

Određivanje kemijskog sastava repinih rezanaca tijekom fermentacije s gljivom bijelog truljenja *Phanerochaete chrysosporium*

Grgić, Jelena

Master's thesis / Diplomski rad

2014

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:109:939444>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-23**

REPOZITORIJ

PTF

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Jelena Grgić

**Određivanje kemijskog sastava repinih rezanaca tijekom fermentacije
s gljivom bijelog truljenja *Phanerochaete chrysosporium***

DIPLOMSKI RAD

Osijek, siječanj 2014.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija
Nastavni predmet: Bioprocesi u zaštiti okoliša
Tema rada je prihvaćena na XI. sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 28. rujna 2012. godine
Mentor: doc. dr. sc. *Natalija Velić*

Određivanje kemijskog sastava repinih rezanaca tijekom fermentacije s gljivom bijelog truljenja

Phanerochaete chrysosporium

Jelena Grgić, 111/DI

Sažetak:

Korištenje lignoceluloznih materijala kao sirovina u biotehnološkoj proizvodnji ovisi o mogućnosti razgradnje lignoceluloznih sastavnica celuloze, hemiceluloze i lignina do fermentabilnih šećera. Filamentozne gljive bijelog truljenja su rijetki organizmi koji imaju sposobnost sinteze ekstracelularnih enzima odgovornih za razgradnju lignoceluloznih sastavnica biljaka. U ovom radu, gljiva *Phanerochaete chrysosporium* uzgajana je u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima na repinim rezancima (lignocelulozni otpadni materijal) kao supstratu, u laboratorijskim staklenkama pri 27 °C u trajanju od 30 dana. Cilj rada bio je istražiti promjene sastava supstrata tijekom fermentacije s naglaskom na razgradnju lignoceluloznih polimera. U početnom uzorku repinih rezanaca, kao i u uzorcima prikupljenim tijekom fermentacije određeni su udjeli ekstraktivnih tvari, pepela, dušika, celuloze, lignina i pentozana, te gubitak na masi lignoceluloznog materijala po završetku fermentacije. Postignut je gubitak na masi lignoceluloznog materijala (19,62%), te povećanje udjela ekstraktivnih tvari (122%), pepela (41%) i dušika (54,24%) kao posljedica rasta gljive *P. chrysosporium*. Postignuta je 24%-tna razgradnja lignina (nakon 20 dana fermentacije) i 21%-tna razgradnja pentozana. Nije došlo do razgradnje celuloze pri primjenjenim uvjetima uzgoja.

Ključne riječi: *Phanerochaete chrysosporium*, repini rezanci, fermentacije na čvrstim nosačima

Rad sadrži: 52 stranice
19 slike
3 tablica
36 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

- | | |
|--|---------------|
| 1. doc. dr. sc. <i>Marina Tišma</i> | predsjednik |
| 2. doc. dr. sc. <i>Natalija Velić</i> | član-mentor |
| 3. izv. prof. dr. sc. <i>Mirela Planinić</i> | član |
| 4. izv. prof. dr. sc. <i>Hrvoje Pavlović</i> | zamjena člana |

Datum obrane: 31. siječnja 2014.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

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

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Biotechnology
Course title: Bioprocesses in environmental protection
Thesis subject was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology Osijek at its session no. XI held on September 28th 2012.
Mentor: *Natalija Velić, PhD, assistant prof.*

Changes in chemical composition of sugar beet pulp during fermentation using fungus
Phanerochaete chrysosporium
Jelena Grgić, 111/DI

Summary:

The use of lignocellulosic materials as a biotechnological production substrate depends mainly on the degradation of lignocellulosic components cellulose, hemicellulose and lignin to fermentable sugars. Filamentous white-rot fungi are among rare microorganisms that produce extracellular enzymes responsible for degradation of plants' lignocellulosic components. The aim of this study was to cultivate fungus *Phanerochaete chrysosporium* under solid-state conditions using sugar beet pulp (lignocellulosic waste material) as a substrate and to investigate the substrate compositional changes during fermentation with emphasis on lignocellulosic polymers degradation. *P. chrysosporium* was cultivated in laboratory jars at 27 °C for 30 days. The chemical composition of samples collected before and after fermentation was analysed, i.e. substrate weight loss, the contents of total extractives, ash, nitrogen, cellulose, lignin and pentosans. The observed substrate weight loss (19.62%), as well as the increase of total extractives (122%), ash (41%) and nitrogen (54.24%) all indicated the growth of *P. chrysosporium*. The achieved conversions of lignin (20 days of fermentation) and pentosan were 24% and 21%, respectively. Cellulose degradation was not observed under the applied cultivation conditions.

Key words: *Phanerochaete chrysosporium*, sugar beet pulp, solid-state fermentation

Thesis contains: 52 pages
19 figures
3 tables
36 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|--|--------------|
| 1. <i>Marina Tišma</i> , PhD, assistant prof. | chair person |
| 2. <i>Natalija Velić</i> , PhD, assistant prof. | supervisor |
| 3. <i>Mirela Planinić</i> , PhD, associate prof. | member |
| 4. <i>Hrvoje Pavlović</i> , PhD, associate prof. | stand-in |

Defense date: January 31, 2014.

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

Zahvaljujem svojoj mentorici dr.sc Natiliji Velići, doc. na poticaju, velikoj pomoći, pristupačnosti, dobroj volji i brojnim savjetima pri provedbi istraživanja i obrade podataka.

Također se zahvaljujem dr. sc. Marini Tišmi, doc. i dr. sc. Mireli Planinć doc. na stručnim savjetima koji su uvelike pomogli izradi ovog rada.

Zahvaljujem svojim kolegama Ivani Jozić i Ivanu Čubelu na suradnji, nesebičnoj pomoći, savjetima i ugodnom druženju tijekom brojnih sati provedenih u laboratoriju.

Posebno se zahvaljujem svojim roditeljima, sestri i bratu koji su mi velikim odricanjima omogućili studiranje, podržavali kroz sve godine studiranja, radovali svim mojim uspjesima i bili uz mene kada je to bilo najpotrebnije.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. LIGNOCELULOZNI MATERIJALI	4
2.1.1. Celuloza	5
2.1.2 Hemiceluloza	7
2.1.3. Lignin	9
2.2. REPINI REZANCI – LIGNOCELULOZNI OTPAD	11
2.3. GLJIVE.....	11
2.3.1. Morgologija i sistematika	11
2.3.2. Ishrana i metabolizam.....	12
2.3.3. Klasifikacija gljiva.....	13
2.3.4. Gljive bijelog truljeja	13
2.3.5. <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	14
2.4. FERMENTACIJE NA ČVRSTIM NOSAČIMA	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO	19
3.1. ZADATAK	20
3.2. MATERIJALI	20
3.2.1 Mikroorganizam	20
3.2.2. Supstrat	21
3.2.3. Kemikalije.....	21
3.3. APARATURA	22
3.3.1. Autoklav	22
3.3.2. Inkubator.....	22
3.3.3. Sušionik	22
3.3.4. Mufolna peć	23
3.3.5. Soxtec sustav.....	23
3.3.6. Spektrofotometar	23
3.3.7. Tresilica	24

3.3.8. Centrifuga.....	24
3.3.9. Kjeldalh uređaj	24
3.3.10. Laboratorijski mlin	24
3.4. METODE	25
3.4.1. Priprema hranjive podloge za uzgoj radnog mikroorganizma	25
3.4.2. Uzgoj gljive bijelog truljenja <i>P. chrysosporium</i> u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima.....	25
3.4.3. Određivanje udjela vode termogravimetrijskom metodom	26
3.4.4. Određivanje udjela ekstraktivnih (akcesornih) tvari	27
3.4.5. Određivanje udjela mineralnih tvari (pepela)	27
3.4.6. Određivanje udjela celuloze	28
3.4.7. Određivanje udjela lignina	29
3.4.8. Određivanje udjela pentozana.....	30
4. REZULTATI I RASPRAVA	32
4.1. RAZGRADNJA REPINIHZANACA POMOĆU GLJIVE BIJELOG TRULJENJA <i>P. chrysosporium</i> U UVJETIMA FERMENTACIJE NA ČVRSTIM NOSAČIMA	33
4.1.1. Gubitak na masi i promjena boje supstrata	33
4.1.2. Određivanje udjela ekstraktivnih tvari, pepela i dušika	34
4.1.3. Određivanje udjela celuloze	35
4.1.4. Određivanje udjela lignina	36
4.1.5. Određivanje udjela pentozana.....	38
5. ZAKLJUČCI	39
6. LITERATURA	41

Popis oznaka, kratica i simbola

SSF	(eng. Solid state fermentation) Fermentacija na čvrstim nosačima
SmF	(eng. Submerged fermentations) Submerzna fermentacija
H_2SO_4	Sumporna kiselina
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	Kalijev dikromat
CH_3COOH	Etanol
HNO_3	Dušična kiselina
NaCl	Natrijev klorid
C_6H_6	Benzen
HCl	Klorovodična kiselina

1. UVOD

Intenzivne industrijske i poljoprivredne aktivnosti čovjeka kao posljedicu imaju značajno onečišćenje okoliša, uzrokovano čvrstim otpadom, plinovima ili otpadnim vodama koje nastaju uslijed tih aktivnosti. Tako primjerice ostaci usjeva i ostali biljni ostaci (lignocelulozni materijali) na poljoprivrednim gospodarstvima koji su se nekoć ponovo koristili, uslijed upotrebe umjetnih gnojiva i napredne mehanizacije postaju otpad (Singh i Pandey, 2009.). Budući da lignocelulozni otpadni materijali zbog svog kemijskog sastava predstavljaju energetski izuzetno važan i bogat resurs, tehnologije koje uključuju njihovo korištenje u svrhu dobivanja različitih korisnih proizvoda poput biogoriva neophodne su u borbi protiv globalnog zagrijavanja i iscrpljivanja rezervi fosilnih goriva. Razvoj novih tehnologija koje se bave smanjenjem i obradom lignoceluloznog otpada sve više se oslanjaju na procese koji se u prirodi spontano događaju, oponašajući ih u kontroliranim uvjetima.

Celuloza, hemiceluloza i lignin čine osnovne sastavnice lignoceluloznih materijala. Pri tome lignin i hemiceluloza stvaraju čvrsti matriks oko celuloze i na taj način osiguravaju mehaničku čvrstoću stanične stijenke biljaka, ali i otpornost na razgradnju do jednostavnih šećera (Singh i Chen, 2008.) – što je osnovna premisa korištenja lignoceluloznih materijala kao supstrata za različite biotehnološke procese. Filamentozne gljive bijelog truljenja, koje uključuju i *Phanerochaete chrysosporium*, su među rijetkim organizmima koji imaju sposobnost razgradnje lignoceluloznih sastavnica biljaka. One proizvode ekstracelularne enzime odgovorne za razgradnju celuloze, hemiceluloze i lignina. Gljive bijelog truljenja se u ovu svrhu uzgajaju u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima. Fermentacije na čvrstim nosačima su procesi koje karakterizira rast mikroorganizama u odsutnosti slobodne vode na netopljivim čvrstim nosačima koji mogu djelovati i kao nosač i kao supstrat za rast (Prado i sur., 2005.).

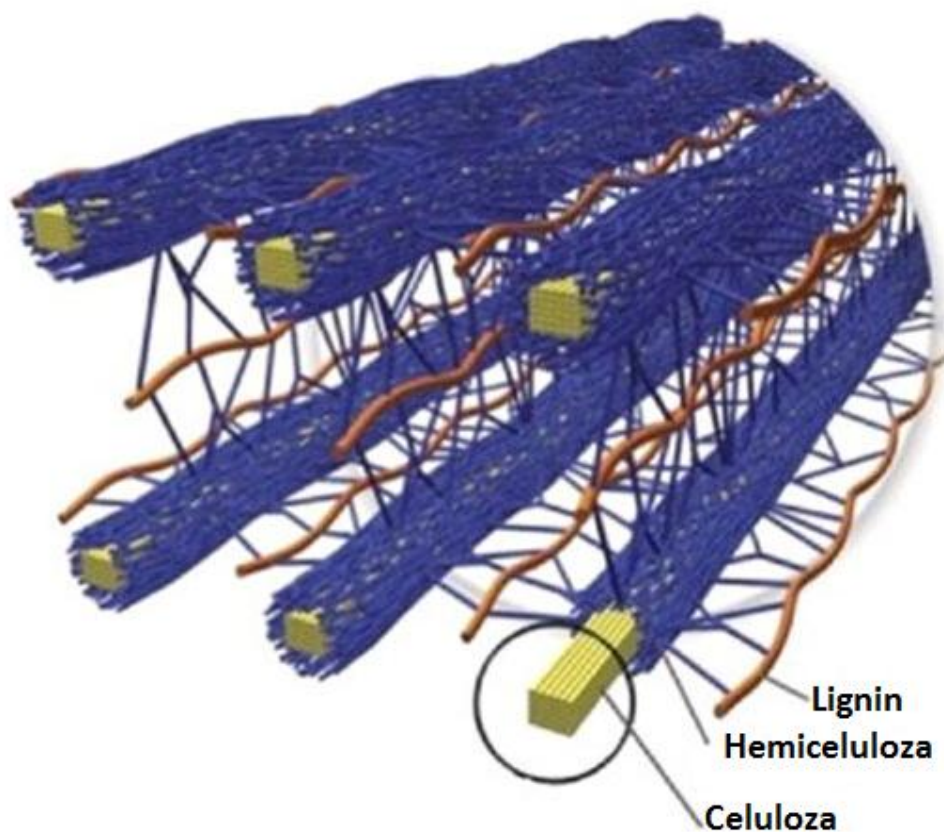
Cilj ovog rada bio je uzgojiti gljivu bijelog truljenja *Phanerochaete chrysosporium* na izluženim i osušenim repnim rezancima kao supstratu i nosaču, u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima i istražiti promjene kemijskog sastava supstrata tijekom fermentacije, s posebnim naglaskom na razgradnju lignoceluloznih sastavnica supstrata.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. LIGNOCELULOZNI MATERIJALI

Od ukupne biljne biomase proizvedene na Zemlji, više od 60% čini lignocelulozna biomasa (Tengerdy i Szakacs, 2003.), koja je važan obnovljivi izvor energije.

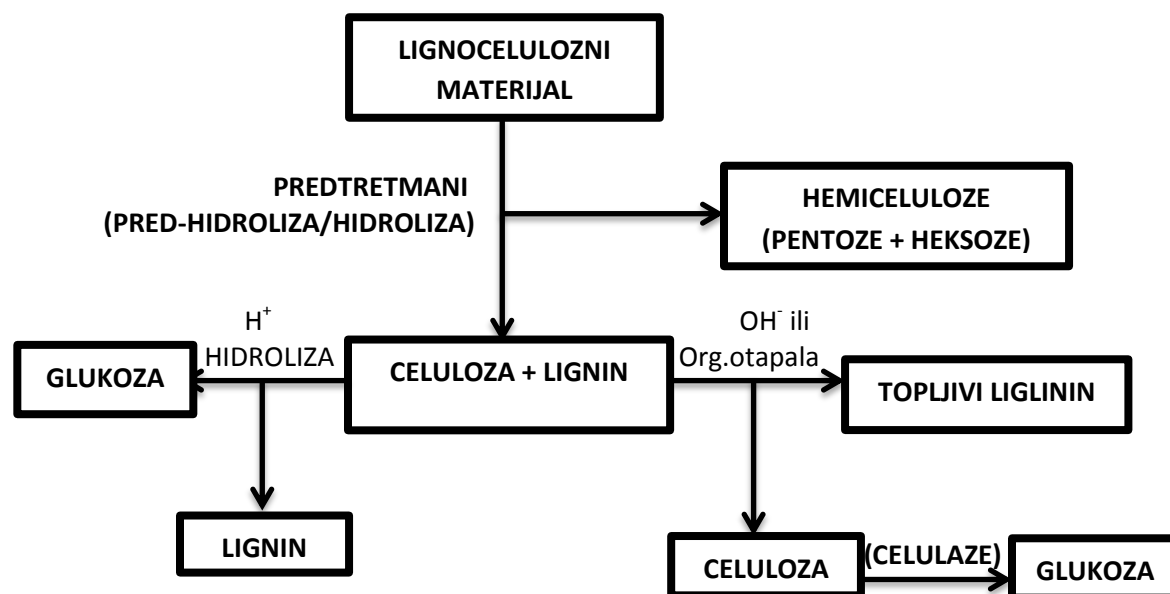
Lignocelulozni materijali sastoje se od tri velike skupine polimera – celuloze, hemiceluloze i lignina, koje izgrađuju staničnu stijenku biljaka te je štite od mikrobiološke razgradnje. Pri tome celuloza čini kostur okružen hemicelulozom i ligninom (**Slika 1.**) (Pereira, 2008.).



Slika 1. Struktura lignoceluloznog materijala (Doherty i sur., 2011.)

Zbog svog kemijskog sastava lignocelulozni materijali imaju veliki potencijal kao supstrati za upotrebu u proizvodnji vrijednih biotehnoloških proizvoda, pri čemu je najveći izazov za potpuno ostvarenje ovog potencijala svladavanje njihove velike otpornost prema razgradnji do fermentabilnih šećera (Lee i sur., 2012.). Uklanjanje hemiceluloze i lignina koji okružuju celulozu često je prva prepreka ka učinkovitoj razgradnji celuloze do glukoze (Singh i Chen, 2008.).

Upravo kompleksnost strukture lignocelulozne biomase uvjetuje primjenu različitih tipova predtretmana, koji prethode procesu hidrolize celuloze i hemiceluloze do fermentabilnih šećera. Predtretmani lignocelulozne biomase uključuju biološke, mehaničke, kemijske metode i razne njihove kombinacije. Izbor najboljeg procesa predobrade ovisi o sirovini, ekonomskoj procjeni i utjecaju sirovine na zaštitu okoliša (Menon i Rao, 2012.). **Slika 2.** prikazuje pojednostavljenu shemu frakcioniranja glavnih komponenti lignoceluloznog materijala (Pereira, 2008.).



Slika 2. Frakcioniranje lignoceluloznih komponenti (Pereira, 2008.)

2.1.1. Celuloza

Celuloza se nalazi u svim biljkama - od visoko razvijenih stabala pa sve do primitivnih organizama, kao što su jednostanični organizmi (morske trave i bakterije). Ona čini osnovni strukturni sastojak stanične stijenke biljnih stanica. Celuloza je baza mnogih tehničkih proizvoda (papir, filmovi, vlakna, aditivi, itd.) te se prema tome za proizvodnju velikih količina najčešće

izolira iz drva putem postupaka dobivanja vlakana (Antonović, 2008.). Celulozne se otpatke danas prerađuje mikrobnim procesom u bioetanol i proteinska krmiva. Važan su i obećavajući izvor ugljika za razvoj proizvodnje različitih biotehnoloških proizvoda. Mogući izvori celuloze za mikrobne procese su:

- otpaci crnogoričnog i bjelogoričnog drva (piljevina, kora, strugotine)
- poljoprivredni otpaci (slama, pljeva, komušina, kukuruzna stabljika) (Marić, 2000.).

Celuloza je netopiva u vodi i organskim otapalima, što ju čini idealnim materijalom za stvaranje trajnih, a za vodu propusnih sustava kao što su biljne stanice (Antonović, 2008.). Celuloza je linearni polimer sačinjen od niza glukoznih jedinica povezanih β -1,4 glikozidnim vezama (**Slika 3.**). Ovako povezane glukozne jedinice stvaraju kristalnu strukturu koja može biti razgrađena do monomernih šećera (Singh i Pandey, 2009.). Celulozni lanac je dugačak (produljen ili rastegnut) te su u njemu jedinice glukoze raspoređene u jednoj ravnini (Antonović, 2008.).



Slika 3. Molekularna struktura celuloze (Pereira, 2008.)

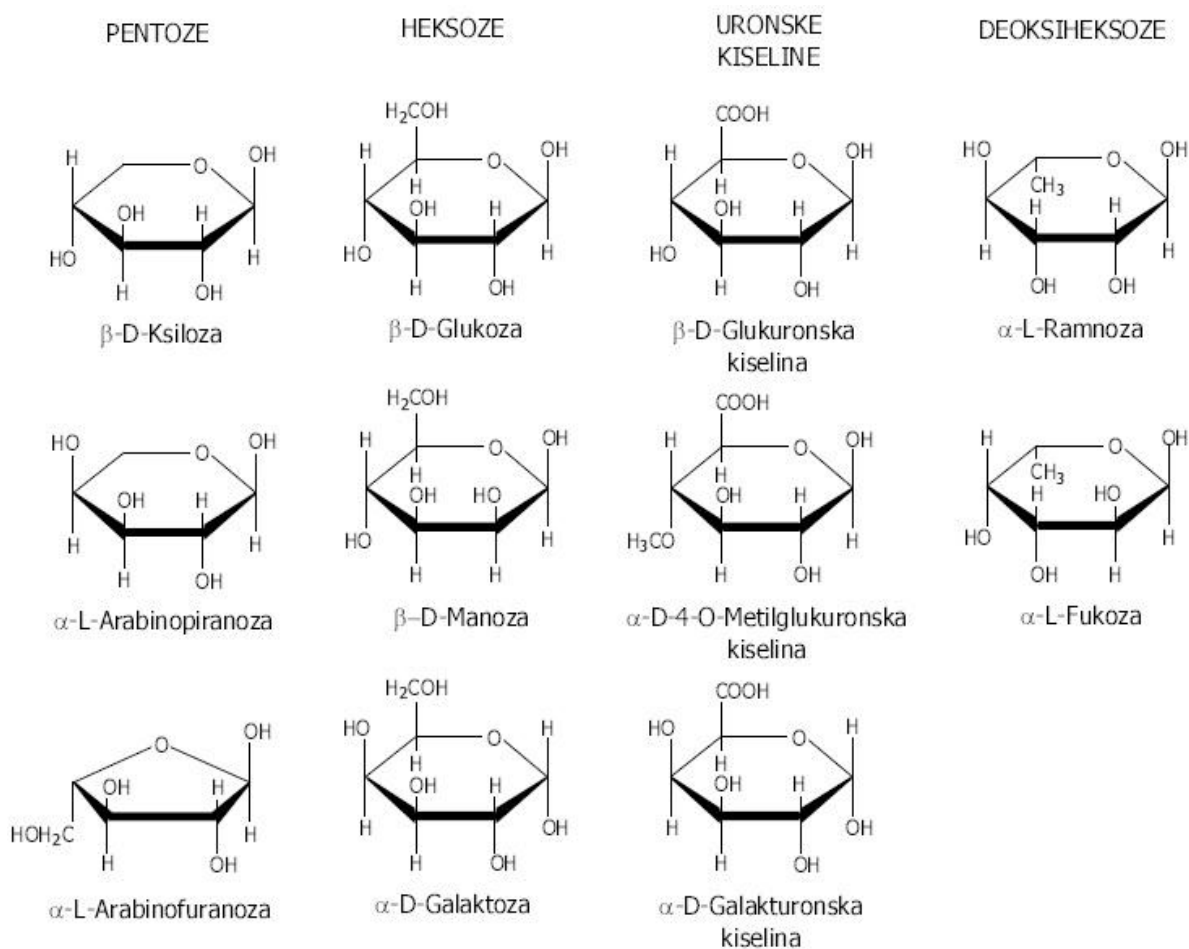
Struktura celuloznih lanaca određuje kemijska i fizikalna svojstva celuloze, kao što su higroskopnost, lako apsorpiranje i desorbiranje vode u amorfnom području te topljivost u jakim kiselinama i lužinama i koncentriranim otopinama soli (Antonović, 2008.). Proces otapanja celuloze počinje s razgradnjom vlaknaste i fibrilarne strukture i završava kompletnom razgradnjom u pojedinačne molekule (Antonović, 2008.).

2.1.2 Hemiceluloza

Još jedna od važnih komponenti lignoceluloznih materijala je hemiceluloza, koja se od celuloze razlikuje po biosintetskom putu nastajanja, kao i po vrsti šećera koje je izgrađuju, po kraćem molekulskom lancu i po grananju lanaca (Antonović, 2008.). Hemiceluloza je izgrađena od pentozna, heksoza, heksauronskih kiselina i deoksiheksoze, pri čemu glavni lanac može biti homopolimer (izgrađen samo od jedne vrste šećera) ili heteropolimer (izgrađen od više vrsta šećera) (**Slika 4.**).

Dugo vremena se vjerovalo da je hemiceluloza posrednik u biosintezi celuloze, odnosno naziv hemiceluloza dobila je na temelju pretpostavke da su ovi polisaharidi preteča celuloze. Danas je poznato da hemiceluloza pripada grupi heterogenih polisaharida koji se stvaraju kroz biosintetske puteve različite nego celuloza te je poznato da celuloza pripada grupi homopolisaharida, a hemiceluloza heteropolisaharidima.

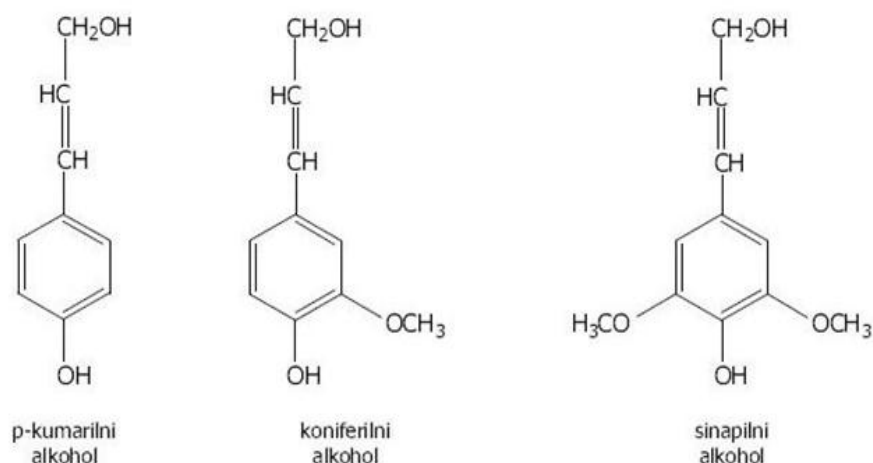
Hemiceluloza je topljiva u vodi pri povišenim temperaturama, pri čemu dolazi do hidrolize. Hidrolizirati je još mogu i razrijeđene kiseline ili lužine, što dovodi do pucanja veza između celuloze, hemiceluloze i lignina. Enzimska hidroliza hemiceluloze je složenija od enzimske hidrolize celuloze, jer uključuje djelovanje više enzima (Waldron, 2010.).



Slika 4. Strukturni prikaz šećernih komponenata hemiceluloze (Antonović, 2008.)

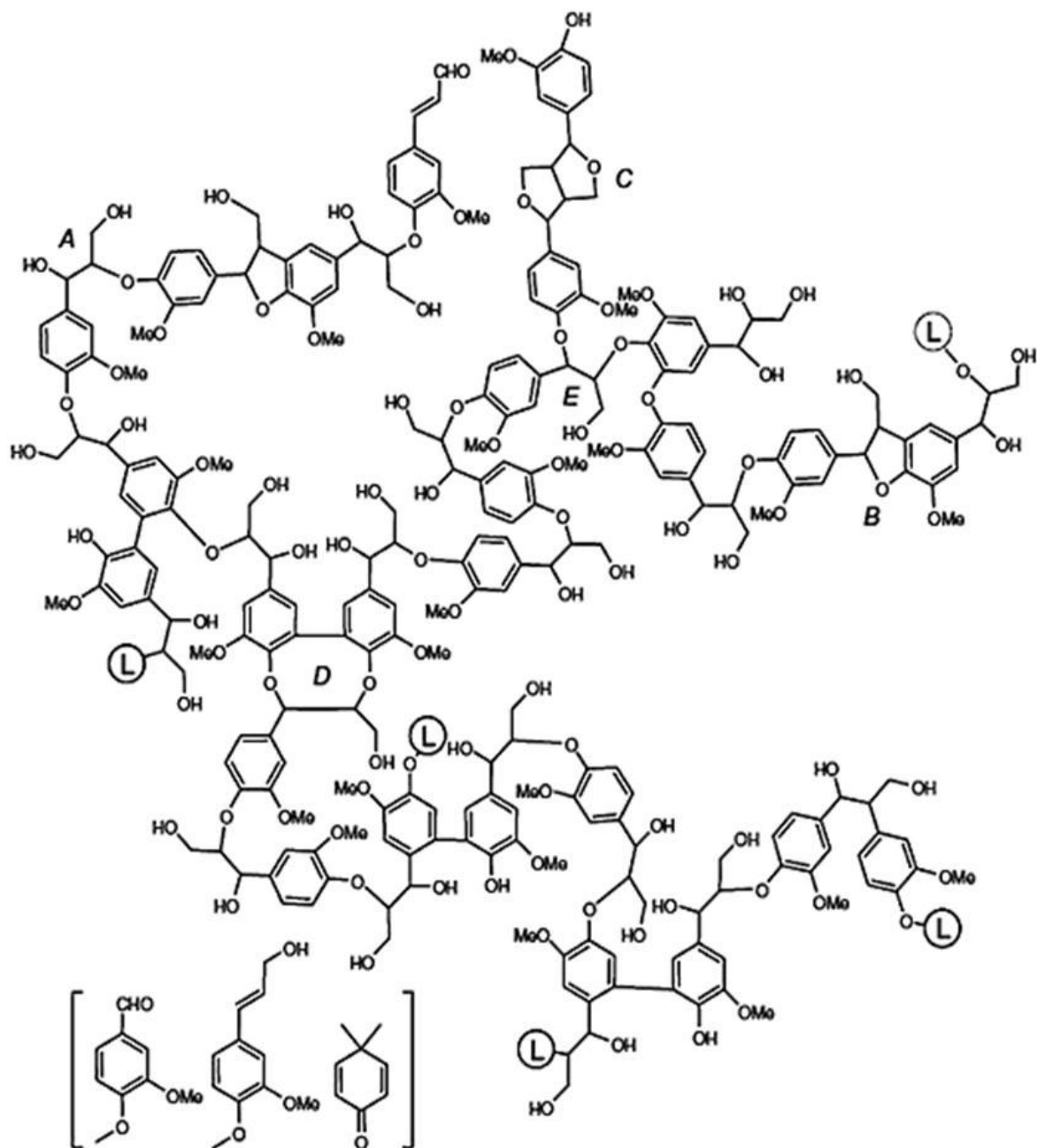
2.1.3. Lignin

Struktura lignina je vrlo složena i nastaje polimerizacijom tri različita monomera: kumarilnog alkohola, koniferilnog alkohola i sinapilnog alkohola (**Slika 5.**), koji se međusobno razlikuju po različitom razmještaju supstituenata u aromatskom prstenu. Ova struktura je također odgovorna za čvrstoću stanične stijenke (Pereira, 2008.). S biokemijskog gledišta važno je što su enzimi koji sudjeluju u procesu stvaranja osnovnih jedinica lignina specifični i nalaze se skoro isključivo u lignificirajućim stanicama ksilema (Antonović, 2008.).



Slika 5. Osnovne građevne jedinice lignina (Antonović, 2008.)

Lignin je amorfna tvar koja je u prirodi izrazito stabilna, vrlo otporna na kemijsku i biološku razgradnju. Biološka razgradnja lignina je oksidacijski proces koji uključuje djelovanje niza izvanstaničnih enzima, koje proizvode gljive (primjerice gljiva bijelog truljenja *P. chrysosporium*) i vrlo mali broj bakterijskih vrsta zahvaljujući kompleksnim enzimskim sustavima koje posjeduju (Pereira, 2008.). Lignin je mnogo teže razgradiv nego celuloza i hemiceluloza, zbog svoje složene strukture i veza koje se ne mogu hidrolizirati (**Slika 6.**) (Pilaš, 2009.).



Slika 6. Segment makromolekule lignina (Alonso, 2005.)

2.2. REPINI REZANCI – LIGNOCELULOZNI OTPAD

Šećerna repa (*Beta vulgaris*) je dvogodišnja biljka koja uglavnom služi za proizvodnju šećera, pri čemu se najveći udio šećera nalazi u tehnološki najznačajnijem dijelu biljke – korijenu (Babić, 2009.). Repini rezanci predstavljaju nusproizvod u proizvodnji šećera, a čine ih biljna vlakana zaostala nakon ekstrakcije saharoze. Većinom se koriste kao stočna hrana, jer imaju puno hranjivih sastojaka, pri čemu se mogu se koristiti svježi ili sušeni (Gagro, 2010.). Osim kao stočna hrana, zanimljiva su i kao dodaci hrani i supstrat za proizvodnju bioplina (Marhart i Campen, 2010.). Zbog svog sastava koji uključuje saharoze zaostalu nakon ekstrakcije, ali i lignocelulozne polimerne sastavnice (**Tablica 1.**) repini rezanci su potencijalna sirovina i za biotehnološku proizvodnju.

Tablica 1. Udjeli lignoceluloznih polimera u repinim rezancima prema različitim autorima.

Lignocelulozni polimer	Udjeli (%)	
	Broughton et al., 1995	Spagnuolo et al., 1997.
Celuloza	23	22-30
Hemiceluloza	26	24-32
Lignin	4,5	3-4

2.3. GLJIVE

2.3.1. Morfologija i sistematika

Jedna od prvih mikrobioloških znanosti jest mikologija, koja se bavi proučavanjem gljiva. Gljive ili fungi uključuju kvasce i plijesni te skupinu makroskopskih organizama, često zvanih mesnatim gljivama. Gljive su posebna skupina organizama koja obuhvaća približno 250.000 vrsta (Duraković, 2002.). Gljive su eukarioti – organizmi čije stanice imaju pravu jezgru koja sadrži stanični genetički materijal i koja je okružena zasebnim omotačem što se naziva jezgrena (nuklearna) membrana (Duraković, 2002.). Većina ih je višestanična iako mogu biti i jednostanične. Zajedno s bakterijama sudjeluju u razgradnji organskih tvari u okolišu. Kako su

gljive izrazito biokemijski aktivne, mnoge imaju iznimnu komercijalnu ulogu u proizvodnji piva, vina, fermentiranih mliječnih proizvoda i antibiotika. No, neke gljive uzrokuju infektivne bolesti sintetizirajući snažne toksine (Duraković, 2003.).

2.3.2. Ishrana i metabolizam

Gljive dobro rastu u tamnom, vlažnom okolišu, ali općenito i na svim mjestima gdje postoji iskoristiv organski materijal. Najveći broj gljiva su saprofiti, odnosno organizmi koji potrebne hranjive tvari dobivaju od mrtve organske tvari. Poput većine bakterija, gljive mogu izlučivati hidrolitičke enzime koji razgrađuju okolišne supstrate. One potom apsorbiraju otopljene hranjive tvari. Gljive su također i kemoorganoheterotrofi i upotrebljavaju organski materijal kao izvor ugljika, elektrona i energije. Većina gljiva iskorištava ugljikohidrate (prvenstveno glukozu ili maltozu) i dušične spojeve za sintezu njihovih vlastitih aminokiselina i proteina (Duraković, 2003.). Gljive su općenito prilagođene okolišu koji je nepovoljan za rast bakterija; one tako mogu preživjeti na mjestima gdje se ne očekuje mikrobni rast. Međutim, gljive se razlikuju od bakterija u određenim okolišnim zahtijevima i u ovim nutritivnim karakteristikama:

1. Gljive u pravilu bolje rastu u kiselom pH području (pH 5,0), koje je prekiselo za rast najvećeg broja bakterija.
2. Najveći broj gljiva su aerobni organizmi, pa one rastu uglavnom na površinama, a manje ispod površine supstrata. Kvasci su fakultativni anaerobi.
3. Najveći je broj gljiva otporniji na osmotski tlak od bakterija; stoga najveći broj gljiva može rasti u okolišu s visokom koncentracijom soli ili šećera.
4. Gljive mogu rasti na tvarima s vrlo malim sadržajem vode, koji je općenito premalen za rast bakterija.
5. Gljive zahtijevaju mnogo manju koncentraciju dušika za rast u odnosu na bakterije.
6. Gljive mogu iskorištavati složene ugljikohidrate primjerice lignin (drvo), koje najveći broj bakterija ne može metabolizirati (Duraković, 2003.).

2.3.3. Klasifikacija gljiva

Svaka gljiva pripada jednoj od pet taksonomskih skupina koje se međusobno razlikuju na osnovi tipa spora, te po morfologiji hifa i spolnom ciklusu. Te skupine su: *Deuteromycetes*, *Zygomycetes*, *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* i *Oomycetes*.

Razred *Basidiomycotina* sadrži gljive nazvane *Basidiomycetes*, općenito poznate kao gljive klobučarke. Njima pripadaju gljive koje rastu na drveću, jestive gljive, gljive puhare, hrđe, snijeti i otrovne gljive. Najveći broj bazidiomiceta žive kao saprofiti i razgrađuju biljni materijal, posebno celulozu i lignin (Duraković, 2003.).

2.3.4. Gljive bijelog truljenja

Od svih poznatih vrsta gljiva samo nekolicina posjeduje sposobnost razgradnje drva (gljive truležnice). Ove gljive pripadaju razdjelima *Basidiomycota* i *Ascomycota*. Tri su glavne vrste gljiva koje razgrađuju drvo: gljive mekog truljenja, gljive smeđeg truljenja i gljive bijelog truljenja, a podjela se temelji na karakteristikama drva i nastalim razgradnim produktima (**Slika 7.**). Gljive truležnice imaju važnu ulogu u procesu kruženja tvari u prirodi i sposobnost razgradnje drvene biomase do jednostavnih produkata: CO₂, H₂O i minerala (Sigoillot i sur., 2012.).



Slika 7. gljive truležnice: A) gljiva smeđeg truljenja; B,C,D) gljive bijelog truljenja (Sigoillot i sur., 2012.)

Gljive bijelog truljenja su najčešći organizmi koji uzrokuju truljenje drveta jer imaju sposobnost degradacije i mineralizacije glavnih komponenti drva celuloze, hemiceluloze i lignina. Ova skupina obuhvaća velik broj gljiva, uglavnom *Basidiomycota*.

Zajednička karakteristika gljiva bijelog truljenja je ekstenzivna degradacija lignina koja rezultira izbjeljivanjem istrulog drveta. Truljenje je karakterizirano vlažnom, mekanom i spužvastom konzistencijom istrulog drveta. Razlikuju se dva tipa bijelog truljenja: simultana (istovremena) razgradnja svih polimera u drvetu i selektivna razgradnja lignina u drvetu (Sigoillot i sur., 2012.). Tijekom simultane razgradnje koju provode primjerice *Trametes versicolor* i *Phanerochaete chrysosporium*, više različitih fungalnih enzima djeluje istovremeno razgrađujući celulozu, hemicelulozu i lignin (Sigoillot i sur., 2012.). Proces selektivne razgradnje lignina puno je rjeđi i tijekom njega fungalni enzimi uklanjaju lignin i necelulozne polisaharide bez veće razgradnje celuloze. *Ceriporiopsis subvermispora* i *Dichomitus squalens* su primjeri organizama koji vrše selektivnu razgradnju lignina. Selektivni razgrađivači lignina posebno su zanimljivi sa stajališta primjene u biotehnologiji, obzirom da uklanjaju lignin, a vrijednu celulozu ostavljaju neoštećenom. Razgradnja lignina pomoću ovih gljiva odvija se tijekom njihovog sekundarnog metabolizma i obično u uvjetima u kojima ima malo dušika (Lankinen, 2004.).

2.3.5. *Phanerochaete chrysosporium*

Phanerochaete chrysosporium je gljiva čija je optimalna temperatura rasta 40 °C i koja provodi simultanu razgradnju svih polimernih sastavnica drva, odnosno lignoceluloznih materijala (**Slika 8.**). Proučavana je kao modelni organizam u razjašnjavanju metaboličkih puteva razgradnje lignina. Isti mehanizmi su uključeni u mineralizaciju za okoliš toksičnih fenolnih kemikalija. Zbog ovih razloga *P. chrysosporium* se koristi kao radni mikroorganizam u brojnim bioprocima čija je uloga zaštita okoliša, kao primjerice biorazgradnja teško razgradivog lignina u poljoprivrednom otpadu s ciljem njegove daljnje upotrebe za ishranu stoke ili za proizvodnju bioetanola (nastaje sirovina s visokim udjelom fermentabilnih šećera), procesi izbjeljivanja u industriji papira i tkanine, detoksikacija i dekolorizacija industrijskih otpadnih voda ili

bioremedijacija odlagališta opasnog otpada (Fraser, 2005.).



Slika 8. Gljiva bijelog truljenja *P. chrysosporium*

(<http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/File:Whiterot.jpg>) [19.01.2014.]

2.4. FERMENTACIJE NA ČVRSTIM NOSAČIMA

Razgradnjom lignoceluloznog materijala pomoću gljiva bijelog truljenja u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima oponaša se proces razgradnje koji se odvija u prirodi, za razliku od submerznog rasta ovih gljiva koji u prirodi nije uobičajen. Fermentacija na čvrstim nosačima eng. „*Solid-state Fermentation*“ (SSF) su procesi uzgoja mikroorganizama u odsutnosti slobodne vode na materijalima koji nisu topljivi i koji djeluju kao fizički nosač ili kao izvor hranjivih tvari za mikroorganizme (Xiong, 2004.). Ovi se procesi gotovo svakodnevno odvijaju u okolišu, poput truljenja voća ili pojave pljesnivosti kruha (Singh i sur., 2008.). Fermentacije na čvrstim nosačima mogu se koristiti za proizvodnju različitih proizvoda poput hrane, goriva, industrijskih kemikalija i farmaceutskih proizvoda (Pandey, 2008.). Kao čvrsti nosači koji se koriste tijekom uzgoja mogu se upotrijebiti inertni (razl. sintetički materijali), ali i ne-inertni materijali poput lignoceluloznog otpada. U posljednjih nekoliko godina lignocelulozni otpad, primjerice repini rezanci, komine i kolači zaostali preradom voća i povrća, sjeme grožđa, trava i sl. sve se češće koristi kao nosač u fermentacijama na čvrstim nosačima (Panda i sur., 2008.). Korištenjem poljoprivredno-industrijskog lignoceluloznog otpada kao supstrata/nosača u SSF procesima istovremeno se smanjuje se količina takvog otpada i dobivaju korisni proizvodi (Pandey, 2008.).

Prednosti fermentacija na čvrstim nosačima u odnosu na submerzne fermentacije (eng. *Submerged fermentations*, SmF) su veća produktivnost procesa, manja potrošnja energije za vođenje procesa, niža cijena opreme i proizvodnje, upotreba različitih otpadnih materijala kao supstrata, manja količina otpadne vode koja nastaje tijekom procesa. Osnovni nedostatak ovih procesa je nedovoljna kontrola procesa (posebno velike varijacije temperature), kao i ograničena opskrba radnog mikroorganizma kisikom i hranjivim tvarima uslijed ograničenja u prijenosu tvari i energije. Prednosti SSF u odnosu na puno češće korištenu submerznu fermentaciju, dane su u **Tablici 2.** (Pandey, 2008.).

Tablica 2. Usporedba SSF i SmF (Pavlečić, 2009.)

SSF	SMF
Većina proizvoda proizvedena u uvjetima niske vlage	Podloge su tekuće i koncentracija otopljenih tvari uglavno ne prelazi više od 5-10%
Medij za uzgoj nije kompleksan, moguć dodatak otopina soli kao izvor minerala, sama obrada i priprema hranjive podloge je dosta jednostavna	Podloge često sadrže čiste i skupe supstrate čime se poskupljuje sam postupak proizvodnje
Tek u novije vrijeme zbog nedovoljne istraženosti postaju zanimljivi kao mogućnost u industrijskoj proizvodnji	Općenito razvijeni procesi, veća mogućnost korištenja različitih mikroorganizama, dobivanje više industrijski važnih proizvoda
Aeracija zahtijeva manje utrošene energije s obzirom da se radi o manjim tlakovima u sustavu	Značajan utrošak energije za aeraciju kod aerobnih procesa
Nemoguće uspostaviti idealnu distribuciju sastojaka podloge, rast može biti limitiran difuzijom hranjivih tvari	U bioreaktorima se postiže dobar stupanj izmješanosti, difuzija hranjivih komponenti nije ograničavajući faktor
Problem s mjernim instrumentima (postavljanje mjerodavnosti)	Fina regulacija procesa (pH elektroda, kisikova elektroda, regulacija temperature)
Kod izdvajanja proizvoda manje otpadne vode, downstream processing jednostavniji (koncentriraniji produkt), međutim ekstrakt može sadržavati dijelove supstrata	Bolje istraženi transport mase i energije te kinetički modeli koji olakšavaju rad na ovim supstratima
Problem s uvećanjem procesa	-

Nekoliko je važnih čimbenika, koje je potrebno razmotriti prilikom razvoja nekog SSF bioprocesa. Ovo uključuje selekciju pogodnih mikroorganizama i supstrata, optimizaciju parametara procesa i izolaciju i pročišćavanje proizvoda. S obzirom na odsutnost slobodne vode u procesu, gljive i plijesni su najpogodniji mikroorganizmi za uzgoj u uvjetima SSF. Bakterije su uglavnom uključene u procesima kompostiranja i u nekim procesima proizvodnje hrane u uvjetima SSF (Pandey, 2008.). Filamentozne gljive su najvažnija skupina mikroorganizama korištenih u SSF procesima zahvaljujući njihovoj fiziološkoj, enzimskoj i biokemijskoj strukturi (Pandey, 2008.). Primjeri SSF upotrebom različitih vrsta mikroorganizama dani su u **Tablici 3.** (Raimbault, 1998.).

Tablica 3. Mikroorganizmi koji se koriste za provođenje procesa SSF (Raimbault, 1998.)

MIKROORGANIZMI	SSF PROCES
Bakterije <i>Bacillus sp.</i> <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Lactobacillus sp.</i>	kompostiranje, proizvodnja amilaze kompostiranje proizvodnja hrane
Plijesni <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Schwanniomyces castelli</i>	proizvodnja hrane, etanola proizvodnja etanola, amilaze
Gljive <i>Alternaria sp.</i> <i>Aspergillus sp.</i> <i>Fusarium sp.</i> <i>P. chrysosporium</i> <i>Trichoderma sp.</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Penicillium notatum, P. roquefortii</i>	kompostiranje kompostiranje, proizvodnja hrane kompostiranje kompostiranje, razgradnja lignina kompostiranje, bioinsekticidi proizvodnja stočne hrane, proizvodnja amilaze, proizvodnja pencilina, sira

Fermentacije na čvrstim nosačima od davnina se primjenjuju u prehrambenoj industriji za proizvodnju tradicionalnih fermentiranih prehrambenih proizvoda (npr. japanski „*koji*“, indonezijski „*tempeh*“, francuski plavi sir, itd.) (Pandey i sur., 2008.). U novije se vrijeme fermentacije na čvrstim nosačima sve češće upotrebljavaju za proizvodnju finih kemikalija, lijekova, enzima, biogoriva, tvari arome, kao i u zaštiti okoliša u svrhu bioremedijacije (Pandey, 2003.).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

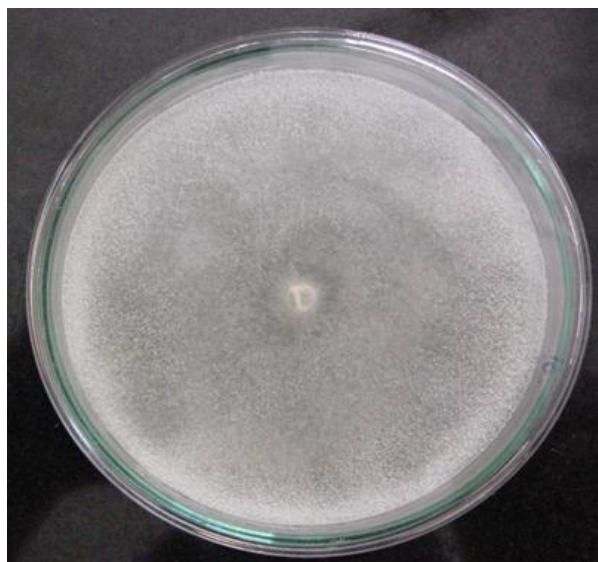
3.1. ZADATAK

Cilj ovog rada bio je istražiti mogućnost upotrebe gljive bijelog truljenja *P. chrysosporium* u svrhu razgradnje lignoceluloznog materijala u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima. Kao supstrat su korišteni izluženi i osušeni repini rezanci zaostali nakon proizvodnje šećera.

3.2. MATERIJALI

3.2.1 Mikroorganizam

Kao radni mikroorganizam korištena je gljiva bijelog truljenja *P. chrysosporium* (**Slika 9.**). Gljiva je uzgajana na krumpirovom agaru (PDA, Biolife Italiana Sr. L. Viale Monza, Italy) tijekom sedam dana pri 27 °C. Kao inokulum u daljnjim pokusima korišteni su micelijski diskovi promjera 6 mm.



Slika 9. Gljiva bijelog truljenja *P. chrysosporium* na krumpirovom agaru

3.2.2. Supstrat

Kao supstrat korišteni su repini rezanci (**Slika 10.**) nastali preradom šećera iz šećerne repe u tvornici šećera „Sladorana Županja d.d. ” (Županja, Hrvatska).



Slika 10. Repini rezanci

3.2.3. Kemikalije

Tijekom rada korištene su sljedeće kemikalije: krumpirov agar (Biolife, Italija), benzen (Carlo Erba, Francuska), $K_2Cr_2O_7$ (Kemika d.d., Hrvatska), konc. H_2SO_4 (Kemika d.d., Hrvatska), 80% CH_3COOH , konc. HNO_3 (Carlo Erba, Francuska), 95% CH_3COOH , 80% etanol, 72% H_2SO_4 , NaCl (Kemika d.d., Hrvatska), HCl (Kemika d.d., Hrvatska), orcinol reagens.

3.3. APARATURA

3.3.1. Autoklav

Sterilizacija staklenki, supstrata, hranjivih podloga je provođena u autoklavu (TIP 7510945, Sutjeska, Beograd).

3.3.2. Inkubator

Fermentacije su provedene u inkubatoru (Termo medicinski aparat, BTEST 1, Bodalec Havoić, Zagreb, Hrvatska).



Slika 11. Inkubator

3.3.3. Sušionik

Sušenje uzoraka provedeno je u sušioniku ST-01/02 (Instrumentaria, tvornica medicinskih instrumenata, Zagreb).

3.3.4. Mufolna peć

Određivanje udjela pepela provedeno je u mufolnoj peći Nabertherm LE 14/11/B150 (Njemačka)

3.3.5. Uređaj za ekstrakciju

Određivanje udjela ekstraktivnih tvari je provedeno na uređaju SOXTEC SUSTAV 1040 Extraction Unit (Foss Tecator).



Slika 12. Uređaj za ekstrakciju

3.3.6. Spektrofotometar

Udjeli lignina topljivog u kiselini i pentozana određeni su spektrofotometrijski na spektrofotometru SHIMADZU, tip UV-1 700 Pharma Spec. (Deutschland GmbH, Duisburg, Njemačka).



Slika 13. Spektrofotometar

3.3.7. Tresilica

U postupku određivanja udjela pentozana korištena je tresilica Julabo, tip SW 23 (Labortechnik GmbH, Seelbach, Njemačka).

3.3.8. Centrifuga

U postupku pripreme uzoraka za određivanje udjela lignina uzorci su centrifugirani na centrifugi Sigma, tip 2-16 PK (SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Njemačka).

3.3.9. Kjeldalh uređaj

Za određivanje udjela ukupnog dušika korišten je uređaj Kjeltect™ 2300 Analyzer Unit (FOSS Analytical, Danska).

3.3.10. Laboratorijski mlin

Usitnjavanje uzorka provedeno je na laboratorijskom mlinu MF10 basic (IKA Labortechnik, Njemačka).

3.4. METODE

3.4.1. Priprema hranjive podloge za uzgoj radnog mikroorganizma

Izvagano je 42 g krumpirovog agara (Biolife, Italija) i dodano je 1000 mL destilirane vode, zagrijano do vrenja i sterilizirano u autoklavu pri 121 °C kroz 15 minuta. Podloga je ohlađena na temperaturu od 45°C do 50°C. Nakon hlađenja podloga je dobro promiješana te prelivena u prethodno sterilizirane Petrijeve zdjelice. Na podlogu je potom naciepljen mikroorganizam. Inkubacija je trajala sedam dana pri 27 °C.

3.4.2. Uzgoj gljive bijelog truljenja *P. chrysosporium* u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima

Staklenke za fermentaciju sterilizirane su u autoklavu kroz jedan sat. Izvagano je 50 g uzorka repinih rezanaca, u svaku staklenku dodano je 32 mL destilirane vode, kako bi osigurali $a_w = 0.98$. Supstrat u staklenkama naciepljen je s pet micelijskih diskova (**Slika 14.**) (pomoću sterilnog bušača čepova $\varnothing$ 6 mm, sterilnom špatulom su diskovi prebačeni u tikvicu s uzorkom) kulture gljive stare 7 dana uzgojene na PDA agaru, te protrešen. Poklopac svake tikvice je zamijenjen listom sterilnog papirnatog ubrusa kako bi se osigurali aerobni uvjeti te papir pričvršćen gumicom. Označene tikvice s uzorcima stavljene su na inkubaciju. Tikvice s uzorcima protresane su ručno jednom dnevno kroz pet minuta. Inkubacija je trajala 10, 20, 30 dana.



A

B

Slika 14. Rezanje micelijskih diskova pomoću sterilnog bušača (A) i repini rezanci naciepljeni radnim mikroorganizmom *P. chrysosporium* (B)

3.4.3. Određivanje udjela vode termogravimetrijskom metodom

U prethodno osušenu (105 °C kroz jedan sat), u eksikatoru ohlađenu, i odvagano aluminijsku posudicu s poklopcem, izvagano je 2g (± 0.0001 mg) uzorka. Posuda s uzorkom stavljena je u sušionik, s koso postavljenim poklopcem, koja je prethodno zagrijana na 105 °C. Nakon sušenja u trajanju od četiri sata uzorak je stavljen u eksikator na hlađenje. Nakon hlađenja kroz jedan sat uzorak se važe. Ponovno se stavlja u sušionik kroz jedan sat, hladi i važe na analitičkoj vagi. Postupak se ponavljao do konstantne mase.

Udio vode određen je prema izrazu:

$$w = \frac{b - a}{b} 100 [\%]$$

a – masa uzorka nakon sušenja [g]

b – masa uzorka prije sušenja [g]

w – udio vlage u uzorku [%]

3.4.4. određivanje udjela ekstraktivnih (akcesornih) tvari

Za analizu je korišteno 3 g prethodno usitnjenog i homogeniziranog uzorka (uzorak je odvagano u ekstrakcijske tuljke i stavljen u ekstrakcijsku jedinicu), a kao ekstrakcijsko otapalo korištena je smjesa otapala etanol : benzen = 1 : 1 (ekstrakcijsko otapalo u količini od 50 mL dodaje se u prethodno osušene i odvagane ekstrakcijske posude koje se onda stavljaju u ekstrakcijsku jedinicu na ploču za zagrijavanje).

Ekstrakcija je provedena u dvije faze („boiling” i „rising”) u ukupnom trajanju od 90 minuta. Nakon završetka ekstrakcije, ekstrakcijske posude s ekstrahiranim tvarima osušene su na 80 °C do konstantne mase.

Udio akcesornih tvari izračunava se na sljedeći način:

$$AT = \frac{b - a}{c} 100 [\%]$$

a – masa prazne tikvice [g]

b – masa tikvice sa osušanim akcesornim tvarima [g]

c – masa apsolutno suhog uzorka [g]

AT – udio akcesornih tvari u uzorku [%]

3.4.5. Određivanje udjela mineralnih tvari (pepela)

Za određivanje udjela pepela odvagano je 2 g uzorka, te ista količina uzorka za određivanje suhe tvari. Odvagani uzorak raspoređen je rahlo u slojevima u prethodno ožarene i izvagane lončice za spaljivanje. Uzorak u lončićima za spaljivanje prethodno je karboniziran na električnom grijaču. Nakon karbonizacije, lončići su stavljeni u peć za spaljivanje Nabertherm LE 14/11/B150 (Njemačka) zagrijanu na 570 °C. Po završetku spaljivanja lončići su izvađeni iz peći, ostavljeni jednu minutu na azbestnoj mrežici te stavljeni u eksikator. Nakon hlađenja kroz jedan sat, lončići su izvagani i određen je udjel pepela je prema izrazu:

$$P = \left(\frac{100 \cdot (b - a)}{\frac{c \cdot 100}{100 - V}} \right) [\%]$$

a – masa praznog lončića za spaljivanje [g]

b – masa lončića za spaljivanje s pepelom [g]

c – masa odvagane količine uzorka [g]

V – udjel vlage ispitivanog uzorka [%]

3.4.6. Određivanje udjela celuloze

Udjel celuloze određen je prema Rivers i sur. (1983.). U epruvete je odvagano 0.8 g prethodno usitnjenog ekstrahiranog uzorka. Uzorku je dodano 30 mL reagensa prema Updergraff (1969.) (150 mL 80% CH_3COOH + 15 mL konc. HNO_3) i stavljeno u vodenu kupelj na 100 °C kroz jedan sat. Nakon jednog sata uzorak je filtriran preko filter papira na Büchnerovom lijevku. Nakon filtracije uzorak je ispran dva puta sa 95% alkoholom. Uzorak s filter papirom prebačen je u aluminijskim posudicama u sušionik, gdje je osušen do konstantne mase pri 105 °C (m_1)

Uzorci s filter papira prebačeni su kvantitativno u porculanske lončice uz pomoć 95% etanola. Etanol je otparen na vodenoj kupelji, dok uzorak nije postao potpuno suh. Uzorak je zatim kvantitativno prebačen u epruvete, te mu je dodano 30mL 72% H_2SO_4 . Epruvete s uzorkom stavljene su u vodenu kupelj na 30 °C kroz jedan sat. Kada se sav uzorak otopio provedena je filtracija preko sinter lončića koji su zatim sušeni u sušioniku do konstantne mase na 105 °C (m_2)

Udjel celuloze izračunava se na sljedeći način:

$$m_{\text{celuloze}} = m_1 - m_2$$

$$C = \frac{m_{\text{celuloze}}}{m_{\text{apsolutno suhog uzorka}}} 100 [\%]$$

3.4.7. Određivanje udjela lignina

Udjeli lignina u uzorcima određeni su prema Aldeus i Sjöholm (2011.). Prije određivanja udjela lignina u uzorcima određen je udio suhe tvari na način da je izvagano 2 g uzorka i osušeno pri 105 °C do konstantne mase.

Izvagano je $100 \pm 0,1$ mg uzorka u Eppendorf tubicu, te je izračunata masa suhe tvari na izvagano količinu uzorka. U prethodno izvagani uzorak dodano je jedan mililitar 72% H_2SO_4 , te je sadržaj izmiješan na vrtložnoj miješalici (Vortex) do otapanja uzorka. Ovako pripremljen uzorak u tubici stavljen je u vodenu kupelj na termostatisiranje pri 30 °C kroz jedan sat. Uzorak u vodenoj kupelji povremeno je izmiješan na Vortex – u. Nakon termostatisiranja, uzorak je prebačen u čašu volumena 50 mL i dodano je 28 mL vode. Čaša s uzorkom pokrivena je aluminijskom folijom te stavljena na sterilizaciju u autoklav na 120 °C kroz jedan sat. Uzorci izvađeni iz autoklava ohlađeni su na temperaturu 80 °C. Udio netopljivog lignina (AIR) određen je na način da se vrući uzorak profiltrirao koristeći prethodno izvagane staklene sinter lončice odgovarajuće poroznosti. Filtrat je zatim prebačen u epruvetu s čepom i sačuvan za određivanje udjela lignina topljivog u kiselini. Uzorak zaostao na staklenim sinter lončićima ispran je vrućom vodom do neutralne reakcije (provjera pomoću pH – indikatorskog papira). Stakleni sinter lončić s uzorkom zatim je osušen u sušioniku na 105 °C do konstantne mase. Udjel lignina topljivog u kiselini određen je spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije prethodno sačuvanog filtrata pri 205 nm.

Udjel lignina koji nije topljiv u kiselini je određen prema izrazu:

$$AIR = \frac{m}{M} \cdot 1000 [mg/g]$$

m – masa uzorka zaostala na sinter lončiću nakon sušenja nakon sušenja do konstantne mase [g]

M – masa apsolutno suhog uzorka prije kiselinske hidrolize [g]

Udjel lignina topljivog u kiselini određen je prema izrazu:

$$ASL = \frac{A \cdot D \cdot V}{a \cdot b \cdot M} \cdot 1000 \text{ [mg/g]}$$

A – apsorbancija

D – faktor razrijeđenja

V – volumen filtrata (*V* = 0,029 L)

a – ekstinkcijski koeficijent (*a* = 110 g /L cm)

b – promjer kivete (*b* = 1 cm)

M – masa apsolutno suhog uzorka prije kiselinske hidrolize (g)

Udjel ukupnog lignina izračunat je prema izrazu:

$$UKUPNI \text{ LIGNIN} = AIR + ASL$$

3.4.8. Određivanje udjela pentozana

Udjeli pentozana određeni su prema protokolu TAPPI T223 cm-01 (2011.). U okruglu tikvicu stavljeno je 1 g neekstahiranog uzorka repinih rezanaca. Dodano je 20 g NaCl, 100 mL 3,85 N HCl i nekoliko kamenčića za vrenje. Tikvica je spojena na aparaturu za destilaciju, te je označen nivo kiseline u tikvici. U lijevak za odjeljivanje dodano je 250 mL 3,85 N HCl. Kiselina je destilirana ujednačenim protokom od oko 2,5 mL po minuti, a destilat je sakupljen u odmjernoj tikvici od 250 mL (uronjenoj u led). Tijekom destilacije održavan je konstantan volumen od 100 mL u okrugloj tikvici dodavajući kiselinu iz lijevka za odjeljivanje kap po kap ili u intervalima 25 mL svakih 10 minuta. Destilat je skupljan tijekom 90 minuta. Destilat (*T* = 20 °C), nadopunjen je s 3,85 N HCl do 250 mL i dobro promiješan. Otpipetirano je 5 mL destilata u odmjernu tikvicu od 50 mL, dodano 25 mL orcinol reagensa, promiješano i termostatirano pri 25 ± 1 °C. Nakon 60 ± 5

minuta nadopunjeno je etanolom do 50 mL, promiješano i ponovno termostatirano 60 ± 5 minuta. Mjerena je apsorbancija pri 630 nm i na osnovu prethodno izrađene baždarne krivulje izračunat udjel pentozana u uzorku.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. RAZGRADNJA REPINIH REZANACA POMOĆU GLJIVE BIJELOG TRULJENJA *P. Chrysosporium* U UVJETIMA FERMENTACIJE NA ČVRSTIM NOSAČIMA

Kemijski sastav repinih rezanaca određen je prije i nakon fermentacije s gljivom bijelog truljenja *P. chrysosporium*. Gubitak na masi lignoceluloznog materijala, udjeli dušika, organskog ugljika, pepela i pentozana određeni su u neekstrahiranim uzorcima. U krutom ostatku zaostalom nakon ekstrakcije ekstraktivnih tvari (ekstrahirani uzorak) određeni su udjeli celuloze i lignina.

4.1.1. Gubitak na masi i promjena boje supstrata

Gubitak na masi supstrata nakon 30 dana fermentacije, koji je iznosio 19,62%, upućuje na rast gljive *P. chrysosporium* na repinim uzorcima. Naime, uslijed potrošnje prisutnih šećera i razgradnje lignoceluloznih sastavnica repinih rezanaca došlo je do gubitka na masi supstrata. Nadalje, promjena boje supstrata (**Slika 15.**) također upućuje na rast *P. chrysosporium* tijekom ovog istraživanja. Zajednička karakteristika gljiva bijelog truljenja je razgradnja lignina koja rezultira izbjeljivanjem lignoceluloznog materijala na kojem raste (najčešće drvo).



a)

b)

Slika 15. Promjena lignoceluloznog sadržaja a) prije fermentacije b) nakon 30 dana fermentacije

4.1.2. Određivanje udjela ekstraktivnih tvari, pepela i dušika

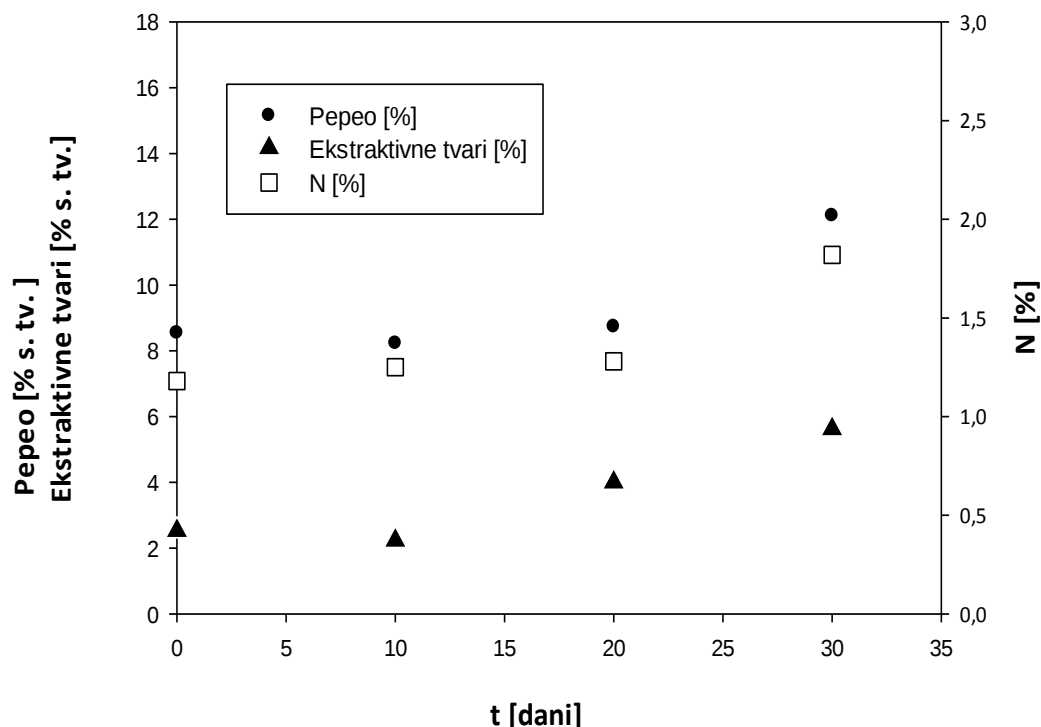
Slika 16. prikazuje udjele ekstraktivnih tvari, mineralnih tvari (pepela) i dušika u uzorcima repinih rezanaca prije i tijekom 30 dana fermentacije s *P. chrysosporium*.

U skupinu ekstraktivnih tvari ubrajaju se različite vrste spojeva, poput alkana, masnih kiselina i masnih alkohola, slobodnih i konjugiranih sterola, terpena, triglicerida i voskova, itd. (Cavka, 2013.). S obzirom na vrstu lignoceluloznog materijala, sadržaj ekstraktivnih tvari obično iznosi 2 – 5%, ali može iznositi i do 15% (Shebani i sur., 2008.). S obzirom da neke od navedenih ekstraktivnih tvari mogu utjecati na mjerenja udjela strukturnih komponenti različitih usjeva i drvenastog materijala, često ih je potrebno izdvojiti prije analize – primjerice prije analize lignina i celuloze. Tijekom ovog istraživanja došlo je do povećanja sadržaja ekstraktivnih tvari od 122% u odnosu na početni uzorak, što se može pripisati mikrobnj aktivnosti, odnosno rastu i razmnožavanju *P. chrysosporium* tijekom fermentacije.

Udjel pepela daje podatak o ukupnom iznosu minerala u ispitivanom uzorku. Iskorišteni supstrati zaostali nakon fermentacije s različitim vrstama gljiva često pokazuju povećanje sadržaja minerala (pepela) i mogu se koristiti za uređenje tla, poboljšanje fizičkih i kemijskih uvjeta tla koji pružaju hranjive tvari za biljke (Peksen et al., 2011.). U uzorcima koji su izuzimani tijekom fermentacije u ovom istraživanju primijećen je kontinuirani porast udjela pepela s produljenjem vremena fermentacije. Nakon 30 dana fermentacije porast u odnosu na početni uzorak iznosio je 41%.

Tijekom ovog istraživanja udjeli dušika, kao i udjeli ekstraktivnih tvari i pepela, također su se kontinuirano povećavali s produljenjem vremena fermentacije. Nakon 30 dana fermentacije porast udjela dušika je iznosio 54,24% u odnosu na početni uzorak.

Rezultati određivanja udjela ekstraktivnih tvari, pepela i dušika u skladu su s istraživanjima koja su provedena na istom supstratu i pri istim uvjetima uzgoja s plijesni *Aspergillus niger* (Jozić, 2013.).



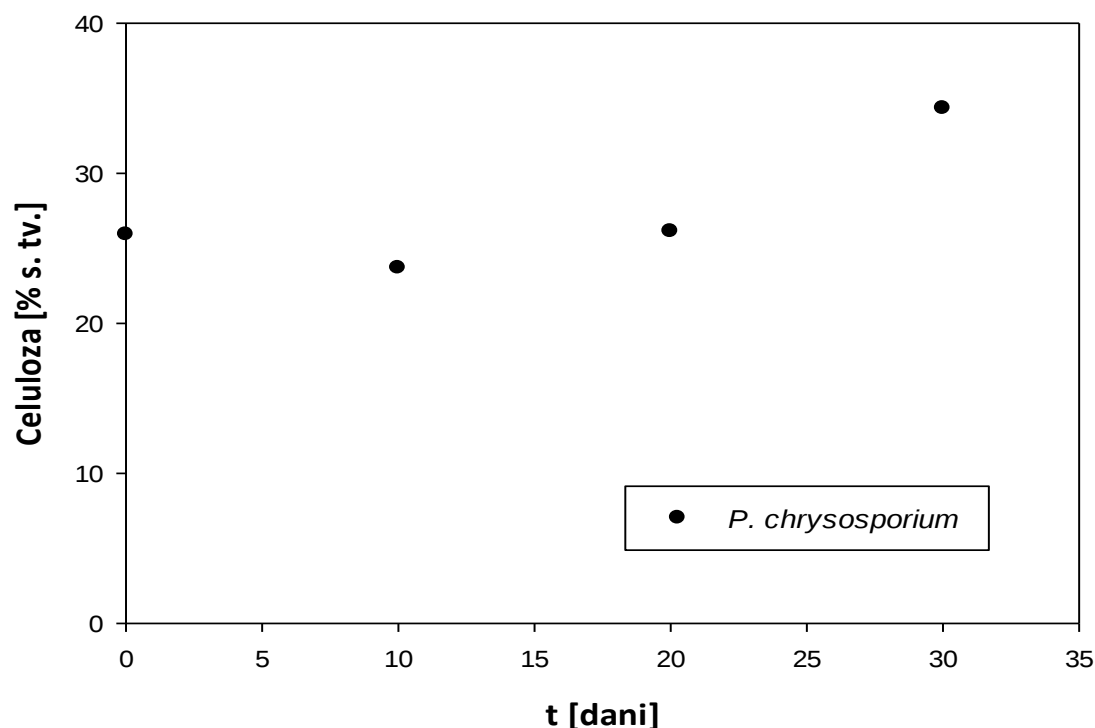
Slika 16. Promjene udjela ekstraktivnih tvari, pepela i dušika u uzorcima repinih rezanaca tijekom 30 dana fermentacije s *P. chrysosporium*

4.1.3. Određivanje udjela celuloze

Udjeli celuloze u uzorcima repinih rezanaca prije i tijekom 30 dana fermentacije s *P. chrysosporium* prikazani su na **Slici 17**.

Iako se *P. chrysosporium* ubraja u skupinu gljiva bijelog truljenja koje provode simultanu razgradnju lignoceluloznih sastavnica, pri čemu istovremenim djelovanjem više različitih fungalnih ekstracelularnih enzima dolazi do razgradnje celuloze, hemiceluloze i lignina (Sigoillot i sur., 2012.), tijekom ovog istraživanja nije došlo do razgradnje celuloze. Porast udjela celuloze koji je primijećen vjerojatno je posljedica rasta i produkcije spora ove gljive, te posljedične adsorpcije spora na površini supstrata. Budući da je primijenjena metoda određivanja udjela celuloze bila gravimetrijska, prisutnost spora vjerojatno je utjecala na kvantifikaciju celuloze.

Isto je primjećeno i u istraživanju provedenom s plijesni *A. niger* pri istim primjenjenim uvjetima uzgoja (Jozić, 2013.), gdje je također primjećen blagi porast udjela celuloze nakon 30 dana fermentacije u odnosu na početni uzorak.



Slika 17. Promjene udjela celuloze u uzorcima repinih rezanaca tijekom 30 dana fermentacije s *P. chrysosporium*

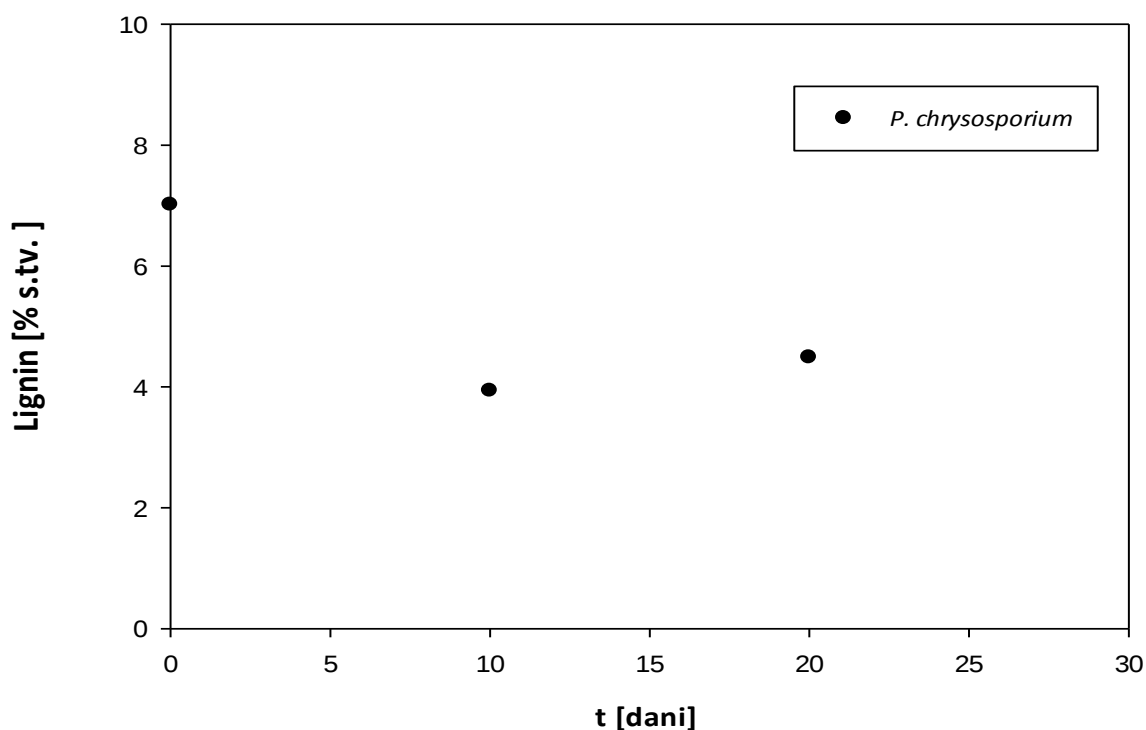
4.1.4. Određivanje udjela lignina

Promjene udjela lignina u uzorcima repinih rezanaca prije i tijekom 20 dana fermentacije s *P. chrysosporium* prikazani su na **Slici 18**.

Najvažniji enzimi uključeni u razgradnju lignina su lignolitički enzimi, kao što su mangan peroksidaze, lignin peroksidaze i lakaze. Uz ove enzime u razgradnji lignina sudjeluju i brojni drugi enzimi, kao i različiti ekstracelularni metaboliti, metalni ioni i reaktivne kisikove vrste (Sigoillot, 2012). Gljive bijelog truljenja posjeduju enzimске sustave odgovorne za sintezu gore navedenih

enzima, što im omogućuje ekstenzivnu razgradnju lignina. Upravo je *P. chrysosporium* proučavana je kao modelni organizam u razjašnjavanju metaboličkih puteva koji omogućuju razgradnju lignina (Singh i Chen, 2008.). Na osnovu rezultata konverzije lignina koja je nakon 20 dana fermentacije iznosila 24%, može se zaključiti da je soj *P. chrysosporium* korišten tijekom ovog istraživanja proizvodio ekstracelularne enzime odgovorne za razgradnju lignina, ali ta razgradnja nije bila značajna pri primjenjenim uvjetima uzgoja.

Kada je kao radni mikroorganizam korištena plijesan *A.niger* pri istim uvjetima uzgoja i na istom supstratu, nakon 20 dana postignuta je konverzija lignina veća od 24%, dok je konačna konverzija nakon 30 dana fermentacije iznosila 49% (Jozić, 2013.).

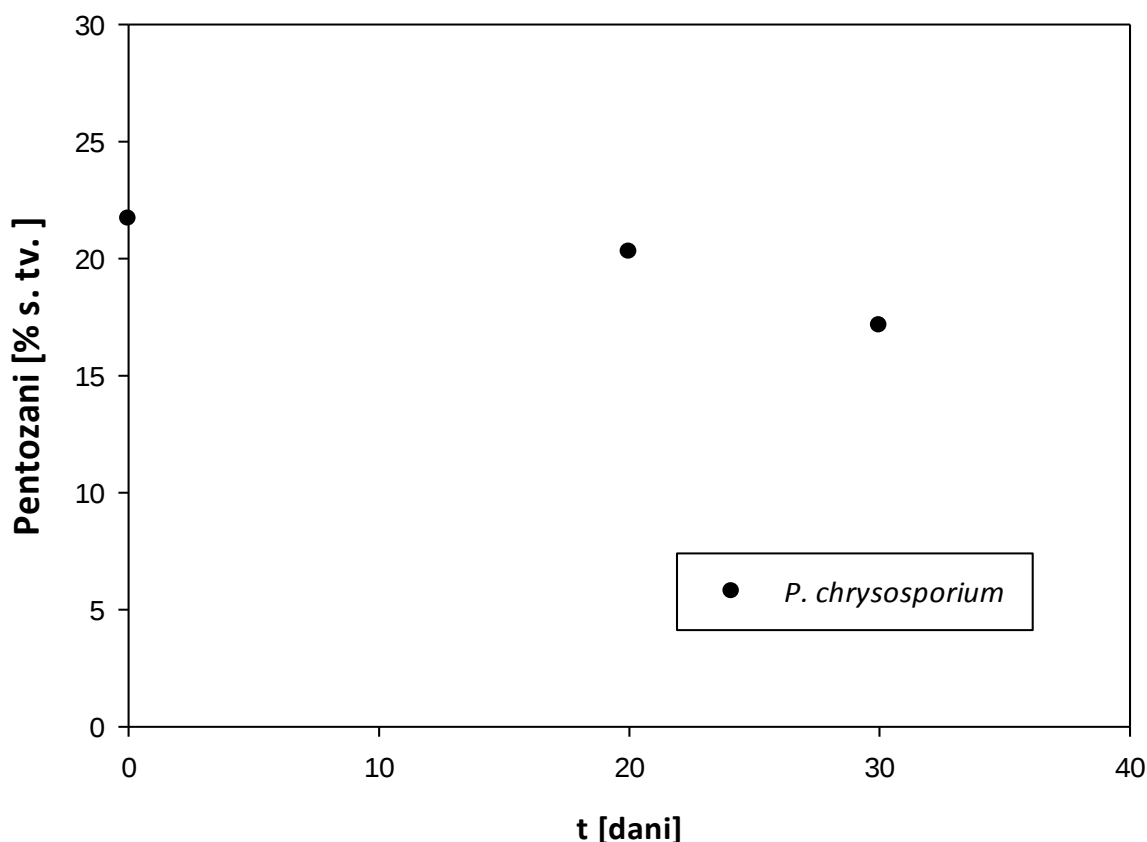


Slika 18. Promjene udjela lignina u uzorcima repinih rezanaca tijekom 20 dana fermentacije s *P. chrysosporium*

4.1.5. Određivanje udjela pentozana

Promjene udjela pentozana u uzorcima repinih rezanaca prije i tijekom 30 dana fermentacije s *P. chrysosporium* prikazani su na **Slici 19**.

Tijekom istraživanja došlo je do smanjenja udjela pentozana u uzorcima fermentiranih repinih rezanaca, u odnosu na početni (nefermentirani) uzorak. Konverzija pentozana nakon 30 dana fermentacije iznosila je 21%, što ukazuje na sposobnost korištenog soja *P. chrysosporium* da razgradi hemicelulozu te razgradne produkte (pentozani) koristi kao izvor ugljika za rast i razmnožavanje. Ipak, smanjenje udjela pentozana (razgradnja hemiceluloze) pri uvjetima uzgoja primjenjenim tijekom ovog istraživanja nije bila značajna. S plijesni *A. niger* postignuta je veća konverzija pentozana (75,18%) pri istim procesnim uvjetima (Jozić, 2013.).



Slika 19. Promjene udjela pentozana u uzorcima repinih rezanaca tijekom 30 dana fermentacije s *P. chrysosporium*

5. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata dobivenih tijekom ovog istraživanja mogu se izvesti sljedeći zaključci:

Gljiva bijelog truljenja *P. chrysosporium* dobro je rasla na repinim rezancima kao supstratu, bez dodataka vanjskih izvora ugljika i dušika, što je potvrđeno vizualno promjenom boje supstrata (izbijeljeni izgled), kao i gubitkom na masi supstrata od 19,62% uslijed potrošnje prisutnih šećera i razgradnje lignoceluloznih sastavnica repinih rezanaca.

Tijekom istraživanja došlo je do povećanja udjela ekstraktivnih tvari od 122%, pepela od 41% i dušika od 54,24% u odnosu na početne udjele u supstratu prije fermentacije, što dodatno potvrđuje da je došlo do rasta i razmnožavanje gljive *P. chrysosporium* tijekom istraživanja.

Soj *P. chrysosporium* korišten u ovom istraživanju nije pokazao celolitičku aktivnost. Porast udjela celuloze zabilježen je nakon 30 dana fermentacije u odnosu na početni uzorak, vjerojatno kao posljedica adsorpcije spora *P. chrysosporium* na supstrat i primijenjene gravimetrijske metode određivanja.

Soj *P. chrysosporium* korišten tijekom ovog eksperimenta proizvodio je ekstracelularne enzime odgovorne za razgradnju lignina i hemiceluloze, ali ta razgradnja nije bila značajna, što potvrđuju dobiveni rezultati konverzije lignina od 24% dobiveni nakon 20 dana fermentacije i pentozana od 21% dobiveni nakon 30 dana fermentacije.

6. LITERATURA

- Aldaeus F, Sjöholm E : COST Action FP0901 Round Robins of lignin samples Part 1 : Lignin content. *Innventia Report* No.:IR 108, 1-23, 2011
- Alonso D, Martins B, Ferreira H, Simões R, Leite R , Ferreira H, Souza MM : Agroindustrial Wastes as Substrates for Microbial Enzymes Production and Source of Sugar for Bioethanol Production, Brazil, 2005.
- Antonović A : *Kemija drva II*. Interna skripta, Šumarski fakultet, Zagreb, 2008.
- Babić J : *Proizvodnja šećera*. Interna skripta, PTF Osijek, 2009.
- Lee C, Zheng Y, Cheng Ch Yu YS, Simmons CW, Dooley TM, Zhang R, Jenkins BM, Vander Gheynst JS : Integrating sugar beet pulp storage, hydrolysis and fermentation for fuel ethanol production. *Appl Energ*, 93, 168-175, 2012.
- Cavka A : *Biorefining of lignocellulose*, Detoxification of inhibitory hydrolysates and potential utilization of residual streams for production of enzymes, Umea University, Sweden, 2013.
- Doherty WOS, Mousavioun P, Fellows CM : Value-adding to cellulosic ethanol: Lignin polymers. *Industrial Crops and Products*, 33, 259-276, 2011.
- Duraković S, Duraković L : *Mikologija u biotehnologiji*. Kugler, Zagreb, 2003.
- Duraković S, Redžepović S : *Uvod u opću mikrobiologiju*. Kugler, Zagreb, 2002.
- Fraser SJ : Intraspesific comparison of *Phanerochaete chrysosporium* strains: peroxidase production, pollutant degradation and mycelial differentiation. *Doktorska disertacija*, Rhodes University, Južnoafrička Republika, 2005.
- Gagro M : *Ratarstvo obiteljskog gospodarstva*. Industrijsko i krmno bilje, Zagreb, 1998.
- Jozić I : Određivanje kemijskog sastava repinih rezanava tijekom fermentacije s plijesni *Aspergillus niger*. *Diplomski rad*, Prehrambeno – tehnološki fakultet Osijek, Osijek 2013.

- Lankinen P : Ligninolytic enzymes of the basidiomycetous fungi *Agaricus bisporus* and *Phlebia radiata* on lignocellulose-containing media. *Disertacija*. University of Helsinki, Helsinki, 2004.
- Marić V : *Biotehnologija i sirovine*. Stručna i poslovna knjiga d.o.o., Zagreb, 2000.
- Marihart J, Campen J : *The EU Beet and Sugar Sector*. A Model of Environmental Sustainability. CIBE-CEFS Brochure, April 2010.
<http://www.cibe-europe.eu/press/Brochure%20CIBE-CEFS%20Final> 05.05.2010.pdf
[23. 02. 2013.]
- Menon V, Rao M : Trends in bioconversion of lignocellulose; Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Progress in Energy and Combustion Science*, 1-29, 2012.
- MicrobeWiki, 2008. <http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/File:Whiterot.jpg> [19.01.2014.]
- Panda BP, Bhargav S, Ali M, Javed S : Solid-state fermentation: An overview. *Chem. Biochem. Eng. Q.* 22 (1), 49–70, 2008.
- Pandey A, Soccol CR, Larroche C : Current Developments in Solid-state Fermentation. *Asiatech Publishers Inc.*, New Delhi, 2008.
- Pandey A : Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13, 81-84, 2003.
- Pavlečić M: *Uzgoj na čvrstom supstratu, 2009. (predavanja, PowerPoint prezentacija)*
https://www.google.ba/search?q=zgoj+na+%C4%8Dvrstom+supstratu&rlz=1C1OPRB_en
[25.02.2013.]
- Peksen A, Yakupoglu G, Yakupoglu T, Gulser C, Ozturk E, Ozdemir N : Changes in chemical compositions of substrates before and after *Ganoderma lucidum* cultivation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27(3), 637–642, 2011.

- Pereira N Jr, Peixoto G, Couto MA, Santa Anna LMM : *Biomass of Lignocellulosic Composition for Fuel Ethanol Production within the Context of Biorefinery*. Series on Biotechnology, v.2, School of Chemistry, Rio de Janeiro, 2008.
- Pilaš J : Proizvodnja lakaze uzgojem *Trametes versicolor* na otpadu industrije papira. *Diplomski rad*. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2009.
- Prado F, Vandenberghe LPS, Woiciechowski AL, Rodrigues-Leon JA, Soccol CR : *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 22, 547, 2005.
- Rimbault M : General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. Universidad Católica de Valparaíso – Chile, *EJB Electronic Journal of Biotechnology* ISSN: 0717-3458, 1998.
- Rivers DB, Zoldak BR, Evans RS, Emert GH : Determination of cellulose in municipal solid wastes contaminated with synthetic materials. *Biotechnol. Lett.* 5(11), 777-780, 1983.
- Shebani AN, van Reenen AJ, Meincken M : The effect of wood extractives on the thermal stability of different wood species. *Thermochim, Acta* 471(1-2), 43–50, 2008.
- Sigoillot JC, Berrin JG, Bey M, Lesage-Meessen L, Levasseur A, Lomascolo A, Record E, Uzan-Boukhris E : Fungal strategies for lignin degradation. *Adv. Bot. Res.* 61, 263–308, 2012.
- Singh D, Chen S : The white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: conditions for the production of lignin-degrading enzymes. *Applied microbiology and biotechnology*, 81(3), 399–417, 2008.
- Singh S, Sczakas G, Soccol C, Pandey A : Production of Enzymes by Solid state Fermentation. *U Current Developments in Solid state Fermentation*. Asiatech Publishers Inc., New Delhi, 2008.
- TAPPI T223 cm-01. Pentosans in wood and pulp, 2001.
- Tengerdy RP, Szakacs G : Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13, 169-179, 2003.

Updergraff DM : Semimicro determination of cellulose in biological materials. *Anal.Biochem.* 32,420-424, 1969.

Waldron K : Bioalcohol production. Biochemical conversion of lignocellulosic biomass, *Woodhead Publishing Limited* ISBN 978-1-84569-961-1, 2010.

Xiong H : Production and Characterization of *Trichoderma reesei* and *Thermomyces Lanuginosus Xylanases*. *Disertacija*. Helsinki University of Technology, Helsinki 2004.

