

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Katja VRABEC

**PRODUKCIJA LIGNOCELULOLITIČNIH ENCIMOV  
Z GLIVAMI BELE TROHNOBE NA TRDNEM  
ODPADKU IZ PAPIRNE INDUSTRIJE**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Katja VRABEC

**PRODUKCIJA LIGNOCELULOLITIČNIH ENCIMOV Z GLIVAMI  
BELE TROHNOBE NA TRDNEM ODPADKU IZ PAPIRNE  
INDUSTRIJE**

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija

**LIGNOCELLULLOLYTIC ENZYME PRODUCTION WITH WHITE  
ROT FUNGI ON SOLID WASTE FROM PULP AND PAPER  
INDUSTRY**

M. SC. THESIS  
Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Mikrobiologija. Delo je bilo opravljeno na Katedri za mikrobiologijo in mikrobro biotehnologijo, Oddelek za zootehniko, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani; Mycomedica d.o.o (Podkoren 72, 4280 Kranjska Gora); Inštitut za celulozo in papir (Bogišičeva 8, 1000 Ljubljana).

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala doc. dr. Maša Vodovnik in za recenzentko prof. dr. Romano Marinšek Logar.

Mentorica: doc. dr. Maša Vodovnik

Recenzentka: prof. dr. Romana Marinšek Logar

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Tomaž ACCETTO  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: doc. dr. Maša VODOVNIK  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: prof. dr. Romana MARINŠEK LOGAR  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Katja Vrabec

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2  
DK UDK 604.4:577.15:582.284.3(043)=163.6  
KG lignocelulolitični encimi / encimska aktivnost / glive bele trohnobe / *Pleurotus ostreatus* / gojenje na trdnem gojišču / odpadni mulj / papirna industrija  
AV VRABEC, Katja, dipl. biol. (UN)  
SA VODOVNIK, Maša (mentorica) / MARINŠEK LOGAR, Romana (recenzentka)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije  
LI 2016  
IN PRODUKCIJA LIGNOCELULOLITIČNIH ENCIMOV Z GLIVAMI BELE TROHNOBE NA TRDNEM ODPADKU IZ PAPIRNE INDUSTRIJE  
TD Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija)  
OP XII, 75 str., 20 pregl., 14 sl., 9 pril., 120 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI V papirni industriji v velikih količinah nastajajo celulozni odpadni mulji, katerih odlaganje predstavlja velik okoljski in ekonomski problem. Vključevanje encimsko kataliziranih procesov v papirno industrijo bi lahko zmanjšalo porabo kemikalij in njihovo odlaganje v odpadne mulje. V tem magistrskem delu smo odpadne mulje preizkusili kot substrat za pridobivanje lignocelulolitičnih encimov z izbranimi glivami. Preizkusili smo sposobnost rasti treh vrst gliv bele trohnobe na različnih papirniških muljih. Za analize encimskih aktivnosti v ekstraktih smo izbrali sev glivne vrste bukovega ostrigarja, *Pleurotus ostreatus* PLAB, ki je najhitreje rassel na muljih iz papirnice Vipap. Prerasli mulj smo v različnih fazah rasti homogenizirali in pripravili grob encimski ekstrakt v katerem smo določali endoglukanazno, ksilanazno in lakazno aktivnost. Aktivnost hidrolitičnih encimov smo merili preko dokazovanja sproščenih reducirajočih sladkorjev (metoda PAHBAH), lakazno aktivnost pa preko oksidacije sintetičnega substrata ABTS. Za oceno števila in molekulske mase encimov v ekstraktih smo slednje ločili tudi na encimogramih. *P. ostreatus* PLAB je med rastjo na mulju, ki nastane v procesu razsivitve odpadnega papirja izločal vsaj 3 različne celulolitične encime molekulskih mas med 35-50 kDa in vsaj 3 različne ksilanolitične encime molekulskih mas reda 30-40 kDa. Po elektroforezi nativnih encimskih ekstraktov tega mulja preraščenega s *P. ostreatus* PLAB smo v ekstraktih zaznali vsaj 2 encima z lakazno aktivnostjo.

#### KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2  
DC UDC 604.4:577.15:582.284.3(043)=163.6  
CX lignocellulolytic enzymes / enzyme activity / white-rot fungi / *Pleurotus ostreatus* / solid-state fermentation / waste sludge / pulp and paper industry  
AU VRABEC, Katja, dipl. biol. (UN)  
AA VODOVNIK, Maša (supervisor) / MARINŠEK LOGAR, Romana (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology  
PY 2016  
TY LIGNOCELLULOLYTIC ENZYME PRODUCTION WITH WHITE ROT FUNGI ON SOLID WASTE FROM PULP AND PAPER INDUSTRY  
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Microbiology)  
NO XII, 75 p., 20 tab., 14 fig., 9 ann., 120 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB Disposal of waste sludges which are produced in large amounts in pulp and paper industry imposes significant environmental and economical problem. Trends in pulp and paper industry aim to include enzymatically catalysed processes to reduce chemical consumption and their consequential deposition in waste sludges. In the following work waste sludges were used for enzyme production on laboratory scale. Three species of white rot fungi were tested for their ability to grow on different paper mill sludges in solid state fermentation conditions. For further enzymatic assays a strain of oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus* PLAB, was chosen due to its ability to grow vigorously on paper sludge from paper mill Vipap. Overgrown sludge was homogenized and crude enzyme extract was tested for endoglucanase, xylanase and laccase activities with reducing sugar assays (hydrolytic enzymes) and ABTS-oxidation assay (laccases). Number and molecular weights of the lignocellulolytic enzymes in the extracts were estimated on zymograms. *P. ostreatus* PLAB grown on paper sludge produced at least 3 different cellulolytic enzymes with molecular masses between 35-50 kDa and at least 3 different xylanolytic enzymes with molecular masses around 30-40 kDa. Electrophoresis of native samples showed *P. ostreatus* PLAB grown on paper sludge produced at least 2 different enzymes with laccase activity.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION</b>	<b>III</b>
<b>KAZALO VSEBINE</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO SLIK</b>	<b>VIII</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC</b>	<b>IX</b>
<b>KAZALO PRILOG</b>	<b>X</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI</b>	<b>XI</b>
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN IN HIPOTEZE	2
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>4</b>
2.1 GLIVE BELE IN RJAVE TROHNOBE	4
2.1.1 <b>Bukov ostrigar</b>	4
2.1.2 <b>Pisana ploskocevka</b>	5
2.1.3 <b>Svetlikava pološčenka</b>	6
2.2 GLIVNI ENCIMI	6
2.2.1 <b>Encimi, ki razgrajujejo celulozo</b>	6
2.2.1.1 Endoglukanaze	9
2.2.2 <b>Encimi, ki razgrajujejo hemicelulozo</b>	10
2.2.2.1 Ksilanaze	11
2.2.3 <b>Encimi, ki razgrajujejo lignin</b>	13
2.2.3.1 Lakaze	15
2.3 PAPIRNIŠKI MULJI	17
2.4 BIOTEHNOLOŠKE APLIKACIJE GLIV V PAPIRNI INDUSTRIJI	18
2.4.1 <b>Obdelava lesa in razpuščanje</b>	18
2.4.2 <b>Odstranjevanje ekstraktivnih snovi</b>	19
2.4.3 <b>Deliginifikacija in beljenje lesne gošče</b>	20
2.4.4 <b>Proizvodnja sekundarnih vlaken</b>	20
2.4.5 <b>Obdelava odpadnih vod</b>	21
3 MATERIAL IN METODE	23

3.1	NAČRT EKSPERIMENTALNEGA DELA	23
3.2	KEMIKALIJE	24
3.3	PRIPRAVA SUBSTRATA ZA GOJENJE GLIV	25
3.4	INOKULACIJA	26
3.5	PRIPRAVA GROBEGA ENCIMSKEGA EKSTRAKTA IN MERJENJE PH GROBIH ENCIMSKIH EKSTRAKTOV	27
3.6	PRESEJALNI TEST ZA DOKAZOVANJE ENCIMSKE AKTIVNOSTI	29
3.7	UGOTAVLJANJE OPTIMALNEGA PH OBMOČJA ENCIMSKE MEŠANICE V EKSTRAKTIH S PRESEJALNIM TESTOM	29
<b>3.7.1</b>	<b>Priprava topnega ksilana</b>	<b>30</b>
3.8	MERJENJE KONCENTRACIJE PROTEINOV V EKSTRAKTIH	30
3.9	SPEKTROFOTOMETRIČNO MERJENJE ENCIMSKIH AKTIVNOSTI V EKSTRAKTIH	31
<b>3.9.1</b>	<b>Metoda merjenja celulazne in ksilanazne aktivnosti preko sproščenih reducirajočih sladkorjev</b>	<b>31</b>
<b>3.9.2</b>	<b>Merjenje lakazne aktivnosti preko oksidacije ABTS</b>	<b>32</b>
3.10	ANALIZA ENCIMSKIH EKSTRAKTOV Z ENCIMOGRAMI	33
<b>3.10.1</b>	<b>Priprava vzorcev</b>	<b>33</b>
<b>3.10.2</b>	<b>Priprava raztopin in gelov za SDS PAGE</b>	<b>33</b>
<b>3.10.3</b>	<b>Gelska elektroforeza</b>	<b>34</b>
<b>3.10.4</b>	<b>Barvanje proteinov s koloidnim Coomassie</b>	<b>35</b>
<b>3.10.5</b>	<b>Renaturacija gelov za dokazovanje endoglukanazne in ksilanazne aktivnosti</b>	<b>36</b>
<b>3.10.6</b>	<b>Barvanje s Kongo rdečim – dokazovanje glikozid hidrolaznih aktivnosti v gelu</b>	<b>37</b>
<b>3.10.7</b>	<b>Dokazovanje lakazne aktivnosti v gelu</b>	<b>37</b>
3.11	LASTNOSTI LIGNOLITIČNIH, CELULOLITIČNIH IN HEMICELULOLITIČNIH ENCIMOV IZ PODATKOVNIH ZBIRK	38
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b>	<b>39</b>
4.1	PRIMERJAVA RASTI GLIV NA RAZLIČNIH PAPIRNIŠKIH MULJIH	39
4.2	OPTIMALNO PH OBMOČJE ENCIMOV V EKSTRAKTIH	42
4.3	KVANTITATIVNE ENCIMSKE AKTIVNOSTI	45

---

<b>4.3.1</b>	<b>Encimske aktivnosti v ekstraktih v odvisnosti od časa gojenja</b>	<b>45</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Optimalni pogoji za testiranje lakazne aktivnosti z ABTS</b>	<b>47</b>
<b>4.3.3</b>	<b>Lakazna aktivnost v odvisnosti od časa gojenja</b>	<b>48</b>
<b>4.4</b>	<b>LASTNOSTI PROTEINOV V EKSTRAKTIH UGOTOVLJENE Z ENCIMOGRAMI</b>	<b>49</b>
<b>4.5</b>	<b>LASTNOSTI LIGNOLITIČNIH, CELULOLITIČNIH IN HEMICELULOLITIČNIH ENCIMOV IZ PODATKOVNIH ZBIRK</b>	<b>50</b>
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA</b>	<b>55</b>
<b>6</b>	<b>SKLEPI</b>	<b>64</b>
<b>7</b>	<b>POVZETEK</b>	<b>65</b>
<b>8</b>	<b>VIRI</b>	<b>68</b>
<b>ZAHVALA</b>		
<b>PRILOGE</b>		

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Encimska razgradnja celuloze (prirejeno po Horn in sod., 2012).	7
<b>Slika 2:</b> Tridimenzionalna struktura katalitske domene endoglukanaze glive <i>T. reesei</i> (PDB koda 1EG1) (PDB, 2016).	9
<b>Slika 3:</b> Shematski prikaz strukture ksilana in mest delovanja ksilanolitičnih encimov (Michelin in sod., 2014).	11
<b>Slika 4:</b> Kristalna struktura katalitske domene ksilanaze <i>Trichoderma longibrachiatum</i> (PDB koda 3AKQ) (PDB, 2016).	12
<b>Slika 5:</b> Strukturni model lignina listavcev (Leonowicz in sod., 1999).	14
<b>Slika 6:</b> Tridimenzionalna struktura lakaze glive <i>T. versicolor</i> (PDB koda 1GYC) (PDB, 2016).	17
<b>Slika 7:</b> Shema eksperimentalnega dela.	23
<b>Slika 8:</b> Shema priprave grobih encimskih ekstraktov.	28
<b>Slika 9:</b> Rast micelija na muljih DIP in KMČN po 24 dneh gojenja.	41
<b>Slika 10:</b> Povprečna endoglukanazna aktivnost v odvisnosti od časa gojenja v ekstraktih kulture <i>P. ostreatus</i> na mulju DIP in povprečna koncentracija ekstrahiranih proteinov.	46
<b>Slika 11:</b> Povprečna ksilanazna aktivnost v ekstraktih v odvisnosti od časa gojenja <i>P. ostreatus</i> na mulju DIP in povprečna koncentracija ekstrahiranih proteinov.	47
<b>Slika 12:</b> Optimizacija metode dokazovanja lakazne aktivnosti: ugotavljanje optimalne redčitve vzorca.	48
<b>Slika 13:</b> Lakazna aktivnost in koncentracija proteinov v ekstraktih kultur <i>P. ostreatus</i> v odvisnosti od časa gojenja na mulju DIP.	49
<b>Slika 14:</b> Primerjava velikosti encimov v ekstraktih na encimogramih.	50

## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica 1:</b> Encimi iz družine glikozid hidrolaz (3.2.1), ki sodelujejo pri razgradnji celuloze (McDonald in sod., 2007) .....	8
<b>Preglednica 2:</b> Encimi, ki sodelujejo pri razgradnji hemiceluloze (McDonald in sod., 2007).....	10
<b>Preglednica 3:</b> Encimi, ki sodelujejo pri razgradnji lignina (McDonald in sod., 2007)....	15
<b>Preglednica 4:</b> Izbrani ekstrakcijski pufri za določanje encimske aktivnosti.....	29
<b>Preglednica 5:</b> Sestava reagentov po Lowry-ju.....	30
<b>Preglednica 6:</b> Sestava nanašalnega pufra.....	33
<b>Preglednica 7:</b> Sestava elektroforetskega pufra za SDS PAGE. ....	34
<b>Preglednica 8:</b> Sestava ločevalnega in nanašalnega gela. ....	34
<b>Preglednica 9:</b> Razlike med postopki dokazovanja encimov s celulazno, ksilanazno in lakazno aktivnostjo v gelih. ....	35
<b>Preglednica 10:</b> Sestava raztopine za barvanje s Coomassie modrim. ....	36
<b>Preglednica 11:</b> Sestava renaturacijskih raztopin.....	36
<b>Preglednica 12:</b> Postopek renaturacije. ....	36
<b>Preglednica 13:</b> Raztopina za barvanje s Kongo rdečim.....	37
<b>Preglednica 14:</b> Raztopina za razbarvanje Kongo rdečega. ....	37
<b>Preglednica 15:</b> Ocena rasti gliv na papirniških muljih. ....	40
<b>Preglednica 16:</b> Rezultati presejalnega testa ugotavljanja optimalnega pH območja celulaz v ekstraktih. ....	43
<b>Preglednica 17:</b> Rezultati presejalnega testa ugotavljanja optimalnega pH območja ksilanaz v ekstraktih. ....	44
<b>Preglednica 18:</b> Lastnosti celulaz <i>P. ostreatus</i> iz podatkovnih zbirk (NCBI, 2016). ....	52
<b>Preglednica 19:</b> Lastnosti ksilanaz <i>P. ostreatus</i> iz podatkovnih zbirk (NCBI, 2016).....	53
<b>Preglednica 20:</b> Lastnosti lakaz <i>P. ostreatus</i> iz podatkovnih zbirk (NCBI, 2016) .....	54

## KAZALO PRILOG

**Priloga A:** Vsebnost vlage v muljih.

**Priloga B:** Žarilna izguba, vsebnost težkih kovin, dušika in skupni organski ogljik mulja KMČN in DIP (ICP, 2015).

**Priloga C:** Različni papirniški mulji.

**Priloga D:** Kvalitativno vrednotenje presejalnih testov encimske aktivnosti na agaroznih ploščah.

**Priloga E:** Slikovni prikaz ugotavljanja optimalnega pH območja ksilanaz v encimskih ekstraktih.

**Priloga F:** Endoglukanazna, ksilanazna in lakazna encimska aktivnost *P. ostreatus* PLAB na mulju DIP.

**Priloga G:** Primerjava endoglukanazne aktivnosti *P. ostreatus* pri gojenju na lignoceluloznih substratih in na mulju DIP.

**Priloga H:** Primerjava ksilanazne aktivnosti *Pleurotus* sp. pri gojenju na lignoceluloznih substratih in na mulju DIP.

**Priloga I:** Primerjava lakazne aktivnosti *P. ostreatus* pri gojenju na lignoceluloznih substratih in na mulju DIP.

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ΔRS	razlika v množini sproščenih reducirajočih sladkorjev
α-Ara	α-arabinofuranozidaza
α-Glu	α-glukuronidaza
β-Xyl	β-ksilozidaza
ABTS reagent	2,2'-azino-bis(3-etylbenzotiazolin-6-sulfonat) diamonijeva sol
ABTS	2,2'-azino-bis(3-etylbenzotiazolin-6-sulfonska kislina)
AK	Aminokislina, aminokislinski
A	Acetatni pufer
Ac	Acetilna skupina
Arab	L-arabinofuranozid
AXE	Acetil ksilan esteraza
BK	Bukov ksilan
BG	β-glukozidaza
CAZy	Carbohydrate-Active EnZymes database
C	Citratni pufer
C1GH61, C4GH61	Polisaharid monooksigenaze, ki delujejo na mestu C1 ali C4
CBH 1,2	Celobiohidrolaza 1,2
CBM	Vezavna domena za ogljikov hidrat (angl. Carbohydrate-Binding Module)
CDH	Celobioza-dehidrogenaza
CMC	Karboksimetil celuloza
(Curtis) P. Karst	(William Curtis) Petter Adolf Karsten
DIP	Mulj, ki nastane v tehnološkem postopku proizvodnje papirne gošče iz recikliranih vlaken po postopku razsivitve (angl. deinking)
DNS	Dinitrosalicilna kislina
EC	Sistem za klasifikacijo encimov (angl. Enzyme Commision)
EG	Endoglukanaza, endoglukanazni
EX	Endoksilanaza
ExplorEnz	Enzyme Nomenclature Database, podatkovna zbirka

Index Fungorum	Podatkovna zbirka informacij o nomenklaturi gliv
IUBMB	International Union of Biochemistry and Molecular Biology
(Jacq.) P. Kumm.	(Nikolaus Joseph von Jacquin) Paul Kummer
KMČN	Mulj, ki nastane na kemijsko mehanski čistilni napravi
(L.) Lloyd	(Carl Linnaeus) Curtis Gates Lloyd
LiP	Ligin peroksidaza
MeG1A	4-O-metil-glukuronska kislina
MnP	Mangan peroksidaza
MW	Molekulska masa
Mb	Mega bazni pari
NCBI	The National Center for Biotechnology Information, strežnik
PAH	Poliaromatski ogljikovodiki
PAHBAH	Hidrazid p-hidroksi benzojeve kisline
P	Fosfatni pufer
PDA	Gojišče krompirjev dekstrozni agar (angl. Potato Dextrose Agar)
PDB	Protein Data Bank, podatkovna zbirka
pI	Izoelektrična točka
RS	Reducirajoči sladkorji
SF	Gojenje v tekočem gojišču (angl. Submerged Fermentation)
SSF	Gojenje na trdnem gojišču (angl. Solid-State Fermentation)
VEV	Čist papirniški mulj iz papirnice Vevče
VEV MIX	Mešani papirniški mulj iz papirnice Vevče
VP	Peroksidaza, ki združuje katalitske lastnosti MnP in LiP (angl. Versatile Peroxidase)
Xyl	D-ksiloza

## 1 UVOD

V papirni industriji nastajajo velike količine papirniških muljev, ki predstavljajo obremenitev za okolje. Nastajajo pri čiščenju procesnih vod na kemo-mehanskih čistilnih napravah in pri recikliranju papirja po postopku razbarvanja papirja oz. razsivitve (angl. deinking). V Evropski Uniji letno proizvedemo 11 milijonov ton papirniških odpadkov, od katerih 70 % izhaja iz produkcije sekundarnih vlaken pri recikliranju papirja (Monte in sod., 2009). Papirniški mulji so zmesi kratkih celuloznih vlaken, anorganskih polnil, kot sta kalcijev karbonat in kaolinit ter preostalih kemikalij raztopljenih v vodi (Likon in Saarela, 2012). Gospodarjenje s papirniškimi mulji vključuje odlaganje na smetišča in kmetijske površine, kompostiranje, sežig in pirolizo ter uporabo v konstrukcijskih materialih (Likon in Saarela, 2012). Zaradi velikih količin papirniških odpadkov, visoke vsebnosti vlage, možne toksičnosti za okolje in spremenljive sestave so metode njihove ponovne uporabe običajno drage, vpliv na okolje pa slabo raziskan (Monte in sod., 2009). Razvoj v papirni industriji je usmerjen k zmanjševanju negativnih vplivov muljev in ostalih stranskih in odpadnih produktov papirne industrije na okolje, mnoge biotehnološke rešitve pa vključujejo uporabo lignolitičnih in celulolitičnih encimov.

Aplikacije encimov v papirni industriji vključujejo beljenje in razbarvanje papirne gošče (angl. pulp), odstranjevanje ekstraktivnih snovi, sproščanje in ločevanje celuloznih vlaken, razgradnjo raztopljenih organskih snovi v odpadnih procesnih vodah. Uporaba encimsko kataliziranih procesov zmanjša porabo kemikalij in energije ter prispeva k izboljšani kvaliteti produktov papirne industrije (Gavrilescu in Chisti, 2005).

Odpadni mulji so lahko primeren substrat za rast gliv bele trohnobe. Slednje namreč izločajo oksidativne in hidrolitične encime, ki razgrajujojo lignin in celulozne polimere (Manavalan in sod., 2015). Glive bele trohnobe so zato že mnogokrat uspešno uporabili za produkcijo encimov z različnimi odpadki, ki so vsebovali celulozo in lignin (Castanera in sod., 2012; Elisashvili in sod., 2008; Gregori in sod., 2008; Iandolo in Piscitelli, 2011; Khalil in sod., 2011; Kurt in Buyukalaca, 2010). Razgradnjo celuloze vršijo endoglukanaze, EG, (EC 3.2.1.4), eksoglukanaze, (EC 3.2.1.91, EC 3.2.1.74) in  $\beta$ -glukozidaze (EC 3.2.1.21). Med hemicelulolitične encime vključujemo (endo)ksilanaze

(EC 3.2.1.8),  $\beta$ -ksilozidaze (EC 3.2.1.37),  $\alpha$ -glukuronidaze (E.C. 3.2.1.131), in druge encime, ki katalizirajo hidrolizo raznovrstnih polisaharidov hemiceluloze. Nabor encimov, ki razgrajujejo lignin, vključuje lignin peroksidaze (LiP) (EC 1.11.1.14), mangan peroksidaze (MnP) (EC 1.11.1.13), peroksidaze, ki združujejo katalitske lastnosti LiP in MnP (VP, angl. versatile peroxidases) (EC 1.11.1.16) in lakaze (EC 1.10.3.2) (Manavalan in sod., 2015).

Za produkcijo encimov gline gojijo v tekočih (angl. submerged fermentation, SF) ali na trdnih gojiščih (angl. solid-state fermentation, SSF). Prednosti gojenja na trdnih gojiščih vključujejo manjšo porabo energije, uporabo nizkocenovnih lignoceluloznih substratov, zmanjšanje potrebe po odstranjevanju vode po končanem gojenju in manjša potreba po sterilnosti opreme. Grob encimski ekstrakt pridobljen v postopku gojenja na trdnem gojišču se lahko neposredno uporabi za obdelavo tarčnih substratov (Yoon in sod., 2014). V primerjavi s SF, se SSF pogosteje uporablja za gojenje manjših količin kultur zaradi tehničnih omejitev pri prenosu v večje merilo (angl. scale-up) (Gregori in sod., 2007).

## 1.1 NAMEN IN HIPOTEZE

Namen pričajočega dela je bil preizkusiti različne vrste papirniških muljev kot substrat za gojenje gline bele trohnobe in proizvodnjo lignocelulolitičnih encimov: celulaz, ksilanaz in lakaz, razvoj postopka za pripravo grobih encimskih ekstraktov iz gojišč preraslih z izbrano vrsto gline, določiti encimsko aktivnost v pridobljenih ekstraktih v različnih fazah rasti in z encimogrami ugotoviti molekulske mase (MW) encimov z izbranimi aktivnostmi.

S pridobljenimi podatki o primernosti papirniških muljev za rast gline bele trohnobe smo želeli oceniti biotehnološko uporabnost trdnih papirniških odpadkov za produkcijo lignocelulolitičnih encimov. Za produkcijo encimov se lahko uporablajo mnogi lignocelulozni substrati, produkcije glivnih encimov na trdnem gojišču s papirniškim muljem pa v znanstveni literaturi še nismo zasledili.

V magistrskem delu smo preverili naslednje delovne hipoteze:

- Vsi papirniški mulji niso enako primerni za rast izbranih vrst gliv.
- Gliva, ki papirniške mulje uporablja kot substrat, med rastjo proizvaja celulaze, ksilanaze in lakaze.
- encimske aktivnosti v ekstraktih glivnih kultur se razlikujejo v odvisnosti od časa inkubacije kultur.
- V ekstraktih glivnih kultur lahko z encimogrami zaznamo več različno velikih ksilanaz, celulaz in lakaz.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 GLIVE BELE IN RJAVE TROHNOBE

Glede na tip razgradnje lesa lahko glive razdelimo na tiste, ki povzročajo belo trohnobo (angl. white rot) in tiste, ki povzročajo rjavo trohnobo (angl. brown rot). Glive bele trohnobe so še posebej dobro raziskane, ker so sposobne razgradnje mnogih nevarnih kemijskih onesnažil v okolju in zaradi lignolitičnih encimov, ki jih proizvajajo (Ting in sod., 2011). Še posebej pogoste so v gozdnih ekosistemih, bolj podvržen jim je les listavcev (Blanchette in sod., 1990). Razgradnjo rastlinskih celičnih sten vršijo z encimi in z ne-encimskimi mehanizmi, sočasno razkrajajo vse komponente stene ali pa preferenčno razgrajujejo lignin. Preferenčna razgradnja lignina povzroči beljen videz lesa (Singh in Singh, 2014).

Glive rjave trohnobe v naravi najdemo v tleh in pogosteje v gozdovih iglavcev. Značilen je rjavkast izgled trohnečega lesa, ki po sušenju zaradi depolimerizacije celuloze razpoka v kockaste strukture in se upraši. Lignin le delno modificirajo in pogosto ostaja v razgrajenih celičnih stenah (Singh in Singh, 2014).

Glive bele trohnobe, za razliko od gliv rjave trohnobe, izražajo poseben razred peroksidaz, ki vključuje encime z visokim oksidacijskim potencialom (MnP, LiP in peroksidaze, ki združujejo katalitske lastnosti obeh) in izločajo na splošno več encimov, ki delujejo direktno na kristalinično celulozo. V primerjavi z glivami rjave trohnobe imajo glive bele trohnobe več zapisov za vezavne domene, ki vežejo celulozo. Taka razvrstitev ne zajame raznolikosti znotraj gliv, ki razgrajujejo les, saj imajo nekatere vrste gliv bele in rjave trohnobe le eno od teh dveh lastnosti (Riley in sod., 2014). V nekaterih virih avtorji ločijo še druge skupine gliv, kot so glive mehke trohnobe (angl. soft rot) in glive, ki povzročajo obarvanje lesa (angl. stain fungi) (Martinez in sod., 2005).

#### 2.1.1 Bukov ostrigar

Bukov ostrigar, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., je gliva, ki jo po svetu gojijo predvsem za prehrano. V sistem jo uvrščamo v družino *Pleurotaceae*, red *Agaricales*, razred *Agaricomycetes*, deblo *Basidiomycota*, kraljestvo *Fungi* (Index Fungorum, 2016).

Genom *P. ostreatus* je velik 34,3 mega baznih parov (Mb) in vključuje 12460 napovedanih genov (Riley in sod., 2014).

Trosnjak je školjkaste oblike, s stranskim betom ali skoraj brez beta, zgoraj gladek, najpogosteje sive ali rjave barve. Beli lističi trosovnice potekajo navzdol na bet. Plodišča razvija najpogosteje v pozni jeseni in zgodnji zimi. Povzroča belo trohnobo lesa, izloča zunajcelične oksidativne in hidrolitične encime in prednostno razkraja lignin in tudi holocelulozo (Manavalan in sod., 2015). *P. ostreatus* je saprotrof na odmrlih drevesih in fakultativni parazit v začetni fazi propadanja drevesa (Pavlík in Pavlík, 2013). Pogosto vidimo trosnjake na pogled zdravih listopadnih drevesih (Barron, 1992). Poleg lesa, micelij *P. ostreatus* dobro prerašča mnogo odpadnih (ligno)celuloznih surovin, kar lahko izkoriščamo za pridelovanje hrane, krme, ekstrakcijo encimov in zdravilnih učinkovin, razgradnjo odpadnih in toksičnih snovi (Gregori in sod., 2007).

### **2.1.2 Pisana ploskocevka**

Pisana ploskocevka, *Trametes versicolor* (L.) Lloyd je pogosta lesna gliva z vrsto biotehnoloških aplikacij. Genom *T. versicolor* je velik 44,8 Mb in vsebuje 14296 napovedanih genov (Floudas in sod., 2012). Uvrščamo jo v družino *Polyporaceae* red *Polyporales*, razred *Agaricomycetes* deblo *Basidiomycota* in kraljestvo *Fungi* (Index Fungorum, 2016).

*T. versicolor* je pogosta lesna goba na odmrlih deblih listavcev. Pahljačasti trosnjaki se razraščajo v skupinah drug nad drugim, so brez beta, ob strani so prirasil na les, zgornja površina je kolobarjasto pisana in žametasta, rob je valovit, trosovnica je cevasta z okroglimi porami. Bazidiospore so tankostenske in gladke (Justo in Hibbett, 2011).

*T. versicolor* pripisujejo mnoge zdravilne učinke, njen lignolitičen encimski sistem pa je predmet mnogih biotehnoloških raziskav (Wasser in Weis, 1999; Singh in Singh, 2014). Predobdelava lesa v papirni industriji s to glivo zmanjša vsebnost lipofilnih ekstraktivnih snovi (kot so smolne kisline in trigliceridi) v gošči, in zmanjša toksičnost odpadnih vod (Singh in Singh, 2014).

### 2.1.3 Svetlikava pološčenka

Svetlikava pološčenka, *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst., je ena najbolj znanih medicinskih makrogliv na svetu. Velikost genoma *G. lucidum* je 43,3 Mb, kodira pa 16113 napovedanih genov, vključno z zapisi za enega najbogatejših setov encimov, ki razgrajujejo les med prostotrosnicami, zato je uporabna v različnih biotehnoloških aplikacijah (Chen in sod., 2012). Uvrščamo jo v družino *Ganodermataceae*, red *Polyporales*, razred *Agaricomycetes*, deblo *Basidiomycota* in kraljestvo *Fungi* (Index Fungorum, 2016).

Trosnjake najdemo na razpadajočem lesu listavcev. Ti so ploščati, pahljačasti, bleščeči in oleseneli, tipično rdečih in rjavih odtenkov. Bet izrašča bočno. Trosovница je bela, luknjičasta s cevkami, pri starejših trosnjakih porjavi. *G. lucidum* izgrajuje številne sekundarne metabolite s terapevtskim delovanjem (Baby in sod., 2015), bioaktivne snovi vključujejo predvsem triterpenoide in polisaharide (Chen in sod., 2012). *G. lucidum* je uporabna v bioremediaciji in encimi, ki jih proizvaja uspešno razgrajujejo poliaromatske ogljikovodike (PAH) v okolju (Ting in sod., 2011). Izdeluje encime, ki so uporabni v papirni industriji, lakaze vrst iz rodu *Ganoderma* se uporablajo na primer za predobdelavo lesnih drobcev pred razpuščanjem (ang. biopulping) (Rodríguez Couto in Toca Herrera, 2006).

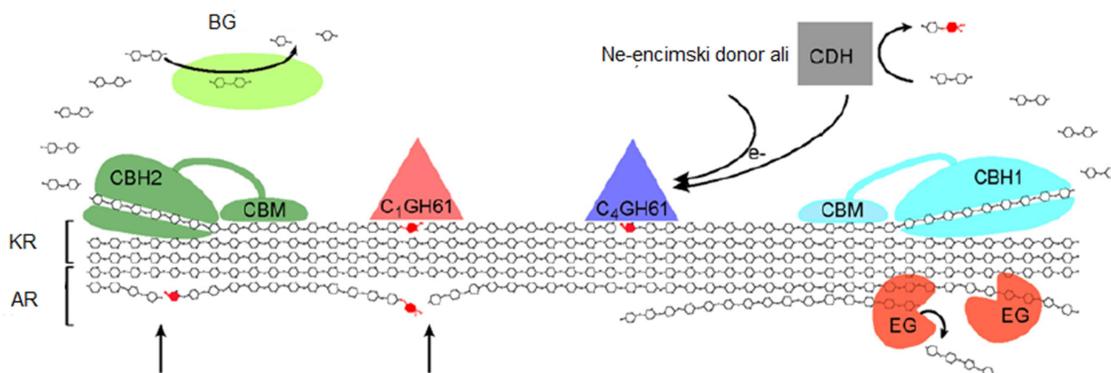
## 2.2 GLIVNI ENCIMI

### 2.2.1 Encimi, ki razgrajujejo celulozo

Rastline, nekatere bakterije, glive, praživali in plaščarji sintetizirajo celulozo, zato jo morajo biti sposobni tudi do neke mere razgraditi in modificirati med svojo rastjo. Večino razgradnje celuloze vršijo bakterije, glive in praživali, gene za celulaze pa najdemo tudi pri nekaterih živalih (Davison, 2005).

Celuloza je količinsko najbolj zastopana organska spojina na Zemlji in glavni ponor ogljika v rastlinah. Predstavlja 15-30 % suhe mase primarnih sten in 40-50 % suhe mase sekundarnih sten lesnatih rastlin. Kemijsko jo lahko definiramo kot strukturni polisaharid, sestavljen iz dolgih verig glukoznih monomerov, povezanih z  $(1 \rightarrow 4)$   $\beta$  vezmi. Ti se

povezujejo v mikrofibrile, parakristalinske komplekse v katerih so  $\beta$ -glukanske verige vzdolžno povezane z vodikovimi vezmi. V primarni steni rastlinskih celic se mikrofibrile nalagajo naključno, v sekundarni pa so urejene vzporedno (Dermastia, 2007).



Slika 1: Encimska razgradnja celuloze (prirejeno po Horn in sod., 2012).

Na kristalinično celulozo direktno delujejo CBH, C<sub>1</sub>GH61 in C<sub>4</sub>GH61. CBH cepijo s koncem glukanskih verig. Nastale disaharide BG cepijo do glukoze. Glavni encimi, ki cepijo znotraj amorfne regije so EG. Mnogi sistemi celulolitičnih encimov vključujejo več EG in/ali CBH, ki lahko delujejo na različne substrate. Prosti elektroni za delovanje C<sub>1</sub>GH61 za C<sub>4</sub>GH61 so lahko encimskega (CDH) ali neencimskega izvora, nimajo pa vse glive obeh oksidoreduktaz in CDH. Okrajšave:  $\beta$ -glukozidaza (BG), endoglukanaza (EG), celobiohidrolazi 1 in 2 (CBH1 in CBH2), celobioza-dehidrogenaza (CDH); vezavna domena za ogljikov hidrat (CBM), polisaharid monoooksigenaze, ki delujejo na mestu C1 ali C4 (C<sub>1</sub>GH61 in C<sub>4</sub>GH61).

Popolna hidroliza celuloze zahteva sinergistično delovanje hidrolitičnih encimov (slika 1). Klasična shema razgradnje celuloze vključuje 3 razrede encimov: endoglukanaze, eksoglukanaze in  $\beta$ -glukozidaze. Endoglukanaze naključno cepijo glikozidne vezi znotraj verige. Encimi z eksoglukanazno aktivnostjo nato odcepljajo di- ali oligosaharide z reducirajočega ali nereduirajočega konca celuloznega polimera. Encimi delujejo sinergistično, endo-delujuči encimi napravijo nove reducirajoče in ne-reducirajoče konce verig za ekso-delujuče encime, ki sproščajo celobiozo.  $\beta$ -glukozidaze cepijo nastalo celobiozo, glavni produkt endo- in eksoglukanaz, v glukozo. Naravni celulolitični sistemi pogosto vključujejo več endo- in ekso- delujučih encimov in so različno specifični za različne oblike celuloze. Razlike v afiniteti za različne oblike celuloze je delno posledica variacij v vezavnih domenah, ki encime vežejo na ogljikov hidrat (Horn in sod., 2012). Poleg naštetih hidrolaz, naj bi pri razgradnji celuloze sodelovali tudi oksidativni encimi. Pri razgradnji kristaliničnih regij celuloze sodelujejo pred kratkim odkrite oksidativne celulaze (angl. lytic polysaccharide monooxygenase), ki so sposobne oksidacije na razgradnjo odpornih polisaharidov (Hemsworth in sod., 2014; Horn in sod., 2012). Eden od limitirajočih dejavnikov pri razgradnji celuloze je dostopnost površine substrata za

delovanje encimov (Zhang in sod., 2009). Celulolitični in hemicelulolitični encimi imajo zato pogosto skupno regulacijo ekspresije (Silva, 2014). Encimi iz družine glikozid hidrolaz, ki sodelujejo pri razgradnji celuloze so našteti v preglednici 1.

**Preglednica 1: Encimi iz družine glikozid hidrolaz (3.2.1), ki sodelujejo pri razgradnji celuloze.**

Encime smo razvrstili glede na ime encima, sistem za klasifikacijo encimov (EC) in reakcijo, ki jo katalizira, kot so razvrščeni v encimski podatkovni zbirki Enzyme Nomenclature Database, (ExplorEnz) po encimski nomenklaturi IUBMB (McDonald in sod., 2007).

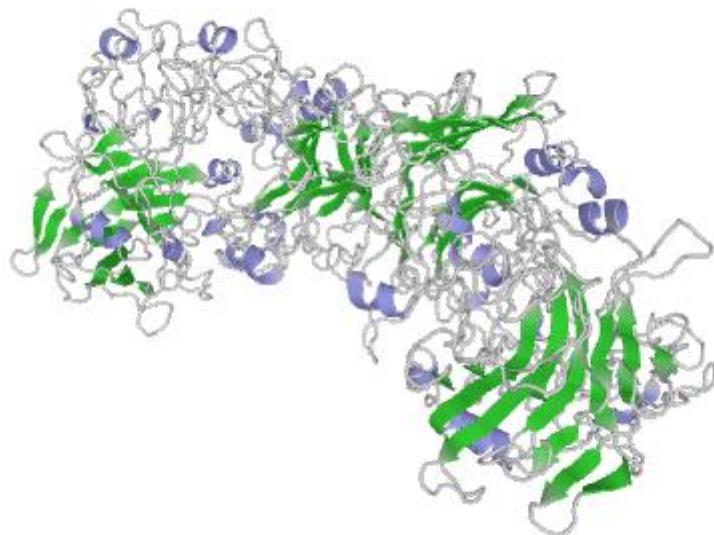
Encim	EC	Reakcija, ki jo encim katalizira
Endo-1,4- $\beta$ -glukanaza (sinonimi: endoglukanaza, celulaza, karboksimetyl celulaza (CMC-aza))	3.2.1.4	Endohidroliza 1,4- $\beta$ -D-glukozidne vezi
celuloza 1,4- $\beta$ -celobiozidaza (sinonim: ekso-1,4- $\beta$ -glukanaza)	3.2.1.91	Hidroliza 1,4- $\beta$ -D-glukozidne vezi, odcepi se celobioza z nereducirajočih koncov
celuloza 1,4- $\beta$ -celobiozidaza	3.2.1.176	Hidroliza 1,4- $\beta$ -D-glukozidne vezi, odcepi se celobioza z reducirajočih koncov
glukan 1,4- $\beta$ -glukozidaza (sinonim: ekso-1,4- $\beta$ -glukanaza)	3.2.1.74	Hidroliza 1,4- $\beta$ -D-glukozidne vezi, odcepi se glukoza
$\beta$ -glukozidaza	3.2.1.21	Hidroliza terminalnega nereducirajočega konca $\beta$ -D-glukoznega ostanka, odcepi se $\beta$ -D-glukoza

Pogoste metode za določanje celulazne aktivnosti vključujejo določanje skupne celulazne aktivnosti, določanje  $\beta$ -glukozidazne aktivnosti, endoglukanazne (EG) aktivnosti in eksoglukanazne oz. celobiohidrolazne aktivnosti (Percival Zhang in sod., 2009). Standardna substrata za določanje skupne celulazne aktivnosti sta filtrirni papir in Avicel (delci mikrokristalinične celuloze). Za zaznavanje eksoglukanazne aktivnosti se uporablja Avicel in regenerirana amorfna celuloza, za zaznavanje endoglukanazne aktivnosti pa karboksimetyl celuloza (CMC) (Percival Zhang in sod., 2009). Alternativa spektrofotometričnim meritvam endoglukanazne aktivnosti je merjenje zmanjšanja viskoznosti substrata. Za dokazovanje  $\beta$ -glukozidazne aktivnosti se najpogosteje uporablja sintetični substrat p-nitrofenil- $\beta$ -D-glukozid (Percival Zhang in sod., 2006).

### 2.2.1.1 Endoglukanaze

Endoglukanaze (EC 3.2.1.4), katerih aktivnost smo analizirali, spadajo v skupino glikozid hidrolaz. Katalizirajo endohidrolizo ( $1 \rightarrow 4$ )- $\beta$ -D-glikozidne vezi v celulozi, liheninu in  $\beta$ -D-glukanih žit. S fragmentacijo do oligosaharidov endoglukanaze hitro depolimerizirajo celulozne polimere (Michelin in sod., 2014).

Dobro preučene so pri glivah *Phanerochaete chrysosporium* in rodu *Trichoderma*. Večina celulaz sestavlja velika katalitska domena in manjša vezavna domena, ki veže celulozo, nekatere endoglukanaze pa so brez vezavne domene. Vezavna domena prepozna celulozo in se veže na njeno površino. Celulaze naj bi se premikale lateralno po površini celuloze, zaradi interakcije vezavne domene z verigami celuloze. V študijah interakcije teh encimov s površino celuloze se pogosto uporabljajo encimi brez vezavnih domen, ki kažejo večjo afiniteto do amorfnih delov celuloze (Prates in sod., 2013).



Slika 2: Tridimenzionalna struktura katalitske domene endoglukanaze glive *T. reesei* (PDB koda 1EG1) (PDB, 2016).

Konkavna površina  $\beta$ -ploskve iz 9 verig tvori žlebič, ki veže substrat (Sandgren in sod., 2001).

## 2.2.2 Encimi, ki razgrajujejo hemicelulozo

Hemicelulozo sestavlja polisaharidi z različno kemijsko sestavo in zgradbo, ki so sestavina rastlinske celične stene (Dermastia, 2007). Razvrščamo jih glede na glavno sladkorno komponento polimera na ksilane ( $\beta$ -1,4-povezane D-ksiloze), manane ( $\beta$ -1,4-povezane D-manoze) in ksiloglukane ( $\beta$ -1,4-povezane glukoze) (Van Den Brink in De Vries, 2011). Glavna veriga hemiceluloze ima mnogo razvjetev, ki jih gradijo monomeri D-galaktoze, D-ksiloze, L-arabinoze in D-glukuronske kisline (Van Den Brink in De Vries, 2011).

Hemiceluloze predstavljajo 25-30 % teže lesa, verige hemiceluloze so kraje od celuloznih in običajno obsegajo 150-200 sladkornih enot (Kirk in Cullen, 1998). Ksilanazno aktivnost lahko merimo s kolorimetričnimi, viskozimetričnimi metodami ali zaznamo z metodo radialne gelske difuzije (Vendrell in sod., 1999).

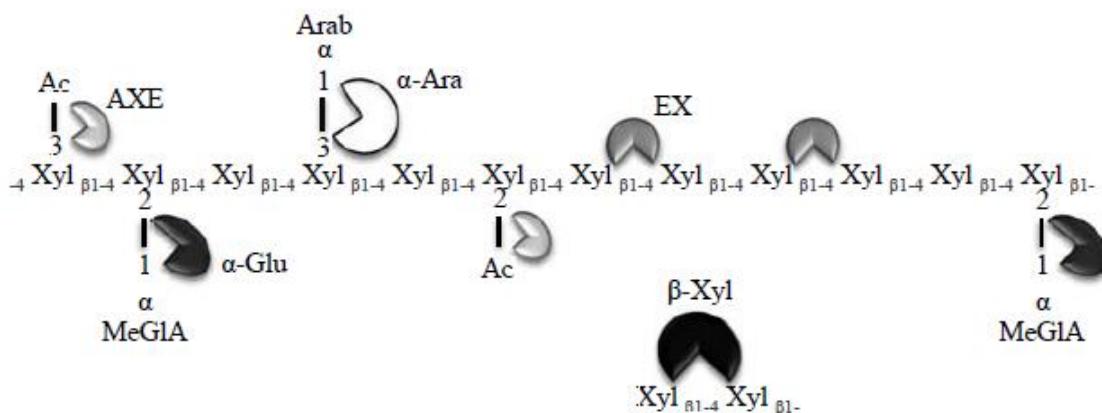
### Preglednica 2: Encimi, ki sodelujejo pri razgradnji hemiceluloze.

Encime smo razvrstili glede na ime encima, sistem za klasifikacijo encimov (EC) in reakcijo, ki jo katalizira, kot so razvrščeni v encimski podatkovni zbirki Enzyme Nomenclature Database, (ExplorEnz) po encimski nomenklaturi IUBMB (McDonald in sod., 2007).

Encim	EC	Reakcija, ki jo encim katalizira
Endo-1,4- $\beta$ -ksilanaza (sinonimi: ksilanaza, endoksilanaza)	3.2.1.8	Endohidroliza 1,4- $\beta$ -D-ksilozidne vezi v ksilanh
$\beta$ -ksilozidaza	3.2.1.37	Hidroliza 1,4-D-ksilanov, odcepi se D-ksiloza
$\alpha$ -L-arabinofuranozidaza	3.2.1.55	Hidroliza terminalnih nereducirajočih $\alpha$ -L-arabinofuranozidnih ostankov v $\alpha$ -L-arabinozidih
acetilesteraza	3.1.1.6	Ocetni ester + H <sub>2</sub> O = alkohol + acetat
$\alpha$ -glukuronidaza	3.2.1.131	$\alpha$ -D-glukuronozid + H <sub>2</sub> O = alkohol + D-glukuronat
endo-1,4- $\beta$ -manaza	3.2.1.78	Endohidroliza 1,4- $\beta$ -D-manozidne vezi v mananh
$\beta$ -manozidaza	3.2.1.25	Hidroliza terminalnih nereducirajočih $\beta$ -D-manozidnih ostankov v $\beta$ -D-manozidih
$\alpha$ -galaktozidaza	3.2.1.22	Hidroliza terminalnih $\alpha$ -D-galaktozidnih ostankov v $\alpha$ -D-galaktozidih

Med hemicelulolitične encime vključujemo endoksilanaze (EC 3.2.1.8),  $\beta$ -ksilozidaze (EC 3.2.1.37),  $\alpha$ -glukuronidaze (E.C. 3.2.1.131) in druge encime, ki katalizirajo hidrolizo

raznovrstnih polisaharidov hemiceluloze. Večina encimov, ki razgrajuje hemicelulozo spada med glikozid hidrolaze (3.2.1.) in tudi hidrolaze, ki cepijo karboksilne estre, kot je acetilesteraza (3.1.1.6).



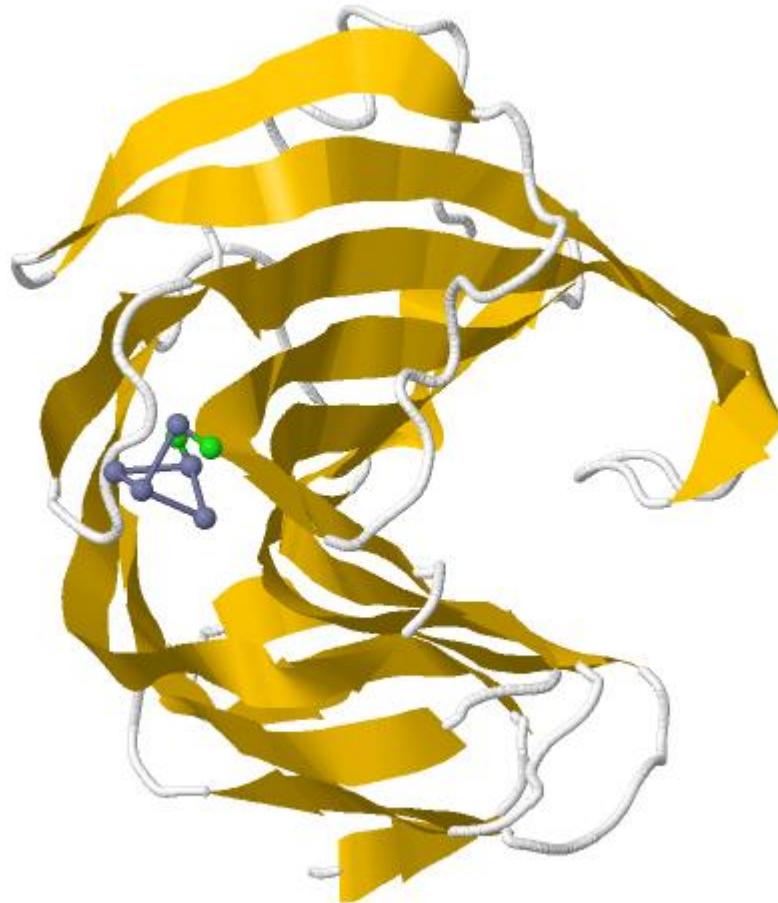
**Slika 3: Shematski prikaz strukture ksilana in mest delovanja ksilanolitičnih encimov (Michelin in sod., 2014).**

Okrajšave: Acetilna skupina (Ac), L-arabinofuranozid (Arab), 4-O-metil-glukuronska kislina (MeG1A), D-ksiloza (Xyl), acetil ksilan esteraza (AXE),  $\alpha$ -glukuronidaza ( $\alpha$ -Glu),  $\alpha$ -arabinofuranozidaza ( $\alpha$ -Ara), endoksilanaza (EX),  $\beta$ -ksilozidaza ( $\beta$ -Xyl).

Različne endoksilanaze razgrajujejo linearne verige 1,4-povezanih enot D-ksiloze, glavne verige ksilana z visoko stopnjo substituiranosti in manjše ksilo-oligosaharide. Sprošcene ksilo-oligosaharide razgrajujejo  $\beta$ -ksilozidaze. Endomanaze so vključene v razgradnjo mananskih polisaharidov, sproščeno manobiozo in manotriozo razgrajujejo  $\beta$ -1,4-manozidaze. Za popolno razgradnjo hemiceluloze je potrebno vsaj 9 različnih encimskih aktivnosti, ki jih najdemo pri encimih iz 12 različnih družin glikozid hidrolaz in štirih družin esteraz, ki delujejo na ogljikove hidrate. Nekateri izmed teh encimov so prikazani v preglednici 2. Mnoge hemicelulaze imajo tudi vezavno domeno, ki se veže na ogljikov hidrat (Van Den Brink in De Vries, 2011).

### 2.2.1.2 Endoksilanaze

Endoksilanaze (EC 3.2.1.8), katerih aktivnost smo merili, spadajo v skupino glikozid hidrolaz in so ključnega pomena za razgradnjo ksilana (Qinnghe in sod., 2004). Dobro so preučene pri rodu *Trichoderma*.



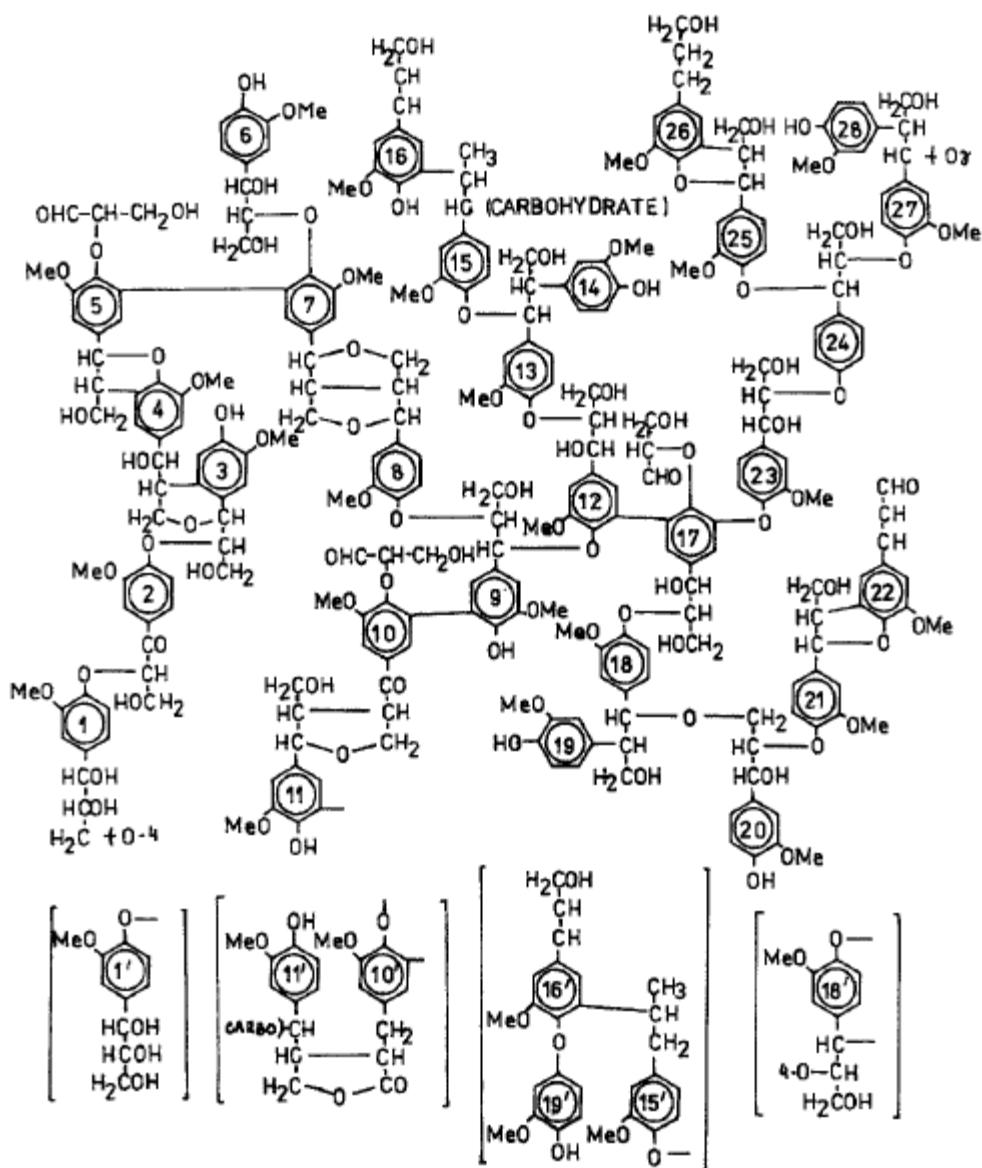
Slika 4: Kristalna struktura katalitske domene ksilanaze *Trichoderma longibrachiatum* (PDB koda 3AKQ) (PDB, 2016).

Cepijo glikozidne vezi v ogrodju ksilana, kar povzroči zmanjšanje stopnje polimerizacije tega substrata. Hidroliza ksilana ni naključna - katere vezi se cepijo v različnih fazah je odvisno od dolžine verige, stopnje razvejanosti in substituiranosti. Na začetku so glavni produkti hidrolize  $\beta$ -D-ksilopiranozil oligomeri, kasneje pa nastajajo vse manjše molekule kot so mono-, di- in trisaharidi  $\beta$ -D-ksilopiranoz. Endoksilanaze lahko razdelimo v dva tipa glede na končni produkt: tiste, ki cepijo stranske verige ksilana (angl. debranching), cepijo 1,3- $\alpha$ -L-arabinofuranozil v arabinoksilanih in sproščajo arabinozo, in tiste, ki ne cepijo stranskih verig (angl. non-debranching). Najbolj učinkovito hidrolizo ksilana vršijo glive, ki izdelujejo oba tipa endoksilanaz. Velika raznolikost znotraj ksilanaz pri glivah nastane s post-translacijskimi modifikacijami in proteolitsko modifikacijo (Polizeli in sod., 2005).

### 2.2.3 Encimi, ki razgrajujejo lignin

Lignin je količinsko najbolj zastopan naravni aromatski polimer (Leonowicz in sod., 1999). Je amorfen, heterogen, plastičen fenolni polimer, ki nastane s polimerizacijo različnih aromatskih alkoholov – monolignolov. Tip alkohola in njegova relativna količina v ligninu se pri posameznih rastlinskih skupinah spreminja. Večina golesemenk izgraje lignin v katerem prevladuje koniferil alkohol, medtem ko lignin pri dvokaličnicah vsebuje več sinapil alkohola. Lignin se veže na celulozo s kovalentnimi vezmi in skupaj s hemicelulozo tvori tridimenzionalno mrežo, ki obdaja celulozne mikrofibrile. Je zelo odporen na kemijsko, biološko in fizikalno razgradnjo, netopen v vodi in daje mehansko oporo lesu. Nalaga se v osrednji lameli in v primarni steni rastlinskih celic, v sekundarni steni ga je manj, 18-35 % (Dermastia, 2007).

Razgradnja lignina je glavni korak v procesu kroženja ogljika v kopenskih ekosistemih. V primerjavi z ozko specifičnimi encimi za razgradnjo ogljikovih hidratov, encimi, ki razgrajujejo lignin niso specifični in lahko oksidirajo različne substrate. Lignolitični encimi delujejo na substrat posredno, preko nastanka visoko reaktivnih ne-specifičnih prostih radikalov, ki cepijo vezi med ogljikovimi atomi in eterske vezi. Različne glive, ki razkrajajo les izrabljajo različne encimske strategije, ki so dobro so preučene le pri nekaterih (Levasseur in sod., 2008).



Slika 5: Strukturni model lignina listavcev (Leonowicz in sod., 1999).

Encime, ki sodelujejo pri razgradnji lignina smo navedli v preglednici 3. Encimski sistem, ki razgrajuje lignin vključuje LiP (EC 1.11.1.14), MnP (EC 1.11.1.13), VP (EC 1.11.1.16) in lakaze (EC 1.10.3.2). Peroksidaze so hemoproteini, medtem ko so lakaze bakrovi proteini. Peroksidaze so skupina oksidoreduktaz, ki posredujejo pri prenosu elektronov iz H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na druge prejemnike. MnP tako generirajo Mn<sup>3+</sup>, ki difundira v substrat in oksidira fenolne in nefenolne enote, LiP pa razgrajuje nefenolne enote lignina. VP, ki so bile opisane pri rodu *Pleurotus* in drugih vrstah, kombinirajo katalitske lastnosti obeh prej

omenjenih peroksidaz. Drugi zunajcelični encimi ki sodelujejo pri razgradnji lignina so oksidaze, ki generirajo  $H_2O_2$ , in dehidrogenaze, katerih substrat predstavljajo razgradni produkti lignina (Martinez in sod., 2005).

**Preglednica 3: Encimi, ki sodelujejo pri razgradnji lignina.**

Encime smo razvrstili glede na ime encima, sistem za klasifikacijo encimov (EC) in reakcijo, ki jo katalizira, kot so razvrščeni v encimski podatkovni zbirki Enzyme Nomenclature Database, (ExplorEnz) po encimski nomenklaturi IUBMB (McDonald in sod., 2007).

Encim	EC	Reakcija, ki jo encim katalizira
Lakaza (sinonim: p-difenol oksidaza)	1.10.3.2	$4\text{-benzendifol} + O_2 = 4\text{-benzosemikinon} + 2H_2O$
Mangan peroksidaza	1.11.1.13	$2\text{ Mn(II)} + 2 H^+ + H_2O_2 = 2\text{ Mn(III)} + 2 H_2O$
Lignin peroksidaza (sinonim: ligninaza)	1.11.1.14	$(3,4\text{-dimetoksifenil})\text{metanol} + H_2O_2 = 3,4\text{-dimetoksibenzaldehid} + 2 H_2O$
Peroksidaza (angl. Versatile peroxidase)	1.11.1.16	$\text{donor} + H_2O_2 = \text{oksidiran donor} + 2H_2O$

Aktivnosti encimov, ki razgrajujejo lignin najpogosteje določamo s fotometričnimi testi, pri katerih zaznavamo obarvane produkte oksidacije substratov (Johannes in Majcherczyk, 2000). Najpogosteje uporabljeni substrati za dokazovanje lakazne aktivnosti so gvajakol, 2,6-dimetoksifenol (Prillinger in Esser, 1975), siringaldazin (Harkin in Obst, 1973) in nefenolni substrat 2,2'-azino-bis(3-etylbenzotiazolin-6-sulfonska kislina) (ABTS) (Childs in Bardsley, 1975). Slednji je edini neodvisen od pH v območju med pH 2-11 (Johannes in Majcherczyk, 2000).

### 2.2.1.3 Lakaze

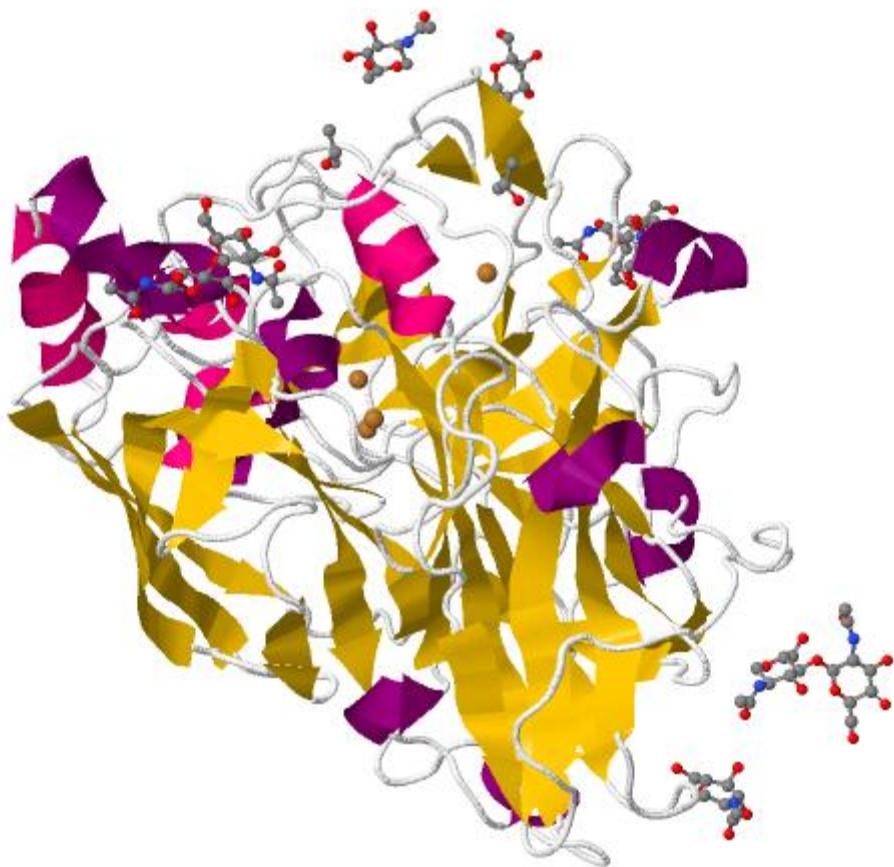
Izmed lignolitičnih encimov smo se v naši raziskavi osredotočili na lakaze. Lakaze (EC 1.10.3.2.) spadajo v skupino fenol oksidaz. Najdemo jih pri glivah, podobni oksidativni encimi, ki vsebujejo baker pa obstajajo tudi pri rastlinah, insektih in bakterijah (Lundell in sod., 2010). Vloge, ki jih imajo lakaze v naštetih organizmih so različne. Vključeni so v patogenezo, imunost in morfogenezo organizmov in pretvorbo kompleksnih organskih spojin, kot so lignin in huminske kisline (Claus, 2004). Pri glivah so tako na primer udeležene v procesu razkroja lignina (Leonowicz in sod., 1999), pri rastlinah pa v njegovo

sintezo (Schuetz in sod., 2014). Večina raziskanih lakaz je glivnih, še posebej iz skupine gliv bele trohnobe. Glivne lakaze imajo pomembno vlogo v rastlinski patogenezi, tvorbi pigmentov in razgradnji lignoceluloznih substratov (Kiiskinen in sod., 2002).

Glivne lakaze pogosto nastopajo kot izoencimi, ki se povežejo v multimerne komplekse. Molekulska masa monomera variira med 50 do 100 kDa. K večji stabilnosti encimov lahko prispeva kovalentna vezava na molekulo ogljikovega hidrata. Za katalitsko aktivnost so potrebni najmanj 4 bakrovi atomi na aktivno enoto proteina, ki so razporejeni na mestih 1, 2 in 3, na mestu 3 sta dva atoma bakra (Claus, 2004).

Lakaze so relativno nespecifični encimi in katalizirajo oksidacijo širokega spektra tako aromatskih kot alifatskih substratov vključno z difenoli, polifenoli, diamini, aromatskimi amini, benzentioli in substituiranimi fenoli v prisotnosti molekularnega kisika (Kiiskinen in sod., 2002; More in sod., 2011). Od reduciranega substrata do molekularnega kisika elektroni potujejo med bakrovimi atomi v aktivnem centru encima. Baker na mestu 1 katalizira štiri monoelektronske oksidacije substrata. Elektroni se prenesejo preko mesta 2 in 3, kjer pride do redukcije molekularnega kisika in sproščanja vode. Z oksidacijo substratov nastanejo reaktivni radikali, ki lahko vstopajo v različne ne-encimske reakcije (Claus, 2004).

Genom *P. ostreatus* (seva PC9 in PC15) vsebuje 12 genov za fenol oksidaze (lakaze), med temi je 6 izocimov, POXA1b (Lacc6), POXA1w, POXA2, POXA3a (Lacc2), POXA3b in POXC (Lacc10), biokemijsko okarakteriziranih (Castanera in sod., 2012). Ob gojenju na trdnem gojišču sta Iandolo in Piscitelli (2011) zaznala izražanje dveh novih izoform lakaze *P. ostreatus*, ki jih prej še niso opisali.



**Slika 6: Tridimenzionalna struktura lakaze glive *T. versicolor* (PDB koda 1GYC) (PDB, 2016).**  
Trije bakrovi atomi na mestih 2 in 3 se nahajajo blizu skupaj (Piontek, 2002).

### 2.3 PAPIRNIŠKI MULJI

Papirniški mulji so zmesi celuloznih vlaken in anorganskih polnil, kot sta kalcijev karbonat in kaolinit, in ostankov kemikalij raztopljenih v vodi (Likon in sod., 2011). Nastajajo na čistilnih napravah pri čiščenju procesnih vod v proizvodnji papirjev in pri recikliranju izrabljenih papirjev v postopku razbarvanja z namenom proizvodnje sekundarnih vlaknin. Znano je, da vsebujejo kratka vlakna lignina, celuloze in hemiceluloze (Chantigny in sod., 2000). Papirniški mulji vsebujejo težke kovine, klorirane organske spojine kot so dioksini in poliklorirani bifenili, in druga onesnažila npr. PAH in hlapna organska topila, maščobne kisline in smole (Beauchamp, 2002; Monte in sod., 2009).

Primarni načini odlaganja in recikliranja papirniških muljev so odlaganje na kmetijske površine, sežiganje na mestu za pridobivanje toplote in odlaganje na smetiščih (Likon in

sod., 2011). Alternativne metode izrabljanja papirniških muljev vključujejo predelavo v hidravlično bariero za pokrivanje smetišč (Kortnik in sod., 2008), kot gradbeni material (Černec in sod., 2005), za odstranjevanje metalnih ionov iz raztopine (Calace in sod., 2003) ali kot absorbent za čiščenje vodne površine (Likon in sod., 2011).

V papirnici Vipap odpadne vode, ki nastajajo v proizvodnji papirja vodijo na industrijsko čistilno napravo. Čiščenje vključuje kemijsko mehanski način obdelave odpadne vode in sekundarno biološko čiščenje z uporabo aktivnega blata. Primarni mulj, ki nastaja na kemijsko-mehanski čistilni napravi se odvede na izžemanje skupaj z biološkim muljem, ki nastane kot gošča na dnu usedalnega bazena. Odpadna voda iz papirne industrije je revna s hranili, zato ji je potrebno dušik in fosfor dodajati (Fain, 2008). Od leta 2009 so na čistilno napravo priključene tudi komunalne odpadne vode mesta Krško z okolico (Letno poročilo Vipap Videm Krško d.d., 2012). Dodatek komunalne odpadne vode je razlog za variabilno sestavo mulja, ki nastane po izžemanju.

Mulj, ki nastane v tehnološkem postopku proizvodnje papirne gošče iz recikliranih vlaken po postopku razsivitve (DIP) je glavni stranski produkt predelave odpadnega papirja. Odpadni papir vstopa v razpuščevalnik, kjer se z dodajanjem kemikalij delci tiskarske barve ločijo od vlaken. Tu nastane prvi rejekt, suspenzija vlaken, delcev barve in nečistoč pa se vodi na serijo prebiranja, flotacij, kjer se odstranjuje tiskarska barva, zgoščevanja in beljenja gošče. Odpadno blato oz. mulj se preko zgoščevanja in izžemanja procesne vode izloča iz postopka (Fain, 2008).

## 2.4 BIOTEHNOLOŠKE APLIKACIJE GLIV V PAPIRNI INDUSTRIJI

Našteli bi lahko mnoge aplikacije gliv in njihovih encimov v okoljski biotehnologiji: ekstrakcija kovin, detoksifikacija in razgradnja ksenobiotikov ter organskih onesnažil (Gadd, 2007). Osredotočila se bom na njihovo uporabo v papirni industriji.

### 2.4.1 Obdelava lesa in razpuščanje

Razpuščanje celuloze, lesovine, odpadnega papirja ali vlaknin enoletnih rastlin je prvi korak v procesu izdelave papirja, kartona in biokompozitov. Lignocelulozni materiali

vključno z lesom in agrikulturimi ostanki v procesu predelave in razpuščanja razpadejo na vlakna. Standardni procesi temeljijo na kemijski, mehanski in kombinirani obdelavi substrata (Singh in Singh, 2014). Razpuščanje s pomočjo gliv (angl. biopulping) je alternativa tradicionalnim metodam razpuščanja, ki temelji na lastnosti nekaterih vrst gliv bele trohnobe, da razgrajujo skoraj izključno lignin. Proses razpuščanja s pomočjo gliv zmanjša porabo kemikalij, energije in tako zmanjšuje onesnaževanje okolja (Singh in sod., 2010). Glive bele trohnobe lahko selektivno odstranjujejo lignin ali spreminjajo njegovo strukturo in omogočijo pridobivanje celuloznih vlaken (Breen in Singleton, 1999). Alternativa predobdelavi lignoceluloznih materialov z glivami, je biomehansko razpuščanje pri katerem se uporablajo encimi, na primer MnP, lakaza, pektinaza in celulaze (Maijala in sod., 2008).

#### **2.4.2 Odstranjevanje ekstraktivnih snovi**

Ekstraktivne snovi so nestrukturne komponente lesa, ki jih je mogoče iz lesa ekstrahirati z organskimi topili. Med ekstraktivne snovi vključujemo polarne spojine, kot so fenoli in tanini, nepolarne snovi, kot so maščobe in steroli ter vodotopne snovi: sladkorje in škrob, proteine in pepel (Martinez in sod., 2005).

V papirni industriji ekstraktivne snovi povzročajo procesne in okoljske težave. Lipofilne spojine, ki tvorijo t.i. lesno smolo, so najbolj problematične in vključujejo proste maščobne kisline, smolne kisline, maščobne alkohole, voske, sterole, sterol estre, gliceride, ketone in druge (Gutiérrez in sod., 2001; Singh in Singh, 2014).

Koloidni delci smole povzročajo vrsto tehnoloških nevšečnosti, kot so mašenje procesnih naprav, zmanjševanje kvalitete lesne gošče, tvorbo madežev in nepravilnosti na papirju. Koloidni delci ostanejo v procesnih vodah, ki se v procesu kroženja in ponovne uporabe procesne vode koncentrirajo, nekatere ekstraktivne snovi, ki se stekajo v odpadne vode pa so toksične za vodne ekosisteme (Gutiérrez in sod., 2001; Singh in Singh, 2014).

Za obdelavo lesa so še posebej primerne glive bele trohnobe ki selektivno razgrajujo lignin in odstranjujejo tudi lipofilne komponente smol (Singh in Singh, 2014). Mikrobnii in encimski pripravki za kontrolu smolnih depozitov, ki vsebujejo triglyceride, so že

komercialno dostopni, v razvoju pa so še drugi produkti, ki bi bili uporabni v procesih razpuščanja (Gutiérrez in sod., 2001).

#### **2.4.3 Delignifikacija in beljenje lesne gošče**

Odstranjevanje lignina iz lesne gošče imenujemo beljenje in je potrebno za doseganje estetskega izgleda papirja in za izboljšanje njegovih lastnosti. Trenutno se v obratih papirne industrije večinoma uporablja postopek beljenja pri katerem se namesto elementarnega klorja uporablja klorov dioksid ( $\text{ClO}_2$ ) (Bajpai, 2012). Pri tem postopku nastajajo klorirane organske spojine, ki so v okolju težko razgradijo in se bioakumulirajo, ter povzročajo genetske in reproduktivne motnje pri živalih in ljudeh (Sharma in sod., 2014). Ker lahko glive bele trohnobe selektivno razgrajujejo lignin so uporabne za beljenje lesne gošče. V encimsko kataliziranem beljenju se uporabljata dva pristopa: s hemicelulolitičnimi encimi in z lignolitičnimi encimi (Bajpai, 2012). Pilotna študija, ki so jo opravili Sharma in sod. (2014) je pokazala, da uporaba ksilanaz in lakaz za beljenje lesne gošče zmanjša koncentracijo organskih halogenov v odpadnih vodah. Uporaba gliv je učinkovita, vendar je postopek počasen, zato raziskave stremijo k uporabi izoliranih glivnih encimov, kot so MnP, LiP in lakaza (Maciel in Ribeiro, 2010).

#### **2.4.4 Proizvodnja sekundarnih vlaken**

Recikliran papir je pomembna surovina za pridobivanje celuloznih vlaken. Proses recikliranja vlaken in odstranjevanja onesnažil vključuje razpuščanje, prebiranje, zgoščevanje in flotacijo. Flotacijske celice so manj učinkovite pri odstranjevanju fleksografskih barvil - črnih sestavljenih iz hidrofilnih pigmentov majhne mase, ki prehajajo v odpadno vodo in jo tako onesnažijo (Fillat in sod., 2015). V raziskavi so Fillat in sod. (2015) ocenili uporabo glivnih lakaz in mediatorjev za razgradnjo treh fleksografskih barvil. Ugotovili so, da lahko dve izmed testiranih barvil (Blue 1 in Magenta HX-E) učinkovito odstranjujemo s pomočjo glivnih lakaz, učinkovitost razbarvanja pa je manjša v prisotnosti kalcijevega karbonata v gošči. Lee in sod. (2013), pa so pokazali, da so komercialne mešanice celulaz in hemicelulaz učinkovite pri odstranjevanju tiskarske barve odpadnega papirja.

#### 2.4.5 Obdelava odpadnih vod

V proizvodnji papirja nastanejo velike količine odpadnih vod (do 60 m<sup>3</sup> na tono papirja) (Thompson in sod., 2001). Poraba vode se je v preteklih desetletjih bistveno zmanjšala z recikliranjem vode in zaprtimi krogotoki znotraj obratov papirne industrije, vendar se je s tem povečala koncentracija onesnažil v odpadni vodi. Značilno je, da ima taka odpadna voda visoko potrebo po kisiku (COD) in rjavo obarvanost zaradi lignina in huminskih kislin. Odvisno od postopkov beljenja pa vsebuje še toksine kot so furani, dioksini in organske spojine, ki vsebujejo klor. Primarno čiščenje odpadne vode iz papirne industrije vključuje odstranjevanje suspendiranih trdnih delcev, biokemijsko potrebo po kisiku (BOD) pa se običajno zmanjša s sekundarnim čiščenjem v aerobnih čistilnih napravah z aktivnim blatom. Za delovanje aktivnega blata je potrebno dodajanje hranil z dušikom in fosforjem, ki povzročajo eutrofifikacijo voda, v katere se očiščene odpadne vode iztekajo (Blank in sod., 2016).

Obarvanost odpadne vode lahko učinkovito zmanjšamo z obdelavo z glivami, koagulacijo, kemijsko oksidacijo in ozonacijo, koncentracijo kloriranih fenolnih spojin in organskih halidov pa učinkovito zmanjšamo z adsorbcijo, ozonacijo in membransko filtracijo (Pokhrel in Viraraghavan, 2004). Znano je, da so tudi glice bele trohnobe sposobne detoksifikacije kloriranih fenolov, pri čemer imajo velik pomen lakaze (Leontievsky in sod., 2000; Rodriguez Couto in Toca Herrera, 2006).

Van Driessel in Christov (2001) navajata zmanjšanje strupenosti in 43-73 % razbarvanje odpadnih vod po izpostavitvi *T. versicolor* v rotirajočem bioreaktorju (angl. rotating biological contactor) z zadrževalnim časom 23 h. Mehna in sod. (1995) pa so dosegli do 92 % zmanjšano obavanost različnih odpadnih papirniških vod po njihovi izpostavitvi *T. versicolor* v obliki peletov, kar omogoča recikliranje biomase. Manzanares in sod. (1995) so prav tako uporabili *T. versicolor* za razbravanje odpadnih vod in dosegli do več kot 70 % razbarvanje, pri čemer so zaznali bistveno višje lakazne aktivnosti kot ob rasti te glice v sintetičnem rastnem mediju. Freitas in sod. (2009) so raziskovali potencial za zmanjšanje obarvanosti in COD odpadne vode iz obratov za beljenje gošče s *Pleurotus*

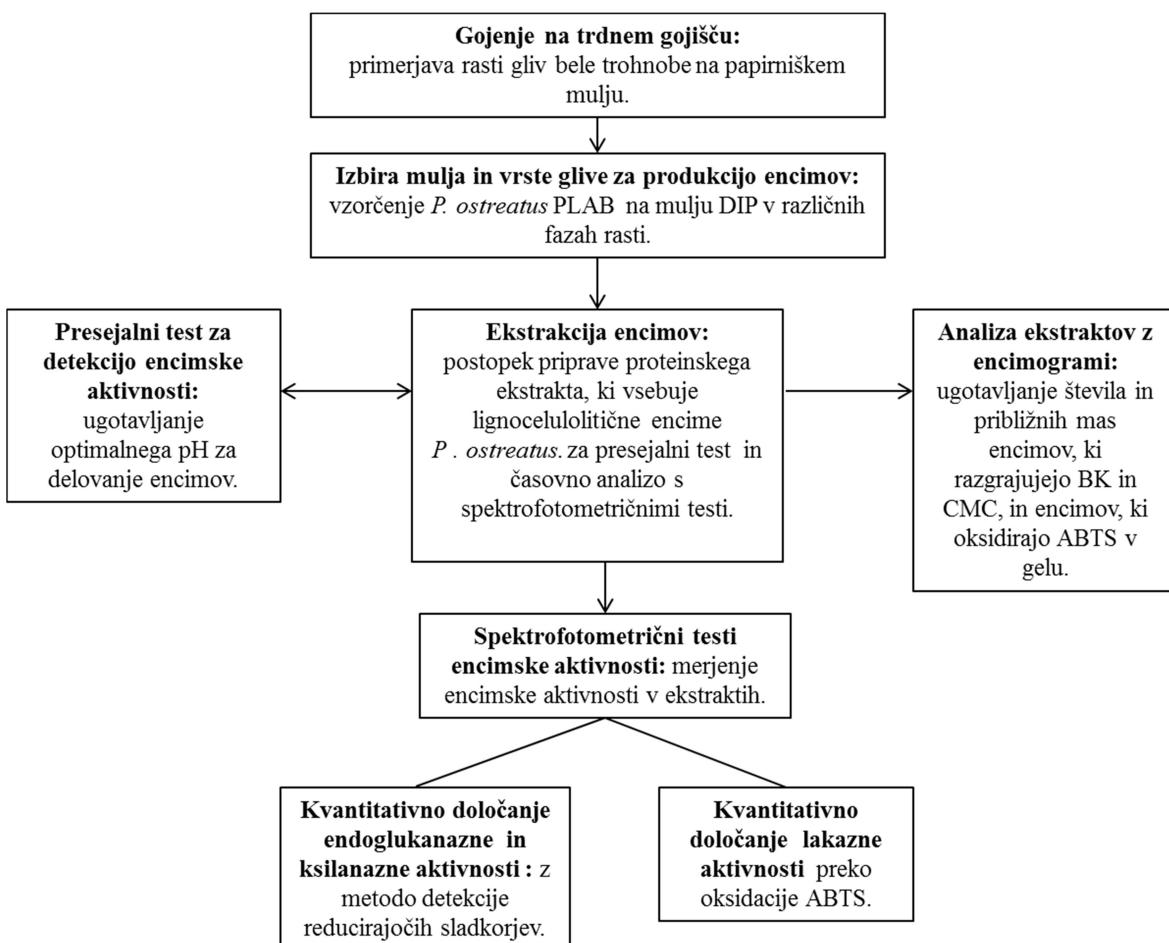
*sajor caju* in *Rhizopus oryzae*. Po desetih dneh so zabeležili zmanjšanje relativne absorbance za 25-46 % pri 250 nm in 72-74 % pri 465 nm in 74-81 % zmanjšanje COD.

Za razgradnjo nekaterih onesnažil je učinkovita kombinacija obdelave z glivami in drugih fiziokemijskih metod (Kamali in Khodaparast, 2015). Gonzalez in sod. (2010) so testirali razgradnjo klorofenolov s *Trametes pubescens* v kombinaciji s kemijskim procesi oksidacije, pri čemer so dosegli popolno razgradnjo vseh testiranih klorofenolov.

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 NAČRT EKSPERIMENTALNEGA DELA

Ključni koraki eksperimentalnega dela so prikazani na sliki 7. V prvi fazi smo primerjali rast izbranih gliv bele trohnobe na trdnem gojišču. Izbrali smo glivo z najhitrejšo rastjo na papirniškem mulju. Iz preraščenega mulja smo nato ekstrahirali encime in s presejalnim testom na agaroznih ploščah ugotavljali optimalno pH območje za delovanje lignocelulolitičnih encimov v ekstraktu. V optimalnem območju smo nato encimske aktivnosti v ekstrakcih merili s spektrofotometričnimi testi ter ekstrakte analizirali z metodo encimogramov.



Slika 7: Shema eksperimentalnega dela.

Glavni koraki vključujejo: gojenje na trdnem gojišču, izbiro mulja (DIP – mulj, ki nastane v procesu razsivitve odpadnega papirja) in glive za optimalno produkcijo encimov, ekstrakcijo encimov iz preraščenih muljev, presejalne in spektrofotometrične teste za dokazovanje encimske aktivnosti in analizo encimskih ekstraktov z encimogrami.

### 3.2 KEMIKALIJE

ABTS, 2,2'-azino-bis(3-etylbenzotiazolin-6-sulfonat) diamonijeva sol (Calbiochem, 194430)

Agaroza (Sigma, A-9414)

40% akrilamid/bis-akrilamid (37.5:1) (Merck, 1.00638)

Aluminijev sulfat-18- hidrat (Riedel-de Haen Ag Seelze-Hannover, 11044)

APS, amonijev persulfat (Gibco, 15523-012)

Bakrov sulfat 5-hidrat CuSO<sub>4</sub> x 5H<sub>2</sub>O (Merck, 1.02790)

Bromfenol modro (Serva, 15375)

BSA, goveji serumski albumin (Sigma, A4503)

n-butanol (Merck, 1.01990)

L-cistein hidroklorid monohidrat (Merck, 1.02839)

Citronska kislina (Merck, 1.00244)

Coomassie briljantno modro G (Sigma B-1131)

CMC, karboksimetil celuloza (Sigma, C-5678)

EDTA, etilandiamin-tetraacetat (Merck, 1.08418)

Etanol (Merck, 1.0983)

Folin-Ciocalteu fenolni reagent (Sigma, F-9252)

Formaldehid (Merck, 1.04000)

Glicin (Sigma, G-8898)

Glicerol (Merck, 1.04092)

D-glukoza (Kemika, 07050 07)

Kalcijev klorid (Merck, 1.02391)

Klorovodikova kislina (Merck, 1.00317)

Kongo rdeče (Sigma, C-6767)

Bukov ksilan (Sigma, X-4252)

Ksiloza (Sigma, X-1500)

2-merkaptoetanol (Sigma, M-7154)

Metanol (Merck, 1.06009)

Natrijev acetat (Sigma, 71180)

Natrijev citrat (Kemika, 1405407)

Natrijev hidroksid (Merck, 1.06498)  
Natrijev klorid (Merck, 1.06404)  
Natrijev karbonat (Merck, 1.06392)  
Dinatrijev hidrogenfosfat (Merck, 1.06580)  
Natrijev dihidrogenfosfat (Merck, 1.06346)  
Natrijev sulfit (Merck, 1.06657)  
Kalij natrijev tartrat (Merck, 1.08087)  
Ocetna kislina (Merck, 1-00063)  
85% ortofosforna kislina (Merck, 1.00573)  
PAHBAH, hidrazid p-hidroksi benzojeve kisline (Sigma, H-9882)  
Izo-propanol (Merck, 1.09634)  
Lestvica za SDS PAGE PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, 26619)  
NaDS, natrijev dodecil sulfat (Merck, 8.17034)  
TEMED, N'N'N'N'-tetrametiletilendiamin (Sigma, T-9281)  
Tris(hidroksimetil) aminometan (Merck, 1.08382)  
Trikloroocetna kislina (Merck, 1.00807)

### 3.3 PRIPRAVA SUBSTRATA ZA GOJENJE GLIV

Kot substrat za gojenje gliv smo uporabili odpadne mulje iz različnih papirnic. Iz papirnice Vipap d.o.o smo pridobili papirniški mulj, ki nastane v postopku razsivitve odpadnega papirja (DIP), mulj iz kemo-mehanske čistilne naprave (KMČN) in 2 različna mulja iz papirnice Vevče, čist papirniški mulj (VEV) in mešani papirniški mulj (VEV MIX), ki vsebuje delež biološkega mulja. Ker je znano, da lahko glive bele trohnobe dobro preraščajo pivske tropine (Gregori in sod., 2008), smo jih v eksperiment vključili za primerjavo.

Mulji so se razlikovali po barvi, konsistenci in vsebnosti vlage. Vhodni material v papirnici Vevče je čista celuloza, v papirnici Vipap pa odpadni papir in les. Mulji iz papirnice Vevče so mokremu gipsu podobne konsistence pretežno bele barve, kar kaže na visoko vsebnost kalcijevega karbonata. Mulji iz papirnice Vipap pa so bolj vlknasti in temne barve.

Primernost muljev za rast gliv bele trohnobe smo testirali v pilotnem presejalnem poskusu (poskus 1). Producijo encimov v različnih fazah rasti micelija smo testirali s poskusom časovne analize produkcije encimov (poskus 2). V poskusu 1 smo primerjali substrate DIP, KMČN, VEV, VEV MIX, mešanico VEV in pivskih tropin za rast treh vrst gliv bele trohnobe. Z vsako vrsto glive smo inokulirali po 8 gojišč z muljem DIP, KMČN in VEV MIX, po 2 gojišči z mešanico VEV in tropine in po eno gojišče z muljem VEV in s pivskimi tropinami. V poskusu 2 smo nato gojili *P. ostreatus* na mulju DIP, ki je vključeval 24 gojišč.

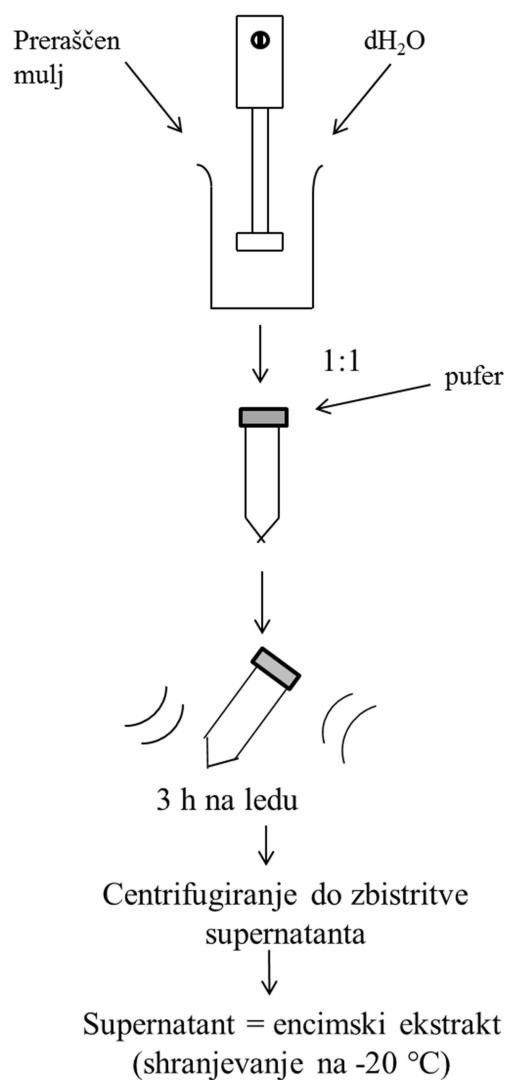
Za gojenje gliv bele trohnobe smo izbrali gojenje na trdnem gojišču, ki je na laboratorijskem nivoju ekonomsko ugodnejše. Izmerili smo odstotek suhe snovi v muljih in muljem s koncentracijo vode pod 65 % (w/w) uravnali vlažnost na 65 % (w/w). Nato smo jih presejali skozi 0,9 mm mrežo, po 200 g alikvotirali v kozarce, in pokrili s pokrovom s filtrom ter avtoklavirali 30 min pri 122 °C.

### 3.4 INOKULACIJA

Preraščene micelije gliv bele trohnobe (*P. ostreatus* PLAB, *T. versicolor* TVER in *G. lucidum* GAL5 iz zbirke podjetja Mycomedica d.o.o.) smo najprej nacepili v petrijeve plošče z gojišči krompirjev dekstrozní agar (PDA). Micelije smo suspendirali v 300 ml destilirane vode in suspenzijo dobro premešali. Avtoklavirana in ohlajena gojišča z muljem smo nato inokulirali s po 5 ml suspenzije micelija. Kot negativne kontrole smo pripravili neinokulirana gojišča. Inokulirana in neinokulirana gojišča smo inkubirali pri 23 °C in spremljali rast micelijev. V poskusu 1 smo kulture inkubirali do 50 dni in v poskusu 2 do 51 dni. Na podlagi predhodnega vedenja o hitrosti preraščanja papirniških muljev smo se za analizo encimske aktivnosti v odvisnosti od časa gojenja odločili za vzorčenje v 7-dnevnih intervalih po pojavu micelija v inokuliranih gojiščih.

### 3.5 PRIPRAVA GROBEGA ENCIMSKEGA EKSTRAKTA IN MERJENJE PH GROBIH ENCIMSKIH EKSTRAKTOV

Za analizo encimskih aktivnosti v odvisnosti od časa inkubacije smo izbrali mulj DIP preraščen s *P. ostreatus* PLAB. V vsaki časovni točki smo naključno izbrali 4 kulture in jih zamrznili. Postopek priprave grobega encimskega ekstrakta je prikazan na sliki 8. Preraščen mulj smo odmrznili in 1,5 min homogenizirali z mehanskim homogenizatorjem Ultra-turrax (Ika) ob dodatku 100 ml destilirane vode na 200 g mulja. Alikvot svežega homogenizata smo prenesli v 50 ml epruveto Falkon in mu dodali ekstrakcijski pufer v razmerju 1:1 (volumen pufra: masa vzorca). Uporabljene pufre prikazuje preglednica 4. Za ugotavljanje pH optimuma delovanja lignocelulolitičnih encimov s presejalnim testom smo uporabili 0,1 M in 0,5 M ekstrakcijske pufre s pH 4,5 do pH 7. Ekstrakcijo smo vedno izvedli na ledu. Inkubirali smo 3 ure z vmesnim mešanjem na orbitalnem stresalniku (Vibromix 204 EV, Tehnica) (6-krat po 30 s), nato pa smo vzorce centrifugirali pri 3270 g 15 min (Allegra X-12R, Beckman Coulter). Supernatant smo prenesli v mikrocentrifugirke in ponovno centrifugirali pri 18400 g, 15 min, 4 °C (Mikro 200R, Hettich) oziroma do zbiralitve. Supernatant smo nato alikvotirali v 1,5 ml mikrocentrifugirke in shranili pri -20 °C. Slednje je predstavljalo grob encimski ekstrakt, ki smo ga uporabljali za nadaljnje teste. Encimskim ekstraktom smo izmerili pH z meritvom pH (pH 700, Eutech Instruments). Za encimske teste smo vsakič uporabili sveže odmrznen ekstrakt.



**Slika 8: Shema priprave grobih encimskih ekstraktov.**

Preraščen mulj smo homogenizirali z mehanskim homogenizatorjem. Homogenizatu smo dodali ekstrakcijski pufer v razmerju 1:1 (w/v), ekstrahirali 3 h na ledu z vmesnim stresanjem in centrifugirali do zbistritve supernatanta. Bister supernatant je predstavljal grob encimski ekstrakt, ki smo ga shranili pri -20 °C.

**Preglednica 4: Izbrani ekstrakcijski pufri za določanje encimske aktivnosti.**

Za dokazovanje endoglukanazne aktivnosti smo uporabili 0,5 M acetatni pufer pH 5, za dokazovanje ksilanazne 0,5 M citratni pufer pH 6 in za dokazovanje lakazne aktivnosti 0,5 M acetatni pufer pH 4.

Določanje encimske aktivnosti:	Endoglukanaze	Ksilanaze	Lakaze
pufer	acetatni	citratni	acetatni
pH	pH 5	pH 6	pH 4
molarna koncentracija pufra	0,5 M	0,5 M	0,5 M

### 3.6 PRESEJALNI TEST ZA DOKAZOVANJE ENCIMSKE AKTIVNOSTI

S presejalnim testom za dokazovanje encimskih aktivnosti na agaroznih ploščah smo ugotavljali, ali so v ekstraktih prisotni encimi sposobni razgradnje karboksimetil celuloze (CMC) in bukovega ksilana (BK) ter kvalitativno ocenili pri katerih vrednostih pH so ti najbolj aktivni (postopek prilagojen po Marinšek Logar, 1999).

Pripravili smo agarozne plošče z 0,2 % (w/v) CMC ali 0,4 % (w/v) BK in 0,6 % (w/v) agaroze. Vanje smo napravili luknjice s Pasteurjevo pipeto v katere smo napipetirali vzorce. Po inkubaciji (30 °C, 2 h) smo plošče sprali z 1M NaCl, prelili z barvilo Kongo rdeče za 15 min in sprali z 1M in 0,5M NaCl. Barvilo Kongo rdeče se veže na intaktne polisaharide, ki vsebujejo  $\beta(1 \rightarrow 4)$  in  $\beta(1 \rightarrow 3)$  ali mešane  $\beta(1 \rightarrow 4)$  in  $\beta(1 \rightarrow 3)$  glikozidne vezi, zato so cone razgradnje substrata po spiranju barvila vidne kot neobarvani krogi.

### 3.7 UGOTAVLJANJE OPTIMALNEGA PH OBMOČJA ENCIMSKE MEŠANICE V EKSTRAKTIH S PRESEJALNIM TESTOM

S presejalnim testom za zaznavanje encimskih aktivnosti smo ugotavljali, v katerem območju pH najbolje delujejo encimi v ekstraktih sposobni razgradnje CMC in BK v agaroznih ploščah. Pripravili smo agarozne plošče z naslednjimi vrednostmi pH: pH 4,5 in pH 5,5 (acetatni pufer), pH 6 (citratni pufer), pH 6,5 in pH 7 (fosfatni pufer). Na agarozne plošče smo nanesli po 10 µl (ugotavljanje ksilanazne aktivnosti) ali po 5 µl encimskega ekstrakta (ugotavljanje celulazne aktivnosti) (v 0,1 M ali 0,5 M ekstrakcijskih pufrih z vrednostmi pH od 4,5 do pH 7). Negativne kontrole smo pripravili s segrevanjem encimskih ekstraktov v termobloku pri 100 °C 15 min.

### 3.7.1 Priprava topnega ksilana

Raztopino BK smo pripravili po prilagojenem protokolu opisanem v (Copa-Patiño in sod., 1993). Raztopino topnega BK smo uporabljali pri presejalnem testiranju encimske aktivnosti, merjenju encimskih aktivnosti preko dokazovanja reducirajočih sladkorjev in SDS PAGE. Pripravili smo 2 % (w/v) suspenzijo BK v izbranem pufru ali destilirani vodi in jo centrifugirali pri 12000 g 10 min (Mikro 200R, Hettich). Pelet smo zavrgli, supernatant pa je predstavljal raztopino topne frakcije ksilana, ki smo jo uporabili za nadaljnje eksperimente.

## 3.8 MERJENJE KONCENTRACIJE PROTEINOV V EKSTRAKTIH

Koncentracije proteinov v vzorcih smo določili z metodo po Lowry-ju (Lowry in sod., 1951). Umeritveno krivuljo smo pripravili z raztopinami govejega serumskega albumina (BSA) v koncentracijah 0 mg/ml, 0,08 mg/ml, 0,16 mg/ml, 0,24 mg/ml, 0,32 mg/ml in 0,4 mg/ml. Vzorcem za standarde in ustrezno redčenim encimskim ekstraktom smo dodali 1M NaOH v razmerju 1:1 ter premešali na orbitalnem stresalniku.

Tako pripravljene vzorce z encimskim ekstraktom smo zaprli in kuhalili 5 min na 100 °C v vodni kopeli in ohladili. Reagente po Lowry-ju smo pripravili, kot je opisano v preglednici 5 in jih zmešali v razmerju Lowry A : Lowry B = 50:1. K 300 µl standarda ali ohlajenega vzorca smo dodali 625 µl mešanice reagentov po Lowry-ju. Tukaj pred uporabo smo zmešali reagent Folin Ciocalteu z destilirano vodo v razmerju 1:1 in dodali po 125 µl k vzorcem in standardom ter hkrati mešali na orbitalnem stresalniku. Razvoj barve poteka 30 min in je stabilna 1 uro. Absorbanco smo izmerili pri 700 nm na spektrofotometru (Shimadzu, UV-160A).

**Preglednica 5:** Sestava reagentov po Lowry-ju.

Reagent po Lowry-ju	Sestava
Lowry A	5 % Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
Lowry B	% NaK-tartrat, 0,5 % CuSO <sub>4</sub> x5H <sub>2</sub> O pH7

### 3.2 SPEKTROFOTOMETRIČNO MERJENJE ENCIMSKIH AKTIVNOSTI V EKSTRAKTIH

#### 3.9.1 Metoda merjenja celulazne in ksilanazne aktivnosti preko sproščenih reducirajočih sladkorjev

Ksilanazno in endoglukanazno aktivnost v ekstraktih smo kvantitativno merili z metodo dokazovanja sproščenih reducirajočih sladkorjev (Lever, 1977). Analizo smo izvedli v treh ponovitvah. Reagent hidrazid p-hidroksi benzojeve kisline (PAHBAH) smo pripravili tik pred uporabo. Za 100 ml reagenta, smo k destilirani vodi po vrsti dodali po 5 ml raztopin: 1 M  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , 0,5 M natrijev citrat, 5 M NaOH in po kapljicah še 0,2 M  $\text{CaCl}_2$ . Na koncu smo dodali 1 g PAHBAH in dopolnili z destilirano vodo do 100 ml.

Uporabili smo naslednja substrata: 1 % (w/v) raztopino CMC v 0,5 M acetatnem pufru pH 5 za določanje endoglukanazne aktivnosti in raztopino topnega BK v 0,5 M citratnem pufru pH 6, za določanje ksilanazne aktivnosti. Po 20  $\mu\text{l}$  encimskega ekstrakta smo dodali k 230  $\mu\text{l}$  raztopine CMC ali BK in tako pripravljene vzorce inkubirali 150 min pri 30 °C. Ob koncu inkubacije smo encimsko aktivnost ustavili z dodatkom 30  $\mu\text{l}$  15 % TCA. Nato smo premešali na orbitalnem stresalniku in po 100  $\mu\text{l}$  vzorca dodali k 5 ml reagenta v epruvetah. Epruvete z vzorci smo pretresli in kuhalni v vodni kopeli 10 min pri 100 °C. Količino sproščenih reducirajočih sladkorjev smo merili pri 420 nm na spektrofotometru (Shimadzu, UV-160A).

Ob vsakem vzorcu smo po istem postopku pripravili kontrolni vzorec, v katerega smo encimski ekstrakt dodali ob koncu inkubacije (tik pred dodatkom k reagentu PAHBAH).

Za test ksilanazne aktivnosti smo umeritveno krivuljo pripravili z raztopinami ksiloze (0 mM, 1 mM, 2 mM, 4 mM in 6 mM), za test endoglukanazne aktivnosti pa z raztopinami glukoze (0 mM, 1 mM, 2 mM, 4 mM in 6 mM).

Od množine reducirajočih sladkorjev (RS) v vzorcih smo odšteli množino RS v pripadajočih kontrolnih vzorcih in tako dobili razliko v množini sproščenih reducirajočih sladkorjev ( $\Delta\text{RS}$ ), ki predstavljajo RS, ki so se sprostili kot posledica delovanja encimov

med časom inkubacije. Encimsko aktivnost smo izračunali iz povprečne spremembe množine reducirajočih sladkorjev ( $\Delta RS$ ), količnika volumna reakcijske mešanice (V) in volumna encimskega ekstrakta (v), časa inkubacije (t) in faktorja redčenja (f) po formuli:

$$EA = \Delta RS * (V/v) * (1/t) * f \quad \dots(1)$$

pri izračunu smo upoštevali faktor redčenja pri homogenizaciji, ki je znašal 1,5. Encimsko aktivnost smo izrazili v  $\mu\text{mol}$  sproščenih reducirajočih sladkorjev na minuto na 1g preraščenega mulja ( $\mu\text{mol RS/min g}$ ).

### 3.9.2 Merjenje lakazne aktivnosti preko oksidacije ABTS

Postopek za določanje lakazne encimske aktivnosti z 2,2'-azino-bis(3-etylbenzotiazolin-6-sulfonsko kislino (ABTS) smo povzeli po Childs in Bardsley (1975). Za pripravo raztopine smo uporabili 2,2'-azino-bis(3-etylbenzotiazolin-6-sulfonat) diamonijevo sol (ABTS reagent). Raztopino ABTS smo vedno pripravili svežo in jo do uporabe shranjevali na ledu. Reakcijska mešanica je vsebovala 100  $\mu\text{l}$  5 mM ABTS, 890  $\mu\text{l}$  0,1 M acetatnega pufra pH 4 in 10  $\mu\text{l}$  ustrezno redčenega encimskega ekstrakta. Na 30 °C segretemu vzorcu (encimski ekstrakt v pufru) smo dodali ohlajen ABTS in merili absorbanci pri 420 nm na spektrofotometru (Shimadzu, UV-160A). Lakazno aktivnost (LA) smo izračunali po enačbi (Vidic, 2008):

$$LA/g = (\Delta A/\text{min}) * (1/\epsilon) * (V/v') * d * f \quad \dots(2)$$

kjer je  $\Delta A/\text{min}$  povprečna spremembra absorbance na časovno enoto in  $\epsilon$  molarni absorbcijski koeficient za kationski radikal ABTS $\cdot+$  pri 420 nm, ki znaša  $36,0 \text{ cm}^2/\mu\text{M}$ . Volumen reakcijske mešanice V je v našem primeru 1 ml, volumen ekstrakta v' pa 0,005 ml (1:1 redčen ekstrakt), pot svetlobnega žarka skozi kiveto (d) je 1, faktor redčenja pri pripravi homogenizata f pa znaša 1,5. Negativne kontrole smo pripravili s segrevanjem encimskega ekstrakta pri 100 °C 20 min.

Vzorce za merjenje lakazne aktivnosti smo pripravili kot je opisano v preglednici 4. Za optimizacijo količine potrebnega encimskega ekstrakta smo izbrali encimski ekstrakt

preraščenega mulja DIP. Poskus smo pripravili v dveh paralelkah. Negativne kontrole smo pripravili v termobloku s segrevanjem pri 100 °C 20 min.

### 3.3 ANALIZA ENCIMSKIH EKSTRAKTOV Z ENCIMOGRAMI

#### 3.10.1 Priprava vzorcev

Vzorce za analizo z encimogrami smo pripravili po predhodno opisanem postopku grobe encimske ekstrakcije (slika 8) z ustreznimi pufri. Za dokazovanje encimov z ksilanazno aktivnostjo v gelu smo uporabili encimski ekstrakt v citratnemu pufru pH 6, za dokazovanje celulazne ekstrakt v acetatnem pufru pH 5 in za dokazovanje lakazne ekstrakt v acetatnem pH 4, kot je opisano v preglednici 4. Encimski ekstrakt smo zmešali z nanašalnim pufrom v razmerju 1:1 in vzorce denaturirali v termobloku pri 85 °C 6 min. Vzorcev za določanje lakazne aktivnosti nismo denaturirali. Nanašalni pufer smo pripravili kot je opisano v preglednici 6.

**Preglednica 6: Sestava nanašalnega pufra.**

Sestavina nanašalnega pufra	Volumen (ml)
dH <sub>2</sub> O	8
0,5 M Tris HCl pH 6,8	2
100 % glicerol	1,6
10 % SDS	3,2
2-merkaptoetanol*	0,8
0,25 % bromofenol modro	0,4

\*sestavino dodamo v digestoriju

#### 3.10.2 Priprava raztopin in gelov za SDS PAGE

Elektroforetski pufer smo pripravili iz sestavin navedenih v preglednici 7. Sestavine smo raztoplili v 5000 ml destilirane vode.

Sestavine za pripravo ločevalnega in nanašalnega gela smo dodajali po sosledju, navedenem v preglednici 8. Pripravili smo gele velikosti 16 x 16 cm in debeline 1 mm. Polimerizacijo smo sprožili z dodatkom katalizatorjev polimerizacije: 10 % APS in

TEMED. Kisik inhibira polimerizacijo, zato smo pred dodatkom katalizatorjev polimerizacije mešanico odzračili z vakuumsko črpalko 15 min s previdnim mešanjem. Po dodatku katalizatorjev polimerizacije smo jo še enkrat previdno premešali in takoj vlili v kalup. Gel smo prekrili z 1 ml n-butanola nasičenega z vodo. Polimerizacija je trajala vsaj 1 h.

Nato smo pripravili nanašalni gel. Po končani polimerizaciji ločevalnega gela smo odlili n-butanol, večkrat sprali z dH<sub>2</sub>O, odlili in s filter papirjem odstranili preostalo vodo. V odzračeno mešanico smo dodali katalizatorja polimerizacije, previdno pomešali in takoj vlili do vrha kalupa in vstavili glavnik. Po potrebi smo dodali mešanico in odstranili mehurčke. Polimerizacija je trajala 1-2 uri.

**Preglednica 7:** Sestava elektroforetskega pufra za SDS PAGE.

Sestavina	Masa (g)
Tris	15
Glicin	72
SDS	5

**Preglednica 8:** Sestava ločevalnega in nanašalnega gela.

Sestavina	10 % ločevalni gel	4 % nanašalni gel
dH <sub>2</sub> O	24,2 ml	18,2 ml
Substrat za dokazovanje	1 % (w/v) raztopina CMC, topna frakcija 2 % (w/v) bukovega ksilana	/
Pufer	15 ml 1,5 M Tris HCl pH 8,8	7,5 ml 0,5 M Tris HCl pH 6,8
10 % SDS	0,6 ml	0,3 ml
30 % akrilamid/bisakrilamid	20 ml	3,9 ml
10 % APS	0,15 ml	0,09 ml
TEMED	0,03 ml	0,03 ml

### 3.10.3 Gelska elektroforeza

Pripravljeni vzorce smo analizirali s poliakrilamidno gelsko elektroforezo z natrijevim dodecil sulfatom (SDS PAGE) v sistemu (BioRad PROTEAN II xi Cell). Za primerjavo

molekulskih mas smo uporabili PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) z masnimi standardi 250, 130, 100, 70, 55, 35, 25, 15 in 10 kDa. Elektroforeza je potekala pri 40 mA 1-2 h, dokler se vzorec ni skoncentriral na meji med nanašalnim in ločevalnim gelom, preko ločevalnega gela pa pri naraščajoči napetosti do 200 V dokler fronta ni dosegla konca gela (7-8 h). Elektroforeza je potekala pri 15 °C. Razlike med postopki dokazovanja celulazne, ksilanazne in lakazne aktivnosti v gelu smo povzeli v preglednici 9. V primeru, da z navedenim postopkom renaturacije encimov z analizirano aktivnostjo nismo uspeli renaturirati smo elektroforezo ponovili z nativnimi vzorci (encimi z lakazno aktivnostjo). Del gela s standardi smo po končani elektroforezi odrezali in pobarvali s koloidnim barvilm Coomassie brilliant blue. Del gela z ločenimi vzorci smo renaturirali in pobarvali s Kongo rdečim oz. dokazali encimsko aktivnost z ABTS.

**Preglednica 9: Razlike med postopki dokazovanja encimov s celulazno, ksilanazno in lakazno aktivnostjo v gelih.**

Encimska aktivnost:	Endoglukanazna	Ksilanazna	Lakazna
Substrat za dokazovanje aktivnosti v ločevalnem gelu:	1 % CMC (raztopljena v dH <sub>2</sub> O na mešalu s segrevanjem)	Topna frakcija bukovega ksilana (2 %), suspenzija centrifugirana pri 12000 g 10 min	Brez substrata v gelu
Vzorci:	Denaturirani s 6 min segrevanjem pri 85 °C	Denaturirani s 6 min segrevanjem pri 85 °C	Nativni
Dokazovanje encimske aktivnosti v gelu:	Renaturacija, barvanje s Kongo rdečim	Renaturacija, barvanje s Kongo rdečim	Oksidacija ABTS
Renaturacijski pufer:	0,05 M acetatni pufer pH 5	0,05 M fosfatni pufer pH 6,5	0,1 M acetatni pufer pH 4

### 3.10.4 Barvanje proteinov s koloidnim Coomassie

Barvali smo po postopku Dyballa in Metzger (2009). Raztopino za barvanje smo pripravili v sosledju navedenem v preglednici 10. Po dodatku vsake sestavine smo počakali, da se popolnoma raztopi/suspendira v dH<sub>2</sub>O. Lestvico smo odrezali, trikrat po 10 min spirali z dH<sub>2</sub>O in položili v plastično kadičko z raztopino za barvanje. Barvali smo preko noči s stalnim mešanjem. Po končanem barvanju smo gele sprali z dH<sub>2</sub>O in fotografirali.

**Preglednica 10: Sestava raztopine za barvanje s Coomassie modrim.**

Sestavina	Količina za 1000 ml	Končna koncentracija
Barvilo CBB G-250	0,2 g	0,02 % (w/v)
Aluminijev sulfat-18- hidrat	50 g	5 % (w/v)
96 % EtOH	100 ml	10 % (v/v)
85 % ortofosforna kislina	23,5 ml	3 % (v/v)

**3.10.5 Renaturacija gelov za dokazovanje endoglukanazne in ksilanazne aktivnosti**

Renaturacijske raztopine smo pripravili kot je navedeno v preglednici 11 in gele renaturirali po korakih opisanih v preglednici 12. Gele smo spirali v plastičnih kadičkah z iztokom. Renaturacijske raztopine smo nalivali v digestoriju. Gele smo inkubirali na steklenih ploščah, zavite v polivinilno folijo.

**Preglednica 11: Sestava renaturacijskih raztopin.**

Renaturacijska raztopina	Sestava
1	10 mM Tris HCl, 5 mM merkaptoetanol in 20 % (v/v) izo-propanol
2	50 mM Tris HCl pH 6,8, 5mM merkaptoetanol in 1mM EDTA
3	ustrezen renaturacijski pufer (preglednica 9)

**Preglednica 12: Postopek renaturacije.**

Korak renaturacije	Čas renaturacije	Temperatura renaturacije	Menjava raztopine
Spiranje z renaturacijsko raztopino 1	50 min	24 °C (pri sobni T)	Vsaj 1-krat
Spiranje z renaturacijsko raztopino 2	Preko noči	4 °C (v hladilniku)	/
Spiranje z renaturacijsko raztopino 3	60 min	4 °C (v hladilniku)	Vsaj 1-krat
Inkubacija	4 h	30 °C	/

### 3.10.6 Barvanje s Kongo rdečim – dokazovanje glikozid hidrolaznih aktivnosti v gelu

Kongo rdeče smo raztopili v raztopini NaOH kot je navedeno v preglednica 13. Barvali smo 60 min pri sobni temperaturi. Gel smo razbarvali z raztopino za razbarvanje Kongo rdečega (preglednica 14) preko noči, v hladilniku. V kadičko smo dodali staničevino, ki veže barvo. Po barvanju barvilo Kongo rdeče ostane vezano na intaktne polisaharide, pasovi razgrajenega substrata pa kažejo prisotnost hidrolitičnih encimov. Gel smo kontrastirali z 2 % (v/v) ocetno kislino in fotografirali.

Preglednica 13: Raztopina za barvanje s Kongo rdečim.

Sestavina	Masa za 1000 ml (g)
Kongo rdeče	1
NaOH	0,2

Preglednica 14: Raztopina za razbarvanje Kongo rdečega.

Sestavina	Masa za 1000 ml (g)
NaOH	0,2
NaCl	58,44

### 3.10.7 Dokazovanje lakazne aktivnosti v gelu

Pripravili smo svežo raztopino ABTS. Za barvanje 1 gela je zadostovalo 10 ml 10 mM ABTS v dH<sub>2</sub>O. Po končani elektroforezi smo gel 5 min spirali z dH<sub>2</sub>O in 5 min z 0,1 M acetatnim pufom pH 4. Lignolitični encimi so sposobni oksidacije ABTS v kationski radikal ABTS•+, ki je modrozelene barve. Pozitiven rezultat so modrozeleno obarvane lise, ki se pojavijo v nekaj trenutkih po aplikaciji raztopine ABTS. Gel smo takoj fotografirali.

### 3.11 LASTNOSTI LIGNOLITIČNIH, CELULOLITIČNIH IN HEMICELULOLITIČNIH ENCIMOV IZ PODATKOVNIH ZBIRK

V podatkovni zbirki NCBI Protein (NCBI, 2016) smo poiskali encime s predvideno celulazno, ksilanazno in lakazno aktivnostjo *P. ostreatus* (Pruitt in sod., 2005). Zaporedja smo obdelali z orodjem SignalP 4.1 (orodje, ki napove prisotnost in lokacijo signalnega peptida v AK zaporedju) in njihove MW preračunali z orodjem ProtParam (orodje za preračunavanje fizikalnih in kemijskih parametrov proteina). Domene, ki predvidoma sestavljajo encime smo določili z orodjem InterProScan (Zdobnov in Apweiler, 2001).

## 4 REZULTATI

### 4.1 PRIMERJAVA RASTI GLIV NA RAZLIČNIH PAPIRNIŠKIH MULJIH

Opazovali smo prisotnost micelija in preraščenost zunanje površine vzorcev mulja. Rast gliv na trdnem gojišču smo ocenili in razvrstili v naslednje kategorije: 0 – v nobenem vzorcu ni bilo vidne rasti micelija, 1 – v manj kot polovici vzorcev je bila vidna rast micelija, micelij je preraščal le dno ali le zgornjo površino kulture na mestu inokulacije, 2 – v več kot polovici vzorcev je bila vidna rast micelija, ki je preraščal več kot 50 % zunanje površine, 3 – v vsaj 80 % vzorcev je bila preraščena celotna zunana površina mulja.

V presejalnem poskusu gojenja na trdnem gojišču (poskus 1) smo testirali rast treh vrst gliv bele trohnobe (*P. ostreatus*, *T. versicolor* in *G. lucidum*) na različnih substratih: muljih DIP, KMČN, VEV MIX, VEV, mešanici mulja VEV in tropin in pivskih tropinah. Rezultate analize rasti prikazuje preglednica 15. Šibko rast micelija *P. ostreatus* in *T. versicolor* smo zaznali na muljih VEV, VEV MIX in KMČN, medtem ko *G. lucidum* ni razvila micelija na nobenem od teh substratov. Vse glive so bile sposobne rasti na kombinaciji mulja VEV in pivskih tropin, na čistih pivskih tropinah pa so vse glive razvile obsežen micelij. Vse tri vrste gliv so dobro preraščale mulj DIP, najbolje pa *P. ostreatus*, zato smo to kombinacijo glive in mulja izbrali za časovno analizo produkcije encimov (poskus 2).

**Preglednica 15: Ocena rasti gliv na papirniških muljih.**

V poskusu 1 smo analizirali rast gliv na muljih KMČN, DIP, VEV, VEV MIX, na mešanici VEV in pivskih tropin in na pivskih tropinah. Rast smo opazovali do 50. dneva gojenja. Interpretacija ocen rasti: 0 – v nobenem vzorcu ni vidne rasti micelija, 1 – v manj kot polovici vzorcev je bila vidna rast micelija, micelij je preraščal le dno ali le zgornjo površino kulture na mestu inokulacije, 2 – v več kot polovici vzorcev je bila vidna rast micelija, ki je preraščal več kot 50 % zunanje površine, 3- v vsaj 80 % vzorcev je bila preraščena celotna zunanja površina mulja. Okrajšave: mulj, ki nastane na kemijsko mehanski čistilni napravi (KMČN), mulj, ki nastane v tehnološkem postopku proizvodnje papirne gošče iz recikliranih vlaken po postopku razsivitve (DIP), čist papirniški mulj iz papirnice Vevče (VEV), mešani papirniški mulj iz papirnice Vevče (VEV MIX).

Mulj/gliva:	<i>P. ostreatus</i> PLAB	<i>T. versicolor</i> TVER	<i>G. lucidum</i> GAL5
KMČN	1	1	0
DIP	3	2	2
VEV MIX	1	1	0
VEV + TROPINE	2	1	1
VEV	1	1	0
TROPINE	2	2	2



**Slika 9: Rast micelija na muljih DIP in KMČN po 24 dneh gojenja.**

Reprezentativni vzorci od leve proti desni: zgoraj *T. versicolor*, *P. ostreatus* in *G. lucidum* na mulju, ki nastane v tehnološkem postopku proizvodnje papirne gošče iz recikliranih vlaken po postopku razsivitve (DIP) in spodaj *G. lucidum*, *P. ostreatus* in *T. versicolor* na mulju, ki nastane na kemijsko mehanski čistilni napravi (KMČN).

#### 4.2 OPTIMALNO PH OBMOČJE ENCIMOV V EKSTRAKTIH

Prisotnost in optimalno pH območje delovanja encimov sposobnih razgradnje CMC in BK smo testirali pod istimi pogoji, kot je navedeno v preglednicah 16 in 17. Testirali smo encimsko aktivnost v pH območju od pH 4,5 do pH 7. Poskus smo izvajali v dveh ponovitvah. Cone razgradnje smo ocenili po naslednjih kriterijih: ni razgradnje (-), cona razgradnje je enako velika ali manjša od difuzijskih con pufra (+), cona razgradnje je večja od difuzijskih con pufra (++) (priloga D). Privzeli smo, da v optimalnem pH območju delovanja encimi tvorijo večje cone razgradnje. Pri testiranju razgradnje CMC smo največkrat in največje cone razgradnje substrata zaznali pri ekstraktu v acetatnem pufru pH 5, na agaroznih ploščah pripravljenih z 0,5 M acetatnim pufrom pH 5, pri testiranju razgradnje BK pa pri encimskem ekstraktu v citratnem pufru pH 6, na agaroznih ploščah z acetatnim pufrom pH 5,5, citratnim pufrom pH 6 in fosfatnim pufrom pH 6. Pri pH nižjih in višjih od opazovanega optimalnega območja smo našteli manj in manjše cone razgradnje. Razgradnja CMC je bila najmanjša na agaroznih ploščah z nevtralnim pH razgradnja BK pa na agaroznih ploščah s pH 4,5 in na ploščah nevtalnim pH. Ocenili smo tudi, da so bile cone razgradnje večje, kjer smo za ekstrakcije uporabili pufre z večjo molarno koncentracijo (0,5 M).

**Preglednica 16:** Rezultati presejalnega testa ugotavljanja optimalnega pH območja celulaz v ekstraktih.

Vzorci pripravljeni z istim ekstrakcijskim pufom so razvrščeni po vrsticah (A4,5, A5, C5, C5,5, C6, P6, P7 in pripradajoče NK). Molarne koncentracije ekstrakcijskih pufrov s katerimi smo pripravili vzorce si sledijo zaporedoma v stolpcih (0,5M in 0,1M). Vzorci na enakih agaroznih ploščah so razvrščeni po stolpcih (različni pufri od pH 4,5 do pH 7). Negativni vzorci (-) so vzorci brez cone razgradnje, pozitivni vzorci (+) so vzorci pri katerih smo zaznali cono razgradnje, ki je bila manjša ali enako velika kot difuzijska cona pufra pri NK (priloga D), vzorce z večjo cono razgradnje od difuzijske cone pufra pa smo označili (++) . Kvalitativne teste smo ovrednotili tako, da smo sešeli vrednosti (+) v vsaki vrstici in stolpcu in jih izrazili kot vsoto ocen ( $\Sigma$ ). Označke pufrov: A- acetatni pufer, C-citratni pufer, P-fosfatni pufer, NK-pripradajoče negativne kontrole, c-molarna koncentracija ekstrakcijskega pufra.

Pufer in pH agarozne plošče:	A pH 4,5	A pH 5	A pH 5,5	C pH 6	P pH 6	P pH 6,5	P pH 7										
c (M): /	0,5	0,1	0,5	0,1	0,5	0,1	0,5	0,1	0,5	0,1	0,5	0,1	0,5	0,1	0,5	0,1	Σ
<b>Pufer in pH vzorcev in NK:</b>																	
<b>A pH 4,5</b>	++	+	++	++	++	++	++	+	++	+	+	+	+	+	+	+	20
<b>A pH 4,5 NK</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
<b>A pH 5</b>	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	21
<b>A pH 5 NK</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
<b>C pH 5</b>	++	+	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	18
<b>C pH 5 NK</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
<b>C pH 6</b>	+	+	++	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	12
<b>C pH 6 NK</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
<b>P pH 6</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	11
<b>P pH 6 NK</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
<b>P pH 7</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	10
<b>P pH 7 NK</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
<b>Σ</b>	9	7	10	9	9	8	7	7	4	6	4	4	3	5			

#### Preglednica 17: Rezultati presejalnega testa ugotavljanja optimalnega pH območja ksilanaz v ekstraktih.

Vzorci z enakim ekstracijskim pufrom so razvrščeni po vrsticah (encimski ekstrakti A4,5, A5, C5, C5,5, C6, P6, P7 in pripadajoče NK). Molarna koncentracija ekstracijskih pufrov s katerimi smo pripravili vzorce si sledi zaporedoma v stolpcih (0,5M in 0,1M). Vzorci na enakih agaroznih ploščah so razvrščeni po stolpcih (različni pufri od pH 4,5 do pH 7). Največkrat in največje cone razgradnje substrata smo zaznali pri encimskem ekstraktu s C pH 6 in na agaroznih ploščah z A pH 5,5, C pH 6 in P pH6. Negativni vzorci (-) so vzorci brez cone razgradnje, pozitivni vzorci (+) so vzorci pri katerih smo zabeležili cono razgradnje, ki je bila manjša ali enako velika kot difuzijska cona pufra pri NK (slika 16), vzorce z večjo cono razgradnje od difuzijske cone pufra pa smo označili (++) . Kvalitativne teste smo ovrednotili tako, da smo sešeli vrednosti (+) v vsaki vrstici in stolcu in jih izrazili kot vsoto ocen ( $\Sigma$ ). A- acetatni pufer, C-citratni pufer, P-fosfatni pufer, NK-pripadajoče negativne kontrole, c-molarna koncentracija ekstracijskega pufra.

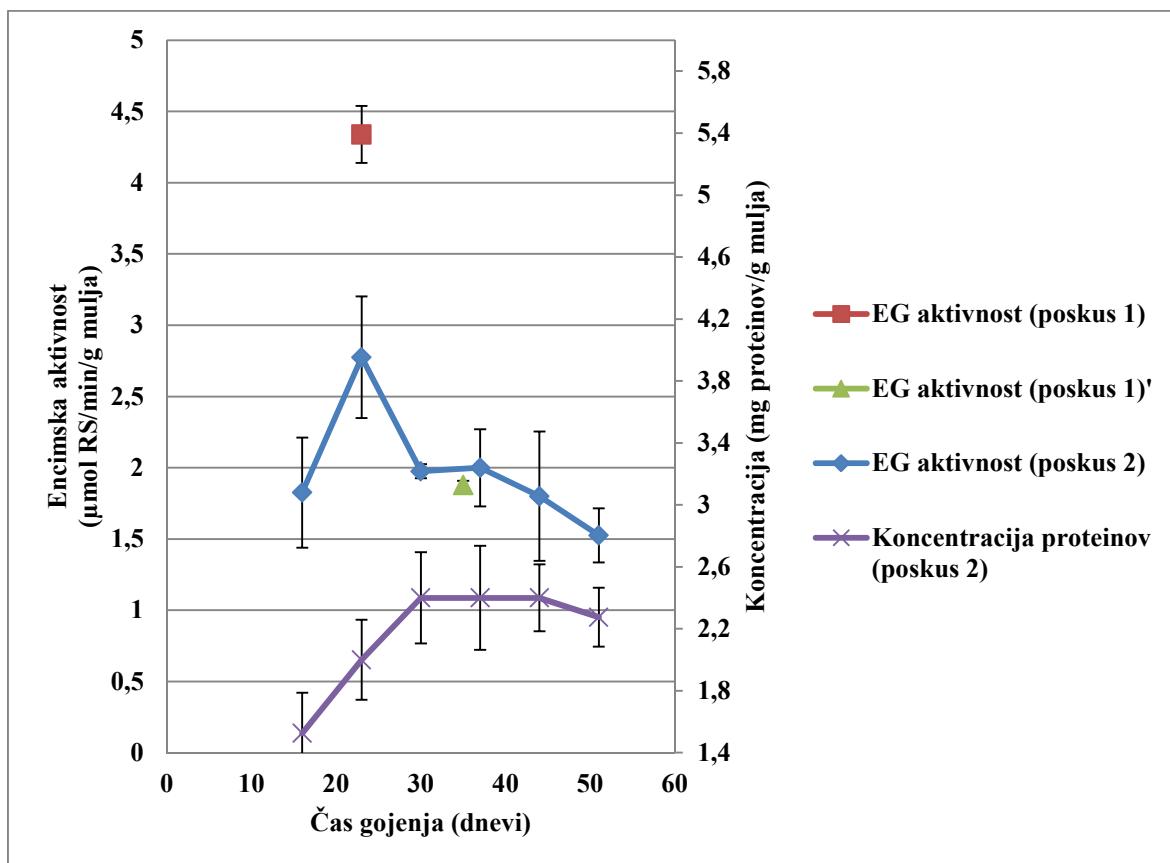
Pufer in pH agarozne plošče	A pH 4,5	A pH 5	A pH 5,5	C pH 6	P pH 6	P pH 6,5	P pH 7									
c (M): /	0,5	0,1	0,5	0,1	0,5	0,1	0,5	0,1	0,5	0,1	0,5	0,1	0,5	0,1	0,1	Σ
<b>Pufer in pH vzorcev in NK:</b>																
<b>A pH 4,5</b>																
-	-	-	-	+	++	+	++	+	++	+	-	+	-	-	11	
<b>A pH 4,5 NK</b>																
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
<b>A pH 5</b>																
-	-	-	-	+	++	++	++	++	++	++	+	-	-	-	15	
<b>A pH 5 NK</b>																
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
<b>C pH 5</b>																
+	-	++	-	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	18	
<b>C pH 5 NK</b>																
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
<b>C pH 6</b>																
+	-	+	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	19	
<b>C pH 6 NK</b>																
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
<b>P pH 6</b>																
-	-	-	-	-	++	++	++	++	++	++	+	-	-	-	13	
<b>P pH 6 NK</b>																
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
<b>P pH 7</b>																
-	-	+	-	++	++	++	++	++	++	++	-	+	-	-	14	
<b>P pH 7 NK</b>																
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
<b>Σ</b>	2	0	4	4	12	11	12	11	12	11	4	4	2	1		

## 4.3 KVANTITATIVNE ENCIMSKE AKTIVNOSTI

### 4.3.1 Encimske aktivnosti v ekstraktih v odvisnosti od časa gojenja

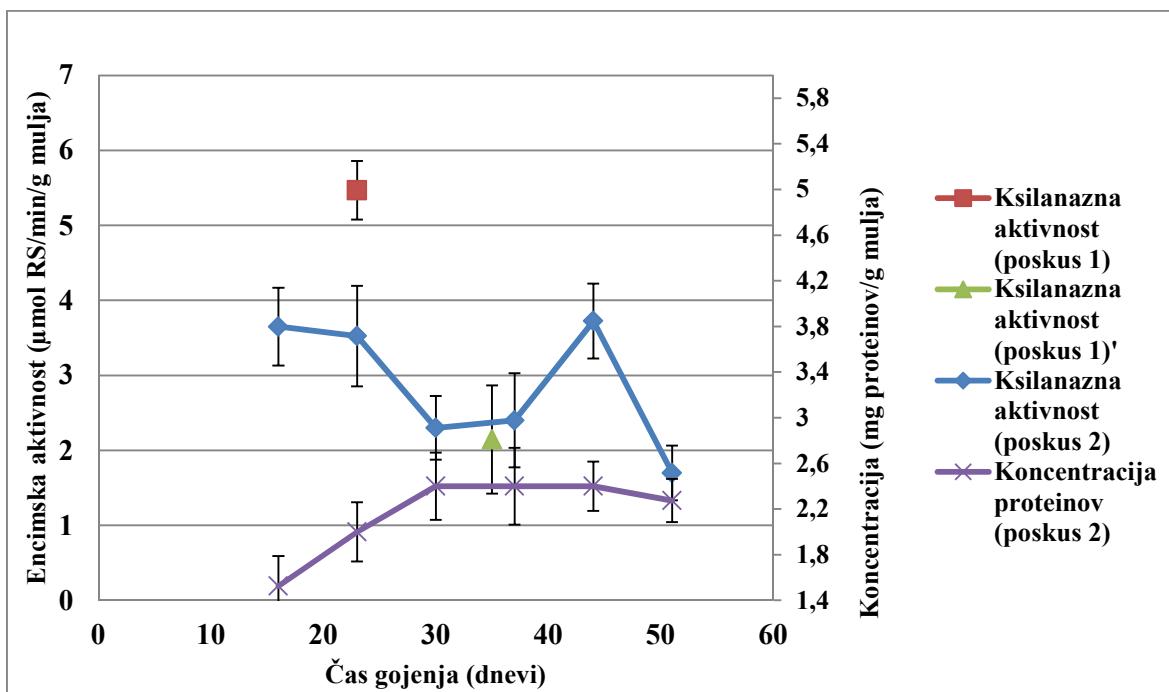
Ksilanazno in endoglukanazno aktivnost v encimskih ekstraktih smo določili z metodo dokazovanja encimske aktivnosti preko sproščenih reducirajočih sladkorjev. Vzorec za časovno analizo produkcije encimov je obsegal 24 gojišč z muljem DIP, nacepljenim s *P. ostreatus* PLAB. V vsaki časovni točki smo vzorčili po 4 naključno izbrane kulture. Vzorčili smo na 16., 23., 30., 37., 44. in 51. dan gojenja (poskus 2). Prva točka vzorčenja je bila v začetni fazi preraščanja mulja, ko je micelij preraščal manj kot polovico zunanje površine kulture. Za primerjavo EA smo analizirali vzorce s *P. ostreatus* na mulju DIP iz presejalnega poskusa (poskus 1). Med 16. in 23. dnem vzorčenja smo izmerili porast v povprečni endoglukanazni aktivnosti, ki je sovpadal z naraščanjem koncentracije proteinov v kulturah (ob predpostavki, da je spremembra aktivnosti med dvema točkama vzorčenja linear). Od 30. dneva do 51. dneva vzorčenja pa smo izmerili znotraj standarnih deviacij primerljive povprečne aktivnosti. Najvišjo povprečno aktivnost smo izmerili v vzorcih odvzetih po 23 dneh gojenja, ko je znašala  $2,8 \pm 0,4 \text{ } \mu\text{mol RS (min}^{-1}\text{) (g}^{-1}\text{)}$  mulja.

Najvišje povprečne ksilanazne aktivnosti smo izmerili v vzorcih odvzetih po 16 in 44 dneh inkubacije. Med posameznimi kulturami so bile velike razlike v produkciji encimov. Najvišje povprečne ksilanazne aktivnosti smo izmerili po 16, 23 in 44 dneh gojenja:  $3,7 \pm 0,5 \text{ } \mu\text{mol RS (min}^{-1}\text{) (g}^{-1}\text{)}$ ,  $3,5 \pm 0,7 \text{ } \mu\text{mol RS (min}^{-1}\text{) (g}^{-1}\text{)}$  in  $3,7 \pm 0,5 \text{ } \mu\text{mol RS (min}^{-1}\text{) (g}^{-1}\text{)}$  mulja. Tako pri merjenju endoglukanazne kot ksilanazne aktivnosti smo najnižje povprečne vrednosti izmerili po 51 dneh inkubacije. Povprečna endoglukanazna aktivnost je po 51. dneh znašala  $1,5 \pm 0,2 \text{ } \mu\text{mol RS (min}^{-1}\text{) (g}^{-1}\text{)}$  mulja in povprečna ksilanazna aktivnost  $1,7 \pm 0,4 \text{ } \mu\text{mol RS (min}^{-1}\text{) (g}^{-1}\text{)}$  mulja.



**Slika 10: Povprečna endoglukanazna aktivnost v odvisnosti od časa gojenja v ekstraktih kulture *P. ostreatus* na mulju DIP in povprečna koncentracija ekstrahiranih proteinov.**

Vsaka časovna točka na grafu predstavlja po 4 naključno izbrane kulture. Vzorčili smo na 16., 23., 30., 37., 44. in 51. dan gojenja (poskus 2). Za primerjavo encimskih aktivnosti (EA) smo analizirali vzorce kultur *P. ostreatus* na mulju, ki nastane v postopku razsivitve (DIP) iz presejalnega poskusa, ki smo jih vzorčili na 23. dan (poskus 1) in 35. dan gojenja (poskus 1)'. Encimsko aktivnost smo izrazili v  $\mu\text{mol}$  reducirajočih sladkorjev sproščenih v 1 minuti na gram mulja pod eksperimentalnimi pogoji ( $\mu\text{mol RS}/\text{min/g}$ ).



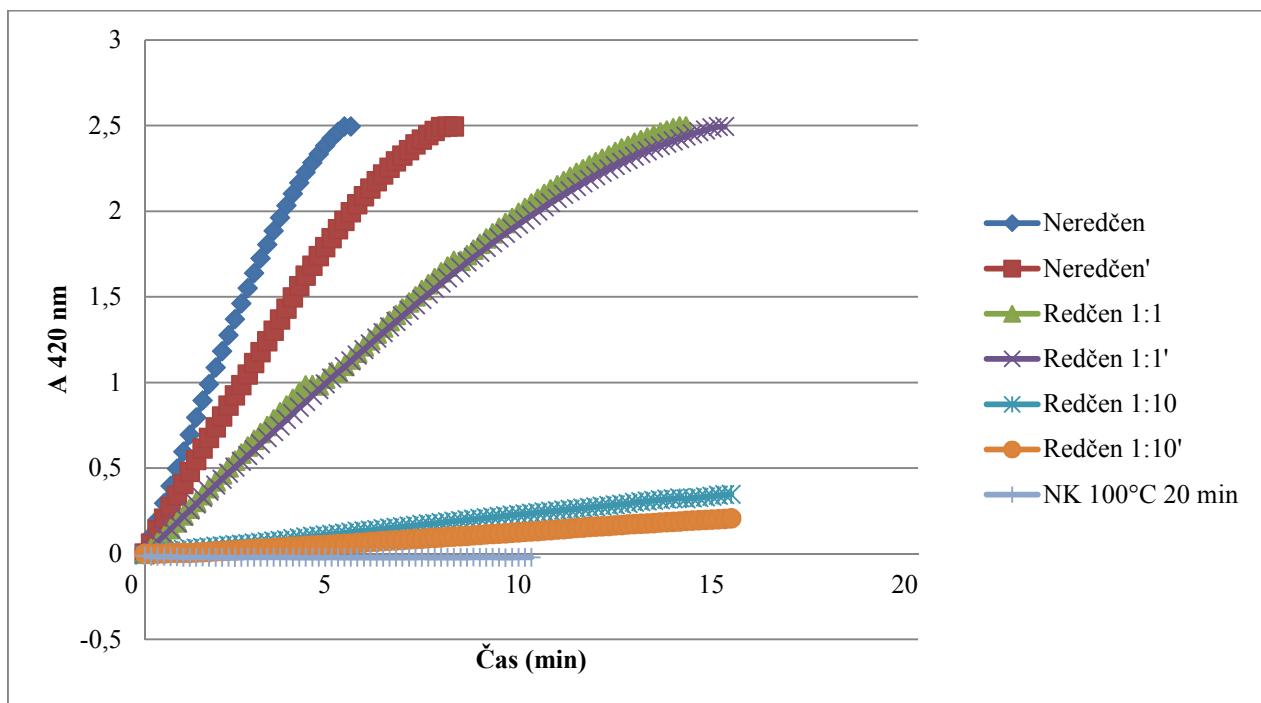
Slika 11: Povprečna ksilanazna aktivnost v ekstraktih v odvisnosti od časa gojenja *P. ostreatus* na mulju DIP in povprečna koncentracija ekstrahiranih proteinov.

Vsaka časovna točka na grafu predstavlja po 4 naključno izbrane kulture. Vzorčili smo na 16., 23., 30., 37., 44. in 51. dan gojenja (poskus 2). Za primerjavo encimskih aktivnosti (EA) smo analizirali vzorce kultur *P. ostreatus* na mulju, ki nastane v postopku razsivitve (DIP) iz presejalnega poskusa, ki smo jih vzorčili na 23. dan (poskus 1) in 35. dan gojenja (poskus 1)'. Encimsko aktivnost smo izrazili v  $\mu\text{mol}$  reducirajočih sladkorjev sproščenih v 1 minuti na gram mulja pod eksperimentalnimi pogoji ( $\mu\text{mol RS}/\text{min/g}$ ).

#### 4.3.2 Optimalni pogoji za testiranje lakazne aktivnosti z ABTS

Preden smo določili časovno dinamiko lakazne aktivnosti, smo preverili, kolikšno redčenje vzorcev je potrebno za optimalno dokazovanje aktivnosti. Spremljali smo porast absorbance po dodatku različnih redčitev encimskega ekstrakta iz preraščenega mulja DIP k reagentu ABTS v dveh ponovitvah. Predpostavili smo, da višja kot je encimska aktivnost, prej bo oksidiral ves ABTS v reakcijski mešanici in bo absorbanca dosegla maksimalno vrednost. Najhitrejši porast v absorbanci smo zabeležili pri vzorcih z neredčenim ekstraktom, nekoliko počasnejši pri vzorcih redčenih 1:1 in najpočasnejši pri vzorcih redčenih 1:10. V nadalnjih poskusih smo izbrali redčitev 1:1, ki se je izkazala za optimalno za merjenje porasta v absorbanci z intervalom 30 s. Pri negativni kontroli (kjer smo encimsko aktivnost ustavili z 20 min segrevanjem pri 100 °C) porasta v absorbanci

nismo zaznali, kar je v skladu s predpostavko, da ne vsebuje aktivnih encimov sposobnih oksidacije ABTS.

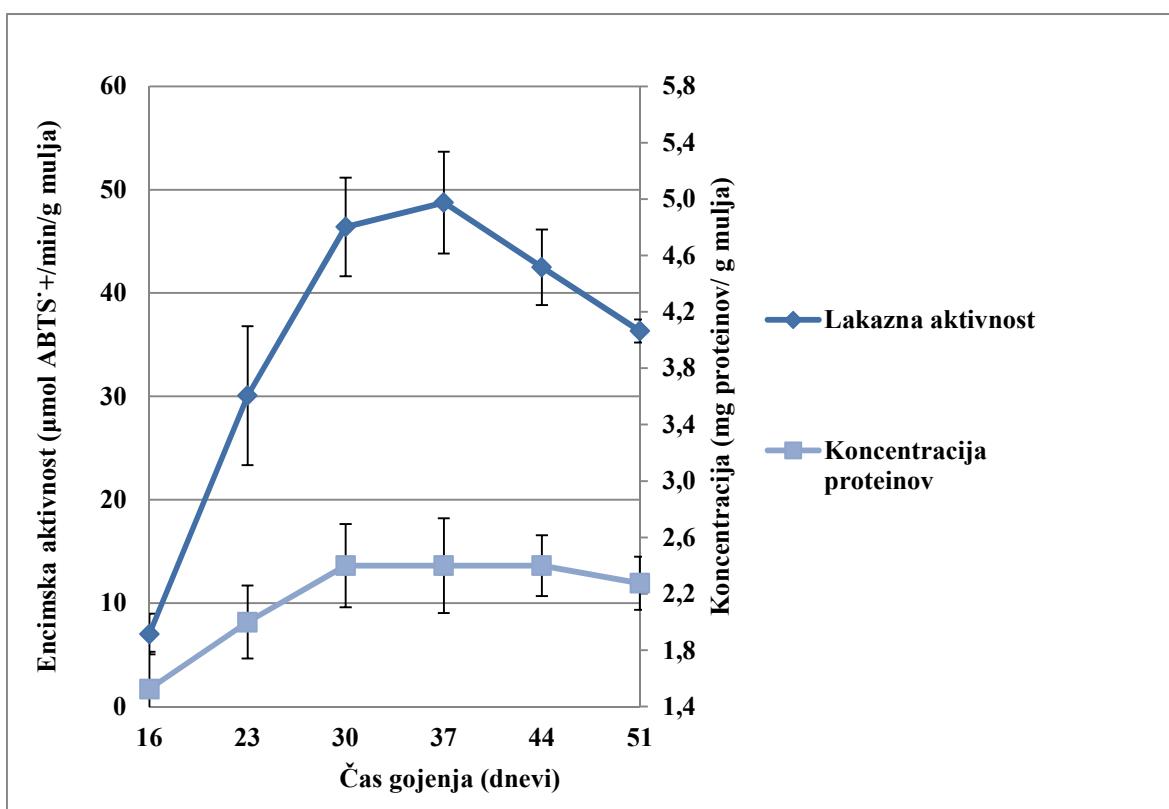


**Slika 12: Optimizacija metode dokazovanja lakazne aktivnosti: ugotavljanje optimalne redčitve vzorca.**

Grafikon prikazuje kontinuirano merjenje absorbance pri 420 nm s 30 s intervalom med posameznimi meritvami. Spremljali smo oksidacijo ABTS do ABTS<sup>•+</sup> v vzorcih, ki so vsebovali neredčene encimske ekstrakte, redčene 1:1 in 1:10 in negativno kontrolo (NK- temperaturno inaktiviran vzorec). Poskus smo izvajali v dveh ponovitvah, te so označene z oznako (').

#### 4.3.3 Lakazna aktivnost v odvisnosti od časa gojenja

Za vsako časovno točko smo analizirali 4 naključne kulture. Prva točka vzorčenja je bila začetek preraščanja mulja, ko ta še ni bil preraščen preko celotne zunanje površine mulja. Meritve smo izvajali v dveh ponovitvah, encimske ekstrakte smo redčili v razmerju 1:1. Rast micelijev smo spremeljali preko merjenja koncentracije proteinov v kulturah. V ekstraktih kultur po 30 dneh inkubacije smo izmerili skoraj 2-krat višjo povprečno koncentracijo proteinov kot v ekstraktih po 23 dnevnih, kar kaže na aktivno rast micelija. Od 30. dneva naprej smo izmerili znotraj standardnih deviacij primerljive vrednosti, kar kaže na to, da se je rast micelija ustalila. Maksimalne povprečne lakazne aktivnosti smo zabeležili 30. in 44. dan inkubacije. Od 44. dneva naprej smo opazili trend padanja povprečne aktivnosti.



Slika 13: Lakazna aktivnost in koncentracija proteinov v ekstraktih kultur *P. ostreatus* v odvisnosti od časa gojenja na mulju DIP.

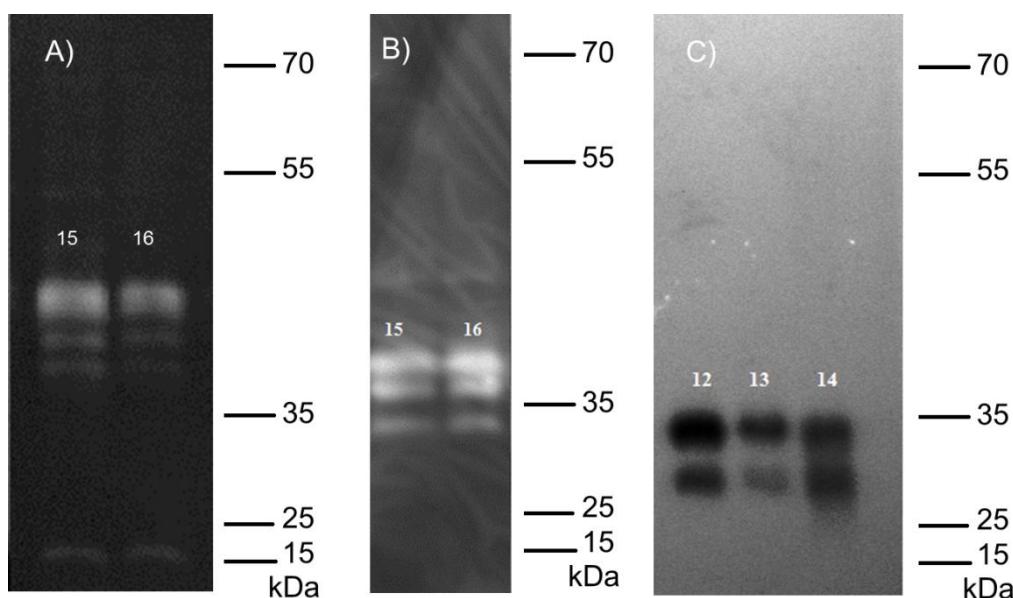
Encimsko enoto smo definirali kot količino encima, ki pretvori 1 μmol ABTS v radikal ABTS<sup>•+</sup> v eni minuti na gram mulja, ki nastane v procesu razsivitve (DIP).

#### 4.4 LASTNOSTI PROTEINOV V EKSTRAKTIH UGOTOVLJENE Z ENCIMOGRAMI

Predhodno pridobljene encimske ekstrakte smo analizirali z encimogrami. Na poliakrilamidnih gelih smo ločili proteine in dokazali encime, ki razgrajujejo CMC in BK oz. oksidirajo ABTS (encimi z lakazno aktivnostjo) (slika 14). Predpostavili smo, da en pas razgradnje oz. oksidacije substrata tvori en encim določene velikosti, čeprav je možno, da se v območju zbistritve nahaja več encimov zelo podobne velikosti.

Tri jasne pasove razgradnje CMC smo zaznali v območju med 35-50 kDa. V območju pod 25 kDa smo zaznali šibko območje razgradnje CMC, kar pa bi lahko predstavljal delno razgrajene encime z delno ohranjeno encimsko aktivnostjo. Prav tako smo zaznali tri pasove razgradnje BK, ki pripadajo encimom velikosti 25 - 55 kDa. Med 25 in 35 kDa smo

zaznali dva pasova oksidacije ABTS, kar kaže na to, da sta bili v ekstraktu prisotni (vsaj) 2 lakazi različnih velikosti (ker so bili encimi ločeni v nativni obliki, slednje ne moremo določiti na osnovi primerjave z denaturiranimi proteinskimi markerji).



Slika 14: Primerjava velikosti encimov v ekstraktih na encimogramih.

A) Gel z vklopljenim substratom karboksimetil celulozo (CMC) prikazuje število in približne velikosti encimov z endoglukanazno aktivnostjo, B) gel z vklopljenim substratom bukov ksilan (BK) prikazuje število in približne velikosti ksilanaz, C) gel brez vklopljenega substrata, na katerem lakazno aktivnost nakazujejo pasovi oksidacije (preko gela prelitega) ABTS . Oznake vzorcev: 12 (51 dni gojenja), 13 (16 dni gojenja), 14 (23 dni gojenja), 15 (30 dni gojenja) in 16 (37 dni gojenja).

#### 4.5 LASTNOSTI LIGNOLITIČNIH, CELULOLITIČNIH IN HEMICELULOLITIČNIH ENCIMOV IZ PODATKOVNIH ZBIRK

Encimi z endoglukanazno aktivnostjo so trenutno glede na strukturne lastnosti razvrščeni v podatkovni zbirkki Carbohydrate-Active EnZymes (CAZy) v naslednje družine glikozid hidrolaz: GH5, GH6, GH7, GH8, GH9, GH12, GH44, GH45, GH48, GH51, GH74, encimi s ksilanazno aktivnostjo pa v družine GH5, GH8, GH10, GH11, GH30, GH43, GH51, GH98. Encimi z lakazno aktivnostjo pa so uvrščeni v skupino encimov s pomožno aktivnostjo, v družino 1 (angl. Auxiliary activity family 1; AA1) (Cantarel in sod., 2009).

V podatkovni zbirki NCBI Protein smo poiskali anotacije celulazne, ksilanazne in lakazne aktivnosti *P. ostreatus*, ki so vnešeni v zbirko na podlagi sekvenčne homologije. Z orodjem ProtParam smo izračunali velikosti, število aminokislin (AK) in izoelektrično točko (pI) proteinov s predvideno encimsko aktivnostjo. Z orodjem InterProScan smo določili na podlagi sekvenčne homologije predvidene domene encimov (Zdobnov in Apweiler, 2001).

Proteine s predvideno celulazno aktivnostjo smo navedli v preglednici 18. Z iskalnim geslom »endoglucanase *P.ostreatus*« smo v zbirki NCBI Protein našli 24 proteinov *P. ostreatus*, ki spadajo med glikozid hidrolaze iz družine 5. V to družino spadajo tudi endoglukanaze. Od tega so bili 4 proteini anotirani kot celulaze *P. ostreatus*. Izračunane molekulske mase predvidenih encimov s celulazno aktivnostjo so znašale od 39 kDa do 64 kDa.

Proteine s predvideno ksilanazno aktivnostjo smo našteli v preglednici 19. V zbirki UniProt smo z iskalnim geslom "endoxyylanase *P. ostreatus*" našli 6 AK zaporedij endo-1,4- $\beta$ -ksilanaz (oz.  $\beta$ -ksilanaz) *P. ostreatus*, 5 od teh pripada sevu PC15, ki so v NCBI protein opisane kot glikozid hidrolaze iz družin GH10 in GH11 in en zadetek je opisan kot ksilanaza. Molekulske mase proteinov s predvideno ksilanazno aktivnostjo so znašale od 23 kDa do 41 kDa. Poleg katalitskih domen iz navedenih družin imajo nekatere celulaze in ksilanaze tudi vezavne domene, ki se vežejo na ogljikov hidrat.

Vse lakaze *P. ostreatus*, ki smo jih našteli so zgrajene iz treh domen multibakovih oksidaz: MO1 (angl. multicopper oxidase, type 1; dostopna koda IPR001117), MO2 (angl. multicopper oxidase, type 2; dostopna koda IPR011706), MO3 (angl. multicopper oxidase, type 3; dostopna koda IPR011707). V zbirki NCBI Protein smo našli 45 zadetkov z iskalnim geslom "laccase *P. ostreatus*", od teh jih je 16 opisanih kot celotnih zaporedij lakaz bukovega ostrigarja *P. ostreatus* seva PC15, slednje smo navedli v preglednici 20. Izračunane molekulske mase so znašale med 53 kDa in 56 kDa.

**Preglednica 18: Lastnosti celulaz *P. ostreatus* iz podatkovnih zbirk.**

Encime iz podatkovnih zbirk smo razvrstili glede na izračunano število aminokislin (AK), izračunano molekulsko maso (MW), teoretično izoelektrično točko (pI), predvidene domene encima z dostopno kodo in dostopna koda podatkovne zbirke. Našteti encimi so zaporedja z anotacijo encimske aktivnosti na osnovi sekvenčne homologije. Predvidene domene encimov smo določili z orodjem InterProScan (Zdobnov in Apweiler, 2001). Gradilo jih katalitske domene glikozid hidrolaz iz družine 5 (GH5) in glivne domene za vezavo na polisaharid (CBM) (NCBI, 2016).

Anotacija na osnovi sekvenčne homologije	Izračunano št. AK	Izračunana MW (kDa)	Teoretična pI	Predvidene domene (dostopna koda)	Dostopna koda v zbirki NCBI Protein
Endo-1,4-β-glukanaza	595	64,27	4,82	katalitska domena GH9 (IPR001701)	KDQ29194
Celulaza	376	39,63	4,70	katalitska domena GH5 (IPR001547), vezavna domena CBM (IPR000254)	KDQ30980
	405	42,78	4,35	katalitska domena GH5 (IPR001547); vezavna domena CBM (IPR000254)	KDQ28749
	370	39,85	5,09	katalitska domena GH5 (IPR001547)	KDQ27083
	370	38,91	4,87	katalitska domena GH5 (IPR001547), vezavna domena CBM (IPR000254)	KDQ24685

**Preglednica 19: Lastnosti ksilanaz *P. ostreatus* iz podatkovnih zbirk.**

Encime iz podatkovnih zbirk smo razvrstili glede na izračunano število aminokislin (AK), izračunano molekulsko maso (MW), teoretično izoelektrično točko (pI), predvidene domene encima z dostopno kodo in dostopno kodo podatkovne zbirke. Našteti encimi so zaporedja z anotacijo encimske aktivnosti na osnovi sekvenčne homologije. Predvidene domene encimov smo določili z orodjem InterProScan (Zdobnov in Apweiler, 2001). Vključujejo katalitske domene glikozid hidrolaz iz družine 10 (GH10) in družine 11 (GH11) in givno vezavno domeno za polisaharid (CBM) (NCBI, 2016).

Anotacija na osnovi sekvenčne homologije	Izračunano št. AK	Izračunana MW (kDa)	Teoretični pI	Predvidene domene (dostopna koda)	Dostopna koda v zbirki NCBI Protein
Endo-1,4- β-ksilanaza (beta-ksilanaza)	382	40,78	4,57	Katalitska domena GH10 (IPR001000), vezavna domena CBM (IPR000254)	KDQ24406
	224	23,77	8,65	Katalitska domena GH11 (IPR033123)	KDQ23385
	313	33,85	6,08	Katalitska domena GH10 (IPR001000)	KDQ24407
	300	31,75	8,32	Katalitska domena GH10 (IPR001000)	KDQ33930
	263	27,01	7,90	Katalitska domena GH11 (IPR033123)	ABY61039
	276	28,35	6,31	Katalitska domena GH11 (IPR033123), vezavna domena CBM (IPR000254)	KDQ23382

**Preglednica 20: Lastnosti lakaz *P. ostreatus* iz podatkovnih zbirk.:**

Encime iz podatkovnih zbirk smo razvrstili glede na izračunano število aminokislin (AK), izračunano molekulsko maso (MW), teoretično izoelektrično točko (pI), predvidene domene encima z dostopno kodo in dostopno kodo podatkovne zbirke. Domene encimov smo določili z orodjem InterProScan (Zdobnov in Apweiler, 2001). Vse lakaze so zgrajene iz treh domen multibakovih oksidaz, označili smo jih MO1 (angl. multicopper oxidase, type 1), MO2 (angl. multicopper oxidase, type 2), MO3 (angl. multicopper oxidase, type 3). Na strežniku NCBI Protein smo našli 45 zadetkov za lakaze *P. ostreatus*, od teh jih je 16 celotnih zaporedij lakaz bukovega ostrigarja *P. ostreatus* seva PC15, slednje smo navedli v preglednici (NCBI, 2016).

Encim (EC)	Izračunano št AK	Izračunana MW (kDa)	Teoretična pI	Predvidene domene (dostopna koda)	Dostopna koda v zbirki NCBI Protein
lakaza (1.10.3.2)	510	54,36	4,47	MO1, MO2, MO3	AAR21094
	500	53,22	4,54	MO1, MO2, MO3	AGO64760
	509	54,25	4,40	MO1, MO2, MO3	AE022162
	506	54,16	4,37	MO1, MO2, MO3	AAR82932
	510	54,36	4,47	MO1, MO2, MO3	BAC65099
	514	56,10	6,30	MO1, MO2, MO3	BAI83290
	502	55,46	5,59	MO1, MO2, MO3	CAC69853
	503	55,55	5,59	MO1, MO2, MO3	KDQ24506
	493	53,22	5,03	MO1, MO2, MO3	KDQ22995
	499	54,47	6,34	MO1, MO2, MO3	KDQ27220
	501	55,23	5,00	MO1, MO2, MO3	KDQ27218
	509	55,02	5,07	MO1, MO2, MO3	KDQ27217
	513	55,90	6,27	MO1, MO2, MO3	KDQ26322
	506	54,14	4,39	MO1, MO2, MO3	KDQ26316
	510	54,36	4,51	MO1, MO2, MO3	KDQ26299
	509	56,14	7,49	MO1, MO2, MO3	KDQ26265

## 5 RAZPRAVA

Cilj našega dela je bil pokazati, da glice bele trohnobe lahko kot substrat uporabljajo odpadne mulje iz papirne industrije in pri tem izločajo biotehnološko zanimive zunajcelične encime. Namen je bil ugotoviti s katero kombinacijo mulja in glice, pri kakšnih časih inkubacije in pogojih ekstrakcije izmerimo najvišje encimske aktivnosti.

**V prvem delu raziskave smo primerjali rast treh različnih gliv na 6 različnih substratih.** Za substrate smo uporabili papirniške mulje in mešanice papirniških muljev. Med gojenjem smo opazovali, pri kateri kombinaciji glice in papirniškega mulja se bo razvil najbolj obsežen micelij. Cilj tega poskusa je bil izbrati optimalno kombinacijo glice in mulja za produkcijo encimov, ki smo jo kasneje časovno spremljali.

Potrdili smo hipotezo, da niso vsi mulji primerni za rast testiranih vrst glice (preglednica 15). Mulj DIP je bil primeren za rast vseh treh glice (slika 9), medtem ko so bili ostali mulji manj primerni za izbrane glivne seve. Za *T. versicolor* TVER in *P. ostreatus* PLAB smo ugotovili, da vsaj delno preraščata vse testirane mulje, najbolj obsežen micelij pa je razvil *P. ostreatus* PLAB na mulju DIP, zato smo to kombinacijo izbrali za časovno analizo produkcije encimov.

V preteklosti so Tišma in sod. (2012) že pokazali, da je trdni papirniški odpadek iz papirne industrije lahko primeren za produkcijo encimov. Za gojenje *T. versicolor* MZKI G-99 v tekočem gojišču in produkcijo lakaz so uspešno uporabili mulj iz kemomehanske čistilne naprave. Ugotovili so, da odpadki iz papirne industrije, ki vsebujejo mikrodelce  $\text{CaCO}_3$ , stimulirajo rast, disperzijo micelija in izločanje lakaz. V naši raziskavi v presejalnem poskusu se odpadek iz kemomehanske čistilne naprave (mulj KMČN) ni izkazal kot primeren substrat za rast izbranih glice na trdnem gojišču, saj so ga glice slabo preraščale ali pa sploh ne.

Poleg različnih muljev smo glice nacepili tudi na pivske tropine, ki predstavljajo preverjeno dober substrat za rast *P. ostreatus* in produkcijo encimov (Gregori in sod., 2008). Iz rezultatov lahko sklepamo, da je rast *P. ostreatus* PLAB na mulju DIP

primerljiva z rastjo na pivskih tropinah. Poskus bi bilo smiselno ponoviti z večkrat neodvisno odvzetim muljem DIP in ugotoviti, ali je gojenje *P. ostreatus* na mulju možno standardizirati.

**V drugem delu smo s kvalitativnim presejalnim testom primerjali učinkovitost ekstrakcije in aktivnost tarčnih encimov v pufrih z različnimi pH vrednostmi in molarno koncentracijo.** Naš namen je bil ugotoviti optimalne pogoje ekstrakcije in aktivnosti tarčnih encimov v ekstraktih.

S presejalnim testom celulazne aktivnosti v ekstraktih smo kvalitativno ocenili, da je razgradnja substrata CMC v agaroznih ploščah najbolj učinkovita pri encimskih ekstraktih v acetatnem pufru pH 5, ki smo jih aplicirali na agarozne plošče pripravljene z enakim pufrom (preglednica 16). S presejalnim testom ksilanazne aktivnosti smo zaznali relativno ozko optimalno območje med pH 5,5 in pH 6 (preglednica 17). Ocenili smo, da so največkrat in največje cone razgradnje substrata BK nastale pri encimskih ekstraktih v citratnem pufru pH 6, nanešenem na agarozne plošče pripravljene z acetatnim pufrom pH 5,5, citratnim pufrom pH 6 ali fosfatnim pufrom pH 6. Kvalitativno smo ocenili, da smo večje cone razgradnje dobili kadar smo uporabili 0,5 M ekstrakcijske pufre kot pri ekstraktih v 0,1 M pufrih.

Slabost presejalnih kvalitativnih testov za ugotavljanje encimske aktivnosti je vpliv človeškega faktorja na odčitavanje rezultatov. Intenzivnost in odtenek barve Kongo rdeče sta med drugim odvisna tudi od pH, zato je primerljivost plošč z različnimi pH slabša. Lažno pozitivno vrednotenje rezultatov smo preprečili tako, da je imel vsak vzorec pripadajočo negativno kontrolo, v kateri je bil vključen toplotno inaktiviran encimski ekstrakt.

**V nadaljevanju poskusa smo pripravili postopek grobe ekstrakcije encimov, pri katerem smo upoštevali podatke o optimalnih pH območjih za delovanje encimov, ki smo jih ugotovili s presejalnim testom oz. jih povzeli iz literature. Pri postopku ekstrakcije smo se zgledovali po ostalih raziskavah, v katerih so ekstrahirali encime iz gojišč s *P. ostreatus* (Khalil in sod., 2011; Sławińska in Kalbarczyk, 2011; Maria**

Rodrigues da Luz in sod., 2012; Eichlerová in sod., 2000; Gregori in sod., 2008). Raziskavam je skupno to, da so za ekstrakcijo uporabili pufre v območju delovanja testiranih encimov, v katerih so suspendirali kulture in suspenzije centrifugirali ali filtrirali, da so pridobili bistre ekstrakte za spektrofotometrične teste. Za ekstrakcijo celulolitičnih encimov so Khalil in sod. (2011) uporabili citratni pufer pH 5 in Ślawińska in Kalbarczyk (2011) acetatni pufer pH 5,5, v naših poskusih pa smo uporabili 0,5 M acetatni pufer pH 5.

Pri ekstrakciji lignolitičnih encimov so Maria Rodrigues da Luz in sod. (2012) uporabili citratni pufer pH 4,8, Eichlerová in sod. (2000) acetatni pufer pH 5 in Gregori in sod. (2008) fosfatni pufer pH 6,5. More in sod. (2011) so ugotovili, da je izmed testiranih optimalni pH za delovanje lakaz glive *Pleurotus sp.* pH 4,5 seva izoliranega za potrebe raziskave iz rastlinskega materiala in nabranih plodišč. (More in sod., 2011). V naših poskusih smo za ekstrakcijo in merjenje lakazne aktivnosti uporabili 0,5 M acetatni pufer pH 4.

**V tretjem delu smo analizirali produkcijo encimov v odvisnosti od faze rasti *P. ostreatus* PLAB na mulju DIP.** Na 6 časovnih točkah smo analizirali po 4 naključno izbrane kulture, iz katerih smo pripravili grobe encimske ekstrakte, v slednjih pa izmerili koncentracije proteinov in encimske aktivnosti. Encimske aktivnosti v odvisnosti od časa gojenja so prikazane na slikah 10, 11 in 12. Izmerjene encimske aktivnosti so odvisne od koncentracije in aktivnosti posameznih encimov v ekstraktu, koncentracija celokupnih proteinov pa nam je služila kot posredno merilo za rast micelija. Potrdili smo hipotezi, da *P. ostreatus* PLAB med rastjo na papirniškem mulju izloča celulaze, ksilanaze in lakaze in da so v ekstraktih izmerjene encimske aktivnosti odvisne od časa inkubacije.

Najvišjo povprečno endoglukanazno aktivnost v encimskih ekstraktih kulture *P. ostreatus* PLAB na mulju DIP (slika 10) smo izmerili pri kulturah, ki smo jih gojili 23 dni. Pri vseh kasnejših točkah vzorčenja smo zabeležili nižjo aktivnost. Opazili smo, da je bila povprečna endoglukanazna aktivnost po 23 dneh gojenja iz predhodnega pilotnega poskusa 1 višja kot v poskusu 2. Čeprav smo v obeh primerih ravnali po enakem postopku so razlike morebiti posledica različnih količin suspendiranega micelija v inokulumu, razlik v temperaturi in vlažnosti zraka v inkubacijskem prostoru, sprememjanja lastnosti substrata

med odtajevanjem in ponovnim zamrzovanjem in morebitnih bakterijskih kontaminacij. Poudariti je potrebno, da smo encimsko aktivnost spremljali v kulturah, ki smo jih vzorčili v 7-dnevnih intervalih in da se dejanska encimska dinamika v vmesnem času lahko razlikuje od naših ugotovitev. Smiselno bi bilo načrtovati obsežnejši poskus z več točkami vzorčenja.

Podobno odstopanje med rezultati poskusov 1 in 2 smo opazili pri meritvah ksilanazne aktivnosti (slika 11), kjer smo zabeležili znatno višjo povprečno encimsko aktivnost v prvi točki vzorčenja presejalnega poskusa 1, kot v poskusu 2. Pri vzorcih odvzetih po 30 dneh in 37 dneh inkubacije smo v 2. poskusu izmerili nižjo povprečno aktivnost, kot po 44. dnevu inkubacije. Najnižjo povprečno ksilanazno aktivnost smo izmerili v vzorcih odvzetih po 51 dneh inkubacije. Razlike v povprečni ksilanazni aktivnosti v ekstraktih kultur z različnimi inkubacijskimi časi so majhne, med posameznimi vzorci pa so velika odstopanja, ki so prikazana kot standardne deviacije (slika 11). Slednje pripisujemo razlikam v hitrosti rasti med posameznimi kulturami, ki smo jih vzorčili v določenih časovnih točkah. Vpliv vzorčenja na končni rezultat je prav tako mogoč, čeprav smo se trudili, da bi bil ta čim manjši- med drugim tudi tako, da smo vsako kulturo pred ekstrakcijo v celoti homogenizirali in odvzeli reprezentativen vzorec.

Časovna analiza lakazne aktivnosti v ekstraktih iz kultur *P. ostreatus* PLAB na mulju DIP je pokazala korelacijo med izmerjeno aktivnostjo in koncentracijo proteinov v ekstraktih v odvisnosti od časa gojenja (slika 13). Višja povprečna lakazna aktivnost pri 30., 37. in 44. dnevu vzorčenja je sovpadala z večjo koncentracijo proteinov v ekstraktih, iz česar lahko sklepamo, da aktivnost narašča na račun rasti micelija, ki izloča lakaze.

Pri zadnji točki vzorčenja (po 51 dneh inkubacije) smo izmerili nizke endoglukanazne, ksilanazne in lakazne aktivnosti. Možni razlogi za nizko aktivnost so prenehanje aktivne rasti micelija zaradi porabe hrani in nastanka produktov razgradnje substrata, ki lahko delujejo represivno na izražanje lignocelulolitičnih encimov ali njihovo aktivnost. V nadaljnjih poskusih bi bilo smiselno analizirati vsebnost dušika in tudi celuloze, hemiceluloz in lignina v gojišču in ugotoviti koliko se njihov delež zmanjša v poznih fazah rasti micelija. Eden od možnih vzrokov za ustavitev rasti in aktivnosti bi bil lahko tudi

nastanek toksičnih stranskih produktov razgradnje ksenobiotikov, ki se pogosto nahajajo v odpadnih muljih (Kaushik in Malik, 2009).

Na produkcijo encimov pri glivah bele trohnobe vplivajo različni okoljski dejavniki in mehanizmi encimske regulacije. Rebelo Barreto Xavier in sod. (2007) so pokazali, da produkcija lakaz pri *T. versicolor* ni neposredno povezana z rastjo celic, kar kaže na to, da je njihova sinteza povezana s sekundarnim metabolizmom. Nasprotno so Tlecuitl-Beristain in sod. (2008) ugotovili pozitivno korelacijo med lakazno aktivnostjo in rastjo gline *P. ostreatus*, maksimalno lakazno aktivnost pa so zaznali na začetku stacionarne faze. V omenjeni raziskavi so pokazali, da je število izraženih izoform lakaz *P. ostreatus* (ATCC 32783) odvisno od faze rasti in gojenja (SSF ali SF) (Tlecuitl-Beristain in sod., 2008; Téllez-Téllez in sod., 2008). V nekaterih raziskavah so zabeležili maksimalno encimsko aktivnost v začetku faze fruktifikacije (Velazquez-Cedeno in sod., 2002; Kurt in Buyukalaca, 2010). V našem primeru na mulju DIP nismo opazili tvorbe primordijev in plodišč. Možno je, da hrnilna sestava mulja DIP in pogoji gojenja ne podpirajo razvoja plodišč pri *P. ostreatus* PLAB.

**V naši raziskavi smo pokazali, da je mulj DIP z vidika produkcije lignocelulolitičnih encimov primerljiv z nekaterimi v literaturi že opisanimi lignoceluloznimi substrati (preglednice 25, 26, 27).** Z gojenjem na papirniškem mulju DIP smo izmerili primerljivo endoglukanazno, nižjo ksilanazno ter višjo lakazno aktivnost v primerjavi z raziskavami, kjer so uporabljali različne lignocelulozne substrate.

Endoglukanazno in ksilanazno aktivnost smo izrazili v  $\mu\text{mol}$  reducirajočih sladkorjev sproščenih v eni minuti na gram mulja pod eksperimentalnimi pogoji. Najvišje povprečne endoglukanazne aktivnosti (normalizirane na gram substrata) v ekstraktih iz preliminarnega poskusa gojenja (poskus 1) *P. ostreatus* PLAB na mulju DIP so znašale 4,4 ( $\pm 0,2$ )  $\mu\text{mol RS (min}^{-1}\text{)}\text{ (g}^{-1}\text{)}$  in 2,8 ( $\pm 0,5$ )  $\mu\text{mol RS (min}^{-1}\text{)}\text{ (g}^{-1}\text{)}$  na 23. dan gojenja (poskus 2). Vrednosti so primerljive z rezultati raziskave Velazquez-Cedeno in sod. (2002), ki so *P. ostreatus* (IE 38) gojili na trdnem gojišču s kavno goščo in izmerili maksimalno endoglukanazno aktivnost 1,4  $\mu\text{mol RS (min}^{-1}\text{)}\text{ (g}^{-1}\text{)}$  na 27. dan gojenja v fazi fruktifikacije. Kurt in Buyukalaca (2010) sta gojila *P. ostreatus* HK 35 na trdnem gojišču

iz slame riža in pšenice z otrobi in v ekstraktu izmerila endoglukanazno aktivnost 2,2  $\mu\text{mol RS (min}^{-1}) (\text{g}^{-1})$  na 20. dan gojenja. Khalil in sod. (2011) so v ekstraktih kultur na trdnem gojišču, ki je vsebovalo slamo riža predhodno obdelano z NaOH izmerili endoglukanazno aktivnost 7,1  $\mu\text{mol RS (min}^{-1}) (\text{g}^{-1})$  na 12. dan gojenja. Izmerjene endoglukanazne aktivnosti na gram mulja DIP so torej primerljive z encimskimi aktivnosti na drugih lignoceluloznih substratih iz literature (priloga G).

Najvišje povprečne ksilanazne aktivnosti, ki smo jih izmerili v ekstraktih kultur *P. ostreatus* na mulju DIP so znašale 5,5 ( $\pm 0,4$ )  $\mu\text{mol RS (min}^{-1}) (\text{g}^{-1})$  na 23. dan gojenja (poskus 1) in 3,7 ( $\pm 0,5$ )  $\mu\text{mol RS (min}^{-1}) (\text{g}^{-1})$  na 16. in 44. dan gojenja (poskus 2). Za primerjavo smo navedli nekaj primerov iz raziskav (priloga H), kjer so za produkcijo uporabili druge lignocelulozne odpadne materiale. Elisashvili in sod. (2008) so na trdnem gojišču z listi bukve in pšenico izmerili ksilanazno aktivnost *P. dryinus* (IBB 903) 54,1  $\mu\text{mol RS (min}^{-1}) (\text{g}^{-1})$  (SSF) in 168  $\mu\text{mol RS (min}^{-1}) (\text{g}^{-1})$  (SF) v enem dnevu gojenja. Iandolo in Piscitelli (2011) so gojili *P. ostreatus* (tip: Florida; ATCC MYA- 2306) na ostankih paradižnika in izmerili ksilanazno aktivnost 9  $\mu\text{mol RS (min}^{-1}) (\text{g}^{-1})$  po 2 dneh gojenja na trdnem gojišču, Qinngh in sod. (2004) so gojili *P. ostreatus* SYJ042 v tekočem gojišču s koruznimi sestavinami in pšenični otrobi v peptonu in izmerili ksilanazno aktivnost 24,98  $\mu\text{mol RS (min}^{-1}) (\text{g}^{-1})$  na 7. dan gojenja. V navedenih raziskavah so izmerili višje ksilanazne aktivnosti, kot smo jih izmerili v ekstraktih preraščenega mulja DIP v naši raziskavi.

Lakazno aktivnost smo definirali kot količino encima, ki pretvori en  $\mu\text{mol ABTS}$  v radikal ABTS $\bullet+$  v eni minutni na gram mulja pod eksperimentalnimi pogoji. V našem poskusu smo izmerili najvišjo povprečno lakazno aktivnost 49 ( $\pm 5$ )  $\mu\text{mol ABTS}\bullet+(\text{min}^{-1}) (\text{g}^{-1})$  pri 37 dneh gojenja. Ta vrednost je višja od aktivnosti, ki so jih izmerili v nekaterih ekstraktih iz kultur, ki so rasle na drugih lignoceluloznih substratih v raziskavah, navedenih v prilogi I. Castanera in sod. (2012) so izmerili lakazno aktivnost dikariantskega seva *P. ostreatus* SS 0,6  $\mu\text{mol ABTS}\bullet+(\text{min}^{-1}) (\text{g}^{-1})$  9. dan gojenja na trdnem gojišču z liofilizirano slamo pšenice, Gregori in sod. (2008) 0,3 ( $\pm 0,1$ )  $\mu\text{mol ABTS}\bullet+(\text{min}^{-1}) (\text{ml}^{-1})$  33. dan gojenja *P. ostreatus* Pl.o4 na trdnem gojišču iz otrobov pšenice in pivskih tropin in Knežević in sod. (2013) 4,8 ( $\pm 0,16$ )  $\mu\text{mol ABTS}\bullet+(\text{min}^{-1}) (\text{ml}^{-1})$  na 14. dan gojenja *P. ostreatus* HAI 592 na

trdnem gojišču iz slame pšenice. Razlog za visoko lakazno aktivnost v primerjavi z gojenjem na drugih lignoceluloznih substratih je lahko visoka vsebnost lignina ali ostalih snovi, ki inducirajo ekspresijo teh encimov, v mulju. Možno je, da je za produkcijo lakaz ugodna tudi struktura mulja, in da je lignin v primerjavi z naravnimi lignoceluloznimi substrati bolj dostopen za razgradnjo. Lakaze lahko poleg lignina oksidirajo aromatske amine, fenolne substrate, kot so barvila na osnovi fenolov (Ling in sod., 2015), in poliaromatske ogljikovodike (Prasetyo in sod., 2016) za katere je znano, da so lahko prisotni v muljih, pridobljenih po postopku razbarvanja (Beauchamp, 2002).

S primerjavo naših rezultatov merjenja encimskih aktivnosti z vrednostmi iz drugih znanstvenih raziskav smo pokazali, da je mulj DIP kot stranski produkt papirne industrije lahko obetaven substrat za ekonomsko ugodno produkcijo encimov. Izkoristili smo prednosti gojenja na trdnem gojišču: takšno gojenje ne zahteva vnosa energije za prezračevanje in mešanje substrata. Prav tako nismo potrebovali energije za dodatno ogrevanje, saj smo glive gojili pri 23 °C. Glavni izziv takega gojenja je povečevanje obsega (ang. scale-up) procesa, pri čemer je glavni tehnološki problem prezračevanje substrata.

**V zadnjem delu raziskave smo encimske ekstrakte iz kultur *P. ostreatus* PLAB na mulju DIP analizirali z encimogrami.** Naš namen je bil ugotoviti okvirno velikost in število encimov, ki razgrajujejo CMC, BK ali oksidirajo ABTS v gelu. Na encimogramih (slika 14) smo analizirali pasove razgradnje CMC in BK in pasove oksidacije ABTS. Iz števila pasov smo sklepali na število in okvirno molekulska maso encimov z endoglukanazno (CMC-azno), ksilanazno in lakazno aktivnostjo. Kot smo predvidevali, encimski profil v ekstraktih sestavlja več različno velikih encimov s hidrolitično oz. oksidativno aktivnostjo in s tem potrdili našo hipotezo.

Encime s CMC-azno aktivnostjo smo zaznali v območju med 35-50 kDa, kjer smo lahko ločili vsaj 3 jasne pasove razgradnje. V območju pod 25 kDa smo zaznali šibko območje razgradnje, kar pa bi lahko predstavljal delno razgrajene encime z delno ohranjeno encimsko aktivnostjo. Najmanjši encimi *P. ostreatus* s predvideno celulazno aktivnostjo v podatkovnih zbirkah so veliki 39,63 kDa (dostopna koda KDQ30980), 39,85 kDa

(dostopna koda KDQ27083) in 38,91 kDa (dostopna koda KDQ24685) (preglednica 18). Prav tako smo zaznali 3 pasove razgradnje BK. *P. ostreatus* na mulju DIP izloča vsaj 3 različne encime, velikostnega reda 30-40 kDa, ki so sposobni razgradnje BK. Encimi s predvideno ksilanazno aktivnostjo, ki po velikosti ustrezajo pasovom razgradnje BK na encimogramih so veliki 31,75 kDa (dostopna koda KDQ33930), 33,85 kDa (dostopna koda KDQ24407) in 40,78 kDa (dostopna koda KDQ24406). Obstaja možnost, da gre za iste encime. Največja ksilanaza po velikosti sovpada z najmanjšo celulazo, kar kaže na to, da bi lahko šlo za isti encim, ki ima tako celulazno kot ksilanazno aktivnost. Nekatere endoksilanaze lahko katalizirajo tudi hidrolizo substratov, ki jih sicer katalizirajo celulaze (Biely in sod., 1997). Nekatere oblike endoglukanaz pa lahko hidrolizirajo različne derivate celuloze in tudi ksilane (Kleman-Leyer in sod., 1996).

Po elektroforezi nativnih encimskih ekstraktov iz kultur *P. ostreatus* na mulju DIP smo zaznali 2 pasova oksidacije ABTS, kar kaže na to, da vsi vzorci vsebujejo vsaj dva encima, ki oksidirata ta substrat. Zaradi spremenjene elektroforetske mobilnosti ločenih encimov z lakazno aktivnostjo po velikosti nismo mogli neposredno primerjati z denaturiranimi standardi.

V pričujočem delu smo želeli pokazati, da je mogoče odpadni ali stranski produkt papirne industrije uporabiti za produkcijo produkta z dodano vrednostjo. V našem primeru so to lignocelulolitični encimi, ki imajo široko biotehnološko uporabnost med drugim prav v papirni industriji. Različni papirniški procesi zahtevajo različne encime ali mešanice encimov. V nekaterih procesih so uporabni že sami grobi encimski ekstrakti.

Celulaze se v papirni industriji uporabljajo za predobdelavo vlaken pred razpuščanjem (lesne gošče) in tudi v mešanicah encimov za razbarvanje papirne gošče (Jegannathan in Nielsen, 2013). Das in sod. (2013) so za razbarvanje tiskarskih barv v gošči iz pisarniškega papirja uporabili mešanico CMC-az,  $\beta$ -glukozidaz, celulolitičnih encimov, katerih aktivnost ugotavljamo s filtrirnim papirjem (angl. filter paper-ase) in ksilanaz glive *Aspergillus fumigatus* ABK9.

V mnogih procesih pa je za obdelavo papirne gošče pomembno, da encimski pripravki ne vsebujejo celulaz, ki bi razgradile celulozna vlakna, zato je te potrebno odstranjevati (Bajpai, 2012). Proses produkcije lignocelulolitičnih encimov je mogoče optimizirati tako, da encimski ekstrakt vsebuje minimalno količino celulaz, in se lahko aplicira v procesu razpuščevanja papirja, ekstrakti, ki vsebujejo veliko količino lakaz in endoksilanaz pa se uporabljajo za beljenje gošče (Levin in sod., 2008).

## 6 SKLEPI

Na podlagi dobljenih rezultatov smo oblikovali naslednje sklepe:

- Za rast gliv *Trametes versicolor* PLAB, *Ganoderma lucidum* GAL5 in *Pleurotus ostreatus* PLAB na trdnem gojišču je izmed testiranih papirniških muljev primeren izključno mulj DIP.
- S presejalnim testom smo kvalitativno ocenili, da endoglukanaze v ekstraktih kultur optimalno delujejo v območju pH med 5 in 5,5, ksilanaze pa med 5,5 in 6.
- Pri višji povprečni koncentraciji proteinov v ekstraktih kultur, ki so rasle na mulju DIP smo izmerili tudi višjo povprečno lakazno aktivnost, medtem ko korelacije med koncentracijo proteinov v ekstraktih na tem mulju in endoglukanazno / ksilanazno encimsko aktivnostjo nismo opazili.
- *P. ostreatus* na mulju DIP izloča vsaj 3 različne encime z molekulskimi masami med 35-50 kDa, ki so sposobni razgradnje CMC in vsaj 3, ki so sposobni razgradnje bukovega ksilana (velikostnega reda 30-40 kDa). Molekulska masa največjega ksilanolitičnega encima sovpada z najmanjšim celulolitičnim, kar bi lahko pomenilo, da gre za encim, ki cepi tako celulozo kot ksilane.
- Po elektroforezi nativnih encimskih ekstraktov smo v ekstraktih zaznali (vsaj) 2 encima, ki oksidirata ABTS.

## 7      POVZETEK

Glive bele trohnobe so biotehnoško pomembna skupina gliv z dovršenim encimskim sistemom za razgradnjo lignina in holoceluloze. Mnoge gline bele trohnobe učinkovito preraščajo različne lignocelulozne substrate, ki nastajajo v gozdarstvu, poljedelstvu in v živilski industriji, kot odpadki ali stranski produkti. Primeren substrat za rast gliv so lahko tudi papirniški mulji, ki nastajajo v velikih količinah v papirni industriji. Tipično so papirniški mulji zmesi kratkih celuloznih vlaknen in anorganskih polnil. Nastajajo z izžemanjem procesnih vod na čistilnih napravah in kot stranski produkt v procesu recikliranja odpadnega papirja.

Mnogi lignolitični, celulitični in hemicelulolitični encimi so uporabni v tehnoloških postopkih lesne predelave in recikliranja papirja v papirni industriji. Vključevanje encimsko kataliziranih procesov v papirni industriji zmanjša porabo kemikalij in s tem onesnaževanje okolja, lahko zmanjša porabo energije in prispeva h kvaliteti končnega produkta.

Namen našega dela je bil ugotoviti, ali lahko uporabimo odpadne papirniške mulje kot substrat za gojenje gliv bele trohnobe na trdnem gojišču in pridobivanje biotehnoško uporabnih lignocelulolitičnih encimov. Po en sev vrst gliv bele trohnobe *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* in *Ganoderma lucidum* smo inokulirali na trdna gojišča s papirniškim muljem. Za testiranje produkcije encimov smo izbrali sev bukovega ostrigarja, *P. ostreatus* PLAB, ki je pokazal bujno rast micelija na mulju DIP, ki nastane v procesu razbarvanja papirja.

Iz homogenizatov kultur *P. ostreatus* PLAB na papirniškem mulju smo pripravili grobe ekstrakte, ki so vsebovali tudi zunajcelične encime. Primerjali smo učinkovitost ekstrakcije tarčnih encimov v pufrih z različnimi pH in molarno koncentracijo. Naš namen je bil ugotoviti optimalne pogoje ekstrakcije in delovanja tarčnih encimov v ekstraktih, informacije pa so predstavljale osnovo za kasnejše kvantitativne analize aktivnosti. Presejalno testiranje celulolitične in ksilanolitične encimske aktivnosti v ekstraktih smo izvedli na agaroznih ploščah v katere smo vklopili substrata karboksimetil celulozo ali

bukov ksilan. Kvalitativno smo ocenili, da je izmed testiranih pufrov optimalen za aktivnost celulolitičnih encimov v ekstraktih kultur *P. ostratus* acetatni pufer pH 5, za aktivnost ksilanolitičnih encimov pa citratni pufer pH 6.

V nadaljevanju poskusa smo izvedli postopek ekstrakcije encimov, pri katerem smo upoštevali optimalni območji pH encimov, ki smo jih ugotovili s presejalnim testom oz. jih povzeli iz literature. Za časovno analizo produkcije encimov v odvisnosti od faze rasti smo analizirali ekstrakte 24 kultur *P. ostreatus* PLAB, ki je rasel na mulju DIP. V ekstraktih smo izmerili koncentracije proteinov in preko dokazovanja sproščenih reducirajočih sladkorjev določili celulazno in ksilanazno aktivnost, lakazno encimsko aktivnost pa smo določili z merjenjem oksidacije ABTS.

Najvišje povprečne endoglukanazne aktivnosti, ki smo jih zaznali v ekstraktih kultur *P. ostreatus* PLAB na mulju DIP so znašale  $4,4 (\pm 0,2) \mu\text{mol RS (min}^{-1}) (\text{g}^{-1})$  v presejalnem poskusu in  $2,8 (\pm 0,5) \mu\text{mol RS (min}^{-1}) (\text{g}^{-1})$  na 23. dan gojenja v poskusu časovne analize produkcije encimov. Najvišje povprečne ksilanazne aktivnosti v ekstraktih istih kultur pa so znašale  $5,5 (\pm 0,4) \mu\text{mol RS (min}^{-1}) (\text{g}^{-1})$  na 23. dan gojenja v presejalnem poskusu in  $3,7 (\pm 0,5) \mu\text{mol RS (min}^{-1}) (\text{g}^{-1})$  na 16. in 44. dan gojenja v poskusu časovne analize produkcije encimov. Najvišja povprečna lakazna aktivnost v zgoraj omenjenih ekstraktih je znašala  $49 (\pm 5) \mu\text{mol ABTS}^{\bullet+} (\text{min}^{-1}) (\text{g}^{-1})$ . Izmerjene encimske aktivnosti smo primerjali z aktivnostmi na lignoceluloznih substratih iz literature in ugotovili, da je mulj DIP primeren substrat za produkcijo izbranih encimov.

Encimske ekstrakte smo analizirali tudi na encimogramih. Encime smo zaznali kot pasove razgradnje substrata karboksimetyl celuloze ali bukovega ksilan v poliakrilamidnem gelu ali kot pasove oksidacije reagenta ABTS. *P. ostreatus* na mulju DIP izloča vsaj 3 različne encime molekulske mase med 35-50 kDa, ki so sposobni razgradnje CMC in vsaj 3, ki so sposobni razgradnje BK velikostnega reda 30-40 kDa. Ugotovili smo, da so celulolitični in ksilanolitični encimi primerljivih molekulskih mas kot encimi v podatkovnih zbirkah. Velikost največjega ksilanolitičnega encimasovпадa z najmanjšim celulolitičnim, kar bi lahko pomenilo, da gre potencialno za isti encim. Za analizo encimov z lakazno aktivnostjo smo uporabili nativne encimske ekstrakte, zato njihovih molekulskih mas ne moremo

ugotoviti iz primerjave z denaturiranimi standardi. Zaznali smo dva pasa oksidacije ABTS, kar kaže na prisotnost vsaj dveh različno velikih encimov.

## 8 VIRI

- Archibald F., Bourbonnais R., Jurasek L., Paice M., Reid I.. 1997. Kraft pulp bleaching and delignification by *Trametes versicolor*. Journal of Biotechnology, 53, 2-3: 215–236
- Baby S., Johnson A. J., Govindan B. 2015. Secondary metabolites from *Ganoderma*. Phytochemistry, 114: 66–101
- Bajpai P. 2012. Environmentally benign approaches for pulp bleaching. 2<sup>nd</sup> ed. Amsterdam, Elsevier: 394 str.
- Barron G. L. 1992. Lignolytic and cellulolytic fungi as predators and parasites. V: The fungal community: its organization and role in the ecosystem. 2<sup>nd</sup> ed. Dighton J., White J., Oudemans P. (eds.). New York, Marcel Dekker Inc.: 311–326
- Beauchamp C. J. 2002. Examination of environmental quality of raw and composting de-inking paper sludge. Chemosphere, 46: 887–895
- Biely P., Vršanská M., Tenkanen M., Kluepfel D. 1997. Endo-β-1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. Journal of Biotechnology, 57, 1-3: 151–166
- Blanchette R. A., Nilsson T., Daniel G., Abad A. R., Rowell R. M., Barbour R. J. 1990. Biological degradation of wood. V: Archaeological wood: properties, chemistry, and preservation. Rowell R. M., Barbour R. J. (eds.). Washington DC, American Chemical Society: 141–174
- Blank C. E., Parks R. W., Hinman N. W. 2016. Chitin: a potential new alternative nitrogen source for the tertiary, algal-based treatment of pulp and paper mill wastewater. Journal of Applied Phycology, doi: 10.1007/s10811-016-0808-5: 14 str. (v tisku)
- Boerjan W., Ralph J., Baucher M. 2003. Lignin biosynthesis. Annual Review of Plant Biology, 54, 1: 519–546
- Bollag J., Leonowicz A. 1984. Comparative studies of extracellular fungal laccases. Applied and Environmental Microbiology, 29: 849–854
- Breen A., Singleton F. L. 1999. Fungi in lignocellulose breakdown and biopulping. Current Opinion in Biotechnology, 10, 3: 252–258
- Calace N., Nardi E., Petronio B., Pietroletti M., Tosti G. 2003. Metal ion removal from water by sorption on paper mill sludge. Chemosphere, 51, 3: 797–803
- Cantarel B. L., Coutinho P. M., Rancurel C., Bernard T., Lombard V., Henrissat B. 2009. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. Nucleic Acids Research, 37, 1: 233–238
- Castanera R., Pérez G., Omarini A., Alfaro M., Pisabarro A. G., Faraco V., Amore A. 2012. Transcriptional and enzymatic profiling of *Pleurotus ostreatus* laccase genes in submerged and solid-state fermentation cultures. Applied and Environmental Microbiology, 78, 11: 4037–4045
- Chantigny M. H., Angers D. A., Beauchamp C. J. 2000. Decomposition of de-inking paper sludge in agricultural soils as characterized by carbohydrate analysis. Soil Biology & Biochemistry, 32: 1561–1570
- Chen S., Xu J., Liu C., Zhu Y., Nelson D. R., Zhou S., Li C., Wang L., Guo X., Sun Y., Luo H., Li Y., Song J., Henrissat B., Levasseur A., Qian J., Li J., Luo X., Shi L., He L., Xiang L., Xu X., Niu Y., Li Q., Han M. V., Yan H., Zhang J., Chen H., Lv A., Wang Z., Liu M., Schwartz D. C., Sun C. 2012. Genome sequence of the model medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. Nature Communications, 3, 913: doi: 10.1038/ncomms1923: 9 str.

- Childs R. E., Bardsley W. G. 1975. The steady-state kinetics of peroxidase with 2,2%-azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen. *Biochemical Journal*, 145: 93–103
- Claus H. 2004. Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron*, 35, 1-2: 93–96
- Copa-Patiño J. L., Kim Y. G., Broda P. 1993. Production and initial characterisation of the xylan-degrading system of *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 40, 1: 69–76
- Cosgrove D. J. 2005. Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6, 11: 850–861
- Černec F., Zule J., Moze A., Ivanuš A. 2005. Chemical and microbiological stability of waste sludge from paper industry intended for brick production. *Waste Management & Research*, 23, 2: 106–112
- Das A., Paul T., Halder S. K., Jana A., Maity C., Mohapatra P. K. D., Pati B.R., Mondal K. C. 2013. Production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus fumigatus* ABK9 in wheat bran-rice straw mixed substrate and use of cocktail enzymes for deinking of waste office paper pulp. *Bioresource Technology*, 128: 290–296
- Davison A. 2005. Ancient origin of glycosyl hydrolase family 9 cellulase genes. *Molecular Biology and Evolution*, 22, 5: 1273–1284
- Dermastia M. 2007. Pogled v rastine. Ljubljana, Nacionalni inštitut za biologijo: 273 str.
- Dyballa N., Metzger S. 2009. Fast and sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteins in polyacrylamide gels. *Journal of Visualized Experiments*, 30: e1431, doi:10.3791/1431: 4 str.
- Eichlerová I., Homolka L., Nerud F., Zadrazil F., Baldrian P., Gabriel J. 2000. Screening of *Pleurotus ostreatus* isolates for their ligninolytic properties during cultivation on natural substrates. *Biodegradation*, 11: 279–287
- Elisashvili V., Penninckx M., Kachlishvili E., Tsiklauri N., Metreveli E., Kharziani T., Kvesitadze G. 2008. *Lentinus edodes* and *Pleurotus species* lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. *Bioresource Technology*, 99: 457–462
- Fain Ž. 2008. Izboljšanje postopka čiščenja voda v podjetju Vipap Videm Krško d.d.. Diplomsko delo. Kranj, Univerza v Mariboru, Fakulteta za organizacijske vede, Smer Organizacija in management delovnih sistemov: 53 str.
- Fillat U., de Eugenio L. I., Martinez M. J. 2015. Assessing enzymatic deinking for secondary fibers paper recycling in the presence of flexographic inks. *Chemical Engineering Journal*, 260: 486–491
- Floudas D., Binder M., Riley R., Barry K., Blanchette R. A., Henrissat B., Martinez A. T., Otillar R., Spatafora J. W., Yadav J. S., Aerts A., Benoit I., Boyd A., Carlson A., Copeland A., Coutinho P. M., de Vries R. P., Ferreira P., Findley K., Foster B., Gaskell J., Glotzer D., Górecki P., Heitman J., Hesse C., Hori C., Igarashi K., Jurgens J. A., Kallen N., Kersten P., Kohler A., Kües U., Kumar T. K. A., Kuo A., LaButti K., Larondo L. F., Lindquist E., Ling A., Lombard V., Lucas S., Lundell T., Martin R., McLaughlin D. J., Morgenstern I., Morin E., Murat C., Nagy L. G., Nolan M., Ohm R. A., Patyshakuliyeva A., Rokas A., Ruiz-Dueñas F. J., Sabat G., Salamov A., Samejima M., Schmutz J., Slot J. C., St. John F., Stenlid J., Sun H., Sun S., Syed K., Tsang A., Wiebenga A., Young D., Pisabarro A., Eastwood D. C., Martin F., Cullen D., Grigoriev I. V., Hibbett D. S. 2012. The paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. *Science*, 336, 6089: 1715–

- 1719
- Freitas A. C., Ferreira F., Costa A. M., Pereira R., Antunes S. C., Gonçalves F., Rocha-Santosa T.A.P., Diniz M.S, Castrod L., Peres I., Duarte A. C. 2009. Biological treatment of the effluent from a bleached kraft pulp mill using basidiomycete and zygomycete fungi. *Science of the Total Environment*, 407, 10: 3282-3289
- Gadd G. M. 2007. Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioworking and bioremediation. *Mycological Research*, 111, 1: 3-49
- Gavrilescu M., Chisti Y. 2005. Biotechnology — a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnology Advances*, 23: 471-499
- González L. F., Sarria V., Sánchez O. F. 2010. Degradation of chlorophenols by sequential biological-advanced oxidative process using *Trametes pubescens* and TiO<sub>2</sub>/UV. *Bioresource Technology*, 101, 10: 3493-3499
- Gregori A., Švagelj M., Pohleven J. 2007. Cultivation techniques and medicinal properties of *Pleurotus* spp. *Food Technology and Biotechnology*, 45, 3: 238-249
- Gregori A., Švagelj M., Pahor B., Berovič M., Pohleven F. 2008. The use of spent brewery grains for *Pleurotus ostreatus* cultivation and enzyme production. *New Biotechnology*, 25, 2: 157-161
- Gutiérrez A., Del Río J. C., Martínez M. J., Martínez A. T. 2001. The biotechnological control of pitch in paper pulp manufacturing. *Trends in Biotechnology*, 19, 9: 340-348
- Harkin J. H., Obst J. R. 1973. Syringaldazine, an effective reagent for detecting laccase and peroxidase in fungi. *Experientia*, 37: 381-387
- Heinfling A., Bergbauer M., Szewzyk U. 1997. Biodegradation of azo and phthalocyanine dyes by *Trametes versicolor* and *Bjerkandera adusta*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48, 2: 261-266
- Hemsworth G. R., Henrissat B., Davies G. J., Walton P. H. 2014. Discovery and characterization of a new family of lytic polysaccharide monooxygenases. *Nature Chemical Biology*, 10, 2: 122-126
- Iandolo D., Piscitelli A. 2011. Enzyme production by solid substrate fermentation of *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor* on tomato pomace. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 163: 40-51
- ICP. 2015. Sestava papirniških muljev. Delovni nalog: Št. naročila: N15-RR7-15-1 in Št. naročila: N15-RR7-15/LP134. (n.d.). Ljubljana, Inštitut za celulozo in papir: 2 str.
- Index Fungorum. 2016. London, The Royal Botanic Gardens Kew; Lincoln, Landcare Research-NZ; Beijing, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Science: baza podatkov  
<http://www.indexfungorum.org> (februar 2016)
- Jegannathan K. R., Nielsen P. H. 2013. Environmental assessment of enzyme use in industrial production—a literature review. *Journal of Cleaner Production*, 42: 228-240
- Johannes C., Majcherczyk A. 2000. Laccase activity tests and laccase inhibitors. *Journal of Biotechnology* 78: 193-199
- Justo A., Hibbett D. S. 2011. Phylogenetic classification of *Trametes* (*Basidiomycota, Polyporales*) based on a five-marker dataset. *Taxon*, 60, 6: 1567-1583
- Kamali M., Khodaparast Z. 2015. Review on recent developments on pulp and paper mill wastewater treatment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 114: 326-342
- Kerem Z., Hadar Y. 1993. Effect of manganese on lignin degradation by *Pleurotus*

- ostreatus* during solid-state fermentation. Applied and Environmental Microbiology, 59, 12: 4115–4120
- Kaushik P., Malik A. 2009. Fungal dye decolourization: recent advances and future potential. Environment International, 35, 1: 127–141
- Khalil M. I., Hoque M. M., Basunia M. A., Alam N., Khan M. A. 2011. Production of cellulase by *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* in solid state fermentation of lignocellulosic biomass. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 35, 4: 333–341
- Kiiskinen L., Viikari L., Kruus K. 2002. Purification and characterisation of a novel laccase from the ascomycete *Melanocarpus albomyces*. Applied Microbiology and Biotechnology, 59: 198–204
- Kirk T. K., Cullen D. 1998. Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. V: Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry. Young R. A., Akhtar M. (eds.). New York, Wiley: 273-307
- Kleman-Leyer K. M., Siika-Aho M., Teeri T. T., Kent Kirk T. 1996. The cellulases endoglucanase I and cellobiohydrolase II of *Trichoderma reesei* act synergistically to solubilize native cotton cellulose but not to decrease its molecular size. Applied and Environmental Microbiology, 62, 8: 2883–2887
- Knežević A., Milovanović I., Stajić M., Lončar N., Brčeski I., Vukojević J., Ćilerdžić J. 2013. Lignin degradation by selected fungal species. Bioresource Technology, 138, 117–123
- Kortnik J., Černec F., Hrast K. 2008. Paper sludge layer as low permeability barrier on waste landfills. Soil & Sediment Contamination, 17, 4: 381–392
- Kurt S., Buyukalaca S. 2010. Yield performances and changes in enzyme activities of *Pleurotus* spp. (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*) cultivated on different agricultural wastes. Bioresource Technology, 101, 9: 3164–3169
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680–685
- Lee C. K., Ibrahim D., Omar I. C. 2012. Enzymatic deinking of various types of waste paper: efficiency and characteristics. Process Biochemistry, 48: 299-305
- Leonowicz A., Matuszewska A., Luterek J., Ziegenhagen D., Wojtaś-Wasilewska M., Cho N.-S., Hofrichter M., Rogalski, J. 1999. Biodegradation of lignin by white rot fungi. Fungal Genetics and Biology, 27, 2-3: 175–185
- Leontievsky A. A., Myasoedova N. M., Baskunov B. P., Evans C. S., Golovleva L. A. 2000. Transformation of 2,4,6-trichlorophenol by the white rot fungi *Panus tigrinus* and *Coriolus versicolor*. Biodegradation, 11, 5: 331–340
- Letno poročilo Vipap Videm Krško za leto 2012. 2013. Krško, Vipap Videm Krško d.d.: 69 str.  
<http://www.vipap.si/pdf/letna-porocila/vipap-videm-krsko-2012.pdf> (maj, 2016)
- Levasseur A., Piumi F., Coutinho P. M., Rancurel C., Asther M., Delattre M., Henrissat B., Pontarotti P., Asther M., Record E. 2008. FOLy: An integrated database for the classification and functional annotation of fungal oxidoreductases potentially involved in the degradation of lignin and related aromatic compounds. Fungal Genetics and Biology, 45, 5: 638-645
- Lever M. 1977. Carbohydrate determination with 4-hydroxybenzoic acid hydrazide (PAHBAH): Effect of bismuth on the reaction. Analytical Biochemistry, 81: 21–27
- Levin L., Herrmann C., Papinutti V. L. 2008. Optimization of lignocellulolytic enzyme

- production by the white-rot fungus *Trametes trogii* in solid-state fermentation using response surface methodology. Biochemical Engineering Journal, 39, 1: 207–214
- Likon M., Cernec F., Svegl F., Saarela J., Zimmie T. F. 2011. Papermill industrial waste as a sustainable source for high efficiency absorbent production. Waste Management, 31, 6: 1350–1356
- Likon M., Saarela J. 2012. The conversion of paper mill sludge into absorbent for oil spill sanitation - the life cycle assessment. Macromolecular Symposia, 320, 1: 50–56
- Ling Z. R., Wang S. S., Zhu M. J., Ning Y. J., Wang S. N., Li B., Yang A. Z., Zhang G. Q., Zhao X. M. 2015. An extracellular laccase with potent dye decolorizing ability from white rot fungus *Trametes* sp. LAC 01. International Journal of Biological Macromolecules, 81: 785–793
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, 193, 1: 265–275
- Maijala P., Kleen M., Westin C., Poppius-Levlin K., Herranen K., Lehto J. H., Reponen P., Maentausta O., Mettala A., Hatakka A. 2008. Biomechanical pulping of softwood with enzymes and white-rot fungus *Physisporinus rivulosus*. Enzyme and Microbial Technology, 43, 2: 169–177
- Manavalan T., Manavalan A., Heese K. 2015. Characterization of lignocellulolytic enzymes from white rot fungi. Current Microbiology, 70: 485–498
- Manzanares P., Fajardo S., Martin C. 1995. Production of ligninolytic activities when treating paper pulp effluents by *Trametes versicolor*. Journal of Biotechnology, 43, 2: 125–132
- Maria Rodrigues da Luz J., Dias Nunes M., Albino Paes S., Pereira Torres D., Cássia Soares da Silva M., Megumi Kasuya M. C. 2012. Lignocellulolytic enzyme production of *Pleurotus ostreatus* growth on agroindustrial wastes. Brazilian Journal of Microbiology, 43, 4: 1508–1515
- Marinšek Logar R. 1999. Opis ksilanolitičnega sistema vampne bakterije *Prevotella bryantii* B<sub>14</sub>. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 120 str.
- Maciel M. J. M., Ribeiro H. C. T. 2010. Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the *Basidiomycota*: a review. Electronic Journal of Biotechnology, 13, 6, doi: 10.2225/vol13-issue6-fulltext-2: 13 str.
- Martinez A. T., Speranza M., Ruiz-dueñas F. J., Ferreira P., Camarero S., Guillén F., Martinez M. J., Guitierrez A., Río J. C. 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. International Microbiology, 8: 195–204
- McDonald A. G., Boyce S., Moss G. P., Dixon H. B., Tipton K. F. 2007. ExplorEnz: a MySQL database of the IUBMB enzyme nomenclature. BMC Biochemistry, 8: 14, doi: 10.1186/1471-2091-8-14: 7 str.
- Mehna A., Bajpai P., Bajpai P. K. 1995. Studies on decolorization of effluent from a small pulp mill utilizing agriresidues with *Trametes versicolor*. Enzyme and Microbial Technology, 17, 1: 18–22
- Michelin M., Polizeli M. de L. T. M., Ruzene D. S., Silva D. P., Teixeira J. A. 2014. Application of Lignocelulosic Residues in the Productin of cellulase and hemicellulase from fungi. V: Fungal enzymes. Polizeli M. de L. T. M., Rai M. (eds.). Boca Raton, CRC Press: 31–64
- Monte M. C., Fuente E., Blanco A., Negro C. 2009. Waste management from pulp and

- paper production in the European Union. *Waste Management*, 29, 1: 293–308
- More S. S., Renuka P. S., Pruthvi K., Swetha M., Malini S., Veena S. M. 2011. Isolation, purification, and characterization of fungal laccase from *Pleurotus* sp. *Enzyme Research*, 2011: 248725, doi: 10.4061/2011/248735: 7 str.
- Moreau A., Montplaisir D., Sparling R., Barnabé S. 2014. Hydrogen, ethanol and cellulase production from pulp and paper primary sludge by fermentation with *Clostridium thermocellum*. *Biomass and Bioenergy*, 72: 256–262
- NCBI. 2016. NCBI Protein Database. Bethesda, National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine: baza podatkov <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein> (februar, 2016)
- Pavlík M., Pavlík Š. 2013. Wood decomposition activity of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) isolate in situ. *Journal of Forest Science*, 59, 1: 28–33
- PDB. 2016. Protein Data Bank. Piscataway, Rutgers, The State University of New Jersey Center for Integrative Proteomics Research; San Diego, San Diego Supercomputer Center and Skaggs School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, University of California: podatkovna zbirka <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do> (december, 2015)
- Percival Zhang Y.-H., Himmel M. E., Mielenz J. R. 2006. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*, 24, 5: 452–481
- Piontek K. 2002. Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-A resolution containing a full complement of coppers. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 40: 37663–37669
- Pokhrel D., Viraraghavan T. 2004. Treatment of pulp and paper mill wastewater-a review. *Science of the Total Environment*, 333, 1-3: 37–58
- Polizeli M. L. T. M., Rizzatti A. C. S., Monti R., Terenzi H. F., Jorge J. A., Amorim D. S. 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67, 5: 577–591
- Prasetyo E. N., Semlitsch S., Nyanhongo G. S., Lemmouchi Y., Guebitz G. M. 2016. Laccase oxidation and removal of toxicants released during combustion processes. *Chemosphere*, 144: 652–660
- Prates É. T., Stankovic I., Silveira R. L., Liberato M. V., Henrique-Silva F., Pereira N., Polikarpov I., Skaf M. S. 2013. X-ray Structure and molecular dynamics simulations of endoglucanase 3 from *Trichoderma harzianum*: structural organization and substrate recognition by endoglucanases that lack cellulose binding module. *PLoS ONE*, 8, 3: e59069, doi: 10.1371/journal.pone.0059069: 11 str.
- Prillinger H., Esser K. 1975. The phenoloxidases of the ascomycete *Podospora anserina* XIII. Action and interaction of genes controlling the formation of laccase. *Molecular and General Genetics*, 156: 333–345
- Pruitt K. D., Tatusova T., Maglott D. R. 2005. NCBI Reference Sequence (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucleic Acids Research*, 33: 501-504
- Qinnghe C., Xiaoyu Y., Tiangui N., Cheng J., Qiugang M. 2004. The screening of culture condition and properties of xylanase by white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Process Biochemistry*, 39, 11: 1561–1566
- Rebelo Barreto Xavier M. A., Mora Tavares A. P., Ferreira R., Amado F. 2007. *Trametes versicolor* growth and laccase induction with by-products of pulp and paper industry.

- Electronic Journal of Biotechnology, 10, 3: 444–451
- Reid I. D., Paice M. G. 1994. Biological bleaching of kraft pulps by white-rot fungi and their enzymes. FEMS Microbiology Reviews, 13, 2: 369–375
- Riley R., Salamov A. A., Brown W., Nagy L. G., Floudas D., Held B. W., Levasseur A., Lombard V., Morin E., Otillar R., Lindquist E. A., Sun H., LaButti K. M., Schmutz J., Jabbour D., Lou H., Baker S. E., Pisabarro A. G., Walton J. D., Blanchette R. A., Henrissat B., Martin F., Cullen D., Hibbett D. S., Grigoriev I. V. 2014. Extensive sampling of basidiomycete genomes demonstrates inadequacy of the white-rot / brown-rot paradigm for wood decay fungi. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 111, 41: 14959–14959
- Rodriguez Couto S., Toca Herrera J. L. 2006. Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. Biotechnology Advances, 24: 500–513
- Sandgren M., Shaw A., Ropp T. H., Wu S., Bott R., Cameron A. D., Stahlberg J., Mitchinson C., Jones T. A. 2001. The X-ray crystal structure of the *Trichoderma reesei* family 12 endoglucanase 3, Cel12A, at 1.9 Å resolution. Journal of Molecular Biology, 308, 2: 295–310
- Sanglimsuwan S., Yoshida N., Morinaga T., Murooka Y. 1993. Resistance to and uptake of heavy metals in mushrooms. Journal of Fermentation and Bioengineering, 75, 2: 112–114
- Schuetz M., Benske A., Smith R. A., Watanabe Y., Tobimatsu Y., Ralph J., Demura T., Ellis B., Samuels A. L. 2014. Laccases direct lignification in the discrete secondary cell wall domains of protoxylem. Plant Physiology, 166, 2: 798–807
- Sharma A., Thakur V. V., Shrivastava A., Jain R. K., Mathur R. M., Gupta R., Kuhad R. C. 2014. Xylanase and laccase based enzymatic kraft pulp bleaching reduces adsorbable organic halogen (AOX) in bleach effluents: A pilot scale study. Bioresource Technology, 169: 96–102
- Silva R. N. 2014. Regulation of plant cell wall degrading enzymes formation in filamentous fungi. V: Fungal enzymes. Polizeli M. de L. T. M., Rai M. (eds.). Boca Raton, CRC Press: 173–213
- Singh A. P., Singh T. 2014. Biotechnological applications of wood-rotting fungi : a review. Biomass and Bioenergy, 62: 198–206
- Singh P., Sulaiman O., Hashim R., Rupani P. F., Peng L. C. 2010. Biopulping of lignocellulosic material using different fungal species: a review. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 9, 2: 141–151
- Sławińska A., Kalbarczyk J. 2011. Evaluation of enzymatic activity of *Pleurotus ostreatus* regarding stages of mycelium development. Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus, 10, 2: 195–202
- Srebotnik E., Hammel K. E. 2000. Degradation of nonphenolic lignin by the laccase/1-hydroxybenzotriazole system. Journal of Biotechnology, 81: 179–188
- Téllez-Téllez M., Fernández F. J., Montiel-González A. M., Sánchez C., Díaz-Godínez G. 2008. Growth and laccase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation. Applied Microbiology and Biotechnology, 81, 4: 675–679
- Thompson G., Swain J., Kay M., Forster C. F. 2001. The treatment of pulp and paper mill effluent: A review. Bioresource Technology, 77, 3: 275–286
- Ting W. T. E., Yuan S. Y., Wu S. D., Chang B. V. 2011. Biodegradation of phenanthrene and pyrene by *Ganoderma lucidum*. International Biodeterioration & Biodegradation, 65, 1: 238–242

- Tišma M., Žnidaršič-Plazl P., Vasić-Rački Đ., Zelić B. 2012. Optimization of laccase production by *Trametes versicolor* cultivated on industrial waste. *Applied Biochemistry & Biotechnology*, 166: 36–46
- Tlecuitl-Beristain S., Sánchez C., Loera O., Robson G. D., Díaz-Godínez G. 2008. Laccases of *Pleurotus ostreatus* observed at different phases of its growth in submerged fermentation: production of a novel laccase isoform. *Mycological Research*, 112: 1080-1084
- Van den Brink J., de Vries R. P. 2011. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91, 6: 1477-1492
- Van Driessel B., Christov L. 2001. Decolorization of bleach plant effluent by mucoralean and white-rot fungi in a rotating biological contactor reactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92, 3: 271–276
- Velazquez-Cedeno M. A., Mata G., Savoie J. M. 2002. Waste-reducing cultivation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius* on coffee pulp: changes in the production of some lignocellulolytic enzymes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18, 3: 201–207
- Vendrell À., Gonza B., Teresa À., Cosson T., Pe A. M. 1999. Enzymatic assays for xylanase and  $\beta$ -glucanase feed enzymes. *Animal Feed Science and Technology*, 77: 345-353
- Vidic I. 2008. Razgradnja kloriranih organskih biocidov z lignolitičnimi glivami. Magistrsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 104 str.
- Wasser S. P., Weis A. L. 1999. Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: Current perspectives (Review). *Critical Reviews in Immunology*, 19, 1: 65-96
- Yoon L. W., Ang T. N., Ngoh G. C., Chua A. S. M. 2014. Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. *Biomass and Bioenergy*, 67: 319–3383
- Zdobnov E. M., Apweiler R. 2001. InterProScan—an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro. *Bioinformatics*, 17, 9: 847-848
- Zhang Y. H. P., Hong J., Ye X. 2009. Cellulase assays. V: *Biofuels*. Vol. 581. Mielenz J. R. (eds.). New York, Humana Press: 213–231

## ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem prof. dr. Romani Marinšek Logar za pobudo, strokovni pregled naloge, napotke tekom dela in nalezljivo navdušenje. Zahvaljujem se svoji mentorici doc. dr. Maši Vodovnik za mentorstvo, vso podporo, strokovno pomoč pri nastajanju in pisanju magistrskega dela in "SDS PAGE tutorial". Hvala mojim neuradnim, a nepogrešljivim mentorjem: dr. Miji Sežun za budno spremljanje poteka dela, strokovno pomoč, nenehno dosegljivost in odlično sodelovanje ter dr. Andreju Gregoriju za seve, raziskovalno opremo in prostor, skrb za zmrzovanje kultur ostrigarjev, pomoč, dobro voljo in idilo v Podkoren. Hvala vsem iz katedre za mikrobiologijo in mikrobiološko biotehnologijo, predvsem Marti za potrpežljivost in iskanje kemikalij in vsem, ki so preživljali z mano ure v laboratoriju. Hvala doc. dr. Tomažu Accettu za strokovne nasvete. Hvala zaposlenim iz podjetja Mycomedica in Inštituta za celulozo in papir, ki so pomagali pri izvedbi dela, še posebej Marku z ICP za homogenizacijo vseh vzorcev. Hvala zaposlenim iz Vipapa za obsežno ekskurzijo po papirnici.

Hvala staršem za spodbudo in finančno podporo tekom študija in vsem družinskim članom za podporo in pričakovanja. Hvala najboljšim cimram iz štirinajstke za skupinska ponočevanja (ob člankih), klepete in interne šale. Hvala kolegom biologom, mikrobiologom in biotehnologom za zanimive ure preživete na fakulteti in na terenu. Hvala vsem prijateljem, ki (še) vedno vztrajate z mano.

## PRILOGE

### Priloga A: Vsebnost vlage v muljih.

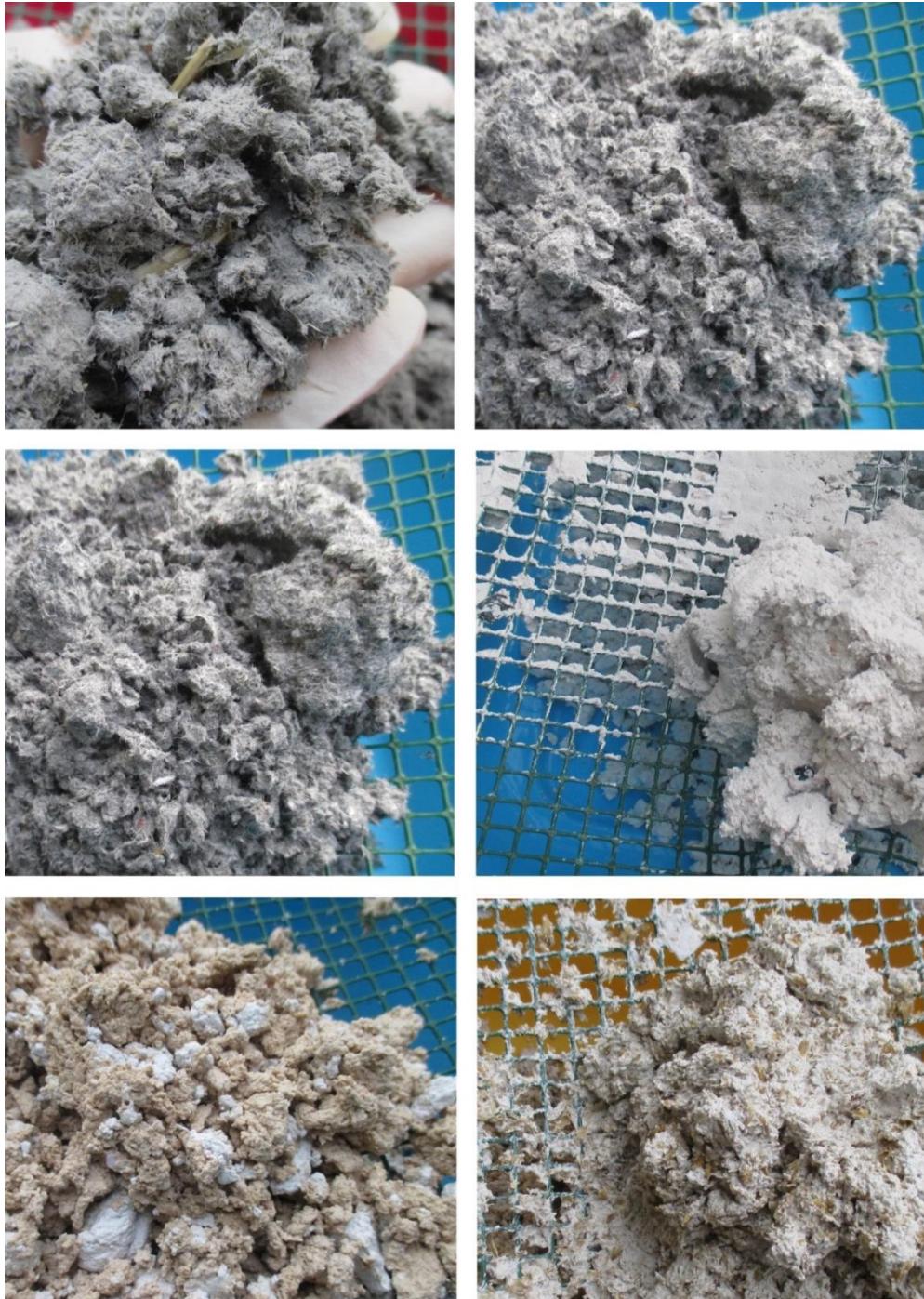
Muljem, ki so vsebovali manj kot 65 % vlage smo odstotek vlage popravili na 65%. Odstotek vlage mulja DIP v poskusu 1 in 2 se je razlikoval (<sup>1,2</sup>). Okrajšave: mulj, ki nastane na kemijsko mehanski čistilni napravi (KMČN), mulj, ki nastane v tehnološkem postopku proizvodnje papirne gošče iz recikliranih vlaken po postopku razsivitve (DIP), čist papirniški mulj iz papirnice Vevče (VEV), mešani papirniški mulj iz papirnice Vevče (VEV MIX).

Mulj/mešanica	DIP	KMČN	VEV	VEV MIX	VEV+tropine
% vlage	60,9 % <sup>1</sup> , 48 % <sup>2</sup> ,	29,5 %	54 %	68,7 %	63,2 %

### Priloga B: Žarilna izguba, vsebnost težkih kovin, dušika in skupni organski ogljik mulja KMČN in DIP (ICP, 2015).

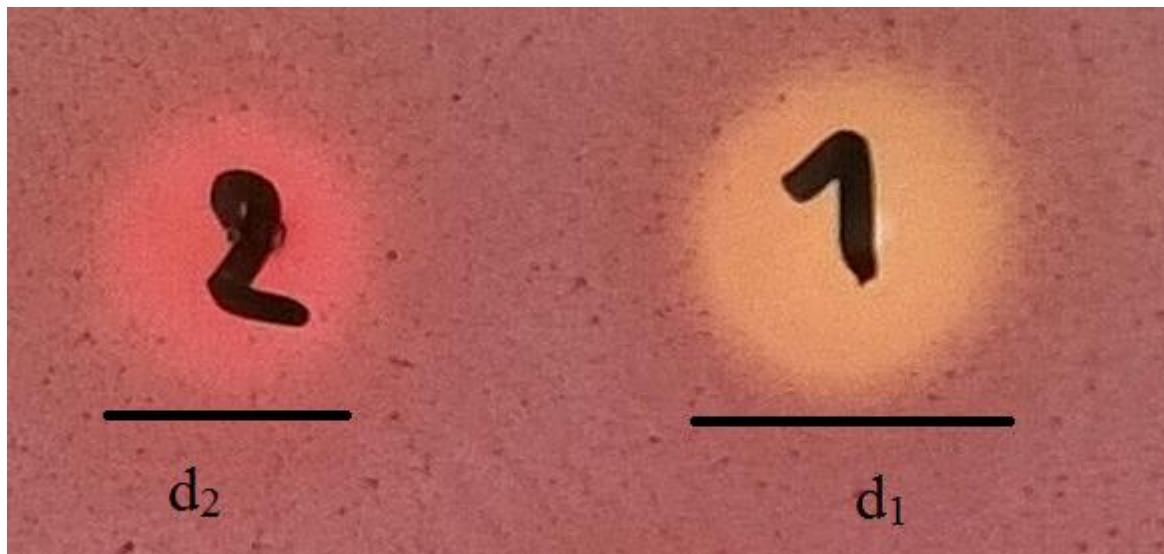
Okrajšave: mulj, ki nastane na kemijsko mehanski čistilni napravi (KMČN), mulj, ki nastane v tehnološkem postopku proizvodnje papirne gošče iz recikliranih vlaken po postopku razsivitve (DIP), suha snov (s.s.), skupni organski ogljik (TOC).

Parameter	Enota	Izmerjena vrednost za mulj KMČN	Izmerjena vrednost za mulj DIP
Suhi ostanek	%	87,82	61,35
Žarilna izguba	%	37,99	57,68
Baker	mg/kg s.s.	88,32 (>11,67)	64,99 (>11,67)
TOC	%	25,38	34,53
Cink	mg/kg s.s.	154,1	84,9
Kadmij	mg/kg s.s.	0,3	0,4
Celotni krom	mg/kg s.s.	8,3	11,6
Nikelj	mg/kg s.s.	1,6	2,2
Svinec	mg/kg s.s.	15,59 (>6,7)	17,04 (>6,7)
Živo srebro	mg/kg s.s.	0,30	0,09
Celoten dušik	%	0,23	1,48



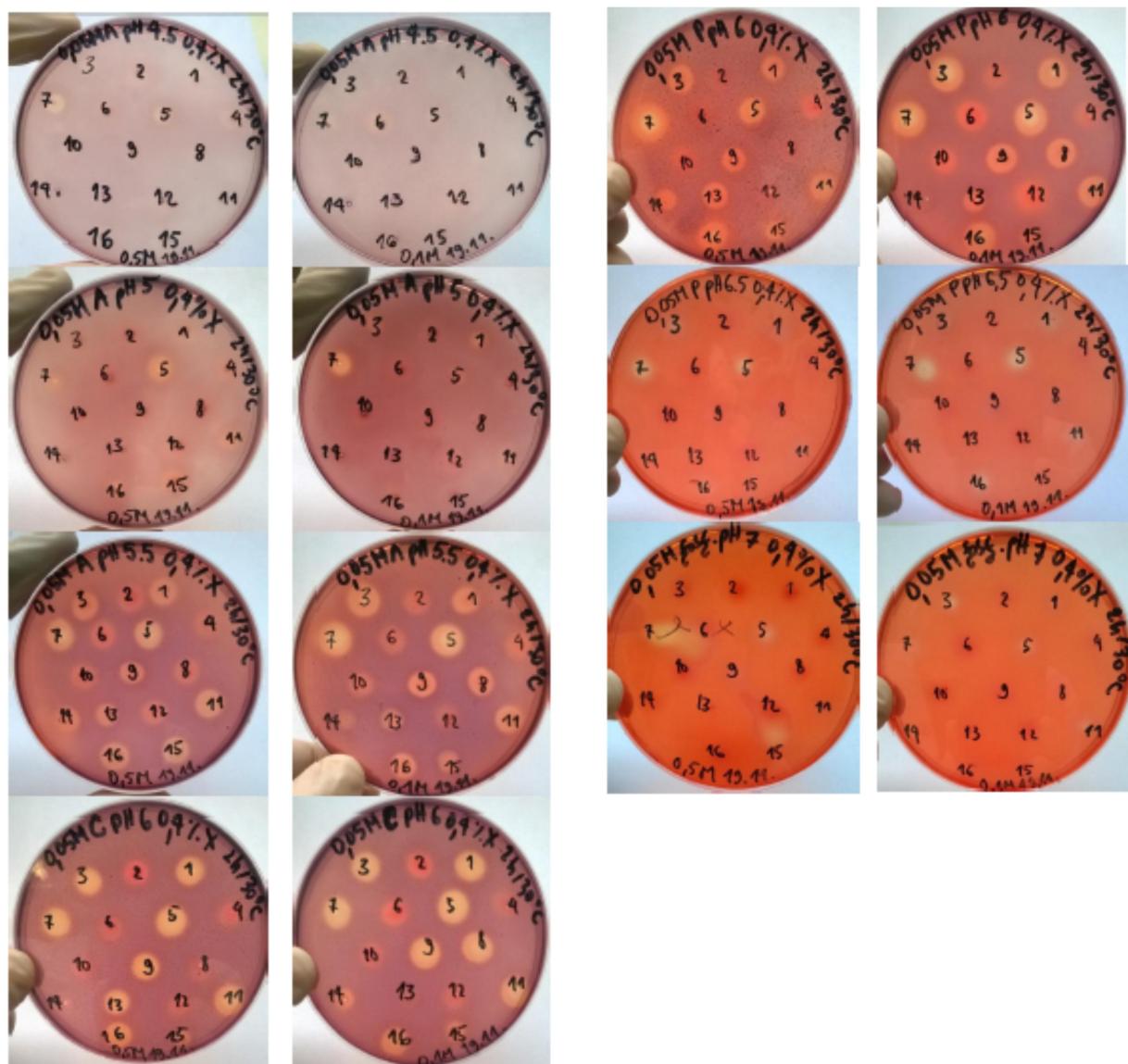
**Priloga C: Različni papirniški mulji.**

Od leve proti desni: zgoraj DIP in KMČN1, v sredini KMČN2 in VEV, spodaj VEV MIX in VEV+tropine. Okrajšave: mulj, ki nastane na kemijsko mehanski čistilni napravi (KMČN), mulj, ki nastane v tehnološkem postopku proizvodnje papirne gošče iz recikliranih vlaken po postopku razsivitve (DIP), čist papirniški mulj iz papirnice Vevče (VEV), mešani papirniški mulj iz papirnice Vevče (VEV MIX). KMČN1 in KMČN2 sta mulja odvzeta ob različnih časih. Mulj KMČN1 smo uporabili za presejalno testiranje gojenja gliv bele trohnobe (poskus 1).



**Priloga D: Kvalitativno vrednotenje presejalnih testov encimske aktivnosti na agaroznih ploščah.**

Na ploščah so pri toplotno inaktiviranih negativnih kontrolah vidne difuzijske cone pufrja, ki so posledica razlik v pH med agarozno ploščo in encimskim ekstraktom. Če je bila cona razgradnje substrata ( $d_1$ ) manjša ali enako velika od pripadajoče difuzijske cone pufrja ( $d_2$ ) smo cono razgradnje označili z znakom (+). Če je bila cona razgradnje substrata ( $d_1$ ) večja od difuzijske cone pufrja ( $d_2$ ) smo cono razgradnje označili z dvemi znaki (++).



**Priloga E: Slikovni prikaz ugotavljanja optimalnega pH območja ksilanaz v encimskih ekstraktih.**  
Testirali smo encimsko aktivnost v 0,5 M acetatnem pufru pH 4,5, pH 5 in pH 5,5, citratnem pufru pH 6, fosfatnem pufru pH 6, pH 6,5 in pH 7. Inkubirali smo 2 h pri 30 °C.

**Priloga F: Endoglukanazna, ksilanazna in lakazna encimska aktivnost *P. ostreatus* PLAB na mulju DIP.**

Povprečne encimske aktivnosti v grobih encimskih ekstraktih *P. ostreatus* PLAB na mulju, ki nastane v postopku razsivitve (DIP) (poskus 2), ki so prikazane na sliki 10, sliki 11 in sliki 13.

Čas gojenja (dnevi)	Povprečna endoglukanazna aktivnost ( $\mu\text{mol RS (min}^{-1}\text{)(g}^{-1}\text{) mulja}$ )	Povprečna ksilanazna aktivnost ( $\mu\text{mol RS (min}^{-1}\text{)(g}^{-1}\text{) mulja}$ )	Povprečna lakazna aktivnost ( $\mu\text{mol ABTS}^{\bullet+}\text{(min}^{-1}\text{)(g}^{-1}\text{) mulja}$ )	Povprečna koncentracija proteinov (mg proteinov/g mulja)
16	1,8 ( $\pm 0,4$ )	3,7 ( $\pm 0,5$ )	7 ( $\pm 2$ )	1,5 ( $\pm 0,3$ )
23	2,8 ( $\pm 0,4$ )	3,5 ( $\pm 0,7$ )	30 ( $\pm 7$ )	2,0 ( $\pm 0,3$ )
30	2,0 ( $\pm 0,1$ )	2,3 ( $\pm 0,4$ )	46 ( $\pm 5$ )	2,4 ( $\pm 0,3$ )
37	2,0 ( $\pm 0,3$ )	2,4 ( $\pm 0,6$ )	49 ( $\pm 5$ )	2,4 ( $\pm 0,3$ )
44	1,8 ( $\pm 0,5$ )	3,7 ( $\pm 0,5$ )	42 ( $\pm 4$ )	2,4 ( $\pm 0,2$ )
51	1,5 ( $\pm 0,2$ )	1,7 ( $\pm 0,4$ )	36 ( $\pm 1$ )	2,3 ( $\pm 0,2$ )

**Priloga G: Primerjava endoglukanazne aktivnosti *P. ostreatus* pri gojenju na lignoceluloznih substratih in na mulju DIP.**

Najvišje povprečne encimske aktivnosti smo primerjali s podatki iz literature. Za primerjavo smo dodali podatke o času gojenja, substratu, metodi določanja RS in načinu gojenja. Encimske aktivnosti so izražene kot količina encima, ki sprosti 1  $\mu\text{mol}$  reducirajočih sladkorjev (glukoze) na minuto na g oz. na ml substrata. Okrajšave: določanje reducirajočih sladkorjev z metodo z dinotrosalicilno kislino (DNS) ali z metodo s hidrazid p-hidroksi benzojevo kislino (PAHBAH), gojenje na trdnem gojišču (SSF), gojenje v tekočem gojišču (SF), mulj, ki nastane v tehnološkem postopku proizvodnje papirne gošče iz recikliranih vlaken po postopku razsivitve (DIP).

Vir	Maksimalna encimska aktivnost <i>P. ostreatus</i> ( $\mu\text{mol RS}$ ( $\text{min}^{-1}$ )( $\text{g}^{-1}$ ))	Čas gojenje ob maks. encimski aktivnosti (dnevi)	Substrat	Metoda	SSF/SF
Velazquez-Cedeno in sod. (2002)	1,4	27 (v fazi fruktifikacije)	Kavna gošča (500 g v 1500 ml vode)	Določanje reducirajočih sladkorjev z DNS	SSF
Kurt in Buyukalaca (2010)	2,2	20 (ob prvi fruktifikaciji)	Slama riža in pšenice + otrobi, namočeni do 70 % vlage	Določanje reducirajočih sladkorjev z DNS	SSF
Khalil in sod. ( 2011)	7,1	12	Slama riža, namočena do 80 % vlage, tretirana z 1 % NaOH	Določanje reducirajočih sladkorjev z DNS	SSF
Naša vrednost- poskus 1	4,4 ( $\pm 0,2$ )	23	mulj DIP	Določanje reducirajočih sladkorjev s PAHBAH metodo	SSF (65 % vlage)
Naša vrednost- poskus 2	2,8( $\pm 0,5$ )	23	mulj DIP	Določanje reducirajočih sladkorjev s PAHBAH metodo	SSF (65 % vlage)

**Priloga H: Primerjava ksilanazne aktivnosti *Pleurotus* sp. pri gojenju na lignoceluloznih substratih in na mulju DIP.**

Najvišje povprečne encimske aktivnosti smo primerjali s podatki iz literature. Za primerjavo smo dodali podatke o času gojenja, substratu, metodi določanja RS in načinu gojenja. Encimske aktivnosti so izražene kot količina encima, ki sprosti 1 µmol reducirajočih sladkorjev (ksiloze) na minuto na g oz. na ml substrata. Okrajšave: določanje reducirajočih sladkorjev z metodo z dinotrosalicilno kislino (DNS) ali z metodo s hidrazid p-hidroksi benzojevo kislino (PAHBAH), gojenje na trdnem gojišču (SSF), gojenje v tekočem gojišču (SF), mulj, ki nastane v tehnološkem postopku proizvodnje papirne gošče iz recikliranih vlaken po postopku razsivitve (DIP).

Vir	Maksimalna encimska aktivnost	Čas gojenje ob maks. encimski aktivnosti (dnevi)	Substrat	Metoda	SSF/SF
<b>Pleurotus sp.</b>					
	(µmol RS (min <sup>-1</sup> )(g <sup>-1</sup> ))				
Elisashvili in sod. (2008)	54,1 (SSF)* in 168 (SF)*	*Aktivnosti podane na dan gojenja	Listi ( <i>Fagus sylvatica</i> ) in slama pšenice	Določanje reducirajočih sladkorjev z DNS metodo	SF in SSF
Iandolo in Piscitelli (2011)	9	2	Ostanki paradižnika	Določanje reducirajočih sladkorjev z DNS metodo	SSF
Qinnghe in sod. (2004)	24,98	7	Koruzne sestavine in pšenični otrobi, pepton	Določanje reducirajočih sladkorjev z DNS metodo	SF
Naša vrednost- poskus št. 1	5,5 (± 0,4)	23	mulj DIP	Določanje reducirajočih sladkorjev s PAHBAH metodo	SSF (65 % vlage)
Naša vrednost- poskus št. 2	3,7 (± 0,5)	16 in 44	mulj DIP	Določanje reducirajočih sladkorjev s PAHBAH metodo	SSF (65 % vlage)

**Priloga I: Primerjava lakazne aktivnosti *P. ostreatus* pri gojenju na lignoceluloznih substratih in na mulju DIP.**

Najvišje povprečne encimske aktivnosti smo primerjali s podatki iz literature. Za primerjavo smo dodali podatke o času gojenja, substratu, metodi določanja encimske aktivnosti in načinu gojenja. Encimsko enoto smo definirali kot količino encima, ki pretvori 1 µmol ABTS v radikal ABTS•+/min na g substrata(SSF), ml gojišča (SF) ali ekstrakta(SSF). Okrajšave: določanje reducirajočih sladkorjev z metodo z dinitrosalicilno kislino (DNS) ali z metodo s hidrazid p-hidroksi benzojevo kislino (PAHBAH), gojenje na trdnem gojišču (SSF), gojenje v tekočem gojišču (SF), mulj, ki nastane v tehnološkem postopku proizvodnje papirne gošče iz recikliranih vlaken po postopku razsivitve (DIP).

Vir	Lakazna aktivnost <i>P. ostreatus</i>	Čas gojenje ob maks. encimski aktivnosti (dnevi)	Substrat	Metoda	SSF/SF
Castanera in sod. (2012)	0,6 µmol ABTS•+ (min⁻¹)(g⁻¹)	9	Slama pšenice (liofilizirana)	ABTS	SSF (70 % vlage)
Gregori in sod. (2008)	0,3 (±0,1) µmol ABTS•+ (min⁻¹)(ml⁻¹)	33	Otrobi pšenice in pivske tropine	ABTS	SSF (65 % vlage)
Knežević in sod. (2013)	4,8 (±0,2) µmol ABTS•+ (min⁻¹)(g⁻¹)	14	Slama pšenice	ABTS	SSF
Naša vrednost poskus št. 2	49 (± 5) µmol ABTS•+ (min⁻¹)(g⁻¹)	37	Mulj DIP	ABTS	SSF (65 % vlage)