

Primena gljiva koje razgrađuju lignocelulozu za proizvodnju bioetanola iz obnovljive biomase

Jelena M. Jović¹, Jelena D. Pejin², Sunčica D. Kocić-Tanackov², Ljiljana V. Mojović¹

¹Tehnološko–metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

²Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, Srbija

Izvod

Predtretman predstavlja neophodan korak u procesu konverzije lignocelulozne biomase do etanola. On unapređuje enzimsku hidrolizu promenama u strukturi lignoceluloze, ali je često utrošak energije za predtretman veliki i/ili se primenjuju skupe i toksične hemikalije, što proces čini ekonomski i ekološki nepogodnim. Primena lignocelulolitičkih gljiva (iz klase Ascomycetes, Deuteromycetes i Basidiomycetes) je atraktivna metoda za predtretman, ekološki prihvatljiva i ne zahteva ulaganje energije. U ovom radu su predstavljeni mehanizmi razgradnje lignoceluloze pomoću gljiva. One proizvode širok spektar enzima i hemijskih supstanci kojima uspešno razgrađuju lignocelulozu, ali i aromatične polimere slične strukturu ligninu. U ovom radu je prikazana mogućnost njihove primene u tehnologiji proizvodnje bioetanola, a navedene su i prednosti i nedostaci biološkog predtretmana.

Ključne reči: biološki predtretman, fungalni enzimi, bioetanol, fermentacija na čvrstom supstratu, lignocelulozna biomasa.

Dostupno na Internetu sa adrese časopisa: <http://www.ache.org.rs/HI/>

Napredak u nauci i medicini, razvoj industrije i unapređenje poljoprivredne proizvodnje omogućili su kvalitetniji i duži život ljudi, ali su, eksplozija ljudske populacije i nesavesno ponašanje većine, stvorili brojne probleme: uvećane su potrebe za hranom, energijom i prostorom; izmenjeni ili uništeni brojni ekosistemi; uvećane količine akumuliranog otpada, a sa njima i zdravstveni i bezbednosni rizici. Zbog intenzivne upotrebe fosilnih sirovina (za proizvodnju energije, brojnih neopodnih hemikalija, proizvoda poput plastike), danas se susrećemo sa dva značajna problema [1]:

1. predviđa se nestanak prirodnih rezervi fosilnih sirovina u narednim godinama;

2. uočen je značajan negativan uticaj na životnu sredinu povezan sa njihovom upotrebom.

Radi prevazilaženja navedenih problema, danas se sve više teži: održivom razvoju (koji podrazumeva reciklažu otpadnog materijala i korišćenje obnovljivih resursa – vode, vazduha i biomase), alternativnim izvorima energije i čistijoj, ekološki prihvatljivoj proizvodnji.

Iz biomase se potrebne hemikalije dobijaju fermentacijom šećernog supstrata ili hemijskom sintezom produkata fermentacije, zbog čega se, svaki materijal koji u sebi sadrži šećere, može koristiti u biotehnoškoj proizvodnji. Prema tipu sirovog materijala sirovine na bazi biomase se dele na šećerne (šećerna repa, šećerna trska, sirak, voće i dr.), skrobne (kukuruz, pšenica, pirinač i dr.) i lignocelulozne [2,3]. Prema poreklu sirovog

PREGLEDNI RAD

UDK 662.754:66:58

Hem. Ind. 69 (6) 627–641 (2015)

doi: 10.2298/HEMIND140916086J

materijala i procesu transformacije dele se na [1]: sirovine prve generacije (poljoprivredne kulture), druge generacije (lignocelulozni i drugi otpad) i treće generacije (fermentativne i fotosintetičke bakterije i alge) – tabela 1.

Lignoceluloznu biomasu čine suvi ostaci biljaka. Veoma je važan obnovljivi izvor energije i jedini je obnovljivi izvor ugljenika. Sastoji se od lignina (aromatičnog polimera) i polisaharida (hemiceluloze i celuloze). Hemijske karakteristike strukturnih komponenata čine je veoma vrednim biotehnoškim supstratom, ali njena primena zahteva uklanjanje lignina i oslobađanje fermentabilnih šećera iz polisaharida, zbog čega su savremena istraživanja usmerena ka pronalaženju efektivne metode kojom se može dobiti visok prinos šećera.

Biološki predtretman podrazumeva konverziju biomase lignocelulolitičkim organizmima; bezbedan je, ekološki prihvatljiv i ne zahteva puno energije za uklanjanje lignina, bez obzira na njegovu obimnu razgradnju. Do 1976. godine je sakupljeno više od 14000 gljiva koje razgrađuju celulozu i druga nerastvorljiva vlakna [4]. Saprofitne gljive klase Agaricomycetes su još krajem karbona razvile sposobnost degradacije lignina [5].

Tekuća istraživanja su usmerena i na primenu fungálnih ligninolitičkih mehanizama u procesu bioremedijacije (transformacije ili razgradnje opasnih supstanci do bezbednih ili manje opasnih). Zahvaljujući nespecifičnom enzimskom sistemu, sačinjenom od lakaza i lignin-, mangan- i verzatil-peroksidaza, gljive su u stanju da razgrađuju složene aromatične polimere, slične strukturu kao lignin – pesticide, poliaromatične ugljovodnike (PAH), polihlorovane bifenile (PCB), boje [6].

Prepiska: Lj. Mojović, Tehnološko–metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Karnegijeva 4, 11000 Beograd, Srbija.

E-pošta: lmojovic@tmf.bg.ac.rs

Rad primljen: 16. septembar, 2014

Rad prihvaćen: 28. novembar, 2014

Tabela 1. Podela i karakteristike sirovina biomase prema poreklu sirovog materijala i procesu transformacije
 Table 1. Classification and characteristics of biomass feedstocks according to origin of raw materials and transformation process

Vrsta sirovine	Poreklo sirovine	Karakteristike
Sirovine prve generacije	Koriste se u ishrani, poreklom su iz poljoprivredne proizvodnje: skrobni, šećerni i uljani usevi (uljarice)	Visok sadržaj šećera ili ulja; visoka cena zbog kompeticije sa hranom
Sirovine druge generacije	Nejestive sirovine: lignocelulozna biomasa i materijal zaostao nakon različitih procesa u poljoprivredi, prehrambenoj industriji i šumarstvu kao i usevi namenjeni proizvodnji energije	Ekonomski povoljnije sirovine; konverzija znatno kompleksnija zbog otpornosti celulozne biomase prema razgradnji.
Sirovine treće generacije	Širok spektar fermentativnih i fotosintetičkih bakterija i alge, koje se za sada proučavaju kao biokatalizatori	Visok sadržaj ulja, ugljenih hidrata ili proteina u njima, prepoznate kao izvanredne sirovine

U ovom radu su opisani mehanizmi razgradnje lignoceluloznog supstrata pomoću gljiva i, kroz različite proizvodne faze, od predtretmana do fermentacije, prikazana je mogućnost njihove primene u tehnologiji proizvodnje bioetanol. Cilj je bio, pre svega, da se predstavi jeftina metoda predtretmana, koja ne zahteva ulaganje energije niti primenu skupih hemikalija. Kroz pregled radova, dosadašnjih istraživanja biološkog predtretmana, ukazano je na prednosti i nedostatke ove metode.

ZNAČAJ BIOETANOLA

Bioetanol predstavlja alternativu fosilnom gorivu. Njegova važnost je, poslednjih godina, porasla zbog potrebe da se smanji zavisnost od sve iscrpljenijih fosilnih resursa, kao i emisija gasova koji uvećavaju efekat staklene bašte. Proizvodnja iz obnovljivih sirovina čini etanol CO₂-neutralnim: ugljen-dioksid oslobođen njegovim sagorevanjem je apsorbovan u toku fotosinteze i iskorišćen za rast biljke. Etanol omogućava čistije sagorevanje i bolje performanse motora, što doprinosi smanjenju emisije polutanata čak i kada se samo pomeša sa benzinom [3,7]. Biorazgradiv je i efikasniji nego konvencionalna goriva; karakteriše ga veći oktanski broj u odnosu na konvencionalna goriva; njegovim sagorevanjem oslobađa se značajna količina toplote i praktično je bez sumpora [8]. Razmatra se i njegova primena u proizvodnji biodizela umesto metanola: u odnosu na metanol nije toksičan i na taj način bi se dobio kompletno biljni biodizel. Proizvodnja bioetanol omogućava zemljama – koje ne poseduju fosilne – oslanjanje na sopstvene resurse i smanjenu zavisnost od uvoza energenata. Trenutno se dobija iz skrobnih i šećernih sirovina koje se koriste i u ishrani, pa bi primena jeftinih sirovina (poput lignoceluloznog otpada) mogla da obezbedi nižu cenu, a zalihe hrane ne bi bile ugrožene. Procenjuje se da se iz poljoprivrednog otpada i neiskorišćenih kultura može proizvesti oko 491 milijardi litara bioetanol godišnje [9]. Proizvodnja goriva bioetanol u svetu je od 2001. do 2011. godine porasla sa 31 na 88,7 milijardi litara [10]. Očekuje se da će do 2020. pro-

izvodnja dostići 125 milijardi litara [11]. Najveći proizvođači u svetu su Brazil i Sjedinjene Američke Države (62% svetske proizvodnje) [9].

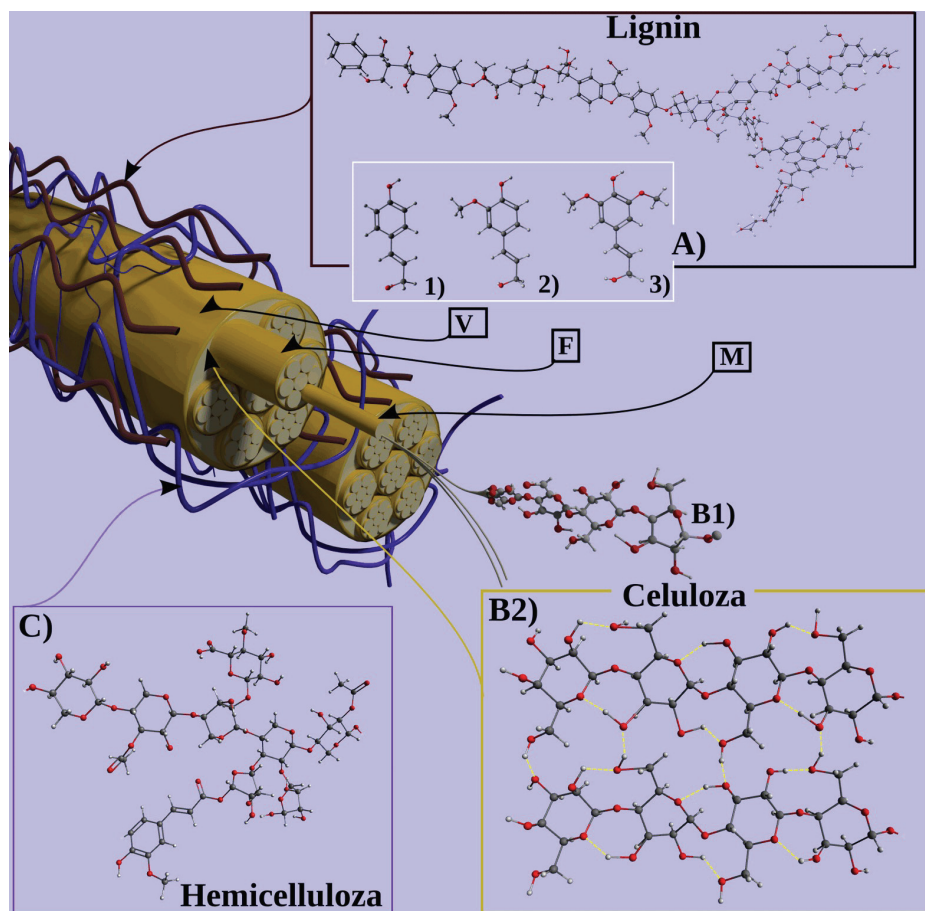
HEMIJSKE I FIZIČKE KARAKTERISTIKE LIGNOCELULOZNE BIOMASE

Tri glavne strukturne komponente lignoceluloze su polimeri celuloza, hemiceluloza i lignin (slika 1). Osim njih, mogu se naći i neke nestrukturne komponente poput vode, proteina, minerala, nestrukturnih saharida i nekih drugih, koje se mogu izdvojiti ekstrakcijom.

Sastav lignoceluloze u velikoj meri zavisi od izvora biomase [12–14]: postoje značajne razlike u udelu strukturnih komponenti – kao i u hemijskom sastavu hemiceluloze i lignina – u zavisnosti od toga da li je biomasa poreklom od mekog, tvrdog drveta ili zeljastih biljaka (videti tabelu 2).

Celuloza (slika 1) je prirodni polimer, polisaharid hemijske formule (C₆H₁₀O₅)_n. Predstavlja gradivnu komponentu primarnog ćelijskog zida viših biljaka, nekih algi i oomiceta; neke bakterije sekretuju celulozu prilikom formiranja biofilma. Celuloza se odlikuje visokim stepenom polimerizacije (od nekoliko stotina, pa čak do 17000 jedinica); u prirodi se najčešće sreće 800 do 10000 jedinica [12]. Osnovna gradivna jedinica celuloze je celobioza (dimer glukoze). Primarno celuloza je linearni homopolimer sastavljen od glukoznih ostataka D-konfiguracije međusobno povezanih β-(1→4)-glikozidnim vezama (slika 1, B1). Uspostavljanjem vodoničnih veza, nekoliko celuloznih lanaca srasta gradeći mikrofibrile koji se ujedinjuju i formiraju vlakna (slika 1, M, F i V). Rezultat brojnih inter- i intrapolimernih vodoničnih veza je kristalno uređenje celuloze (sekundarna struktura, slika 1, B2). Osim kristalnih, prirodna celuloza sadrži i amorfne tj. parakristalne regione [15].

Hemiceluloza je termin kojim se predstavlja familija polisaharida kao što su arabinosilani, glukomanani, galaktani, ksiloglukani, ksilani, manani i β-(1→3, 1→4)-glukani, koji se mogu naći u ćelijskom zidu biljaka i čiji sastav i organizacija zavise od porekla i metode ekstrakovanja. Za razliku od celuloze, hemiceluloza (slika 1, C)



Slika 1. Struktura lignocelulozne biomase; A) deo polimera lignina, 1) p-kumaril, 2) koniferil i 3) sinapil alkohol; B1) linearni polimer celuloze; B2) kristalna struktura celuloze; C) deo polimera hemiceluloze; M) mikrofibril; F) fibril; V) celulozno vlakno.

Figure 1. Lignocellulosic biomass structure: A) part of lignin polymer, 1) p-coumaryl, 2) coniferyl and 3) sinapyl alcohol; B1) linear cellulose, B2) crystalline structure of cellulose; C) part of hemicellulose polymer; M) microfibril; F) fibril; V) cellulose fiber.

Tabela 2. Udeo osnovnih komponenti lignoceluloze u zavisnosti od porekla biomase

Table 2. Proportion of basic components of lignocellulose depending on source of biomass

Lignocelulozni materijal	Sadržaj celuloze, %	Sadržaj hemiceluloze, %	Sadržaj lignina, %	Referenca
Stablo tvrdog drveta	40–55	24–40	18–25	[12]
Stablo mekog drveta	45–50	25–35	25–35	[12]
Ljuska oraha	25–30	25–30	30–40	[12]
Kukuruzni oklasak	33–45	31–35	6–15	[12,13]
Trave	25–43	24–50	10–30	[12,14]
Stabljike kukuruza	35	16,8	7	[13]
Pšenična slama	30–38	24–50	8–15	[12–14]
Lišće	15–20	80–85	0	[12]
Ražana slama	31–38	25–31	0–19	[13,14]

nema kristalno uređenje, veoma je razgranate strukture i poseduje acetil grupe vezane za polimerni lanac. Razgranati polisaharidni lanci sačinjeni su uglavnom od aldopentoznih jedinica (ksilozna i arabinosa) i od nekih aldohexozna (glukoza, manozna i galaktoza). Osim visokog stepena polimerizacije, polimer hemiceluloze obično ima supstituente na glavnom lancu ili granama [16]. Glavni tip intrapolimernih veza hemiceluloze čine

estarske veze, a prisutna je i značajna količina karboksilnih grupa [12]. U literaturi se sreću različiti podaci o stepenu polimerizacije, ali jedna opšta slika je da ne prelazi 200 jedinica, dok je granica minimuma oko 50 [2,12,17]. Najvažnija funkcija hemiceluloze je doprinos jačanju ćelijskog zida, što se postiže njenom interakcijom sa celulozom i ligninom. Na slici 1 (C) prikazan je

deo molekula ksilana, najčešćeg polimera iz familije hemiceluloza.

Lignin je najkompleksniji biopolimer u prirodi i jedini konstituent biomase baziran na aromatičnim jedinicama (slika 1, A). On čini 15–25% suve mase drvenastih biljaka i 40% energije sadržane u lignoceluloznoj biomasi [18]; obezbeđuje mehaničku čvrstoću biljkama, povezivanjem sa polisaharidima omogućava vaskularnom tkivu biljaka efikasan transport vode i nutrijenata, štiti biljku od degradacije sprečavanjem penetracije lignocelulolitičkih enzima kroz ćelijski zid. Struktura lignina još uvek nije u potpunosti razjašnjena, ali je utvrđeno da su primarni prekursori njegove sinteze (tj. reakcije sparivanja radikala) tri monolignola: *p*-kumaril, koniferil i sinapil alkohol (slika 1, A pod 1), 2) i 3), redom) [19], koji nastaju od fenilalanina (Phe) u opštem fenilpropanoidnom i specifičnom monolignolnom putu [20]. Oni se inkorporiraju u lignin u formi fenilpropanoida: *p*-hidroksifenil (H), guajacil (G) i siringil (S) [19]. Pošto nastaje polidisperzni polimer – u kom se ne može uočiti pravilno ponavljanje većih jedinica – razlika u strukturi lignina različitog porekla se predstavlja razlikom u brojnosti fenilpropan jedinica i distribuciji veza unutar jedinica. Glavne intrapolimerne veze lignina su etarske veze (70%) i ugljenik–ugljenik veze (30%) [21]. Svi lignini u manjim količinama sadrže i nekompletne ili modifikovane monolignole, pa se mogu uočiti drugačiji monomeri [19,22].

PREDTRETMAN LIGNOCELULOZNE BIOMASE

Lignoceluloznu bimasu karakteriše velika otpornost prema razgradnji enzimima ili mikroorganizmima. Različite su pretpostavke uzroka ove otpornosti. U literaturi se najčešće navode: struktura i količina lignina; acetilovana hemiceluloza; lignin-ugljenohidratni kompleks (eng. *lignin carbohydrate complexes*, LCC); kristaliničnost celuloze i stepen polimerizacije; zapremina pora; specifična površina celuloze [23,24]. Nerazgranata hemiceluloza (ksiloglukani, homoksilani i manani) formira vodonične veze sa površinom celuloznih fibrila, dok su bočni lanci (uronska kiselina i arabinoza) kovalentno vezani sa drugim hemicelulozama ili ligninom [23]. Na ovaj način se formiraju za enzime nepropustne mreže – lignin–ugljenohidratni kompleksi.

Konverzija lignoceluloze do željenih produkata je višestepeni proces (slika 2) koji obuhvata: predtretman (fizički, hemijski, fizičko-hemijski i/ili biološki), hidrolizu polimera do metabolišućih molekula, primenu ovih molekula za mikrobn rast i fermentaciju do željenih produkata, separaciju i prečišćavanje produkata. Metode predtretmana se mogu kombinovati ili primeniti samostalno.

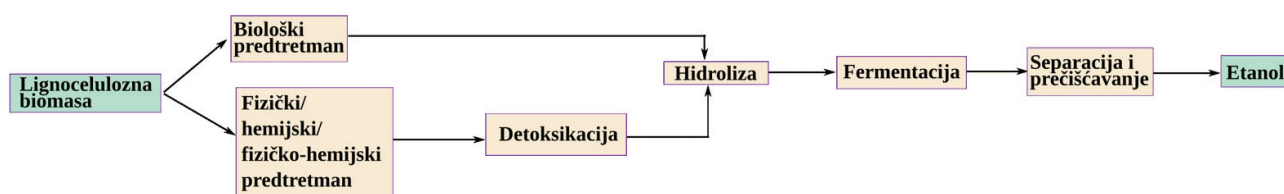
Da bi jedan predtretman bio efektivan treba da zadovolji određene kriterijume: efikasnost u širokom spektru vrsta i količina lignoceluloznog materijala; mogućnost dobijanja najvećeg dela lignoceluloznih komponenti u upotrebljivoj formi u različitim frakcijama; treba minimizirati potrebu za pripremom koja prethodi predtretmanu (npr. redukcija veličine); da ne proizvodi uopšte ili proizvede što manje količine inhibitora narednih procesa – hidrolize i fermentacije; male potrebe za energijom ili da se uložena energija upotrebi u druge svrhe; da bude ekonomski isplativ.

Biološki predtretman

Biološki predtretman se izvodi organizmima sposobnim da proizvode enzime i druge hemijske supstance kojima se može ukloniti lignin i osloboditi šećeri (pentoze i heksoze) iz kompleksnog lignoceluloznog supstrata. Ne zahteva primenu skupih hemikalija, niti utrošak energije – u kombinaciji sa drugim metodama omogućava veći prinos, smanjuje potrebe za energijom, ublažava oštre uslove metoda sa kojim se kombinuje [25,26] – i ekološki je bezbedan. Pošto pomenuti organizmi ne mogu da koriste ugljenik iz lignina, već iz oslobođenih šećera, biološki predtretman može dovesti do gubitka dela ugljenih hidrata. Iako bi represija hidrolitičkih enzima mogla da uspori ovaj proces, dodatno bi se produžilo vreme trajanja predtretmana čija dužina već predstavlja problem. Rešenje može biti korišćenje brzorastućih organizama koji proizvode veće količine enzima ili primena neke druge metode predtretmana pre biološke. Studija na pirinčanim ljuskama je pokazala da je, nakon primene vodonik-peroksida, vreme inkubacije *Pleurotus ostreatus* skraćeno sa 60 na 18 dana [27].

Organizmi razgrađivači lignoceluloze

Razgradnja lignoceluloze u prirodi je raspodeljena među gljivama i bakterijama. Bakterije su uglavnom ograničene na biomasu sa manjom količinom lignina,



Slika 2. Uprošćena šema proizvodnje bioetanol iz lignocelulozne biomase.

Figure 2. Simple flow chart of bioethanol production from lignocellulosic biomass.

jer slabo proizvode ligninaze (neke aktinomicete [28]). Kao bolje adaptirani organizmi na vodeno okruženje nego gljive, pretežno razgrađuju biljke vodenih staništa. Nalaze se i u crevnom sistemu herbivora. Celulolitičke bakterije obuhvataju vrste rodova *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Caldicellulosiruptor*, *Butyrivibrio*, *Acetivibrio*, *Cellulomonas*, *Erwinia*, *Thermobifida*, *Fibrobacter*, *Cytophaga* i *Sporocytophaga* [29].

Na osnovu iskorišćenosti materijala i karakteristika trulog drveta, razlikuju se tri tipa lignocelulolitičkih gljiva: gljive izazivači belog, braon i mekog truljenja; dok je sposobnost iskorišćenja celuloze rasprostranjena u čitavom carstvu Fungi od protista, poput Chytridiomycetes, do naprednih Basidiomycetes. Belo i braon truljenje izazivaju bazidiomicete; meko truljenje je posledica delovanja askomiceta i deuteromiceta [30].

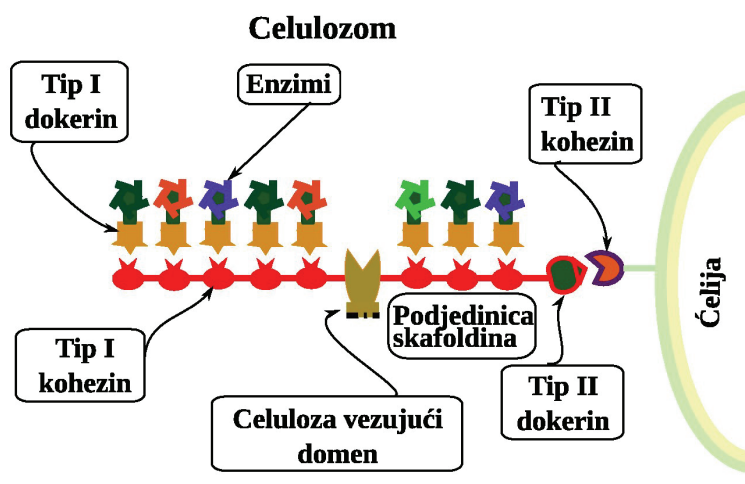
Gljive izazivači belog truljenja su sposobne da razgrađuju sve frakcije drveta. Najefikasniji su razgrađivači lignina u prirodi, zbog čega imaju veoma važnu ulogu u reciklaži ugljenika iz lignifikovanog tkiva. Nakon razgradnje drvo ostaje u vidu belih vlakana. Pretežno rastu na tvrdom drvetu (poput breze i jasike), ali se mogu naći i na mekom, npr. boru (*Heterobasidion annosum*, *Phellinus pini* i *Phlebia radiata*) [30]. Sposobne su za selektivnu (*Ceriporiopsis subvermispora*, *Dichomitus squalens*, *Phlebia radiata* i dr.) [31] i neselektivnu razgradnju lignina (*Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* i *Fomes fomentarius*) [30]. Selektivnom razgradnjom uklanjaju lignin i hemicelulozu dok celuloza uglavnom ostaje intaktna [31]; neselektivnom uklanjaju podjednako sve komponente lignoceluloze [28,30,31].

Gljive izazivači braon truljenja razgrađuju hemicelulozu i celulozu, dok lignin u izvesnoj meri modifikuju. Braon trulež je drvo tamne (braon) boje (što ukazuje na prisustvo modifikovanog lignina), smanjeno i razbijeno na fragmente oblika cigle ili kocke koji se lako mrve

dajući braon prah. Za razliku od gljiva izazivača belog truljenja – koje hidrolizuju polisaharide samo do one količine hidrolizata koje mogu da iskoriste za sopstveni metabolizam – gljive izazivači braon truljenja depolimerizuju celulozu i hemicelulozu brže nego što gljiva može da iskoristi hidrolizate, pa dolazi do akumulacije neiskorišćenih šećera [28,32]. Lignin, modifikovan ovim gljivama, je reaktivniji nego prirodni zbog većeg sadržaja fenolnih hidroksilnih i karboksilnih grupa [33]. Među gljivama izazivačima braon truljenja najizučavanija je *Gloeophyllum trabeum*.

Meko truljenje izazivaju gljive klasa Ascomycetes i Deuteromycetes (*Fungi imperfecti*) – drvo postaje mekano, braon boje. Postoje dva tipa meke truleži [34]: tip I se odlikuje bikoničnim ili cilindričnim šupljinama u sekundarnom zidu, tip II je erozivni tip degradacije. Ispitivanja vrste *Daldinia concentrica* su pokazala da ove gljive prevashodno oksiduju i mineralizuju siringil jedinice lignina dok je guajacil veoma otporan na njihovo dejstvo, zbog čega su u degradaciji mekog drveta, koje sadrži znatno više G jedinica, veoma neefikasne [28].

Osim aerobne razgradnje, koja se vrši slobodnim enzimima, postoji i, značajno drugačija, anaerobna razgradnja u kojoj učestvuju enzimi multienzimskih kompleksa – celulozoma (slika 3). Celulozomi su prvi put identifikovani i opisani kod termofilne, anaerobne, celulolitičke bakterije *Clostridium thermocellum*. Biohemijska istraživanja celulozoma su pokazala da se najveći deo celulolitičkog procesa odvija u ekstracelularnim celulozomima koji su organizovani na površini ćelija u formi policelulozomalnih organela [35]. Podjedinice celulozoma su sastavljene od brojnih funkcionalnih domena koji interaguju međusobom i sa celuloznom supstratom. Jedna od ovih podjedinica je veliki glikoprotein skafoldin koji ima ulogu nosača [29]. On selektivno vezuje različite podjedinice celulaza i kilanaza u kohezivni kompleks (slika 3), kombinujući njihove „ko-



Slika 3. Struktura celulozoma.

Figure 3. Structure of cellulosome.

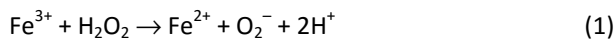
hezin“ domene sa karakterističnim „dokerin“ dome-nima [35], prisutnim na svakoj od podjedinica. Skafoldin nekih celulozoma poseduje i mesta za vezivanje ugljenih hidrata. Celulozomalne sisteme proizvode i anaerobne bakterije *Acetivibrio cellulolyticus*, *Bacteroides cellulosolvens*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* i anaerobne gljive rodova *Neocallimastix*, *Piromyces* i *Orpinomyces*.

FUNGALNI ENZIMI I NJHOVI MEHANIZMI RAZGRADNJE LIGNOCELULOZE

Gljive proizvode širok spektar enzima i hemijskih supstanci koji, na različite načine iskombinovani kod različitih vrsta, zajedno razgrađuju lignoceluloznu biomasu. Mehanizmi razgradnje se mogu podeliti na oksidativne i hidrolitičke.

Oksidativni mehanizmi

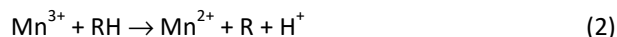
Akcijom fungalnih redoks enzima (glioksal oksidaze, piranoza-2-oksidaze i aril-alkohol oksidaze) nastaje vodonik peroksid (H_2O_2), koji reaguje sa redoks-aktivnim gvožđem (prisutnim u drvetu u dovoljnim količinama) i, kroz Fentonovu reakciju (1), proizvodi hidrosilni radikal – $\cdot OH$. $\cdot OH$ je veoma moćan oksidujući agens, sposoban da katalizuje visoko nespecifične reakcije i raskida kovalentne veze lignina i celuloze [36].



Gljive (kao i mnoge biljke, insekti i bakterija *Azospirillum lipoferum*) proizvode multibakarne enzime – lakaze. Fungalne lakaze katalizuju formiranje fenoksil radikala, čija nespecifična reakcija vodi C_α -hidroksil oksidaciji do ketona, raskidanju veze između alkil i aril grupa, demetoksilaciji i raskidanju $C_\alpha-C_\beta$ veze u ligninu, kao i do reakcije polimerizacije [30,37]. Mehanizam razgradnje obuhvata prenos jednog elektrona sa malog molekula supstrata (tzv. medijatora) na molekul kiseonika, nakon čega oksidovani medijator difunduje u gusto pakovanu lignocelulozu i inicira reakciju slobodnih radikala koja vodi depolimerizaciji [5]. U prisustvu medijatora malog molekula, poput hidroksibenzotriazola, moguća je i oksidacija nefenolnih komponenti lignina [30].

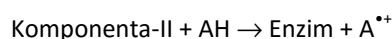
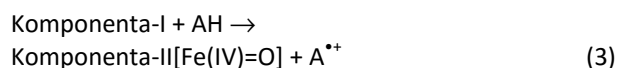
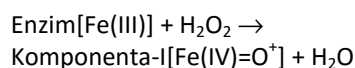
Drugu grupu fungalnih ligninolitičkih enzima čine hem peroksidaze: lignin peroksidaze (LiP), mangan peroksidaze (MnP) i verzatil (hibridne) peroksidaze (VP). U supstratu je obično prisutno više izoenzima LiP, MnP, VP. LiP katalizuju reakcije cepanje β -O-4 etarskih veza i $C_\alpha-C_\beta$ veza u ligninu [38], oksidaciju aromatičnih C_α alkohola, hidroksilaciju, formiranje hinona i raskidanje aromatičnog prstena. Registrovane su kod 40% proučavanih gljiva [39]. Zahvaljujući invarijantnim ostacima triptofana (trp171) prisutnim u izoenzimu LiP-A,

moгу oksidovati i nefenolne aromatične komponente lignina [40]. LiP su poznate kao jaki oksidansi zbog većeg deficita elektrona u gvožđu u porfirinskom prstenu u odnosu na druge peroksidaze. MnP oksiduju Mn^{2+} u visoko reaktivan Mn^{3+} (medijator u procesu oksidacije organskog supstrata, reakcija (2) [30]), koji je stabilizovan helatorima fungalnog porekla, poput oksalne kiseline [41]:



MnP ne poseduju invarijantne ostatke triptofana, pa u odsustvu intermedijera, poput tiola, ne mogu oksidovati nefenolne komponente lignina [42]. Verzatil peroksidaze ispoljavaju i LiP i MnP aktivnost. One poseduju Mn-vezujuće mesto i kada vežu Mn [39] sposobne su da oksiduju Mn^{2+} do Mn^{3+} . Poput lignin peroksidaza i VP poseduju ostatke triptofana, trp164, analoge onim u LiP, koji im omogućavaju oksidaciju nefenolnih aromatičnih komponenti lignina [30].

Katalitički ciklus peroksidaza obuhvata 3 odvojena koraka, reakcija (3):



Ciklus počinje raskidanjem O–O veze u molekulu H_2O_2 i uklanjanjem dva elektrona iz enzima; oslobađa se voda i formira intermedijerno jedinjenje $O=Fe(IV)-\text{porfirin } \pi\text{-radikalni katjon}$ (tj. komponenta-I[$Fe(IV)=O^+$]) [43]. U narednom koraku, redukcijom porfirinskog radikala komponente-I, nastaje drugi intermedijer (komponenta-II[$Fe(IV)=O$]) čijom redukcijom se (u trećem koraku) enzim vraća u prirodno stanje; istovremeno se (sa redukcijom komponenti I i II) oksiduje supstrat i oslobađaju dva supstratna radikala ($A^{\cdot+}$) [44], po jedan u svakom koraku.

U oksidacione procese su uključene i celobioza dehidrogenaze (CDH), enzimi koje sintetišu i gljive koje razgrađuju i gljive koje ne razgrađuju lignin. CDH sadrže dve prostetičke grupe: hem i flavin adenin dinukleotid (FAD). Neke poseduju samo FAD prostetičku grupu, zbog čega su dugo vremena posmatrane kao poseban enzim celobioza:hinon oksidoreduktaza (eng. *cellobiose quinone oxidoreductase* – CBQ) [45]. Oksiduju oligomerne šećere do laktone koristeći širok spektar akceptora elektrona poput hinona, fenoksiradikala, Fe^{3+} i Cu^{2+} . Mogu direktno modifikovati lignin raskidanjem β -etarskih veza, demetoksilacijom aromatičnih komponenti, uvođenjem hidrosilnih grupa u nefenolne komponente kroz produkciju hidrosil radikala [46]; ili indirektno, kroz interakciju sa manganom: oksidovanjem celobioze do 4-O-b-D-glukopiranozil-D-glukonske kise-

line (celobionske kiseline) koja je efikasan helator mangana (Mn(III)) [47]; prevođenjem nerastvornog MnO₂ u depoe rastvornog Mn, u formi Mn(II) i Mn(III), čime je olakšano formiranje MnP i obezbeđen dodatni Mn(II) za MnP katalizu; redukcijom toksičnih hinona do odgovarajućih fenola koji služe kao supstrat za MnP [47,48].

Hidrolitički mehanizmi

Potrebnu energiju lignocelulolitičke gljive obezbeđuju iz molekula šećera oslobođenih hidrolizom polisaharida (celuloze i hemiceluloze) odgovarajućim enzimima.

Razgradnju celuloze katalizuju celulaze. Celulaze poseduju katalitički modul i modul za vezivanje za ugljene hidrate (eng. *carbohydrate-binding module* – CBM). Prema načinu delovanja dele se u tri klase: endo-(1,4)- β -glukanaze (endocelulaze), celobiohidrolaze (egzocelulaze) i β -glukozidaze [4,29,49]. Egzocelulaze razgrađuju kristaliničnu celulozu uklanjajući celobiozne jedinice sa krajeva celuloznih lanaca; endocelulaze razgrađuju amorfnu celulozu hidrolizom unutrašnjih glikozidnih veza. Postoji značajan sinergizam celobiohidrolaza i endocelulaza, a njihovo zajedničko prisustvo i kooperativnost određuju visoko efikasan enzimski sistem za industrijsku primenu [49,50]. Nakon delovanja endo- i egzocelulaza, β -glukozidaze oslobađaju molekule glukoze iz celobioze i celodekstrina; poseduju aktivna mesta u obliku džepa, koja im omogućavaju da deluju na neredukujuće glukozne jedinice [49,51].

Odvajanje celuloze od hemiceluloze, kao i razgradnju hemiceluloze, vrše hemicelulaze. Hemicelulaze deluju sinergistički sa drugim hemicelulazama, ali i sa celulazama [49]. Prema tipu veze koju hidrolizuju hemicelulaze se dele na: glikozidne hidrolaze (hidrolizuju glikozidne veze) i ugljenohidratne esteraze (hidrolizuju estarske veze); prema načinu na koji razgrađuju hemicelulozu dele se na: enzime koji vrše depolimerizaciju i enzime koji uklanjaju grane i bočne lance (eng. *debranching*). Depolimerizacija osnovnog lanca vrši se endo- i egzohidrolizom [52,53]; endohidroliza počinje negde oko sredine lanca i teče nasumično; egzohidro-

liza kreće sa krajeva lanaca. Odvajanje grana i bočnih lanaca od osnovnog vrše tzv. „pomoćni“ enzimi: neki mogu da napadnu samo kratke oligomere lanca, dok drugi kidaju grane i bočne lance ne dodirujući osnovni lanac [53]. Za potpunu hidrolizu hemiceluloze neophodno je usklađeno delovanje sve tri grupe enzima [49]. U tabeli 3 navedene su šire zastupljene hemicelulaze, supstrati na koje deluju i proizvodi razgradnje [29,49,54].

Procesni uslovi biološkog predtretmana

Biološki predtretman se može izvoditi fermentacijom na čvrstom supstratu (SSF) ili submerznom fermentacijom (SmF). Za razliku od SmF, kultivacija na čvrstom supstratu podrazumeva rast organizama i formiranje produkata u uslovima relativno male vlažnosti (60–70%, koliko je potrebno organizmima za rast i metaboličke procese) [13]. Druge prednosti SSF nad SmF su: veći prinos i produktivnost; bolje karakteristike dobijenih proizvoda; i niža cena procesa zbog mogućnosti primene agroindustrijskog i poljoprivrednog otpada kao supstrata, smanjenog mešanja, niže cene sterilizacije, primene manjih reaktora (koriste se reaktor sa pakovanim slojem, sa fluidizovanim slojem i horizontalni bubanj) [13].

Da bi gljive, izazivači belog i braon truljenja, mogle da se razviju na lignoceluloznom supstratu poljoprivrednog porekla, neophodna je dekontaminacija supstrata. U laboratorijskim uslovima se dekontaminacija postiže autoklaviranjem pre zasejavanja, što za industriju predstavlja skup postupak; pa, da bi industrijska upotreba biomase iz poljoprivrede ipak bila moguća, predložena je dekontaminacija jeftinim hemikalijama poput natrijum-bisulfita, natrijum-metabisulfita i natrijum-ditionita, kojima se postižu jednako dobri rezultati [55]. Gljive se mogu razviti i rasti i na supstratu koji je podvrgnut samo površinskoj sterilizaciji. Nakon što se formira na površini, gljiva se lako može izboriti sa ostalim organizmima u supstratu [55]. Međutim, tokom razgradnje lignina stvaraju se sve povoljniji uslovi za razviće celulolitičkih organizama (kojih u unutrašnjosti

Tabela 3. Neke fungalne hemicelulaze, njihovi supstrati i produkti razgradnje
Table 3. Some fungal hemicellulase, their decomposition products and substrates

Supstrat	Enzim	Proizvod	Reference
Ksilan	Endo- β -ksilanaza	Oligosaharidi	[49,54]
Ksiloglukan/ksilan/oligosaharidi oslobođeni endo- β -ksilanazom	β -Ksilozidaza	Ksiloza	[49]
Ksilan/druge hemiceluloze	Acetilksilanska esteraza	Acetil grupa	[29,49]
Ksilan	Feruloilna esteraza	Ferulinska kiselina	[29,49]
Bočni lanci arabinoze na ksilanu/ksilan/ksiloglukan	α -Arabinofuranozidaza	α -Arabinoza	[29,49]
Galaktomanan/galaktoglukomanan/ksilan	α -Galaktozidaza	D-Galaktoza	[29,49]
Veza između ksilana i glukuronske kiseline	α -Glukuronidaza	D-Glukuronska kiselina	[29,49]
β -(1 \rightarrow 4)-D-manozil polimer/(galakto)(gluko)manani	Mananaze	Manooligosaharidi	[49]
Manooligosaharidi	β -Manozidaze	Manoza	[49]

supstrata uvek ima) i koji mogu dovesti do većeg gutbitka celuloze, zbog čega je dubinska dekontaminacija neophodna [56].

Pravilno pripremljena i primenjena adekvatna veličina inokuluma je još jedan veoma bitan faktor. Inokulacija gljiva se može vršiti dodavanjem suspenzije spora u supstrat do postizanja odgovarajuće inicijalne koncentracije, obično reda 10^5 – 10^7 spora/ml [57–59]. Za inokulaciju se mogu koristiti i konidije, micelijumi gajeni u tečnom medijumu ili na agaru, supstrat od cerealijskih zrna za rast na kom su razvijeni micelijumi gljiva (eng. *spawn grown*) i prekolonizacija lignoceluloze gljivom [56]. Kultivacija micelijumima gajenim u tečnom medijumu omogućava bržu i lakšu inokulaciju nego u slučaju primene agarnih diskova; obično se koriste agarni diskovi prečnika 8–10 mm [60,61]. U eksperimentu sa prekolonizovanim iverom, kada je primenjena gljiva *P. chrysosporium*, primećeno je da udeo inokuluma 2–5% daje dobre performanse i omogućava uštedu energije pri mehaničkom usitnjavanju, međutim, sa uvećanjem udela inokuluma do 20%, ušteda energije ne raste [62].

Ligninolitički sistem operiše pod sekundarnim metabolizmom. Dodavanjem inducera poput Mn^{2+} , H_2O_2 i aromatičnih komponenti, može se stimulisati sekrecija ligninolitičkih enzima i razgradnja biomase; dok se dodavanjem nutrijenata stimuliše uvećanje fungalne biomase i ubrzo kolonizacija u dublje slojeve lignoceluloznog supstrata [62]. Međutim, dovoljne količine nutrijenata nisu uslov i za produkciju ligninolitičkih enzima. Istraživanja su pokazala da se ligninolitički sistem *P. chrysosporium* aktivira u uslovima nedovoljne količine azota, što je okidač za otpočinjanje sekundarnog metabolizma kod najvećeg broja gljiva koje izazivaju belo truljenje; u ređim slučajevima okidač može biti nedovoljno ugljenika ili sumpora [39].

Još jedan bitan faktor predstavlja veličina čestica supstrata. Velike čestice mogu da ometaju prodor gljiva i difuziju vazduha, vode i metaboličkih intermedijera u dublje slojeve biomase. Sa smanjenjem veličine čestica povećava se dodirna površina, smanjuje zapremina, čime je olakšano prodiranje u dublje slojeve. Međutim, prevelikom redukcijom veličine smanjuje se međučestični prostor i time onemogućava nesmetana cirkulacija vazduha kroz interčestične kanale. Treba istaći i da svako veće usitnjavanje biomase zahteva više energije, pa je neophodno odrediti najveću optimalnu veličinu čestica kako bi se smanjili troškovi ulaganja energije. Na osnovu dosadašnjih eksperimenata (koje su sproveli Nazarpour i sar. [63], Membrilo i sar. [64], Wan i Li [65] i dr.) može se zaljučiti da se najveće uklanjanje lignina postiže na česticama prečnika 5–10 mm; znatno manje lignina se uklanja kada su čestice supstrata prečnika manjeg od 1 mm ili većeg od 15 mm – za dobijanje malih čestica (<1 mm) troši i više energije.

Vlažnost je veoma važan parametar za proces fermentacije na čvrstom supstratu. Inicijalna vlažnost utiče na rast i razvoj gljiva, kao i na sekundarni metabolizam. Nekim optimumom se smatra 70–85% vlage [62]. U slučaju premalo vlage onemogućen je rast i razvoj gljiva, dok previše vlage može negativno uticati na cirkulaciju gasova i moguća je kontaminacija supstrata bakterijama. Dobri rezultati razgradnje lignina su dobijeni pri vlažnosti od 70% [62].

Bazidiomicete koje izazivaju belo truljenje su mezofili, koje visoku razgradnju lignina postižu između 25–30 °C [65]; askomicete dobro rastu na oko 39 °C [62]. Metabolizam ligninolitičkih gljiva generiše toplotu i stvara temperaturni gradijent. Da temperatura ne bi porasla do visine koja inhibira rast i metabolizam, ili ubija gljive, tokom predtretmana je potrebno uklanjati višak toplote iz sistema.

Optimalne pH vrednosti rasta većine gljiva koje izazivaju belo truljenje su između 4 i 5. Mnoge od njih mogu tokom predtretmana acidifikovati supstrat do vrednosti koja inhibira rast gljiva, pa je potrebno pratiti i korigovati uslove kiselosti sredine [56].

Degradacija lignina je gotovo u potpunosti oksidativni proces, zbog čega je aeracija još jedan veoma bitan parametar. Povećanjem nivoa kiseonika može se znatno unaprediti proces razgradnje lignina gljivama. Eksperimentalno je utvrđeno da brzina formiranja $^{14}CO_2$ u uslovima povećanog nivoa kiseonika značajno raste (u eksperimentu sa *P. chrysosporium* brzina formiranja $^{14}CO_2$ je bila tri puta veća u uslovima čistog kiseonika (100% O_2) u odnosu na atmosferu sa 21% O_2 [39]). Kada se predtretman izvodi u erlenmajeru u statičkom procesu, pasivna difuzija vazduha je dovoljna, međutim ako se proces izvodi sa pakovanim slojem neophodno je primeniti prinudnu cirkulaciju vazduha [62]. Da bi se obezbedilo izvođenje fungalnog predtretmana aeracija mora biti kontrolisana, jer visoka koncentracija kiseonika ne unapređuje selektivnost delignifikacije, iako unapređuje brzinu [56,62].

Najveći nedostatak biološkog predtretmana predstavlja dugo vreme trajanja procesa, uglavnom nekoliko nedelja do nekoliko meseci. Uprkos tome što je u pitanju jeftina metoda, ima zanemarljive zahteve za energijom, ekološki je pogodna, zbog dugog vremena još uvek nije primenljiva u industriji. *P. chrysosporium* je brzorastuća gljiva i može za svega nekoliko dana da značajno razgradi lignin, ali je neselektivni razlagač. Nasuprot njoj, *P. ostreatus*, druga široko proučavana gljiva, može za nekoliko nedelja ostvariti značajnu razgradnju lignina [62]. U zavisnosti od vrste gljive i supstrata zavisi i vreme trajanja procesa; za dostizanje maksimuma razgradnje tvrdog drveta je najčešće potrebno 3–8 nedelja, a slame 3–4 nedelje [56].

METODE HIDROLIZE

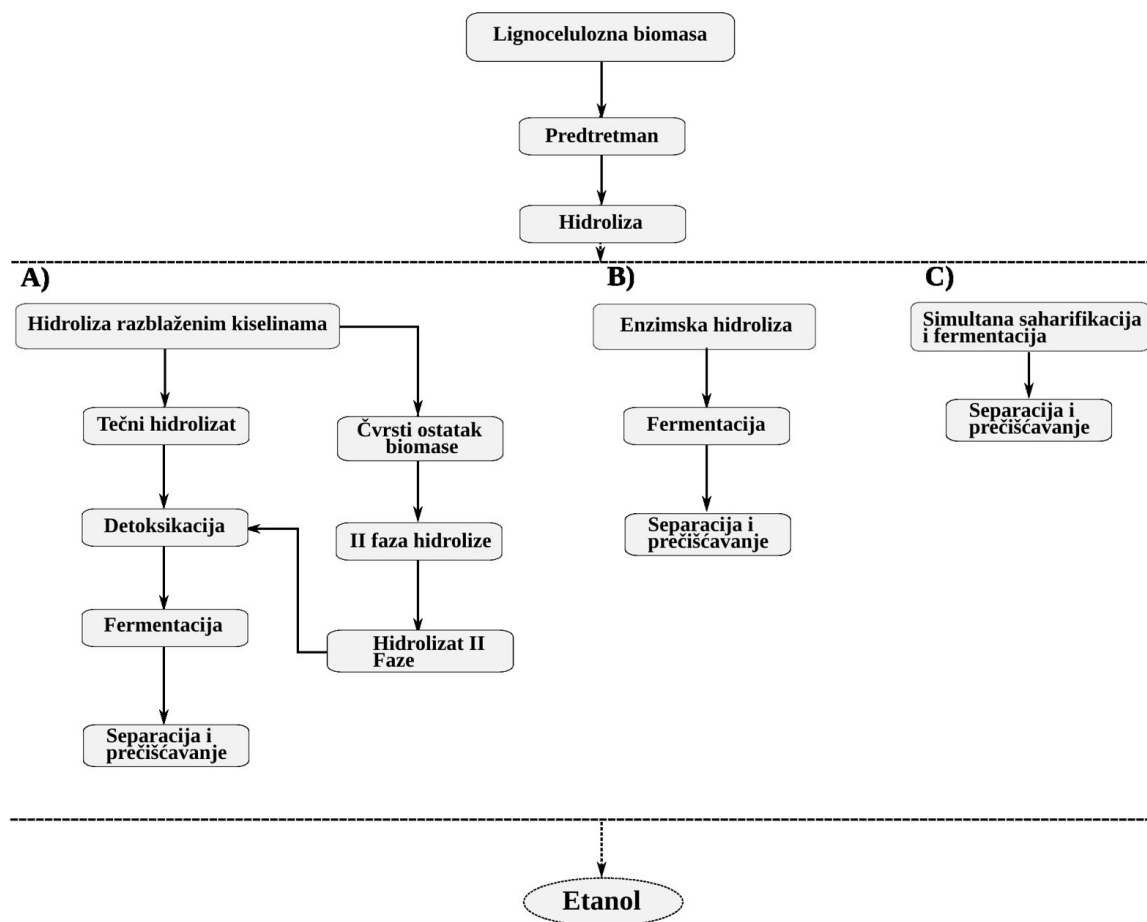
Razgradnja polisaharida do fermentabilnih šećera vrši se kiselinama (razblaženom ili koncentrovanom sumpornom ili hlorovodoničnom kiselinom) ili enzimima (fungalnim i bakterijskim celulazama i hemicelulazama). Proces razblaženim kiselinama može biti jednostepeni ili dvostepeni (slika 4). U oba slučaja dolazi do dehidratacije jednog dela oslobođenih šećera, zbog čega nastaju inhibitori fermentacije: hidroksimetilfurfurali (HMF, od heksoza) i furfurali (od pentoz). Hidroliza koncentrovanim kiselinama je efikasnija; razgradnja polisaharida je potpuna i brza i skoro da nema formiranja HMF i furfurala [2]. Međutim, iz bezbednosnih razloga i da bi se snizila cena procesa, na kraju je neophodno kiselinu ukloniti i neutralisati, za šta se koristi kalcijum-hidroksid; problem predstavlja formiranje hidratanog gipsa ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) jer je zagađivač životne sredine.

Enzimskom hidrolizom se postiže visok prinos redukujućih šećera i visoka selektivnost; niža je cena procesa, procesni uslovi za naredni korak (fermentacije)

su umereni; međutim, cena samih enzima je još uvek visoka, što onemogućava da bioetanol iz lignoceluloze bude konkurentan fosilnom gorivu ili bioetanolu dobijenom iz skrobnihih sirovina [2]. Enzimska hidroliza (slika 4) može teći paralelno sa fermentacijom (simultana saharifikacija i fermentacija, SimSF) [66] – procesi fermentacije i hidrolize teku u suboptimalnim uslovima, smanjena je inhibicija krajnjim proizvodima hidrolize; ili može biti odvojen proces od fermentacije (en. separate hydrolysis and fermentation, SHF) – moguće je podesiti optimalne uslove za procese fermentacije i hidrolize, ali inhibicija supstratom je izraženija i veći su troškovi proizvodnje nego kod SimSF.

INHIBITORI FERMENTACIJE I DETOKSIKACIJA

Iako tokom biološkog predtretmana ne nastaju inhibitori hidrolize i fermentacije, u eksperimentu sa neprečišćenim enzimima Wang i sar. su pokazali da prisustvo lakaze, posebno aktivne lakaze, utiče represivno na aktivnost celulaza [67], pa je poželjno ukloniti ovaj enzim pre početka hidrolize. Za razliku od biološkog



Slika 4. Metode hidrolize: A) dvostepeni postupak razblaženim kiselinama, B) enzimska hidroliza – odvojena hidroliza i fermentacija, C) enzimska hidroliza – simultana saharifikacija i fermentacija.

Figure 4. Hydrolysis methods: A) two-stage dilute-acid hydrolysis process; B) enzymatic hydrolysis – separate hydrolysis and fermentation; C) enzymatic hydrolysis – simultaneous saccharification and fermentation.

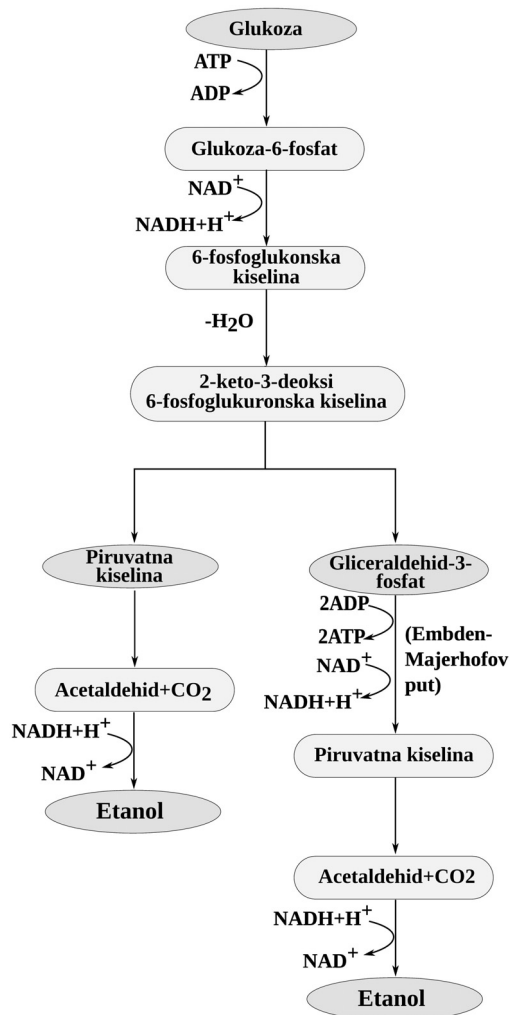
predtretmana tokom fizičkih, fizičko–hemijskih i hemijskih metoda, kao i u procesu hidrolize kiselinama, često nastaju inhibitori, koje čine: slabe kiseline, derivati furana i fenolne komponente. Inhibitorski efekat mogu imati i primenjene hemikalije, ekstrakti uključujući terpenoide, alkohole i aromatične komponente (tanine), metali oslobođeni iz opreme koja se koristi i aditivi kao što su nikel, gvožđe, bakar i hrom.

Inhibitori imaju toksičan efekat na proizvodne mikroorganizme i na taj način smanjuju prinos i produktivnost. Stepennost toksičnosti zavisi od fiziološkog stanja ćelije, rastvorenog kiseonika i pH medijuma [12]. Detoksikacija se vrši hemijskim (bazama [68], najčešće $\text{Ca}(\text{OH})_2$), fizičkim (evaporacijom u rotacionom evaporatoru, ekstrakcijom, jonskom izmenom, aktivnim ugljem) i biološkim metodama (enzimima lakazama i peroksidazama, gljivama *Trametes versicolor*, *Trichoderma reesei* ili različitim bakterijama [69]).

Fermentacija hidrolizata

Fermentacija je metabolički proces konverzije šećera do kiselina, gasova i/ili alkohola. U lignoceluloznom hidrolizatu su prisutne dve grupe šećera: heksoze (glukoza, manozna i galaktoza) i pentoze (ksilozna i arabinozna), ali organizmi, koji se pretežno koriste u industriji etanola, uglavnom ne mogu efikasno fermentisati pentoze (videti tabelu 4) [70–72].

Metabolizam glukoze se odvija Embden-Majerhofovim (EM, slika 5) (pr. u kvascu *Saccharomyces cerevisiae*) ili Entner–Doudorofovim (ED) putem (slika 5, u bakterijama poput *Zymomonas sp.*). ED putem se oslobađa upola manje ATP po molu glukoze nego u slučaju EM puta, zbog čega se biomasa proizvodnog mikroorganizma ne uvećava mnogo, pa više šećera može da se konvertuje do željenog proizvoda. U industriji etanola se prioritetno koristi kvasac *S. cerevisiae*



Slika 5. Metabolički putevi fermentacije glukoze: Entner–Doudorofov (ED) i Embden Majerhofov (EM).

Figure 5. The metabolic pathways for glucose fermentation: Entner–Doudoroff (ED) and Embden Meyerhof (EM) pathways.

Tabela 4. Organizmi producenti etanola i supstrat koji mogu fermentisati
Table 4. Organisms producers of ethanol and substrate they can ferment

Organizam	Supstrat
Gljive	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Glukoza, fruktoza, galaktoza, maltoza, maltotrioza, ksiluloza
<i>S. carlsbergensis</i>	Glukoza, fruktoza, galaktoza, maltoza, maltotrioza, ksiluloza
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Glukoza, galaktoza, laktoza
<i>Candida tropicalis</i>	Glukoza, ksilozna, ksiluloza
Bakterije	
<i>Zymomonas mobilis</i>	Glukoza, fruktoza, saharozna, inženjerovana da koristi ksilozu
<i>Clostridium thermocellum</i>	Glukoza, celobioza, celuloza
<i>C. acetobutylicum</i>	Konverzija ksiloze do acetona i butanola, u manjim količinama do etanola
<i>Escherichia coli</i>	Ksilozna
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Ksilozna, celobioza, glukoza
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Brže iskorišćenje celobioze nego glukoze
<i>L. casei</i>	Laktoza
<i>L. xylosus</i>	Celobioza ukoliko su dodati nutrijenti, glukoza, ksilozna i arabinozna

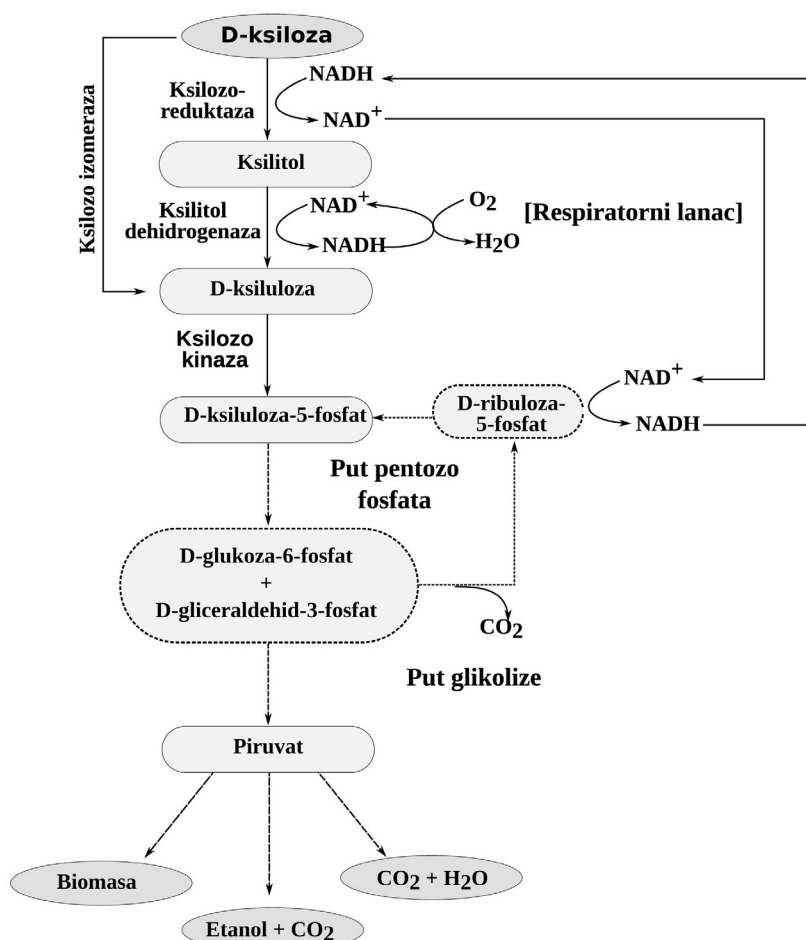
[73,74]: bezbedan (GRAS), tolerantan prema inhibitorima fermentacije, ali ne može fermentisati aldopenoze do etanola.

Kanalisanje pentoznih šećera do centralnog metabolizma u bakterijama se vrši izomeraznim putem; u kvascima i filamentoznim gljivama metaboličkim putem reduktaza/dehidrogenaza [75]. Malo organizama je sposobno prirodno da fermentiše pentoze (neke vrste rodova *Pichia* i *Candida*, kao i filamentozna gljiva *Fusarium oxysporum* [75]), ali je brzina konverzije ovim organizmima mala. Predloženi put katabolizma ksiloze dat je na slici 6. Metaboličkim inženjerstvom uvedeni su putevi ksiloza izomeraze i arabinoza izomeraze u *S. cerevisiae* i, na taj način, stvoreni sojevi kojima se postižu visoki prinosi. Metode genetičkog i metaboličkog inženjerstva primenjene su i na drugim proizvodnim mikroorganizmima; osim unapređenju fermentacije, teži se i povećanju otpornosti organizama prema inhibitorima fermentacije [76].

Neke bakterije poput *Clostridium thermocellum* i filamentozne gljive *Monilia sp.*, *Neurospora sp.*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Aspergillus sp.*, *Trichoderma viri-*

de [72], mogu direktno transformisati celulozu do etanola, ali je mali prinos etanola, dugo vreme konverzije i nastaju sporedni produkti poput sirćetne i mlečne kiseline.

U novije vreme razmatra se primena samo jednog organizma sposobnog za četiri biološke konverzije: produkciju glikolitičkih enzima (celulaze i hemicelulaze), hidrolizu predtretirane biomase, fermentaciju heksoza i fermentaciju pentozna. Ova metoda je poznata pod nazivom konsolidovani bioproces (CBP) – ili direktna mikrobna konverzija (DMC). Kako još uvek nije pronađen niti stvoren idealan organizam, često se primenjuje bakterija *Clostridium thermocellum*, koja je sposobna da hidrolizuje celulozu i fermentiše glukozu, zajedno sa *C. thermosaccharolyticum* koja može fermentisati pentoze [77,78]. Novije studije su fokusirane na kombinovanju proizvodnje celulaza i sojeva mikroorganizama koji daju visoke prinose etanola poput *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* i *Zymomonas mobilis*.



Slika 6. Metabolički putevi fermentacije ksiloze.

Figure 6. The metabolic pathways for xylose fermentation.

ZAKLJUČAK

Potreba za zamenom fosilnog alternativnim gorivima je usmerila mnoga istraživanja ka razvoju tehnologije proizvodnje etanola na jeftinim sirovinama, poput lignoceluloznog otpada. Zbog kompleksnosti strukture i velike otpornosti lignocelulozne biomase prema dejstvu enzima i mikroorganizama, razvijene su različite metode predtretmana (fizičke, hemijske, fizičko–hemijske, biološke), koje većinom zahtevaju skupe i toksične hemikalije, ulaganje energije ili specijalno konstruisanu opremu. Biološkim predtretmanom bi se mogla obezbediti jeftina, ekološki bezbedna tehnologija, koja ne zahteva dodatno ulaganje energije ni toksičnih hemikalija. Postojeći problem – dugo vreme inkubacije – sa kojima se susreće biološki predtretman, bi se mogao rešiti primenom brzorastućih gljiva koje mogu proizvesti veće količine ligninolitičkih enzima, ili kombinovanjem biološke i neke druge metode predtretmana; dok primena selektivnih razgrađivača lignina omogućava da se celuloza sačuva. Još jedna pozitivna strana primene biološkog predtretmana su sporedni proizvodi: od fungalne biomase se mogu dobiti hitin i hitozan, koji se koriste za proizvodnju superapsorbentata; upotreba jestive gljive, poput bukovače (*P. ostreatus*), se može koristiti u ishrani; a prečišćavanjem enzimskih ekstrakata, nastalim tokom predtretmana, dobijaju se industrijski enzimi koji se mogu koristiti u procesima bioizbeljivanja, bioremedijacije...

Trenutna istraživanja fungalnih ligninolitičkih mehanizama su usmerena na mogućnost primene gljiva i njihovih enzima u biološkom predtretmanu, biopulpiranju i bioremedijaciji (zbog sposobnosti da razgrađuju aromatična jedinjenja po strukturi slična komponentama lignina).

LITERATURA

- [1] K. Srirangan L. Akawi, M. Moo-Young C.P. Chou, Towards sustainable production of clean energy carriers from biomass resources, *Appl. Energy* **100** (2012) 172–186.
- [2] V. Semenčenko, L. Mojović, S. Petrović, O. Očić, Novi trendovi u proizvodnji bioetanola, *Hem. Ind.* **65** (2011) 103–114.
- [3] Lj. Mojović i grupa autora, Bioetanol kao gorivo: stanje i perspektive, Monografija, Tehnološki fakultet, Leskovac, 2007.
- [4] I.S. Thakur Thakur, *Industrial Biotechnology: Problems and Remedies*, I.K. International Pvt Ltd., 2006.
- [5] T. Canam, J. Town, K. Iroba, L. Tabil, T. Dumonceaux, in: A. Chandel, S. S. da Silva (Eds.), *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass – Techniques, Applications and Commercialization*, InTech, 2013. pp.181–206.
- [6] P. Siripong, B. Oraphin, T. Sanro, P. Duanporn, Screening of Fungi from Natural Sources in Thailand for Degradation of Polychlorinated Hydrocarbons, *Am.-Eurasian J. Agric. Environ. Sci.* **5** (2009) 466–472.
- [7] BNDES, CGEE (Orgs.), *Sugarcane-based bioethanol: energy for sustainable development*. 1st ed., BNDES, Rio de Janeiro, 2008.
- [8] Bioethanol - a very special compound, <http://www.cropenergies.com/en/Bioethanol/>
- [9] N. Sarkar, S.K. Ghosh, S. Bannerjee, K. Aikat, Bioethanol production from agricultural wastes: An overview, *Renew. Energy* **37** (2012) 19–27.
- [10] Lj. Mojović, D. Pejin, M. Rakin, J. Pejin, S. Nikolić, Al. Djukić-Vuković, How to improve the economy of bioethanol production in Serbia, *Renewable Sustainable Energy Rev.* **16** (2012) 6040–6047.
- [11] L. Mojović, S. Nikolić, D. Pejin, J. Pejin, A. Djukić-Vuković, S. Kocić-Tanackov, V. Semenčenko, in: A. Méndez-Vilas, (Eds.), *Materials and processes for energy: communicating current research and technological developments*, Formatex Research Center, 2013, pp. 380–392.
- [12] P.F.H. Harmsen, W.J.J. Huijgen, L.M. Bermudez Lopez, R.R.C. Bakker, Literature review of physical and chemical pretreatment process for lignocellulosic biomass. *Wageningen UR, Food Biobased Res. (ECN-E-10-013)*, 2010.
- [13] S.I. Mussatto, L.F. Ballesteros, S. Martins, J.A. Teixeira, in: K.-Y. Show, X. Guo (Eds.), *Industrial Waste*, 2012, pp. 121–140.
- [14] D.K. Lee, V.N. Owens, A. Boe, P. Jeranyama, *Composition of Herbaceous Biomass Feedstocks*, South Dakota State University, 2007.
- [15] T.T. Teeri, Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases, *Trends Biotechnol.* **15** (1997) 160–167.
- [16] S.E. Jacobsen, C.E. Wyman, *Cellulose and Hemicellulose Hydrolysis Models for Application to Current and Novel Pretreatment Processes*, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **84–86** (2000) 81–96.
- [17] Z. Fang, *Pretreatment techniques for biofuels and biorefineries*, Springer-Verlag, Berlin, 2013.
- [18] Pure lignin environmental technology, <http://purelignin.com/lignin>.
- [19] J.P. Marković, J.B. Radović, R.T. Štrbanović, D.S. Bajić, M.M. Vrvčić, Changes in the infrared attenuated total reflectance (ATR) spectra of lignins from alfalfa stem with growth and development, *J. Serb. Chem. Soc.* **74** (2009) 885–892.
- [20] R. Vanholme, B. Demedts, K. Morreel, J. Ralph, W. Boerjan, Lignin Biosynthesis and Structure, *Plant Physiol.* **153** (2010) 895–905.
- [21] V.K. Gupta, M.G. Tuohy, *Biofuel technologies: recent developments*, Springer, Berlin, 2013.
- [22] J. Ralph, C. Lapierre, J.M. Marita, H. Kim, F. Lu, R.D. Hatfield, S. Ralph, C. Chapple, R. Franke, M.R. Hemm, J. Van Doorselaere, R.R. Sederoff, D.M. O'Malley, J.T. Scott, J.J. MacKay, N. Yahiaoui, A.M. Boudet, M. Pean, G. Pilate, L. Jouanin, W. Boerjan, Elucidation of new structures in lignins of CAD- and COMT-deficient plants by NMR, *Phytochemistry* **57** (2001) 993–1003.
- [23] S.P.S. Chundawat, G.T. Beckham, M. Himmel, B.E. Dale, *Deconstruction of Lignocellulosic Biomass to Fuels and*

- Chemicals, *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* **2** (2011) 121–145.
- [24] V.S. Chang, M.T. Holtzapple, Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **84–86** (2000) 5–37.
- [25] H. Itoh, M. Wada, Y. Honda, M. Kuwahara, T. Watanabe, Bioorganosolve pretreatments for simultaneous saccharification and fermentation of beech wood by ethanolysis and white rot fungi, *J. Biotechnol.* **103** (2003) 273–280.
- [26] V. Balan, L. da Costa Sousa, S.P. Chundawat, R. Vismeh, A.D. Jones, B.E. Dale, Mushroom spent straw: a potential substrate for an ethanol-based biorefinery, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **35** (2008) 293–301.
- [27] J. Yu, J. Zhang, J. He, Z. Liu, Z. Yu, Combinations of mild physical or chemical pretreatment with biological pretreatment for enzymatic hydrolysis of rice hull, *Bioresour. Technol.* **100** (2009) 903–908.
- [28] A. Hatakka, in: A. Steinbüchel (Ed.), *Biopolymers Online*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005, pp. 129–145.
- [29] W.R. de Souza, in: A. Chandel, S.S. da Silva (Eds.), *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass – Techniques, Applications and Commercialization*, InTech, Rijeka, 2013, pp. 207–247.
- [30] I. Isroi, R. Millati, S. Syamsiah, C. Niklasson, M.N. Cahyanto, K. Lundquist, M.J. Taherzadeh, Biological pretreatment of lignocelluloses with white-rot fungi and its applications: a review, *BioResources* **6** (2011) 5224–5259.
- [31] A.B. Gore, *Environmental research at the leading edge*, Nova Science Publishers, New York, 2006.
- [32] M. Monroy, I. Ortega, M. Ramírez, J. Baeza, J. Freer, Structural change in wood by brown rot fungi and effect on enzymatic hydrolysis, *Enzyme Microb. Technol.* **49** (2011) 472–477.
- [33] L. Jin, T.P. Schultz, D.D. Nicholas, Structural Characterization of Brown-Rotted Lignin, *Holzforschung* **44** (1990) 133–138.
- [34] R.A. Blanchette, B.W. Held, J.A. Jurgens, D.L. McNew, T.C. Harrington, S.M. Duncan, R.L. Farrell, Wood-Destroying Soft Rot Fungi in the Historic Expedition Huts of Antarctica, *Appl. Environ. Microbiol.* **70** (2004) 1328–1335.
- [35] E.A. Bayer, L.J. Shimon, Y. Shoham, R. Lamed, Celluloses-structure and ultrastructure, *J. Struct. Biol.* **124** (1998) 221–234.
- [36] A.C. Ritschkoff, Decay mechanisms of brown-rot fungi. Espoo 1996, Technical Research Centre of Finland, VTT Publications 268, 1996.
- [37] H.D. Youn, Y.C. Hah, S.O. Kang, Role of laccase in lignin degradation by white-rot fungi, *FEMS Microbiol. Lett.* **132** (1995) 183–188.
- [38] T. Lundell T.R. Wever, R. Floris, P. Harvey, A. Hatakka, G. Brunow, H. Schoemaker, Lignin peroxidase L3 from *Phlebia radiata*. Pre-steady-state and steady-state studies with veratryl alcohol and a non-phenolic lignin model compound 1-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-(2-methoxyphenoxy)propane-1,3-diol, *Eur. J. Biochem.* **211** (1993) 391–402.
- [39] K-E.L. Eriksson, H. Bermek, in: M. Schaechter (Ed.), *Encyclopedia of microbiology*, 3rd ed., Elsevier, cop. 2009.
- [40] W. Blodig, A.T. Smith, K. Winterhalter, K. Piontek, Evidence from spin-trapping for a transient radical on tryptophan residue 171 of lignin peroxidase, *Arch. Biochem. Biophys.* **370** (1999) 86–92.
- [41] M. Hofrichter, Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP), *Enzyme Microb. Technol.* **30** (2002) 454–466.
- [42] M.G. Paice, I.D. Reid, R. Bourbonnais, F.S. Archibald, L. Jurasek, Manganese Peroxidase, Produced by *Trametes versicolor* during Pulp Bleaching, Demethylates and Delignifies Kraft Pulp, *Appl. Environ. Microbiol.* **59** (1993) 260–265.
- [43] D.W.S. Wong, Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **157** (2009) 174–209.
- [44] R.S. Koduri, M. Tien, Oxidation of guaiacol by lignin peroxidase. Role of veratryl alcohol, *J. Biol. Chem.* **270** (1995) 22254–22258.
- [45] S.D. Mansfield, E. De Jong, J.N. Saddler, Cellobiose dehydrogenase, an active agent in cellulose depolymerization, *Appl. Environ. Microbiol.* **63** (1997) 3804–3809.
- [46] G. Henriksson, L. Zhang, J. Li, P. Ljungquist, T. Reitberger, G. Pettersson, G. Johansson, Is cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium* a lignin degrading enzyme?, *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1480** (2000) 83–91.
- [47] G. Henriksson, G. Johansson, G. Pettersson, A critical review of cellobiose dehydrogenases, *J. Biotechnol.* **78** (2000) 93–113.
- [48] B.P. Roy, T. Dumonceaux, A.A. Koukoulas, F.S. Archibald, Purification and Characterization of Cellobiose Dehydrogenases from the White Rot Fungus *Trametes versicolor*, *Appl. Environ. Microbiol.* **62** (1996) 4417–4427.
- [49] M.D. Sweeney, F. Xu, Biomass Converting Enzymes as Industrial Biocatalysts for Fuels and Chemicals: Recent Developments, *Catalysts* **2** (2012) 244–263.
- [50] L.T.A.S. Semêdo, R.C. Gomes, E.P.S. Bon, R.M.A. Soares, L.F. Linhares, R.R.R. Coelho, Endocellulase and Exocellulase Activities of Two *Streptomyces* Strains Isolated from a Forest Soil, Twenty-First Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **84–86** (2000) 267–276.
- [51] J. Kaur, B. Chadha, B. Kumar, G. Kaur, H. Saini, Purification and characterization of β -glucosidase from *Melanocarpus* sp. MTCC 3922, *Electron. J. Biotechnol.* **10** (2007) 260–270.
- [52] R. Varnaité, V. Raudonienė, Destruction of hemicellulose in rye straw by micromycetes, *Ekologija* **54** (2008) 169–172.
- [53] J.M. Vivanco, F. Bal, *Secretions and Exudates in Biological Systems*, Springer, Berlin, 2012.
- [54] A. Krisana, S. Rutchadaporn, G. Jarupan, E. Lily, T. Sutipa, K. Kanyawim, Endo-1,4- β -xylanase B from *Aspergillus* cf. *niger* BCC14405 Isolated in Thailand: Purification, Characterization and Gene Isolation, *J. Biochem. Mol. Biol.* **38** (2005) 17–23.

- [55] G.M. Scott, M. Akhtar, M.J. Lentz, in: R.A. Young, M. Akhtar (Eds.), *Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry*, Wiley, New York, 1997.
- [56] J. Lee, Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol, *J. Biotechnol.* **56** (1997) 1–24.
- [57] J.S. Bak, J.K. Ko, I.G. Choi, Y.C. Park, J.H. Seo, K.H. Kim, Fungal pretreatment of lignocellulose by *Phanerochaete chrysosporium* to produce ethanol from rice straw, *Biotechnol. Bioeng.* **104** (2009) 471–482.
- [58] K. Selvam, K.P. Saritha, K. Swaminathan, M. Manikandan, K. Rasappan, P. Chinnasamy, Pretreatment of wood chips and pulps with *Fomes lividus* and *Trametes versicolor* to reduce chemical consumption in paper industries, *Asian J. Microbiol. Biotechnol. Environ. Sci.* **8** (2006) 771–776.
- [59] U.G. Phutela, K. Kaur, M. Gangwar, N.K. Khullar, Effect of *Pleurotus florida* on paddy straw digestibility and biogas production, *International Journal of Life Sciences* **6** (2012) 14–19.
- [60] X. Feng, M. del Pilar Castillo, A. Schnürer, Fungal pretreatment of straw for enhanced biogas yield, *SGC Rapport*, 2013.
- [61] Y.A.-G. Mahmoud, Biodegradation of water hyacinth by growing *Pleurotus ostreatus* and *P. sajor-caju* and trial for using in production of mushroom spawn, *Acta Aliment.* **5** (2006) 63–72.
- [62] C. Wan, Y. Li, Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass, *Biotechnol. Adv.* **30** (2012) 1447–1457.
- [63] F. Nazarpour, D.K. Abdullah, N. Abdullah, N. Motedayen, R. Zamiri, Biological Pretreatment of Rubberwood with *Ceriporiopsis subvermisporea* for Enzymatic Hydrolysis and Bioethanol Production, *BioMed Res. Int.* (2013) 268349.
- [64] I. Membrillo, C. Sánchez, M. Meneses, E. Favela, O. Loera, Effect of substrate particle size and additional nitrogen source on production of lignocellulolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* strains, *Bioresour. Technol.* **99** (2008) 7842–7847.
- [65] C. Wan, Y. Li, Microbial pretreatment of corn stover with *Ceriporiopsis subvermisporea* for enzymatic hydrolysis and ethanol production, *Bioresour. Technol.* **101** (2010) 6398–403.
- [66] D.J. Pejin, Lj.V. Mojović, J.D. Pejin, O.S. Grujić, S.L. Markov, S.B. Nikolić, M.N. Marković, Increase in bioethanol production yield from triticale by simultaneous saccharification and fermentation with application of ultrasound, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **87** (2012) 170–176.
- [67] F.Q. Wang, H. Xie, W. Chen, E.T. Wang, F.G. Du, A.D. Song, Biological pretreatment of corn stover with ligninolytic enzyme for high efficient enzymatic hydrolysis, *Bioresour. Technol.* **144** (2013) 572–578.
- [68] B. Alriksson, A. Sjöde, N.O. Nilvebrant, L.J. Jönsson, Optimal conditions for alkaline detoxification of dilute-acid lignocellulose hydrolysates, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **13** (2006) 599–611.
- [69] E. Palmqvist, B. Hahn-Hägerdal, Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification, *Bioresour. Technol.* **74** (2000) 17–24.
- [70] S.O. Serna-Saldívar, C. Chuck-Hernández, E. Pérez-Carrillo, E. Heredia-Olea, in: M.A.P. Lima, A.P.P. Natalense, *Bioethanol, InTech*, 2012, pp. 51–74.
- [71] V. Senthilkumar, P. Gunasekaran, Bioethanol production from cellulosic substrates: Engineered bacteria and process integration challenges, *J. Sci. Ind. Res.* **64** (2005) 845–853.
- [72] Y. Lin, S. Tanaka, Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **69** (2006) 627–642.
- [73] S. Nikolić, Lj. Mojović, D. Pejin, M. Rakin, M. Vukašinić, Production of bioethanol from corn meal hydrolysates by free and immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* var. *Ellipsoideus*, *Biomass Bioenergy* **34** (2010) 1449–1456.
- [74] S.B. Nikolić, Lj.V. Mojović, M.B. Rakin, D.J. Pejin, V.A. Nedović, Effect of different fermentation parameters on bioethanol production from corn meal hydrolysates by free and immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **84** (2009) 497–503.
- [75] L. Viikari, J. Vehmaanperä, A. Koivula, Lignocellulosic ethanol: From science to industry, *Biomass Bioenergy* **46** (2012) 13–24.
- [76] K. Fujitomi, T. Sanda, T. Hasunuma, A. Kondo, Deletion of the PHO13 gene in *Saccharomyces cerevisiae* improves ethanol production from lignocellulosic hydrolysate in the presence of acetic and formic acids, and furfural, *Bioresour. Technol.* **111** (2012) 161–166.
- [77] C.E. Wyman, Ethanol from lignocellulosic biomass: technology, economics, and opportunities, *Bioresour. Technol.* **50** (1994) 3–16.
- [78] D.G. Olson, J.E. McBride, A.J. Shaw, L.R. Lynd, Recent progress in consolidated bioprocessing, *Curr. Opin. Biotechnol.* **23** (2011) 1–10.

SUMMARY

APPLICATION OF LIGNOCELLULOLYTIC FUNGI FOR BIOETHANOL PRODUCTION FROM RENEWABLE BIOMASS

Jelena M. Jović¹, Jelena Pejin², Sunčica Kocić-Tanackov², Ljiljana Mojović¹

¹*Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade, Belgrade, Serbia*

²*Faculty of Technology, University of Novi Sad, Novi Sad, Serbia*

(Review paper)

Pretreatment is a necessary step in the process of conversion of lignocellulosic biomass to ethanol; by changing the structure of lignocellulose, enhances enzymatic hydrolysis, but often it consumes large amounts of energy and/or needs an application of expensive and toxic chemicals, which makes the process economically and ecologically unfavourable. Application of lignocellulolytic fungi (from the class Ascomycetes, Basidiomycetes and Deuteromycetes) is an attractive method for pre-treatment, environmentally friendly and does not require the investment of energy. Fungi produce a wide range of enzymes and chemicals, which, combined in a variety of ways, together successfully degrade lignocellulose, as well as aromatic polymers that share features with lignin. On the basis of material utilization and features of a rotten wood, they are divided in three types of wood-decay fungi: white rot, brown rot and soft rot fungi. White rot fungi are the most efficient lignin degraders in nature and, therefore, have a very important role in carbon recycling from lignified wood. This paper describes fungal mechanisms of lignocellulose degradation. They involve oxidative and hydrolytic mechanisms. Lignin peroxidase, manganese peroxidase, laccase, cellobiose dehydrogenase and enzymes able to catalyze formation of hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$) such as glyoxal oxidase, pyranose-2-oxidase and aryl-alcohol oxidase are responsible for oxidative processes, while cellulases and hemicellulases are involved in hydrolytic processes. Throughout the production stages, from pre-treatment to fermentation, the possibility of their application in the technology of bioethanol production is presented. Based on previous research, the advantages and disadvantages of biological pre-treatment are pointed out.

Keywords: Biological pretreatment • Fungal enzymes • Bioethanol • Solid state fermentation • Lignocellulosic biomass