

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Ivan Kovač

**USPOREDBA DVA SUSTAVA ZA UZGOJ GLJIVE BIJELOG TRULJENJA
Trametes versicolor NA ČVRSTIM NOSAČIMA**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, travanj 2014.

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija
Nastavni predmet: Bioproceni u zaštiti okoliša
Tema rada je prihvaćena na XI. sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 30. rujna 2013. godine.
Mentor: doc. dr. sc. *Natalija Velić*
Komentor: izv.prof. dr. sc. *Darko Velić*

USPOREDBA DVA SUSTAVA ZA UZGOJ GLJIVE BIJELOG TRULJENJA *Trametes versicolor* NA ČVRSTIM NOSAČIMA

Ivan Kovač, 132-DI

Sažetak: U ovom radu gljiva bijelog truljenja *Trametes versicolor* uzgajana je u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima u dva različita laboratorijska bioreaktorska sustava (horizontalno-cilindrični stakleni reaktor-HBR i laboratorijski bioreaktor s pliticama-TBR) s ciljem istraživanja uspješnosti biološke obrade lignoceluloznog materijala. U oba sustava, kao supstrat su korišteni repini rezanci identičnog sastava, početne mase i vlažnosti, dok je kao inokulum korišten isti broj micelijskih diskova čiste kulture *T. versicolor* TV-6. Oba sustava bila su aerirana na istovjetan način. U horizontalnom bioreaktoru miješanje je provedeno periodično, dok je uzorak u bioreaktoru s pliticama nanesen u tankom sloju te je kao takav bio u statičnim uvjetima tijekom aerobne fermentacije. Tijekom 30 dana fermentacije praćeni su relevantni procesni parametri (temperatura u različitim slojevima supstrata, relativna vlažnost) te gubitak na masi i promjena boje uzorka. Nadalje, određivan je kemijski sastav lignoceluloznog materijala (udjeli vode, pepela, celuloze i pentozana). Primjenom oba sustava postignut je gubitak na masi lignoceluloznog materijala (21,33 % HBR i 46,50 % TBR), povećanje udjela pepela (175,5 % HBR i 78,9 % TBR), smanjenje udjela celuloze (64,65 % HBR i 42,34 % TBR) te smanjenje udjela pentozana (42,39 % HBR i 62,61 % TBR). Dobiveni rezultati upućuju na mogućnost primjene oba sustava za razgradnju i/ili prethodnu obradu lignoceluloznih materijala pomoću gljive bijelog truljenja *T. versicolor*.

Ključne riječi: fermentacija na čvrstim nosačima, *T. versicolor*, repini rezanci, lignocelulozni materijal, biorazgradnja

Rad sadrži: 52 stranice
31 sliku
1 tablicu
32 literaturne reference

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>Darko Velić</i> | član-komentor |
| 4. izv. prof. dr. sc. <i>Mirela Planinić</i> | zamjena člana |

Datum obrane: 15. travnja 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

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Process Engineering
Subdepartment of Bioprocess 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 30th 2013.
Mentor: *Natalija Velić*, PhD, assistant prof.
Co-mentor: *Darko Velić*, PhD, associate prof.

COMPARISON OF TWO SOLID STATE BIOREACTOR CONFIGURATIONS FOR CULTIVATION OF WHITE-ROT FUNGUS *Trametes versicolor*

Ivan Kovač, 132-DI

Summary: In this study, white-rot fungus *Trametes versicolor* was cultivated under solid state conditions using two different laboratory bioreactors (horizontal cylindrical glass bioreactor and tray bioreactor). The aim of the study was to investigate the biological treatment efficiency of lignocellulosic material. Sugar beet waste of identical chemical composition, initial mass and moisture content was used as a substrate, while the same amount of *T. versicolor* TV-6 mycelial discs were used as inoculum in both bioreactors. Furthermore, both bioreactors were aerated identically. Bed layer mixing in horizontal bioreactor was performed periodically, while inoculated substrate in the tray bioreactor remained static throughout the experiment. During 30 days of fermentation, relevant process parameters (temperature in different bed layers and relative moisture) were measured and chemical composition of substrate (% of moisture, ash, cellulose and pentosane), weight loss and substrate color change were determined. Material weight loss (21,33% HBR and 46,50 % TBR), ash content increase (175,5 % HBR and 78,9 % TBR), cellulose content decrease (64,65 % HBR and 42,34 % TBR) as well as pentosane content (42,39 % HBR and 62,61 % TBR) were observed in both investigated bioreactor systems. The obtained results indicate that both bioreactor systems can be used for biological degradation and/or pretreatment of lignocellulosic materials using white-rot fungus *T. versicolor* as inoculum.

Key words: solid-state fermentation, *T. versicolor*, sugar beet waste, lignocellulosic material, biodegradation

Thesis contains: 52 pages
31 figures
1 table
32 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>Darko Velić</i> , PhD, associate prof. | member-co-supervisor |
| 4. <i>Mirela Planinić</i> , PhD, associate prof. | stand-in |

Defense date: April 15th 2014.

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

Na samom početku želio bih se zahvaliti mentorici doc. dr. sc. Nataliji Velić i komentoru prof. dr. sc. Darku Veliću na vodstvu, trudu i pomoći tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se i tehničarki Jelki Babić na pomoći u laboratoriju te brojnim korisnim savjetima tijekom eksperimentalnog dijela ovog rada.

Hvala kolegici Ivani Ćurković na pomoći tijekom eksperimentalnog dijela ovog rada te na potpori i prijateljstvu tijekom cijelog studija.

Zahvaljujem se svim kolegama sa smjera Procesno inženjerstvo što su uljepšali moje studentske dane i bili podrška kada je bilo najteže.

Najviše se zahvaljujem svojoj obitelji i Margareti na bezuvjetnoj potpori, motivaciji, razumijevanju i pomoći tijekom svih ovih godina. Bez Vas sve ovo ne bi bilo moguće.

Hvala Vam svima od srca!

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. FERMENTACIJE NA ČVRSTIM NOSAČIMA.....	4
2.1.1. Opći princip provedbe SSF	5
2.1.2. Prednosti i nedostaci SSF	7
2.1.3. Bioreaktori za provođenje SSF	8
2.1.3.1. Bioreaktori s pliticama.....	8
2.1.3.2. Bioreaktori s nasutim slojem	9
2.1.3.3. Bioreaktori s horizontalnim bubnjem	10
2.1.3.4. Bioreaktori s fluidizirajućim slojem	11
2.1.4. Primjena SSF.....	12
2.2. GLJIVE	13
2.2.1. Morfologija, sistematika i klasifikacija.....	13
2.2.2. Gljive bijelog truljenja.....	14
2.2.3. <i>Trametes versicolor</i>	16
2.3. LIGNOCELULOZNI OTPADNI MATERIJAL	17
3. EKSPERIMENTALNI DIO	20
3.1. ZADATAK.....	21
3.2. MATERIJALI	21
3.2.1. Supstrat.....	21
3.2.2. Mikroorganizam	21
3.2.3. Kemikalije	22
3.2.4. Ostali materijali	22
3.3. APARATURA	23
3.3.1. Laboratorijski horizontalno-cilindrični stakleni bioreaktor (HBR) i laboratorijski bioreaktor s pliticama (TBR).....	23
3.3.2. Uređaji za mjerenje temperature, relativne vlažnosti i udjela suhe tvari.....	24
3.3.3. Autoklav	25
3.3.4. Laminar	25
3.3.5. Sušionik	26
3.3.6. Mufolna peć	26
3.3.7. Uređaj za ekstrakciju	26
3.3.8. Spektrofotometar	26
3.3.9. Laboratorijski mlin	27
3.3.10. Kromametar	27
3.3.11. Aparatura za provedbu testa anaerobne razgradnje.....	28
3.4. METODE	28

3.4.1. Priprema hranjive podloge i uzgoj inokuluma za SSF.....	28
3.4.2. Uzgoj gljive bijelog truljenja <i>T. versicolor</i> na čvrstim nosačima u laboratorijskom horizontalno-cilindričnom staklenom bioreктору (HBR)	29
3.4.3. Uzgoj gljive bijelog truljenja <i>T. versicolor</i> na čvrstim nosačima u laboratorijskom bioreктору s pliticama (TBR)	30
3.4.4. Određivanje udjela vode termogravimetrijskom metodom	31
3.4.5. Određivanje udjela pepela.....	31
3.4.6. Određivanje udjela celuloze	32
3.4.7. Određivanje udjela pentozana	33
3.4.8. Određivanje boje uzorka	33
3.4.9. Test anaerobne razgradnje	34
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	36
4.1. USPOREDBA HBR-a i TBR-a KAO SUSTAVA ZA UZGOJ GLJIVE BIJELOG TRULJENJA <i>T. versicolor</i> NA ČVRSTIM NOSAČIMA	37
4.1.1. Praćenje procesnih parametara tijekom eksperimenta	38
4.1.2. Određivanje sastava lignocelulozne biomase tijekom eksperimenta.....	40
4.2. TEST ANAEROBNE RAZGRADNJE	45
5. ZAKLJUČCI.....	47
6. LITERATURA.....	49

1. UVOD

Fermentacije na čvrstim nosačima (eng. *Solid State Fermentations*, SSF) su procesi pri kojima mikroorganizmi rastu na vlažnim čvrstim nosačima koji istovremeno mogu biti i supstrati za rast mikroorganizama. Zbog kompatibilnosti uvjeta za odvijanje fermentacija na čvrstim nosačima i metabolizma filamentoznih gljiva, upravo se one najčešće koriste kao radni mikroorganizam u navedenim procesima. U posljednjih dvadesetak godina SSF procesi koriste se sve češće za proizvodnju vrijednih biotehnoloških produkata, ali i u svrhu bioremedijacije za uklanjanje različitih vrsta onečišćujućih tvari iz pojedinih sastavnica okoliša. Pojava goveđe spongiformne encefalopatije („kravlje ludilo“) i potreba za pronalaskom alternativnih krmiva dodatno su potaknuli interes znanstvenika i proizvođača za SSF procese (Durand, 2003.). Fermentacije na čvrstim nosačima nude brojne mogućnosti u obradi poljoprivredno-industrijskih ostataka zbog malih energetskehtjeva, male količine nastale otpadne vode te ekološkog zbrinjavanja krutog otpada (Pandey, 2003.).

Velik dio navedenog otpada čini lignocelulozni otpadni materijal koji se može koristiti kao supstrat u proizvodnji vrijednih biotehnoloških produkata, poput biogoriva i enzima. Pri tome najveći problem predstavlja njegova teška razgradnja do fermentabilnih šećera, uzrokovana složenom kemijskom strukturom njegovih sastavnica (Janušić i sur., 2008.; Zheng i sur., 2012.).

Za biološku razgradnju lignoceluloznog otpadnog materijala sve češće se koriste fermentacije na čvrstim nosačima upotrebom gljiva bijelog truljenja kao radnog mikroorganizma. Gljive bijelog truljenja proizvode niz enzima koji mogu razgraditi lignin, hemicelulozu i celulozu, pripremajući na taj način materijal za daljnju biotehnološku proizvodnju (Tišma i sur., 2013.).

U ovom radu istraživana je mogućnost primjene dva različita aerobna laboratorijska bioreaktorska sustava (laboratorijski horizontalno-cilindrični stakleni bioreaktor, HBR i laboratorijski bioreaktor s pliticama, TBR) za razgradnju repinih rezanaca tijekom uzgoja gljive bijelog truljenja *Trametes versicolor*.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. FERMENTACIJE NA ČVRSTIM NOSAČIMA

Fermentacije na čvrstim nosačima provode se na dvije vrste nosača:

- inertni, koji služe samo kao nosač (vlakna, smole);
- neinertni, koji služe i kao nosač i kao supstrat (lignocelulozni materijali).

Obje vrste nosača karakterizira velika površina po jedinici volumena. Pri laganom miješanju i kompresiji ne dolazi do njihovog mehaničkog oštećenja, odnosno zadržavaju svoju strukturu. Prostor između čestica nosača uglavnom je ispunjen plinovitom fazom te manjim dijelom vodenom fazom u obliku tankog filma ili sitnih kapljica. Budući da je većina vode apsorbirana u čvrstom matriksu, slobodna voda može se naći u vrlo malim količinama, ili se fermentacija odvija u odsustvu slobodne vode (Mitchell i sur., 2006.; Raimbault, 1998.).

U većini SSF procesa kao radni mikroorganizam koriste se filamentozne gljive, a nešto rjeđe bakterije i kvasci. Uglavnom su to aerobni procesi u kojima se kao supstrati koriste nusproizvodi iz poljoprivrede te šumarske i prehrambene industrije (Mitchell i sur., 2006.).

Karakteristike fermentacija na čvrstim nosačima:

- raspodjela i rast mikroorganizama te nastajanje produkata metabolizma odvijaju se na površini čvrstih nosača;
- hranjiva podloga nije homogena i ne može se lako miješati (potrebna specifična oprema);
- sadržaj slobodne vode je nizak, a ovisi o fizikalnim i kemijskim osobinama čvrstih nosača;
- aeraciju kroz sloj čvrstih nosača teško je provesti te se ona svodi na strujanje zraka po površini;
- tijekom procesa razvija se toplina pri čemu dolazi do povećanja temperature u sloju čvrstih nosača i smanjenja sadržaja vlage;
- čvrsti nosači imaju veliku površinu po jedinici volumena (10^3 – 10^6 m²/cm³) (Pejin, 2003.; Raimbault, 1998.).

2.1.1. Opći princip provedbe SSF

Opći koraci u provedbi fermentacije na čvrstim nosačima gotovo su identični koracima u provedbi submerznih fermentacija koje se najčešće koriste u biotehnološkoj proizvodnji (eng. *Submerged Fermentations*, SmF):

1. Priprema inokuluma
2. Priprema supstrata
3. Priprema bioreaktora
4. Inokulacija i punjenje bioreaktora
5. Kontrola i upravljanje procesom
6. Pražnjenje bioreaktora
7. Metode izdvajanja proizvoda
8. Zbrinjavanje nastalog otpada (Mitchell i sur., 2006.).

1. Priprema inokuluma

Vrsta i način pripreme inokuluma ovise o radnom mikroorganizmu. U većini SSF procesa kao radni mikroorganizam koriste se filamentozne gljive. Cilj ovog koraka je uzgojiti dostatnu količinu inokuluma visoke mikrobiološke aktivnosti (Mitchell i sur., 2006.).

2. Priprema supstrata i bioreaktora

Supstrat je često potrebno usitniti (rezanjem, mljevenjem ili na neki drugi način). Ponekad je supstratu potrebno dodati vodu i nutrijente ili izvršiti predtretman supstrata kako bi se povećala dostupnost nutrijenata. Supstrat je često potrebno sterilizirati ili pasterizirati (ovisno o stupnju aseptičnosti koju proces zahtijeva) izvan bioreaktora, iako je poželjnije ovaj korak provesti unutar bioreaktora. Bioreaktor je potrebno sterilizirati prije dodavanja supstrata čime se sprječava kontaminacija neželjenim mikroorganizmima tijekom SSF procesa (Mitchell i sur., 2006.).

3. Inokulacija i punjenje bioreaktora

Inokulacija se može provesti prije ili nakon punjenja bioreaktora. Ako se sloj supstrata ne može promiješati unutar bioreaktora, inokulacija se provodi izvan bioreaktora. U suprotnom, inokulacija se provodi raspršivanjem inokuluma iznad sloja supstrata tijekom miješanja. Ako je supstrat potrebno sterilizirati ili pasterizirati te inokulirati izvan

bioreaktora, punjenje je potrebno provesti vrlo oprezno kako bi se spriječio ili minimizirao unos kontaminanata (Mitchell i sur., 2006.).

4. Kontrola i upravljanje procesom

Kontrola i upravljanje procesom ovise o konstrukciji bioreaktora, no glavni zadatak je regulacija protoka, temperature ulaznog zraka, brzine miješanja sloja supstrata i temperature rashladne vode kako bi se kontrolirali ključni parametri fermentacije (temperatura sloja supstrata, aktivitet vode, koncentracija otopljenog kisika, itd.) i održavale njihove optimalne vrijednosti za rast mikroorganizma i nastajanje proizvoda (Mitchell i sur., 2006.).

5. Pražnjenje bioreaktora

Izdvajanje proizvoda može se provesti unutar bioreaktora ili izvan njega. U svakom slučaju, cjelokupni sadržaj mora se ukloniti iz bioreaktora (Mitchell i sur., 2006.) po završenom procesu.

6. Metode izdvajanja proizvoda

Ovisno o procesu, cjelokupni sadržaj bioreaktora predstavlja produkt ili se pak produkt izdvaja iz smjese fermentiranog susprata i biomase radnog mikroorganizma i zatim pročišćava. Prilikom izdvajanja produkta iz sadržaja bioreaktora ili iz biomase, primjenjuju se različite metode separacije (filtracija, centrifugiranje), razaranja stanica (fizikalne, kemijske i biološke metode), pročišćavanja (koncentriranje, ekstrakcija, ultrafiltracija, adsorpcija, taloženje), operacije visokog stupnja razdvajanja (kristalizacija, kromatografija, elektroforeza) te sušenje (konvekcijsko, kontaktno, raspršivanjem, liofilizacija) (Mitchell i sur., 2006., Marić i Šantek, 2009.).

7. Zbrinjavanje nastalog otpada

U nekim slučajevima, kruti otpadni materijal može se koristiti kao proizvod (hrana ili krmivo), no često zaostaje kruti ostatak koji je potrebno zbrinuti na adekvatan način (Mitchell i sur., 2006.).

2.1.2. Prednosti i nedostaci SSF

Fermentacije na čvrstim nosačima imaju mnoge prednosti u odnosu na submerzne fermentacije:

- jednostavnost procesa i izvedbe bioreaktora;
- veći prinos proizvoda;
- veća otpornost na kontaminaciju (zbog nižeg aktiviteta vode);
- bolja i ekonomičnija aeracija;
- uvjeti uzgoja slični prirodnom staništu mikroorganizama;
- mala potrošnja energije;
- inokulacija sporama olakšava jednoliko raspršivanje inokuluma unutar supstrata;
- često jednostavnije izdvajanje proizvoda;
- jednostavna obrada ostatka nakon fermentacije;
- ostatak nakon fermentacije se može koristiti kao stočna hrana ili gnojivo (mala količina nastalog otpada) (Ali i Zulkali, 2011.; Couto i Sanroman, 2006.; Mussatto i sur., 2012.; Pejin, 2003.).

Osim navedenih prednosti, fermentacije na čvrstim nosačima imaju i određene nedostatke:

- heterogenost sustava zbog otežanog miješanja (otežano mjerenje pH, temperature, relativne vlažnosti, koncentracije kisika i koncentracije biomase);
- formiranje vrućih točaka (eng. *hot spots*) kao posljedica disanja i metabolizma mikroorganizma;
- moguće upotrijebiti samo mikroorganizme koji rastu pri nižim aktivitetima vode;
- često je potreban predtretman supstrata (rezanje, mljevenje, homogenizacija, hidroliza);
- potreban veći volumen inokuluma;
- proces dugo traje (Ali i Zulkali, 2011.; Couto i Sanroman, 2006.; Mussatto i sur., 2012.; Pejin, 2003.).

2.1.3. Bioreaktori za provođenje SSF

Fermentacije na čvrstim nosačima se u laboratorijskim uvjetima obično provode u Petrijevim zdjelicama, Erlenmayerovim bočicama, Rouxovim bočicama, staklenkama i ostalom staklenom posuđu. Ovakvi eksperimenti su jednostavni te se lako provode. Uloga bioreaktora je osigurati odvijanje SSF procesa u kontroliranim uvjetima, spriječiti otpuštanje mikroorganizama u okolinu te spriječiti kontaminaciju sloja supstrata nepoželjnim mikroorganizmima iz okoline. Tijekom procesa prate se i kontroliraju ključni parametri, poput temperature sloja supstrata i aktiviteta vode. Održavanje optimalnih vrijednosti navedenih parametara ključno je za rast mikroorganizama i nastanak proizvoda. Pri razvijanju matematičkih modela procesa, najveći problem predstavlja heterogenost sustava te otežano odvajanje biomase od supstrata (Tišma i sur., 2014.).

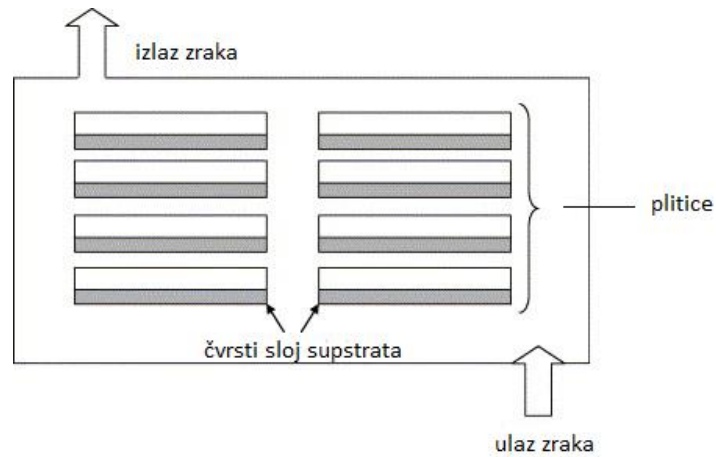
Postoji četiri glavna tipa bioreaktora za fermentacije na čvrstim nosačima:

- bioreaktori s pliticama;
- bioreaktori s nasutim slojem;
- bioreaktori s horizontalnim bubnjem;
- bioreaktori s fluidizirajućim slojem.

2.1.3.1. Bioreaktori s pliticama

Bioreaktori s pliticama (**Slika 1**) su najstariji i najjednostavniji bioreaktori za provođenje SSF-a. Plitice mogu biti perforirane, a najčešće se izrađuju od drveta, plastike ili metala. Čvrsti nosač se nanosi na plitice u tankom sloju (5–15 cm) te se plitice smještaju u termostatiranu komoru. Plitice se slažu jedna na drugu, s razmakom od nekoliko centimetara, a proces se može jednostavno uvećati (eng. *scale up*) povećanjem broja plitica. Ova tehnologija zahtijeva velike površine (komore), puno manualnog rada i teško se primjenjuje u procesima koji zahtijevaju visoku sterilnost, ali se odlikuje jednostavnošću izvedbe i niskim investicijskim troškovima (Durand, 2003.; Pandey i sur., 2003.).

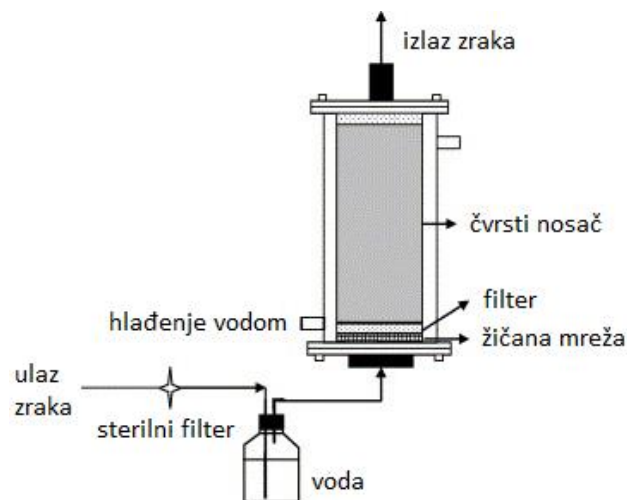
Bioreaktori s pliticama koriste se u proizvodnji sojinog umaka, imunosupresiva i lipaza (Tišma i sur., 2014.).



Slika 1 Shematski prikaz bioreaktora s pliticama (prema Rodríguez Couto i Sanromán, 2006.)

2.1.3.2. Bioreaktori s nasutim slojem

Bioreaktori s nasutim slojem (**Slika 2**) su sustavi bez miješanja koji se sastoje od nasute kolone s perforiranim bazom kroz koju se provodi aeracija. Opremljeni su dvostrukim plaštem za regulaciju temperature kroz koji protječe voda (Tišma i sur., 2014.).

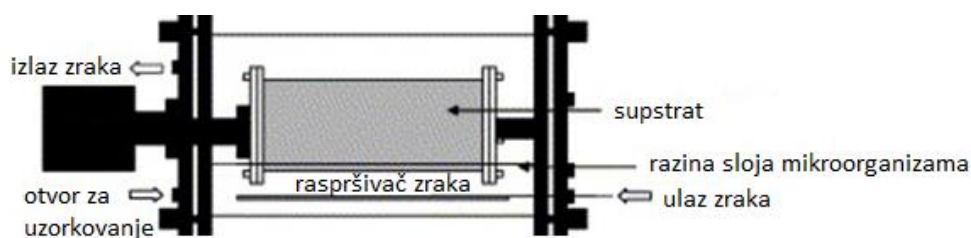


Slika 2 Shematski prikaz bioreaktora s nasutim slojem (prema Rodríguez Couto i Sanromán, 2006.)

Prednosti ovih bioreaktora su veća ekonomičnost od bioreaktora s pliticama, manji zahtjevi za prostorom i radnom snagom, bolja kontrola i upravljanje procesom, mogućnost primjene za mikroorganizme osjetljive na miješanje, poboljšanje učinkovitosti izvedbom s više slojeva u kontinuiranom načinu rada (nastaje manje topline te je lakše izbjeći nepoželjne visoke temperature). Najveći nedostaci su otežano punjenje zbog rasta gljiva, začepljivanje bioreaktora supstratom, visok pad tlaka (osobito pri višim protocima) i otežano odvođenje topline. Bioreaktori s nasutim slojem upotrebljavaju se u proizvodnji enzima, procesima obezbojivanja i proizvodnji antibiotika (Tišma i sur., 2014.).

2.1.3.3. Bioreaktori s horizontalnim bubnjem

Bioreaktori s horizontalnim bubnjem (**Slika 3**) sastoje se od horizontalnog cilindra i sustava za miješanje. Okretanjem horizontalnog bubnja provodi se miješanje sloja čvrstog nosača/supstrata i mikroorganizma, pri čemu miješanje može biti povremeno ili kontinuirano, ovisno o visini sloja čvrstog nosača i brzini rotacije bubnja (Bhargav i sur., 2008.). Miješanje u ovom tipu bioreaktora osobito je važno kako bi se povećala kontaktna površina između stijenke bioreaktora i čvrstog nosača te kako bi se osigurala dovoljna količina kisika za radni mikroorganizam (Durand, 2003.).



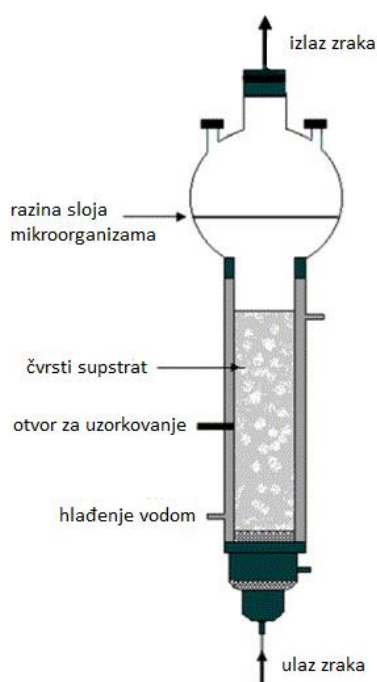
Slika 3 Shematski prikaz bioreaktora s horizontalnim bubnjem (prema Rodríguez Couto i Sanromán, 2006.)

Najveća prednost ovih bioreaktora je nježno i uniformno miješanje zbog nepostojanja mješala, dok nedostaci uključuju moguće oštećenje micelija gljive, aglomeraciju čestica tijekom vremena, otežanu kontrolu prijenosa tvari i topline unutar sloja supstrata, mogućnost kontaminacije i usporen rast mikroorganizma zbog trenja među česticama.

Bioreaktori s horizontalnim bubnjem upotrebljavaju se uproizvodnji celulaze, pigmentata i lignolitičkih enzima te proizvodnji biogoriva iz celuloznih materijala (Tišma i sur., 2014.).

2.1.3.4. Bioreaktori s fluidizirajućim slojem

Bioreaktori s fluidizirajućim slojem (**Slika 4**) sastoje se od vertikalne komore (kolone) s perforiranim dnom kroz koju prolazi zrak (ili neki drugi plin) dovoljnom brzinom da čestice supstrata dovodi u fluidizirajuće stanje (Tišma i sur., 2014.). Pri tome visina vertikalne kolone mora biti dovoljno velika da omogući ekspanziju čvrstog nosača (Bhargav i sur., 2008.).



Slika 4 Shematski prikaz bioreaktora s fluidizirajućim slojem (prema Rodríguez Couto i Sanromán, 2006.)

Prednosti ovih bioreaktora su učinkovito odvođenje topline, dobra aeracija, jednolika raspodjela vlage i inokuluma, jednostavnija kontrola aglomeracije, jednolika temperatura u sloju supstrata, jednostavno upravljanje bioreaktorom, veća učinkovitost zbog povećane kontaktne površine katalizatora i tekuće faze te moguće *in situ* sušenje proizvoda. Međutim, postoje i neki nedostaci. Ako je supstrat ljepljiv može doći do aglomeracije čestica koje ne

mogu fluidizirati. Također, ako su čestice supstrata različite veličine, neke fluidiziraju a neke ne. Bioreaktori s fluidizirajućim slojem primjenjuju se u obradi otpadnih voda i proizvodnji etanola (Tišma i sur., 2014.).

2.1.4. Primjena SSF

Fermentacije na čvrstim nosačima koriste se za proizvodnju važnih biotehnoloških produkata kao što su hrana, goriva, krmiva te različiti kemijski i farmaceutski pripravci. Koriste se već stoljećima, ponajviše u proizvodnji tradicionalnih prehrambenih proizvoda kao što su:

- Tempeh, koji uključuje uzgoj *Rhizopus oligosporus* na kuhanoj soji (ovaj fermentirani proizvod je vrlo popularan u Indoneziji);
- *Koji*, korak u proizvodnji sojinog umaka, koji uključuje uzgoj *Aspergillus oryzae* na kuhanoj soji;
- Ang-kak ili „crvena riža“, koji uključuje uzgoj *Monascus purpureus* na kuhanoj riži (Mitchell i sur., 2006.; Vandenberghe i sur. 2004.).

U zadnjih nekoliko desetljeća ponovno se javlja velik interes za primjenom SSF te dolazi do značajnog povećanja broja proizvoda dobivenih ovom tehnologijom. Neki od njih su:

- enzimi (amilaze, proteaze, lipaze, pektinaze, tanaze, celulaze, transferaze, ksilanaze, fitaze, sirila);
- pigmenti;
- arome i spojevi okusa (voćne arome, acetaldehid, 3-metilbutanol, izoamil acetat, pirazini);
- etanol i organske kiseline (oksalna, limunska, mliječna);
- giberelinska kiselina (hormon rasta biljaka);
- ksantan guma;
- proteinizirana krmiva dobivena iz poljoprivrednih nusproizvoda;
- krmiva sa smanjenim udjelom toksina te krmiva poboljšane probavljivosti;
- antibiotici (penicilin, oksitetraciklin);
- biološki agensi (biopesticidi i bioherbicidi);

- sirevi obogaćeni plemenitim plijesnima (Mitchell i sur., 2006.; Wang i sur., 2010.; Pandey, 2003.; Bellon-Maurel i sur. 2003.; Couto i Sanroman., 2006.; Raimbault, 1998.; Vandenberghe i sur., 2004.).

Daljnji razvoj SSF usmjeren je na njihovu primjenu u bioprocesima kao što su:

- bioremedijacija;
- biorazgradnja toksičnih spojeva;
- detoksikacija poljoprivredno-industrijskih ostataka;
- nutritivno obogaćivanje bilja i ostataka usjeva;
- kompostiranje;
- proizvodnja biogoriva (Pandey, 2003.).

2.2. GLJIVE

Jedna od prvih mikrobioloških znanosti je mikologija, znanost koja se bavi proučavanjem gljiva. Do danas je opisano od 80 000 do 100 000 različitih vrsta gljiva, iako se pretpostavlja da se ukupan broj vrsta kreće oko 1,5 milijuna (Webster i Weber, 2007.). Gljive obuhvaćaju veliku skupinu organizama kojoj pripadaju kvasci, plijesni i mesnate gljive (Tišma, 2010.).

2.2.1. Morfologija, sistematika i klasifikacija

Gljive su heterotrofni eukariotski mikroorganizmi koji se uglavnom hrane apsorpcijom pomoću enzima koje izlučuju u medij u kojem rastu. Većina gljiva su aerobni mikroorganizmi koji rastu na blago kiselim supstratima te na vlažnim i tamnim mjestima. Mogu se razmnožavati spolno i nespolno, a karakterizira ih postojanje micelija, vegetativne tubularne strukture sastavljene od mnoštva hifa. Hife nastaju klijanjem iz spora te su povezane polisaharidom hitinom. Hife imaju pregrade (septe) koje mogu sadržavati pore za prijenos tvari iz citoplazme i organela te za migraciju jezgre kroz micelij do drugih dijelova (Tišma, 2010.; Webster i Weber, 2007.).

Gljive se dijele u četiri velika odjela: *Chytridiomycota*, *Ascomycota*, *Basidiomycota* i *Zygomycota*. Odjel *Basidiomycota* čini najveću skupinu gljiva s više od 30 000 vrsta (Webster i Weber, 2007.). Pripadaju mu mnoge poznate mesnate gljive, puhare, smrčci, biljni patogeni hrđe i snijeti. Većina su saprofiti koji uzrokuju odumiranje i razgradnju drveta, a postoje i neke patogene vrste (Tišma, 2010.; Webster i Weber, 2007.).

2.2.2. Gljive bijelog truljenja

Od svih poznatih vrsta gljiva, samo manji broj ima sposobnost razgradnje drveta. Nazivaju se gljive truležnice, a pripadaju pododjelima *Basidiomycota* i *Ascomycota*. Postoji tri glavne vrste gljiva koje razgrađuju drvo: gljive mekog truljenja, gljive smeđeg truljenja i gljive bijelog truljenja (Slika 5). Imaju važnu ulogu u procesu kruženja tvari u prirodi te mogu razgraditi drvenu biomasu do CO₂, H₂O i minerala (Sigoillot i sur., 2012.).



Slika 5 Gljive truležnice. A) gljiva smeđeg truljenja, B), C) i D) gljive bijelog truljenja (Sigoillot i sur., 2012.)

Gljive bijelog truljenja su najčešći uzročnici truljenja drveta zbog sposobnosti degradacije i mineralizacije njegovih glavnih komponenti: celuloze, hemiceluloze i lignina. Karakterizira ih ekstenzivna razgradnja lignina pri čemu dolazi do izbjeljivanja istrulog drveta koje ima vlažnu, mekanu i spužvastu konzistenciju. Ova skupina obuhvaća velik broj gljiva, uglavnom iz odjela *Basidiomycota*. Postoje dva tipa bijelog truljenja: simultana (istovremena) razgradnja svih navedenih polimera u drvetu i selektivna razgradnja. Pri simultanoj razgradnji, koju provode primjerice *Trametes versicolor* i *Phanerochaete chrysosporium*, veći broj različitih fungalnih enzima istovremeno razgrađuje celulozu, hemicelulozu i lignin. Pri selektivnoj razgradnji dolazi do razgradnje lignina i hemiceluloze, dok celuloza ostaje uglavnom nerazgrađena. Ovaj tip razgradnje nešto je rjeđi, a provode ga primjerice *Ceriporiopsis subvermispora* i *Dichomitus squalens* (Sigoillot i sur., 2012.).

Razgradnja lignoceluloznih sastavnica upotrebom gljiva bijelog truljenja odvija se djelovanjem niza enzima. Lignin najvećim dijelom razgrađuju lignin peroksidaza (LiP), mangan peroksidaza (MnP), lakaza (Lac) i versatil peroksidaza (VP), dok manju ulogu imaju glioksal oksidaza, aril alkohol oksidaza, piranoza 2-oksidaza, celobioza oksidoreduktaza i celobioza dehidrogenaza. Razgradnja celuloze i hemiceluloze katalizirana je karboksimetil celulazom, β -glukozidazom, endomananzom, β -manozidazom i mnogim drugim enzimima (Hatakka, 1994.; Wong, 2009.).

Gljive bijelog truljenja koriste se u procesu proizvodnje pulpe u industriji papira, biološkom izbjeljivanju pulpe drveta te proizvodnji enzima. Posljednjih godina sve više se koriste za uklanjanje bojila za tekstil, uklanjanje različitih bojila iz otpadnih voda i razgradnju ksenobiotika (Wesenberg i sur., 2003.).

2.2.3. *Trametes versicolor*

Trametes versicolor (Slika 6), poznat i kao „puranov rep“ (eng. *turkey tail*), je gljiva bijelog truljenja koja se ubraja u pododjel *Basidiomycota* (Webster i Weber, 2007.).



Slika 6 Gljiva bijelog truljenja *T. versicolor* (<http://curbstonevalley.com>) [5.3.2014.]

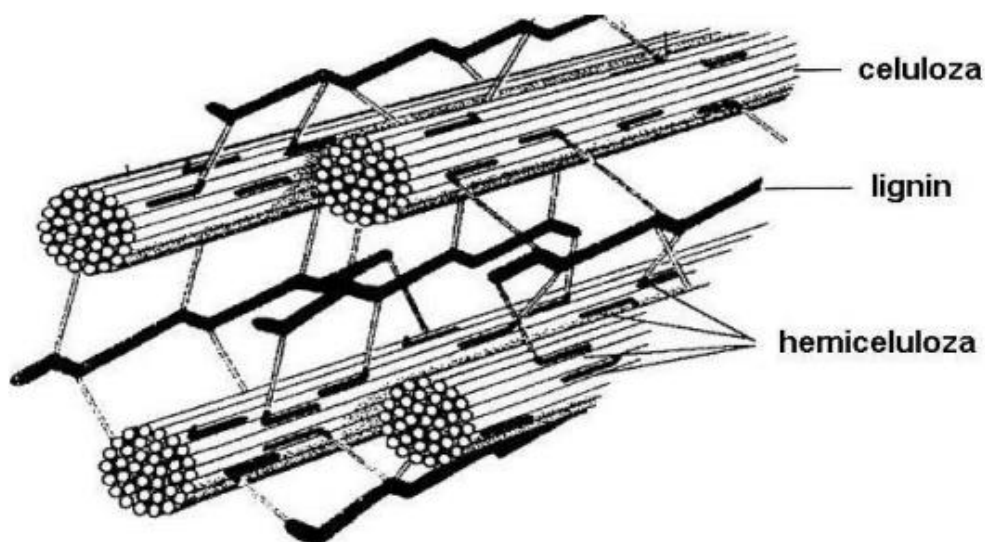
Raste na deblima, stabljikama i otpalim granama mrtvog, raspadajućeg drveća, a ponekad i na ranama živog drveća stvarajući nakupine, redove ili preklapajuće formacije (Tišma, 2010). Može rasti pri niskoj relativnoj vlažnosti, dok su neki industrijski sojevi otporni i na vrlo visoke temperature (Webster i Weber, 2007.). *T. versicolor* proizvodi sve enzime potrebne za razgradnju lignoceluloznih sastavnica (mangan peroksidaza, lignin peroksidaza, lakaza celulaza itd.). Učinkovito razgrađuje lignin, policikličke aromatske ugljikovodike, poliklorirane bifenile i sintetičke boje. Osim navedenih enzima, proizvodi i glikopeptide koji se upotrebljavaju u antikancerogenoj terapiji (Tišma, 2010). Najveću primjenu ima u proizvodnji pulpe u industriji papira, proizvodnji enzima te bioremedijaciji (Xavier i sur., 2007.).

2.3. LIGNOCELULOZNI OTPADNI MATERIJAL

Lignocelulozni materijal čini više od 60% biljne biomase proizvedene na Zemlji (Tengerdy i Szakacs, 2003.). Velike količine lignoceluloznog otpadnog materijala nastaju u poljoprivrednoj, prehrambenoj i drvnoj industriji u obliku slame, tropa, piljevine itd. (Tišma i sur., 2013.; Tengerdy i Szakacs, 2003.). Takav otpadni materijal može se koristiti u proizvodnji biogoriva, enzima, krmiva i drugih vrijednih biotehnoloških produkata upotrebom SSF (Zheng i sur., 2012.; Janušić i sur., 2008.; Tengerdy i Szakacs, 2003.). Pri tome najveći izazov predstavlja složena kemijska struktura lignoceluloznog materijala, odnosno njegovih sastavnica, koja otežava njegovu razgradnju na jednostavne šećere (Zheng i sur., 2012.).

Osnovne sastavnice svih lignoceluloznih materijala su celuloza, hemiceluloza i lignin (**Slika 7**), a njihov udjel ovisi o vrsti lignoceluloznog materijala (Janušić i sur., 2008.).

Celuloza je najvažnija sastavnica većine staničnih stijenki biljaka. To je linearni polimer građen od molekula D-glukoze međusobno povezanih β -(1,4)-glikozidnom vezom. Dugi lanci celuloze povezani vodikovim vezama i van der Waalsovima silama tvore mikrofibrile promjera do 3 nm, koji zajedno čine celulozna vlakna. Postoje dvije vrste celuloze: kristalna, kod koje su mikrofibrili gusto složeni (spriječen ulaz vode i djelovanje enzima) i amorfna, čija je struktura manje uređena. Zbog toga je amorfna celuloza manje otporna u odnosu na kristalnu celulozu. Lignin, hemiceluloza, pektin i proteini tvore rešetku koja obavija celulozne mikrofibrile, čineći celulozu teško razgradivom. Kako bi se glukoza (koja tvori celulozu) mogla upotrijebiti kao supstrat u biotehnološkoj proizvodnji, potrebno je „pokidati“ staničnu stijenku, tj. razgraditi lignin i hemicelulozu te smanjiti udjel kristalne celuloze (Janušić i sur., 2008.).



Slika 7 Osnovne sastavnice lignoceluloznog materijala (Janušić i sur., 2008.)

Tablica 1 Udjel celuloze, hemiceluloze i lignina u nekim lignoceluloznim materijalima (prema Janušić, 2008.)

Lignocelulozni materijal	Celuloza (%)	Hemiceluloza (%)	Lignin (%)
Stabljika kukuruza	28	28	11
Klip kukuruza	45	35	15
Slama pšenice	30	50	15
Repini rezanci	22–30	24–32	3–4

Hemiceluloza je polisaharid koji u usporedbi s celulozom ima nižu molekularnu masu te više heterogenu strukturu. Građena je od heksoza (D-manoza, D-galaktoza, D-glukoza) i pentoza (D-ksiloza, L-arabinoza) međusobno povezanih β -(1,4)- i β -(1,3)-glikozidnim vezama sa prisutnim šećerima ili uronskim kiselinama na pobočnim lancima. Hemicelulozni polimeri prijanjaju na površinu celuloznih mikrofibrila pomoću vodikovih veza, dajući čvrstoću staničnoj stijenci. Budući da je hemiceluloza građena od mnogo različitih monomera, za potpunu hidrolizu potreban je velik broj enzima (Janušić i sur., 2008.; Tišma, 2010.).

Lignin je trodimenzionalni, amorfni, aromatski, u vodi netopljivi heteropolimer građen od hidroksifenil propan jedinica povezanih C-C i C-O-C vezama. Nepravilne je strukture a nastaje nasumičnom sintezom iz prekursora koniferilnog, *p*-kumarilnog i sinapilnog alkohola. Ključna

je komponenta stanične stijenke biljaka, koja tvori zaštitni sloj oko lanaca celuloze i hemiceluloze, štiteći ih na taj način od enzimatske razgradnje (Tišma, 2010.).

Lignocelulozni otpad se sve više koristi kao sirovina u biotehnološkoj proizvodnji. Repini rezanci, lignocelulozni otpad nastao kao nusprodukt u proizvodnji šećera iz šećerne repe, zbog svog kemijskog sastava (prisutnost zaostalih jednostavnih šećera, celuloza, hemiceluloza, lignin, pektin) predstavljaju odličnu sirovinu kao supstrat za anaerobnu razgradnju (Hutnan i sur., 2000.), ali i kao supstrat/nosač za uzgoj mikroorganizama. Udjeli pojedinih lignoceluloznih sastavnica repinih rezanaca prikazani su u **Tablici 1**.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Cilj ovog rada bio je ispitati mogućnost primjene dva različita laboratorijska bioreaktorska sustava (horizontalno-cilindrični stakleni bioreaktor, HBR i bioreaktor s pliticama, TBR) u svrhu biološke razgradnje lignoceluloznog materijala - repinih rezanaca pomoću gljive bijelog truljenja *T. versicolor*.

3.2. MATERIJALI

3.2.1. Supstrat

Kao supstrat, odnosno neinertni čvrsti nosač, tijekom uzgoja korišteni su izluženi i osušeni repini rezanci (**Slika 8**) zaostali nakon proizvodnje šećera u tvornici Sladorana d.d. Županja.



Slika 8 Izluženi i osušeni repini rezanci

3.2.2. Mikroorganizam

Kao radni mikroorganizam korištena je gljiva bijelog truljenja *T. versicolor* TV 6 dobiven iz kolekcije MZKI Ljubljana, Slovenija (**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 Radni mikroorganizam *T. versicolor* TV 6 na krumpirovom agaru

3.2.3. Kemikalije

Tijekom rada korištene su sljedeće kemikalije:

- kloridna kiselina, HCl (Kemika, Zagreb, Hrvatska);
- natrijev klorid, NaCl (Kemika, Zagreb, Hrvatska);
- orcinol reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska);
- octena kiselina, CH₃COOH (Kemika, Zagreb, Hrvatska);
- nitratna kiselina, HNO₃ (Kemika, Zagreb, Hrvatska);
- etanol, C₂H₅OH (Kemika, Zagreb, Hrvatska);
- vodikov peroksid, H₂O₂ (Kemika, Zagreb, Hrvatska);
- sumporna kiselina, H₂SO₄ (Kemika, Zagreb, Hrvatska);
- silikonska mast, Baysilone paste (GE Bayer Silicones).

3.2.4. Ostali materijali

Za provedbu testa anaerobne razgradnje kao inokulum je korišten digestat zaostao nakon anaerobne fermentacije u fermentorima (Osatina grupa d.o.o.) razrijeđen s toplom vodom u omjeru 1:1.

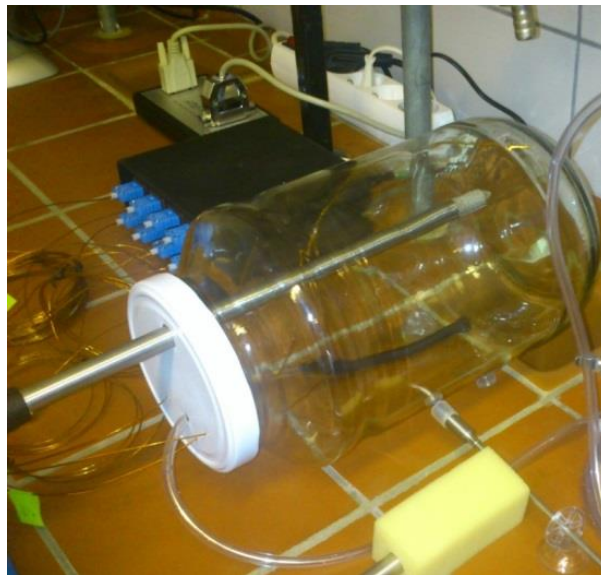
3.3. APARATURA

3.3.1. Laboratorijski horizontalno-cilindrični stakleni bioreaktor (HBR) i laboratorijski bioreaktor s pliticama (TBR)

Biološka obrada repinih reznaca provedena je u dva različita bioreaktorska sustava opremljena odgovarajućim osjetilima za praćenje temperature i relativne vlažnosti, kao i sustava za aeraciju:

- laboratorijski horizontalno-cilindrični stakleni bioreaktor (HBR) (**Slika 10**);
- laboratorijski bioreaktor s pliticama (TBR) (**Slika 11**).

Aeracija je provedena kontinuirano u oba sustava sterilnim zrakom pomoću kompresora protoka zraka 30 L/h.



Slika 10 Horizontalno-cilindrični stakleni bioreaktor (HBR)



Slika 11 Laboratorijski bioreaktor s pliticama (TBR)

3.3.2. Uređaji za mjerenje temperature, relativne vlažnosti i udjela suhe tvari

Mjerenje temperature i relativne vlažnosti unutar bioreaktora tijekom procesa fermentacije provedeno je pomoću uređaja Testo 635 i Testo 350 (**Slika 12**).



Slika 12 Uređaji za mjerenje temperature i relativne vlažnosti Testo 635 i Testo 350

Određivanje udjela suhe tvari u uzorku provedeno je pomoću halogenog analizatora vlage Halogen Moisture Analyzer HR 73 (Mettler Toledo, Švicarska) (**Slika 13**).



Slika 13 Halogeni analizator vlage

3.3.3. Autoklav

Sterilizacija dijelova opreme, supstrata i hranjivih podloga provedena je u autoklavu (TIP 7510945, Sutjeska, Beograd).

3.3.4. Laminar

Sterilizacija laboratorijskog bioreaktora s pliticama provedena je UV zračenjem u laminaru AV100-CV100 (TELSTAR, Španjolska) (**Slika 14**).



Slika 14 Laminar

3.3.5. Sušionik

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

3.3.6. Mufolna peć

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

3.3.7. Uređaj za ekstrakciju

Određivanje udjela ekstraktivnih tvari provedeno je na uređaju SOXTEC SYSTEM 1040 Extraction Unit (Foss Tecator, Danska) (Slika 15).



Slika 15 Uređaj za ekstrakciju

3.3.8. Spektrofotometar

Udjeli pentozana određeni su spektrofotometrijski na spektrofotometru SHIMADZU, tip UV-1700 Pharma Spec. (Deutschland GmbH, Duisburg, Njemačka) (Slika 16).



Slika 16 Spektrofotometar

3.3.9. Laboratorijski mlin

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

3.3.10. Kromametar

Određivanje boje uzorka provedeno je pomoću kromametra Konica Minolta CR 400 (Konica Minolta, Osaka, Japan) (**Slika 17**).



Slika 17 Kromametar Konica Minolta CR 400

3.3.11. Aparatura za provedbu testa anaerobne razgradnje

Test anaerobne razgradnje proveden je u aparaturi (**Slika 18**) sastavljenoj od sljedećih elemenata:

- staklenke (400 mL);
- plastični poklopci (probušeni u sredini);
- menzure (100 mL);
- gumeni čepovi (probušeni u sredini);
- teflonske cjevčice;
- gumice.



Slika 18 Aparatura za provedbu testa anaerobne razgradnje

3.4. METODE

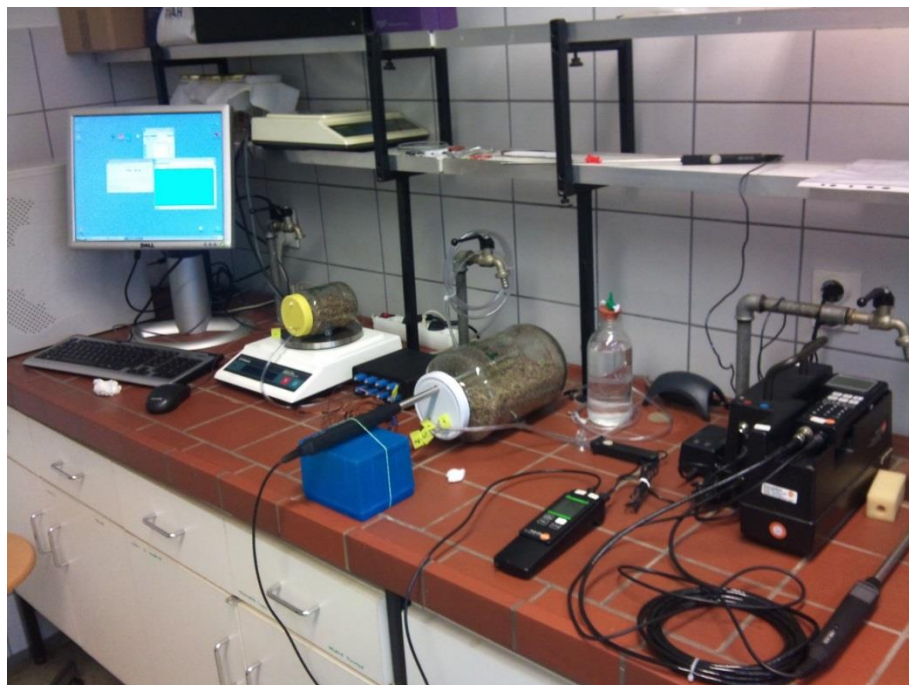
3.4.1. Priprema hranjive podloge i uzgoj inokuluma za SSF

Izvagano je 42 g krumpirovog agara (Biolife, Italija), dodano 1000 mL destilirane vode, zagrijano do vrenja i sterilizirano u autoklavu pri 121°C tijekom 15 minuta. Podloga je ohlađena na temperaturu od 45°C do 50°C. Nakon hlađenja podloga je dobro promiješana i prelivena u prethodno sterilizirane Petrijeve zdjelice. Ovako pripremljene podloge korištene su za uzgoj radnog mikroorganizama. Inkubacija je trajala sedam dana pri 27°C.

3.4.2. Uzgoj gljive bijelog truljenja *T. versicolor* na čvrstim nosačima u laboratorijskom horizontalno-cilindričnom staklenom bioreaktoru (HBR)

Uzgoj *T. versicolor* na repinim rezancima kao čvrstom nosaču proveden je u horizontalno-cilindričnom staklenom bioreaktoru volumena 2000 mL. Bioreaktor je napunjen repinim rezancima i vodom u omjeru 1:2,2 te steriliziran u autoklavu pri 121 °C kroz jedan sat. Nakon toga, bioreaktor je nacijepljen s 40 micelijskih diskova kulture *T. versicolor*. Eksperiment je proveden pri ambijentalnoj temperaturi tijekom 30 dana uz aeraciju sterilnim zrakom, pri čemu je sadržaj HBR-a ručno miješan svakih 24 sata kroz pet minuta. Tijekom eksperimenta praćene su promjene procesnih parametara (temperatura sloja supstrata i biomase, ambijentalna temperatura, relativna vlažnost zraka u bioreaktoru), promjene kemijskog sastava supstrata (udjeli suhe tvari, celuloze, pentozana, pepela) te promjena mase i boje supstrata. Za kontrolu i mjerenje procesnih parametara korištene su ubodne sonde Tip-K te uređaji Testo 635 i Testo 350.

Horizontalno-cilindrični stakleni bioreaktor i upotrijebljena oprema prikazani su na **Slici 19**.



Slika 19 Prikaz horizontalno-cilindričnog staklenog bioreaktora i upotrijebljene opreme

3.4.3. Uzgoj gljive bijelog truljenja *T. versicolor* na čvrstim nosačima u laboratorijskom bioreaktoru s pliticama (TBR)

Uzgoj *T. versicolor* na repinim rezancima kao čvrstom nosaču proveden je u laboratorijskom bioreaktoru u pliticama (TBR). Sterilnost TBR-a osigurana je tretmanom bioreaktora UV zračenjem u laminaru neposredno prije nacijepljivanja, pri čemu su plitice TBR prethodno dezinficirane kemijski (alkoholom) i toplinom (plamenik). Bioreaktor se sastoji od metalnog postolja s pliticama (4 plitice dimenzija 275 x 190 x 15 mm) postavljenima jedna iznad druge (razmak između plitica od 45 mm) te staklene komore s poklopcem u koju je postavljeno metalno postolje s pliticama. Na plitice je u tankom sloju (12 mm) nanesen supstrat koji je nacijepljen micelijskim diskovima kulture *T. versicolor*. Eksperiment je proveden u statičnim uvjetima (bez miješanja) pri ambijentalnoj temperaturi tijekom 30 dana uz aeraciju sterilnim zrakom. Tijekom eksperimenta praćene su promjene procesnih parametara (temperatura sloja supstrata i biomase, ambijentalna temperatura te relativna vlažnost zraka u bioreaktoru), promjene kemijskog sastava supstrata (udjeli suhe tvari, celuloze, pentozana, pepela) te promjena mase i boje supstrata. Za kontrolu i mjerenje procesnih parametara korišten je višekanalni sustav termoparova (ubodne sonde Tip-K) u sprezi s Pico A/D konverterom i PicoLog računalnom aplikacijom za akviziciju podataka te uređaji Testo 635 i Testo 350.

Laboratorijski bioreaktor s pliticama i upotrijebljena oprema prikazani su na **Slici 20**.



Slika 20 Prikaz laboratorijskog bioreaktora s pliticama i upotrijebljene opreme

3.4.4. Određivanje udjela vode termogravimetrijskom metodom

U prethodno osušenu (105 °C kroz jedan sat), u eksikatoru ohlađenu i odvagano aluminijsku posudicu s poklopcem, izvagano je 2 g ($\pm 0,0001$ mg) uzorka. Posuda s uzorkom prethodno je zagrijana na 105 °C te stavljena u sušionik s koso postavljenim poklopcem. Nakon sušenja kroz četiri sata, uzorak je stavljen u eksikator na hlađenje te izvagan nakon hlađenja kroz jedan sat. Ponovno je stavljen u sušionik kroz jedan sat, ohlađen i izvagan na analitičkoj vagi. Postupak se ponavljao do konstantne mase.

Udjel vode određen je prema sljedećem izrazu:

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

gdje su:

a - masa uzorka nakon sušenja [g]

b - masa uzorka prije sušenja [g]

w - udjel vlage u uzorku [%]

3.4.5. Određivanje udjela pepela

Pripremljene su porculanske posudice, žarene u mufolnoj peći na 575 °C i nakon 30 do 45 minuta izvagane. Nakon toga izvagano je 2 g uzorka. Posudice s uzorkom prethodno su karbonizirane na električnom grijaču. Nakon karbonizacije, uzorak je stavljen u mufolnu peć na jedan sat. U slučaju nedovoljnog spaljivanja uzorka, dodana je mala količina vodikovog peroksida te je uzorak vraćen na spaljivanje u trajanju od jednog sata. Po završetku spaljivanja posudice su izvađene iz peći, ostavljene jednu minutu na azbestnoj mrežici i stavljene u eksikator. Nakon hlađenja u trajanju od jednog sata, posudice su izvagane te je određen udjel pepela prema izrazu:

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

gdje su:

a - masa prazne posudice za spaljivanje [g]

b - masa posudice za spaljivanje s pepelom [g]

c - masa odvagane količine uzorka [g]

V - udjel vlage ispitivanog uzorka [%]

3.4.6. Određivanje udjela celuloze

Udjeli celuloze određeni su 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 % CH₃COOH + 15 mL konc. HNO₃) i stavljeno u vodenu kupelj na 100 °C u trajanju od jednog sata (epruvete moraju biti uronjene u vodu tako da razina vode premaši razinu uzorka). Nakon toga, uzorak je filtriran preko filter papira na Büchnerovom lijevku. Nakon filtracije uzorak je ispran dva puta sa 95 %-tnim etanolom. 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 kvantitativno su prebačeni u porculanske posudice uz pomoć 95 %-tnog etanola. Etanol je otparen na vodenoj kupelji sve dok uzorak nije postao potpuno suh. Uzorak je zatim kvantitativno prebačen u epruvete te mu je dodano 30mL 72 %-tne sumporne kiseline. Epruvete s uzorkom stavljene su u vodenu kupelj na 30 °C na 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:

$$m_{cel} = m_1 - m_2$$

$$C = \frac{m_{cel}}{m_{asu}} \times 100 [\%]$$

gdje su:

m_{cel} - masa celuloze [g]

m_{asu} - masa apsolutno suhog uzorka [g]

C - udjel celuloze [%]

3.4.7. 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 označena razina 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 prikupljan 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 prikupljan tijekom 90 minuta. Destilat ($T = 20^{\circ}\text{C}$) je nadopunjen 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 $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$. 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 je udjel pentozana u uzorku.

3.4.8. Određivanje boje uzorka

Na samom početku potrebno je odrediti vrstu boje (crvena, plava, zelena, žuta) u ovisnosti o prevladavajućoj valnoj duljini, zatim zasićenost boje, tj. „kroma“ koja predstavlja intenzitet boje te reflektiranu ili apsorbiranu svjetlost. Ako se u jednakoj mjeri reflektiraju sva valna područja bijele, tj. sunčeve svjetlosti, tada nam se predmet čini bijel. Ako se u potpunosti apsorbira sunčeva svjetlost, to rezultira crnom bojom predmeta.

Mjerenje boje uzorka provedeno je pomoću kromametra Konica Minolta CR 400 (**Slika 17**). Ovaj tip kromametra mjeri reflektiranu svjetlost s površine predmeta. Predmet se postavlja

na otvor mjerne glave promjera 8 mm. U otvoru se nalazi ksenonska lučna svjetiljka, koja pulsiranjem baca svjetlost okomitu na površinu predmeta. Reflektiranu svjetlost mjeri šest vrlo osjetljivih silikonskih fotoćelija. Računalo zapisuje podatke i izražava ih u pet različitih sustava (X, Y, Z; Yxy; Lab; LCH; Hunter Lab). U radu je korišten *Lab* sustav, koji daje približne vrijednosti kao i ljudsko oko.

L^* - vrijednosti daju ocjenu je li nešto tamno ili svijetlo. Ako je $L^* = 0$, predmet je crn, a ako je $L^* = 100$, predmet je bijel.

a^* - vrijednost može biti pozitivna ili negativna. Ako je pozitivna, rezultat je crvena boja, a ako je negativna, rezultat je zelena boja.

b^* - vrijednost također može biti pozitivna ili negativna. Ako je pozitivna, rezultat je žuta boja, a ako je negativna, rezultat je plava boja.

U ovom eksperimentalnom radu su praćene a^* , b^* i L^* vrijednosti suhih i vlažnih uzoraka te uzoraka koji su izuzimani iz bioreaktora tijekom procesa fermentacije.

Ukupna promjena boje (ΔE) izračunata je po formuli:

$$\Delta E = \sqrt{[(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]}$$

te kao promjena boje (C_{ab}^*):

$$C_{ab}^* = \sqrt{[(\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]}$$

3.4.9. Test anaerobne razgradnje

Anaerobna razgradnja uključuje razgradnju materijala u odsutnosti kisika koju provode odgovarajući mikroorganizmi: hidrolizne, kiselinske i metanogene bakterije. Proizvodi anaerobne razgradnje su bioplin (kojeg čine CH_4 i CO_2), mala količina biomase anaerobnih mikroorganizama te kruti ostatak – digestat.

Test anaerobne razgradnje proveden je u jednostavnoj aparaturi na osnovu koje se vizualno prati tijek testa, očitavanjem volumena nastalog bioplina prema modificiranoj metodi opisanoj u Morse i sur., 2011. Ovim testom istraživana je mogućnost proizvodnje bioplina iz nefermentiranih repinih rezanaca te iz repinih rezanaca obrađenih (fermentiranih) pomoću gljive bijelog truljenja *T. versicolor*.

Izvagano je po 0,2 g nefermentiranih repinih rezanaca te repinih rezanaca nakon fermentacije u trajanju od 15 i 30 dana s gljivom bijelog truljenja *T. versicolor*. Uzorci su stavljeni u graduirane cilindre (menzure) od 100 mL oko kojih su pričvršćeni plastični poklopci probušeni u sredini i osigurani gunicama. Nakon toga, u menzure je do vrha dodan inokulum razrijeđen s toplom vodom u omjeru 1:1. U kontrolne menzure (slijepe probe) nisu dodani uzorci, već samo inokulum razrijeđen s toplom vodom u omjeru 1:1. Kako bi se osigurali anaerobni uvjeti menzure su zatvorene gumenim čepovima probušenim u sredini, kroz koje su provučene teflonske cjevčice te su spojevi menzura i gumenih čepova premazani silikonskom masti (osobito oko izljeva menzure). Menzure su zatim okrenute naopako i pomoću plastičnih poklopaca pričvršćene na staklenke koje su prethodno napunjene vodom do polovice volumena. Tako pripremljene menzure i staklenke postavljene su u termostat na temperaturu od 37 °C. Nastali bioplin potiskuje tekući sadržaj menzure u staklenku s vodom te se jednostavno očitava volumen nastalog bioplina. Test je završen kada nastane 100 mL plina.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. USPOREDBA HBR-A I TBR-A KAO SUSTAVA ZA UZGOJ GLJIVE BIJELOG TRULJENJA *T. VERSICOLOR* NA ČVRSTIM NOSAČIMA

Gljiva bijelog truljenja, *T. versicolor* TV 6, uzgajana je na repinim rezancima zaostalim nakon proizvodnje šećera, čiji je kemijski sastav određen prije i nakon fermentacije u trajanju 15 i 30 dana. Određen je gubitak na masi repinih rezanaca te u neekstrahiranim uzorcima udjeli pepela i udjeli pentozana. U ekstrahiranim uzorcima (kruti ostatak zaostao nakon ekstrakcije ekstraktivnih tvari) određeni su udjeli celuloze. Eksperiment u HBR-u (**Slika 21**) proveden je uz aeraciju vlažnim zrakom, a sadržaj je ručno miješan svakih 24 sata kroz pet minuta. Eksperiment u TBR-u (**Slika 22**) proveden je u statičnim uvjetima (bez miješanja) i uz aeraciju vlažnim zrakom.



Slika 21 Uzgoj gljive bijelog truljenja *T. versicolor* TV 6 u horizontalno-cilindričnom staklenom bioreaktoru (HBR)



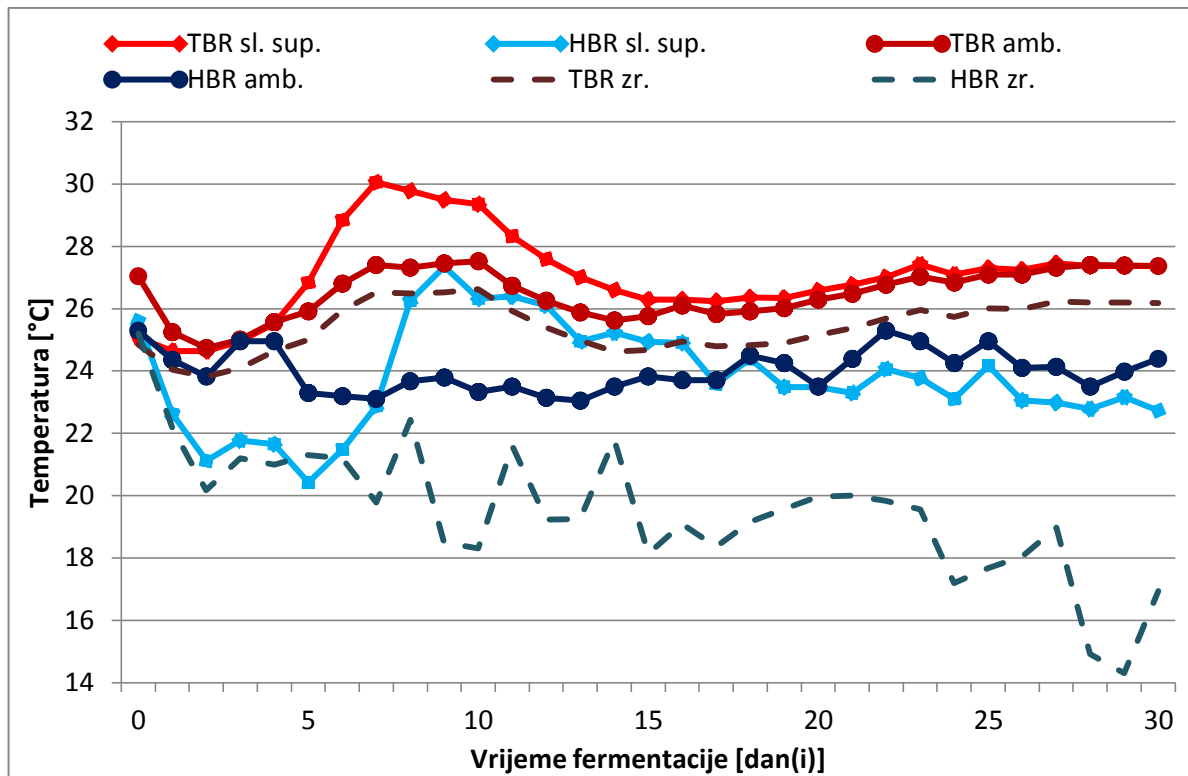
Slika 22 Uzgoj gljive bijelog truljenja *T. versicolor* TV 6 u laboratorijskom bioreaktoru s pliticama (TBR)

4.1.1. Praćenje procesnih parametara tijekom eksperimenta

Temperatura je praćena pomoću višekanalnog sustava termoparova (ubodne sonde Tip-K) u sprezi s Pico A/D konverterom i PicoLog računalnom aplikacijom za akviziciju podataka te uređaja Testo 635 i Testo 350. Promjena temperature tijekom eksperimenta prikazana je na **Slici 23**. Ambijentalna temperatura bila je u intervalu od 23,05°C do 25,3°C tijekom eksperimenta u HBR-u te od 24,74 °C do 27,52 °C tijekom eksperimenta u TBR-u. Temperatura u sloju supstrata iznosila je od 20,5 °C do 27,4 °C u HBR-u te od 24,64 °C do 30,07 °C u TBR-u. Razlike u temperaturi unutar bioreaktora i temperaturi u sloju supstrata između HBR-a i TBR-a posljedica su različite prosječne ambijentalne temperature.

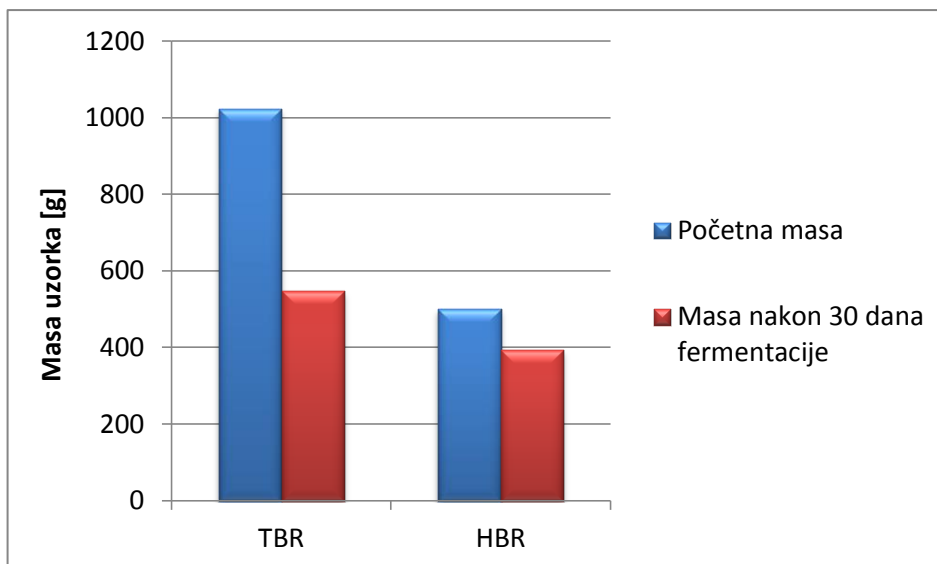
Najveća temperatura izmjerena u sloju supstrata postignuta je tijekom devetog dana eksperimenta u HBR-u te tijekom sedmog dana u TBR-u, nakon čega je postupno opadala. Porast temperature unutar bioreaktora kao i u sloju supstrata kod oba sustava posljedica je metaboličke aktivnosti radnog mikroorganizma. Veći porast temperature uočen je tijekom

eksperimenta u TBR-u, što se može objasniti uzgojem u statičnim uvjetima, tj. izostankom miješanja, uslijed čega je došlo i do slabije izmjene topline između sloja supstrata i okoline. pri čemu dolazi do formiranja tzv. vrućih točaka.



Slika 23 Promjena temperature tijekom fermentacije u HBR-u i TBR-u ($TBR_{sl. sup.}$ – temperatura u sloju supstrata u TBR-u, $HBR_{sl. sup.}$ – temperatura u sloju supstrata u HBR-u, TBR_{amb} – ambijentalna temperatura tijekom provedbe eksperimenta u TBR-u, HBR_{amb} – ambijentalna temperatura tijekom provedbe eksperimenta u HBR-u, $TBR_{zr.}$ – temperatura zraka u TBR-u, $HBR_{zr.}$ – temperatura zraka u HBR-u)

Tijekom fermentacije od 30 dana došlo je do gubitka na masi supstrata u oba bioreaktora (**Slika 24**). Tijekom eksperimenta u HBR-u postignut je gubitak na masi lignoceluloznog supstrata (repini rezanci) od 21,33 %, dok je tijekom eksperimenta u TBR-u postignut gubitak na masi lignoceluloznog supstrata (repini rezanci) od 46,50 %. Do gubitka na masi supstrata došlo je uslijed intenzivnog rasta i razmnožavanja gljive *T. versicolor*, odnosno potrošnje prisutnih jednostavnih šećera, kao i onih nastalih razgradnjom lignoceluloznih sastavnica repinih rezanaca.

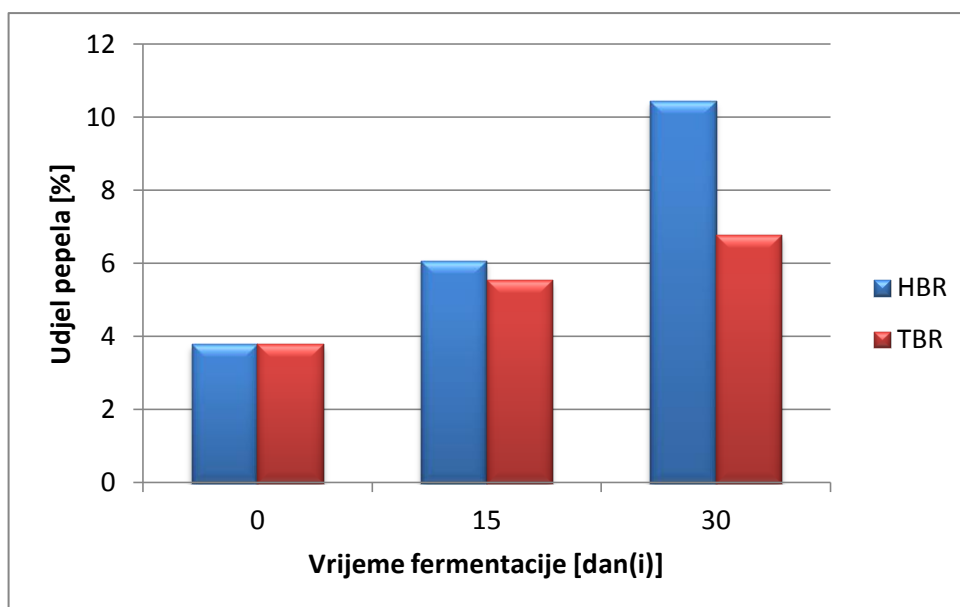


Slika 24 Masa uzorka prije i nakon fermentacije u trajanju od 30 dana u oba bioreaktora (HBR i TBR)

4.1.2. Određivanje sastava lignocelulozne biomase tijekom eksperimenta

Tijekom eksperimenta praćene su promjene udjela pepela, pentozana, celuloze te promjena boje uzorka.

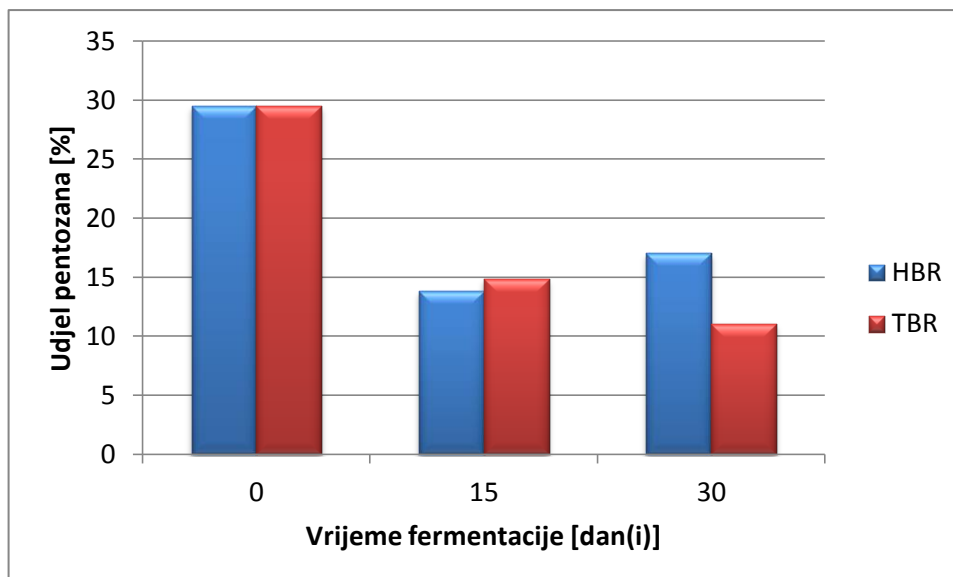
Pepeo je anorganski ostatak koji zaostaje nakon uklanjanja organske tvari i vode te predstavlja mjerilo ukupnog udjela mineralnih tvari u uzorku. Iskorišteni supstrati zaostali nakon fermentacije s različitim vrstama gljiva često pokazuju povećanje sadržaja minerala (pepela) i mogu se koristiti za uređenje tla, tj. za poboljšanje fizikalnih i kemijskih osobina tla (Peksen i sur., 2011.). U uzorcima koji su izuzimani tijekom fermentacije vidljiv je kontinuirani porast udjela pepela s produljenjem vremena fermentacije. Nakon 30 dana fermentacije u HBR-u došlo je do porasta udjela pepela u uzorku od 175,5 %, dok je nakon 30 dana fermentacije u TBR-u došlo do porasta udjela pepela u uzorku od 78,9 % (**Slika 25**).



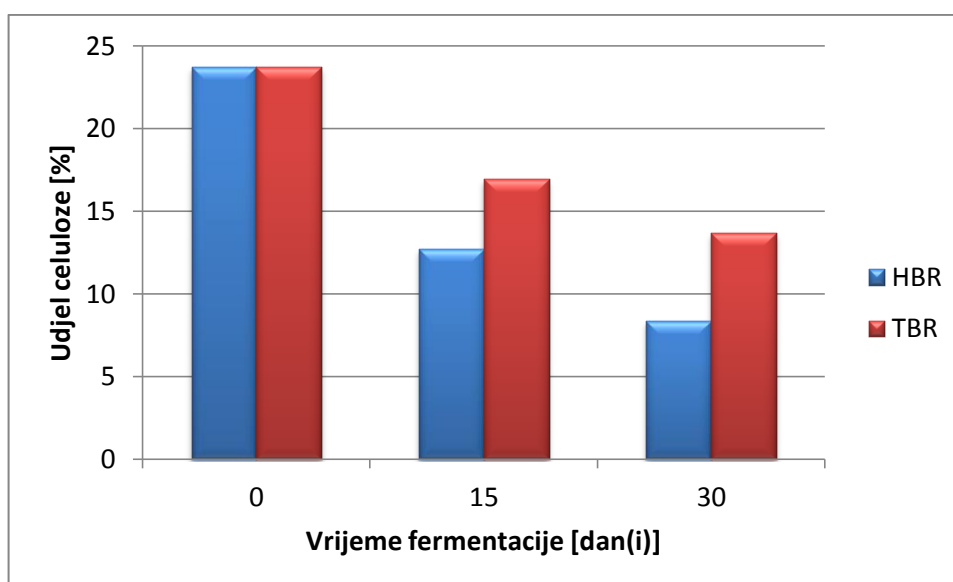
Slika 25 Promjena udjela pepela u uzorku tijekom fermentacije u oba bioreaktora (HBR i TBR)

Tijekom eksperimenta došlo je do smanjenja udjela pentozana u uzorcima fermentiranih repinih reznaca u odnosu na početni (nefermentirani) uzorak (**Slika 26**). U HBR-u je postignuta konverzija pentozana od 42,39 % nakon 30 dana fermentacije dok je u TBR-u postignuta konverzija pentozana od 62,61 % nakon 30 dana fermentacije. Postignute konverzije pentozana tijekom fermentacije ukazuju na sposobnost *T. versicolor* da razgradi hemicelulozu te produkte razgradnje (pentozani) koristi kao izvor ugljika za rast i razmnožavanje.

Osim toga, *T. versicolor* pokazuje i celulolitičku aktivnost, jer je tijekom eksperimenta došlo do smanjenja udjela celuloze (**Slika 27**). U HBR-u je postignuta konverzija celuloze od 64,65 % nakon 30 dana fermentacije, dok je u TBR-u postignuta konverzija celuloze 42,34 % nakon 30 dana fermentacije.



Slika 26 Promjena udjela pentozana tijekom fermentacije u oba bioreaktora (HBR i TBR)



Slika 27 Promjena udjela celuloze tijekom fermentacije u oba bioreaktora (HBR i TBR)

Izgled supstrata i razvoj gljive bijelog truljenja tijekom fermentacije u oba bioreaktora prikazani su na **Slici 28**.



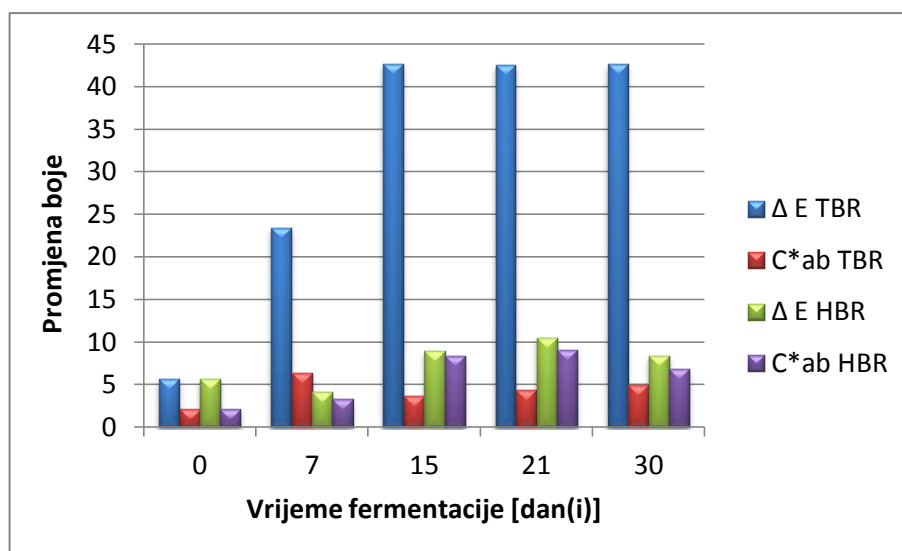
A



B

Slika 28 Prikaz supstrata i razvoja gljive bijelog truljenja tijekom fermentacije u oba bioreaktora (HBR (A) i TBR (B))

Slika 29 prikazuje promjenu boje uzorka nakon 7, 15, 21 i 30 dana fermentacije. Najveća promjena boje uočena je 21. dana fermentacije u HBR-u te 15. dana fermentacije u TBR-u.



Slika 29 Promjena boje uzorka tijekom fermentacije u oba bioreaktora (HBR i TBR)

Slika 30 prikazuje izgled supstrata prije i nakon fermentacije s *T. versicolor* TV 6 u HBR-u i TBR-u te izgled nefermentiranih repinih rezanaca. Sposobnost razgradnje lignina zajednička je karakteristika gljiva bijelog truljenja, što za posljedicu ima izbijeljeni izgled materijala na kojem raste. Tijekom ovog istraživanja također je došlo je do promjene boje supstrata, koji je dobio karakterističan izbijeljeni izgled. Promjene boje uzorka prikazane na **Slici 30** rezultat su rasta micelija gljive koji je izrazito bijele boje i izbijeljenja supstrata.



A

B

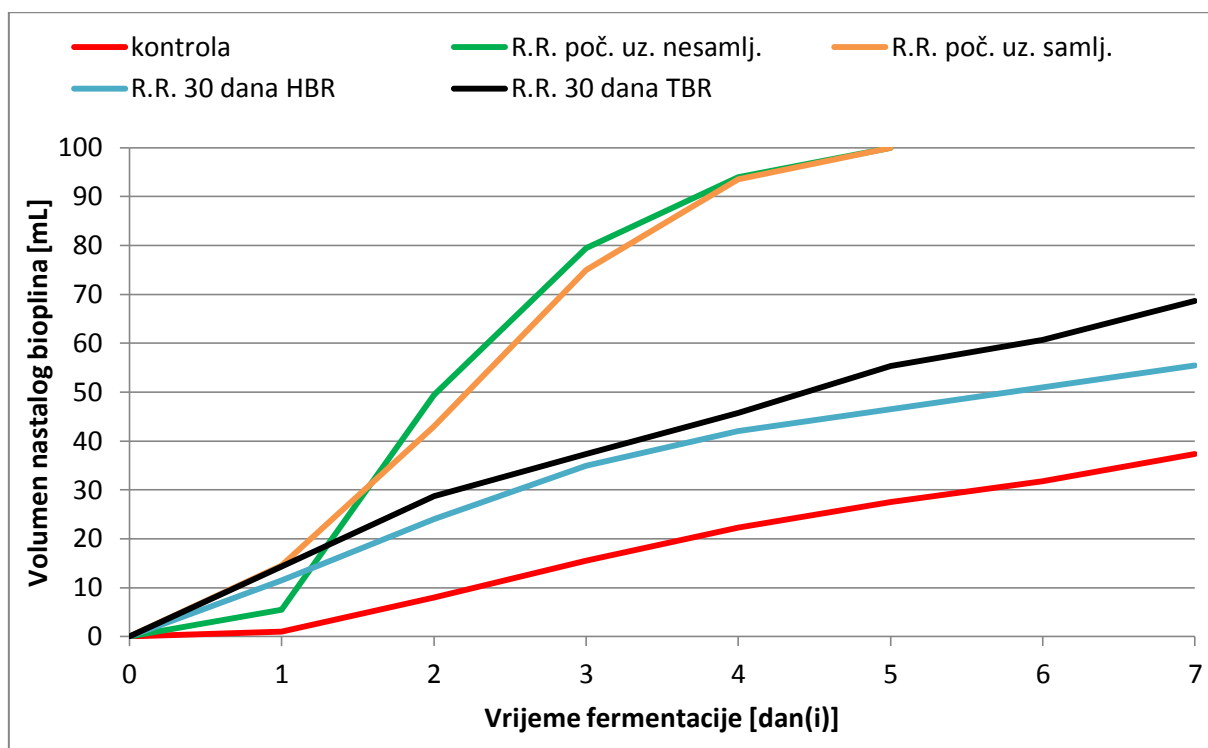
C

Slika 30 Izgled supstrata nakon 30 dana fermentacije s *T. versicolor* TV 6 u HBR-u (A), nefermentirani repini rezanci (B), izgled supstrata nakon 30 dana fermentacije s *T. versicolor* TV 6 u TBR-u (C)

4.2. TEST ANAEROBNE RAZGRADNJE

Provedbom testa anaerobne razgradnje izvršena je usporedba mogućnosti proizvodnje bioplina iz nefermentiranih repinih rezanaca te iz repinih rezanaca fermentiranih pomoću gljive bijelog truljenja *T. versicolor* TV 6 u oba bioreaktorska sustava (HBR i TBR).

Dobiveni rezultati prikazani su na **Slici 31**.



Slika 31 Volumen bioplina nastalog tijekom testa anaerobne razgradnje

Test anaerobne razgradnje provodio se do nastajanja 100 mL bioplina, odnosno u ovom istraživanju produljen je do ukupnog trajanja od sedam dana. Tijekom testa došlo je do proizvodnje bioplina u svim uzorcima, uključujući i kontrolne, u kojima bioplin nastaje zbog odumiranja i anaerobne razgradnje samih mikroorganizama.

Najveća i najbrža produkcija bioplina postignuta je korištenjem nefermentiranih uzoraka repinih rezanaca (samljevenih i nesamljevenih), pri čemu je nakon pet dana nastalo 100 mL bioplina. Razlog tome je prisustvo jednostavnih šećera (preostalih u izluženim repinim

rezancima nakon proizvodnje šećera) koje mikroorganizmi najprije troše, nakon čega započinje razgradnja lignoceluloznih sastavnica.

Korištenjem uzoraka fermentiranih pomoću gljive bijelog truljenja *T. versicolor* TV 6, dolazi do smanjene i sporije produkcije bioplina. U usporedbi s testom provedenim s nefermentiranim repinim rezancima kada je 100 mL bioplina proizvedeno nakon 5 dana, kroz isti vremenski period postignuta je produkcija bioplina od 46 mL za uzorak fermentiranih repinih rezanaca iz HBR-a te 55mL za uzorak iz TBR-a.

Manja produkcija bioplina korištenjem fermentiranih uzoraka u odnosu na nefermentirane uzorke repinih rezanaca može se objasniti smanjenom količinom fermentabilnih šećera iz kojih nastaje bioplin budući da su isti prethodno potrošeni za rast i razmnožavanje radnog mikroorganizma *T. versicolor* TV 6. Ipak, na osnovu značajno veće količine bioplina koja nastaje u odnosu na kontrolne uzorke u prvih 24 sata eksperimenta, ali i dalje tijekom eksperimenta može se zaključiti da je tijekom fermentacije s *T. versicolor* došlo do razgradnje lignoceluloznih sastavnica (poglavito celuloze i hemiceluloze) do fermentabilnih šećera koje anaerobne bakterije mogu brzo metabolizirati.

5. ZAKLJUČCI

Na osnovi dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

Gljiva bijelog truljenja *T. versicolor* dobro je rasla na repinim rezancima kao supstratu, bez dodataka vanjskih izvora ugljika i dušika, što je potvrđeno promjenom izgleda supstrata koji je bio premrežen bijelim micelijem gljive u oba reaktorska sustava, kao i promjenom boje supstrata. Gubitak na masi lignoceluloznog supstrata od 21,33% (HBR) i 46,50 % (TBR) nakon 30 dana fermentacije uslijed potrošnje prisutnih šećera i razgradnje lignoceluloznih sastavnica repinih rezanaca, također upućuje na intenzivan rast i aktivnost radnog mikroorganizma.

Tijekom istraživanja došlo je do povećanja udjela pepela od 175,5 % (HBR) i 78,9 % (TBR) nakon 30 dana fermentacije u odnosu na početni udjel pepela u supstratu prije fermentacije, što dodatno potvrđuje da je došlo do rasta i razmnožavanja gljive bijelog truljenja *T. versicolor* tijekom istraživanja.

Rezultati konverzije celuloze od 64,65% nakon 30 dana fermentacije u HBR-u te 42,34 % nakon 30 dana fermentacije u TBR-u upućuju na izrazitu celulolitičku aktivnost soja *T. versicolor* TV6 upotrebljenog tijekom ovog istraživanja. Osim celulolitičkih enzima, ovaj soj tijekom eksperimenta proizvodio je ekstracelularne enzime odgovorne za razgradnju hemiceluloze, što potvrđuju rezultati konverzije pentozana nakon 30 dana fermentacije od 42,39 % u HBR-u te 62,61 % u TBR-u.

Oba istraživana bioreaktorska sustava mogu se uspješno primijeniti u procesima biološke razgradnje lignoceluloznih materijala. Zbog većeg gubitka na masi lignoceluloznog materijala (46,50 %) i većeg stupnja konverzije pentozana (62,61 %), kao i zbog jednostavnosti izvedbe, TBR sustav čini se prikladniji za provedbu procesa biološke razgradnje repinih rezanaca upotrebom gljive bijelog truljenja *T. versicolor*.

S obzirom na volumen i brzinu nastajanja bioplina tijekom testa anerobne razgradnje, može se zaključiti da su repini rezanci koji nisu prethodno biološki obrađeni pomoću gljive bijelog truljenja *T. versicolor* TV 6 bolji supstrat za proizvodnju bioplina u odnosu na biološki obrađene repine rezance.

6. LITERATURA

Ali H K Q, Zulkali M M D: Design Aspects of Bioreactors for Solid-state Fermentation. *Chem. Biochem. Eng. Q.* 25, 255–266, 2011.

Bellon-Maurel V, Orliac O, Christen P: Sensors and measurements in solid-state fermentation: a review. *Process Biochemistry* 38, 881–896, Elsevier, 2003.

Bhargav S, Panda B P, Ali M, Javed S: Solid-State Fermentation: An Overview. *Chem. Biochem. Eng. Q.* 22, 49–70, 2008.

Couto S R, Sanroman M A: Application of solid-state fermentation to food industry: a review. *Journal of Food Engineering* 76, 291–302, Elsevier, 2006.

Curbstonevalley, 2010.

<http://curbstonevalley.com/wp-content/uploads/2010/02/TversicolorLg.jpg>

(5.3.2014.)

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

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

Hutnan M, Drtil M, Mrafkova L: Anaerobic degradation of sugar beet pulp. *Biodegradation* 11, 203–211, Kluwer Academic Publishers, 2000.

Janušić V, Ćurić D, Krička T, Voća N, Matin A: Predtretmani u proizvodnji bioetanola iz lignocelulozne biomase. *Stručni članak*, 2008.

Marić V, Šantek B: *Biokemijsko inženjerstvo*. Golden Marketing-Tehnička knjiga, Zagreb, 2009.

Mitchell D A, Krieger N, Berovič M: *Solid-State Fermentation Bioreactors: Fundamentals of Design and Operation*. Springer, Heidelberg, 2006.

- Morse M C, Liao Q, Criddle C S, Frank C W: Anaerobic biodegradation of the microbial copolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate): Effects of comonomer content, processing history, and semi-crystalline morphology. *Polymer* 52, 547–556., 2011.
- Mussatto S I, Ballesteros L F, Martins S, Teixeira J A: Use of Agro-Industrial Wastes in Solid State Fermentation Processes. *UIndustrial Waste*. Intech, 2012.
- Pandey A: Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 13, 81–84, Elsevier, 2003.
- Pejin D J: *Industrijska mikrobiologija*. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, 2003.
- 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.
- Raimbault M: General and microbiological aspects of solid-state fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, Vol. 1, No. 3, 1998.
- Rivers D B, Zoldak B R, Emert G H: Determination of cellulose in municipal solid wastes contaminated with synthetic materials. *Biotechnology Letters*, Vol. 5, No. 11, 777–780, 1983.
- Sigoillot J C, Berrin J G, Bey M, Lesage-Meessen L, Levasseur A, Lomascolo A, Record E, Uzan-Boukhris E: Fungal strategies for lignin degradation. *Advances in Botanical Research*, Vol. 61, Elsevier, 2012.
- TAPPI T223 cm-01. Pentosans in wood and pulp, 2001.
- Tengerdy R P, Szakacs G: Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 13, 169–179, Elsevier, 2003.
- Tišma M, Panjičko M, Zelić B, Velić N: Razgradnja lignoceluloznega materiala s pomočjo gliv bele trohnohe. *Ekolist*, 2013.

- Tišma M: Proizvodnja lakaze submerznim uzgojem *Trametes versicolor*. *Doktorski rad*, Zagreb, 2010.
- Tišma M, Velić N, Zelić B: From Waste to Value-Added Products–Solid-State Fermentation by White-Rot Fungi. U *Recent Developments in Biotechnology Vol. 12, Bioprocess/Biochemical Engineering*, Studium Press LLC, New Delhi, India,*u objavi*
- Udergraff D M: Semimicro determination of cellulose in biological materials. *Anal.Biochem.* 32,420–424, 1969.
- Vandenbergh L P S, Soccol C R, Prado F C, Pandey A: Comparison of Citric Acid Production by Solid-State Fermentation in Flask, Column, Tray and Drum Bioreactors. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Vol. 118, 2004.
- Wang E Q, Li S Z, Tao L, Geng X, Li T C: Modeling of rotating drum bioreactor for anaerobic solid-state fermentation. *Applied Energy* 87, 2839–2845, Elsevier, 2010.
- Webster J, Weber R: *Introduction to Fungi*. Cambridge University Press, Cambridge, 2007.
- Wesenberg D, Kyriakides I, Agathos S N: White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances* 22, 161–187, Elsevier, 2003.
- Wong D W S: Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes, *Appl. Biochem. Biotech.*157, 174–209, 2009.
- Xavier A M R B, Tavares A P M, Ferreira R, Amado F: *Trametes versicolor* growth and laccase induction with by-products of pulp and paper industry. *Electronic Journal of Biotechnology*, Vol. 10, No. 3, 2007.
- Zheng Y, Yu C, Cheng Y S, Lee C, Simmons C W, Dooley T M, Zhang R, Jenkins B M, VanderGheynst J S: Integrating sugar beet pulp storage, hydrolysis and fermentation for fuel ethanol production. *Applied Energy* 93, 168–175, Elsevier, 2012.