

Utjecaj dodatka različitih induktora na aktivnost lakaze tijekom uzgoja *Trametes versicolor* na pljevici ječma

Potočnik, Martin

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:109:142742>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-20**

REPOZITORIJ

PTFS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE J. J. STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

Martin Potočnik

**UTJECAJ DODATKA RAZLIČITIH INDUKTORA NA AKTIVNOST
LAKAZE TIJEKOM UZGOJA *TRAMETES VERSICOLOR* NA
PLJEVICI JEČMA**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, studeni 2019.

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 VII. sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 25. 4. 2019.
Mentor: izv. prof. dr.sc. Marina Tišma
Pomoć pri izradi: Gordana Šelo, mag. ing. proc., asistent
dr. sc. Anita Šalić (Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije)

UTJECAJ DODATKA RAZLIČITIH INDUKTORA NA AKTIVNOST LAKAZE TIJEKOM UZGOJA *TRAMETES VERSICOLOR* NA PLJEVICI JEČMA
Martin Potočnik

Sažetak:

U ovom radu istraživana je utjecaj dodatka različitih induktora (bakrov sulfat, ljuska jajeta, otpad iz industrije papira) na proizvodnju lakaze tijekom uzgoja *Trametes versicolor* TV-6 na pljevici ječma. Najveća volumna aktivnost sirovog (nepročišćenog) enzima postignuta je nakon 10 dana trajanja pokusa ($V.A. = 494,76 \text{ U dm}^{-3}$) u kojem je kao induktor korišten *Calplex H90*, otpad iz industrije papira. Sirovi enzimski pripravak je potom djelomično pročišćen taloženjem proteina s amonijevim sulfatom te dijalizom. Istraživana je utjecaj temperature, pH i dodatka različitih metala na volumnu aktivnost djelomično pročišćenog i sirovog enzima. Najveća volumna aktivnost djelomično pročišćenog enzima postignuta je pri $T = 50 \text{ °C}$ i $\text{pH} = 4$ i iznosila je $V.A. = 2780,28 \text{ U dm}^{-3}$. Ispitana je stabilnost enzima (nepročišćenog i pročišćenog) prilikom skladištenja pri tri različite temperature ($T = +25, +4$ i -20 °C) tijekom 20 dana, pri čemu je pokazano da je najveća stabilnost enzima postignuta skladištenjem pri $T = 4 \text{ °C}$. Na kraju, testirana je mogućnost primjene lakaze u slobodnom i imobiliziranom obliku u procesu obezbojenja tekstilnog bojila anilinskog tipa, otopljenog u vodi i u glicin-HCl puferu pH 4. Pokusi su provedeni pri dvije različite temperature $T = 25$ i 55 °C . U pokusu obezbojenja sa sirovim enzimom u glicin-HCl puferu, pri $T = 55 \text{ °C}$ postignuta je 100 %-tna konverzija anilinskog bojila.

Ključne riječi: *Trametes versicolor*, lakaza, induktori, SSF fermentacija, obezbojenje bojila

Ovaj rad je izrađen u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost „Razvoj održivog integriranog procesa proizvodnje biološki aktivnih izolata iz proizvodnih ostataka prehrambene industrije“ (POPI-WinCEco)(IP-2018-01-1227)

Rad sadrži: Slika: 31
Stranica: 41
Literarnih referenci: 23

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. predsjednik prof. dr. sc. Mirela Planinić
2. član-mentor izv. prof. dr. sc. Marina Tišma
3. član prof. dr. sc. Ana Bucić-Kojić
4. zamjena člana prof. dr. sc. Daliborka Koceva Komlenić

Datum obrane: 28. studenog, 2019.

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

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Course title: Chemical and biochemical reactors
Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. VII held on April 25, 2019.
Mentor: *Marina Tišma*, PhD, assoc. prof.
Technical assistance: *Gordana Šelo*, mag. ing. proc., Assistant
dr. sc. *Anita Šalić* (University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology,)

Influence of addition of different inducers on laccase activity during cultivation of *Trametes versicolor* on barley husk
Martin Potočnik

Summary:

In this master's thesis the influence of different inductors (copper sulfate, eggshell, waste of the paper industry) on laccase production during the growth of *Trametes versicolor* TV-6 on barley husk was investigated. The highest volume activity of crude (unpurified) enzyme (V.A. = 494,76 U dm⁻³) was accomplished after 10 days in experiment performed with the addition of *Calplex H90*, waste of paper industry. Crude enzyme was additionally purified by protein sedimentation method with ammonium sulfate and dialysis method. The influence of temperature, pH and addition of metals on volume activity of partially purified and crude enzyme was researched. The highest volume activity of partially purified enzyme was accomplished at $T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $\text{pH} = 4$, and was V.A. = 2780,28 U dm⁻³. Enzyme (unpurified and purified) stability while stored at three different temperatures ($T = +25, +4, \text{ and } -20\text{ }^{\circ}\text{C}$) during 20 days was investigated, whereby it was shown that the highest stability of the enzyme was achieved during storage at $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$. At the end, the possibility of laccase application in free and immobilized forms for decolorization of aniline textile dye dissolved in water and glycine-HCl buffer, pH 4, was investigated. The experiments were conducted at two different temperatures $T = 25$ and $55\text{ }^{\circ}\text{C}$. 100 % conversion of aniline dye was achieved in experiment with crude enzyme in experiment performed in glycine-HCl buffer, pH 4 and at $T = 55\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Key words: *Trametes versicolor*, laccase, inducers, solid state fermentation, dye decolorization

Thesis contains: Figures: 31
Pages: 41
References: 23

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|---|--------------|
| 1. <i>Mirela Planinić</i> , PhD, full prof. | chair person |
| 2. <i>Marina Tišma</i> , PhD, associate prof. | supervisor |
| 3. <i>Ana Bucić-Kojić</i> , PhD, full prof. | member |
| 4. <i>Daliborka Koceva Komlenić</i> , PhD, full prof. | stand-in |

Defense date: November 28, 2019

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

Veliku zahvalnost dugujem mojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Marini Tišmi na svom posvećenom vremenu, poticanju i savjetima tijekom izrade diplomskog rada. Hvala na susretljivosti i pristupačnosti u svakom potrebnom trenutku.

mag. ing. proc., asistent Gordani Šelo zahvaljujem na pomoći, savjetima i strpljenju tijekom brojnih sati provedenih u laboratoriju.

dr. sc. Aniti Šalić zahvaljujem se na pristupačnosti, pomoći, savjetima i strpljenju tijekom izrade djela diplomskog rada u Zagrebu.

Zahvaljujem se kolegi Teu Lukačiću na pomoći i idejama prilikom izrade eksperimentalnog djela rada u laboratoriju.

Hvala svim mojim prijateljima i ostalim kolegama na potpori i brojnim korisnim idejama.

Posebna zahvala mojim roditeljima, bratu i baki na razumijevanju i bezuvjetnoj podršci koju su mi pružili tijekom cijelog studiranja jer bez njih sve ovo ne bi bilo moguće.

Veliko hvala Loreni Kores na beskrajnoj podršci, uloženom vremenu, poticanju i razumijevanju u svakom trenutku.

Veliko HVALA svima!

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1 Gljive bijelog truljenja	4
2.1.1. <i>Trametes versicolor</i>	4
2.2. Lakaze	5
2.3. Pljevica ječma	6
2.4. Fermentacije na čvrstim nosačima	7
3. EKSPERIMENTALNI DIO	10
3.1. Zadatak	11
3.2 MATERIJALI I METODE	11
3.2.1. Mikroorganizam	11
3.2.2. Kemikalije	12
3.2.3. Aparatura	12
3.2.4. Uzgoj i čuvanje kulture	16
3.2.5. Priprema inokuluma	16
3.2.6. Proizvodnja lakaze.....	16
3.2.7. Pročišćavanje sirovog enzima amonijevim solima i dijalizom	17
3.2.9. Obezbojenje tekstilnih boja	18
3.3. ANALITIČKE METODE	19
3.3.1. Mjerenje aktivnosti enzima lakaze.....	19
3.3.2. Određivanje koncentracije proteina Bradfordičinom metodom	20
3.3.3 Ispitivanje stabilnosti enzima prilikom skladištenja pri različitim temperaturama	21
3.3.4. Karakterizacija enzima.....	21
4. REZULTATI I RASPRAVA	283
4.1. Proizvodnja lakaze uzgojem <i>T. versicolor</i> TV-6 na pljevici ječma u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima	24
4.2. Proizvodnja lakaze uzgojem <i>T. versicolor</i> TV-6na pljevici ječma u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima s dodatkom bakrovog sulfata	25
4.3. Proizvodnja lakaze uzgojem <i>T. versicolor</i> TV-6 na pljevici ječma u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima s dodatkom ljuske jajeta	25
4.4. Proizvodnja lakaze uzgojem <i>T. versicolor</i> na pljevici ječma u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima s dodatkom otpada porijeklom iz industrije papira	26

4.5. Stabilnost enzima tijekom skladištenja pri različitim temperaturama	27
4.6. Karakterizacija enzima	28
4.6.1. Utjecaj pH na aktivnost enzima lakaza.....	28
4.6.2. Utjecaj temperature na aktivnost enzima lakaza.....	29
4.6.3. Utjecaj metala na enzim lakaza.....	30
4.6.4. Kinetika enzima lakaza	30
4.7. Obezbojenje anilinske boje enzimom lakaza	33
4.7.1. Istraživanje obezbojenja anilinske boje sa sirovim enzimskim preparatom lakaza	33
4.7.2. Istraživanje obezbojenja anilinske boje s djelomično pročišćenim enzimskim preparatom lakaza.....	34
4.7.3. Istraživanje obezbojenja anilinske boje s imobiliziranom sirovim enzimskim preparatom lakaza.....	36
5. ZAKLJUČCI	37
6. LITERATURA	39

Popis oznaka, kratica, i simbola

OZNAKE:

c množinska koncentracija tvari (mmol dm^{-3})

d promjer kivete (cm)

K_m Michaelisova konstanta (mmol dm^{-3})

n broj okretaja (min^{-1})

r_s brzina reakcije ($\text{dm}^3 \text{min}^{-1} \text{mmol}^{-1}$)

t vrijeme (h ili dani)

T temperatura ($^{\circ}\text{C}$)

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})

γ koncentracija proteina (mg dm^{-3})

KRATICE:

ABTS 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)

BSA goveđi serumski albumin

LiP lignin peroksidaza

MnP mangan peroksidaza

S.A. specifična aktivnost enzima (U mg^{-1})

SSF eng. solid-state fermentation ili fermentacija na čvrstim nosačima

U međunarodna jedinica enzimске aktivnosti ($\mu\text{mol min}^{-1}$)

V.A. volumna aktivnost enzima (U dm^{-3})

SIMBOLI:

λ valna duljina (nm)

ϵ ekstinkcijski koeficijent ($\text{dm}^3 \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

1. UVOD

Pljevica ječma je po kemijskom sastavu lignolitički materijal. Uglavnom se upotrebljava kao stočna hrana, ali zbog svog kemijskog sastava može se koristiti kao supstrat za uzgoj različitih filamentoznih gljiva u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima u svrhu proizvodnje enzima, kao što je primjerice lakaza. Nadalje, nakon biološke obrade materijala kao što je pljevica, oni se mogu upotrebljavati kao supstrati ili kosupstrati u proizvodnji bioplina.

Trametes versicolor je filamentozna gljiva koja pripada bazidiomicetama, tkz. gljivama bijelog truljenja i često se u znanstvenim istraživanjima koristi kao radni mikroorganizam za obradu lignoceluloznih materijala u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima u svrhu proizvodnje biogoriva, nutritivno obogaćene hrane ili nekih visokovrijednih produkata, kao što su npr. enzimi.

Cilj ovog rada bio je:

- a) Razviti proces proizvodnje lakaze tijekom uzgoja *Trametes versicolor* TV-6 na pljevici ječma
- b) Istražiti utjecaj dodatka različitih induktora (bakrov sulfat, samljevena i nesamljevena ljuska jajeta, otpad industrije papira) na aktivnost enzima
- c) Pročistiti i karakterizirati enzim
- d) Ispitati stabilnost enzima skladištenjem pri različitim temperaturama
- e) Ispitati mogućnost primjene slobodnog i imobiliziranog enzima u postupku obezbojenja tekstilne boje anilinskog tipa

2. TEORIJSKI DIO

2.1 Gljive bijelog truljenja

Lignin, celuloza i hemiceluloza pripadaju makromolekulama koje su sastavni dio biljaka. Ove makromolekule nisu jednakomjerno raspoređene u biljci, već se njihov sastav i kvantiteta razlikuje između pojedinih dijelova biljke. S ciljem proizvodnje fermentabilnih šećera i nekih drugih visokovrijednih produkta, potrebno ih je razgraditi.

U carstvo gljiva (5 taksonomskih skupina) pripadaju i gljive truležnice (bazidomicete i askomicete). Gljive su u prirodi vrlo rasprostranjeni organizmi, heterotrofi su, od kojih je velik broj saprofita. Građene su od dugih stanica hifa, koje se međusobno spajaju u micelij. Gljive bijelog truljenja, kao i gljive mekog i smeđeg truljenja, imaju sposobnost razgradnje lignocelulozne biomase (Duraković, 1996; Webster i Weber, 2007).

Ovisno o kemijskom sastavu supstrata na kojem rastu, gljive bijelog truljenja izlučuju izvanstanične enzime čije sinergističko djelovanje doprinosi razgradnji lignoceluloznih sastavnica supstrata (Hatakka, 1994).

Neke od poznatih gljiva bijelog truljenja su *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus* i *Trametes versicolor*. Ove gljive luče izvanstanične lignolitičke enzime od kojih su najbolje poznati lignin peroksidaza (LiP), mangan peroksidaza (MnP) i lakaza. Ovi enzimi kataliziraju razgradnju lignina (Malherbe i sur., 2002).

S obzirom na lignolitičke enzime koje proizvode, gljive bijelog truljenja mogu se podijeliti u 3 skupine (Hatakka, 1994):

- Gljive koje proizvode: LiP, MnP i lakazu
- Gljive koje proizvode: MnP i lakazu
- Gljive koje proizvode: LiP i lakazu

2.1.1. *Trametes versicolor*

Gljiva bijelog truljenja *Trametes (coriolus) versicolor*, još poznata i pod nazivom puranov rep, spada u koljeno bazidomicete. U prirodi je široko rasprostranjena. Pronalazimo je na površini raznih trulih i mrtvih stabala. Često je prisutna u više boja po čemu je i dobila ime: lat. *versicolor* - višebojan. Ima mogućnost razgrađivanja lignina, aromatskih ugljikovodika,

polikloriranih bifenila i nekih sintetskih bojila pomoću vlastitih enzima koje proizvodi (Webster i Weber, 2007).

Pri optimalnim uvjetima rasta proizvodi enzime koji mogu razgrađivati lignin (mangan peroksidaza, lignin peroksidaza, lakaza) i celulozu (celulaza) (Malherbe i Cloete, 2002).



(<https://www.first-nature.com/fungi/trametes-versicolor.php>, 11.10.2019.)

Slika 2.1. *Trametes versicolor*

2.2. Lakaze

Lakaza je samo jedan od izvanstaničnih enzima koje luči *Trametes versicolor*. Ovaj enzim pripada skupini polifenol oksidaza i u svom aktivnom centru sadrži ione bakra. Ovaj enzim prisutan je kod biljaka i gljiva, a neka istraživanja pokazuju i prisutnost kod bakterija, te insekata. Dok je u biljaka najpoznatiji utjecaj lakaze na sintezu lignina, kod gljiva ovaj enzim uz razgradnju lignina svoju funkcionalnu zadaću ima i kod rasta gljiva, interakcije gljiva sa biljkama i zaštite gljive u nepovoljnim uvjetima. Za razliku od lignin peroksidaze i mangan peroksidaze koji su kod gljiva bijelog truljenja ekstracelularni enzimi, lakazu nalazimo izvan, ali i unutar stanice. Unatoč tome, najveća količina lakaze nalazi se izvan stanice (98 %). Po strukturi, lakaze su monomerne proteinske jedinice, ali mogu postojati i u obliku identičnih duplih monomera. U svojoj strukturi sadrže više atoma bakra (Baldrian, 2006; Claus, 2004).

Lakaze se mogu primjenjivati u oksidaciji ksenobiotika, pesticida, heterocikličkih, aromatskih ugljikovodika, obezbojenju sintetskih boja, detoksifikaciji poljoprivrednih površina, i sl.

2.3. Pljevica ječma

Ječam (*Hordeum vulgare*) pripada grupi strnih žitarica koje rastu u klasu i mogu narasti prosječno od 60 - 100 cm. Rastom u klasu ječam poprima dvije forme, ozime i jare. Ječam nije osobito široko rasprostranjen u svijetu, u odnosu na druge žitarice, no ima velik značaj za proizvodnju stočne hrane, pivarskoj industriji i industriji proizvodnje žestokih alkoholnih pića (Hrgović, 2006).

Za prehranu ljudi koristi se na mjestima gdje teško uspijeva pšenica, a u odnosu na pšenicu ranije se sije i ranije dozrijeva što omogućuje sadnju i nekih drugih biljnih kultura na istoj površini tijekom godine. Za ljudsku prehranu ječam se mora oljuštiti, a od njega se prave proizvodi kao kaša, pahuljice ili brašno (Živković, 2015).

Ječam je građen od korijena, stabljike, listova i klasa, na kojem se nalazi plod. Plod sadrži plodnu i sjemenu ovojnicu, aleuronski sloj, endosperm i klicu, zlatno je žute boje. Prilikom prerade dolazi do odvajanja ploda i pljevice. Plod se dalje upotrebljava, a pljevica zaostaje te se smatra otpadom ili proizvodnim ostatkom. Na **Slici 2.3.** prikazani su klas ječma, plod i pljevica. U novije vrijeme zbog brige za zbrinjavanjem ili oporabom otpadnih materijala, nastoji se pronaći najbolji način za iskorištenje proizvodnih ostataka nakon uzgoja ječma (žetveni ostatci) ili nakon prerade u prehrambenoj industriji (pljevica).

Pljevica ječma može biti dobar supstrat za rast gljiva bijelog truljenja u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima i proizvodnju željenih produkata, kao što je primjerice enzim lakaza.



Slika 2.3. a) Klas ječma **b)** Plod ječma **c)** Pljevica ječma

2.4. Fermentacije na čvrstim nosačima

Fermentacije na čvrstim nosačima (eng. solid state fermentations) su procesi u kojima se najčešće koriste lignocelulozni materijali kao supstrati za rast mikroorganizama pri čemu sadrže mali udio slobodne vode. Da bi ovakav tip fermentacije bio uspješan i primjenjiv, prvo je potrebno odabrati odgovarajuće mikroorganizme i supstrat. Najbolji mikroorganizmi za fermentaciju na čvrstim nosačima su filamentozne gljive koje uključuju plijesni te različite bazidiomicete i askomicete.

Supstrati za fermentaciju moraju biti čvrsti i netopivi u vodi, gdje služe kao nosači, ali i izvor hranjivih tvari. Osim izbora supstrata, mnoštvo je faktora koji utječu na uspješnost fermentacije: veličina čestica, početna vlažnost, pH, prethodna sterilizacija supstrata, temperatura inkubacije, aeracija, starost i koncentracija inokuluma, dodatni izvori ugljika i dušika, mineralnih tvari te dodatak induktora (Pandey, 2003).

Kao supstrati najčešće su to šumski ili poljoprivredni otpadci, te proizvodni ostaci prehrambene industrije. Upravo zbog kemijske strukture ovih materijala, ovim tipom fermentacije moguće je uzgojiti gljive bijelog truljenja koje imaju sposobnost njihove razgradnje katalitičkim djelovanjem sintetiziranih enzima. Time gljive bijelog truljenja modificiraju željeni supstrat, tvore visokovrijedne produkte i „pripremaju“ materijal za daljnje postupke prerade (Tišma i sur., 2013).

U novije vrijeme zbog učestalijih istraživanja i boljeg shvaćanja pojedinih aspekata ovog tipa fermentacije, točnije prijenosa topline i tvari unutar samog procesa sve je veći interes za ovom tehnologijom. Istraživanja su usmjerena prema proizvodnji mnoštva različitih proizvoda kao što su enzimi, pigmenti, antibiotici, organske kiseline, bioinsekticidi i herbicidi, te proizvodnji obogaćene stočne hrane, hrane sa poboljšanim svojstvom probavljivosti, ali i samog uzgoja inokuluma nekih mikroorganizama (Pandey, 2003).

Fermentacije na čvrstim nosačima u bioreaktorima sastoje se od sljedećih procesnih koraka:

1. Priprava inokuluma
2. Priprava supstrata
3. Priprava bioreaktora
4. Inokulacija i punjenje bioreaktora

5. Rad bioreaktora (upravljanje parametrima i varijablama)
6. Pražnjene bioreaktora
7. Metode izdvajanja proizvoda (eng. Downstream procesi)
8. Rukovanje s otpadom (Mitchell i sur., 2006)

Princip pripreme supstrata sastoji se od nekoliko koraka. Supstrat se često reže, melje, trga te granulira kako bi se dobila željena veličina čestica. Često se vrši i dodavanje vode ili mineralnih tvari s ciljem postizanja optimalne vlažnosti materijala za rast željenom mikroorganizma. Također je važno napraviti prethodnu sterilizaciju ili pasterizaciju radi mogućih kontaminacija i rasta divljih mikroorganizama (Mitchell i sur., 2006).

Prije početka provedbe procesa u bioreaktorima, bioreaktor je nakon prethodnog rada potrebno očistiti i sterilizirati, nakon čega ide punjenje i inokulacija koju je moguće provesti unutar ili izvan bioreaktora prilikom čega je važno zadržavati aseptične uvjete okoline i bioreaktora kako bi se spriječio naknadni unos kontaminanata (Mitchell i sur., 2006).

Način rada bioreaktora ovisi o vrsti samog reaktora. Glavni cilj je stvaranje povoljnih i najekonomičnijih uvjeta za rast i razvoj željenog mikroorganizma na supstratu. Ovo se postiže pravilnim projektiranjem bioreaktora i manipuliranjem operacijskih varijabli i parametara kao što su brzina i temperatura aeracije, temperatura rashladne vode, temperatura i vlaga unutar biomase, brzina okretaja miješanja (ukoliko se provodi) i sl. (Mitchell i sur., 2006).

Prilikom pražnjena bioreaktora potrebno je ukloniti svu nastalu biomasu iz uređaja te je dobro provesti ispiranje i/ili sušenje unutar bioreaktora (Mitchell i sur., 2006).

Proizvodi se ovim tipom fermentacije odvajaju kao cijele krutine ili samo pojedinačni dijelovi koji se kasnije pročišćavaju i podvrgnuti su metodama pomoću kojih dobivamo željeni produkt.

U ovisnosti o samom tipu produkta, moguće ga je dobiti različitim metodama separacije (filtracija, centrifugiranje), razaranjem stanica (fizikalne, kemijske i biološke metode), metodama pročišćavanja (koncentriranje, ekstrakcija, ultrafiltracija, adsorpcija, taloženje), operacijama visokog stupnja razdvajanja (kristalizacija, kromatografija, elektroforeza), sušenje (konvekcijsko, kontaktno, sušenje raspršivanjem, liofilizacija) (Mitchell i sur., 2006).

U konačnici, nakon procesa fermentacije ostaju određene količine otpada. Cilj pravilnog rukovanja s otpadom je smanjiti količinu organskih spojeva koji se odbacuju u okoliš i postići što veću ekonomičnost procesa (Mitchell i sur., 2006.)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Zadatak

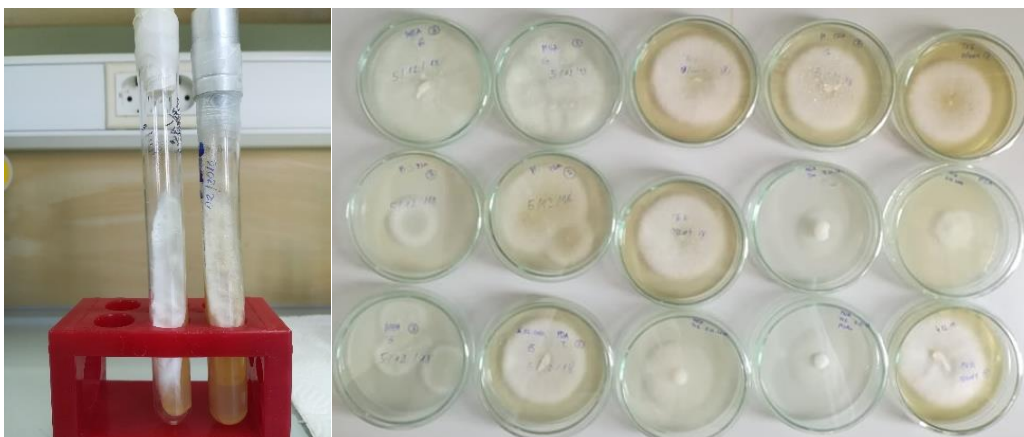
Cilj ovog diplomskog rada bio je:

- a) Proizvesti enzim lakazu iz gljive bijelog truljenja *Trametes versicolor* TV-6 fermentacijom na čvrstim nosačima u laboratorijskim teglicama na steriliziranom supstratu pljevice ječma, mjeriti aktivnost enzima tijekom rasta gljive u određenom vremenskom periodu te istražiti mogućnost proizvodnje enzima prilikom dodatka različitih induktora (bakrov sulfat, samljevena i nesamljevena ljuska jajeta, *Calplex H90* - otpad industrije papira).
- b) Djelomično pročistiti sirovi ekstrakt enzima
- c) Istražiti ovisnost aktivnosti enzima o T i pH te utjecaj dodataka različitih metala na aktivnost enzima
- d) Istražiti stabilnost enzimskog preparata skladištenjem pri različitim temperaturama tijekom 20 dana ($T = 4, 27, -20\text{ °C}$)
- e) Provesti katalitičku reakciju obezbojenja tekstilne boje anilinskog tipa sa sirovim i djelomično pročišćenim preparatom enzima lakaza

3.2 MATERIJALI I METODE

3.2.1. Mikroorganizam

U ovom radu korišten je soj mikroorganizma *Trametes versicolor* TV-6 MZKI, (Ljubljana, Slovenija) prikazan na **Slici 3.1.**



Slika 3.1. a) Zamrznute kulture *Trametes versicolor* TV-6 b) Kulture *Trametes versicolor* TV-6 na maltoza ekstrakt agaru i krumpirovom dekstroza agaru



Slika 3.2. *Trametes versicolor* TV-6 na pljevici ječma

3.2.2. Kemikalije

Korištene su sljedeće kemikalije: maltoza ekstrakt agar (Biolife, Viale Monza, Milan, Italija), krumpirov dekstroza agar (Biolife, Viale Monza, Milan, Italija), ledena octena kiselina, 99,5% (Macron fine chemicals Njemačka), etanol (Gram mol, Zagreb, Hrvatska), bakrov sulfat, 98+% (Acros organics, SAD), 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeva sol, fenilmetilsulfonil florid ($C_7H_7FO_2S$), kalcijev klorid dihidrat, (Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka), BSA otopina – goveđi serumski albumin, *Calplex – H90*, otpad iz industrije papira (10.3.2011.), glicin, amonijev sulfat (Acros Organics, New Jersey, SAD).

3.2.3. Aparatura

3.2.3.1. Spektrofotometar

Za mjerenje koncentracije proteina i aktivnosti lakaze korišten je spektrofotometar (SHIMADZU UV 1280) (**Slika 3.3.**)



Slika 3.3. Spektrofotometar

3.2.3.2. Tresilica

Ekstrakcija enzima provedena je na tresilici (Julabo SW22) (**Slika 3.4.**)



Slika 3.4. Tresilica

3.2.3.3. Autoklav

Sterilizacija korištenog laboratorijskog posuđa, pribora i potrebnih otopina, provedena je u autoklavu (TIP 7510945, Sutjeska, Beograd) (**Slika 3.5.**)



Slika 3.5. Autoklav

3.2.3.4. Centrifuge s hlađenjem

Nakon ekstrakcije, uzorci su centrifugirani na centrifugi (Hermle Z 326 K) (Slika 3.6.), a dobiveni tekući ostatak korišten je za mjerenje volumne aktivnosti enzima koristeći spektrofotometar. Za taloženje enzima prilikom metoda pročišćavanja i uklanjanje suspendiranih tvari kod otopine tekstilnih boja, korištena je centrifuga Hettich UNIVERSAL 320 R.



Slika 3.6. Centrifuge

3.2.3.5. pH-metar

Mjerenje pH prilikom priprema otopina zadanih pH vrijednosti u svrhu istraživanja ovisnosti aktivnosti enzima o pH provedeno je pomoću pH metra (Iskra MA 7740) (Slika 3.7.).



Slika 3.7. pH metar

3.2.3.7. Inkubatori

Za uzgoj *Trametes versicolor* TV-6 na prethodno steriliziranom i pripremljenom supstratu u svrhu proizvodnje enzima lakaze korišten su inkubatori (Binder, Tuttlingen, Njemačka) (Slika 3.10.).



Slika 3.10. Inkubator

3.2.3.9. Laboratorijski mlin

Laboratorijski mlin (ZM 200) Slika 3.12 korišten je za usitnjavanje ljuske jajeta kao induktora.



Slika 3.12. Laboratorijski mlin ZM 200

3.2.4. Uzgoj i čuvanje kulture

U 500 cm³ redestilirane vode suspendirano je 20 g krumpirovog agara (Biolife Italiana Sr. L. Viale Monza, Milan, Italija), zagrijano je do vrenja i lagano miješano staklenim štapićem radi postizanja potpune homogenosti. Nakon toga podloga je sterilizirana u autoklavu na $T = 121$ °C tijekom 15 min. Podloga je zatim ohlađena i prenesena u prethodno sterilizirane Petrijeve zdjelice. Na krutu podlogu u aseptičnim uvjetima naciepljen je radni mikroorganizam. Inkubacija je trajala 7 dana na $T = 27$ °C u laboratorijskom inkubatoru.

3.2.5. Priprema inokuluma

Epruvete sa 10 cm³ vode sterilizirane su u autoklavu na $T = 121$ °C tijekom 15 min. U aseptičnim uvjetima izuzeti su plagovi od 5 mm s podloge krumpirovog agara s prethodno uzgojenim mikroorganizmom. Pet plagova preneseno je u sterilizirane i prethodno ohlađene epruvete, te promiješano na vortexu.

3.2.6. Proizvodnja lakaze

Provedena su dva tipa pokusa, s i bez dodatka induktora. U pokusu bez dodatka induktora, u teglicu je odvagano 50 g pljevice ječma i dodano je 60 cm³ vode, nakon čega je ovako pripremljena hranjiva podloga sterilizirana. Nakon sterilizacije, hranjiva podloga je ohlađena i inokulirana s 10 cm³ suspenzije spora *Trametes versicolor* TV-6, kako je opisano u prethodnom poglavlju. Rast mikroorganizma i sinteza enzima provedena je u inkubatorima pri $T = 27$ °C tijekom 10 dana.

U pokusu s dodatkom induktora (bakrov sulfat, samljevena i nesamljevena ljuska jajeta, *Calplex H90* - otpad industrije papira) u teglicu je odvagano 45 g pljevice ječma, dodano je 5 g induktora i 60 cm³ destilirane vode, nakon čega je ovako pripremljena hranjiva podloga sterilizirana. Nakon sterilizacije, hranjiva podloga je ohlađena i inokulirana s 10 cm³ suspenzije spora *Trametes versicolor* TV-6, kako je opisano u prethodnom poglavlju. Rast mikroorganizma i sinteza enzima proveden je u inkubatorima pri $T = 27$ °C tijekom 10 dana.

Svaki pokus trajao je ukupno 10 dana i svakog dana izuzete su po dvije teglice prethodno naciepljene sa *Trametes versicolor* TV-6, a sadržaj svake dobro je promiješan te je iz obe teglice izuzeto po 1 g uzorka za mjerenje aktivnosti enzima lakaze i približno 3 g za ispitivanje postotka vlage u uzorku. Ekstrakcija je provedena na način da je 1 g uzorka ekstrahiran u 10 cm³

destilirane vode u trajanju od 30 min na tresilici pri 150 okr min^{-1} , pri $T = 27\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nakon toga uzorak je stavljen na centrifugu (10000 rcf, 10 min), a aktivnost lakaze mjerena je iz dobivenog supernatanta.



Slika 3.14. Uzgoj *Trametes versicolor* TV-6 na pljevici ječma u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima s ciljem proizvodnje lakaze ($T = 27\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 10$ dana)

3.2.7. Pročišćavanje sirovog enzima amonijevim solima i dijalizom

Taloženje proteina provedeno je s amonijevim sulfatom koji je dodan u uzorak, uslijed čega je došlo do taloženja lakaze. Prije postupka taloženja dodano je 0,0174 g fenilmetilsulfonil florida (PMSF) koncentracije 1 mmol dm^{-3} kako bi se spriječila potencijalna degradacija proteina proteazama. Taloženje se vrši na magnetnoj miješalici u posudi s ledom. U otopinu proteina (približno 100 cm^3) dodaje se polako, u obrocima amonijev sulfat u koncentracijama 75% u odnosu na koncentraciju zasićenja koja iznosi $514,72\text{ g dm}^{-3}$. Nakon toga se dobivena suspenzija centrifugira 20 min na 14000 rpm i $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Talog se otapa u demineraliziranoj vodi za daljnje korištenje. Koncentracija proteina i aktivnost enzima mjereni su u supernatantu i talogu.

Dijaliza je provedena uz pomoć crijeva za dijalizu koje se reže s obzirom na visinu posude u kojoj se dijaliza vrši, volumenu dobivenog uzorka i natapanja u vodi. Nakon toga jedan kraj crijeva vezan je u čvor te se provjerava da na crijevu nema oštećenja. Uzorak se odpipetira u crijevo, odozgo se zaveže drugi čvor i crijevo se uroni u posudu s prethodno napunjenom redestiliranom vodom. U posudu se stavlja magnet te se dijaliza provodi 24 h na magnetskoj miješalici uz lagano miješanje. Posuda u kojoj se vrši dijaliza je termostatirana na temperaturi od $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nakon 24 h crijevo se vadi iz prve posude i stavlja u drugu te se postupak ponavlja i odvija još 24 h.

3.2.8. Imobilizacija enzima

Prethodno pripremljen tekući alginat pomješan je s 5 cm³ djelomično pročišćenog i sirovog enzima. Otopina tekućeg alginata i enzima kapaljkom je dodavana u čašu s destiliranom vodom prilikom čega se u vodi skrućivala. Već nakon nekoliko minuta bile su vidljive čvrste kuglice alginata sa imobiliziranim enzimom lakaza (**Slika 3.14.**)



Slika 3.14. Kapsule alginata s imobiliziranim enzimom lakaza

3.2.9. Obezbojenje tekstilnih boja

Mogućnost primjene proizvedenog enzima za obezbojenje boja testirana je u šaržnim pokusima obezbojenja anilinskog tipa bojila, ljubačaste boje. Provedeni su sljedeći pokusi:

- a) Šaržni pokus obezbojenja anilinske boje sirovim enzimskim preparatom
- b) Šaržni pokus obezbojenja anilinske boje s djelomično pročišćenim enzimskim preparatom
- c) Šaržni pokus obezbojenja anilinske boje s imobiliziranim sirovim enzimskim preparatom

Sva tri pokusa provedena su pri tri različita uvjeta:

- a) otapalo: voda, $T = 25^{\circ}\text{C}$
- b) otapalo: glicin-HCl pufer, pH 4, $T = 25^{\circ}\text{C}$
- c) otapalo: glicin-HCl pufer, pH 4, $T = 55^{\circ}\text{C}$

Početna koncentracija bojila bila je u svim pokusima ista: $0,75 \text{ g cm}^{-3}$.

U svakom pokusu je mjerena apsorbancija pri 545 nm i aktivnost enzima. Radi usporedbe, provedeni su i pokusi bez dodatka enzima (slijepe probe).

3.3. ANALITIČKE METODE

3.3.1. Mjerenje aktivnosti enzima lakaze

Aktivnost lakaze mjerena je spektrofotometrijski pri $\lambda = 420 \text{ nm}$ i $T = 25 \text{ °C}$ u kvarcnoj kiveti volumena 1 cm^3 uz korišten ABTS kao supstrat.

Otopina ABTS-a ($c = 3 \text{ mmol dm}^{-3}$) je pripravljena otapanjem u glicin-HCl puferu ($\text{pH} = 4,5$) i čuvana je u tikvici obloženoj aluminijskom folijom, u hladnjaku pri $T = 4 \text{ °C}$. Otopina ABTS-a je termostatirana pri $T = 25 \text{ °C}$ minimalno pet minuta prije početka mjerenja aktivnosti. Iz dobivenih vrijednosti promjene apsorbancije u vremenu, izračunata je volumna aktivnost enzima lakaze prema jednadžbi:

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

gdje su V_r ukupni volumen uzorka u kiveti (cm^3), V_E volumen dodanog uzorka koji sadrži enzim (cm^3), ε ekstinkcijski koeficijent ($\varepsilon_{420} = 0,036 \text{ dm}^3 \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), d promjer kivete ($d = 1 \text{ cm}$), $\Delta A/\Delta t$ 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 $1 \mu\text{mol}$ supstrata u minuti (Tišma, 2010).

Specifična aktivnost enzima izračunata je prema jednadžbi:

$$S. A. = \frac{V. A.}{\gamma_E}$$

gdje su S.A. specifična aktivnost enzima (U mg^{-1}), V.A. volumna aktivnost enzima (U dm^{-3}) i γ_E masena koncentracija enzima (mg dm^{-3}) koja je izmjerena prema metodi opisanoj u **poglavlju**

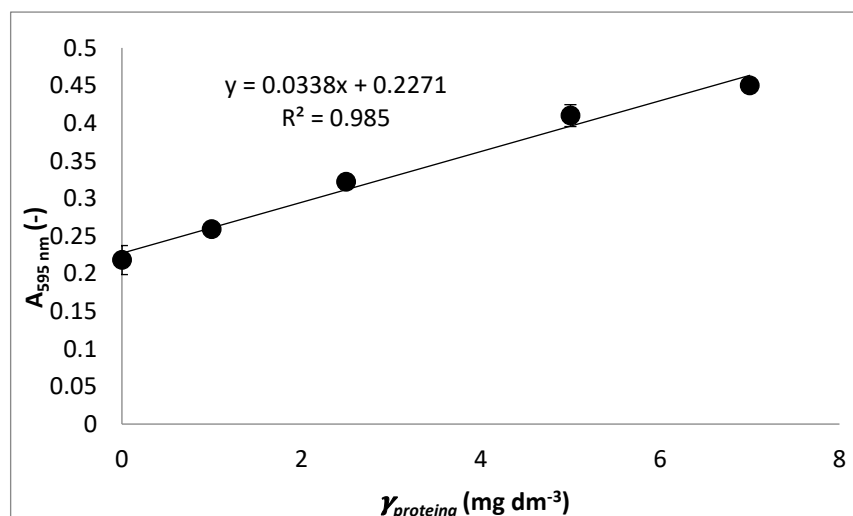
3.3.2.

3.3.2. Određivanje koncentracije proteina Bradfordičinom metodom

Mjerenje koncentracije enzima provedeno je prema Bradfordičinih metodi. Ova metoda se bazira na nespecifičnom vezanju anionskog oblika boje Coomassie Brilliant Blue G-250 za bazične i aromatske bočne ogranke proteina, pri čemu dolazi do stvaranja kompleksa proteina i boje. Kompleks u kiselom mediju ima apsorpcijski maksimum na valnoj duljini od 595 nm (Strelec, 2013).

Pripremljene su otopine BSA u koncentracijama od 0, 0,5, 1, 5 i 7 mg dm⁻³ na način da se u plastične kivete volumena 1 cm³ prvo dodaje 0,2 cm³ Bradfordičinog reagensa, a nakon toga dodaje se 0,8 cm³ BSA otopine pripremljenih koncentracija. Od vremena dodavanja BSA u kivete s Bradfordičinim reagensom počinje se mjeriti vrijeme te se nakon točno 5 min mjeri apsorbanacija na valnoj duljini od 595 nm. Iz dobivenih apsorbanacija i poznatih koncentracija u svakoj kiveti izrađuje se krivulja ovisnosti vrijednosti apsorbanacije o koncentraciji BSA.

Koncentracije proteina u svim uzorcima bile su izmjerene na način da je u plastične kivete volumena 1 cm³ odpipetirano 0,2 cm³ Bradfordičinog reagensa te dodano 0,8 cm³ enzima. Kivete su potom termostetirane 5 minuta na sobnoj temperaturi i nakon toga je izmjerena apsorbanacija na valnoj duljini od 595 nm. Svaki uzorak analiziran je u tri ponavljanja, a rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri mjerenja. Koncentracija proteina izračunata je iz kalibracijske krivulje (**Slika 3.15.**). Izračunate koncentracije proteina korištene su za izračun specifične aktivnosti enzima.



Slika 3.15. Kalibracijska krivulja za određivanje koncentracije proteina

3.3.3 Ispitivanje stabilnosti enzima prilikom skladištenja pri različitim temperaturama

Proizvedeni enzimski ekstrakti skladišteni su pri tri različite temperature ($T = 25\text{ °C}$, 4 °C i -20 °C) tijekom 20 dana. Aktivnost enzima mjerena je svaka 24 h.

3.3.4. Karakterizacija enzima

Ispitan je utjecaj pH, temperature, te dodatak različitih metala na aktivnost sirovog i djelomično pročišćene lakaze koristeći ABTS kao supstrat.

Istraživanje utjecaja pH na aktivnost enzima

S ciljem istraživanja utjecaja pH na aktivnosti enzima pripremljeni su puferi različitih pH vrijednosti, u rasponu od 2,5 do 6. U kvarcnu kivetu volumena od 1 cm^3 stavljeno je $0,9\text{ cm}^3$ prethodno pripremljene $3,2\text{ mol dm}^{-3}$ otopine ABTS-a u pripremljenom glicin-HCl puferu određene pH vrijednosti te je dodano $0,1\text{ cm}^3$ enzima, promiješano i stavljeno u spektrofotometar. Promjena apsorbancije u vremenu mjerena je pri valnoj duljini od 420 nm . Za svaki pH analizirana su tri uzorka. Iz dobivenih vrijednosti dA/dt , izračunate su volumna aktivnost enzima te rezidualna aktivnost enzima.

Ispitivanje utjecaja temperature na aktivnost enzima

Ispitivanje utjecaja temperature na aktivnost enzima provedeno je na način da je otopina ABTS-a u glicin-HCl puferu ($\text{pH} = 4,5$) bila termostatorana pri različitim temperaturama od 25 °C do 90 °C prije dodatka enzima. U kvarcnu kivetu volumena od 1 cm^3 , dodano je $0,9\text{ cm}^3$ otopine ABTS-a, a nakon termostatoranja, dodano je $0,1\text{ cm}^3$ enzima. Reakcijska smjesa je promiješana i spektrofotometrijski pri 420 nm mjerena je dA/dt . Provedena su tri mjerenja za svaku ispitanu temperaturu, a iz dobivenih vrijednosti dA/dt , izračunate su volumna aktivnost enzima te rezidualna aktivnost enzima.

Ispitivanje utjecaja dodatka različitih metala na aktivnost enzima

Postupak ispitivanja utjecaja metala na aktivnost enzima napravljen je tako da je kod svake od osam različitih soli metala odvagano po $0,1\text{ g}$, otopljeno u destiliranoj vodi volumena 10 cm^3 i snažno pomiješano u vortex miješalici. U eppendorf plastične kivete (volumena $1,5\text{ cm}^3$) je

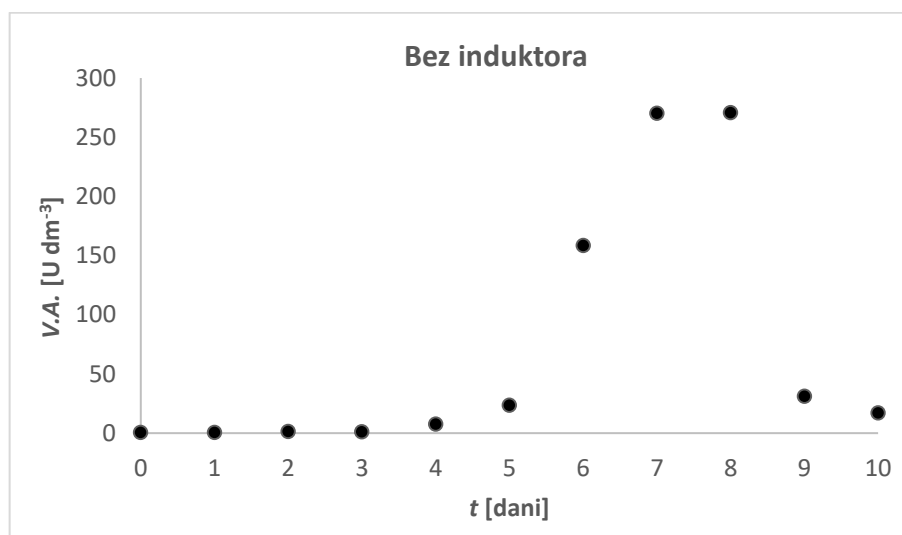
pipetiran uzorak sirovog i djelomično pročišćenog enzimskog preparata volumena 1 cm^3 te je potom dodano 0.5 cm^3 prethodno pripremljenih otopina metala. Nakon toga uzorci su stavljeni na tresilicu (300 okr min^{-1} , 30 min). Nakon 30 min u kvarcne kivete od 1 cm^3 dodano je 0.9 cm^3 otopine ABTS-a koncentracije 0.2 mol dm^{-3} i 0.1 cm^3 enzima s metalom. Iz dobivenih vrijednosti dA/dt , izračunate su volumna aktivnost enzima te rezidualna aktivnost enzima.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Proizvodnja lakaze uzgojem *T. versicolor* TV-6 na pljevici ječma u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima

Proizvodna enzima lakaze iz gljive bijelog truljenja *Trametes versicolor* TV-6 provedena je u laboratorijskim teglicama koristeći pljevicu ječma kao supstrat. Provedeni pokusi u trajanju od 10 dana razlikovali su se u tome što je prvi pokus proveden bez dodatka induktora, a ostali su provedeni s dodatkom različitih induktora u svrhu istraživanja utjecaja induktora na sintezu željenog enzima. Svi eksperimenti su provedeni u dvije paralelne probe, a grafički su prikazani rezultati srednjih vrijednosti. Svi pokusi odvijali su se u identičnim procesnim uvjetima gdje su masa supstrata, prisutnost vode, koncentracija inokuluma (broj plagova i veličina plagova) temperatura, vrijeme i aeracija bili jednaki.

Rezultati volumne aktivnosti lakaze tijekom uzgoja *Trametes versicolor* TV-6 na pljevici ječma bez dodatka induktora prikazani su na **Slici 4.1**.

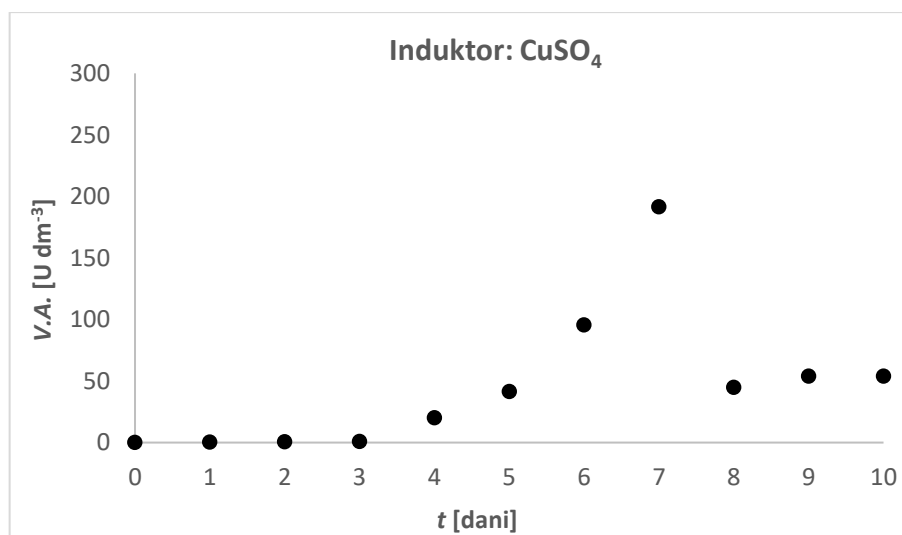


Slika 4.1. Volumna aktivnost enzima lakaza u pokusu bez dodatka induktora (laboratorijske teglice, $T = 27^{\circ}\text{C}$, $t = 10$ d)

Iz dobivenih rezultata prikazanih na **Slici 4.1**. vidljivo da su najveće volumne aktivnosti lakaze postignute nakon sedmog i osmog dana fermentacije ($V.A. = 270,93 \text{ U dm}^{-3}$).

4.2. Proizvodnja lakaze uzgojem *T. versicolor* TV-6 na pljevici ječma u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima s dodatkom bakrovog sulfata

U drugom pokusu istraživao je utjecaj dodatka otopine bakrovog sulfata koncentracije 0,1 mmol dm⁻³ na aktivnost lakaze.

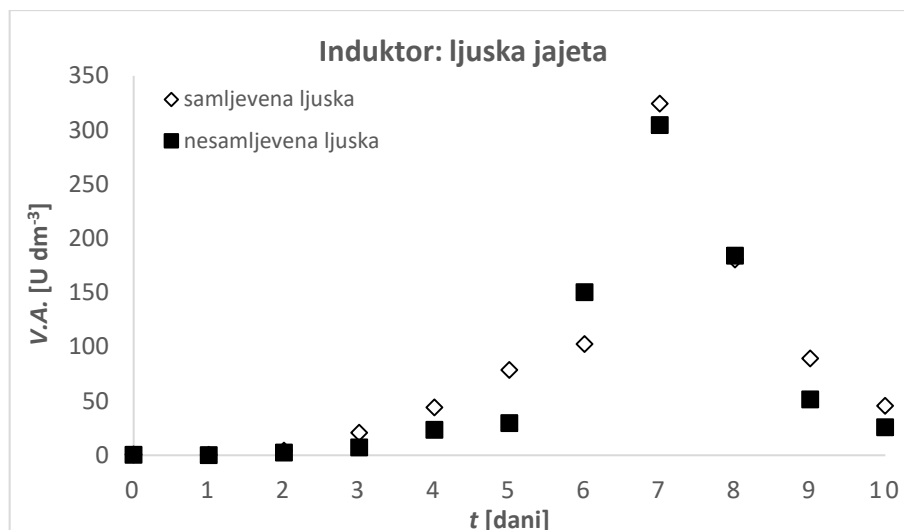


Slika 4.2. Volumna aktivnost enzima lakaza uz dodatak otopine bakrova sulfata (laboratorijske teglice, $T = 27^{\circ}\text{C}$, $t = 10 \text{ d}$, $c_{\text{induktora}} = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$)

Iz rezultata prikazanih na **Slici 4.2.** vidljivo je da je sedmi dan pokusa postignuta najveća volumna aktivnost lakaze u iznosu od 191,58 U dm⁻³. Ova volumna aktivnost je za 29.28 % niža od volumne aktivnosti lakaze u pokusu bez induktora te se može zaključiti da dodatak bakrovog supstrata u koncentraciji od 0,1 mol dm⁻³ nije djelovao inducibilno na sintezu lakaze.

4.3. Proizvodnja lakaze uzgojem *T. versicolor* TV-6 na pljevici ječma u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima s dodatkom ljuske jajeta

U trećem pokusu su kao induktor korištene samljevene (veličina čestica 1 mm) i nesamljevene tj. grubo usitnjene (veličina čestice oko 5 mm) ljuske kokošjeg jajeta kako bi se istražio njihov utjecaj na aktivnost lakaze.

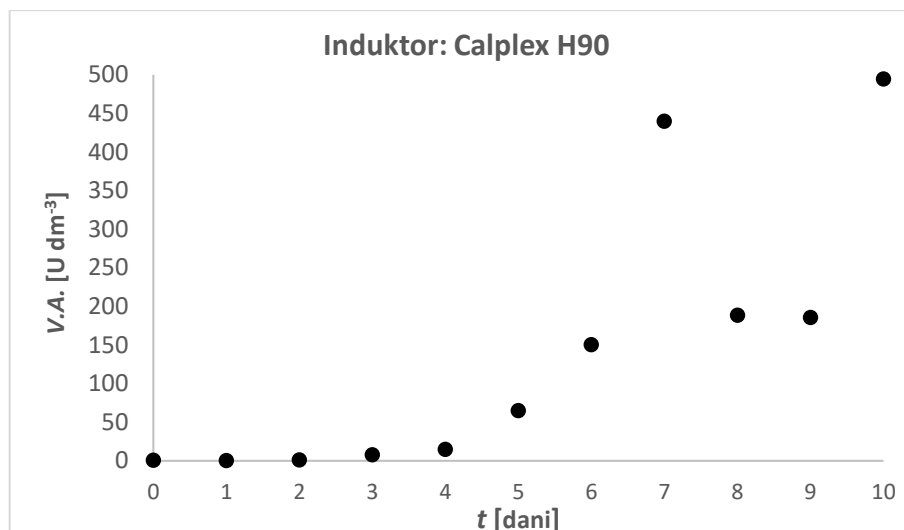


Slika 4.3. Volumna aktivnost enzima lakaze uz dodatak samljevane i nesamljevane ljuske jajeta (laboratorijske teglice, $T = 27^{\circ}\text{C}$, $t = 10 \text{ d}$, $m_{\text{induktora}} = 5 \text{ g}$)

Iz rezultata prikazanih na **Slici 4.3.** vidljivo je da su najveće aktivnosti lakaze postignute sedmi dan i iznose $324,48 \text{ U dm}^{-3}$ u pokusu u kojem je korištena sitno samljevana ljuska jajeta, te $304,42 \text{ U dm}^{-3}$ u pokusu u kojem je korištena ljuska jajeta veće veličine čestica 5 mm. U oba slučaja aktivnosti enzima su bile veće u odnosu na pokus bez dodatka induktora te se može zaključiti da je ljuska jajeta djelovala inducibilno na sintezu enzima.

4.4. Proizvodnja lakaze uzgojem *T. versicolor* na pljevici ječma u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima s dodatkom otpada porijeklom iz industrije papira

U sljedećem pokusu korišten je *Calplex H90* - otpad iz industrije papira kao potencijalni induktor sinteze lakaze.



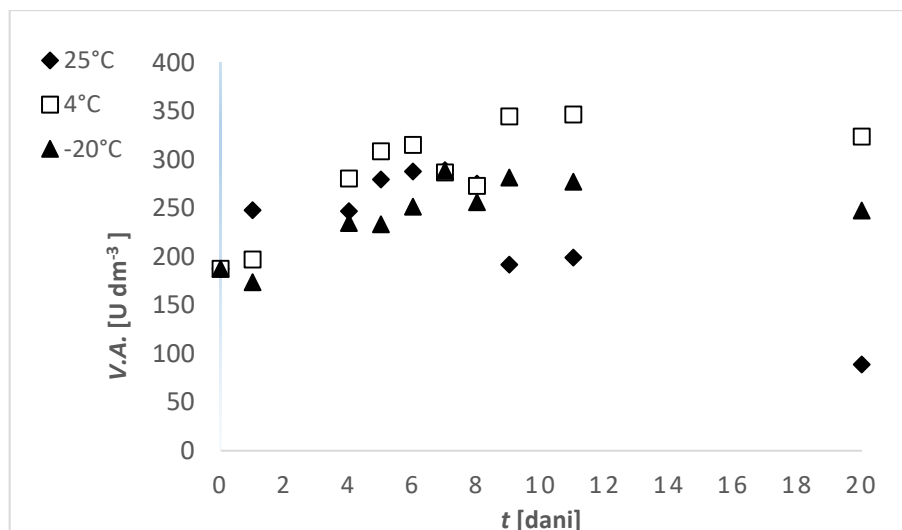
Slika 4.4. Volumna aktivnost enzima lakaza uz dodatak *Calplex-a* H90 - otpada iz industrije papira (laboratorijske teglice $T = 27^{\circ}\text{C}$, $t = 10$ d, $m_{\text{induktora}} = 5$ g)

Iz dobivenih rezultata prikazanih na **Slici 4.4** vidljivo je da je najveća aktivnost lakaze postignuta deseti dan ($V.A. = 494,76 \text{ U dm}^{-3}$). Iz rezultata je također vidljivo da je nakon sedmog dana trajanja pokusa aktivnost lakaze bila $440,04 \text{ U dm}^{-3}$. Osmi i deveti dan trajanja fermentacije aktivnost lakaze je bila niža, no deseti dan je opet porasla. Ovi rezultati najvjerojatnije su posljedica heterogenosti sustava. U ovom pokusu reološka svojstva hranjive podloge su bila drukčija od svih ostalih pokusa, prvenstveno zbog viskozne otopine pripremljenog induktora. Aktivnost lakaze u ovom pokusu u odnosu na pokus proveden bez dodatka induktora veća je za 75,24 % što je ujedno i najveća postignuta aktivnost među svim provedenim pokusima.

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je *Calplex H90* najbolji induktor sinteze lakaze od svih ispitanih induktora u ovom istraživanju.

4.5. Stabilnost enzima tijekom skladištenja pri različitim temperaturama

Rezultati aktivnosti sirovog enzimskog preparata tijekom 20 dana skladištenja pri tri različite temperature prikazani su na Slici 4.5.



Slika 4.5. Volumna aktivnost enzima lakaza tijekom 20 dana skladištenja pri različitim temperaturama

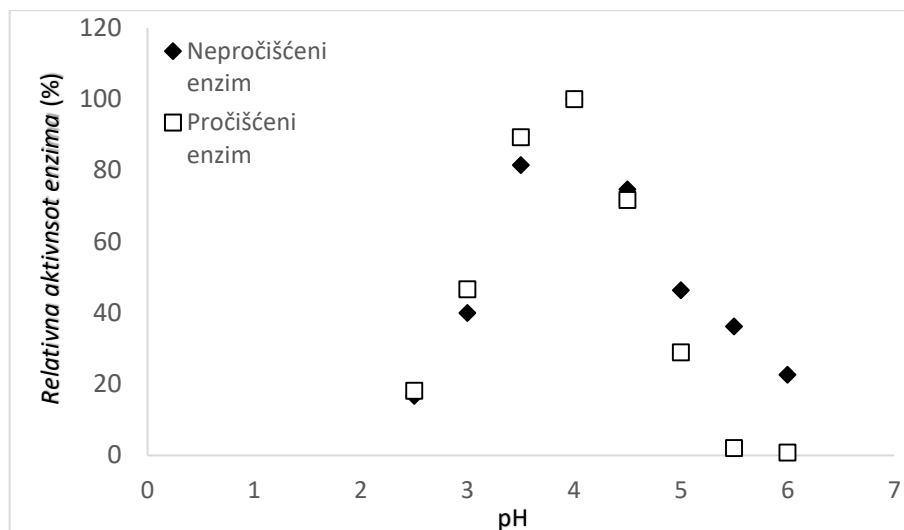
Iz rezultata prikazanih na **Slici 4.5.** vidljivo je da enzim ne gubi svoju aktivnost tijekom 11 dana skladištenja pri sve tri ispitane temperature. Dapače, uočen je porast aktivnosti tijekom skladištenja uzoraka pri 4 i -20°C. Nakon 20 dana skladištenja, uzorak skladišten pri 25 °C izgubio je 67,99 % svoje aktivnosti, dok se može zaključiti da ostale dvije temperature skladištenja nisu imale utjecaj na gubitak enzimske aktivnosti.

4.6. Karakterizacija enzima

S ciljem karakterizacije enzima, provedena su istraživanja utjecaja pH, temperature te dodataka različitih metala na aktivnost enzima.

4.6.1. Utjecaj pH na aktivnost enzima lakaza

Rezultati utjecaja pH na aktivnost djelomično pročišćenog i sirovog enzima prikazani su na **Slici 4.6.**

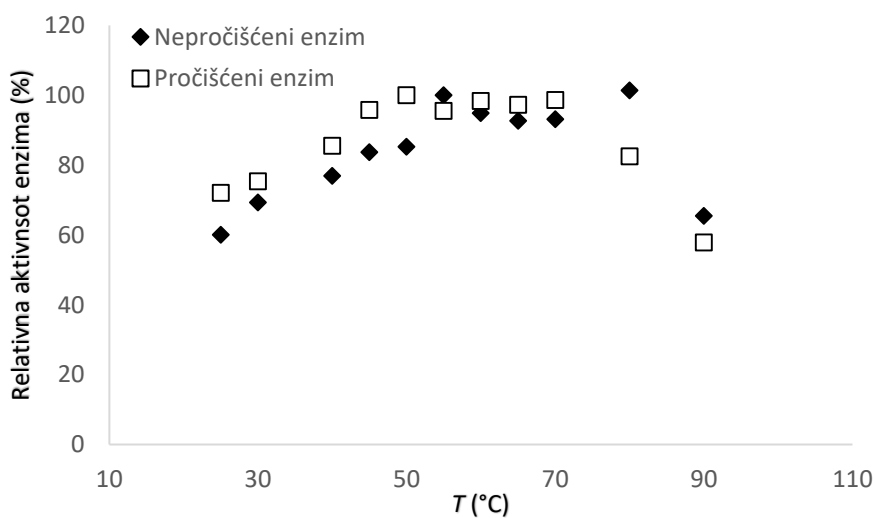


Slika 4.6. Utjecaj pH na aktivnost enzima

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da je maksimalna aktivnost enzima postinuta pri pH 4 s oba enzima, pročišćenim i nepročišćenim.

4.6.2. Utjecaj temperature na aktivnost enzima lakaza

Rezultati utjecaja temperature na aktivnost djelomično pročišćenog i sirovog enzima prikazani su na **Slici 4.7.**

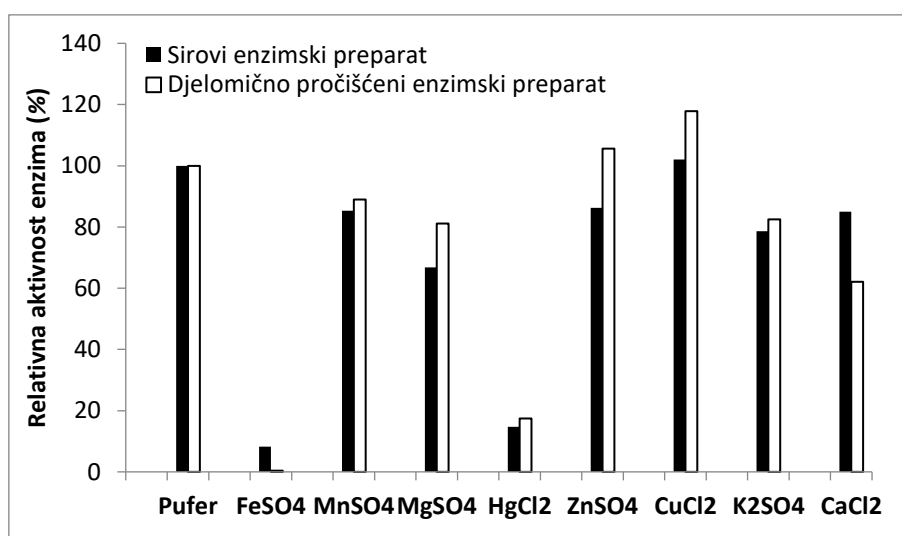


Slika 4.7. Utjecaj temperature na aktivnost enzima

Iz dobivenih rezultata, može se zaključiti da je najveća aktivnost djelomično pročišćenog enzimskog preparata postignuta pri $T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, a sirovog pri $T = 55\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.6.3. Utjecaj metala na enzim lakaza

Metali mogu inhibirati enzim na način da mijenjaju strukturu enzima ili da tvore metal-protein kompleks (Assche i Clusters, 1989). U ovom pokusu istraživan je utjecaj različitih soli na aktivnost sirovog i djelomično pročišćenog enzimskog preparata .

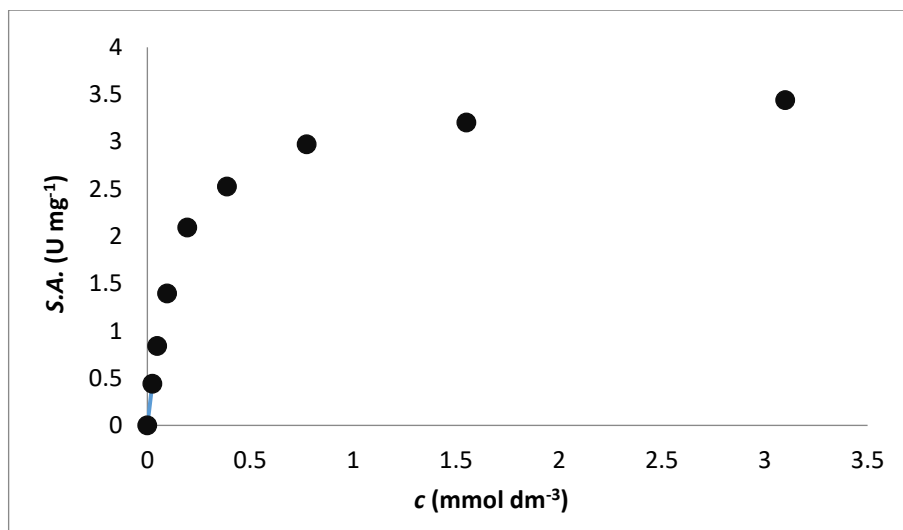


Slika 4.8. Relativna aktivnost sirovog i djelomično pročišćenog enzimskog preparata lakaza u pokusima s dodanim solima ($T = 27\text{ }^{\circ}\text{C}$)

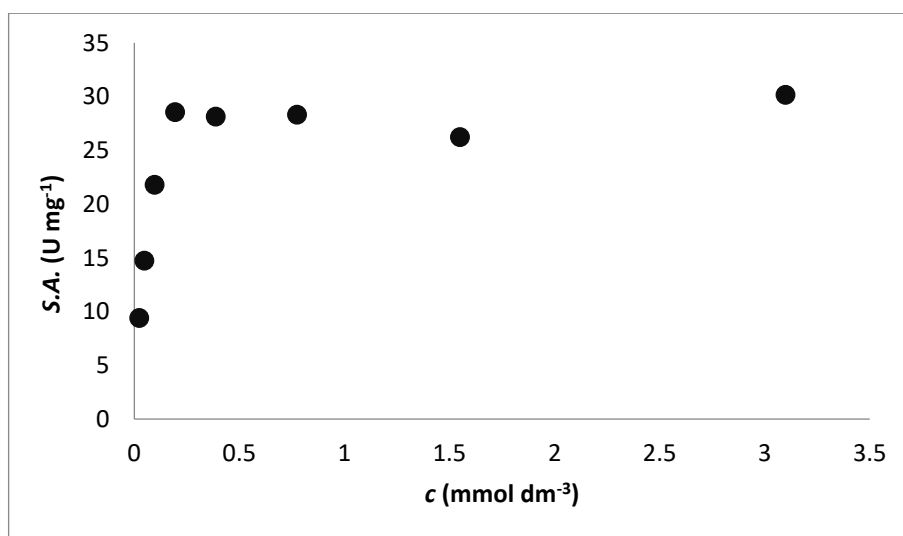
Iz dobivenih rezultata prikazanih na **Slici 4.8.** vidljivo je da FeSO₄ i HgCl₂ najviše inhibiraju enzim. Također, pokazano je da na gubitak njegove aktivnosti utječe i dodatak MgSO₄, K₂SO₄ i CaCl₂, a dodatak ZnSO₄ i CuCl₂ utječe na porast aktivnosti djelomično pročišćenog enzimskog pripravka.

4.6.4. Kinetika enzima lakaza

Rezultati ovisnosti specifične aktivnosti enzima o koncentraciji ABTS-a prikazani su na **Slici 4.9** (sirovi enzimski preparat) i **Slici 4.10** (djelomično pročišćeni enzimski preparat).

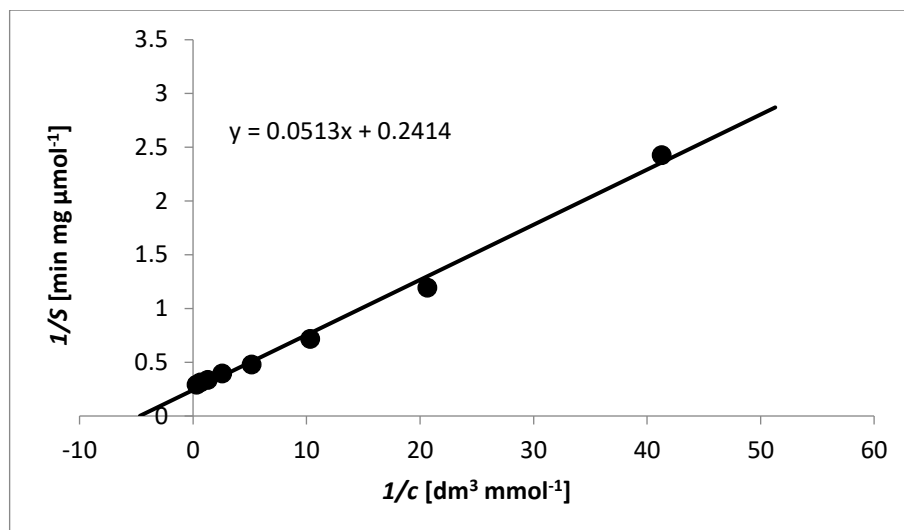


Slika 4.9. Ovisnost specifične aktivnosti sirovog enzimskog preparata o koncentraciji ABTS-a ($T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 4,5$)

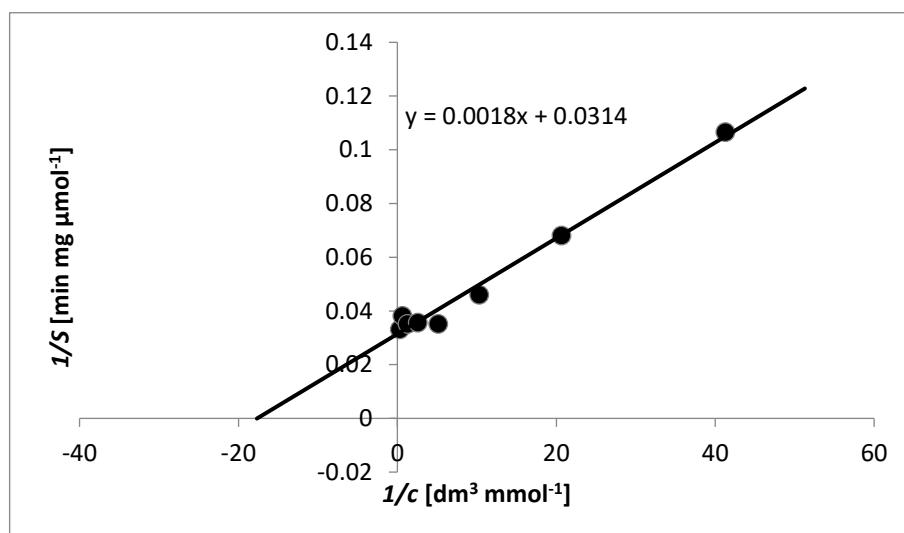


Slika 4.10. Ovisnost specifične aktivnosti djelomično pročišćenog enzimskog preparata o koncentraciji ABTS-a ($T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 4,5$)

Lineariziranim oblikom Michaelis-Menteničinog kinetičkog modela dobivaju se rezultati prikazani na **Slici 4.11.** (sirovi enzinski preparat) i **Slici 4.12** (djelomično pročišćeni enzinski preparat).



Slika 4.11. Linearizirani oblik Michaelis-Menteničine kinetike (Lineweaver-Burkov pravac). Pokus proveden sa sirovim enzimskim preparatom lakaze



Slika 4.12. Linearizirani oblik Michaelis-Menteničine kinetike (Lineweaver-Burkov pravac). Pokus proveden sa djelomično pročišćenim enzimskim preparatom lakaze

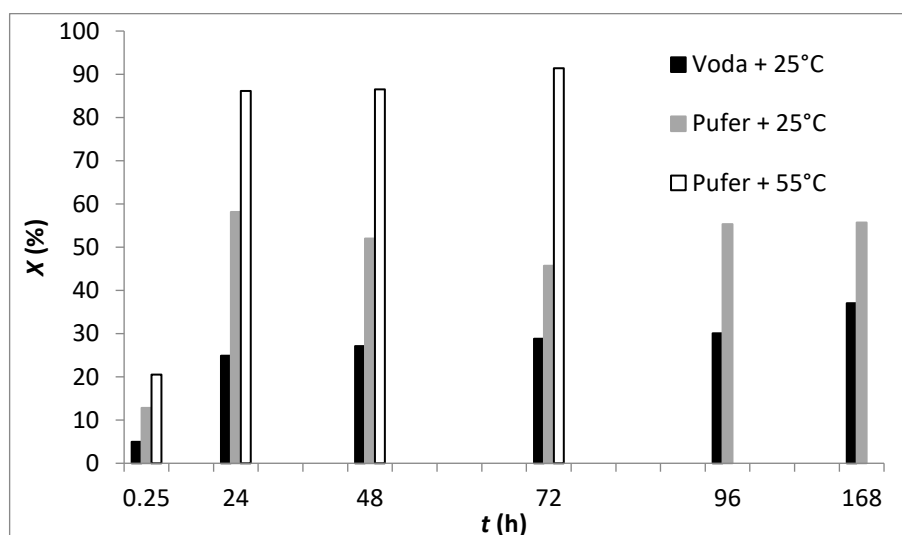
Iz rezultata prikazanih na **Slici 4.11.** i **Slici 4.12.** izračunate su maksimalne brzine reakcije V_m , koje za sirovi enzim iznose $4,14 \text{ U mg}^{-1}$, a za djelomično pročišćeni $31,85 \text{ U mg}^{-1}$. Procijenjena vrijednost Michaelis-Menteničine konstante K_m za sirovi enzimski preparat iznosi $0,213 \text{ mmol dm}^{-3}$, a za djelomično pročišćeni $0,057 \text{ mmol dm}^{-3}$

4.7. Obezbojenje anilinske boje enzimom lakaza

U sljedećim pokusima istraživano je obezbojenje anilinske boje s enzimom lakaza pri različitim procesnim uvjetima.

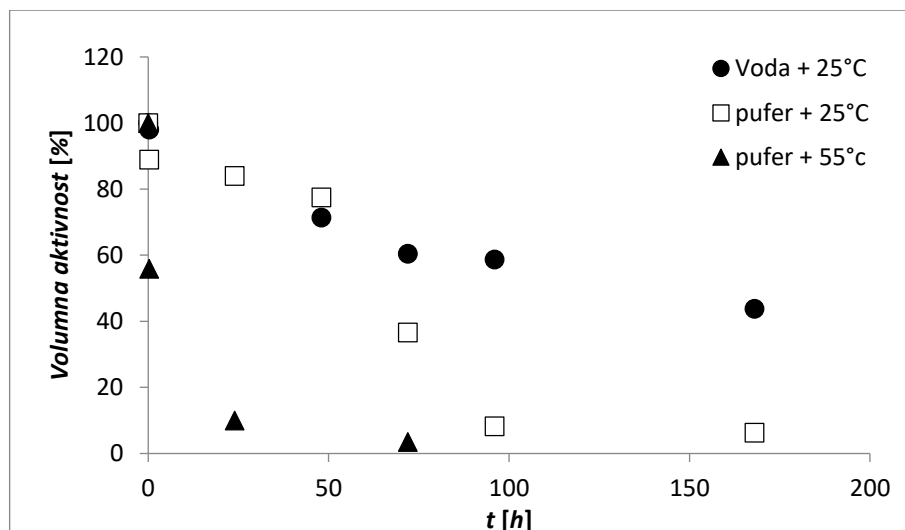
4.7.1. Istraživanje obezbojenja anilinske boje sa sirovim enzimskim preparatom lakaza

Istraživanje procesa obezbojenja sa sirovim enzimskim preapratom provedeno je šaržno, u kotlastom reaktoru s mješalom, na tri načina. Prva dva pokusa provedena su pri sobnoj temperaturu, ali je u prvom boja bila otopljena u vodi, a u drugom u puferu pri pH 4. U trećem pokusu, boja je bila otopljena u puferu, ali je pokus termostatiran pri temperaturi od 55 °C. U svim pokusima mjerena je aktivnost enzima tijekom vremena.



Slika 4.13. Ovisnost konverzije boje o vremenu u šaržnom pokusu

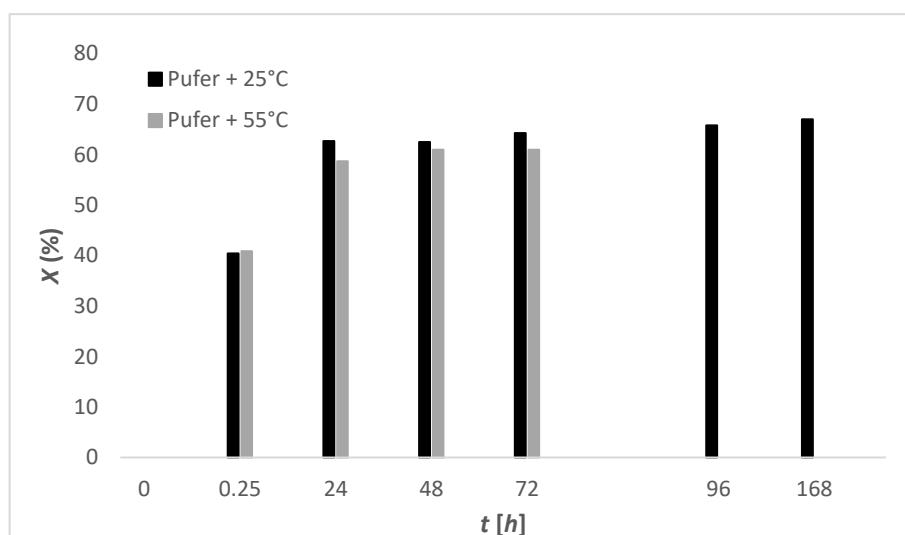
Iz **Slike 4.13.** je vidljivo da je najveća konverzija postignuta u pokusu provedenom u puferu pri 55 °C ($X = 91,40\%$), a najmanja u pokusu provedenom u vodi pri 25 °C ($X = 37,03\%$). Pokus proveden u puferu pri 55 °C je zaustavljen nakon 72 h zbog gubitka enzimске aktivnosti što je vidljivo na **Slici 4.14.**



Slika 4.14. Aktivnost enzima izražena kao relativna volumna aktivnost tijekom vremena u pokusu obezbojenja bojila s lakazom

4.7.2. Istraživanje obezbojenja anilinske boje s djelomično pročišćenim enzimskim preparatom lakaza

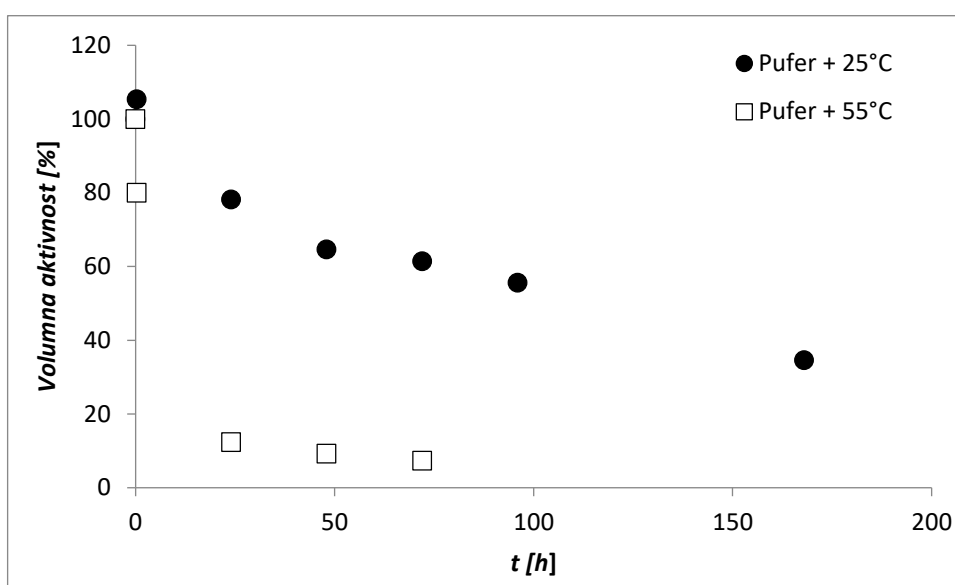
Pokusi s djelomično pročišćenom preparatom enzima lakaza provedeni su u šaržnim uvjetima, u kotlastom reaktoru s mješalom, pri dvije različite temperature ($T = 25$ i 55 °C) koristeći boju otoljenu u puferu, pH 4.



Slika 4.15. Ovisnost konverzije bojila o vremenu

Iz rezultata prikazanih na **Slici 4.15.** je vidljivo da se reakcija obezbojenja anilinske boje odvijala približno jednoliko pri obje ispitane temperature, 25 °C i 55 °C. U pokusu provedenom pri 55 °C postignuta je konverzija od 60,96 % nakon 72 h, nakon čega je pokus zaustavljen zbog gubitka aktivnosti enzima.

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da su u oba eksperimenta obezbojenja anilinske boje s djelomično pročišćenim preparatom enzima lakaza u glicin-HCl puferu postignuti slični rezultati, pri čemu je nakon 168 h u pokusu provedenom pri temperaturi od 25 °C postignuta za 6,02 % veća konverzija u odnosu na pokus proveden pri temperaturi od 55 °C.

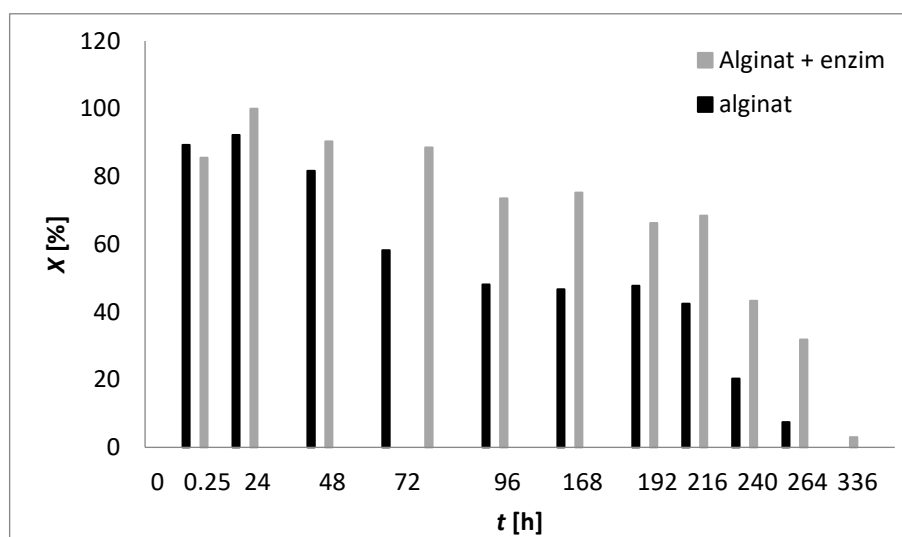


Slika 4.16. Ovisnost relativne volumne aktivnosti enzima o vremenu

Iz dobivenih rezultata pokusa prikazanih na **Slici 4.16.** vidljivo je da se volumna aktivnost enzima lakaza smanjivala tijekom vremena, a najveći gubitak aktivnosti postignut je u eksperimentu provedenom u puferu pri temperaturi od 55 °C, gdje je nakon 72 h iznosila 3,8 % od početne vrijednosti.

4.7.3. Istraživanje obezbojenja anilinske boje sa imobiliziranim sirovim enzimskim preparatom lakaza

Rezultati istraživanja procesa obezbojenja anilinske boje s imobiliziranim enzimom prikazani su na Slici 4.17.



Slika 4.17. Ovisnost konverzije anilinske boje o vremenu u pokusima provedenom s imobiliziranim enzimom i alginatom

Pokus s imobiliziranim sirovim enzimskim preparatom proveden je pri pH 4 and $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ koristeći istu koncentraciju enzima koja je korištena u šaržnim pokusima. Ovi procesni uvjeti su odabrani s obzirom da je u šaržnim pokusima najveća konverzija (oko 60 %) postignuta u pokusu provedenom u puferu i pri $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dodatno, kad je šaržni pokus proveden pri optimalnim uvjetima, postignute konverzije su bile iste, ali je deaktivacija enzima bila brža. U prva 24 h, aktivnost enzima je smanjena za oko 90 %. Upotreba imobiliziranog sirovog enzimskog preparata bi u industrijskim razmjerima imati pozitivan ekonomski učinak. Kako bi se dokazalo da je proces obezbojenja uzrokovan reakcijom, a ne samo procesom adsorpcije bojila na alginat, napravljen je pokus u kojem su korištene samo kuglice alginata. Rekcija je započeta s dodatkom kuglica alginata bez i s imobiliziranim enzimom, a nove koncentracije bojila dodavane su u reaktor svaka 24 h. Ukupno je provedeno 10 ciklusa, a početna koncentracija bojila u svakom ciklusu bila je 75 mg dm^{-3} . Tijekom trajanja pokusa mjerena je

aktivnost enzima u reakcijskoj smjesi kako bi se ispitao učinak imobilizacije. Niske aktivnosti od 2 U dm^{-3} su izmjerene.

Kada se koriste slobodni enzimi, brzine reakcije su obično brža, u odnosu kad se koriste imobilizirani enzimi. S druge strane, slobodni enzimi se ne mogu ponodno upotrebljavati i osjetljiviji su na procesne uvjete. Imobilizacija utječe na poboljšanje enzimске stabilnosti, štiti enzim od denaturacije, omogućava lakše izdvajanje enzima iz reakcijske smjese s ciljem daljnje upotrebe pri čemu je moguće održati katalitičku aktivnost enzima stabilnom u nekoliko ciklusa.

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, samljevena i nesamljevena ljuska kokošnjeg jajeta i *Calplex H90* - otpad industrije papira) s ciljem proizvodnje enzima lakaza, pomoću procesa fermentacije na čvrstim nosačima u sterilnim laboratorijskim teglicama.

U pokusima bez dodatka induktora uzgojem gljive bijelog truljenja *Trametes versicolor* TV-6, maksimalna izmjerena volumna aktivnost enzima lakaza u laboratorijskim teglicama iznosila je 270,93 U dm⁻³.

Od svih testiranih induktora (bakrov sulfat, samljevena i nesamljevena ljuska kokošnjeg jajeta, *Calplex H90* - otpad industrije papira) *Calplex H90* – otpad industrije papira pokazao se najboljim induktorom za proizvodnju enzima lakaza. Maksimalna izmjerena volumna aktivnost iznosila je 494,76 U dm⁻³.

Proveden je pokus stabilnosti prilikom kojeg je ispitivana promjena aktivnosti enzima u odnosu na temperaturu skladištenja tijekom vremena. Utvrđeno je da se enzim lakaza najbolje skladišti pri temperaturi od 4 °C.

Karakterizacijom enzima lakaza dokazano je da djelomično pročišćeni enzimski preparat ima optimalnu aktivnost pri $T = 55$ °C, sirovi pri $T = 50$ °C, a optimalni pH u oba slučaja je 4. Ispitivanjem utjecaja različitih metala na aktivnost enzima lakaza dokazano je svi kationi, osim Cu²⁺ inhibiraju enzim, pri čemu se rezidualna aktivnost enzima kreće od 66 % (Mg²⁺) do 85 % (Mn²⁺). Aktivnost djelomično pročišćenog enzima porasla je s dodatkom Cu²⁺ i Zn²⁺.

U pokusima obezbojenja anilinskog tipa bojila dokazano je da se imobilizirana lakaza u su svrhu može uspješno koristiti u repetitivnim šaržnim pokusima.

6. LITERATURA

Baldrian P: Fungal laccases – occurrence and properties, *FEMS Microbiology Reviews* 30: 215–242, 2006.

Claus H: Laccases: structure, reactions, distribution, *Micron* 35: 93-6, 2004.

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

English B, Min W, van Oijen A, Lee Taek K, Luo G, Sun H, Cherayil JB, Kou SC: Ever-fluctuating single enzyme molecules: Michaelis-Menten equation revisited, *Nature Chemical Biology* 2: 87-94, 2006.

Hatakka A: Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: Production and role in lignin degradation, *FEMS Microbiology Reviews* 13: 125-135, 1994.

Hrgović S.: Osnove agrotehnike proizvodnje: ječma, zobi i raži, stručni rad, Hrvatski zavod za poljoprivrednu savjetodavnu službu, Glasnik zaštite bilja 1, 2006.

Kovač I: Usporedba dva sustava za uzgoj gljive bijelog truljenja *Trametes versicolor* na čvrstim nosačima, *Diplomski rad*. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2014.

Malherbe S, Cloete TE: Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications, *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 2: 105-114, 2002.

Pandey A: Solid-state fermentation, *Biochemical Engineering Journal* 13: 81-84, 2001.

Strelec I, Kovač T: *Praktikum iz biokemije*, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2013.

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

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

Tišma M: Oksidacija fenolnih spojeva lakazom iz *Trametes versicolor* u različitim tipovima reaktora, *Magistarski rad*, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2008.

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

Van Assche F, Clusters H: Effects of metals on enzyme activity in plants, *Plan, Cell & Environment* 13: 195-206.

Webster J, Weber RWS: Introduction to Fungi. *Cambridge University Press*, 2007.

Živković M: Agrotehnika uzgoja ječma (*Hordeum vulgare* L.), *Završni rad*, Preddiplomski studij smjera Bilinogojstvo, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek, 2015.