

Proizvodnja i karakterizacija enzima ksilanaza uzgojem *Thermomyces lanuginosus* na pljevici ječma

Mamuzić, Davor

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:109:770811>

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

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

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Davor Mamuzić

Proizvodnja i karakterizacija enzima ksilanaza uzgojem
***Thermomyces lanuginosus* na pljevici ječma**

Diplomski rad

Osijek, rujan 2023.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

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 RAD

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 ksilanaza uzgojem *Thermomyces lanuginosus* na pljevici ječma

Davor Mamuzić, 0011167246

Sažetak:

U ovom radu je istraživana mogućnost proizvodnje ksilanaze tijekom devet dana uzgoja *Thermomyces lanuginosus* na pljevici ječma. Najveća volumna aktivnost ksilanaze ($V.A. = 3642 \text{ U cm}^{-3}$) postignuta je nakon osam dana. Ispitana je ovisnost aktivnosti enzima o pH i temperaturi, pri čemu je dokazano da ksilanaza pokazuje maksimalnu aktivnost pri $\text{pH} = 6$ i $T = 75 \text{ }^\circ\text{C}$. Dodatno, mjerena je stabilnost sirovog ekstrakta ksilanaze pri $T = 50$ i $60 \text{ }^\circ\text{C}$ tijekom 24 sata, te stabilnost enzima tijekom 75 dana skladištenja pri $T = -20, 4$ i $20 \text{ }^\circ\text{C}$. S ciljem ispitivanja uspješnosti proizvedenog sirovog enzimskog preparata u hidrolizi različitih lignoceluloznih materijala, proveden je šaržni proces hidrolize pljevice pira, bučine pogače i tropa grožđa tijekom 18 sati pri čemu je mjerena koncentracija reducirajućih šećera u šećernom hidrolizatu. Dokazano je da je najveća koncentracija reducirajućih šećera ($c = 61,01 \text{ mg g}^{-1}$) dobivena hidrolizom tropa grožđa.

Ključne riječi: ksilanaza, *Thermomyces lanuginosus*, pljevica ječma, saharifikacija, lignocelulozni materijali

Rad sadrži: 35 stranica

22 slike

4 tablice

18 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: 29. 9. 2023.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

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 THESIS

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 xylanase by cultivation of *Thermomyces lanuginosus* on barley husk

Davor Mamuzić, 0011167246

Summary:

In this work, the possibility of xylanase production by *Thermomyces lanuginosus* on barley husk during a nine-day cultivation was explored. The highest volume activity of xylanase ($V.A. = 3642 \text{ U cm}^{-3}$) was reached after 8 days. The dependence of enzyme activity on pH and temperature was tested, showing that xylanase had maximum activity at pH 6 and temperature 75 °C. In addition, the stability of the xylanase crude extract was measured at different temperatures ($T = 50$ and 60 °C) during 24 hours. The stability of the enzyme was also measured during storage at temperatures ($T = -20, 4$ and 20 °C) for 75 days. To test the success of the prepared crude enzyme preparation in hydrolyzing lignocellulosic materials, a batch process was carried out to hydrolyze spelt chaff, pumpkin pomace, and grape pomace for 18 hours, during which the concentration of reducing sugars in the sugar hydrolysate was measured. It was found that the highest concentration of reducing sugars ($c = 61,01 \text{ mg g}_{\text{st}}^{-1}$) was obtained in the hydrolysis of grape pomace.

Key words: xylanase, *Thermomyces lanuginosus*, barley husk, saccharification, lignocellulosic materials

Thesis contains: 35 pages
22 figures
4 tables
18 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>Daliborka Koceva Komlenić</i> , PhD, Full prof. | stand-in |

Defense date: 29. 9. 2023.

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

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. Pljevica ječma	4
2.2. <i>Thermomyces lanuginosus</i>	6
2.2.1. Ksilanaza	6
2.3. Fermentacija na čvrstim nosačima	7
3. EKSPERIMENTALNI DIO	9
3.1. Zadatak	10
3.2. Materijali i metode	10
3.2.1. Supstrat i mikroorganizam	10
3.2.2. Kemikalije	10
3.2.3. Priprema pufera	11
3.2.4. Priprema otopine supstrata	12
3.2.5. Priprema otopine natrijeva karbonata	12
3.2.6. Priprema DNS reagensa	12
3.3. Analitičke metode	12
3.3.1. Biološka obrada supstrata	12
3.3.2. Ekstrakcija ksilanaze	14
3.3.3. Određivanje aktivnosti ksilanaze	16
3.3.4. Određivanje suhe tvari	17
3.3.5. Utjecaj pH vrijednosti na aktivnost ksilanaze	17
3.3.6. Utjecaj temperature na aktivnost ksilanaze	17
3.3.7. Utjecaj koncentracije supstrata na aktivnost ksilanaze	17
3.3.8. Utjecaj uvjeta skladištenja na aktivnost ksilanaze	18

3.3.9. Utjecaj povišene temperature na stabilnost ksilanaze	18
3.3.10. Saharifikacija lignoceluloznih sirovina pomoću enzimskog preparata iz <i>T. lanuginosus</i>	18
3.3.11. Analiza reducirajućih šećera DNS metodom	19
4. REZULTATI I RASPRAVA	20
4.1. Aktivnost enzima ksilanaze tijekom fermentacije na čvrstim nosačima	21
4.1.1. Udio vlage supstrate tijekom proizvodnje ksilanaze	21
4.2. Karakterizacija nepročišćene ksilanaze	22
4.2.1. Utjecaj pH vrijednosti reakcijskog medija na aktivnost ksilanaze.....	22
4.2.2. Utjecaj temperature na aktivnost ksilanaze	23
4.2.3. Utjecaj koncentracije supstrata na aktivnost ksilanaze	24
4.2.4. Utjecaj uvjeta skladištenja na aktivnost ksilanaze.....	25
4.2.5. Utjecaj povišene temperature na aktivnost ksilanaze.....	25
4.3. Saharifikacija odabranih lignoceluloznih sirovina nepročišćenim enzimskim preparatom.....	26
4.3.1. Kalibracijska krivulja za određivanje masene koncentracije reducirajućih šećera DNS metodom.....	26
4.3.2. Koncentracija reducirajućih šećera dobivenih saharifikacijom lignoceluloznih sirovina	28
5. ZAKLJUČCI	31
6. LITERATURA	33

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 (mg g^{-1})
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. <i>Potato dextrose agar</i> (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

Ječam je plod jednogodišnje ili dvogodišnje biljke koja se ubraja u jedne od najstarijih žitarica u Europi. Zrno ječma je najčešće obraslo pljevicama koje predstavljaju nusprodukt koji nastaje prilikom proizvodnje proizvoda od ječma. Pljevica je po kemijskom sastavu lignocelulozni materijal koji sadrže visoke koncentracije bioaktivnih spojeva. Može se koristiti kao dodatak stočnoj hrani, u obradi poljoprivrednog tla, građevinarstvu i slično. Međutim, pljevica se može koristiti kao supstrat za uzgoj mikroorganizama u svrhu proizvodnje visokovrijednih proizvoda, poput, primjerice, enzima (Živković, 2015.).

Thermomyces lanuginosus je termofilna gljiva koja je otporna na visoke temperature i stabilna je pri širokom rasponu pH. U prirodi se ova gljiva najčešće pojavljuje u kompostu i zemlji, gdje sudjeluje u razgradnji biomase. Razgradnjom te biomase, odnosno lignoceluloznog materijala, *T. lanuginosus* proizvodi različite enzime, od kojih je jedan od najznačajnijih ksilanaza (Singh i sur., 2003.).

Ksilanaza je enzim koji se može proizvesti iz nekoliko različitih mikroorganizama. Kao takva, ksilanaza iz različitih izvora može imati različita fizikalno-kemijska svojstva, različitu strukturu, pa tako i različitu primjenu u različitim industrijama. Danas je ksilanaza pronašla svoje mjesto u industriji proizvodnje celuloze i papira, tekstilnoj i farmaceutskoj industriji. Ksilanaza se također koristi u proizvodnji hrane i pića, te u ishrani životinja (Beg i sur., 2001.).

Cilj ovog rada bio je:

- a) Proizvesti enzim ksilanazu uzgojem *Thermomyces lanuginosus* na pljevici ječma tijekom 9 dana fermentacije na čvrstim nosačima. Odrediti dan nakon kojeg se postiže najveća volumna aktivnost enzima te proizvesti dovoljan volumen sirovog enzimskog pripravka za daljnju karakterizaciju.
- b) Provesti karakterizaciju enzima (odrediti optimalni pH i T , te mjeriti utjecaj različitih temperatura skladištenja na stabilnost enzima tijekom vremena).
- c) Testirati uspješnost enzima u procesima hidrolize različitih lignoceluloznih materijala (bučine pogače, pljevice pira i tropa grožđa) korištenjem nepročišćenog enzimskog koktela kao biokatalizatora.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Pljevica ječma

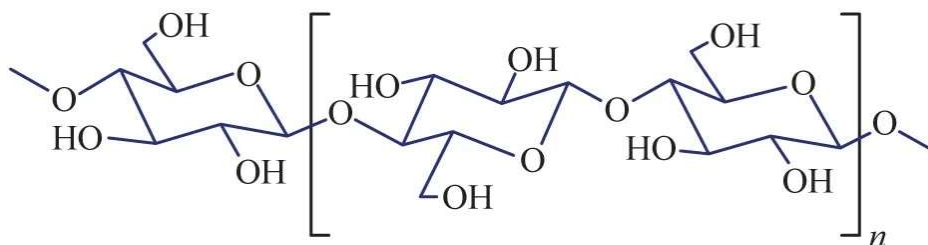
Ječam (*Hordeum vulgare*) spada u skupinu strnih žitarica. Uzgaja se za potrebe stočarske proizvodnje, te za potrebe proizvodnje piva. Za te dvije različite upotrebe uzgajaju se dvije različite vrste ječma. Ječam namijenjen za stočnu ishranu ima veći prinos u odnosu na pivarski ječam (Hrgović, 2006.).

Prema površinama na kojima je posijan, ječam zauzima četvrto mjesto u svijetu nakon pšenice, kukuruza i riže. Osjetljiv je na kiselost pa mu najbolje odgovaraju neutralne i slabo alkalne vrste tla. Otporniji je na sušu u odnosu na pšenicu, ali je osjetljiviji na niske temperature (Kovačević i sur., 2014.).

Ječam je samooplodna biljka građena od korijena, stabljike, lista, klasa i ploda. Plod ječma je zrno s kojim su srasle pljevice. Prilikom obrade ječma u svrhu primjene u prehrambenoj industriji, pljevice se odvajaju od zrna i tretiraju se kao otpad (Živković, 2015.).

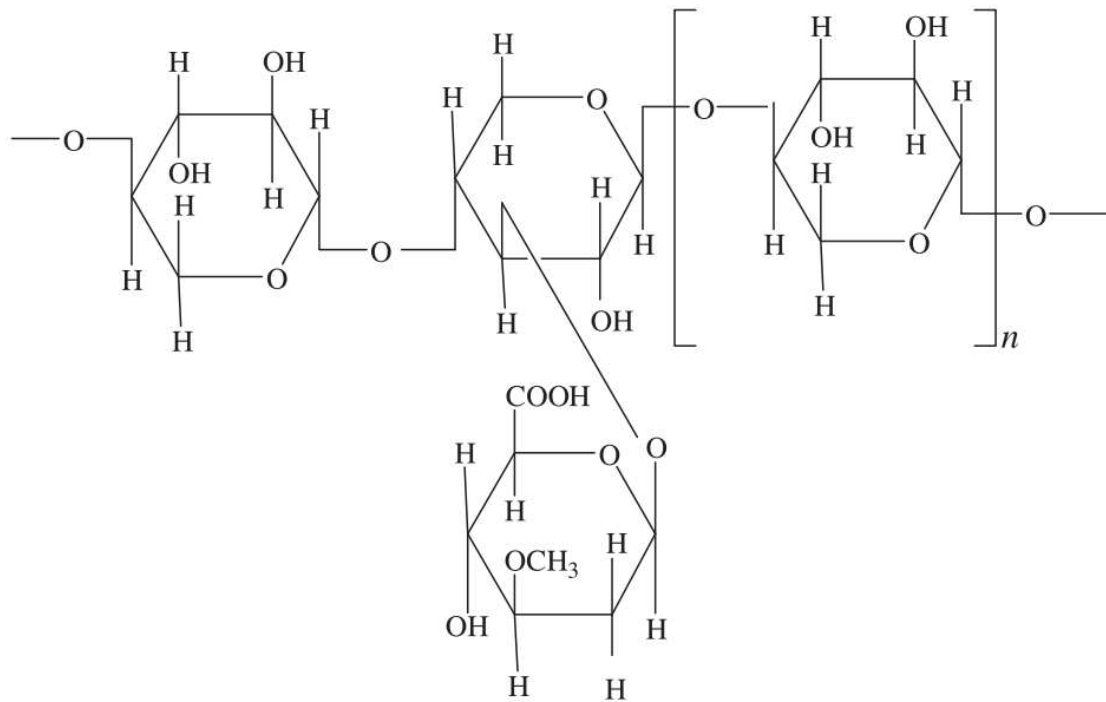
Pljevica ječma ima jedinstvenu kemijsku strukturu. Bogata je bioaktivnim komponentama poput arabinoksilana i β -glukana, a budući da je lignocelulozni materijal, čine je tri prirodna polimera: celuloza, hemiceluloza i lignin (Mariona Martínez-Subirà, 2021.).

Celuloza $(C_6H_{10}O_5)_n$ je kompleksan polimer sastavljen od glukoznih jedinica povezanih β -glukozidnim vezama (**slika 1**). Ona je glavni sastojak staničnih stijenki biljaka i netopljiva je u vodi i organskim otapalima. Primjena celuloze je u današnje vrijeme široka, od proizvodnje papira, pa sve do proizvodnje lakova i ljepila. Celuloza se najčešće proizvodi iz lignoceluloznih materijala primjenom kiselinske hidrolize (Kragić, 2021.).



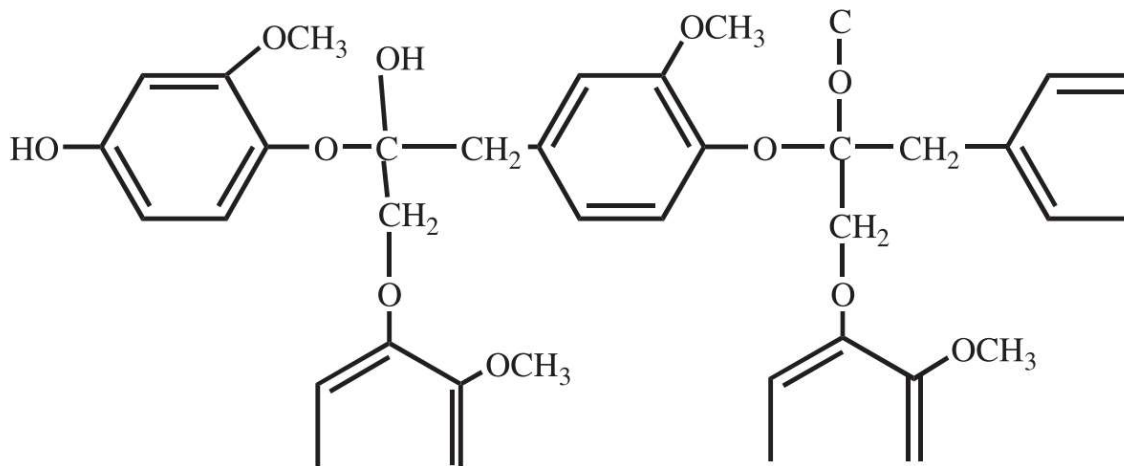
Slika 1. Kemijska struktura celuloze (Encyclopedia Britannica, 10. 9. 2023.)

Hemiceluloza (**slika 2**) je polimer koji je građen od više različitih šećera poput glukoze, ksiloze, galaktoze, arabinoze i manoze. Uloga hemiceluloze je da služi kao punilo između celuloze i lignina. Lakše ju je hidrolizirati nego celulozu i zbog toga je u lignoceluloznom materijalu u svrhu njihove primjene u lignoceluloznim biorafinerijama, poželjniji veći udio hemiceluloze (Reddy i sur., 2005.).



Slika 2 Kemijska struktura hemiceluloze (Alam i sur., 2014.)

Lignin (**slika 3**) je kompleksni, u vodi netopljivi polimer. Građen je od fenilpropana (**slika 3**) i uloga mu je poboljšanje čvrstoće biljnih stanica. Vlakna s visokim udjelom lignina su gruba, kruta i imaju smečkastu boju koja se ne može izbjeliti korištenjem uobičajenih oksidirajućih sredstava za izbjeljivanje (Reddy i sur., 2005.).



Slika 3. Kemijska struktura lignina (Reddy i sur., 2005.)

2.2. *Thermomyces lanuginosus*

Thermomyces lanuginosus, poznata kao i *Humicola lanuginosa*, široko je rasprostranjena gljiva koja se najčešće izolira iz organskih tvari u raspadu. Prvi put je izolirana 1899. godine iz krumpira koji je termostatiran na temperaturi od 52-53 °C. Termofilne gljive mogu rasti i na temperaturama do 60 °C, a na temperaturama nižim od 20 °C ne mogu opstati. Zbog toga su enzimi koje one proizvode stabilniji pri povišenim temperaturama od enzima mezofilnih mikroorganizama (Singh i sur., 2003.).

Osim termostabilnosti, *Thermomyces lanuginosus* je stabilna i pri širokom rasponu pH vrijednosti, pa bi se moglo pretpostaviti da su i enzimi koje ona proizvodi stabilni pri različitim pH vrijednostima. Smatra se da je ova gljiva dobar proizvođač ksilanaze (Torre i sur., 2021.) te β-glukozidaze, maltaze, lipaze i proteaze (Jensen i sur., 2002.).

2.2.1. Ksilanaza

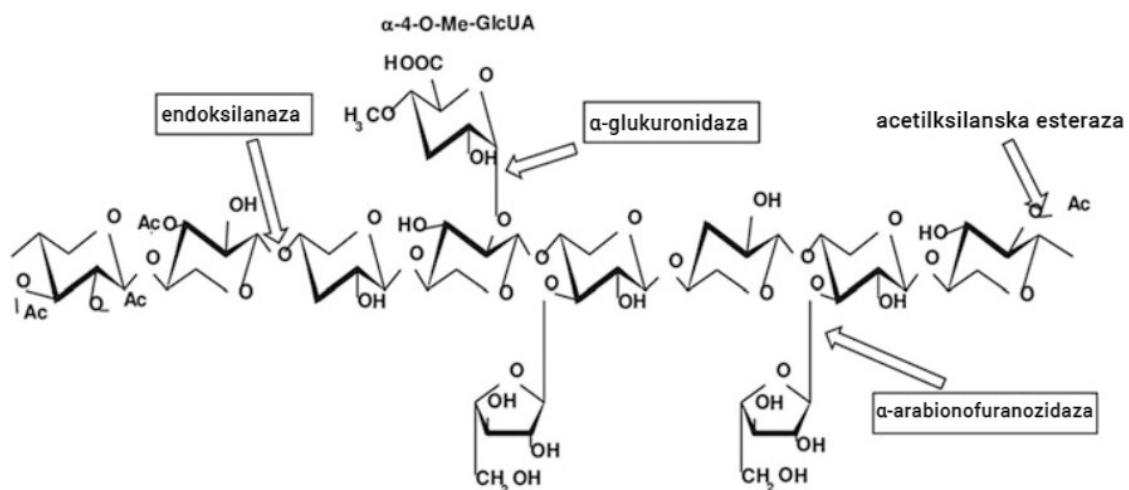
Ksilan je drugi najsloženiji polisaharid pored celuloze, za čiju je razgradnju potrebno nekoliko različitih enzima, od kojih je najznačajnija ksilanaza (Beg i sur., 2001.).

Ksilanaza (slika 4) je enzim koji katalizira hidrolizu β-1,4 glikozidne veze pri čemu dolazi do oslobađanja ksiloze. Ksilanaze se mogu pronaći u raznim organizmima, od bakterija,

termofilnih i mezofilnih gljiva, do protozoa, puževa, insekata, algi i biljaka. Najzastupljenije su u gljivama, a neke od najznačajnijih izvora su: *Thermomyces lanuginosus*, *Aspergillus niger*, *Cephalosporium paradoxa*, *Aspergillus ochraceus*, *Thermoderma harzianum* (Franolić, 2021.).

Ksilanaza je po strukturi jednolančani glikoprotein. Postoji nekoliko različitih vrsta ksilanaza, a s obzirom na molekularnu masu i izoelektričnu točku, ksilanaze se dijele na visokomolekularne ksilanaze s niskom izoelektričnom točkom i niskomolekularne ksilanaze s visokom izoelektričnom točkom (Franolić, 2021.).

Ksilanaza se može proizvesti fermentacijom u kapljevitim podlogama (sumberzna fermentacija, SmF) i fermentacijom na čvrstim nosačima. Prednost fermentacije u kapljevitim podlogama je homogenost reakcijske smjese, dok je prednost fermentacije na čvrstim nosačima niski troškovi uzgoja mikroorganizma, relativno niska stopa onečišćenja i visoka produktivnost po volumenu reaktora (Franolić, 2021.).

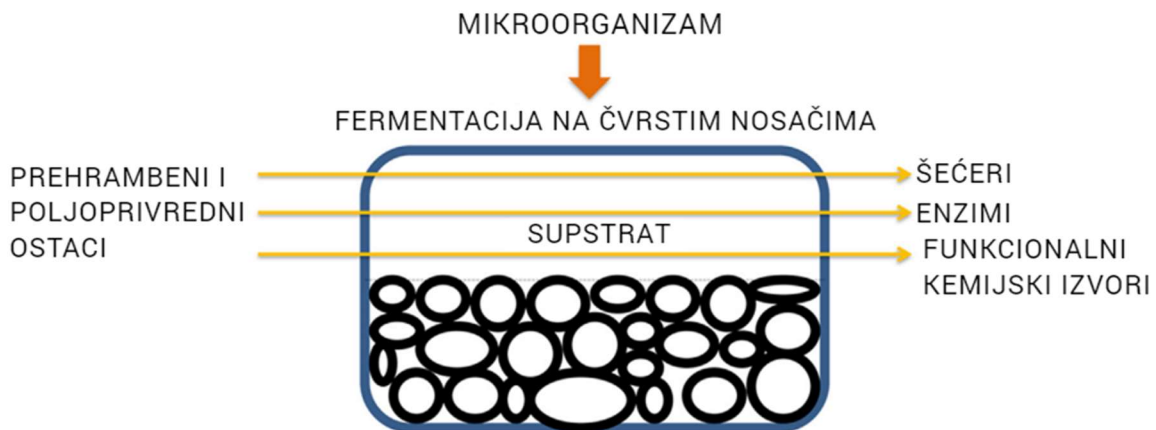


Slika 4. Kemijska struktura ksilanaze (Sunna i sur., 1997.)

2.3. Fermentacija na čvrstim nosačima

Fermentacija na čvrstim nosačima (eng. „*solid state fermentation*“, SSF) je proces koji podrazumijeva rast mikroorganizama na čvrstom supstratu, u kontroliranim uvjetima, bez prisutnosti slobodne vode. Na slici 5 prikazani su mogući produkti koji nastaju prilikom SSF

procesa. Glavni zahtjev ovakve fermentacije je dovoljna količina vlage za rad metabolizma i za podržavanje rasta mikroorganizama (Srivastava i sur., 2019.).



Slika 5. Fermentacija na čvrstim nosačima (Srivastava i sur., 2019.)

Da bi fermentacija na čvrstim nosačima bila uspješna potrebno je odabrati odgovarajuće mikroorganizme, odgovarajući supstrat, te optimizirati procesne parametre, kao i izoliranje i pročišćavanje produkta. Najčešće korišteni mikroorganizmi su filamentozne gljive, kvasci i neke bakterije. Supstrat je čvrsta tvar koja služi kao nosač i izvor nutrijenata za mikroorganizme. To su najčešće lignocelulozni materijali kao što su poljoprivredni ostaci i ostaci iz prehrambene industrije (Srivastava i sur., 2019.).

Supstrati koji se koriste u SSF procesima mogu biti inertni i neinertni. Lignocelulozni materijali spadaju u skupinu neinertnih supstrata, te tako služe kao nosač za radni mikroorganizam, ali i kao izvor hranjivih tvari mikroorganizmima (Barrios-González, 2012.).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Zadatak

Cilj ovog rada bio je:

- a) proizvesti enzim ksilanazu uzgojem *Thermomyces lanuginosus* na pljevici ječma tijekom 9 dana fermentacije na čvrstim nosačima
- b) provesti karakterizaciju enzima (odrediti optimalni pH i T , te mjeriti utjecaj različitih temperatura skladištenja na stabilnost enzima tijekom vremena)
- c) testirati uspješnost enzima kao biokatalizatora u procesima hidrolize pljevice pira, bučine pogače i tropa grožđa

3.2. Materijali i metode

3.2.1. Supstrat i mikroorganizam

Kao supstrat korištena pljevica ječma (BC Institut, Zagreb) koja je prije provedbe fermentacije skladištena u zamrzivaču na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Kao mikroorganizam korištena je gljiva *Thermomyces lanuginosus* Tsiklinsky (ATCC[®]76323TM) (DSMZ Institut, Njemačka). Kultura mikroorganizma je uzgajana na PDA (Biolife Italiana Sr. L. Viale Monza, Milan, Italija) uz dodatak ekstrakta kvasca (0,5 %, w/v) (Roseto degli Abruzzi TE, Italija) deset dana pri $45\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.2 Kemikalije

Za izradu ovog diplomskog rada korištene su sljedeće kemikalije: Na-K tartarat (Fischer scientific, Ujedinjeno Kraljevstvo), 3,5-dinitrosalicilna kiselina (Acros organics, Belgija), 1 M natrijev hidroksid (Gram mol, Zagreb, Hrvatska), Bradford reagens (PTFOS), natrij karbonat (Kemika, Hrvatska), arabinoksilan (Megazyme, Irska), *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

Pripremljene su otopine natrijev citratnog pufera pH 3,0, 4,0, 5,0 i 6,0. Pufer je pripremljen otapanjem odgovarajuće mase limunske kiseline $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ i odgovarajuće mase trinatrijevog citrat dihidrata $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ u 100 cm^3 vode (**tablica 1**).

Tablica 1. 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

Pripremljene su otopine natrijev fosfatnog pufera pH 6,0, 7,0 i 8,0 miješanjem dviju otopina: monobazični natrijev fosfat monohidrat ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) i dvobazični bezvodni natrijev fosfat (Na_2HPO_4) u odgovarajućem volumenu s ciljem postizanja željenog pH (**tablica 2**). Nakon miješanja otopina dodano je 50 cm^3 destilirane vode. Postupak pripreme potrebnih otopina prikazan je u **tablici 3**.

Tablica 2. 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 3. 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

Kao supstrat za mjerenje aktivnosti enzima korištena je 0,1 M otopina supstrata arabinoksilana.

3.2.5. Priprema otopine natrijeva karbonata

Otopina natrijeva karbonata pripravljena je otapanjem 2,12 g natrijevog karbonata u 100 mL destilirane vode.

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 na 60 °C. Kalij natrij tartarat (150 g) je zatim postupno otopljen. Otopina je zatim prebačena u odmjernu tikvicu od 500 cm³. Nakon hlađenja, tikvica je napunjena do oznake. DNS reagens je pohranjen na tamnom do upotrebe.

3.3. Metode

3.3.1. Biološka obrada supstrata

Fermentacija na čvrstim nosačima je provedena u laboratorijskim staklenkama ukupnog volumena 650 cm³. U laboratorijske staklenke izvagano je 30 g pljevice ječma i dodano je 60 cm³ destilirane vode kako bi se početna vlažnost supstrata korigirala na vlažnost od 70%. Uzorci su zatim sterilizirani u autoklavu (ASTELL AMA270, Kent, Velika Britanija) (**slika 6**) na 121 °C u trajanju od 15 minuta.



Slika 6. Autoklav (ASTELL AMA270, Kent, Velika Britanija)

Uzorci su ohlađeni na sobnu temperaturu nakon sterilizacije, pa su inokulirani s 5 micelijskih diskova *T. lanuginosus* uzgojene na PDA agaru ($\varnothing = 1$ cm). Micelijski diskovi su prije inokulacije suspendirani u 5 cm³ sterilizirane destilirane vode (**slika 7**).



Slika 7. Micelijski diskovi *T. lanuginosus* suspendirani u destiliranoj vodi

Fermentacija na čvrstim nosačima je za proizvodnju ksilanaze trajala 9 dana u inkubatoru (BINDER GmbH, KB 115, Njemačka) (**slika 8**) s ventilacijom postavljenom na 20 % i 45 °C. Pripremljeno je ukupno 20 laboratorijskih staklenki, od kojih su se za svaki dan ispitivanja koristile po 2 laboratorijske staklenke.



Slika 8. Laboratorijski inkubator (BINDER GmbH, KB 115, Njemačka)

3.3.2. Ekstrakcija ksilanaze

Nakon fermentacije je provedena ekstrakcija enzima ksilanaza. Za pripremu ekstrakta enzima, odvagano je 2 g fermentiranog uzorka (**slika 9**) u plastične kivete i dodano dodano 10 cm³ 0,1 mol/dm³ citratnog pufera pH = 7,0.



Slika 9. Uzorak pljevice ječma i *T. lanuginosus* u laboratorijskoj staklenci nakon 3 dana fermentacije

Ekstrakcija je trajala 15 minuta na sobnoj temperaturi, pri čemu su uzorci miješani 30 sekundi svakih 5 minuta na vorteks mješalici (Vortex MX- S, DLAB Scientific, Kina). Nakon ekstrakcije uzorci su centrifugirani pri 5000 rpm (5 min, 20 °C) (Z 326 K, Hermle Labortechnik GmbH, Njemačka) (5 min, 20 °C) (Z 326 K, Hermle Labortechnik GmbH, Njemačka) (**slika 10**). Supernatant dobiven nakon centrifugiranja je korišten za određivanje aktivnosti ksilanaze.



Slika 10. Centrifuga (Z 326 K, Hermle Labortechnik GmbH, Njemačka)

3.3.3. Određivanje aktivnosti ksilanaze

Aktivnost ksilanaze određivana je spektrofotometrijski (UV-1280, UV-VIS Spectrophotometer, Shimadzu, Japan) (**slika 11**) na valnoj duljini $\lambda = 540$ nm testom fiksnog vremena (eng. „*end point assay*“). Mjerenje je provedeno u tri paralelne probe prema protokolu prikazanom u **tablici 4**.



Slika 11. Spektrofotometar (UV-1280, UV-VIS Spectrophotometer, Shimadzu, Japan)

Tablica 4. Slijed provedbe spektrofotometrijskog mjerenja volumne aktivnosti ksilanaze

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			
DNS ()	1,5 cm ³	1,5 cm ³	1,5 cm ³
ekstrakt enzima			0,1 cm ³
pufer	0,1 cm ³		
razvoj obojenja pri 100 °C u vodenoj kupelji, 5 minuta			
hlađenje u vodenoj kupelji, 10 minuta			
vorteksiranje 10 sekundi, spektrofotometrijsko mjerenje			

3.3.4. Određivanje udjela suhe tvari

Udio suhe tvari u uzorcima je određen termogravimetrijskom metodom na uređaju za radijacijsko-infracrveno sušenje (HR-73, Mettler Toledo). Odvagano je $2 \pm 0,01$ g uzorka na aluminijsku pliticu i provedeno je sušenje do konstantne mase pri $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ (gubitak mase od 1 mg u 50s) (Planinić i sur. 2004). Određivanje suhe tvari za navedene uzorke je provedeno u dvije paralelne probe.

3.3.5. Utjecaj pH vrijednosti na aktivnost ksilanaze

Za određivanje ovisnost enzimske aktivnosti o pH, proizvodnja enzima ksilanaze je provedena tijekom 9 dana prema metodi opisanoj u poglavlju 3.1.1. Nakon fermentacije provedena je ekstrakcija enzima u različitim puferima. Korištena su dva različita pufera u različitom pH rasponu. Natrijev citratni pufer pripremljen je u pH rasponu od 3 do 6. Natrijev fosfatni pufer pripremljen je u pH rasponu od 6 do 8. Supstrat korišten za mjerenje aktivnosti ksilanaze otopljen je u navedenim puferima u koncentraciji od $0,1\text{ mol dm}^{-3}$ i aktivnost ksilanaze je mjerena prema protokolu opisanom u poglavlju 3.3.

3.3.6. Utjecaj temperature na aktivnost ksilanaze

Za određivanje ovisnost enzimske aktivnosti o pH, proizvodnja enzima ksilanaze je provedena tijekom 9 dana prema metodi opisanoj u poglavlju 3.3.1. Nakon fermentacije je provedena ekstrakcija enzima u natrij-fosfatnom puferu ($\text{pH} = 6$) prema prethodno opisanom protokolu. Supstrat korišten za mjerenje aktivnosti ksilanaze je otopljen u koncentraciji od $0,1\text{ mol dm}^{-3}$ u natrij-fosfatnom puferu ($\text{pH} = 6$). Mjerenje aktivnosti enzima provedeno je u temperaturnom rasponu od $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3.7. Utjecaj koncentracije supstrata na aktivnost ksilanaze

Za određivanje ovisnosti aktivnosti enzima o koncentraciji, pripremljene su otopine supstrata u različitim početnim koncentracijama od $0,25\text{ mmol dm}^{-3}$ do 15 mmol dm^{-3} .

3.3.8. Utjecaj uvjeta skladištenja na aktivnost ksilanaze

Sirovi ekstrakti enzima skladišteni su na tri temperature (25 °C, 4 °C i -20 °C). Tijekom 75 dana je mjerena aktivnost enzima. Enzimski ekstrakti su skladišteni zasebno za pojedini dan mjerenja kako bi se ispitaio utjecaj zamrzavanja i odmrzavanja ekstrakta enzima na aktivnost ksilanaze.

3.3.9. Utjecaj povišene temperature na stabilnost ksilanaze

Za određivanje stabilnosti ksilanaze pri povišenim temperaturama provedeno je temperiranje ekstrakta enzima pri 50 °C i 60°C. Aktivnost enzima je potom mjerena tijekom 24 sata.

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

Za ovo istraživanje provedena je saharifikacija određenih lignoceluloznih sirovina (pljevica pira, bučina pogača i trop grožđa), koje su katalizirane pomoću sirovog enzimskog preparata iz *T. lanuginosus* koji sadrži ksilanazu. Za saharifikaciju je provedena proizvodnja enzima prema prethodno opisanom protokolu u trajanju od 9 dana. Nakon fermentacije enzim je ekstrahiran u natrij-fosfatnom puferu (pH= 6). Lignocelulozne sirovine su sterilizirane u autoklavu te je provedena hidroliza navedenih sirovina s različitom početnom masom (1,5 g i 2 g). Hidroliza je započeta dodatkom 4 cm³ enzimskog pripravka, a u isto vrijeme je za slijepu probu korišten isti volumen pufera. Hidroliza je provedena u vodenoj kupelji s trešnjom (150 rpm) (JULABO, SW22, Seelbach, Njemačka) (**slika 12**) pri 45 °C u trajanju od 18 sati. Dobiveni uzorci su centrifugirani u trajanju od 5 minuta na 5000 g i iz supernatanta je mjerena koncentracija reduciranih šećera.



Slika 12. Vodena kupelj

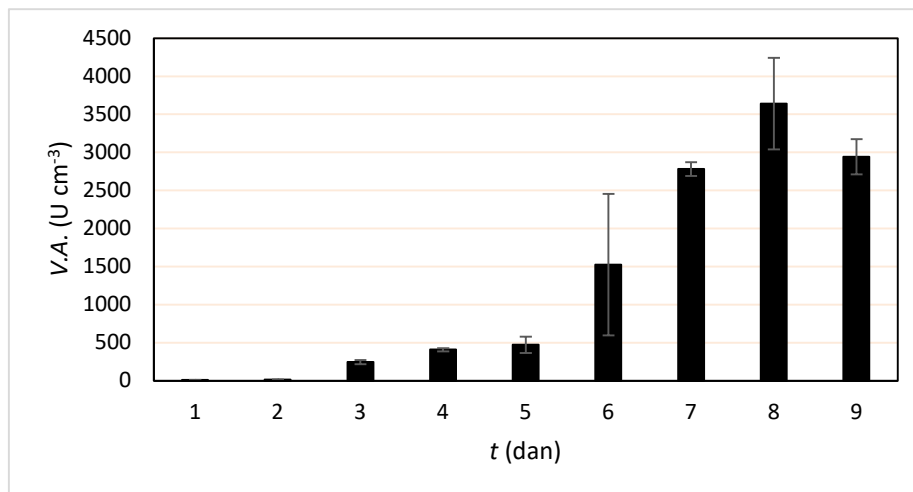
3.3.11. Analiza reducirajućih šećera DNS metodom

Za određivanje koncentracije reducirajućih šećera u staklenu epruvetu je dodano 0,1 cm³ uzorka i 1500 cm³ DNS reagensa. Nakon vorteksiranja uzorci su inkubirani u vodenoj kupelji 5 minuta pri 100°C. Zatim su uzorci ohlađeni u vodenoj kupelji u trajanju od 10 minuta. Tako ohlađeni uzorci su vorteksirani i izmjerena je apsorbancija pri 540 nm nasuprot slijepo probe. Slijepa proba je pripremljena na isti način, ali je umjesto uzorka dodano 0,1 cm³ pufera. Za pripremu baždarnog pravca je korištena glukoza kao standard pripremljen u koncentraciji od 0,2 do 1 mg cm⁻³.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Aktivnost enzima ksilanaze tijekom fermentacije na čvrstim nosačima

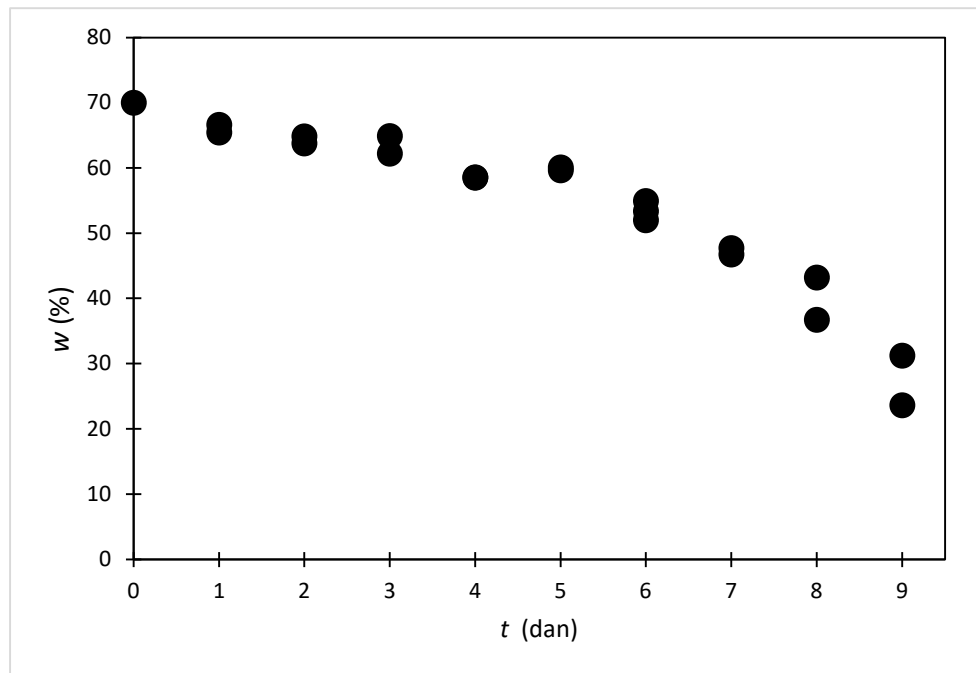
Enzim ksilanaza je proizveden uzgojem *T. lanuginosus* u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima na pljevici ječma u trajanju od 9 dana. Svakoga dana su uzimani uzorci u razmaku od 24 sata te je provedena kruto-tekuća ekstrakcija, a iz dobivenih ekstrakata određivana je aktivnost ksilanaze. Analize su napravljene u dvije paralelne probe. Na **slici 13** su prikazane srednje vrijednosti volumnih aktivnosti ksilanaze. Najveća aktivnost ksilanaze zabilježena je nakon 8 dana fermentacije, a iznosi 3642 U cm^{-3} . U istraživanju koje su proveli Gaffney i sur. (2009.) uzgojem *T. lanuginosus* na pšeničnim mekinjama, postignuta je maksimalna aktivnost od 2335 U cm^{-3} nakon 40 sati fermentacije na čvrstim nosačima pri 45°C . U ovom diplomskom radu postignuta je veća maksimalna aktivnost od one koju su postigli Gaffney i sur. (2009.).



Slika 13. Volumna aktivnost ksilanaze prilikom uzgoja *T. lanuginosus* na pljevici ječma tijekom 9 dana fermentacije

4.1.1. Udio vlage pljevice ječma tijekom fermentacije na čvrstim nosačima

Tijekom ovog istraživanja mjereno je i udio vlage. Iz **slike 14** je vidljivo kako se udio vlage smanjivao tijekom fermentacije, sve do 23,66%. Ovaj udio vlage nije dovoljan za rast gljive prilikom fermentacije na čvrstim nosačima. Zbog toga je fermentacija zaustavljena nakon 9. dana.

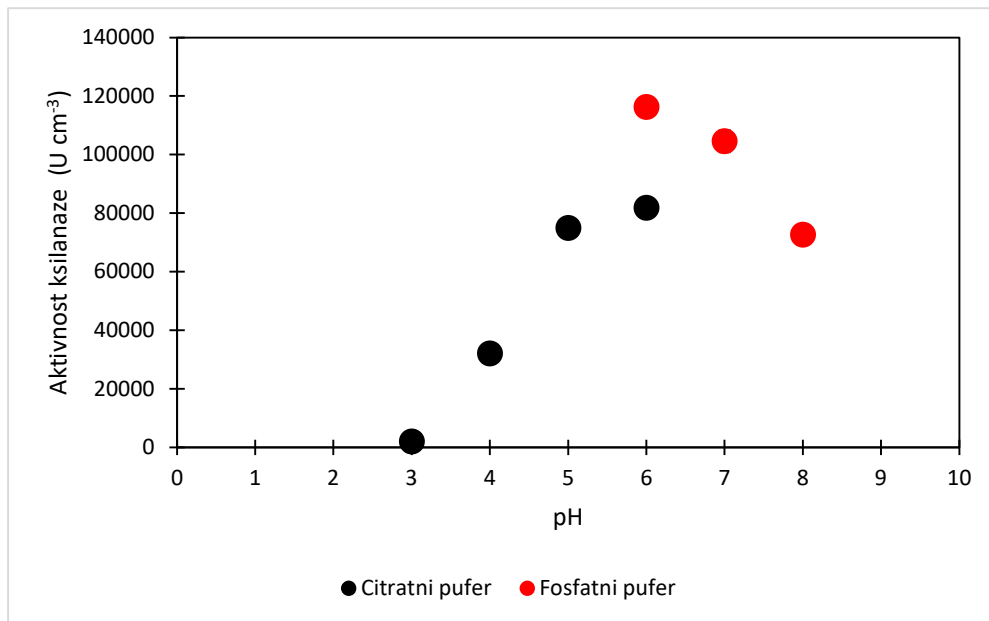


Slika 14. Promjena početnog udjela vlage u supstratu tijekom fermentacije

4.2. Karakterizacija nepročišćene ksilanaze

4.2.1. Utjecaj pH vrijednosti reakcijskog medija na aktivnost ksilanaze

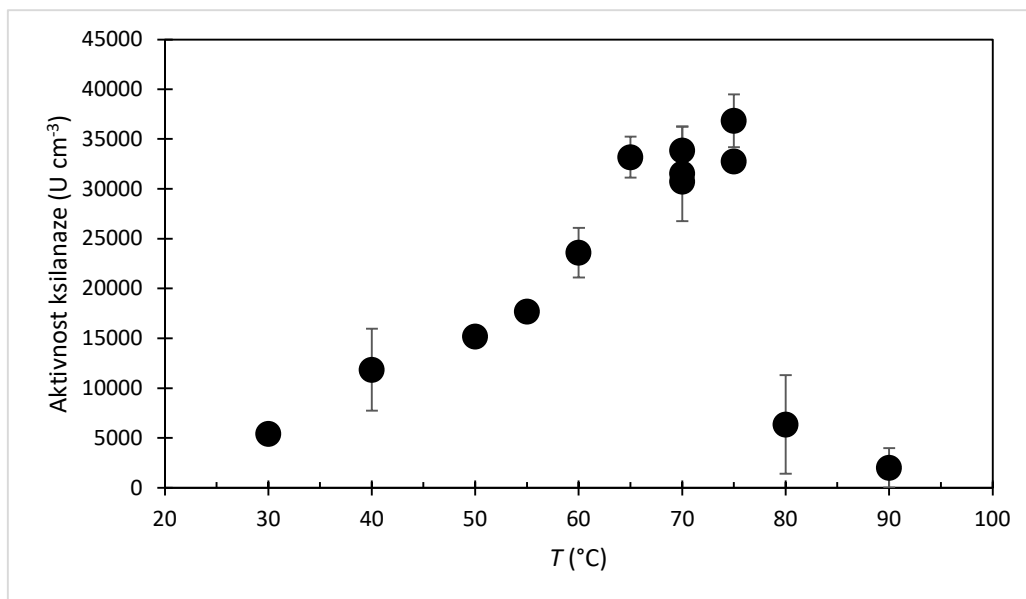
Za ispitivanje utjecaja pH na aktivnost ksilanaze korišteni su natrij-citratni pufer (pH=3-6) i natrij-fosfatni pufer (pH=6-8). Ovim ispitivanjem je utvrđeno da je najveća aktivnost ksilanaze postignuta pri pH 6 u fosfatnom puferu i ona iznosi 116292 U cm^{-3} . Također se može zaključiti da je aktivnost ksilanaze veća u fosfatnom puferu nego u citratnom pri istoj pH vrijednosti. Pri pH vrijednostima višim ili nižim od 6 dolazi do smanjenja aktivnosti enzima što znači da enzim nije stabilan u širokom rasponu pH (slika 15). Tran i sur. su 2021. proveli istraživanje u kojem su mjerili aktivnost ksilanaze dobivene pomoću *Streptomyces thermocarboxydus* na pšeničnim mekinjama. Došli su do zaključka da je najveća volumna aktivnost ksilanaze postignuta pri pH 10 i iznosila je 5785 U cm^{-3} .



Slika 15. Ovisnost aktivnosti ksilanaze o pH

4.2.2. Utjecaj temperature na aktivnost ksilanaze

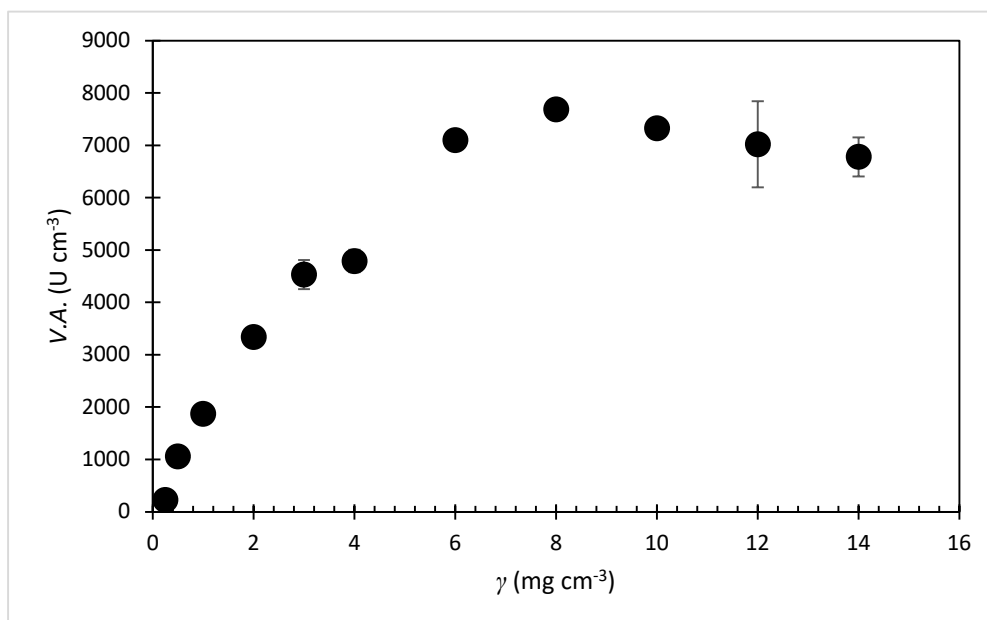
Na slici 16 je prikazan utjecaj temperature na volumnu aktivnost ksilanaze prilikom hidrolize supstrata. Može se zaključiti da je volumna aktivnost najveća pri 75 °C i ona iznosi 36841 U cm⁻³. Također je vidljivo da daljnjim povećanjem i smanjenjem temperature aktivnost enzima opada. U istraživanju koje su proveli Tran i sur. (2021.) s *Streptomyces thermocarboxydus* na pšeničnim mekinjama, maksimalna volumna aktivnost (4330 cm⁻³) je izmjerena pri 35 °C.



Slika 16. Ovisnost aktivnosti ksilanaze o temperaturi

4.2.3. Utjecaj koncentracije supstrata na aktivnost ksilanaze

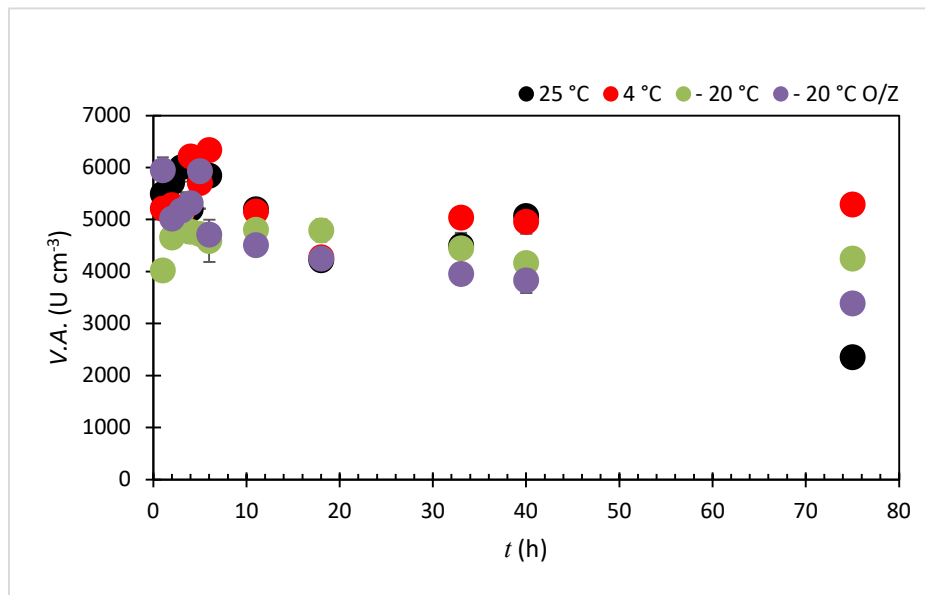
Na **slici 17** je prikazana volumna aktivnost enzima pri različitim koncentracijama supstrata. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da bi se kinetika ove reakcije mogla opisati Michaelis-Menteničinom kinetikom.



Slika 17. Ovisnost aktivnosti ksilanaze o koncentraciji supstrata (arabinoksilan)

4.2.4. Utjecaj uvjeta skladištenja na aktivnost ksilanaze

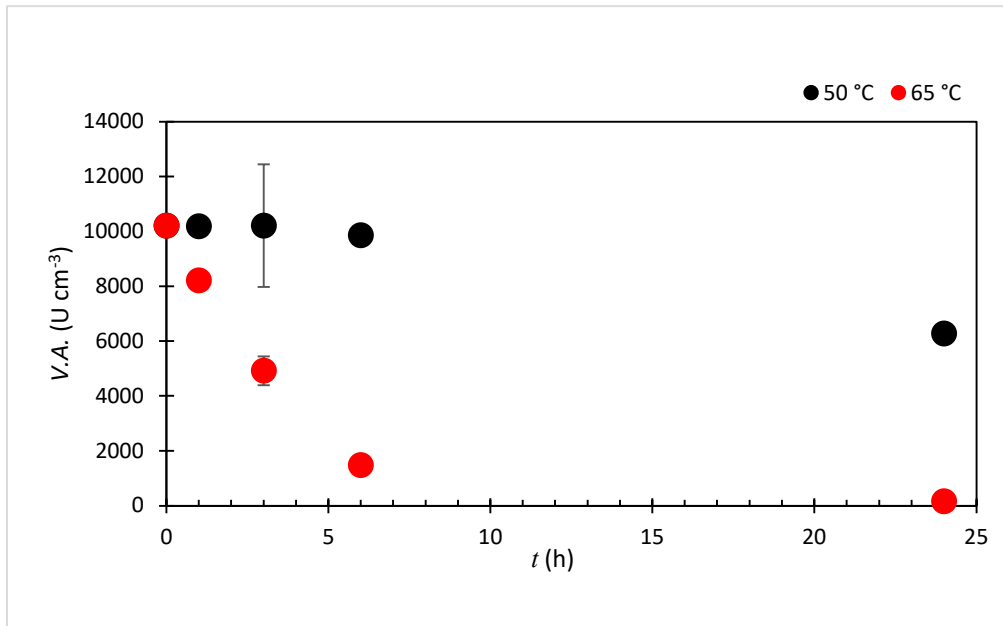
Kako bi se utvrdio utjecaj temperature i vremena skladištenja na aktivnost enzima, enzimski preparat je skladišten u trajanju od 75 dana pri različitim temperaturama ($T = -20, 4, 25 \text{ } ^\circ\text{C}$). Kako je vidljivo iz **slike 18** volumna aktivnost ksilanaze se smanjuje pri svim temperaturama skladištenja. Najveću aktivnost nakon 75 dana ima uzorak skladišten pri $4 \text{ } ^\circ\text{C}$ (5290 U cm^{-3}), a najmanju ima uzorak skladišten na $25 \text{ } ^\circ\text{C}$ (2356 U cm^{-3}).



Slika 18. Rezidualna aktivnost ksilanaze tijekom skladištenja

4.2.5. Utjecaj povišene temperature na aktivnost ksilanaze

Kako bi se ispitala operativna stabilnost enzima pri povišenim temperaturama, sirovi enzimski pripravak je inkubiran pri $50 \text{ } ^\circ\text{C}$ i $65 \text{ } ^\circ\text{C}$ u trajanju od 24 sata. Za vrijeme inkubacije su periodično uzimani uzorci, te je mjerena volumna aktivnost ksilanaze. Na **slici 19** su prikazani rezultati iz kojih se može zaključiti da je volumna aktivnost ksilanaze veća pri $50 \text{ } ^\circ\text{C}$, dok se uzorcima temperiranim na $65 \text{ } ^\circ\text{C}$ aktivnost u potpunosti smanjila nakon 24 sata.

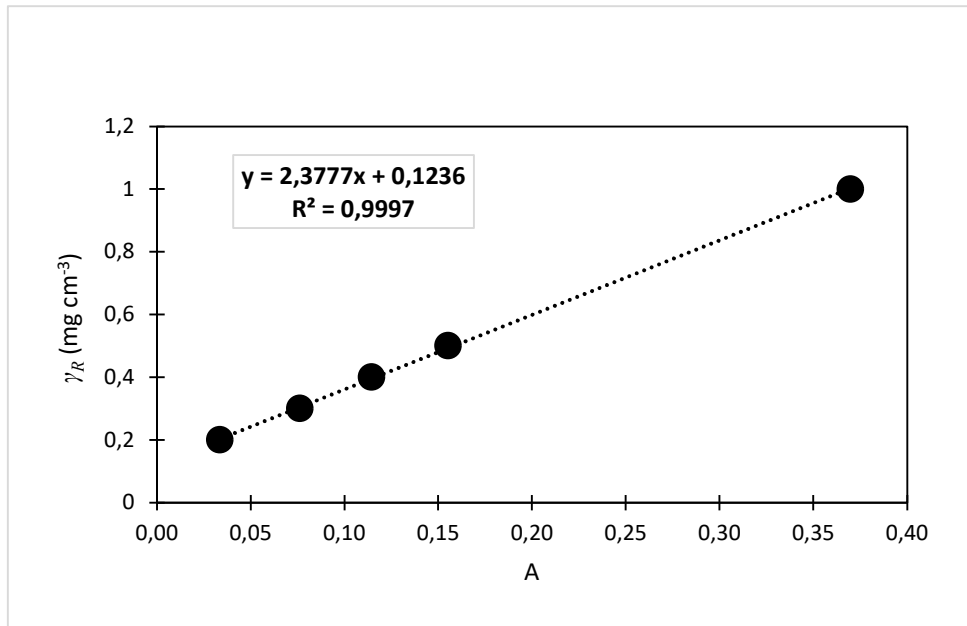


Slika 19. Rezidualna aktivnost ksilanaze nakon inkubacije pri povišenim temperaturama

4.3. Saharifikacija odabranih lignoceluloznih sirovina nepročišćenim enzimskim preparatom

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

Na slici 20 je prikazana kalibracijska krivulja za određivanje masene koncentracije reducirajućih šećera. Ova kalibracijska krivulja prikazuje ovisnosti koncentracije reducirajućih šećera o apsorbanciji.



Slika 20. Kalibracijska krivulja za izračunavanje masene koncentracije reducirajućih šećera u hidrolizatima

Metodom linearne regresije je dobivena sljedeća jednadžba:

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

odnosno:

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

pri čemu je:

γ_R = masena koncentracija reducirajućih šećera (mg cm⁻³)

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

Prema jednadžbi 4 su izračunate masene koncentracije reducirajućih šećera u hidrolizatima. Zatim su preračunate na suhu tvar uzoraka prema sljedećoj formuli:

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

pri čemu je:

C = maseni udio reducirajućih šećera u uzorku (mg g^{-1})

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

V_e = volumen sirovog enzimskog preparata (cm^3)

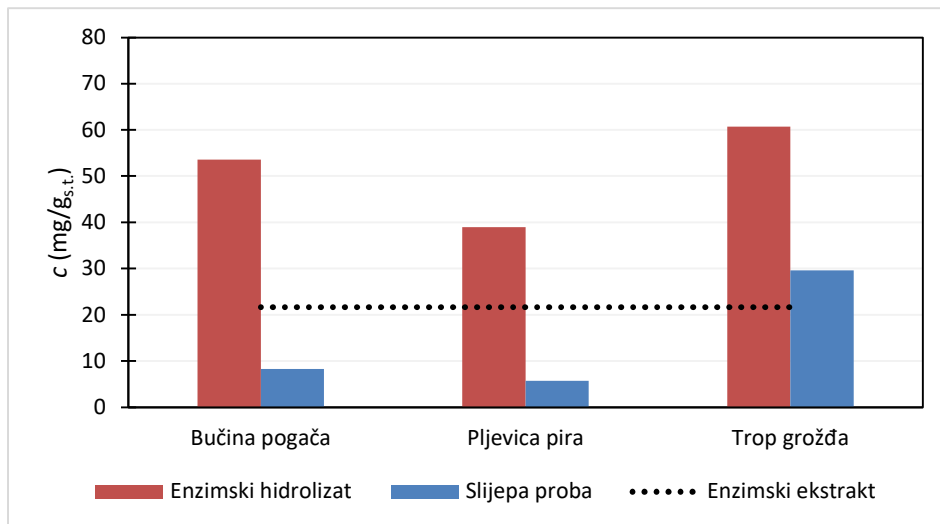
m_{LS} = masa lignocelulozne sirovine (g)

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

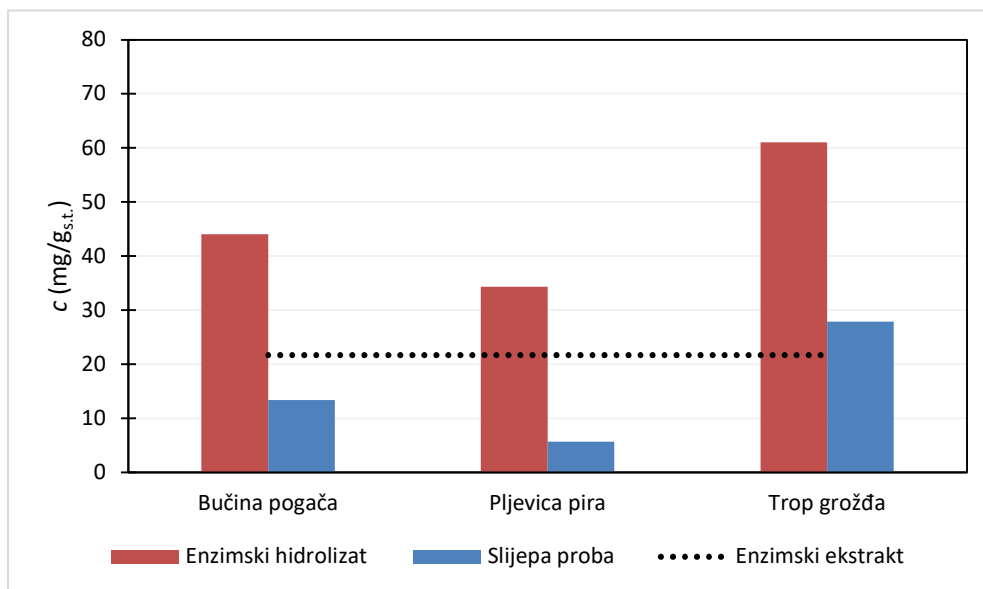
4.3.2. Koncentracija reducirajućih šećera dobivenih saharifikacijom lignoceluloznih sirovina

Saharifikacijom se lignocelulozne sirovine, odnosno celuloza i hemiceluloza hidroliziraju na osnovne građevne jedinice (monosaharide, pentoze i heksoze) uz prisustvo katalizatora. Katalizatori mogu biti enzimi, te razrijeđene i koncentrirane kiseline. U procesu saharifikacije hemiceluloza se razgrađuje na pentoze (ksiloza i arabinoza) i heksoze (galaktoza i maltoza), a celuloza se razgrađuje na glukozu.

Za ovo istraživanje su korištene tri različite lignocelulozne sirovine (bučina pogača, pljevica pira i trop grožđa). Istraživana je mogućnost saharifikacije primjenom nepročišćenog enzimskog koktela bogatog ksilanazom. Za svaku sirovinu su provedena dva pokusa: u prvom pokusu početna masa sirovine je bila 2 g, a u drugom 1,5 g. Dodatno, provedena je i slijepa proba u kojoj je korišten pufer umjesto enzimskog koktela. Na **slici 21** je prikazani su rezultati hidrolize 2 g lignoceluloznih sirovina (dalje u tekstu: Pokus 1), a na **slici 22** rezultati hidrolize 1,5 g lignoceluloznih sirovina (dalje u tekstu: Pokus 2).



Slika 21. Maseni udio reducirajućih šećera u šećernom hidrolizatu nakon hidrolize 2 g lignoceluloznih sirovina



Slika 22. Maseni udio reducirajućih šećera u šećernom hidrolizatu nakon hidrolize 1,5 g lignoceluloznih sirovina

Koncentracija reducirajućih šećera u slijepoj probi za bučinu pogaču je bila $8,26 \text{ mg g}_{\text{st}}^{-1}$ (pokus 1) i $13,35 \text{ mg g}_{\text{st}}^{-1}$ (pokus 2). Nakon hidrolize koncentracija reducirajućih šećera se povećala na $53,55 \text{ mg g}_{\text{st}}^{-1}$ (pokus 1) i $43,99 \text{ mg g}_{\text{st}}^{-1}$ (pokus 2).

4. Rezultati i rasprava

Koncentracije reducirajućih šećera u slijepim probama pokusa u kojima je korištena pljevica pira su bile $5,73 \text{ mg g}_{\text{st}}^{-1}$ (pokus 1) i $5,67 \text{ mg g}_{\text{st}}^{-1}$ (pokus 2). Nakon hidrolize došlo je do povećanja koncentracija reducirajućih šećera na $38,98 \text{ mg g}_{\text{st}}^{-1}$ (pokus 1) i $34,29 \text{ mg g}_{\text{st}}^{-1}$ (pokus 2).

Koncentracija reducirajućih šećera u slijepoj probi u pokusu u kojem je kao supstrat korišten trop grožđa je bila $29,60 \text{ mg g}_{\text{st}}^{-1}$ (pokus 1) i $27,86 \text{ mg g}_{\text{st}}^{-1}$ (pokus 2). Nakon hidrolize koncentracija reducirajućih šećera se povećala na $60,68 \text{ mg g}_{\text{st}}^{-1}$ (pokus 1) i $61,01 \text{ mg g}_{\text{st}}^{-1}$ (pokus 2).

Iz **slike 21** i **slike 22** se može zaključiti da je najveći porast koncentracije reducirajućih šećera u hidrolizatu (6,8 puta) dobiven saharifikacijom 2 g pljevice pira. Porast koncentracije reducirajućih šećera u hidrolizatu za ostale lignocelulozne materijala iznosio je 6,48 puta (saharifikacija 2 g bučine pogače), te 2,05 puta (saharifikacija 2 g tropa grožđa). Nakon saharifikacije 1,5 g bučine pogače, došlo je do povećanja koncentracija reducirajućih šećera za 3,30 puta, a nakon saharifikacije 1,5 g pljevice pira, koncentracija reducirajućih šećera se povećala za 2,19 puta.

Najmanji porast koncentracije reducirajućih šećera u hidrolizatu (2,19 puta) dobiven je saharifikacijom 1,5 g tropa grožđa. Takav porast se može objasniti time što trop grožđa sadrži najveću koncentraciju šećera ($27,86 \text{ mg g}_{\text{st}}^{-1}$). U istraživanju koje su proveli Fernandes i sur. (2020.) najveća zabilježena koncentracija reducirajućih šećera iznosila je $199,60 \text{ mg g}_{\text{st}}^{-1}$. Međutim, do tih koncentracija su došli saharifikacijom tropa grožđa pomoću enzima iz gljive *Phlebia rufa* (Pers.).

5. ZAKLJUČCI

Na osnovu podataka dobivenih u eksperimentima doneseni su sljedeći zaključci:

- Dokazana je mogućnost proizvodnje ksilanaze uzgojem *T. lanuginosus* na pljevici ječma kao supstratu koji predstavlja nusprodukt prehrambene industrije.
- Najveća volumna aktivnost ksilanaze ($V.A. = 3642 \text{ U cm}^{-3}$) postignuta je nakon 8. dana fermentacije.
- Enzim pokazuje optimalnu aktivnost pri pH 6 i $T = 75 \text{ }^\circ\text{C}$.
- Proizvedeni enzimski koktel stabilan je pri temperaturama skladištenja od $4 \text{ }^\circ\text{C}$ i -20°C tijekom 75 dana skladištenja.
- Najveći prinos u proizvodnji reducirajućih šećera postignut je enzimskom saharifikacijom 2 grama pljevice pira ($38,98 \text{ mg g}^{-1}$).

6. LITERATURA

- Alam M. M., Maniruzzaman M., Morshed M. M.: Application and advances in microprocessing of natural fiber (jute)–based composites, *Comprehensive Materials Processing*, 7:243-260, 2014.
- Beg Q. K., Kapoor M., Mahajan L., Hoondal G.S.: Microbial xylanases and their industrial applications: a review, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(3–4):326–38, 2001.
- Encyclopedia Britannica, <https://www.britannica.com>, pristupljeno 10.09.2023.
- Fernandes J. M. C., Fraga I., Sousa R. M. O. F., Rodrigues M. A. M., Sampaio A., Bezerra R. M. F., Dias A. A.: Pretreatment of grape stalks by fungi: Effect on bioactive compounds, fiber composition, saccharification kinetics and monosaccharides ratio, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(16):1-13, 2020.
- Franolić M.: Pročišćavanje enzima *endo*-1,4-ksilanaze proizvedene fermentacijom *Trametes versicolor* na čvrstim nosačima, *Završni rad*, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2021.
- Gaffney M., Doyle S., Murphy R.: Optimization of xylanase production by *Thermomyces lanuginosus* in Solid State Fermentation, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 73 (12): 2640-2644, 2009.
- Hrgović S.: Osnove agrotehnike proizvodnje: ječma, zobi i raži, stručni rad, Hrvatski zavod za poljoprivrednu savjetodavnu službu, *Glasnik zaštite bilja 1*, 2006.
- Jensen B., Nebelong P., Olsen J., Reeslev M.: Enzyme production in continuous cultivation by the thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*, *Biotechnology Letters*, 24(1),41–45, 2002.
- Kovačević V., Rastija M.: *Žitarice*, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, 2014.
- Kragić K.: Karakterizacija kemijskog sastava i antioksidacijski potencijal plodova biljke jarebice (*Sorbus Aucuparia* L.) s različitih prirodnih staništa u Republici Hrvatskoj, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2022.

- Martínez-Subirà M., Romero M., Macia A., Puig E., Romagosa I.: Bioactive compounds and antioxidant capacity in pearling fractions of huller, partially hull-less and hull-less food barley genotypes, Agrotecnio-Cerca Center, University of Lleida, 2021.
- Reddy N., Yiqi Y.: Structure and properties of high quality natural cellulose fibers from cornstalks, *Polymer*, 46(15):5494-5500, 2005.
- Singh S., Madlala A. M., Prior B. A.: *Thermomyces lanuginosus*: Properties of strains and their hemicellulases, *FEMS Microbiology Reviews*, 27(1):3–16, 2003.
- Srivastava N., Srivastava M., Ramteke P.W., Mishra P.K.: Solid-State Fermentation Strategy for Microbial Metabolites Production: An Overview, *Microbial Secondary Metabolites Biochemistry and Applications*, 345-354, 2019.
- Sunna A., Antranikian G.: Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria, *Critical Reviews in Biotechnology*, 17(1):39-67, 1997.
- Torre C. L., Silva-Lucca R. A., Ferreira R., Luz L. A.: Correlation of the conformational structure and catalytic activity of the highly thermostable xylanase of *Thermomyces lanuginosus* PC7S1T, *Biocatalysis and Biotransformation*, 41(1):1-12, 2021.
- Tran T. D., Doan C. T., Wang S. L.: Conversion of wheat bran to xylanases and dye adsorbent by *Streptomyces Thermocarboxydus*, *Polymers*, 13(2):1-18, 2021.
- Živković M: Agrotehnika uzgoja ječma (*Hordeum vulgare* L.), *Završni rad*, Preddiplomski studij smjera Bilinogojstvo, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, 2015.