

Optimiranje procesa proizvodnje lipaze uzgojem *Thermomyces lanuginosus* na pogači buče

Buljan, Klara

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:543930>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](#) / [Imenovanje-Nekomercijalno-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna](#)

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

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

PREHRAMBENO – TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Klara Buljan

**Optimiranje procesa proizvodnje lipaze uzgojem *Thermomyces
lanuginosus* na pogači buče**

Diplomski rad

U Osijeku, studeni, 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za procesno inženjerstvo
Katedra za termodinamiku i reakcijsko inženjerstvo
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij Procesno inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Nastavni predmet: Kemijski i biokemijski reaktori

Tema rada je prihvaćena na I. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2022./2023. održanoj 31. listopada 2022.

Mentor: prof. dr. sc. *Marina Tišma*

Pomoć pri izradi: Darijo Šibalić, mag. ing. techn. aliment.

Optimiranje procesa proizvodnje lipaze uzgojem *Thermomyces lanuginosus* na pogači buče
Klara Buljan, 0113134531

Sažetak:

U ovom radu proučavan je proces proizvodnje lipaze pomoću *Thermomyces lanuginosus*, fermentacijom na čvrstim nosačima na pogači buče kao supstratu. Proces proizvodnje proveden je prema Box-Behnken eksperimentalnom planu pokusa. Kvadratni model definiran je na temelju optimizacije pet nezavisnih varijabli (početna masa supstrata (X_1), udio inokuluma (X_2), udio vlage (X_3), vrijeme fermentacije (X_4) i temperatura fermentacije (X_5)). Na osnovi dobivenih eksperimentalnih podataka i provedene numeričke optimizacije procesa, definirani su optimalni procesni uvjeti proizvodnje lipaze ($m_s=50$ g, $n=7$, $w_{H_2O}=60\%$, $t=2$ dana, $T=45^\circ\text{C}$). Maksimalna aktivnost lipaze prema predviđenom modelu iznosila $14,9985$ U cm^{-3} , a izmjerena aktivnost dobivena eksperimentalnim putem $15,7690$ U cm^{-3} , što pokazuje točnost modela od 95.113%. Rezultati ANOVA analize pokazuju da je predloženi model statistički značajan, te prema p -vrijednosti najveći utjecaj na proizvodnju lipaze ima temperatura. Ispitana je i stabilnost lipaze tijekom skladištenja u vremenskom periodu od 100 dana, na temperaturama od 25°C , 4°C i -20°C . Početna aktivnost lipaze smanjuje se nakon 20. dana skladištenja na temperaturama od 25°C i 4°C , te nakon 60. dana skladištenja na temperaturi od -20°C . Smanjenje aktivnosti lipaze nakon 100 dana skladištenja bilježi pad od 43% na temperaturi od 25°C , 34% na temperaturi od 4°C , te 10% na temperaturi od -20°C .

Ključne riječi: Lipaza, *Thermomyces lanuginosus*, fermentacija na čvrstim nosačima, metoda odzivnih površina

Rad sadrži: 51 stranica
14 slika
4 tablice
34 literaturnih referenci

Jezik izvornika: Hrvatski

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

- | | |
|---|---------------|
| 1. prof. dr. sc. <i>Mirela Planinić</i> | Predsjednik |
| 2. prof. dr. sc. <i>Marina Tišma</i> | član-mentor |
| 3. prof. dr. sc. <i>Ana Bucić-Kojić</i> | Član |
| 4. prof. dr. sc. <i>Daliborka Koceva-Komlenić</i> | zamjena člana |

Datum obrane: 8. studenog 2022.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Process engineering
Subdepartment of thermodynamic and reaction engineering
Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia

Graduate program Food engineering

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Biotechnology

Course title: Chemical and biochemical reactors

Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. I. held on 31th October 2022.

Mentor: *Marina Tišma*, Full prof.

Technical assistance: Darijo Šibalić, mag. ing. techn. aliment.

Lipase production by Cultivation of *Thermomyces lanuginosus* on Hulled Pumpkin - Process Optimization

Klara Buljan, 0113134531

Summary:

In this graduate thesis, the process of *Thermomyces lanuginosus*, lipase production was studied, by solid-state fermentation process on pumpkin pomace as a substrate. The production was carried out according to the Box-Behnken experimental plan. The square model is defined by optimization of five independent variables (initial weight of the substrate (X_1), inoculum size (X_2), moisture content (X_3), fermentation time (X_4) and fermentation temperature (X_5)). According to the obtained experimental data and numerical optimization of the process, optimal process conditions for lipase production are defined ($m_s = 50$ g, $n = 7$, $w_{H_2O} = 60\%$, $t = 2$ days, $T = 45^\circ\text{C}$). The maximum activity of lipase according to the model prediction was $14.9985 \text{ U cm}^{-3}$, and the measured activity obtained by experimental means $15.7690 \text{ U cm}^{-3}$, which shows the accuracy of the model of 95.113%. The results of the ANOVA analysis show that the proposed model is statistically significant, and according to p -value the greatest influence on lipase production is the temperature. The lipase stability during storage for a period of 100 days, at temperatures of 25°C , 4°C and -20°C , was also investigated. The initial activity of lipase decreases after the 20th day of storage at temperatures of 25°C and 4°C , and after the 60th day of storage at a temperature of -20°C . A decrease in lipase activity after 100 days of storage recorded a decrease of 43% at 25°C , 34% at 4°C , and 10% at -20°C .

Key words: Lipase, *Thermomyces lanuginosus*, solid state fermentation, response surface methodology

Thesis contains: 51 pages
14 figures
4 tables
34 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|--|--------------|
| 1. <i>Mirela Planinić</i> , Full prof. | chair person |
| 2. <i>Marina Tišma</i> , Full prof. | Supervisor |
| 3. <i>Ana Bucić-Kojić</i> , Full prof. | Member |
| 4. <i>Daliborka Koceva-Komlenić</i> , Full prof. | stand-in |

Defense date: November 8, 2022

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology
Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek

Zahvaljujem se od srca dragoj mentorici prof. dr. sc. Marini Tišma na velikoj prilici i ukazanom povjerenju, te pomoći, utrošenom vremenu i razumijevanju prilikom rada u laboratoriju i izradi diplomskog rada!

Veliko hvala mom najboljem prijatelju Dariju Šibalić na prenesenom znanju i pomoći tijekom izrade i pisanja diplomskog rada. Bilo je jako lijepo učiti i raditi nešto novo od jutra do večeri u nasmijanoj i ugodnoj atmosferi laboratorija.

Hvala mojim prijateljima i obitelji na podršci, strpljenju i povjerenju, a najviše hvala mojoj majci koja me bodrila s neba kroz sve ove godine!

Hvala i najboljem suprugu Dini te sinu Lovri. Ovaj dan posvećujem vama!

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. <i>Thermomyces lanuginosus</i>	4
2.2. Lipaza	4
2.2.1. Primjena lipaze u industrijama	6
2.3. Fermentacija na čvrstim nosačima	7
2.4. Modeliranje metodom odzivnih površina	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO	11
3.1. Zadatak	12
3.2. Materijali.....	12
3.2.1. Supstrat i mikroorganizam	12
3.2.2. Kemikalije	13
3.2.3. Priprema Tris-HCl pufera.....	14
3.2.4. Priprema pufera s emulgatorom	14
3.2.5. Priprema otopine pNP-palmitata.....	14
3.3. Metode	14
3.3.1. Fermentacija na čvrstim nosačima	14
3.3.2. Ekstrakcija enzima.....	16

3.3.3. Mjerenje aktivnosti lipaze.....	16
3.3.4. Određivanje pH vrijednosti supstrata.....	17
3.3.5. Određivanje suhe tvari.....	18
3.3.6. Ispitivanje temperature skladištenja na aktivnost lipaze	19
3.3.7. Box-Behnkenov plan pokusa i obrada podataka metodom odzivnih površina.....	19
4. REZULTATI I RASPRAVA	23
4.1. Rezultati eksperimenata proizvodnje lipaze provedenih prema Box-Behnken dizajnu	24
4.2. Modeliranje i optimiranje uvjeta proizvodnje lipaze	26
4.3. Profil proizvodnje lipaze pri optimalnim uvjetima	30
4.3.1. Utjecaj vremena fermentacije na proizvodnju lipaze.....	30
4.3.2. Utjecaj početnog udjela vlage supstrata na proizvodnju lipaze	31
4.3.3. Utjecaj početne mase supstrata na proizvodnju lipaze.....	33
4.3.4. Utjecaj temperature na proizvodnju lipaze	34
4.5. Utjecaj temperature skladištenja na aktivnost lipaze	34
5. ZAKLJUČCI	36
6. LITERATURA.....	38

Popis oznaka, kratica i simbola

OZNAKE:

β_0 - konstanta jednadžbe odzivnog polinoma;

β_{ij} - koeficijent člana interakcije jednadžbe odzivnog polinoma;

β_j - koeficijent linearnog člana jednadžbe odzivnog polinoma;

β_{jj} - koeficijent kvadratnog člana jednadžbe odzivnog polinoma;

d = promjer kivete (1 cm)

dA/dt = promjena apsorbancije u vremenu (min^{-1})

ε = ekstinkcijski koeficijent ($2,6159 \text{ dm}^3 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

k – broj varijabli

V_e = volumen enzima u kiveti (cm^3)

V_u = ukupni volumen uzorka u kiveti (cm^3)

X_1 – Masa supstrata (g)

X_2 – Udio inokuluma (-)

X_3 – Udio vlage (%)

X_4 – Vrijeme fermentacije (dani)

X_5 - Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)

$X_{i,j}$ - ispitivane nezavisne varijable (procesni uvjeti)

Y - modelom predviđena odzivna funkcija

KRATICE:

ANOVA –analiza varijance (eng. Analysis of Variance)

BBD –Box-Behnken plan pokus (eng. Box-Behnken Design)

CCD– centralno kompozitni plan pokusa (eng. Central-Composite Design)

FFD– faktorijalni plan pokusa (eng. Full Factorial Design)

CCF – plošno centrirani kompozitni plan (eng. Face centres composite design)

PMMA – polimetil metakrilat

RSM – metoda odzivnih površina (eng. Response surface methodology)

SSF – fermentacija na čvrstim nosačima (eng. Solid State Fermentation)

TLL– lipaza iz *Thermomyces lanuginosus*

1. UVOD

U današnje vrijeme, sve više istraživanja bavi se razvojem održivih metoda i procesa. S obzirom na to, agroindustrijski ostaci koriste se često kao supstrati za proizvodnju različitih proizvoda, uključujući materijale, kemikalije, gnojiva i energiju. Velika pozornost pridaje se istraživanju mogućnosti primjene ovih supstrata za uzgoj mikroorganizama s ciljem proizvodnje industrijskih enzima, od kojih je lipaza jedan od značajnijih.

Lipaza (triacilglicerol hidrolaza, EC 3.1.1.3) je enzim koji katalizira reakcije hidrolize, esterifikacije i transesterifikacije. Izvori lipaza su biljke, životinje i mikroorganizmi, a najčešće se koriste filamentne gljive. Jedna od njih je termofilna gljiva *Thermomyces lanuginosus* koja je podložna rastu na temperaturama od 20°C - 60°C (Singh i sur., 2003.; Contesini i sur., 2010).

Potreba za održivom i energetski efikasnijom proizvodnjom enzima zahtjeva i bolje tehnike fermentacije. Zbog sličnosti s prirodnim staništem mikroorganizma te povećanom proizvodnjom enzima fermentacija na čvrstim nosačima (eng. Solid State Fermentation, SSF) smatra se prikladnom metodom za proizvodnju lipaze. U tom procesu mikroorganizmi razgrađuju složene organske spojeve supstrata u manje molekule djelovanjem kompleksnog enzimskog sustava (Koyani i Rajput, 2015).

Mnogi čimbenici mogu značajno utjecati na učinkovitost procesa te ih je stoga potrebno optimirati. Metoda odzivnih površina (eng. Response surface methodology, RSM) omogućuje procjenu učinaka nekoliko procesnih varijabli koje djeluju na sustav kao i njihovu samu interakciju (Liyana-Pathirana i Shahidi, 2005).

U ovom radu proces proizvodnje lipaze iz *Thermomyces lanuginosus* proveden je u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima na pogači buče dobivenoj kao nusprodukt proizvodnje bučinog ulja. Istraženi su optimalni uvjeti proizvodnje lipaze prema Box-Behnken eksperimentalnom planu metodom odzivnih površina, te je ispitana mogućnost skladištenja lipaze na različitim temperaturama, u određenom vremenu skladištenja.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. *Thermomyces lanuginosus*

Thermomyces lanuginosus je termofilna filamentozna gljiva prvi put izolirana 1899. godine iz krumpira. Pripada skupini *Deuteromycete* te se razmnožava nespolno formirajući konidiofore, morfološki slične vegetativnim hifama (Xie i sur., 2020). Na raznim medijima kolonije *Thermomyces lanuginosus* rastu relativno brzo te mijenjaju obojenje od početne bijele boje, preko sivo-zelene i ljubičaste do zrele tamno smeđe boje (Singh i sur., 2003).

Većina gljiva su mezofili te rastu pri temperaturama između 20 °C i 40 °C, a optimalan rast postižu pri 25-30°C, dok termofilne gljive imaju optimalan rast između 40-50°C, a ponekad rastu i na višim temperaturama uz postizanje veće toplinske stabilnosti enzima (Sreelatha i sur., 2017). *T. lanuginosus* je termofilna gljiva koja raste na temperaturi od 20°C do 60°C uz temperaturni optimum oko 50°C (Singh i sur., 2003). Također, *T. lanuginosus* čini dio prirodne mikroflore raspadajućeg biološkog materijala poljoprivredne i šumarske industrije te komposta. Do danas je izolirano više sojeva *T. lanuginosus* iz otpadnog materijala kao što su juta, drvo bukve, kukuruzovina, žetveni ostatci, rezanci šećerne repe i drugi (Gomes i sur., 1993.; Matsuzawa i sur., 1999).

Uzgoj *T. lanuginosus* provodi se s ciljem proizvodnje velikog broja termostabilnih enzima od znanstvenog i komercijalnog interesa kao što su α -amilaza, α -glukozidaza, β -glukozidaza, glukoamilaza, invertaza, maltaza, ksilanaza, pektinaza, fitaza, proteaza, aminopeptidaza i lipaza (Jensen i sur., 2002).

2.2. Lipaza

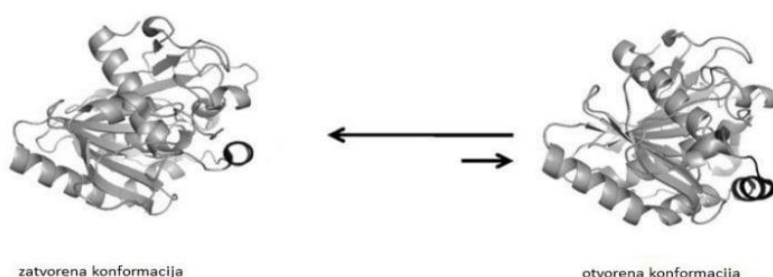
Lipaze su hidrolitički enzimi koji kataliziraju hidrolizu triacilglicerola u glicerol i masne kiseline. Sveprisutne su u prirodi, a izvori lipaza su životinje, biljke i mikroorganizmi. Bakterijske lipaze osim što su stabilnije od ostalih također su i komercijalno važnije zbog lakšeg uzgoja te postizanja većeg prinosa (Bharathi i Rajalakshmi, 2019).

2. Teorijski dio

Industrijska potražnja za novim izvorima lipaza s različitim katalitičkim karakteristikama potaknula je izolaciju enzima i odabir novih sojeva ili uzgoj genetski modificiranih mikroorganizama kao što je *Pichia pastoris* s mogućnosti ekspresije gena koji kodira za sintezu lipaze (Yan i sur., 2014). Za upotrebe u industrijama komercijalno značajne su samo mikrobne termostabilne lipaze. Istraživanja sve više vode prema izolaciji enzima čije se reakcije mogu izvoditi na višim temperaturama, čime se povećava topljivost supstrata i stupanj konverzije (Zheng i sur., 2010).

Lipaze se razvrstavaju u dvije različite skupine, na temelju njihove specifičnosti i izvora. Mikrobne lipaze imaju važnu primjenu u biotehnologiji jer su stabilne pri visokoj temperaturi, različitim rasponima pH vrijednosti te u raznim organskih otapalima (Bharathi i Rajalakshmi, 2019).

Lipaze su vrlo učinkovite u katalizirajućim reakcijama u vodenom mediju i mediju s niskim udjelom vode (organski medij). U homogenom mediju imaju aktivni centar koji je izoliran od medija polipeptidnim lancem, zvan hidrofobni poklopac. Ovisno o podrijetlu lipaze ovisi i veličina poklopca. U prisutnosti hidrofobnih nosača, proteina ili neke druge molekule, poklopac se pomiče, lipaza se adsorbira na hidrofobnu površinu u otvorenu konformaciju, pri čemu je aktivni centar dostupan molekulama supstrata za moguće stvaranje enzim-supstrat kompleksa (Fernandez-Lafuente, 2010).



Slika 1. Promjena konformacije lipaze *Thermomyces lanuginosus* na granicama faza ulje-voda (Fernandez-Lafuente, 2010)

Lipaza iz *T. lanuginosus* (TLL) pokazuje stabilnost u lužnatom području pH vrijednosti, stabilna je pri povišenoj temperaturi i pokazuje veliki afinitet prema različitim supstratima. TLL je vrlo učinkovita u katalizirajućim reakcijama u vodenom i organskom mediju, a predstavlja protein molekulske mase 31 700 g/mol koji se sastoji od 269 aminokiselina (Fernandez-Lafente, 2010). Aktivno mjesto TLL čini slijed od tri aminokiseline (Ser-His-Asp). Nadalje, hidrofobni poklopac smješten iznad aktivnog mjesta enzima nužan je za međufaznu aktivnost lipaze gdje se postavljanjem u položaj otvorene konformacije omogućuje stvaranje enzim-supstrat kompleksa. Zbog navedenih karakteristika, TLL odstupa od klasične Michaelis-Menteničine kinetike (Šibalić i sur., 2020).

Lipaze iz *T. lanuginosus* se uglavnom proizvode u industrijskim mjerilima s dobro poznatim sojevima *Aspergillus niger*, no sve raširenija istraživanja dovela su do proizvodnje lipaze iz *T. lanuginosus* submerznim uzgojem ili uzgojem na čvrstim nosačima. Uzgojem na čvrstim nosačima dobiva se veća proizvodnja i produktivnost enzima, te veća stabilnost i poboljšana katalitička svojstva enzima. Osim toga, niska brzina prijenosa metaboličke topline uzgojem na čvrstim nosačima poboljšava rast i proizvodnju enzima iz termofilnih gljiva. Također omogućuje i nastanak biokatalizatora s prirodno imobiliziranim enzimima sprječavajući postupke ekstrakcije, pročišćavanja te daljnje imobilizacije enzima (Ávila-Cisneros i sur., 2014).

2.2.1. Primjena lipaze u industrijama

Industrijska primjena enzima dovodi do velike uštede energije, kemikalija, vremenskog trajanja procesa, oslobađanja štetnih plinova i eutrofikacije što rezultira istim ili čak povećanim prinosom konačnog proizvoda u odnosu na kemijski katalizirane procese. Mikrobne lipaze predstavljaju industrijski važne biokatalizatore, a mikroorganizmi prepoznati kao potencijalni proizvođači lipaza su bakterije, gljive i kvasci (Bharathi i Rajalakshmi, 2019).

Industrija pulpe i papira koristi enzim lipazu u procesu razgradnje smole koja smanjuje kvalitetu samog papira uzrokovanjem mrlja (Skals i sur., 2008). Kožna

industrija enzime proteazu i lipazu koristi za razgradnju neželjenih proteina i masti iz životinjske dlake (Li et al., 2010). U industriji hrane i pića koristi se u proizvodnji pekarskih proizvoda za poboljšanje okusa i produljenje roka trajanja, te u procesu proizvodnje kruha djelujući na lipide povećanjem emulgirajućih svojstava. U proizvodnji mliječnih proizvoda za hidrolizu mlijeka, masti te modifikaciju masti iz maslaca što rezultira razvojem okusa u mlijeku, siru i maslacu. Industrija mesa i ribe lipazu upotrebljava za poboljšanje okusa uklanjanjem masti iz mesa i ribe, a u industriji pića za poboljšanje okusa alkoholnih pića (Verma i sur., 2012). Zamjenom kemijskih katalizatora s imobiliziranom lipazom u proizvodnji finih kemikalija smanjuje se količina toksičnog otpada, vrijeme reakcije, te se zaobilazi primjena kromatografskih kolona čime se štedi otapalo. Kozmetička industrija koristi enzim lipazu kao zamjenu za kositreni katalizator u procesu transesterifikacije biljnih ulja u svrhu smanjenja nastalog otpada te uštede energije zbog njegove aktivnosti pri niskim temperaturama. Korištenjem lipaze u postupku enzimske proizvodnje biodizela nastaje manje otpadne vode, manji je utrošak energije kao i zagađenje okoliša te ne nastaju nusprodukti u odnosu na kemijski kataliziran proces gdje se kao katalizatori koriste kiseline ili lužine. Farmaceutska industrija upotrebljava enzim lipazu zajedno s katalizatorom nikla u reakcijama za dobivanje lijeka koji se koristi za poremećaje živčanog sustava (γ -aminomaslačna kiselina), kako bi se povećala brzina reakcije i prinos proizvoda (Jegannathan i Nielsen, 2013). Lipaze u medicinskoj industriji služe kao dijagnostički alat u ispitivanju triglicerida u krvi, dok se u pročišćavanju otpadnih voda koriste za odmašćivanje odvoda začepljenih lipidima (Sreelatha i sur., 2017).

2.3. Fermentacija na čvrstim nosačima

Fermentacija na čvrstim nosačima podrazumijeva način uzgoja mikroorganizma u mediju bez prisutnosti slobodne vode. U navedenom slučaju, čvrsti nosači predstavljaju izvor makro- i mikro-elemenata potrebnih za rast i razvoj mikroorganizma. U odnosu na uzgoj drugih mikroorganizama, SSF predstavlja okruženje u kojima gljive prirodno rastu. Najjednostavniji primjer navedenog tipa

fermentacije predstavlja kompostiranje uz prisustvo prirodno prisutnih mikroorganizama (Raghavarao i sur., 2003).

SSF je postupak u kojemu je čvrsta podloga, odnosno supstrat, postavljena u fermentoru, inokulirana s jednim ili više sojeva te se inkubira u kontroliranim uvjetima. Uspješno se koristi u proizvodnji mikrobni proizvoda poput enzima, farmaceutskih lijekova, goriva, industrijskih kemikalija i hrane. U današnje vrijeme koristi se i kao nova tehnologija za proizvodnju proteina ili polipeptida hrane. Tijekom SSF, mikrobni rast događa se na granici faza čvrsto-tekuće te mikroorganizmi razgrađuju složene organske spojeve iz supstrata do jednostavnijih koje koriste za svoj rast i metabolizam (Yin i sur., 2019).

S godinama SSF nailazi na sve veće zanimanje jer se može koristiti u razne svrhe. Najvažnija svojstva ovakvog načina uzgoja čine otpornosti mikroorganizama na stvaranje inhibicije enzimom uz prisutnost veće količine supstrata kao što su glukoza, glicerol ili neki drugi izvori ugljika. Nadalje, kao važan faktor izdvaja se korištenje agroindustrijskih nusprodukata kao supstrata za proizvodnju metabolita uz niske troškove, te omogućuje ekonomsku održivost SSF kao i smanjenje ekoloških problema (Lizardi-Jiménez i Hernánadez-Martínez, 2017).

SSF zahtijeva korištenje manjih volumena vode u odnosu na sumbreznu fermentaciju, što ima veliki utjecaj na ekonomičnost procesa te korištenje uglavnom jeftinih agroindustrijskih nusproizvoda kao medija za uzgoj kulture (Banat i sur., 2020). Nadalje, kod SSF je potrebno provoditi kontrolu važnih parametara kao što su temperatura, udio vlage te miješanje kako bi se postigla aeracija podloge bez oštećenja mikroorganizam (Agarwal i sur., 2020).

Mnoge gljive u prirodnim staništima rastu na čvrstim materijalima kao što su drvo i lišće, te proizvode visoke prinose enzima. Takvi uvjeti postižu se i SSF koji se provode šaržno, a nusprodukti industrija koji su korišteni kao supstrati ovise o prikladnosti za rast odabranog radnog mikroorganizma. Mikroorganizam može rasti na površini supstrata, unutar matriksa supstrata te između dijelova supstrata.

Prilikom rasta mikroorganizmi proizvode enzime koji razgrađuju makromolekule koje onda koriste kao izvore C i N (Mitchell i sur., 2002).

2.4. Modeliranje metodom odzivnih površina

Metoda odzivnih površina je skup empirijskih i statističkih tehnika kojima se modeliraju i optimiraju određeni procesni uvjeti u svrhu dobivanja odgovarajućeg odziva kao funkcije nezavisnih (ulaznih) varijabli. Ovu metodu razvili su 1951. godine Box i Wilson te se od tada koristi kao tehnika za dizajniranje raznih pokusa. RSM je visoko učinkovita i pouzdana metoda koja osim što identificira parametre koji utječu na proces, objašnjava i međusobni odnos između ispitivanih parametara, a primjenjuje se u slučajevima gdje više varijabli utječe na proces. Ima široku primjenu u proučavanju interakcija, odabiru optimalnih uvjeta i kvantificiranju odnosa između jednog ili više izmjerenih odgovora u ograničenom broju eksperimenata (Isiaka i Olufolahan, 2018. ; Witek-Krowiak i sur.,2014).

RSM definira učinak nezavisnih varijabli, samih ili u kombinaciji, na procese. Korištenjem ove metode dobije se veliki broj informacija za manji broj eksperimenata što dovodi do uštede vremena s obzirom na klasične metode. Postupci optimizacije RSM-om mogu se podijeliti u tri faze. Prva faza obuhvaća određivanje nezavisnih parametara procesa te postavljanje njihovih razina. Druga faza je odabir eksperimentalnog dizajna te predviđanje i provjera jednadžbe modela, dok treća faza uključuje nastanak trodimenzionalne odzivne površine kao odgovor funkcije nezavisnih parametara (Baş i Boyaci, 2007).

Jedan od učinkovitih načina skraćivanja vremena je planiranje pokusa (engl. Design of Experiments, DOE). Izrada plana pokusa kojim se definiraju eksperimenti koji će se provesti vrši se prije primjene same metode odzivnih površina.

Nekoliko najčešćih oblika plana pokusa su:

- Centralno kompozitni plan pokusa (eng. *Central composite design*, CCD)
- Plošno centrirani kompozitni plan (eng. *Face centres composite design*, CCF)

- Box-Behnken plan pokusa (eng. *Box-Behnken design*, BBD)
- Faktorijalni plan pokusa (eng. *Full Factorial design*, FFD)

Odabir dizajna eksperimenta ovisi najviše o tome kakvu odzivnu funkciju očekujemo. Za aproksimaciju funkcije odaziva eksperimentalnim podacima koji se ne mogu opisati linearnim funkcijama, treba koristiti eksperimentalni dizajn za modele drugog reda (kvadratni polinom). Primjer dizajna za modele drugog reda je Box-Behnken dizajn ili trofaktorijalni pokus na tri razine. Dizajn je kreiran kako bi se smanjio broj eksperimenata te poboljšala preciznost samog modela uklanjajući eksperimentalne točke koje imaju visoke vrijednosti te odudaraju od uklapanja u kvadratni model (Bezerra i sur., 2008.; Witek-Krowiak i sur., 2014).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Zadatak

Zadatak ovog diplomskog rada bio je:

- a) Ispitati međusobni utjecaj procesnih uvjeta fermentacije (početna masa supstrata, udio inokuluma, udio vlage, vrijeme i temperatura fermentacije) na proizvodnju lipaze uzgojem *T. lanuginosus* na bučinoj pogači prema Box-Behnken eksperimentalnom planu.
- b) Aproksimirati eksperimentalne podatke matematičkim modelom te evaluirati prikladnost modela matematičko-statističkim metodama pomoću programskog paketa Design-Expert® 7.0.0.
- c) Odrediti optimalne uvjete proizvodnje lipaze numeričkom optimizacijom primjenom metode odzivnih površina.
- d) Provesti uzgoj *T. lanuginosus* prema definiranim optimalnim uvjetima s ciljem validacije matematičkog modela.

3.2. Materijali

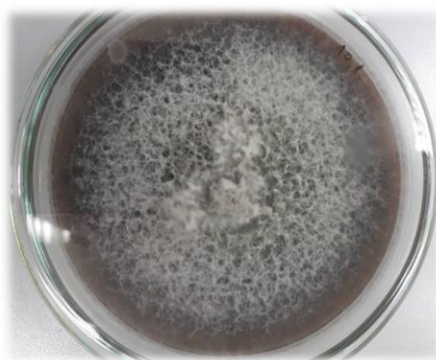
3.2.1. Supstrat i mikroorganizam

Istraživanja su provedena na pogači buče dobivenoj nakon proizvodnje hladno prešanog bučinog ulja (SME Lazić, Vraneševci, Hrvatska). Neposredno prije provedbe fermentacije, peleti buče su usitnjeni na ultracentrifugalnom mlinu (ZM200, Retsch, Njemačka) na veličinu čestica 1 – 5 mm i čuvani u zamrzivaču na -20 °C.



Slika 2. Ultracentrifugalni mlin Retsch ZM200

Radni mikroorganizam korišten u ovom radu je *Thermomyces lanuginosus* Tsiklinsky (ATCC®76323TM) (DSMZ Institut, Njemačka). Prije provedbe eksperimenata, kultura je uzgajana na krumpirovom agaru (Biolife Italiana Sr. L. Viale Monza, Milan, Italija) deset dana pri 45 °C.



Slika 3. *Thermomyces lanuginosus*

3.2.2. Kemikalije

Za provedbu eksperimenata korištene su sljedeće kemikalije: krumpirov agar (PDA) (Biolife Italiana Srl, Italija), klorovodična kiselina (Sigma Aldrich, Austrija), acetonitril (J. T. Baker, SAD), tris(hidroksimetil)aminometan (Tris) i Arapska guma (Acros Organics, Belgija), *p*-nitrofenil palmitat (*p*NP-palmitat) (Alfa Aesar, SAD).

3.2.3. Priprema Tris-HCl pufera

U 250 cm³ destilirane vode dodano je 3,0285 g tris(hidroksimetil)aminometana (100 mmol dm⁻³ otopina Tris-baze). Potom je 25 cm³ pripremljene otopine razrijeđeno s 25 cm³ destilirane vode (50 mmol dm⁻³ otopina Tris-baze) te je provedena korekcija na pH 9 s klorovodičnom kiselinom (Tris-HCl pufer, 50 mmol dm⁻³, pH = 9).

3.2.4. Priprema pufera s emulgatorom

U 50 cm³ Tris-HCl pufera (50 mmol dm⁻³, pH = 9) dodano je 0,15 g emulgatora (Arapska guma). Emulgator je otopljen u ultrazvučnoj kupelji (Elmasonic P 120H, Njemačka).

3.2.5. Priprema otopine pNP-palmitata

Otopina supstrata za mjerenje enzimske aktivnosti pripremljena je otapanjem pNP-palmitata u acetonitrilu tako da je koncentracija pNP-palmitata iznosila 10 mmol dm⁻³.

3.3. Metode

3.3.1. Fermentacija na čvrstim nosačima

Fermentacija na čvrstim nosačima provedena je u laboratorijskim staklenkama ukupnog volumena 650 cm³. Procesni uvjeti fermentacije definirani su prema Box-Behnken eksperimentalnom planu (**Tablica 2**). U laboratorijske staklenke odvagana je određena masa usitnjenih bučinih peleta te je dodana potrebna količina destilirane vode s ciljem provedbe korekcije početne vlažnosti supstrata (X_1 i X_3 varijable). Uzorci su potom dobro promiješani da bih se osigurala adekvatna poroznost i ujednačena vlažnost supstrata te sterilizirani u autoklavu tijekom 15 minuta na 121 °C (TIP 7510945, Sutjeska, Beograd).



Slika 4. Autoklav TIP 7510945, Sutjeska, Beograd

Nakon hlađenja na sobnu temperaturu, supstrat u svakoj teglici inokuliran je s micelijским diskovima *T. lanuginosus* na PDA agaru ($\varnothing = 1$ cm) suspendiranih u 5 cm³ sterilizirane destilirane vode. Broj micelijских diskova korištenih za pripremu inokuluma definiran je u Box-Behnken eksperimentalnom planu (**Tablica 2**) (X_2 varijabla). Fermentacija je provedena u inkubatoru (BINDER GmbH, KB 115, Njemačka) s ventilacijom postavljenom na 20 %. Vrijeme i temperatura fermentacije definirani su eksperimentalnim planom kao varijable X_4 i X_5 . Prema Box-Behnkenu provedeno je 46 eksperimenata u dvije paralelne probe.



Slika 5. Inkubator, BINDER GmbH, KB 115, Njemačka

3.3.2. Ekstrakcija enzima

Nakon fermentacije provedena je ekstrakcija lipaze. U 2 g fermentiranog supstrata dodano je 10 cm³ pufera (Tris-HCl; 50 mmol dm⁻³, pH = 9). Ekstrakcija je provedena intenzivnim miješanjem svakih 5 minuta tijekom 15 minuta (Vortex MX-S, DLAB Scientific, Kina) pri sobnoj temperaturi ($T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Ekstrakti su izbistreni centrifugiranjem tijekom 5 minuta pri 10 000 rpm (Z 326 K, Hermle Labortechnik GmbH, Njemačka). Dobiveni supernatant korišten je za određivanje aktivnosti lipaze.



Slika 6. Mješalica, Vortex MX-S,
DLAB Scientific, Kina



Slika 7. Centrifuga, Z 326 K, Hermle
Labortechnik GmbH, Njemačka

3.3.3. Mjerenje aktivnosti lipaze

Aktivnost lipaze mjerena je spektrofotometrijski (UV-1280 UV-VIS Spectrophotometer, Shimadzu, Japan) pri valnoj duljini $\lambda = 440\text{ nm}$ (Šibalić i sur., 2020). Reakcijska smjesa za određivanje aktivnosti lipaze pripravljena je intenzivnim miješanjem 2880 μL pufera s emulgatorom (Tris-HCl, 50 mmol dm⁻³, pH = 9; Arapska guma 0,3 % (w/v)) i 120 μL supstrata (pNP-palmitat, 10 mmol dm⁻³) na vrtložnoj mješalici u staklenoj epruveti. Nakon miješanja supstrata u puferu, reakcijska smjesa

inkubirana je na 35 °C pri djelovanju ultrazvuka u trajanju od 1 minute (frekvencija = 35 kHz, snaga = 100%) s ciljem pripreme stabilne emulzije. Potom je 900 µL reakcijske smjene izuzeto u PMMA kivetu te je provedena inicijalizacija reakcije hidrolize supstrata dodatkom 100 µL ekstrakta enzima. Kinetika nastanka produkta praćena je promjenom apsorbancije u vremenu tijekom 120 sekundi u vremenskom intervalu od 60. do 120. sekunde. Volumna aktivnost lipaze izračunata je prema formuli:

$$V.A. = \frac{V_u}{\varepsilon \cdot d \cdot V_e} \cdot \frac{dA}{dt}$$

gdje je:

$V.A.$ = volumna aktivnost enzima ($U \text{ cm}^{-3}$)

V_u = ukupni volumen uzorka u kiveti (cm^3)

V_e = volumen enzima u kiveti (cm^3)

ε = ekstinkcijski koeficijent ($2,6159 \text{ dm}^3 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

d = promjer kivete (1 cm)

dA/dt = promjena apsorbancije u vremenu (min^{-1})

3.3.4. Određivanje pH vrijednosti supstrata

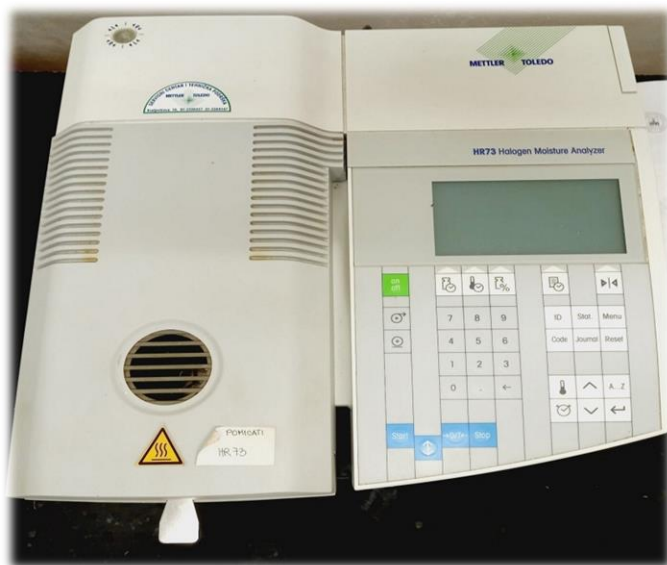
Za određivanje pH vrijednosti supstrata nakon fermentacije provedena je ekstrakcija s vodom. U 2 g fermentiranog supstrata dodano je 10 cm^3 destilirane vode. Ekstrakcija je provedena miješanjem tijekom 15 minuta u pravilnim vremenskim intervalima od 5 minuta (Vortex MX-S, DLAB Scientific, Kina) pri sobnoj temperaturi. pH vrijednost ekstrakta mjerena je pH-metrom (MA 5740, Iskra, Slovenija).



Slika 8. pH- metar, MA 5740, Iskra, Slovenija

3.3.5. Određivanje suhe tvari

Udio suhe tvari određen je u svim uzorcima (svježem i biološki obrađenom supstratu), termogravimetrijskom metodom na uređaju za radijacijsko-infracrveno sušenje (HR-73, Mettler Toledo). Na aluminijsku pliticu postavljenu na integriranu vagu uređaja odvagan je 1 g usitnjenog uzorka te je sušenje provedeno brzom metodom. Uvjeti sušenja su: standardna metoda, temperatura sušenja 105 °C i kriterij završetka procesa (eng. switch off 3: gubitak mase od 1 g u 50 s) (Planinić i sur. 2004). Tijekom sušenja instrument kontinuirano određuje masu uzorka, a sušenje je provedeno do konstantne mase. Određivanje suhe tvari za sve uzorke provedeno je u jednoj probi.



Slika 9. HR-73, Mettler Toledo

3.3.6. Ispitivanje temperature skladištenja na aktivnost lipaze

Sirovi enzimski ekstrakti lipaze skladišteni su na tri različite temperature (25°C, 4°C i -20°C) te je enzimska aktivnost mjerena tijekom 100 dana skladištenja. Da bi se izbjegao utjecaj zamrzavanja i odmrzavanja, ekstrakti na -20°C skladišteni su zasebno za svaki dan uzorkovanja.

3.3.7. Box-Behnkenov plan pokusa i obrada podataka metodom odzivnih površina

U ovom radu metoda odzivnih površina korištena je za procjenu utjecaja i optimiranje procesnih uvjeta fermentacije na aktivnost lipaze. Prema prethodno definiranoj jednadžbi (1) za izračun broja eksperimenata predložen je Box-Behnkenov plan pokusa s tri ponavljanja u centralnoj točki ispitivanog eksperimentalnog područja (Tablica 2).

Pet ispitivanih varijabli u tri razine (Tablica 1) su prevedene u kodirane varijable prema izrazu:

$$X = \frac{x - \frac{(x_{max} + x_{min})}{2}}{\frac{(x_{max} - x_{min})}{2}} \quad 1$$

Tablica 1. Faktori utjecaja i područje eksperimentalnog ispitivanja u tri razine za procjenu utjecaja uvjeta fermentacije na aktivnost lipaze

Varijable	Kodirana varijabla		
	-1	0	1
X ₁ – Masa supstrata (g)	30	50	70
X ₂ – Udio inokuluma (-)	3	5	7
X ₃ – Udio vlage (%)	50	60	70
X ₄ – Vrijeme fermentacije (dani)	2	3	4
X ₅ - Temperatura (°C)	35	40	45

Tablica 2. Box-Behnkenov plan pokusa (eksperimentalna matrica) korišten za proizvodnju lipaze

Br. Eksperimenta	X ₁ (g)	X ₂ (-)	X ₃ (%)	X ₄ (dani)	X ₅ (°C)
1	30	3	60	3	40
2	70	3	60	3	40
3	30	7	60	3	40
4	70	7	60	3	40
5	50	5	50	2	40
6	50	5	70	2	40
7	50	5	50	4	40
8	50	5	70	4	40
9	50	3	60	3	35
10	50	7	60	3	35
11	50	3	60	3	45
12	50	7	60	3	45
13	30	5	50	3	40

3. Eksperimentalni dio

14	70	5	50	3	40
15	30	5	70	3	40
16	70	5	70	3	40
17	50	5	60	2	35
18	50	5	60	4	35
19	50	5	60	2	45
20	50	5	60	4	45
21*	50	5	60	3	40
22*	50	5	60	3	40
23*	50	5	60	3	40
24	50	3	50	3	40
25	50	7	50	3	40
26	50	3	70	3	40
27	50	7	70	3	40
28	30	5	60	2	40
29	70	5	60	2	40
30	30	5	60	4	40
31	70	5	60	4	40
32	50	5	50	3	35
33	50	5	70	3	35
34	50	5	50	3	45
35	50	5	70	3	45
36	30	5	60	3	35
37	70	5	60	3	35
38	30	5	60	3	45
39	70	5	60	3	45
40	50	3	60	2	40
41	50	7	60	2	40
42	50	3	60	4	40
43	50	7	60	4	40
44*	50	5	60	3	40
45*	50	5	60	3	40
46*	50	5	60	3	40

* Centralna točka

Prema Box-Behnkenovom planu pokusa provedeno je 46 eksperimenata sa 6 ponavljanja u centralnoj točki ispitivanog eksperimentalnog područja. Za aproksimaciju dobivenih eksperimentalnih podataka korišten je kvadratni polinom drugog reda, odnosno matematički model odzivnih površina:

$$Y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j X_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} X_j^2 + \sum_{j=1}^{k-1} \sum_{i=1}^k \beta_{ij} X_i X_j \quad 2$$

gdje je:

Y - modelom predviđena odzivna funkcija;

β_0 - konstanta jednadžbe odzivnog polinoma;

β_j - koeficijent linearnog člana jednadžbe odzivnog polinoma;

β_{jj} - koeficijent kvadratnog člana jednadžbe odzivnog polinoma;

β_{ij} - koeficijent člana interakcije jednadžbe odzivnog polinoma;

$X_{i,j}$ - ispitivane nezavisne varijable (procesni uvjeti);

k – broj varijabli

Na osnovi dobivenog matematičkog modela (polinoma) konstruirana je odzivna površina koja omogućava vizualni prikaz međusobnog utjecaja ispitanih nezavisnih varijabli na promatrani odaziv (aktivnost lipaze). Odzivna površina može se prikazati kao površina u 3D prostoru ili pomoću kontura odzivnih površina.

Procjena koeficijenata modela nelinearnom regresijskom analizom, statistička analiza (ANOVA) značajnosti ispitivanih parametara na promatrane procese te numerička optimizacija ispitivanih procesnih parametara provedena je primjenom softverskog paketa Design Expert® 7.0.0.

Provjera uspješnosti optimiranja SSF procesa provedena je usporedbom rezultata dobivenih metodom odzivnih površina i eksperimentalno dobivenih rezultata pri utvrđenim optimalnim uvjetima fermentacije.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Rezultati eksperimenata proizvodnje lipaze provedenih prema Box-Behnken dizajnu

U ovom radu ispitan je utjecaj uvjeta uzgoja termofilne gljive *T. lanuginosus* na čvrstim nosačima s ciljem proizvodnje lipaze visoke volumne aktivnosti. Prvi dio diplomskog rada odnosio se na definiranje Box-Behnken eksperimentalnog plana prema kojemu je ispitan utjecaj 5 nezavisnih varijabli u tri razine (početna masa supstrata (X_1), udio inokuluma (X_2), udio vlage (X_3), vrijeme fermentacije (X_4), temperatura fermentacije (X_5)) na proizvodnju lipaze (Y). U tu svrhu definirano je i provedeno 46 eksperimenata sa 6 ponavljanja u centralnoj točki ispitanog područja.

Nakon fermentacije, provedena je ekstrakcija lipaze te je izmjerena volumna aktivnost u 3 paralelna mjerenja. Volumna aktivnost lipaze izmjerena za svaki pojedini eksperiment prikazana je kao srednja vrijednost u **tablici 3**. Plavo označeni eksperimenti predstavljaju procesne uvjete u kojima je dobivena maksimalna aktivnost lipaze. Prema dobivenim eksperimentalnim rezultatima može se zaključiti da procesni uvjeti fermentacije (u ispitanom području) značajno utječu na proizvodnju lipaze, budući da su izmjerene vrijednosti aktivnosti lipaze bile u rasponu od $0,0085 \text{ U cm}^{-3}$ do $16,5096 \text{ U cm}^{-3}$. Maksimalna aktivnost lipaze dobivena je u eksperimentima koji su provedeni na temperaturi od $45 \text{ }^\circ\text{C}$. Međutim, da bi se procijenio utjecaj ostalih ispitanih varijabli na proizvodnju lipaze, potrebno je aproksimirati eksperimentalne podatke matematičkim modelom, procijeniti koji od faktora modela statistički značajno utječu na proizvodnju lipaze te provesti numeričku optimizaciju s ciljem definiranja optimalnih uvjeta proizvodnje lipaze.

Tablica 3. Srednje vrijednosti volumne aktivnosti lipaze u ekstraktima biološki obrađene bučine pogače dobivenim pri ispitivanju različitih procesnih uvjeta fermentacije prema Box-Behnkenovom dizajnu (eksperimentalna matrica)

br. eksperimenata	X_1 (g)	X_2 (-)	X_3 (%)	X_4 (dani)	X_5 ($^\circ\text{C}$)	Y (U cm^{-3})
-------------------	--------------	--------------	--------------	-----------------	-------------------------------	-------------------------------

4.Rezultati i rasprava

1	30	3	60	3	40	1,8716
2	70	3	60	3	40	0,6617
3	30	7	60	3	40	2,4867
4	70	7	60	3	40	0,1467
5	50	5	50	2	40	1,4402
6	50	5	70	2	40	0,0109
7	50	5	50	4	40	4,1764
8	50	5	70	4	40	0,0537
9	50	3	60	3	35	0,0181
10	50	7	60	3	35	0,0194
11	50	3	60	3	45	16,2229
12	50	7	60	3	45	16,0079
13	30	5	50	3	40	9,9086
14	70	5	50	3	40	1,1626
15	30	5	70	3	40	0,0837
16	70	5	70	3	40	0,0085
17	50	5	60	2	35	0,0103
18	50	5	60	4	35	0,0103
19	50	5	60	2	45	16,1751
20	50	5	60	4	45	2,1193
21*	50	5	60	3	40	1,5056
22*	50	5	60	3	40	1,5138
23*	50	5	60	3	40	1,6209
24	50	3	50	3	40	0,2787
25	50	7	50	3	40	4,4765
26	50	3	70	3	40	0,0486
27	50	7	70	3	40	0,3144
28	30	5	60	2	40	0,4377
29	70	5	60	2	40	0,3937
30	30	5	60	4	40	3,0229
31	70	5	60	4	40	0,8553
32	50	5	50	3	35	0,0194
33	50	5	70	3	35	0,0195
34	50	5	50	3	45	13,2841
35	50	5	70	3	45	14,2637
36	30	5	60	3	35	0,0175
37	70	5	60	3	35	0,0121
38	30	5	60	3	45	10,9188
39	70	5	60	3	45	16,5096
40	50	3	60	2	40	2,7065
41	50	7	60	2	40	3,5862
42	50	3	60	4	40	1,6495

43	50	7	60	4	40	2,0022
44*	50	5	60	3	40	1,7355
45*	50	5	60	3	40	1,3991
46*	50	5	60	3	40	1,8770

* Centralna točka



Slika 10. Prikaz uzgoja termofilne gljive *T. lanuginosus* od 1. do 7. dana fermentacije (eksperiment broj 39 u **tablici 3**)

4.2. Modeliranje i optimiranje uvjeta proizvodnje lipaze

Drugi dio diplomskog rada odnosi se na aproksimaciju eksperimentalnih podataka matematičkim modelom te evaluacija prikladnosti modela matematičko-statističkim metodama pomoću programskog paketa Design-Expert® 7.0.0. Kvadratni model (**jednadžba 3**) korišten je za aproksimaciju eksperimentalnih podataka. Budući da se predloženi model, s obzirom na broj promatranih varijabli koje utječu na odaziv, sastoji od 5 linearnih članova, 5 kvadratnih članova i 10 članova interakcije, potrebno je provesti evaluaciju prikladnosti odabranog modela pomoću analize varijanci (ANOVA).

$$\begin{aligned}
 Y = & \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_5 X_5 + \beta_1^2 X_1^2 + \beta_2^2 X_2^2 + \beta_3^2 X_3^2 + \\
 & \beta_4^2 X_4^2 + \beta_5^2 X_5^2 + \beta_1 \beta_2 X_1 X_2 + \beta_1 \beta_3 X_1 X_3 + \beta_1 \beta_4 X_1 X_4 + \beta_1 \beta_5 X_1 X_5 + \beta_2 \beta_3 X_2 X_3 + \\
 & \beta_2 \beta_4 X_2 X_4 + \beta_2 \beta_5 X_2 X_5 + \beta_3 \beta_4 X_3 X_4 + \beta_3 \beta_5 X_3 X_5 + \beta_4 \beta_5 X_4 X_5
 \end{aligned} \tag{3}$$

Svi članovi modela koji se nisu pokazali statistički značajnim (kriterij $p < 0,05$) isključeni su iz modela, eksperimentalni podatci su ponovo aproksimirani te je u konačnici definiran reducirani matematički model kvadratnog polinoma sa pripadajućim koeficijentima regresije (**jednadžba 4**).

$$Y = 1,68 + (-1,10 \cdot X_1) + 1,03 \cdot X_2 + (-1,82 \cdot X_3) + 4,48 \cdot X_5 + 2,17 \cdot X_1 \cdot X_3 + 2,68 \cdot X_2 \cdot X_5 + (-2,04 \cdot X_3 \cdot X_5) + (-2,29 \cdot X_4 \cdot X_5) + 2,82 \cdot X_5^2 \quad 4$$

Rezultati ANOVA analize (**tablica 4**) pokazali su da je predloženi model statistički značajan ($p < 0,0001$), te da model može opisati 82,82% varijabilnosti eksperimentalnih rezultata. Prema p -vrijednosti, temperatura (X_5) je imala najveći utjecaj na proizvodnju lipaze, prateći udio vlage (X_3), početnu masu supstrata (X_1) te udio inokuluma (X_2). Također, prema rezultatima statističke analize vidljivo je da je nezavisna varijabla X_4 (vrijeme fermentacije) uklonjena iz modela kao linearni član. Međutim, kao član interakcije sa temperaturom (X_4X_5) vrijeme kao nezavisna varijabla pokazuje statistički značajan utjecaj na proizvodnju lipaze. Signifikantnost u modelu također predstavlja i međusobna interakcija temperature i udjela inokuluma (X_2X_5) te temperature i udjela vlage (X_3X_5). Definirani matematički model korišten je prilikom numeričke optimizacije optimalnih uvjeta uzgoja *T. lanuginosus* i proizvodnje lipaze maksimalne volumne aktivnosti.

Tablica 4. Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno određene aktivnosti lipaze u ekstraktima biološki obrađene bučine pogače polinomnim modelom primjenom višestruke regresije

	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	456,51	9	50,72	17,14	< 0,0001
<i>Linearni članovi</i>					
X_1	17,76	1	17,76	6,00	0,0200
X_2	14,99	1	14,99	5,07	0,0314

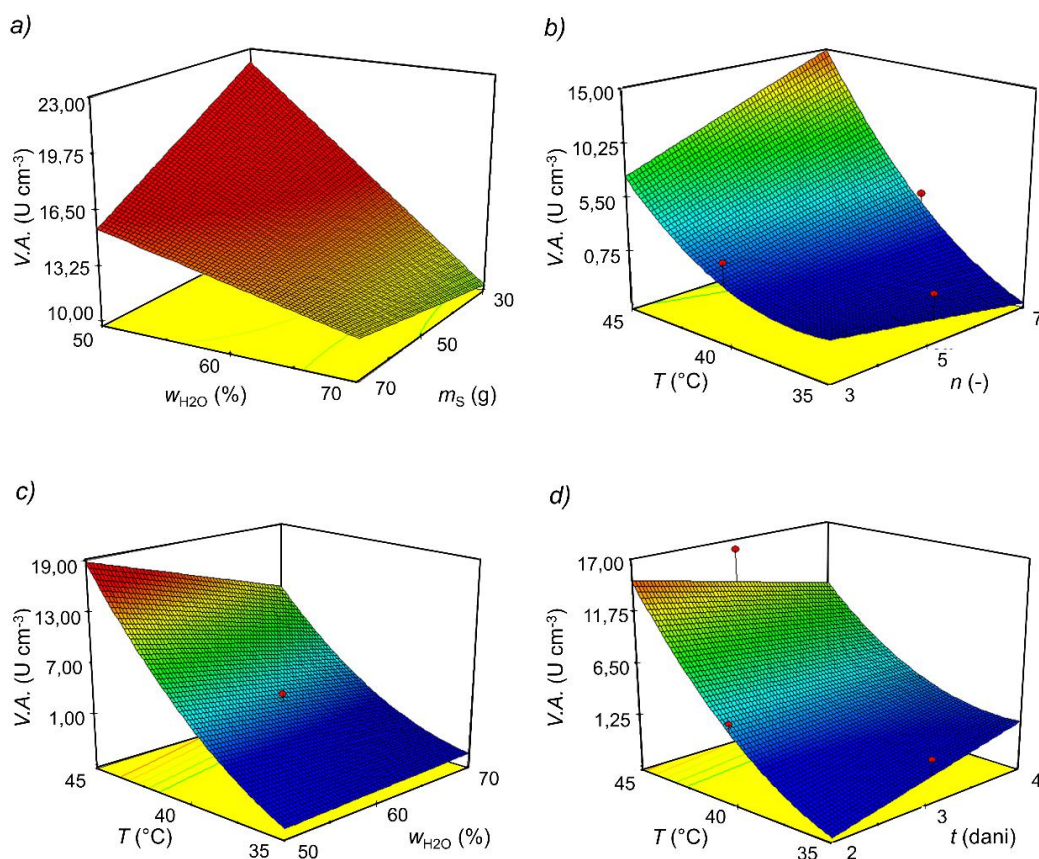
X_3	46,35	1	46,35	15,66	0,0004
X_5	162,02	1	162,02	54,75	< 0,0001
<i>Članovi interakcije</i>					
X_1X_3	18,80	1	18,80	6,35	0,0169
X_2X_5	18,48	1	18,48	6,25	0,0178
X_3X_5	10,65	1	10,65	3,60	0,0668
X_4X_5	13,98	1	13,98	4,73	0,0372
<i>Kvadratni članovi</i>					
X_5^2	50,48	1	50,48	17,06	0,0002
Ostatak	94,69	32	2,96		
Nedostatak modela	93,50	27	3,46	14,54	0,0036
Pogreška	1,19	5	0,24		
Ukupno	551,20	41			
R^2	0,8282				

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

Vizualni prikaz utjecaja statistički značajnih članova na promatrani odziv (aktivnost lipaze) prikazani su trodimenzionalnim (3D) odzivnim površinama konstruiranih pomoću definiranog matematičkog modela (**slika 11. a-d**). Vizualni prikaz daje uvid u međusobni utjecaj ispitanih varijabli na promatrani odziv. Na osnovu dobivenih eksperimentalnih rezultata, reduciranog matematičkog modela i odzivnih površina provedena je numerička optimizacija procesa te su definirani optimalni uvjeti proizvodnje lipaze kako slijedi:

- a) $m_s = 50$ g,
- b) $n = 7$,
- c) $w_{H_2O} = 60\%$,
- d) $t = 2$ dana,
- e) $T = 45$ °C.

Prema definiranim optimalnim uvjetima fermentacije i matematičkom modelu maksimalna aktivnost lipaze iznosi $14,9985 \text{ U cm}^{-3}$. Validacija modela provedena je prema optimalnim uvjetima fermentacije te je izmjerena aktivnost lipaze u ekstraktu iznosila $15,7690 \text{ U cm}^{-3}$ što pokazuje kako je model s 95.113% točnosti pokazao slaganje s eksperimentalnim rezultatom.



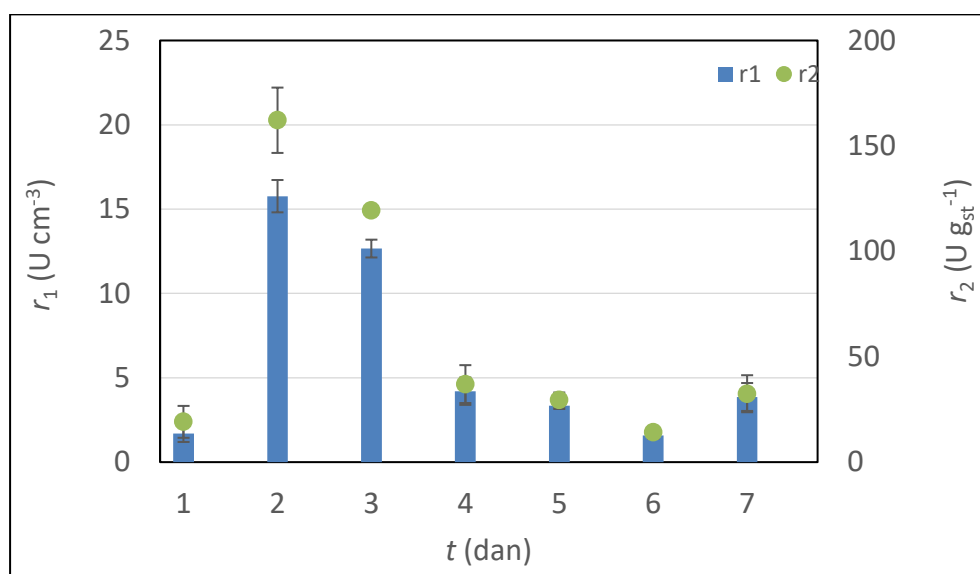
Slika 11. Trodimenzionalni dijagram odzivne površine za aktivnost lipaze u ovisnosti o interakciji: a) udjela vode i mase supstrata; b) temperature i udjela inokuluma; c) temperature i udjela vode; d) temperature i vremena fermentacije

4.3. Profil proizvodnje lipaze pri optimalnim uvjetima

Nakon definiranja optimalnih uvjeta, proveden je SSF proces u trajanju od 7 dana s ciljem validacije modela te prikupljanja dodatnih informacija o procesu proizvodnje lipaze. U tu svrhu, provedeni su šaržni eksperimenti u laboratorijskim staklenkama prema prethodno definiranim uvjetima u dvije paralelne probe. Tijekom svakog dana fermentacije provedena je ekstrakcija lipaze, izmjerena je aktivnost lipaze, određen je udio vlage te pH vrijednost supstrata prema opisanom protokolu u poglavlju 3.

4.3.1. Utjecaj vremena fermentacije na proizvodnju lipaze

Rezultati mjerenja aktivnosti lipaze tijekom SSF procesa prikazani su na **slici 12** kao volumna aktivnost r_1 (U cm^{-3}) te izražena na suhu tvar supstrata r_2 ($\text{U g}_{\text{st}}^{-1}$). Prema predikcijama definiranog matematičkog modela (**jednadžba 4**), aktivnost lipaze smanjuje se tijekom trajanja fermentacije što je prikazano negativnim predznakom ispred interakcijskog parametra X_4 (vrijeme fermentacije) te je vidljivo i pomoću vizualnog prikaza odzivnih površina na slici **11 d**. S obzirom na dobivene eksperimentalne rezultate, najveća aktivnost lipaze postignuta je nakon drugog dana fermentacije nakon čega slijedi smanjenje aktivnosti enzima. Maksimalna aktivnost lipaze iznosila je $15,8 \text{ U cm}^{-3}$ i $162,1 \text{ U g}_{\text{st}}^{-1}$. Usporedno s literaturnim rezultatima o proizvodnji lipaze na čvrstim nosačima iz *T. lanuginosus* (Damaso i sur., 2008; Ávila-Cisneros i sur., 2014; Tišma i sur., 2019) zaključeno je da su nakon provedbe optimizacije SSF uvjeta postignute do sad najveće aktivnosti lipaze.



Slika 12. Profil proizvodnje lipaze tijekom fermentacije (Procesni uvjeti: $m_s = 50$ g, $n = 7$, $w_{H_2O} = 60\%$, $t = 7$ dana $T = 45$ °C)

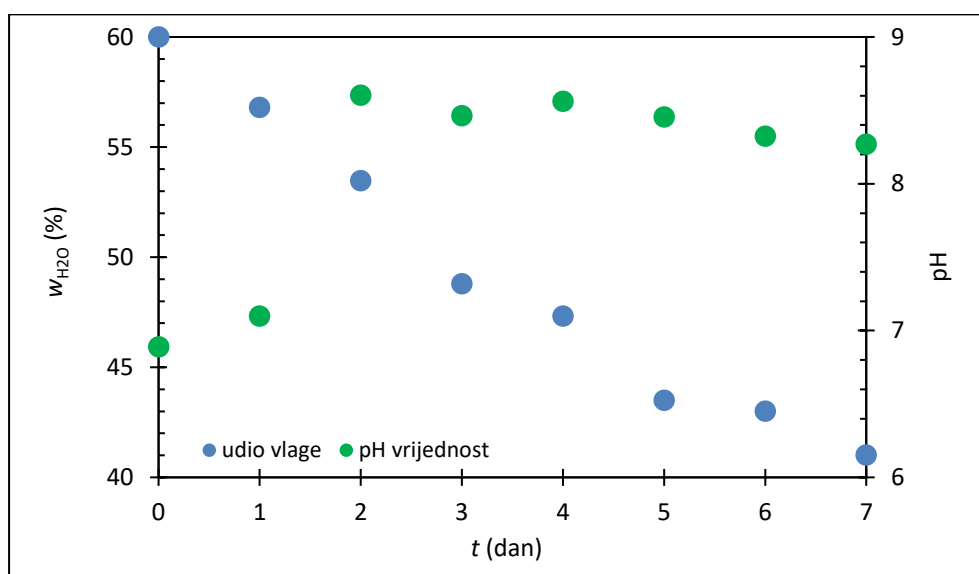
Prema rezultatima vidljiv je trend smanjenja aktivnosti lipaze tijekom SSF procesa. Pad aktivnosti lipaze može biti izazvana fizikalnim, kemijskim i biokemijskim promjenama supstrata. Primjerice, na smanjenje proizvodnje lipaze ili inhibiciju mogu utjecati polifenolni spojevi koji se prirodno nalaze u supstratu ili su oslobođeni tijekom fermentacije kao i izlučivanje sekundarnih metabolita mikroorganizma (Yang i sur., 2020). Slične rezultate pokazali su i drugi autori koji su naveli utjecaj proteaza kao glavnog faktora inhibicije lipaze (Di Luccio i sur., 2004, Kempka i sur., 2008).

4.3.2. Utjecaj početnog udjela vlage supstrata na proizvodnju lipaze

U ovom istraživanju, mjerenje udjela vlage se pokazao kao jedan od najvažnijih parametara za rast mikroorganizama i sintezu lipaze. Do prestanka sinteze lipaze ili inhibiciju može dovesti promjena udjela vlage supstrata. Konačni udio vlage u supstratu predstavlja početni udio vode, voda koja je nastala tijekom respiracije, utrošena voda tijekom metaboličke aktivnosti radnog mikroorganizma, te voda koja se gubi isparavanjem (Nagel i sur., 2000). Iz tog razloga, ispitan je utjecaj početne vlage supstrata na proizvodnju lipaze tijekom SSF procesa, u rasponu od 50% do 70%.

Prema rezultatima statističke analize, vidljivo je da nezavisna varijabla X_3 (udio vlage) ima signifikantan utjecaj u modeliranju i optimizaciji procesa ($p = 0,0004$). Nadalje, prema 3D prikazu odzivnih površina (**slika 11 c**), smanjenje početnog udjela vlage supstrata pri optimalnoj temperaturi (45 °C) doprinosi povećanju volumne aktivnosti lipaze. Međutim, uslijed povišene temperature tijekom SSF dolazi do značajnog gubitka vode u supstratu što je vidljivo iz rezultata prikazanih na **slici 13**. Do trećeg dana fermentacije, udio vode bio je manji od 50% te je došlo do smanjenja aktivnosti lipaze. S druge strane, povećanjem početnog udjela vlage supstrata sa 60% na 70% rezultiralo je sljepljivanjem i aglomeracijom čestica supstrata. Posljedično tomu, onemogućeno je prodiranje hifa mikroorganizama u unutrašnjost supstrata te je došlo do smanjene proizvodnje lipaze. Iz tog razloga, početni udio vlage od 60% definiran je kao optimalni udio za primijenjeni šaržni sustav.

Također, promatrana je promjena pH vrijednosti supstrata tijekom fermentacije (**slika 13**), pri čemu je za određivanje početne pH vrijednosti korišten biološki neobrađen i nesterilan supstrat. Prije inokulacije supstrata, pH vrijednost iznosila je 6,9. Do drugog dana fermentacije bilježi se porast na 8,6 nakon čega sljedećih dana fermentacije pH vrijednost ostaje konstantna. Povećanje pH vrijednosti i smanjenje aktivnosti lipaze može se objasniti proteolitičkom aktivnosti i prisutnosti amonijevih iona koji se oslobađaju tijekom deaminacije aminokiselina (Di Luccio i sur., 2004).



Slika 13. Udio vlage i pH vrijednosti supstrata tijekom fermentacije (Procesni uvjeti:

$$m_s = 50 \text{ g}, n = 7, w_{\text{H}_2\text{O}} = 60\%, t = 7 \text{ dana}, T = 45 \text{ }^\circ\text{C}$$

4.3.3. Utjecaj početne mase supstrata na proizvodnju lipaze

Prilikom optimizacije SSF uvjeta ispitan je utjecaj početne mase supstrata na proizvodnju lipaze. Promjena početne mase supstrata direktno je utjecala ne samo na početnu koncentraciju mikro- i makroelemenata potrebnih za metaboličku aktivnost mikroorganizma, nego i na visinu sloja supstrata u laboratorijskoj staklenci. Prema rezultatima statističke analize masa supstrata predstavlja signifikantnu varijablu u procesu. Nadalje, negativan predznak prije interakcijskog parametara u modelu predlaže smanjenje početne mase supstrata, što je vidljivo i prema 3D prikazu odzivne površine (**slika 11 a**). Eksperimenti koji su provedeni s većim udjelom supstrata (70 g) uzrokovalo je ljepljivost supstrata što može smanjiti poroznost te dovesti do aglomeracije čestica i ograničiti prijenosa mase i kisika u bioreaktoru. Suprotno tomu, u eksperimentima koji su provedeni s manjom početnom masom supstrata (30 g) zabilježen je veći trend smanjenja udjela vlage supstrata (brže

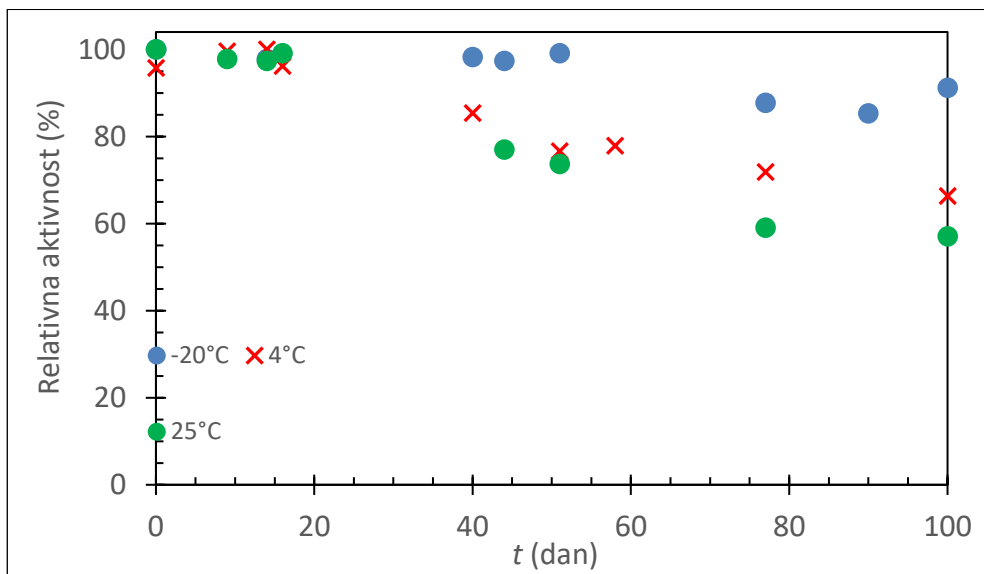
isušivanje) što je rezultiralo smanjenom proizvodnjom lipaze. U interakciji s ostalim nezavisnim varijablama optimalna masa supstrata iznosi 50 g.

4.3.4. Utjecaj temperature na proizvodnju lipaze

Od svih testiranih nezavisnih varijabli, najznačajniji utjecaj na proizvodnju lipaze imala je temperatura ($p < 0,0001$) s pozitivnim predznakom u regresijskom modelu. Prema modelu, povećanje temperature dovodi do boljeg rasta termofilnog mikroorganizma kao što je *T. lanuginosus*, a samim time i veću proizvodnju lipaze. Trodimenzionalni (3D) dijagram metode odzivnih površina (**slika 11 b, c, d**) prikazuje međusobni utjecaj temperature i drugih ispitanih varijabli na proizvodnju lipaze. Prema svim rezultatima, vidljivo je da je maksimalna aktivnost lipaze postignuta u ispitnom području pri 45 °C.

4.5. Utjecaj temperature skladištenja na aktivnost lipaze

Stabilnost sirovog enzimskog ekstrakta praćena je pri temperaturama skladištenja na 25 °C, 4 °C i -20 °C te je mjerena aktivnost lipaze tijekom 100 dana skladištenja. Prema rezultatima (**slika 14**) aktivnost lipaze na temperaturama 25 °C i 4 °C pri definiranim uvjetima skladištenja nije se mijenjala do 20. dana skladištenja, dok se na temperaturi od -20 °C početna aktivnost lipaze nije se mijenjala do 60. dana skladištenja. Nakon 100 dana, uočen je pad aktivnosti lipaze za 43% pri temperaturi od 25 °C, za 34% pri temperaturi od 4 °C, te za 10% pri temperaturi skladištenja od -20 °C. Bitno je napomenuti da smrzavanje i odmrzavanje nije utjecalo na aktivnost lipaze.



Slika 14. Relativna aktivnost lipaze tijekom skladištenja sirovog enzimskog ekstrakta na tri temperature

5. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobivenih eksperimentalnih podataka te statističke obrade istih doneseni su sljedeći zaključci:

- ✓ Dokazana je mogućnost proizvodnje lipaze uzgojem na čvrstim nosačima koristeći *T. Lanuginosus* kao termofilnu gljivu te pogaču buče kao supstrat koji predstavlja nusprodukt prehrambene industrije.
- ✓ Nakon provedenih eksperimenata vidljivo je da istraživani procesni uvjeti fermentacije (m_s , n , w_{H_2O} , t , T) znatno utječu na proizvodnju lipaze.
- ✓ Maksimalna aktivnost lipaze izmjerena je pri temperaturi od 45 °C, drugog dana fermentacije ($V.A. = 15,8 \text{ U cm}^{-3}$) što pokazuje 95,1 % podudaranja i točnosti s predloženim modelom ($V.A. = 14,9985 \text{ U cm}^{-3}$).
- ✓ Nakon optimizacije procesa definirani su optimalni uvjeti proizvodnje lipaze pri čemu početna masa supstrata (X_1) iznosi 50 g, broj plagova inokuluma (X_2) je 7, početni udio vlage supstrata (X_3) 60 %, vrijeme fermentacije (X_4) 2 dana,, te temperatura fermentacije (X_5) od 45 °C.
- ✓ Prema rezultatima ANOVA analize, najveći utjecaj na proizvodnju lipaze ima temperatura, zatim udio vlage, početna masa supstrata i udio inokuluma, dok vrijeme fermentacije utječe u interakciji sa ostalim članovima.
- ✓ Smanjenjem početnog udjela vlage dolazi do povećanja aktivnosti lipaze, no i do značajnog gubitka vode u supstratu, s obzirom na optimalnu temperaturu od 45 °C pri kojoj *T. lanuginosus* bolje raste i producira lipazu.
- ✓ Povećanje početne mase supstrata dovodi do promjene teksture i ljepljivosti materijala, dok manji udio mase supstrata dovodi do bržeg isušivanja te smanjenja proizvodnje lipaze.
- ✓ pH vrijednost raste do drugog dana fermentacije s početnih pH 6,9 na pH 8,6 te ostalih dana fermentacije ostaje konstantna.
- ✓ Rezultati mjerenja aktivnosti lipaze prilikom 100 dana skladištenja na temperaturama od 25 °C i 4 °C pokazali su da je lipaza stabilna do 20. dana skladištenja.

- ✓ Rezultati mjerenja aktivnosti lipaze prilikom 100 dana skladištenja na temperaturi od -20 °C pokazali su da je lipaza stabilna do 60. dana skladištenja.

6. LITERATURA

Literatura

- Agarwal V, Kumar D, Varadwaj P, Tiwari A: Water activity and biomass estimation using digital image processing in solid- state fermentation. *Bioresource Technology* 308:1-6, 2020.
- Ávila-Cisneros N, Velasco-Lozano S, Huerta-Ochoa S, Córdova-López J, Gimeno M, Favela-Torres E: Production of Thermostable Lipase by *Thermomyces lanuginosus* on Solid,State Fermentation: Selective Hydrolysis of Sardine Oil. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 174:1859-1872, 2014.
- Banat IM, Carboué Q, Saucedo-Castañeda G, Cázares-Marinero J: Biosurfactants: The Green Generation of Speciality Chemicals and Potential Production Using Solid-State Fermentation (SSF) Technology. *Bioresource Technology* 320:15-17, 2020.
- Baş D, Boyacı IH: Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 78:836–845, 2007.
- Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, Villar LS, Escaleira LA: Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* 76:965-977, 2008.
- Bharathi D, Rajalakshmi G: Microbial lipases: An overview of screening, production and purification. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 22:1-11, 2019.
- Damaso MCT, Passianoto MA, Freitas SC de, Freire DMG, Lago RCA, Couri S: Utilization of agroindustrial residues for lipase production by solid-state fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology* 39:676–681, 2008.
- Di Luccio M, Capra FF, Ribeiro NP, Vargas GDLP, Freire DMG, De Oliveira D: Effect of temperature, moisture, and carbon supplementation on lipase production by solid-state fermentation of soy cake by *Penicillium simplicissimum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 113:173–180, 2004.
- Fernandez-Lafuente R: Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 62: 197–212, 2010.
- Gomes J, Purkarthofer H, Hayn M, Kapplmüller J, Sinner M, Steiner W: Production of a high level of cellulase-free xylanase by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* in laboratory and pilot scales using lignocellulosic materials. *Applied Microbiology and Biotechnology* 39:700–707, 1993.

- Isiaka AA, Olufolahan OA: Optimization of culture conditions for enhanced lipase production by an indigenous *Bacillus aryabhattai* SE3-PB using response surface methodology. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 32:1-10, 2018.
- Jegannathan KR, Nielsen PH: Environmental assessment of enzyme use in industrial production. *Journal of Cleaner Production* 42: 228-240, 2013.
- Jensen B, Nebelong P, Olsen J, Reeslev M: Enzyme production in continuous cultivation by the thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*. *Biotechnology Letters* 24:41–45, 2002.
- Kempka AP, Lipke NL, da Luz Fontoura Pinheiro T, Menoncin S, Treichel H, Freire DMG, Di Luccio M, de Oliveira D: Response Surface Method to Optimize the Production and Characterization of Lipase from *Penicillium verrucosum* in Solid State Fermentation. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 31:119–125, 2008.
- Koyani RD, Rajput KS: Solid State Fermentation: Comprehensive Tool for Utilization of Lignocellulosic through Biotechnology. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques* 5:1-10, 2015.
- Li S, Li J, Yi J, Shan Z: Cleaner beam house process trial on cattle sofa leather. *Journal of Cleaner Production* 18:471-477, 2010.
- Liyana-Pathirana C, Shahidi F: Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chemistry* 93:47–56, 2005.
- Lizardi-Jiménez MA, Hernánadez-Martínez R: Solid state fermentation (SSF): diversity of applications to valorize waste and biomass. *Springer* 44:1-7, 2017.
- Matsuzawa M, Muramatsu T, Yamamori T, Knoll W, Yano R: Characterization and biobleaching effect of hemicellulases produced by thermophilic fungi. *Biotechnology Letters* 21:415–420, 1999.
- Mitchell D, Berovic M, Krieger N: Overview of solid state bioprocessing. *Biotechnology Annual Review*, 8:183-225, 2002.
- Nagel F-JJ, Tramper J, Bakker MSN, Rinzema A: Model for On-Line Moisture-Content Control During Solid-State Fermentation. *Biotechnology & Bioengineering*, 72:231–243, 2000.
- Planinić M, Bucić A, Tomas S, Bilić M, Velić D, Koceva Komlenić D: Fast moisture determination methods in flour samples. *Proceedings of International*

- Congress Flour-Bread'03 and 6. Croatian Congress of Cereal Technologists, str. 102-108. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2004.
- Raghavarao KSMS, Ranganathan TV, Karanth NG: Some engineering aspects of solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 13:127–135, 2003.
- Singh S, Madlala AM, Prior BA: *Thermomyces lanuginosus*: properties of strains and their hemicellulases. *FEMS Microbiology Reviews* 27:3–16, 2003.
- Skals PB, Krabek A, Nielsen PH, Wenzel H: Environmental assessment of enzyme assisted processing in pulp and paper industry. *The International Journal of Life Cycle Assessment* 13:124-132, 2007.
- Sreelatha B, Koteswara Rao V, Ranjith Kumar R, Girisham S, Reddy SM: Culture conditions for the production of thermostable lipase by *Thermomyces lanuginosus*. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences* 6:87-95, 2017.
- Šibalić D, Šalić A, Zelić B, Nam Tran N, Hessel V, Tišma M: A new spectrophotometric assay for measuring the hydrolytic activity of lipase from *Thermomyces lanuginosus*: a kinetic modeling. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 8:4818–4826, 2020.
- Tišma M, Tadić T, Budžaki S, Ostojčić M, Šalić A, Zelić B, Tran NN, Ngothai Y, Hessel V: Lipase production by solid-state cultivation of *Thermomyces lanuginosus* on by-products from cold-pressing oil production. *Processes*, 7:1-12, 2019.
- Verma N, Thakur S, Bhatt AK: Microbial lipases: industrial applications and properties. *International Research Journal of Biological Sciences*, 1:88-92, 2012.
- Witek-Krowiak A, Chojnacka K, Podstawczyk D, Dawiec A, Pokomeda K: Application of response surface methodology and artificial neural network methods in modelling and optimization of biosorption process. *Bioresource Technology* 160:150-160, 2014.
- Xie X-L, Wei Y, Song Y-Y, Pan G-M, Chen L-N, Wang G, Zhang S-H: Genetic analysis of four sexual differentiation process proteins (isp4/SDPs) in *Chaetomium thermophilum* and *Thermomyces lanuginosus* reveals their distinct roles in development. *Frontiers in Microbiology* 10:1-5, 2020.
- Yan J, Zheng X, Li S: A novel and robust recombinant *Pichia pastoris* yeast whole cell biocatalyst with intracellular overexpression of a *Thermomyces lanuginosus* lipase: Preparation, characterization and application in biodiesel production. *Bioresource Technology* 151:43–48, 2014.

- Yang, X-Y, Zhang J-X, Ding Q-Y, He Z-C, Zhu C-Y, Zhang K-Q, Niu X-M: Metabolites from two dominant thermophilic fungal species *Thermomyces lanuginosus* and *Scytalidium thermophilum*. *Chemistry and Biodiversity*, No. e2000137, 17, 2020.
- Yin H, Jia F, Huang J: The variation of two extracellular enzymes and soybean meal bitterness during solid-state fermentation of *Bacillus subtilis*. *Grain & Oil Science and Technology* 2:39-43, 2019.
- Zheng YY, Guo XH, Song NN, Li DC: Thermophilic lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Gene cloning, expression and characterization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 69:127-132, 2010.