 70 % (C), 75 % (D), 70 % (E) 70 % (F).

Tablica 5. Sastav hranjivih podloga korištenih za SSF uzgoj plijesni u tikvicama

sastojak / hranjiva podloga	A	B	C	D	E	F
predobrađen kukuruzni oklasak [g]	5	5	3,5	3,5	3,5	-
neobrađen kukuruzni oklasak [g]	-	-	-	-	-	3,5
pšenične mekinje [g]	-	-	1,5	1,5	1,5	1,5
otopina soli [mL]	5	2,5	-	-	-	-
voda [%]	70	75	70	75	70	70

Tablica 6. Sastav otopine soli

sastojak otopine soli	masa [g]	sastojak otopine soli	masa [g]
kalijev dihidrogen fosfat	28,0	cinkov sulfat heptahidrat	19,6
diamonijev sulfat	19,6	kobaltov klorid	0,0028
urea	4,2	kvašćev ekstrakt	7,0
magnezijev sulfat heptahidrat	4,2		
kalcijev klorid	4,2		
željezov sulfat heptahidrat	0,07		
magnezijev sulfat heptahidrat	21,84		

3.1.4.2. Hranjiva podloga za SmF uzgoj plijesni u tikvicama

Polučvrsta hranjiva podloga za SmF uzgoj plijesni *T. reesei* i proizvodnju celulolitičkih enzima sastojala se od 70 % kukuruznog oklasaka, 30 % pšeničnih mekinja i otopine soli (tablica 8) kao glavnih sastojaka. U tablici 7 je prikazan sastav i količina različitih podloga.

Tablica 7. Sastav hranjivih podloga korištenih za SmF uzgoj plijesni u tikvicama

sastojak / hranjiva podloga	a	b	c	d	e	f	g
obrađen kukuruzni oklasak [g L ⁻¹]	14	9,8	-	-	-	21	21
neobrađen kukuruzni oklasak [g L ⁻¹]	-	-	14	20	21	-	-
pšenične mekinje [g L ⁻¹]	-	4,2	6	-	9	9	9
otopina soli [mL]	200	200	200	-	-	-	-
0,2 mL L ⁻¹ otopine Tween 80 [mL]	-	-	-	200	-	-	-
liofilizirane celulaze iz <i>T. reesei</i> [g L ⁻¹]	-	-	-	-	-	0,05	-

Tablica 8. Sastav otopine soli i otopine elemenata u tragovima korištene za SmF uzgoj plijesni

sastojak otopine soli	koncentracija [g L ⁻¹]	sastojak otopine elemenata	koncentracija [g L ⁻¹]
kvašćev ekstrakt	5,0	željezov sulfat heptahidrat	5,0
kalijev dihidrogen fosfat	5,0	manganov sulfat monohidrat	1,6
diamonijev sulfat	3,75	cinkov sulfat heptahidrat	1,4
magnezijev sulfat heptahidrat	0,3	kobaltov klorid heksahidrat	0,2
kalcijev klorid dihidrat	0,3	etilendiaminotetraoctena kiselina (EDTA)	15,0
repičino ulje	0,5		
0,2 mL L ⁻¹ otopine Tween 80 [1 g L ⁻¹]			
1 mL L ⁻¹ otopine elemenata u tragovima			

3.1.4.3. Hranjiva podloga za uzgoj u bioreaktoru

Tekuća hranjiva podloga za uzgoj plijesni *T. reesei* i proizvodnju celulolitičkih enzima sastojala se od 35,3 g L⁻¹ lignocelulozne sirovine (70 % predobrađenog kukuruznog oklaska, 30 % usitnjenih pšeničnih mekinja), 0,71 g L⁻¹ ulja repice, 0,2 mL L⁻¹ otopine Tween 80 koncentracije 1 g L⁻¹ i 0,06 g L⁻¹ enzimskog pripravka liofiliziranih celulaza iz *T. reesei*.

3.1.4.4. Sastav podloge za enzimsku hidrolizu

Tablica 9. Sastav podloga za enzimsku hidrolizu kukuruznog oklasa ***

$\gamma = 10 \text{ g L}^{-1}$ supstrata (glukan)								
sadržaj / broj tikvice	1	2	3	4	5	6	7	8
otopina Tween 80 [g L^{-1}]	0	1	2	4	6	12	20	0
Celluclast 1.5L [$0,38 \text{ mL g}^{-1}$]	+	+	+	+	+	+	+	+
kukuruzni oklasak	o	o	o	O	o	o	o	n
citratni pufer [ampicilin 100 mg L^{-1}]	+	+	+	+	+	+	+	+
$\gamma = 100 \text{ g L}^{-1}$ supstrata (sveukupna suha tvar)								
sadržaj tikvice / broj tikvice	9	10	11	12	13	14	15	16
otopina Tween 80 [g L^{-1}]	0	1	2	4	6	12	20	0
Celluclast 1.5L [$0,38 \text{ mL g}^{-1}$] Viscozyme L [$0,182 \text{ mL g}^{-1}$]	+	+	+	+	+	+	+	+
kukuruzni oklasak	o	o	o	O	o	o	o	n
citratni pufer [ampicilin 100 mg L^{-1}]	+	+	+	+	+	+	+	+

*n= neobrađen kukuruzni oklasak; o = predobrađen kukuruzni oklasak;

***+ = prisustvo enzimskog/ih pripravka, citratnog pufera.

3.1.5. Oprema i aparatura

3.1.5.1. Centrifuge

Za izolaciju celulolitičkih enzima iz prevrele lignocelulozne podloge te za dodatno pročišćavanje enzima korištena je centrifuga Harrier 18/80 MSE (Sanyo, Velika Britanija). Uzorci su centrifugirani u polipropilenskim kivetama s konusnim dnom od 15 mL i 50 mL (Greiner Nio-One GmbH, Frickenhausen, Njemačka) i u polipropilenskim epruveticama od 1,5 mL (Eppendorf®, Hamburg, Njemačka).

3.1.5.2. Bioreaktor s miješalom

U ovom istraživanju korišten je bioreaktor s miješalom (Biostat MD, B. Braun, Njemačka) volumena 2 L (slika 5).



Slika 5. Bioreaktor s miješalom (Biostat MD, B. Braun, Njemačka) (vlastita fotografija)

Korisni volumen ovog bioreaktora je 1,7 L. Sterilizacija hranjive podloge vršila se zajedno s bioreaktorom u autoklavu. Bioreaktor je opremljen sustavom za regulaciju temperature, korekciju pH vrijednosti i praćenje koncentracije otopljenog kisika. Na poklopcu bioreaktora nalaze se otvori za priključak sustava inokulacije i dodatak hranjive podloge, dodavanje kiseline i lužine te otvor za priključak filtera za ulazni zrak. Zrak ulazi u bioreaktor kroz sterilni ulazni filter za zrak te iz njega izlazi kroz sterilni izlazni filter na izlaznom cjevovodu bioreaktora. Pomoću staklenog zvonca, sterilno, izuzimani su uzorci za praćenje tijeka bioprocesa. Protok zraka reguliran je pomoću rotametra ovisno o pO_2 izmjerenim u podlozi. Za korekciju pH vrijednosti korištene su peristaltičke pumpe kao sastavni dio mjerno – regulacijskog sustava bioreaktora.

3.1.5.3. Spektrofotometar

Pomoću UV/Vis spektrofotometra Cary 13E Varian (Australija) određivane su apsorbancije pri 595 nm za određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu (poglavlje 3.2.7.2.) i apsorbancije pri 450 nm za određivanje glukoze DNSA metodom

(poglavlje 3.2.7.1.). Za tu svrhu korištene su staklene kivete promjera 10 mm (Hellma Optik GmbH, Jena, Njemačka). Kao referentna vrijednost uzeta je apsorbancija prema zraku.

3.1.5.4. Uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC)

Koncentracija različitih ugljikohidrata (glukoza, ksiloza i celobioza) u supernatantima (tekuća faza) uzoraka izuzetih tijekom enzimske hidrolize (poglavlje 3.2.6.) određena je pomoću uređaja za kromatografiju Shimadzu CLASS-VP LC-10A_{VP} (Shimadzu; Kyoto, Japan) prikazanog na slici 6.



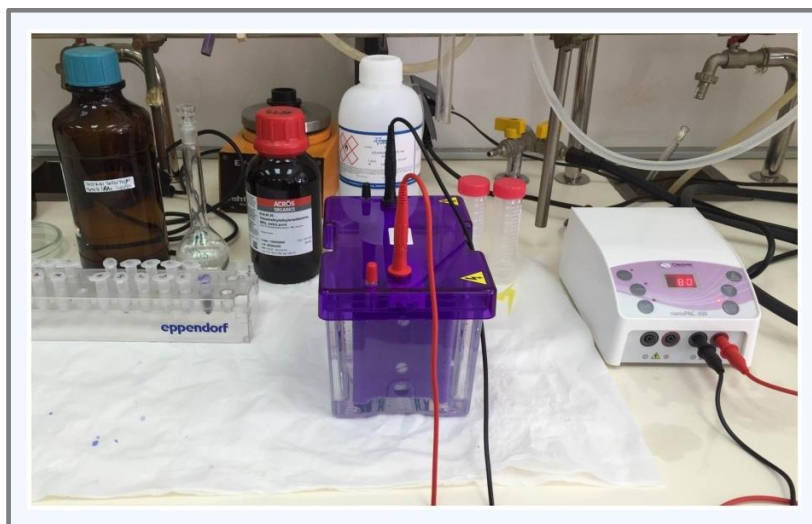
Slika 6. Shimadzu CLASS-VP LC-10A_{VP} sustav za kromatografiju (Shimadzu, Kyoto, Japan) (vlastita fotografija)

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 μm; Sigma-Aldrich Co. (LLC), St. Louis, SAD) s predkolonom (Supelcogel™ H; 5 cm x 4,6 mm i.d., 9 μm; 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).

3.1.5.5. Sustav za elektroforezu u poliakrilamidnom gelu u prisustvu natrijevog dodecilsulfata (SDS-PAGE)

Elektroforezom u poliakrilamidnom gelu u prisustvu natrijevog dodecilsulfata (SDS-PAGE) razdvojeni su proteini iz uzoraka dobivenih tijekom enzimske hidrolize lignocelulozne sirovine (poglavlje 3.2.7.4.). Sustav za vertikalni SDS-PAGE (slika 7) sastoji

se od izvora električne energije (nanoPAC-300 mini; Cleaver Scientific Ltd, Warwickshire, Ujedinjeno Kraljestvo) i kadice za vertikalnu elektroforezu (omniPAGE CVS10D mini, 10 x 10 cm širine, 2 seta staklenih pločica, razmaknice 1 mm debljine, 2 x 12 uzoraka, češljići debljine 1 mm; Cleaver Scientific Ltd, Warwickshire, Ujedinjeno Kraljestvo) (slika 7).



Slika 7. Sustav za SDS-PAGE (Cleaver Scientific Ltd, Warwickshire, Ujedinjeno Kraljestvo)
(vlastita fotografija)

3.1.5.6. Ostala oprema i aparatura

U tablici 10 prikazan je popis opreme i aparature s proizvođačem koja je korištena u ovom istraživanju. Također, ostala oprema podrazumijeva osnovni laboratorijski pribor, stakleno posuđe i Erlenmayerove tikvice, Büchnerov lijevak, plamenici, hladnjak i zamrzivač za čuvanje kemikalija (+4 °C) i uzoraka (-20 °C). Korišteno je osobno računalo s programskim paketom Windows 10 Professional.

Tablica 10. Ostala oprema i aparatura

oprema	proizvođač
laboratorijska tresilica	Certomat RM, B. Braun Biotech International, Santorius Group, Goettingen, Njemačka
autoklav	Sutjeska, Beograd, Jugoslavija
sušionik	Instrumentaria ST-50, Zagreb, Hrvatska
magnetska miješalica	Cimarec™, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, SAD
homogenizator	Tehtnica EV-100, Železniki, Slovenija
kupelj	Sutjeska, Beograd, Jugoslavija
peristaltičke pumpe	Chemap Ag, Uster, Švicarska Ismatec, Glattbrugg, Švicarska
pH metar	Metrohm AG, Zofingen, Švicarska
tehnička vaga	Tehtnica ET-1211, Železniki, Slovenija
analitička vaga	Santorius, Göttingen, Njemačka
mikroskop	Olympus CH20, Tokyo, Japan

3.2. Metode rada

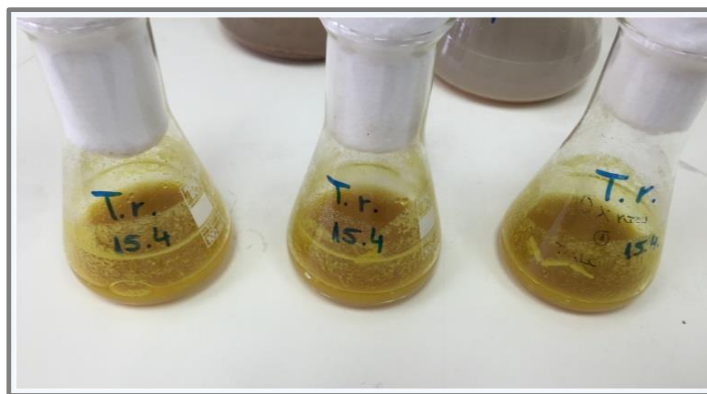
3.2.1. Priprema inokuluma

3.2.1.1. Priprema kulture plijesni *T. reesei* uzgojene na kosom agaru

Kultura plijesni *T. reesei* je uzgojena na kosoj hranjivoj podlozi u epruvetama i Rouxovoj bočici tijekom dva tjedna na temperaturi od 28 °C. Spore plijesni sastrugane su s površine podloge, resuspendirane uz dodatak otopine Tween 80 (1 g L⁻¹) i profiltrirane kroz gazu. Spore su čuvane u hladnjaku na +4 °C.

3.2.1.2. Priprema predkulture plijesni *T. reesei*

U Erlenmayerove tikvice od 100 mL (3x) (slika 8) i 500 mL (2x) u kojima se nalazilo 20 mL odnosno 100 mL PD podloge (prethodno sterilizirane i ohlađene) naciepljena je čista kultura *T. reesei* uzgojene na kosoj hranjivoj podlozi. Podloga je naciepljena s 3x10⁶ spora/g izvora ugljika. Kultura je uzgajana na tresilici pri 180 o min⁻¹, na temperaturi od 30 °C i pH vrijednosti 4,5 tijekom 2 dana.



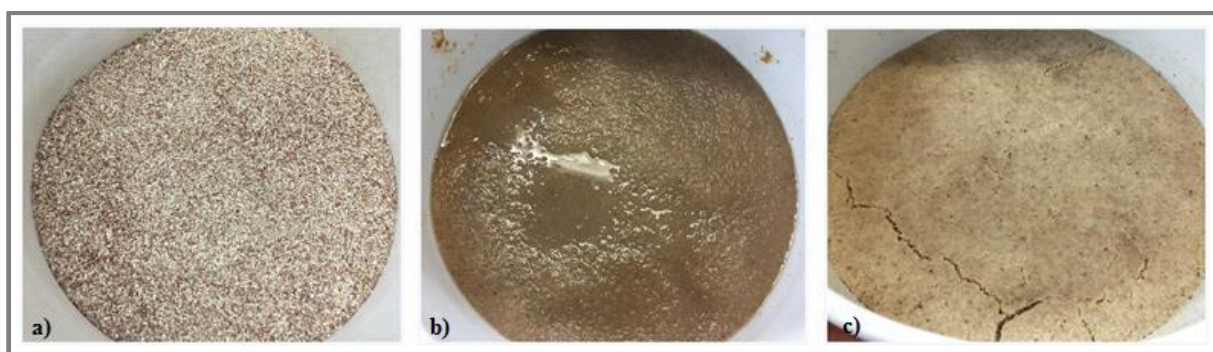
Slika 8. Predkultura *T. reesei* uzgojena u PD bujonu (vlastita fotografija)

3.2.2. Priprema lignocelulozne sirovine

Kukuruzni oklasak usitnjen je u drobilici za vrtni otpad, a zatim u reznom mlinu. Dimenzija usitnjenih čestica (99,35 %) prema granulometrijskoj analizi bila je manja od 1 mm, od čega je 69,5 % čestica imalo dimenziju 0,5–1 mm (Lešić, 2014). Pšenične mekinje usitnjene su u električnom mlinu.

3.2.2.1. Predobrada kukuruznog oklasaka natrijevom lužinom

Prethodno usitnjen kukuruzni oklasak pomiješan je s 3 %-tnom natrijevom lužinom uz omjer lužine i suhe tvari kukuruznog oklasaka (engl. *liquid to solid ratio*, LSR) 8:1 mL g⁻¹, te su kuhani 30 min pri temperaturi od 121 °C u autoklavu (slika 9). Vruća smjesa predobrađene lignocelulozne sirovine filtrirana je preko Büchnerovog lijevka, a zatim je filtarski kolač ispran s vodom u više naljeva do postizanja neutralne pH vrijednosti, osušen pri 50 °C do otprilike 5 % vlage, zamrznut i kasnije korišten za pripravu hranjivih podloga.



Slika 9. Kukuruzni oklasak tijekom alkalne hidrolize: (a) neobrađen kukuruzni oklasak; (b) izgled tijekom hidrolize; (c) predobrađen kukuruzni oklasak (vlastita fotografija)

3.2.3. Priprema podloga za SSF uzgoj i proizvodnju celulolitičkih enzima

Šaržni uzgoj plijesni *T. reesei* proveden je na 6 različitih hranjivih podloga za rast i proizvodnju celulolitičkih enzima u Erlenmeyerovim tikvicama od 500 mL. Tikvice s hranjivim podlogama A, B, C, D, E i F i 15 tikvica istog sastava hranjive podloge F (tablica 5) sterilizirane su u autoklavu pri 121 °C tijekom 20 min i tlaku od 1,5 – 2 bar. Hranjive podloge naciepljene su s čistom kulturom plijesni uzgojene na kosom agaru i to s 3×10^6 spora g^{-1} izvora ugljika. Koncentracija spora i volumen za naciepljivanje određeni su brojanjem spora u Thomaovoj komorici. Šaržni uzgoj i proizvodnja celulolitičkih enzima provedena je u inkubatoru pri 28 °C uz stalnu kontrolu sadržaja vlage, pri aerobnim uvjetima i pH vrijednosti 4,5, odnosno 5,8 (podloga E). Vrijeme uzgoja na hranjivim podlogama A, B, C, D, E i F iznosilo je 31 dan pri čemu se uzorak izuzimao posljednjeg dana. Također, pripremljeno je 15 tikvica podloge F pri čemu se svakih 1–2 dana tijekom 35 dana uzgoja izuzimala po jedna tikvica.

Praćen je udio vode u podlozi tijekom uzgoja pri čemu se vršilo vaganje tikvica s hranjivom podlogom prije i nakon uzgoja. Nakon izuzimanja tikvica, u prevrelu podlogu je dodano 50 ml otopine Tween 80 koncentracije 1 g L^{-1} . Tikvice su stavljene na tresilicu pri 150 o min^{-1} kroz pola sata. Izdvojena prevrela podloga centrifugirana je pri 4 500 o min^{-1} 10 min, a zaostali talog zajedno s tikvicom spremio na -20 °C. Nakon odvajanja supernatanta iz prevrele podloge, u supernatantu je određena celulolitička aktivnost primjenom DNSA metode (poglavlje 3.2.7.1.).

3.2.4. Priprema podloga za SmF uzgoj i proizvodnju celulolitičkih enzima

Na tresilici je proveden šaržni uzgoj sa 7 različitih hranjivih podloga (a, b, c, d, e, f, g) prema gore prikazanim sastavu (tablica 7). U Erlenmayerove tikvice od 500 mL dodano je 200 mL hranjive podloge, nakog čega su tikvice sterilizirane u autoklavu pri 121 °C kroz 20 min i tlaku od 1,5 – 2 bar. Nakon hlađenja, hranjive podloge a, b, c, d inokulirane su s čistom kulturom plijesni *T. reesei*. Brojanjem spora u Thomaovoj komorici određena je koncentracija spora i određen volumen za naciepljivanje hranjivih podloga. Hranjive podloge naciepljene su s 3×10^6 spora/g izvora ugljika. Hranjive podloge e, f i g inokulirane su s predkulturom plijesni *T. reesei* uzgojene na PD podlozi (poglavlje 3.1.4.). SmF uzgoj je proveden pri temperaturi od 28 °C i 150 o min^{-1} u aerobnim uvjetima, u trajanju 11 – 14 dana. Uzorkovanje se vršilo svakih 2 – 3 dana. Prevrela podloga centrifugirana je pri 4 500 o min^{-1} kroz 10 min. Izdvojen talog je sadržavao nehidrolizirani lignocelulozni supstrat i biomasu plijesni. U

supernatantu je određena koncentracija glukoze, odnosno celulolitička aktivnost primjenom DNSA metode.

3.2.5. Provedba šaržnog procesa proizvodnje celulolitičkih enzima u laboratorijskom bioreaktoru

Šaržni proces uzgoja plijesni i proizvodnje celulolitičkih enzima vođen je u bioreaktoru korisnog volumena $V_k = 1,7$ L kroz 5 dana. U bioreaktor je preneseno repičino ulje i otopina Tween 80 te kukuruzni oklasak određene koncentracije (poglavlje 3.1.4.3.), nakon čega je izvršena sterilizacija. Potrebna demineralizirana voda za uzgoj i otopine za korekciju pH vrijednosti zasebno se sterilizirala. Sterilizacija je provedena u autoklavu pri 121 °C tijekom 20 min i tlaku od 1,5 – 2 bar. Također, u podlogu je nakon sterilizacije dodano 0,05 g L⁻¹ liofiliziranog enzimskog pripravka celulaza iz *T. reesei*. Pokrenuto je miješanje te sustavi za regulaciju temperature (30 °C), broja okretaja miješanja (200 o min⁻¹), regulaciju pH vrijednosti (pH 4,5) i pO₂ (pO₂ > 20 %). Korištene otopine za korekciju pH vrijednosti podloge bile su 1 M otopina H₂SO₄ i 1 M otopina NaOH (s dodatkom 3 % NH₃). Početak uzgoja aproksimiran je dodatkom 200 mL predkulture plijesni *T. reesei* uzgojene u PD bujonu na prethodno opisan način (poglavlje 3.2.1.2.). Uzorci iz bioreaktora (približno 30 mL) izuzeti su pomoću sterilnog sustava za uzorkovanje, prvi nakon 3 dana te svaki sljedeći nakon 24 sata. Prevela podloga je centrifugirana pri 4 500 o min⁻¹ kroz 10 min i odvojen supernatant se spremio u zamrzivač na -20 °C te kasnije upotrijebljen za određivanje celulolitičke aktivnosti.

3.2.6. Optimiranje procesa enzimske hidrolize kukuruznog oklaska

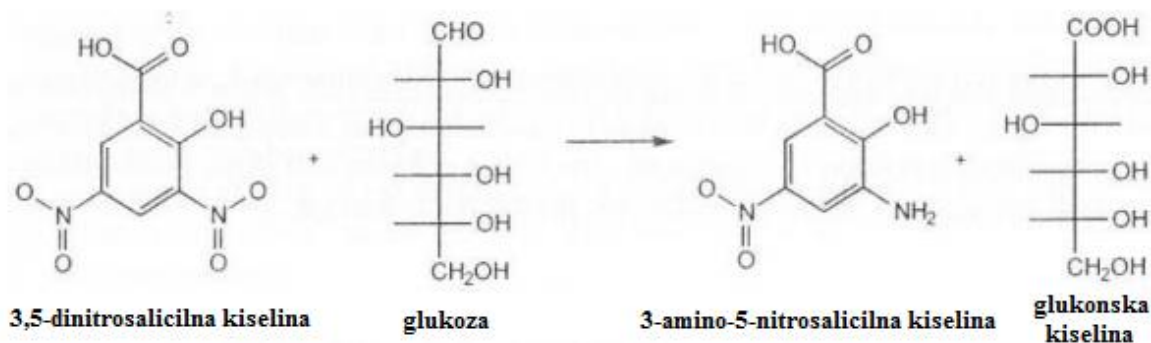
Praćen je utjecaj dodatka otopine Tween 80 na efikasnost enzimske hidrolize predobrađene lignocelulozne sirovine. Provedena su dva eksperimenta, prvi eksperiment vođen je uz 10 g L⁻¹ supstrata (računato na gluklan), a drugi uz 100 g L⁻¹ supstrata (računato na sveukupnu suhu tvar). Reakcijska smjesa je sadržavala predobrađen kukuruzni oklasak (supstrat), 30 mL citratnog pufera (c = 50 mM; pH vrijednost = 5,0), antibiotik (ampicilin, 100 mg L⁻¹) te različite koncentracije otopine Tween 80 kao što je navedeno u poglavlju 3.1.4.4. (tablica 9). Također, provedena je enzimska hidroliza neobrađenog kukuruznog oklaska bez dodatka otopine Tween 80. Dodana količina celulolitičkih enzima u prvom eksperimentu (Celluclast 1.5L, Sigma) iznosila je 0,38 mL g⁻¹ glukana. U drugom eksperimentu je, osim navedenog enzimskog preparata, korišten i Viscozyme L koji osim celulolitičke aktivnosti ima i hemicelulolitičku i pektinaznu aktivnost. Koncentracija dodanog Viscozyme L iznosila je 0,182 mL g⁻¹ suhe tvari. Enzimska hidroliza se provodila pet dana na laboratorijskoj magnetskoj tresilici pri 45 °C. Uzorkovanje se vršilo nakon 2, 4, 6, 12, 24, 48,

72 i 120 h. Uzorci su centrifugirani pri $10\,000\text{ o min}^{-1}$ tijekom 15 min. Proces hidrolize praćen je mjerenjem koncentracije šećera (glukoza, ksiloza i celobioza) u supernatantu primjenom tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC), određivanjem proteina metodom po Bradfordu i natrij dodecil sulfat-poliakrilamid gel elektroforezom (SDS-PAGE). Dobiveni talog (nehidrolizirani supstrat) je osušen pri $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ i izvagan te je izračunata učinkovitost enzimске hidrolize.

3.2.7. Analitičke metode

3.2.7.1. Određivanje celulolitičke aktivnosti enzima

Aktivnost celulolitičkih 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 (slika 10). Jedan mol šećera reagira s jednim molom DNS kiseline. Kao rezultat kemijske reakcije, DNS 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 540 nm.



Slika 10. Kemijska reakcija redukcije glukoze upotrebom 3,5-dinitrosalicilne kiseline (Anonymous 1, 2016)

Primjenom FPA testa (engl. *Filter Paper Assay*) (Mandels i sur., 1976) određena je celulolitička aktivnost enzima sa supstratom koji je netopljiv u vodi (filter papir Whatman No.1) kojeg je propisala Međunarodna unija za čistu i primijenjenu kemiju (engl. *International Union for Pure and Applied chemistry*, IUPAC). Celulolitička aktivnost izražena je u internacionalnoj jedinici (engl. *International Units*, IU).

3.2.7.1.1. Priprema reagensa i otopina za analizu

Za pripravu DNS 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 4 M natrijeve lužine. U 200 mL demineralizirane vode otopljeno je 2 g glukoze te su pripremljena različita razrjeđenja otopine glukoze za izradu baždarnog pravca (prilog 7.2.). Supstrat, filter papir Whatman No.1 reza se na trakice dimenzija 1x6 cm ($\approx$ 50 mg). Reagens i otopine čuvane su pri +4 °C.

3.2.7.1.2. Postupak provođenja analize

Nakon centrifugiranja prevrele podloge lignocelulozne sirovine (4500 o min^{-1} kroz 10 min) iz supernatanta je odpipetirano 0,5 mL uzorka i preneseno u epruvetu. U tako pripremljeni nerazrijeđeni uzorak enzima dodano je 1 mL citratnog pufera (0,05 M; pH vrijednost 4,8). Proba s enzimom nije sadržavala supstrat, dok je kontrola supstrata i kontrola reagensa sadržavala samo 1,5 mL citratnog pufera. Epruvete su inkubirane u vodenoj kupelji na temperaturi od 50 °C kroz 60 minuta. Nakon desetak minuta inkubacije dodan je supstrat, Whatman No.1, filter papir. Dodatkom 1,5 mL DNS reagensa zaustavljena je enzimska reakcija. Reakcijska smjesa kuhala se pri 100 °C kroz 15 minuta nakon čega je dodano 0,5 mL Rochelleovih soli. Nakon hlađenja u ledenoj vodenoj kupelji dobivena smjesa se ponovo centrifugirala pri $10\,000 \text{ o min}^{-1}$ kroz 3 – 4 minute, te se razrijedila s vodom u omjeru 2:15. Izmjerena je apsorbancija uzorka pri 540 nm prema zraku.

3.2.7.1.3. Izračun celulolitičke aktivnosti

Izračunata je razlika apsorbancije za pojedine enzimске reakcije i sume apsorbancija odgovarajućih enzimskih proba i kontrole supstrata (prije oduzeta kontrola reagensa). U jednadžbu baždarnog pravca uvrštena je razlika apsorbancije. Temeljem jednadžbe pravca određena je koncentracija nastale glukoze i izračunata celulolitička aktivnost izražena kao FPA (IU).

Vrijednost celulolitičke aktivnosti (FPA nerazrijeđenog enzimskog uzorka) izračunata je prema ovoj jednadžbi:

$$FPA = \frac{m_{gl}}{M_{gl}} * \frac{1}{t_{ink}} [IU] \quad [1]$$

gdje su:

- m_{gl} = masa glukoze (mg);
- M_{gl} = molarna masa glukoze (180 mg μmol^{-1});
- t_{ink} = vrijeme inkubacije (60 min).

Internacionalna jedinica (IU) iznosi:

1 IU = 1 $\mu\text{mol min}^{-1}$ „glukoze“ (reducirajući šećeri kao glukoza) formirane tijekom reakcije hidrolize;
= 1 $\mu\text{mol min}^{-1}$ razgrađenog supstrata;
= 0,18 mg min^{-1} glukoze.

3.2.7.2. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu

Metodom po Bradfordu (Bradford, 1976) određena je koncentracija proteina u uzorcima SSF uzgoja, SmF uzgoja u tikvicama i uzgoja u bioreaktoru. Također, istoimenom metodom određena je koncentracija proteina uzoraka tijekom enzimske hidrolize lignocelulozne sirovine.

Ova kolorimetrijska metoda se temelji na reakciji proteina s bojom *Coomassie Brilliant Blue G-250* (CBB) u kiselom mediju. CBB reagira s baznim pobočnim grupama, primarno Arg, Lys i His te u manjoj mjeri s aromatskim pobočnim grupama Tyr, Trp i Phe. Anionski oblik boje se hidrofobnim interakcijama i ionskim vezama veže sa spomenutim ograncima proteina pri čemu dolazi do stvaranja kompleksa protein – boja i dovodi do vidljive promjene boje iz smeđe u plavu. Prilikom vezanja na protein pomiče se apsorpcijski maksimum boje s valne duljine 465 nm na 595 nm što se prati spektrofotometrijski.

3.2.7.2.1. Postupak provođenja analize

Nakon centrifugiranja prevrele podloge lignocelulozne sirovine (4500 o min^{-1} , 10 min) iz supernatanta je odpipetirano 0,05 mL uzorka i preneseno u epruvetu. U svaku epruvetu potom se dodalo 1,5 mL nerazrijeđenog Bradford reagensa, sadržaj se vorteksirao i ostavio 15 minuta u tami na sobnoj temperaturi, nakon čega je očitana apsorbancija pri 595 nm. Uz

pomoć jednadžbe baždarnoga pravca za BSA (engl. *Bovine serum albumin*) određena je koncentracija proteina u uzorku (prilog 7.1.).

3.2.7.3. Određivanje koncentracije šećera pomoću tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC)

Shimadzu CLASS-VP LC-10A_{VP} kromatograf (Japan) korišten je za određivanje koncentracije šećera u izuzetim uzorcima tijekom enzimске hidrolize lignocelulozne sirovine. Dijelovi sustava opisani su u poglavlju 3.1.5.4.

3.2.7.3.1. Priprema uzoraka za HPLC analizu

Iz svake tikvice prilikom enzimске hidrolize izuzeto je po 1 mL smjese u Eppendorf epruvetice i zamrznuto na -20 °C. Denaturacija proteina izvršena je kuhanjem uzoraka proteina pri 100 °C tijekom 10 min. Zatim je izvršeno centrifugiranje pri 10 000 o min⁻¹ tijekom 10 min. Za određivanje koncentracije šećera HPLC analizom priređeno je odgovarajuće razrjeđenje dobivenog supernatanta ovisno o početnoj koncentraciji supstrata i vremenu enzimске 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).

3.2.7.3.2. HPLC analiza

Za pripremu otopina korištena je redestilirana voda čija je vodljivost iznosila manje od 1 µS. Kao pokretna faza korištena je otopina H₃PO₄ (0,1 % vol/vol) u vodi. Po 20 µL svakog uzorka injektirano je i propušteno kroz kolonu pri temperaturi od 30 °C i brzini protoka pokretne faze od 0,5 mL min⁻¹.

Nakon kromatografske analize integracija dobivenih dijagrama se izvršila pomoću računalnog programa CLASS.VP verzija 6.10. Koncentracija šećera u uzorku određena je iz baždarnih pravaca za standarde šećera (Mušak, 2014). Baždarni dijagrami i vrijeme zadržavanja za standarde glukoze, ksiloze i celobioze prikazani su u prilogu 7.3.

3.2.7.4. Razdvajanje proteina elektroforezom u poliakrilamidnom gelu u prisustvu natrijevog dodecilsulfata

Metodom SDS-PAGE (engl. *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) razdvojeni su proteini iz supernatanta dobivenog centrifugiranjem uzoraka uzetog posljednjeg dana (120 h) enzimске hidrolize lignocelulozne sirovine. SDS se na molekule proteina veže u omjeru 1,4 g SDS-a po 1 g proteina i daje im negativan neto naboj

prikrivajući nativni naboj molekule. Sve molekule proteina u uzorku (supernatantu) tada imaju jednaku gustoću naboja pa brzina kretanja u električnom polju ovisi samo o molekulskoj masi pojedinog proteina.

3.2.7.4.1. Priprema gelova, otopina i pufera

Tablica 11. Sastav gelova, otopina i pufera korištenih za SDS-PAGE

gel za razdvajanje [12 %]		gel za sabijanje [4,5 %]	
demineralizirana voda, 5,25 mL		demineralizirana voda, 4,2 mL	
30 % akrilamid, 6,0 mL		30 % akrilamid, 0,65 mL	
10 % APS (amonij persulfat), 150 μ L		10 % APS (amonij persulfat), 67 μ L	
TEMED, 15 μ L		TEMED, 6,7 μ L	
Tris-HCL (1,5 M Tris-HCL; pH 8,8, 0,4 % SDS), 3,75 mL		Tris-HCL (0,5 M Tris-HCL; pH 6,8, 0,4 % SDS), 1,6 mL	

otopina za bojanje	otopina za odbojavanje	pufer za uzorke (Laemmli pufer)
45 % metanol	20 % metanol	40 % glicerol, 4 mL
10 % octena kiselina	10 % octena kiselina	10 % 2-merkaptotanol, 2 mL
45 % demineralizirana voda	70 % demineralizirana voda	0,005 % boja BPB (bromfenol plavo), 0,03 g
0,3 % <i>Coomassie Brilliant Blue</i> R-250 boja		Tris-HCL (0,5 M Tris-HCL; pH 6,8, 0,4 % SDS), 5 mL
		Laemmli reagens
		SDS, 1,2 g

3.2.7.4.2. Priprema uzoraka za analizu

Nakon izuzimanja određenog volumena tekuće faze uzoraka (supernatant) za HPLC analizu, preostali volumen iskoristio se za razdvajanje proteina. Proteini u supernatantima enzimске reakcije s početnom koncentracijom glukana od 10 g L⁻¹ taloženi su s trikloroocetnom kiselinom (TCA). 50 μ L uzorka supernatanta pomiješan je s 20 % TCA u omjeru 1:1, pri čemu je konačna koncentracija TCA iznosila 10 %. Taloženje proteina odvijalo se na temperaturi od 0 °C (led) u vremenu od 20 minuta nakon čega je izdvojen talog centrifugiranjem pri 10 000 o min⁻¹ kroz 10 min. Talog (proteini) je ispran s otopinom etanol/etil acetat (1:1), te se ponovilo centrifugiranje pri 10 000 o min⁻¹ i 10 min (3x). Dobiveni talog proteina osušen je na zraku i otopljen u 10 μ L vode i 10 μ L pufera za uzorke

(Laemmli pufer) kuhanjem pri 100 °C kroz 15 minuta. Pomoću mikropipete priređeni su uzorci (po 15 µL) prenešeni u jažice gela. Osim uzoraka, na gel je nanešen obojani standard proteina poznatih molekulskih masa (Novex® Sharp Protein Standard, Life Technologies).

3.2.7.4.3. SDS-PAGE metoda

Razdvajanje proteina iz smjese provedeno je postupkom prema Laemmli-ju u sustavu za SDS-PAGE elektroforezu (Laemmli, 1970). Elektroforeza je provedena u diskontinuiranom sustavu, odnosno u sustavu u kojem se pufer za provođenje elektroforeze, po sastavu i pH vrijednosti razlikovao od pufera u poliakrilamidnom gelu. Također, taj se gel sastojao od dva dijela: poliakrilamidnog gela za sabijanje proteina u smjesi ($\phi = 4,5 \%$) i poliakrilamidnog gela za razdvajanje proteina ($\phi = 12 \%$). Razlika se očituje u stupnju umreženosti gela i pH vrijednosti. Gel je tijekom ovog postupka uronjen u pufer za SDS-PAGE elektroforezu. Proces razdvajanja proteina pod djelovanjem električnog polja proveden je pri naponu od 180 V i jakosti struje od 40 mA tijekom 1 h. Nakon provedene elektroforeze, izvršeno je bojanje proteinskih vrpca otopinom za bojanje te postupak odbojavanja otopinom za odbojavanje (tablica 11).

3.2.7.5. Određivanje udjela vode u hranjivoj podlozi tijekom SSF uzgoja

Vaganjem tikvica s hranjivom podlogom nakon sterilizacije i nakon SSF uzgoja plijesni *T. reesei* pratila se promjena udjela vode podloge koja je izračunata prema sljedećim jednadžbama:

$$U_v = \frac{m_{pv}}{m_{uk}} * 100 \quad [\%] \quad [2]$$

$$m_{uk} = m_{sh/poč} + m_{pv} \quad [g] \quad [3]$$

$$m_{pv} = m_{v/poč} - \Delta_{tm} \quad [g] \quad [4]$$

$$\Delta_{tm} = m_{ts} - m_{tu} \quad [g] \quad [5]$$

gdje su:

- m_{pv} = masa preostale vode u hranjivoj podlozi (g);
- m_{uk} = ukupna masa hranjive podloge tijekom uzgoja (g);
- $m_{sh/poč}$ = masa suhe tvari na početku uzgoja (g);
- $m_{v/poč}$ = masa vode na početku uzgoja (g);
- Δ_{tm} = gubitak mase tikvica (g);
- m_{ts} = masa tikvice nakon sterilizacije (g);

- m_{tu} = masa tikvice nakon uzgoja (g);
- U_v = udio vode hranjive podloge (%).

3.2.7.6. Određivanje učinkovitosti procesa enzimske hidrolize lignocelulozne sirovine

Nakon provedene enzimske hidrolize kukuruznog oklaska preostala smjesa u tikvicama centrifugirana je pri 4500 o min^{-1} tijekom 10 min te je dobiveni talog stavljen na sušenje pri 105°C do konstantne mase. Vaganjem na analitičkoj vagi određena je masa nehidroliziranog supstrata. Masa nehidroliziranog supstrata izračunata je iz razlike mase prazne kivete i mase kivete sa suhim uzorkom prema sljedećoj jednadžbi:

$$m_{NH} = m_{pune\ kivete} - m_{prazne\ kivete} \quad [g] \quad [6]$$

Učinkovitost enzimske hidrolize lignocelulozne sirovine izračunata je prema jednadžbi:

$$E_H = \frac{m_H - m_{NH}}{m_H} \quad [\%] \quad [7]$$

gdje su:

- m_H = početna masa kukuruznog oklaska (hidrolizat) u tikvici (g);
- m_{NH} = masa nehidroliziranog kukuruznog oklaska (g);
- E = učinkovitost enzimske hidrolize (%).

3.2.7.7. Stupanj enzimske hidrolize strukturnih polisaharida

Stupanj enzimske hidrolize strukturnih polisaharida, glukana i ksilana, do monosaharida, glukoze i ksiloze, izračunato je prema jednadžbama:

$$\eta_{EH} = \frac{\gamma_{monosah}}{\gamma_{polisah} * K_f} * 100 \quad [\%] \quad [8]$$

$$\gamma_{polisah} = \gamma_p * U_{polisah} \quad [g\ L^{-1}] \quad [9]$$

gdje su:

- $\gamma_{monosah}$ = koncentracija monosaharida u enzimskom hidrolizatu ($g\ L^{-1}$);
- $\gamma_{polisah}$ = koncentracija strukturnog polisaharida ($g\ L^{-1}$);
- K_f = korektivni faktor;
- η_{EH} = iskorištenje enzimske hidrolize (%);
- γ_p = koncentracija glukana, odnosno sveukupne suhe tvari u podlozi ($g\ L^{-1}$);

- U_{polisah} = udio strukturnih polisaharida u predobrađenom/neobrađenom kukuruznom oklasku (tablica 2).

Korektivni faktor predstavlja omjer molekulske mase monomerne građevne jedinice strukturnog polisaharida i monosaharida. Korektivni faktor za ksilozu je 1,14, a za glukozu 1,1.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. SSF uzgoj plijesni *T. reesei* i proizvodnja celulolitičkih enzima

Proizvodnja celulolitičkih enzima provedena je u tikvicama na čvrstoj podlozi lignocelulozne sirovine. Provedena su dva vremenski odijeljena uzgoja. Istraživanje je započeto na podlogama s predobrađenim kukuruznim oklaskom uz dodatak ili bez pšeničnih mekinja i otopinom soli u trajanju od 31 dan, a nastavljeno na podlozi s neobrađenim kukuruznim oklaskom i pšeničnim mekinjama u trajanju od 35 dana. Cilj uzgoja bio je odrediti optimalan sastav hranjive podloge za proizvodnju celulolitičkih enzima s plijesni *T. reesei* i odrediti vrijeme uzgoja *T. reesei* za postizanje maksimalne celulolitičke aktivnosti enzima.

4.1.1. Optimiranje sastava hranjivih podloga za SSF uzgoj plijesni u tikvicama

U tablici 12 prikazane su vrijednosti celulolitičke aktivnosti (FPA) enzima tijekom prvog uzgoja plijesni na lignoceluloznoj sirovini.

Tablica 12. Izmjerena celulolitička aktivnost

podloga	FPA [IU]
A	0,0121
B	0,0444
C	0,0403
D	0,0532
E	0,0434
F	0,0609

Sve hranjive podloge, A, B, C, D i E sadržavale su kukuruzni oklasak kao izvor ugljika. Pandey i suradnici su 2015. godine objavili rad u kojemu su uspoređivali učinak različitih supstrata na rast više vrsta plijesni roda *Trichoderma* sp. prilikom SSF uzgoja.

Uspoređujući ih s pšeničnim mekinjama, maltozom, saharozom i filter papirom, kukuruzni oklasak se pokazao najboljim supstratom za biosintezu celulaza tijekom SSF uzgoja različitih vrsta plijesni. Najveća celulolitička aktivnost (FPA) postignuta je s plijesni *Trichoderma reesei*.

Podloge A i B razlikovale su se u količini dodane otopine soli (izvor nutrijenata) i vode. Neki mikroorganizmi ne mogu rasti ili je njihov rast usporen u podlogama s povećanim osmotskim tlakom, odnosno smanjenim aktivitetom vode. Veća koncentracija soli u podlozi A utjecala je na rast plijesni smanjujući celulolitičku aktivnost. Prevreća podloga B, s manjom koncentracijom soli i s 75 % vode pokazuje veću enzimsku aktivnost (0,0444 IU), nego podloga A s 70 % vode (0,0121 IU). Podloge C i D, koje su umjesto otopine soli kao izvor dušika sadržavale pšenične mekinje i to u istoj koncentraciji, pokazale su veće vrijednosti celulolitičke aktivnosti u odnosu na prethodne podloge, posebice podloga D (0,0532 IU) koja je sadržavala 75 % vode. Brojne znanstvene studije svoje istraživanje temelje na određivanju optimalnog omjera vode i suhe tvari te optimalne temperature za proizvodnju celulolitičkih enzima. Tako su Wang i njegovi suradnici 2005. godine tijekom SSF uzgoja plijesni *T. reesei*, soj LW1, na kukuruznoj slami i pšeničnim mekinjama izmjerili najveću celulolitičku aktivnost u podlogama u kojima je dodana veća količina vode, 2:1 u korist vode (66 % vode). U našem slučaju optimalna količina vode iznosila je 70 %. Upravo taj postotak vode kao optimalan za proizvodnju celulolitičkih enzima s *T. reesei* navode Lee i suradnici koji su u svom radu iz 2011. godine koristili mješavinu šećerne trske i palminih koštica. Do istog zaključka došli su Sun i suradnici (2010) koji su utvrdili da je 70 %-tna vlažnost optimalna za SSF proizvodnju celulaza s *Trichoderma sp.* Veće količine vode smanjuju porozivnost sirovine, sprječavaju prijanjanje promotora, mijenjaju strukturu supstrata i smanjuju otapanje kisika iz zraka što se očituje u smanjenju brzine rasta radnog mikroorganizma. Manje količine vode (<45 %) smanjuju topljivost nutrijenata te postaju nedostupne za rast plijesni (Sun i sur., 2010). Podloga F, sadržavajući 70 % vode, se na temelju naših rezultata pokazala podlogom s optimalnim sastavom za proizvodnju celulolitičkih enzima pomoću *T. reesei*.

Nadalje, podloga F je sadržavala 30 % pšeničnih mekinja u ukupnoj suhoj tvari podloge, što je optimalni postotak prema istraživanju Xia i Cen iz 1999. godine. Tijekom istraživanja je vizualno, u svim podlogama, bilo teško utvrditi ikakve promjene u rastu plijesni što se odrazilo i na dobivene rezultate vrijednosti celulolitičke aktivnosti. Promjene su bile vidljive na podlogama s dodanim pšeničnim mekinjama. Uzimajući u obzir literaturne izvore, mnogi navode pšenične mekinje kao pogodan supstrat ili kosupstrat za proizvodnju

celulolitičkih enzima pomoću plijesni (Sharada i sur., 2013; Benkun i sur., 2007; Devendra i sur., 2012). Manje količine mekinja daju slabiji rast plijesni te time i nižu celulolitičku aktivnost, dok s druge strane veće količine uzrokuju jači rast plijesni, ali smanjuju biosintezu celulolitičkih enzima. Razlog tome leži u činjenici da pšenične mekinje sadrže adekvatne količine ovih nutrijenata: proteini 1,32 %, ugljikohidrati 69 %, masti 1,9 %, vlakna 2,6 %, pepeo 1,8 %, kalcij 0,05 %, magnezij 0,17 %, fosfor 0,35 %, kalij 0,45 %, sumpor 0,12 % i raznovrsne aminokiseline. Struktura pšeničnih mekinja je dovoljno porozna za dobru opskrbu kisikom (Balaraju i sur., 2010). U ovom istraživanju pšenične mekinje su se primarno koristile kao izvor dušika potrebnog za odvijanje metaboličkih reakcija, iako služe i kao izvor ugljika stanicama plijesni.

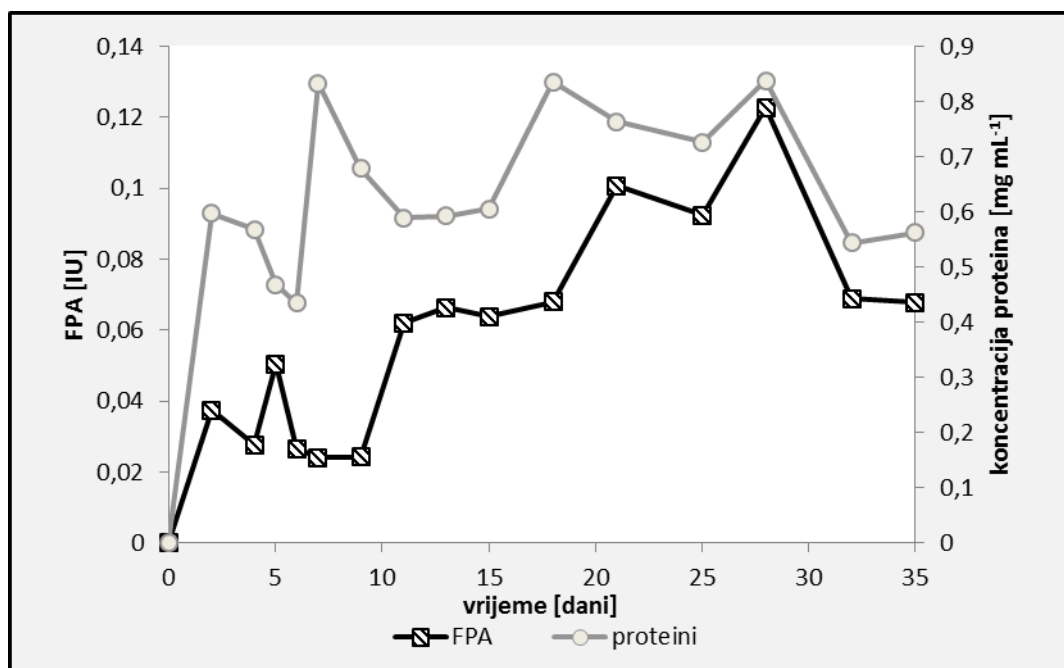
Također, podloga F je sadržavala neobrađen kukuruzni oklasak za razliku od ostalih spomenutih podloga kod kojih je kukuruzni oklasak predobrađen. Alkalna obrada provodila se u cilju smanjenja udjela lignina čime se smanjuje adsorpcija endo- i egzoglukanaza na površinu supstrata što ima pozitivan učinak na celulolitičku aktivnost. Za očekivati je bilo, da će se to odraziti i u našem istraživanju, što nije.

Tijekom uzgoja, tikvice su povremeno pomiješane kako bi se homogenizirala kultura i potaknuo rast uslijed opskrbe kisikom iz zraka. Temperatura uzgoja iznosila je 28 °C što je u rasponu optimalne temperature od 28 – 30 °C za rast većine plijesni roda *Trichoderma sp.* (Wang i sur., 2005; Lee i sur., 2011). pH vrijednost podloga A, B, C, D i F iznosila je 4,5 što se pokazalo u skladu s potrebama rasta plijesni i za biosintezu celulaza. Naime, podloga E je s većom pH vrijednošću od 5,8, pokazala manju aktivnost enzima u odnosu na podlogu C koja je bila jednakog sastava i udjela vode kao i podloga E. Iako optimalna vrijednost varira od vrste do vrste, većina sojeva celulolitičkih plijesni za svoj rast zahtjeva nešto manje pH vrijednosti. Kiselije i bazičnije pH vrijednosti pokazuju inhibitorni učinak na rast plijesni (Haltrich i sur., 1996). Celulaze s optimalnim pH u kiselom pH području (pH 4,5 – 6,0) smatraju se pogodnima za industrijsku primjenu (Tolan i Foody, 1999).

4.1.2. Određivanje vremena uzgoja *T. reesei* za postizanje maksimalne celulolitičke aktivnosti enzima

Iako se istraživanja temeljena na proizvodnji celulolitičkih enzima pomoću *Trichoderma sp.* SSF uzgojem s ovim istraživanjem ne mogu usporediti zbog različitog vođenja bioprocesa (korištenje različitih sojeva ili mutanta plijesni, različitih supstrata i uvjeta

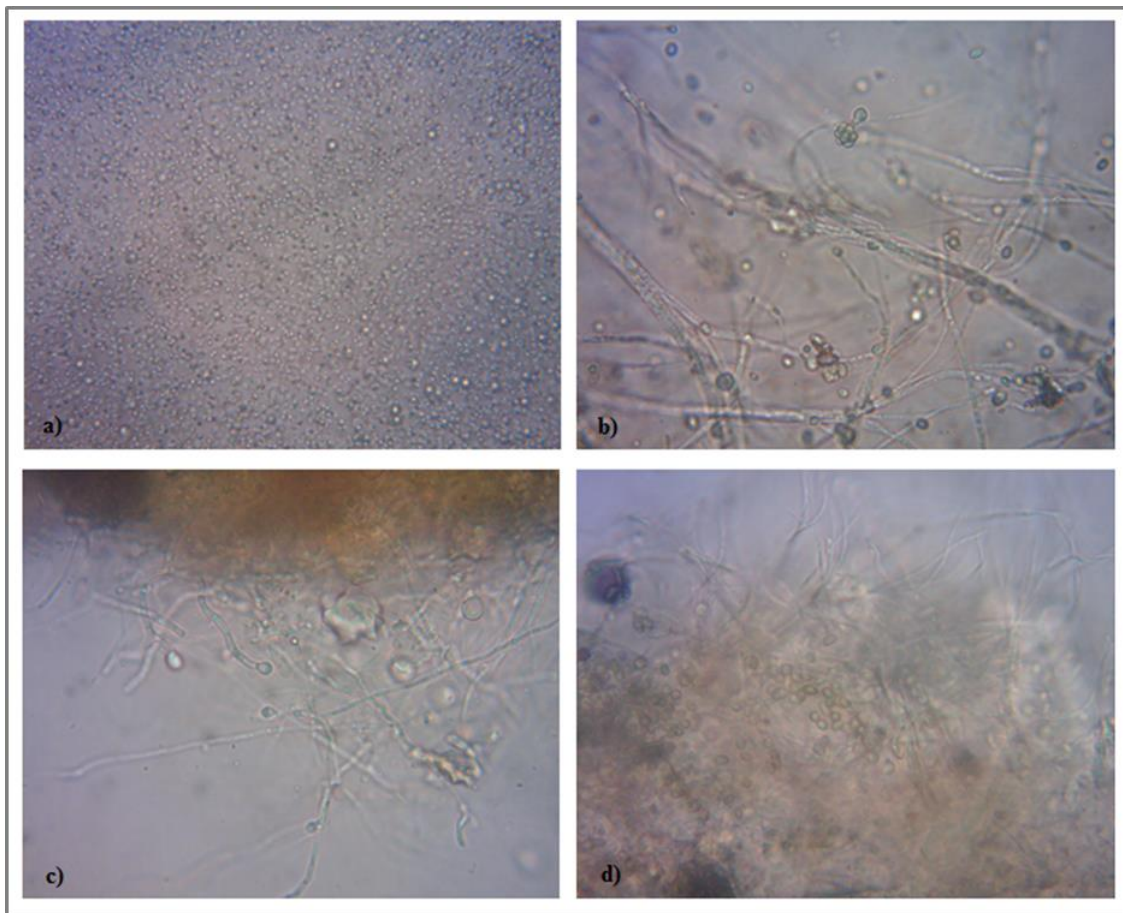
uzgoja), vrijednosti celulolitičke aktivnosti bile su neočekivano vrlo male. Bilo je za pretpostaviti da je vrijeme uzgoja, značajan faktor koji utječe na rast plijesni i proizvodnju celulolitičkih enzima, mogući razlog male celulolitičke aktivnosti te se daljnje istraživanje usmjerilo na višekratno izuzimanje uzoraka tijekom 35 dana uzgoja u kojima je kasnije određena celulolitička aktivnost.



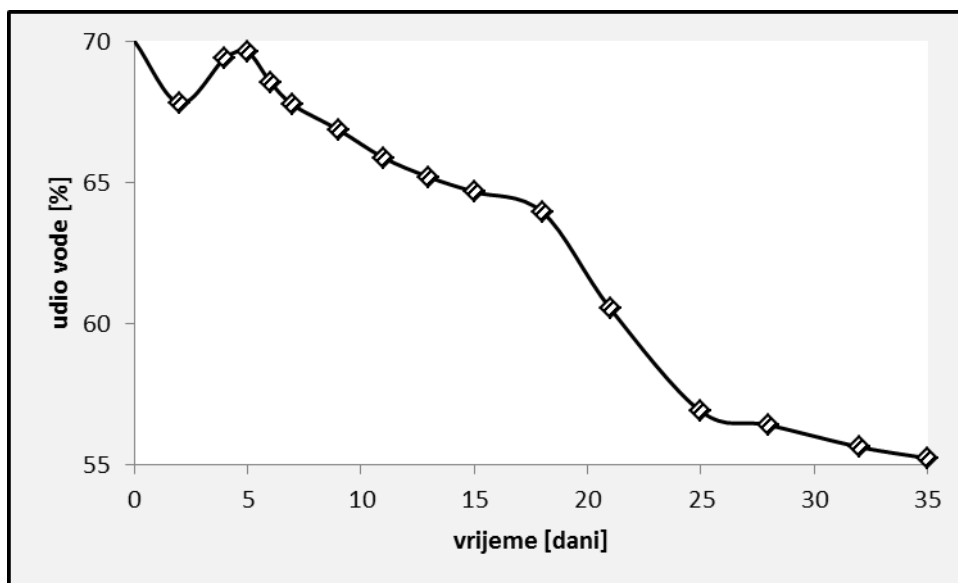
Slika 11. Celulolitička aktivnost i koncentracija proteina tijekom uzgoja na podlozi F

Analizirajući krivulju rasta (slika 11), značajnije povećanje celulolitičke aktivnosti uočene su nakon 9., 18. i 25. dana SSF uzgoja. Najveća celulolitička aktivnost zabilježena je u 28. danu i iznosila je 0,1228 IU. Tijekom šaržnog SSF uzgoja u tikvicama s podlogom F određivala se koncentracija ekstracelularnih proteina u supernatantu. U prvih 9 dana inkubacije aktivnost enzima je bila neznatna, iznosila je svega nekoliko 0,02 IU, dok se koncentracija proteina nakon 7. dana uzgoja značajno povećala. Za razliku od 2. dana uzgoja gdje je koncentracija proteina iznosila 0,598 mg mL⁻¹, nakon 6. dana uzgoja njena vrijednost je porasla na 0,835 mg mL⁻¹. Uzimajući u obzir vrijednosti aktivnosti celulolitičkih enzima i koncentracije proteina te slike mikroskopskih slika preparata plijesni (slika 12a), lag faza rasta (adaptacija stanica na novonastale uvjete) plijesni ove vrste trajala je duže nego očekivano, nakon čega je započeo lagani rast. Od samih početaka uzgoja do 11. dana, aktivnost enzima povećala se za svega 0,03 IU. Izrazita stagnacija aktivnosti enzima uočena je u razdoblju između 11. i 18. dana uzgoja. To može biti posljedica promjene temperature tijekom uzgoja.

Naime, tijekom tog vremenskog razdoblja, temperatura inkubacije je varirala, povećavajući se dostizala je temperaturne vrijednosti veće od 30 °C.



Slika 12. Mikroskopski prikaz rasta plijesni *T. reesei* kod SSF tehnike uzgoja: (a) klamidospore plijesni uočene u prvim danima uzgoja; (b) umrežavanje hifa te nastanak micelija; (c) fialide na vrhovima konidiofora (široke u sredini i sužene u osnovi i na kraju); (d) gusto isprepletene hife (micelij), snimljeno u posljednjim danima uzgoja



Slika 13. Promjena udjela vode u podlozi tijekom SSF uzgoja plijesni

Između 11. i 28. dana uzgoja izmjeren je stalan porast celulolitičke aktivnosti. Mikroskopske slike nativnog preparata plijesni (slike 12b i 12c) prikazuju formirani micelij. Nakon 18. dana uzgoja porast aktivnosti enzima je bio značajniji te se mogu uočiti sličnosti u obliku krivulja koncentracije proteina i aktivnosti enzima. Porast aktivnosti celulaza paralelno raste s koncentracijom proteina. Naime, indicija promjene vode, odnosno vlage u tikvicama može ukazati na dobivene rezultate (slika 13). Vaganjem tikvica prije sterilizacije i nakon uzgoja uočen je lagani pad mase tikvica tokom uzgoja istovremeno s rastom enzimske aktivnosti. Rast celulolitičke aktivnosti može se pripisati akumulaciji biomase plijesni koja unatoč smanjenoj vlažnosti podloge proizvodi značajne količine ukupnih proteina uključujući celulaze. Najveća celulolitička aktivnost i koncentracija proteina ($0,837 \text{ mg mL}^{-1}$) izmjerena je u 28. danu uzgoja, nakon čega obje vrijednosti padaju što je posljedica djelovanja proteolitičkih enzima koje sintetizira plijesan. Plijesan na podlozi F u 31. danu SSF uzgoja pokazuje jednaku celulolitičku aktivnost kao i u prvotnom 31. danu uzgoja (poglavlje 4.1.1.). Na slici 11 vidljivo je da je ta vrijednost $0,065 \pm 1 \text{ \% IU}$.

Podloga F se pokazala najpogodnijom za SSF uzgoj plijesni *T. reesei* u optimalnom trajanju uzgoja od 28 dana. Maksimalna izmjerena celulolitička aktivnost iznosila je 0,1228 IU, odnosno 6,2845 IU/g glukana.

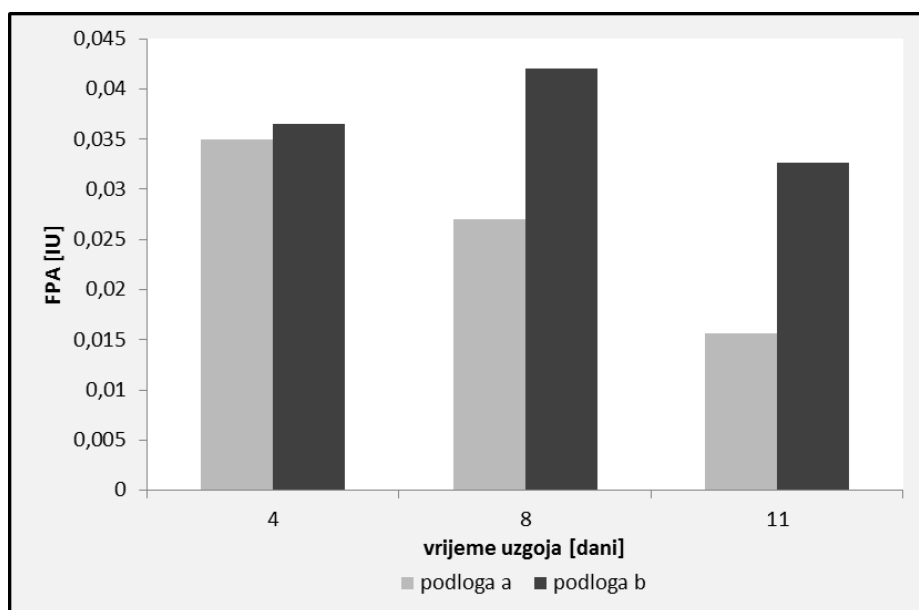
4.2. SmF uzgoj plijesni *T. reesei* i proizvodnja celulolitičkih enzima u tikvicama

SmF tehnikom je provedena optimizacija sastava polučvrstih hranjivih podloga za šaržni uzgoj plijesni *T. reesei*. Cilj je bio istražiti koja je od 7 hranjivih podloga najpogodnija

za proizvodnju celulolitičkih enzima. Uzorci su izuzimani svakih 3 – 4 dana kako bi se odredilo optimalno vrijeme uzgoja za postizanje maksimalne celulolitičke aktivnosti. Kao izvor ugljika, za rast plijesni i proizvodnju celulolitičkih enzima korišten je kukuruzni oklasak. Kukuruznom oklasku dodavane su pšenične mekinje, otopine soli i otopina Tween 80. Na temelju dobivenih rezultata, odabrana je pogodna hranjiva podloga za uzgoj plijesni u laboratorijskom bioreaktoru.

4.2.1. Optimiranje sastava hranjivih podloga za SmF uzgoj plijesni u tikvicama

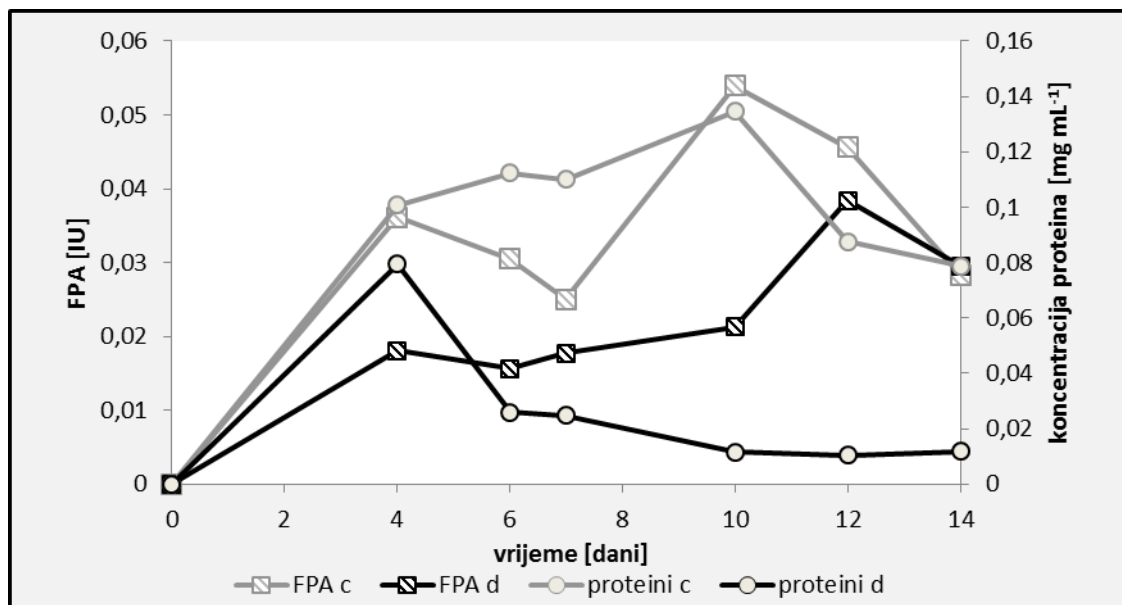
U prvotnom uzgoju, u trajanju od 11 dana, praćena je celulolitička aktivnost na dvjema polučvrstim podlogama čija je koncentracija suhe tvari iznosila 14 g L^{-1} . Veće vrijednosti celulolitičke aktivnosti izmjerene su tijekom uzgoja na podlozi b, koja je za razliku od podloge a sadržavala pšenične mekinje (30 % suhe tvari). Pšenične mekinje su se i u SmF uzgoju pokazale kao dobar kosupstrat. Najveća celulolitička aktivnost uočena je 8. dana inkubacije kod podloge b ($0,0419 \text{ IU}$) (slika 14), nakon čega aktivnost opada. Podloga a pokazuje stalnu tendenciju pada celulolitičke aktivnosti, uz maksimalnu celulolitičku aktivnost u 4. danu.



Slika 14. Celulolitička aktivnost tijekom uzgoja na hranjivim podlogama a i b

Nadalje, u idućem eksperimentu korištene su hranjive podloge s neobrađenim kukuruznim oklaskom kao izvorom ugljika (slika 15). Koncentracija suhe tvari bila je veća i iznosila je 20 g L^{-1} . Podloga c pokazala je veće vrijednosti celulolitičke aktivnosti od podloge d i to kroz cijelo vremensko razdoblje uzgoja od 14 dana. Vrijeme uzgoja bilo je produženo zbog izmjene tendencije rasta celulolitičke aktivnosti. Naime, najveća zabilježena aktivnost iznosila

je 0,0539 IU u 10. danu uzgoja na podlozi c. Aktivnost celulaza uzgojem plijesni na podlozi d doseže svoju maksimalnu celulolitičku aktivnost tek 12. dana uzgoja i to svega 0,0384 IU. Razlike između maksimalnih celulolitičkih aktivnosti primjenom ovih podloga iznose 0,0155 IU, dok je razlika maksimalnih aktivnosti između podloge a i b bila neznatna. U zadnjem danu uzgoja celulolitička aktivnost kod obiju podloga je bila jednaka, iznosila je $0,02 \pm 1 \%$ IU.



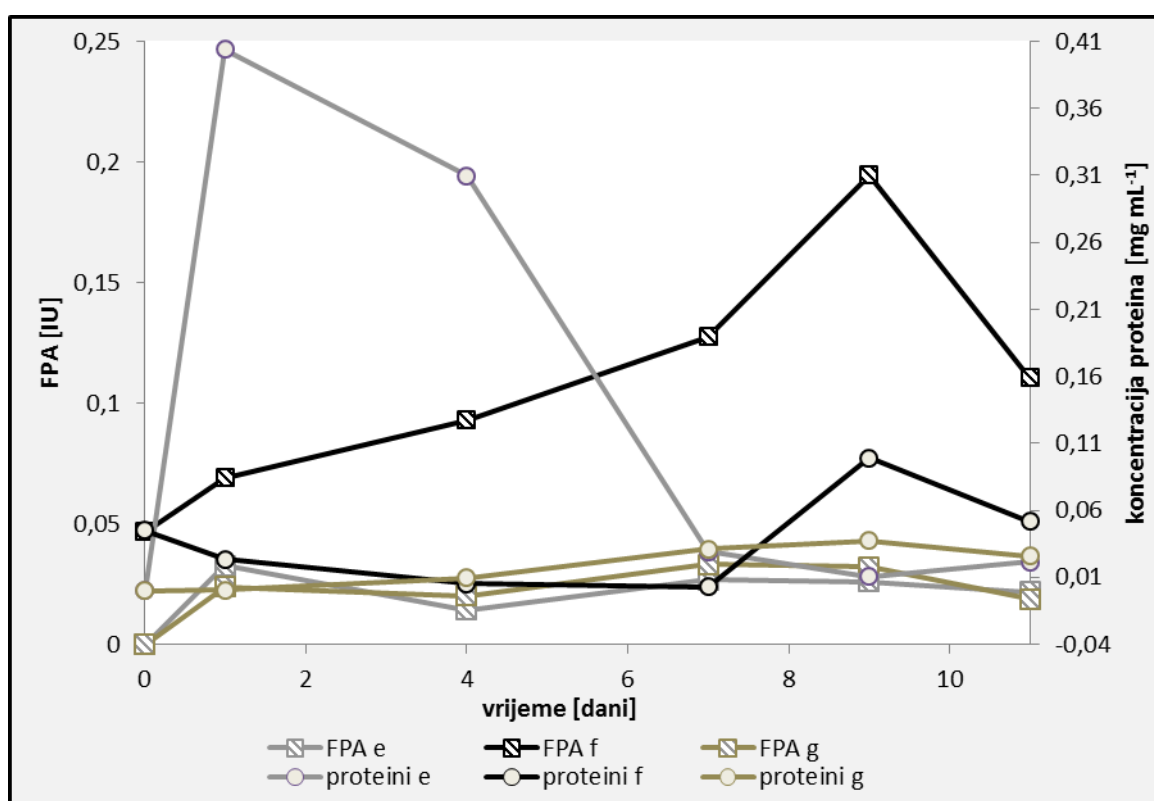
Slika 15. Celulolitička aktivnost i koncentracija proteina tijekom uzgoja na podlogama c i d

Tekući sastav hranjive podloge d činila je otopina Tween 80. Tween 80 je neionski, površinski aktivni spoj. Djelovanjem na staničnu stijenku povećava celulolitičku aktivnost u podlozi uslijed olakšanog otpuštanja celulolitičkih enzima s površine periplazmatske membrane u hranjivu podlogu (Kamande i sur., 2000). Unatoč toj činjenici, brzina proizvodnje celulolitičkih enzima nije bila veća u odnosu na podlogu c koja nije sadržavala otopinu Tween 80. No, promatrajući krivulju rasta celulolitičke aktivnosti u pokusu s podlogom d (slika 15), uočava se da je dodatak otopine Tween 80 imao za posljedicu skoro nepromjenjivu aktivnost celulolitičkih enzima od oko 0,018 IU kroz 6 dana.

Prema literaturnim izvorima dodatak otopine Tween 80 povećava sekreciju izvanstaničnih proteina (Park i sur, 1992; Helle i sur., 1993). Vrijednosti koncentracija proteina se na grafičkom prikazu (slika 15) znatno razlikuju. Naime, koncentracije izvanstaničnih proteina primjenom podloge d opadaju nakon 4. dana uzgoja plijesni i postižu svoj minimum od oko 0,011 mg mL⁻¹ u 10. danu uzgoja. Uspoređujući s podlogom c, u 10. danu postignuta je maksimalna koncentracija proteina od 0,135 mg mL⁻¹ nakon čega se ona smanjivala. Za

napomenuti je da je upravo u tom danu zabilježena i maksimalna celulolitička aktivnost. Minimalna koncentracija proteina prilikom proizvodnje plijesni na podlozi c, u posljednjem danu uzgoja, odgovara maksimalnoj vrijednosti ($0,08 \text{ mg mL}^{-1}$).

Naime, razlog bržeg rasta plijesni i veće proizvodnje celulolitičkih enzima primjenom podloge c može se objasniti činjenicom da je ta podloga u svom sastavu sadržavala 30 % pšeničnih mekinja, za razliku od podloge d u koju je dodan samo neobrađeni kukuruzni oklasak. Kao i u SSF slučaju, tako su se i kod SmF tehnike uzgoja pšenične mekinje pokazale boljim izvorom dušika potrebnog za rast, razvoj i održavanje staničnih funkcija plijesni *T. reesei* nego otopina soli što se odrazilo i na vrijednost celulolitičke aktivnosti.



Slika 16. Celulolitička aktivnost i koncentracija proteina tijekom uzgoja na podlogama e, f i g

Eksperiment se nastavio analiziranjem aktivnosti enzima i koncentracije proteina na podlogama e, f i g s koncentracijom suhe tvari od 30 g L^{-1} u trajanju od 11 dana. U sve tri podloge je bila sadržana otopina Tween 80 i pšenične mekinje (30 %). Podlogu e činio je neobrađen, a podlogu g predobrađen kukuruzni oklasak. U podlogu f dodane su liofilizirane celulaze iz *T. reesei*. Analizirajući graf na slici 14 vidljivo je da je celulolitička aktivnost na podlogama e i g imala malu vrijednost te nije vidljiv značajniji porast aktivnosti tijekom uzgoja. Također, maksimalne vrijednosti celulolitičke aktivnosti, uspoređujući podloge e i g,

poprimale su jednake vrijednosti i to oko 0,033 IU. No, podloga koja je sadržavala neobrađen kukuruzni oklasak (podloga g) tu je maksimalnu aktivnost postigla već u 1. danu uzgoja.

Koncentracija kukuruznog oklasaka je na početku uzgoja (30 g L^{-1}) u podlogama e i g bila veća nego u prethodnim podlogama a, b, c i d (14 i 20 g L^{-1}). Međutim, značajnije povećanje celulolitičke aktivnosti zbog povećanja koncentracije izvora ugljika nisu zabilježene. Također, ni inokulacija podloga s uzgojenim micelijem, umjesto sporama plijesni *T. reesei*, nije povećao vrijednosti celulolitičkih enzima.

Najveće vrijednosti aktivnosti celulaza tijekom cijelog uzgoja, dobivene su uzgojem plijesni na podlozi f. Naime, u tu podlogu dodane su celulaze iz *T. reesei* ($0,05 \text{ g L}^{-1}$) u samom početku uzgoja u svrhu indukcije proizvodnje celulaza produktima razgradnje celuloze. Na početku uzgoja, celulolitička aktivnost iznosila je 0,047 IU. Aktivnost se postepeno povećavala sve do 9. dana uzgoja gdje je iznosila visokih 0,194 IU. Podloga f je u kratkom vremenskom periodu postigla znatno veće vrijednosti celulolitičke aktivnosti od svih prethodno primijenjenih podloga. Ovakvi rezultati bili su očekivajući. Dodatkom celulaza smanjilo se vrijeme potrebno za induciranje proizvodnje celulaza. U 2. danu uzgoja, vrijednost celulolitičke aktivnosti duplo je viša od postignutih maksimalnih vrijednosti kod podloga e i g. Ovo znatno povećanje aktivnosti zbog dodatka celulaza na početku uzgoja, ekonomski je opravdano i može se kompenzirati kasnijom izolacijom i pročišćavanjem celulolitičkih enzima te ponovnom reciklacijom u svrhu postizanja veće produktivnosti bioprocesa.

Podloga f se pokazala najpogodnijom za SmF uzgoj plijesni *T. reesei* u optimalnom trajanju uzgoja od 9 dana gdje je maksimalna celulolitička aktivnost iznosila 0,194 IU, odnosno 5,3710 IU/g glukana. Usporedimo li SmF uzgoj sa SSF uzgojem plijesni *T. reesei*, veću celulolitičku aktivnost od 6,2845 IU/g glukana postiže se SSF uzgojem što je za 14,5 % veća vrijednost od postignute maksimalne celulolitičke aktivnosti prilikom SmF uzgoja. Međutim, ona se postiže tek u 28. danu uzgoja za razliku od optimalnih 9 dana Smf uzgoja plijesni. U 9. danu SSF uzgoja celulolitička aktivnost (1,2436 IU/g glukana) iznosila je 23,15 % celulolitičke aktivnosti postignute u istom danu SmF uzgojem što čini SmF uzgoj efikasnijim za proizvodnju celulolitičkih enzima s *T. reesei*.

4.2.2. SmF uzgoj plijesni u laboratorijskom bioreaktoru

Proveden je šaržni uzgoj plijesni *T. reesei* u laboratorijskom bioreaktoru tijekom 5 dana. Podlogu su činili alkalno predobrađen kukuruzni oklasak (70 %) kao izvor ugljika i pšenične mekinje (30 %) kao izvor dušika, repičino ulje i otopina Tween 80 uz dodane liofilizirane

celulaze iz *T. reesei* u cilju sinteze produkata hidrolize celuloze. U tablici 13 prikazani su dobiveni rezultati eksperimenta. Maksimalnu koncentraciju aktivnosti celulaza, 0,07245 IU, bilježimo u 3. danu uzgoja nakon čega vrijednosti počinju lagano padati. Koncentracija izvanstaničnih proteina također bilježi svoju maksimalnu vrijednost u 3. danu uzgoja i iznosi 0,1849 mg mL⁻¹. Padom koncentracije proteina paralelno pada celulolitička aktivnost. U posljednjem danu uzgoja (5. dan), koncentracija proteina svela se na 0,0055 mg mL⁻¹, što čini tek 3 % početne vrijednosti proteina. Značajno niža vrijednost aktivnosti enzima u bioreaktoru, u odnosu na pokus u tikvicama, može biti posljedica značajno većih sila smicanja koje negativno utječu na rast micelija plijesni.

Tablica 13. Ukupna celulolitička aktivnost i koncentracija proteina tijekom uzgoja u bioreaktoru

vrijeme [dani]	FPA [IU]	koncentracija proteina [mg mL⁻¹]
3	0,0725	0,1849
4	0,0570	0,1629
5	0,0526	0,0055

Iako je prije i tijekom uzgoja dodavano sredstvo protiv pjenjenja, intenzivno pjenjenje podloge uzrokovalo je začepljenje izlaznog filtera za zrak što je uzrokovalo porast tlaka u bioreaktoru. Zbog smanjenog dotoka zraka, rast plijesni je bio usporen. Zbog navedenih tehničkih problema, uzgoj je ranije završen unatoč prethodno planiranom vođenju uzgoja uz prihranu supstratom. Za usporedbu, Novy i njezini suradnici su 2015. godine koristili isti QM 9414 soj *T. reesei* za proizvodnju celulolitičkih enzima na predobrađenoj pšeničnoj slami kao izvoru ugljika. Njihove vrijednosti celulolitičke aktivnosti bile su znatno veće, u 7. danu uzgoja postigli su aktivnost celulaza od $1,7 \pm 0,1$ FPU/ml.

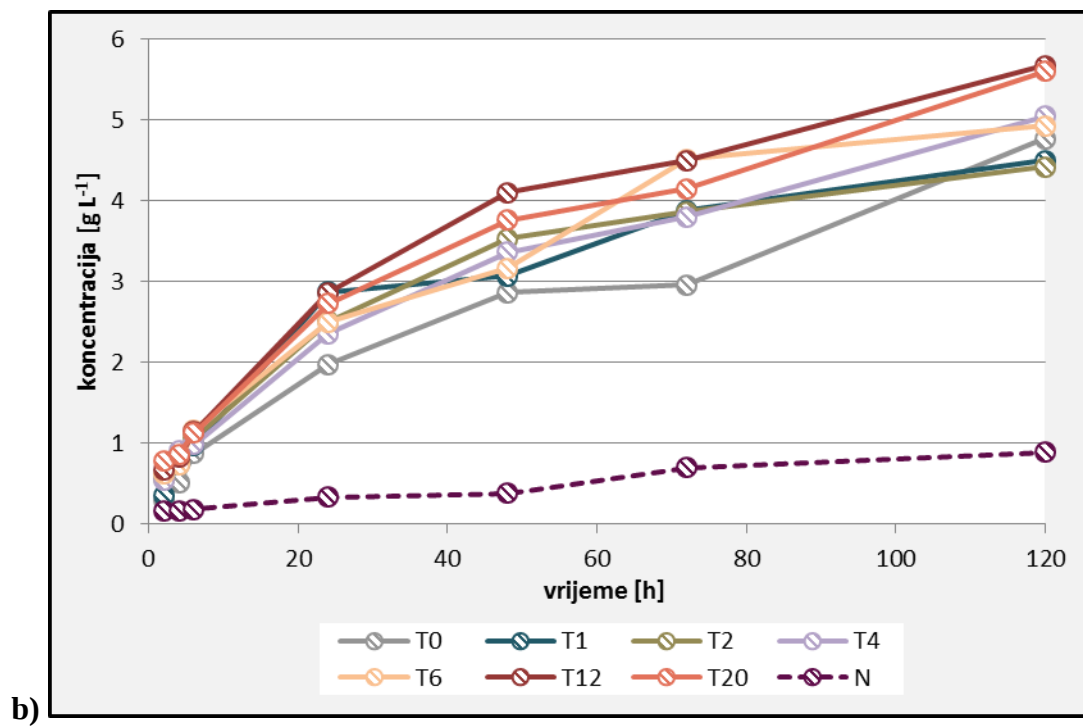
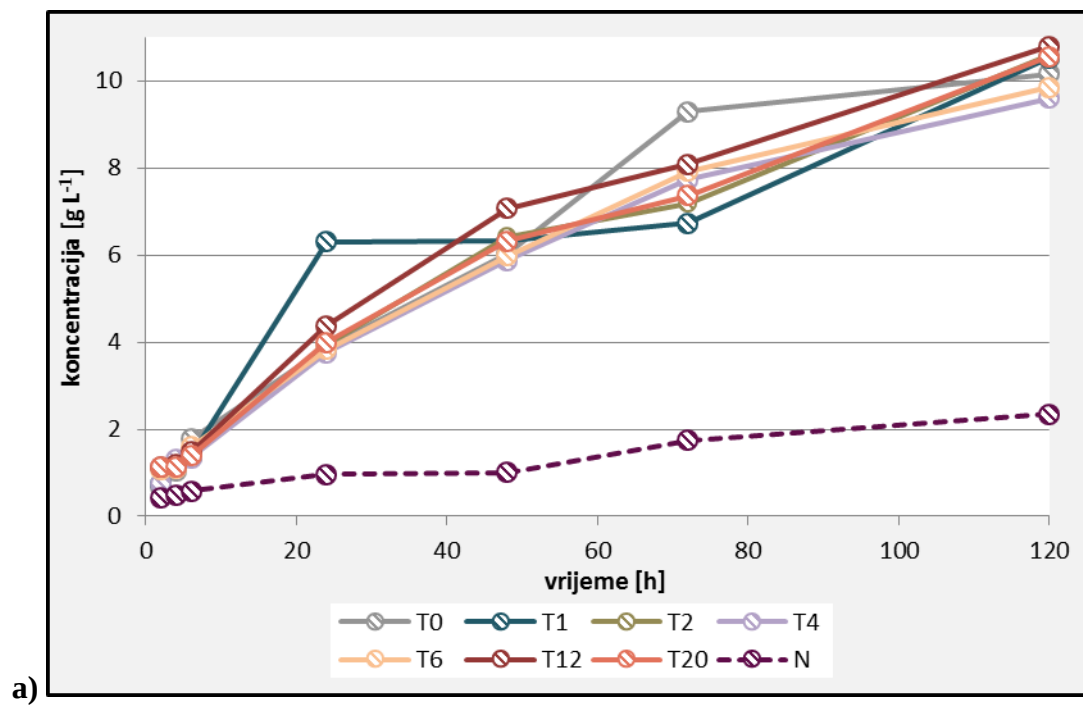
Vrlo mala celulolitička aktivnost postignuta u navedenim podlogama, posljedica je vrlo slabog rasta plijesni. U daljnjem eksperimentu potrebno je odrediti β -glukozidaznu aktivnost enzima odgovornog za hidrolizu celobioze do glukoze. Naime, provedenim istraživanjima učinka sastava podloge i tehnike uzgoja (SSF i SmF) na biosintezu celulaza na kukuruznom oklasku kao izvoru ugljika, nedovoljno visoka β -glukozidazna aktivnost enzimskog preparata ima za posljedicu inhibiciju celulolitičkih enzima celobiozom. Zbog toga je potrebno dodati β -glukozidazu enzimskom preparatu. Također, koriste se genetički modificirani sojevi

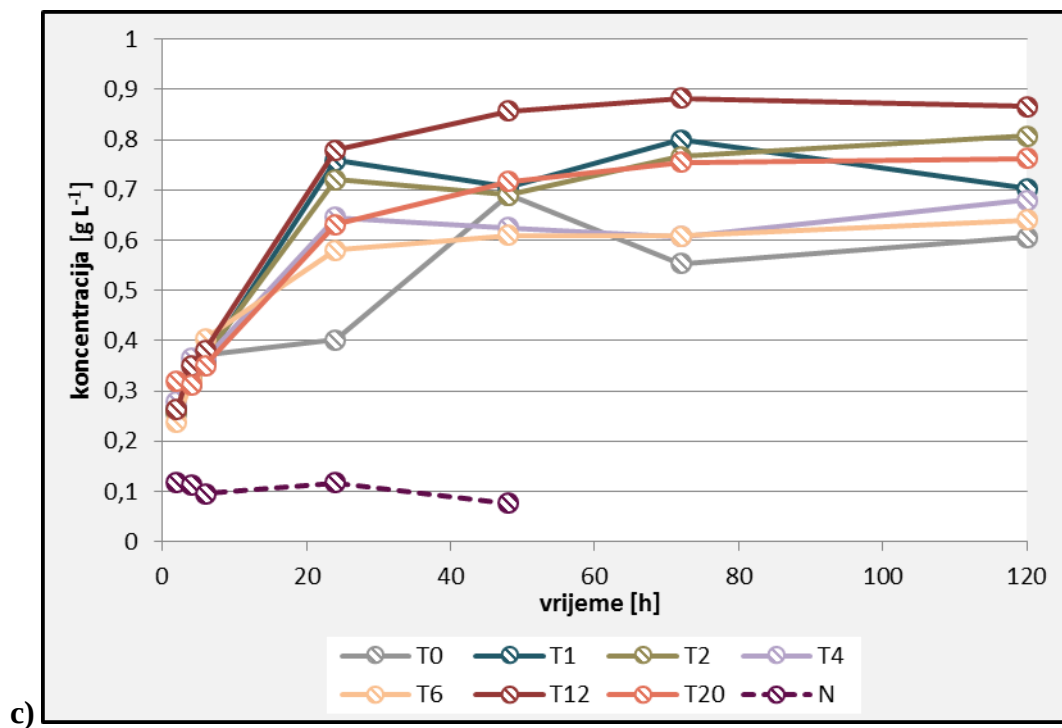
mikroorganizama koji imaju optimalan omjer egzo- i endoglukanazne aktivnosti u odnosu na β -glukozidaznu aktivnost što se postiže heterolognom ekspresijom gena za ovaj enzim u proizvodnim sojevima.

4.3. Optimiranje procesa enzimske hidrolize kukuruznog oklaska

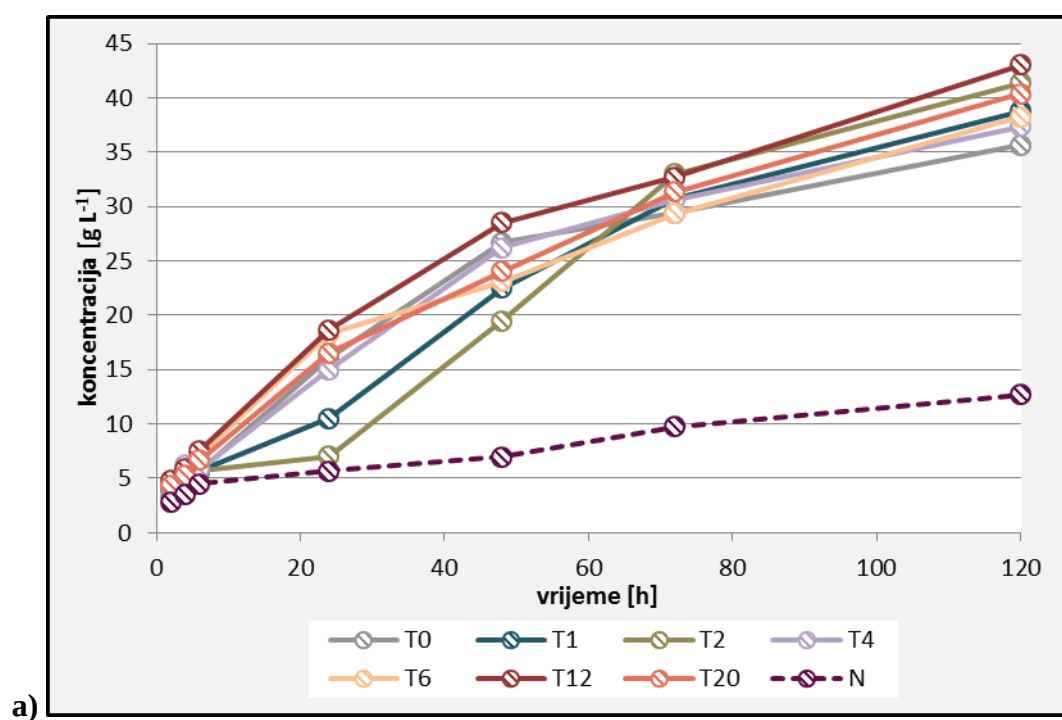
U nastavku ovog rada istražen je učinak Tweena 80 na učinkovitost enzimske hidrolize, odnosno na prirast jednostavnijih šećera: glukoza, ksiloza i celobioza. Enzimska hidroliza provedena je uz dvije početne koncentracije izvora ugljika: 10 g L^{-1} glukana i 100 g L^{-1} sveukupne suhe tvari podloge. Kao supstrat korišten je predobrađen kukuruzni oklasak te je u svaku podlogu dodan citratni pufer. Kao kontrola provedena je enzimska hidroliza neobrađenog kukuruznog oklaska i obrađenog kukuruznog oklaska bez dodatka otopine Tweena 80. Eksperiment uz manju koncentraciju supstrata provodi se da bi se utvrdila učinkovitost enzimske hidrolize glukana. U eksperimentu s 10 g L^{-1} glukana izbjegnuto je učinak inhibicije celulaza s produktima hidrolize, te se može utvrditi ukupan doseg enzimske hidrolize u određenim uvjetima. Naime, koncentracija produkta hidrolize uz početnu koncentraciju glukana od 10 g L^{-1} , dovoljno je mala da ne inhibira celuloze. Kod hidrolize s većom početnom koncentracijom supstrata postiže se veća koncentracija produkata što je važno prilikom proizvodnje biogoriva. Veće koncentracije šećera daju pozitivan učinak na produktivnost bioprocasa, ali i na proces izdvajanja krajnjeg proizvoda (npr. bioetanol) te smanjuju troškove proizvodnje biogoriva. No, problem predstavlja inhibicija celulaza do koje dolazi zbog velikih koncentracija šećera. Rješenje tog problema je integracija dvaju bioprocasa. Istovremenom enzimskom hidrolizom i mikrobnom fermentacijom inhibicija je zanemariva zbog niskih koncentracija fermentabilnih šećera koji se troše za rast i biosintezu proizvoda.

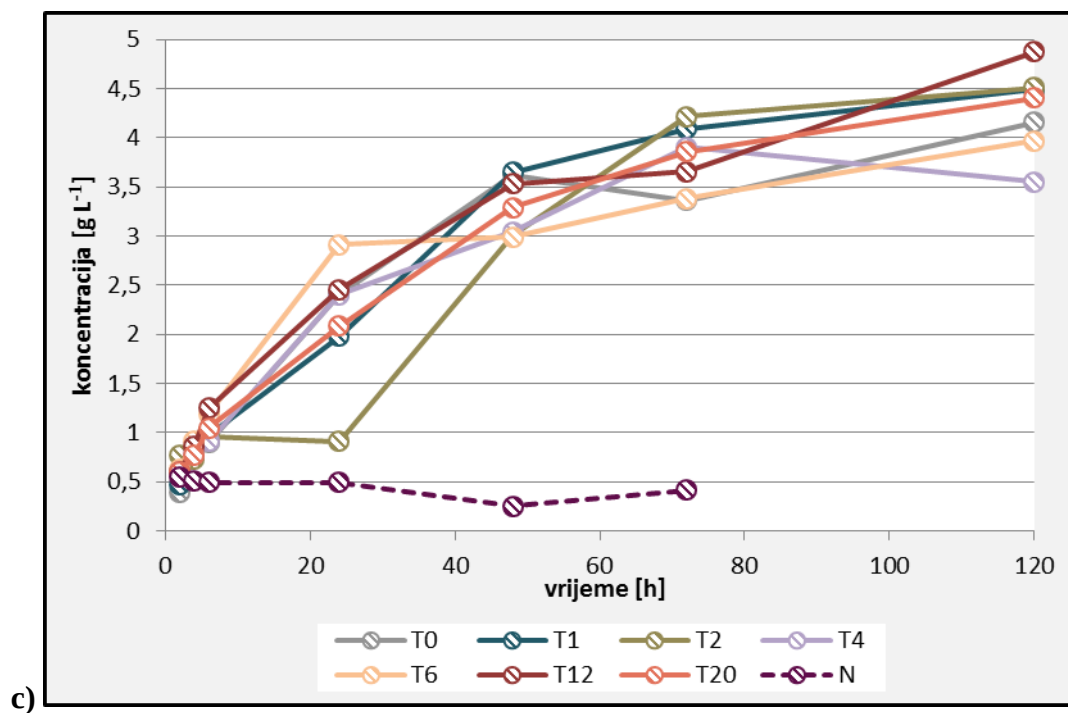
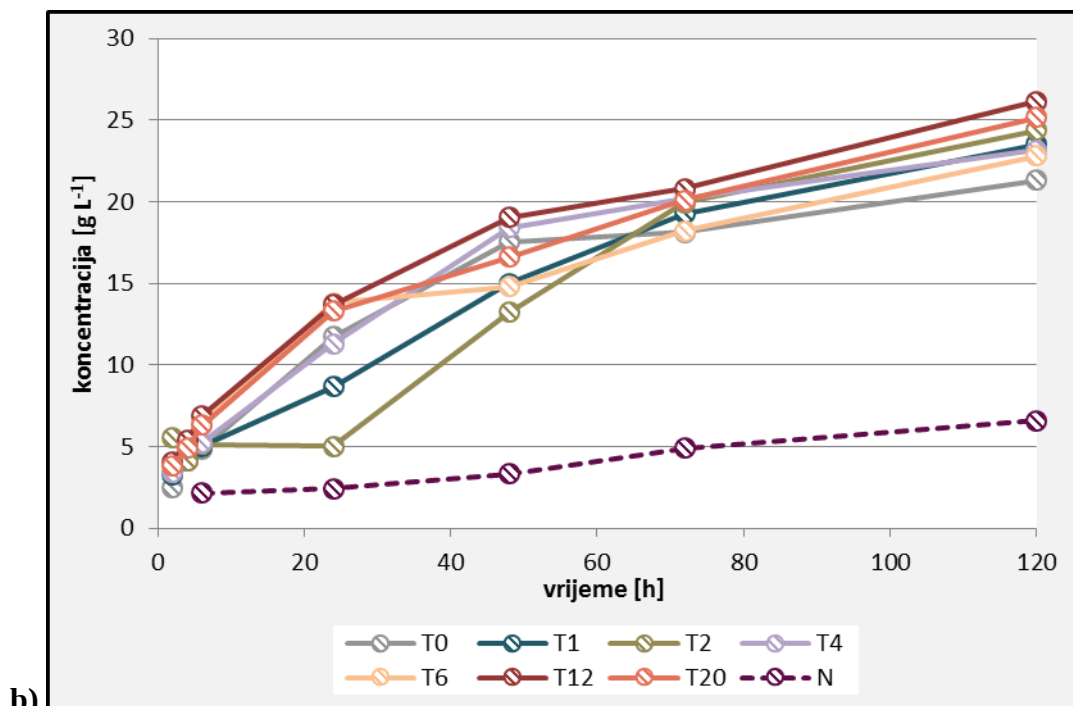
U daljnjem tekstu dani su grafički prikazi dobivenih rezultata. Također, prikazane su dobivene vrijednosti određivanih koncentracija proteina nakon enzimske hidrolize te je izvedena SDS-PAGE elektroforeza u svrhu razdvajanja proteina.





Slika 17. Utjecaj Tweena 80 na kinetiku hidrolize predobrađenog kukuruznog oklaska, $\gamma = 10 \text{ g L}^{-1}$ supstrata (glukan): (a) glukoza; (b) ksiloza; (c) celobioza; (T0-20 = uzorak s 0-20 g L^{-1} Tweena 80; N = uzorak s neobrađenim kukuruznim oklaskom bez dodatka Tweena 80)





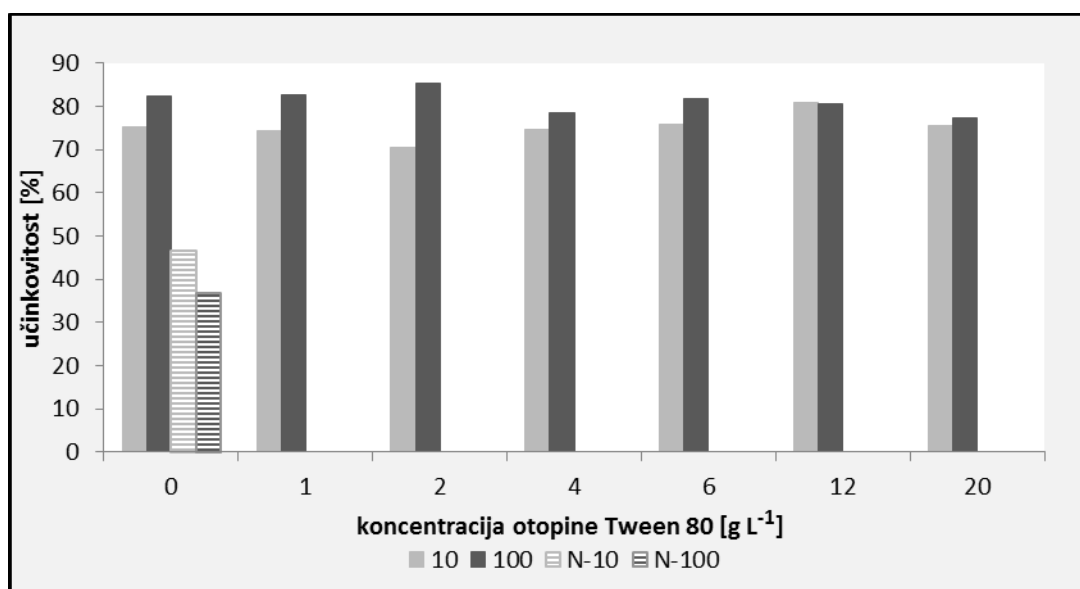
Slika 18. Utjecaj Tweena 80 na kinetiku hidrolize predobrađenog kukuruznog oklaska, $\gamma = 100 \text{ g L}^{-1}$ supstrata (glukan): (a) glukoza; (b) ksiloza; (c) celobioza; (T0-20 = uzorak s 0-20 g L^{-1} Tweena 80; N = uzorak s neobrađenim kukuruznim oklaskom bez dodatka Tweena 80)

Koncentracije Tweena 80 iznosile su 1, 2, 4, 6, 12 i 20 g L⁻¹. Prema očekivanom, vidljiv je pozitivan učinak Tweena 80 na brzinu hidrolize glukana i ksilana, te na prinos fermentabilnih šećera kod obje koncentracije supstrata. Također, podloge različitih početnih koncentracija izvora ugljika tretirane su s dva različita enzimski preparata. U podlogu s 10 g L⁻¹ dodan je Celluclast 1.5L, a u 100 g L⁻¹ supstrata enzimski koktel (CV) koji je sadržavao Celluclast 1.5L i Viscozyme L. Maksimalne koncentracije glukoze od 10,8 g L⁻¹, ksiloze 5,7 g L⁻¹ i celobioze 0,9 g L⁻¹ postignute su dodatkom 12 g L⁻¹ Tweena 80 u podlogu s početnom koncentracijom 10 g L⁻¹ glukana (slika 17 a-c). Stupanj hidrolize glukana do glukoze uz dodatak 12 g L⁻¹ Tweena 80, iznosio je 98,2 % što je za 16,4 % veće u odnosu na enzimsku reakciju bez dodatka Tweena 80. Stupanj hidrolize ksilana u istim uvjetima iznosio je 84,38 %, dok je u enzimskoj reakciji bez dodatka Tweena 80 bio 71,06 %. Enzimskom hidrolizom kukuruznog oklaska na podlozi s početnom koncentracijom suhe tvari od 100 g L⁻¹ i dodatkom 12 g L⁻¹ Tweena 80, maksimalne koncentracije iznose: glukoza 43,1 g L⁻¹, ksiloza 26,2 g L⁻¹ te celobioza 0,9 g L⁻¹ (slika 18 a-c). Stupanj hidrolize glukana uz dodatak Tweena 80 iznosila je 81,6 %, dok je stupanj hidrolize ksilana iznosio 70,62 %. Dodatak 12 g L⁻¹ Tweena 80 povećao je stupanj hidrolize glukana za 12,8, a ksilana za 14,01 %.

Naime, stupanj hidrolize glukana dodatkom 12 g L⁻¹ Tweena 80, u podlogu manje koncentracije supstrata, povećao se za visokih 107 % dok se dodatkom Tweena 80 iste koncentracije u podlogu s većom koncentracijom supstrata, stupanj hidrolize glukana povećao tek za 14 %. Tween 80 je pokazao jednaki učinak i na hidrolizu ksilana do ksiloze. Dodatkom 12 g L⁻¹ Tweena 80, stupanj hidrolize ksilana u podlozi s 10 g L⁻¹ supstrata veći je za 25 % u odnosu na stupanj hidrolize ksilana bez dodanog Tweena 80. U podlozi s početnih 100 g L⁻¹ supstrata ta je razlika manja i iznosi 13 %.

Brojni su eksperimenti bazirani na učinku Tweena 80 na odvijanje brzine enzimске hidrolize predobrađenih lignoceluloznih sirovina (Li i sur., 2016; Zheng i sur., 2014). Kod većine procesa predobrade lignocelulozne sirovine, pa tako i alkalnom obradom, zaostaje određen postotak lignina. Tween 80 se pokazao učinkovitim surfaktantom, koji se veže na hidrofobnu površinu lignina i sprječava ireverzibilnu adsorpciju celulaza čime se omogućuje neometano odvijanje enzimске hidrolize (Park i sur., 1992). Vrijednosti koncentracija šećera dobivene enzimskom hidrolizom neobrađenog kukuruznog oklaska i bez dodatka Tweena 80, kod obje početne koncentracije supstrata, znatno su niže u odnosu na vrijednosti gore spomenutih koncentracija. Vrijednosti koncentracije šećera dobivene enzimskom hidrolizom predobrađenog kukuruznog oklaska s dodatkom otopine Tween 80 veće su za više od 70 %

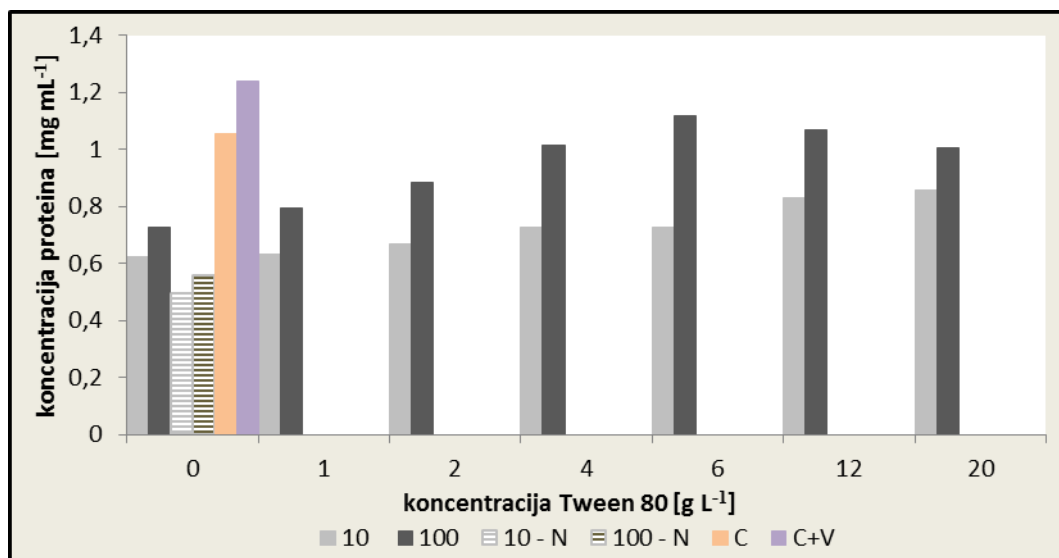
vrijednosti koncentracija šećera neobrađenog kukuruznog oklaska. Alkalno predobrađenom kukuruznom oklasku (1 g L^{-1} Tween 80) višestruko se povećava koncentracija fermentabilnih šećera u enzimskom hidrolizatu uz obje početne koncentracije supstrata (slika 17 i 18). Stupanj hidrolize glukana u neobrađenom kukuruznom oklasku iznosio je samo 25 %, a ksilana 11,7 % za 10 g L^{-1} glukana. Stupanj hidrolize glukana u neobrađenom kukuruznom oklasku uz 100 g L^{-1} suhe tvari biomase iznosio je 31,4 %, a ksilana tek 14,22 %.



Slika 19. Učinkovitost procesa enzimske hidrolize u ovisnosti o koncentraciji Tweena 80 (10 = 10 g L^{-1} glukana; 100 = 100 g L^{-1} sveukupne suhe tvari; N – 10 = 10 g L^{-1} glukana-neobrađen kukuruzni oklasak; N – 100 = 100 g L^{-1} sveukupne suhe tvari- neobrađen kukuruzni oklasak)

Također, rezultati prikazuju da dodatak Tween 80 povećava učinkovitost procesa enzimske hidrolize kukuruznog oklaska (slika 19). Nehidrolizirani kukuruzni oklasak sadrži lignin i zaostale strukturne ugljikohidrate. Međutim, vrijednosti su manje uspoređujući ih s dobivenim vrijednostima učinkovitosti hidrolize bez dodatka Tweena 80. Kod viših koncentracija suhe tvari od 100 g L^{-1} , najveća postignuta vrijednost učinkovitosti dodatkom 2 g L^{-1} Tweena 80 iznosila je 85 % što je samo za 3 % više od dobivene vrijednosti bez dodatka Tweena 80. Neznatno veća razlika postignuta je kod enzimske hidrolize s manjom početkom koncentracijom od 10 g L^{-1} glukana. 80 %-tna učinkovitost postignuta je s koncentracijom površinske aktivne tvari od 12 g L^{-1} , dok je učinkovitost hidrolize bez dodatka Tweena 80 iznosila 75 %.

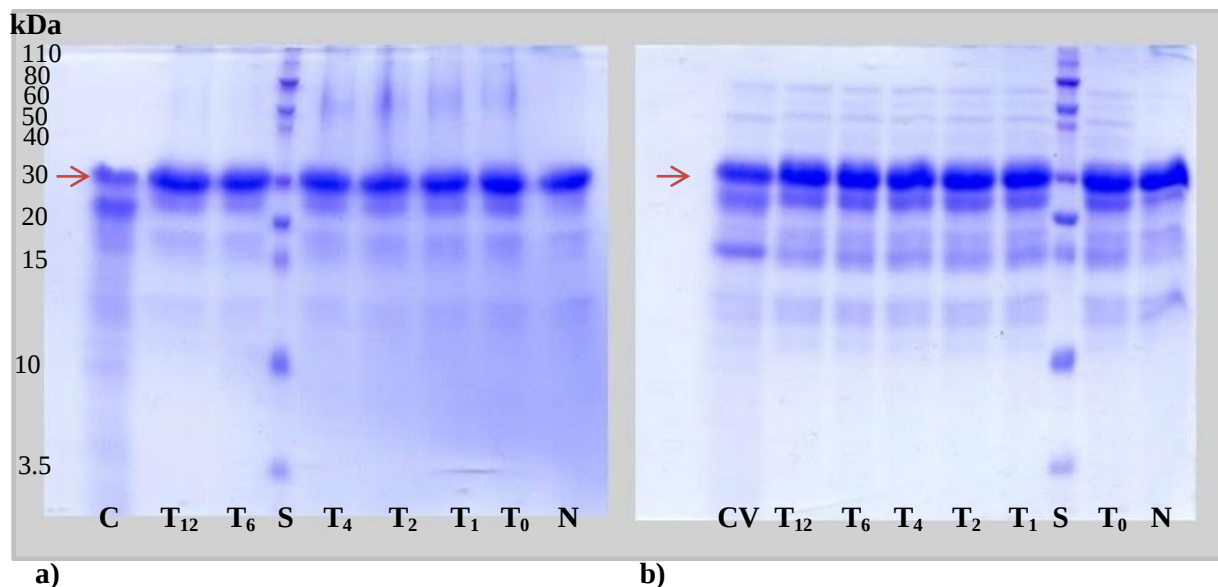
Nadalje, uzimajući u obzir rezultate procesa enzimске hidrolize s neobrađenim kukuruznim oklaskom, vidljive su značajne razlike u dobivenim rezultatima. Učinkovitost hidrolize na podlozi s većom koncentracijom suhe tvari veća je za oko 56 % u odnosu na podlogu s neobrađenim kukuruznim oklaskom. Također, značajni rast učinkovitosti od 43 % vidljiv je i kod koncentracije podloge od 10 g L^{-1} . Inhibicijski učinak lignina na enzimsku hidrolizu lignoceluloznih sirovina potvrđena je mnogim eksperimentima (Chernoglazov i sur., 1988; Nakagame i sur., 2011).



Slika 20. Ovisnost koncentracije proteina o koncentraciji Tweena 80 (10 = 10 g L^{-1} glukana; 100 = 100 g L^{-1} sveukupne suhe tvari; 10 – N = 10 g L^{-1} glukana – neobrađen kukuruzni oklasak; 100 – N = 100 g L^{-1} sveukupne suhe tvari – neobrađen kukuruzni oklasak; C = Celluclast 1.5L; C+V = Celluclast 1.5L + Viscozyme L)

Koncentracija proteina nakon 120 h enzimске hidrolize u podlozi s početnih 10 g L^{-1} supstrata lagano raste porastom koncentracije dodanog Tweena 80. S 20 g L^{-1} površinski aktivne tvari postiže se maksimalna koncentracija proteina koja iznosi $0,86 \text{ mg L}^{-1}$ (slika 20). Ta je vrijednost za 28 % veća od vrijednosti koncentracije proteina bez dodatka Tweena 80. Maksimalna postignuta koncentracija proteina nakon 120 h provedene enzimске hidrolize na podlozi s početnih 100 g L^{-1} suhe tvari postigla se dodatkom 6 g L^{-1} Tweena 80. Ta je vrijednost za 35 % veća od vrijednosti koncentracije proteina bez dodatka Tweena 80 u podlogu. U ovom eksperimentu, dodatak Tweena 80 povećao je koncentraciju enzima u suspenziji smanjujući udio adsorbiranih enzima. Razlog manje koncentracije desorbiranih proteina nakon enzimске hidrolize s neobrađenim kukuruznim oklaskom je adsorpcija enzima na hidrofobnu površinu što smanjuje koncentraciju enzima za hidrolizu lignocelulozne sirovine.

Dobiveni supernatant nakon centrifugiranja podloga sadrži vezane enzime koji se mogu koristiti u daljnjoj proizvodnji npr. mikrobnih lipida.



Slika 21. SDS-PAGE izdvojenih proteina iz uzoraka dobivenih nakon 120 sati enzimске hidrolize kukuruznog oklaska: **(a)** 10 g L^{-1} supstrata (glukan); **(b)** 100 g L^{-1} sveukupne suhe tvari; (T_0 = bez Tweena 80, $T_1 = 1 \text{ g L}^{-1}$, $T_2 = 2 \text{ g L}^{-1}$, $T_4 = 4 \text{ g L}^{-1}$, $T_6 = 6 \text{ g L}^{-1}$; $T_{12} = 12 \text{ g L}^{-1}$ Tweena 80; N = neobrađen kukuruzni oklasak bez dodatka Tweena 80; C = Celluclast 1.5 L; CV = enzimski preparati Celluclast 1.5 L i Viscozyme L; S = proteinski standard)

SDS-PAGE elektroforezom izdvojeni su proteini iz supernatanta nakon 120 h enzimске hidrolize u podlozi s 10 g L^{-1} glukana i 100 g L^{-1} sveukupne suhe tvari. Slika 21 prikazuje rezultate analize. Postignut je sličan profil vrpca izdvojenih proteina u uzorcima, međutim intenzitet vrpca, tj. količina proteina je značajno manja za uzorak proteina u neobrađenom kukuruznom oklasku u odnosu na ostale. Proteini su ostali vezani na supstrat odnosno lignin čija količina iznosi oko 20 % u neobrađenom oklasku. Profil bendova i njihov intenzitet u skladu je s određenim koncentracijama proteina.

5. ZAKLJUČCI

Na osnovi ovog istraživanja može se zaključiti:

1. Uzgojem plijesni *Trichoderma reesei* na čvrstoj hranjivoj podlozi (SSF) s neobrađenim kukuruznim oklaskom (70 %), pšeničnim mekinjama (30 %) i Tweenom 80, postignuta je maksimalna celulolitička aktivnost od 0,1228 IU u optimalnom trajanju uzgoja od 28 dana.
2. Proizvodnjom celulolitičkih enzima s plijesni *T. reesei* na polučvrstoj hranjivoj podlozi (SmF) s predobrađenim kukuruznim oklaskom (70 %), pšeničnim mekinjama (30 %), Tweenom 80 i dodanim liofiliziranim celulazama u svrhu indukcije biosinteze celulaza, maksimalna celulolitička aktivnost iznosila je 0,194 IU. Optimalno vrijeme uzgoja za postizanje maksimalne celulolitičke aktivnosti iznosi 9 dana.
3. Veća celulolitička aktivnost od 6,2845 IU/g glukana postigla se SSF uzgojem plijesni što je za 14,5 % veća vrijednost od postignute maksimalne celulolitičke aktivnosti prilikom SmF uzgoja. Vrijeme uzgoja potrebno za postizanje maksimalne celulolitičke aktivnosti SSF uzgojem bilo je 28 dana, za razliku od Smf uzgoja plijesni kod kojeg je iznosio 9 dana. SmF uzgoj pokazao se učinkovitijim u proizvodnji celulolitičkih enzima s *T. reesei*, u 9. danu uzgoja celulolitička aktivnost iznosila je 5,3719 g/g glukana što je 4,3 puta veća vrijednost nego u SSF procesu.
4. Dodatak Tweena 80 povećao je stupanj enzimske hidrolize strukturnih ugljikohidrata predobrađenog kukuruznog oklaska. Optimalna koncentracija Tweena 80 pri enzimskoj hidrolizi preobrađenog kukuruznog oklaska iznosila je 12 g L^{-1} kod obje početne koncentracije supstrata (10 g L^{-1} glukana i 100 g L^{-1} suhe tvari). Maksimalan stupanj hidrolize glukana i ksilana povećao se za 12 – 16 % ovisno o početnoj koncentraciji supstrata.
5. Alkalna predobrada kukuruznog oklaska značajno povećava stupanj hidrolize strukturnih ugljikohidrata.
6. Dodatak Tweena 80 smanjuje koncentraciju adsorbiranih celulolitičkih enzima na lignin u lignoceluloznoj sirovini.

.

6. LITERATURA

Anonymous 1 (2016) Determination of Sugar as Glucose, <www.ibric.org>. Pristupljeno 5. lipnja 2016.

Balaraju, K., Park, K., Jahagirdar, S., Kaviyarasan, V. (2010) Production of cellulase and laccase enzymes by *Oudemansiella radicata* using agro wastes under solid-state and submerged conditions, *Res. Biotech.* **1**, 21-28.

Balat, M. (2011) Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energ. Convers. Manag.* **52**, 858-875.

Balat, M., Balat, H., Cahide, O.Z. (2008) Progress in bioethanol processing, *Prog. Energ. Combust.* **34**, 551–573.

Bayer, E. A., Belaich, J. P., Shoham, Y., Lamed, R. (2004) The cellulosomes: multienzyme machines for degradation of plant cell wall polysaccharides, *Annu. Rev. Microbiol.* **58**, 521-554.

Benkun, Q., Risheng, Y., Ying, Y., Yuan, C. (2007) Influence of different ratios of rice straw to wheat bran on production of cellulolytic enzymes by *Trichoderma viride* ZY-01 in solid state ferme, *Bioresource Technol.* **63**, 157-181.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* **72**, 248–54.

Brethauer, S., Wyman, C. E. (2010) Review: Continuous Hydrolysis and Fermentation for Cellulosic Ethanol Production, *Bioresource Technol.* **101**, 4862–4874.

Broda K., D'Agostino N., Goré, R., Johnson, R., Reeves S. (1994) 3rd workshop on theorem proving with analytic tableaux and related methods, Imperial College London, Department of Computing, London, England.

Cardona, A. Sanchez, O. (2007) Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities, *Bioresource Technol.* **98**, 15–27.

Chernoglazov, V., Ermolova, O., Klyosov, A. (1988) Adsorption of high-purity endo-1,4-[beta]-glucanases from *Trichoderma reesei* on components of lignocellulosic materials: cellulose, lignin, and xylan, *Enzyme Microb. Tech.* **10**, 503–507.

- Demirbas, A. (2005) Bioethanol from cellulosic materials: a renewable motor fuel from biomass, *Energ. Source.* **27**, 327–337.
- Devendra, M., Dhananjay, S., Durgesh, P., Jitendra, P. M. (2012) Optimization of solid state fermentation conditions for the production of cellulose by *Trichoderma reesei*, *J. Environ. Biol.* **33**, 5–8.
- Drissen, R. E. T., Maas, R. H. W., Van Der Maarel, M. J. E. C., Kabel, M. A., Schols, H. A., Tramper, J., Beeftink, H. H. (2007) A generic model for glucose production from various cellulose sources by a commercial cellulose complex, *Biocatal. Biotransfor.* **25**, 419–429.
- Du, R., Su, R., Li, X., Tantai, X., Liu, Z., Yang, J., (2012) Controlled adsorption of cellulase onto pretreated corncob by pH adjustment, *Cellulose* **19**, 371–80.
- Dutta, S., Wu, K. C. W. (2014) Enzymatic breakdown of biomass: enzyme active sites, immobilization, and biofuel production, *Green Chem.* **16**, 4615-4626.
- Erdei, B., Galbe, M., Zacchi, G. (2013) Simultaneous saccharification and co-fermentation of whole wheat in integrated ethanol production, *Biomass Bioenerg.* **56**, 506–514.
- Gams, W., Bissett, J. (1998) Morphology and identification of *Trichoderma*. U: *Trichoderma and Gliocladium*, (Kubicek, C. P., and Harman, G. E., ured.) Taylor & Francis, London, str. 3–34.
- Haltrich, D., Nidetzky, B., Kulbe, K. D., Steiner, W., Zupaneic, S. (1996) Production of fungal xylanases, *Bioresource Techn.* **58**, 137-161.
- Helle, S. S., Duff, S. J., Cooper, B., Cooper, D. G. (1993) Effect of surfactants on cellulose hydrolysis, *Biotechnol. Bioeng.* **42**, 611-617.
- Ivetić, D. Ž, Antov, M. G. (2013) Bioetanol iz lignoceluloznih sirovina: obnovljivi izvori i enzimska tehnologija za održivu proizvodnju energije, *Zaštita materijala* **55**, 21–30.
- Jabasingh, S. A, Nachiyar, C. V. (2011) Utilization of pretreated bagasse for the sustainable bioproduction of cellulase by *Aspergillus nidulans* MTCC344 using response surface methodology, *Ind. Crop. Prod.* **34**, 1564–71.

- Juhász, T., Szengyel, Z., Réczey, K., Siika-Aho, M., Viikari, L. (2005) Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources, *Process Biochem.* **40**, 3519-3525.
- Kamande, G. M., Baah, K. J., Cheng, T. A., McAllistet, T., Shelford, J. A. (2000) Effects of Tween 60 and Tween 80 on protease activity, thiol group reactivity, protein absorption and cellulose degradation by rumen microbial enzymes, *J. Dairy Sci.* **83**, 536-542.
- Kindermann, J., El-Ayouti, Y., Samuels, G. J., Kubicek, C. P. (1998) Phylogeny of the genus *Trichoderma* based on sequence analysis of the internal transcribed spacer region 1 of the r DNA cluster, *Fungal Genet. Biol.* **24**, 298-309.
- Kleman-Leyer, K., Siika, M., Teeri, T., Kirk, K. (1996) The cellulases endoglucanase I and cellobiohydrolase II of *Trichoderma reesei* act synergistically to solubilize native cotton cellulose but not to decrease its molecular size, *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2883-2887.
- Kristensen, J. B. (2009) Enzymatic hydrolysis of lignocellulose. Substrate interactions and high solids loadings, Forest & Landscape Research, Frederiksberg.
- Kubicek, C. P., Eveleigh, D. E., Esterbauer, H., Steiner, W., Kubicek-Pranz, E. M. (1990) *Trichoderma* cellulases: biochemistry, physiology, genetics and applications, The Royal Society Chemistry, Cambridge.
- Kubicek, C. P., Penttilä, M. E. (1998) Regulation of production of plant polysaccharide degrading enzymes by *Trichoderma*. U: Enzymes, Biological Control and Commercial Applications, (Harman, G. E., Kubicek, C. P., ured.), Taylor and Francis, London, str. 49-71.
- Kullnig-Gradinger, C. M., Szakacs, G., Kubicek, C. P. (2002) Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multiple approach., *Mycol. Res.* **7**, 757-767.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4., *Nature* **227**, 680-685.
- Lee, C. K., Darah, I., Ibrahim, C. O. (2011) Production and Optimization of Cellulase Enzyme Using *Aspergillus niger* USM AI 1 and Comparison with *Trichoderma reesei* via Solid State Fermentation System, *Biotechnol. Res. Int.* **6**, 213-232.

- Lešić, T. (2014) Analiza ekstraktivnih tvari i lignina u bukovoj piljevini, pšeničnoj slami kukuruznim oklascima, Završni rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu
- Li, Y., Sun, Z., Ge, X., Zhang, J. (2016) Effects of lignin and surfactant on adsorption and hydrolysis of cellulases on cellulose, *Biotechnol. Biofuel.* **9**, 9-20.
- Limayem, A., Ricke, S. C. (2012) Lignocellulosic biomass for bioethanol production: current perspectives, potential issues and future prospects, *Prog. Energ. Combust.* **38**, 449–67.
- Liu, W. J., Jiang, H., Yu, H. Q. (2015) Thermochemical conversion of lignin to functional materials: a review and future directions, *Green Chem.* **17**, 4888.
- Lynd, L. R., Laser, M. S., Bransby, D., Dale, B. E., Davison, B., Hamilton, R., Himmel, M., Keller, M., McMillan, J. D., Sheehan, J., Wyman, C. E. (2008) How biotech can transform biofuels, *Nat. Biotechnol.* **26**, 169-72.
- Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H., Pretorius, I. S. (2002) Microbial cellulases utilization. Fundamentals and biotechnology, *Microbiol.* **33**, 506-577.
- Mandels, M., Andreotti, R., Roche, C. (1976) Measurement of saccharifying cellulase, *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **6**, 21-33.
- Martinez, D., Berka, R. M., Henrissat, B., Saloheimo, M., Baker, M. S. E., Chapman, J., Chertkov, O., Coutinho, P. M., Cullen, D., Danchin, E. G., Grigoriev, I. V., Harris, P., Jackson, M., Kubicek, C. P. (2008) Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jrcorina*), *Nat. Biotechnol.* **26**, 553-60.
- Merino, S. T., Cherry, J. (2007) Progress and Challenges in Enzyme Development for Biomass Utilization, *Adv. Biochem. Engin./Biotechnol.* **108**, 95–120.
- Meyer, A. S., Rosgaard, L., Sørensen, H. R. (2009) The minimal enzyme cocktail concept for biomass processing., *J. Cereal Sci.* **50**, 337-344.
- Miller, G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.* **31**, 426-428.

Mušak, L. (2014), Određivanje sastava lignoceluloznih hidrolizata pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti, Završni rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Nakagame, S., Chandra, R. P., Kadla, J. F., Saddler, J. N. (2011) Enhancing the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass by increasing the carboxylic acid content of the associated lignin, *Biotechnol. Bioeng.* **108**, 538–548.

Novy, V., Longus, K., Nidetzky, B. (2015) From wheat straw to bioethanol: integrative analysis of a separate hydrolysis and co-fermentation process with implemented enzyme production, *Biotechnol. Biofuel.* **8**, 30-46.

Pamment, N. C, Robinson, J. H., Moo-Young, M. (1978) Solid state cultivation of *Chaetomium cellulolyticum* on alkali pretreated sawdust, *Biotechnol. Bioeng.* **20**, 1735-1744.

Pandey, A. (2003) Solid-state fermentation, *Biochem. Eng. J.* **13**, 81–84.

Pandey, S., Shrivastava, M., Shahid, M., Kumar, V., Singh, A. (2015) *Trichoderma* species Cellulases Produced by Solid State Fermentation, *J. Data Mining Genomics Proteomics* **6**, 170.

Park, J.W., Takahata, Y., Kajiuchi, T., Akehata, T. (1992) Effects of nonionic surfactant on enzymatic hydrolysis of used newspaper, *Biotechnol. Bioeng.* **39**, 117–120.

Persoon, C. H. (1794) *Disposita methodica fungorum*, *Römer's Neu. Mag. Bot.* **1**, 81-128.

Rifai, M. A. (1969) A revision of the genus *Trichoderma*, *Mycol. Pap.* **116**, 1-116.

Rosgaard, L., Pedersen, S., Langston, J., Akerhielm, D., Cherry, J. R., Meyer, A. S. (2007) Evaluation of minimal *Trichoderma reesei* cellulase mixtures on differently pretreated barley straw substrates, *Biotechnol. Progr.* **23**, 1270- 1276.

Ryu, D. D. Y., Mandels, M. (1980) Cellulases biosynthesis and applications, *Enz. Microb. Technol.* **2**, 91-102.

Sanchez, O., Cardona, A. C. (2008) Trend in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks, *Bioresource Technol.* **99**, 5270–5295.

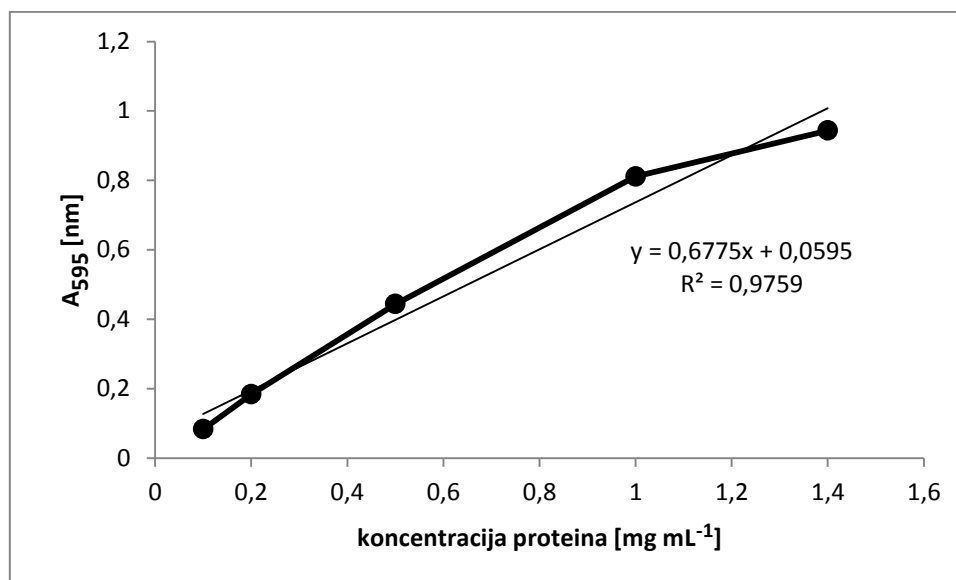
Sarkar, N., Ghosh, S. K., Bannerjee, S., Aikat, K. (2012) Bioethanol production from agricultural wastes: An overview, *Renew. Energ.* **37**, 19-27.

- Schüle, M. (1997) Enzymatic properties of cellulases from *Humicola insolens*, *J. Biotechnol.* **57**, 71-81
- Schuster, A., Schmoll, M. (2010) Biology and biotechnology of *Trichoderma*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **87**, 787–799.
- Seaby, D. A. (1989) Further observations on *Trichoderma*. *Mushroom Journal* **197**, 147- 151.
- Semenčenko, V., Mojović, Lj., Petrović, S., Očić, O. (2011) Novi trendovi u proizvodnji bioetanol, *Hem. Ind.* **65**, 103–114.
- Sharada, R., Venkateswarlu, G., Venkateshwar, S., Anand Rao, M. (2013) Production of cellulase – a review, *IJPBS* **4**, 1070–1090.
- Subramaniam, R., Vimala, R. (2012) Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: A comparative study, *Int. J. Sci. Nature* **3**, 480-486.
- Sukumaran, R. K., Singhania, R. R., Ashok, P. (2005) Microbial cellulases. Production, applications and challenges, *J. Sci. Ind. Res. India.* **64**, 832-844.
- Sun, H., Ge, X., Hao, Z., Peng, M. (2010) Cellulase production by *Trichoderma sp.* on apple pomace under solid state fermentation, *African J. Biotech.* **9**, 163-166.
- Sun, Y., Cheng, J. (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review, *Bioresource Technol.* **83**, 1–11.
- Šantek Ivančić, M., Miškulin, E., Beluhan, S., Šantek, B. (2016) Novi trendovi u proizvodnji etanola kao biogoriva, *Kem. Ind.* **1-2**, 25–38
- Taherzadeh, M. J., Karimi, K. (2007) Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review, *Bioresources* **2**, 707-738.
- Talebna, F., Karakashev, D., Angelidaki, I. (2010) Production of bioethanol from wheat straw: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation, *Bioresource Technol.* **101**, 4744–4753.
- Taylor, J. W., Jacobson, D. J., Kroken, S., Kasuga, T., Geiser, D. M., Hibbett, D. S., Fisher, M. C. (2000) Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi, *Fungal Genet. Biol.* **31**, 21–32.

- Teeri, T., Koivula, A. (1995) Cellulose degradation by native and engineered fungal cellulases. *Carbohydr. Eur.* **12**, 28-33.
- Tolan, J. S., Foody, B. (1999) Cellulase from Submerged Fermentation, *Biochem. Eng. Biotechnol.* **65**, 42-66.
- Tsiklauri, N. D., Khardziani, T. S., Kachlishvili, E. T., Elisahvili, V. I. (1999) Cellulase and xylanase activities of higher basidiomycetes during bioconversion of of plant raw material depending on the carbon source in the nutrient medium, *Appl. Biochem. Micro.* **35**, 291-295.
- Walker, G. (2010) Bioethanol: science and technology of fuel alcohol, Ventus publishing, Frederiksberg.
- Wang, J. Sh., Wang, J., Gulfraz, M. (2005) Efficient Cellulase Production from Corn Straw by *Trichoderma Reesei* LW1 Through Solid State Fermentation Process, *Ethnobot. Leaflet.* **6**, 1523-1540.
- Watanabe, H., Tokuda, G. (2001) Animal Cellulases, *Cell. Mol. Life. Sci.* **58**, 1167- 1178.
- Xia, L. M., Cen, P. L. (1999) Cellulase production by solid state fermentation on lignocellulosic waste from the xylose industry, *Process Biochem.* **34**, 909- 912.
- Xu, Q., Singh, A., Himmel, M. E. (2009) Perspectives and new directions for the production of bioethanol using consolidated bioprocessing of lignocellulose, *Curr. Opin. Biotech.* **20**, 364-371.
- Yu, Y., Lou, X., Wu, H. (2008) Some recent advances in hydrolysis of biomass in hotcompressed water and its comparisons with other hydrolysis methods, *Energ. Fuel.* **22**, 46-60.
- Zaldivar, J., Nielsen, J., Olsson, L. (2001) Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integratio, *Appl. Microbiol. Biot.* **56**, 17-34.
- Zheng, J. Y., Zhuang, M. F., Yu, Z. Y. (2014) The effect of surfactants on the diameter and morphology of electrospun ultrafine nanofiber, *J. Nanomater.* **20**, 34-75.
- Zhuang, J., Marchant, M. A., Nokes, S. E, Strobel, H. J. (2007) Economic analysis of cellulase production methods for bio-ethanol, *Appl. Eng. Agr.* **23**, 679-687.

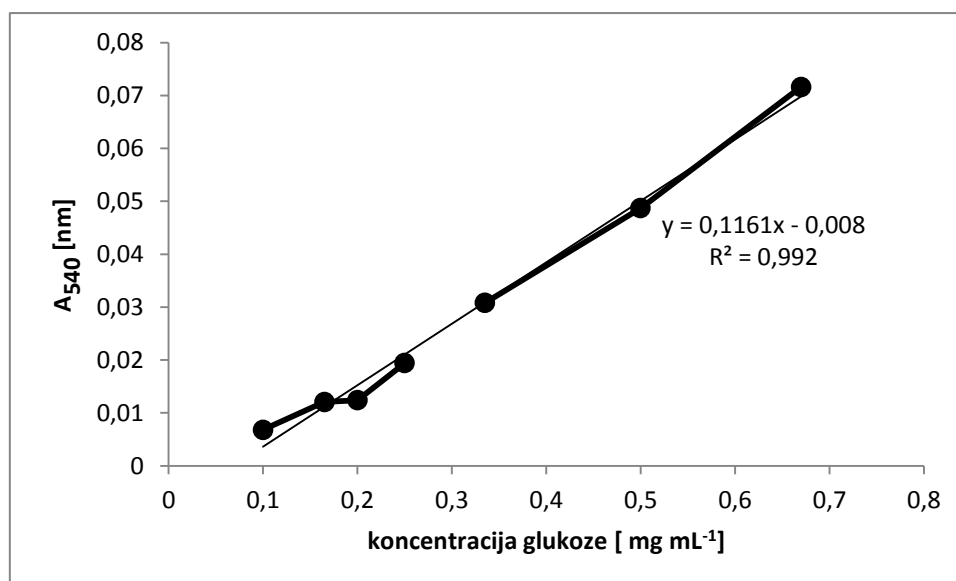
7. PRILOZI

Prilog 7.1.



Slika 22. Baždarni pravac za određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu

Prilog 7.2.

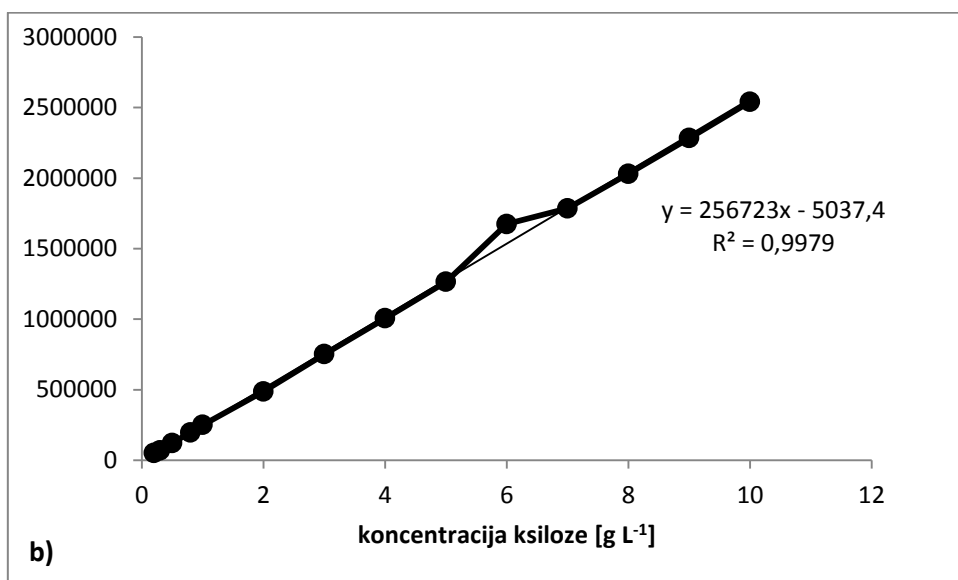
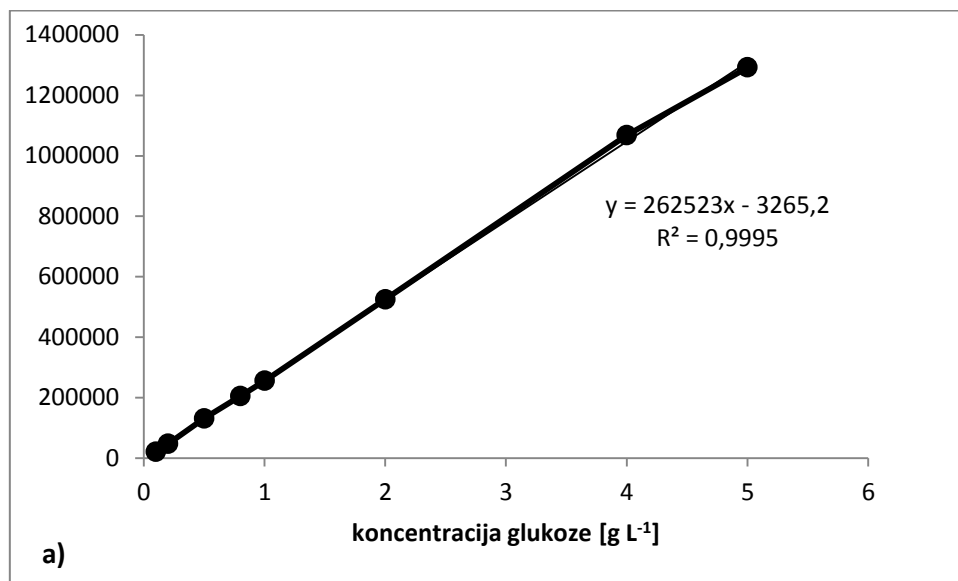


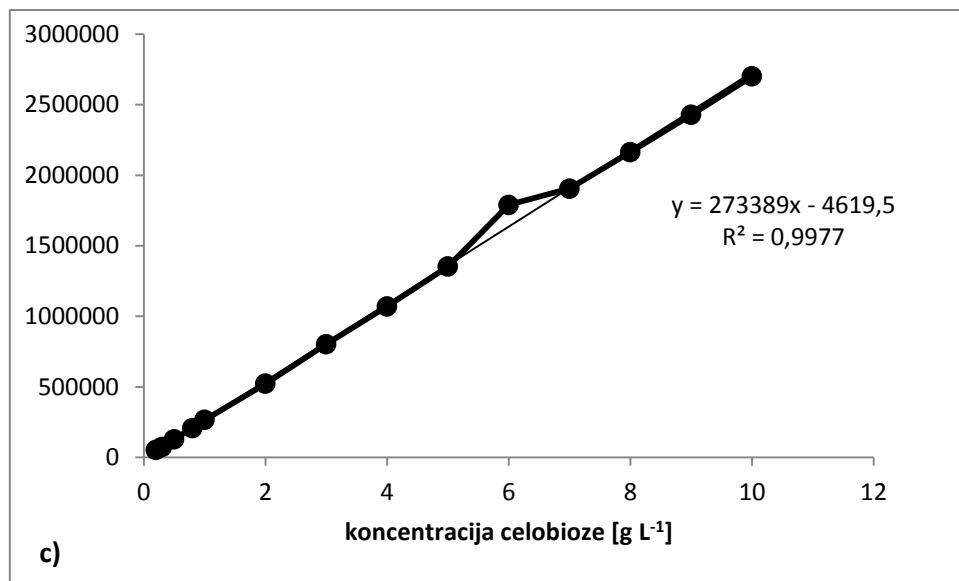
Slika 23. Baždarni pravac za određivanje FPA vrijednosti enzima DNSA metodom

Prilog 7.3.

Tablica 14. Vrijeme zadržavanja monosaharida na kromatografskoj koloni

standard	vrijeme zadržavanja, t_z [min]
glukoza	14,0
ksiloza	14,8
celobioza	11,8-12,0





Slika 24. Baždarni pravci za određivanje koncentracije glukoze (**a**), ksiloze (**b**) i celobioze (**c**) kromatografskom metodom

