

Ispitivanje utjecaja izvora ugljika i dušika na proizvodnju lignocelulolitičkih enzima s pomoću kvasca *Debaryomyces hansenii*

Blažević, Katja

Master's thesis / Diplomski rad

2025

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:159:009523>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-30**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2024.

Katja Blažević

**ISPITIVANJE UTJECAJA RAZLIČITIH
IZVORA UGLJIKA I DUŠIKA NA
PROIZVODNJU LIGNOCELULOLITIČKIH
ENZIMA S POMOĆU KVASCA**

Debaryomyces hansenii

Rad je izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta pod mentorstvom prof. dr. sc. Božidara Šanteka te uz pomoć dr.sc. Nenada Marđetka.

Ovaj diplomski rad je izrađen u sklopu HRZZ projekta "Biorafinerijski sustav za proizvodnju biogoriva i biokemikalija iz neprehrambenih lignoceluloznih sirovina" (Biorefinery-NFLRM; IP-2022-10-3075; voditelj projekta red. prof. dr. sc. Božidar Šantek).

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Bioproceno inženjerstvo

ISPITIVANJE UTJECAJA IZVORA UGLJIKA I DUŠIKA NA PROIZVODNJU LIGNOCELULOLITIČKIH ENZIMA S POMOĆU KVASCA *Debaryomyces hansenii*

Katja Blažević, univ. bacc.ing. biotechn.

0058216310

Sažetak:

Lignocelulozne sirovine predstavljaju značajan izvor obnovljivih resursa koji se koriste u različitim industrijama. Njihova razgradnja uz pomoć lignocelulolitičkih enzima ključna je za biotehnološke procese, jer omogućava efikasnu proizvodnju korisnih proizvoda poput biogoriva i biokemikalija. Dodatno, ti enzimi imaju primjenu u brojnim industrijama čime dodatno povećavaju svoj značaj u održivom razvoju. U ovom istraživanju, na temelju preliminarnih analiza identificiran je kvasac *D. hansenii* kao dobar proizvođač karboksimetil celulaze (CMC-aze). Zatim je optimiziran sastav hranjive podloge za uzgoj *D. hansenii*, kroz varijacije u izvorima ugljika i dušika, s ciljem povećanja aktivnosti lignocelulolitičkih enzima. Kvašćev ekstrakt, u omjeru izvora ugljika i dušika 2:1, pokazao se optimalnim za poticanje lignocelulolitičke aktivnosti. Osim toga, lignocelulozna biomasa (čvrsti hidrolizat biljke blještac) se pokazala kao dobar induktor enzimske aktivnosti. Kod uzgoja *D. hansenii* u bioreaktoru uz melasu i kvašćev ekstrakt postignute su ove specifične enzimske aktivnosti ($U_{\text{guk. proteina}^{-1}}$): 772 za celulazu, 1700 za CMC-azu i 156 za ksilanazu, što potvrđuje potencijal *D. hansenii* u razgradnji lignoceluloznih sirovina.

Ključne riječi: lignocelulolitički enzimi, optimizacija, izvor ugljika i dušika, kvasac *Debaryomyces hansenii*

Rad sadrži: 61 stranica, 15 slika, 1 tablica, 148 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: prof. dr. sc. Božidar Šantek

Pomoć pri izradi: dr. sc. Nenad Marđetko

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Antonija Trontel
2. prof. dr. sc. Božidar Šantek
3. izv. prof. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc (član)
4. prof. dr. sc. Jasna Novak (zamjenski član)

Datum obrane: 8.siječnja 2025.

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 brewing and malt technology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Bioprocess Engineering

ANALYSIS OF THE EFFECT OF CARBON AND NITROGEN SOURCES ON THE PRODUCTION OF LIGNOCELLULOLYTIC ENZYMES BY YEAST *Debaryomyces hansenii*

Katja Blažević, univ. bacc.ing. biotechn.
0058216310

Abstract:

Lignocellulosic raw materials represent a significant renewable resource used in various industries. Their degradation with the help of lignocellulolytic enzymes is crucial for biotechnological processes, as it enables the efficient production of valuable products such as biofuels and biochemicals. Additionally, these enzymes find applications in numerous industries, further enhancing their importance in sustainable development. In this study, based on preliminary analyses, the yeast *D. hansenii* was identified as a good producer of carboxymethyl cellulase (CMC-ase). Subsequently, the nutrient medium for cultivating *D. hansenii* was optimized through variations in carbon and nitrogen sources to increase lignocellulase activity. A yeast extract with a carbon-to-nitrogen ratio of 2:1 proved to be optimal for promoting lignocellulolytic activity. Furthermore, lignocellulosic biomass (solid part of reed canary grass hydrolysate) was shown to be an effective inducer of enzymatic activity. The cultivation of *D. hansenii* in a bioreactor using molasses and yeast extract was also conducted. The specific enzyme activities achieved in bioreactor ($\text{U g}_{\text{uk. proteina}}^{-1}$) were: 772 for cellulase, 1700 for CMC-ase, and 156 for xylanase, confirming the potential of *D. hansenii* in the degradation of lignocellulosic materials.

Keywords: lignocellulolytic enzymes, optimization, carbon and nitrogen source, yeast *Debaryomyces hansenii*

Thesis contains: 61 pages, 15 figures, 1 table, 148 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Božidar Šantek, PhD, Full professor

Technical support and assistance: Nenad Marđetko, PhD

Reviewers:

1. Antonija Trontel, PhD, Associate professor (president)
2. Božidar Šantek, PhD, Full professor (mentor)
3. Andreja Leboš Pavunc, PhD, Associate professor (member)
4. Jasna Novak, PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: day, month, year (e.g. December 20th, 2024)

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. Lignocelulozna biomasa	3
2.1.1. Prirodni izvori i potencijal lignocelulozne biomase	3
2.1.2. Struktura i sastav lignocelulozne biomase	4
2.1.3. Predobrada lignocelulozne biomase.....	5
2.2. Lignocelulolitički enzimi	7
2.2.1. Celulaze	7
2.2.2. Hemicelulaze	8
2.2.3. Ligninaze	8
2.2.4. Primjena lignocelulolitičkih enzima u industriji	9
2.3. Proizvodnja lignocelulolitičkih enzima	10
2.3.1. Postupak proizvodnje enzima.....	10
2.3.2. Mikroorganizmi u proizvodnji lignocelulolitičkih enzima	12
2.4. Lignocelulolitički kvasci u prirodi	13
2.5. Primjena kvasaca u biotehnološkim procesima.....	14
2.5.1. Potencijal kvasaca u proizvodnji lignocelulolitičkih enzima	14
2.5.2. Primjena kvasaca u konsolidiranom bioprocenom sustavu	15
2.6. Perspektive i unapređenja u primjeni (hemi)celulolitičkih kvasaca	15
2.7. <i>Debaryomyces hansenii</i>	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1. MATERIJALI.....	17
3.1.1. Radni mikroorganizmi	17
3.1.2. Kemikalije, komercijalni enzimi i sirovine	17
3.1.3. Hranjive podloge	19
3.1.4. Oprema i uređaji.....	20

3.2. METODE	22
3.2.1. Uzgoj kvasaca u svrhu preliminarnih istraživanja lignocelulitičke aktivnosti	22
3.2.2. Uzgoj odabranog kvasca i optimizacija hranjive podloge radi povećanog prinosa lignocelulolitičkih enzima	22
3.2.3. Uzgoj odabrane vrste kvasca u bioreaktoru na hranjivoj podlozi optimalnog sastava	23
3.2.4. Analitičke metode	23
4. REZULTATI I RASPRAVA	27
4.1. Uzgoj odabranih vrsta kvasaca tijekom preliminarnih istraživanja lignocelulolitičke aktivnosti	28
4.2. Optimizacija sastava hranjive podloge za uzgoj <i>D. hansenii</i> s ciljem povećanja prinosa lignocelulolitičkih enzima	32
4.2.1. Uzgoj <i>D. hansenii</i> na glukozi kao izvoru ugljika, uz različite izvore dušika i njihove koncentracije	33
4.2.3. Uzgoj <i>D. hansenii</i> na melasi kao izvoru ugljika, uz različite koncentracije i izvore dušika	40
4.2.4. Uzgoj <i>D. hansenii</i> na fruktozi kao izvoru ugljika, uz različite izvore i koncentracije dušika	43
4.2.5. Usporedba specifičnih enzimskih aktivnosti na ispitivanim izvorima ugljika i dušika s ciljem odabira optimalnog sastava hranjive podloge za uzgoj u većem mjerilu	43
4.3. Uzgoj <i>D. hansenii</i> na optimiziranoj hranjivoj podlozi u bioreaktoru	45
5. ZAKLJUČCI	48
6. LITERATURA	50

1. UVOD

U današnje vrijeme ljudske aktivnosti generiraju velike količine otpada, uključujući lignocelulozni otpad. Lignocelulozna biomasa, koja dolazi iz raznih izvora poput poljoprivrednih ostataka, šumskog otpada i komunalnog otpada, je najzastupljenija obnovljiva sirovina na Zemlji (Brandt i sur., 2021). S godišnjom proizvodnjom od oko 180 milijardi tona, lignocelulozna biomasa je široko dostupna sirovina pogodna za proizvodnju različitih biomaterijala, biokemikalija, biogoriva, smola i drugih proizvoda s dodanom vrijednošću (Mujtaba i sur., 2023; Rajesh Banu i sur., 2021).

Prednosti primjene lignocelulozne biomase u različitim biotehnološkim procesima uključuju održivost i smanjenje otpada, jer se koriste nusproizvodi koji bi inače završili na deponijima. Osim toga, zamjena fosilnih goriva biomasom može značajno smanjiti emisije stakleničkih plinova, čime se aktivno doprinosi borbi protiv klimatskih promjena (Haus i sur., 2020). Međutim, primjena lignocelulozne biomase suočava se s izazovima, poput složene strukture sirovine zbog koje je nužna njegova predobrada te ekonomske isplativosti postojećih metoda predobrade. Unatoč tim izazovima, istraživanja i inovacije u tehnologijama obrade i konverzije nastavljaju otvarati nove mogućnosti za korištenje lignocelulozne biomase kao održive alternative fosilnim gorivima.

Struktura lignocelulozne biomase je kompleksna i sastoji se uglavnom od celuloze, hemiceluloze i lignina. Celuloza, najrasprostranjeniji biopolimer, osigurava mehaničku čvrstoću staničnim stijenkama biljaka, dok hemiceluloza i lignin doprinose strukturnom integritetu i zaštiti. Ove komponente su međusobno povezane složenim vezama koje pružaju kemijsku stabilnost i kompaktnost (Bichot i sur., 2018). To otežava njihovu razgradnju i pretvorbu u fermentabilne šećere, ključne za proizvodnju bioenergije (Kumar i Sharma, 2017). Stoga se različiti fizikalni, kemijski i biološki postupci koriste za razgradnju lignocelulozne strukture kako bi se oslobodile korisne komponente koje se mogu pretvoriti u biogoriva ili druge vrijedne proizvode.

Kombinacija kemijske i enzimske hidrolize često se koristi kao način predobrade lignocelulozne biomase. Enzimska hidroliza, koja se smatra biološkom metodom, ima brojne prednosti u odnosu na druge metode razgradnje i pretvorbe u fermentabilne šećere. Ova metoda je visoko specifična i učinkovita, uz blage uvjete procesiranja, što smanjuje potrošnju energije i kemikalija. Također, stvara manje otpada i zagađenja, omogućuje korištenje raznih

sirovina i lako se integrira s fermentacijskim procesima, optimizirajući proizvodnju bioetanola i drugih bioproizvoda.

Za enzimsku razgradnju biljnog materijala, zbog njegove heterogene kompozicije, nužna je grupna aktivnost nekoliko enzima (Mäkelä i sur., 2014). Jednim imenom oni se nazivaju lignocelulolitičkim enzimima, a uključuju grupe enzima celulaza, hemicelulaza i ligninaza. Za proizvodnju lignocelulolitičkih enzima koriste se različiti mikroorganizmi, uključujući plijesni, bakterije i kvasce. U ovom radu proveden je uzgoj kvasca *Debaryomyces hansenii* s ciljem istraživanja utjecaja izvora ugljika i dušika u hranjivoj podlozi na proizvodnju lignocelulolitičkih enzima. Praćena je aktivnost enzima karboksimetil celulaze, celulaze i ksilanaze. Aktivnost je mjerena primjenom DNS metode, koja omogućuje kvantifikaciju oslobođenih reducirajućih šećera, čime se procjenjuje enzimsku razgradnju supstrata. Izbor optimalnih uvjeta za maksimalnu enzimsku aktivnost omogućuje dublje razumijevanje potencijala ovog kvasca u industrijskim primjenama, kao što su biokonverzija biomase i proizvodnja bioetanola.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Lignocelulozna biomasa

2.1.1. Prirodni izvori i potencijal lignocelulozne biomase

Lignocelulozna biomasa je najobilnija obnovljiva sirovina na Zemlji (Brandt i sur., 2021). Potječe iz mnoštva različitih izvora uključujući poljoprivredne ostatke poput slame od pšenice i ječma, kukuruzovine, komušine i oklasaka. Također, obuhvaća biljke i njihove ostatke kao što su listovi, stabljike, djetelina i trava, kao i energetske usjeve. U ovu kategoriju spada i otpad iz industrijske proizvodnje hrane i pića, uključujući tehnološki neispravno voće i povrće. Drvni ostaci iz održavanja voćnjaka, vinograda i maslinika, šumski otpad te otpad drvne industrije, kao što su piljevina i ostaci obrade drva, također su važni izvori. Uz to, dio komunalnog otpada, poput otpadnog papira i zelene frakcije kućnog otpada, kao i biomasa iz parkova i vrtova, spadaju u lignoceluloznu biomasu.

Procjene sugeriraju da godišnja proizvodnja lignocelulozne biomase iznosi 1,5 trilijuna tona, što je čini gotovo neiscrpnim izvorom sirovina za ekološki prihvatljive i biokompatibilne proizvode (Kim i sur., 2006). Biokonverzija značajnih količina otpadnih voda (Wu i sur., 2008) te u farmaceutskoj i prehrambenoj lignocelulozne biomase u fermentabilne šećere ima potencijalnu primjenu u proizvodnji bioenergije, primjerice bioetanola (Roland i sur., 2019). Nadalje, razgradnja lignina i drugih staničnih komponenti omogućava pretvorbu ove biomase u vezivne agense, emulgatore i druge korisne proizvode (Arola i Linder, 2016). Osim toga, primjenu nalazi i u pročišćavanju industriji (Gil-Chávez i sur., 2021).

Rasprostranjenost i dostupnost ove sirovine daje značajnu prednost korištenju bioenergije nad ograničenim fosilnim gorivima. Nadalje, zbog korištenja nusproizvoda i otpadnih materijala, često je jeftinija alternativa u usporedbi s fosilnim gorivima. Održivost je jedna od ključnih prednosti, jer lignocelulozna biomasa predstavlja obnovljivi izvor energije, smanjujući ovisnost o neobnovljivim resursima. Korištenjem ovih sirovina također se učinkovito smanjuje količina otpada na deponijima, jer se koriste nusproizvodi koji bi inače bili odbačeni. Konačno, zamjena fosilnih goriva lignoceluloznom biomasom može značajno smanjiti emisije stakleničkih plinova, doprinoseći borbi protiv klimatskih promjena (Haus i sur., 2020).

Unatoč brojnim prednostima lignocelulozne biomase kao obnovljive sirovine, njezina primjena u industriji za proizvodnju bioenergije i drugih proizvoda suočava se s nekoliko izazova. Prvo, kompleksna struktura lignoceluloze otežava njezinu učinkovitu pretvorbu u fermentabilne šećere, što zahtijeva složene i skupe tehnološke procese (Isikigor i Becer, 2015). Drugo,

postoje problemi s ekonomskom isplativošću, jer trenutačne metode obrade često nisu dovoljno konkurentne u odnosu na tradicionalne izvore energije. Uz to, nedostatak standardiziranih i samodostatnih procesa za biokonverziju lignocelulozne biomase dodatno usporava njezinu široku primjenu.

2.1.2 Struktura i sastav lignocelulozne biomase

Lignocelulozna biomasa posjeduje složenu strukturu koja se pretežno sastoji od polisaharida, fenolnih polimera i proteina. Ima kompleksnu prostornu organizaciju, u kojoj je celuloza (polimer ugljikohidrata) okružena gustim slojem kojeg čine hemiceluloza (drugi polimer ugljikohidrata) i lignin (aromatični polimer) (Yousuf i sur., 2020). Hemiceluloza je povezana s celulozom među- i unutar-molekulskim vodikovim vezama, s ligninom esterskim i eterskim vezama. Hemiceluloza također formira kovalentne veze s ligninom (Viikari i sur., 2009). Navedeni polimeri čvrsto su vezani jedan uz drugog te predstavljaju više od 90 % suhe tvari biljne stanice, a udio svakog od njih varira ovisno o vrsti biljke, godini uzgoja, periodu žetve te različitim dijelovima biljke (Bocchini Martins i sur., 2011).

Celuloza je najrasprostranjeniji biopolimer u prirodi i jedan od ključnih sastojaka staničnih stijenki većine biljaka (Khandelwal i Windle, 2013). Kao homopolisaharidni polimer, sastoji se od molekula β -D-glukopiranoze povezanih β -1,4-glikozidnim vezama. Molekule celuloze imaju linearni oblik, a osnovna jedinica je celobioza, dimer koji nastaje povezivanjem dviju molekula glukoze (Semenčenko i sur., 2011). Stanične stijenke biljnih stanica posjeduju mehaničku čvrstoću zahvaljujući upravo celulozi. Njezina struktura je polukristalna, što podrazumijeva izmjenu kristaliničnih i amorfne regije. Kristalinične regije su kohezivne i čvrste, formirane paralelnim rasporedom linearnih lanaca, što dovodi do formiranja intermolekulskih vodikovih veza. Ove vodikove veze doprinose netopljivosti celuloze i niskoj reaktivnosti, čime se povećava otpornost celuloze na kiselinsku hidrolizu i otežava prodiranje vode. S druge strane, amorfne regije tvore celulozni lanci koji su manje organizirani, pristupačniji enzimima i podložniji hidrolizi (Bocchini Martins i sur., 2011). Amorfne regije u strukturi celuloze omogućuju higroskopnost koja utječe na elastičnost celuloznih vlakana, omogućavajući im da vežu vodu iz okoline, što rezultira njihovom fleksibilnošću i prilagodljivošću.

Hemiceluloza je drugi najzastupljeniji obnovljivi biopolimer čini 25–35% lignocelulozne biomase (Saha, 2003). Riječ je o heterogenom polimeru sastavljenom od pentozna (D-ksiloza, D-arabinoza), heksoza (D-manoza, D-glukoza, D-galaktoza) i acetiliranih šećera. Prema svojoj strukturi i glavnoj šećernoj jedinici koja se u njoj nalazi, hemiceluloza se može podijeliti u četiri glavne vrste: ksilan, manan, ksiloglukan i gluklan (Quaseem i sur., 2021). Glavni predstavnik, ksilan, je linearna hemiceluloza čiji se osnovni lanac sastoji od jedinica ksiloze

(Rennie i Scheller, 2014). Sadržaj i struktura hemiceluloze variraju ovisno o vrsti biljke. Na primjer, tvrdo drvo, jednogodišnje biljke i žitarice u svom sastavu imaju dominantno ksilan, dok meko drvo pretežno sadrži glukomanan (Sun, 2010). Polimerni lanci hemiceluloze imaju kratke grane i amorfnu strukturu, a zbog manje organiziranih polimera olakšano je prodiranje vode i djelovanje enzima. Upravo amorfne regije hemiceluloze omogućava bržu i lakšu hidrolizu, stoga se hemiceluloza razgrađuje brže nego celuloza. U lignoceluloznoj biomasi prisutne su intermolekularne vodikove veze između celuloze i hemiceluloze, kao i između različitih lanaca celuloze. Također, postoje intramolekularne vodikove veze unutar celuloze, ksilana i glukomanana (Zhang i sur., 2011). Ove interakcije ključne su za strukturni integritet i fleksibilnost stanične stijenke biljaka.

Lignin je ključni sastojak staničnih stijenki biljaka, osobito u kori i drvetu, gdje čini oko 25% mase lignocelulozne sirovine. Ovaj polimer ima složenu trodimenzionalnu strukturu koja se sastoji od tri različite fenilpropanske jedinice: p-kumaril alkohola, koniferil alkohola i sinapil alkohola. Pretežno amorfne prirode, lignin se odlikuje čvrstoćom i rigidnošću zahvaljujući umreženim fenolnim polimerima unutar svoje strukture. Lignin je povezan s hemicelulozom putem kovalentnih i nekovalentnih veza, pri čemu α -eterska veza predstavlja primarnu interakciju između lignina i ugljikohidrata, konkretno između lignina i C-6 pozicije manoze (Nishimura i sur., 2018). Budući da se celulozna vlakna ugrađuju u matriks hemiceluloze i lignina, lignin istovremeno predstavlja i fizičku barijeru za kontakt između celulolitičkih enzima i supstrata (Ivetić i Antov, 2014). Nadalje, odgovoran je za nepropusnost te zaštitu od mikroorganizama i oksidacijskog stresa (Mäki-Arvela i sur., 2012). Međutim, ova kompleksna struktura otežava izdvajanje i pročišćavanje ovih triju komponenti, što rezultira teškom prirodnom degradacijom lignocelulozne biomase.

2.1.3. Predobrada lignocelulozne biomase

Lignoceluloza je kemijski stabilna i složena tvar koja se teško razgrađuje, što čini predobradu ove sirovine ključnim korakom u proizvodnji visokovrijednih proizvoda. Mikroorganizmi ne mogu koristiti lignocelulozu u njenom izvornom obliku, već samo jednostavnije komponente poput celuloze i hemiceluloze. Učinkovitost predobrade direktno utječe na dostupnost supstrata, rast mikroorganizama i proizvodnju vrijednih metabolita. Ciljevi predobrade uključuju uklanjanje lignina i hemiceluloze, smanjenje kristalčnosti celuloze te povećanje poroznosti sirovine. Osim toga, predobrada treba osigurati formiranje fermentabilnih šećera, spriječiti gubitak ugljikohidrata, izbjeći nusproizvode koji inhibiraju hidrolizu i fermentaciju te biti ekonomski isplativa (Kumar i sur., 2009). Postoje različite metode predobrade, koje se dijele na fizičke, kemijske i biološke (Bušić i sur., 2018; Kostylev i Wilson, 2012). Ove metode igraju ključnu ulogu u optimizaciji procesa i povećanju isplativosti proizvodnje.

2.1.3.2. *Biološka predobrada*

Među različitim strategijama za pretvorbu lignocelulozne biomase u fermentabilne šećere, biološka predobrada se smatra efikasnom i održivom. Ova metoda koristi lignocelulolitički potencijal određenih mikroorganizama kako bi smanjila otpornost lignocelulozne biomase, čime se poboljšava proces saharifikacije uz pomoć hidrolitičkih enzima. Biološka predobrada može uključivati direktno uzgajanje mikroorganizama na lignocelulozi ili primjenu njihovih enzima (Kumar i Chandra, 2020). Enzimska hidroliza pomoću mikroorganizama uključuje interakciju nekoliko enzima, pri čemu enzimski sustav obuhvaća tri glavne vrste enzima: celulaze, hemicelulaze i ligninaze, uz nekoliko pomoćnih enzima (Okeke i sur., 2024).

Ovaj proces je ekološki prihvatljiv i ekonomski isplativ, jer ne zahtijeva kemikalije, ima nisku potrošnju energije i ne oslobađa toksične inhibitore. Nadalje, enzimska predobrada i hidroliza provode se pod blagim uvjetima, što dodatno povećava učinkovitost procesa. Iako dolazi do gubitka šećera uslijed asimilacije mikroorganizama, taj se gubitak može nadoknaditi korištenjem enzima umjesto samih mikroorganizama. Dodatno, primjena kombiniranih pristupa, poput simultane saharifikacije i fermentacije ili simultane predobrade i saharifikacije, značajno smanjuje energetske zahtjeve i troškove. Nasuprot tome, tradicionalne metode predobrade, uključujući fizičke, kemijske i fizikalno-kemijske procese, zahtijevaju visoku potrošnju energije, a samo djelomično razgrađuju lignoceluloznu biomasu i proizvode toksične nusprodukte, što ih čini ekonomski i ekološki neodrživima.

Sirovi, djelomično pročišćeni ili pročišćeni lignocelulolitički i hidrolitički enzimi mogu se primijeniti za učinkovitu pretvorbu lignocelulozne biomase u brojne vrijedne proizvode. Ovaj postupak predobrade ovisi o sastavu biomase i vrsti enzima koji se primjenjuju (Michalska i sur., 2015). Imobilizirani mikroorganizmi i enzimi mogu se višekratno koristiti za važne industrijske biotehnološke procese (Anu i sur., 2023). Međutim, inhibicija produktom, termička inaktivacija, inhibicija supstratom, nizak prinos proizvoda i visoki troškovi enzima čine ih neprikladnima za procese biokonverzije.

Iako biološka predobrada i konsolidirani bioproceni sustavi imaju veliki potencijal, njihova šira primjena je ograničena iz nekoliko razloga. Biološka predobrada je sporija u usporedbi s fizičkim i kemijskim metodama (Anu i sur., 2020). Proizvodnja etanola iz lignocelulozne sirovine zahtijeva visoke troškove i značajnu potrošnju energije. Tijekom ovog bioprocena dolazi do gubitka polimernih i monomernih šećera kroz njihovu konverziju u mikrobnom metabolizmu. Također, primjetan je nedostatak odgovarajućih mikroorganizama koji mogu provoditi učinkovitu predobradu, saharifikaciju i fermentaciju, uključujući sojeve koji mogu metabolizirati C6 i C5 šećere. Osim toga, većina mikroorganizama ne može koristiti lignin i

njegove degradirane proizvode stoga oni ostaju neiskorišteni u hranjivoj podlozi. Ipak, s razvojem znanosti i tehnologije pojavljuju se nove metode za prevladavanje ovih izazova.

2.2. Lignocelulolitički enzimi

Lignocelulolitički enzimi karakteriziraju se kao skupina enzima sposobnih za razgradnju lignocelulozne biomase na njene monomerske jedinice, čineći je dostupnom za biokonverziju u razne proizvode i primjene u najrazličitijim industrijama (Benatti i Polizeli, 2023). Enzimi djeluju kao katalizatori u živim organizmima tj. reguliraju brzinu biokemijskih reakcija. Osim toga, enzimi pomažu i potiču pretvaranje supstrata u korisne krajnje proizvode metabolizma jer stvaraju odgovarajuće uvjete za odvijanje biokemijskih reakcija (Karigar i Rao, 2011). Svi poznati enzimi spadaju u jednu od sedam glavnih klasa enzima: oksidoreduktaze, transferaze, hidrolaze, liaze, izomeraze, ligaze i translokaze (de Souza Vandenberghe i sur., 2020). Istraživanja pokazuju da se lignocelulolitički enzimi mogu karakterizirati kao velika grupa uglavnom ekstracelularnih proteina, koja uključuje ligninolitičke enzime (peroksidaze i oksidaze) i hidrolitičke enzime (celulaze, hemicelulaze, pektinaze, hitozane, amilaze, proteaze, esteraze i mananaze) (Godliving, 2012).

2.2.1. Celulaze

Celulaze su enzimi koji kataliziraju hidrolizu β -1,4-glikozidnih veza prisutnih u molekulama celuloze, oslobađajući njihove monomerske podjedinice. Ovisno o načinu djelovanja i specifičnosti prema supstratu, celulaze se mogu klasificirati u tri glavne vrste: endoglukanaze, egzoglukanaze (ili celobiohidrolaze) i β -glikozidaze (Sharma i Yazdani, 2016). Endoglukanaze (EC 3.2.1.4) kataliziraju nasumično razbijanje unutarnjih β -1,4-glikozidnih veza u amorfnim dijelovima celuloznog lanca. One pronalaze površinska mjesta duž molekula celodekstrina i umeću molekulu vode u β -(1,4) vezu, stvarajući nove parove reducirajućih i nereducirajućih krajeva, koji su zatim izloženi djelovanju egzoglukanaza. Egzoglukanaze (EC 3.2.1.91; EC 3.2.1.176) razgrađuju te krajeve, postupno oslobađajući celobiozu. Naposljetku, β -glikozidaze (EC 3.2.1.21) igraju ključnu ulogu u završnom koraku hidrolize celuloze, razgrađujući celobiozu i oslobađajući dvije molekule glukoze (Horn i sur., 2012). Za potpunu hidrolizu celuloze neophodna je sinergijska suradnja ovih enzima. Tek kada ova tri enzima rade zajedno, celuloza se može potpuno hidrolizirati u glukozu ili mineralizirati u H_2O i CO_2 . Sporedni proizvodi hidrolize celuloze su šećeri koji služe kao izvori ugljika i energije za mikroorganizme (Saini i sur., 2015).

2.2.2. Hemicelulaze

Kao i kod celuloze, potpuna hidroliza i degradacija hemiceluloze zahtijeva sinergijsko djelovanje niza enzima (Okeke i sur., 2024). Ovi enzimi, poznati kao hemicelulaze, djeluju razbijajući postojeće glikozidne veze između ugljikohidrata, a također podržavaju i druge glikohidrolaze u uklanjanju metilnih i acetilnih skupina s površine hemiceluloze (Houfani i sur., 2020). Hemicelulaze se mogu podijeliti u dvije glavne klase: one s depolimerizirajućim djelovanjem, koje hidroliziraju glikozidne veze glavnog lanca (ksilanaze, glukanaze i mananaze), te pomoćne enzime koji razbijaju esterske i glikozidne veze bočnih lanaca hemiceluloze (α -L-arabinofuranozidaza, acetil ksilan esterase, β -glukuronidaza, glukuronil esterase i ferulinska kiselina esterase) (Shrivastava i sur., 2023). Među svim tim enzimima, ksilanaze predstavljaju glavnu klasu enzima koji sudjeluju u hidrolizi hemiceluloze (Okeke i sur., 2024). Kombinirano djelovanje tri značajna enzima - endoksilanaze, egzoksilanaze i β -ksilozidaze - ključno je za razgradnju okosnice ksilana u hemicelulozi. Endoksilanaze (EC 3.2.1.8) razbijaju β -1,4 veze u okosnici ksilana, dok egzoksilanaze (EC 3.2.1.37) hidroliziraju β -1,4 veze ksilana s nereducirajućih krajeva i oslobađaju ksilooligosaharide. Naposlijetku, β -ksilosidaze razbijaju ksilobiozu i ksilooligosaharide, što rezultira oslobađanjem ksiloze (Chukwuma i sur., 2020).

2.2.3. Ligninaze

Budući da lignin čini aromatski i hidrofobni polimer sastavljen od fenolnih i nefenolnih dijelova, odlikuje se složenom strukturom koja mu pruža visoku otpornost na djelovanje hidrolaza (Li i sur., 2016). Stoga se njegova depolimerizacija i degradacija odvijaju kroz nekoliko oksidativnih reakcija koje dovode do oslobađanja nusproizvoda s manjom stabilnošću. Enzimi uključeni u ovaj enzimski sustav oksidativne degradacije lignina nazivaju se ligninazama i dijele se u dvije glavne skupine: peroksidaze i oksidaze (Pollegioni i sur., 2015). Peroksidaze su enzimi koji započinju depolimerizaciju lignina putem oksidacijskih reakcija koje dovode do stvaranja slobodnih radikala i aniona u prisutnosti vodikovog peroksida (Okeke i sur., 2024). Postoje četiri poznate klase peroksidaza koje sudjeluju u ovom procesu: lignin peroksidaze, mangan peroksidaze, svestrane peroksidaze i peroksidaze za izbjeljivanje (Chukwuma i sur., 2020). Lignin peroksidaze (EC 1.11.1.14) su glikoproteini s hem grupama koji igraju ključnu ulogu u depolimerizaciji lignina. Ovi enzimi provode oksidaciju i degradaciju različitih fenolnih spojeva uklanjanjem elektrona u prisutnosti vodikovog peroksida kao supstrata (Janusz i sur., 2017). Grupu oksidaza najviše predstavljaju lakaze (EC 1.10.3.2), bakreni enzimi koji se sastoje od monomernih, dimernih i tetramernih glikoproteina (Claus, 2004). Sadrže tri koordinatno povezana atoma bakra, čime održavaju aktivna mjesta aminokiselina (Dwivedi i sur., 2011). Oksidativna aktivnost ovih enzima uključuje oksidaciju četiri elektrona iz aromatskih i

nearomatskih jedinica supstrata, nakon čega slijedi redukcija molekularnog kisika u prisutnosti vode. Lakaze djeluju na oksidaciju fenolnih jedinica, uz gubitak elektrona i stvaranje nestabilnih slobodnih radikala (Guimarães i sur., 2017).

2.2.4. Primjena lignocelulolitičkih enzima u industriji

Lignocelulolitički enzimi imaju široku primjenu u industriji hrane i pića. Koriste se za ekstrakciju i bistrenje sokova, poboljšavajući prinos i aromu te smanjujući viskoznost (de Souza i Kawaguti, 2021). U pekarstvu, ksilanaze omekšavaju tijesto i poboljšavaju kvalitetu, dok lakaze povećavaju stabilnost i mekoću kruha (Singh i Gupta, 2020; Mandal, 2015). U stočnoj hrani poboljšavaju razgradnju vlakana i nutritivnu kvalitetu krmiva (Lobedanz i sur., 2016). U pivarskoj industriji enzimi olakšavaju i ubrzavaju proces glavnog vrenja i kvalitetu piva, dok lakaze uklanjaju fenolne spojeve, poboljšavajući boju i stabilnost pića (de Souza i Kawaguti, 2021; Bilal i Iqbal, 2019). Osim toga, oksidacijom polifenola produljuje se rok trajanja vina i piva te poboljšava njihova kvaliteta (Chakraborty i sur., 2016).

U tekstilnoj industriji, enzimi su ekološka alternativa kemikalijama za procese poput pranja i izbjeljivanja (Madhu i Chakraborty, 2017). Celulaze se koriste za obradu pamuka i uklanjanje nečistoća iz pamučnih tkanina (Rahman i sur., 2020). Enzimi smanjuju oštećenja vlakana i potrošnju vode tijekom izbjeljivanja, dok lakaze djeluju na indigo boje (Zhang i sur., 2018). Također, lignocelulolitički enzimi poboljšavaju kvalitetu tkanine u procesu njenog poliranja (Bussler i sur., 2021). Naposljetku, otpad iz tekstilne industrije također se može tretirati lignocelulolitičkim enzimima (Shindhal i sur., 2020).

Opskrba čistom celulozom za proizvodnju papira značajno je smanjena, potičući industriju da se oslanja na poljoprivredni i papirni otpad (Nathan, 2022). Pretvorba lignoceluloznog otpada u papir uključuje različite procese kao što su priprema, prerada, obnova i izbjeljivanje (Bajpai, 2015). Od 1980-ih, primjena lignocelulolitičkih enzima se povećala, uključujući biološko izbjeljivanje, uklanjanje tinte i obrada otpadnih voda. U procesu uklanjanja tinte, enzimi razgrađuju veze između vlakana papira i čestica tinte (Hasanin i sur., 2020). U procesu biološkog izbjeljivanja lignin se odvaja od celuloze s pomoću ksilanaza, celulaza i lakaza, poboljšavajući izgled i svjetlinu papira (Gupta i sur., 2022; Hussain i sur., 2022; Singh i sur., 2016).

Proizvodnja biogoriva značajno je porasla i smatra se ključnom alternativom za rješavanje klimatske krize i smanjenje emisija stakleničkih plinova (Haus i sur., 2020). Druga generacija biogoriva, koja ne konkurira prehrambenim usjevima, proizvodi se iz lignocelulozne biomase, uključujući poljoprivredne i prehrambene ostatke (Thompson i Meyer, 2013). Zbog složene

strukture lignocelulozne biomase, šećeri se ne mogu fermentirati standardnim mikroorganizmima. Stoga, proizvodnja ovih goriva uključuje predobradu, hidrolizu i fermentaciju, pri čemu se lignocelulozna biomasa kovertira u fermentabilne šećere i dalje u biogoriva poput bioplina, bioetanola ili biovodika (Saravanan i sur., 2022). Primjena lignocelulolitičkih enzima u predobradi i hidrolizi sirovina značajno je porasla zbog smanjenja negativnih utjecaja biogoriva na okoliš (Bangaru i sur., 2022). Učinkovite enzimske mješavine sadrže uglavnom celulaze, hemicelulaze i ligninaze (Pasin i sur., 2020). Istraživanja se fokusiraju na razvoj mikroorganizama za razgradnju lignocelulozne biomase s visokim prinosom proizvoda veće dodane vrijednosti, uključujući i genetičku modifikaciju radnih mikroorganizama (Saravanan i sur., 2022). Visoka cijena komercijalnih enzima ostaje ograničavajući faktor, no imobilizacija enzima nudi rješenje za njihovu višekratnu upotrebu i hiperaktivaciju (Rajnish i sur., 2021).

Industrijalizacija i masovna upotreba pesticida u poljoprivredi uzrokuju značajnu kontaminaciju tla, vode i zraka. Bioremedijacija koristi biljke, mikroorganizme ili njihove enzime za detoksikaciju i transformaciju zagađivača u okolišu (Li i sur., 2020). Oksidoreduktaze, poput lignin peroksidaza, mangan peroksidaza, svestranih peroksidaza i lakaza, pokazuju potencijal za razgradnju tvari koje zagađuju okoliš (Kumar i Chandra, 2020; Gouma i sur., 2014). Lakaze, na primjer, kataliziraju reakcije koje razgrađuju fenolne spojeve, pesticide, herbicide, fungicide i farmaceutske spojeve (Bilal i Iqbal, 2019).

2.3. Proizvodnja lignocelulolitičkih enzima

2.3.1. Postupak proizvodnje enzima

Biotehnološkim postupcima se uz pomoć različitih radnih mikroorganizama obnovljive sirovine konvertiraju u proizvode veće dodane vrijednosti, poput enzima, organskih kiselina, alkohola i polimera (Al-Maqtari i sur., 2019). Krajnji proizvodi bioprocesa, kao što su etanol i mliječna kiselina, djeluju kao akseptori protona, pri čemu se NADH reciklira u NAD⁺, omogućujući stanici da nastavi proizvoditi energiju putem glikolize fosforilacijom na razini supstrata. Dakle, kako bi održali energetske balans, mikroorganizmi stvaraju brojne krajnje proizvode metabolizma.

Trenutačno se koriste dvije tehnike za proizvodnju lignocelulolitičkih enzima, kako u laboratorijskom tako i u industrijskom mjerilu: submerzna proizvodnja (engl. *submerged fermentation* - SmF) i proizvodnja na čvrstom supstratu (engl. *solid state fermentation* - SSF) (Benatti i Polizeli, 2023). Prva metoda definira se kao proizvodnja u kojoj su supstrat i radni

mikroorganizam uronjeni u tekuću hranjivu podlogu. Nasuprot tome, proizvodnja na čvrstom ili polučvrstom supstratu odvija se na supstratu s vrlo malo ili bez slobodne vode, pri čemu radni mikroorganizam uglavnom raste na površini supstrata (Singh i sur., 2021).

2.3.1.1. Submerzna proizvodnja enzima

Submerzna proizvodnja je proces koji uključuje uzgoj pažljivo odabranih mikroorganizama u zatvorenim bioreaktorskim sustavima koji sadrže bogatu hranjivu podlogu i dostupnu koncentraciju otopljenog kisika potrebnog za rast radnog mikroorganizma. Tijekom korištenja supstrata iz hranjive podloge, mikroorganizmi oslobađaju željene enzime (Renge i sur., 2012). Šaržni i kontinuirani postupci proizvodnje su uobičajene tehnike submerzne proizvodnje enzima. U šaržnom bioprocesu, sterilizirana hranjiva podloga inokulira se s radnim mikroorganizmom, nakon čega se bioproces odvija sve dok se ne potroši limitirajući supstrat, najčešće izvor ugljika, iz hranjive podloge. S druge strane, kod kontinuiranog bioprocesa, sterilizirana hranjiva podloga ulazi u bioreaktor određenom brzinom razrjeđenja, a istom brzinom izlazi konvertirana hranjiva podloga. Ovaj postupak osigurava stabilnost bioprocesa uz konstantan nadzor njegovog odvijanja. Parametri poput temperature, pH vrijednosti, potrošnje kisika i stvaranja ugljikovog dioksida pažljivo se mjere i kontroliraju kako bi se odredili optimalni uvjeti za vođenje određenog bioprocesa. Budući da submerzna proizvodnja omogućava bolju kontrolu parametara bioprocesa te daje veću pouzdanost i ponovljivost, češće se koristi za industrijsku proizvodnju enzima u usporedbi s proizvodnjom na čvrstom ili polučvrstom supstratu (Singh i sur., 2021). Međutim, submerzna proizvodnja ima i određene nedostatke, poput visoke potrošnje energije, potrebe za većim ulaganjima s manjom produktivnošću (i prinosom) uz dulje vrijeme trajanja bioprocesa (Hansen i sur., 2015).

2.3.1.2. Proizvodnja enzima na čvrstom ili polučvrstom supstratu

Proizvodnja enzima na čvrstom ili polučvrstom supstratu podrazumijeva uzgoj mikroorganizama supstratima poput žitarica, rižinih i pšeničnih mekinja, bagase ili celulozne kaše (Renge i sur., 2012). Ovaj način proizvodnje koristi različite nusproizvode kao supstrate za uzgoj mikroorganizama, pri čemu se najčešće odvija relativno spor i kontinuiran proces potrošnje supstrata. Odabir supstrata temelji se na različitim parametrima, prvenstveno na cijeni i dostupnosti, ali i na veličini čestica te udjelu vode. Proizvodnja na čvrstom ili polučvrstom supstratu nudi brojne prednosti u odnosu na submerznu proizvodnju, uključujući visoku volumetrijsku produktivnost, relativno visoku koncentraciju proizvoda, smanjenu količinu otpadnih voda i jednostavniju opremu. Iako supstrat zahtijeva održavanje određenog udjela vode potrebne za rast radnog mikroorganizma, ovaj način proizvodnje omogućava relativnu dobru prilagodbu mikroorganizama na supstrat (Prevot i sur., 2013).

2.3.1.3. Bioreaktori u mikrobnj proizvodnji enzima

Različite vrste bioreaktora mogu se primijeniti u oba načina proizvodnje enzima. Bioreaktori trebaju osigurati *in vitro* uvjete za uzgoj radnih mikroorganizama s ciljem proizvodnje željenih enzima iz supstrata (Ramesh i sur., 2019). U submerznoj proizvodnji, najčešći su bioreaktori s mehaničkim miješalom ili bioreaktori miješani zrakom (uključujući i barbotirajuće kolone). U proizvodnji enzima na čvrstom ili polučvrstom supstratu, bioreaktori se dijele u četiri skupine: bioreaktori s površinskim uzgojem u tavama, bioreaktori s nasutim slojem, bioreaktori s fluidiziranim slojem i bioreaktori s rotirajućim bubnjem (Singh i sur., 2021). Odabir odgovarajućeg načina uzgoja i bioreaktora ovisi o brojnim čimbenicima, uključujući vrstu radnog mikroorganizma i supstrata. Glavni kriteriji za takav odabir uključuju: adekvatan prijenos mase, male sile smicanja, sterilnost, aeraciju, kontrolu pH i temperature, nisku potrošnju energije, odgovarajuću granulaciju supstrata i učinkovit sustav miješanja i prijenosa mase (Pino i sur., 2018).

2.3.2. Mikroorganizmi u proizvodnji lignocelulolitičkih enzima

Neke arheje, poput vrsta iz rodova *Pyrococcus*, *Sulfolobus*, *Thermogladus* i *Thermofilum*, opisane su kao potencijalni razgrađivači lignocelulozne biomase (Suleiman i sur., 2020). Većina njih živi u ekstremnim uvjetima na povećanim temperaturama, pH i salinitetom, što ih čini pogodnim za industrijske procese poput predobrade i konverzije lignocelulozne biomase.

Bakterije su također važni mikroorganizmi za proizvodnju lignocelulolitičkih enzima zbog svoje prilagodljivosti promjenama pH i temperature, fleksibilnosti prema potrebama za kisikom te relativno velikim potencijalom za genetičke modifikacije (Chukwuma i sur., 2021). Lignocelulolitički enzimi su prisutni kod mnogih vrsta, uključujući aerobne i anaerobne, pri čemu se međusobno razlikuju po prinosu i konačnim broju proizvoda metabolizma. Najveći broj ovih bakterija dolazi iz rodova *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Cellulomonas*, *Clostridium* i *Pseudomonas*, uz prisustvo i drugih rodova koji imaju lignocelulolitičku aktivnost (Chukwuma i sur., 2021).

Iako bakterije i arheje imaju određene prednosti u proizvodnji lignocelulolitičkih enzima, filamentozne gljive se najčešće proučavaju za razgradnju lignocelulozne biomase (Muaaz-Us-Salam i sur., 2020). Filamentozne gljive sastoje se od hifa s perforiranim zidovima (septama) koji omogućuju prolazak proteina i njihovu sekreciju kroz staničnu membranu (Shoji i sur., 2014). Njihova sposobnost izlučivanja velikih količina enzima u ekstracelularno okruženje olakšava prikupljanje ovih enzima. Vrste *Aspergillus* i *Trichoderma*, iz koljena Ascomycota, najpoznatiji su primjeri celulozolitčnih plijesni u industriji, odgovorne za više od 50 % istraživanja

vezanih uz celulaze. Poznate su kao gljive mekog truljenja, koje uzrokuju oštećenja u staničnim zidovima biljaka (Liu i sur., 2021). Proteomička istraživanja pokazala su da *Aspergillus niger* i *Trichoderma reesei* posjeduju širok spektar enzima, uključujući celobiohidrolaze, endoglukanaze i hemicelulaze (Borin i sur., 2015). Osim njih, i drugi rodovi filamentoznih gljiva, poput *Penicillium*, *Fusarium* i *Rhizopus*, značajni su industrijski proizvođači ovih enzima (Rastegari, 2018). Osim Ascomycota, genomske analize plijesni iz koljena Basidiomycota pokazale su da posjeduju dva enzimska sustava: hidrolitički sustav za razgradnju celuloze i hemiceluloze te oksidativni sustav za oksidaciju i razgradnju lignina, koji uključuje lakaze i nekoliko peroksidaza (Mäkelä i sur., 2020). Ove basidiomicete obuhvaćaju gljive s bijelim i smeđim truljenjem, nazvane tako jer napadaju staničnu stijenku biljaka, ostavljajući je s vlaknastom teksturom u izbijeljenoj ili smeđoj boji (Mäkelä i sur., 2020). Među njima se ističu vrste nekih rodova poput *Phlebia*, *Pleurotus*, *Phanerochaete*, *Trametes*, *Polyporus* i *Lentinus* (Liu i sur., 2020; Okal i sur., 2020).

2.4. Lignocelulolitički kvasci u prirodi

Kvasci su jednostanični mikroorganizmi koji su, zajedno s plijesnima i gljivama, klasificirani kao članovi Kraljevstva gljiva (fungi). Kvasci koji razgrađuju celulozu i ksilan mogu se izolirati iz prirode kako bi se istražila njihova svojstva razgradnje polisaharida i korištenje proizvoda hidrolize za rast ili pretvorbu u korisne proizvode.

Iako su mnoge filamentozne gljive poznate po korištenju netopljive, kristalne celuloze (poput Avicela, filtriranog papira (FP) i α -celuloze) kao jedinog izvora ugljika, kod kvasaca ova sposobnost nije jasno potvrđena. Većina celulaza u kvascima djeluje samo na topljive derivate celuloze, kao što su karboksimetil celuloza (CMC) ili hidroksietil celuloza (HEC). Ipak, Giese i sur. (2017) i de Souza i sur. (2013) izvijestili su da neki sojevi iz roda *Trichosporon* i *Cryptococcus* mogu rasti na Avicelu i proizvoditi enzime aktivne na Avicelu, FP-celulozi i CMC-u. Najveću aktivnost celulaze pokazali su *Tr. laibachii*, *Tr. moniliiforme* i *Cr. laurentii*. Također, kvasci iz roda *Candida* (*C. homilentoma*, *C. kashinagacola*, *C. tropicalis*, *C. utilis*) i tropski izolati *Aureobasidium pullulans* pokazali su aktivnost ili sposobnost rasta na kristalnoj celulozi (Mattam i sur., 2016; Yun i sur., 2015; Kudanga i Mwenje, 2005; Villas-Boas i sur., 2002). Međutim, njihov ograničeni rast i vrlo niske razine aktivnosti celulaze sugeriraju da kvasci ne mogu učinkovito koristiti netopljivu celulozu.

Nasuprot tome, proizvodnja celulolitičkih enzima koji djeluju na topljive oblike celuloze, uključujući celulo-oligosaharide, zabilježena je u mnogim vrstama kvasaca. Korištenje CMC-a kao enzimskog supstrata oslabilo je značenje pojma "celulolitički", jer mnogi mikroorganizmi koji ne mogu razgraditi celulozu mogu hidrolizirati CMC ili druge topljive derivate celuloze

koristeći β -1,3- β -1,4-glukanazu (Lynd i sur., 2002). Takvu aktivnost su pokazali neki sojevi iz rodova *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Debaryomyces*, *Aureobasidium*, *Myriangiaceae* i *Candida* (poput *C. homilentoma*, *C. kashinagacola*, *C. tropicalis*) koji su izolirani iz različitih staništa, uključujući uzorke iz tla i ambrozijskih kukaca (Giese i sur., 2017; Jaiboon i sur., 2016; Mattam i sur., 2016; Gomes i sur., 2015; Yun i sur., 2015; Korhola i sur., 2014; Augustín, 2000). CMC-aze su također proizveli psihrotolerantni sojevi kvasaca iz vrsta *Rhodotorula*, *Mrakia*, *Cryptococcus*, *Aureobasidium*, *Leuconurospora* i *Tetracladium* (Carrasco i sur., 2016; Krishnan i sur., 2011; Pathan i sur., 2010; Chi i sur., 2009).

U usporedbi s ograničenim brojem kvasaca koji su sposobni rasti na celulozi, sposobnost kvasaca da koriste ksilan kao jedini izvor ugljika prilično je rasprostranjena. Veliki broj sojeva koji proizvode ksilanaze izoliran je iz različitih okruženja, uključujući tlo, trulo drvo, razgrađenu bagasu šećerne trske, tropske močvarne šume i crijeva insekata koji se hrane biljkama. Šuchová i sur. (2022) izvijestili su da kvasci iz rodova *Aureobasidium*, *Blastobotrys*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Meyerozyma*, *Scheffersomyces*, *Sugiyamaella* i *Trichosporon* dosljedno pokazuju visoke razine ksilanolitičke aktivnosti.

2.5. Primjena kvasaca u biotehnološkim procesima

2.5.1. Potencijal kvasaca u proizvodnji lignocelulolitičkih enzima

Među različitim skupinama mikroorganizama, enzimski potencijal kvasaca još uvijek nije toliko istražen kao onaj bakterija i plijesni (Arman i sur., 2020). Ipak, kvasci nude brojne prednosti kao proizvođači enzima, posebno celulaza i ksilanaza. Prednost ovih proizvođača enzima leži u njihovoj sposobnosti prirodne ekspresije gena za hidrolitičke enzime, kao i u učinkovitoj regulaciji unosa i katabolizma ugljikohidrata. Kvasci se često smatraju boljim izborom od bakterija za biotehnološku proizvodnju, zahvaljujući jednostavnijim procesima izdvajanja i otpornosti na bakterijsku ili virusnu kontaminaciju (Adelabu i sur., 2019). Nadalje, kvasci su modelna eukariotska skupina koja se može uzgajati u kraćem razdoblju od plijesni i lako se genetski modificira (de Souza i Magalhães, 2010). Na primjer, kvasci se mogu genetski modificirati za razgradnju polisaharida s pomoću heterolognih gena, koristeći poznate industrijske ili laboratorijske sojeve poput *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* ili *Pichia pastoris* (Anandharaj i sur., 2020; Tian i sur., 2019). Ova metoda omogućuje prilagodbu kvasaca za specifičnu razgradnju polisaharida. Također, omogućava korištenje sojeva koji su prirodno dobri proizvođači ciljanih proizvoda, zahvaljujući svojoj visokoj produktivnosti i otpornosti na stres u industrijskim uvjetima.

2.5.2. Primjena kvasaca u konsolidiranom bioprocesnom sustavu

Jedna privlačna mogućnost za smanjenje visokih troškova enzimске hidrolize uz korištenje komercijalnih enzimskih koktela je proizvodnja i izlučivanje lignocelulolitičkih enzima u velikim količinama od strane kvasaca koji se koriste za proizvodnju bioetanol. Jedan od glavnih ciljeva proizvodnje na lignoceluloznim sirovinama je formiranje konsolidiranog bioprocesnog sustava, gdje se komercijalni enzimi za saharifikaciju potpuno zamjenjuju enzimima koje proizvode kvasci (Olson i sur., 2012). Ovaj pristup donosi brojne prednosti, ali i određene nedostatke. Simultana saharifikacija i fermentacija (SSF) je tehnika koja omogućava istovremeno izvođenje enzimске hidrolize i fermentacije unutar istog bioreaktora. Ova kombinacija može smanjiti broj potrebnih posuda, čime se smanjuju inicijalni troškovi. SSF omogućava trenutnu pretvorbu oslobođenih šećera u određeni proizvod (npr. etanol), što sprječava pojavu povratne inhibicije supstratom lignoceluloznih enzima (Teugjas i Våljamäe, 2013; Qing i sur., 2010). Ova karakteristika značajno utječe na učinkovitost saharifikacije u stvarnim industrijskim lignoceluloznim hidrolizatima (Xiao i sur., 2004). Osim toga, SSF održava razinu slobodnih šećera na niskoj razini, što smanjuje rizik od bakterijske kontaminacije. S druge strane, proces SSF mora se provoditi na temperaturi koju podnose kvasci (± 35 °C), što je znatno niže od optimalne temperature za lignocelulozne enzime ($\pm 50 - 60$ °C). Stoga je potrebno razviti termotolerantne mikroorganizme koji će omogućiti fermentaciju šećera na povećanim temperaturama koje su optimalne za proces saharifikacije.

2.6. Perspektive i unapređenja u primjeni (hemi)celulolitičkih kvasaca

Veliki potencijal lignocelulolitičkih, točnije (hemi)celulolitičkih kvasaca u biotehnologiji istaknut je kroz brojne primjere u literaturi. Istraživanja usmjerena na identifikaciju i karakterizaciju prirodnih (hemi)celulolitičkih kvasaca prate razvoj inženjerskih sojeva za biotehnoške procese. Najčešće korišteni sojevi su *S. cerevisiae* i *K. marxianus*, koji su dobro poznati i efikasni. Međutim, enzimске aktivnosti u ovim rekombinantnim sojevima trenutno su niske u usporedbi s filamentoznim gljivama i superiornim prirodnim kvascima. Dosadašnji radovi fokusirali su se na razvoj rekombinantnih celulolitičkih sojeva s ciljem proizvodnje bioetanol, dok su prirodni hemicelulozni kvasci uglavnom korišteni za generiranje različitih drugih bioproizvoda. Ipak, mogućnosti buduće primjene su znatno šire, budući da kvasci mogu proizvoditi različite biomolekule iz celuloze i ksilana. To uključuje istraživanje novih sojeva i prirodnih proizvoda, razvoj rekombinantnih sojeva koji će poboljšati hidrolizu polisaharida i prinos određenog proizvoda, kao i optimizaciju procesa predobrade biomase kako bi se osiguralo optimalno usklađivanje s odabranim kvascem. Uz to, važno je unaprijediti cjelokupni bioproces, uključujući izdvajanje i pročišćavanje određenog proizvoda (Šuchová i sur., 2022).

2.7. *Debaryomyces hansenii*

Debaryomyces hansenii je halotolerantni i kserotolerantni nekonvencionalni kvasac s velikim potencijalom za biotehnoške primjene (Navarrete i Martínez, 2020). Ovaj kvasac može se naći u raznim staništima s niskom aktivnošću vode, uključujući morsku vodu, sir, meso, vino, pivo, voće i tlo, a također u proizvodima s visokim sadržajem šećera.

Biotehnoška proizvodnja nastoji razviti održive načine proizvodnje koji smanjuju negativan utjecaj na okoliš. *D. hansenii* se ističe svojom sposobnošću rasta u medijima s velikim koncentracijama soli, što smanjuje potrebu za čistom vodom, rizik od kontaminacije i troškove sterilizacije (Navarrete i sur., 2020; Navarrete i Martínez, 2020). Osim toga, ovaj kvasac može koristiti različite izvore ugljika i rasti u prisutnosti određenih inhibitora, što ga čini izvrsnom opcijom za industrijske bioprocene sustave koji koriste lignoceluloznu i nelignoceluloznu biomasu (Dyerberg i sur., 2022).

Zahvaljujući tim sposobnostima, *D. hansenii* pokazuje izvanredne osobine u zahtjevnim uvjetima industrijskih bioprocena. Jedan od glavnih izazova s kojima se industrija suočava je velika količina otpada koja se generira, a koja može ozbiljno ugroziti okoliš i zdravlje ako se ne kontrolira. Iskorištavanje potencijala *D. hansenii* za revalorizaciju otpadnih tokova može doprinijeti održivom upravljanju otpadom i prijelazu s linearne na kružnu ekonomiju. Iz otpadnih tokova mogu se dobiti visoko vrijedne kemikalije kao npr. vitamini, antioksidansi i rekombinantni proteini, uključujući industrijske enzime i terapijske peptide. Ove karakteristike čine *D. hansenii* važnim alatom za postizanje ekološki prihvatljive i održive proizvodnje.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Radni mikroorganizmi

Radni mikroorganizmi korišteni u ovom istraživanju bili su kvasci *Debaryomyces hansenii* JCM 1990, *Pachysolen tannophilus* JCM 31685, *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 3418 i *Yarrowia lipolytica* DSM 21175, koji potječu iz zbirke mikroorganizama Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Radne kulture čuvane su pri 4 °C na odgovarajućim krutim hranjivim podlogama, smještenim u Petrijevim zdjelicama.

3.1.2. Kemikalije, komercijalni enzimi i sirovine

U ovom diplomskom radu korištene su kemikalije, komercijalni enzimi i sirovine koje su navedene u tablici 1.

Tablica 1. Kemikalije, enzimi i sirovine korišteni prilikom izrade ovog rada

Kemikalija	Stupanj čistoće	Proizvođač
3,5-dinitrosalicilna kiselina (DNS)	≥98 %	Sigma-Aldrich, SAD
albumin	≥96 %	Sigma-Aldrich, SAD
arabinoza	p.a.	Kemika, Hrvatska
bakrov(II)sulfat pentahidrat	99 %	Honeywell, SAD
blještac	/	Iz Podravine
Briljantno plava G	p.a.	Sigma-Aldrich, SAD
cinkov sulfat heptahidrat	99 %	Merck KgaA, Njemačka
D-(-)-fruktoza	za biokemiju i mikrobiologiju	Kemika, Hrvatska
fenol	99 %	Kemika, Hrvatska
glukoza	p.a.	Kemika, Hrvatska
kalcijev klorid	p.a.	Merck, Njemačka
kalijev dihidrogenfosfat	≥ 99 %	Kemika, Hrvatska
karboksimetil celuloza	99 %	Sigma-Aldrich, SAD
kobalt(II)sulfat heptahidrat	≥ 99 %	Sigma-Aldrich, SAD
ksilan > 95 %	> 95 %	Biosynth Carbosynth, Švicarska
ksiloza	≥ 99 %	Sigma-Aldrich, SAD
kukuruzna močevina	za upotrebu u biotehnologiji	Dynamite Baits, UK
kvaščeč ekstrakt	za upotrebu u biotehnologiji	Sigma-Aldrich, SAD
magnezijev sulfat heptahidrat	≥ 99 %	LACH NER d.o.o., Češka
mangan(II)sulfat	98 %	Kemika, Hrvatska
melasa	50 % saharoze, teh	Sladorana, Hrvatska
mikrokristalična celuloza	99 %	Sigma-Aldrich, SAD
natrijev hidroksid	≥ 98 %	Merck KGaA, Njemačka
natrijev sulfit	≥ 99 %	Sigma-Aldrich, SAD
tripton	za upotrebu u biotehnologiji	Sigma-Aldrich, SAD
Tween 80	99 %	Merck KgaA, Njemačka

3.1.3. Hranjive podloge

3.1.3.1. Hranjiva podloga za održavanje radnih mikroorganizama

Kulture odabranih vrsta kvasaca održavane su na krutim hranjivim podlogama, u Petrijevim zdjelicama, sastava : 20 g L⁻¹ glukoze, 20 g L⁻¹ triptona, 10 g L⁻¹ kvašćevog ekstrakta i 20 g L⁻¹ agara.

3.1.3.2. Hranjiva podloga za uzgoj inokuluma kvasaca *D. hansenii*, *P. tannophilus*, *S. cerevisiae* i *Y. lipolytica*

Za uzgoj inokuluma odabranih vrsta kvasaca, pripravljena je YPD (engl. *Yeast Extract-Peptone-Dextrose Broth*) tekuća hranjiva podloga u Erlenmeyerovim tikvicama. Ova podloga sastojala se od: 20 g L⁻¹ glukoze, 20 g L⁻¹ triptona i 10 g L⁻¹ kvašćevog ekstrakta. Sterilizacija hranjivih podloga provedena je u autoklavu pri temperaturi od 121 °C tijekom 20 minuta.

3.1.3.3. Hranjive podloge korištene u preliminarnim istraživanjima lignocelulolitičke aktivnosti kvasaca

Hranjive podloge korištene za uzgoj odabranih vrsta kvasaca u svrhu preliminarnog istraživanja lignocelulolitičke aktivnosti pripravljene su u Erlenmeyerovim tikvicama i sadržavale su: 10 g L⁻¹ jednog izvora ugljika (glukoza, fruktoza, arabinoza ili ksiloza), 5 g L⁻¹ kvašćevog ekstrakta, 2 g L⁻¹ peptona, 1 g L⁻¹ KH₂PO₄ i 0,5 g L⁻¹ MgSO₄ · 7 H₂O. Ove podloge, volumena 240 mL, sterilizirane su u autoklavu na 121 °C tijekom 20 minuta.

3.1.3.4. Hranjiva podloga za uzgoj inokuluma odabrane vrste kvasca

Za uzgoj inokuluma odabrane vrste kvasca korištena je YPD tekuća hranjiva podloga, čiji je sastav prethodno opisan u potpoglavlju 3.1.3.2. Međutim, prilikom uzgoja kvasca na fruktozi, podloga je prilagođena tako da umjesto 20 g L⁻¹ glukoze sadrži 10 g L⁻¹ fruktoze i 2 g L⁻¹ glukoze.

3.1.3.5. Hranjive podloge korištene u istraživanju lignocelulolitičke aktivnosti odabranog kvasca

Hranjive podloge za uzgoj odabrane vrste kvasca u Erlenmeyerovim tikvicama, usmjerene na proizvodnju lignocelulolitičkih enzima, pripravljene su s različitim sastavima. Svaka podloga sadržavala je jedan od četiri različita izvora ugljika: 20 g L⁻¹ glukoze, 20 g L⁻¹ fruktoze, 40 g L⁻¹ melase ili 2 g L⁻¹ glukoze s dodatkom čvrstog hidrolizata biljke blještac (*Phalaris*

arundinacea L.) u koncentraciji od 2 % (w/v). Korištena je biljka koja je prethodno osušena i usitnjena te tretirana s 1 % NaOH pri 180 °C tijekom 10 minuta.

Uz svaki izvor ugljika, kombiniran je jedan izvor dušika u svakoj od sljedećih koncentracija: 1 g L⁻¹, 5 g L⁻¹ i 10 g L⁻¹. Izvori dušika bili su kvašičev ekstrakt i kukuruzna močevina. Svaka podloga također je sadržavala 1 g L⁻¹ otopine Tweena 80. Hranjive podloge pripravljene su u volumenu od 240 mL u Erlenmeyerovim tikvicama i sterilizirane su u autoklavu pri 121 °C tijekom 20 minuta.

Za ovaj uzgoj pripravljena je i otopina mikroelemenata sastavljena od: 1 g L⁻¹ CoSO₄ · 7 H₂O, 1 g L⁻¹ CuSO₄ · 5 H₂O, 1 g L⁻¹ MnSO₄ i 1 g L⁻¹ CaCl₂. Ova otopina filtrirana je kroz jednokratni sterilni filter (0,20 µm, celuloza acetat; CHROMAFIL Xtra, Macherey-Nagel GmbH & Co., KG, Düren, Njemačka) i zatim dodana u hranjivu podlogu tijekom uzgoja odabranog kvasca.

3.1.3.6. Hranjiva podloga za uzgoj inokuluma odabrane vrste kvasca za uzgoj u bioreaktoru

Za uzgoj inokuluma odabrane vrste kvasca, koji će biti nacijepljen u bioreaktor, pripravljena je tekuća hranjiva podloga koja sadrži: 35 g L⁻¹ glukoze, 5 g L⁻¹ fruktoze, 20 g L⁻¹ kvašičevog ekstrakta i 20 g L⁻¹ peptona. Podloga je pripravljena u Erlenmeyerovim tikvicama i sterilizirana pri 121 °C tijekom 20 minuta.

3.1.3.7. Hranjiva podloga za uzgoj odabrane vrste kvasca u bioreaktoru

Hranjiva podloga za uzgoj odabrane vrste kvasca u bioreaktoru s miješalom sadržavala je 40 g L⁻¹ melase, 10 g L⁻¹ kvašičevog ekstrakta te 1 g L⁻¹ otopine Tween 80. Podloga je sterilizirana zajedno s bioreaktorom na 121 °C tijekom 20 minuta.

3.1.4. Oprema i uređaji

3.1.4.1. Centrifuga

Za izdvajanje biomase kvasaca iz suspenzije tijekom pripreme uzoraka za Bradfordovu i DNS analizu, kao i UPLC analizu korištena je centrifuga CF-10 High-Performance (Witeg, Njemačka; 9000rpm). Prilikom koncentriranja enzima korištena je centrifuga Thermo Scientific SL 8R (Thermo Fischer Scientific, SAD; 7000 rpm/4 °C/10 min).

3.1.4.2. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultra visoke djelotvornosti (UPLC)

Uređaj UPLC Agilent Technologies 1290 Infinity II (Santa Clara, SAD) korišten je za određivanje koncentracije supstrata i proizvoda metabolizma u uzorcima izuzetim tijekom

uzgoja. Uređaj se sastoji od pumpe (G7104A 1290 Flexible Pump), injektora (G7129B1290 Vialsampler), pećnice, analitičke kolone (Rezex ROA-Organic Acid H+, Phenomenex) dimenzija 150 x 7,8 mm s odgovarajućim pretkOLONAMA, detektora indeksa loma (G7162A 1260 RID) te računalnog softvera za obradu podataka (OpenLAB CDS). Kao mobilna faza korištena je 0,0025 M otopina sumporne kiseline protoka 0,6 mL min⁻¹, a volumen analiziranog uzorka iznosio je 10 µL.

3.1.4.3. Spektrofotometar

Spektrofotometar Cary 100, UV-VIS (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD) korišten je za određivanje optičke gustoće hranjive podloge kao pokazatelja rasta biomase odabrane vrste kvasca pri valnoj duljini od 600 nm. Također, tijekom enzimske DNS analize, određivana je koncentracija reducirajućih šećera mjerenjem apsorbancije pri 575 nm, dok je koncentracija ukupnih proteina određivana metodom po Bradfordu pri 595 nm.

3.1.4.4. Vage

Za vaganje kemikalija korištena je analitička vaga Acculab ALC210.4 (SAD) i tehnička vaga Tehnica ET-1211 (Slovenija).

3.1.4.5. Tresilica za mikrobiološke uzgoje

Uzgoji kvasaca u Erlenmeyerovim tikvicama provedeni su na tresilici Certomat RM (B. Braun Biotech. International, Sartorius group, Njemačka) pri 28 °C i 180 rpm.

3.1.4.6. Bioreaktor

U svrhu uzgoja odabranog kvasca u većem mjerilu korišten je bioreaktor Biostat C plus (Sartorius group, Njemačka) s miješalom, ukupnog volumena 30 L.

3.1.4.7. Ostala oprema

Od ostale opreme i pribora, korišten je autoklav za sterilizaciju podloga, laboratorijskog posuđa i dijelova bioreaktora. Za pohranu uzoraka na -20 °C korišten je zamrzivač (Gorenje, Slovenija). Termomikser TS-100 (BioSan, Latvija) je služio za miješanje i održavanje željene temperature tijekom DNS analize. Također, korištene su vortex miješalice LLG – unitexter 1 (LLG – Labware, Njemačka) za homogeniziranje uzoraka i magnetska miješalice (Tehnica ET - 1111, Slovenija) pri pripremi reagensa. Osim toga, korišteni su i plamenici, kao i stakleno i plastično laboratorijsko posuđe.

3.2. METODE

3.2.1. Uzgoj kvasaca u svrhu preliminarnih istraživanja lignocelulolitičke aktivnosti

Radni mikroorganizmi iz čistih kultura uzgojenih na čvrstim podlogama u Petrijevim zdjelicama preneseni su sterilnom ušicom u tekuće hranjive podloge za inokulum, čiji je sastav opisan u potpoglavlju 3.1.3.2. Te podloge su zatim stavljene na tresilicu na 24 sata pri 28 °C i 180 rpm kako bi se potaknuo rast inokuluma. Nakon toga, inokulum je nacijepljen u hranjive podloge korištene za preliminarna istraživanja enzimske aktivnosti, čiji je sastav detaljno opisan u potpoglavlju 3.1.3.3., čime je započeo uzgoj kvasaca submerznim postupkom.

Nacijepljene hranjive podloge inkubirane su na tresilici pri 28 °C i 180 rpm kako bi se procijenila sposobnost ispitivanih kvasaca u korištenju različitih izvora ugljika te utjecaj tih izvora na enzimsku aktivnost. Uzorci su uzimani u aseptičnim uvjetima u periodičnim vremenskim intervalima. Mjerene su optička gustoća biomase, ukupna količina proteina korištenjem Bradfordove metode, koncentracija reducirajućih šećera DNS analizom te koncentracija šećera u podlozi s pomoću UPLC-a. Na temelju rezultata DNS i UPLC analize izračunata je enzimska aktivnost. Cilj je bio identificirati kvasac koji ima najveću sposobnost proizvodnje lignocelulolitičkih enzima.

3.2.2. Uzgoj odabranog kvasca i optimizacija hranjive podloge radi povećanog prinosa lignocelulolitičkih enzima

Na temelju preliminarnih istraživanja identificiran je najbolji kvasac za proizvodnju lignocelulolitičkih enzima, nakon čega se pristupilo uzgoju tog kvasca. Za početak, pripremljen je inokulum odabranog kvasca, tako što je u hranjivu podlogu za inokulum (potpoglavlje 3.1.3.4.) sterilnom ušicom dodan mikroorganizam iz čiste kulture s čvrste hranjive podloge u aseptičnim uvjetima. Inokulum je inkubiran na tresilici pri 28 °C i 180 rpm. Nakon 24 sata inkubacije, u aseptičnim je uvjetima izuzeto 10 mL inokuluma te nacijepljeno u hranjive podloge za uzgoj.

Odabrani kvasac uzgajan je submerznim postupkom u hranjivim podlogama volumena 240 mL, smještenim u Erlenmeyerovim tikvicama. Podloge su sadržavale različite izvore ugljika, kao i različite izvore te koncentracije izvora dušika, kako je detaljno opisano u potpoglavlju 3.1.3.5. Cilj ovog pristupa bio je optimizirati sastav podloge kroz ispitivanje izvora te omjera ugljika i dušika koji najbolje podržava rast odabranog kvasca i rezultira najvećom lignocelulolitičkom aktivnošću. Uzgoj kvasca proveden je na tresilici pri 28 °C i 180 rpm. Treći

dan uzgoja, preko sterilnog filtera veličine pora 0,2 μm i u aseptičnim uvjetima, dodano je 1 mL otopine mikroelemenata (potpoglavlje 3.1.3.5.) kako bi se potaknula aktivnost kvasca u proizvodnji enzima.

Uzgoj u hranjivim podlogama koje su sadržavale glukozu i fruktozu trajao je 8 dana, dok je uzgoj u podlogama s melasom trajao 9 dana. Uzgoj s glukozom i čvrstim hidrolizatom biljke blještac trajao je 6 dana. Uzorci su prikupljeni u sterilnim uvjetima u periodičnim vremenskim intervalima. Tijekom analize, mjerena je optička gustoća biomase, ukupna količina proteina korištenjem Bradfordove metode, koncentracija reducirajućih šećera DNS analizom te koncentracija šećera u podlozi s pomoću UPLC-a. Na temelju rezultata DNS i UPLC analize izračunata je enzimska aktivnost.

3.2.3. Uzgoj odabrane vrste kvasca u bioreaktoru na hranjivoj podlozi optimalnog sastava

Nakon što su na temelju rezultata uzgoja odabranog kvasca u tikvicama utvrđeni optimalni izvor ugljika te izvor i koncentracija dušika za proizvodnju lignocelulolitičkih enzima, pripravljena je hranjiva podloga volumena 4,5 L za uzgoj u bioreaktoru s miješalom, čiji je sastav opisan u potpoglavlju 3.1.3.7.

U steriliziranu hranjivu podlogu u bioreaktoru nacijepljeno je 0,5 L inokuluma odabrane vrste kvasca, prethodno uzgojenog na podlozi za uzgoj inokuluma (potpoglavlje 3.1.3.6.). Pri inokulaciji je također dodano 20 mL otopine mikroelemenata, čiji je sastav opisan u potpoglavlju 3.1.3.5.

Proveden je uzgoj odabrane vrste kvasca šaržnim postupkom pri temperaturi od 30 °C, pH 5,85, uz aeraciju od 3 L min^{-1} i brzinom miješanja od 400 rpm. Pjenjenje je kontrolirano dodatkom antipjenića. Trajanje uzgoja iznosilo je 48 sati, a uzorci su prikupljeni u periodičnim vremenskim intervalima. Tijekom analize, mjerene su optička gustoća biomase, ukupna količina proteina korištenjem Bradfordove metode, koncentracija reducirajućih šećera DNS analizom te koncentracija šećera i proizvoda metabolizma u podlozi s pomoću UPLC-a. Na temelju rezultata DNS i UPLC analize izračunata je enzimska aktivnost.

3.2.4. Analitičke metode

3.2.4.1. *Određivanje optičke gustoće*

Tijekom svakog uzgoja, uzorci su prikupljeni i najprije homogenizirani na vrtložnoj miješalici. Nakon toga, suspenzija je prebačena u plastičnu kivetu koja je umetnuta u spektrofotometar,

gdje je mjerena optička gustoća pri 600 nm. Ovaj postupak omogućava praćenje rasta biomase kvasca.

3.2.4.2. Bradfordova metoda

Bradfordova metoda je tehnika koja omogućuje kvantifikaciju proteina. U ovoj metodi, koncentracija ukupnih proteina proporcionalna je apsorbanciji pri 595 nm, što je rezultat interakcije između proteina i boje Coomassie Brilliant Blue G-250 m (Bradford 1976). Kada se ova boja veže na proteinske molekule, dolazi do promjene u apsorpciji svjetlosti, pri čemu se maksimalna apsorpcija pomiče s 465 nm na 595 nm. Ova promjena omogućava preciznu kvantifikaciju proteina, budući da s povećanjem koncentracije proteina raste i apsorbancija.

Za početak, prikupljeni su uzorci centrifugirani kako bi se izdvojila biomasa kvasca iz suspenzije. Zatim je pomiješano 60 µL supernatanta uzorka s 1140 µL Bradfordovog reagensa u plastičnoj kiveti. Kiveta je ostavljena na sobnoj temperaturi 5 minuta nakon čega je izmjerena apsorbancija uzoraka na 595 nm korištenjem UV/VIS spektrofotometra. Koncentracije proteina u uzorcima izračunate su pomoću baždarnog dijagrama. Za njegovu izradu pripremljene su otopine s različitim masenim koncentracijama proteina albumina u Eppendorf kivetama. Mjerenjem apsorbancija na 595 nm za svaku od tih otopina, izrađena je jednadžba pravca [1], koja omogućava precizno i jednostavno izračunavanje koncentracije proteina u uzorcima.

$$\text{Abs} = 1,575 \cdot \text{koncentracija (g L}^{-1}\text{)} + 0,006 \quad [1]$$

3.2.4.3. DNS metoda

DNS metoda korištena je za određivanje koncentracije reducirajućih šećera. 3,5-dinitrosalicilna kiselina (DNS ili DNSA) je aromatski spoj koji reagira s reducirajućim šećerima i drugim reducirajućim molekulama da bi se stvorila 3-amino-5-nitrosalicilna kiselina, koja snažno apsorbira svjetlost na 540 nm (Miller, 1959). Aktivnost nekoliko celulolitičkih enzima može se procijeniti provođenjem inkubacije otopine uzorka s različitim celuloznim ili hemiceluloznim supstratima. Tijekom ovog procesa, enzimi razgrađuju celulozu i hemicelulozu, što rezultira oslobađanjem reducirajućih šećera. Nakon inkubacije, oslobođeni šećeri mogu se kvantificirati DNS metodom, budući da se 3,5-dinitrosalicilna kiselina veže na te šećere i apsorbira svjetlost pri određenoj valnoj duljini. Apsorbancija nastale otopine pri određenoj valnoj duljini proporcionalna je koncentraciji šećera u uzorku. Za precizno mjerenje, izrađene su baždarne krivulje [2] i [3], koje su dobivene mjerenjem apsorbancije otopina glukoze i ksiloze različitih koncentracija nakon reakcije s DNS reagensom.

Baždarni pravac za glukozu: $y = 2,747x - 0,351$ [2]

Baždarni pravac za ksilozu: $y = 2,785x - 0,076$ [3]

Korištena su tri supstrata: natrijeva karboksimetil celuloza (CMC), mikrokristalna celuloza (MCC) i ksilan. Jedna jedinica enzimске aktivnosti = U određena je kao količina enzima koji otpušta 1 μmol odgovarajućeg reducirajućeg šećera u minuti. Specifična enzimска aktivnost izražena je kao enzimске jedinice po gramu ukupnih proteina ($\text{U g}_{\text{uk.proteina}}^{-1}$).

Uzorci za analizu prikupljeni su svakih 24 sata te centrifugirani kako bi se izdvojila biomasa kvasca iz suspenzije. Zatim je u svrhu DNS analize razrijeđeno 500 μL supernatanta uzorka s 500 μL vode. Izvagano je 5 – 10 mg supstrata u reakcijsku epruvetu od 2000 μL i dodano 1000 μL razrijeđene otopine uzorka. Reakcijske epruvete stavljene su na inkubaciju 30 minuta na termo tresilici pri 45 °C. Nakon inkubacije uzorci su centrifugirani 5 minuta pri 10 000 okretaja u minuti kako bi se istaložio višak supstrata. Potom je 600 μL supernatanta dodano u 600 μL DNSA reagensa u reakcijskoj epruveti od 2000 mL. Smjesa je inkubirana 15 minuta na 95 °C. U slučaju prisutnosti redukcijskih šećera inkubaciju prati razvoj boje iz žute (boja DNA reagensa) u jantarnu. Uzorak je ostavljen 5 minuta na ledu i zatim je mjerena apsorbancija pri 575 nm na UV/VIS spektrometru. Na temelju izmjerene apsorbancije, iz baždarnog pravca dobivena je odgovarajuća koncentracija koja uključuje šećere oslobođene iz supstrata, kao i šećere preostale u podlozi.

Enzimска aktivnost (U L^{-1}) = oslobođeni šećer (μmol) / vrijeme inkubacije (min) \cdot 1 L \cdot faktor razrjeđenja [4]

Specifična enzimска aktivnost ($\text{U g}_{\text{uk.proteina}}^{-1}$) = enzimска aktivnost (U L^{-1}) \cdot masena koncentracija proteina (g L^{-1}) [5]

3.2.4.4. Priprema i analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti (UPLC)

Bilo je potrebno izračunati preostalu koncentraciju šećera u hranjivoj podlozi kako bi se, pomoću razlike između te vrijednosti i ukupnog šećera izmjenog DNS analizom, odredila koncentracija šećera oslobođenog enzimskom reakcijom. Ova koncentracija oslobođenog šećera bit će korištena u jednadžbi za određivanje enzimске aktivnosti [4], opisanoj u poglavlju 3.2.4.4. Za određivanje koncentracije šećera u podlozi korišten je UPLC; Agilent Technologies 1290 Infinity II LC sustav (Santa Clara, CA, Sjedinjene Države), Carbo-H++ predkolona (4 mm \times 3 mm; Phenomenex, Des Plaines, IL, Sjedinjene Države), kolumna Rezex ROA (15 cm \times

7,8 mm; Phenomenex, Des Plaines, IL, Sjedinjene Države). Mobilna faza bila je 0,0025 M H₂SO₄, volumen analiziranog uzorka bio je 10 µl, a brzina protoka bila je 0,6 ml min⁻¹.

Uzorci za UPLC analizu pripremljeni su tako da je alikvot od 750 µl supernatanta svakog pojedinog uzorka pomiješan sa 750 µl 10 % w/w ZnSO₄ u Eppendorf reakcijskoj epruveti ukupnog volumena 2 mL. Dobivena otopina homogenizirana je na vrtložnoj miješalici i ostavljena da stoji 5 minuta kako bi se istaložili proteini i nečistoće. Zatim je sadržaj epruvete centrifugiran pri 13.500 o/min tijekom 5 min (CF-10, witeg Labortechnik GmbH, Offenburg, Njemačka). Naposljetku, sadržaj reakcijske epruvete filtriran je kroz 0,20µm najlonski filter pomoću štrcaljke (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Njemačka) u staklenu vijalu kako bi se uklonili istaloženi proteini i tako pripremljeni uzorci stavljeni su u UPLC uređaj.

3.2.4.5. Statistička analiza

Standardna devijacija eksperimentalnih podataka u preliminarnim istraživanjima izračunata je korištenjem standardne procedure u softveru Statistica 12.0 (StatSoft; Tulsa, OK; SAD). Standardna devijacija prikazana je na slikama u obliku trake na stupcima. U preliminarnom istraživanju, svi eksperimenti ponovljeni su barem u duplikatu, a dobiveni rezultati prikazani su kao prosječne vrijednosti na slikama.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Lignocelulozne sirovine su široko rasprostranjene i predstavljaju značajan resurs za razne biotehnološke procese usmjerene na proizvodnju visokovrijednih proizvoda. Da bi se ove sirovine mogle učinkovito iskoristiti od strane mikroorganizama, nužna je njihova predobrada. Jedan od najefikasnijih koraka u tom procesu je kombinacija blago kiselinske i biološke hidrolize, koja uključuje enzimsku razgradnju predobrađene lignocelulozne sirovine. Lignocelulolitički enzimi ne samo da igraju ključnu ulogu u ovom procesu, već imaju i široku primjenu u drugim industrijama (npr. prehrambena, industrija papira i biogoriva).

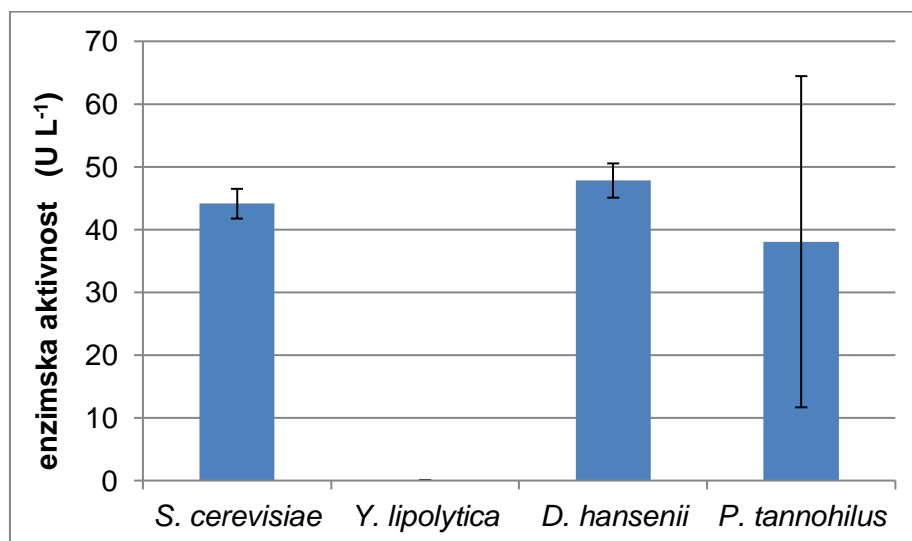
U ovom diplomskom radu fokus je bio istraživanje sposobnosti odabranih vrsta kvasaca u proizvodnji lignocelulolitičkih enzima. Osim toga, analizirana je mogućnost povećanja prinosa tih enzima putem optimizacije sastava hranjive podloge za uzgoj kvasaca.

Rezultati diplomskog rada podijeljeni su u nekoliko međusobno povezanih poglavlja. U poglavlju 4.1. predstavljeni su rezultati uzgoja odabranih vrsta kvasaca u tikvicama, s ciljem preliminarnе analize lignocelulolitičke aktivnosti. Na temelju tih rezultata identificiran je kvasac koji najefikasnije proizvodi lignocelulolitičke enzime. Poglavlje 4.2. fokusira se na optimizaciju sastava hranjive podloge za uzgoj ovog kvasca, s ciljem povećanja prinosa lignocelulolitičkih enzima. Ovo poglavlje podijeljeno je u nekoliko potpoglavlja koja se bave uzgojem kvasca u tikvicama na hranjivim podlogama koje sadrže različite izvore ugljika: 4.2.1. glukozu, 4.2.2. glukozu uz predobrađenu biomasu blješca, 4.2.3. melasu i 4.2.4. fruktozu. U svakom od ovih potpoglavlja uspoređivane su specifične enzimске aktivnosti dobivene tijekom uzgoja kvasca na hranjivim podlogama s različitim koncentracijama kvašćevog ekstrakta i kukuruzne močevine kao izvorima dušika. U potpoglavlju 4.2.5. sveukupno je analiziran utjecaj izvora ugljika i dušika na specifičnu enzimsku aktivnost te je na temelju tih rezultata odabran optimalni sastav hranjive podloge za uzgoj u većem mjerilu. Naposljetku, u poglavlju 4.3. analizirani su rezultati uzgoja odabranog kvasca na hranjivoj podlozi optimalnog sastava za uzgoj u većem mjerilu tj. bioreaktoru.

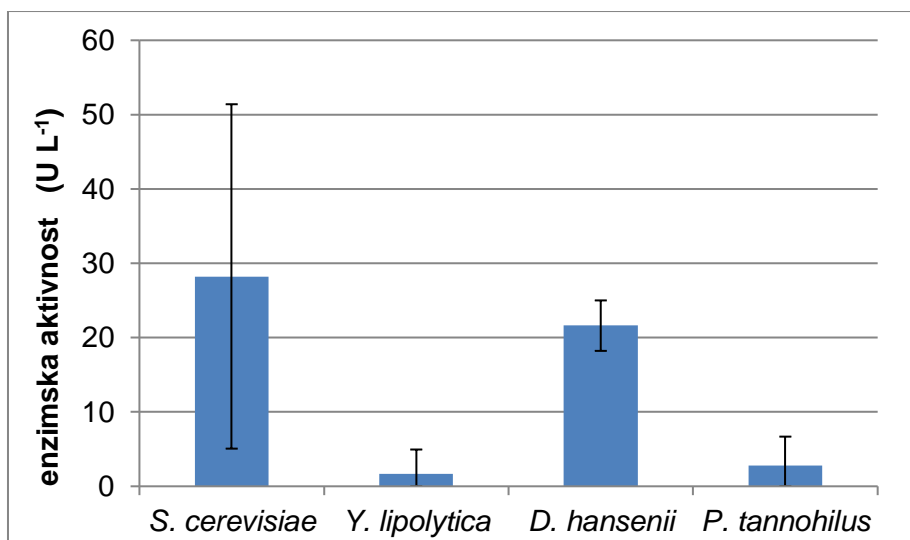
4.1. Uzgoj odabranih vrsta kvasaca tijekom preliminarnih istraživanja lignocelulolitičke aktivnosti

U preliminarnom istraživanju korišteni su sljedeći kvasci: *Debaryomyces hansenii* JCM 1990, *Pachysolen tannophilus* JCM 31685, *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 3418 i *Yarrowia lipolytica* DSM 21175. Uzgoj ovih kvasaca proveden je submerznim postupkom u tikvicama s ciljem identifikacije vrste koja posjeduje najveću sposobnost proizvodnje lignocelulolitičkih enzima. Detaljan opis ovog postupka nalazi se u potpoglavlju 3.2.1., a sastav hranjivih podloga u potpoglavlju 3.1.3.3.

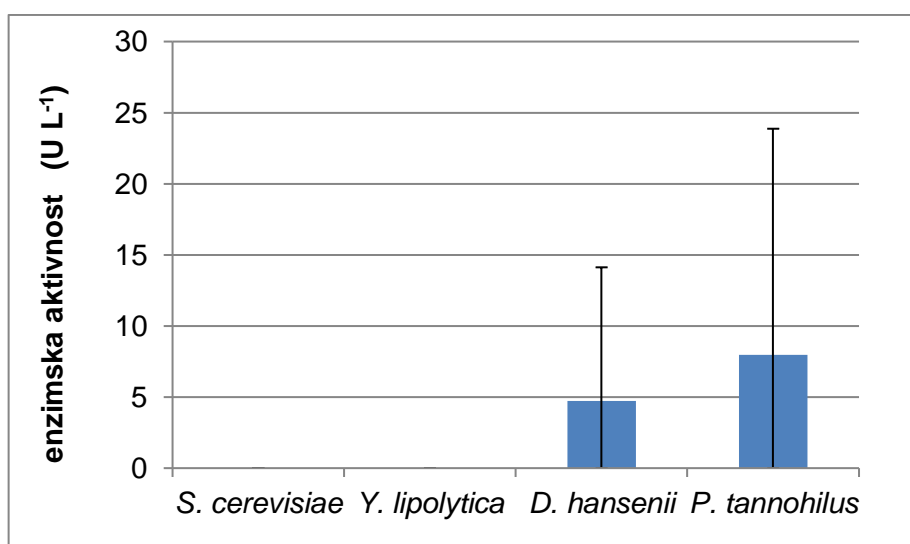
Svaki od kvasaca uzgajan je u hranjivim podlogama koje su sadržavale različite izvore ugljika, uključujući glukozu, fruktozu, ksilozu i arabinozu. Tijekom svakog uzgoja mjerena je koncentracija oslobođenih šećera kombinacijom DNS metode (potpoglavlje 3.2.4.3.) i UPLC analize (potpoglavlje 3.2.4.4.). Na temelju dobivenih rezultata izračunata je aktivnost karboksimetil celulaze (CMC-aze) prema jednadžbi [4], pri čemu je kao supstrat korišten kompleksni šećer natrijeva karboksimetil celuloza. Rezultati mjerenja enzimske aktivnosti CMC-aze prikazani su na slikama 1– 4, koje prikazuju prosječnu aktivnost odabranih vrsta kvasaca na različitim izvorima ugljika.



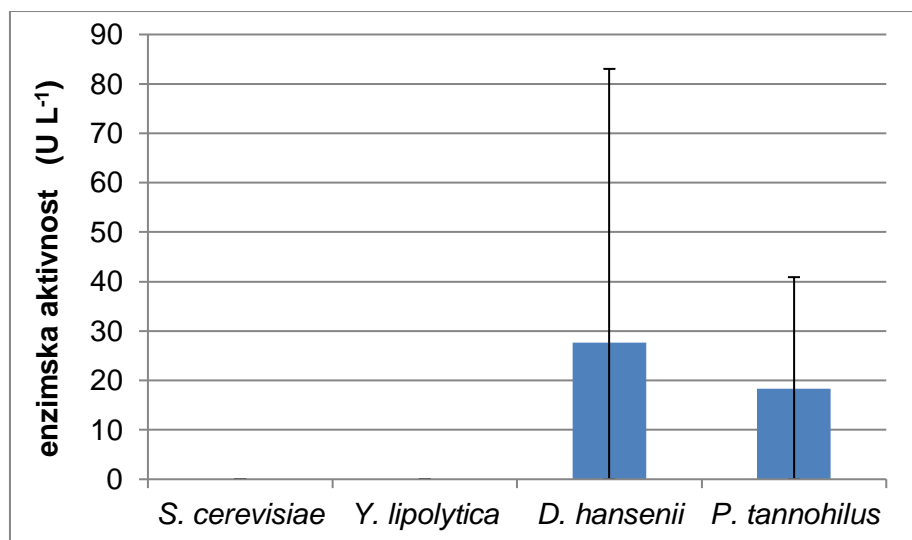
Slika 1. Prosječna enzimna aktivnost kod odabranih vrsta kvasaca na glukozu kao izvoru ugljika



Slika 2. Prosječna enzimna aktivnost odabranih vrsta kvasaca na fruktozi kao izvoru ugljika



Slika 3. Prosječna enzimna aktivnost odabranih vrsta kvasaca na ksilozi kao izvoru ugljika



Slika 4. Prosječna enzimska aktivnost odabranih vrsta kvasaca na arabinozi kao izvoru ugljika

Iz rezultata prikazanih na slikama 1 - 4 vidljivo je da je kvasac *D. hansenii* pokazao najveću prosječnu enzimsku aktivnost u usporedbi s drugim kvascima na hranjivim podlogama s glukozom i arabinozom kao izvorima ugljika, a ona je iznosila 47,81 U L⁻¹ odnosno 27,68 U L⁻¹ (slika 1, slika 4). Ovi rezultati su u skladu s onima od Giese i sur. (2017), gdje je na celobiozi *D. hansenii* postigao aktivnost CMC-aze u vrijednosti od 65 U L⁻¹. Dakle, *D. hansenii* se pokazao kao učinkovit proizvođač CMC-aze, što dodatno podupiru prethodna istraživanja koja ističu rod *Debaryomyces* kao jedan od mikroorganizama koji konstitutivno proizvodi celulaze i ksilanaze (Barbosa i sur., 2010). S druge strane, *S. cerevisiae* ostvario je najveću prosječnu enzimsku aktivnost u hranjivoj podlozi s fruktozom (slika 2), dok je u podlozi s glukozom pokazao samo malo manju aktivnost u odnosu na *D. hansenii*. Međutim, *S. cerevisiae* nije pokazao enzimsku aktivnost u hranjivim podlogama s ksilozom i arabinozom kao izvorima ugljika (slika 3, slika 4). Kvasac *Y. lipolytica* pokazao je enzimsku aktivnost isključivo na podlozi s fruktozom, ali ta je aktivnost bila vrlo mala. U hranjivoj podlozi s fruktozom najveću prosječnu enzimsku aktivnost postigao je *P. tannophilus*, u vrijednosti od 7,96 U L⁻¹, dok je njegova aktivnost u podlogama s ostalim šećerima također bila prisutna, ali nešto manja u odnosu na druge kvasce.

Očito je da su u hranjivim podlogama s glukozom i fruktozom kao izvorima ugljika postignute enzimске aktivnosti kod gotovo svih ispitanih vrsta kvasaca te se na tim šećerima mogu primijetiti neke od najvećih vrijednosti. Razlog tome je što su heksoze preferirani izvor ugljika većini kvasaca (Tsoutsos, 2010). Naime, glukoza i fruktoza se lakše metaboliziraju od arabinoze i ksiloze, jer brzo ulaze u glikolizu, dok pentoze zahtijevaju dodatne metaboličke korake i prisustvo specifičnih enzima koje mnogi kvasci nemaju. Može se uočiti da su *D. hansenii* i *P. tannophilus* porasli u podlogama sa svim ispitivanim izvorima ugljika, što je u skladu s literaturom koja navodi da ovi mikroorganizmi mogu metabolizirati i heksoze i pentoze (Dyerberg i sur., 2022; Aristidou i Penttilä, 2000). Ova sposobnost predstavlja značajnu prednost u procesima obrade lignocelulozne sirovine, koja se sastoji od celuloze, čiji je osnovni monomer glukoza, te hemiceluloze koja, osim glukoze, uključuje i pentoznu frakciju, najčešće u obliku arabinoze i ksiloze. Ova sinergija omogućava učinkovitiju fermentaciju i maksimalnu iskoristivost dostupnih šećera, što može dovesti do povećanja prinosa bioetanolu i drugih korisnih bioprodukata. Također, upotreba mikroorganizama koji mogu metabolizirati širok spektar ugljikohidrata može značajno smanjiti troškove proizvodnje, čime se poboljšava ukupna ekonomska održivost biotehnoških procesa.

Sveukupno, *D. hansenii* se ističe najvećom prosječnom enzimskom aktivnošću u podlozi s glukozom kao izvorom ugljika, a njegova aktivnost također je izmjerena na ostalim ispitivanim šećerima, uključujući pentoze i heksoze. Dodatna prednost ovog kvasca je njegova sposobnost rasta u prisutnosti određenih inhibitora koji se oslobađaju tijekom kemijske i biološke predobrade lignocelulozne sirovine. Primjerice, može podnijeti do 4 g L⁻¹ furfurala i 2 g L⁻¹ hidrosimetilfurfurala, a ta tolerancija se povećava u prisustvu natrija u hranjivoj podlozi (Dyerberg i sur., 2022). Osim toga, *D. hansenii* je halofil koji može rasti u podlogama s velikim koncentracijama soli, što znači da čista voda neće biti potrebna za industrijsku proizvodnju biomase. Korištenje velikih koncentracija soli također smanjuje rizik od kontaminacije odnosno potrebu za sterilizacijom čime se smanjuju troškovi biotehnoške proizvodnje (Navarrete i sur., 2020; Navarrete i Martínez, 2020).

Sposobnost *D. hansenii* da koristi različite izvore ugljika i da raste u prisutnosti određenih inhibitora čini ga zanimljivim za primjenu u industrijskim bioprocima koji se temelje na lignoceluloznim sirovinama. Stoga je *D. hansenii* odabran za daljnja istraživanja usmjerena na optimizaciju procesa proizvodnje lignocelulolitičkih enzima.

4.2. Optimizacija sastava hranjive podloge za uzgoj *D. hansenii* s ciljem povećanja prinosa lignocelulolitičkih enzima

Na temelju rezultata preliminarnih istraživanja, za daljnji uzgoj i optimizaciju sastava hranjive podloge, odabran je kvasac *D. hansenii*. Cilj je bio unaprijediti sastav hranjive podloge za uzgoj ovog kvasca kako bi se povećala lignocelulolitička aktivnost. Optimizacija je provedena kroz varijacije izvora ugljika, kao i izvora i koncentracije dušika.

Ovaj pristup optimizaciji sastava hranjive podloge za uzgoj odabran je zato što je proizvodnja enzima, neophodnih za brojne biotehnološke procese, energetski i nutritivno zahtjevna, pri čemu su i ugljik i dušik od esencijalne važnosti. Dušik igra ključnu ulogu u anabolizmu mikrobnih stanica, procesu kojim se stvaraju esencijalne molekule poput aminokiselina, građevnih blokova proteina i enzima, te nukleinskih kiselina, nositelja genetske informacije (Berkeley, 2023). Ugljik iz hranjive podloge osigurava energiju za rast mikroorganizama i proizvodnju enzima, dok je dušik, kao sastojak proteina, također neophodan za mikrobnii rast.

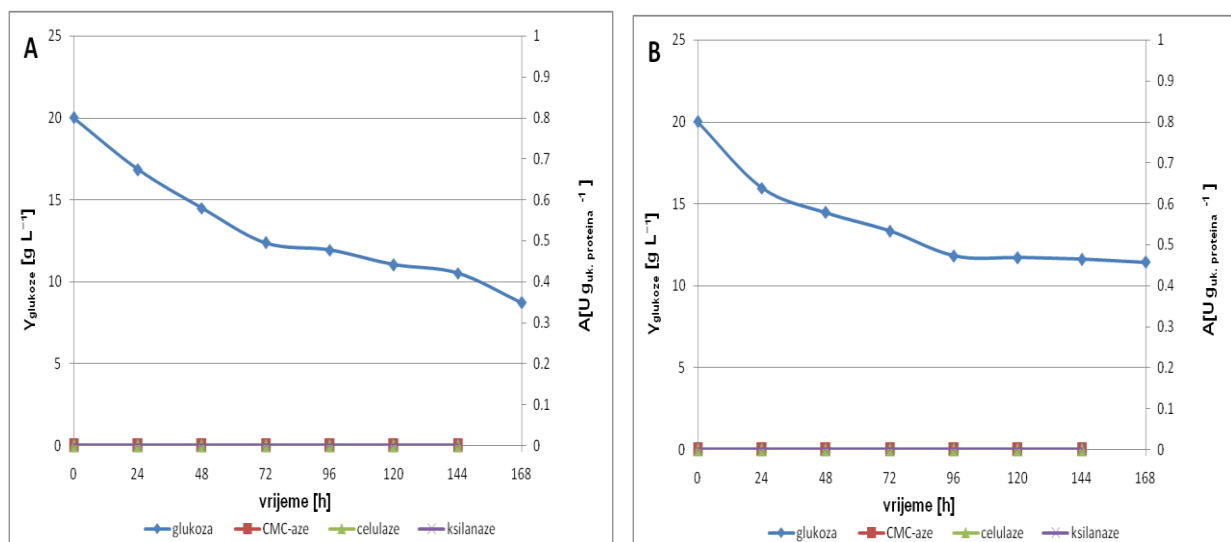
Hernández i Hobbie (2010) navode kako varijacije u sastavu hranjive podloge mogu utjecati na aktivnost ekstracelularnih enzima kroz dva glavna mehanizma. Prvi mehanizam, nazvan "model ograničenja resursa", sugerira da veća dostupnost lako dostupnog ugljika i dušika potiče mikroorganizme na ulaganje u proizvodnju enzima kako bi brzo razgradili dostupne supstrate. Međutim, Kochova teorija mikrobne ekonomičnosti (1985) nudi alternativni pogled, tvrdeći da mikroorganizmi povećavaju proizvodnju enzima upravo kada su hranjive tvari oskudne, što im omogućuje efikasniju razgradnju kompleksnijih resursa. Drugi mehanizam, "model stimulacije supstratom", pretpostavlja da se aktivnost enzima može regulirati direktnom prisutnošću supstrata koji razgrađuju, što dovodi do povećane aktivnosti specifičnih enzima.

D. hansenii je uzgajan u Erlenmeyerovim tikvicama submerznim postupkom, čiji su detalji opisani u potpoglavlju 3.2.2. Tekuće hranjive podloge sadržavale su četiri različita izvora ugljika: glukozu, fruktozu, glukozu uz čvrsti hidrolizat blješca te melasu. Uz to, svaka podloga uključivala je jedan od izvora dušika, kvašćev ekstrakt ili kukuruznu močevinu, u različitim koncentracijama: 1, 5 ili 10 g L⁻¹ (potpoglavlje 3.1.3.5.). Tijekom svakog uzgoja mjerena je koncentracija oslobođenih šećera kombinacijom DNS metode (potpoglavlje 3.2.4.3.) i UPLC analize (potpoglavlje 3.2.4.4.), a rezultati su korišteni za izračun enzimске aktivnosti prema jednadžbi [4]. Praćena je enzimska aktivnost triju različitih skupina enzima: celulaza, karboksimetil celulaza (CMC-aza) i ksilanaza, s pomoću supstrata kristalične celuloze, natrijev karboksimetil celuloze i ksilana. Za izračun specifične enzimске aktivnosti, prema jednadžbi

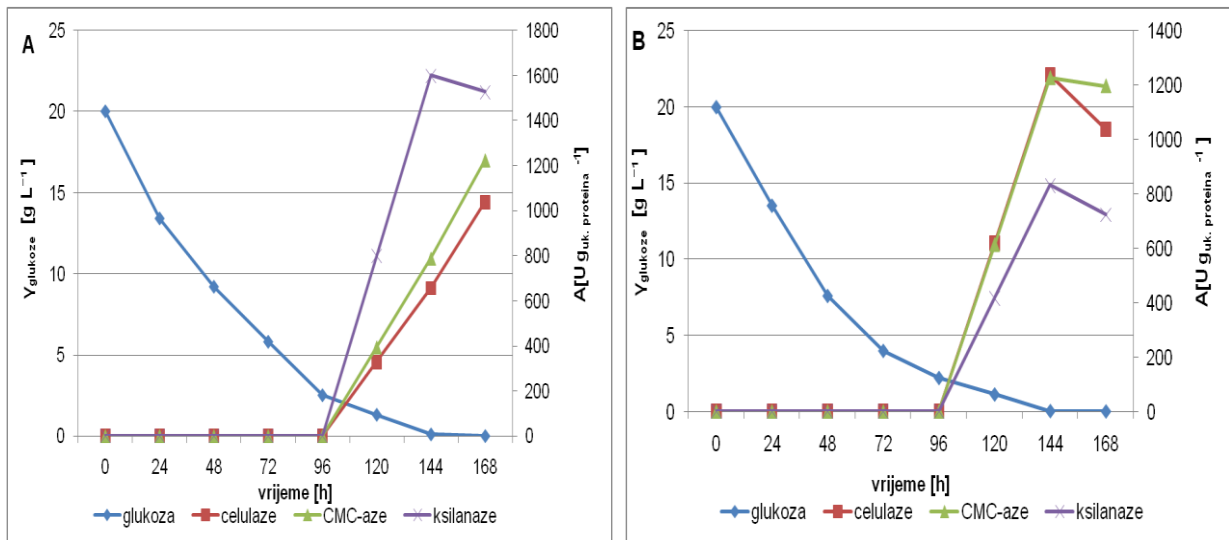
[5], korištena je još i koncentracija ukupnih proteina dobivena Bradfordovom metodom (Potpoglavlje 3.2.4.2).

4.2.1. Uzgoj *D. hansenii* na glukozi kao izvoru ugljika, uz različite izvore dušika i njihove koncentracije

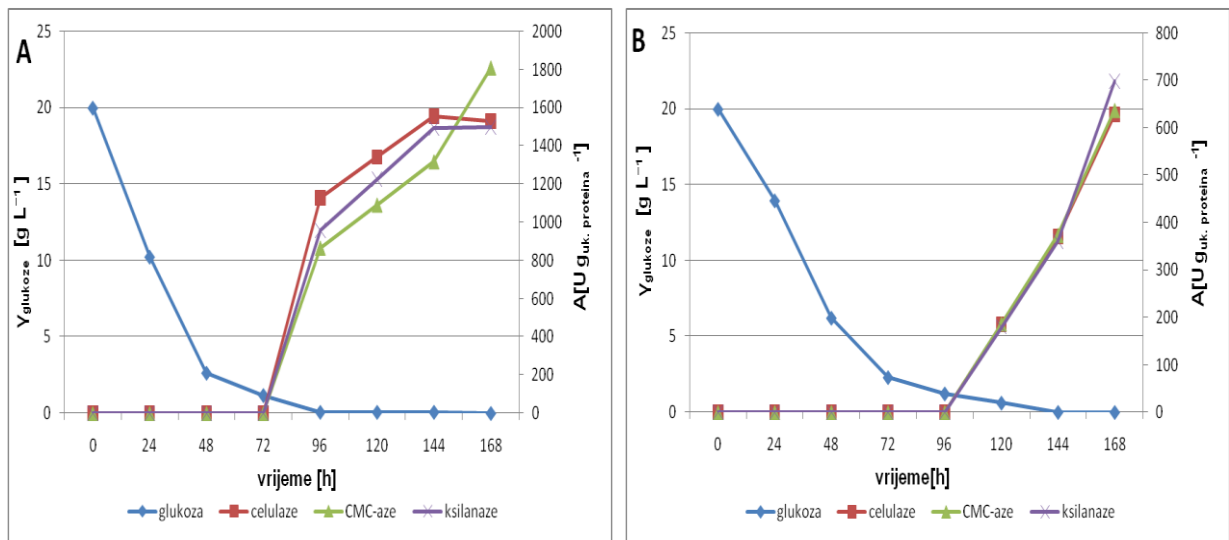
D. hansenii je uzgajan u hranjivim podlogama s konstantnom koncentracijom glukoze od 20 g L⁻¹, dok su koncentracije izvora dušika varirale. Na slikama 5 – 7 usporedno su prikazane specifične enzimске aktivnosti s kvašćevim ekstraktom i kukuruznom močevinom kao izvorima dušika, pri koncentracijama od 1, 5 i 10 g L⁻¹.



Slika 5. Promjena specifične enzimске aktivnosti CMC-aza, celulaza i ksijanaza na glukozi kao izvoru ugljika, uz kvašćev ekstrakt (A) odnosno kukuruznu močevinu (B) kao izvore dušika pri koncentraciji od 1 g L⁻¹.



Slika 6. Promjena specifične enzimске aktivnosti CMC-aza, celulaza i ksilanaza na glukozi kao izvoru ugljika, uz kvašćev ekstrakt (A) odnosno kukuruznu močevinu (B) kao izvore dušika pri koncentraciji od 5 g L⁻¹



Slika 7. Promjena specifične enzimске aktivnosti CMC-aza, celulaza i ksilanaza na glukozi kao izvoru ugljika, uz kvašćev ekstrakt (A) odnosno kukuruznu močevinu (B) kao izvore dušika pri koncentraciji od 10 g L⁻¹

U hranjivoj podlozi s glukozom kao izvorom ugljika, pri koncentraciji od 1 g L^{-1} kvašćevog ekstrakta odnosno kukuruzne močevine, nije izmjerena enzimska aktivnost ni jednog od ispitivanih enzima (slika 5A, 5B). Kvasac je samo djelomično potrošio glukozu iz hranjive podloge. Prethodna istraživanja naglašavaju važnost adekvatne koncentracije izvora dušika u hranjivim podlogama (Reddy i Kanwal, 2022). Naime, izvori dušika moraju biti prisutni u koncentracijama koje osiguravaju optimalno djelovanje enzima i pravilnu ekspresija gena, posebno onih koji se odnose na celulaze i ksilanaze (Yang i sur., 2023; England i sur., 2010). Rezultati ovog istraživanja ukazuju na to da koncentracija od 1 g L^{-1} nije dovoljna za poticanje proizvodnje lignocelulolitičkih enzima kod proučavanih izvora dušika. Ova mala koncentracija mogla je ograničiti rast *D. hansenii* na glukozu i inhibirati enzimsku aktivnost, što objašnjava neiskorištenu glukozu u hranjivoj podlozi. Naime, dušik igra ključnu ulogu u sintezi primarnih i sekundarnih metabolita, uključujući proteine, aminokiseline i nukleotide (Li i sur., 2024). Stoga, njegov nedostatak može uzrokovati manjak resursa neophodnih za sintezu proteina i enzima bitnih za metabolizam šećera, kao i za metabolizam proizvodnje enzima.

Na slici 6 prikazan je porast specifične enzimске aktivnosti pri koncentraciji izvora dušika od 5 g L^{-1} , koji je zabilježen nakon 96 sati, kako na kvašćevom ekstraktu (A), tako i na kukuruznoj močevini (B). Na kvašćevom ekstraktu izmjerena je vrlo visoka aktivnost ksilanaze u vrijednosti od $1600,00 \text{ U g}_{\text{uk.proteina}}^{-1}$, dok je ta aktivnost bila značajno manja na kukuruznoj močevini, u iznosu od $832,38 \text{ U g}_{\text{uk.proteina}}^{-1}$. S druge strane, specifične aktivnosti CMC-aze i celulaze bile su nešto veće na kukuruznoj močevini u usporedbi s onima na kvašćevom ekstraktu.

Na slici 7 se može primijetiti da je pri koncentraciji izvora dušika od 10 g L^{-1} zabilježen porast specifične enzimске aktivnosti već nakon 72 sata na kvašćevom ekstraktu (A), a nakon 96 sati na kukuruznoj močevini (B). Maksimalna aktivnost u oba slučaja postignuta je u 168. satu uzgoja. Na kvašćevom ekstraktu specifične enzimске aktivnosti svih ispitivanih enzima bile su vrlo velike, pri čemu je maksimalna vrijednost CMC-aze iznosila $1807,12 \text{ U g}_{\text{uk.proteina}}^{-1}$. S druge strane, na kukuruznoj močevini zabilježene su specifične enzimске aktivnosti koje su bile dvostruko manje, s maksimalnom vrijednošću CMC-aze od $637,284 \text{ U g}_{\text{uk.proteina}}^{-1}$.

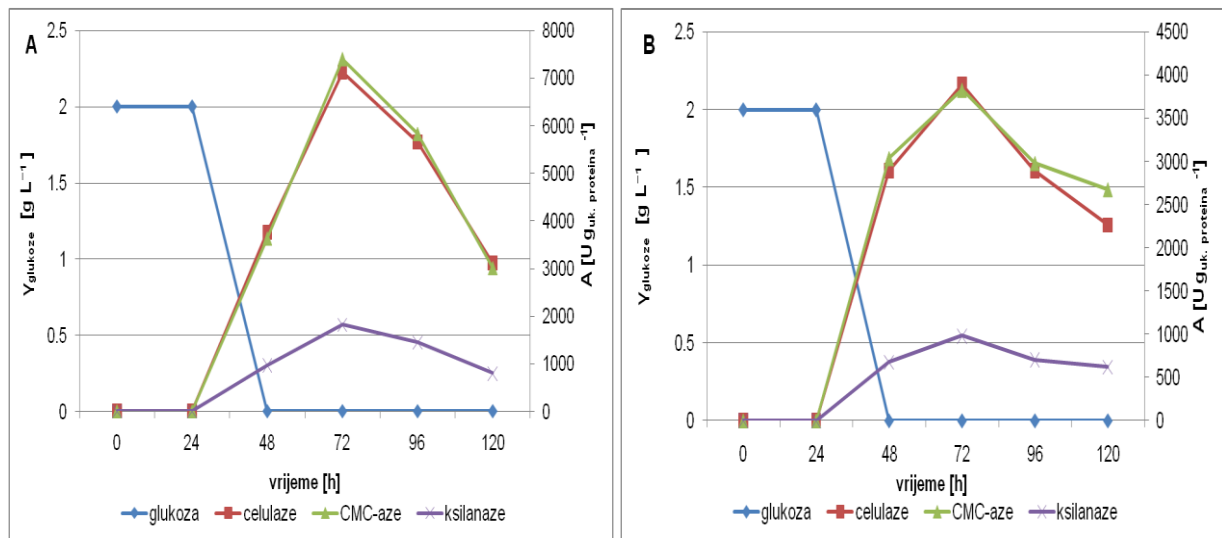
Usporedbom specifičnih enzimskih aktivnosti na određenom izvoru, pri različitim koncentracijama dušika, može se primijetiti da je na kvašćevom ekstraktu postignuta veća aktivnost pri koncentraciji od 10 g L^{-1} u odnosu na 5 g L^{-1} , a pri 1 g L^{-1} aktivnosti nije bilo. Najveća koncentracija optimizirala je dostupnost dušika i potaknula sintezu enzima potrebnih za razgradnju lignoceluloznog supstrata. S druge strane, na kukuruznoj močevini izmjerene

su veće specifične enzimске aktivnosti pri koncentraciji od 5 g L⁻¹. Naime, ovi organski izvori dušika imaju različite kemijske i fiziološke karakteristike, stoga optimalno djeluju pri različitim koncentracijama. Istraživanja su pokazala da priroda i koncentracija dušika predstavljaju ključne faktore koji utječu na regulaciju enzima (Okal i sur., 2020). Moguće je da veća koncentracija kukurzne močevine može inhibirati rast mikroorganizama ili promijeniti njihov metabolizam, što dovodi do smanjenja enzimске aktivnosti. Ovi rezultati ukazuju na to da prilagodba koncentracije dušika može značajno utjecati na enzimsku aktivnost, ovisno o korištenom izvoru.

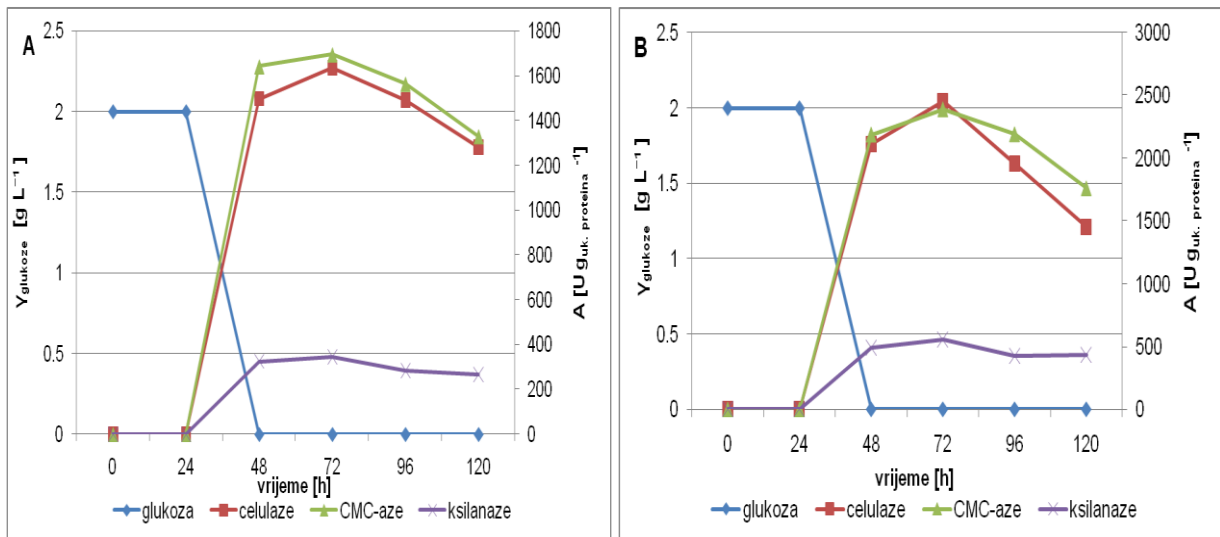
Sveukupno, najveće vrijednosti specifičnih enzimskih aktivnosti izmjerene su u hranjivoj podlozi s kvaščevim ekstraktom od 10 g L⁻¹. Omjer izvora ugljika i dušika bio je 2:1, što sugerira da je ova kombinacija optimalna za proizvodnju lignocelulolitičkih enzima na glukozu. Istraživanje de Almeida i suradnika (2013) također je istaknulo kvaščev ekstrakt kao najbolji organski izvor dušika, rezultirajući najvećom aktivnošću lipaza kod kvasca *Candida viswanathii*. S druge strane, prema Gottschalku i suradnicima (2013), siromašni izvori dušika pogodovali su gljivi *Aspergillus awamori* u akumulaciji ksilanaze, β-ksilozidaze i feruloil esteraze. Međutim, najveća akumulacija β-glukozidaze postignuta je korištenjem bogatog organskog izvora dušika, kvaščevog ekstrakta.

4.2.2. Uzgoj *D. hansenii* na glukozi i lignoceluloznoj sirovini, uz različite izvore dušika i njihove koncentracije

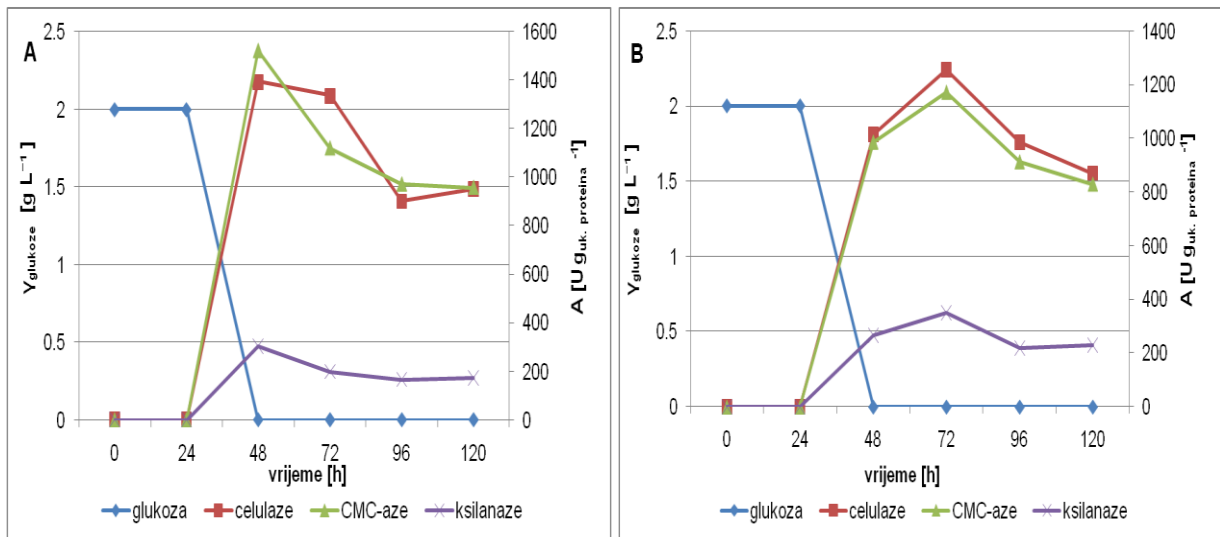
D. hansenii je uzgajan u hranjivim podlogama koje su sadržavale glukozu u koncentraciji od 2 g L^{-1} , zajedno s predobrađenom lignoceluloznom sirovinom, biljkom blještac (*Phalaris arundinacea* L.), u koncentraciji od 2% (w/v). Osim toga, različite hranjive podloge sadržavale su raznolike izvore dušika. Na slikama 8 - 10 prikazane su specifične enzimске aktivnosti, uspoređujući učinke kvašćevog ekstrakta i kukuruzne močevine pri koncentracijama od $1,5$ i 10 g L^{-1} .



Slika 8. Promjena specifične enzimске aktivnosti na glukozi i čvrstom hidrolizatu biljke blještac, uz kvašćev ekstrakt (A) odnosno kukuruznu močevinu (B) kao izvore dušika pri koncentraciji od 1 g L^{-1}



Slika 9. Promjena specifične enzimске aktivnosti na glukozi i čvrstom hidrolizatu biljke bještac, uz kvašćev ekstrakt (A) odnosno kukuruznu močevinu (B) kao izvore dušika pri koncentraciji od 5 g L⁻¹



Slika 10. Promjena specifične enzimске aktivnosti na glukozi i čvrstom hidrolizatu biljke bještac, uz kvašćev ekstrakt (A) odnosno kukuruznu močevinu (B) kao izvore dušika pri koncentraciji od 10 g L⁻¹

Na slici 8 vidljivo je da je pri koncentraciji izvora dušika od 1 g L^{-1} , maksimalna specifična enzimska aktivnost postignuta nakon 72 sata uzgoja, i to za oba ispitivana izvora (A i B). Međutim, vrijednosti su bile značajno veće na kvašćevom ekstraktu, s aktivnostima celulaze i CMC-aze oko $7000 \text{ U g}_{\text{uk.proteina}}^{-1}$, u odnosu na približno $3800 \text{ U g}_{\text{uk.proteina}}^{-1}$ na kukuruznoj močevini. Pri koncentraciji od 5 g L^{-1} ispitivane specifične enzimске aktivnosti bile su nešto veće na kukuruznoj močevini u odnosu na kvašćev ekstrakt (slike 9A i 9B), s postignutim maksimumom također u 72. satu uzgoja. Pri koncentraciji od 10 g L^{-1} , vrijednosti specifične enzimске aktivnosti CMC-aze i celulaze na kvašćevom ekstraktu bile su tek neznatno veće u odnosu na kukuruznu močevinu (slike 10A i 10B). Aktivnosti ksilanaze bile su približno jednake za oba izvora, ali značajno manje u odnosu na druge enzime u svim varijantama hranjive podloge. Sveukupno, kvašćev ekstrakt pri koncentraciji od 1 g L^{-1} pokazao se kao najbolji izvor dušika kod uzgoja *D. hansenii* u prisutnosti lignocelulozne sirovine i glukoze.

Na svakom od izvora i pri svakoj koncentraciji dušika primjećuje se trend u kojem je specifična enzimska aktivnost ispitivanih enzima dosegla maksimum, nakon čega je došlo do postupnog smanjenja, što je u skladu s istraživanjem Qureshi i sur. (2012) koji sugeriraju da smanjenje proizvodnje enzima tijekom daljnje inkubacije može biti posljedica smanjenja hranjivih tvari, inaktivacije stanica, kataboličke represije ugljikom i nakupljanja inhibitora u hranjivoj podlozi.

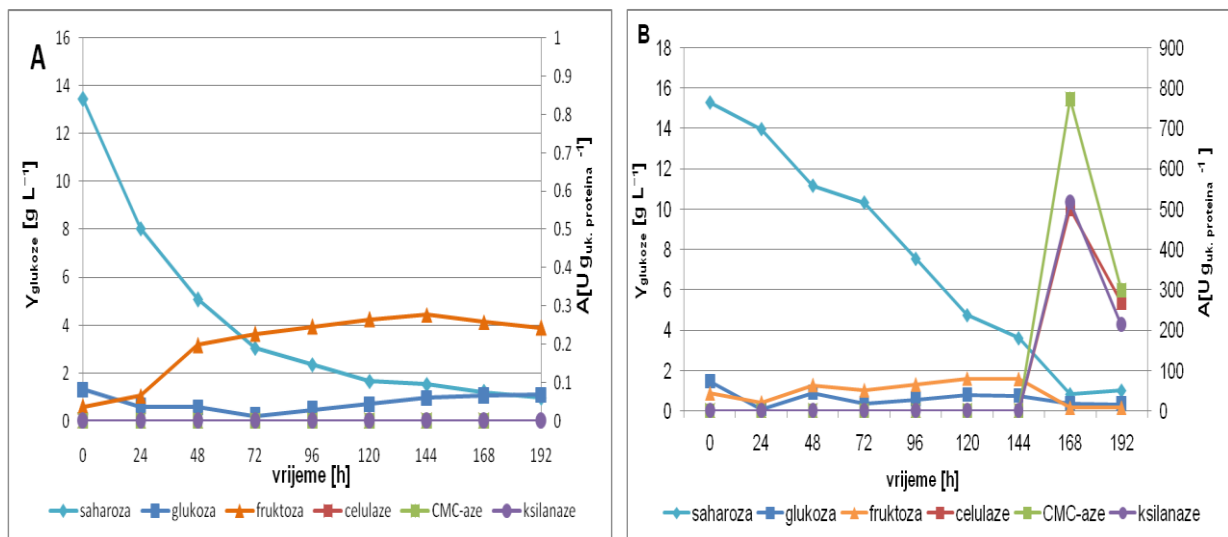
Usporedbom specifičnih enzimskih aktivnosti na određenom izvoru dušika, pri različitim koncentracijama, rezultati su pokazali da je aktivnost najveća pri koncentraciji od 1 g L^{-1} , kako na kvašćevom ekstraktu, tako i na kukuruznoj močevini. Nadalje, na oba izvora dušika i za sve ispitivane enzime primijećeno je da se pri koncentraciji od 5 g L^{-1} specifična aktivnost značajno smanjuje, dok je pri 10 g L^{-1} aktivnost još manja. Naime, C/N omjer je poznat kao ključni parametar u bioprocesima, budući da utječe na rast stanica i proizvodnju metabolita (Walker i Walker, 2018). Koncentracija izvora dušika od 1 g L^{-1} , uz omjer izvora ugljika i dušika 2:1, očito pruža optimalne uvjete za djelovanje enzima, što može biti rezultat idealnog balansa hranjivih tvari.

Međutim, primijećeno je da veća koncentracija dušika dovodi do značajnog smanjenja specifične enzimске aktivnosti. Ovaj pad može ukazivati na inhibiciju aktivnosti, koja može biti uzrokovana toksičnim učincima većih koncentracija dušika ili neadekvatnim omjerom sastojaka hranjive podloge. Santos i sur. (2016) istraživali su utjecaj izvora ugljika i dušika na dugovječnost stanica kvasca *S. cerevisiae* te su zaključili da neadekvatan omjer ovih izvora može dovesti do pojave replikacijskog stresa u stanicama, koji rezultira gubitkom njihove vijabilnosti i skraćivanjem životnog vijeka. U mediju koji je sadržavao 2 % glukoze

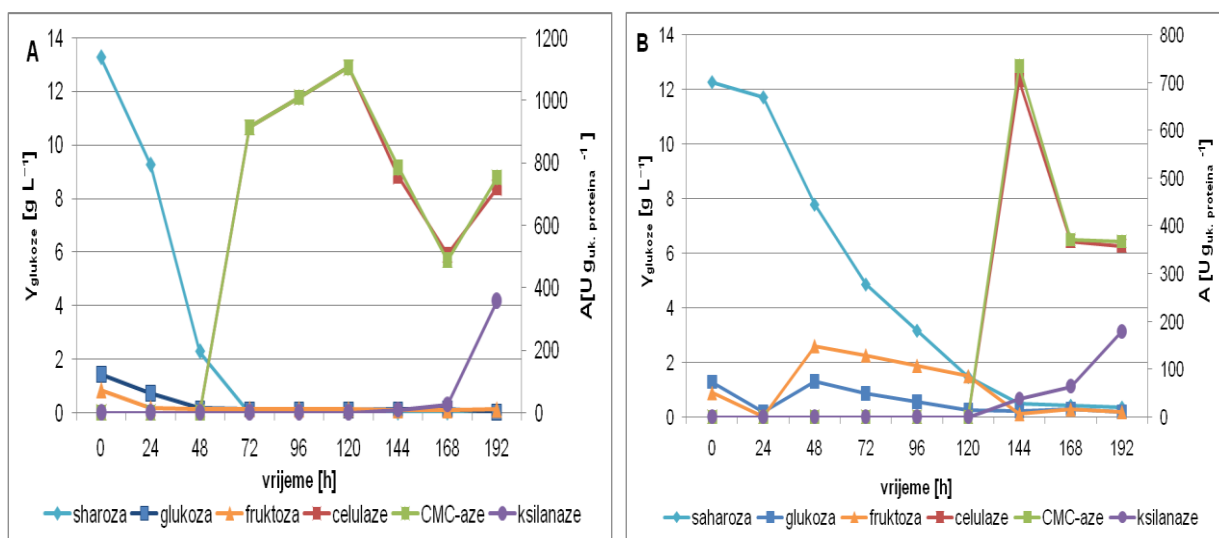
koncentracije iznad 0,1 % amonijaka dovele su do postupnog skraćivanja životnog vijeka stanica, s gotovo nikakvim preživljavanjem stanica 9. dan pri koncentraciji od 1,0 % amonijaka. Naime, jedna od posljedica gubitka vijabilnosti stanica jest smanjena proizvodnja enzima. Stoga ovi rezultati naglašavaju važnost pažljivog sastavljanja hranjivih podloga za biotehnoške procese kako bi se osigurala maksimalna enzimska aktivnost.

4.2.3. Uzgoj *D. hansenii* na melasi kao izvoru ugljika, uz različite koncentracije i izvore dušika

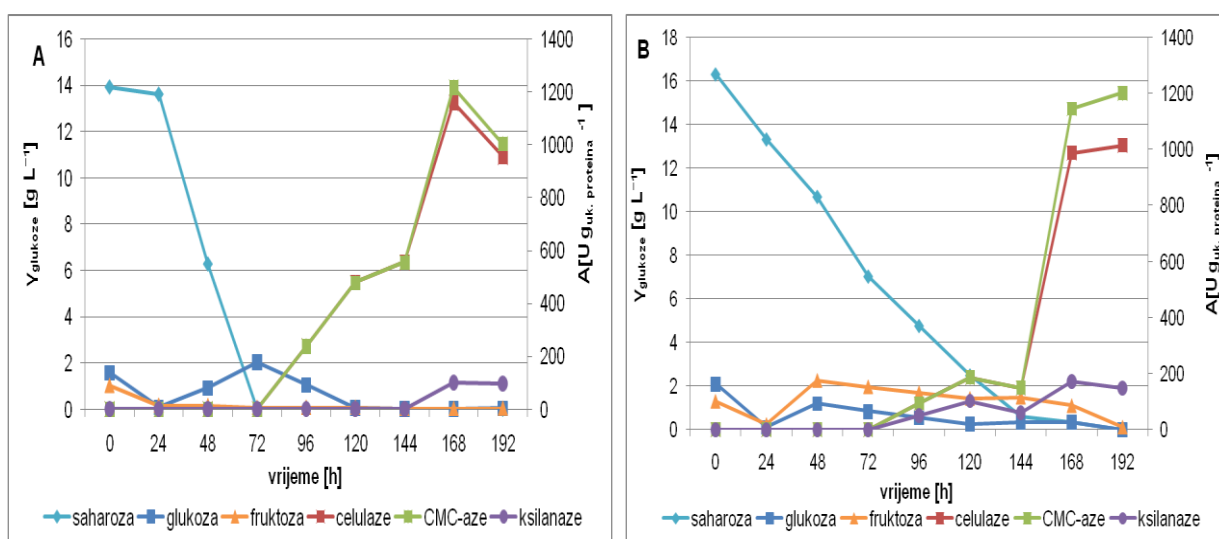
D. hansenii je uzgajan u hranjivim podlogama s konstantnom koncentracijom melase u iznosu od 40 g L⁻¹, a uz varijabilne koncentracije izvora dušika. Melasa je gusta, tamna tekućina koja nastaje kao nusproizvod tijekom procesa proizvodnje šećera iz šećerne trske ili šećerne repe. Sastoji od otprilike 50 % (w/w) ukupnih šećera (pretežno saharoze, glukoze i fruktoze), vode, sirovog proteina i masti, teških metala, vitamina i drugih hranjivih tvari (Jiang i sur., 2009). Na slikama 11 – 13 usporedno je prikazana specifična enzimska aktivnost u hranjivim podlogama s kvašćevim ekstraktom ili kukuruznom močevinom pri koncentracijama od 1, 5 i 10 g L⁻¹.



Slika 11. Promjena specifične enzimске aktivnosti na melasi kao izvoru ugljika, uz kvašćev ekstrakt (A) odnosno kukuruznu močevinu (B) kao izvore dušika pri koncentraciji od 1 g L⁻¹



Slika 12. Promjena specifične enzimske aktivnosti na melasi kao izvoru ugljika, uz kvašćev ekstrakt (A) odnosno kukuruznu močevinu (B) kao izvore dušika pri koncentraciji od 5 g L⁻¹



Slika 13. Promjena specifične enzimske aktivnosti na melasi kao izvoru ugljika, uz kvašćev ekstrakt (A) odnosno kukuruznu močevinu (B) kao izvore dušika pri koncentraciji od 10 g L⁻¹

U hranjivoj podlozi s kvašćevim ekstraktom pri koncentraciji od 1 g L⁻¹ nije izmjerena specifična enzimska aktivnost (slika 11A). S druge strane, na kukuruznoj močevini je, iako tek nakon 144 sata uzgoja, a zabilježene vrijednosti nisu bile posebno velike (Slika 11B). Na slici 12 prikazano je da je pri koncentraciji izvora dušika od 5 g L⁻¹ specifična enzimska aktivnost ispitivanih enzima bila veća u hranjivoj podlozi s kvašćevim ekstraktom (A) u usporedbi s kukuruznom močevinom (B). Osim toga, aktivnost na kvašćevom ekstraktu zabilježena je već nakon 48 sati uzgoja, dok se na kukuruznoj močevini javila tek nakon 120 sati. Pri koncentraciji izvora dušika od 10 g L⁻¹ (slika 13A i 13B), specifične enzimske aktivnosti bile su približno jednake na kukuruznoj močevini i kvašćevom ekstraktu, s tim da su aktivnosti CMC-aze i

celulaze bile nešto veće na kvašćevom ekstraktu, dok je aktivnost ksilanaze bila nešto veća na kukuruznoj močevini. U oba je slučaja specifična enzimaska aktivnost zabilježena nakon 72 sata.

Usporedbom specifičnih enzimskih aktivnosti na određenom izvoru dušika pri različitim koncentracijama, utvrđeno je da je u hranjivim podlogama s kvašćevim ekstraktom povećanje njegove koncentracije dovelo do rasta specifične aktivnosti većine ispitivanih enzima, osim ksilanaze, koja je bila najaktivnija pri 5 g L^{-1} . U podlogama s kukuruznom močevinom, specifične enzimске aktivnosti pri 1 g L^{-1} i 5 g L^{-1} bile su približno jednake, osim kod ksilanaze, čija je aktivnost bila značajno veća pri 1 g L^{-1} . Nadalje, pri koncentraciji od 10 g L^{-1} kukuruzne močevine, također je zabilježeno povećanje specifične enzimске aktivnosti u usporedbi s manjim koncentracijama. Dakle, očito je u ovom slučaju veća koncentracija dušika pogodovala proizvodnji lignocelulolitičkih enzima. U dostupnoj literaturi postoje kontradiktorni podaci o utjecaju prirode i koncentracije izvora dušika na proizvodnju lignocelulolitičkih enzima. U slučaju *Trichoderma reesei*, smanjenje regulatora dušika rezultiralo je smanjenjem proizvodnje celulaze, uz niže razine ekspresije gena za celulazu (Qian i sur., 2023). Nasuprot tome, pokazalo se da dušik potiskuje ekspresiju ligninolitičkih enzima kod bazidiomiceta bijele truleži (Edwards i sur., 2011).

Sveukupno, na kvašćevom ekstraktu pri koncentraciji od 10 g L^{-1} , uz omjer izvora ugljika i dušika 2:1, zabilježene su najveće vrijednosti specifične enzimске aktivnosti, što sugerira da su ovaj izvor i ta koncentracija optimalni za proizvodnju lignocelulolitičkih enzima s pomoću *D. hansenii* na melasi. Također, He i sur. su (2014) zabilježili da bi se neki lignocelulozni enzimi, poput ksiloglukanaze, ksilanaze i endoglukanaze, mogli proizvoditi s pomoću *T. reesei* u mediju koji sadrži melasu od trske. Nadalje, zaključili su da je saharoza iz melase dobar induktor ksilanaze kod *T. reesei*. Naime, u njihovom istraživanju zabilježene su značajno veće aktivnosti ksilanaze, koje su dosegle čak $3670 \text{ U g}_{\text{uk.proteina}}^{-1}$, dok je u ovom istraživanju maksimalna aktivnost ksilanaze iznosila samo $518,61 \text{ U g}_{\text{uk.proteina}}^{-1}$. Međutim, najveća vrijednost CMC-aze u ovom istraživanju iznosila je $1216,89 \text{ U g}_{\text{uk.proteina}}^{-1}$, dok su oni postigli samo $115 \text{ U g}_{\text{uk.proteina}}^{-1}$.

4.2.4. Uzgoj *D. hansenii* na fruktozi kao izvoru ugljika, uz različite izvore i koncentracije dušika

D. hansenii uzgajan je u hranjivim podlogama koje su sadržavale 20 g L⁻¹ fruktoze kao izvor ugljika, uz kvašćev ekstrakt ili kukuruznu močevinu kao izvor dušika u koncentracijama od 1,5 ili 10 g L⁻¹. Međutim, ni kod jednog od ovih izvora ili koncentracija nije zabilježena enzimska aktivnost ispitivanih enzima. Uzgoj *D. hansenii* na fruktozi ponovljen je dva puta, pri čemu je u hranjivu podlogu za inokulum dodana fruktoza (potpoglavlje 3.1.3.4.) kako bi se kvasac lakše prilagodio na njen metabolizam. Ipak, *D. hansenii* nije mogao u potpunosti metabolizirati fruktozu ni pri jednoj varijanti izvora i koncentracije dušika, što je rezultiralo izostankom enzimске aktivnosti. S druge strane, u preliminarnim istraživanjima, gdje je koncentracija fruktoze bila 10 g L⁻¹, *D. hansenii* pokazao je enzimsku aktivnost (poglavlje 4.1.). Ovi rezultati sugeriraju da pri koncentraciji od 20 g L⁻¹ može doći do inhibicije fruktozom, ili da omjeri C/N u kombinaciji s fruktozom i ispitivanim izvorima dušika nisu optimalni.

U literaturi postoje različiti podaci za enzimsku aktivnost u hranjivoj podlozi s fruktozom, ali ni jedan u kontekstu proizvodnje lignocelulolitičkih enzima s pomoću *D. hansenii*. U slučaju gljive *Pleurotus sajor-caju*, aktivnost lakaze bila je značajno veća u mediju obogaćenom fruktozom (Bettin i sur., 2008). Nasuprot tome, Prasher (2015) je zabilježio da gljiva *Dictyoarthrinium synnematicum* pokazuje maksimalnu aktivnost lakaze s laktozom, dok u mediju s fruktozom nije postignuta nikakva aktivnost. Ovo potvrđuje da proizvodnja lignocelulolitičkih enzima ovisi o različitim faktorima, uključujući vrstu mikroorganizma, uvjete uzgoja te izvore ugljika i dušika, kao i njihove koncentracije (Stajčić i sur., 2006; Kapich i sur., 2004).

4.2.5. Usporedba specifičnih enzimskih aktivnosti na ispitivanim izvorima ugljika i dušika s ciljem odabira optimalnog sastava hranjive podloge za uzgoj u većem mjerilu

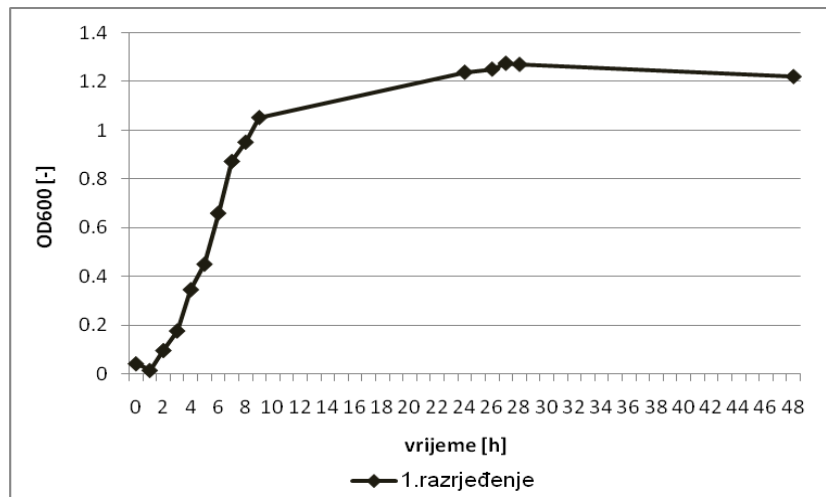
Usporedbom rezultata uzgoja na različitim izvorima ugljika primjećuje se da su neke od najvećih vrijednosti specifičnih enzimskih aktivnosti postignute u hranjivoj podlozi s 2 g L⁻¹ glukoze i čvrstim hidrolizatom biljke blještac. Moguće je da je lignocelulozna sirovina djelovala kao induktor lignocelulolitičkih enzima, što je u skladu s Hernándezovim i Hobbijevim (2010) "modelom stimulacije supstratom". Slično tome, istraživanje Reddyja i Kanwala (2022) pokazalo je da je korištenje poljoprivrednog otpada kao prirodnog induktora potaknulo rast gljive *Morchella spongiosa* i aktivnost lignocelulolitičkih enzima u usporedbi s kontrolnom skupinom. Naime, enzimi uključeni u kataboličke puteve inducirani su u prisutnosti spojeva koji su predodređeni za razgradnju kroz te puteve (Punekar, 2018). Međutim, važno je napomenuti da je kod uzgoja na čvrstom hidrolizatu biljke blještac enzimska reakcija trajala 15 minuta, dok je na ostalim izvorima ugljika trajala 30 minuta, što je, prema jednadžbi za određivanje enzimске aktivnosti [4], rezultiralo većim enzimskim aktivnostima. U hranjivim

podlogama koje sadrže glukozu i melasu, zabilježene su približno jednake vrijednosti specifične enzimске aktivnosti CMC-aze i celulaze, pri čemu su one na glukozu bile nešto veće. Ovaj rezultat može biti posljedica prisutnosti proteina u melasi, što može rezultirati prividno manjom specifičnom enzimskom aktivnošću. U usporedbi s glukozom i drugim izvorima ugljika, melasa, koja sadrži velike koncentracije šećera, predstavlja jeftinu sirovinu za proizvodnju bioproizvoda s dodanom vrijednošću putem biokonverzije (Zhang i sur., 2019). Zbog toga je melasa odabrana kao izvor ugljika u hranjivoj podlozi za uzgoj *D. hansenii* u većem mjerilu.

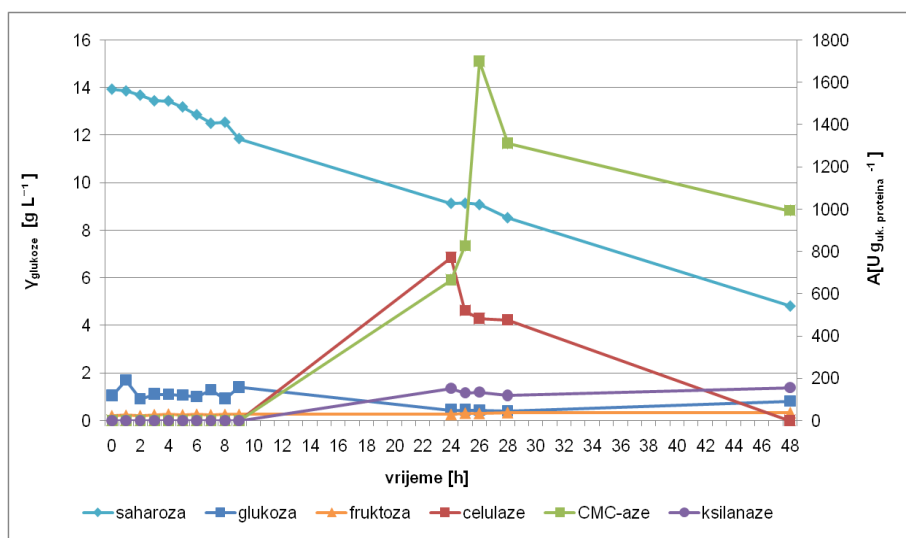
Što se tiče izvora dušika, u hranjivim podlogama s kvašćevim ekstraktom postignuta je veća specifična enzimska aktivnost ispitivanih enzima u većini slučajeva. Ovo sugerira da je kvašćev ekstrakt bolji organski izvor dušika od kukuruzne močevine za uzgoj lignocelulolitičkih enzima s pomoću *D. hansenii*. Nadalje, povećanjem koncentracije dušika došlo je do povećanja specifične enzimске aktivnosti, uz optimalan omjer izvora ugljika i dušika 2:1. Ovaj podatak je u skladu s Hernándezovim i Hobbijevim (2010) "modelom ograničenja resursa", prema kojem povećanje dostupnosti dušika potiče proizvodnju enzima. Zbog toga je kvašćev ekstrakt u koncentraciji od 10 g L⁻¹ odabran kao izvor dušika za uzgoj *D. hansenii* u većem mjerilu.

4.3. Uzgoj *D. hansenii* na optimiziranoj hranjivoj podlozi u bioreaktoru

D. hansenii je uzgajan u bioreaktoru s miješalom submerznim postupkom u tekućoj hranjivoj podlozi. Detalji ovog postupka opisani su u potpoglavlju 3.2.3., a sastav podloge opisan je u 3.1.3.7. Melasa, u koncentraciji od 40 g L^{-1} korištena je kao izvor ugljika, dok je kvašćev ekstrakt u koncentraciji od 10 g L^{-1} služio kao izvor dušika. Na slikama 14 i 15 prikazana je promjena specifične enzimске aktivnosti te promjena koncentracije biomase u vremenu.



Slika 14. Promjena OD600 [-] tijekom uzgoja *D. hansenii* u bioreaktoru na melasi kao izvoru ugljika i kvašćevom ekstraktu kao izvoru dušika



Slika 15. Promjena specifične enzimске aktivnosti u bioreaktoru

Slika 14 prikazuje promjenu optičke gustoće tijekom uzgoja, koja je mjerena na 600 nm za prvo decimalno razrjeđenje kvasčeve biomase. Od početka uzgoja do 2. sata odvijala se lag faza, gdje je biomasa ostala konstantna, jer su se stanice prilagođavale novim uvjetima i nisu se dijelile. Nakon toga, od 2. do 9. sata, uslijedila je eksponencijalna faza, obilježena naglim porastom koncentracije biomase zbog ubrzanog dijeljenja stanica. Nakon 9. sata, rast biomase se značajno usporio, što je označilo početak stacionarne faze, tijekom koje se zabilježio vrlo mali porast koncentracije biomase do 27. sata. Nakon toga, koncentracija biomase se počela blago smanjivati, prelazeći u fazu odumiranja, uzrokovanu iscrpljenjem nutrijenata i nakupljanjem toksičnih produkata.

Na slici 15 prikazan je odnos između potrošnje saharoze, glukoze i fruktoze i specifične enzimске aktivnosti tijekom uzgoja kvasca u bioreaktoru. U početnoj fazi, do 9. sata, saharoza se razgrađivala dok su koncentracije glukoze i fruktoze ostale uglavnom konstantne. To sugerira da je kvasac prvenstveno koristio monosaharide oslobođene hidrolizom saharoze, čime se održavala njihova konstantna koncentracija. Nakon 9. sata, pojavila se enzimska aktivnost svih ispitivanih enzima, što se poklopilo s početkom stacionarne faze. Dok se koncentracija saharoze smanjivala od 9. do 24. sata, specifična aktivnost celulaze je rasla, dosegnuvši svoj maksimum od $482,76 \text{ U g}_{\text{uk.proteina}}^{-1}$, a maksimum CMC-aze postignut je u 26. satu u vrijednosti od $1700 \text{ U g}_{\text{uk.proteina}}^{-1}$. Ovaj porast sugerira da su ovi enzimi inducirani prisutnošću saharoze ili produkata njezine razgradnje. Do 28. sata, aktivnost oba enzima smanjivala se, a nakon 28. sata uslijedio je nagli pad enzimске aktivnosti, koji se poklopio s fazom odumiranja kvasca. Aktivnost ksilanaze također je detektirana nakon 9. sata uzgoja, gdje je postignuta vrijednost od samo $153,10 \text{ U g}_{\text{uk.proteina}}^{-1}$, koja je ostala približno konstantna do kraja uzgoja. Niska aktivnost ksilanaze tijekom cijelog razdoblja sugerira da uvjeti u bioreaktoru nisu bili optimalni za njezinu proizvodnju ili da kvasac korišten u istraživanju ima ograničenu sposobnost sinteze ksilanaze.

Specifična enzimska aktivnost detektirana je tijekom stacionarne faze, pri čemu je na kraju te faze došlo do smanjenja aktivnosti. Istraživanje Sakpetch i sur. (2017) također je pokazalo da je maksimalna proizvodnja lignocelulolitičkih enzima povezana s rastom mikroorganizama, posebno tijekom stacionarne faze. U ovom su istraživanju ispitivani hidrolitički i ligninolitički enzimi kod bakterijskih i gljivičnih izolata, kao i aktinomiceta. Kada stanice pređu u stacionarnu fazu, dolazi do brojnih fizioloških, morfoloških i promjena u ekspresiji gena. Ou i sur. (2004) navode da prinos proteina u stacionarnoj fazi kod bakterija može biti čak 121% veći u odnosu na logaritamsku fazu. S druge strane, u fazi micelijalnog rasta (eksponencijalnoj fazi) gljiva *A. bisporus* i *G. lucidum* zabilježena je znatno veća ekspresija gena i enzima koji modificiraju lignin (Zhou i sur., 2018; Patyshakuliyeva i sur., 2015). Ovi rezultati ukazuju na to da vrsta

mikroorganizma i različiti faktori koji utječu na rast igraju ključnu ulogu u regulaciji enzimske aktivnosti. Stoga je važno razumjeti metabolizam mikroorganizma, uključujući fazu rasta u kojoj se najviše eksprimiraju željeni enzimi, kako bi se optimizirali uvjeti uzgoja, povećao prinos enzima i poboljšala ekonomičnost procesa.

Dio uzorka uzetog nakon 48 sati je analiziran, dok je drugi dio prvo centrifugiran radi koncentriranja enzima, a potom analiziran. Izmjerene specifične enzimske aktivnosti u koncentriranom uzorku iznosile su $345 \text{ U g}_{\text{uk.proteina}}^{-1}$ za celulazu, $1200 \text{ U g}_{\text{uk.proteina}}^{-1}$ za CMC-azu i $400 \text{ U g}_{\text{uk.proteina}}^{-1}$ za ksilanaze. Sve enzimske aktivnosti u koncentriranom uzorku bile su veće u usporedbi s aktivnostima izmjerenim u nekoncentriranom uzorku.

Utvrđeno je da maksimalna specifična enzimska aktivnost CMC-aze u bioreaktoru iznosi $1700 \text{ U g}_{\text{uk.proteina}}^{-1}$, što je značajno veće u odnosu na vrijednost od $1218 \text{ U g}_{\text{uk.proteina}}^{-1}$ postignutu u istoj hranjivoj podlozi u tikvicama. Slično tome, enzimska aktivnost ksilanaze u bioreaktoru ($156 \text{ U g}_{\text{uk.proteina}}^{-1}$) također je premašila onu zabilježenu u tikvicama ($102 \text{ U g}_{\text{uk.proteina}}^{-1}$). Ovi rezultati ukazuju na pozitivan utjecaj kontroliranih uvjeta u bioreaktoru, poput pH, temperature, aeracije i miješanja, na proizvodnju CMC-aze i ksilanaze. Nasuprot tome, aktivnost celulaze bila je veća u tikvicama ($1160 \text{ U g}_{\text{uk.proteina}}^{-1}$) nego u bioreaktoru ($772 \text{ U g}_{\text{uk.proteina}}^{-1}$). Ovaj nalaz sugerira da specifični parametri u bioreaktoru nisu bili optimalni za celulazu, ili da je došlo do inhibicije enzima na većim koncentracijama. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se optimizirali parametri bioreaktora za maksimalnu proizvodnju svih triju enzima, uključujući ispitivanje utjecaja različitih temperatura, pH vrijednosti, brzine miješanja i sastava hranjive podloge. Dodatna analiza ekspresije gena uključenih u sintezu enzima pružila bi vrijedne informacije o regulaciji njihove proizvodnje u ovom sustavu.

5. ZAKLJUČCI

1. Ispitivanje lignocelulolitičke aktivnosti kvasaca *D. hansenii* JCM 1990, *P. tannophilus* JCM 31685, *S. cerevisiae* ZIM 3418 i *Y. lipolytica* DSM 21175 pokazalo je da *D. hansenii* ostvaruje aktivnost CMC-aze na svim testiranim izvorima ugljika (glukoza, fruktoza, ksiloza i arabinoza), s najvećom prosječnom aktivnošću na glukozu u iznosu od 47,81 U L⁻¹. Ovaj rezultat ističe *D. hansenii* kao perspektivnog kandidata za daljnja istraživanja.
2. Za proizvodnju lignocelulolitičkih enzima s pomoću *D. hansenii* ispitivani su različiti omjeri izvora ugljika i dušika u hranjivoj podlozi. Rezultati pokazuju da omjer 2:1 predstavlja optimalan odnos za postizanje maksimalne specifične enzimске aktivnosti CMC-aze i celulaze, neovisno o korištenom izvoru ugljika.
3. Specifična aktivnost ksilanaze pokazala je drugačiji trend u odnosu na CMC-azu i celulazu. Naime, veća aktivnost ksilanaze uočena je pri manjim koncentracijama dušika, s određenim varijacijama ovisno o izvoru ugljika. Na primjer, u podlozi s glukozom, optimalan omjer izvora ugljika i dušika za ksilanazu bio je 4:1, dok je u podlozi s melasom to bio omjer 20:1. Ovi rezultati ukazuju na kompleksnu regulaciju sinteze ksilanaze i potencijalnu represiju na razini transkripcije ili translacije pri višim koncentracijama dušika.
4. Korištenje kvašćevog ekstrakta kao organskog izvora dušika rezultiralo je značajno većim specifičnim enzimskim aktivnostima celulaze, CMC-aze i, u većini slučajeva, ksilanaze u usporedbi s kukuruznom močevinom. Ovaj rezultat sugerira da kvašćev ekstrakt sadrži esencijalne nutrijente, poput vitamina, minerala i peptida, koji dodatno potiču *D. hansenii* u proizvodnji lignocelulolitičkih enzima.
5. Dodatak čvrstog hidrolizata biljke blještac u hranjivu podlogu s glukozom rezultirao je najvećim specifičnim enzimskim aktivnostima svih triju enzima, pri čemu su zabilježene maksimalne vrijednosti od 7121,85 U g_{uk.proteina}⁻¹ za celulazu, 7396,98 U g_{uk.proteina}⁻¹ za CMC-azu i 1820,28 U g_{uk.proteina}⁻¹ za ksilanazu. Ovaj rezultat sugerira da prisutnost lignocelulozne biomase inducira ekspresiju gena odgovornih za sintezu ovih enzima u *D. hansenii*.
6. Uzgoj *D. hansenii* u bioreaktoru, u usporedbi s manjim volumenom u tikvicama, doveo je do povećanja specifične enzimске aktivnosti CMC-aze i ksilanaze. Međutim, uočeno

je i smanjenje aktivnosti celulaze u bioreaktoru. Ovaj rezultat ukazuje na potrebu za daljnjom optimizacijom uvjeta u bioreaktoru, poput temperature, pH, brzine miješanja i sastava hranjive podloge, kako bi se postigla maksimalna moguća proizvodnja svih triju enzima.

6. LITERATURA

1. Adelabu BA, Kareem SO, Oluwafemi F, Abideen Adeogun I (2019) Bioconversion of corn straw to ethanol by cellulolytic yeasts immobilized in *Mucuna urens* matrix. *J King Saud Univ Sci* **31**, 136-141. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2017.07.005>
2. Al-Maqtari Q, Al-Ansi W, Mahdi A (2019) Microbial enzymes produced by fermentation and their applications in the food industry -A review. *Int J Agric Innov Res* **8**, 62-82. ISSN (Online) 2319-1473
3. Anandharaj M, Lin YJ, Rani RP, Nadendla EK, Ho MC, Huang CC i sur. (2020) Constructing a yeast to express the largest cellulosome complex on the cell surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* **117**, 2385-2394. <https://doi.org/10.1073/pnas.1916529117>
4. Anu, Kumar A, Rapoport A, Kunze G, Kumar S, Singh D i sur. (2020) Multifarious pretreatment strategies for the lignocellulosic substrates for the generation of renewable and sustainable biofuels: A review. *Renew Energy* **160**, 1228-1252. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.07.031>
5. Anu, Kumar V, Singh D, Singh B (2023) A greener, mild, and efficient bioprocess for the pretreatment and saccharification of rice straw. *Biomass Convers Biorefin* **13**, 4121–4133. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01450-9>
6. Aristidou A i Penttilä M (2000) Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. *Curr Opin Biotechnol* **11**, 187-198. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(00\)00085-9](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(00)00085-9)
7. Arman Z, Sondana GA, Fikriyyah NN, Afifah ZN, Balqis M, Hasanah R i sur. (2020) Screening of amylolytic and cellulolytic yeast from *Dendrobium spathilingue* in Bali Botanical Garden, Indonesia. U: Proceedings of the 5th international symposium on current progress in mathematics and sciences **2242**, Indonesia. <https://doi.org/10.1063/5.0007802>
8. Arola S i Linder MB (2016) Binding of cellulose binding modules reveal differences between cellulose substrates. *Sci Rep* **6**, 35358. <https://doi.org/10.1038/srep35358>
9. Agustín J (2000) Polysaccharide hydrolases of *Aureobasidium pullulans*. *Folia Microbiol* **45**, 143–146. <https://doi.org/10.1007/BF02817413>
10. Bajpai P (2015) Green Chemistry and Sustainability in Pulp and Paper Industry, Springer, Cham, str. 11–39.
11. Bangaru A, Sree KA, Kruthiventi C, Banala M, Shreya V, Vineetha Y i sur. (2022). Role of Enzymes in Biofuel Production: Recent Developments and Challenges. U: Chowdhary P, Khanna N, Pandit S, Kumar R (ured.) Bio-Clean Energy Technologies: Volume 1, Springer, Singapore, str. 81-112.
12. Barbosa AM, Giese EC, Dekker RFH, Borsato D, Briones Pérez AI, Úbeda Iranzo JF (2010) Extracellular β -glucosidase production by the yeast *Debaryomyces pseudopolymorphus* UCLM-NS7A: optimization using response surface methodology. *N Biotechnol* **27**, 374-381. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2010.05.013>

13. Benatti ALT i Polizeli MdLTdM (2023) Lignocellulolytic Biocatalysts: The Main Players Involved in Multiple Biotechnological Processes for Biomass Valorization. *Microorganisms***11**, 162. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010162>
14. Berkeley (2023) Nitrogen. University of California Museum of Paleontology, <https://ugc.berkeley.edu/background-content/nitrogen/>. Pristupljeno 15.11.2024.
15. Bettin F, Montanari Q, Calloni R, Gaio TA, Silveira MM, Dillon AJP (2009) Production of laccases in submerged process by *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 in relation to carbon and organic nitrogen sources, antifoams and Tween 80. *J Ind Microbiol Biotechnol***36**, 1-9. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0463-1>
16. Bichot A, Delgenès JP, Méchin V, Carrère H, Bernet N, García-Bernet D (2018) Understanding biomass recalcitrance in grasses for their efficient utilization as biorefinery feedstock. *Rev Environ Sci Biotechnol***17**, 707-748. <https://doi.org/10.1007/s11157-018-9485-y>
17. Bilal M i Iqbal HMN (2019) Sustainable bioconversion of food waste into high-value products by immobilized enzymes to meet bio-economy challenges and opportunities – A review. *Food Res Int***123**, 226-240. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.04.066>
18. Bocchini Martins DA, do Prado HFA, Ribeiro Leite RS, Ferreira H, de Souza Moretti MM, da Silva R i sur. (2011) Agroindustrial Wastes as Substrates for Microbial Enzymes Production and Source of Sugar for Bioethanol Production. U : Kumar S (ured.) Integrated Waste Management, 2.izd., IntechOpen, Rijeka, str. 319-345.
19. Borin GP, Sanchez CC, De Souza AP, De Santana ES, De Souza AT, Leme AFP i sur. (2015) Comparative secretome analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* during growth on sugarcane biomass. *PLoS One***10**, 1-20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129275>
20. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem***72**, 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
21. Brandt SC, Brognaro H, Ali A, Ellinger B, Maibach K, Rühl M i sur. (2021) Insights into the genome and secretome of *Fusarium metavorans* DSM105788 by cultivation on agro-residual biomass and synthetic nutrient sources. *Biotechnol Biofuels***14**, 74. <https://doi.org/10.1186/s13068-021-01927-9>
22. Bušić A, Marđetko N, Kundas S, Morzak G, Belskaya H, Ivančić Šantek M i sur. (2018) Bioethanol production from renewable raw materials and its separation and purification: A review. *Food Technol Biotechnol***56**, 289-311. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.03.18.5546>
23. Bussler L, Jacomini D, Corrêa JM, Kadowaki MK, Maller A, Simão R de CG (2021) Recombinant cellulase of *Caulobacter crescentus*: potential applications for biofuels and textile industries. *Cellulose***28**, 2813–2832. <https://doi.org/10.1007/s10570-021-03700-5>

24. Carrasco M, Villarreal P, Barahona S, Alcaíno J, Cifuentes V, Baeza M (2016) Screening and characterization of amylase and cellulase activities in psychrotolerant yeasts. *BMC Microbiol***16**, 21. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0640-8>
25. Chakraborty S, Gupta R, Jain KK, Hemansi, Gautam S, Kuhad RC (2016) Cellulases: Application in Wine and Brewery Industry. U: Gupta VK (ured.) *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, Elsevier, Amsterdam, str. 193-200.
26. Chi Z, Chi Z, Zhang T, Liu G, Li J, Wang X (2009) Production, characterization and gene cloning of the extracellular enzymes from the marine-derived yeasts and their potential applications. *Biotechnol Adv***27**, 236–255. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.01.002>
27. Chukwuma OB, Rafatullah M, Tajarudin HA, Ismail N (2020) Lignocellulolytic enzymes in biotechnological and industrial processes: A review. *Sustainability***12**, 7282. <https://doi.org/10.3390/su12187282>
28. Chukwuma OB, Rafatullah M, Tajarudine HA, Ismail N (2021) A review on bacterial contribution to lignocellulose breakdown into useful bio-products. *Int J Environ Res Public Health***18**, 6001. <https://doi.org/10.3390/ijerph18116001>
29. Claus H (2004) Laccases: Structure, reactions, distribution. *Micron***35**, 93-96. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2003.10.029>
30. de Almeida AF, Taulk-Tornisielo SM, Carmona EC (2013) Influence of carbon and nitrogen sources on lipase production by a newly isolated *Candida viswanathii* strain. *Ann Microbiol***63**, 1225–1234. <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0580-y>
31. de Souza ACD, Carvalho FP, Batista CFSE, Schwan RF, Dias DR (2013) Sugarcane bagasse hydrolysis using yeast cellulolytic enzymes. *J Microbiol Biotechnol***23**, 1403-1412. <https://doi.org/10.4014/jmb.1302.02062>
32. de Souza PM i de Oliveira Magalhães P (2010) Application of microbial α -amylase in industry - a review. *Braz J Microbiol***41** (4) 850–861. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000400004>
33. de Souza TSP i Kawaguti HY (2021) Cellulases, Hemicellulases, and Pectinases: Applications in the Food and Beverage Industry. *Food Bioproc Tech***14**, 1446–1477. <https://doi.org/10.1007/s11947-021-02678-z>
34. de Souza Vandenberghe LP, Karp SG, Binder Pagnoncelli MG, von Linsingen Tavares M, Libardi Junior N, Valladares Diestra K i sur. (2020) Classification of enzymes and catalytic properties. U: Singh SP, Pandey A, Singhania RR, Larroche C, Li Z (ured.) *Biomass, Biofuels, Biochemicals: Advances in Enzyme Catalysis and Technologies*, 1.izd., Elsevier, Amsterdam, str.11-30.
35. Dwivedi UN, Singh P, Pandey VP, Kumar A (2011) Structure-function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. *J Mol Catal B Enzym***68**, 117-128. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.11.002>
36. Dyerberg ASB, Navarrete C, Martínez JL (2022) High-throughput screening of a *Debaryomyces hansenii* library for potential candidates with improved stress tolerance and wider carbon utilisation capabilities. bioRxiv <https://doi.org/10.1101/2022.03.24.485636>

37. Edwards IP, Zak DR, Kellner H, Eisenlord SD, Pregitzer KS (2011) Simulated atmospheric N deposition alters fungal community composition and suppresses ligninolytic gene expression in a Northern Hardwood forest. *PLoS One***6**, 1-10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020421>
38. England JC, Perchuk BS, Laub MT, Gober JW (2010) Global regulation of gene expression and cell differentiation in *Caulobacter crescentus* in response to nutrient availability. *J Bacterio***192**, 819-833. <https://doi.org/10.1128/JB.01240-09>
39. Giese EC, Dussán KJ, Pierozzi M, Chandel AK, Pagnocca FC, Da Silva SS (2017) Cellulase production by *Trichosporon laibachii*. *Orbita***9**, 271-278. <https://doi.org/10.17807/orbital.v9i4.1024>
40. Gil-Chávez J, Gurikov P, Hu X, Meyer R, Reynolds W, Smirnova I (2021) Application of novel and technical lignins in food and pharmaceutical industries: structure-function relationship and current challenges. *Biomass Convers Biorefin***11**, 2387–2403. <https://doi.org/10.1007/s13399-019-00458-6>
41. Godliving YS (2012) Lignocellulolytic enzymes from tropical fungi: Types, substrates and applications. *Sci Res Essays***7**, 1544-1555. <https://doi.org/10.5897/SRE11.1812>
42. Gomes FCO, Safar SVB, Marques AR, Medeiros AO, Santos ARO, Carvalho C i sur. (2015) The diversity and extracellular enzymatic activities of yeasts isolated from water tanks of *Vriesea minarum*, an endangered bromeliad species in Brazil, and the description of *Occultifur brasiliensis* f.a., sp. nov. *Anton Leeuw Int J G***107**, 597–611. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0356-4>
43. Gottschalk LMF, Paredes RDS, Teixeira RSS, Da Silva ASA, Bon EPDS (2013) Efficient production of lignocellulolytic enzymes xylanase, β -xylosidase, ferulic acid esterase and β -glucosidase by the mutant strain *Aspergillus awamori* 2B.361 U2/1. *Braz J Microbiol***44**, 569–576. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000200037>
44. Gouma S, Fragoeiro S, Bastos AC, Magan N (2014) Bacterial and Fungal Bioremediation Strategies. U: Das S (ured.) Microbial Biodegradation and Bioremediation, Elsevier, Amsterdam, str. 301–323.
45. Guimarães LRC, Woiciechowskin AL, Karp SG, Coral JD, Zandoná Filho A, Soccol CR (2017) Laccases. U: Pandey A, Negi S, Soccol CR (ured.) Current Developments in Biotechnology and Bioengineering, Elsevier, Amsterdam, str. 199-216.
46. Gupta GK, Dixit M, Kapoor RK, Shukla P (2022) Xylanolytic Enzymes in Pulp and Paper Industry: New Technologies and Perspectives. *Mol Biotechnol***64**, 130–143. <https://doi.org/10.1007/s12033-021-00396-7>
47. Hansen GH, Lübeck M, Frisvad JC, Lübeck PS, Andersen B (2015) Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: Comparison of solid state and submerged fermentation. *Process Biochem***50**, 1327-1341. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.05.017>
48. Hasanin MS, Hashem AH, Abd El-Sayed ES, El-Saied H (2020) Green ecofriendly bio-deinking of mixed office waste paper using various enzymes from *Rhizopus microsporus* AH3: efficiency and characteristics. *Cellulose***27**, 4443-4453. <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03071-3>

49. Haus S, Björnsson L, Börjesson P (2020) Lignocellulosic ethanol in a greenhouse gas emission reduction obligation system—a case study of Swedish sawdust based-ethanol production. *Energies***13**, 1048. <https://doi.org/10.3390/en13051048>
50. He J, Wu AM, Chen D, Yu B, Mao X, Zheng P i sur. (2014) Cost-effective lignocellulolytic enzyme production by *Trichoderma reesei* on a cane molasses medium. *Biotechnol Biofuels***7**, 43. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-43>
51. Hernández DL i Hobbie SE (2010) The effects of substrate composition, quantity, and diversity on microbial activity. *Plant Soi***335**, 397–441. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0428-9>
52. Horn SJ, Vaaje-Kolstad G, Westereng B, Eijsink VGH (2012) Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnol Biofuels***5**, 45 <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-45>
53. Houfani AA, Anders N, Spiess AC, Baldrian P, Benallaoua S (2020) Insights from enzymatic degradation of cellulose and hemicellulose to fermentable sugars— a review. *Biomass Bioenergy***134**, 105481. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105481>
54. Hussain A, Bilal M, Rafeeq H, Jabeen Z, Afsheen N, Sher F i sur. (2022) Role of laccase in the pulp and paper industry. U: Bhat R, Kumar A, Nguyen TA, Sharma S (ured.) *Nanotechnology in Paper and Wood Engineering*, Elsevier, Amsterdam, str. 35–60.
55. Isikgor FH i Becer CR (2015) Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polym Chem***6**, 4497-4559. <https://doi.org/10.1039/c5py00263j>
56. Ivetić D i Antov M (2014) Bioetanol iz lignoceluloznih sirovina: obnovljivi izvori enzimska tehnologija za održivu proizvodnju energije. *Zaštita materijala***55**, 54–58. <https://doi.org/10.5937/ZasMat1401054I>
57. Jaiboon K, Lertwattanasakul N, Limtong P, Limtong S (2016) Yeasts from peat in a tropical peat swamp forest in Thailand and their ability to produce ethanol, indole-3-acetic acid and extracellular enzymes. *Mycol Prog***15**, 755–770. <https://doi.org/10.1007/s11557-016-1205-9>
58. Janusz G, Pawlik A, Sulej J, Świdarska-Burek U, Jarosz-Wilkolazka A, Paszczyński A (2017) Lignin degradation: Microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution. *FEMS Microbiol Rev***41**, 941–962. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux049>
59. Jiang L, Wang J, Liang S, Wang X, Cen P, Xu Z (2009) Butyric acid fermentation in a fibrous bed bioreactor with immobilized *Clostridium tyrobutyricum* from cane molasses. *Bioresour Techno***100**, 3403-3409. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.032>
60. Kapich AN, Prior BA, Botha A, Galkin S, Lundell T, Hatakka A (2004) Effect of lignocellulose-containing substrates on production of ligninolytic peroxidases in submerged cultures of *Phanerochaete chrysosporium* ME-446. *Enzyme Microb Techno***34**, 187-195. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2003.10.004>
61. Karigar CS i Rao SS (2011) Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: A review. *Enzyme Res***2011**, 805187. <https://doi.org/10.4061/2011/805187>

62. Khandelwal M i Windle AH (2013) Hierarchical organisation in the most abundant biopolymer-cellulose. *Mater Res Soc Symp Proc***1504**, 10.1557/opl.2013.379. <https://doi.org/10.1557/opl.2013.379>
63. Kim J, Yun S, Ounaies Z (2006) Discovery of cellulose as a smart material. *Macromolecules***39**, 4202-4206. <https://doi.org/10.1021/ma060261e>
64. Koch AL (1985) The macroeconomics of bacterial growth. U: Fletsher M, Floodgate GD (ured.) *Bacteria in their Natural Environments*, Academic Press, Cambridge, str. 1-42.
65. Korhola M, Hakonen R, Juuti K, Edelmann M, Kariluoto S, Nyström L i sur. (2014) Production of folate in oat bran fermentation by yeasts isolated from barley and diverse foods. *J Appl Microbiol***117**, 679–689. <https://doi.org/10.1111/jam.12564>
66. Kostylev M i Wilson D (2012) Synergistic interactions in cellulose hydrolysis. *Biofuels***3**, 61-70. <https://doi.org/10.4155/bfs.11.150>
67. Krishnan A, Alias SA, Wong CMVL, Pang KL, Convey P (2011) Extracellular hydrolase enzyme production by soil fungi from King George Island, Antarctica. *Polar Bio***34**, 1535–1542. <https://doi.org/10.1007/s00300-011-1012-3>
68. Kudanga T i Mwenje E (2005) Extracellular cellulase production by tropical isolates of *Aureobasidium pullulans*. *Can J Microbiol***51**, 773-776. <https://doi.org/10.1139/W05-053>
69. Kumar A i Chandra R (2020) Ligninolytic enzymes and its mechanisms for degradation of lignocellulosic waste in environment. *Heliyon***6**, e03170. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03170>
70. Kumar AK i Sharma S (2017) Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. *Bioresour Bioprocess***4**, 7. <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0137-9>
71. Kumar P, Barrett DM, Delwiche MJ, Stroeve P (2009) Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Ind Eng Chem Res***48**, 3713-3729. <https://doi.org/10.1021/ie801542g>
72. Li J, Yuan M, Meng N, Li H, Sun J, Sun B (2024) Influence of nitrogen status on fermentation performances of non-*Saccharomyces* yeasts: a review. *Food Sci Hum Wellness***13**, 556-567. <https://doi.org/10.26599/FSHW.2022.9250050>
73. Li M, Pu Y, Ragauskas AJ (2016) Current understanding of the correlation of lignin structure with biomass recalcitrance. *Front Chem***4**, 45. <https://doi.org/10.3389/fchem.2016.00045>
74. Li Q, Liu J, Gadd GM (2020) Fungal bioremediation of soil co-contaminated with petroleum hydrocarbons and toxic metals. *Appl Microbiol Biotechnol***104**, 8999-9008. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10854-y>
75. Liu J, Yang J, Wang R, Liu L, Zhang Y, Bao H i sur. (2020) Comparative characterization of extracellular enzymes secreted by *Phanerochaete chrysosporium*

- during solid-state and submerged fermentation. *Int J Biol Macromol***152**, 288-294. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.256>
76. Liu L, Huang WC, Liu Y, Li M (2021) Diversity of cellulolytic microorganisms and microbial cellulases. *Int Biodeterior Biodegradation***163**, 105277. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2021.105277>
 77. Lobedanz S, Damhus T, Borchert TV, Hansen TT, Lund H, Lai W i sur. (2016) Enzymes in Industrial Biotechnology. U: Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, 5.izd., John Wiley & Sons, Hoboken str.1-73.
 78. Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH, Pretorius IS (2002) Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiol Mol Bio***66**, 506-577. <https://doi.org/10.1128/membr.66.3.506-577.2002>
 79. Madhu A i Chakraborty JN (2017) Developments in application of enzymes for textile processing. *J Clean Prod***145**, 114-133. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.01.013>
 80. Mäkelä MR, Donofrio N, de Vries RP (2014) Plant biomass degradation by fungi. *Fungal Genetics and Biology***72**, 2-9. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.08.010>
 81. Mäkelä MR, Hildén K, Kowalczyk JE, Hatakka A (2020) Progress and Research Needs of Plant Biomass Degradation by Basidiomycete Fungi. U: Nevalainen H (ured.) Grand Challenges in Fungal Biotechnology, Springer, Cham, str. 405-438.
 82. Mäki-Arvela P, Salminen E, Riittonen T, Virtanen P, Kumar N, Mikkola JP (2012) The challenge of efficient synthesis of biofuels from lignocellulose for future renewable transportation fuels. *Intl Jnl of Chem Eng***2012**, 674761 <https://doi.org/10.1155/2012/674761>
 83. Mandal A (2015) Review on Microbial Xylanases and their Applications. *Int J Life Sci***4**, 178-187. <https://www.crdeepjournal.org/wp-content/uploads/2015/07/Vol-4-3-5-JLS.pdf>
 84. Mattam AJ, Kuila A, Suralikerimath N, Choudary N, Rao PVC, Velankar HR (2016) Cellulolytic enzyme expression and simultaneous conversion of lignocellulosic sugars into ethanol and xylitol by a new *Candida tropicalis* strain. *Biotechnol Biofuels***9**, 157. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0575-1>
 85. Michalska K, Bizukojć M, Ledakowicz S (2015) Pretreatment of energy crops with sodium hydroxide and cellulolytic enzymes to increase biogas production. *Biomass Bioenergy***80**, 213-221. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.05.022>
 86. Miller GL (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal Chem***31**, 426-428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
 87. Muaaz-U-Salam S, Cleall PJ, Harbottle MJ (2020) Application of enzymatic and bacterial biodelignification systems for enhanced breakdown of model lignocellulosic wastes. *Sci Total Environ***728**, 138741. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138741>
 88. Mujtaba M, Fernandes Fraceto L, Fazeli M, Mukherjee S, Savassa SM, Araujo de Medeiros G i sur. (2023) Lignocellulosic biomass from agricultural waste to the circular economy: a review with focus on biofuels, biocomposites and bioplastics. *J Clean Prod***402**, 136815. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2023.136815>

89. Nathan VK (2022) Extremozymes and Their Industrial Applications. U: Arora NK, Agnihotri S, Mishra J (ured.) Application of Extremozymes in the Paper and Pulp Industries, Academic Press, Cambridge, str. 231-247.
90. Navarrete C, Jacobsen IH, Martínez JL, Procentese A (2020) Cell factories for industrial production processes: Current issues and emerging solutions. *Processes***8**, 768. <https://doi.org/10.3390/pr8070768>
91. Navarrete C i Martínez JL (2020) Non-conventional yeasts as superior production platforms for sustainable fermentation based bio-manufacturing processes. *AIMS Bioeng***7**, 289–305. <https://doi.org/10.3934/bioeng.2020024>
92. Nishimura H, Kamiya A, Nagata T, Katahira M, Watanabe T (2018) Direct evidence for α ether linkage between lignin and carbohydrates in wood cell walls. *Sci Rep***8**, 6538. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24328-9>
93. Okal EJ, Aslam MM, Karanja JK, Nyimbo WJ (2020) Mini review: Advances in understanding regulation of cellulase enzyme in white-rot basidiomycetes. *Microb Pathog***147**, 104410. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104410>
94. Okeke ES, Ezugwu AL, Anaduaka EG, Mayel MH, Ezike TC, Ossai EC (2024) Ligninolytic and cellulolytic enzymes — biocatalysts for green agenda. *Biomass Convers Biorefin***14**, 3031–3055. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-02777-7>
95. Olson DG, McBride JE, Shaw JA, Lynd LR (2012) Recent progress in consolidated bioprocessing. *Curr Opin Biotechnol***23**, 396-405. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.11.026>
96. Ou J, Wang L, Ding X, Du J, Zhang Y, Chen H i sur. (2004) Stationary phase protein overproduction is a fundamental capability of *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun***314**, 174-180. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.12.077>
97. Pathan AAK, Bhadra B, Begum Z, Shivaji S (2010) Diversity of yeasts from puddles in the vicinity of Midre Lovénbreen glacier, arctic and bioprospecting for enzymes and fatty acids. *Curr Microbio***60**, 307–314. <https://doi.org/10.1007/s00284-009-9543-3>
98. Patyshakuliyeva A, Post H, Zhou M, Jurak E, Heck AJR, Hildén KS i sur. (2015) Uncovering the abilities of *Agaricus bisporus* to degrade plant biomass throughout its life cycle. *Environ Microbiol***17**, 3098-3109. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12967>
99. Pino MS, Rodríguez-Jasso RM, Michelin M, Flores-Gallegos AC, Morales-Rodríguez R, Teixeira JA i sur. (2018) Bioreactor design for enzymatic hydrolysis of biomass under the biorefinery concept. *Chem Eng* **J347**, 119-136. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.04.057>
100. Pollegioni L, Tonin F, Rosini E (2015) Lignin-degrading enzymes. *FEBS* **J282**, 1190–1213. <https://doi.org/10.1111/febs.13224>
101. Prasher IB i Chauhan R (2015) Effect of Carbon and Nitrogen Sources on the Growth, Reproduction and Ligninolytic Enzymes Activity of *Dictyoarthrinium Synnematicum* *Somrith. Adv Zool Bot***3**, 24-30. <https://doi.org/10.13189/azb.2015.030203>

102. Prévot V, Lopez M, Copinet E, Duchiron F (2013) Comparative performance of commercial and laboratory enzymatic complexes from submerged or solid-state fermentation in lignocellulosic biomass hydrolysis. *Bioresour Technol***129**, 690-693. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.135>
103. Puneekar NS (2018) ENZYMES: Catalysis, Kinetics and Mechanisms, 1.izd., Springer, Singapore, str. 461–492.
104. Qaseem MF, Shaheen H, Wu AM (2021) Cell wall hemicellulose for sustainable industrial utilization. *Renew Sust Energ Rev***144**, 110996. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.110996>
105. Qian Y, Sun Y, Zhong L, Sun N, Sheng Y, Qu Y i sur. (2019) The GATA-Type transcriptional factor are1 modulates the expression of extracellular proteases and cellulases in *Trichoderma reesei*. *Int J Mol Sci***20**, 4100. <https://doi.org/10.3390/ijms20174100>
106. Qing Q, Yang B, Wyman CE (2010) Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes. *Bioresour Technol***101**, 9624-9630. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.137>
107. Qureshi AS, Khushk I, Bhutto MA, Dahot MU, Bano S, Iqbal H (2012) Production and partial characterization of invertase from *Mucor geophyllus* EFRL 03. *Afr J Biotechnol***11**, 10736-10743. <https://doi.org/10.5897/AJB11.4303>
108. Rahman M, Hack-Polay D, Billah M, Nabi NU (2020) Bio-based textile processing through the application of enzymes for environmental sustainability. *Int J Technol Manag Sustain Dev***19**, 87-106. https://doi.org/10.1386/tmsd_00017_1
109. Rajesh Banu J, Preethi, Kavitha S, Tyagi VK, Gunasekaran M, Karthikeyan OP i sur. (2021) Lignocellulosic biomass based biorefinery: A successful platform towards circular bioeconomy. *Fue***302**, 121086. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.121086>
110. Rajnish KN, Samuel MS, Datta S, Chandrasekar N, Balaji R, Jose S, Selvarajan E (2021). Immobilization of cellulase enzymes on nano and micro-materials for breakdown of cellulose for biofuel production-a narrative review. *Int J Biol Macromol***182**, 1793-1802. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.05.176>
111. Ramesh D, Muniraj IK, Thangavelu K, Karthikeyan S (2019) Knowledge update on bioreactor technology for cellulase production. U: Srivastava N, Srivastava M, Mishra PK, Ramteke PW, Lakhan Singh R (ured.) *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, Elsevier, Amsterdam, str. 181-193.
112. Rastegari AA (2018) Molecular mechanism of cellulase production systems in *Penicillium*. U: Gupta VK, Rodriguez-Couto S (ured.) *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, Elsevier, Amsterdam, str. 153-166.
113. Reddy MS, Kanwal HK (2022) Influence of carbon, nitrogen sources, inducers, and substrates on lignocellulolytic enzyme activities of *Morchella spongiola*. *J Agric Food Res***7**, 100271. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2022.100271>
114. Renge V, Khedkar SV, Nandurkar NR (2012) Enzyme synthesis by fermentation method : A review. *Sci Rev Chem Commun***2**, 585-590.

<https://www.tsijournals.com/articles/enzyme-synthesis-by-fermentation-method--a-review.pdf>

115. Rennie EA i Scheller HV (2014) Xylan biosynthesis. *Curr Opin Biotechnol***26**, 100-107. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.11.013>
116. Saha BC (2003) Hemicellulose bioconversion. *J Ind Microbiol Biotechnol***30**, 279–291. <https://doi.org/10.1007/s10295-003-0049-x>
117. Saini A, Aggarwal NK, Sharma A, Yadav A (2015) Actinomycetes: A Source of Lignocellulolytic Enzymes. *Enzyme Res***2015**, 279381. <https://doi.org/10.1155/2015/279381>
118. Sakpetch P, H-Kittikun A, Chandumpai A (2017) Isolation and screening of potential lignocellulolytic microorganisms from rubber bark and other agricultural residues. *Walailak J Sci Technol***14**, 953–967. <https://wjst.wu.ac.th/index.php/wjst/article/view/2886>
119. Santos J, Leitão-Correia F, Sousa MJ, Leão C (2016). Nitrogen and carbon source balance determines longevity, independently of fermentative or respiratory metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Oncotarget***7**, 23033–23042. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8656>
120. Saravanan A, Kumar PS, Jeevanantham S, Karishma S, Vo DVN (2022). Recent advances and sustainable development of biofuels production from lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol***344**, 126203. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126203>
121. Semenčenko VV, Mojović LV, Petrović SD, Očić OJ (2011) Novi trendovi u proizvodnji bioetanola. *Hem Ind***65**, 103-114. <https://doi.org/10.2298/HEMIND100913068S>
122. Sharma S i Yazdani SS (2016) Diversity of Microbial Cellulase System. U: Gupta VK (ured.) *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, Elsevier, Amsterdam, str. 49-64.
123. Shindhal T, Rakholiya P, Varjani S, Pandey A, Ngo HH, Guo W i sur. (2020) A critical review on advances in the practices and perspectives for the treatment of dye industry wastewater. *Bioengineered***12**, 70–87. <https://doi.org/10.1080/21655979.2020.1863034>
124. Shoji JY, Kikuma T, Kitamoto K (2014) Vesicle trafficking, organelle functions, and unconventional secretion in fungal physiology and pathogenicity. *Curr Opin Microbiol***20**, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.03.002>
125. Shrivastava M, Maibam PD, Aishwarya A, Goyal A (2023). Hemicellulases and Auxiliary Activities for Biomass Hydrolysis. U: Bisaria V (ured.) *Handbook of Biorefinery Research and Technology*, Springer, Dordrecht, str. 1-23.
126. Singh A, Bajar S, Devi A, Pant D (2021) An overview on the recent developments in fungal cellulase production and their industrial applications. *Bioresour Technol Rep***14**, 100652. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100652>

127. Singh D i Gupta N (2020) Microbial Laccase: a robust enzyme and its industrial applications. *Biologia***75**, 1183–1193. <https://doi.org/10.2478/s11756-019-00414-9>
128. Singh S, Singh VK, Aamir M, Dubey MK, Patel JS, Upadhyay RS i sur. (2016) Cellulase in Pulp and Paper Industry. U: Gupta VK (ured.) New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering, 1.izd., Elsevier, Amsterdam, str. 152-162.
129. Stajić M, Persky L, Friesem D, Hadar Y, Wasser SP, Nevo E i sur. (2006) Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. *Enzyme Microb Technol***38**, 65-73. <https://doi.org/10.1016/j.enzymictec.2005.03.026>
130. Šuchová K, Fehér C, Ravn JL, Bedó S, Biely P, Geijer C (2022) Cellulose- and xylan-degrading yeasts: Enzymes, applications and biotechnological potential. *Biotechnol Adv***59**, 107981. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.107981>
131. Suleiman M, Krüger A, Antranikian G (2020) Biomass-degrading glycoside hydrolases of archaeal origin. *Biotechnol Biofuels***13**, 53. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01792-y>
132. Sun RC (2010) Hemicelluloses. U: Ren JL, Sun RC (ured.) Cereal straw as a resource for sustainable biomaterials and biofuels, 1.izd., Elsevier, Amsterdam, str. 73-76.
133. Teugjas H i Väljamäe P (2013) Product inhibition of cellulases studied with ¹⁴C-labeled cellulose substrates. *Biotechnol Biofuels***6**, 104. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-104>
134. Thompson W i Meyer S (2013) Second generation biofuels and food crops: Co-products or competitors. *Glob Food Secur***2**, 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2013.03.001>
135. Tian S, Du JL, Bai ZS, He J, Yang XS (2019) Design and construction of synthetic cellulosome with three adaptor scaffoldins for cellulosic ethanol production from steam-exploded corn stover. *Cellulose***26**, 8401–8415. <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02366-4>
136. Tsoutsos T (2010) Modelling hydrolysis and fermentation processes in lignocelluloses-to-bioalcohol production. U: Waldron K (ured.) Bioalcohol Production, Woodhead Publishing, Cambridge, str. 340-362.
137. Viikari L, Suumäkki A, Grönqvist S, Raaska L, Ragauskas A (2009) Forest Products: Biotechnology in Pulp and Paper Processing. U: Schaechter M (ured.) Encyclopedia of Microbiology, 3.izd., Academic Press, str. 80-94.
138. Villas-Bôas SG, Esposito E, De Mendonça MM (2002) Novel lignocellulolytic ability of *Candida utilis* during solid-substrate cultivation on apple pomace. *World J Microbiol Biotechnol***18**, 541–545. <https://doi.org/10.1023/A:1016350612380>
139. Walker GM i Walker RSK (2018) Enhancing Yeast Alcoholic Fermentations. *Adv Appl Microbiol***105**, 87-129. <https://doi.org/10.1016/bs.aams.2018.05.003>
140. Wu Y, Zhang S, Guo X, Huang H (2008) Adsorption of chromium (III) on lignin. *Bioresour Technol***99**, 7709-7715. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.01.069>

141. Xiao Z, Zhang X, Gregg DJ, Saddler JN (2004) Effects of sugar inhibition on cellulases and β -glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. *Appl Biochem Biotechnol***115**, 1115–1126. <https://doi.org/10.1385/ABAB:115:1-3:1115>
142. Yang R, Wang Z, Xia Y, Zheng F, Kang F, Meng X, i sur. (2023) Role of the Nitrogen Metabolism Regulator TAM1 in Regulation of Cellulase Gene Expression in *Trichoderma reesei*. *Appl Environ Microbiol***89**, e01421-22. <https://doi.org/10.1128/aem.01421-22>
143. Yousuf A, Pirozzi D, Sannino F (2020) Fundamentals of lignocellulosic biomass. U: Yousuf A, Pirozzi D, Filomena S (ured.) Lignocellulosic Biomass to Liquid Biofuels, 1.izd., Academic Press, str. 1-15.
144. Yun YH, Suh DY, Yoo HD, Oh MH, Kim SH (2015) Yeast associated with the ambrosia beetle, *Platypus koryoensis*, the pest of oak trees in Korea. *Mycobiology***43**, 458-466. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2015.43.4.458>
145. Zhang J, Sun L, Zhang H, Wang S, Zhang X, Geng A (2018) A novel homodimer laccase from *Cerrena unicolor* BBP6: Purification, characterization, and potential in dye decolorization and denim bleaching. *PLoS One***13**, 1-20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202440>
146. Zhang S, Jiang H, Xue S, Ge N, Sun Y, Chi Z i sur. (2019) Efficient Conversion of Cane Molasses into Fructooligosaccharides by a Glucose Derepression Mutant of *Aureobasidium melanogenum* with High β -Fructofuranosidase Activity. *J Agric Food Chem***67**, 13665-13672. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b05826>
147. Zhang X, Yang W, Blasiak W (2011) Modeling study of woody biomass: Interactions of cellulose, hemicellulose, and lignin. *Energ Fuel***25**, 4786–4795. <https://doi.org/10.1021/ef201097d>
148. Zhou S, Zhang J, Ma F, Tang C, Tang Q, Zhang X (2018) Investigation of lignocellulolytic enzymes during different growth phases of *Ganoderma lucidum* strain G0119 using genomic, transcriptomic and secretomic analyses. *PLoS One***13**, 1-20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198404>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, Katja Blažević izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



Vlastoručni potpis