Proizvodnja lakaze i mangan-peroksidaze tijekom uzgoja Trametes versicolor na kukuruznoj silaži i bioreaktoru s pliticama

Jurić, Dino

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:109:407455

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-19**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

SVEUČILIŠTE J. J. STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO–TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Dino Jurić

PROIZVODNJA LAKAZE I MANGAN-PEROKSIDAZE TIJEKOM UZGOJA *TRAMETES VERSICOLOR* NA KUKURUZNOJ SILAŽI U BIOREAKTORU S PLITICAMA

DIPLOMSKI RAD

Osijek, listopad, 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za procesno inženjerstvo
Katedra za termodinamiku i reakcijsko inženjerstvo
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet: Kemijski i biokemijski reaktori
Tema rada je prihvaćena na X. sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 12.07.2016.
Mentor: izv. prof. dr. sc. *Marina Tišma*

Proizvodnja lakaze i mangan-peroksidaze tijekom uzgoja *Trametes versicolor* na kukuruznoj silaži u bioreaktoru s pliticama

Dino Jurić, 290 - DI

Sažetak:
U ovom radu istraživan je utjecaj dodatka različitih induktora (bakrov sulfat, ferulična kiselina, siringična kiselina, vanilinska kiselina, veratrilni alkohol) na aktivnost lakaze i mangan-peroksidaze tijekom sedam dana uzgoja *T. versicolor* na kukuruznoj silaži u malom mjerilu s početnom masom supstrata od 50 g. Najveće aktivnosti oba enzima postignute su 7. dan provedbe pokusa u pokusima kada je kao induktor korištena 0,1 mol dm^{-3} otopina $CuSO_4$., pri čemu je volumna aktivnost lakaze iznosila 1389,1 U dm^{-3}, a mangan-peroksidaze 209,1 U dm^{-3} Napravljeno je uvećanje procesa u bioreaktoru s pliticama, dimenzija 75 x 154 x 70 cm, sa šest plitica dimenzija 50 x 5 x 40 cm. Proces je proveden pri sljedećim početnim uvjetima: $m_{kukuruzne\ silaže}$ = 600 g (po svakoj plitici), vlažnost supstrata = 82,30 ± 0,26 %, visina sloja supstrata = 3 cm, veličina čestica supstrata = 1-2 cm, masa inokuluma: 200 g, protok zraka = 2,5 dm^3 min^{-1}, T = 27 °C, t = 5 - 7 dana, c_{CuSO4} = 0,1 mol dm^{-3}. Najveće aktivnosti oba enzima postignute su 7. dan provedbe pokusa, pri čemu je volumna aktivnost lakaze iznosila 722,1 U dm^{-3}, a mangan-peroksidaze 140,1 U dm^{-3}.

Ključne riječi: *Trametes versicolor*, lakaza, mangan-peroksidaza, SSF fermentacija, induktori

Rad sadrži: Slika: 28
Stranica: 52
Tablica: 4
Literaturnih referenci: 37

Jezik izvornika: Hrvatski

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

1.	izv. prof. dr. sc. *Natalija Velić*	predsjednik
2.	izv. prof. dr. sc. *Marina Tišma*	član-mentor
3.	izv. prof. dr. sc. *Ana Bucić-Kojić*	član
4.	izv. prof. dr. sc. *Mirela Planinić*	zamjena člana

Datum obrane: 6. listopada 2017.
Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of process engineering
Subdepartment of thermodynamic and reaction engineering
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Course title: Chemical and biochemical reactors
Thesis subject was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology Osijek at its session no. X. held on July 12th, 2016.
Mentor: *Marina Tišma, PhD, associate prof.*

Production of laccase and manganese peroxidase during the cultivation of *Trametes versicolor* on corn silage in a tray bioreactor

Dino Jurić, 290 - DI

Summary:
In this work, the influence of various inducers (copper sulphate, ferulic acid, syringic acid, vanillic acid, veratryl alcohol) on activity of laccase and manganese-peroxidase, during 7 days solid-state small-scale cultivation of *T. versicolor* on corn silage with the initial substrate mass of 50 g, was investigated. The highest enzymes activities were achieved on the seventh day using 0.1 mol dm^{-3} of $CuSO_4$ as an inducer, and were 1389,1 U dm^{-3} and 209,1 U dm^{-3} for laccase and manganese-peroxidase, respectively.

The scale-up of the process was done in the tray bioreactor (75 x 154 x 70 cm) comprised of six trays (50 x 5 x 40 cm). The process was carried out at the following initial process conditions: $m_{\text{corn silage}}$ = 600 g (per tray), substrate humidity of 82,30 ± 0,26 %, substrate layer height = 3 cm, substrate particle size = 1- 2 cm, inoculum mass = 200 g, airflow = 2.5 dm^3 min^{-1}, T = 27 °C, t = 5 - 7 days, c_{CuSO4} = 0,1 mol dm^{-3}. The highest enzymes activities were achieved on the seventh day and were 722.1 U dm^{-3} and 140.1 U dm^{-3}, for laccase and manganese-peroxidase, respectively.

Key words: *Trametes versicolor*, laccase, manganese peroxidase, SSF fermentation, inducers

Thesis contains: Figures: 28
Pages: 52
Tables: 4
References: 37

Original in: Croatian

Defense committee:

1. *Natalija Velić*, PhD, associate prof. — chair person
2. *Marina Tišma*, PhD, associate prof. — supervisor
3. *Ana Bucić-Kojić*, PhD, associate prof. — member
4. *Mirela Planinić*, PhD, associate prof. — stand-in

Defense date: October 6, 2017.

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

Sadržaj

1. UVOD 1

2. TEORIJSKI DIO 4

2.1. Gljive bijelog truljenja 5

2.1.1. *Trametes versicolor* 6

2.2. Lakaze 7

2.3. Mangan – peroksidaza 9

2.4. Vrste bioreaktora za uzgoj mikroorganizama u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima 11

2.4.1. Bioreaktor s pliticama 17

3. EKSPERIMENTALNI DIO 19

3.1. Zadatak 20

3.2. Materijali i metode 20

3.2.1. Mikroorganizam 20

3.2.2. Supstrat 20

3.2.3. Popis kemikalija 20

3.2.4. Aparatura 21

3.2.5. Istraživanje utjecaja dodataka različitih induktora na aktivnost lakaze i mangan-peroksidaze tijekom uzgoja *Trametes versicolor* u laboratorijskim teglicama 23

3.2.6. Proizvodnja lakaze i mangan-peroksidaze tijekom uzgoja *Trametes versicolor* na kukuruznoj silaži u bioreaktoru s pliticama 24

3.3. Analitičke metode 24

3.3.1. Mjerenje aktivnosti lakaze i mangan-peroksidaze 24

3.3.2. Istraživanje ovisnosti aktivnosti lakaze i mangan-peroksidaze o pH 26

3.3.3. Istraživanje ovisnosti aktivnosti lakaze i mangan-peroksidaze o temperaturi 26

4. REZULTATI I RASPRAVA 27

4.1. Istraživanje utjecaja dodataka različitih induktora na aktivnost lakaze i mangan-peroksidaze tijekom uzgoja *T. versicolor* u laboratorijskim teglicama 28

4.2. Proizvodnja lakaze i mangan-peroksidaze tijekom uzgoja *Trametes versicolor* na kukuruznoj silaži u bioreaktoru s pliticama 40

4.3. Istraživanje ovisnosti aktivnosti lakaze i mangan-peroksidaze o pH 42

4.4. Istraživanje ovisnosti aktivnosti lakaze i mangan-peroksidaze o temperaturi 43

5. ZAKLJUČCI 46

6. LITERATURA 48

Popis oznaka, kratica i simbola

SIMBOLI:

c	množinska koncentracija tvari (mmol dm^{-3} ili mol dm^{-3})
d	promjer kivete (cm)
n	broj okretaja (okr min^{-1})
T	temperatura (°C)
t	vrijeme (dan)
$V.A.$	volumna aktivnost enzima (U dm^{-3})
V_E	volumen dodanog uzorka koji sadrži enzim (cm^3)
V_r	ukupni volumen uzorka u kiveti (cm^3)
$\Delta A/\Delta t$	promjena apsorbancije u vremenu (min^{-1})

KRATICE:

ABTS	2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)
DMP	2,6-dimetoksifenol
EC	eng. *Enzyme Classification* ili klasifikacija enzima
LiP	lignin-peroksidaza
MnP	mangan-peroksidaza
MZKI	Mikrobiološka zbirka Kemijskog instituta, Ljubljana, Slovenija
SSF	eng. *solid-state fermentation* ili fermentacija na čvrstim nosačima
U	međunarodna jedinica enzimske aktivnosti (µmol min^{-1})

GRČKI SIMBOLI:

Δ	promjena
λ	valna duljina (nm)
ε	ekstincijski koeficijent (dm^3 μmol^{-1} cm^{-1})

1. UVOD

Kukuruzna silaža se najčešće uzgaja za upotrebu kao stočna hrana te u novije vrijeme u proizvodnji bioplina zajedno s gnojnicom kao ko-supstratom. Osim kukuruzne silaže i mnoge druge kulture, ali i žetveni ostatci tih kultura upotrebljavaju se u procesima proizvodnje bioplina. Oni u tom procesu, zbog složene lignocelulozne strukture, nisu iskorišteni u potpunosti. Da bi proces proizvodnje bioplina bio što učinkovitiji u svrhu uklanjanja lignina iz lignoceluloznih materijala koriste se različite metode (kemijske, fizikalne, fizikalno-kemijske, termičke, biološke). Biološke metode, kao što je primjena gljiva bijelog truljenja, mogu se u tu svrhu koristiti zasebno ili u kombinaciji s drugim metodama. Biološke metode baziraju se na uzgoju gljiva bijelog truljenja u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima, a mogu se provoditi u različitim vrstama bioreaktora: bioreaktor s pliticama, bioreaktor s rotirajućim bubnjem, bioreaktor s fiksnim slojem, bioreaktor s prisilnom aeracijom sloja, bioreaktor s fluidiziranim slojem i dr. (Planinić i sur., 2016.).

Bioreaktor s pliticama je najjednostavniji tip ovih bioreaktora, a najčešće se sastoji od termostatirane komore s ravnim perforiranim pliticama gdje vlažni zrak cirkulira unutar komore ili se unutar reaktora raspršuje voda kako bi atmosfera bila blizu zasićenja. Prednosti ove vrste bioreaktora su u jednostavnosti izvedbe i niskim troškovima ulaganja, ali uvećanjem mjerila na industrijsku razinu pojavljuju se različiti problemi, kao što su primjerice potreba za velikim prostorom i radnom snagom (Planinić i sur., 2016.).

Osim u proizvodnji bioplina, provode se brojna istraživanja primjene ovih gljiva za proizvodnju visokovrijednih produkata kao što su primjerice enzimi. Tijekom procesa rasta na lignoceluloznim materijalima, gljive bijelog truljena razgrađuju složene polimere, zahvaljujući ekstracelularnom enzimskom sustavu. Jedni od važnijih biokatalizatora su lakaze i mangan-peroksidaze, koje zajedno s lignin-peroksidazama pripadaju skupini lignolitičkih enzima koji uspješno razgrađuju fenilpropanski polimer lignin i druge aromatske spojeve u spojeve manje molekularne mase.

Na samu produktivnost enzima utječu uvjeti provedbe procesa (masa supstrata, masa inokuluma, temperatura, pH, način miješanja), tip uzgoja (submerzni uzgoj, uzgoj na čvrstim nosačima), te dodatak različitih induktora sinteze željenog enzima.

Cilj ovog rada bio je:

a) proizvesti enzime lakazu i mangan-peroksidazu uzgojem *T. versicolor* na kukuruznoj silaži u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima u laboratorijskim teglicama, te ispitati utjecaj

dodatka različitih induktora (bakrov sulfat, ferulična kiselina, siringična kiselina, vanilinska kiselina, veratrilni alkohol) na aktivnost lakaze i mangan-peroksidaze;

b) na temelju dobivenih rezultata iz pokusa u laboratorijskim teglicama, napraviti uvećanje mjerila u bioreaktoru s pliticama (definirati početne reakcijske uvjete kao što su masa supstrata, vlažnost supstrata, masa inokuluma, vrijeme trajanja uzgoja, temperatura, odabir induktora, koncentracija induktora).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Gljive bijelog truljenja

Gljive su jedni od najrasprostranjenijih živih organizama na Zemlji. Gljive su heterotrofni, nefotosintetski organizmi čije su stanice obavijene staničnom stijenkom koja je građena od polisaharida hitina. Za većinu gljiva su karakteristične vlaknaste, cjevaste i dugačke stanice koje se nazivaju hife, a njihovim ispreplitanjem nastaje mreža hifa koja tvori micelij. Rastu svugdje u prirodi gdje postoji iskoristivi organski materijal (Johnson, 1990.; Duraković, 1996.).

Najveći broj gljiva su saprofitni organizmi koji od organskih ostataka mrtvih organizama dobivaju potrebne hranjive tvari, te kemoorganoheterotrofi s obzirom da koriste organski materijal kao izvor ugljika i energije. Mogu sintetizirati različite hidrolitičke i lignolitičke enzime pomoću kojih razgrađuju supstrate prisutne u okolišu, nakon čega otopljene hranjive tvari apsorbiraju. Primarni polisaharid koji pohranjuju je glikogen, a za sintezu vlastitih aminokiselina i proteina prvenstveno koriste glukozu i maltozu, te dušične spojeve (Pilaš, 2009.).

Gljive se prema tipu spora, morfologiji hifa i spolnom ciklusu razvrstavaju u jednu od pet taksonomskih skupina: Deuteromycetes, Zygomycetes, Ascomycetes, Basidiomycetes i Oomycetes (Šelo, 2014.).

U razred Basidiomycotina svrstavamo gljive Basidiomycetes koje su poznate kao gljive klobučarke, te njima pripadaju gljive koje rastu na drveću, jestive gljive, gljive puhare, hrđe, snijeti i otrovne gljive. Većina bazidiomiceta žive kao saprofiti i razgrađuju biljni materijal, posebno celulozu i lignin (Šelo, 2014.).

Gljive koje u prirodi rastu na drveću poznate su pod nazivom gljive truljenja i dijele se na gljive bijelog, smeđeg i mekog truljenja. Gljive bijelog truljenja imaju sposobnost razgradnje biljnog polimera lignina i lignoceluloznog materijala, te rastu na trulom ili živom drveću i drvenom materijalu. Iako su razvili kompletan enzimski sustav za razgradnju lignina, ne mogu ga koristiti kao izvor ugljika za rast i razvoj, već im je za tu svrhu potreban neki drugi izvor ugljika. Naziv su dobile po tome što tijekom procesa razgradnje lignoceluloznog materijala, materijal ostaje bijelo obojen. Gljive bijelog truljenja imaju značajnu ulogu u bioremedijaciji, jer enzimi koji sudjeluju u razgradnji drveta također mogu katalizirati razgradnju različitih onečišćujućih organskih tvari prisutnih u prirodi, pri čemu se posebno ističe gljiva *Phanerochaete chrysosporium*, za koju je poznato da može razgraditi toksične i u vodi netopljive komponente, učinkovitije od nekih drugih mikroorganizama (Gadd, 2001.; Singh, 2006.; Singh i sur.,2009.).

Za razgradnju lignina i lignoceluloznih materijala važna je kombinacija izvanstaničnih lignolitičkih enzima lakaze, lignin-peroksidaze (LiP) i mangan-peroksidaze (MnP) pa se prema ustrojstvu i proizvodnji navedenih enzima gljive bijelog truljenja mogu podijeliti u tri skupine (Lankinen, 2004):

- gljive koje proizvode LiP, MnP i lakazu
- gljive koje proizvode MnP i lakazu
- gljive koje proizvode LiP i lakazu

Gljive bijelog truljenja su otporni mikroorganizmi na širok raspon pH i temperature kao i na prisustvo različitih toksičnih spojeva (Merwe, 2002.).

2.1.1. *Trametes versicolor*

Trametes versicolor je gljiva bijelog truljenja iz razreda Basidiomycetes poznata po tome što se u prirodi pojavljuje u više različitih boja (**Slika 2.1.**), po čemu je i dobila ime (lat. *trametes* – mršav; *versicolor* – u više boja).

UHM Department of Botany, 2017. (19.8.2017.)

Varga, 2009. (19.8.2017.)

Ridgway, 2016. (19.8.2017.)

Slika 2.1. Primjeri različitog izgleda gljive *Trametes versicolor*

Široko je rasprostranjena, te je u prirodi možemo naći na različitim posječenim hrastovim trupcima i trupcima drugih stabala, te otpalim granama i stabljikama.

Različiti sojevi ovog mikroorganizma proizvode različite izvanstanične lignolitičke enzime kao što su lignin-peroksidaze, mangan-peroksidaze, celulaze, avicelulaze i ponajviše lakaze (Tavares i sur., 2005.; Singh, 2006.; Desai i Nityanand, 2011.), koji učinkovito razgrađuju lignin, bifenilne smjese i brojna sintetska bojila.

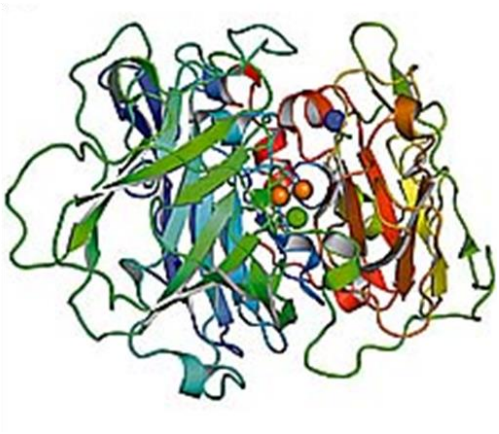
Jedna od najpoznatijih i najznačajnijih primjena *Trametes versicolor* je u procesima delignifikacije i izbjeljivanja kraft pulpe, kao i obezbojenjima otpadnih tokova nastalih izbjeljivanjem pulpe. Zbog toga je primjena *Trametes versicolor* prepoznata kao baza za nove, okolišno prihvatljivije tehnologije u industriji pulpe i papira, čime se izbjegava upotreba organskih ili anorganskih kiselina i drugih kemikalija štetnih po okoliš (Young i Masood, 1998.).

2.2. Lakaze

Lakaze (benzendiol: kisik oksidoreduktaze, EC 1.10.3.2) su izvanstanični enzimi koji pripadaju grupi oksidoreduktaza, a prema porijeklu se mogu podijeliti u dvije skupine: lakaze porijeklom iz viših biljaka i lakaze porijeklom iz gljiva koje predstavljaju znatno raširenju i zastupljeniju skupinu. Najveći broj ih je izoliran iz gljiva bijelog truljenja (Riva, 2006.; Desai i Nityanand, 2011.), te iz bakterija i kukaca (Singh i sur., 2009.; Desai i Nityanand, 2011.).

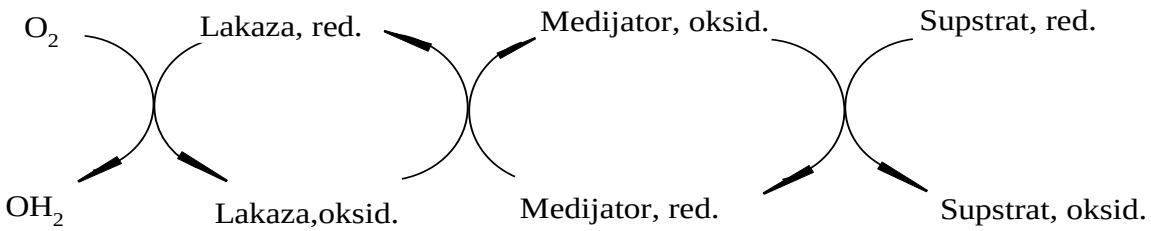
Lakaze imaju široku fiziološku funkciju, te je poznato da sudjeluju u razvoju spora kod gljiva, u procesu nastajanja melanina, oksidaciji voda i povrća, zaštiti biljaka protiv kukaca i mikroorganizama, kao i u sintezi lignina.

Lakaze se ubrajaju u skupinu metaloenzima pošto u svom katalitičkom centru sadrže više atoma bakra, te za katalitičku aktivnost su im potrebna minimalno četiri atoma bakra po aktivnoj jedinici proteina koja su razmještena na tri funkcionalna mjesta (T1, T2 i T3). Na mjestu T1 nalazi se paramagnetski „plavi“ bakar koji apsorbira pri 610 nm, zatim na T2 mjestu paramagnetski „ne plavi“ bakar koji ne apsorbira u vidljivom dijelu spektra i na T3 mjestu je smješten dijamagnetski par bakar-bakar koji apsorbira pri 330 nm (**Slika 2.2.**). Navedeni centri bakra prenose elektrone s reducirajućeg supstrata na bakar T1 te na klaster sačinjen od bakra T2 i T3, nakon čega slijedi redukcija kisika i nastanak vode (Couto i Toca-Herrera, 2007.; Minussi i sur., 2007.; Kunamneni i sur., 2008.; Singh, 2009.; Desai i Nityanand, 2011.; Šelo, 2014.).



Slika 2.2. Pojednostavljeni prikaz strukture lakaze porijeklom iz *Trametes versicolor* (Sakurai i Kataoka, 2007.)

Dok većina enzima posjeduje specifično svojstvo samo prema određenom supstratu, lakaze pomoću kisika kataliziraju oksidaciju velikog broja različitih supstrata poput *o* -, *p* - difenola, aminofenola, polifenola, poliamina, nekih anorganskih iona, lignina, arildiamina, aromatskih amina, različitih nefenolnih supstrata te askorbinske kiseline. Kako bi lakaze mogle razgraditi nefenolne spojeva i velike molekule poput lignina, potrebna im je pomoć određenih niskomolekularnih spojeva (medijatora) kao što su 3-hidroksiantranilat (HAA), 1-hidroksibenzotriazol (HBT) i 2,2'–azino–bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (ABTS) (Kunamneni i sur., 2008.; Majeau i sur., 2010.; Desai i Nityanand, 2011.).



Slika 2.3. Pojednostavljeni prikaz katalitičkog ciklusa lakaza – medijator oksidacijskog sustava (Tišma, 2010.)

Osim u industriji pulpe i papira gdje su ekološki prihvatljivije rješenje naspram standardnih postupaka izbjeljivanja (Gadd, 2001.), mogu se koristiti u prehrambenoj industriji za sprječavanje promjena poput gubitka boje, promjene okusa i mirisa hrane i pića, tj. u svrhu produljenja roka trajanja hrane i poboljšanja kvalitete (Minussi i sur., 2002.). Također je poznato da se primjenjuju u enzimskim imunotestovima (EIA), te kao biosenzori za detekciju

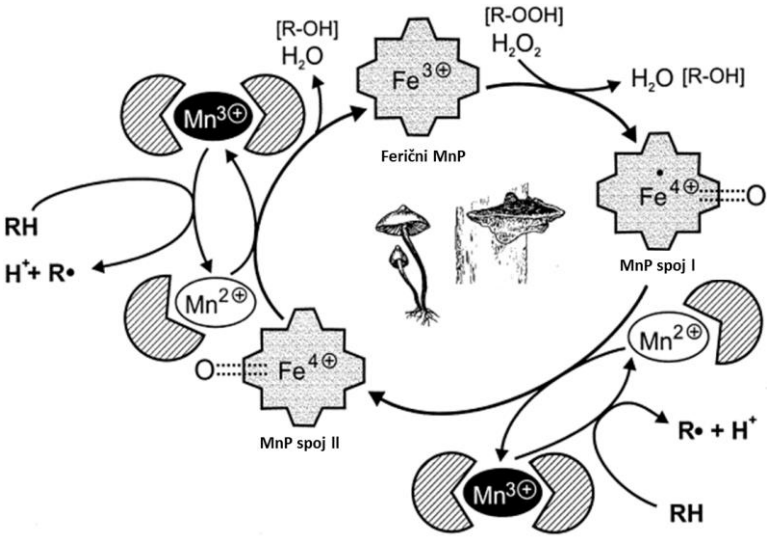
raznih fenolnih spojeva, u kozmetičkoj industriji za izbjeljivanje zubi kao sastavni dio paste za zube, u bojama i za kosu s obzirom da smanjuju iritaciju i ekološki su prihvatljivije u odnosu na klasične boje koje sadrže vodikov peroksid (Desai i Nityanand, 2011.).

2.3. Mangan – peroksidaza

Mangan-peroksidaze (MnP, EC 1.11.1.13) su, uz lakazu, važni lignolitički enzimi. Pronađene su u svim gljivama bijelog truljenja koje imaju sposobnost razgradnje lignina. Pripadaju glikoproteinima sa hem skupinom, te ova vrsta enzima ima vrlo specifično Mn^{2+} - vezujuće mjesto koje sadrži tri aminokiselinske skupine, dvije glutaminske kiseline i asparaginsku kiselinu (Jarvinen i sur., 2012.).

Mangan-peroksidaze u svom katalitičkom ciklusu (**Slika 2.4.**) koriste Mn^{2+} kao elektron donor koji je sveprisutan u tlu i lignoceluloznim materijalima, a ciklus započinje vezivanjem vodikova peroksida ili organskog peroksida na mangan-peroksidazu, pri čemu se uz prijenos dva elektorna iz hema formira MnP Spoj I, koji je Fe^{4+}-okso-porfirin-radikalni kompleks. Zatim se kovalentna veza dioksida heterolitički cijepa čime nastaje jedna molekula vode. Nakon toga se nastavlja redukcija MnP Spoja II (Fe^{4+}-okso-porfirin kompleks). Monokelirani Mn^{2+} ion djeluje kao elektron donor za navedeni porfirinski međuprodukt i oksidira se u Mn^{3+}. Redukcija MnP Spoja II se odvija na sličan način i drugi Mn^{3+} nastaje od Mn^{2+} što dovodi do stvaranja nativnog enzima i otpuštanja druge molekule vode. Dok MnP spoj I može osim pomoću Mn^{2+} biti reduciran i drugim elektron donorima kao što su ferocijanid i fenolima, MnP spoju ll je potreban Mn^{2+} kako bi se završio katalitički ciklus. Nastali visoko reaktivni Mn^{3+} se stabiliziraju pomoću organskih kiselina kao što je oksalna kiselina, te djeluju kao difuzijski redoks-posrednik koji napada fenolne strukture lignina što rezultira u stvaranju nestabilnih slobodnih radikala koji se spontano raspadaju.

Mangan-peroksidaze su osjetljive na visoke koncentracije vodikova peroksida, jer visoke koncentracije uzrokuju reverzibilnu inaktivaciju enzima formiranjem MnP spoja III, koji se nalazi u katalitički neaktivnom oksidacijskom stanju (Hofrichter, 2002.).



Slika 2.4. Pojednostavljeni prikaz katalitičkog ciklusa mangan-peroksidaze (Hofrichter, 2002.)

Mangan-peroksidaze sadrže pet disulfidnih mostova i dva kalcijeva iona koji održavaju strukturu aktivnog mjesta. Aktivno mjesto se sastoji od molekule histidina, vezane vodikovom vezom na ostatak asparaginske kiseline, te na stražnjoj strani posjeduje mjesto za vezanje peroksidaze koje sadrži ostatak histidina i arginina (Hofrichter, 2002.).

Kelirani Mn^{3+} zajedno s karboksilnim kiselinama uzrokuju oksidaciju jednog elektrona različitih supstrata. Fenolni i amino aromatski spojevi su oksidirani pomoću vodika čime nastaju fenolni i amino radikali, a kod nefenolnih aromatskih spojeva nastaju aril kationski radikali. Kelirani Mn^{2+} i karboksilne kiseline mogu reagirati jedni s drugima, te time stvaraju alkil radikale koji zatim podliježu naknadnim spontanim reakcijama s dioksidom i stvaraju različite radikale za koje se smatra da su izvor peroksida mangan-peroksidazama u odsustvu vodikova peroksida. Mangan-peroksidaza oksidira organske sulfatne spojeve, nezasićene masne kiseline i njezine derivate, te formira reaktivne radikale koji u prisustvu dioksida napadaju strukturu lignina i izvor su vodikova peroksida (Hofrichter, 2002.).

Mangan-peroksidaza primarno ima funkciju depolimerizacije prirodnog i sintetičkog lignina, ali također ima veliki potencijal u remedijaciji industrijskog otpada i obezbojenju sintetičkih boja. Osim toga, koristiti se za razgradnju postojanih organskih zagađivača kao što su policiklički aromatski ugljikovodici, nitroaromatski zagađivač 2, 4, 6 – trinitrotoluen i pentaklorfenol (Zhang i sur., 2016).

Osim kod razgradnje lignina, mangan-peroksidaza pokazuje sposobnost razgradnje humusnih tvari i raznih organskih onečišćivača toksičnih za ljude kao što su, primjerice, ksenobiotici.

Ima veliki potencijal za razgradnju širokog spektra onečišćujućih tvari u okolišu, te za praktičnu upotrebu u bioremedijaciji onečišćujućih tvari u okolišu (Zhang i sur., 2016).

2.4. Vrste bioreaktora za uzgoj mikroorganizama u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima

Uzgoj mikrorganizama u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima (SSF) uključuje kontrolirani uzgoj i rast mikroorganizama na vlažnim čvrstim materijalima, a prostor između navedenih čestica je u bliskom kontaktu s plinskom fazom i minimalnom količinom slobodne vode. Ovim procesom većina mikroorganizama se uzgaja u aerobnim uvjetima kao što su filamentozne gljive, te neke bakterije i kvasci.

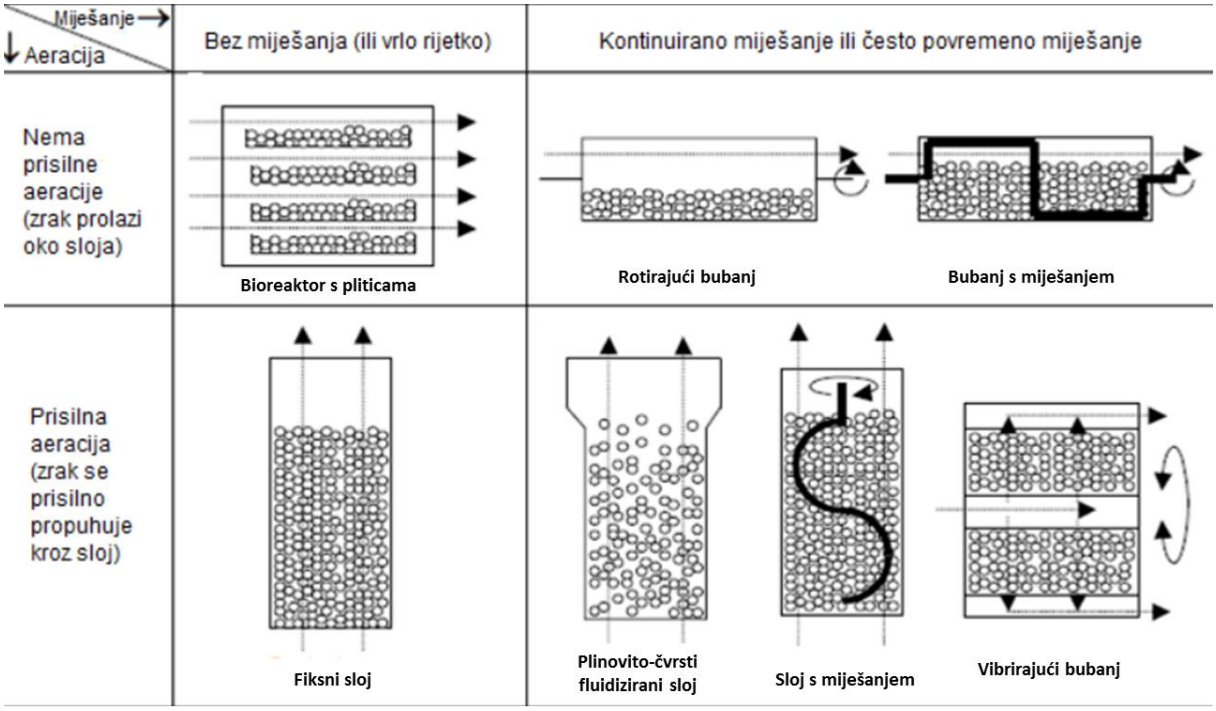
Najčešće korišteni supstrati u SSF-procesima su poljoprivredni, šumski ili prehrambeni otpadni produkti ili nusprodukti koji su odabrani kao prikladni za poticanje rasta organizama za proizvodnju i stvaranje željenog proizvoda. U skupinu otpadnih produkata i nusprodukata ubrajamo pšenične mekinje, krute ostatke od prešanja ulja, trop jabuke i grožđa, koru banana i citrusnog voća, pulpu kave, citrusa i šećerne repe, melasu šećerne repe, kao i brojne žetvene ostatke različitih žitarica i uljarica.

U posljednjih nekoliko desetljeća sve je veći interes za SSF tehnologijom, a istraživanja su usmjerena ka proizvodnji široke palete proizvoda kao što su: enzimi (amilaze, proteaze, lipaze, pektinaze, celulaze), pigmenti, spojevi mirisa i okusa, organski spojevi niske molekularne mase (etanol, oksalna, limunska i mliječna kiselina), proteinski obogaćeni poljoprivredni ostaci za upotrebu kao hrana za životinje, stočna hrana sa smanjenom razinom toksina ili sa poboljšanom probavljivosti, antibiotici (penicilin i oksitetraciklin), sredstva za biološku kontrolu (bioinsekticidi I bioherbicidi), te inokulum spora (kao što je inokulum spora *Penicillium roqueforti* za proizvodnju plavog sira) (Mitchell i sur., 2006.).

Također se istražuje uporaba mikroorganizama koji rastu u SSF uvjetima u procesima obezbojenja boja, uklanjanja pulpe i bioremedijaciji.

Različiti bioreaktori koriste se u SSF procesima. Mogu se kategorizirati na temelju različitog načina izvedbe aeracije i miješanja (**Slika 2.5.**), čime su podijeljeni u četiri osnovne grupe: bioreaktori bez prisilne aeracije, bioreaktori s prisilnom aeracijom bez miješanja, bioreaktori s

kontinuiranim miješanjem uz cirkulaciju zraka i bioreaktori s povremenim miješanjem uz prisilnu aeraciju.



Slika 2.5. Osnovne karakteristike dizajna različitih SSF bioreaktora, razvrstanih u 4 grupe s obzirom na način miješanja i vrstu aeracije (Mitchell i sur., 2006.)

Bioreaktori bez prisilne aeracije

Bioreaktori bez prisilne aeracije rade na principu jedne od najjednostavnijih i najstarijih tehnologija koje su drevne civilizacije koristile za proizvodnju različitih proizvoda fermentacijom raznih poljoprivrednih sirovina, na način da su kulturu mikroorganizma nacjepljivali na određeni poljoprivredni supstrat u određenom prostoru (Durand, 2003.).

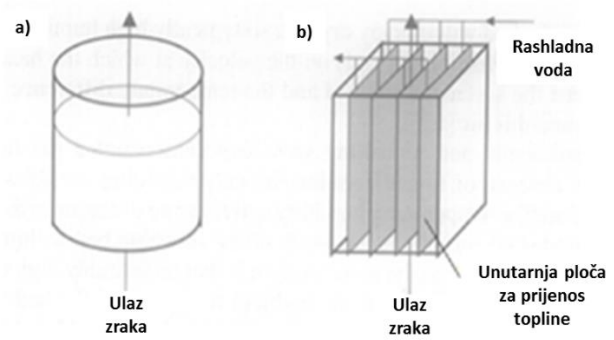
Iako je ova tehnologija napredovala, ona se i dalje temelji na istom principu, a primijenjena na komercijalnoj razini bazira se uglavnom na procese koji se provode u bioreaktorima s pliticama (eng. *tray reactors*). Kod bioreaktora s pliticama se čvrsti supstrat inokulira radnim mikroorganizmom pri čemu nema miješanja reakcijske smjese ili je miješanje vrlo rijetko (jedanput do dvaput dnevno). Aeracija se ostvaruje na način da se zrak ne propuhuje kroz plitice, već kruži oko njih. Ovi bioreaktori mogu biti izgrađeni od različitih materijala kao što su drvo, metal ili plastika. Maksimalna visina plitica je 15 cm, a mogu imati perforirano dno. Pliltice su smještene u termostatiranom prostoru, koji zapravo predstavlja bioreaktor. Plitice

su složene paralelno, jedna iznad druge, s razmakom od nekoliko centimetara, a povećanjem broja plitica jednostavno se može utjecati na povećanje produktivnosti procesa (Durand, 2003.).

Bioreaktori s prisilnom aeracijom bez miješanja

Bioreaktori s fiksnim slojem i bioreaktori s fiksnim slojem i povremenim miješanjem spadaju u zasebnu skupinu SSF bioreaktora čija osnovna značajka izvedbe je horizontalni ili vertikalni stupac ispunjen supstratom, kroz koji se zrak propuhuje s jednog kraja na drugi. Kod vertikalnog stupca, supstrat miruje na perforiranoj ploči kroz koju se zrak može upuhivati s vrha ili dna bioreaktora. Postoje i druge izvedbe gdje se zrak može uvoditi kroz perforiranu cijev koja prolazi uzduž središnje osi stupca. Postoje dvije osnovne izvedbe fiksnog sloja: tradicionalni i *Zymotis* tip. Bioreaktor s tradicionalnim fiksnim slojem može imati vodeni plašt, ali bez dodatnih unutarnjih površina za prijenos topline, a kod bioreaktora s *Zymotis* tipom fiksnog sloja, unutarnje ploče za prijenos topline su umetnute u sloj paralelno sa strujom zraka (Mitchell i sur., 2002).

Sloj supstrata se može povremeno miješati (svakih nekoliko sati) kod tradicionalne izvedbe bioreaktora, dok je kod *Zymotis* tipa bioreaktora sloj supstrata stacionaran zbog toga što unutarnje ploče ovog tipa bioreaktora sprječavaju miješanje krutog sadržaja.



Slika 2.6. Osnovne karakteristike i shema tradicionalnog bioreaktora s fiksnim slojem (a) i *Zymotis* tipa bioreaktora (b) (Mitchell i sur., 2002.)

Kod bioreaktora s fiksnim slojem varijable su visina i širina bioreaktora, prisutnost ili odsutnost vanjskog vodenog plašta, prisutnost ili odsutnost unutarnjih ploča za prijenos topline, prisutnost ili odsutnost sustava za povremeno miješanje, a kod bioreaktora s ugrađenim

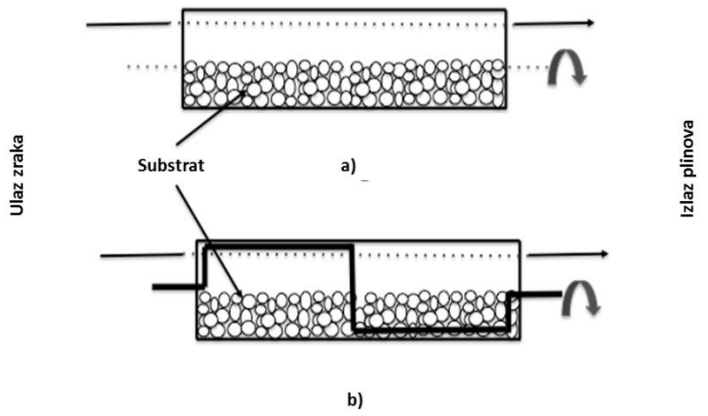
pločama za prijenos topline razmak između susjednih ploča je uvedena kao dodatna varijabla dizajna odnosno izvedbe reaktora (Mitchell i sur., 2002).

Temperatura, vlažnost i brzina protoka ulaznog zraka, temperatura i brzina protoka rashladne vode su operativne varijable statičnih bioreaktora s fiksnim slojem, a u slučaju bioreaktora s fiksnim slojem i povremenim miješanjem treba pratiti i učestalost, trajanje i intenzitet miješanja te hoće li se dodati voda supstratu za vrijeme miješanja. Najvažnija operativna varijabla za tradicionalni tip bioreaktora je površinska brzina strujanja zraka, a visina sloja je ključna varijabla dizajna (Mitchell i sur., 2002).

Bioreaktori s kontiuniranim miješanjem uz cirkulaciju zraka

U skupinu bioreaktora s kontinuiranim miješanjem i cirkulacijom zraka spadaju bioreaktori s rotirajućim bubnjem i bioreaktori s bubnjem i miješanjem. Ova skupina bioreaktora sadrži sloj supstrata (10 - 40 % volumena bubnja) koji se miješa unutar vodoravnog ili blago nagnutog cilindra uz cirkulaciju zraka iznad sloja supstrata (Mitchell i sur., 2002).

Ove dvije vrste bioreaktora se razlikuju u načinu miješanja sloja supstrata (**Slika 2.7.**), gdje se kod rotirajućeg bubnja miješanje sloja provodi okretanjem bubnja i može se potaknuti ugradnjom unutrašnjih pregrada (podizača), a kod druge vrste bioreaktora miješanje sloja supstrata se postiže lopaticama ili strugačima koji su postavljeni na središnju osovinu, a miješanje se najčešće provodi neprekidno (Mitchell i sur., 2002).



Slika 2.7. Shema bioreaktora s rotirajućim bubnjem bez pregrada (a) i s pregradama (b) (Tišma i sur., 2014.)

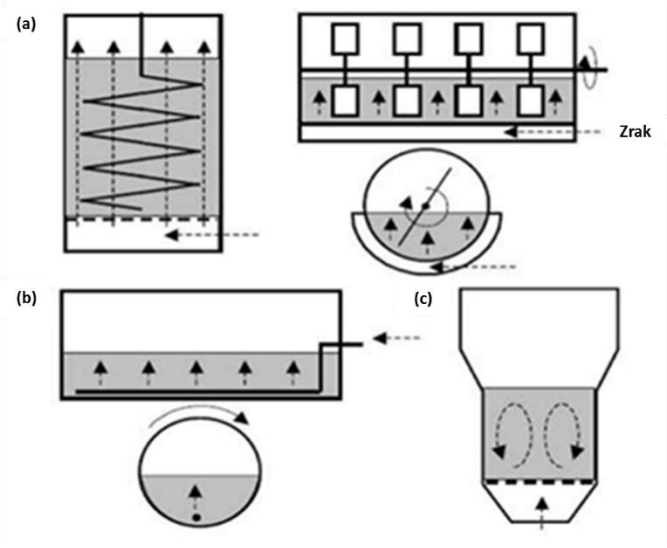
Kod bioreaktora s rotirajućim bubnjem uglavnom se koriste male brzine rotacije (oko 1 rpm), te pri tim brzinama rotacije kod bioreaktora bez podizača krutine će slijediti režim padanja

pomičući se prema gore sa stijenkom rotirajućeg bubnja i padajući natrag na dno bubnja. Ugradnjom podizača poboljšava se miješanje unutar sloja i kontakt između sloja i slobodnog gornjeg prostora. Način na koji će zrak cirkulirati u gornjem slobodnom prostoru bioreaktora ovisi o dizajnu ulaznog i izlaznog otvora za zrak, o brzini protoka zraka i brzini rotacije bubnja (Mitchell i sur., 2002).

U ovoj skupini bioreaktora varijable dizajna su omjer duljine i promjera, prisutnost ili odsutnost podizača rotirajućeg bubnja te dizajn lopatica ili strugača u slučaju miješanja, a operativne varijable su vlažnost, temperatura i brzina protoka zraka, koeficijent punjenja čvrstog materijala i brzina okretaja bubnja ili miješala (Mitchell i sur., 2002).

Bioreaktori s povremenim miješanjem uz prisilnu aeraciju

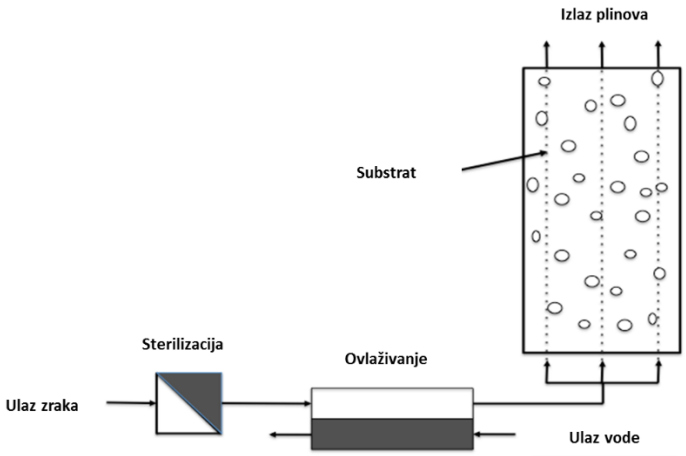
Pod skupinu bioreaktora s prisilnom aeracijom sloja te stalnim ili povremenim miješanjem spadaju bioreaktori s fiksnim slojem i miješanjem, vibrirajućim bubnjem i fluidiziranim plinovito-čvrstim slojem. Na **Slici 2.8.** prikazane su različite izvedbe i osnovne značajke miješanja ovisno o vrsti bioreaktora (Mitchell i sur., 2006).



Slika 2.8. Različite izvedbe miješanja kod bioreaktora s prisilnom aeracijom sloja i kontinuiranim ili povremenim miješanjem (Mitchell i sur., 2006.).

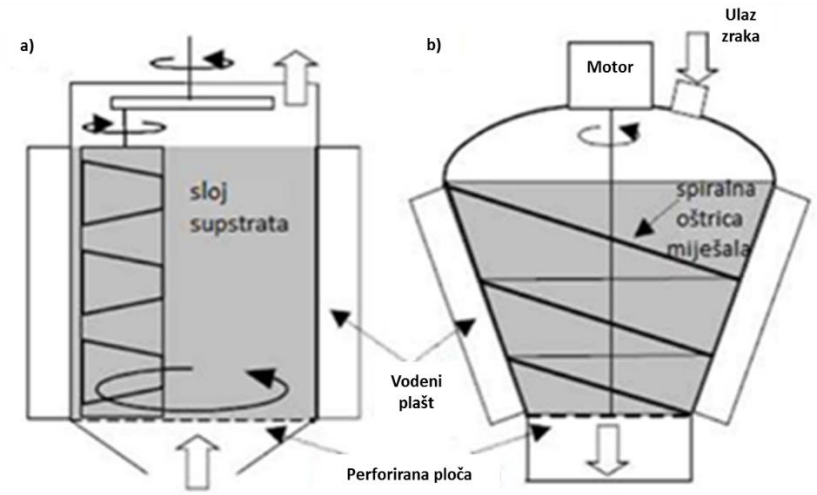
(a) Mehaničko miješanje unutarnjim miješalom: lijevo – okomito miješanje sloja, desno – bubanj sa središnjim miješalom.
(b) Miješanje nastalo pomicanjem samog bubnja.
(c) Miješanje strujanjem zraka.

Bioreaktori s fiksnim slojem i miješanjem sadrže sustav za aeraciju pri čemu se zrak upuhuje odozdo kroz perforiranu ploču koja ujedno služi kao potpora za supstrat, a pomoću mehaničkog miješala se sloj supstrata miješa (**Slika 2.8.(a)**). Kod vibrirajućeg bubnja između dva koncentrična perforirana horizontalna cilindra se nalazi supstrat, miješanje se postiže rotacijom cilindra (**Slika 2.8.(b)**), a zrak se uvodi u središnji cilindar i prolazi radijalno kroz sloj supstrata prema van. Bioreaktori s fluidiziranim slojem plinovito-čvrsto rade slično kao bioreaktori s miješanjem s razlikom da je brzina aeracije dovoljno visoka da fluidizira čestice supstrata i dovodi do miješanja (**Slika 2.8.(c)**), te je moguće ugradnjom dodatnog miješala razbiti aglomerate supstrata i biomase (**Slika 2.9.**) (Mitchell i sur., 2006).



Slika 2.9. Shema bioreaktora s fluidiziranim plinovito-čvrstim slojem (Tišma i sur., 2014.)

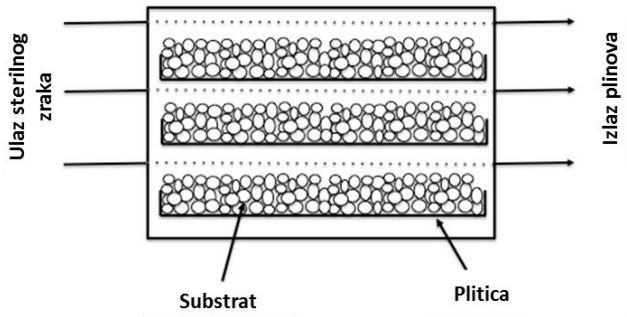
Kod navedenih vrsta bioreaktora miješanje se ostvaruje na različite načine i sam dizajn miješala je ključan, jer se supstrat ne smije zdrobiti i ne smije doći do smicanja uz stijenku bioreaktora. Neki tipovi bioreaktora sadrže učvršćena spiralna ili planetarna miješala (**Slika 2.10.**), kojima se postiže kontinuirano miješanje, a drugo rješenje uključuje vertikalne vijke na pokretnim kolicima koja se kreću unatrag i naprijed duž osi bioreaktora, te unatoč tome što miješalo radi bez prekida, postiže se da je svaki pojedini dio sloja miješan povremeno (jednom ili dvaput na sat) (Mitchell i sur., 2006).



Slika 2.10. Shema bioreaktora s planetarnim miješalom (a) i bioreaktora sa spiralnom oštricom miješala (b) (Mitchell i sur., 2006.)

2.4.1. Bioreaktor s pliticama

Ova vrsta bioreaktora sastoji se od zatvorenog prostora u kojem je stacioniran određeni broj pojedinačnih plitica (**Slika 2.11.**). Obično imaju mogućnost regulacije temperature i vlage, a uvođenje svježeg zraka može se poticati ventilatorima. Učinkovitost cirkulacije zraka u bioreaktoru ovisi o različitim čimbenicima kao što su veličina i geometrija bioreaktora, smještaj ulaznih i izlaznih otvora, smještaj ventilatora, te razmaci između plitica (Mitchell i sur., 2002).



Slika 2.11. Osnovna izvedba dizajna bioreaktora s pliticama (Tišma i sur., 2014.)

Ovi reaktori se često primjenjuju u industriji, unatoč nedostatcima. Naime, zahtijevaju veliki prostor, te postoji velika potreba za radnom snagom. Također je teško osigurati sterilne uvjete, te se zbog toga moraju graditi sterilne prostorije i osigurati postupci i oprema, a alternativa bi mogla biti korištenje polipropilenskih polupropusnih vrećica koje se mogu

sterilizirati. Neke vrećice imaju i mikroporoznu zonu koja omogućava pasivni protok zraka (Durand, 2003.).

Plitice mogu biti izgrađene od različitih materijala kao što su bambus, drvo, plastika ili žičana mreža, a obično su otvorene s gornje strane, dok bočne strane i dno mogu biti perforirani kako bi se potaknula izmjena plinova. Također, uzgoj u mikroporoznim plastičnim vrećicama omogućava izmjenu plinova između plitica i praznog prostora bioreaktora bez kontaminacije, što je važno jer zrak u gornjem slobodnom prostoru bioreaktora ovakvog tipa obično nije sterilan. Sloj supstrata smješten u pliticama može mirovati tijekom cijelog procesa uzgoja ili ga se može ručno okretati jednom do dva puta dnevno (Mitchell i sur., 2002).

Kod ove vrste bioreaktora toplina se prenosi kondukcijom, a prijenos tvari se odvija difuzijom zbog toga što se zrak ne propuhuje prisilno kroz sloj supstrata, već zrak cirkulira oko površine plitica, te zbog toga na nekim mjestima može doći do velikih gradijenata temperature (oko 3 $°C\ cm^{-1}$).

Radne varijable pomoću kojih se može utjecati na proces u bioreaktoru s pliticama su temperatura, vlažnost zraka i brzina protoka zraka u slobodnom dijelu bioreaktora, a visina sloja supstrata u plitici se smatra glavnom varijablom dizajna. Povećanjem visine sloja supstrata u pliticama povećava se i vjerojatnost razvijanja nepoželjnih visokih temperatura u sredini sloja, te kako ne bi došlo do razvijanja nepoželjnih visokih temperature preporučena maksimalna dubina sloja je obično između 2 - 10 cm. S obzirom na navedeno ograničenje, povećanjem dubine sloja ne može se uvećati mjerilo procesa, već samo povećanjem broja i širine plitica. Zbog toga, nedostatak povećanja mjerila procesa je potreba za intenzivnijim radom kod ručnog punjenja, sterilizacije, miješanja i pražnjenja velikog broja plitica (Mitchell i sur., 2002).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Zadatak

Cilj ovog rada bio je:

a) proizvesti enzime lakazu i mangan-peroksidazu uzgojem *T. versicolor* na kukuruznoj silaži u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima u laboratorijskim teglicama, te ispitati utjecaj dodatka različitih induktora (bakrov sulfat, ferulična kiselina, siringična kiselina, vanilinska kiselina, veratrilni alkohol) na aktivnost lakaze i mangan peroksidaze;

b) na temelju dobivenih rezultata iz pokusa u laboratorijskim teglicama, napraviti uvećanje mjerila u bioreaktoru s pliticama (definirati početne reakcijske uvjete kao što su masa supstrata, vlažnost supstrata, masa inokuluma, vrijeme trajanja uzgoja, temperatura, odabir induktora, koncentracija induktora).

3.2. Materijali i metode

3.2.1. Mikroorganizam

U ovom radu korištena je gljiva bijelog truljenja *Trametes versicolor* TV-6 (MZKI, Ljubljana, Slovenija).

3.2.2. Supstrat

Kukuruzna silaža (žetva 2015., Istočna Hrvatska) je nakon žetve i usitnjavanja dostavljena u laboratorij, te pohranjena na -20 °C prije uporabe u pokusima biološke obrade.

3.2.3. Popis kemikalija

Korištene su slijedeće kemikalije: krumpirov agar (Biolife Italiana Sr. L. Viale Monza, Milan, Italija), 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina), trans-4-hidroksi-3-metoksi cimetna kiselina, 4-hidroksi-3,4-dimetoksi benzojeva kiselina, Na_2HPO_4 (Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka), limunska kiselina monohidrat (E330) (AGZ d.o.o.), glicin, 3,4-dimetoksi benzojev alkohol, 4-hidroksi-3-metoksi benzojeva kiselina, 2,6-dimetoksifenol, $CuSO_4$, $C_3H_2Na_2O_4 \cdot H_2O$ (Acros Organics, New Yersey, USA), $MnSO_4 \cdot H_20$ (Alfa Aesar, Massachusetts, SAD), H_2O_2 (Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska), HCl (Fischer Scientific, Loughborough, UK).

3.2.4. Aparatura

Autoklav

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

Vertikalni laminarni kabinet

Vertikalni laminarni kabinet (Telstar AV100-CV100) je kabinet s vertikalnim laminarnim protokom gdje je provođen rad s mikroorganizmom i uzorcima kada je za to bilo potrebno sterilno okruženje u samom radnom prostoru.

Tresilica

U svrhu pripreme ekstrakta enzima, korištena je vodena kupelj s tresilicom (Julabo SW22).

Centrifuga s hlađenjem

Nakon ekstrakcije uzoraka, prije mjerenje aktivnosti enzima na spektrofotometru, uzorci su centrifugirani na *Multifuge 3 L-R* centrifugi (Heareus).

Spektrofotometar

Aktivnost lakaze i mangan-peroksidaze određivane su na spektrofotometru (Shimadzu, UV-1700 PharmaSpec).

pH-metar

Priprema različitih otopina određene pH vrijednosti koje služe u svrhu istraživanja ovisnosti aktivnosti enzima o pH provođeno je pomoću pH-metra (Hanna Instruments 2211 pH/ORP Meter).

Inkubator

Uzgoj *T. versicolor* u laboratorijskim teglicama proveden je u inkubatoru (KB 115, BINDER GmbH, Njemačka) (**Slika 3.1.**), kao i priprema inokuluma za provedbu procesa uzgoja *T. versicolor* u bioreaktoru s pliticama.

Slika 3.1. Inkubator (KB 115, BINDER GmbH, Njemačka)

Bioreaktor s pliticama

Proces proizvodnje enzima u uvećanom mjerilu proveden je u bioreaktor s pliticama (**Slika 3.2.**). Ovaj biorekator (dimenzija 75 × 154 × 70 cm) je izgrađen je od nehrđajućeg čelika, a sastoji se od šest plitica (50 × 5 × 40 cm) ugrađenih u termostatsku komoru s mogućnošću regulacije temperature u rasponu od 25 do 65 °C. Temperatura se mjeri *on-line* na različitim mjestima u bioreaktoru (slobodni prostor bioreaktora i fermentacijski sloj svake plitice) pomoću termo sondi (jedna po svakoj plitici i jedna za mjerenje temperature zraka u slobodnom prostoru bioreaktora kao referentna temperatura) povezanih s programibilnim logičkim kontroler (PLC) sustavom. Komprimirani sterilni zrak ubrizgava se izravno na ventilator koji se nalazi unutar reaktora, što omogućuje ravnomjernu raspodjelu zraka regulacijom protoka zraka (0,5 - 3 dm^3 min^{-1}), a za vlaženje zraka koristi se dodatni spremnik sa sterilnom destiliranom vodom.

Slika 3.2. Bioreaktor s pliticama

3.2.5. Istraživanje utjecaja dodataka različitih induktora na aktivnost lakaze i mangan-peroksidaze tijekom uzgoja *Trametes versicolor* u laboratorijskim teglicama

U laboratorijske teglice izvagano je 50 g kukuruzne silaže (odmrznute i sušene na sobnoj temperaturi 24 h, te usitnjene na veličinu čestica 1 – 2 cm) i 110 cm^3 destilirane vode, sterilizirano 20 min pri T = 120 °C te ostavljeno da se hladi na sobnoj temperaturi. Pripremljene su otopine bakrovog sulfata različitih koncentracija (0,05 mol dm^{-3}, 0,1 mol dm^{-3} i 0,15 mol dm^{-3}), te otopine vanilinske kiseline, ferulične kiseline, siringične kiseline i veratrilnog alkohola različitih koncetracija (0,5 mmol dm^{-3}, 1 mmol dm^{-3} i 1,5 mmol dm^{-3}) koje su također sterilizirane. Postupak nacjepljivanja kukuruzne silaže u laboratorijskim teglicama proveden je u sterilnim uvjetima u horizontalnom laminarnom kabinetu, na način da je u staklene epruvete, u 10 cm^3 sterilizirane vode dodano 5 micelijskih diskova *Trametes versicolor* TV-6 sa Petrijeve zdjelice, promjera 10 mm, promiješano na vortexu kako bi se resuspendirale spore. U laboratorijske teglice bez induktora je dodano 10 cm^3 suspenzije spora, a u ostale laboratorijske teglice dodano je po 10 cm^3 otopine bakrovog sulfata (0,05 mol dm^{-3}, 0,1 mol dm^{-3} i 0,15 mol dm^{-3} u dvije paralelne serije), vanilinske kiseline, ferulične kiseline, siringične kiseline te veratrilnog alkohola (0,5 mmol dm^{-3}, 1 mmol dm^{-3} i 1,5 mmol dm^{-3} u dvije paralelne serije) i 10 cm^3 suspenzije spora. Teglice su ručno protresene te poklopljene papirnatim ubrusima i stavljene u inkubator na 27 °C. Uzgoj je trajao 7 dana pri čemu je svakodnevno uziman uzorak iz teglica (oko 1 g). U svrhu pripreme ekstrakta enzima za mjerenje aktivnosti enzima, u 1 g uzroka dodano je 10 mL destilirane H_2O, termostatirano u vodenoj tresilici pri

27 °C i 150 okr/min, 30 min. Nakon ekstrakcije uzorci su centrifugirani (10 min, 10 000 x g) te je iz supernatanta mjerena aktivnost lakaze s ABTS-om kao supstratom i aktivnost MnP s 2,6-dimetoksifenolom (DMP) kao supstratom prema metodi opisanoj u **Poglavlju 3.3.1**.

3.2.6. Proizvodnja lakaze i mangan-peroksidaze tijekom uzgoja *Trametes versicolor* na kukuruznoj silaži u bioreaktoru s pliticama

U bioreaktor s pliticama dodano je 600 g kukuruzne silaže i 500 cm^3 destilirane vode po plitici s ciljem postizanja vlažnosti materijala od 82,30 ± 0,26 %. Bioreaktor s ovako pripremljenim supstratom je steriliziran 20 min pri T = 120 °C i ohlađen prije inokuliranja. Pripremljena je 0,1 mol dm^{-3} otopina bakrovog sulfata koja je također sterilizirana. Postupak nacjepljivanja kukuruzne silaže u bioreaktoru s pliticama proveden je na način da je po plitici dodano 200 g inokuluma. Inokulum je bio micelij gljive narastao na kukuruznoj silaži tijekom 7 dana uzgoja u laboratorijskim teglicama.

Provedena su dva pokusa, jedan pokus u kojem nije dodavan induktor sinteze lakaze, te drugi u kojem je dodavan bakrov sulfat kao induktor. U bioreaktor s pliticama bez induktora je dodano 200 g inokuluma, a kod drugoga uzgoja je dodano 40 cm^3 0,1 mol dm^{-3} otopine bakrovog sulfata zajedno s 200 g inokuluma. Nacjepljeni sadržaj na plitici je termostatiran na 27 °C uz protok sterilnog zraka 2,5 dm^3 min^{-1}. Uzgoj je trajao 7 dana pri čemu je 0., 5., 6. i 7. dan uzorkovano oko 1 g sa tri mjesta sa tri plitice (broj 4, 5 i 6). Uzorci su ekstrahirani i centrifugirani po istom principu opisanom u **Poglavlju 3.2.5**. Iz dobivenih supernatanata mjerena je aktivnost lakaze s ABTS-om kao supstratom i aktivnost MnP s DMP-om kao supstratom prema metodi opisanoj u **Poglavlju 3.3.1**.

3.3. Analitičke metode

3.3.1. Mjerenje aktivnosti lakaze i mangan-peroksidaze

Mjerenje aktivnosti lakaze

Aktivnost lakaze mjerena je spektrofotometrijski pri λ = 420 nm i temperaturi 25 °C u kvarcnoj kiveti volumena 1 cm^3 koristeći ABTS kao supstrat.

Otopina ABTS-a (c = 3 mmol dm^{-3}) je pripremana otapanjem u glicin-HCl puferu (pH = 3,5) i čuvana je u tikvici obloženoj aluminijskom folijom, u hladnjaku na temperaturi od 4 °C.

Otopina ABTS-a je termostatirana 10 minuta prije početka mjerenja pri 25 °C. Mjerenja su provedena u kvarcnoj kiveti volumena 1 cm^3, gdje je u 500 µL otopine ABTS-a dodavano 100 µL uzorka. Prije samog mjerenja sadržaj kivete je ručno promiješan i stavljen u spektrofotometar. Tijekom 100 s, pri λ = 420 nm, mjerena je promjena apsorbancije u vremenu ($\Delta A/\Delta t$) te je iz dobivenih promjena apsorbancije izračunata volumna aktivnost enzima lakaze prema jednadžbi:

$$V.A. = \frac{V_r}{\varepsilon \cdot d \cdot V_E} \cdot \frac{\Delta A}{\Delta t} \qquad (1)$$

gdje su V_r ukupni volumen uzorka u kiveti (cm^3), V_E volumen dodanog uzorka koji sadrži enzim (cm^3), ε ekstincijski koeficijent (ε_{420} = 0,036 dm^3 µmol^{-1} cm^{-1}), d promjer kivete (d = 1 cm), $\Delta A/\Delta t$ promjena apsorbancije u vremenu (nagib pravca) (min^{-1}), $V.A.$ volumna aktivnost enzima (U dm^{-3}), pri čemu 1 U predstavlja jedinicu volumne aktivnosti, odnosno onu aktivnost enzima koja je potrebna da se oksidira 1 µmol supstrata u minuti (Tišma i sur., 2008.; Tišma, 2010.).

Mjerenje aktivnosti mangan-peroksidaze

Aktivnost mangan-peroksidaze mjerena je spektrofotometrijski pri λ = 469 nm i temperaturi 25 °C u kvarcnoj kiveti volumena 1,4 cm^3 koristeći DMP kao supstrat.

Reakcijska smjesa sadržavala je 0,05 mol dm^{-3} natrij-malonat pufera (pH = 4,5), 1 mmol dm^{-3} $MnSO_4$, 0,5 mmol dm^{-3} DMP i 100 mm^3 uzorka pri čemu reakcija započinje dodatkom 0,1 mmol dm^{-3} vodikovog peroksida.

Mjerenja su provedena u kvarcnoj kiveti volumena 1,4 cm^3, gdje je u 900 µL reakcijske smjese (0,05 mol dm^{-3} natrij-malonat pufera (pH = 4,5), 1 mmol dm^{-3} $MnSO_4$, 0,5 mmol dm^{-3} DMP) dodavano 100 µL uzorka te 100 µL 0,1 mmol dm^{-3} vodikovog peroksida. Prije samog mjerenja sadržaj kivete je ručno promiješan i stavljen u spektrofotometar. Tijekom 100 s, pri λ = 469 nm, mjerena je promjena apsorbancije u vremenu ($\Delta A/\Delta t$) te je iz dobivenih promjena apsorbancije izračunata volumna aktivnost enzima mangan-peroksidaze prema **jednadžbi 1**.

3.3.2. Istraživanje ovisnosti aktivnosti lakaze i mangan-peroksidaze o pH

Ispitivanje utjecaja pH na aktivnost enzima lakaze i mangan-peroksidaze provedeno je u kvarcnim kivetama volumena 1 cm^3. Mjerenja su provedena u 0,2 mol dm^{-3} glicin-HCl puferu u rasponu pH od 2,4 do 3,6 i u 0,05 mol dm^{-3} citrat-fosfatnom puferu u rasponu pH od 3,0 do 5,4 pri temperaturi 25 °C za lakazu, a za mangan-peroksidazu su provedena u 0,05 mol dm^{-3} natrij-malonat puferu u rasponu pH od 2 do 7 pri temperaturi 25 °C. Iz dobivenih rezultata promjene apsorbancije s vremenom je izračunata volumna aktivnost enzima.

3.3.3. Istraživanje ovisnosti aktivnosti lakaze i mangan-peroksidaze o temperaturi

U vodenoj kupelji je za ispitivanje ovisnosti aktivnosti lakaze o temperaturi termostatiran 0,2 mol dm^{-3} glicin-HCl pufer (pH 3,5) 10 minuta u temperaturnom rasponu 25 – 70 °C, a za mangan-peroksidazu 0,05 mol dm^{-3} natrij-malonat pufer (pH 4,5) u istom temperaturnom rasponu. Puferi su termostatirani sa razlikom od 5 °C u intervalu od 25 do 70 °C i dodani u kvarcnu kivetu zajedno sa supstratom i uzorkom, te je iz tako pripremljene reakcijske smjese mjerena aktivnost enzima lakaze i mangan-peroksidaze prema metodi opisanoj u **Poglavlju 3.3.1.**

4. REZULTATI I RASPRAVA

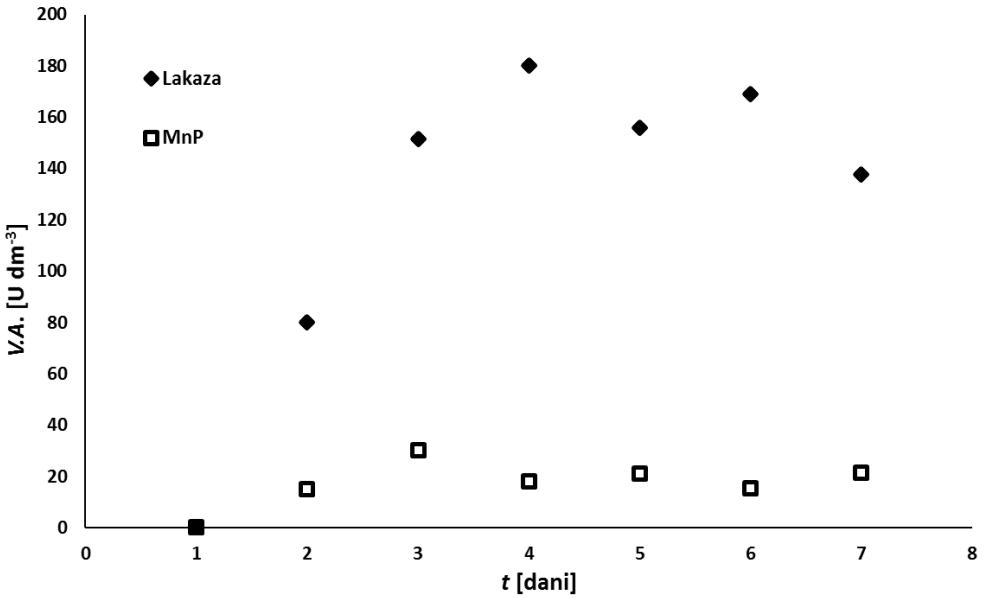
4.1. Istraživanje utjecaja dodataka različitih induktora na aktivnost lakaze i mangan-peroksidaze tijekom uzgoja *T. versicolor* u laboratorijskim teglicama

Proizvodnja enzima lakaze i mangan-peroksidaze iz gljive bijelog truljenja *Trametes versicolor* TV-6 provedena je šaržno u uvjetima uzgoja SSF fermentacije u laboratorijskim teglicama. Provedeno je šest pokusa, od kojih je prvi proveden bez dodatka induktora, a narednih pet s dodatkom različitih koncentracija induktora s ciljem istraživanja njihovog utjecaja na aktivnost lakaze i mangan-peroksidaze i s ciljem postizanja veće aktivnosti navedenih enzima.

Kod svih pokusa, uzgoj je trajao 7 dana pri čemu su svakodnevno uzimani uzorci iz teglica, koji su ekstrahirani i centrifugirani, a zatim je iz tekućinskog ostatka prema metodama opisanima u **Poglavlju 3.3.1.** mjerena aktivnost enzima. Pokusi su provedeni u dvije paralelne serije, a grafički su prikazani rezultati srednjih vrijednosti.

U svim pokusima uvjeti uzgoja (masa supstrata, vlažnost supstrata, koncentracija inokuluma, temperatura, vrijeme) su bili jednaki, jedino su različiti induktori dodavani u tri različite koncentracije.

Prvi pokus je proveden bez dodatka induktora, a rezultati volumnih aktivnosti lakaze i mangan-peroksidaze tijekom 7 dana provedbe pokusa, prikazani su na **Slici 4.1.**



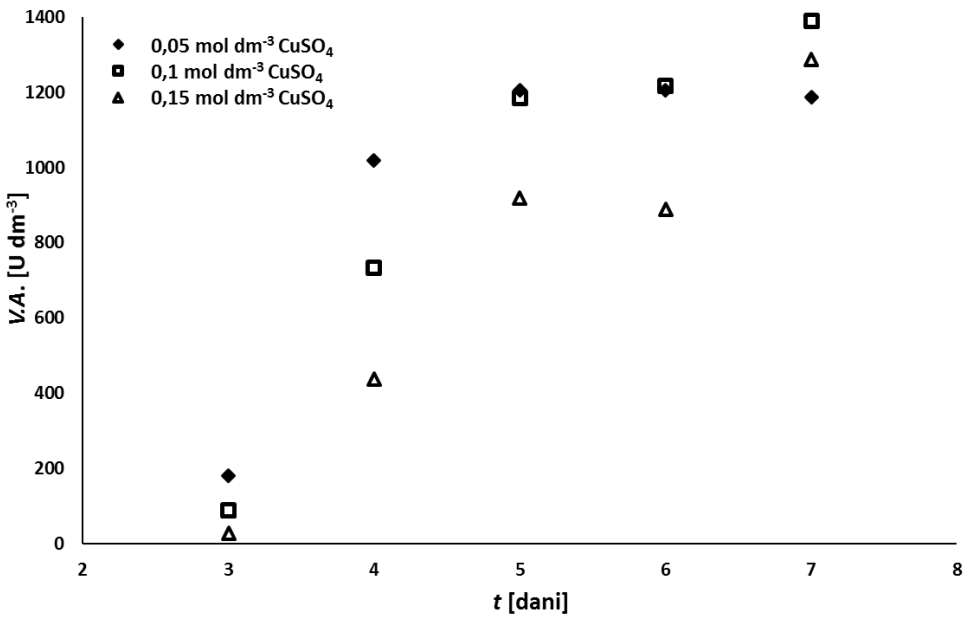
Slika 4.1. Volumna aktivnost enzima lakaza i mangan-peroksidaza bez dodatka induktora (laboratorijske teglice, *T* = 27 °C, *t* = 7 dana)

Iz rezultata je vidljivo da je najveća aktivnost lakaze (180,2 U dm^{-3}) postignuta četvrtog dana pokusa, dok je najveća aktivnost mangan-peroksidaze (30,1 U dm^{-3}) postignuta trećeg dana izvođenja pokusa. Također je vidljivo da je volumna aktivnost lakaze pet do šest puta veća u odnosu na aktivnost mangan-peroksidaze. Nakon četvrtog dana (za lakazu) odnosno trećeg dana (za mangan-peroksidazu) aktivnosti enzima se ne mijenjaju ili neznatno smanjuju.

U narednim pokusima uzgoja *T. versicolor* u laboratorijskim teglicama dodavani su različiti induktori u određenim koncentracijama kako bi se istražio njihov utjecaj na aktivnost lakaze i mangan-peroksidaze, te kako bi se odabrao najbolji induktor sinteze ovih enzima za potrebe provedbe pokusa u bioreaktoru s pliticama.

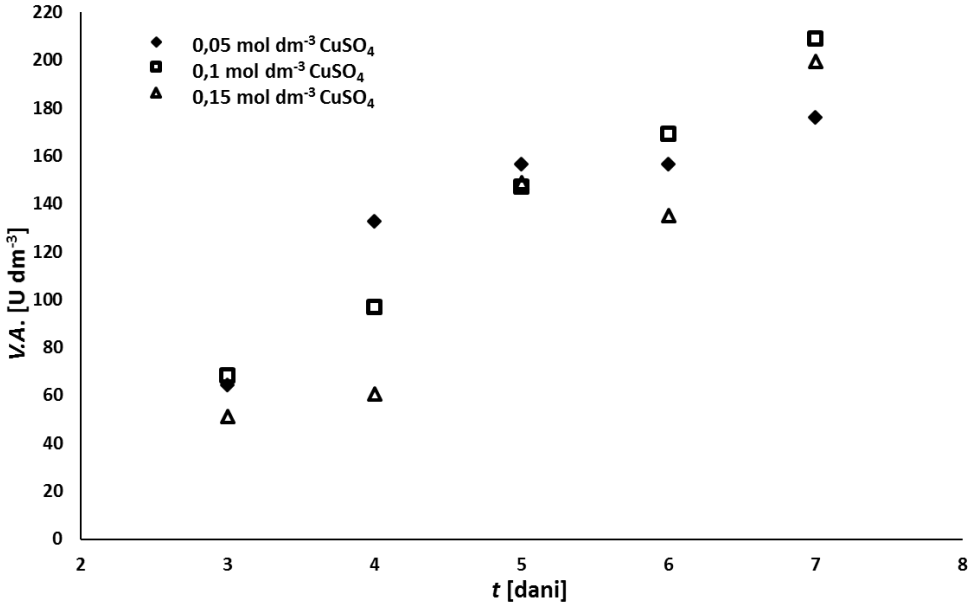
Istraživanje utjecaja dodatka bakrovog sulfata na aktivnost enzima lakaza i mangan-peroksidaza

U drugom pokusu istraživan je utjecaj dodatka bakrovog sulfata u tri različite koncentracije (0,05 mol dm^{-3}, 0,1 mol dm^{-3} i 0,15 mol dm^{-3}) na aktivnost lakaze i mangan-peroksidaze. Ukupno je nacijepljeno 6 teglica, za svaku ispitanu koncentraciju induktora po 2 teglice, a prikazane su srednje vrijednosti rezultata postignutih iz dviju teglica, za svaku koncentraciju induktora posebno. Rezultati volumnih aktivnosti enzima prikazani su na **Slici 4.2.** (lakaza) i **Slici 4.3.** (mangan-peroksidaza).



Slika 4.2. Volumna aktivnost enzima lakaza uz dodatak otopine bakrova sulfata različitih koncentracija (c = 0,05 mol dm^{-3}, c = 0,1 mol dm^{-3}, c = 0,15 mol dm^{-3}; laboratorijske teglice, T = 27 °C, t = 7 dana)

Iz rezultata prikazanih na **Slici 4.2.**, vidljivo je da je šestog dana pokusa uz dodatak 0,05 mol dm^{-3} otopine bakrova sulfata postignuta najveća aktivnost lakaze (1204,8 U dm^{-3}), a pri upotrebi većih koncentracija induktora (0,1 mol dm^{-3} i 0,15 mol dm^{-3}) najveća aktivnost lakaze postignuta je sedmog dana i iznosila je 1389,1 U dm^{-3}, odnosno 1287,4 U dm^{-3}. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da se primjenom 0,1 mol dm^{-3} otopine bakrovog sulfata postiže najveća aktivnost lakaze (1389,1 U dm^{-3}) te da je ona 8 puta veća u odnosu na pokus u kojem nije korišten induktor.



Slika 4.3. Volumna aktivnost enzima mangan-peroksidaza uz dodatak otopine bakrova sulfata različitih koncentracija (c = 0,05 mol dm^{-3}, c = 0,1 mol dm^{-3}, c = 0,15 mol dm^{-3}; laboratorijske teglice, T = 27 °C, t = 7 dana)

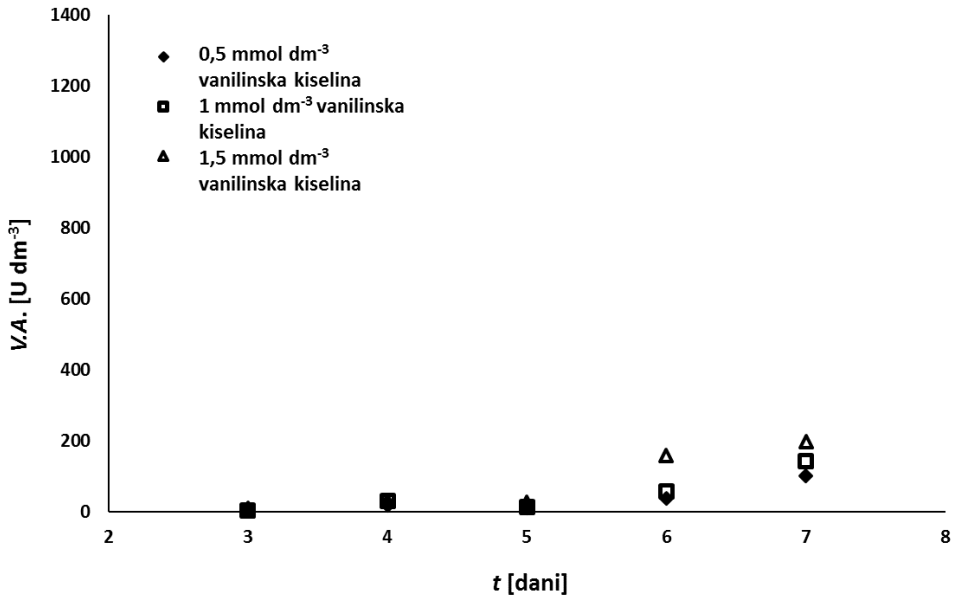
Iz rezultata prikazanih na **Slici 4.3.**, vidljivo je da se najveće aktivnosti mangan-peroksidaze u rasponu od 176,0 do 209,1 U dm^{-3} postižu zadnjeg dana provedbe pokusa, pri čemu je, kao i kod proizvodnje lakaze, i u ovom pokusu najveća aktivnost postignuta kada je korištena 0,1 mol dm^{-3} otopina bakrova sulfata (209,1 U dm^{-3}).

Dodatkom 0,1 mol dm^{-3} otopine bakrova sulfata postignuta je 7 puta veća aktivnost mangan-peroksidaze (209,1 U dm^{-3}) u odnosu na pokus bez dodatka induktora (30,1 U dm^{-3}). Levin i sur. (2002.) su ispitivali utjecaj dodataka različitih koncentracija otopine bakrovog sulfata (1 mmol dm^{-3}; 0,0016 mmol dm^{-3}) na aktivnost mangan-peroksidaze uzgojem *Trametes trogii*, pri čemu su dodatkom 1 mmol dm^{-3} otopine bakrovog sulfata postigli 13 puta veću aktivnost mangan-peroksidaze (1280 U dm^{-3}) u usporedbi s pokusom uz dodatak 0,0016 mmol dm^{-3} otopine bakrovog sulfata kojom su postigli 100 U dm^{-3}, 27. dana trajanja pokusa.

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je otopina bakrova sulfata dobar induktor sinteze lakaze i mangan-peroksidaze, te se od svih ispitivanih koncentracija, najveća volumna aktivnost oba ispitivana enzima postiže primjenom 0,1 mol dm^{-3} otopine bakrova sulfata.

Istraživanje utjecaja dodatka vanilinske kiseline na aktivnost lakaze i mangan-peroksidaze

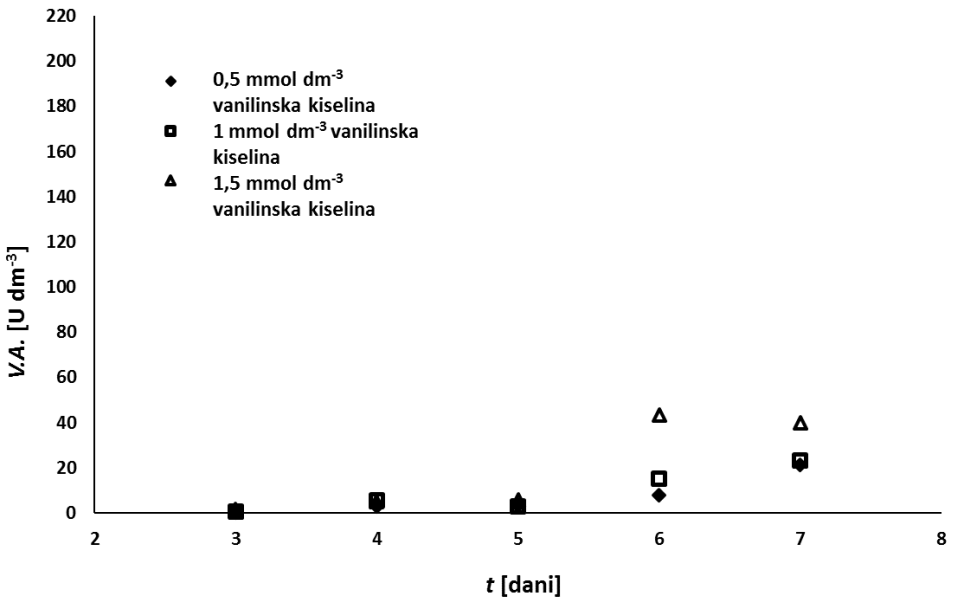
U trećem pokusu istraživan je utjecaj dodatka vanilinske kiseline u tri različite koncentracije (c = 0,5 mmol dm^{-3}, c = 1 mmol dm^{-3} i c = 1,5 mmol dm^{-3}) na aktivnost lakaze i mangan-peroksidaze. Ukupno je nacijepljeno 6 teglica, za svaku ispitanu koncentraciju induktora po 2 teglice, a prikazane su srednje vrijednosti rezultata postignutih iz dviju teglica, za svaku koncentraciju induktora posebno. Rezultati volumnih aktivnosti enzima prikazani su na **Slici 4.4.** (lakaza) i **Slici 4.5.** (mangan-peroksidaza).



Slika 4.4. Volumna aktivnost enzima lakaza uz dodatak otopine vanilinske kiseline različitih koncentracija (c = 0,5 mmol dm^{-3}, c = 1 mmol dm^{-3}, c = 1,5 mmol dm^{-3}; laboratorijske teglice, T = 27 °C, t = 7 dana)

Iz rezultata prikazanih na **Slici 4.4.**, vidljivo je da je sedmog dana pokusa uz dodatak 0,5 mmol dm^{-3}, 1 mmol dm^{-3} i 1,5 mmol dm^{-3} otopine vanilinske kiseline postignuta najveća aktivnost lakaze (100,9 U dm^{-3}; 140,9 U dm^{-3}; 196,1 U dm^{-3}). Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da se primjenom 1,5 mmol dm^{-3} otopine vanilinske kiseline postiže najveća aktivnost lakaze (196,1 U dm^{-3}) te da je ona 1,09 puta veća u odnosu na pokus u kojem nije korišten induktor.

Elisashvili V. i Kachlishvili E. (2009.) su objavili da se submerznim uzgojem gljive bijelog truljenja *Cerrene unicolor* uz dodatak 0,5 mmol dm^{-3} otopine vanilinske kiseline postiže približno 1,42 puta veća aktivnost lakaze.



Slika 4.5. Volumna aktivnost enzima mangan-peroksidaza uz dodatak otopine vanilinske kiseline različitih koncentracija (c = 5 mmol dm^{-3}, c = 1 mmol dm^{-3}, c = 1,5 mmol dm^{-3}; laboratorijske teglice, T = 27 °C, t = 7 dana)

Iz rezultata prikazanih na **Slici 4.5.**, vidljivo je da je šestog dana pokusa uz dodatak 1,5 mmol dm^{-3} otopine vanilinske kiseline postignuta najveća aktivnost mangan-peroksidaze (43,4 U dm^{-3}), a pri upotrebi manjih koncentracija induktora (0,5 mmol dm^{-3} i 1 mmol dm^{-3}) najveća aktivnost mangan-peroksidaze postignuta je sedmog dana i iznosila je 21,5 U dm^{-3}, odnosno 23,4 U dm^{-3}. Također, kao i kod lakaze, i u ovom pokusu najveća aktivnost je postignuta kada je korištena 1,5 mmol dm^{-3} otopina vanilinske kiseline (43,4 U dm^{-3}).

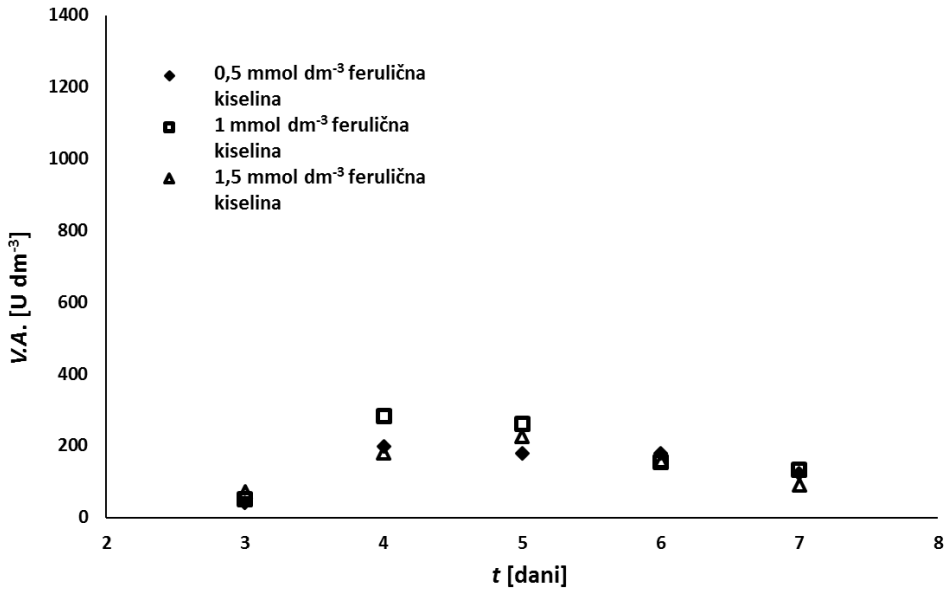
Dodatkom 1,5 mmol dm^{-3} otopine vanilinske kiseline postignuta je 1,44 puta veća aktivnost mangan-peroksidaze (43,4 U dm^{-3}) u odnosu na pokus bez dodatka induktora (30,1 U dm^{-3}). Elisashvili V. i Kachlishvili E. (2009.) su dobili slične rezultate submerznim uzgojem gljive bijelog truljenja *Cerrene unicolor* uz dodatak 0,5 mmol dm^{-3} otopine vanilinske kiseline pri čemu je postignuta 2 puta veća aktivnost mangan-peroksidaze.

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da otopina vanilinske kiseline slabo utječe na sintezu lakaze, dok umjereno inducira sintezu mangan-peroksidaze, te se od svih ispitivanih

koncentracija, najveća volumna aktivnost oba ispitivana enzima postiže primjenom 1,5 mmol dm^{-3} otopine vanilinske kiseline.

Istraživanje utjecaja dodatka ferulične kiseline na aktivnost lakaze i mangan-peroksidaze

U četvrtom pokusu istraživan je utjecaj dodatka ferulične kiseline u tri različite koncentracije (0,5 mmol dm^{-3}, 1 mmol dm^{-3} i 1,5 mmol dm^{-3}) na aktivnost lakaze i mangan-peroksidaze. Ukupno je nacijepljeno 6 teglica, za svaku ispitanu koncentraciju induktora po 2 teglice, a prikazane su srednje vrijednosti rezultata postignutih iz dviju teglica, za svaku koncentraciju induktora posebno. Rezultati volumnih aktivnosti enzima prikazani su na **Slici 4.6.** (lakaza) i **Slici 4.7.** (mangan-peroksidaza).

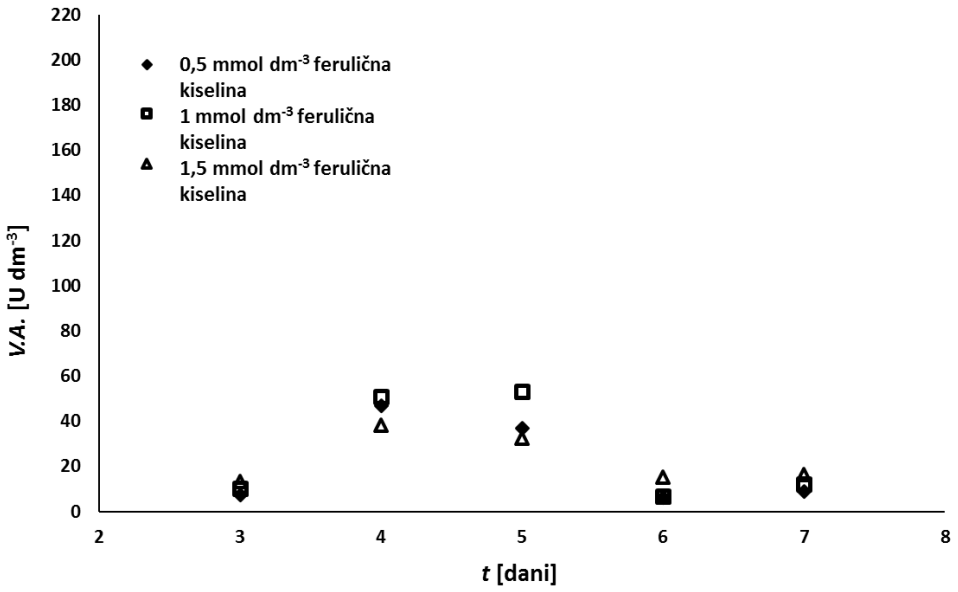


Slika 4.6. Volumna aktivnost enzima lakaza uz dodatak otopine ferulične kiseline različitih koncentracija (c = 0,5 mmol dm^{-3}, c = 1 mmol dm^{-3}, c = 1,5 mmol dm^{-3}; laboratorijske teglice, T = 27 °C, t = 7 dana)

Iz rezultata prikazanih na **Slici 4.6.**, vidljivo je da je četvrtog dana pokusa uz dodatak 0,5 mmol dm^{-3} i 1 mmol dm^{-3} otopine ferulične kiseline postignuta najveća aktivnost lakaze (197,2 U dm^{-3}; 283,5 U dm^{-3}), a pri upotrebi veće koncentracije induktora (1,5 mmol dm^{-3}) najveća aktivnost lakaze postignuta je petog dana i iznosila je 226,6 U dm^{-3}. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da se primjenom 1 mmol dm^{-3} otopine ferulične kiseline postiže najveća aktivnost

lakaze (283,5 U dm^{-3}) te da je ona 1,57 puta veća u odnosu na pokus u kojem nije korišten induktor.

Elisashvili V. i Kachlishvili E. (2009.) su objavili da se submerznim uzgojem gljive bijelog truljenja *Cerrene unicolor* uz dodatak 0,5 mmol dm^{-3} otopine ferulične kiseline postiže približno 1,09 puta veća aktivnost lakaze, a Fonseca i sur. (2014.) su objavili da se submerznim uzgojem gljive bijelog truljenja *Phlebia brevispora* BAFC 633 uz dodatak 0,3 mmol dm^{-3} ferulične kiseline postiže približno 2 puta veća aktivnost lakaze.



Slika 4.7. Volumna aktivnost enzima mangan-peroksidaza uz dodatak otopine ferulične kiseline različitih koncentracija (c = 0,5 mmol dm^{-3}, c = 1 mmol dm^{-3}, c = 1,5 mmol dm^{-3}; laboratorijske teglice, T = 27 °C, t = 7 dana)

Iz rezultata prikazanih na **Slici 4.7.**, vidljivo je da je četvrtog dana pokusa uz dodatak 0,5 mmol dm^{-3} i 1,5 mmol dm^{-3} otopine ferulične kiseline postignuta najveća aktivnost mangan-peroksidaze (46,8 U dm^{-3}; 38,4 U dm^{-3}), a pri upotrebi 1 mmol dm^{-3} otopine ferulične kiseline najveća aktivnost mangan-peroksidaze je postignuta petog dana i iznosila je 53,1 U dm^{-3}. Također, kao i kod lakaze, i u ovom pokusu najveća aktivnost je postignuta kada je korištena 1 mmol dm^{-3} otopina ferulične kiseline (53,1 U dm^{-3}).

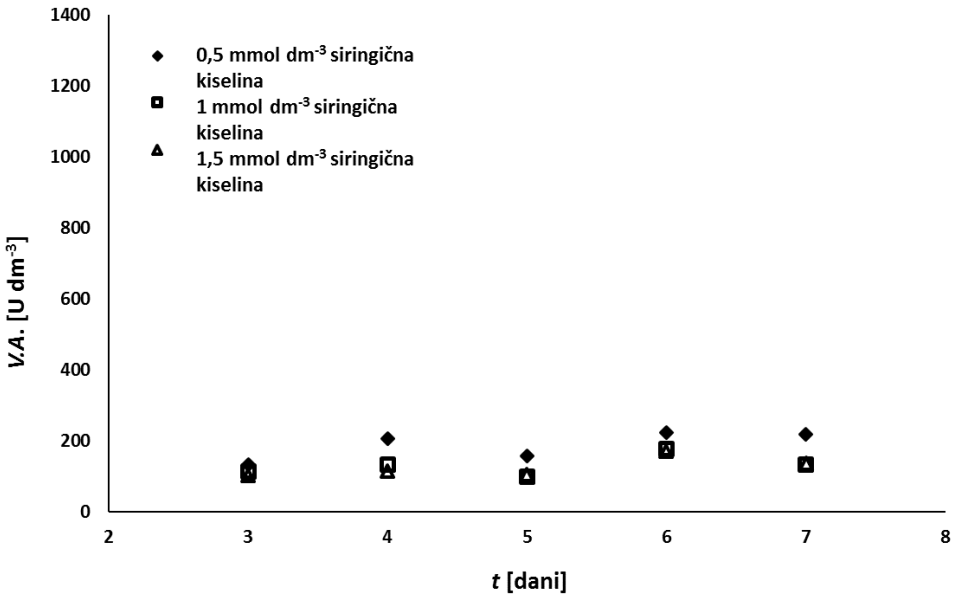
Dodatkom 1 mmol dm^{-3} otopine ferulične kiseline postignuta je 1,76 puta veća aktivnost mangan-peroksidaze (53,1 U dm^{-3}) u odnosu na pokus bez dodatka induktora (30,1 U dm^{-3}).

Ovi rezultati u skladu su s podatcima iz literature. Elisashvili V. i Kachlishvili E. (2009.) su objavili da se submerznim uzgojem gljive bijelog truljenja *Cerrene unicolor* uz dodatak 0,5 mmol dm^{-3} koncentracije otopine ferulične kiseline postiže 1,78 puta veća aktivnost mangan-peroksidaze.

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da otopina ferulične kiseline umjereno inducira sintezu lakaze i mangan-peroksidaze, te se od svih ispitivanih koncentracija, najveća volumna aktivnost oba ispitivana enzima postiže primjenom 1 mmol dm^{-3} otopine ferulične kiseline.

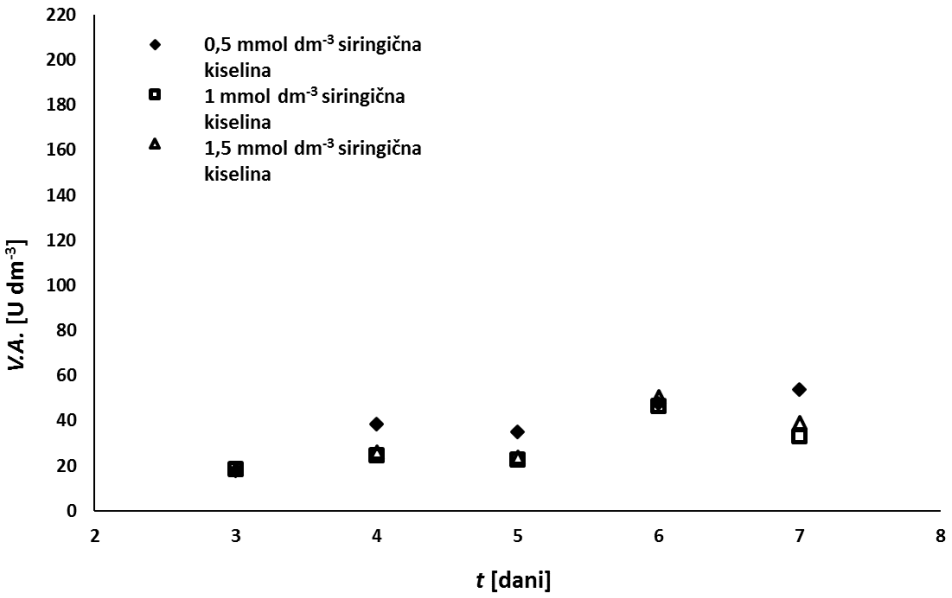
Istraživanje utjecaja dodatka siringične kiseline na aktivnost lakaze i mangan-peroksidaze

U petom pokusu istraživan je utjecaj dodatka siringične kiseline u tri različite koncentracije (0,5 mmol dm^{-3}, 1 mmol dm^{-3} i 1,5 mmol dm^{-3}) na aktivnost lakaze i mangan-peroksidaze. Ukupno je nacijepljeno 6 teglica, za svaku ispitanu koncentraciju induktora po 2 teglice, a prikazane su srednje vrijednosti rezultata postignutih iz dviju teglica, za svaku koncentraciju induktora posebno. Rezultati volumnih aktivnosti enzima prikazani su na **Slici 4.8.** (lakaza) i **Slici 4.9.** (mangan-peroksidaza).



Slika 4.8. Volumna aktivnost enzima lakaza uz dodatak otopine siringične kiseline različitih koncentracija (c = 0,5 mmol dm^{-3}, c = 1 mmol dm^{-3}, c = 1,5 mmol dm^{-3}; laboratorijske teglice, T = 27 °C, t = 7 dana)

Iz rezultata prikazanih na **Slici 4.8.**, vidljivo je da se najveće aktivnsoti lakaze postižu primjenom najniže koncentracije siringične kiseline, a najveća izmjerena vrijednost postignuta je šesti dan provedbe pokusa (223,1 U dm^{-3}) . U usporedbi s pokusom bez dodatka induktora, može se izračunati da je ova aktivnost za 1,24 puta veća. Fonseca i sur. (2014.) su objavili da se submerznim uzgojem gljive bijelog truljenja *Phlebia brevispora* BAFC 633 uz dodatak 0,3 mmol dm^{-3} siringične kiseline postiže približno 2,2 puta veća aktivnost lakaze.



Slika 4.9. Volumna aktivnost enzima mangan-peroksidaza uz dodatak otopine siringične kiseline različitih koncentracija (*c* = 0,5 mmol dm^{-3}, *c* = 1 mmol dm^{-3}, *c* = 1,5 mmol dm^{-3}; laboratorijske teglice, *T* = 27 °C, *t* = 7 dana)

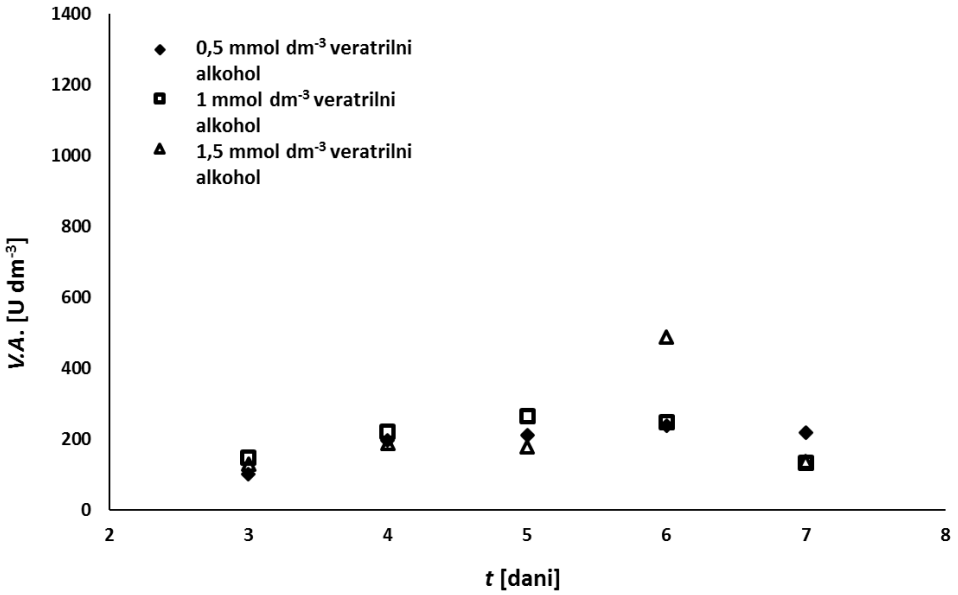
Iz rezultata prikazanih na **Slici 4.9.**, vidljivo je da je šestog dana pokusa uz dodatak 1 mmol dm^{-3} i 1,5 mmol dm^{-3} otopine siringične kiseline postignuta najveća aktivnost mangan-peroksidaze (46,4 U dm^{-3}; 50,7 U dm^{-3}), a pri upotrebi 0,5 mmol dm^{-3} otopine siringične kiseline najveća aktivnost mangan-peroksidaze je postignuta sedmog dana i iznosila je 53,9 U dm^{-3}. Također, kao i kod lakaze, i u ovom pokusu najveća aktivnost je postignuta kada je korištena 0,5 mmol dm^{-3} otopina siringične kiseline (53,9 U dm^{-3}).

Dodatkom 0,5 mmol dm^{-3} otopine siringične kiseline postignuta je 1,79 puta veća aktivnost mangan-peroksidaze (53,9 U dm^{-3}) u odnosu na pokus bez dodatka induktora (30,1 U dm^{-3}).

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da otopina siringične kiseline umjereno inducira sintezu lakaze i mangan-peroksidaze, te se od svih ispitivanih koncentracija, najveća volumna aktivnost oba ispitivana enzima postiže primjenom 0,5 mmol dm^{-3} otopine siringične kiseline.

Istraživanje utjecaja dodatka veratrilnog alkohola na aktivnost lakaze i mangan-peroksidaze

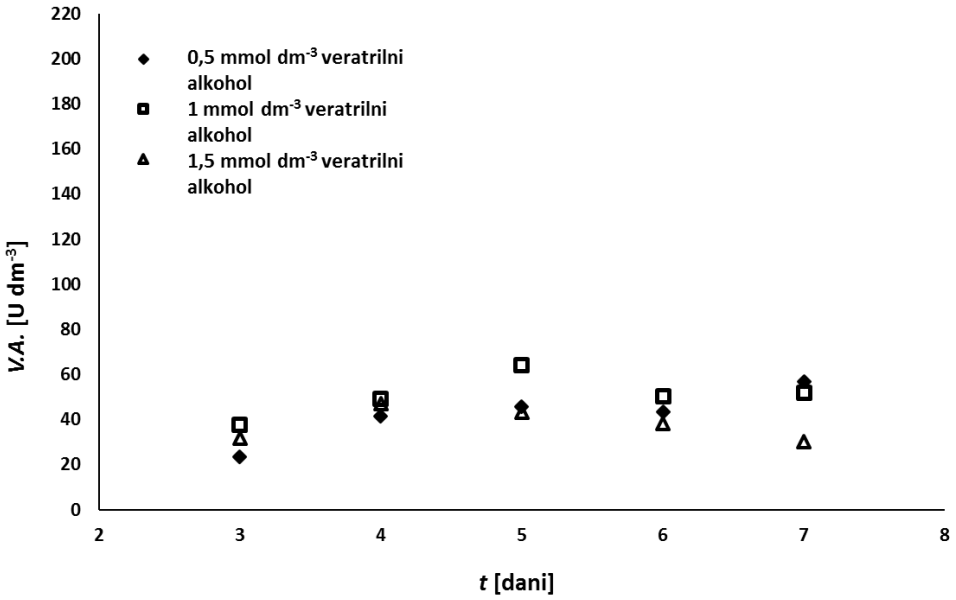
U šestom pokusu istraživan je utjecaj dodatka veratrilnog alkohola u tri različite koncentracije (0,5 mmol dm^{-3}, 1 mmol dm^{-3} i 1,5 mmol dm^{-3}) na aktivnost lakaze i mangan-peroksidaze. Ukupno je nacijepljeno 6 teglica, za svaku ispitanu koncentraciju induktora po 2 teglice, a prikazane su srednje vrijednosti rezultata postignutih iz dviju teglica, za svaku koncentraciju induktora posebno. Rezultati volumnih aktivnosti enzima prikazani su na **Slici 4.10.** (lakaza) i **Slici 4.11.** (mangan-peroksidaza).



Slika 4.10. Volumna aktivnost enzima lakaza uz dodatak otopine veratrilnog alkohola različitih koncentracija (c = 0,5 mmol dm^{-3}, c = 1 mmol dm^{-3}, c = 1,5 mmol dm^{-3}; laboratorijske teglice, T = 27 °C, t = 7 dana)

Iz rezultata prikazanih na **Slici 4.10.**, vidljivo je da je najveća aktivnost lakaze postinuta šesti dan primjenom 1,5 mmol dm^{-3} otopine veratrilnog alkohola (486,6 U dm^{-3}) i u odnosu na pokus bez dodatka induktora ona je 2,7 puta veća.

S druge strane, Dominguez i sur. (2007.) su objavili da se uzgojem *T. versicolor* u „airlift“ bioreaktoru uz dodatak 20 mmol dm^{-3} otopine veratrilnog alkohola postiže približno 6 puta veća aktivnost lakaze.



Slika 4.11. Volumna aktivnost enzima mangan-peroksidaza uz dodatak otopine veratrilnog alkohola različitih koncentracija (c = 0,5 mmol dm^{-3}, c = 1 mmol dm^{-3}, c = 1,5 mmol dm^{-3}; laboratorijske teglice, T = 27 °C, t = 7 dana)

Iz rezultata prikazanih na **Slici 4.11.**, vidljivo je da je četvrtog dana pokusa uz dodatak 1,5 mmol dm^{-3} otopine veratrilnog alkohola postignuta najveća aktivnost mangan-peroksidaze (47,2 U dm^{-3}), petog dana pokusa uz dodatak 1 mmol dm^{-3} otopine veratrilnog alkohola je postignuta najveća aktivnost mangan-peroksidaze (64,3 U dm^{-3}), a pri upotrebi 0,5 mmol dm^{-3} otopine veratrilnog alkohola najveća aktivnost mangan-peroksidaze je postignuta sedmog dana i iznosila je 56,9 U dm^{-3}. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da se primjenom 1 mmol dm^{-3} otopine veratrilnog alkohola postiže najveća aktivnost mangan-peroksidaze (64,3 U dm^{-3}) te da je ona 2,1 puta veća u odnosu na pokus u kojem nije korišten induktor.

Hakala i sur. (2006.) su objavili da se submerznim uzgojem gljive bijelog truljenja *Physisporinus rivulosus* T241i uz dodatak 0,5 mmol dm^{-3} veratrilnog alkohola postiže 15 - 20 puta veća aktivnost mangan-peroksidaze.

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je otopina veratrilnog alkohola dobar induktor sinteze lakaze i mangan-peroksidaze, te se od svih ispitivanih koncentracija, najveća volumna aktivnost lakaze postiže primjenom 1,5 mol dm^{-3} otopine veratrilnog alkohola, a mangan-peroksidaze primjenom 1 mmol dm^{-3} otopine veratrilnog alkohola.

4.2. Proizvodnja lakaze i mangan-peroksidaze tijekom uzgoja *Trametes versicolor* na kukuruznoj silaži u bioreaktoru s pliticama

Proizvodnja enzima lakaze i mangan-peroksidaze iz soja TV-6 gljive bijelog truljenja *Trametes versicolor* provedena je šaržno u uvjetima uzgoja SSF fermentacija u bioreaktoru s pliticama. Izvedeno je dva pokusa s ciljem istraživanja utjecaja na aktivnost lakaze i mangan-peroksidaze i postizanjem veće aktivnosti navedenih enzima. Prvi pokus je proveden bez dodatka induktora, a drugi pokus uz dodatak 0,1 mol dm^{-3} otopine bakrova sulfata jer se navedena otopina pokazala kao najbolji induktor u procesu proizvodnje enzima u laboratorijskim teglicama.

Kod oba pokusa, uzgoj je trajao 7 dana pri čemu su nulti, peti, šesti i sedmi dan uzimani uzorci iz bioreaktora, koji su ekstrahirani i centrifugirani, a zatim je iz tekućinskog ostatka prema metodi opisanoj u **Poglavlju 3.3.1.** mjerena aktivnost enzima. Pokusi su provedeni u tri paralelne serije.

Prvi pokus je proveden bez dodatka induktora gdje je ispitivana volumna aktivnost lakaze i mangan-peroksidaze, te rezultati su prikazani u **Tablici 1** i **Tablici 2**.

Tablica 1 Aktivnost enzima lakaza bez dodatka induktora tijekom uzgoja *Trametes versicolor* na kukuruznoj silaži u bioreaktoru s pliticama (T = 27 °C, t = 7 dana)

***t* [dani]**	***V.A.* [U dm^{-3}]**
0.	35,5 ± 18,7
5.	124,8 ± 38,4
6.	226,5 ± 37,0
7.	209,9 ± 81,1

Iz rezultata prikazanih u **Tablici 1**, vidljivo je da volumna aktivnost lakaze raste do šestog dana pokusa kada je najveća (226,5 U dm^{-3}), te nakon toga pada. U odnosu na pokus proveden u

laboratorijskim teglicama kada je aktivnost lakaze iznosila 180,2 U dm^{-3}, može se izračunati da je u pokusu u bioreaktoru aktivnost lakaze 1,26 puta veća.

Tablica 2 Aktivnost enzima MnP bez dodatka induktora tijekom uzgoja *Trametes versicolor* na kukuruznoj silaži u bioreaktoru s pliticama (*T* = 27 °C, *t* = 7 dana)

***t* [dani]**	***V.A.* [U dm^{-3}]**
0.	7,4 ± 4,0
5.	28,0 ± 5,7
6.	53,9 ± 11,1
7.	56,9 ± 22,3

Iz rezultata prikazanih u **Tablici 2**, vidljivo je da volumna aktivnost mangan-peroksidaze raste do sedmog dana kada je najveća (56,9 U dm^{-3}). U odnosu na pokus proveden u laboratorijskim teglicama kada je aktivnost mangan-peroksidaze iznosila 30,1 U dm^{-3}, može se izračunati da je u pokusu u bioreaktoru aktivnost mangan-peroksidaze 1,89 puta veća.

Tablica 3 Aktivnost enzima lakaza uz dodatak 0,1 mol dm^{-3} otopine bakrova sulfata tijekom uzgoja *T. versicolor* na kukuruznoj silaži u bioreaktoru s pliticama (*T* = 27 °C, *t* = 7 dana)

***t* [dani]**	***V.A.* [U dm^{-3}]**
0.	35,8 ± 14,3
5.	556,5 ± 36,5
6.	685,1 ± 166,3
7.	722,1 ± 145,5

Iz rezultata prikazanih u **Tablici 3**, vidljivo je da volumna aktivnost lakaze raste do sedmog dana pokusa kada je najveća (722,1 U dm^{-3}). U odnosu na pokus proveden bez dodatka induktora u bioreaktoru s pliticama kada je aktivnost lakaze bila 226,5 U dm^{-3}, može se izračunati da se primjenom 0,1 mol dm^{-3} otopine bakrovog sulfata postiže 3,19 puta veća aktivnost lakaze.

Tablica 4 Aktivnost enzima MnP uz dodatak 0,1 mol dm^{-3} otopine bakrova sulfata tijekom uzgoja *T. versicolor* na kukuruznoj silaži u bioreaktoru s pliticama (*T* = 27 °C, *t* = 7 dana)

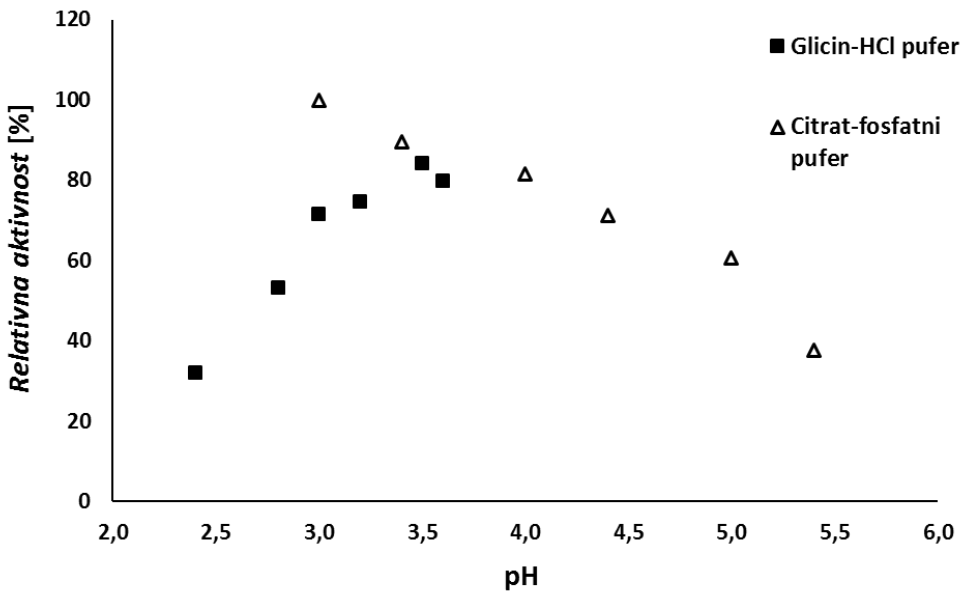
***t* [dani]**	***V.A.* [U dm^{-3}]**
0.	8,3 ± 3,4
5.	77,3 ± 22,1
6.	111,2 ± 19,0
7.	140,1 ± 31,8

Iz rezultata prikazanih u **Tablici 4**, vidljivo je da volumna aktivnost mangan-peroksidaze raste do sedmog dana pokusa kada je najveća (140,1 U dm^{-3}). U odnosu na pokus proveden bez dodatka induktora u bioreaktoru s pliticama kada je aktivnost mangan-peroksidaze bila 56,9 U dm^{-3}, može se izračunati da se primjenom 0,1 mol dm^{-3} otopine bakrovog sulfata postiže 2,46 puta veća aktivnost mangan-peroksidaze.

4.3. Istraživanje ovisnosti aktivnosti lakaze i mangan-peroksidaze o pH

Za potrebe provedbe istraživanja ovisnosti enzima lakaza o pH, korišteni su ekstrakti enzima proizvedeni u pokusu provedenom u bioreaktoru s pliticama s dodatkom induktora 0,1 mol dm^{-3} $CuSO_4$ čija je izmjerena volumna aktivnost bila 872,2 U dm^{-3}.

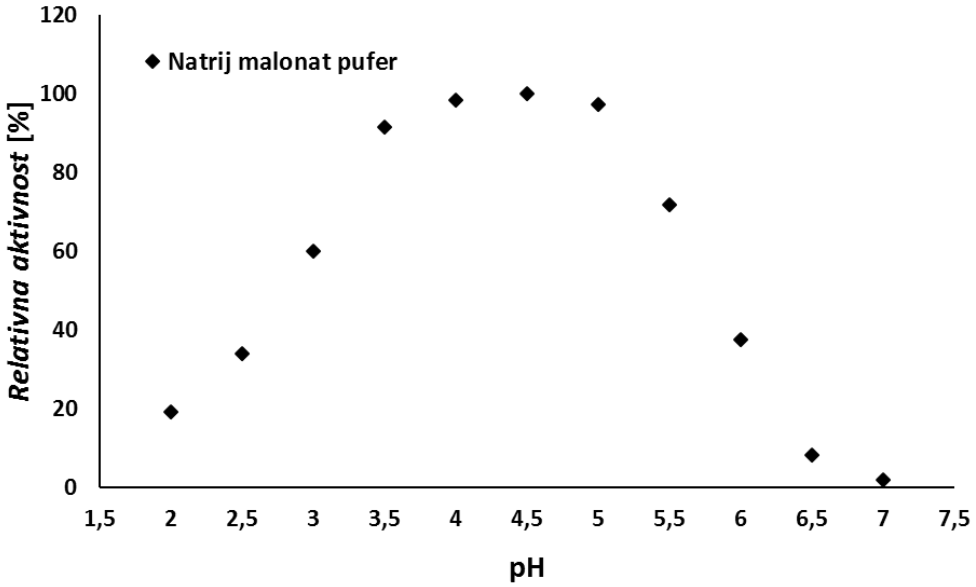
Aktivnost lakaze mjerena je koristeći ABTS (c = 3,0 mmol dm^{-3}) kao supstrat otopljen u 0,05 mol dm^{-3} citrat-fosfatnom puferu (pH = 3,0 – 5,4) i 0,2 mol dm^{-3} glicin-HCl puferu (pH = 2,4 – 3,6) pri temperaturi 25 °C. Rezultati ovisnosti relativne vrijednosti volumne aktivnosti lakaze o pH prikazani su na **Slici 4.12.** Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da se maksimalna aktivnost lakaze postiže pri pH 3,5.



Slika 4.12. Ovisnost relativne aktivnosti lakaze (proizvedena u bioreaktoru s pliticama uz dodatak 0,1 mol dm^{-3} $CuSO_4$) o pH (T = 25 °C)

Za potrebe provedbe istraživanja ovisnosti enzima mangan-peroksidaza o pH, korišteni su ekstrakti enzima proizvedeni u pokusu provedenom u bioreaktoru s pliticama s dodatkom induktora 0,1 mol dm^{-3} $CuSO_4$ čija je izmjerena volumna aktivnost bila 177,175 U dm^{-3}.

Aktivnost mangan-peroksidaze mjerena je koristeći DMP (c = 0,5 mmol dm^{-3}) kao supstrat otopljen u 0,05 mol dm^{-3} natrij-malonat puferu (pH: 2,0 – 7,0) pri temperaturi 25 °C. Rezultati ovisnosti relativne vrijednosti volumne aktivnosti mangan-peroksidaze o pH prikazani su na **Slici 4.13.** Maksimalna aktivnost mangan-peroksidaze postignuta pri pH 4,5. Također, navedeni rezultati pokazuju visoku aktivnost mangan-peroksidaze u rasponu pH 4 – 5 nakon čega povišenjem pH aktivnost enzima naglo pada.

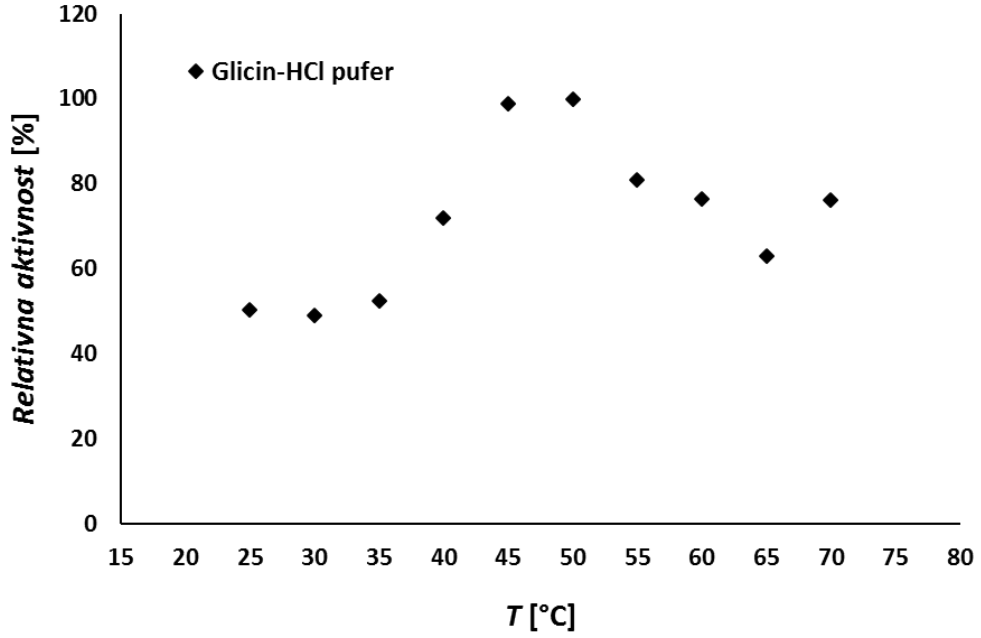


Slika 4.13. Ovisnost relativne aktivnosti mangan-peroksidaze (proizvedena u bioreaktoru s pliticama uz dodatak 0,1 mol dm^{-3} $CuSO_4$) o pH (T = 25 °C)

4.4. Istraživanje ovisnosti aktivnosti lakaze i mangan-peroksidaze o temperaturi

Za potrebe provedbe istraživanja ovisnosti enzima lakaza o temperaturi, korišteni su ekstrakti enzima proizvedeni u pokusu provedenom u bioreaktoru s pliticama bez dodatka induktora čija je izmjerena volumna aktivnost bila 123,6 U dm^{-3}.

Aktivnost lakaze iz *Trametes versicolor* TV-6 proizvedene u bioreaktoru s pliticama mjerena je koristeći ABTS otopljen u 0,2 mol dm^{-3} glicin-HCl puferu (pH 3,5). Prije mjerenja aktivnosti enzima, otopina ABTS-a je termostatirana u rasponu od 25 – 70 °C tijekom 10 minuta.
Rezultati ovisnosti relativne aktivnosti lakaze o temperaturnim vrijednostima u otopini glicin-HCl pufera prikazani su na **Slici 4.14.**

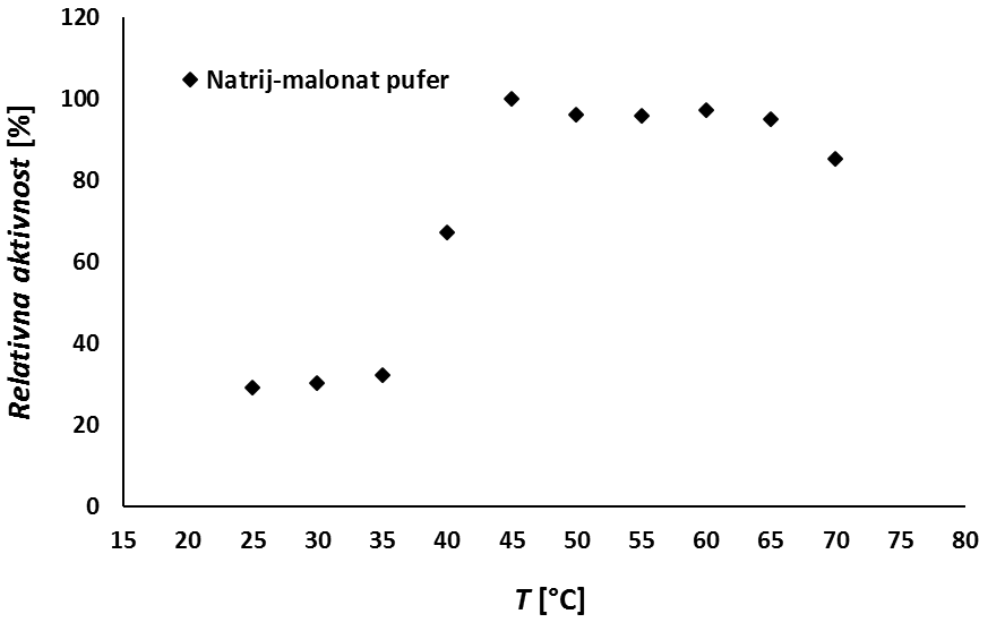


Slika 4.14. Ovisnost relativne aktivnosti lakaze (proizvedena u bioreaktoru s pliticama bez dodatka induktora) o temperaturi (pH = 3,5)

Iz dobivenih rezultata pokazano je da je maksimalna aktivnost lakaze postignuta pri temperaturi od 50 °C. Također, navedeni rezultati pokazuju dosta veliku aktivnost lakaze u rasponu temperature 45 – 50 °C nakon čega povišenjem temperature aktivnost enzima pada.

Za potrebe provedbe istraživanja ovisnosti enzima mangan-peroksidaze o temperaturi, korišteni su ekstrakti enzima proizvedeni u pokusu provedenom u bioreaktoru s pliticama bez dodatka induktora čija je izmjerena volumna aktivnost bila 81,9 U dm^{-3}.
Aktivnost mangan-peroksidaze iz *Trametes versicolor* TV-6 proizvedene u bioreaktoru s pliticama mjerena je koristeći DMP otopljen u 0,05 mol dm^{-3} natrij-malonat puferu (pH 4,5). Prije mjerenja aktivnosti enzima, otopina DMP-a je termostatirana u rasponu od 25 – 70 °C tijekom 10 minuta.

Rezultati ovisnosti relativne aktivnosti mangan-peroksidaze o temperaturnim vrijednostima u otopini natrij-malonat pufera prikazani su na **Slici 4.15.**



Slika 4.15. Ovisnost relativne aktivnosti mangan-peroksidaze (proizvedena u bioreaktoru s pliticama bez dodatka induktora) o temperaturi (pH = 4,5)

Iz dobivenih rezultata pokazano je da je maksimalna aktivnost mangan-peroksidaze postignuta u temperaturnom rasponu od 45 do 70 °C.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih pokusa i dobivenih rezultata doneseni su sljedeći zaključci:

U ovom radu provedeni su pokusi uzgoja gljive bijelog truljenja *Trametes versicolor* TV-6 uz dodatak različitih induktora (bakrov sulfat, vanilinska kiselina, ferulična kiselina, siringična kiselina i veratrilni alkohol) u različitim koncentracijama s ciljem proizvodnje enzima lakaza i mangan-peroksidaza, u uvjetima fermentacija na čvrstim nosačima, u laboratorijskim teglicama te u uvećanom mjerilu u bioreaktoru s pliticama.

Dokazano je da izbor i koncentracija induktora utječu na aktivnost enzima.

U pokusima bez dodatka induktora uzgojem gljive bijelog truljenja *Trametes versicolor* TV-6 u laboratorijskim teglicama maksimalna volumna aktivnost lakaze iznosila je 180,2 U dm^{-3}, a mangan-peroksidaze 30,1 U dm^{-3}.

Od svih testiranih induktora (bakrov sulfat, ferulična kiselina, siringična kiselina, vanilinska kiselina i veratrilni alkohol), 0,1 mol dm^{-3} otopina bakrovog sulfata se pokazala najboljim induktorom za proizvodnju lakaze i mangan-peroksidaze. Maksimalna volumna aktivnost lakaze iznosila je 1389,1 U dm^{-3}, a mangan-peroksidaze 209,1 U dm^{-3}.

Uvećanjem mjerila proizvodnje enzima lakaze i mangan-peroksidaze uzgojem gljive bijelog truljenja *T. versicolor* TV-6 u bioreaktoru s pliticama, bez dodatka induktora dobivene su 1,26 puta veće volumne aktivnosti lakaze (226,5 U dm^{-3}) i 1,89 puta veće volumne aktivnosti mangan-peroksidaze (56,9 U dm^{-3}) u odnosu na pokuse provedene u laboratorijskim teglicama bez dodatka induktora kada su one iznosile 180,2 U dm^{-3} (za lakazu) i 30,1 U dm^{-3} (za mangan-peroksidazu).

Induktor (0,1 mol dm^{-3} otopina bakrovog sulfata) kojim su se postigle najviše volumne aktivnosti enzima lakaze i mangan-peroksidaze uzgojem *T. versicolor* TV-6 u laboratorijskim teglicama, korišten je u uvećanom mjerilu u bioreaktoru s pliticama, pri čemu je postignuta 3,19 puta veća volumna aktivnosti lakaze (722,1 U dm^{-3}) i 2,46 puta veća volumna aktivnost mangan-peroksidaze (140,1 U dm^{-3}) u usporedbi s volumnim aktivnostima lakaze i mangan-peroksidaze dobivenim proizvodnjom u bioreaktoru s pliticama bez dodatka induktora. Međutim, u usporedbi s pokusom u malom mjerilu, ove aktivnosti su niže, i to 1,92 puta su niže volumne aktivnosti lakaze, te 1,49 puta niže volumne aktivnosti mangan-peroksidaze.

Istraživanjem ovisnosti aktivnosti enzima o pH i temperaturi, utvrđeno je da lakaza pokazuje optimalnu aktivnost pri T = 50 °C i pH = 3,5, a mangan-peroksidaza pri T = 45 - 70 °C i pH = 4,5.

6. LITERATURA

Couto S R, Toca-Herrera J L: Laccases production at reactor scale by filamentous fungi. *Biotechnology Advances* 25: 558 – 569, 2007.

Desai S S, Nityanand C.: Microbial Laccases and their Applications: A Review. *Asian Journal of Biotechnology* 3: 98 – 124, 2011.

Dominguez A, Gomez J, Lorenzo M, Sanroman A: Enhanced production of laccase activity by *Trametes versicolor* immobilized into alginate beads by the addition of different inducers. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23: 367 – 373, 2007.

Duraković S: *Opća mikrobiologija,* Prehrambeno tehnološki inženjering, Zagreb, 1996.

Durand A: Bioreactor designs for solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 13: 113 – 125, 2003.

Elisashvili V, Kachlishvili E: Physiological regulation of laccase and manganese peroxidase production by white-rot Basidiomycetes: A review. *Journal of Biotechnology* 144: 37 – 42, 2009.

Fonseca M I, Ramos-Hryb A B, Farina J I, Afanasiuk S S S, Villalba L L, Zapata P D: Effect of chemical and metallic compounds on biomass, mRNA levels and laccase activity of *Phlebia brevispora* BAFC 633. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 30: 2251 – 2262, 2014.

Gadd G M: *Fungi in bioremediation*. Press Syndicate of the University of Cambridge, Cambridge, 2001.

Hakala T K, Hildén K, Maijala P, Olsson C, Hatakka A: Differential regulation of manganese peroxidases and characterization of two variable MnP encoding genes in the white-rot fungus Physisporinus rivulosus. *Applied Microbiology and Biotechnology* 73: 839 – 849, 2006.

Hofrichter M: Lignin conversion by manganese peroxidase (MnP): A review. *Journal of Enzyme and Microbial Technology* 30: 454 – 466, 2002.

Järvinen J, Taskila S, Isomäki R, Ojamo H: Screening of white-rot fungi manganese peroxidases: a comparison between the specific activities of the enzyme from different native producers. *AMB Express* 2: 62, 2012.

Johnson J A: *Investigating fungi which cause rot and decay*, Tested studies for laboratory teaching, C.A. Goldman, 1990.

Kunamneni A, Camarero S, Garcia-Burgos C, Plou F J, Ballesteros A, Alcalde M: Engineering and applications of fungal laccase for organic synthesis. *Microbial Cell Factories* 7: 1475 – 2859, 2008.

Lankinen P: Ligninolytic enzymes of the basidiomycetous fungi *Agaricus biosporus* and *Phlebia radiata* on lignocellulose containing media. *Academic Dissertation in Microbiology*. University of Helsinki, Finland, 2004.

Levin L, Forchiassin F, Ramos A M: Copper induction of lignin-modifying enzymes in the white-rot fungus Trametes trogii. *Mycologia* 94: 377–383, 2002.

Majeau J-A, Brar S K, Tyagi R D: Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. *Bioresource Technology* 101: 2331 – 2350, 2010.

Merwe van der J J: Production of laccase by the white – rott fungus *Pycnoporus sanguineus*. *Master thesis*. Faculty of Natural and Agricultural Sciences, Bloemfontein (South Africa), 2002.

Minussi R C, Pastore G M, Duran N: Potential applications of laccase in the food industry. *Trends in Food Science & Technology* 13: 205 – 216, 2002.

Minussi R C, Rossi M, Bologna L, Rotilio D, Pastore G M, Duran N: Phenols removal in must: Strategy for wine stabilization by laccase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 45: 102 – 107, 2007.

Mitchell D A, Krieger N, Berovič M: *Solid-state fermentation bioreactors, Fundamentals of design and operation*. Springer, Berlin Heidelberg, 2006.

Mitchell D A, Berovič M, Krieger N: Overview of solid state bioprocessing. *Biotechnology Annual Review* 8, 183 – 225, 2002.

Pilaš J: Proizvodnja lakaze uzgojem *Trametes versicolor* na otpadu industrije pulpe i papira. *Diplomski rad*. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2009.

Planinić M, Zelić B, Čubel I, Bucić-Kojić A, Tišma M: Corn forage biological pretreatment by *Trametes versicolor* in a tray bioreactor. *Waste Management & Research* 34: 802 – 809, 2016.

Ridgway M: *Turkey tails on eucalyptus (Trametes versicolor)*. JungleDragon, 2016. https://www.jungledragon.com/image/39643/turkey_tails_on_eucalyptus_trametes_versicolor.html, [19.8.2017.]

Riva S: Laccases, blue enzymes for green chemistry. *Trends in Biotechnology* 24, 219 – 226, 2006.

Sakurai T, Kataoka K: Basic and Applied features of multicopper oxidases, CueO, bilirubin oxidase, and laccase. *Chemical Record* 7: 220 – 229, 2007.

Singh H: *Mycoremediation: fungal bioremediation*. Wiley-Interscience, New Jersey, 2006.

Singh A, Kuhad R C, Ward O P: *Advances in Applied Bioremediation*. Springer, New York, 2009.

Šelo G: Utjecaj dodatka sirka na aktivnost lakaze tijekom submerznog uzgoja *Trametes versicolor. Diplomski rad.* Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2014.

Tavares A M P, Coelho M A Z, Coutinho J A P, Xavier A M R B: Laccase improvement in submerged cultivation: induced production and kinetic modelling. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 80, 669 – 676, 2005.

Tišma M, Žnidaršič-Plazl P, Plazl I, Zelid B, Vasid-Rački Đ: Modelling of L-DOPA oxidation catalyzed by laccase. *Chemical & Biochemical Engineering Quarterly* 22: 307 – 313, 2008.

Tišma M: Proizvodnja lakaze submerznim uzgojem *Trametes versicolor*. *Doktorski rad*. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2010.

Tišma M, Velić N, Zelić B: From waste to value-added products – solid-state fermentation by white-rot fungi. U *Biotechnology (Multi – Volume Set)*, str. 223 – 256, Studium Press LCC, New Delhi, 2014.

UHM Department Of Botany: *Medicinal Mushroom?*, 2017. http://www.botany.hawaii.edu/faculty/wong/BOT135/Lecture025_medicinal_mushroom.htm, [19.8.2017.]

Varga B M: *Forest stripes II*, 2009. http://bmvgallery.com/tag/trametes-versicolor/, [19.8.2017.]

Young R A, Masood A: *Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry*. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1998.

Zhang H, Zhang S, He F, Qin X, Zhang X, Yang Y: Characterization of a manganese peroxidase from white-rot fungus Trametes sp.48424 with strong ability of degrading different types of

dyes and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Hazardous Materials* 320: 265 – 277, 2016.