

Proizvodnja i karakterizacija enzima β -glukozidaza uzgojem *Thermomyces lanuginosus* na pljevici ječma

Kolarić, Marko

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:109:651686>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-13**

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Marko Kolarić

Proizvodnja i karakterizacija enzima β -glukozidaze uzgojem

***Thermomyces lanuginosus* na pljevici ječma**

Diplomski rad

U Osijeku, 10. svibnja 2023.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za procesno inženjerstvo
Katedra za energiju, okoliš i održivi razvoj
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij Procesno inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet: Kemijski i biokemijski reaktori
Tema rada je prihvaćena na IX. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2021./2022. održanoj 29. lipnja 2022.
Mentor: prof. dr. sc. *Marina Tišma*
Pomoć pri izradi: Darijo Šibalić, mag. ing. techn. aliment.

Proizvodnja i karakterizacija enzima β -glukozidaze uzgojem *Thermomyces lanuginosus* na pljevici ječma
Marko Kolarić, 0113144982

Sažetak:

U ovom radu korištena je pljevica ječma kao supstrat za uzgoj *Thermomyces lanuginosus* u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima s ciljem proizvodnje enzima β -glukozidaza. Tijekom 9 dana fermentacije, svakodnevno je analiziran udio vlage supstrata i mjerena je volumna aktivnost enzima. Nadalje, ispitan je utjecaj pH, temperature i koncentracije supstrata *p*-nitrofenil- β -D-glukopiranozida na aktivnost nepročišćenog enzimskog preparata. Mjerena je stabilnost β -glukozidaze pri 50 °C i 65 °C tijekom 24 sata te njena stabilnost tijekom skladištenja pri različitim temperaturama ($T = 4$ °C, 25 °C i -20 °C) tijekom 75 dana. Na kraju, provedena je saharifikacija odabranih lignoceluloznih sirovina (pljevice pira, bučine pogače i tropa grožđa) katalizirana proizvedenim sirovim enzimskim preparatom ($V.A. = 18,7$ U/cm³) tijekom 18 h.

Ključne riječi: β -glukozidaza, *Thermomyces lanuginosus*, pljevica ječma, saharifikacija, lignocelulozni materijali

Rad sadrži: 46 stranica
23 slika
7 tablice
25 literaturnih referenci

Jezik izvornika: Hrvatski

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

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

Datum obrane: 10. 5. 2023.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Process engineering
Subdepartment of Energy, Environment and Sustainable Development
Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia

Graduate program Food engineering

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. IX. held on 29th June 2022.

Mentor: *Marina Tišma*, PhD, Full Prof.

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

Production and characterization of enzyme β -glucosidase by growing *Thermomyces lanuginosus* on barley husk

Marko Kolarić, 0113144982

Summary:

The objective of this work was to use barley husk as a substrate for the cultivation of *Thermomyces lanuginosus* under solid-state fermentation conditions to produce the enzyme β -glucosidase. The moisture content of the substrate and the volume activity of the enzyme extract were monitored daily during 9 days of cultivation. To carry out the characterization of the produced enzyme, the influence of pH, temperature, and concentration of the *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside substrate on the activity of the crude enzyme were performed. The stability of the β -glucosidase during incubation at 50 °C and 65 °C for 24 hours was measured. The activity of enzyme during 75-days storage at three different temperatures ($T= 4$ °C, 25 °C and -20 °C) was measured. In the end, saccharification of various lignocellulosic raw materials (bran husk, pumpkin cake, and grape pomace) using a crude enzyme cocktail (V.A. = 18.7 U/cm³) during 18 h was done.

Key words: β -glucosidase, *Thermomyces lanuginosus*, barley husk, saccharification, lignocellulosic materials

Thesis contains: 46 pages
23 figures
7 tables
25 references

Original in: Croatian

Defense committee:

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

Defense date: 10. 5. 2023.

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

Zahvaljujem svojim roditeljima i bratu na bezuvjetnoj podršci i neizmjernej pomoći tijekom ovih 5 godina studiranja. Zahvaljujem svim svojim prijateljima i kolegama koji su to vrijeme učinili lakšim i sretnijim. Zahvaljujem svim profesorima na uloženom trudu i prenesenom znanju. Posebno zahvaljujem mentorici Marini Tišmi i komentoru Dariju Šibaliću što su uvijek bili na raspolaganju i pružili veliku količinu pomoći i vremena.

Moj uspjeh je i Vaš uspjeh.

Hvala Vam!

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. FERMENTACIJA NA ČVRSTIM NOSAČIMA	4
2.1.1. Lignocelulozni supstrati	6
2.1.2. Proizvodnja visokovrijednih produkata fermentacijom na čvrstim nosačima	10
2.1.3. Vrste bioreaktora korištenih u fermentaciji na čvrstim nosačima	12
2.1.4. <i>Thermomyces lanuginosus</i>	13
2.1.5. Hidrolitički enzimi iz <i>Thermomyces lanuginosus</i>	14
2.1.5. Saharifikacija lignoceluloznih sirovina	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1. ZADATAK	18
3.2. MATERIJALI	18
3.2.1. Supstrat i mikroorganizam	18
3.2.2. Kemikalije	18
3.2.3. Priprema pufera	18
3.2.4. Priprema otopine supstrata	20
3.2.5. Priprema otopine natrijeva karbonata	20
3.2.6. Priprema DNS reagensa	20
3.3. METODE	20
3.3.1. Biološka obrada supstrata	20
3.3.2. Ekstrakcija enzima	22
3.3.3. Mjerenje aktivnosti β -glukozidaze	23
3.3.4. Određivanje suhe tvari	25
3.3.5. Utjecaj pH vrijednosti na aktivnost β -glukozidaze	25
3.3.6. Utjecaj temperature na aktivnost β -glukozidaze	26
3.3.7. Utjecaj koncentracije supstrata na aktivnost β -glukozidaze	26
3.3.8. Utjecaj uvjeta skladištenja na aktivnost β -glukozidaze	26
3.3.9. Utjecaj povišene temperature na stabilnost β -glukozidaze	26
3.3.10. Saharifikacija lignoceluloznih sirovina pomoću enzimskog preparata iz <i>T. lanuginosus</i>	27
3.3.11. Analiza reducirajućih šećera DNS metodom	27
4. REZULTATI I RASPRAVA	29
4.1. PROFIL PROIZVODNJE ENZIMA B-GLUKOZIDAZA TIJEKOM FERMENTACIJE NA ČVRSTIM NOSAČIMA	30
4.1.1. Udio vlage supstrata tijekom proizvodnje β -glukozidaze	31
4.2. KARAKTERIZACIJA NEPROČIŠĆENE B-GLUKOZIDAZE	32

4.2.1. Utjecaj pH vrijednosti reakcijskog medija na aktivnost β -glukozidaze	32
4.2.2. Utjecaj temperature na aktivnost β -glukozidaze.....	33
4.2.3. Utjecaj koncentracije supstrata na aktivnost β -glukozidaze	33
4.2.4. Utjecaj uvjeta skladištenja na aktivnost β -glukozidaze.....	34
4.2.5. Utjecaj povišene temperature na aktivnost β -glukozidaze	35
4.3. SAHARIFIKACIJA ODABRANIH LIGNOCELULOZNIH SIROVINA NEPROČIŠĆENIM ENZIMSKIM PREPARATOM.....	36
4.3.1. Kalibracijska krivulja za određivanje masene koncentracije reducirajućih šećera DNS metodom	36
4.3.2. Koncentracija reducirajućih šećera dobivenih saharifikacijom pljevice pira, bučine pogače i tropa grožđa.....	38
5. ZAKLJUČCI.....	42
6. LITERATURA.....	44

Popis oznaka, kratica i simbola

OZNAKE:

A	apsorbancija uzorka (-)
A_{GP}	apsorbancija glavne probe (-)
A_{KE}	apsorbancija kontrole ekstrakta (-)
A_{SP}	apsorbancija slijepe probe (-)
C	maseni udio reducirajućih šećera u uzorku ($\text{mg g}_{\text{st}}^{-1}$)
c	množinska koncentracija tvari (mmol dm^{-3})
d	promjer kivete (1 cm)
dA/dt	promjena apsorbancije u vremenu (min^{-1})
ϵ	molarni ekstinkcijski koeficijent ($4,9952 \text{ dm}^3 \text{ mmol cm}^{-1}$)
m_{LS}	masa lignocelulozne sirovine (g)
rpm	okretaji po minuti (eng. <i>revolutions per minute</i>)
T	temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
t	vrijeme (min)
$V.A.$	volumna aktivnost enzima (U cm^{-3})
V_e	volumen enzima u kiveti (cm^3)
V_e	volumen sirovog enzimskog preparata (cm^3)
V_u	ukupni volumen uzorka u kiveti (cm^3)
w_{st}	udio suhe tvari lignocelulozne sirovine (%)
γ_R	masena koncentracija reducirajućih šećera (mg cm^{-3})
γ_R	masena koncentracija reducirajućih šećera (mg cm^{-3})
λ	valna duljina (nm)

KRATICE:

PDA eng. *Potato dextrose agar* (agar s krumpirovom dekstrozom)

<i>p</i> -NPG	<i>p</i> -nitrofenil- β -D-glukopiranozid
SMF	submerzna fermentacija
SSF	eng. <i>Solid-State Fermentation</i> (fermentacija na čvrstim nosačima)
TLL	lipaza iz <i>Thermomyces lanuginosus</i>

1. UVOD

Lignocelulozna biomasa je široko rasprostranjeni i lako dostupni izvor obnovljivog ugljika i kao takva, ima veliki potencijal primjene u lignoceluloznim biorefinerijama. Iz lignocelulozne biomase moguće je proizvesti čitav niz bioprodukata, kao što su visokovrijedni produkti, nutritivno obogaćena hrana, nutritivno obogaćeni dodatci stočnoj hrani, različiti materijali (primjerice bioplastika) i energija (biogoriva). Zbog velikog broja različitih tipova lignocelulozne biomase i njenog heterogenog kemijskog sastava, regionalne dostupnosti, sezonskog karaktera, izazova tijekom skladištenja i/ili transporta, postoje brojni izazovi za komercijalizaciju lignoceluloznih biorafinerija.

Jedna od ekoloških metoda obrade lignocelulozne biomase je fermentacija na čvrstim nosačima pri čemu se mikroorganizmi uzgajaju na lignoceluloznoj biomasi s ciljem njene (pred)obrade i/ili modifikacije za daljnju primjenu u proizvodnji bioprodukata.

Pljevica ječma je po kemijskom sastavu lignocelulozni materijal. Uglavnom se upotrebljava kao stočna hrana, ali zbog svog kemijskog sastava može se koristiti i kao supstrat za uzgoj različitih gljiva u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima u svrhu proizvodnje visokovrijednih produkata, kao što je primjerice proizvodnja industrijski važnih enzima.

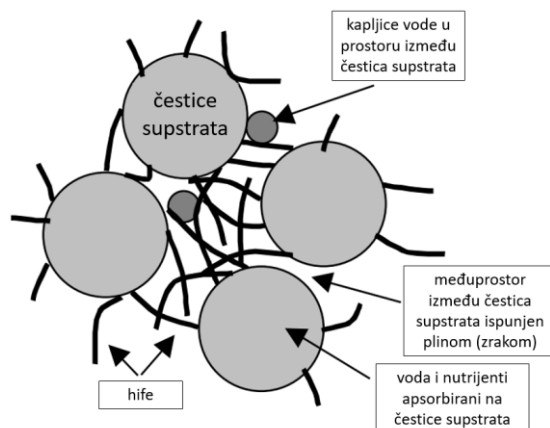
Thermomyces lanuginosus je termofilna gljiva. U prirodi je prisutna kao dio mikroflore odgovorne za razgradnju biološkog materijala tijekom kompostiranja. Iz tog razloga, *T. lanuginosus* se često koristi u istraživanjima kao radni mikroorganizam za obradu lignoceluloznih sirovina u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima s ciljem proizvodnje visokovrijednih proizvoda kao što su primjerice enzimi, ali i za proizvodnju biogoriva i nutritivno obogaćene hrane.

U ovom radu ispitana je mogućnost iskorištenja pljevice ječma kao lignocelulozne sirovine za uzgoj *T. lanuginosus* i proizvodnje termostabilnog enzima β -glukozidaze. Osim za uzgoj radnog mikroorganizma, ispitan je potencijal različitih lignoceluloznih sirovina u procesu saharifikacije i proizvodnje šećernih hidrolizata pomoću enzimskog koktela iz *T. lanuginosus* koji mogu imati daljnji potencijal za primjenu u proizvodnji bioetanola.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Fermentacija na čvrstim nosačima

Uzgoj mikroorganizama u uvjetima fermentacije na čvrstim supstratima (engl. „*solid state fermentation*“, SSF) podrazumijeva procese u kojima se mikroorganizmi, najčešće filamentne gljive, uzgajaju na čvrstim supstratima, u kontroliranim uvjetima, bez prisutnosti slobodne vode ili s minimalnom količinom slobodne vode. Slobodna voda može se nalaziti u obliku kapljica između čestica supstrata ili može biti u obliku tankog filma na površini supstrata. Kao što je prikazano na **slici 1**, mikroorganizmi tijekom fermentacije mogu rasti na površini, između čestica supstrata te u samom supstratu. Nadalje, prostor između čestica supstrata ispunjava plinovita faza zajedno s niskim udjelom slobodne vode koja je potrebna za neometano odvijanje procesa (Mitchell i sur., 2006).



Slika 1. Slikoviti prikaz krute, plinovite i tekuće faze tijekom uzgoja mikroorganizama na čvrstim nosačima (Mitchell i sur., 2006)

S obzorom na fizikalno-kemijske karakteristike, supstrati korišteni u SSF procesu mogu se podijeliti na inertne i neinertne. Biološki materijali kao što su lignocelulozne sirovine, pripadaju skupini neinertnih supstrata. Kao takvi, tijekom SSF procesa oni služe kao fizički nosač za radni mikroorganizam, ali istovremeno predstavljaju i izvor hranjivih tvari neophodnih za proces fermentacije (Barrios-González, 2012). Inertni nosači nemaju ulogu supstrata tj. izvora hranjivih tvari za mikroorganizam. U tom slučaju, za pravilno odvijanje SSF procesa potrebno je dodati izvore hranjivih tvari (mikro i makro nutrijente) kako bi se osigurao rast i metabolička aktivnost radnog mikroorganizma (Pandey i sur., 2013). U literaturi je

navedeno nekoliko inertnih materijala korištenih u SSF kao što su perlit, poliuretanska pjena (PUF), poli(stiren-divinilbencen), amberlit i vermikulit (Lareo i sur., 2006).

Kao što je već navedeno, u SSF procesima slobodne vode nema ili je prisutna u malim količinama. Takve uvjete preferiraju filamentne gljive. Također, mali udio vode smanjuje rizik od kontaminacije. SSF je ekološki, energetska i ekonomski prihvatljivija metoda u odnosu na submerzne fermentacije (SmF) (Thomas i sur., 2013; Tišma i sur., 2021). S druge strane, prednosti SmF procesa u odnosu na SSF, su lakša kontrola procesnih parametara, mogućnost odvajanja biomase, i sl. Prednosti i nedostaci SSF procesa u odnosu na SmF procese prikazani su u **tablici 1** (Mitchell i sur., 2006). Unatoč svim prednostima, postoje neki važni tehnološki problemi koje je potrebno razmotriti kako bi se poboljšao cjelokupni SSF proces. Neki od njih su problemi uzrokovani heterogenošću sustava, kao što je otpor prijenosu topline i mase, odvajanje mikroorganizama od supstrata i problemi uzorkovanja tijekom fermentacije u svrhu kontinuiranog praćenja kemijskog sastava supstrata i/ili produkta (Šelo i sur., 2021).

Tablica 1. Razlika između SSF i SmF procesa

SSF procesi	SmF procesi
Hranjiva podloga je lignocelulozni materijal, lako dostupan i jeftin; dodatno prihranjivanje mineralnom otopinom ako je potrebno.	Složena hranjiva podloga.
Nizak udio vode rezultira manjim rizikom kontaminacije.	Tekuća hranjiva podloga, mogućnost kontaminacije.
Veća produktivnost.	Manja produktivnost.
Otežan proces miješanja.	Mogućnost jednostavnog miješanja.
Nizak udio vode predstavlja problem prilikom odvođenja metaboličke topline.	Visok udio vode olakšava regulaciju temperature u sustavu.
Kontrola procesnih parametara otežana zbog heterogenosti sustava.	Jednostavno nadziranje procesnih parametara (temperatura, pH, koncentracija otopljenog kisika).
Slabo istraženi fenomeni prijelaza tvari.	Dobro poznati procesi prijenosa tvari.

Uzgoj mikroorganizama u SSF uvjetima u zadnjih nekoliko godina postaje sve popularnija metoda zbog svoje primjene u proizvodnji stočne hrane, goriva, hrane, kemikalija i farmaceutskih proizvoda. U **tablici 2** dan je kronološki prikaz razvoja SSF-a (Thomas i sur., 2013.) Osim navedenog, inovativni pristup uzgoja mikroorganizama na lignoceluloznim supstratima, u prvom redu gljiva iz reda *Polyporales*, posebice roda *Ganoderma*, usmjeren je k proizvodnji sve popularnijih bioloških konstrukcijskih materijala poput imitacijskih materijala kože (Gandia i sur., 2021).

Tablica 2. Razvoj i primjena SSF procesa tijekom godina

Razdoblje	Proces
2600. pr. Kr.	Proizvodnja kruha u Egiptu
2500. pr. Kr.	Konzerviranje ribe pomoću šećera i soli
1000. pr. Kr.	Proizvodnja sira u Aziji pomoću <i>Penicillium roqueforti</i>
18. st.	Galna kiselina, upotreba u tiskarstvu i štavljenju kože
1900. – 1920.	Proizvodnja fungalnih enzima, amilaza
1940. – 1950.	Proizvodnja penicilina pomoću SSF i SmF procesa
1950. – 1960.	Transformacije steroida pomoću funga
1960. – 1980.	Proizvodnja mikotoksina; krmiva obogaćena proteinima
1980. – danas	Proizvodnja alkohola i giberlinske kiseline

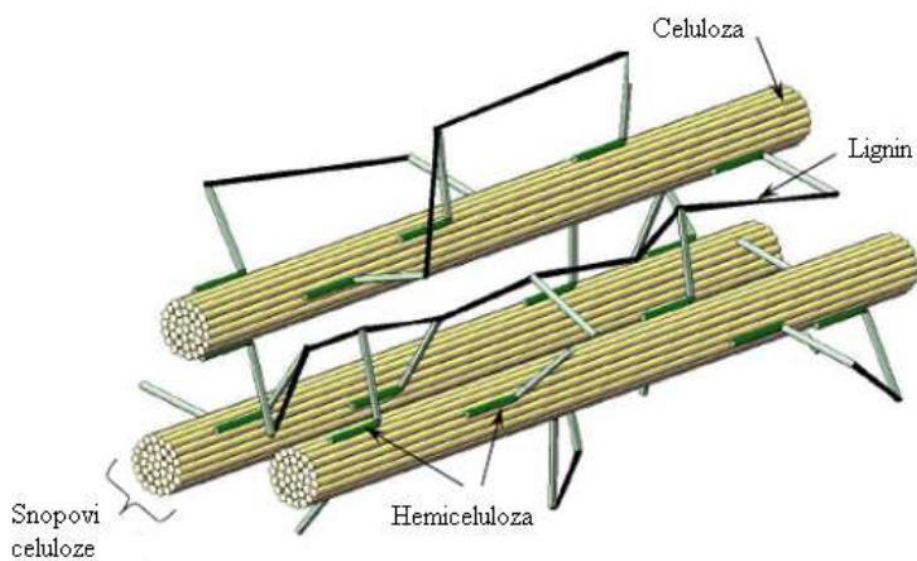
2.1.1. Lignocelulozni supstrati

Lignocelulozna sirovina je biljna biomasa te predstavlja najrašireniji biopolimer u prirodi čiji potencijal još uvijek nije u potpunosti iskorišten (Palonen i Viikari, 2004).

Otpadne lignocelulozne sirovine uključuju poljoprivredne ostatke kao što su *a*) pšenična i rižina slama, pšenične mekinje, *b*) šumski i drvni otpad kao što su piljevina te usitnjeni ostaci drveća; *c*) komunalni biotpad, *d*) otpad koji nastaje u prehrambenoj industriji (otpad uljarica, ostaci voća i povrća, pljevica ječma). Najveća količina otpadnih lignoceluloznih

materijala nastaje u poljoprivrednoj, prehrambenoj i drvnjoj industriji. Lignocelulozne sirovine većinom se spaljuju ili ostavljaju na polju, te njihov potencijal ostaje neiskorišten. Zbog svog kemijskog sastava lignocelulozni materijali imaju veliki potencijal kao supstrat za upotrebu u proizvodnji vrijednih biotehnoloških proizvoda.

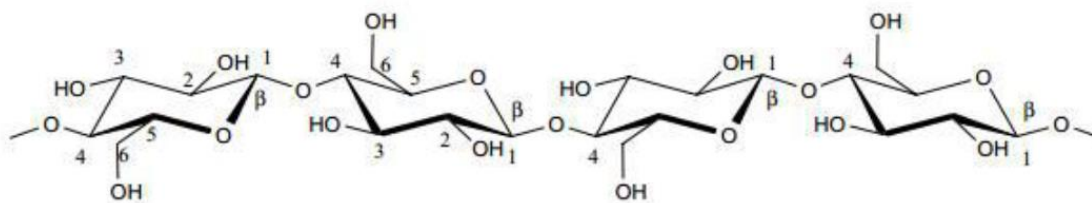
Glavne sastojke lignoceluloznih materijala čine tri prirodna polimera, a to su celuloza, hemiceluloza i lignin, koji tvore kompleksnu strukturu prikazanu na **slici 2**. Složena kemijska struktura lignoceluloznog materijala, odnosno njegovih najvažnijih sastavnica, otežava njegovu primjenu u proizvodnju visokovrijednih produkata (Palonen i Viikari, 2004).



Slika 2. Prikaz strukture lignoceluloznog materijala (Adapa i sur., 2009)

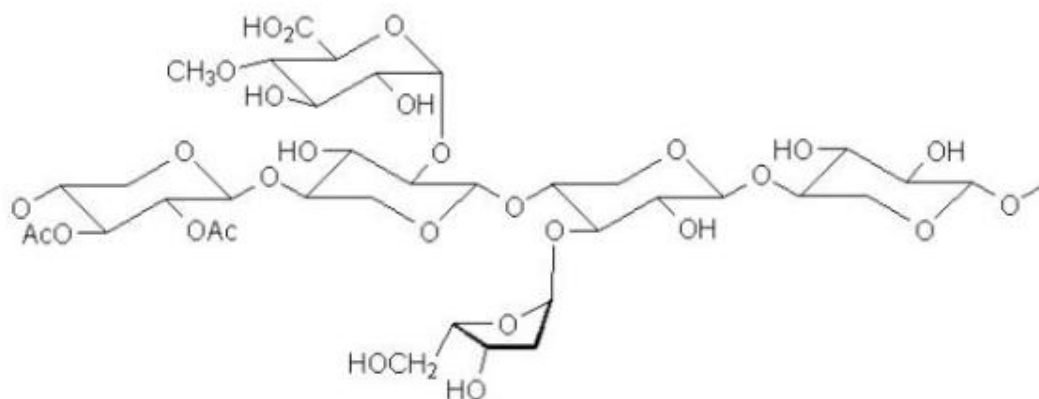
Celuloza, $(C_6H_{10}O_5)_n$, je osnovni strukturni sastojak stanične stijenke biljne stanice. Celuloza je polisaharid građen od jedinica D-glukoze koje su linearno povezane β -(1,4)-glikozidnom vezom (**slika 3**). Netopiva je u vodi i organskim otapalima. Celuloza je osnovni sastojak mnogih industrijskih proizvoda: papira, kartona, ljepenke, vate i celuloznih vlakana za tekstilnu industriju. Široku primjenu nalaze i derivati celuloze (esteri i eteri) u proizvodnji lakova, eksploziva, ljepila, filmova, celulozida i dr. Unutar stanične stijenke sirovina biljnog podrijetla, celuloza je povezana s hemicelulozom i ligninom. Zbog toga je oslobađanje celuloze

u cilju dobivanja fermentabilnih šećera (glukoze) iz takve strukture često tehnološki izazov (Laine, 2005).



Slika 3. Struktura celuloze (Laine, 2005.)

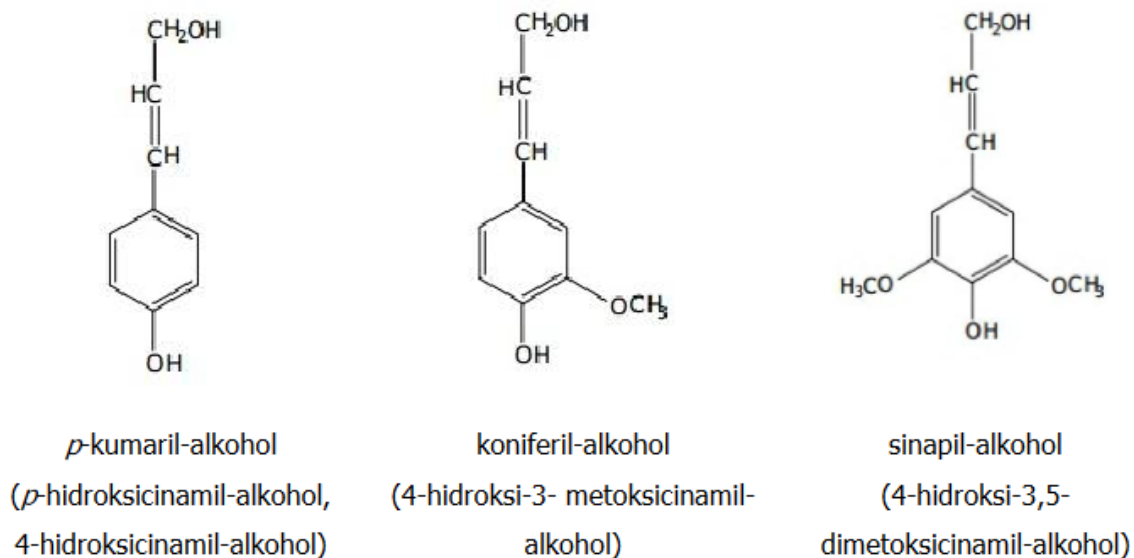
Hemiceluloza je kompleksni ugljikohidrat građen od različitih šećera poput pentoza (ksiloza i arabinoza), heksoza (manoza, glukoza i galaktoza) i šećernih kiselina (slika 4). Za razliku od celuloze, hemiceluloza ima različiti broj jedinica glukoze, dužinu i grananje lanca. Lako se hidrolizira pomoću razrijeđenih kiselina i lužina. U odnosu na celulozu i lignin, hemiceluloza je termokemijski osjetljivija, te će tijekom termokemijske predobrade prvo reagirati bočne grupe, a nakon toga osnovni kostur hemiceluloze (Laine, 2005).



Slika 4. Struktura hemiceluloze (Laine, 2005)

Lignin je, uz celulozu i hemicelulozu, jedan od najrasprostranjenijih polimera u prirodi koji je prisutan u staničnoj stijenci biljaka. To je amorfni heteropolimer, građen od tri fenilpropanske jedinice (*p*-kumarilni alkohol, koniferilni alkohol i sinapilni alkohol), koje su međusobno povezane različitim vrstama veza (slika 5). Lignin nije topljiv u vodi zbog čega ga

je vrlo teško razgraditi. Upravo zbog slabije razgradivosti, lignin negativno utječe na efikasnost saharifikacije tj. količinu nastalih šećera iz lignoceluloze (Laine, 2005).



Slika 5. Osnovne građevne jedinice lignina (Laine, 2005)

Pljevica ječma

Ječam (*Hordeum vulgare*) pripada grupi strnih žitarica (**slika 6**) koje rastu u klasu i mogu narasti prosječno od 60 - 100 cm. Glavni razlozi uzgoja ječma su za potrebe stočarske proizvodnje i sve širu industrijsku proizvodnju zrna za potrebe pivarske industrije. U industriji piva i viskija ječam ima posebnu važnost jer se od njega dobiva kvalitetan slad. Sladni sirup upotrebljava se u pekarskoj industriji, konditorskoj, farmaceutskoj i tekstilnoj industriji, u proizvodnji alkohola, octa, kvasca i drugim proizvodima. Također, ječam se koristi u hranidbi domaćih životinja. Zrno ječma ima veliku hranidbenu vrijednost, a u tovu popravljiva kakvoću slanine i mesnih proizvoda. U suvremenoj prehrani ječam se rijetko koristi u prehrani ljudi, osim u zemljama u kojima teže uspijeva pšenica. Ječam se sastoji od korijena, stabljike, listova i klasa, na kojem se nalazi plod. Prilikom prerade dolazi do odvajanja ploda i pljevice. Plod se dalje upotrebljava, a pljevica zaostaje te se smatra proizvodnim ostatkom.

Pljevica ječma (**slika 7**) može biti dobar supstrat za rast gljiva bijelog truljenja u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima i proizvodnju željenih produkata, kao što je primjerice enzim β -glukozidaza (Hrgović, 2006; Živković, 2015).



Slika 6. Plod ječma



Slika 7. Pljevica ječma

2.1.2. Proizvodnja visokovrijednih produkata fermentacijom na čvrstim nosačima

U tablici 3 je prikazan pregled literature u kojoj su korišteni različiti mikroorganizmi za obradu različitih lignoceluloznih sirovina s ciljem proizvodnje različitih produkata (Šelo i sur., 2021)

Tablica 3. Mikroorganizmi i supstrati korišteni za proizvodnju visokovrijednih produkata (Šelo i sur., 2021)

Mikroorganizmi		Supstrati	Produkti
Filamentozne gljive	<i>Trametes versicolor</i>	Komine rajčice	Lakaze, ksilanaze, proteaze
	<i>Aspergillus niger</i>	Brašno od sjemenki granadile	Fenolni spojevi
	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Uljana komina bundeve bez ljuski	lipaze
	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Komina od jabuke	Fenolni antioksidansi
	<i>Actinomucor elegans</i> <i>Umbelopsis isabellina</i>	Komina od grožđa	γ-linolenska kiselina i karotenoidi
Bakterije	<i>Actinobacillus succinogenes</i>	Hidrolizat voća i povrća	jantarna kiselina
	<i>Cupriavidus necator</i>	Sojin kolač, <i>babassu</i> kolač	biorazgradivi polimeri (polihidroksialkanoati, PHA)
Kvasci	Aktivni suhi kvasac	Pšenične mekinje	Poboljšanje prehrambenih, fizičkih i nutritivnih svojstava pšeničnih mekinja
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ostaci klipa kukuruza	etanol

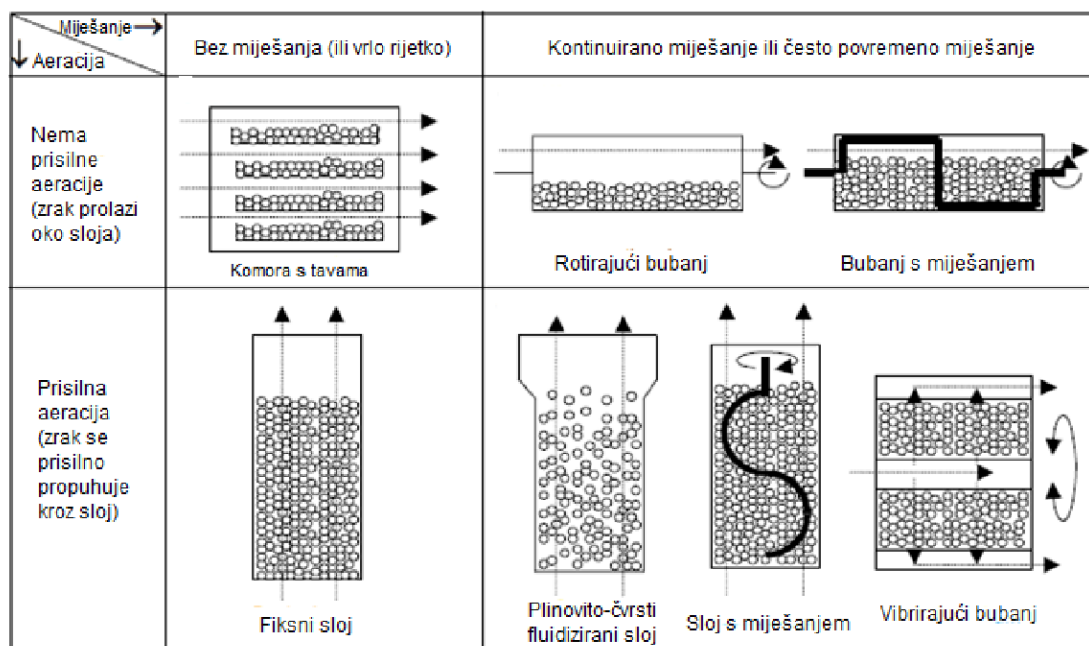
U literaturi nema dostupnih podataka o primjeni pljevice ječma kao supstrata za uzgoj mikroorganizama u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima, no postoje podatci o primjeni pivskog tropa. Pivski trop je nusproizvod pivarske industrije i čini 85 % otpada od proizvodnje piva. Korišten je kao supstrat za proizvodnju hidrolitičkih (ksilanaze, β-glukozidaze i celulaze) i

lignolitičkih (lakaza, mangan peroksidaza i lignin peroksidaza) enzima. Nakon obrade s *T. versicolor* došlo je do povećanja udjela proteina, pepela, polifenolnih spojeva i šećera (Zeko-Pivač i sur., 2022).

2.1.3. Vrste bioreaktora korištenih u fermentaciji na čvrstim nosačima

Prilikom odabira bioreaktora za SSF, važno je omogućiti kontinuiranu dobavu kisika, uklanjanje ugljikovog dioksida, dobro miješanje, odvodnju topline, sprječavanje kontaminacije, kao i kontinuiranu kontrolu procesnih parametara (Pandey i sur., 2003). Postoji veliki broj različitih laboratorijskih izvedbi SSF reaktora, dok je njihova industrijska primjena još uvijek limitirana. Laboratorijskim SSF bioreaktorima pripadaju i Petrijeve zdjelice, staklenke, Erlenmeyerove tikvice sa širokim grlom, Roux boce i valjak boce, no u ovim izvedbama nije moguće provoditi aeraciju u miješanje (Durand i sur., 2003).

Vrste SSF bioreaktora obzirom na način mješanja i aeracije prikazani su na **slici 8**. Razlikuju se dva načina aeracije kod SSF bioreaktora: kruženje zraka oko supstrata i prisilno propuhivanje zraka kroz supstrat. S obzirom na miješanje razlikujemo tri vrste bioreaktora: bioreaktori kod kojih nema miješanja (čvrsti sloj miruje), bioreaktori kod kojih se čvrsti sloj miješa svakih nekoliko sati ili jednom dnevno i bioreaktori kod kojih se čvrsti sloj često miješa (nekoliko puta na sat) (Mitchell i sur., 2006).



Slika 8. Podjela bioreaktora s obzirom na aeraciju i miješanje (Mitchell i sur., 2006)

2.1.4. *Thermomyces lanuginosus*

Thermomyces lanuginosus je termofilna gljiva, koja je uglavnom istraživana za proizvodnju raznih enzima od komercijalnog interesa, uključujući β -glukozidazu. Ova gljiva je diljem svijeta uzgajana na raznim lignoceluloznim sirovinama kao što su pljevica ječma, bučina pogača, pljevica pira, pivski trop, trop grožđa, itd. Sojevi ove gljive rastu u temperaturnom rasponu između 20 °C i 60 °C, pri čemu je optimalna temperatura oko 50 °C (Singh i sur., 2003). Optimalni pH za rast većine sojeva *T. lanuginosus* je 6,5.

U prirodi se *T. lanuginosus* nalazi u suhim i vodenim travnjacima, ilovači i sedimentima, te na organskim supstratima kao što su stabljike, korijenje i lišće, kompostima raznih biljnih materijala te izmetima ptica i sisavaca (Singh i sur., 2003).

T. lanuginosus pripada deuteromicetama („nesavršenim“ gljivama) zato jer se razmnožavaju nespolno stvarajući aleurokonidije. Na odgovarajućim supstratima, kolonije ove gljive brzo rastu (za dva dana), do promjera od 2,5 do 5 cm pri temperaturi od 45 °C do 50 °C. Na početku, kolonije su bijele boje i veličine su oko 1mm, ali ubrzo postanu sive ili sivkasto-

zelene. Nakon nekog vremena, kolonije postaju ljubičasto-smeđe. Zrele kolonije su tamno smeđe do crne boje (Singh i sur., 2003).

T. lanuginosus ne može rasti u anaerobnim uvjetima. Osim kisika, gljivi je za normalan rast potreban i ugljikov dioksid radi asimilacije piruvat karboksilaze koja omogućuje normalno odvijanje procesa glukoneogeneze. Kao izvor ugljika, ova gljiva najčešće koristi hemicelulozu (Singh i sur., 2003).

2.1.5. Hidrolitički enzimi iz *Thermomyces lanuginosus*

Lipaze kataliziraju širok raspon reakcija kao što su hidroliza, esterifikacija i transesterifikacija. Lipaze iz *T. lanuginosus* (TLL) posjeduju temperaturnu i pH stabilnost, kompatibilnost s organskim otapalima i afinitet prema različitim supstratima. Kod eukariota, enzim lipaza je korišten u različitim fazama metabolizma kao što su razgradnja masti, apsorpcija, promjena sastava i metabolizma lipoproteina (Šibalić i sur., 2020). Lipaze imaju veliku industrijsku primjenu, a neke od njih su proizvodnja biodizela i detergenata, farmaceutskih proizvoda, kože, tekstila, te u industriji papira.

α -amilaza je dimerni enzim koji katalizira hidrolizu škroba, amiloze i amilopektina. α -amilaza iz *T. lanuginosus* najaktivnija je u blago kiselim uvjetima i na temperaturi od 65 °C. (Singh i sur., 2003). α -amilaze imaju veliku primjenu u prehrambenoj industriji, proizvodnji detergenata i farmaceutskih proizvoda, tekstila i u industriji papira.

Ksilanaza iz *T. lanuginosus* je polipeptid od 225 aminokiselina i vrlo je slična s ksilanazama iz drugih izvora, ali se razlikuje u prisutnosti disulfidnog mosta koji većina mezofilnih ksilanaza nema i povećane gustoće nabijenih ostataka u proteinu. Dok se temperaturni optimumi većine ksilanaza kreću od 55 °C do 65 °C, ksilanaze nekih sojeva *T. lanuginosus* optimalnu aktivnost pokazuju na 70 °C do 80 °C. Ksilanaze se primjenjuju u industriji hrane, stočne hrane te industriji celuloze i papira jer se mogu koristiti za razgradnju ksilana u industrijskim enzimskim reakcijama (Singh i sur., 2003).

Hitinaze su glikozil hidrolaze koje kataliziraju razgradnju β -1,4 veze u hitinu. Aktivni su u širokom rasponu pH (3,0 – 11,0) i temperature (30 – 60 °C). Hitinaze su biološki korisne jer

razgrađuju biopolimer hitin. Hitin predstavlja ozbiljan ekološki problem (hitinski otpad), a godišnje ga nastane do 100 milijardi tona. Hitinaze se koriste u razgradnji hitina u sirovim ljušturama rakova bez prethodne obrade jakim kemikalijama, a također imaju primjenu u medicini jer je otkriveno da hitinaza ima antifungalna svojstva (Singh i sur., 2003).

β -glukozidaza je enzim prisutan u raznim vrstama živih organizama. Poznata je kao učinkovit biokatalizator hidrolize raznih glikozida. β -glukozidaza je enzim koji se sastoji od dva polipeptidna lanca molekulske mase od 200 000 g mol⁻¹. β -D glukozidaza hidrolizira glukozidne supstrate koji sadrži terminalni, nereducirajući ostatak β -D-glukoze s ciljem oslobađanja glukoze (Lin i sur., 1999). Najčešća upotreba ovog enzima je u svrhu poboljšanja arome vina, čajeva i voća te u hidrolizi celuloze. Nedostaci šire primjene su zbog nestabilnosti enzima i visokih troškova regeneracije enzima (Lin i sur., 1999; Zhou i sur., 2013).

2.1.5. Saharifikacija lignoceluloznih sirovina

Kao što je već navedeno, saharifikacija je proces u kojem se lignocelulozni materijali, točnije hemiceluloza i celuloza hidroliziraju na osnovne građevne jedinice (monosaharide, pentoze i heksoze) uz prisustvo katalizatora. Kako bi došlo do oslobađanja jednostavnih šećera, potrebno je provesti predobradu sirovine na način da se ukloni lignin i razbije kristalna struktura celuloze.

Osnovni načini predobrade lignocelulozne sirovine uključuje kemijske, fizikalne i biološke metode. Najpoznatiji fizikalni procesi su ekstruzija, obrada s kipućom vodom i parnom eksplozijom. Prilikom ekstruzije, biomasa se u ekstruderu miješa, zagrijava i smiče. Ovo rezultira fizikalnom i kemijskom promjenom celuloze, hemiceluloze i lignina, što dovodi do povećane enzimске dostupnosti celuloze. Kod saharifikacije s parnom eksplozijom, biomasa se izlaže visokim temperaturama (150 – 260 °C) i tlaku (20 – 50 bar) nekoliko minuta te se nakon toga uspostavlja atmosferski tlak koji uzrokuje eksploziju materijala i posljedično lakše uklanjanje lignina. Prilikom saharifikacije s kipućom vodom, koristi se kipuća voda s ciljem lakše konverzije biomase u glukozu. Glavna prednost fizikalnih procesa je dobivanje velike količine šećera, nekorištenje kemikalija i toksičnih spojeva. Glavni nedostatak su energetski zahtjevni uvjeti odvijanja procesa (visoka temperatura i tlak) (Capolupo i sur., 2016).

Najpoznatiji primjeri kemijske saharifikacije su saharifikacija organskim otapalima i ozonoliza. Kod saharifikacije organskim otapalima, materijali se miješaju s organskim otapalima i vodom i zagrijavaju se na temperaturi od 150 – 200 °C ovisno o vrsti materijala, u svrhu otapanja lignina i hemiceluloze te kako bi ostala celuloza u krutom ostatku. Ozonoliza je proces u kojem ozon oštećuje lignin reagirajući s aromatskom strukturom biomase pri čemu se također oslobađaju i razne kiseline i aldehidi. Glavne prednosti kemijske saharifikacije su dobra razgradnja lignina i sigurnost za okoliš. Glavni nedostatak su visoki troškovi ozona (Capolupo i sur., 2016).

Biolška saharifikacija postaje sve popularnija metoda zbog efikasnosti i ekonomičnosti, a može se provoditi s mikroorganizmima i enzimima. Ove metode imaju prednost u odnosu na prethodno navedene zbog toga što se provode pri blagim procesnim uvjetima pH i temperature i ne koriste se za okoliš neprihvatljive kemikalije (Capolupo i sur., 2016).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Zadatak

Cilj ovog rada bio je :

- a) ispitati mogućnost iskorištenja pljevice ječma kao supstrata za uzgoj termofilne gljive *T. lanuginosus*
- b) proizvesti i karakterizirati enzim β -glukozidazu
- c) ispitati učinkovitost β -glukozidaze u procesu saharifikacije pljevice pira, bučine pogače i tropa grožđa

3.2. Materijali

3.2.1. Supstrat i mikroorganizam

Istraživanja su provedena na pljevici ječma (BC Institut, Zagreb). Prije provedbe fermentacije, pljevica ječma je skladištena u zamrzivaču na -20 °C.

Radni mikroorganizam korišten u ovom radu je *Thermomyces lanuginosus* Tsiklinsky (ATCC®76323™) (DSMZ Institut, Njemačka). Prije provedbe eksperimenata, kultura je uzgajana na PDA (Biolife Italiana Sr. L. Viale Monza, Milan, Italija) uz dodatak kvaščeve ekstrakta (0,5 %, w/v) (Roseto degli Abruzzi TE, Italija) deset dana pri 45 °C.

3.2.2. Kemikalije

Za provedbu eksperimenata korištene su slijedeće kemikalije: Kalijev natrijev tartarat (Fischer Scientific, Velika Britanija), 3,5-dinitrosalicilna kiselina (Acros Organics, Belgija), 1M NaOH (Gram Mol, Hrvatska), Bradford reagens (PTFOS), natrij karbonat (Kemika, Hrvatska), *p*-nitrofenil- β -D-glukopiranozid (Across Organics, Belgija), natrij-fosfat bezvodni (Fischer Scientific, Velika Britanija), natrij-fosfat monohidrat (Acros Organics, Belgija).

3.2.3. Priprema pufera

Natrij-citratni pufer pripremljen je u pH području 3,0 4,0 5,0 i 6,0. Pufer je pripremljen na način da se otopi određena masa limunske kiseline, $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ i određena masa trinatrijev

citrat dihidrata, $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ u 100 cm^3 vode (**tablica 4**). Nakon svake odvage i otapanja u 100 cm^3 vode pH je provjeravan pH-metrom.

Tablica 4. Priprema natrij-citratnog pufera

pH	$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ $c = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$	$C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ $c = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$
	$m \text{ (g)}$	$m \text{ (g)}$
3,0	1,72	0,53
4,0	1,24	1,21
5,0	0,74	1,91
6,0	0,24	2,60

Natrij-fosfatni pufer pripremljen je pri pH 6,0 7,0 i 8,0 na način da su pomiješane dvije otopine (natrijev fosfat monobazni monohidrat ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) i natrijev fosfat dibazni bezvodni (Na_2HPO_4)) u odgovarajućem volumenu kako bi se dobio željeni pH (**tablica 5**). Nakon što su otopine pomiješane, dodano je 50 cm^3 destilirane vode. Nakon pripreme pufera, pH je provjeravan s pH-metrom. Proces pripreme potrebnih otopina prikazan je u **tablici 6**.

Tablica 5. Priprema natrij-fosfatnog pufera

pH	$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	Na_2HPO_4	H_2O
	$V \text{ (cm}^3\text{)}$	$V \text{ (cm}^3\text{)}$	$V \text{ (cm}^3\text{)}$
6,0	44,29	5,71	50
7,0	19,87	30,13	50
8,0	3,52	46,48	50

Tablica 6. Priprema otopina $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ i Na_2HPO_4

pH	$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ $c = 200 \text{ mmol dm}^{-3}$		Na_2HPO_4 $c = 200 \text{ mmol dm}^{-3}$	
	$m \text{ (g)}$	$V_{H_2O} \text{ (cm}^3\text{)}$	$m \text{ (g)}$	$V_{H_2O} \text{ (cm}^3\text{)}$
6,0	1,3799	50	0,2839	10
7,0	0,6900	25	0,9937	35
8,0	0,1380	5	1,4196	50

3.2.4. Priprema otopine supstrata

Otopina supstrata *p*-nitrofenil- β -D-glukopiranozida (*p*-NPG) za mjerenje aktivnosti enzima pripremljena je otapanjem *p*-NPG u puferu u koncentraciji od 1 mmol dm⁻³.

3.2.5. Priprema otopine natrijeva karbonata

Otopina natrijeva karbonata pripremljena je tako što je u 100ml destilirane vode otopljeno 2,12 g natrijeva karbonata. Molarna masa Na₂CO₃ iznosi 105,99 g mol⁻¹

3.2.6. Priprema DNS reagensa

DNS reagens pripremljen je otapanjem 10,9 g 3,5-dinitrosalicilne kiseline u 400 cm³ 0,5 mol dm⁻³ NaOH pri 60 °C. Zatim je postupno otopljen kalijev-natrijev tartarat (150 g). Otopina je potom prenesena u odmjernu tikvicu od 500 cm³. Nakon hlađenja, tikvica je nadopunjena do oznake. DNS reagens čuvan je na tamnom do korištenja.

3.3. Metode

3.3.1. Biološka obrada supstrata

Fermentacija na čvrstim nosačima provedena je u laboratorijskim staklenkama ukupnog volumena 650 cm³. U laboratorijske staklenke odvagano je 30 g pljevice ječma te je dodano 60 cm³ destilirane vode s ciljem provedbe korekcije početne vlažnosti supstrata na udio vlage od 70%. Uzorci su potom sterilizirani u autoklavu tijekom 15 minuta na 121 °C (ASTELL AMA270, Kent, Ujedinjeno Kraljevstvo) (**slika 9**).



Slika 9. Autoklav

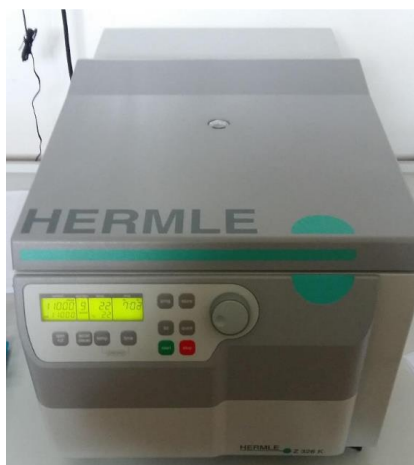
Nakon sterilizacije, uzorci su ohlađeni na sobnu temperaturu te inokulirani je s 5 micelijskih diskova *T. lanuginosus* na PDA agaru ($\varnothing = 1$ cm) suspendiranih u 5 cm³ sterilizirane destilirane vode. Za proizvodnju enzima β -glukozidaze, SSF proces je trajao 9 dana u inkubatoru (BINDER GmbH, KB 115, Njemačka) (**slika 10**) s ventilacijom postavljenom na 20 % i 45 °C. Ukupno je pripremljeno 20 laboratorijskih staklenki, za svaki dan fermentacije 2 laboratorijske staklenke.



Slika 10. Laboratorijski inkubator

3.3.2. Ekstrakcija enzima

Nakon fermentacije provedena je ekstrakcija β -glukozidaze. Za pripremu ekstrakta enzima, izvagano je 2 g biološki obrađenog uzorka u plastične kivete i dodano 10 cm^3 $0,1 \text{ mol/dm}^3$ citratnog pufera $\text{pH} = 7,0$. Ekstrakcija je provedena u trajanju od 15 minuta pri sobnoj temperaturi, a uzorci su miješani 30 sekundi svakih 5 minuta na vorteks miješalici (Vortex MX-S, DLAB Scientific, Kina). Nakon ekstrakcije uzorci su izbistreni centrifugiranjem pri 5 000 rpm (5 min, $20 \text{ }^\circ\text{C}$) (Z 326 K, Hermle Labortechnik GmbH, Njemačka) (**slika 11**). Dobiveni supernatant korišten je za određivanje aktivnosti β -glukozidaze.



Slika 11. Centrifuga

3.3.3. Mjerenje aktivnosti β -glukozidaze

Aktivnost β -glukozidaze mjerena je spektrofotometrijski (UV-1280 UV-VIS Spectrophotometer, Shimadzu, Japan) (slika 12) pri valnoj duljini $\lambda = 400$ nm testom fiksnog vremena (engl. "end point assay") uz supstrat *p*-NPG prema modificiranoj metodi Karpe i suradnika (Karpe i sur., 2017). Mjerenje je provedeno u tri paralele prema protokolu prikazanom u tablici 7.

Tablica 7. Slijed provedbe spektrofotometrijskog mjerenja aktivnosti β -glukozidaze

Reagensi	Slijepa proba	Glavna proba	Kontrola ekstrakta
supstrat	0,9 cm ³	0,9 cm ³	0,9 cm ³
ekstrakt enzima		0,1 cm ³	
vorteksiranje 10 sekundi, inkubacija 50 °C, 5 minuta			
Na ₂ CO ₃ (0,2 mol dm ³)	1,5 cm ³	1,5 cm ³	1,5 cm ³
ekstrakt enzima			0,1 cm ³
pufer	0,1 cm ³		
vorteksiranje 10 sekundi, spektrofotometrijsko mjerenje			

Volumna aktivnost β -glukozidaze izračunata je prema formuli:

$$V.A. = \frac{V_u}{\varepsilon \cdot d \cdot V_e} \cdot \frac{dA}{dt} \quad 1$$

gdje je:

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

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

V_e = volumen enzima u kiveti (cm^3)

ε = ekstinkcijski koeficijent ($4,9952 \text{ dm}^3 \text{ mmol cm}^{-1}$)

d = promjer kivete (1 cm)

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

Promjena apsorbancije u vremenu (dA/dt) izračunata je prema sljedećoj formuli:

$$\frac{dA}{dt} = \frac{(A_{GP} - A_{SP}) - (A_{KE} - A_{SP})}{t} \quad 2$$

gdje je:

A_{GP} = apsorbancija glavne probe

A_{SP} = apsorbancija slijepe probe

A_{KE} = apsorbancija kontrole ekstrakta

t = vrijeme (min)



Slika 12. Spektrofotometar

3.3.4. Određivanje suhe tvari

Udio suhe tvari u svim uzorcima određen je termogravimetrijskom metodom na uređaju za radijacijsko-infracrveno sušenje (HR-73, Mettler Toledo) primjenom standardne metode sušenja pri temperaturi od 105 °C kako slijedi: 2 ± 0,01 g uzorka odvagano je na aluminijsku pliticu uređaja te je provedeno sušenje do konstantne mase (gubitak mase od 1 mg u 50 s) (Planinić i sur. 2004). Određivanje suhe tvari za sve uzorke provedeno je u dvije paralelne probe.

3.3.5. Utjecaj pH vrijednosti na aktivnost β-glukozidaze

Za određivanje ovisnosti aktivnosti enzima o pH vrijednosti, provedena je proizvodnja enzima β-glukozidaze prema prethodno opisanom protokolu u trajanju od 8 dana. Nakon fermentacije, provedena je ekstrakcija enzima u različitim puferima. U ovom istraživanju korištena su dva različita pufera u različitom pH području. Natrij-citratni pufer pripremljen je u pH području od 3 do 6. Natrij-fosfatni pufer pripremljen je u pH području od 6 do 8. Supstrat korišten za mjerenje aktivnosti β-glukozidaze (*p*-NPG) otopljen je u koncentraciji od 0,1 mol dm⁻³ u navedenim puferima te je provedeno mjerenje aktivnosti β-glukozidaze prema prethodno opisanom protokolu.

3.3.6. Utjecaj temperature na aktivnost β -glukozidaze

Za određivanje ovisnosti aktivnosti enzima β -glukozidaze o temperaturi, provedena je proizvodnja enzima β -glukozidaze prema prethodno opisanom protokolu u trajanju od 8 dana. Nakon fermentacije, provedena je ekstrakcija enzima u natrij-fosfatnom puferu (pH = 6) prema prethodno opisanom protokolu. Supstrat korišten za mjerenje aktivnosti β -glukozidaze (*p*-NPG) otopljen je u koncentraciji od 0,1 mol dm⁻³ u natrij-fosfatnom puferu (pH = 6). Mjerenje aktivnosti enzima provedeno je prema protokolu opisanom u poglavlju 3. (**tablica 7**) u temperaturnom rasponu od 30 °C do 80 °C.

3.3.7. Utjecaj koncentracije supstrata na aktivnost β -glukozidaze

Za određivanje ovisnosti koncentracije *p*-NPG-a na aktivnost β -glukozidaze, pripremljene temeljne otopine supstrata u različitim početnim koncentracijama. Aktivnost enzima izmjerena je prema prethodno opisanom protokolu s koncentracijom supstrata u području od 0,25 mmol dm⁻³ do 15 mmol dm⁻³.

3.3.8. Utjecaj uvjeta skladištenja na aktivnost β -glukozidaze

Nakon proizvodnje enzima prema opisanom protokolu u trajanju fermentacije od 8 dana, sirovi enzimski ekstrakti skladišteni su na tri temperature (25 °C, 4 °C i -20 °C) te je tijekom 75 dana provedeno mjerenje aktivnosti enzima. Da bi se ispitao utjecaj zamrzavanja i odmrzavanja enzimskog ekstrakta na aktivnost β -glukozidaze, enzimski ekstrakti skladišteni su zasebno za pojedini dan mjerenja. Također, pripremljen je enzimski ekstrakt koji se na dan mjerenja odmrzavao i ponovno zamrzavao i skladištio do idućeg dana mjerenja.

3.3.9. Utjecaj povišene temperature na stabilnost β -glukozidaze

Za određivanje stabilnosti enzima β -glukozidaze pri povišenoj temperaturi provedeno je temperiranje enzimskog ekstrakta pri 50 °C i 60 °C. Aktivnost enzima mjerenja je tijekom 24 sata prema prethodno opisanom protokolu.

3.3.10. Saharifikacija lignoceluloznih sirovina pomoću enzimskog preparata iz *T. lanuginosus*

U ovom dijelu istraživanja provedena je saharifikacija odabranih lignoceluloznih sirovina (pljevica pira, bučina pogača i trop grožđa), katalizirane pomoću sirovog enzimskog preparata iz *T. lanuginosus*. U tu svrhu, provedena je proizvodnja enzima prema prethodno opisanom protokolu u trajanju od 8 dana. Nakon fermentacije, provedena je ekstrakcija enzima u natrij-fosfatnom puferu (pH = 6) prema prethodno opisanom protokolu. Pljevica pira, bučina pogača i trop grožđa sterilizirani su u autoklavu te je provedena hidroliza s različitom početnom masom lignocelulozne sirovine (1,5 g i 2 g). Enzimska hidroliza započeta je dodatkom 4 cm³ enzimskog pripravka uz istovremenu provedbu slijepa probe za koju je umjesto enzimskog pripravka korišten isti volumen pufera. Hidroliza je provedena u trajanju od 18 sati u vodenoj kupelji s trešnjom (150 rpm, 45 °C) (JULABO, SW22, Seelbach, Njemačka) (slika 13). Nakon saharifikacije, uzorci su centrifugirani 5 minuta na 5000 g te je u dobivenom supernatantu izmjerena koncentracija reducirajućih šećera.



Slika 13. Vodena kupelj

3.3.11. Analiza reducirajućih šećera DNS metodom

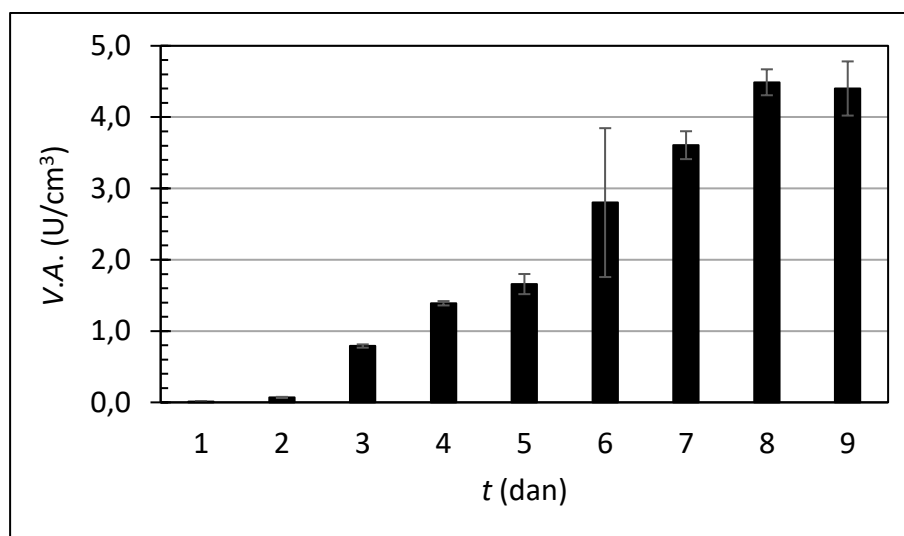
Koncentracija reducirajućih šećera mjerena je na slijedeći način: u staklenu epruvetu dodano je 0,1 cm³ uzorka i 1500 cm³ DNS reagensa. Nakon vorteksiranja, provedena je inkubacija u vodenoj kupelji 5 minuta pri 100 °C. Uzorci su ohlađeni tijekom 10 minuta u hladnoj vodenoj kupelji, vorteksirani te je izmjerena apsorbancija pri 540 nm nasuprot slijepa

probe. Slijepa proba pripremljena je na isti način uz dodatak $0,1 \text{ cm}^3$ pufera umjesto uzorka. Koncentracija reducirajućih šećera izračunata je iz baždarnog pravca. Za pripremu baždarnog pravca korištena je glukoza kao standard pripremljen u koncentraciji od $0,2$ do 1 mg cm^{-3} .

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Profil proizvodnje enzima β -glukozidaza tijekom fermentacije na čvrstim nosačima

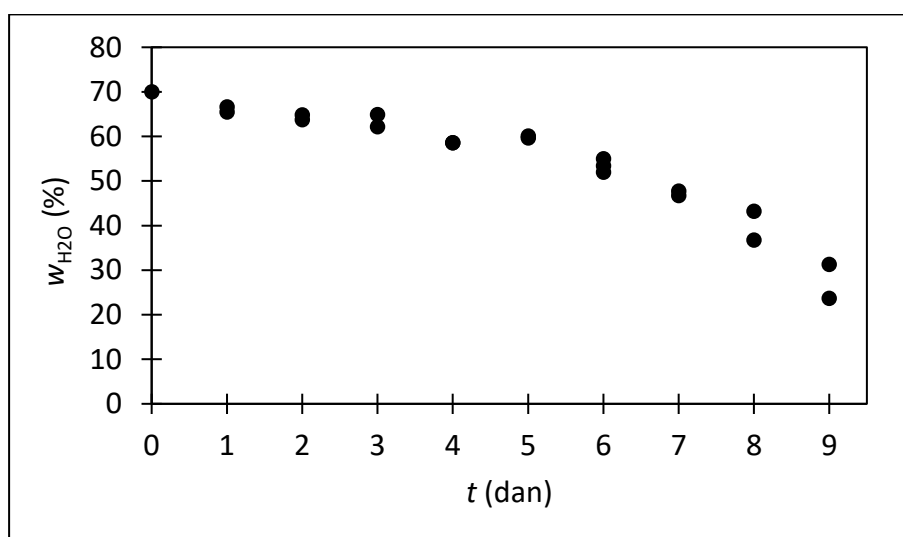
Proizvodnja enzima β -glukozidaze uzgojem gljive *T. lanuginosus* provedena je u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima na pljevici ječma u trajanju od 9 dana. Svakog dana, u vremenskom razmaku od 24h, uzimani su uzorci iz laboratorijskih staklenki te su pripremljeni ekstrakti u kojima je određena aktivnost enzima β -glukozidaze. Analize su provedene u dvije paralelne probe. Rezultati volumne aktivnosti β -glukozidaze tijekom uzgoja gljive *T. lanuginosus* na pljevici ječma prikazani su na **slici 14** kao srednja vrijednost dva mjerenja. Prema dobivenim rezultatima, maksimalna aktivnost β -glukozidaze zabilježena je nakon 8 dana fermentacije te je iznosila 4,49 U cm⁻³. U istraživanju koje su proveli Lin i sur. (1999) provedena je proizvodnja enzima β -glukozidaze submerznim uzgojem *T. lanuginosus*-SSBP uz dodatak grubo usitnjenog zrna kukuruza. Izmjerena aktivnosti β -glukozidaze nakon 7 dana fermentacije iznosila je 4,20 U cm⁻³.



Slika 14. Volumna aktivnost enzima β -glukozidaza tijekom uzgoja *T. lanuginosus* na pljevici ječma tijekom 9 dana fermentacije

4.1.1. Udio vlage supstrata tijekom proizvodnje β -glukozidaze

Budući da se uzgoj mikroorganizama na čvrstim nosačima provodi u okolini sa smanjenim udjelom vlage i bez prisutnosti slobodne vode, od velike je važnosti provesti monitoring udjela vlage supstrata tijekom procesa fermentacije. Udio vlage tijekom provedbe SSF procesa u ovisnosti je o početnom udjelu vode, o količini vode koja se oslobodi tijekom respiracije radnog mikroorganizma, o utrošenoj vodi tijekom metabolizma gljive kao i o vodi koja se gubi tijekom hidrolize složenih komponenti supstrata (poput polisaharida) te tijekom isparavanja (Nagel i sur., 2000). Iz navedenih razloga provedeno je mjerenje udjela vlage supstrata tijekom SSF procesa. Iz **slike 15** vidljivo je kako se udio vlage smanjivao tijekom fermentacije, te se udio vlage smanjio sa početnih 70% na 23,66%. Ovaj udio vlage nije dovoljan za rast gljive u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima te je iz navedenog razloga SSF proces zaustavljen nakon 9. dana. Također, smanjenje udjela vlage supstrata može opravdati smanjenje volumne aktivnosti β -glukozidaze prikazano u prethodnom poglavlju.

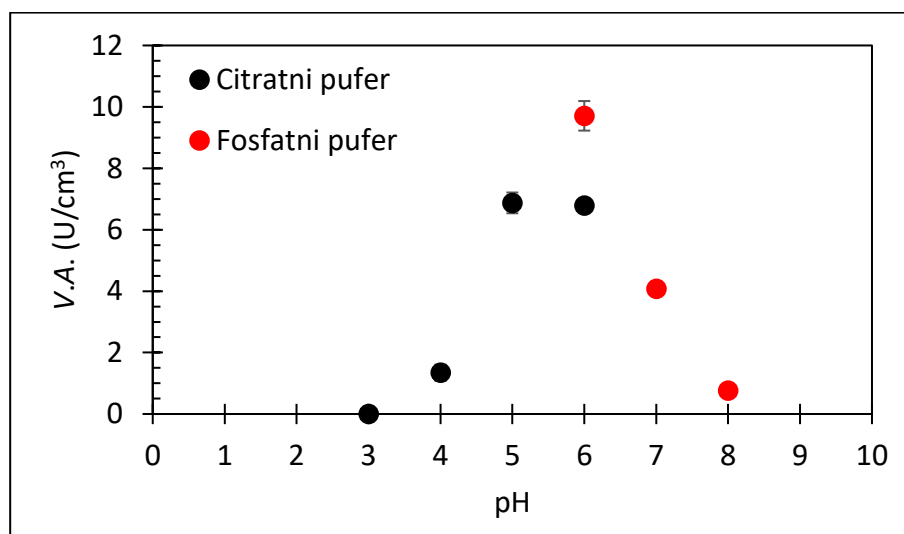


Slika 15. Promjena početnog udjela vlage supstrata tijekom fermentacije

4.2. Karakterizacija nepročišćene β -glukozidaze

4.2.1. Utjecaj pH vrijednosti reakcijskog medija na aktivnost β -glukozidaze

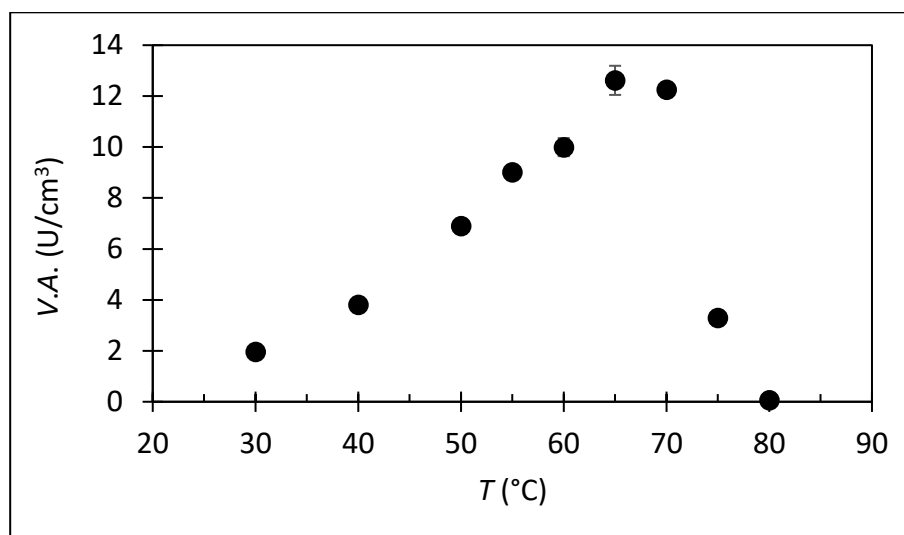
U svrhu ispitivanja utjecaja pH na aktivnost β -glukozidaze korišteni su natrij-citratni pufer u pH području od 3 do 6, te natrij-fosfatni pufer u pH području od 6 do 8. Prema dobivenim rezultatima prikazanih na **slici 16**, može se zaključiti da je najveća aktivnost β -glukozidaze ($9,7 \text{ U cm}^{-3}$) zabilježena primjenom natrij-fosfatnog pufera pri pH 6. Iz rezultata se može zaključiti da enzim β -glukozidaza pokazuje veću aktivnost u fosfatnom puferu nego u citratnom puferu pri istom pH. Prilikom povećanja ili sniženja pH dolazi do značajnog smanjenja aktivnosti β -glukozidaze te se može zaključiti da enzim nije stabilan u širokom rasponu pH. U istraživanju koje su proveli Lin i sur. (1999) provedena je proizvodnja enzima β -glukozidaze submerznim uzgojem *T. lanuginosus*-SSBP. Aktivnost enzima je bila najveća pri pH 6, a znatno se aktivnost smanjila pri pH 8.



Slika 16. Ovisnost aktivnosti enzima β -glukozidaza o pH

4.2.2. Utjecaj temperature na aktivnost β -glukozidaze

O ovom istraživanju ispitan je utjecaj temperature na volumnu aktivnost enzima β -glukozidaza u reakciji hidrolize supstrata *p*-nitrofenil- β -D-glukopiranozida. Prema rezultatima može se zaključiti da enzim β -glukozidaza pokazuje maksimalnu aktivnosti pri 65 °C te je ona iznosila 13 U cm⁻³ (Slika 17.). Daljnjim povećanjem temperature dolazi do smanjenja aktivnosti enzima. Povećanjem temperature za 10 °C rezultiralo je redukcijom enzimске aktivnosti za 80%. U istraživanju koje su proveli Lin i sur. (1999), najveća aktivnost enzima je zabilježena pri temperaturi od 65 °C, a već pri temperaturi od 75°C aktivnost enzima je opala za 83.3%.

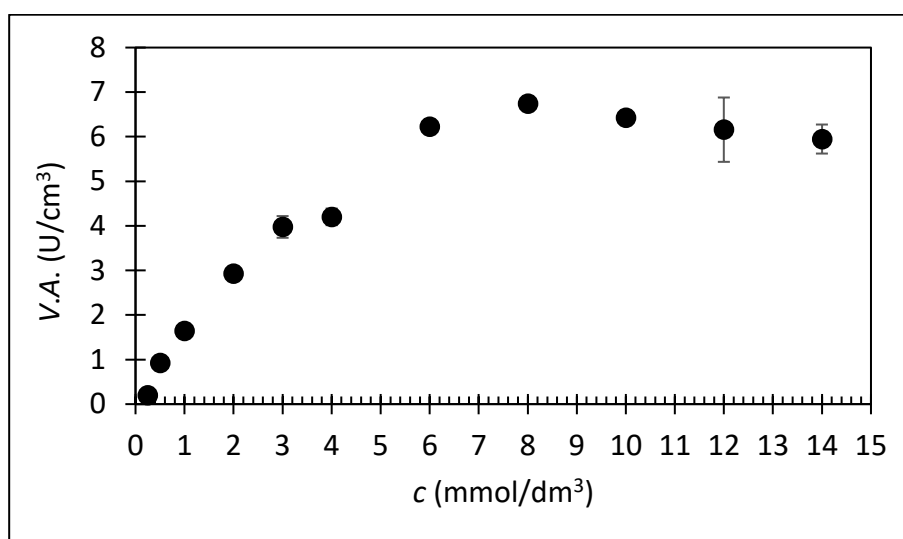


Slika 17. Ovisnost aktivnosti enzima β -glukozidaza o temperaturi

4.2.3. Utjecaj koncentracije supstrata na aktivnost β -glukozidaze

Za mjerenje aktivnosti enzima β -glukozidaze kao supstrat korišten je *p*-nitrofenil- β -D-glukopiranozid, glikozidni oblik molekule glukoze u kojoj je anomerni vodik zamijenjen 4-nitrofenilnom skupinom. U reakciji kataliziranoj pomoću enzima β -glukozidaze dolazi do hidrolize glikozidne veze uz otpuštanje molekule glukoze i *p*-nitrofenola koji daje karakteristično žuto obojenje. U ovom istraživanju ispitan je utjecaj koncentracije supstrata na aktivnost enzima β -glukozidaze u sirovom enzimskom ekstraktu. Prema rezultatima može se zaključiti da povećanje koncentracije supstrata do 8 mmol dm⁻³ rezultira povećanjem aktivnosti enzima (Slika 18.). Daljnjim povećanjem koncentracije supstrata dolazi do blagog

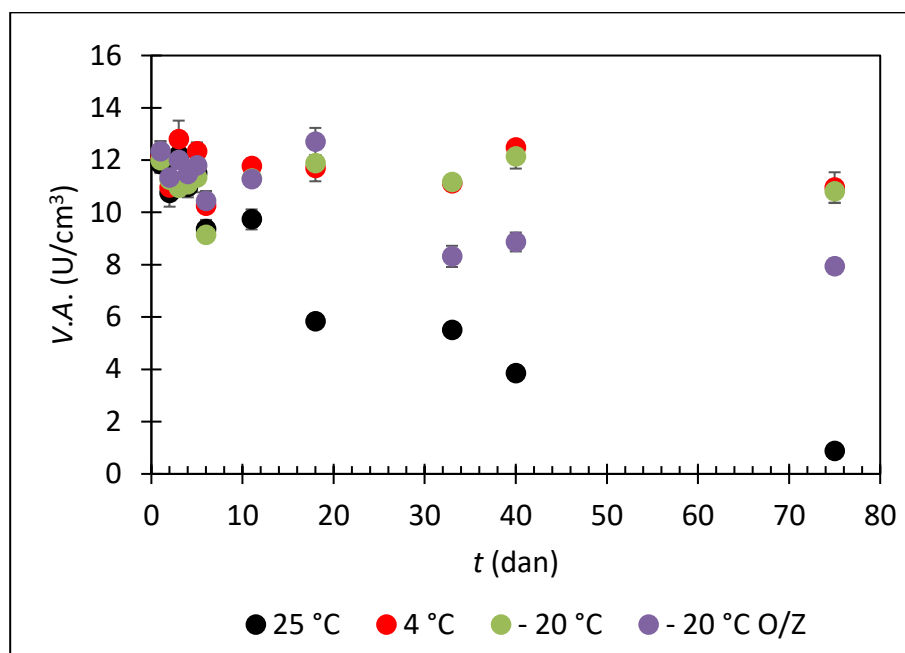
smanjenja aktivnosti β -glukozidaze. U navedenom slučaju, smanjenje aktivnosti enzima može biti posljedica inhibicije enzima supstratom ili inhibicijom jednog od produkata reakcije. U istraživanju kojega su proveli Lin i sur. (1999) dokazano je da prisutnost glukoze u koncentraciji od 4 mmol dm^{-3} u reakcijskom mediju može dovesti do smanjenja aktivnosti enzima β -glukozidaze za 70%. Navedene činjenice i rezultati mogu se povezati sa smanjenom aktivnosti enzima β -glukozidaze u sirovom enzimskom ekstraktu budući da u je u kemijskom sastavu pljevice ječme prisutna glukoza (Demirel i sur., 2018) koja može utjecati na aktivnost enzima.



Slika 18. Ovisnost aktivnosti enzima β -glukozidaza o koncentraciji supstrata (p -NPG)

4.2.4. Utjecaj uvjeta skladištenja na aktivnost β -glukozidaze

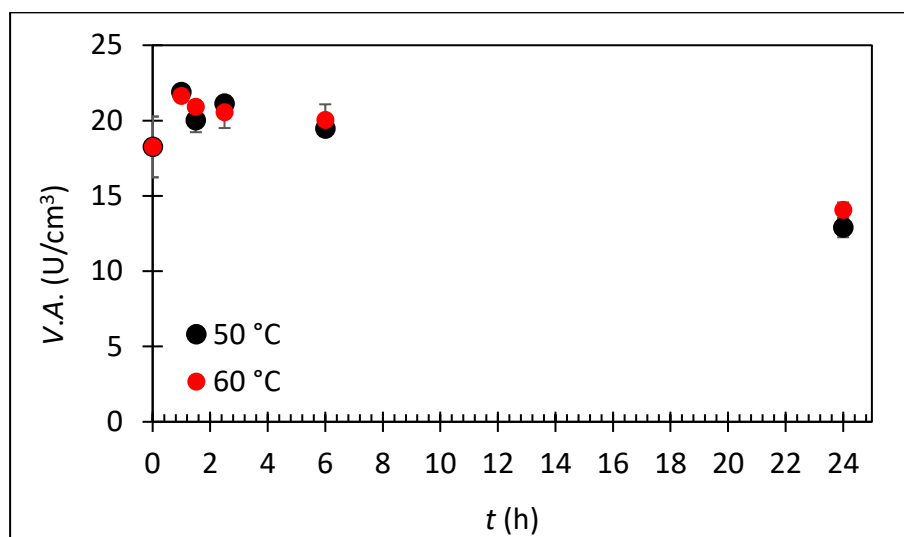
Stabilnost enzimskog ekstrakta, odnosno aktivnost enzima β -glukozidaze pri različitim temperaturama skladištenja ispitana je te prikazana kao rezidualna aktivnost na **slici 19**. Prema rezultatima može se zaključiti da se aktivnost β -glukozidaze smanjila s početnih 12 U cm^{-3} na 1 U cm^{-3} tijekom 75 dana skladištenja. Skladištenjem enzimskog preparata na 4°C i -20°C β -glukozidaza je zadržala početnu aktivnost. Međutim, uočen je negativni utjecaj smrzavanja i odmrzavanja enzimskog pripravka (rezultati označeni -20°C O/Z) na aktivnost β -glukozidaze što se može povezati sa mehaničkom denaturacijom enzima uslijed stvaranja kristala leda vode u okolini enzima, kao i u aktivnom mjestu enzima.



Slika 19. Rezidualna aktivnosti β -glukozidaze tijekom skladištenja

4.2.5. Utjecaj povišene temperature na aktivnost β -glukozidaze

Prema prethodno prikazanim rezultatima (poglavlje 4) enzim β -glukozidaza pokazuje najveću aktivnosti pri 65 °C. Da bi se ispitala operativna stabilnost β -glukozidaze, sirovi enzimski pripravak inkubiran je pri povišenim temperaturama (50 °C i 60 °C) u trajanju od 24 sata. Tijekom inkubacije periodično su izuzimani uzorci te je mjerena volumna aktivnost enzima. Rezultati su prikazani na **slici 20** iz kojih se može zaključiti da proizvedena β -glukozidaza pokazuje visoku operativnu stabilnost pri povišenoj temperaturi budući da je enzim zadržao 72% početne aktivnosti. Razlog visoke operativne stabilnosti enzima pri povišenim temperaturama leži u činjenici što je enzim proizveden iz termofilne gljive.

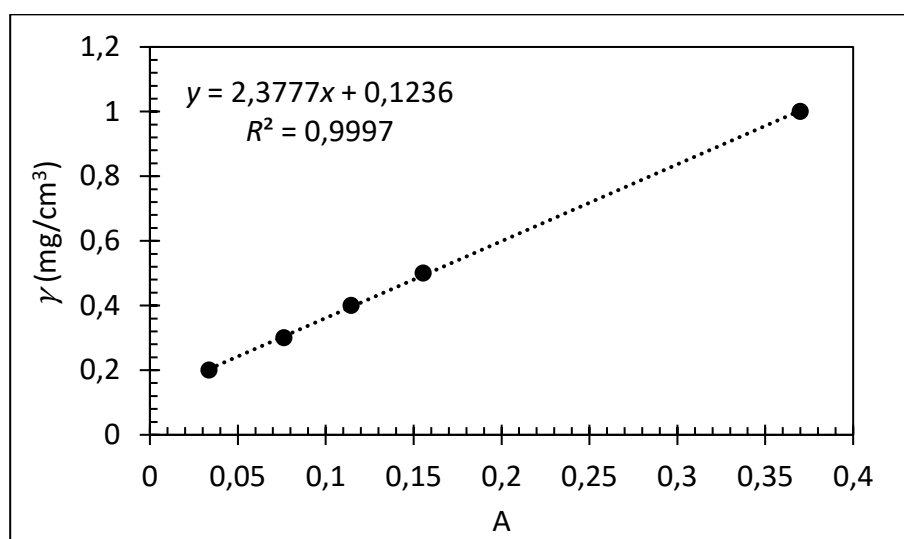


Slika 20. Rezidualna aktivnosti β -glukozidaze nakon inkubacije pri povišenim temperaturama

4.3. Saharifikacija odabranih lignoceluloznih sirovina nepročišćenim enzimskim preparatom

4.3.1. Kalibracijska krivulja za određivanje masene koncentracije reducirajućih šećera DNS metodom

Kalibracijska krivulja za određivanje masene koncentracije reducirajućih šećera prikazana je na slici 21.



Slika 21. Kalibracijska krivulja za izračunavanje masene koncentracije reducirajućih šećera u hidrolizatima

Prema dobivenim rezultatima ovisnosti apsorbancije o koncentraciji glukoze (**slika 21**) i primjenom metodom linearne regresije dobivena je jednadžba:

$$y = 2,3777 \cdot x + 0,1236 \quad 3$$

odnosno:

$$\gamma_R = 2,3777 \cdot A + 0,1236 \quad 4$$

gdje je:

γ_R = masena koncentracija reducirajućih šećera (mg cm^{-3})

A = apsorbancija uzorka (izmjerena pri valnoj duljini 540 nm)

Prema jednadžbi 4 izračunate su masene koncentracije reducirajućih šećera u hidrolizatima koje su preračunate na suhu tvar uzoraka prema navedenom izrazu:

$$C = \frac{\gamma_R \cdot V_e}{m_{LS} \cdot w_{st}} \cdot 100 \quad 5$$

gdje je:

C = maseni udio reducirajućih šećera u uzorku ($\text{mg g}_{\text{st}}^{-1}$)

γ_{R} = masena koncentracija reducirajućih šećera (mg cm^{-3})

V_{e} = volumen sirovog enzimskog preparata (cm^3)

m_{LS} = masa lignocelulozne sirovine (g)

w_{st} = udio suhe tvari lignocelulozne sirovine (%)

4.3.2. Koncentracija reducirajućih šećera dobivenih saharifikacijom pljevice pira, bučine pogače i tropa grožđa

Saharifikacija je proces u kojem se lignocelulozni materijali, točnije hemiceluloza i celuloza hidroliziraju na osnovne građevne jedinice (monosaharide, pentoze i heksoze) uz prisustvo katalizatora. Katalizator mogu biti enzimi kao i razrijeđene i koncentrirane kiseline. Tijekom hidrolize hemiceluloza se razgrađuje na smjesu šećera koju čine pentoze (ksiloza i arabinoza) i heksoze (galaktoza i manoz), a celuloza se razgrađuje na glukozu.

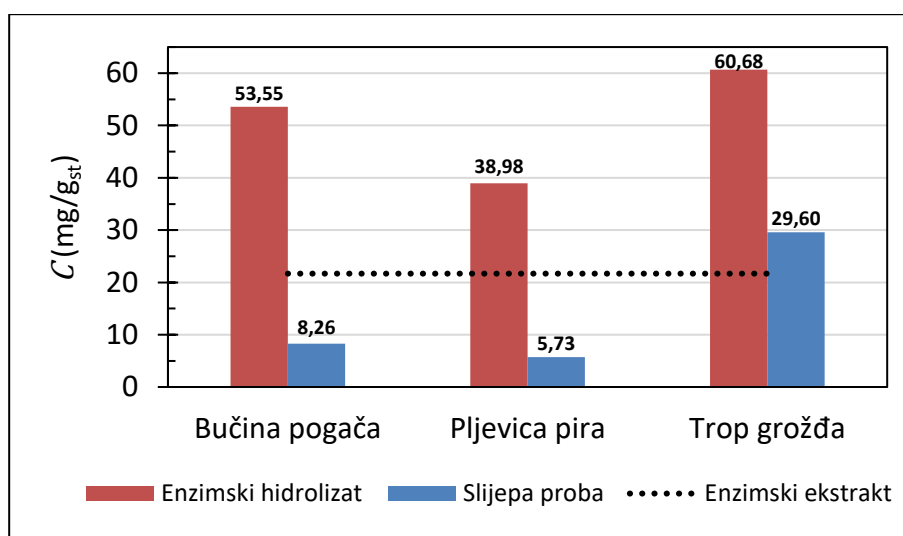
U ovom istraživanju ispitana je mogućnost saharifikacije tri različite lignocelulozne sirovine (bučina pogača, pljevica pira i trop grožđa) promjenom nepročišćenog enzimskog koktela dobiven uzgojem termofilne gljive *T. lanuginosus* s ciljem proizvodnje reducirajućih šećera. Saharifikacija je provedena enzimskom hidrolizom različite početne mase sirovine od 2 grama i 1,5 grama. Rezultati enzimske hidrolize 2 g lignocelulozne sirovine prikazani su na **slici 22**, a rezultati hidrolize s 1,5 g lignocelulozne sirovine prikazani su na **slici 23**. Tijekom provedbe enzimske hidrolize, usporedno je provedena slijepa proba u kojoj je umjesto enzimskog ekstrakta korišten isti volumen pufera.

Prema dobivenim rezultatima za bučinu pogaču, koncentracija reducirajućih šećera u slijepoj probi bila je $8,26 \text{ mg g}_{\text{st}}^{-1}$ (2 g sirovine) i $13,35 \text{ mg g}_{\text{st}}^{-1}$ (1,5 g sirovine). Nakon provedene

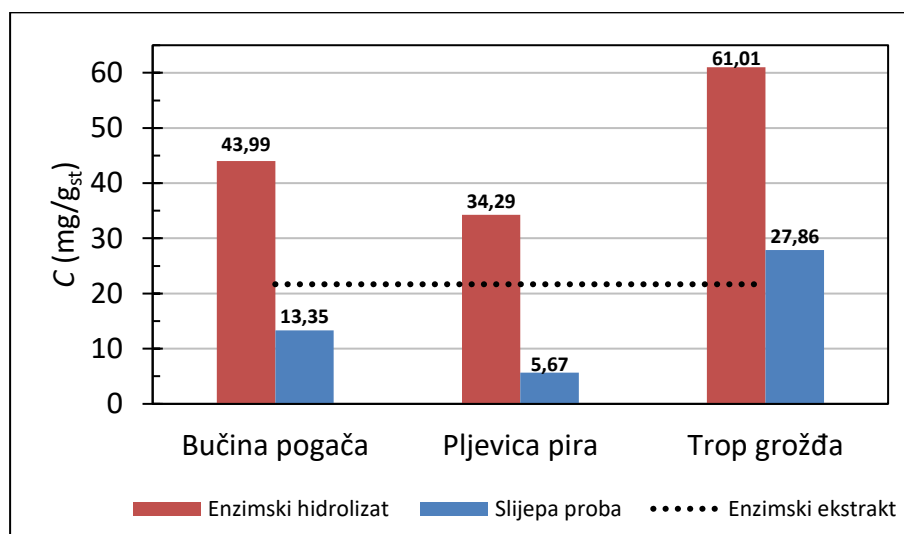
saharifikacije pomoću enzimskog koktela došlo je do povećanja koncentracije reducirajućih šećera na $53,55 \text{ mg g}_{\text{st}}^{-1}$ (2 g sirovine) i $43,99 \text{ mg g}_{\text{st}}^{-1}$ šećera (1,5 g sirovine).

Prema dobivenim rezultatima za pljevicu pira, koncentracija reducirajućih šećera u slijepoj probi bila je $5,73 \text{ mg g}_{\text{st}}^{-1}$ (2 g sirovine) i $5,67 \text{ mg g}_{\text{st}}^{-1}$ (1,5 g sirovine). Nakon provedene saharifikacije pomoću enzimskog koktela došlo je do povećanja koncentracije reducirajućih šećera na $38,98 \text{ mg g}_{\text{st}}^{-1}$ (2 g sirovine) i $34,29 \text{ mg g}_{\text{st}}^{-1}$ šećera (1,5 g sirovine).

Prema dobivenim rezultatima za trop grožđa, koncentracija reducirajućih šećera u slijepoj probi bila je $29,60 \text{ mg g}_{\text{st}}^{-1}$ (2 g sirovine) i $27,86 \text{ mg g}_{\text{st}}^{-1}$ (1,5 g sirovine). Nakon provedene saharifikacije pomoću enzimskog koktela došlo je do povećanja koncentracije reducirajućih šećera na $60,68 \text{ mg g}_{\text{st}}^{-1}$ (2 g sirovine) i $61,01 \text{ mg g}_{\text{st}}^{-1}$ šećera (1,5 g sirovine).



Slika 22. Maseni udio reducirajućih šećera u šećernom hidrolizatu nakon hidrolize 2 g lignocelulozne sirovine



Slika 23. Maseni udio reducirajućih šećera u šećernom hidrolizatu nakon hidrolize 1,5 g lignocelulozne sirovine

Najveći porast koncentracije reducirajućih šećera u hidrolizatu (6,80 puta) zabilježen je saharifikacijom 2 g pljevice pira. Povećanje koncentracije reducirajućih šećera u hidrolizatu saharifikacijom 2 g bučine pogače iznosio je 6,48 puta, te 2,05 puta saharifikacijom 2 g tropa grožđa. Izmjerene razlike u koncentracijama reducirajućih šećera mogu se povezati s kemijskim sastavom odabranih lignoceluloznih sirovina.

Karakteristike koje čine lignoceluloznu biomasu otpornom razgradnji su kristalna struktura celuloze, hemiceluloza koja je smještena između makro- i mikrofibrilne celuloze te lignin koji je odgovoran za strukturnu stabilnost i ispunjava prostor između hemiceluloze i celuloze (Šelo i sur., 2023). Nadalje, u istraživanjima koje su proveli Winger i sur. (2014), najveća aktivnost hidrolitičkih enzima iz *T. lanuginosus* izmjerena je za enzime α -galaktozidaza, β -ksilanaza i β -glukozidaza te β -ksilozidaza, α -arabinozidaza i β -manozidaza bitnih za proces saharifikacije hemiceluloze. Prema literaturnim podacima, udio hemiceluloze u pljevici pira iznosi 24,28%, u bučinoj pogači 6,69% te 8,55% za trop grožđa (Budžaki i sur., 2018; de Barros i sur., 2019; Šelo i sur., 2023). Navedene činjenice mogu objasniti rezultate dobivene za

saharifikaciju pljevice pira u ovom istraživanju budući da ona, od svih ispitanih materijala, sadrži najveći udio hemiceluloze.

Najmanji porast koncentracije reducirajućih šećera primjenom tropa grožđa kao lignocelulozne sirovine može se povezati sa činjenicom da je zabilježena najveća koncentracija šećera u slijepoj probi za trop grožđa. Visoka koncentracija slobodnih šećera može djelovati inhibicijski na aktivnost hidrolitičkih enzima. U istraživanju koje su proveli Rohman i sur. (2018) dokazan je inhibitori učinak produkata hidrolize hemiceluloze (arabinoza i ksiloza) na hidrolitičke enzime. Osim reducirajućih šećera, trop grožđa u svom kemijskom sastavu ima značajno veći udio lignina (31,35%) u odnosu na bučinu pogaču (0,74%), i pljevicu pira (14,77%) (Budžaki i sur., 2018; de Barros i sur., 2019; Šelo i sur., 2023). Budući da lignin svojom kompleksnom polimernom strukturom omeđuje hemicelulozu i celulozu, udio lignina u sirovini značajno utječe na tijek i iskorištenje procesa saharifikacije, što je izravno utjecalo na rezultate u ovom istraživanju. Iz tog razloga, da bi se osiguralo maksimalno iskorištenje procesa saharifikacije te povećao prinos reducirajućih šećera u hidrolizatu, prije enzimske hidrolize potrebno je provesti odgovarajuću predobradu lignocelulozne sirovine kako bi se uklonila ligninska barijera i razbila kristalna struktura celuloze (Capolupo i Faraco, 2016). Prilikom odabira metode za predobradu lignocelulozne sirovine bitno je uzeti u obzir i potencijalne derivate koji nastaju tijekom predobrade (poput furana, alifatskih kiselina i aromatskih spojeva) koji mogu djelovati inhibitori na hidrolitičke enzime (Hidayatullah i sur., 2020). Kumar i sur. (2017) su proveli proces saharifikacije lignoceluloznih sirovina na tri načina, bez predobrade i uz predobradu pomoću natrijeva hidroksida i vodikova peroksida. Najveća koncentracija šećera izmjerena je kod sirovina koje su bile tretirane s vodikovim peroksidom. Razlog leži u činjenici što vodikov peroksid utječe na razgradnju lignina i posljedično nastaje veća količina šećera tijekom saharifikacije. Osim toga, tijekom tretmana s vodikovim peroksidom došlo je do manje akumulacije toksičnih spojeva u odnosu na tretman sa NaOH. Navedena sinergija kemijske i biološke obrade lignocelulozne sirovine smanjila bi formiranje toksičnih spojeva i povećala prinos proizvodnje šećera enzimskom saharifikacijom.

5. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobivenih eksperimentalnih podataka doneseni su sljedeći zaključci:

- ✓ Dokazana je mogućnost proizvodnje β -glukozidaze uzgojem *T. lanuginosus* na pljevici ječma kao supstratu koji predstavlja nusprodukt prehrambene industrije.
- ✓ Maksimalna aktivnost β -glukozidaze (V.A. = 4,49 U/mL) izmjerena je nakon 8. dana fermentacije.
- ✓ Enzim pokazuje optimalnu aktivnost pri pH 6 i $T = 65\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- ✓ Proizvedeni enzimski pripravak stabilan je pri temperaturama skladištenja od $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, te pri povišenim temperaturama ($T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $T = 65\text{ }^{\circ}\text{C}$)
- ✓ Najveći prinos u proizvodnji reducirajućih šećera postignut je u pokusu enzimske saharifikacije 2 grama pljevice pira ($38,98\text{ mg g}_{\text{st}}^{-1}$).

6. LITERATURA

- Adapa P, Tabil L, Schoenau G: Compaction characteristics of barley, canola, oat and wheat straw. 2nd International Conference on Cognitive Computing and Information Processing, CCIP 2016
- Barrios-González J: Solid-state fermentation: physiology of solid medium, its molecular basis and applications. *Process Biochemistry* 47(2):175-185, 2012.
- Budžaki S, Strelec I, Krnić M, Alilović K, Tišma M, Zelić, B: Proximate analysis of cold-press oil cakes after biological treatment with *Trametes versicolor* and *Humicola grisea*. *Engineering in Life Sciences* 18(12):924-931, 2018.
- Capolupo L, Faraco V: Green methods of lignocellulose pretreatment for biorefinery development. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100:9451-9467, 2016.
- de Barros RDRO, Becarelli P, de Oliveira RA, Tognotti L, da Silva Bon EP: *Triticum spelta* straw hydrothermal pretreatment for the production of glucose syrups via enzymatic hydrolysis. *Biochemical Engineering Journal* 151:107340, 2019.
- Demirel F, Germec M, Coban HB, Turhan I: Optimization of dilute acid pretreatment of barley husk and oat husk and determination of their chemical composition. *Cellulose* 25:6377-6393, 2018.
- Durand A: Bioreactor designs for solid state fermentation, *Biochemical Engineering Journal* 13:113-125, 2003.
- Gandia A, van den Brandhof JG, Appels FV, Jones MP: Flexible fungal materials: shaping the future. *Trends in Biotechnology* 39(12):1321-1331, 2021.
- Hrgović S: Osnove agrotehnike proizvodnje: ječma, zobi i raži; *Glasnik zaštite bilja* 1/2006, 2006.
- Laine C: Structures of hemicelluloses and pectins in wood and pulp. Helsinki University of Technology, 2005.
- Lareo C, Sposito AF, Bossio AL, Volpe DC: Characterization of growth and sporulation of *Mucor bacilliformis* in solid state fermentation on an inert support. *Enzyme and Microbial Technology* 38(3-4):391-399, 2006.
- Lin J, Pillay B, Singh S: Purification and biochemical characteristics of β -D-glucosidase from a thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*-SSBP. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 30(1):81-87, 1999.
- Mitchell DA, Berovič M, Krieger N. Solid-state fermentation bioreactor fundamentals: Introduction and overview (pp. 1-12). *Springer Berlin Heidelberg* 2006.
- Palonen H, Viikari L: Role of oxidative enzymatic treatments on enzymatic hydrolysis of softwood. *Biotechnology and Bioengineering* 86(5):550-557, 2004.

- Pandey A, Thomas L, Larroche C: Current developments in solid-state fermentation; *Biochemical Engineering Journal* 81:146-161, 2013.
- Pandey A: Solid-state fermentation; *Biochemical Engineering Journal* 13:81-84, 2003.
- Šelo G, Planinić M, Tišma M, Martinović J, Perković G, Bucić AK: Bioconversion of grape pomace with *Rhizopus oryzae* under solid-state conditions: Changes in the chemical composition and profile of phenolic compounds. *Microorganisms* 11:956, 2023.
- Šelo G, Planinić M, Tišma M, Tomas S, Koceva DK, Bucić AK: A Comprehensive Review on Valorization of Agro-Food Industrial Residues by Solid-State Fermentation. *Foods* 2021, 10, 927
- Šibalić D, Šalić A, Tušek AJ, Sokač T, Brekalo K, Zelić B, Tran NN, Hessel V, Tišma M: Sustainable production of lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Process optimization and enzyme characterization. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 59(48):21144-21154, 2020.
- Singh S, Madlala AM, Prior BA: *Thermomyces lanuginosus*: properties of strains and their hemicellulases. *FEMS Microbiology Reviews* 27:3-16, 2003.
- Thomas, L., Larroche, C., Pandey, A. (2013) Current developments in solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* 81, 146– 161.
- Tišma M, Žnidaršič-Plazl P, Šelo G, Tolj I, Šperanda M, Bucić-Kojić A, Planinić M: *Trametes versicolor* in lignocellulose-based bioeconomy: State of the art, challenges and opportunities. *Bioresource Technology* 330:124997, 2021.
- Zeko-Pivač A, Bošnjaković A, Planinić M, Parlov-Vuković J, Novak P, Jednačak T, Tišma M: Improvement of the Nutraceutical Profile of Brewer's Spent Grain after Treatment with *Trametes versicolor*. *Microorganisms* 2022, 10, 2295
- Zhou Y, Wang L, Wu T, Tang X, Pan S: Optimal immobilization of β -glucosidase into chitosan beads using response surface methodology. *Electronic Journal of Biotechnology* 16(6):6-6, 2013.
- Živković M: Agrotehnika uzgoja ječma (*Hordeum vulgare* L.). *Završni rad*. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet; 2015.