

UNIVERZITET U BEOGRADU  
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Jelena M. Jović

**Lignocelulolitička aktivnost odabranih  
izolata autohtonih gljiva Srbije**

doktorska disertacija

Beograd, 2020

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Jelena M. Jović

**The lignocellulolytic activity of selected  
isolates of autochthonous fungi of Serbia**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020

**MENTOR:**

---

Dr Ljiljana Mojović, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko - metalurški fakultet

**ČLANOVI KOMISIJE:**

---

Dr Suzana Dimitrijević-Branković, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko - metalurški fakultet

---

Dr Zorica Knežević-Jugović, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko - metalurški fakultet

---

Dr Maja Vukašinović-Sekulić, vanredni profesor,  
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko - metalurški fakultet

---

Dr Sunčica Kocić-Tanackov, docent,  
Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet

**DATUM ODBRANE:**

---

## ZAHVALNICA

*Veliku zahvalnost dugujem svom mentoru dr Ljiljani Mojović na podršci, razumevanju i dragocenim savetima tokom eksperimentalnog rada i pomoći prilikom izrade publikacija i pisanja teze.*

*Zahvaljujem dr Suzani Dimitrijević-Branković na pomoći, stručnim savetima i sugestijama koje mi je pružila tokom eksperimentalnog rada u okviru ove disertacije.*

*Zahvaljujem dr Zorica Knežević-Jugović i dr Sunčici Kocić-Tanackov na zanimljivim i inspirativnim razgovorima koji su doprineli uspešnoj realizaciji ove teze.*

*Zahvaljujem dr Maji Vukašinović - Sekulić čiji česti saveti, ali i postavljena pitanja, su mi pomogli u prevazilaženju problema i dilema sa kojim sam se susretala tokom izvođenja eksperimenata.*

*Zahvaljujem svojim koleginicama, profesorima i tehničarima sa Katedre za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju, Tehnološko - metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, bez čije podrške, saveta i šala, ne bi bilo lako prevazići probleme koji svakodnevno nastaju u laboratoriji, posebno u popodnevnom i večernjim satima.*

*Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici, mami Gordani, tati Miroslavu i bratu Aleksandru, bez čije nesebične pomoći i podrške, do realizacije ove disertacije nikada ne bi došlo. Hvala vam što ste bili moj tim od prvog izlaska na teren i prikupljanja uzoraka, do konačne izrade disertacije.*

# Lignocelulolitička aktivnost odabranih izolata autohtonih gljiva Srbije

## Sažetak

Gljive su tokom evolucije razvile mehanizme razgradnje lignoceluloze koji su bazirani na aktivnosti enzima sposobnih da raskinu intrapolimerne i interpolimerne veze u lignoceluloznom supstratu i na taj način oslobode fermentabilne šećere, zbog čega se poslednjih godina intenzivno istražuje mogućnost njihove primene u predtretmanu lignoceluloznog supstrata. Takođe, zbog sposobnosti uklanjanja teških metala, kao i razgradnje pesticida, poliaromatičnih ugljovodonika, polihlorovanih bifenila i drugih zagađivača slične strukture ligninu, mogu se koristiti i u bioremedijaciji zemljišta i vode. Predmet istraživanja u okviru ove disertacije je bila izolacija, selekcija i identifikacija autohtonih gljiva Srbije sa izraženom lignocelulolitičkom aktivnošću. Osnovni cilj je bio odabir izolata sa visokim potencijalom za primenu u predtretmanu biomase na osnovu ispoljene ligninolitičke i hidrolitičke aktivnosti i definisanje uslove za unapređenje ligninolitičke aktivnosti odabranog izolata koji bi bili primenljivi u predtretmanu lignoceluloznog otpada radi postizanja efikasne hidrolize.

Istraživanje je obuhvatalo tri faze. U prvoj fazi je izvršena izolacija gljiva, ispitivanje ligninolitičke i hidrolitičke aktivnosti uspešno izolovanih uzoraka, selekcija i identifikacija potencijalnih kandidata za primenu u biotehnološkim procesima na lignoceluloznom supstratu. Među 12 uspešno izolovanih gljiva, visokom ligninolitičkom aktivnošću su se istakli izolati identifikovani kao *Trametes hirsuta* F13 i *Stereum gausapatum* F28, dok je izolat identifikovan kao *Myrmaecium fulvopruinatum* F14 ispoljio visoku hidrolitičku aktivnost, ali zanemarljivu ligninolitičku aktivnost. Izolat *T. hirsuta* F13 je ispoljio lakaznu i mangan peroksidaznu aktivnost, dok je *S. gausapatum* F28 pored lakazne i mangan peroksidazne ispoljio i slabu lignin peroksidaznu aktivnost. Izolat *M. fulvopruinatum* F14 je pokazao najbolje vrednosti karboksimetil celulazne ( $5253,42 \pm 262,67$  U/l na čvrstom supstratu i  $3159,98 \pm 158,00$  U/l u tečnom medijumu) i ksilanazne aktivnosti ( $6831,15 \pm 304,15$  U/l na čvrstom i  $3792,97 \pm 189,65$  U/l u tečnom medijumu), dok su *T. hirsuta* F13 i *S. gausapatum* F28 ispoljili umerene aktivnosti ovih enzima (oko 1000 U/l). Zbog zanemarljive ligninolitičke aktivnosti *M. fulvopruinatum* F14 nije razmatran kao potencijalni kandidat za primenu u tretmanu lignocelulozne biomase.

U drugoj fazi je ispitan potencijal razgradnje lignoceluloznog otpada – piljevine bukve – pomoću *T. hirsuta* F13 i *S. gausapatum* F28, koji je obuhvatao uticaj različitih faktora (vlažnosti supstrata, tip kultivacije, dodatak mineralnog medijuma) na ligninolitičku aktivnost, kao i selektivnost razgradnje lignoceluloze koja je procenjena pomoću koeficijenta selektivnosti sa ciljem da se odabere najbolji izolat za primenu u predtretmanu. Istraživanje je pokazalo da je kultivacija na čvrstom supstratu generalno pogodnija za proizvodnju ligninolitičkih enzima i da se dodavanjem mineralnog medijuma proizvodnja može dodatno unaprediti, ali je pokazalo i da vlažnost supstrata utiče na tip ligninolitičke aktivnosti – viša vlažnost podstiče lakaznu, a niže mangan peroksidaznu aktivnost. Utvrđeno je da je izolat *T. hirsuta* F13 bolji proizvođač lakaza i da je sposoban za proizvodnju ovog enzima i u tečnom medijumu u kom je nakon 7 dana inkubacije zabeležena lakazna aktivnost od  $315,9 \pm 0,7$  U/l, dok je *S. gausapatum* F28 bolji proizvođač mangan zavisnih peroksidaza, ali ispoljava visoku ligninolitičku aktivnost samo prilikom kultivacije na čvrstom supstratu i u uslovima niže vlažnosti nego *T. hirsuta* F13. Oba izolata su pokazala potencijal za primenu u predtretmanu lignoceluloznog supstrata, međutim analizom selektivnosti razgradnje piljevine bukve veća selektivnost je postignuta izolatom *T. hirsuta* F13 (koeficijent selektivnosti 1,7) nego izolatom *S. gausapatum* F28 (1,1), čime je potvrđeno da *T. hirsuta* F13 brže razgrađuje lignin nego celulozu, zbog čega je bolji kandidat za primenu u lignoceluloznom predtretmanu nego *S. gausapatum* F28.

U trećoj fazi je ispitana mogućnost primene melasne džibre poreklom od šećerne repe u predtretmanu lignoceluloznog supstrata kao suplementa za unapređenje ligninolitičke aktivnosti izolata *Trametes hirsuta* F13 sa ciljem poboljšanja efikasnosti hidrolize tretiranog supstrata. Izvršena je analiza i optimizacija kultivacionih uslova primenom eksperimentalnog dizajna, funkcije poželjnosti i genetičkog algoritma. Analize su pokazale da bi melasna džibra mogla da bude adekvatna alternativa mineralnom medijumu kao suplement za unapređenje ligninolitičke aktivnosti izolata *T. hirsuta* F13, ali i da dominantni tip ligninolitičke aktivnosti zavisi od koncentracije džibre – pri nižim koncentracijama dominira mangan peroksidazna, dok pri višim koncentracijama dominira lakazna aktivnost. Koncentracija džibre od 13%, vlažnost supstrata od 63% i temperatura 25 °C su dobijene kao optimalni uslovi predtretmana. Primena melasne džibre pod dobijenim optimalnim uslovima je unapredila lakaznu aktivnost ~2,4 puta dok je mangan peroksidazna aktivnost unapređena ~3 puta. Efikasnost hidrolize komercijalnim enzimom Cellic CTec2 nakon predtretmana je takođe bila poboljšana. Nakon 24 h hidrolize supstrata tretiranog 7 i 18 dana izolatom *T. hirsuta* F13 u prisustvu melasne džibre

oslobođeno je, redom,  $20,54 \pm 0,80$  mg/ml i  $63,58 \pm 1,47$  mg/ml redukujućih šećera, dok je tretman u odsustvu melasne džibre dao, redom,  $16,84 \pm 0,30$  mg/ml i  $53,63 \pm 2,16$  mg/ml redukujućih šećera. Razlika između tretmana u prisustvu i odsustvu melasne džibre je bila statistički značajna i nakon 7 i nakon 18 dana ( $p < 0,05$ ), što je pokazalo da primena melasne džibre u predtretmanu gljivama može unaprediti predtretman, a time i saharifikaciju.

**Ključne reči:** gljive, lignoceluloza, melasna džibra, lakaza, mangan peroksidaza, celulaza, ksilanaza, *Trametes hirsuta* F13, *Stereum gausapatum* F28, *Myrmaecium fulvopruinatum* F14.

**Naučna oblast:** Tehnološko inženjerstvo

**Uža naučna oblast:** Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija

**UDK broj:**

# The lignocellulolytic activity of selected isolates of autochthonous fungi of Serbia

## Summary

During evolution, fungi have developed mechanisms of lignocellulose degradation that are based on the activity of enzymes capable of breaking intrapolymer and interpolymer bonds in the lignocellulose substrate, thus releasing fermentable sugars, which is the reason for the intensive investigation of their possible use in the pretreatment of lignocellulose in recent years. They can also be used in bioremediation of soil and water due to their ability to remove heavy metals, as well as to decompose pesticides, polyaromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls, and other pollutants with a structure similar to lignin. The subject of the research within this dissertation was the isolation, selection, and identification of fungi autochthonous for Serbia with pronounced lignocellulolytic activity. The main goal was to select isolates with the high potential for use in biomass pretreatment based on the expressed ligninolytic and hydrolytic activity and to define the conditions that would improve the ligninolytic activity of the selected isolate, which would be applicable in the pretreatment of lignocellulosic waste with improved hydrolysis efficiency.

The research was performed in three phases. The first phase included the isolation of fungi, testing of ligninolytic and hydrolytic activity of successfully isolated samples, selection, and identification of potential candidates for application in biotechnological processes on a lignocellulosic substrate. Among the 12 successfully isolated fungi, isolates identified as *Trametes hirsuta* F13 and *Stereum gausapatum* F28 showed high ligninolytic activity, while the isolate identified as *Myrmaecium fulvopruinatum* F14 exhibited high hydrolytic activity but negligible ligninolytic activity. *T. hirsuta* F13 showed laccase and manganese peroxidase activity, while *S. gausapatum* F28, besides laccase and manganese peroxidase, also exhibited a weak lignin peroxidase activity. The isolate *M. fulvopruinatum* F14 showed the best values of carboxymethyl cellulase activity ( $5253.42 \pm 262.67$  U / l in a solid substrate and  $3159.98 \pm 158.00$  U / l in liquid medium) and xylanase activity ( $6831.15 \pm 304.15$  U / l in solid and  $3792.97 \pm 189.65$  U / l in liquid medium), while *T. hirsuta* F13 and *S. gausapatum* F28 showed moderate activities of these enzymes (about 1000 U / l). Because of negligible ligninolytic



activity, *M. fulvopruinatum* F14 was not considered for use in the treatment of lignocellulosic biomass.

In the second phase of the research, the potential for degradation of lignocellulosic waste (beech sawdust) by *T. hirsuta* F13 and *S. gausapatum* F28, the influence of various factors (substrate moisture, type of cultivation, mineral medium addition) on the ligninolytic activity as well as the selectivity of lignocellulose degradation was evaluated using a selectivity coefficient in order to select the best isolate for the use in pretreatment. Research has shown that solid substrate cultivation is generally more suitable for the production of ligninolytic enzymes and that the addition of a mineral medium can further improve the production, but has revealed that substrate humidity affects the type of ligninolytic activity – higher humidity stimulates laccase while lowers manganese peroxidase activity. It was found that the isolate *T. hirsuta* F13 was a better producer of laccase and was able to produce this enzyme in a liquid medium. The highest value of laccase activity of  $315.9 \pm 0.7$  U/l was recorded after seven days of incubation under submerged cultivation conditions. *S. gausapatum* F28 was a better producer of manganese-dependent peroxidases, but exhibited high ligninolytic activity only when cultivated on a solid substrate and under conditions of lower substrate moisture compared to *T. hirsuta* F13. Both isolates showed potential for use in the pretreatment of the lignocellulosic substrate; however, when the selectivity of beech sawdust degradation was analyzed, higher selectivity was achieved with *T. hirsuta* F13 isolate (selectivity coefficient 1.7) than with *S. gausapatum* F28 isolate (1.1), which confirmed that *T. hirsuta* F13 degrades lignin faster than cellulose, making it a better candidate for use in lignocellulose pretreatment than *S. gausapatum* F28.

In the third phase, the potential for use of sugar beet molasses stillage in the pretreatment of the lignocellulosic substrate as a supplement to improve the ligninolytic activity of *T. hirsuta* F13 and thus to improve the efficiency of hydrolysis of the treated substrate was investigated. Analysis and optimization of cultivation conditions were performed using experimental design, desirability function, and genetic algorithm. Results have shown that molasses stillage could be an adequate alternative to mineral medium as a supplement to improve the ligninolytic activity of *T. hirsuta* F13, but also that the dominant type of ligninolytic activity depends on the concentration of the stillage – at lower concentrations, the dominant type was manganese peroxidase, while at higher concentrations, it was laccase activity. A concentration of molasses stillage of 13%,

substrate moisture of 63%, and a temperature of 25 °C were obtained as optimal pretreatment conditions. The application of molasses stillage to the pretreatment, together with the obtained optimal cultivation conditions, improved laccase activity ~2.4 times, and manganese peroxidase activity ~3 times. The hydrolysis efficiency of the pretreated substrate with the commercial enzyme Cellic CTec2 was also improved. After 24 h of hydrolysis of the substrate treated for 7 and 18 days with *T. hirsuta* F13 isolate in the presence of molasses stillage,  $20.54 \pm 0.80$  mg/ml and  $63.58 \pm 1.47$  mg/ml reducing sugars were released, respectively, while from the substrate treated in the absence of molasses,  $16.84 \pm 0.30$  mg/ml and  $53.63 \pm 2.16$  mg/ml reducing sugars were released, respectively. The difference between treatments in the presence and absence of molasses stillage was statistically significant in both cases, after 7 and 18 days ( $p < 0.05$ ), which implies that the application of molasses stillage to the fungal pretreatment of lignocellulose can improve pretreatment result, and thus enhance hydrolysis.

**Key words:** fungi, lignocellulose, molasses stillage, laccase, manganese peroxidase, cellulase, xylanase, *Trametes hirsuta* F13, *Stereum gausapatum* F28, *Myrmaecium fulvopruinatum* F14.

**Scientific field:** Technological engineering

**Scientific subfield:** Biochemical engineering and biotechnology

**UDC number:**

## Lista oznaka i skraćenica

**PAH** - poliaromatični ugljovodonici;

**PCB** - polihlorovani bifenili;

**LCC** - poznato kao lignin-ugljenohidratni kompleks (eng. *lignin carbohydrate complexes – LCC*);

**HMF** - hidroksimetil furfural;

**AFEX** - dekompozicija eksplozijom u prisustvu amonijaka;

**CDH** - celobioza dehidrogenaza;

**FAD** - flavin adenin dinukleotid;

**CBQ** - celobioza:hinon oksidoreduktaza (eng. *cellobiose quinone oxidoreductase – CBQ*);

**CBMOD** - modul za vezivanje za ugljene hidrate (eng. *carbohydrate-binding module – CBMOD*);

**SHF** - odvojena hidroliza i fermentacija (eng. *separate hydrolysis and fermentation – SHF*);

**SimSF** - simultana saharifikacija i fermentacija;

**EM** - Embden-Majerhofov put;

**ED** - Entner–Doudorofov put;

**ATP** - adenzin trifosfat;

**CBP** - konsolidovani bioproces;

**DMC** - direktna mikrobna konverzija;

**COD** - hemijska potrošnja kiseonika (eng. *chemical oxygen demand – COD*);

**EDTA** - etilen diamin tetra acetat dihidrat (eng. *ethylenediaminetetraacetic acid*);

**ITS** - interni transkripcioni spejser;

**LBM** – mineralni medijum za proizvodnju ligninolitičkih enzima (eng. *Ligninolytic basale medium*);

**LBMI** – mineralni medijum za pripremu inokuluma za testove ligninolitičke aktivnosti;

**LBMA** – mineralni medijum za kvalitativnu analizu ligninolitičke aktivnosti;

**CBM** – mineralni medijum za proizvodnju hidrolitičkih enzima celulaza (eng. *Cellulase basale medium*);

**CMC** – karboksimetil celuloza (en. *Carboxymethyl cellulose*);

**CMCaza** – karboksimetil celulaza;

**MnP** – mangan peroksidaza;

**LiP** – lignin peroksidaza;

**VP** – verzatil peroksidaze;

**SSF** – kultivacija na čvrstom supstratu (*en. Solid State Fermentation*);

**SF** – kultivacija u tečnom supstratu (*en. Submerged Fermentation*);

**w/v** – masa/zapremina;

**w/w** – masa/masa;

**LMS** - supstrat kome je dodat mineralni medijum;

**SSdS** - supstrat kome nije dodat mineralni medijum;

**FPU** – filter papir jedinica (*en. Filter Paper Unit*);

**CMCU** – karboksimetil celulozna jedinica (*en. Carboxymethyl Cellulose Unit*);

**ABTS** – 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina);

**m<sub>L</sub>** – gubitak ukupnog lignina;

**m<sub>t</sub>** – gubitak biomase;

**ANOVA** – analiza varijanse;

**FFD** – frakcionisani faktorijski dizajn (*eng. Fractional Factorial Design – FFD*);

**PBD** – Plaket-Burman dizajn (*eng. Plackett-Burham design – PBD*);

**CCD** – centralni kompozitni dizajn (*eng. Central Composite Design – CCD*);

**CCI** – upisani centralni kompozitni dizajn (*eng. Inscribed Central Composite Design – CCI*);

**CCF** – centralni kompozitni dizajn sa tačkama u centru površina koje formiraju tačke faktorijskog dizajna (*eng. Face-Centered Central Composite Design – CCF*);

**BBD** – Boks-Benken dizajn (*eng. Box-Behnken Design – BBD*);

**RSM** – metodologija odgovora površine (*eng. Response Surface Method – RSM*);

**GA** – genetički algoritam (*eng. Genetic Algorithm*);

**AP** - adekvatna preciznost (*eng. adequate precision – AP*);

**VLS** – lignocelulozni supstrat kome je vlažnost supstrata podešena samo destilovanom vodom;

**MLS** – lignocelulozni supstrat kome je vlažnost supstrata podešena dodavanjem melasne džibre;

**NTS** – netretiran supstrat.

## Spisak tabela

<b>Tabela 1:</b> Podela i karakteristike sirovina biomase prema poreklu sirovog materijala i procesu transformacije [1].....	2
<b>Tabela 2:</b> Udeo osnovnih komponenti lignoceluloze u zavisnosti od porekla biomase [30].....	4
<b>Tabela 3:</b> Veze unutar lignoceluloznog kompleksa [30, 45].....	7
<b>Tabela 4:</b> Veličina komada u zavisnosti od primenjene metode mehaničkog usitnjavanja [47, 48].....	10
<b>Tabela 5:</b> Neke fungalne hemicelulaze, njihovi supstrati i produkti razgradnje [81, 102, 106].....	23
<b>Tabela 6:</b> Organizmi producenti etanola i supstrat koji mogu fermentisati [121].....	30
<b>Tabela 7:</b> Hemijski sastav melasne džibre poreklom od šećerne repe [144–146].....	36
<b>Tabela 8:</b> Karakteristike lokaliteta u vreme prikupljanja gljiva.....	48
<b>Tabela 9:</b> Veličina inokuluma korišćena u različitim fazama istraživanja.....	50
<b>Tabela 10:</b> Opseg vrednosti faktora korišćenih u frakcionisanom faktorijskom dizajnu..	72
<b>Tabela 11:</b> Kvalitativna analiza ligninolitičke i hidrolitičke aktivnosti izolata.....	78
<b>Tabela 12:</b> Sojevi/izolati koji su pokazali najveću sličnost sa izolatima F13, F14 i F28. .	87
<b>Tabela 13:</b> Aktivnost ligninolitičkih i hidrolitičkih enzima izolata <i>M. fulvopruinatum</i> F14 dobijena SSF i SF kultivacijom (LiP – lignin peroksidaze; MnP – mangan peroksidaze; VP – verzatil peroksidaze).....	92
<b>Tabela 14:</b> Struktura korišćene lignocelulozne biomase.....	93
<b>Tabela 15:</b> Enzimska aktivnost i proizvodnja proteina po jedinici mase supstrata i specifična aktivnost dobijena na lignoceluloznom supstratu sa dodatim mineralnim medijumom (LMS) i supstratu bez mineralnog medijum (SSdS) izolatima <i>T. hirsuta</i> F13 i <i>S. gausapatum</i> F28.....	100
<b>Tabela 16:</b> Značajnost regresionih koeficijenata glavnih efekata dobijenih za za linearno fitovan model preklopnog dizajna: A – veličina inokuluma, B – koncentracija melasne džibre, C – vlažnost supstrata, D – temperatura, E – inicijalna pH.....	107
<b>Tabela 17:</b> Matrica centralnog kompozitnog dizajna sa predviđenim i izmerenim vrednostima odgovora (lakazne aktivnosti i MnP aktivnosti). Podaci su prikazani standardnim redosledom eksperimenata: A je koncentracija džibre (%), B je vlažnost	

supstrata (%), C je temperatura inkubacije (°C). Originalne vrednosti faktora su date u zagradi pored odgovarajućih kodiranih vrednosti.....108

**Tabela 18:** Test značajnosti regresionih koeficijenata i ANOVA analiza modela lakazne aktivnosti: A – koncentracija džibre; B – vlažnost supstrata; C – temperatura.....110

**Tabela 19:** Test značajnosti regresionih koeficijenata i ANOVA analiza modela mangan peroksidazne aktivnosti: A – koncentracija džibre; B – vlažnost supstrata; C – temperatura.....111

**Tabela 20:** Redukcija biomase i lignina nakon 18 i 35 dana predtretmana MLS i VLS. ....123

## Spisak slika

<b>Slika 1:</b> 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.....	6
<b>Slika 2:</b> Uprošćena šema proizvodnje bioetanola iz lignocelulozne biomase.....	8
<b>Slika 3:</b> Struktura celulozoma.....	19
<b>Slika 4:</b> Metode hidrolize: a) dvostepeni postupak razblaženim kiselinama, b) enzimaska hidroliza – odvojena hidroliza i fermentacija, c) enzimaska hidroliza – simultana saharifikacija i fermentacija.....	27
<b>Slika 5:</b> Entner-Doudorofov put fermentacije u <i>Zymomonas sp.</i> [126].....	31
<b>Slika 6:</b> Predloženi putevi katabolizma ksiloze gljivama [129].....	32
<b>Slika 7:</b> Izgled lokaliteta u vreme zimskog (a i b) i prolećnog (c i d) sakupljanja uzoraka gljiva.....	47
<b>Slika 8:</b> Izgled supstrata sa kog su prikupljeni uzorci gljiva a) kora drveta, b) oboreno deblo obraslo mahovinom i gljivama, c) opalo lišće, d) oborene grane.....	48
<b>Slika 9:</b> Standardna prava a) glukoze korišćena pri izračunavanju celulazne aktivnosti i b) ksiloze korišćena za izračunavanje ksilanazne aktivnosti.....	54
<b>Slika 10:</b> Standardna prava za određivanje koncentracije proteina prema Lorijevoj metodi: a) više koncentracije proteina – 550 nm i b) niže koncentracije proteina – 750 nm.....	55
<b>Slika 11:</b> Standardna prava glukoze korišćena pri izračunavanju koncentracije oslobođenih šećera tokom hidrolize.....	61
<b>Slika 12:</b> Prikaz kompromisa koji se dobija u frakcionisanom faktorijskom dizajnu. Redovi pokazuju broj eksperimenata (n) u odgovarajućem FFD. Kolone pokazuju broj faktora koje treba ispitati u eksperimentu. Čelije na preseku kolone i reda u gornjem levom uglu daju forma FFD $2^{(k-p)}=n$ sa konkretnim brojem faktora i reda frakcije, kao i rezoluciju dizajna koja je napisana latinskim brojem; u donjem desnom uglu boldiranim slovima je data informaciju o tome kako se mogu formirati faktori koji nedostaju, koji su eliminisani frakcionisanjem. Prazne čelije su nemogući FFD [182, 185].....	68
<b>Slika 13:</b> Geometrija centralnog kompozitnog dizajna sa dva faktora (a) i tri faktora (b): zelenom bojom su obeležene tačke faktorijskog dizajna, plavom aksijalne tačke, a crvenom centralne [181, 182].....	70

<b>Slika 14:</b> Geometrija Boks-Benken dizajna. Plavom bojom su obeležene centralne tačke [192].....	70
<b>Slika 15:</b> Promena profila funkcija transformacije u zavisnosti od vrednosti koeficijenata $r$ , $r_1$ i $r_2$ ( $Y_{ix}$ je 3, $Y_i^x$ je 1, $c_i$ je 2): a) transformacija maksimizacije odgovora, b) transformacija minimizaciji odgovora, c) target funkcija [151].....	76
<b>Slika 16:</b> Rezltati kvalitativne analize lakazne aktivnosti dobijeni izolatom F13 u testu oksidacije $\alpha$ -naftola (a) i gvajakola (b) i izolatom F28 u testu oksidacije $\alpha$ -naftola (c) i gvajakola (d).....	80
<b>Slika 17:</b> Kvalitativna analiza lignin peroksidazne aktivnosti: a) kontrola, b) izolat F28, c) izolat F14.....	81
<b>Slika 18:</b> Ligninolitička aktivnost izolovanih gljiva dobijena na čvrstom supstratu (SSF) i tečnom supstratu (SF): a) lakazna aktivnost, b) aktivnost mangan zavisnih peroksidaza; c) aktivnost verzatil peroksidaza (mangan nezavisnih peroksidaza) i d) aktivnost lignin peroksidaza.....	83
<b>Slika 19:</b> Aktivnost hidrolitičkih enzima proizvedenih kultivacijom na čvrstom supstratu (SSF) ili u tečnom supstratu (SF): a) celulazna aktivnost, b) ksilanazna aktivnost.....	84
<b>Slika 20:</b> Izgled 7 dana starih micelijuma izolata a) <i>T. hirsuta</i> F13, b) <i>M. fulvopruinatum</i> , b) <i>S. gausapatum</i> gajenih na krompir dekstroznom agaru.....	84
<b>Slika 21:</b> Gel elektroforeza sa PCR proizvodima ITS sekvenci.....	85
<b>Slika 22:</b> Komparativna filogenetska analiza izolata <i>T. hirsuta</i> F13 i <i>S. gausapatum</i> F28 i njima bliskih vrsta/izolata bazirana na ITS sekvencama. Parametri korišćeni za konstruisanje filogenetskog stabla su: Tamura-Nei model, test filogenije primenom "bootstrap" metode, broj replikacija je bio 1000. NCBI pristupni brojevi su dati u zagradi. ....	86
<b>Slika 23:</b> Izgled plodonosnog tela i oštećenja na plodonosnom telu izolata F28 ( <i>S. gausapatum</i> ).....	88
<b>Slika 24:</b> Mikroskopske karakteristike micelijuma <i>S. gausapatum</i> F28 izolata: a) pigmentne kapi na površini i unutar hifa, b) generativne hife sa dvostrukim kukičastim konekcijama.....	89
<b>Slika 25:</b> Mikroskopske karakteristike micelijuma izolata <i>T. hirsuta</i> F13 (a) generativne hife i (b) jednostruka kukičasta konekcija (obeležena strelicom).....	89
<b>Slika 26:</b> Skeletne (a) i generativne (b) hife izolata <i>M. fulvopruinatum</i> F14.....	90
<b>Slika 27:</b> Koncentracija oslobođenih šećera tokom hidrolize enzimskim ekstraktima.....	92



<b>Slika 28:</b> Uticaj kultivacionih uslova na lakaznu aktivnost izolata <i>T. hirsuta</i> F13 i <i>S. gausapatum</i> F28.....	94
<b>Slika 29:</b> Uticaj kultivacionih uslova na mangan peroksidaznu aktivnost izolata <i>T. hirsuta</i> F13 i <i>S. gausapatum</i> F28.....	96
<b>Slika 30:</b> Uticaj kultivacionih uslova na lignin peroksidaznu aktivnost izolata <i>T. hirsuta</i> F13 i <i>S. gausapatum</i> F28.....	96
<b>Slika 31:</b> Uticaj vlažnosti na lakaznu aktivnost izolata <i>T. hirsuta</i> F13 i <i>S. gausapatum</i> F28.....	98
<b>Slika 32:</b> Uticaj vlažnosti na aktivnost mangan zavisnih peroksidaza izolata <i>T. hirsuta</i> F13 i <i>S. gausapatum</i> F28.....	98
<b>Slika 33:</b> Uticaj vlažnosti na aktivnost mangan nezavisnih (verzatil) peroksidaza izolata <i>T. hirsuta</i> F13 i <i>S. gausapatum</i> F28.....	99
<b>Slika 34:</b> Razgradnja lignina i biomase izolatima <i>T. hirsuta</i> F13 i <i>S. gausapatum</i> F28. Stupci na grafiku predstavljaju procenat mase suvog supstrata, udeo Klasonovog lignina, lignina rastvornog u kiselinama i ukupnog lignina u suvoj masi supstrata pre i posle tretmana. Asteriskom su obeležene statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ) između preostalog lignina (lignina nakon predtretmana) i kontrole (inicijalne mase lignina), kao i preostale mase supstrate (mase supstrata nakon predtretmana) i inicijalne mase supstrata (kontrole). Sve vrednosti su računane u odnosu na inicijalnu masu.....	102
<b>Slika 35:</b> Poređenje lakazne (a) i mangan peroksidazne aktivnosti (b) primenom različitih agenasa: 10% rastvora džibre, 20% rastvora džibre, destilovane vode ( $dH_2O$ ) i mineralnog medijuma (LBM).....	105
<b>Slika 36:</b> Grafici dijagnostike regresije modela lakazne aktivnosti: a) Rezidual prema Fitovanju (eng. <i>Residuals vs. Fitted</i> ) grafik ispituje linearnu vezu među promenljivim; b) Normalni Q-Q (eng. <i>Normal Q-Q</i> ) grafik ispituje distribuciju podataka modela; c) Skala-lokacija (eng. <i>Scale-location</i> ) grafik ispituje homoskedastičnost modela; d) Reziduali prema Meri Uticaja (eng. <i>Residuals vs. Leverage</i> ) ispituje uticajne tačke, vrednosti Kukovih distanci (eng. <i>Cook's distances</i> ) su manje od 0.5.....	112
<b>Slika 37:</b> Grafici dijagnostike regresije modela MnP aktivnosti: a) Rezidual prema Fitovanju (eng. <i>Residuals vs. Fitted</i> ) grafik ispituje linearnu vezu među promenljivim; b) Normalni Q-Q (eng. <i>Normal Q-Q</i> ) grafik ispituje distribuciju podataka modela; c) Skala-lokacija (eng. <i>Scale-location</i> ) grafik ispituje homoskedastičnost modela; d) Reziduali prema Meri Uticaja (eng. <i>Residuals vs. Leverage</i> ) ispituje uticajne tačke, vrednosti Kukovih distanci (eng. <i>Cook's distances</i> ) su manje od 0.5.....	113

<b>Slika 38:</b> Vrednosti Kukovih distanci rezidualnih tačaka modela lakazne aktivnosti (a) i modela MnP aktivnosti (b).....	114
<b>Slika 39:</b> 3D grafici i grafici kontura pokazuju uticaj (a) koncentracije džibre i vlažnosti supstrata pri temperaturi 27 °C, (b) koncentracije džibre i temperature pri vlažnosti 70%, (c) vlažnosti supstrata i temperature pri koncentraciji džibre 13% na lakaznu aktivnost izolata <i>T. hirsuta</i> F13.....	115
<b>Slika 40:</b> 3D grafici i grafici kontura pokazuju uticaj (a) koncentracije džibre i vlažnosti supstrata pri temperaturi 27 °C, (b) koncentracije džibre i temperature pri vlažnosti 70%, (c) vlažnosti supstrata i temperature pri koncentraciji džibre 13% na MnP aktivnost izolata <i>T. hirsuta</i> F13.....	116
<b>Slika 41:</b> Varijacije lakazne – ▽, ksilanazne – ○ i celulazne – × aktivnosti u različitim eksperimentima (pod različitim kultivacionim uslovima).....	118
<b>Slika 42:</b> Simulacija genetičkog algoritma – promene u populaciji do postizanja najbolje vrednosti generalne funkcije poželjnosti.....	119
<b>Slika 43:</b> Validacija odabranih optimalnih uslova ( $p > 0,05$ ; razlika statistički nije značajna).....	120
<b>Slika 44:</b> Lakazna, MnP i VP aktivnosti dobijene nakon 7, 18 i 35 dana inkubacije pod optimalnim uslovima. VLS – lignocelulozni supstrat kome je vlažnost supstrata podešena samo destilovanom vodom; MLS – lignocelulozni supstrat kome je vlažnost supstrata podešena dodavanjem melasne džibre.....	121
<b>Slika 45:</b> Promene aktivnosti verzatil peroksidaza (VP) tokom pod različitim kultivacionim uslovima, tj. tokom različitih eksperimenata.....	122
<b>Slika 46:</b> Koncentracija redukujućih šećera ekvivalentna koncentraciji glukoze zabeležena nakon 1h, 4h, 24h i 48h saharifikacije kontrole (×), 7 dana (△), 18 dana (⊖) i 35 dana (●) tretiranog supstrata. (MLS – je supstrat kome je dodata melasna džibra pre tretmana izolatom <i>T. hirsuta</i> F13; VLS – supstrat kome nije dodavana melasna džibra pre tretmana izolatom <i>T. hirsuta</i> F13, vlažnost supstrata je podešena destilovanom vodom).....	124

# Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Teorijski deo.....	3
2.1. Hemijske i fizičke karakteristike lignocelulozne biomase.....	3
2.1.1. Hemijske interakcije između komponenti lignoceluloze.....	7
2.2. Predtretman lignocelulozne biomase.....	8
2.3. Metode predtretmana lignocelulozne biomase.....	9
2.3.1. Fizički predtretman.....	9
2.3.2. Fizičko-hemijski predtretman.....	11
2.3.3. Hemijski predtretman.....	14
2.3.4. Biološki predtretman.....	16
2.3.5. Organizmi razgrađivači lignoceluloze.....	17
2.4. Fungalni enzimi i njihovi mehanizmi razgradnje lignoceluloze.....	19
2.4.1. Oksidativni mehanizmi.....	19
2.4.2. Hidrolitički mehanizmi.....	22
2.4.3. Procesni uslovi biološkog predtretmana.....	23
2.5. Metode hidrolize.....	26
2.6. Inhibitori fermentacije i detoksikacija.....	28
2.6.1. Fermentacija hidrolizata.....	28
2.7. Melasna džibra – karakteristike i primena.....	32
2.8. Cilj istraživanja.....	37
3. Eksperimentalni deo.....	38
3.1. Materijali.....	38
3.1.1. Agensi za molekularno-biološke eksperimente.....	38
3.1.2. Supstrati i podloge.....	38
3.1.3. Reagensi, boje i enzimi.....	38
3.1.4. Supstance p.a. čistoće.....	39
3.1.5. Uređaji i servisi.....	41
3.1.6. Softver.....	41
3.2. Hranljivi medijumi, puferi i rastvori reagenasa.....	42
3.2.1. Hranljivi medijumi.....	42
3.2.2. Puferi.....	43

Puferi za testove enzimске aktivnosti.....	43
Puferi za ekstrakciju DNK molekula.....	44
3.2.3. Rastvori reagenasa.....	44
3.2.4. Gel za elektroforezu.....	46
3.3. Metode.....	47
3.3.1. Izolacija i selekcija gljiva.....	47
Izolacija gljiva.....	47
Selekcija izolata.....	49
3.3.2. Priprema inokuluma.....	49
3.3.3. Kultivacioni uslovi proizvodnje enzima.....	50
3.3.4. Ekstrakcija enzima.....	51
3.3.5. Enzimska analiza.....	52
Kvalitativna analiza.....	52
Kvantitativna analiza.....	52
3.3.6. Određivanje koncentracije proteina.....	55
3.3.7. Izračunavanje enzimске aktivnosti.....	56
3.3.8. DNK izolacija.....	58
3.3.9. PCR amplifikacija ITS sekvenci.....	59
3.3.10. Gel elektroforeza.....	59
3.3.11. Sekvenciranje i identifikacija.....	59
3.4. Hidroliza.....	60
3.4.1. Ispitivanje hidrolitičkog potencijala izolata.....	60
3.4.2. Hidroliza predtretiranog supstrata.....	60
3.4.3. Određivanje koncentracije šećera oslobođenog hidrolizom.....	60
3.5. Analiza supstrata.....	61
3.5.1. Određivanje suve mase supstrata.....	61
3.5.2. Određivanje ekstrakata.....	61
3.5.3. Određivanje lignina.....	62
3.5.4. Određivanje holoceluloze.....	64
3.5.5. Određivanje sadržaja pepela.....	64
3.5.6. Određivanje ukupnog azota.....	64
3.6. Statistička analiza.....	65
3.7. Eksperimentalni dizajn.....	65
3.7.1. Frakcionisani faktorijski dizajn.....	71

3.7.2. Metodologija odgovora površine.....	72
3.7.3. Funkcija poželjnosti.....	73
3.7.4. Genetički algoritam.....	77
4. Rezultati i diskusija.....	78
4.1. Izolacija i selekcija izolata.....	78
4.1.1. Kvalitativna analiza.....	78
4.1.2. Kvantitativna analiza.....	81
4.2. Identifikacija izolata sa najboljim aktivnostima ligninolitičkih i hidrolitičkih enzima.....	85
4.3. Hidrolitički i ligninolitički potencijal odabranih izolata.....	91
4.3.1. Potencijal izolata <i>M. fulvopruinatum</i> F14.....	91
4.3.2. Potencijal izolata <i>T. hirsuta</i> F13 i <i>S. gausapatum</i> F28.....	93
Uticaj kultivacionih uslova.....	94
Uticaj vlažnosti supstrata.....	97
Uticaj dodatka mineralnog medijuma i vremena inkubacije na ligninolitičku aktivnost.....	99
Redukcija biomase i lignina.....	102
4.4. Unapređenje ligninolitičke aktivnosti izolata <i>T. hirsuta</i> F13 primenom eksperimentalnog dizajna i suplementacijom melasnom džibrom.....	104
4.4.1. Melasna džibra kao suplement za unapređenje ligninolitičke aktivnosti.....	104
4.4.2. Frakcionisani faktorijski dizajn.....	106
4.4.3. Centralni kompozitni dizajn.....	107
Analiza kvaliteta modela.....	109
Uticaj ispitivanih faktora na lakaznu i mangan peroksidaznu aktivnost izolata <i>T. hirsuta</i> F13.....	114
4.4.4. Optimizacija predtretmana primenom funkcije poželjnosti i genetičkog algoritma.....	117
4.4.5. Validacija predviđenih optimuma i doprinos melasne džibre ligninolitičkoj aktivnosti.....	119
4.4.6. Enzimaska hidroliza i redukcija lignina.....	122
5. Zaključak.....	125
6. Literatura.....	130
7. Prilozi.....	161
7.1. ITS sekvence.....	161

7.2. Taksonomija i sistematika.....	164
7.3. Optimizacija – genetički algoritam (GA).....	166

# 1. Uvod

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 neophodnih 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 – vazduha, biomase), alternativnim izvorima energije i čistijoj, ekološki prihvatljivoj proizvodnji [2, 3]. 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 biotehnološkoj 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 [4, 5]. Prema poreklu sirovog 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) [6]. Hemijske karakteristike strukturnih komponenata čine je veoma interesantnim biotehnološkim 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.

*Tabela 1: Podela i karakteristike sirovina biomase prema poreklu sirovog materijala i procesu transformacije [1]*

<b>Vrsta sirovine</b>	<b>Poreklo sirovine</b>	<b>Karakteristike</b>
<i>Sirovine prve generacije</i>	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
<i>Sirovine druge generacije</i>	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.
<i>Sirovine treće generacije</i>	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

Tokom evolucije gljive su razvile mehanizme za pristup energiji koja je inkorporirana u teško razgradivoj lignoceluloznoj biomasi u formi polisaharida. Saprofitne gljive koje pripadaju klasi Agaricomycetes su još krajem karbona razvile sposobnost degradacije lignina [7]. Fungalni mehanizmi razgradnje lignoceluloze su bazirani na aktivnosti enzima sposobnih da raskinu intrapolimerne i interpolimerne veze lignoceluloznog supstrata oslobađajući na taj način fermentabilne šećere koje koriste u svojoj ishrani za nadoknadu potrebne energije. U zavisnosti od toga koji je tip enzimske aktivnosti potreban za raskidanje veze, razlikuju se dve grupe mehanizama razgradnje lignoceluloze: oksidativni (zaduženi za razgradnju lignina) i hidrolitički (raskidaju veze u polisaharidima) [8, 9]. Kao najefikasniji razgrađivači lignoceluloznog supstrata u prirodi, lignocelulolitičke gljive su privukle pažnju i poslednjih godina se intenzivno istražuje mogućnost njihove primene u biorafineriji i različitim industrijskim procesima [10, 11]. S obzirom na to da je iskorišćenje poljoprivrednog i drugog lignoceluloznog otpada za dobijanje fermentabilnih proizvoda otežano zbog njegove velike otpornosti prema dejstvu proizvodnih mikroorganizama i enzima, pronalaženje efikasne i jeftine metode za primenu ovog supstrata je jedan od primarnih ciljeva istraživanja [12]. S obzirom na to da predtretman gljivama koje razgrađuju lignocelulozu ne zahteva ulaganje dodatne energije i primenu toksičnih hemikalija i ne generišu se opasni sporedni produkti, primena ovih



organizama je privukla veliku pažnju. Do 1976. godine je sakupljeno više od 14000 gljiva koje razgrađuju celulozu i druga nerastvorljiva vlakna [13], a tokom poslednje decenije prijavljivanje novih sojeva gljiva koje razgrađuju lignoceluloznu biomasu je postalo učestalije. Potraga za efikasnim sistemima razgradnje lignoceluloze podstakla je istraživanja gljiva koje su karakteristične za različite geografske regione i koje su se adaptirale na različite klimatske uslove. Efikasni sistemi razgradnje lignina predstavljaju ekološki i ekonomski povoljno alternativno rešenja za biotehnološke i agroindustrijske procese [14].

Osim na primenu u tretmanu lignoceluloznog supstrata, tekuća istraživanja su usmerena i na primenu fungalnih ligninolitičkih mehanizama u procesu bioremedijacije (transformacije ili razgradnje opasnih supstanci do bezbednih ili manje opasnih). Gljivama sposobnim za razgradnju lignoceluloze se mogu ukloniti teški metali iz vode i zemljišta [15–18]. Zahvaljujući nespecifičnom enzimskom sistemu, sačinjenom od lakaza i lignin, mangan i verzatil peroksidaza, gljive su u stanju da razgrađuju složene aromatične polimere, slične strukture kao lignin – pesticide, poliaromatične ugljovodonike (PAH), polihlorovane bifenile (PCB), boje [19–29].

## **2. Teorijski deo**

### **2.1. 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 [30–32]: 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).

Tabela 2: Udeo osnovnih komponenti lignoceluloze u zavisnosti od porekla biomase [30]

Lignocelulozni materijal	Celuloza (%)	Hemiceluloza (%)	Lignin (%)
Stablo tvrdog drveta	40-55	24-40	18-25
Stablo mekog drveta	45-50	25-35	25-35
Ljuska oraha	25-30	25-30	30-40
Kukuruzni oklasak	45	35	15
Trave	25-40	35-50	10-30
Papir	85-99	0	0-15
Slama	30	50	15
Lišće	15-20	80-85	0
Novine	40-55	25-40	18-30

*Celuloza* (slika 1) je prirodni polimer, polisaharid hemijske formule  $(C_6H_{10}O_5)_n$ . 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 [30]. Osnovna gradivna jedinica celuloze je celobioza (dimer glukoze). Primarno celuloza je linearni homopolimer sastavljen od glukoznih ostataka D-konfiguracije međusobno povezanih  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-glikozidnim vezama (slika 1, b1) [30, 33]. 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) [30, 33]. Osim kristalnih, prirodna celuloza sadrži i amorfne tj. parakristalne regione [33]. Postoje četiri glavna polimorfa celuloze: I, II, III, IV [34]. U prirodi je rasprostranjena celuloza I koja predstavlja kombinaciju dve forme  $I_\alpha$  i  $I_\beta$  prisutne u različitim odnosima kod različitih vrsta. Obe forme sadrže celulozne lance sa alternirajućim glukoznim jedinicama okrenutim u suprotnim smerovima. U većini biljaka dominantna forma je  $I_\beta$  [35].

Celuloze su relativno higroskopne (apsorbuju 8-14% vode pri normalnom atmosferskom pritisku, temperaturi 20 °C i relativnoj vlažnosti 60%). Nerastvorne su u vodi u kojoj bubre i u razblaženim kiselinama na niskim temperaturama. Rastvorljivost je povezana sa stepenom hidrolize [30]. Na visokim temperaturama postaju rastvorne s obzirom na to da je uložena energija dovoljna za razbijanje vodoničnih veza koje

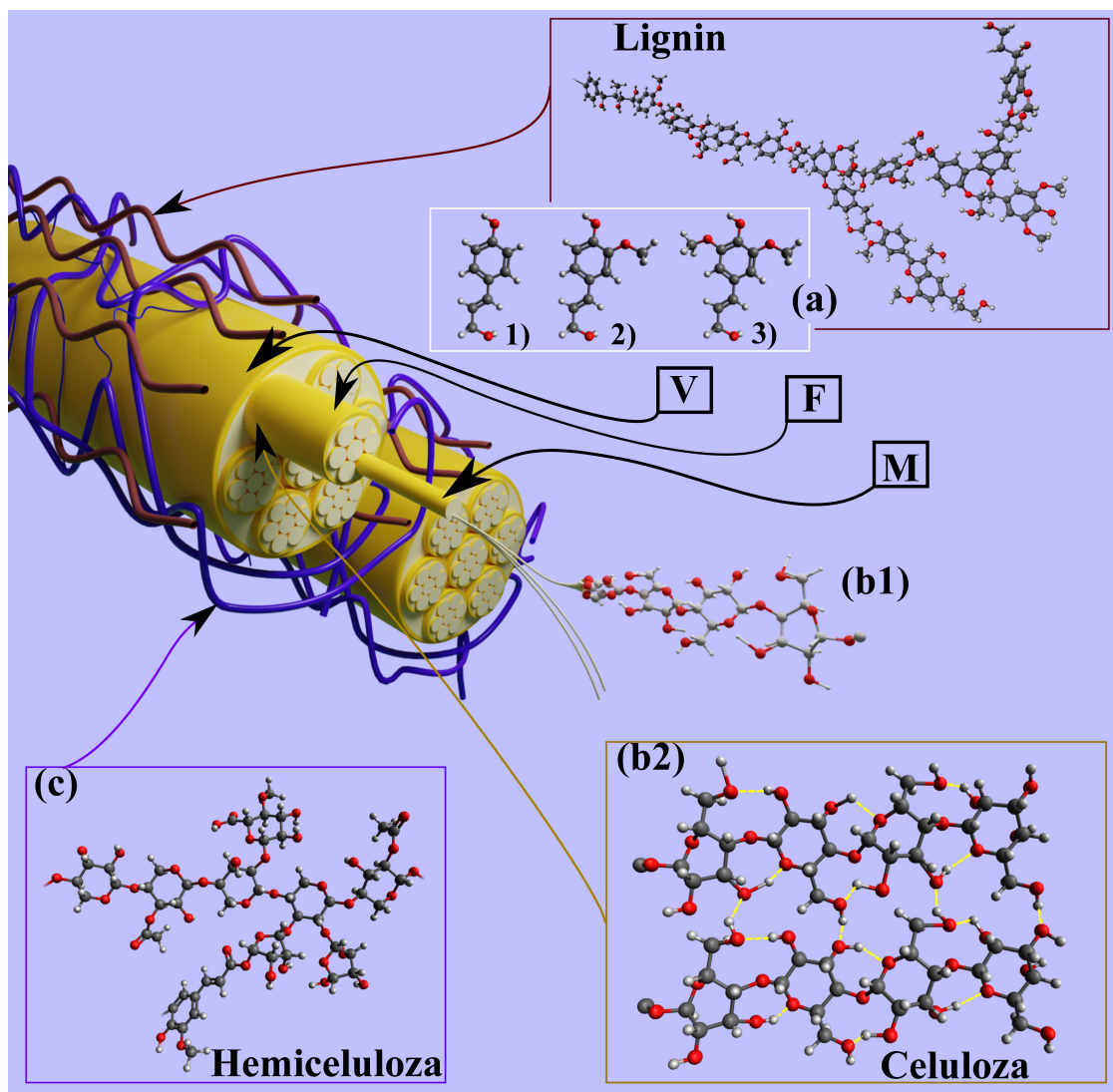
održavaju kristalnu strukturu molekula. Rastvorne su i u koncentrovanim kiselinama u kojima se odvija veliki stepen hidrolize polimera, dok u bazama dolazi do bubrenja i do rastvaranja frakcija molekula male molekulske težine (<200) [30].

*Hemiceluloza* je termin kojim se predstavlja familija polisaharida kao što su arabinoksilani, glukomanani, galaktani, ksiloglukani, ksilani, manani i  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 4)-glukani, koji se mogu naći u ćelijskom zidu biljaka i čiji sastav i organizacija zavise od porekla i metode ekstrahovanja [36]. Za razliku od celuloze, hemiceluloza (slika 1, c) nema kristalno uređenje, veoma je razgranate strukture i poseduje acetil grupe vezane za polimerni lanac. Razgranati polisaharidni lanci sačinjeni su uglavnom od aldopentoznih jedinica (ksiloza i arabinoza) i od nekih aldoheksoza (glukoza, manoza i galaktoza). Osim visokog stepena polimerizacije, polimer hemiceluloze obično ima supstituente na glavnom lancu ili granama [36]. Glavni tip intrapolimernih veza hemiceluloze čine estarske veze, a prisutna je i značajna količina karboksilnih grupa [30]. 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 [4, 30, 37]. 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.

Hemiceluloza je nerastvorna u vodi na niskim temperaturama, mada njena hidroliza počinje na temperaturama nižim nego u slučaju hidrolize celuloze. Prisustvo kiselina značajno povećava rastvorljivost hemiceluloze u vodi [30].

*Lignin* je najkompleksniji biopolimer u prirodi i jedini konstituent biomase baziran na aromatičnim jedinicama (slika 1a). On čini 15–25% suve mase drvenastih biljaka i 40% energije sadržane u lignoceluloznoj biomasi [38]; 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 [39, 40]. Primarni prekursori sinteze lignina (koja se naziva reakcijom sparivanja radikala) su tri monolignola: p-kumaril, koniferil i sinapil alkohol (slika 1a pod 1), 2) i 3), redom) [40], koji nastaju od fenilalanina (Phe) u opštem fenilpropanoidnom i specifičnom monolignolnom putu [41]. Oni se inkorporiraju u lignin u formi fenilpropanoida: p-hidroksifenil (H), guajacil (G) i siringil (S) [40]. 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%) [42]. Svi lignini u manjim količinama sadrže i nekompletne ili modifikovane monolignole, pa se mogu uočiti i drugačiji monomeri [40, 43].



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.

Lignin se dobro rastvara u alkoholima male molekulske težine, dioksinu, acetonu, dimetil sulfoksidu. Lignin se generalno ne rastvara u vodi, međutim hemijskim tretmanom

se može dobiti lignosulfonat koji je rastvoran u vodi [44]. Na povišenim temperaturama omekšava što omogućava povećanje brzine reakcija depolimerizacije kisele ili bazne prirode.

### 2.1.1. Hemijske interakcije između komponenti lignoceluloze

U okviru lignoceluloznog kompleksa utvrđena su četiri glavna tipa interpolimernih i intrapolimernih veza (tabela 3) [30, 45].

Tabela 3: Veze unutar lignoceluloznog kompleksa [30, 45].

Intrapolimernе veze		Interpolimernе veze	
<b>Etarske</b>	lignin, celuloza, hemiceluloza	<b>Etarske</b>	celuloza-lignin, hemiceluloza-lignin
<b>Ugljenik-ugljenik</b>	lignin	<b>Estarske</b>	hemiceluloza-lignin
<b>Vodonične</b>	celuloza	<b>Vodonične</b>	celuloza-hemiceluloza, hemiceluloza-lignin, celuloza-lignin
<b>Estarske</b>	hemiceluloza		

*Intrapolimernе veze* – Kao što je već pomenuto, glavne veze unutar molekula lignina su etarske veze (70%) i ugljenik-ugljenik veze (30%) [30]. U molekulu celuloze glikozidne veze (koje učestvuju u formiranju inicijalnog polimernog lanca) i vodonične veze (koje su razlog kristalinične strukture celuloze) čine dva glavna tipa veze, a ustanovljeno je i prisustvo karboksilnih grupa u celulozi (1 karboksilna grupa na 100 do 1000 monomernih jedinica glukoze) [30]. Glavni tip veze u hemicelulozi čine estarske veze, za razliku od celuloze nema vodoničnih veza, ali je prisutna značajna količina karboksilnih grupa [30].

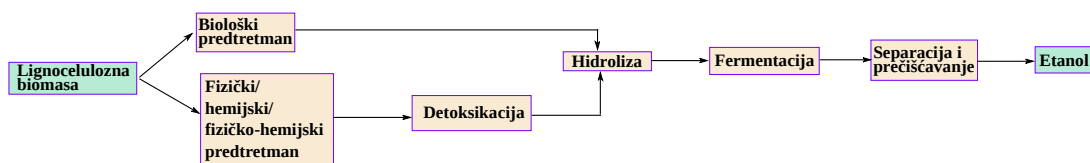
*Interpolimernе veze* – Nerazgranata hemiceluloza (ksiloglukani, homoksilani i manani) formira vodonične veze sa površinom celuloznih fibrila, dok bočni lanci (uronska kiselina i arabinoze) su kovalentno vezane sa hemicelulozama ili ligninom [45]. Na ovaj način se formiraju za enzime nepropustne mreže, poznate kao lignin-ugljenohidratni kompleksi (eng. *lignin carbohydrate complexes* – LCC). Većinu veza u LCC monokotiledonih biljaka čine estarske veze formirane između bočnih lanaca hemiceluloza i fenolnih kiselina (ferulati i diferulati) koji čine deo perifernog lignina [45]. Molekul

lignina sa molekulima celuloze i hemiceluloze formira i vodonične veze. Za etarske veze koje lignin formira sa polisaharidima još uvek nije utvrđeno da li je to sa molekulima celuloze i hemiceluloze ili oba polisaharida [30].

## 2.2. Predtretman lignocelulozne biomase

Lignoceluloznu biomasu 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 [45, 46]. 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 [45]. 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 mikrobnii rast i fermentaciju do željenih produkata, separaciju i prečišćavanje produkata. Metode predtretmana se mogu kombinovati ili primeniti samostalno.



Slika 2: Uprošćena šema proizvodnje bioetanol iz lignocelulozne biomase

Da bi jedan predtretman bio efektivan treba da zadovolji određene kriterijume: efikasnost u širokom spektru vrsta i količini 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 proizvodi 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 [45, 46].

## **2.3. Metode predtretmana lignocelulozne biomase**

Metode predtretmana se mogu podeliti na fizičke, fizičko-hemijske, hemijske i biološke metode. Mogu se primenjivati zasebno ili se može primeniti kombinacija ovih metoda.

### **2.3.1. Fizički predtretman**

Fizički predtretman obuhvata metode kojima se redukuje veličina lignoceluloznog materijala, uvećava slobodna specifična površina i smanjuje stepen kristaliničnosti celuloze, čime se olakšava degradacija enzimima do odgovarajućih produkata [12, 47, 48]. U ovu grupu predtretmana spadaju različite metode mehaničkog usitnjavanja (rasparčavanje, mlevenje diskovima, vibracionom energijom, kuglama, koloidno mlevenje...), radijacija (gama zračenje, elektronskim snopom, mikrotalasno zračenje...) i neke druge metode (hidrotermalne metode, piroliza, ekstruzija...) [12].

*Mehaničkim usitnjavanjem* se vrši redukcija veličine lignocelulozne biomase do komada veličine od 50 mm do 0,2 mm, zavisno od primenjene tehnike usitnjavanja (tabela 4) i željene veličine konačnih komada (ustanovljeno je da veličina ispod 0,4 mm nema značajnog uticaja na brzinu i prinos hidrolize biomase) [47]. Metodom rasparčavanja se redukuju ograničenja prenosa mase i toplote dok se veća redukcija veličine komada postiže mlevenjem. Tip biomase i dužina mlevenja (kao i primenjena metoda mlevenja) utiču na veličinu specifične dodirne površine, stepen polimerizacije i redukciju kristaliničnosti celuloze [47, 48].

Prema literaturnim podacima mehaničko usitnjavanje je energetski neefikasan proces, a količina energije koju treba uložiti zavisi od [49]:

- karakteristika uređaja (brzine motora, vrste mehanizma za usitnjavanje, smeštajnih kapaciteta komore za usitnjavanje...);
- karakteristika materijala (biomase) koji se koristi (hemijski sastav, vlažnost, temperatura);

- koja veličina konačnih komada se želi dobiti.

Velika potrošnja energije, visoka cena i nemogućnost uklanjanja lignina su razlog zbog čega se mehanički predtretman još uvek ne koristi kao isključivi predtretman [48].

*Tabela 4: Veličina komada u zavisnosti od primenjene metode mehaničkog usitnjavanja [47, 48]*

<b>Metoda</b>	<b>Veličina komada biomase [mm]</b>
<b>Žetva i prekondicioniranje</b>	10-50
<b>Rasparčavanje (Chipping)</b>	10-30
<b>Brušenje i mlevenje</b>	0,2-2

Međutim mehaničko usitnjavanje može da se primeni, ne samo pre već i nakon drugih tipova predtretmana. Studije su pokazale da se primenom mehaničkog predtretmana nakon hemijskog smanjuje potrošnje energije pri mlevenju, kao i cena razdvajanja čvrste od tečne faze, nema potrebe za intenzivnim mešanjem rastvora tokom predtretmana i ne nastaju inhibitori fermentacije [50].

*Radijaciona metoda predtretmana* uključuje primenu  $\gamma$ -zračenja [51, 52], elektronskog snopa [53], ultrazvučnih talasa [54], pulsno električnog polja, mikrotalasnog zračenja [55] i dr. Promene koje nastaju primenom ove metode predtretmana odnose se na povećanje specifične površine, snižavanje stepena polimerizacije i kristaliničnosti celuloze, hidrolizu hemiceluloze i delimično na depolimerizaciju lignina [48]. Međutim ove metode još uvek nisu našle primenu u industriji jer su obično spore, potrebno je puno energije i veoma su skupe. Interesantnom metodom se čini primena mikrotalasa u kombinaciji sa alkalnim ili vodenim okruženjem, jer potrošnja energije nije prevelika i dobija se veći prinos redukujućih šećera enzimskom hidrolizom. Zagrevanjem, koje potiče od vibracija polarnih veza biomase i vodenog okruženja, dolazi do termičke obrade lignoceluloznog materijala pri kojoj se oslobađa sirćetna kiselina stvarajući tako kiselu sredinu za autohidrolizu [55]. Najveća efikasnost se postiže kombinovanjem sa alkalnim tretmanom [56, 57].

*Piroliza* predstavlja termičku razgradnju organske materije u odsustvu (molekulskog) kiseonika. Postoji više varijanti pirolize, a koja će se primeniti zavisi od



željenog proizvoda. Produkti pirolize biomase su čađ, tečnost (katran) i gas (CO, H<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, C<sub>n</sub>H<sub>m</sub> i CO<sub>2</sub>) [58]. Tip biomase, vreme zadržavanja, brzina zagrevanja i temperatura (koja je i najznačajniji faktor) su faktori od kojih zavisi vrsta dobijenog konačnog proizvoda.

*Ekstruzija* je metoda koja kombinuje više različitih operacija u jednoj jedinici. Fizička razgradnja biomase se postiže mešanjem, zagrevanjem i usitnjavanjem. Ovim predtretmanom se vrši depolimerizacija celuloze, hemiceluloze, lignina i proteina [59]. Viši prinosi šećera se postižu primenom nižih temperatura i dužeg vremena zadržavanja ili primenom visokih temperatura i kraćeg vremena zadržavanja u ekstruderu [60].

### **2.3.2. Fizičko-hemijski predtretman**

Fizičko-hemijski predtretman obuhvata hidrotermalne metode [eksploziju vodenom parom (autohidrolizu), predtretman toplom vodom], dekompoziciju eksplozijom u prisustvu amonijaka, dekompoziciju eksplozijom u prisustvu CO<sub>2</sub>. [26, 39–44].

*Hidrotermalne metode* predtretmana obuhvataju katalizu razgradnje polisaharida hidronijum jonima nastalim autojonizacijom vode, sirćetne kiseline i ponekada mogu nastati i od uronske kiseline. Etarske veze hemiceluloze su najpodložnije ovom tipu reakcije. U operacionim uslovima značajnijim se smatra formiranje hidronijum jona autojonizacijom sirćetne kiseline [61], jer je proces autojonizacije vode ograničen na inicijalni stadijum. Temperaturni opseg hidrotermalnog predtretmana kreće se od 150-230 °C. Eksperimentalno je potvrđeno da se ovim predtretmanom favorizuje ekstrakcija ksiloze u velikom procentu [62].

*Eksplozija vodenom parom* (autohidroliza) je jedna od češće korišćenih metoda predtretmana. Postupak se sastoji u tome da se usitnjena biomasa izlaže dejstvu zasićene vodene pare pod povišenim pritiskom (0,69-4,83 MPa) nekoliko sekundi do nekoliko minuta, a zatim se pritisak naglo smanjuje, što dovodi do eksplozivne dekompozicije. Inicijalna temperatura iznosi 160-260 °C [63]. Zadržavanjem biomase u vodenoj pari određeno vreme, pre eksplozivne dekompozicije, dolazi do hidrolize hemiceluloze sirćetnom kiselinom, nastalom hidrolizom acetil grupa iz hemiceluloze, i drugim kiselinama oslobođenim tokom ovog procesa [64]. Ove kiseline mogu dalje da katalizuju hidrolizu ili razgradnju oslobođenih šećera glukoze i ksiloze.

Ključni faktori nekatalizovane eksplozije vodenom parom su trajanje tretmana, temperatura, veličina čestica biomase i sastav vlage. Ovim tretmanom se pre svega postiže uklanjanje hemiceluloze čime se poboljšava pristupačnost enzima celuloznim vlaknima. Dobra rastvorljivost hemiceluloze se može postići pri višim temperaturama i kraćem procesu ili nižim temperaturama i dužem procesu [48, 63]. Da bi se smanjilo formiranje furfurala i hidroksimetil furfurala (HMF), koji su rezultat razgradnje ksiloze i glukoze, respektivno, a koji predstavljaju inhibitore fermentacije, poželjnije je primenjivati duži tretman sa nižim temperaturama [65].

Iako se ovim postupkom značajno unapređuje enzimska hidroliza celuloze, prinos glukoze čini 90% u odnosu na 15% bez predtretmana, prinos redukujućih šećera iz hemiceluloze je nizak. Dodatkom  $\text{SO}_2$  ili  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (koja je jeftinija) može se rešiti ovaj problem [48]. U poređenju sa mehaničkim predtretmanom za ovaj postupak je potrebno znatno manje energije (i do 70%) i nema otpadnih efluenata koje bi trebalo reciklirati da bi se zaštitila životna sredina, što utiče na poskupljenje postupka.

*Predtretman toplom vodom* je proces koji se odvija na visokoj temperaturi (160-240 °C) vodom pod pritiskom koji održava vodu u tečnom stanju. Tokom ovog procesa voda se ponaša kao slaba kiselina i oslobađa hidronijum jon, što uzrokuje depolimerizaciju hemiceluloze selektivnom hidrolizom glikozidnih veza, oslobađajući O-acetil grupu i druge kisele delove hemiceluloze [64, 67]. Ovo, dalje, vodi formiranju sirćetne i uronske kiseline koje katalizuju hidrolizu hemiceluloze i oligosaharida iz hemiceluloze. Iako je koncentracija nastalih furfurala i HMF znatno manja nego predtretmanom razblaženim kiselinama ili eksplozijom vodenom parom, mogućnost stvaranja monosaharida i njihova dalja razgradnja do inhibitora fermentacije se može smanjiti podešavanjem pH vrednosti između 5 i 7 [64].

Ova metoda je atraktivna zbog svoje jednostavnosti i neupotrebe hemikalija opasnih po životnu sredinu. Celuloza ostaje prilično sačuvana. Najvećim delom je u čvrstom stanju, a udeo glukana je veći nego pri tretmanu razblaženim kiselinama [67]. Do sada nije zabeleženo formiranje pseudo lignina.

*Dekompozicija eksplozijom u prisustvu amonijaka (AFEX)* se izvodi tečnim amonijakom na visokoj temperaturi i pritisku. Lignocelulozni materijal je izložen ovakvim uslovima neko vreme, a zatim se pritisak naglo snizi. Koncept je sličan eksploziji

vodenom parom. Generalno proces obuhvata doziranje amonijaka od 1-2 kg amonijaka/kg suve mase, temperaturu od 90 °C i pritisak 3 MPa u trajanju do 30 min. [47, 63]. Hemijski efekat amonijaka pod pritiskom izaziva bubrenje celuloze čime se uvećava dostupna površina dok dekrystalizuje celuloza. Ovo rezultira izmenom kristalne strukture celuloze I u celulozu III [47]. Ovim predtretmanom se ne postiže značajna rastvorljivost hemiceluloze u poređenju sa tretmanom kiselinama ili eksplozijom vodenom parom katalizovanom kiselinama. Uglavnom se rastvaraju manje količine oligomerne forme hemiceluloze. Distribucija lignina ostaje relativno ista, ali se struktura lignina rigorozno menja zbog čega se uvećava zadržavanje vode i razgradnja.

AFEX predtretman je pogodan za zeljaste useve i trave, može značajno da unapredi saharifikaciju [47, 68], a za hidrolizu nije potrebna velika količina enzima [66]. Ne formiraju se monomeri šećera i ne nastaju inhibitori za naredne, biološke, procese, te s toga ispiranje vodom nije potrebno. Takođe nije neophodno usitnjavanje čestica da bi se povećala efikasnost ovog procesa. Da bi se zaštitila životna sredina i snizila cena amonijak se mora reciklirati nakon predtretmana. Ova metoda nije efikasna kod lignoceluloznih materijala sa visokim sadržajem lignina.

*Dekompozicija eksplozijom u prisustvu CO<sub>2</sub>* je predtretman sličan eksploziji vodenom parom i AFEX-u. Pretpostavlja se da ugljen dioksid formira ugljenu kiselinu i ubrzava hidrolizu [63]. Metoda je bazirana na korišćenju superkritičnog fluida CO<sub>2</sub> (na temperaturi iznad kritične i pri povišenom pritisku gas koji ispunjava sud ima gustinu kao tečnost). Superkritični uslovi efikasno uklanjaju lignin što olakšava dalju razgradnju. Delignifikacija se može dodatno unaprediti dodatkom etanola [69].

Kada se uporede sa molekulima vode i amonijaka, molekuli CO<sub>2</sub> su takođe mali i mogu na isti način prodrati u pore lignoceluloze. Nakon eksplozije i oslobađanja CO<sub>2</sub> pritiska uočavaju se raskinute celulozne i hemicelulozne strukture, što za posledicu daje veću površinu supstrata dostupnu enzimu [70].

Prinos redukujućih šećera je znatno veći nego kada predtretman nije uključen [71], međutim u poređenju sa eksplozijom parom i u prisustvu amonijaka je nešto niži [69], dok je znatno veći nego primenom razblaženih kiselina, što je pokazano predtretmanom ostataka šećerne trske [72]. Ovaj predtretman je ekonomski isplativiji nego AFEX i formira se znatno manje inhibitora nego eksplozijom parom. Međutim

spornim se smatra neophodan visok pritisak. S druge strane primena ugljen dioksida je atraktivna alternativa jer se cena može sniziti zbog njegove koprodukcije tokom proizvodnje etanola. Ostale prednosti su netoksičnost, nezapaljivost i ponovno dobijanje nakon ekstrakcije.

### 2.3.3. Hemijski predtretman

*Ozonoliza* predstavlja primenu ozona u predtretmanu lignoceluloznog materijala. Ozon je visoko reaktivan prema dvostrukim vezama kao i funkcionalnim grupama sa velikom gustinom naelektrisanja, te je s toga lignin glavna komponenta razgradnje, dok se hemiceluloza delimično razgrađuje [73, 74]. Iz lignina se oslobađaju komponente manje molekulske težine, pretežno organske kiseline, poput mravlje i sirćetne kiseline zbog čega može doći do smanjenja pH vrednosti sa 6,5 na 2 [73]. Prednosti ove metode su efektivno uklanjanje lignina, neprodukovanje toksičnih komponenti koje bi mogle da utiču na procese hidrolize i fermentacije, kao i to što proces teče na sobnoj temperaturi i atmosferskom pritisku. Međutim potrebne su velike količine ozona što poskupljuje proces.

*Predtretman kiselinama* može da se izvodi koncentrovanim ili razblaženim kiselinama. U najčešćoj upotrebi je sumporna kiselina, osim nje primenjuju se i hlorovodonična, azotna i sirćetna kiselina. Koncentrovane kiseline su izuzetno moćan agens za razgradnju lignocelulozne biomase. Proces teče na niskim temperaturama (pr. 40 °C), što predstavlja očiglednu prednost u odnosu na tretman razblaženim kiselinama koji se odvija na znatno višim temperaturama. Međutim visoka koncentracija kiselina (30-70%) čini proces ekstremno korozivnim i opasnim. Da bi proces bio ekonomski opravdan neophodno je prečistiti iskorišćene kiseline što predstavlja energetski veoma zahtevan korak [12]. Predtretman koncentrovanim kiselinama dodatno poskupljuje primena specijalne nemetalne opreme ili skupih legura. Neutralizacijom nastaju velike količine gipsa čijim odlaganjem se zagađuje životna sredina [12].

Predtretman razblaženim kiselinama pre enzimske hidrolize je znatno češća metoda, a razblažene kiseline se mogu upotrebiti i za hidrolizu do redukujućih šećera. Razlikuju se dva tipa predtretmana razblaženim kiselinama [63]:

- kontinualni proces na visokim temperaturama ( $T > 160$  °C), kraće vreme, sa malim udelom čvrste faze (5-10%);

- diskontinualni proces na nižim temperaturama ( $T < 160$  °C), duže vreme, sa udelom biomase (čvrste faze) 10-40% (maseni procenti).

Na nižim temperaturama dolazi do razgradnje šećera te se s toga saharifikacijom dobija mali prinos, zbog čega je poželjniji tretman na visokim temperaturama kraće vreme [12]. Mešavina kiseline i biomase može se zagrevati indirektno preko zidova suda ili direktnim ubrizgavanjem pare, kojom se kasnije operiše na isti način kao i pri nekatalizovanoj eksploziji parom [64]. Kiselina se dodaje u tečnost filtriranjem kroz sloj, raspršivanjem po ostacima (nakon čega se vrši njihovo zagrevanje) ili mućkanjem sa biomasom u reaktoru [64]. Eksperimenti su pokazali da primenom sirćetne kiseline čak i u visokoj koncentraciji (do 80%) relativno dugo vreme (oko 30 min.) ne može se razgraditi lignin. Uklanjanje značajne količine lignina se može postići dodavanjem azotne kiseline.

Predtretmanom razblaženim kiselinama može se značajno unaprediti hidroliza celuloze. Lignin se ne može razgraditi, ali nastaju promene na ligninu zbog čega se uvećava osetljivost celuloze na dejstvo enzima. Ova metoda je veoma skupa, čak skuplja nego neke fizičko-hemijske metode poput eksplozije parom i u prisustvu amonijaka. Potrebno je sitnjenje materijala do veličine 1mm što zahteva 33% energije potrebne za čitav proces [64]. Dodatne troškove čini i odstranjivanje soli nastalih neutralizacijom, koja je neophodna pre enzimske hidrolize.

*Predtretman bazama* je u osnovi proces delignifikacije, a odstranjuje i deo hemiceluloze. Za ovu metodu se najčešće koriste NaOH, KOH,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  i amonijak [67, 75]. Efikasnost ove metode zavisi od reakcione temperature, trajanja tretmana i količine alkalija, kao i od količine lignina u tretiranom materijalu (manje lignina veća efikasnost). U poređenju sa predtretmanom kiselinama potrebne su niže temperature [76] i pritisak i nisu potrebni specijalno konstruisani reaktori [67], moguća je ponovna upotreba zaostalih alkalija, a raskidanje estarskih veza između hemiceluloze i lignina je efikasnije [75]. Pri tretmanu bazama dolazi do bubrenja biomase čime se povećava unutrašnja površina. Glavni nedostatak ove metode je dugo vreme procesa koje može biti od nekoliko sati do nekoliko dana, može doći do saponifikacije [75, 76].

*Predtretman vodonik peroksidom* u vodi pri podešenoj  $\text{pH}=11-12$  (eng. *alkaline peroxide pretreatment*) je veoma efektivna metoda. Odvija se na nižoj temperaturi (21-50

°C) i atmosferskom pritisku određeno vreme (6-24h). Može da unapredi enzimsku hidrolizu [12, 77]. Nije zabeleženo prisustvo furfurala ili hidroksimetil furfurala. Ekološki pogodna metoda [78]. Glavni nedostaci ove metode su cena vodonik peroksida i veće količine soli koje nastaju.

*Predtretman organskim rastvaračima* je proces u kome se uklanjanje lignina i hemiceluloze iz biomase vrši pomoću organskih rastvarača ili njihovih vodenih rastvora kojima se, prema potrebi, dodaju katalizatori neorganske kiseline (HCl i H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Pri temperaturama višim od 185 °C nije potrebno dodavati katalizatore [63]. Rastvarači su niži alkoholi (metanol, etanol), viši alkoholi (etilen glikol, glicerol i dr.), organske i perorganske kiseline, aceton, estri i dr. Dodavanjem katalizatora se obično postiže viši prinos [63]. Jedna od prednosti ovog predtretmana je što se lignin visoke čistoće može lako izdvojiti iz rastvarača i koristiti u proizvodnji električne energije, procesima grejanja i dr. [12]. Nakon predtretmana neophodno je rastvarač ukloniti iz reaktora, evaporisati, kondenzovati i reciklirati da bi se snizila cena procesa. Uklanjanje rastvarača je neophodno i zato što rastvarači mogu biti inhibitori procesa enzimske hidrolize i fermentacije [12].

Ovaj proces se može primeniti zajedno sa predtretmanom kiselinama pri čemu se dvostepenim frakcionisanjem mogu ukloniti lignin i hemiceluloza [12, 63].

#### **2.3.4. 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 [79, 80] – 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 [81].

### 2.3.5. Organizmi razgrađivači lignoceluloze

Razgradnja lignoceluloze u prirodi je raspodeljena među gljivama i bakterijama. Bakterije su uglavnom ograničene na biomasu sa manjom količinom lignina, jer slabo proizvode ligninaze (neke aktinomicete [82]).

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* [7].

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 [83].

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*) [83]. Sposobne su za selektivnu (*Ceriporiopsis subvermispora*, *Dichomitus squalens*, *Phlebia radiata* i dr.) [84] i neselektivnu razgradnju lignina (*Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* i *Fomes fomentarius*) [83]. Selektivnom razgradnjom uklanjaju lignin i hemicelulozu dok celuloza uglavnom ostaje intaktna [84]; neselektivnom uklanjaju podjednako sve komponente lignoceluloze [82–84].

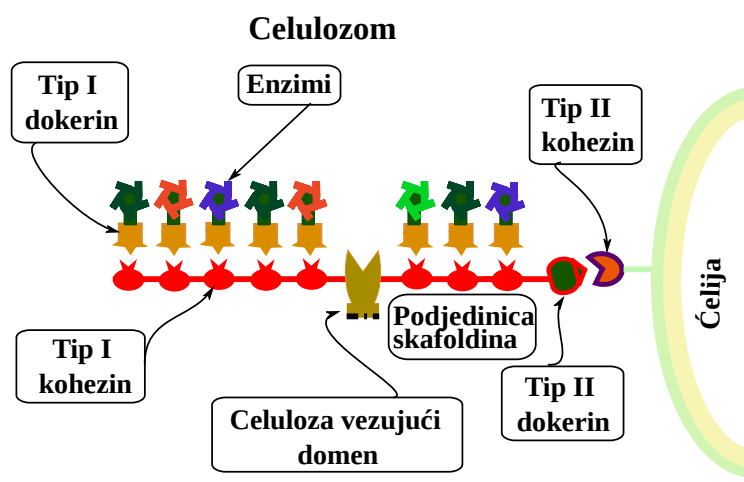
Gljive izazivači braon truljenja razgrađuju hemicelulozu i celulozu, dok lignin u izvesnoj meri modifikuju. Braon trulež je drvo tamne (braon) boje (što ukazuje na prisustvo modifikovanog lignina), smanjeno i razbijeno na fragmente oblika cigle ili kocke koji se lako mrve dajući braon prah. Za razliku 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 [82, 85]. Lignin, modifikovan ovim gljivama, je reaktivniji nego prirodni zbog većeg sadržaja fenolnih hidroksilnih i karboksilnih grupa [86]. 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 [87]: 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 [82].

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 [88]. 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 [7]. On selektivno vezuje različite podjedinice celulaza i ksilanaza u kohezivni kompleks (slika 3), kombinujući njihove „kohezin“ domene sa karakterističnim „dokerin“ domenima [88], prisutnim na svakoj od podjedinica. Skafoldin nekih celulozoma poseduje i mesta za vezivanje ugljenih hidrata. Celulozomalne sisteme produkuju i anaerobne bakterije *Acetivibrio cellulolyticus*, *Bacteroides cellulosolvens*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* i anaerobne gljive rodova *Neocallimastix*, *Piromyces* i *Orpinomyces*.





Slika 3: Struktura celulozoma

## 2.4. Fungalni enzimi i njihovi 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.

### 2.4.1. Oksidativni mehanizmi

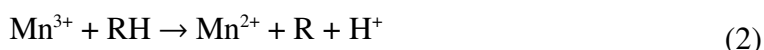
Akcijom fungalnih redoks enzima (glioksal oksidaze, piranoza-2-oksidaze i aril-alkohol oksidaze) nastaje vodonik peroksid ( $H_2O_2$ ), koji reaguje sa redoks-aktivnim gvožđem (prisutnim u drvetu u dovoljnim količinama) i, kroz Fentonovu reakciju (1), proizvodi hidroksilni radikal –  $\cdot OH$ .  $\cdot OH$  je veoma moćan oksidujućii agens, sposoban da katalizuje visoko nespecifične reakcije i raskida kovalentne veze lignina i celuloze [89, 90].



Gljive (kao i mnoge biljke, insekti i bakterija *Azospirillum lipoferum*) proizvode multibakarne enzime – lakaze. Fungalne lakaze katalizuju formiranje fenoksil radikala,

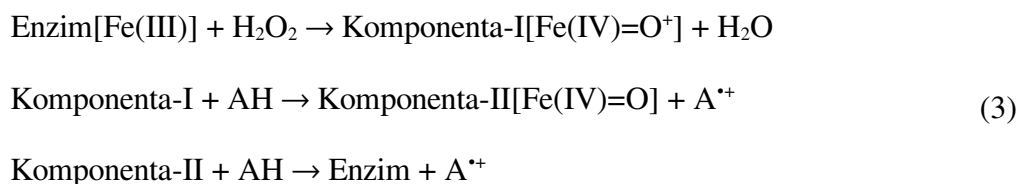
čija nespecifična reakcija vodi C<sub>α</sub>-hidroksil oksidaciji do ketona, raskidanju veze između alkil i aril grupa, demetoksilaciji i raskidanju C<sub>α</sub>-C<sub>β</sub> veze u ligninu, kao i do reakcije polimerizacije [83, 91]. Mehanizam razgradnje obuhvata prenos jednog elektrona sa malog molekula supstrata (tzv. medijatora) na molekul kiseonika, nakon čega oksidovani medijator difunduje u gusto pakovanu lignocelulozu i inicira reakciju slobodnih radikala koja vodi depolimerizaciji [7]. U prisustvu medijatora malog molekula, poput hidroksibenzotriazola, moguća je i oksidacija nefenolnih komponenti lignina [83].

Drugu grupu fungalnih ligninolitčkih 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<sub>α</sub>-C<sub>β</sub> veza u ligninu [92], oksidaciju aromatičnih C<sub>α</sub> alkohola, hidroksilaciju, formiranje hinona i raskidanje aromatičnog prstena. Registrovane su kod 40% proučavanih gljiva [93]. Zahvaljujući invarijantnim ostacima triptofana (trp171) prisutnim u izoenzimu LiP-A, mogu oksidovati i nefenolne aromatične komponente lignina [94]. LiP su poznate kao jaki oksidansi zbog većeg deficita elektrona u gvožđu u porfirinskom prstenu u odnosu na druge peroksidaze. MnP oksiduju Mn<sup>2+</sup> u visoko reaktivan Mn<sup>3+</sup> (medijator u procesu oksidacije organskog supstrata, reakcija (2) [83]), koji je stabilizovan helatorima fungalnog porekla, poput oksalne kiseline [95]:



MnP ne poseduju invarijantne ostatke triptofana, pa u odsustvu intermedijera, poput tiola, ne mogu oksidovati nefenolne komponente lignina [96]. Verzatil peroksidaze ispoljavaju i LiP i MnP aktivnost. One poseduju Mn-vezujuće mesto i kada vežu Mn [93] sposobne su da oksiduju Mn<sup>2+</sup> do Mn<sup>3+</sup>. Poput lignin peroksidaza i VP poseduju ostatke triptofana, trp164, analoge onim u LiP, koji im omogućavaju oksidaciju nefenolnih aromatičnih komponenti lignina [83].

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



Ciklus počinje raskidanjem O–O veze u molekulu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i uklanjanjem dva elektrona iz enzima; oslobađa se voda i formira intermedijerno jedinjenje O=Fe(IV)-porfirin  $\pi$ -radikalni katjon (tj. komponenta-I[Fe(IV)=O<sup>+</sup>]) [97]. 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<sup>+</sup>) [98], 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) [99]. Oksiduju oligomerne šećere do laktona koristeći širok spektar akceptora elektrona poput hinona, fenoksiradikala, Fe<sup>3+</sup> i Cu<sup>2+</sup>. Mogu direktno modifikovati lignin raskidanjem  $\beta$ -etarskih veza, demetoksilacijom aromatičnih komponenti, uvođenjem hidroksilnih grupa u nefenolne komponente kroz produkciju hidroksil radikala [100]; ili indirektno, kroz interakciju sa manganom: oksidovanjem celobioze do 4-O-b-D-glukopiranozil-D - glukonske kiseline (celobionske kiseline) koja je efikasan helator mangana (Mn(III)) [101]; prevođenjem nerastvornog MnO<sub>2</sub> 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 [101, 102].

## 2.4.2. 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* – CBMOD). Prema načinu delovanja dele se u tri klase: endo-(1,4)- $\beta$ -glukanaze (endocelulaze), celobiohidrolaze (egzocelulaze) i  $\beta$ -glukozidaze [7, 13, 103]. 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 [103, 104]. Nakon delovanja endo- i egzocelulaza,  $\beta$ -glukozidaze oslobađaju molekule glukoze iz celobioze i celodekstrina; poseduju aktivna mesta u obliku džepa, koja im omogućavaju da deluju na neredukujuće glukozne jedinice [103, 105].

Odvajanje celuloze od hemiceluloze, kao i razgradnju hemiceluloze, vrše hemicelulaze. Hemicelulaze deluju sinergistički sa drugim hemicelulazama, ali i sa celulazama [103]. 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 [106, 107]; endohidroliza počinje negde oko sredine lanca i teče nasumično; egzohidroliza 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 [107]. Za potpunu hidrolizu hemiceluloze neophodno je usklađeno delovanje sve tri grupe enzima [103]. U tabeli 5 navedene su šire zastupljene hemicelulaze, supstrati na koje deluju i proizvodi razgradnje [7, 103, 108].

Tabela 5: Neke fungalne hemicelulaze, njihovi supstrati i produkti razgradnje [81, 102, 106]

Supstrat	Enzim	Proizvod
Ksilan	<b>endo-<math>\beta</math>-ksilanaza</b>	oligosaharidi
Ksiloglukan/ksilan/oligosaharidi oslobodeni endo- $\beta$ -ksilanazom	<b><math>\beta</math>-ksilozidaza</b>	ksiloza
Ksilan/druge hemiceluloze	<b>Acetilksilanska esteraza</b>	Acetil grupa
Ksilan	<b>Feruloilna esteraza</b>	Ferulinska kiselina
Bočni lanci arabinoze na ksilanu	<b><math>\alpha</math>-arabinofuranozidaza</b>	$\alpha$ -arabinoza
Galaktomanan/galaktoglukomanan	<b><math>\alpha</math>-galaktozidaza</b>	D-galaktoza
Veza između ksilana i glukuronske kiseline	<b><math>\alpha</math>-glukuronidaza</b>	D-glukuronska kiselina
$\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-manozil polimer/(galakto)(gluko)manani	<b>manaze</b>	manooligosaharidi
Manooligosaharidi	<b><math>\beta</math>-manozidaze</b>	manoza

### 2.4.3. Procesni uslovi biološkog predtretmana

Biološki predtretman se može izvoditi fermentacijom na čvrstom supstratu (SSF) ili submerznom fermentacijom (SF). Za razliku od SF, 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) [31]. Druge prednosti SSF nad SF 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) [31].

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 [109]. 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 [109]. Međutim, tokom razgradnje lignina stvaraju se sve povoljniji uslovi za razviće celulolitičkih organizama (kojih u unutrašnjosti supstrata uvek ima) i koji mogu dovesti do većeg gubitka celuloze, zbog čega je dubinska dekontaminacija neophodna [110].

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 105–107 spora/ml [111, 112]. 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 [110]. 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 [113, 114]. 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 [115].

Ligninolitički sistem operiše pod sekundarnim metabolizmom. Dodavanjem induktora 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 ubrzava kolonizacija u dublje slojeve lignoceluloznog supstrata [115]. 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 [93].

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. [116], Membrilo i sar. [117], Wan i Li [118] 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 [115]. 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% [115].

Bazidiomicete koje izazivaju belo truljenje su mezofili, koje visoku razgradnju lignina postižu između 25–30 °C [118]; askomicete dobro rastu na oko 39 °C [115]. Metabolizam ligninolitčkih 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 [110].

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  $^{14}\text{CO}_2$  u uslovima povećanog nivoa kiseonika značajno raste (u eksperimentu sa

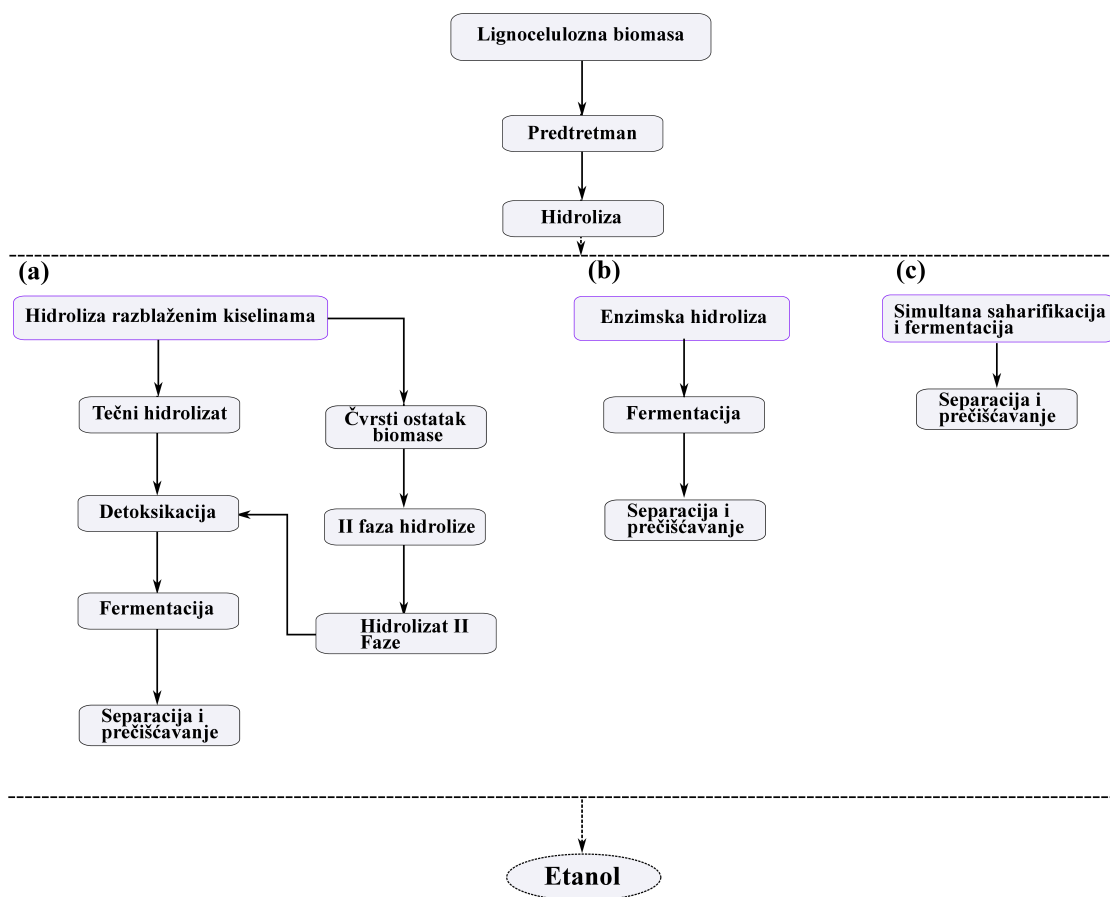
*P. chrysosporium* brzina formiranja  $^{14}\text{CO}_2$  je bila tri puta veća u uslovima čistog kiseonika (100%  $\text{O}_2$ ) u odnosu na atmosferu sa 21%  $\text{O}_2$  [93]). Kada se predtretman izvodi u erlenmajeru u statičkom procesu, pasivna difuzija vazduha je dovoljna, međutim ako se proces izvodi sa pakovanim slojem neophodno je primeniti prinudnu cirkulaciju vazduha [115]. Da bi se obezbedilo izvođenje fungalnog predtretmana aeracija mora biti kontrolisana, jer visoka koncentracija kiseonika ne unapređuje selektivnost delignifikacije, iako unapređuje brzinu [110, 115].

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 [115]. 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 [110].

## 2.5. 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 pentoza). Hidroliza koncentrovanim kiselinama je efikasnija; razgradnja polisaharida je potpuna i brza i skoro da nema formiranja HMF i furfurala [4]. 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 hidratisanog gipsa ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) jer je zagađivač životne sredine.





Slika 4: Metode hidrolize: a) dvostepeni postupak razblaženim kiselinama, b) enzimska hidroliza – odvojena hidroliza i fermentacija, c) enzimska hidroliza – simultana saharifikacija i fermentacija.

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 skrobnih sirovina [4]. Enzimska hidroliza (slika 4) može teći paralelno sa fermentacijom (simultana saharifikacija i fermentacija, SimSF) [119] – procesi fermentacije i hidrolize tek u suboptimalnim uslovima, smanjena je inhibicija krajnjim proizvodima hidrolize; ili može biti odvojen proces od fermentacije (eng. *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.

## 2.6. 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 [120], pa je poželjno ukloniti ovaj enzim pre početka hidrolize. Za razliku od biološkog 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. Inhibitorni efekat mogu imati i primenjene hemikalije, ekstrakti uključujući terpene, 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. Stepentoksičnosti zavisi od fiziološkog stanja ćelije, rastvorenog kiseonika i pH medijuma [30]. Detoksikacija se vrši hemijskim (bazama [121], 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 [122]).

### 2.6.1. Fermentacija hidrolizata

Fermentacija je metabolički proces konverzije šećera do kiselina, gasova i/ili alkohola. U lignoceluloznom hidrolizatu su prisutne dve grupe šećera: heksoze (glukoza, manoza i galaktoza) i pentoze (ksiloza i arabinoza), ali organizmi, koji se pretežno koriste u industriji etanola, uglavnom ne mogu efikasno fermentisati pentoze (videti tabelu 6) [123–125].

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 prioritarno koristi kvasac *S. cerevisiae* [126, 127]: bezbedan (GRAS), tolerantan prema inhibitorima fermentacije, ali ne može fermentisati aldopentoze do etanola.

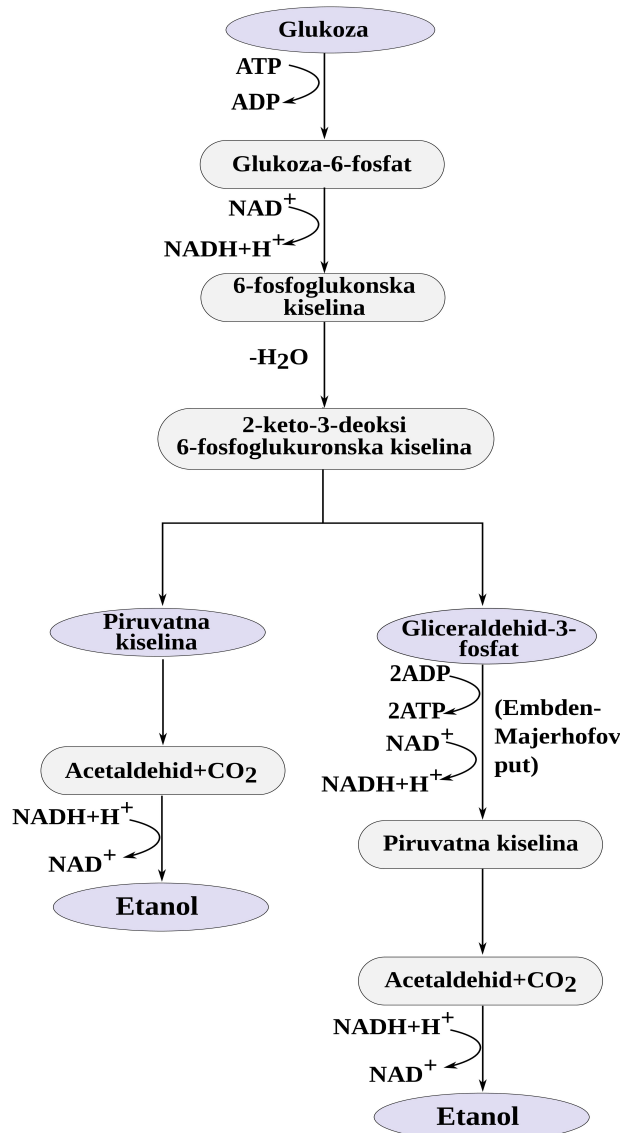
Kanalisanje pentoznih šećera do centralnog metabolizma u bakterijama se vrši izomernim putem; u kvascima i filamentoznim gljivama metaboličkim putem reduktaza/dehidrogenaza [128]. Malo organizama je prirodno sposobno da fermentiše pentoze (neke vrste rodova *Pichia* i *Candida*, kao i filamentozna gljiva *Fusarium oxysporum* [128]), 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 [129].

Neke bakterije poput *Clostridium thermocellum* i filamentozne gljive *Monilia sp.*, *Neurospora sp.*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Aspergillus sp.*, *Trichoderma viride* [125], mogu direktno transformisati celulozu do etanola, ali je mali prinos etanola, dugo vreme konverzije i nastaju sporedni produkti poput sirćetne i mlečne kiseline.

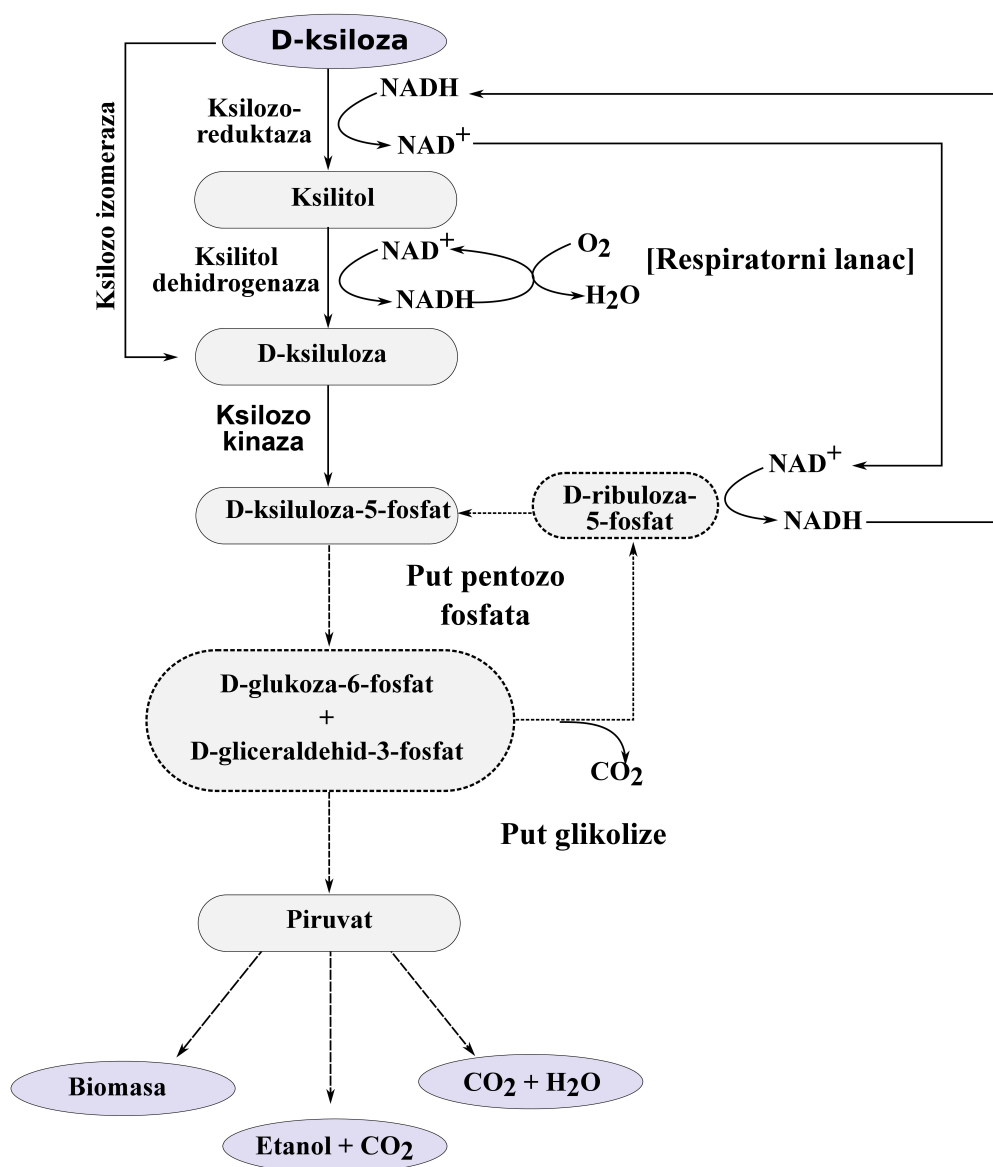
U novije vreme razmatra se primena samo jednog organizma sposobnog za četiri biološke konverzije: produkciju glikolitičkih enzima (celulaze i hemicelulaze), hidrolizu predtretirane biomase, fermentaciju heksoza i fermentaciju pentoza. Ova metoda je poznata pod nazivom konsolidovani bioproces (CBP) – 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 [130, 131]. Novije studije su fokusirane na kombinovanju proizvodnje celulaza i sojeva mikroorganizama koji daju visoke prinose etanola poput *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* i *Zymomonas mobilis*.

Tabela 6: Organizmi producenti etanola i supstrat koji mogu fermentisati [121]

<b>Organizam</b>	<b>Supstrat</b>
<b>Gljive</b>	
<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, ksiloza, ksiluloza
<b>Bakterije</b>	
<i>Zymomonas mobilis</i>	Glukoza, fruktoza, saharoza, 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>	Ksiloza
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Ksiloza, 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, ksiloza i arabinoza



Slika 5: Entner-Doudorofov put fermentacije u *Zymomonas sp.* [126]



Slika 6: Predloženi putevi katabolizma ksiloze gljivama [129]

## 2.7. Melasna džibra – karakteristike i primena

Džibra je sporedni proizvod industrije alkohola. Tokom proizvodnje alkohola, sa svakim proizvedenim litrom etanola generiše se 10-15 litara džibre, čiji sastav zavisi od polaznog supstrata koji je korišćen u proizvodnji, a koji može biti šećerni (šećerna repa, šećerna trska, melasa...), skrobni (kukuruz, kasava...) ili celulozni. [132]. Na primer, u melasnoj džibri je sadržaj organskih materija (koje su u formi organskih kiselina), ali i

katjona poput kalijuma, kalcijum i magnezijuma, znatno viši nego u džibri poreklom od šećerne trske [132].

Do generisanja melasne džibre dolazi onda kada se kao proizvodni supstrat u industriji etanola koristi melasa. Karakterišu je tamnobraon boja koja uglavnom potiče od melanoidina, niska pH vrednost (4,6-5,25), neprijatan miris, kao i velika hemijska potrošnja kiseonika (eng. *chemical oxygen demand* – COD) koja može iznositi i 100 g/l zbog čega melasna džibra pripada grupi supstanci sa velikim potencijalom zagađenja vodenih ekosistema [132, 133]. Melasna džibra je visoko toksična za životinje, biljke, mikrobe i mikrofloru tekućih voda. Sa njenim ispuštanjem u vodene ekosisteme dolazi do razmnožavanja organizama sposobnih da razgrađuju organske komponente sadržane u melasnoj džibri, pri čemu dolazi do iscrpljivanja kiseonika i uginuća vodenih životinja. Takođe, tamna boja blokira sunčevu svetlost i onemogućava odvijanje fotosinteze biljkama, dok voda kontaminirana džibrom više ne može da se koristi kao izvor pijaće vode. Sa nestankom prirodnih čistača i predatora može doći do širenje endemskih bolesti poput malarije ili amebijaza [132]. Smatra se i da bi džibra mogla da bude jedan od većih izvora gasova koji izazivaju efekat staklene bašte. Emisija ovih gasova može biti rezultat razgradnje džibre tokom transporta ili privremenog skladištenja [134]. U istraživanjima vodenim u Brazilu je uočena povećana emisija gasova koji izazivaju efekat staklene bašte, posebno diazot monoksida (N<sub>2</sub>O) nakon primene džibre na plantažama šećerne trske [132, 135]. Džibra odložena na zemljište bi mogla da ima genotoksičan efekat na beskičmenjake koji žive u zemljištu. Naime, utvrđeno je da kada su jaja nematoda, koje pripadaju vrstama *Meloidogyne javanica* i *M. incognita*, bila izložena uticaju džibre, smanjena je bila njihova gustina kao i stopa izleganja mladih jedinki. Takođe utvrđena je i smanjena stopa fekunditeta i fertiliteta ženki mušice *Drosophila melanogaster* [132, 136].

S obzirom na negativni uticaj na životnu sredinu i na zdravlje ljudi i ostalih organizama, velika pažnja se poklanja pronalaženju alternativnih načina primene melasne džibre, ali i džibre uopšte, kako bi se smanjilo njeno ispuštanje u vodu ili odlaganje na zemljište. Brojne studije su razmatrale potencijalnu primenu ovog agensa kao fertilizatora poljoprivrednih kultura, zatim za proizvodnju i gajenje kvasaca, proizvodnju energije (biogasa), njeno prečišćavanje pre ispuštanja u spoljašnju sredinu, ili za proizvodnju enzima lakaze [132].

Primena džibre kao fertilizatora useva u kombinaciji sa irigacijom može značajno da snizi troškove primene hemijskog đubriva. Proces fertilizacije kombinovan sa irigacijom se naziva fertirigacija i jedan je od najčešće korišćenih načina primene džibre u fertilizaciji useva [132]. Međutim, pre primene ove metode potrebno je razmotriti parametre kao što su tip zemljišta, udaljenost od vode, kapaciteta zemljišta (zadržavanje vode), udeo soli u zemljištu i treba biti oprezan pri nanošenju džibre na zemljište da ne bi došlo do salinizacije zemljišta, spuštanja teških metala do podzemnih voda, kao i promene kvaliteta zemljišta, ili do uvećanja fitotoksičnosti [132, 137, 138]. Takođe, treba voditi računa o koncentraciji džibre koja se koristi u fertilizaciji poljoprivrednih kultura i o kulturi, jer je utvrđeno da koncentracije otpadne džibre veće od 2,5% imaju toksičan efekat na "rast, biomasu i primarnu produktivnost" kultura kao što su grašak (*Pisum sativum*) i suncokret (*Helianthus annuus*) [139, 140]. Utvrđeno je i da koncentracija džibre veća od 50% inhibira germinaciju semena crnog luka, dok koncentracija oko 10% ima pozitivan efekat na germinaciju [141]. Negativan efekat džibre je uočen i kod formiranja i razvoja nekih cvetnica poput *Sida rhombifolia* i trava poput *Brachiaria decumbens*, dok u slučaju šećerne trske negativni efekti nisu uočeni [132].

Još jedna alternativna upotreba džibre je proizvodnja biogasa biodigestijom organskih komponenata džibre [132]. Proces biodigestije obuhvata acidogenu fazu – u kojoj hidrolizom organskih komponenti kao što su lipidi, ugljeni hidrati i proteini, nastaju manji molekuli čijom oksidacijom se formiraju kiseline poput sirćetne i propionske; i metanogenu fazu – u kojoj se vrši konverzija kiselina do metana, ugljen dioksida i organskih kiselina ili se vrši dalja redukcija ugljen dioksida do metana pomoću anaerobnih mikroorganizama. Džibra koja je dobijena nakon biodigestije se dalje može koristiti u fertilizaciji [132].

Razmatrana je i primena melasne džibre, ali i džibre generalno, u proizvodnji kvasca. Ova metoda bi mogla da pomogne u rešavanju problema odlaganja otpadne džibre, ali se smatra skupom metodom, jer je potrebno dosta energije za koncentrovanje džibre, ali i dodavanje izvora azota i magnezijuma da bi supstrat bio pogodan za rast kvasca [132].

Mnoge studije su razmatrale i tretman otpadne džibre pomoću gljiva ili njihovih enzima [139, 142], kao i primenu melasne džibre kao supstrata za proizvodnju enzima



lakaze pomoću gljiva [143]. Melasna džibra sadrži tamni pigment melanoidin koji se teško razgrađuje konvencionalnim metodama tretmana, a tokom anaerobne fermentacije može doći do uvećanja količine ovog pigmenta. Ovaj pigment ima antioksidantna svojstva što ga čini toksičnim za akvatične organizme [139]. Boji melasne džibre doprinose još i fenolne komponente (taninska kiselina i huminska kiselina) koje potiču od korišćene sirovine, karamelizovanih šećera nastalih pregrevanjem šećera i furfurala formiranih tokom hidrolize kiselinama [139]. Primena gljiva u predtretmanu je oksidativni proces. Gljive izazivači bele truleži su pokazale prilično dobre rezultate pri tretmanu otpadne melasne džibre. Neke od najčešće istraživanih vrsta za primenu u tretmanu otpadne melasne džibre su *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Coriolus hirsutus*, *Flavodon flavus* [139]. Gljivama je tretirana otpadna džibra koncentracije od 6,25% do 12,5% i tom prilikom je boja redukovana za 70-82%, dok je izolatima poput *Coriolus hirsutus* (*T. hirsuta*) COD smanjen 90%. U redukciji boje su učestvovali enzimi (biodegradacija) sa 90%, dok je ostalih 10% činila adsorpcija na micelijumu [142]. U eksperimentima sa marinskom vrstom gljiva *Flavodon flavus* je uklonjeno 68% policikličnih aromatičnih hidrokarbona (eng. *polycyclic aromatic hydrocarbons* – PAHs) [142]. Filamentozne gljive poput vrsta roda *Aspergillus* takođe uspešno dekolorizuju melasnu džibru, a uspešne su i u redukciji COD. Tako je, na primer, vrstama *A. niveus* i *A. niger* postignuta redukcija boje za 60-69%, dok je COD smanjen za 75–95% [142].

Osim predtretmana ispitivana je i mogućnost primene melasne džibre kao supstrata za proizvodnju fungalnih lakaza. Iako retke, ove studije su pokazale da melasna džibra uz dodatak odgovarajućih nutrijenata kao što je urea i uz optimizaciju proizvodnih uslova može značajno doprineti poboljšanju proizvodnje fungalne lakaze [143]. Sun W. i sar. [143] su optimizovali kultivacione uslove za proizvodnju lakaze vrstom *Coriolus hirsutus* na razblaženoj melasnoj džibri i pokazali da 47% melasna džibra može poslužiti kao dobar supstrat u proizvodnji enzima lakaza (hemijske karakteristike melasne džibre prikazane su u tabeli 7).

Hemijske karakteristike (tabela 7) pokazuju da melasna džibra poreklom od šećerne repe sadrži bakar, mangan, fenolne komponente – induktore ligninolitičkih enzima [139, 144–146]. Takođe sadrži masne kiseline – medijatore MnP aktivnosti koji imaju važnu ulogu u oksidaciji nefenolnih komponenata lignina – kao i natrijum, kalijum,

kalcijum, magnezijum, sulfat i druge komponente koje se koriste za pripremu mineralnog medijuma za rast gljiva i proizvodnju enzima [144, 147].

*Tabela 7: Hemijski sastav melasne džibre poreklom od šećerne repe [144–146]*

<b>Komponente</b>	<b>Koncentracija različitih komponenata u melasnoj džibri – otpadna voda poreklom iz destilerija (g/l)</b>
pH	4,6-5,25
BOD	15,5-40
TOC	13,02-42,4
Ukupna čvrsta materija	70-95
Mlečna kiselina	4,49
Glikolna kiselina	2,52
Sirćetna kiselina	1,29
Piroglutaminska kiselina	1,12
Izobuterna kiselina	0,92
Buterna kiselina	0,83
Mravlja kiselina	0,82
Propionska kiselina	0,05
Limunska kiselina	0,01
Tartarna kiselina	0,01
Sukcinska kiselina	0,8-0,9
Glicerol	3,08-26
Betain	0,86-20
Inozitol	0,4-0,9
Azot	1,5-4,2
Fosfor	0,290
Kalijum	7,7-10,7
Kalcijum	0,08-03
Magnezijum	0,02-0,03
Sulfat	1,0-1,5
Natrijum	0,7-2,0
Hlor	1,0-4,5
Gvožđe	0,258
Bakar	0,0024
Cink	0,0137
Mangan	0,0039

Zbog hemijskih karakteristika koje ukazuju na to da bi melasna džibra mogla da posluži kao induktor ligninolitičke aktivnosti gljiva, ali i činjenice da se razblažena melasna džibra može koristiti u proizvodnji lakaza, kao i to da gljive mogu rasti na melasnoj džibri i proizvoditi enzime ligninolitičkog sistema kojima razgrađuju melanoidin i druge organske komponente koje džibru čine toksičnom za vodene organizme, u ovoj disertaciji je ispitana mogućnost primene ovog agensa kao suplementa za unapređenje ligninolitičke aktivnosti odabranog izolata gljiva korišćenog u tretmanu piljevine bukve, kako bi se odgovorilo izazovu pronalaženja jeftine metode unapređenja biološkog predtretmana lignocelulozne biomase, kao i pronalaženju alternativnog načina primene otpadne melasne džibre.

## **2.8. Cilj istraživanja**

Istraživanja izvedena tokom rada na ovoj disertaciji su obuhvatala izolaciju autohtonih gljiva Srbije sposobnih da razgrađuju lignocelulozu, ispitivanje njihove lignocelulolitičke aktivnosti i selekciju i identifikaciju izolata sa najboljim ligninolitičkim i hidrolitičkim karakteristikama. Cilj je bio odabrati izolat sa visokim potencijalom za primenu u predtretmanu biomase na osnovu ispoljene ligninolitičke i hidrolitičke aktivnosti, ispitati i definisati uslove za unapređenje ligninolitičke aktivnosti odabranog izolata koji bi bili primenljivi u predtretmanu lignoceluloznog otpada radi postizanja efikasne hidrolize. S tim u vezi je ispitana mogućnost primene melasne džibre kao suplementa za unapređenje ligninolitičke aktivnosti, a sa njom i procesa predtretmana.

## 3. Eksperimentalni deo

### 3.1. Materijali

Odabrani izolati korišćeni u ovoj disertaciji su *Myrmaecium fulvopruinatum* F14, *Trametes hirsuta* F13 i *Stereum gausapatum* F28. Supstrati, podloge, reagensi, supstance p.a. čistoće i uređaji i servisi korišćeni u eksperimentima su navedeni u nastavku.

#### 3.1.1. Agensi za molekularno-biološke eksperimente

Direktni prajmer (ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'), Sigma-Aldrich, Nemačka;

Reverzni prajmer (ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), Sigma-Aldrich, Nemačka;

PCR master miks (2× PCR LongNova-RED Master Mix; DNA GDAŃSK) Blirt S.A., Gdansk, Poljska;

#### 3.1.2. Supstrati i podloge

Sladni ekstrakt, Torlak, Beograd, Srbija

Agar, Torlak, Beograd, Srbija

Ekstrakt kavsca, Torlak, Beograd, Srbija

Želatin, Carl Roth, Nemačka

Mlečna kiselina, Sigma-Aldrich, Merck, Steinheim, Nemačka

Agarozna gel, Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, Kalifornija, Sjedinjene Američke Države

#### 3.1.3. Reagensi, boje i enzimi

Gvajakol, Thermo Fisher Scientific, Fair Lawn, Nju Džersi, Sjedinjene Američke Države;

$\alpha$ -naftol, Sigma-Aldrich, Nemačka

Azure B, Sigma-Aldrich, Merck, Sent Luis, Montana, Sjedinjene Američke  
Države;

Fenol crveno, Merck, Darmstadt, Nemačka

Metiloranž, NRK® Inženjering, Srbija

Metilplavo, NRK® Inženjering, Srbija

Karboksimetil celuloza, srednje viskoznosti, Sigma-Aldrich, Nemačka

Ksilan iz bukve,  $\geq 90\%$  (HPLC), Sigma-Aldrich, Nemačka

Cellic CTec2, Novozymes A/S, Bagsvaerd, Danska

### **3.1.4. Supstance p.a. čistoće**

3, 5 - dinitrosalicilna kiselina ( $C_7H_4N_2O_7$ ), Acros Organics, New Jersey,  
Sjedinjene Američke Države

Folin (Folin & Ciocalteu's phenol reagent), Sigma-Aldrich, Nemačka

70% Etanol ( $C_2H_5OH$ ), Reahem, Novi Sad, Srbija

96% Etanol ( $C_2H_5OH$ ), Reahem, Novi Sad, Srbija

Izopropanol ( $C_3H_8O$ ), Fisher Chemical, Fisher Scientific, Loughborough,  
Ujedinjeno Kraljevstvo

Hloroform ( $CHCl_3$ ), Fisher Chemical, Fisher Scientific, Loughborough,  
Ujedinjeno Kraljevstvo

$\beta$ -mercaptoethanol ( $C_2H_6OS$ ), Sigma-Aldrich, Nemačka

Etilendiaminotetrasirćetna kiselina – EDTA ( $C_{10}H_{16}N_2O_8$ ), Sigma-Aldrich,  
Nemačka

Tris baza ( $C_4H_{11}NO_3$ ), Sigma-Aldrich, Nemačka

Hlorovodonična kiselina (HCl), Fisher Chemical, Fisher Scientific,  
Loughborough, Ujedinjeno Kraljevstvo

Heksadeciltrimetilamonijum-bromid – CTAB ( $C_{19}H_{42}BrN$ ), za molekularnu biologiju,  $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich, Nemačka

Dekstroza ( $C_6H_{12}O_6$ ), Torlak, Beograd, Srbija

Mikrokristalna celuloza [ $(C_6H_{10}O_5)_n$ ], prah, Carl Roth, Nemačka

Karboksimetil celuloza (CMC; srednje viskoznosti), Sigma-Aldrich, Nemačka

Ksilan iz bukve ( $>90\%$ ), Sigma-Aldrich, Nemačka

Amonijum nitrat ( $NH_4NO_3$ ), Centrohem, Beograd, Srbija

Magnezijum sulfat ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ), Merck-Alkaloid, Skoplje, Makedonija

Kalcijum hlorid ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ), Centrohem, Beograd, Srbija

Kalijum dihidrogen fosfat ( $KH_2PO_4$ ), Centrohem, Beograd, Srbija

Gvožđe sulfat ( $Fe_2(SO_4)_3$ ), Centrohem, Beograd, Srbija

Bakar sulfat ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ), Zorka Pharma a.d., Šabac, Srbija

Mangan sulfat ( $MnSO_4 \cdot H_2O$ ), Hemos, Beograd, Srbija

Cink sulfat ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ), Lach-Ner, Neratovice, Republika Češka

Kobalt hlorid ( $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ), Sigma-Aldrich, Nemačka

Sukcinska (ćilibarna) kiselina ( $C_4H_6O_4$ ), Fisher Chemical, Fisher Scientific, Loughborough, Ujedinjeno Kraljevstvo

Natrijum laktat ( $C_3H_5NaO_3$ ), Fisher Chemical, Fisher Scientific, Loughborough, Ujedinjeno Kraljevstvo

Natrijum tartarat ( $C_4H_4Na_2O_6 \cdot 2H_2O$ ), Fisher Chemical, Fisher Scientific, Loughborough, Ujedinjeno Kraljevstvo

Kalijum-natrijum tartarat ( $KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$ ), Centrohem, Beograd, Srbija

Tartarična kiselina ( $C_4H_6O_6$ ), Fisher Chemical, Fisher Scientific, Loughborough, Ujedinjeno Kraljevstvo

Natrijum hidroksid (NaOH), Centrohem, Beograd, Srbija

Natrijum sulfit ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ), Centrohema, Beograd, Srbija

Natrijum hlorit ( $\text{NaClO}_2$ ), Centrohema, Beograd, Srbija

Sumporna kiselina ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), Zorka Pharma a.d., Šabac, Srbija

### 3.1.5. Uređaji i servisi

Macrogen servis za sekvenciranje (Macrogen Inc., Amsterdam, the Netherlands);

Banka gena GenBank Nacionalnog centra za biotehnoške informacije (*en. National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank database*);

UV/Vis spektrofotometar (Ultrospec 3300 pro; Amersham Biosciences Ltd, Little Chalfont, Ujedinjeno Kraljevstvo);

Centrifuga (Z-206-A high capacity, compact centrifuge; HERMLE Labortechnik GmbH, Wehingen, Nemačka);

Mikrocentrifuga (MiniSpin®, maksimalne brzine 12100×g; Eppendorf, Hamburg, Nemačka);

Mikroskop (Axio Imager A1, Carl Zeiss MicroImaging GmbH., Nemačka);

PCR uređaj (QB-24 Thermal Cycler, Quanta Biotech Ltd., Bajflit, Ujedinjeno Kraljevstvo);

Electroforeza (MultiSUB Horizontal Gel Systems, Cleaver Scientific Ltd., Rugby, Ujedinjeno Kraljevstvo);

Vorteks (REAX 7000, Heidolph, Nemačka);

Orbitalna vazдушna tresilica (KS 4000i control, IKAR, Werke GmbH & Co. KG, Nemačka);

Analizator vlakana (behrotest® device for determining Crude Fiber Content, behr Labor-Technik GmbH, Dizeldorf, Nemačka)

### 3.1.6. Softver

RStudio verzija 1.2.1335 i R programski jezik verzija 3.4.4 [148] – korišćen u eksperimentalnom dizajnu i statističkoj analizi.

U istraživanju su korišćeni sledeći softverski paketi:

- R paket *FrF2* [149]
- R paket *RSM* [150]
- paket *desirability* [151]
- paket *GA* [152]
- 3D grafici su konstruisani pomoću *persp* funkcije [148].

## 3.2. Hranljivi medijumi, puferi i rastvori reagenasa

### 3.2.1. Hranljivi medijumi

Priprema 1000 ml krompir dekstroznog agara: 200 g oljuštenog krompira se kuva 30 minuta u 500-600 ml destilovane vode, a zatim se filtrira kroz dvoslojnu gazu. U filtrat krompira se doda 20 g dekstroze, 15 g agara, podesi se pH na 6,2 i dolije se destilovana voda do 1000 ml.

Priprema 1000 ml sladnog agara: 20 g sladnog ekstrakta, 18 g agara i destilovana voda dopunjena do 1000 ml zagreva se na temperaturi ključanja 20 minuta kako bi se sladni bujon rastvorio.

Priprema 1000 ml mineralnog agara za pripremu inokuluma za proizvodnju i test ligninolitčkih enzima (LBMI): 2 g  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 1 g ekstrakta kvasca, 10 g glukoze; 1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,01 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 15,0 g agara i destilovana voda do 1000 ml. Pre sterilizacije pH treba podesiti na 5,5.

Priprema 1000 ml mineralnog agara za kvalitativnu analizu ligninolitčke aktivnosti (LBMA): 1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 2,0 g glukoze; 0,5 g  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; 0,5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,01 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,01 g ekstrakta kvasca; 0,001 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; 0,001 g  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ ; 0,001 g  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 16 g agara i destilovana voda do 1000 ml. Pre sterilizacije pH podesiti na 5,5. Ova podloga je pripremljena prema protokolu koji je predložio Pointing S. [1] uz modifikaciju – umesto amonijum tartarata primenjuje se  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .

Priprema 1000 mililitara mineralnog medijuma za proizvodnju ligninolitčkih enzima (LBM): 0,5 g  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; 1,0 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,0 g ekstrakt kvasca;



0,01 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,05 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; 0,03 g  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 0,05 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,035 g  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,02 g  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  i destilovana voda do 1000 ml. Pre sterilizacije pH podesiti na 5,5. Ova podloga je dobijena modifikacijom podloga koje su predložili Pointing S. i Chand P. i sar. [153, 154].

Priprema 1000 ml mineralnog agara za pripremu inokuluma za proizvodnju i test celulolitičkih enzima (CBM): 5,0 g  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; 1,0 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,1 g kvašćev ekstrakt; 0,001 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 16 g agara i destilovana voda do 1000 ml. Za pripremu inokuluma u medijum se dodaje 2,0 g glukoze. Pre sterilizacije pH podesiti na 5,5. Ova podloga je pripremljena prema protokolu koji je predložio Pointing S. [153] uz modifikaciju – umesto amonijum tartarata primenjuje se  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .

Priprema 1000 ml Mandals medijuma [154, 155] za proizvodnju hidrolitičkih enzima: 0,3g/l urea; 0,75g/l pepton; 0,25 g/l kvašćev ekstrakt; 1,4 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 2,0 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,379 g/l  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,3 g/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,005 g/l  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,00118 g/l  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 0,0014 g/l  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,02 g/l  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  i destilovana voda do 1000 ml. Pre sterilizacije pH je podešen na 5,5.

### **3.2.2. Pufferi**

#### ***Pufferi za testove enzimске aktivnosti***

Za 200 ml natrijum-acetatnog pufera koncentracije 10 mmol/l i pH 5 potrebno je uzeti 7,2 ml stok rastvora sirćetne kiseline (100 mmol/l) i 12,8 ml stok rastvora natrijum acetata (100 mmol/l). Smešu rastvora sirćetne kiseline i natrijum acetata dopuniti destilovanom vodom do 200 ml i podesiti pH natrijum hidroksidom (2 mol/l).

Za 200 ml natrijum-acetatnog pufera koncentracije 50 mmol/l i pH 5 potrebno je uzeti 64 ml stok rastvora sirćetne kiseline (100 mmol/l) i 36 ml stok rastvora natrijum acetata (100 mmol/l). Smešu rastvora sirćetne kiseline i natrijum acetata dopuniti destilovanom vodom do 200 ml i podesiti pH natrijum hidroksidom (2 mol/l).

Za 200 ml natrijum laktatnog pufera koncentracije 250 mmol/l i pH vrednosti 4,5 potrebno je uzeti 11,2 ml natrijum laktata i 2,22 ml mlečne kiseline i dopuniti vodom do 200 ml. Doterati pH natrijum hidroksidom koncentracije 2 mol/l.

Za 200 ml natrijum sukcinatnog pufera koncentracije 250 mmol/l i pH vrednosti 4,5 potrebno je uzeti 100 ml rastvora sukcininske kiseline koncentracije 0,25 mol/l i titracijom natrijum hidroksidom koncentracije 5 mol/l podesiti pH.

Za 200 ml natrijum tartaratnog pufera koncentracije 125 mmol/l i pH vrednosti 4,5 potrebno je uzeti 6,6 ml stok rastvora tartarične kiseline koncentracije 500 mmol/l i 43,4 ml stok rastvora natrijum tartarata koncentracije 500 mmol/l i dopuniti destilovanom vodom do 200 ml. Doterati pH natrijum hidroksidom koncentracije 2 mol/l.

### ***Puferi za ekstrakciju DNK molekula***

Za pripremu 200 ml Tris-HCl pufera koncentracije 1 mol/l i pH 8.0 potrebno je 24,22 g Tris baze, 160 ml destilovane vode, podesiti pH koncentrovanom hlorovodoničnom kiselinom (HCl) i dopuniti vodom do 200 ml. Pufer sterilisati u autoklavu i čuvati na sobnoj temperaturi.

Za pripremu 1000 ml dinatrijum etilen diamin tetra acetat dihidrat (EDTA) pufera koncentracije 0,5 mol/l i pH 8 potrebno je uzeti 186.1 g EDTA i podesiti pH natrijum hidroksidom. EDTA se rastvara tek pri pH 8 za šta je potrebno 18-20 g NaOH na 1000 ml.

Za pripremu 500 ml 1X TE pufera (pH 8) potrebno je uzeti 5 ml Tris-HCl pufera koncentracije 1 mol/l i 1 ml EDTA koncentracije 0,5 mol/L i dopuniti vodom do 500 ml. 0,1X TE pufer se dobija razblaženjem 1X TE pufera destilovanom vodom. Nakon razblaženja proveriti pH i doterati prema potrebi, pH mora da bude 8.

Za 200 ml 2X CTAB lizionog pufera potrebno je uzeti 20 ml Tris-HCl pufera koncentracije 1 mol/l i pH 8.0, 56 ml NaCl koncentracije 5 mol/l, 16 ml EDTA 0.5 mol/l i 4.0 g CTAB. Neposredno pre upotrebe dodati 0,4 ml  $\beta$ -merkaptetanola. Pufer je pripremljen prema receptu koji su dali Gardes i Burns [156]

### **3.2.3. Rastvori reagenasa**

Za pripremu 100 ml rastvora gvajakola koncentracije 2 mmol/l potrebno je rastvoriti 0,025 g gvajakola u 100 ml destilovane vode.

Za pripremu 100 ml fenol crvenog koncentracije 0,71 mmol/l potrebno je rastvoriti 0,02516 g fenol crvenog u 100 ml destilovane vode.

Za pripremu 100 ml azure B koncentracije 0,160 mmol/l potrebno je rastvoriti 0,00489 g boje azure B u 100 ml destilovane vode.

Za pripremu 100 ml mangan sulfata koncentracije 1,25 mmol/l potrebno je rastvoriti 0,02113 g u 100 ml destilovane vode.

Za pripremu 100 ml želatina koncentracije 0,5% (w/v) potrebno rastvoriti 0,5 g želatina u 100 ml destilovane vode.

Za pripremu 100 ml DNS reagensa za test enzimske aktivnosti potrebno je rastvoriti 1 g DNS-a u 20 ml natrijum hidroksida koncentracije 2 mol/l. Nakon rastvaranja dodati 30 g kalijum-natrijum tartarata i dopuniti vodom do 100 ml.

Za pripremu 100 ml DNS reagensa za određivanje redukujućih šećera u supstratu potrebno je rastvoriti 1 g DNS-a, 0,05 g natrijum sulfita i 1 g natrijum hidroksida u 100 ml destilovane vode.

Za pripremu 100 ml 40%(w/v) rastvora kalijum-natrijum tartarata potrebnog u postupku određivanja redukujućih šećera potrebno je 40 g kalijum-natrijum tartarata rastvoriti u 100 ml destilovane vode.

Za pripremu 100 ml rastvora karboksimetil celuloze koncentracije 1% (w/v) potrebno je 1 g karboksimetil celuloze rastvoriti u 100 ml natrijum acetatnog pufera koncentracije 50 mmol/l i pH vrednosti 5.

Za pripremu 100 ml rastvora ksilana koncentracije 1% (w/v) potrebno je 1 g ksilana rastvoriti u 100 ml natrijum acetatnog pufera koncentracije 50 mmol/l i pH vrednosti 5.

Za pripremu kompleksnog reagensa koji se koristi pri određivanju proteina metodom po Loriju treba pripremiti tri rastvora: rastvor A (2% w/v Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), rastvor B (1% w/v CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O) i rastvor C (2% w/v Na-K-tartarata) u destilovanoj vodi i pomešati ih u odnosu 100:1:1= rastvor A: rastvor B: rastvor C [157].

U pripremi smeše Taširo (*Tashiro*) indikatora koristi se 100 ml vodenog rastvora metiloranža koncentracije 0,1% i 4 ml vodenog rastvora metil plavo koncentracije 1%.

### **3.2.4. Gel za elektroforezu**

Za 50 ml agarozna gela za vizualizaciju PCR proizvoda potrebno je 0,6 g agaroze rastvoriti u 50 ml TE pufera i zagrevati u mikrotalasnoj rerni 2,5 minuta dok se agarozna u potpunosti ne rastvori. Tokom zagrevanja na svakih 20 sekundi prekidati zagrevanje i mešati kružnim pokretima do potpunog rastvaranja. Nakon rastvaranja, dodati 1,2  $\mu$ l etidijum bromida, promešati, izliti u kadicu za elektroforezu i ostaviti 30 minuta da se ohladi i formira čvrst gel.

## 3.3. Metode

### 3.3.1. Izolacija i selekcija gljiva

#### *Izolacija gljiva*

Lokalitet na kom su prikupljeni uzorci gljiva nalazi se u okolini grada Leskovca, na jugu Srbije, i čine ga hrastova šuma, zona bagrema uz hrastovu šumu kao i okolne livade i voćnjaci (slika 7).



*Slika 7: Izgled lokaliteta u vreme zimskog (a i b) i prolećnog (c i d) sakupljanja uzoraka gljiva.*

Supstrat sa koga su sakupljeni uzorci činili su panjevi, oborena stabala i grane, opalo lišće, ili živa stabala biljaka (slika 8). Sakupljanje gljiva je vršeno dva puta – u januaru i junu 2014. godine. Karakteristike lokaliteta u vreme prikupljanja uzoraka su date u Tabeli 8.

*Tabela 8: Karakteristike lokaliteta u vreme prikupljanja gljiva*

Karakteristike lokaliteta	Sezona u kojoj su prikupljene gljive	
	6. januar 2014. godine	5. jun 2014. godine
Lokalitet	Okolina Leskovca, Srbija	Okolina Leskovca, Srbija
GPS koordinate	N 43°4'0.871" E 21°54'6.056"	N 43°4'0.871" E 21°54'6.056"
Nadmorska visina	325 m	325 m
Sezona	Zima	Proleće
Temperatura vazduha u vreme prikupljanja gljiva	12-16 °C	25-28 °C



*Slika 8: Izgled supstrata sa kog su prikupljeni uzorci gljiva a) kora drveta, b) oboreno deblo obraslo mahovinom i gljivama, c) opalo lišće, d) oborene grane.*

Kulture gljiva su izolovane iz plodonosnog tela primenom površinske sterilizacije [158, 159]. Postupak je sledeći: nakon dezinfekcije površine plodonosnog tela 70% alkoholom, površinski sloj plodonosnog tela se ukloni i iz unutrašnjosti plodonosnog tela se izdvoji komad veličine nekoliko milimetara do 1 cm i prenese na sladni ili krompir dekstrozni agar prethodno razliven u Petri šolji. Nakon formiranja micelijuma, vrši se presejavanje kulture tako što se sa ivice kulture odseca agarni disk (komad micelijuma koji je rastao na agaru, zbog jednostavnosti se naziva agarnim diskom) prečnika do 10 mm i prenosi na svežu podlogu. Presejavanje kulture se ponavlja na 3-7 dana sve do uspostavljanja potpuno čiste kulture. Čista kultura se skladišti i čuva u mraku, na temperaturi 4 °C i presejava na svežu agarnu podlogu svakih 6 meseci. Aktivna kultura, koja će se koristiti u eksperimentima, se održava presejavanjem na svežu podlogu svake 2-3 nedelje, kako bi bila spremna za trenutno korišćenje.

### ***Selekcija izolata***

U selekciji izolata su primenjivane kvalitativne i kvantitativne metode detekcije lakazne, mangan peroksidazne, lignin peroksidazne, karboksimetil celulazne i ksilanazne aktivnosti. Kvalitativna analiza je sprovedena na mineralnom agaru za proizvodnju ligninolitičkih enzima (LBM) ili za proizvodnju hidrolitičkih enzima (CBM) sa dodatim odgovarajućim reagensom za detekciju aktivnosti. Kvantitativno je proveravana lakazna, lignin peroksidazna i celulazna sposobnost izolovanih gljiva. Kvantitativna analiza je podrazumevala primenu enzimskih eseja za merenje ligninolitičke aktivnosti (lakazne, mangan peroksidazne ili lignin peroksidazne) i hidrolitičke aktivnosti (karboksimetil celulazne i ksilanazne). Inokulum korišćen u ovim analizama je pripreman na mineralnim podlogama LBM i CBM (poglavlje 3.2.1).

### **3.3.2. Priprema inokuluma**

U zavisnosti od tipa enzima koji će se proizvoditi (ligninolitički ili hidrolitički) inokulum je pripreman na LBMI ili CBM agarnoj podlozi (poglavlje 3.2.1). Priprema inokuluma je podrazumevala sledeće: sterilno prenošenje agarnog diska prečnika 10 mm na odgovarajući mineralni agar i inkubiranje u mraku, 7 dana, na 30 °C. Nakon inkubacije, inokulacija odgovarajućeg lignoceluloznog supstrata je vršena u sterilnim uslovima odgovarajućim brojem agarnih diskova prečnika 10 mm. Inokulacija agarne

podloge u kvalitativnim esejima je vršena sterilnim prenošenjem jednog diska prečnika 10 mm na sredinu agarne podloge. Broj inokulacionih diskova zavisio je od faze istraživanja kao što je prikazano u Tabeli 9. Inkubacija inokulisanog lignoceluloznog supstrata je trajala 7-35 dana, zavisno od faze istraživanja.

*Tabela 9: Veličina inokuluma korišćena u različitim fazama istraživanja*

<b>Faza istraživanja</b>	<b>Broj diskova</b>
Kvalitativna analiza (selekcija izolata)	1
Kvantitativna analiza – ligninolitički enzimi (selekcija izolata)	6
Kvantitativna analiza – hidrolitički enzimi (selekcija izolata)	4
Kvantitativna analiza – hidrolitički enzimi (ispitivanje hidrolitičkog potencijala)	1
Kvantitativna analiza – ligninolitički enzimi (ispitivanje ligninolitičkog potencijala)	6
Kvantitativna analiza – ligninolitički i hidrolitički enzimi (melasna džibra, optimizacija)	3-6
Kvantitativna analiza – ligninolitički enzimi (melasna džibra, predtretman)	3

### **3.3.3. Kultivacioni uslovi proizvodnje enzima**

U selekciji odgovarajućih izolata je korišćena piljevina bukve i mineralni medijumi LBMI i Mandals medijum (poglavlje 3.2.1) u kultivaciji na čvrstoj podlozi (SSF) i u tečnom medijumu (SF). U SSF kultivaciji je korišćeno 5 g lignoceluloznog supstrata i 9 ml odgovarajućeg mineralnog medijuma (70% vlažnosti supstrata), u SF kultivaciji je korišćeno 3 g lignoceluloznog supstrata i 50 ml odgovarajućeg mineralnog medijuma. Inokulisan supstrat je inkubiran 7 dana u statičkim uslovima u mraku na 30 °C, nakon čega je izvršena ekstrakcija enzima i test aktivnosti.

U ispitivanju hidrolitičkog potencijala izolata korišćeni su enzimski ekstrakti proizvedeni SSF kultivacijom na piljevini bukve kojoj je dodat Mandals medijum (poglavlje 3.2.1). Odgovarajućom zapreminom Mandals medijuma je podešena vlažnost



supstrata na 70%. Tako pripremljen supstrat je sterilisan u autoklavu, nakon čega je inokulisan i inkubiran sedam dana, u mraku na 30 °C.

U ispitivanju mogućnosti primene i uslova primene odabranih izolata u tretmanu lignoceluloznog supstrata korišćena je piljevina bukve i mineralni medijum LBM (poglavlje 3.2.1), u SSF i SF kultivaciji, ili destilovana voda. U SSF kultivaciji je korišćeno 5 g piljevine bukve. Vlažnost supstrata podešena pomoću LBM i destilovane vode na 68% i 75%. Vreme ispoljavanja određenih enzimskih aktivnosti je ispitivano nakon 3, 5, 7 i 10 dana. Inokulisan supstrat je inkubiran u mraku na 30 °C u statičkim uslovima.

U optimizaciji uslova predtretmana, kao suplement je korišćena melasna džibra poreklom od šećerne repe. Inkubacija je trajala 7 dana. U predtretmanu pod optimalnim uslovima inkubacija je trajala 7, 18 i 35 dana, nakon čega je izvršena ekstrakcija enzima i test aktivnosti (više detalja u poglavlju 3.7).

### **3.3.4. Ekstrakcija enzima**

U testovima sprovedenim radi selekcije odgovarajućih izolata, za ekstrakciju ligninolitičkih enzima proizvedenih SSF kultivacijom korišćeno je 50 ml destilovane vode, dok je za ekstrakciju hidrolitičkih enzima korišćen 0.05 M natrijum-acetatni pufer pH 5 (poglavlje 3.2.2). Odnos biomase na kojoj su proizvedeni enzimi i ekstrakcionog pufera ili vode je bio 1:10 (masa supstrata : zapremina ekstrakcionog pufera).

U testovima hidrolitičkog potencijala ekstrakt je bio acetatni pufer. U testovima ligninolitičkog potencijala, kao i u procesu statističke optimizacije, ekstrakcija enzima je vršena destilovanom vodom.

Voda odnosno pufer je dodat u Erlenmajer, nakon čega je šejkiran 30 minuta na 220 rpm i 30 °C. Tečna faza je odvojena od čvrste filtriranjem kroz *Whatman no. 1* filter papir, zatim centrifugirana na 4185×g i 25±2 °C pomoću *Z-206-A high capacity* kompaktne centrifuge. Nakon centrifugiranja supernatant je još jednom profiltriran kao bi se uklonile sve potencijalne nečistoće koje mogu remetiti merenje enzimske aktivnosti. Na isti način je izvršeno odvajanje enzima nakon SF kultivacije.

Enzimski ekstrakti su čuvani na 4 °C do primene u esejima. Enzimski testovi su sprovedeni unutar 24 h od ekstrakcije.

### **3.3.5. Enzimska analiza**

#### ***Kvalitativna analiza***

U kvalitativnoj analizi su ispitivane lakazna, lignin peroksidazna i celulazna aktivnost. Test enzimskih aktivnosti je vršen na agarnoj podlozi. Lakazna aktivnost je ispitivana na mineralnom agaru LBMA (sastav podloge je predstavljen u poglavlju 3.2.1) koji je sadržao 0,005% (w/v)  $\alpha$ -naftola ili 0,05% (w/v) gvajakola [153]. Lignin peroksidazna aktivnost je testirana pomoću boje azure B dodate u LBMA. Mineralna podloga je sadržala 0,01% (w/v) boje azure B [153]. Potvrda lakazne aktivnosti je pojava plave do crne boje oko kulture na agaru koji sadrži  $\alpha$ -naftol, ili pojava narandžasto-crvene do braon boje na agaru koji sadrži gvajakol. Potvrda lignin-peroksidazne aktivnosti je obezbojenje površine agara koji sadrži azure B ispod i/ili oko kulture.

U kvalitativnoj analizi celulazne aktivnosti korišćena je mikrokristalna celuloza u mineralnom agaru CBM [153]. Pojava bistrih zona na mutnom agaru je potvrda celulazne aktivnosti izolovanih gljiva.

#### ***Kvantitativna analiza***

U kvantitativnoj analizi su ispitivane lakazna, mangan peroksidazna, lignin peroksidazna, karboksimetil celulazna i ksilanazna aktivnost.

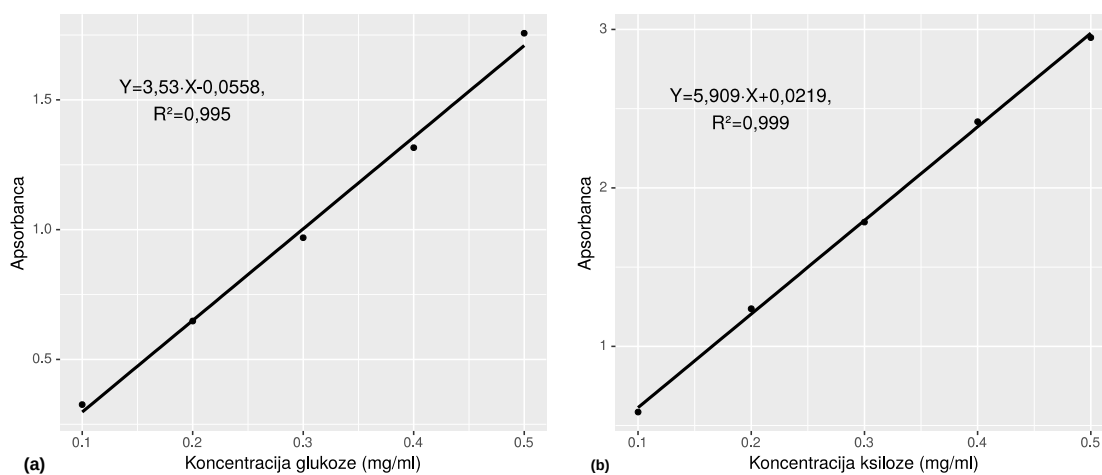
Lakazna aktivnost je određivana testom oksidacije gvajakola [160]. U testu su korišćeni natrijum-acetatni pufer molske koncentracije 10 mmol/l i pH vrednosti 5, rastvor gvajakola koncentracije 2 mmol/l i enzimski ekstrakti. Procedura određivanja lakazne aktivnosti podrazumeva pripremu 5 ml reakcione smeše i 5 ml kontrole. Reakciona smeša sadrži 3 ml acetatnog pufera, 1 ml rastvora gvajakola i 1 ml enzimskog ekstrakta. Kontrola sadrži 3 ml pufera, 1 ml destilovane vode i 1 ml enzimskog ekstrakta. Pripremljena kontrola i reakciona smeša se inkubiraju 30 minuta na 30 °C. Porast koncentracija oksidovanog gvajakola se određuje na spektrofotometru na talasnoj dužini 470 nm. Koeficijent apsorptivnosti oksidovanog gvajakola iznosi  $\epsilon_{470 \text{ nm}} = 6,74 \text{ l}/(\text{mmol}\cdot\text{cm})$  [161].

Mangan peroksidazna aktivnost je određivana testom oksidacije fenol crvenog [162, 163]. U testu su korišćeni natrijum laktatni pufer koncentracije 250 mmol/l i pH vrednosti 4,5, natrijum sukcinatni pufer koncentracije 250 mmol/l i pH vrednosti 4,5, fenol crveno koncentracije 0,71 mmol/l, mangan sulfat koncentracije 1,25 mmol/l, želatin koncentracije 0,5 %, vodonik peroksid koncentracije 0,62 mmol/l i enzimski ekstrakti. Procedura određivanja mangan peroksidazne aktivnosti podrazumeva pripremu reakcione smeše i dve kontrole. Reakciona smeša (test) zapremine 5 ml sadrži 1 ml natrijum sukcinatnog pufera, 0,7 ml fenol crvenog, 0,4 ml mangan sulfata, 1 ml natrijum laktatnog pufera, 1 ml želatina, 0,4 ml vodonik peroksida, 0,5 ml enzimskog ekstrakta. Kontrola jedan (I) umesto mangana sadrži destilovanu vodu, kontrola dva (II) umesto mangana i vodonik peroksida sadrži destilovanu vodu. Reakcija započinje dodavanjem vodonik peroksida. Inkubacija traje 5 minuta na 30 °C, nakon čega se reakcija zaustavlja dodavanjem 200 µl natrijum hidroksida koncentracije 5 mol/l. Nakon zaustavljanja reakcije određuje se razlika u apsorbanci u odnosu na referentnu kivetu (reakciona smeša bez vodonik peroksida i sa inaktiviranim enzimom). Porast apsorbance se određuje na spektrofotometru na 610 nm talasne dužine. Pri izračunavanju aktivnosti mangan zavisnih peroksidaza potrebno je od apsorbance testa oduzeti apsorbancu kontrole I, a pri izračunavanju aktivnosti verzatilnih (hibridnih) peroksidaza potrebno je od apsorbance kontrole I oduzeti apsorbancu kontrole II. Koeficijent apsorptivnosti oksidovanog fenol crvenog je  $\epsilon_{610\text{ nm}} = 22 \text{ l}/(\text{mmol}\cdot\text{cm})$  [164].

Lignin peroksidazna aktivnost je određivana testom oksidacije azure B [165, 166]. U testu se koristi natrijum tartaratni pufer koncentracije 125 mmol/l, azure B koncentracije 0,160 mmol/l, vodonik peroksid koncentracije 2 mmol/l i enzimski ekstrakt. Reakciona smeša zapremine 2,5 ml sadrži 1 ml natrijum tartaratnog pufera, 0,5 ml azure B, 0,5 ml enzimskog ekstrakta i 0,5 ml vodonik peroksida. Reakcija počinje dodavanjem vodonik peroksida i traje 5 minuta. Promena apsorbance se određuje na 651 nm. Pad apsorbance je indikator lignin peroksidazne aktivnosti. Molarni apsorpcioni koeficijent oksidovanog azure B je  $\epsilon_{651\text{ nm}} = 48,8 \text{ l}/(\text{mmol}\cdot\text{cm})$  [165].

Celulazna i ksilanazna aktivnost su određivane izmenjenom DNS metodom po Mileru [167]. U enzimskom testu su korišćeni acetatni pufer koncentracije 50 mmol/l i pH vrednosti 5, rastvor CMC ili ksilana koncentracije 1 %, enzimski ekstrakt i DNS pripremljen prema receptu za određivanje enzimske aktivnosti (poglavlje 3.2.3).

Procedura određivanja enzimске aktivnosti je sledeći: reakciona smeša, enzimska kontrola i supstrat kontrola se inkubiraju 30 minuta na 50 °C. Nakon inkubacije dodaje se 1 ml DNS reagensa u svaku od epruveta i inkubira 100 °C, a zatim ohladi do sobne temperature i doda 4 ml destilovane vode u svaku od epruveta. Apsorbanca se određuje na 540 nm na spektrofotometru. Od apsorbance reakcione smeše se oduzima apsorbanca enzimске kontrole i kontrole supstrata. Koncentracija oslobođenog šećera tokom inkubacije se određuje na osnovu standardne prave glukoze i ksiloze (slika 9). Reakciona smeša zapremine 1ml sadrži 0,5 ml rastvora CMC/ksilana i 0,5 ml enzimskog ekstrakta. Enzimska kontrola zapremine 1 ml sadrži 0,5 ml acetatnog pufera i 0,5 ml enzimskog ekstrakta. Supstrat kontrola sadrži 0,5 ml acetatnog pufera i 0,5 ml supstrata CMC/ksilana.



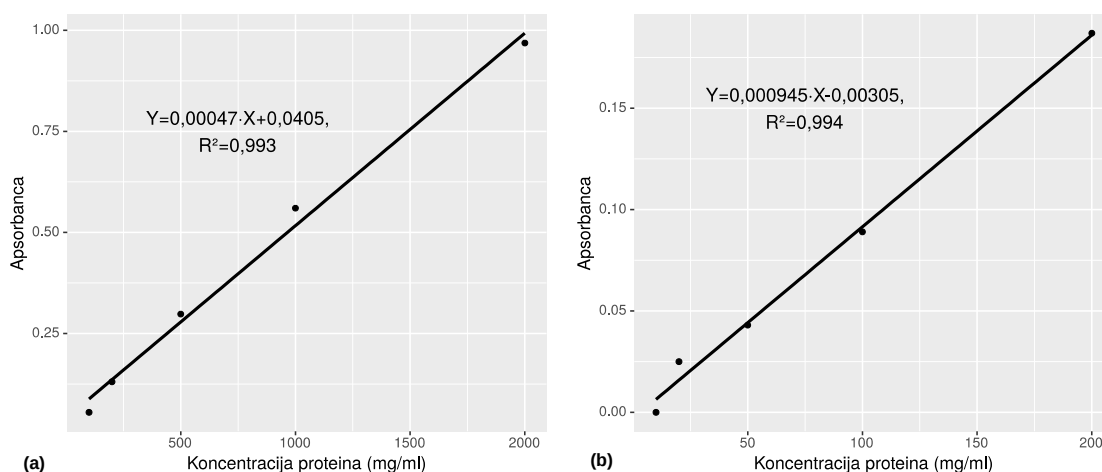
Slika 9: Standardna prava a) glukoze korišćena pri izračunavanju celulazne aktivnosti i b) ksiloze korišćena za izračunavanje ksilanazne aktivnosti.

Test celulazne aktivnosti pomoću filter papira (FPU) je izvođen prema malo izmenjenom protokolu koji je predložio Ghose T. K. [168]. Metoda se izvodi na sledeći način: 1 ml natrijum acetatnog pufera koncentracije 50 ml/mol (Protokol 3.2.2), 0,5 ml enzimskih ekstrakata i 1 traka filter papira (1×6 cm) se doda u epruvetu i inkubira 60 minuta na 50 °C. U isto vreme treba pripremiti i kontrolu (1,5 ml natrijum acetatnog pufera i traka filter papira), koja koja se takođe inkubirana 60 minuta na 50 °C. Nakon inkubacije treba dodati 1,5 ml DNS reagensa i inkubirati 5 minuta na 100 °C, a zatim ohladiti do sobne temperature i dodati 4 ml destilovane vode. Apsorbancu meriti na spektrofotometru na 540 nm u odnosu na referencu (1,5 ml pufera i 1,5 ml DNS).

Koncentracija oslobođene glukoze je utvrđena pomoću standardne prave, a aktivnost je predstavljena brojem FP jedinica (FPU).

### 3.3.6. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina je određivana metodom po Loriju (*Lowry*) [157]. Kao standard je korišćen goveđi serum albumin, a koncentracija proteina je određena pomoću standardne prave (slika 10). Postupak se sastoji u sledećem: u 0,1 ml uzorka ili standarda treba dodati 0,1 ml 2 N rastvora NaOH nakon čega se vrši hidrolitacija 10 minuta zagrevanjem na 100 °C. Nakon hidrolizacije treba ohladiti hidrolizat do sobne temperature, a zatim dodati 1 ml kompleksnog reagensa (priprema reagensa je data u poglavlju 3.2.3) i ostaviti 10 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega treba dodati 0,1 ml 1 N rastvora Folin reagensa, vorteksirati i ostaviti da stoji 30-60 minuta na sobnoj temperaturi (ne treba da stoji duže od 60 minuta, u eksperimentima izvođenim tokom rada na ovoj disertaciji trajanje ovog koraka je bilo 45 minuta).



Slika 10: Standardna prava za određivanje koncentracije proteine prema Lorijevoj metodi: a) više koncentracije proteina – 550 nm i b) niže koncentracije proteina – 750 nm.

Količina proteina proizvedenog po jedinici suve mase supstrata je izračunata pomoću formule 4:

$$w_m = (\gamma \cdot V_{ex}) / m_s \quad (4)$$

gde je  $w_m$  masa proteina po jedinici mase supstrata (mg/g),  $\gamma$  je koncentracija proteina dobijena Lorijevom metodom (mg/ml),  $V_{ex}$  je ukupna zapremina ekstrahovanih enzima (ml), a  $m_s$  je suva masa supstrata (g).

### 3.3.7. Izračunavanje enzimске aktivnosti

Enzimska aktivnost je izračunata primenom Lamber-Berovog zakona [169]. U izračunavanju ligninolitičkih aktivnosti je korišćena jednačina (5):

$$EA = \frac{\Delta A \cdot V}{t \cdot \epsilon \cdot v \cdot d} \cdot D \quad (5)$$

gde je  $EA$  enzimska aktivnost (U/ml),  $\Delta A$  promena apsorbance,  $V$  je zapremina reakcione smeše (ml),  $t$  je vreme inkubacije (min),  $\epsilon$  je molarni apsorpcioni koeficijent [l/(mmol·cm)],  $v$  zapremina enzimskog ekstrakta (ml),  $d$  širina kivete – put koji svetlost prolazi u kiveti (1 cm),  $D$  razblaženje enzima. Jedna jedinica (U) ligninolitičkog enzima je definisana kao količina enzima koja katalizuje oksidaciju 1  $\mu$ mol supstrata za 1 minut (  $\mu$ mol/min).

U izračunavanju proizvodnje enzima po jedinici suve mase supstrata korišćena je formula 6:

$$EAM = \frac{EA \cdot V_{ex}}{m_s} \quad (6)$$

gde je  $EAM$  aktivnost enzima prema jedinici mase supstrata (U/g),  $EA$  enzimska aktivnost (U/ml),  $V_{ex}$  ukupna zapremina ekstrahovanih enzima (ml),  $m_s$  suva masa supstrata (g).

U izračunavanju specifične enzimске aktivnosti korišćena je formula 7:

$$SEA = \frac{EA}{\gamma} \quad (7)$$

gde je  $SEA$  specifična aktivnost po jedinici mase proteina (U/mg),  $EA$  enzimska aktivnost (U/ml),  $\gamma$  koncentracija proteina (U/ml).

U izračunavanju hidrolitičkih aktivnosti korišćeni su standardna prava (jednačina prave 8) i molarna masa glukoze odnosno ksiloze. Aktivnost hidrolitičkih enzima je određena pomoću jednačine (9).

$$y = A \cdot x + B \quad (8)$$

$$EA = \frac{\frac{x}{M} \cdot V}{v \cdot t \cdot d} \cdot D \quad (9)$$

Članovi u jednačinama (8) i (9) su  $EA$  – enzimska aktivnost (U/ml),  $y$  – apsorbanca,  $x$  – koncentracija šećera glukoze odnosno ksiloze (mg/ml),  $A$  – nagib prave,  $B$  – presek na y-osi,  $M$  – molarna masa šećera (glukoze – 0,180156 mg/μmol odnosno molarna masa ksiloze – 0,15013 mg/μmol),  $V$  ukupna zapremina reakcione smeše (ml),  $v$  – zapremina enzima (ml),  $t$  – vreme inkubacije (min),  $d$  širina kivete – put koji svetlost prolazi u kiveti (1 cm),  $D$  – razblaženje enzima.

U izračunavanju FPU jedinica (formula 10) korišćena je metoda koju je predložio Ghose T. K. [168]:

$$FPU = \frac{0,37}{\text{Koncentracija enzima koja oslobađa 2,0 mg glukoze}} U/ml \quad (10)$$

Koncentracija enzima koja oslobađa 2,0 mg glukoze koja se koristi u izračunavanju FPU je obrnuto proporcionalna razblaženju enzima (formula 11) [168]:

$$\text{Koncentracija} = \frac{1}{\text{razblaženje}} \left( = \frac{\text{zapremina enzima u razblaženom rastvoru}}{\text{ukupna zapremina razblaženog rastvora}} \right) \quad (11)$$

U izračunavanju CMCU jedinica (jednačina ) takođe je korišćena metoda koju je predložio Ghose T. K. [168]:

$$CMCU = \frac{0,185}{\text{Koncentracija enzima koja oslobađa 0,5 mg glukoze}} U/ml \quad (12)$$

Koncentracija enzima koja oslobađa 0,5 mg glukoze se određuje prema formuli 12 [168].

### 3.3.8. DNK izolacija

DNK je izolovana iz svežih uzoraka gljiva koji su bili u eksponencijalnoj fazi rasta [170]. Uzorci su pripremljeni na mineralnom agaru i u bujonu istog sastava kao CBM (sastav medijuma je dat u poglavlju 3.2.1). Delovi micelijuma veličine 2,5-3 mm su uzeti sa 7 dana stare kulture gajene na CBM agaru, očišćeni od agara i sterilno preneti u endorf kivete u kojima je bilo 700  $\mu$ l CBM bujona. Uzorci su inkubirani 3 dana u mraku na 30 °C. Pre ekstrakcije DNK izvršeno je peletiranje uzoraka mikrocentrifugom na  $25 \pm 2$  °C i  $4313 \times g$  koje je trajalo 3 minuta, nakon čega je uklonjen mineralni medijum. Ovaj korak je ponovljen dva puta, nakon čega je dodato 500  $\mu$ L 0,1 $\times$  TE (Tris-EDTA) pufera čija je pH 8 (poglavlje 3.2.2). Uzorci su vorteksirani u prekidima 3-5 puta, a zatim je izvršeno peletiranje mikrocentrifugom na  $4313 \times g$  da bi se osiguralo ispiranje uzoraka od zaostalog mineralnog medijuma. Ovaj korak je ponovljen dva puta, u prvom koraku centrifugiranje je trajalo 5 minuta, u drugom 3 minuta.

U izolaciji DNK je korišćena delimično modifikovana metoda koju su predložili Gardes i Bruns [156]. Uzorci očišćeni od mineralnog medijuma su resuspendovani u 2X CTAB lizionom puferu (poglavlje 3.2.2). Dodato je 300  $\mu$ l CTAB lizionog pufera u endorf kivete sa uzorcima, nakon čega su uzorci vorteksirani 3-5 puta, a zatim su usledila 3 ciklusa smrzavanja na -20 °C i zagrevanja na 65 °C. Svaki ciklus je obuhvatao 15 minuta smrzavanja u zamrzivaču i 15 minuta zagrevanja u termošejkeru. Svrha ovih ciklusa je da olakšaju razbijanje ćelijskog zida [156]. Nakon ciklusa zamrzavanja i zagrevanja sledi gnječenje (mrvljenje, usitnjavanje) sterilnim staklenim štapićima 30 sekundi, nakon čega su uzorci zagrevani 45 minuta na 65 °C.

Kada je završena faza razbijanja ćelijskog zida i ćelije izvršeno je prečišćavanje DNK molekula hloroformom. U kivete sa uzorcima je dodato po 300  $\mu$ l hloroforma, nakon čega su uzorci vorteksirani sa prekidima 10-15 puta, a zatim centrifugirani 15 minuta na  $6720 \times g$  kako bi se istaložili proteini i ostale nečistoće. Nakon toga je vodena faza sa DNK molekulom preneti sterilno u novu kivetu i izvršena je precipitacija ledenim izopropanolom 10 minuta na 4 °C, a zatim peletiranje 10 minuta maksimalnom brzinom mikrocentrifuge od  $7000 \times g$  na sobnoj temperaturi. Nakon precipitacije uklonjen je supernatant a pelet je ispran ledenim 70% etanolom, sušen 15 minuta na 37 °C i resuspendovan u 0.1 X TE puferu.



### **3.3.9. PCR amplifikacija ITS sekvenci**

Pre PCR amplifikacije DNK uzorci su razblaženi u ultračistoj destilovanoj vodi. Na PCR-u je umnožen region internog transkripcionog spejsera (ITS) ribozomalne DNK. U postupku su korišćeni ekstrahovana DNK koja je služila kao obrazac za umnožavanje i set prajmera ITS1/ITS4 (poglavlje 3.1.1). Reakciona smeša zapremine 50  $\mu$ l je sadržala 1  $\mu$ l DNK uzorka, 1  $\mu$ l ITS1 prajmera koncentracije 10  $\mu$ mol/l, 1  $\mu$ l ITS4 prajmera koncentracije 10  $\mu$ mol/l, 25  $\mu$ l 2 $\times$  PCR LongNova-RED master miksa i 22  $\mu$ l ultračiste destilovane vode. Postupak je bio sledeći: inicijalna denaturacija je tekla 15 minuta na 95 °C, zatim je sledilo 30 ciklusa denaturacije (30 s na 95 °C), nakon toga korak hibridizacije (30 s na 55 °C), korak elongacije (90 s na 72 °C) i na kraju finalna ekstenzija 5 min na 72 °C.

### **3.3.10. Gel elektroforeza**

PCR proizvodi su ispitani na gel elektroforezi; etidijum bromid je korišćen za vizuelizaciju DNK proizvoda. PCR proizvodi su pripremljeni za analizu na agarozu gel elektroforezi mešanjem 1  $\mu$ l boje 6XLD i 5  $\mu$ l PCR proizvoda rastvorenog u 0,1X TE puferu, a zatim dodati u bunarčice gela potopljenog u TE puferu. Nakon toga je kroz sistem puštena jednosmerna struja jačine 90 V da teče 55 minuta, nakon čega je na UV lampi provereno prisustvo proizvoda.

### **3.3.11. Sekvenciranje i identifikacija**

Sekvenciranje PCR produkata je izvršio Macrogen servis za sekvenciranje. Dobijene sekvence su upoređene sa GenBank bankom gena Nacionalnog centra za biotehnoške informacije (NCBI) [171, 172]. Filogenetska analiza je urađena pomoću MEGA 5 softvera [173].

## **3.4. Hidroliza**

### **3.4.1. Ispitivanje hidrolitičkog potencijala izolata**

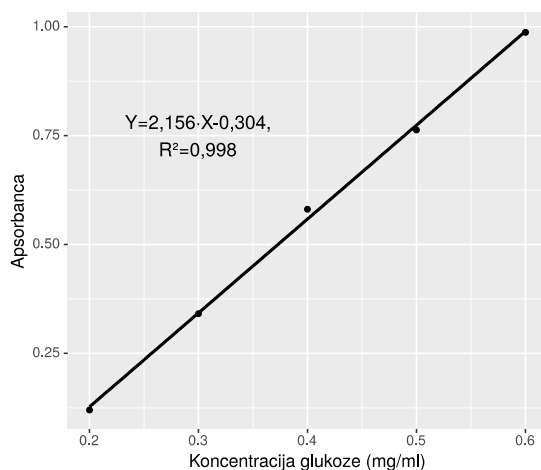
Hidrolitički potencijal izolata je ispitivan u postupku hidrolize otpadnog celuloznog supstrata (starih novina) enzimskim ekstraktima. Novine su isečene na komade 1×1 cm. Lignocelulozni supstrat u odnosu na zapreminu enzimskih ekstrakata je činio 6%, 8% i 10%, tj. u 100 ml enzimskih ekstrakata dodato je, redom, 6 g, 8g i 10 g listića novina. Hidroliza je tekla 72 h, na 50 °C i 150 rpm na orbitalnoj vazdušnoj tresilici. Koncentracija oslobođenih šećera je određena DNS modifikovanom metodom po Mileru [167] objašnjenom u poglavlju 3.4.3.

### **3.4.2. Hidroliza predtretiranog supstrata**

U hidrolizi lignoceluloznog supstrata tretiranog gljivama je korišćen komercijalni enzim Cellic CTec2. 1 g predtretiranog ili netretiranog supstrata je hidrolizovan komercijalnim enzimom. Doziranje supstrata je bilo 10% (w supstrata/v pufera). Korišćen je 0,05 mol/l natrijum acetatni pufer (pH 5). Doziranje enzima je bilo 1,5% (w enzima/w supstrata). Hidroliza je trajala 48 h na orbitalnoj vazdušnoj tresilici pri 150 rpm i temperaturi inkubacije 50 °C; uzorci su uzimani nakon 1 h, 4h, 24 h i 48 h. Koncentracija oslobođenih šećera je određena DNS modifikovanom metodom po Mileru [167] objašnjenom u poglavlju 3.4.3.

### **3.4.3. Određivanje koncentracije šećera oslobođenog hidrolizom**

Koncentracija šećera oslobođena hidrolizom je utvrđena DNS modifikovanom metodom po Mileru [167], koja se izvodi na sledeći način: u epruvetu dodati 3 ml razblaženog šećera i 3 ml DNS i zagrevati 15 minuta na 90 °C. Nakon toga dodati 1 ml 40% kalijum-natrijum tartarata, promešati, a onda ohladiti do sobne temperature. Apsorbanca je merena na 505 nm na spektrofotometru, a koncentracija šećera je određena pomoću standardne krive šećera (slika 11)



Slika 11: Standardna prava glukoze korišćena pri izračunavanju koncentracije oslobođenih šećera tokom hidrolize.

### 3.5. Analiza supstrata

#### 3.5.1. Određivanje suve mase supstrata

Ukupna suva masa supstrata je određena prema NREL/TP-510-42621 protokolu [174]. Postupak je sledeći: vegeglas posude, pre dodatka uzoraka biomase, sušiti 4h na  $105 \pm 3$  °C do konstantne mase. Nakon toga, dodati 1 g supstrata i izmeriti masu na analitičkoj vagi, a zatim prebaciti u sušnicu na  $105 \pm 3$  °C i sušiti do konstantne mase. Udeo suve mase je izračunat pomoću formule 13:

$$SuveMase = \frac{(M_{ps} - M_p)}{M_{is}} \cdot 100\% \quad (13)$$

gde je *SuveMase* udeo suve mase u supstratu (%),  $M_{ps}$  masa supstrata nakon sušenja i posude u kojoj se supstrat nalazi (g),  $M_p$  masa posude u kojoj se supstrat nalazi (g),  $M_{is}$  masa supstrata pre sušenja (g).

#### 3.5.2. Određivanje ekstrakata

Ekstrakti su određeni Sokshlet metodom prema protokolu NREL/TP-510-42619 [175]. U ekstrakciji je korišćena destilovana voda za ekstrakte rastvorne u vodi (proces je trajao 6 h), a zatim smeša etanola i acetona (odnos etanol:aceton=1:2) za ekstrakte

rastvorne u organskim rastvaračima (proces je trajao 6 h takođe). Vakuum uparivačem je uklonjen višak tečnosti i izmerena je masa ekstrakata. Udeo ekstrakata u ukupnoj suvoj masi supstrata je određen pomoću formule 14 koja je predložena u protokolu NREL/TP-510-42619 [175].

$$Ekstr = \frac{M_{eb} - M_b}{ODS} \quad (14)$$

U formuli 14 *Ekstr* je udeo ekstrakata u suvoj masi supstrata (%),  $M_{eb}$  je masa ekstrakata i suda u kom se ekstrakti nalaze (g),  $M_b$  masa suda u kom se nalaze ekstrakti (g) i *ODS* suva masa supstrata (g).

### 3.5.3. Određivanje lignina

Lignin nerastvoran u kiselinama i lignin rastvoran u kiselinama su određeni prema LAP-003 i LAP-004 protokolima, pri čemu je korišćen i analizator vlakana [176, 177]. Postupak određivanja Klasonovog lignina je sledeći: u 1 g suve mase lignoceluloznog supstrata treba dodati 15 ml 72% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ohlađene u frižideru na 4 °C i pomešati sa uzorkom do njegovog potpunog natapanja kiselinom. Postupak hidrolize supstrata u koncentrovanoj kiselini teče 2 h na 20 °C uz mešanje na svakih 15 minuta staklenim štapićem. Nakon isteka dva sata hidrolize u koncentrovanoj kiselini, uzorak treba prebaciti u 560 ml dejonizovane vode (koncentracija kiseline treba dostići 3%) i zagrevati do blagog ključanja u trajanju od 4 h uz održavanje zapremine dodavanjem vruće vode prema potrebi. Nakon toga, uzorak filtrirati i izmeriti masu filtrata za dalje određivanje lignina rastvornog u kiselinama, a talog sušiti na 105±3 °C do konstantne mase, nakon čega ga treba prebaciti u peć za spaljivanje gde temperaturu treba povećavati za 10 °C svakog minuta do dostizanja temperature od 575 ± 25 °C. Uzorak treba žariti na 575 ± 25 °C minimum 3 h. Udeo lignina nerastvornog u kiselinama treba izračunati pomoću formule 15 koja je predložena u LAP-003 protokolu [176]:

$$AIL = \frac{M_2 - M_3}{M_1 \cdot \frac{T_{ar}}{T_{prep}}} \cdot 100 \quad (15)$$

gde je  $ALL$  udeo lignina nerastvornog u kiselinama (%);  $M_1$  inicijalna masa uzorka (g);  $M_2$  masa posude sa uzorkom, masa lignina nerastvornog u kiselinama i masa pepela nerastvornog u kiselinama (g);  $M_3$  masa posude sa uzorkom i masa pepela nerastvornog u kiselinama (g);  $T_{ar}$  udeo suve mase originalnog supstrata, pre bilo kakve prerade (%);  $T_{prep}$  udeo suve mase dobijen tokom pripreme supstrata za analizu (%).

Udeo lignina rastvornog u kiselinama se određuje pomoću formule 16 koja je predložena u LAP-004 protokolu [177]. Izračunavanje se odnosi na supstrat oslobođen od ekstrakata. U analizi u ovom istraživanju su korišćeni uzorci koji su pre hidrolize sumpornom kiselinom ekstrahovani metodom po Sokshletu (Soxhlet) [175].

$$ASL = \frac{\frac{A}{b \cdot a} \cdot d \cdot V \cdot \frac{L}{1000 \text{ ml}}}{\frac{M \cdot T_f}{100}} \cdot 100 \quad (16)$$

U formuli 16  $ASL$  je lignin rastvoran u kiselinama (%);  $A$  je apsorbanca na 205 nm;  $d$  je faktor razblaženja;  $b$  je dužina puta koju svetlost prelazi u kiveti, iznosi 1 cm;  $a$  je koeficijent apsorptivnosti koji iznosi 110 l/g·cm;  $V$  zapremina filtrata (ml);  $M$  inicijalna masa suvog supstrata (g);  $T_f$  je udeo ukupnog sadržaja suve mase uzorka dobije tokom LAP-003 analize (%).

Udeo lignina rastvornog u kiselinama u ukupnoj masi supstrata na osnovu udela u ekstrahovanoj biomasi dobija se iz formule 17 predložene u LAP-004 protokolu:

$$ASL_{tot} = ASL_{eks} \cdot \frac{100\% - E}{100\%} \quad (17)$$

gde je  $ASL_{tot}$  udeo lignina rastvornog u kiselinama u ukupnoj biomasi (%);  $ASL_{eks}$  je udeo lignina rastvornog u kiselinama u ekstrahovanoj biomasi (%);  $E$  je udeo ekstrakata u ukupnoj masi biomase (%).

### 3.5.4. Određivanje holoceluloze

Sadržaj holoceluloze je određen pomoću ponovo odobrenog ASTM 1104-56 protokola [178]. Postupak je sledeći: uzeti 2 g suvog supstrata iz kog su prethodno uklonjeni ekstrakti, dodati 80 ml destilovane vode, 0,5 ml sirćetne kiseline i 1 g natrijum hlorita. Smešu zagrevati 60 minuta na 70 °C u vodenom kupatilu, nakon čega treba ponovo dodati 0,5 ml sirćetne kiseline i 1 g natrijum hlorita. Proces dodavanja sirćetne kiseline i natrijum hlorita treba ponoviti još četiri puta, na svakih sat vremena, do ukupnog trajanja od 6 h. Nakon navršenih 6 sati delignifikacije, smešu ostaviti da se ohladi, a zatim isprati acetonom i sušiti na 105 °C do konstantne mase. Masu osušene holoceluloze izmeriti na analitičkoj vagi.

### 3.5.5. Određivanje sadržaja pepela

Sadržaj pepela je određen prema protokolu NREL/TP-510-42622 [179]. Postupak je sledeći: suvi uzorak dodati u porcelanske posude i spaljivati 4 h na 575±25 °C u peći. Nakon toga, uzorak ohladiti u desikatoru i na analitičkoj vagi zabeležiti njegovu masu. Zatim ponovo preneti u peć na 575±25 °C i sušiti do konstantne mase (promena mase manja od 0,1 mg) [179]. Udeo pepela u suvoj masi supstrata je određen pomoću formule 18 predložene u protokolu NREL/TP-510-42622 [179].

$$Pep = \frac{M_{pp} - M_p}{ODS} \cdot 100 \quad (18)$$

U formuli 18  $Pep$  je udeo pepela (%),  $M_{pp}$  je masa pepela i suda u kom je pepeo (g),  $M_p$  je masa suda (g),  $ODS$  suva masa supstrata (g).

### 3.5.6. Određivanje ukupnog azota

Ukupan azot je određen metodom po Kjeldalu (Kjeldahl) [180]. Procedura obuhvata tri faze. Prva faza (digestija koncentrovanom kiselinom) obuhvata sledeće: odmeriti 1g lignoceluloznog supstrata i 10 ml koncentrovane sumporne kiseline. Nakon toga dodati 5 g kalijum sulfata, 0,25 ml bakar sulfat penta hidrata koncentracije 5 mol/l i 0,25 g selen. Nakon toga smešu zagrevati do potpunog nestanka ugljenika. Nakon digestije, smeša se postepeno hladi i pažljivo se u nju dodaje 100-200 ml destilovane vode.

Druga faza je faza destilacije. Ovo je faza u kojoj se amonijak odvaja od digestione smeše. U ovoj fazi treba dodati oko 70 ml natrijum hidroksida koncentracije 40%, nakon čega sledi destilacija. Zagrevanjem se formira para koja odvlači azot od digestione smeše u erlenmajer sa 50 ml sumporne kiseline čija je koncentracija 0,05 mol/l i kojoj se dodaje Taširo (*Tashiro*) indikator (poglavlje 3.2.3). Destilacija traje sve do potpunog prelaska amonijaka u kiselinu.

Treća faza je faza titracije. U ovoj fazi se vrši titracija dodavanjem rastvora natrijum hidroksida koncentracije 0,1 mol/l u kiselinu sa amonijakom i indikatorom. Sadržaj azota je određen primenom jednačine 19 [180]:

$$N = \frac{(V_{sk} - V_{nh}) \cdot 14}{ODS \cdot 1000} \cdot 100 \quad (19)$$

gde je  $N$  udeo azota u supstratu (%),  $(V_{sk} - V_{nh})$  količina kiseline koja je vezala azot [ $V_{sk}$  je zapremina sumporne kiseline (ml),  $V_{nh}$  je zapremina natrijum hidroksida (ml)], ODS masa supstrata (g).

### 3.6. Statistička analiza

Vrednosti su iskazane kao srednja vrednost ± standardna devijacija. Srednje vrednosti su upoređene analizom varijanse (ANOVA). Uticaj kultivacionih uslova na sposobnost gljiva da proizvedu adekvatne aktivnosti je testirana dvosmernim ANOVA testom. Velčova (Welch) ANOVA praćena Tukijevim HSD testom (*en Tukey's honestly significant difference – HSD*) je primenjena u proceni razlika u enzimskoj aktivnosti gljiva gajenim pod konkretnim kultivacionim uslovima. T-test je korišćen u evaluaciji maksimalnih aktivnosti dobijenih na SSdS i LMS. Razlike su smatrane statistički značajnim za  $p < 0,05$ .

### 3.7. Eksperimentalni dizajn

Metodama eksperimentalnog dizajna je moguće pomoću manjeg broja eksperimenata simultano ispitati uticaj više faktora na istraživani sistem ili proces nego ispitivanjem jednog po jednog faktora. Metode eksperimentalnog dizajna koje se najčešće koriste za sticanje nekih polaznih informacija o istraživanom sistemu, kao i u početnim

istraživanjima kada se radi tzv. skrining uticaja faktora na istraživani sistem/proces, uključuju faktorijski dizajn (koji može biti potpuni faktorijski dizajn ili frakcionisani faktorijski dizajn) i Plaket-Burman dizajn (eng. *Plackett-Burham design – PBD*) [181, 182]. Za detaljnije upoznavanje sistema, kao i optimizaciju uslova sa ciljem unapređenja procesa ili sistema, se uglavnom koristi metodologija odgovora površine (eng. *Response Surface Method – RSM*) u okviru koje se mogu koristiti dva dizajna – centralni kompozitni dizajn (eng. *Central Composite Design – CCD*) i Boks-Benken dizajn (eng. *Box–Behnken Design – BBD*) [181, 182]. Koji dizajn će biti odabran zavisi od broja faktora čiji uticaj na sistem se želi ispitati, resursa kojima se raspolaže, kao i željenog finalnog ishoda istraživanja.

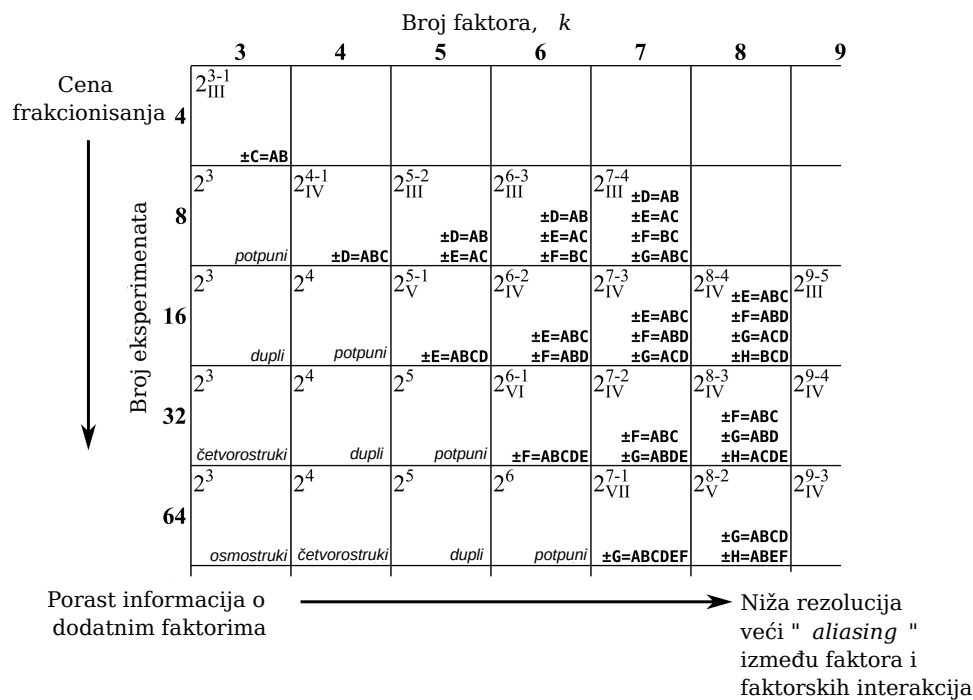
**Faktorijski dizajn** je tehnika koja omogućava da se ispituju efekti različitih faktora ili međufaktorskih interakcija na istraživani sistem ili proces. Prilikom primene faktorijskog dizajna neophodno je odrediti broj nivoa svakog od faktora [181]. U najčešćoj upotrebi je faktorijski dizajn u kom su postavljena dva nivoa svakog od faktora. Prednosti ovakvog faktorijskog dizajna uključuju mali broj eksperimenata koje treba izvesti; dobijeni rezultati se mogu dobiti logičkim razmatranjem, primenom elementarne aritmetike i kompjuterske grafike; kvantitativni rezultati mogu dati usmerenje za dalja istraživanja; a dizajn se može dodatno uvećati ukoliko je potrebno prikupiti više detalja o sistemu [181]. Faktorijski dizajn može biti frakcionisani ili potpuni.

*Potpuni faktorijski dizajn* sadrži sve kombinacije postavljenih nivoa ispitivanih faktora. Ovaj dizajn je pogodan za ispitivanje manjeg broja faktora. Naime, broj eksperimenata koje treba izvesti u slučaju faktorijskog dizajna drugog reda (eng. *two-level full factorial design*) je  $2^k$  gde je  $k$  je broj faktora koji se ispituju, a osnova 2 je broj odabranih nivoa [183]. Tako je recimo za  $k=3$  ukupan broj eksperimenata koje treba izvesti 8, za  $k=4$  ukupan broj eksperimenata je 16, za  $k=5$  broj eksperimenata je 32 itd. Korišćenjem potpunog faktorijskog dizajna mogu se dobiti informacije o uticaju glavnih efekata (tj. pojedinačnih faktora na ispitivani sistem), ali i informacije o interakcijama među faktorima (uticaj interakcija drugog, trećeg, četvrtog reda itd.; maksimum interakcija među faktorima zavisi od broja ispitivanih faktora). Najčešće se pažnja poklanja glavnim efektima i interakcijama drugog reda, dok se interakcije trećeg i viših redova uglavnom zanemaruju [181, 182].



*Frakcionisani faktorijski dizajn (FFD)* se često koristi u ranoj fazi istraživanja kada je potrebno testirati što veći broj faktora radi odabira onih koji imaju značajan uticaj na istraživani sistem ili proces i da, u isto vreme, istraživanje bude brzo i ne bude skupo. Ovaj dizajn omogućava da se u najmanjem broju pokušaja (tj. da se pomoću najmanjeg broja eksperimenata) ispituju uticaji glavnih efekata kao i željenih interakcija [184]. Oblik FFD je  $2^{(k-p)}$  gde je k broj eksperimenata koji se ispituje, a  $1/2^p$  je frakcija potpunog faktorijskog dizajna. Na primer  $2^{(5-2)}$ -dizajn je  $1/4$  potpunog faktorijskog dizajna čiji je oblik  $2^5$  i omogućava ispitivanje uticaja 5 faktora na istraživani sistem ili proces pomoću samo 8 eksperimenata, dok bi u slučaju potpunog faktorijskog dizajna trebalo izvesti 32 eksperimenta [181, 184]. U FFD postoji kompromis između rezolucije dizajna, broja faktora, broja potrebnih eksperimenata i obrasca formiranja alijasa glavnih efekata sa interakcijama kao što je prikazano na slici 12. Rezolucija dizajna u velikoj meri zavisi od reda frakcionisanja, što je viši red frakcionisanja niža je rezolucija (slika 12), međutim tokom skrininga u ranim fazama eksperimenata, niža rezolucija (recimo rezolucija III koja je najčešće primenjivana tokom skrininga) može da bude dovoljna za identifikaciju uticajnih faktora [181, 182].

*Plaket-Burman dizajn (PBD)* je tip frakcionisanog faktorijskog dizajna kojim se određuju glavni efekti u redukovanom broju eksperimenata uz pretpostavku da interakcije među faktorima mogu biti zanemarene [186]. Ovaj dizajn se uglavnom koristi u skrining fazi i pogodan je za primenu kada se ispituje više od sedam faktora. PBD omogućava da se ispita m-broj faktora u m+1 eksperimenata. Za razliku od faktorijskog dizajna koji ima oblik stepena sa osnovom dva, PBD ima oblik  $4k$  (gde je k broj posmatranja;  $k=1,2,\dots,n$ ). Dakle, broj eksperimenata u PBD je deljiv sa 4 i za 1 je veći od broja faktora čiji efekat na istraživani proces/sistem se ispituje. Na primer, za 7, 11, 15, 19 itd. faktora potrebno je izvesti, redom, 8, 12, 16, 19 itd. eksperimenata [186].

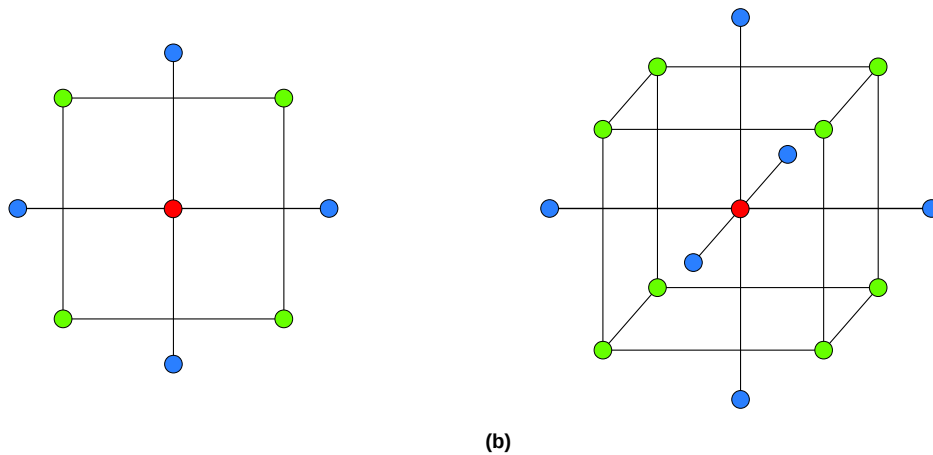


Slika 12: Prikaz kompromisa koji se dobija u frakcionisanom faktorijskom dizajnu. Redovi pokazuju broj eksperimenata ( $n$ ) u odgovarajućem FFD. Kolone pokazuju broj faktora koje treba ispitati u eksperimentu. Čelije na preseku kolone i reda u gornjem levom uglu daju forma FFD  $2^{(k-p)}$  sa konkretnim brojem faktora i reda frakcije, kao i rezoluciju dizajna koja je napisana latinskim brojem; u donjem desnom uglu boldiranim slovima je data informaciju o tome kako se mogu formirati faktori koji nedostaju, koji su eliminisani frakcionisanjem. Prazne ćelije su nemogući FFD [182, 185]

**Metodologija odgovora površine (RSM)** se obično koristi u analizi strukturne pouzdanosti ili optimizacije procesa/sistema [187]. Ova metoda kombinuje eksperimentalni dizajn, regresionu analizu i metode optimizacije [188]. S obzirom na to da je za RSM potrebno izvesti više eksperimenata nego u slučaju faktorijskog dizajna, posebno skrining dizajna FFD ili PBD, u ovoj metodi se prevashodno koriste faktori za koje se zna da su značajni za ispitivani sistem [189]. Kao rezultat primene RSM dobija se analitička ili eksplicitna funkcija, što omogućava da operacije koje slede – analiza strukturne pouzdanosti i optimizacija – budu brže i da ne zahtevaju dodatne eksperimente

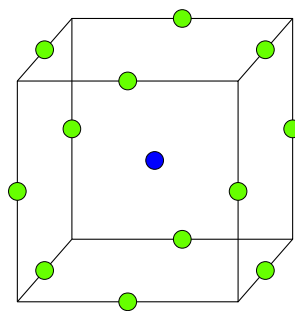
ili simulacije [187]. Standardne metode odgovora površine koje su u čestoj upotrebi su centralni kompozitni dizajn i Boks-Benken dizajn. Predikcioni modeli koji se dobijaju primenom ovih metoda mogu dati 3D grafike odgovora površine [189].

*Centralni kompozitni dizajn (CCD)* je baziran na faktorijskom dizajnu drugog reda kome su dodata ponavljanja centralnih tačaka i aksijalne tačke (ukupno  $2k$  aksijalnih tačaka;  $k$  je broj faktora koji se ispituju) [190]. Takođe, radi se randomizacija eksperimenata – eksperimenti se izvode nasumičnim redosledom radi smanjenja uticaja faktora koji nisu uzeti u razmatranje tj. nisu pod kontrolom kao što je recimo ljudski faktor, problemi sa instrumentima koji se koriste u eksperimentu i slično [182, 190]. Rastojanje aksijalnih tačaka od centra zavisi od broja faktora i jednako je poluprečniku kruga (kada se radi o dizajnu sa dva faktora), odnosno sfere (kada se radi o tri ili više faktora) koja obuhvata aksijalne i tačke faktorijskog dizajna i čiji centar čine centralne tačke dizajna (slika 13). Tako je, recimo, u slučaju CCD sa dva faktora rastojanje od centra do aksijalnih tačaka  $\sqrt{2}=1,41$  , u slučaju dizajna sa 3 faktora je  $\sqrt{3}=1,73$  , itd. [181, 182]. Ovakvi dizajni se nazivaju cirkularni (dva faktora) odnosno sferični (tri ili više faktora) [182, 191]. U slučaju kada postoje ograničenja faktora koji se ispituju, CCD se može smanjiti i tada se koristi varijanta CCD koja se naziva upisani centralni kompozitni dizajn (eng. *Inscribed Central Composite Design – CCI*). CCI zahteva 5 tačaka svakog faktora. Još jedna varijanta CCD koja se može koristiti je CCD sa tačkama u centru površina koje formiraju tačke faktorijskog dizajna (eng. *Face-Centered Central Composite Design – CCF*). CCF zahteva tri nivoa svakog ispitivanog faktora. Ovaj dizajn se može dobiti uvećanjem postojećeg faktorijskog dizajna ili frakcionisanog faktorijskog dizajna rezolucije V [191].



Slika 13: Geometrija centralnog kompozitnog dizajna sa dva faktora (a) i tri faktora (b): zelenom bojom su obeležene tačke faktorijskog dizajna, plavom aksijalne tačke, a crvenom centralne [181, 182].

**Boks-Benken dizajn (BBD)** ne sadrži faktorijski dizajn. BBD je nezavisni kvadratni dizajn čije se tačke nalaze na sredini ivica i u centru, a ne kao u slučaju CCD u uglovima prostora (slika 14). U pitanju je rotirajući dizajn koji zahteva tri nivoa svakog od faktora [191]. Broj eksperimenata koji je potreban da bi se razvio BBD je definisan kao  $2k(k-1)+C_0$ , pri čemu je  $k$  broj faktora, a  $C_0$  broj centralnih tačaka [192].



Slika 14: Geometrija Boks-Benken dizajna. Plavom bojom su obeležene centralne tačke [192].

U ovom istraživanju su korišćeni FFD i CCD. FFD je korišćen za selekciju faktora koji imaju najveći uticaj na ispitivani sistem, dok je RSM korišćena za ispitivanje efekta odabranih faktora na ispitivani sistem; za modelovanje odgovora površine korišćen je CCD pristup. U optimizaciji predtretmana korišćeni su još i funkcija poželjnosti (eng. *Desirability Function*) i genetički algoritam (eng. *Genetic Algorithm – GA*) jer je bilo potrebno izvršiti simultanu optimizaciju više odgovora (detalji su dati u nastavku).

### **3.7.1. Frakcionisani faktorijski dizajn**

Za selekciju faktora sa najvećim uticajem na ispitivani sistem korišćen je  $2^{5-2}$ -frakcionisani faktorijski dizajn (FFD), dopunjen preklopnim (eng. *foldover*) dizajnom. Frakcionisani faktorijski dizajn se koristi u ranoj fazi eksperimenata, za skrining (eng. *screening*) faktora koji se ispituju. Skrining dizajn se koristi za selekciju faktora sa značajnim uticajem na ispitivani sistem, odnosno uticaj glavnih efekata a ne interakcija [181]. Rezolucija skrining dizajna je najčešće tri (III) i u tom slučaju su formirani alijasi glavnih efekata sa interakcijom dva faktora i obrnuto [181, 193]. Da bi se omogućila nepristrasnost u proceni efekata, poželjne su više rezolucije dizajna. U ovom istraživanju FFD je korišćen za prikupljanje nekih podataka o ispitivanom sistemu, dok je za selekciju uticajnih faktora FFD proširen preklopnim dizajnom do rezolucije pet (V), s obzirom na to da glavni efekti i interakcije dva faktora nisu u alijansi u slučaju dizajna sa rezolucijom V [181, 193].

Primenom FFD je ispitivan uticaj veličine inokuluma, koncentracije džibre, vlažnosti supstrata, temperature i inicijalne pH na lakaznu i mangan peroksidaznu aktivnost odabranog izolata. Dobijeni rezultati su linearno fitovani, a zatim je primenjena analiza varijanse (ANOVA), pri čemu je kao prag selekcije uticajnih faktora korišćena p-vrednost manja od 0,1 sa ciljem da se iz dalje analize isključe samo faktori koji sigurno ne utiču na ispitivani sistem. U tabeli 10 su date kodirane i realne vrednosti ispitivanih faktora.

Tabela 10: Opseg vrednosti faktora korišćenih u frakcionisanom faktorijskom dizajnu.

Faktor	Jedinica	Kodirane i realne vrednosti faktora	
		-1	1
Veličina inokuluma	disk	3	6
Koncentracija džibre	%	10	20
Vlažnost supstrata	%	62	72
Temperature	°C	24	30
pH	-	5	9

### 3.7.2. Metodologija odgovora površine

Identifikovani uticajni faktori su dalje ispitani primenom metodologije odgovora površine. Za ovo istraživanje je odabran sferični centralni kompozitni dizajn podeljen u dva bloka. Prvi blok primenjenog centralnog kompozitnog dizajna se sastojao od 2<sup>3</sup> potpunog faktorijskog dizajna sa osam tačaka, i četiri replikacije u centru (tj. četiri centralne tačke), drugi blok se sastojao od šest aksijalnih tačaka i tri centralne tačke. Dakle, odgovori (vrednosti lakazne i mangan peroksidazne aktivnosti) su dobijeni u 21-om eksperimentu. Za analizu svakog pojedinačnog faktora je korišćeno pet različitih nivoa (-1,73; -1; 0; 1; 1,73). Ispitivani sistem je opisan pomoću polinomalne jednačine drugog reda (jednačina 20).

$$\hat{Y} = \beta_0 + \sum \beta_i \cdot x_i + \sum \beta_{ij} \cdot x_{ii} \cdot x_{jj} + \sum \beta_{ii} \cdot x_{ii}^2, \quad i = 1, 2, \dots, k, j = 1, 2, \dots, k \quad (20)$$

U jednačini 20  $\hat{Y}$  je predviđena vrednost odgovora,  $\beta_0$  je koeficijent preseka,  $\beta_i$  koeficijent glavnih efekata,  $\beta_{ij}$  koeficijent interakcija faktora,  $\beta_{ii}$  koeficijent kvadratnih članova glavnih efekata,  $x_i$  glavni efekti,  $x_{ij}$  interakcije faktora,  $x_{ii}^2$  kvadrat glavnih efekata,  $i$  i  $j$  su brojači faktora,  $k$  je broj ispitivanih faktora. Primenom ANOVA dobijene su vrednosti koeficijenata [181]. U polinomalnoj jednačini 20 su korišćene kodirane vrednosti faktora tj. vrednosti glavnih efekata..

Kodiranje je izvršeno pomoću formule 21:

$$x_i = \frac{Y_i - Y_0}{\Delta Y_{i,2}}, \quad i = 1, 2, \dots, k \quad (21)$$

gde je  $Y_i$  realna vrednost ispitivanog faktora (minimalna, maksimalna ili centralna),  $Y_0$  realna centralna vrednost ispitivanog faktora,  $\Delta Y_{i2}$  polovina opsega u okviru kog je ispitivan faktor ( $\Delta Y_{i,2} = \frac{Y_{i,maks} - Y_{i,min}}{2}$ ;  $Y_{i,maks}$  je maksimalna vrednost faktora korišćena u eksperimentu,  $Y_{i,min}$  je minimalna vrednost faktora korišćena u eksperimentu),  $i$  brojač faktora.

Kvalitet modela je analiziran primenom linearne regresione analize i dijagnostike ( $R^2$  vrednost i dijagnostički grafici), ANOVA, kao i određivanjem adekvatne preciznosti (eng. *adequate precision* – AP) koja je izračunata pomoću formule 22.

$$A.P. = \frac{\max(\hat{Y}) - \min(\hat{Y})}{\sqrt{p \cdot \frac{\sigma^2}{n}}} \quad (22)$$

U jednačini 22  $A.P.$  je adekvatna preciznost,  $\hat{Y}$  je predviđena vrednost za postavljene uslove eksperimenta,  $p$  je broj članova modela,  $\sigma^2$  je srednja vrednost kvadrata odstupanja,  $n$  je broj eksperimenata u dizajnu.

### 3.7.3. Funkcija poželjnosti

Funkcija poželjnosti koju su predstavili Džordž Derindžer (*George Derringer*) i Ronald Suč (*Ronald Suich*) je jedna od najčešće korišćenih metoda za optimizaciju više odgovora [194]. Među odgovorima koje treba optimizovati uvek postoji neki konflikt, zbog čega se optimizacijom dobija kompromisno rešenje. Princip optimizacije primenom funkcije poželjnosti obuhvata dva koraka [194]:

1. transformaciju pojedinačnih odgovora u individualne funkcije poželjnosti; i
2. agregaciju pojedinačnih funkcija poželjnosti u jednu koja se naziva globalna funkcija poželjnosti.

Individualne funkcije poželjnosti se mogu dobiti pomoću funkcija jednostrane transformacije, kojima pripadaju funkcija maksimizacije (jednačina 23) i funkcija minimizacije (jednačina 24), ili dvostrane transformacije kojoj pripada funkcija

targetiranja željenog rešenja (jednačina 25). Individualne funkcije poželjnosti mogu imati vrednosti između 1 i 0 [151, 194].

$$di^{max} = \begin{cases} 0 & \hat{Y}_i \leq Y_{ix} \\ \left[ \frac{\hat{Y}_i - Y_{ix}}{Y_i^x - Y_{ix}} \right]^r & Y_{ix} < \hat{Y}_i < Y_i^x, \quad i=1,2,\dots,n \\ 1 & \hat{Y}_i \geq Y_i^x \end{cases} \quad (23)$$

$$di^{min} = \begin{cases} 0 & \hat{Y}_i > Y_i^x \\ \left[ \frac{\hat{Y}_i - Y_i^x}{Y_{ix} - Y_i^x} \right]^r & Y_{ix} < \hat{Y}_i < Y_i^x, \quad i=1,2,\dots,n \\ 1 & \hat{Y}_i < Y_{ix} \end{cases} \quad (24)$$

$$di^{target} = \begin{cases} \left[ \frac{\hat{Y}_i - Y_{ix}}{c_i - Y_{ix}} \right]^{r_1} & Y_{ix} \leq \hat{Y}_i \leq c_i \\ \left[ \frac{\hat{Y}_i - Y_i^x}{c_i - Y_i^x} \right]^{r_2} & c_i < \hat{Y}_i \leq Y_i^x \\ 0 & \hat{Y}_i < Y_{ix} \text{ ili } \hat{Y}_i > Y_i^x \end{cases} \quad i=1,2,\dots,n \quad (25)$$

U jednačinama 23, 24 i 25  $d_i$  je individualna funkcija poželjnosti. U slučaju funkcije maksimizacije (jednačina 23;  $di^{max}$ )  $Y_{ix}$  je minimalna prihvatljiva vrednost odgovora  $\hat{Y}_i$ ,  $Y_i^x$  je maksimalna vrednost odgovora  $\hat{Y}_i$  koja u transformaciji maksimizacije nije neophodna, ali se iz praktičnih razloga postavlja [194],  $r$  je težinski koeficijent funkcije koji određuje oblik funkcije. U slučaju funkcije minimizacije (jednačina 24;  $di^{min}$ )  $Y_i^x$  je maksimalna prihvatljiva vrednost odgovora  $\hat{Y}_i$ ,  $Y_{ix}$  je minimalna vrednost odgovora  $\hat{Y}_i$  koju bi iz praktičnih razloga trebalo postaviti,  $r$  je težinski koeficijent funkcije koji određuje oblik funkcije [151, 194].

Dvostrana transformacija (target funkcija prikazana jednačinom 25;  $di^{target}$ ) se koristi onda kada treba ograničiti i minimalnu i maksimalnu prihvatljivu vrednost



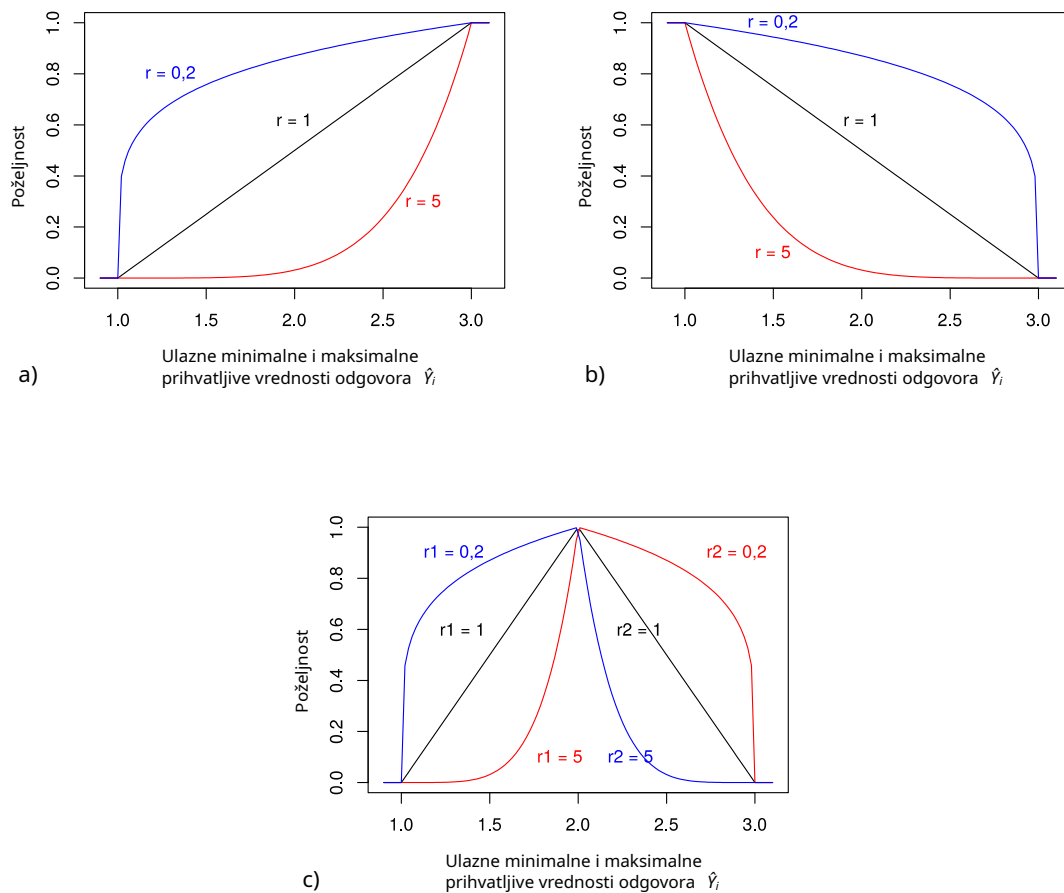
odgovora  $\hat{Y}_i$  [194]. U jednačini 25  $Y_{ix}$  je minimalna prihvatljiva vrednost odgovora  $\hat{Y}_i$ ,  $Y_i^x$  je maksimalna prihvatljiva vrednost odgovora  $\hat{Y}_i$ ,  $c_i$  je ciljana vrednost, a  $r_1$  i  $r_2$  su težinski koeficijenti. Vrednosti izvan postavljenih  $Y_i^x$  i  $Y_{ix}$  granica su neprihvatljive [151, 194].

Koeficijenti  $r$ ,  $r_1$  i  $r_2$  mogu imati vrednosti između 0 i 10. Kada je vrednost ovih koeficijenat 1 funkcija je linearna, ukoliko je vrednost manja od 1 funkcija sporije dostiže željene vrednosti (logaritamska funkcija), ukoliko je vrednost veća od 1 funkcija brzo dostiže željene vrednosti (eksponencijalna funkcija). Vrednosti koeficijenata različite od 1 se uglavnom koriste kada se želi dati prednost nekom od ispitivanih odgovora ( $\hat{Y}_i$ ) [151, 194]. Izgled profila funkcija transformacije u zavisnosti od vrednosti koeficijenata  $r$ ,  $r_1$  i  $r_2$  je prikazan na slici 15.

Formirane pojedinačne funkcije poželjnosti ( $d_i$ ) se zatim kombinuju u globalnu funkciju poželjnosti. Globalna funkcija poželjnosti je geometrijska sredina pojedinačnih funkcija poželjnosti (jednačina 26) [151, 194]:

$$D = \left( \prod_{i=1}^r d_i \right)^{1/r} \quad (26)$$

Kao i u slučaju pojedinačnih funkcija poželjnosti i globalna funkcija poželjnosti može imati vrednosti od 0 do 1. Vrednost 0 znači nepoželjan ishod. Kombinovanjem definisane  $D$  funkcije i predikcione jednačine (modela) dobijene u eksperimentalnom dizajnu može se optimizovati ispitivani proces ili sistem [151, 194].



Slika 15: Promena profila funkcija transformacije u zavisnosti od vrednosti koeficijenta  $r$ ,  $r_1$  i  $r_2$  ( $Y_{ix}$  je 3,  $Y_i^x$  je 1,  $c_i$  je 2): a) transformacija maksimizacije odgovora, b) transformacija minimizaciji odgovora, c) target funkcija [151].

U ovom istraživanju je korišćena transformacija maksimizacije (jednačina 23) u slučaju oba odgovora, i lakazne i mangan peroksidazne aktivnosti. Minimalna prihvatljiva vrednost lakazne aktivnosti je postavljena na 50 U/l, maksimalna lakazna aktivnost je postavljena na 245 U/l, vrednost težinskog koeficijenta ( $r$ ) je postavljena na 0,1. Minimalna prihvatljiva vrednost aktivnosti mangan peroksidaza je postavljena na 50 U/l, maksimalna vrednost je postavljena na 90 U/l, a vrednost težinskog koeficijenta ( $r$ ) je postavljena na 3.

### 3.7.4. Genetički algoritam

Za selekciju najpoželjnijih uslova predtretmana lignoceluloznog supstrata pomoću odabranog izolata korišćen je genetički algoritam (GA). GA je vrsta evolucionih algoritama – kompjuterskih procesa inspirisanih evolucionom biologijom – i može simultano pratiti i unapređivati veći broj rešenja i hipoteza [195]. Principi kojima se vodi GA optimizacija su principi evolucije kroz koju prolazi populacija jedinki, dok problem koji treba rešiti definiše okruženje GA [196, 197]. Potencijalna rešenja problema, tj. kandidati rešenja, su individue koje se u ovom slučaju nazivaju *hromozomi*. Genotip ovih individua (odnosno hromozoma) kodira moguće rešenje problema, dok prevođenje genotipa u fenotip utvrđuje način na koji treba interpretirati hromozom kako bi se dobilo stvarno rešenje. Adekvatnost individue za postavljeni problem zavisi od njene podesnosti za postavljeni problem što se naziva fitness; što je individua podesnija za postavljeni problem veća je verovatnoća da će preživeti [196, 197]. Evolucijom populacije individua neke jedinke nestaju dok nove, drugačije, postaju deo populacije. Te nove jedinke su posledica *rekombinacija* i *mutacija* ranijih jedinki [196, 197].

GA se koristi za identifikaciju najbolje hipoteze, tj. za optimizaciju datih merenih vrednosti [195]. Za razliku od nekih drugih metoda koje koriste gradijent informacije kako bi pronašli najbolje kandidate u skladu sa "fitness funkcijom", GA može koristiti funkciju direktno, što je posebno značajno prilikom optimizacije više odgovora primenom funkcije poželjnosti [198]. Operatori koje GA koristi su veličina populacije, verovatnoća rekombinacija, verovatnoća mutacija [152].

Radi odabira adekvatnih kultivacionih uslova koji bi unapredili predtretman lignoceluloze i učinili hidrolizu lignoceluloznog supstrata efikasnom, primenjene su sledeće vrednosti operatora genetičkog algoritma: veličina populacije 1000 jedinki, verovatnoća rekombinacija 0,8, verovatnoća mutacija 0,2 i broj generacija 5000. U prilogu 7 je data R skripta primenjenog genetičkog algoritma. Primenjena metoda je inspirisana modelom koji je razvio Tongsuk (*Thongsook*) [199].

## 4. Rezultati i diskusija

### 4.1. Izolacija i selekcija izolata

U januaru i junu 2014. godine je prikupljen 31 uzorak gljiva koji je uključivao plodonosna tela ili delove supstrata (bele i braon truleži) sa delovima plodonosnih tela i spora. Na agarnu podlogu je iz plodonosnog tela gljiva, primenom površinske sterilizacije, uspešno izolovano 12 uzoraka, koji su kasnije podvrgnuti kvalitativnom i kvantitativnom ispitivanju aktivnosti ligninolitičkih i hidrolitičkih enzima.

#### 4.1.1. Kvalitativna analiza

Rezultati kvalitativne analize (tabela 11) su pokazali da su svi izolati bili sposobni da proizvedu celulaze, 8 izolata lignin peroksidaze (oksidacija azure B) i 10 izolata lakaze (oksidacija gvajakola i/ili  $\alpha$ -naftola).

Tabela 11: Kvalitativna analiza ligninolitičke i hidrolitičke aktivnosti izolata

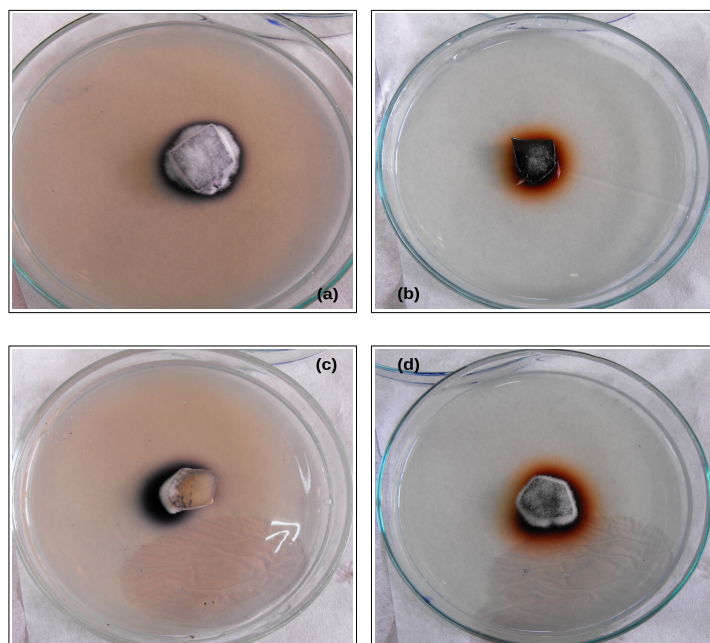
Izolat	Ligninolitička aktivnost			Hidrolitička aktivnost
	$\alpha$ -naftol	Gvajakol	Azure B	Mikrokristalna celulozy
F1	-	+	+	++
F5	-	+	+	+
F5II	-	+	+	+
F13	+++	+++	-	++
F14	-	-	+++	+++
F17	++	++	-	+
F18	-	+	+	++
F21	-	-	-	+
F23	-	+	+	+
F24	+	++	-	+
F28	+++	+++	+	++
F31	++	++	+	++

+++ : visoka aktivnost; ++ : umerena aktivnost; + : slaba aktivnost; - : nema aktivnosti

Utvrđivanje prisustva ligninolitičke i hidrolitičke aktivnosti je procenjivano 12 h, 18 h i 24h nakon inokulacija, a zatim na svaka 24 h u okviru sedam dana inkubacije. U slučaju da se neka od aktivnosti nije ispoljila u tom periodu, promene su praćene još 7

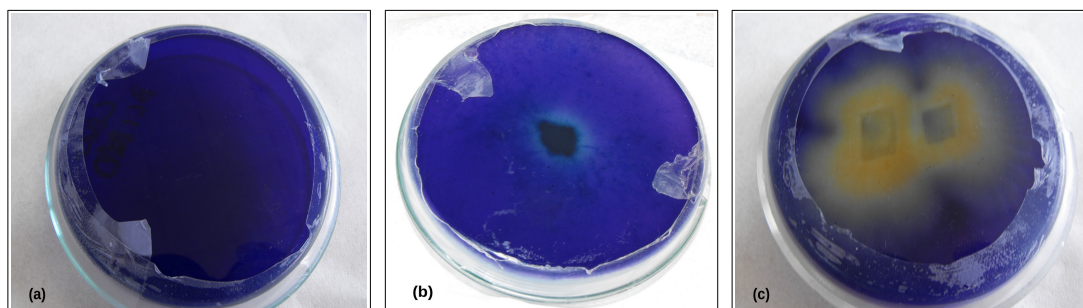
odnosno 14 dana. Ukoliko do ispoljavanja neke ili svih testiranih aktivnost nije došlo tokom 21-og dana praćenja, zaključak je bio da posmatrani izolat ne ispoljava ispitivanu enzimsku aktivnost. Vreme ispoljavanja promene kao i intenzitet promene (veličina obojane površine, veličina bistre površine ili intenzitet boje) su uzimani u obzir prilikom procene najefikasnijih izolata, tj. izolata sa najvećim potencijalom za konverziju lignoceluloznog materijala.

Kvalitativna analiza je pokazala da od svih izolata koji su oksidovali gvajakol, samo izolati F13, F17, F25, F28 i F31 su oksidovali i  $\alpha$ -naftol. Razlog bi mogla biti visoka specifičnost lakaze pojedinih izolata ka gvajakolu kao supstratu, ili je oksidacija gvajakola posledica delovanja mangan zavisnih peroksidaza ili hibridnih (verzatil) peroksidaza. Sposobnost izolata da oksiduje oba supstrata (i gvajakol i  $\alpha$ -naftol) je smatrana potvrdom da ispitivan izolat ispoljava lakaznu aktivnost, a intenzitet boje, vreme pojave boje kao i veličina obojene površine su izdvojili samo dva izolata kao jake proizvođače lakazne aktivnosti. Nakon manje od 24 h od inokulacije uočeno je formiranje tamno plave (skoro crne nijanse) poli  $\alpha$ -naftola dobijenog oksidacijom  $\alpha$ -naftola i tamno crvene (odnosno crveno-braon) boje dobijene oksidacijom gvajakola do tetragvajakola [200] u testu sa izolatima F13 i F28 (slika 16). Izolati F17, F24 i F31 su ispoljili umerenu lakaznu aktivnost nakon 5-7 dana inkubacije, dok je kod svih ostalih izolata, kod kojih je zabeležena lakazna aktivnost, reakcija bila slaba i ispoljila se tek nakon 7-14 dana. Od svih izolata koji su oksidovali gvajakol/ $\alpha$ -naftol i azure B, samo kod izolata F28 i F31 može se potvrditi sposobnost proizvodnje lakaze i lignin peroksidaze na osnovu kvalitativne analize, s obzirom na to da je oksidacija gvajakola/ $\alpha$ -naftola nastupila nekoliko dana pre oksidacije azure B.



Slika 16: Rezltati kvalitativne analize lakazne aktivnosti dobijeni izolatom F13 u testu oksidacije  $\alpha$ -naftola (a) i gvajakola (b) i izolatom F28 u testu oksidacije  $\alpha$ -naftola (c) i gvajakola (d).

Azure B je reagens koji mogu oksidovati samo lignin peroksidaza i peroksidaza iz korena rena [165], a pojava zelenih i/ili obezbojenih površina na agaru ukazuje na lignin peroksidaznu aktivnost. Istraživanja su potvrdila da se indukcija enzima lignin peroksidaze dešava kasnije tokom inkubacije i da su sinteza i aktivnost ovog enzima inhibirani višim koncentracijama  $Mn^{2+}$  jona [201, 202]. Sa smanjenjem koncentracije  $Mn^{2+}$  stvaraju se uslovi za lignin peroksidaze, a vreme ispoljavanja lignin peroksidazne aktivnosti može nam potvrditi da li je u oksidaciji gvajakola i  $\alpha$ -naftola učestvovala samo lakaza ili je to rezultat i peroksidazne aktivnosti. Od osam izolata koji su ispoljili lignin peroksidaznu aktivnost, dva izolata, F28 i F14, (slika 17) su ispoljila najbolju aktivnost ovog enzima. Zone obezbojenja su pretežno prisutne ispod micelijuma, što bi moglo da znači da je lignin peroksidaza pretežno vezana za membranu ćelije. Lignin peroksidazna aktivnost je kod svih izolata zabeležena nakon 10-18 dana, zbog čega je, na osnovu kvalitativne analize, moguće sa sigurnošću potvrditi samo za izolate F28 i F31 da ispoljavaju obe aktivnosti, i lakaznu i lignin peroksidaznu.



Slika 17: Kvalitativna analiza lignin peroksidazne aktivnosti: a) kontrola, b) izolat F28, c) izolat F14.

U kvalitativnom testu celulazne aktivnosti korišćena je mikrokristalna celuloza. Naime, kristaliničnost celuloze je jedan od glavnih razloga otpornosti lignoceluloznog supstrata prema dejstvu mikroorganizama i enzima. Tokom proizvodnje mikrokristalne celuloze stepen kristaliničnosti celuloze se uvećava [203], međutim celobiohidrolaze i endoglukanaze zajedno mogu da hidrolizuju ovaj supstrat [204]. Prisustvo bistrih zona u zamućenom agaru je potvrda simultanog delovanja hidrolitičkih enzima [205]. Rezultati su potvrdili da svi izolati proizvode hidrolitičke enzime, međutim najbolju hidrolitičku aktivnost u kvalitativnom eseju je ispoljio izolat F14. Razgradnja mikrokristalne celuloze ovim izolatom je bila uočljiva već nakon 3 dana inkubacije. Mikrokristalna celuloza se razgrađuje teže nego celuloza dobijena bubrenjem u kiselim rastvorima (eng. *acid swollen cellulose*) ili kuglično mlevena celuloza (eng. *ball-milled cellulose*) koje su u češćoj upotrebi u enzimskim testovima [153]. S tim u vezi, činjenica da se već nakon 3 dana inkubacije mogu uočiti zone razgradnje ukazuje na izolat sa jakim hidrolitičkim enzimima.

#### 4.1.2. Kvantitativna analiza

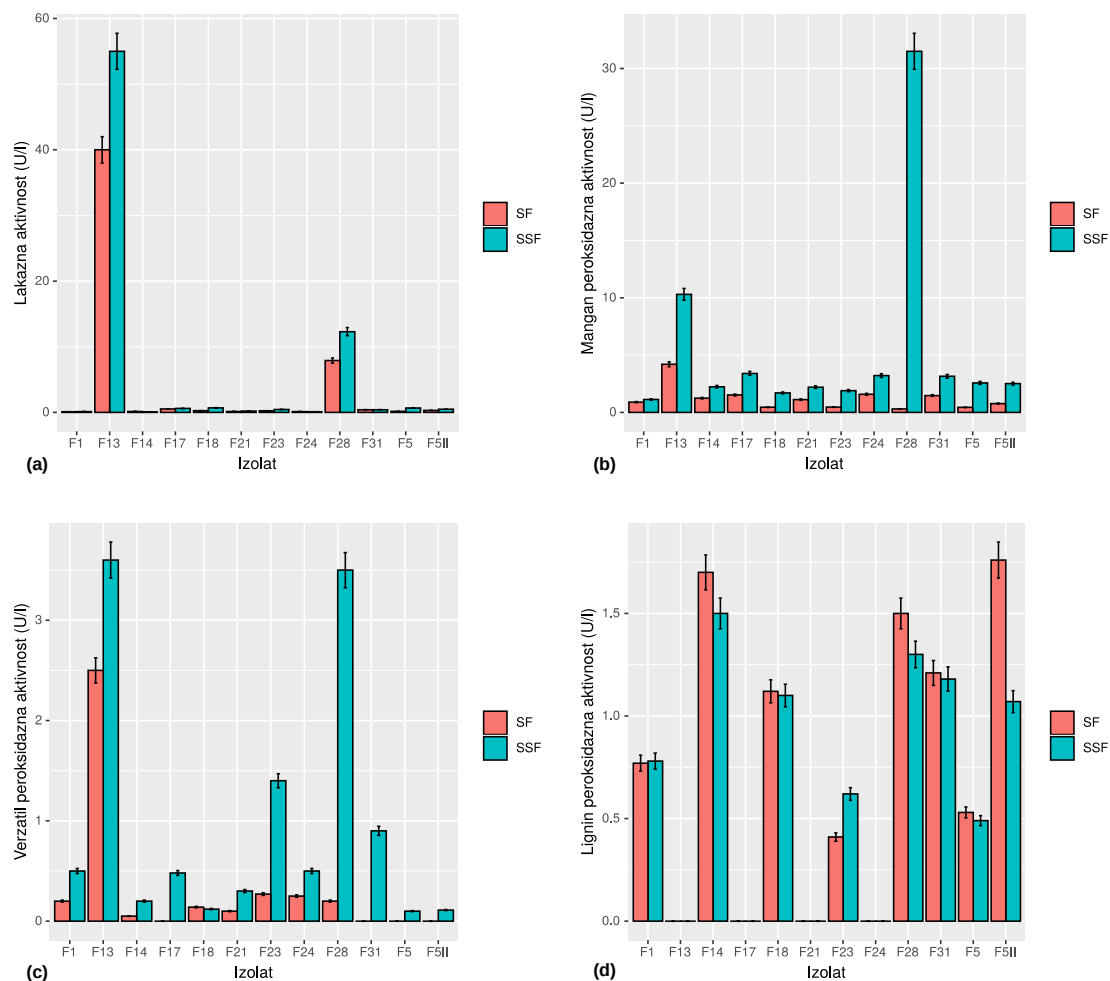
Nakon kvalitativne primenjena je kvantitativna analiza ligninolitičkih i hidrolitičkih enzima radi selekcije izolata sa najvećim potencijalom za primenu u biokonverziji lignoceluloznog supstrata. U kvantitativnoj analizi su primenjeni eseji lakazne, mangan peroksidazne, lignin peroksidazne, karboksimetil celulazne i ksilanazne aktivnosti. U testovima su korišćeni enzimi ekstrahovani sedmog dana inkubacije.

U testu lakazne aktivnosti je korišćen gvajakol kao reagens. Za razliku od drugih reagenasa koji se često koriste za određivanje lakazne aktivnosti, kao što su ABTS [2,2'-

azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)] ili siringaldazin, test koji koristi gvajakol je manje osetljiv jer brzo dolazi do inaktivacije enzima proizvodom reakcije i teže je detektovati lakazu [206]. Zbog toga su očekivane vrednosti lakazne aktivnosti niže od vrednosti koje se mogu dobiti ostalim reagensima, međutim u testu sa gvajakolom se mogu detektovati jake lakaze [207, 208]. Kao i u kvalitativnoj analizi, najbolju lakaznu aktivnost su pokazali izolati F13 i F28 (slika 18). Izmerena lakazna aktivnost izolata F13 iznosila je  $55,00 \pm 2,75$  U/l na čvrstom supstratu i  $40,00 \pm 2,00$  U/l u tečnom supstratu, dok su izmerene vrednosti dobijene na čvrstom i tečnom supstratu izolata F28 iznosile redom  $12,30 \pm 0,62$  U/l i  $7,90 \pm 0,40$  U/l.

Mangan peroksidazna aktivnost je testirana oksidacijom fenol crvenog. Najbolju aktivnost ispoljio je izolat F28 na čvrstom medijumu,  $31,50 \pm 1,58$  U/l, dok u tečnom medijumu nije zabeležena aktivnost ovim izolatom (slika 18). Kao i u slučaju lakaza, izolat F13 se takođe isticao kao proizviđač mangan peroksidaze (slika 18). Zabeleženo je  $10,30 \pm 0,51$  U/l na čvrstom supstratu, ali za razliku od izolata F28, sa izolatom F13 je detektovana slaba mangan peroksidazna aktivnost i u tečnom medijumu,  $4,20 \pm 0,21$  U/l. Aktivnost mangan nezavisnih peroksidaza (verzatil tj. hibridnih peroksidaza) je bila slaba, ni sa jednim izolatom nije zabeležena vrednost veća od 4 U/l. Kao i u slučaju lakazne i aktivnosti mangan zavisnih peroksidaza, izolati F13 i F28 su se najviše isticali kao proizvođači mangan nezavisnih peroksidaza. Najbolje vrednosti aktivnosti ovog enzima su dobijene kultivacijom na čvrstom supstratu,  $3,60 \pm 0,18$  U/l (F13) i  $3,50 \pm 0,18$  U/l (F28). Lignin peroksidazna aktivnost je ispitivana testom oksidacije boje azure B. Kao i u slučaju kvalitativne analize, osam izolata je pokazalo slabu aktivnost. Međutim vrednosti izmerenih lignin peroksidaznih aktivnosti su bile veoma niske, nisu prelazile 2 U/l i ni jedan izolat se nije isticao kao proizvođač lignin peroksidaza (slika 18).

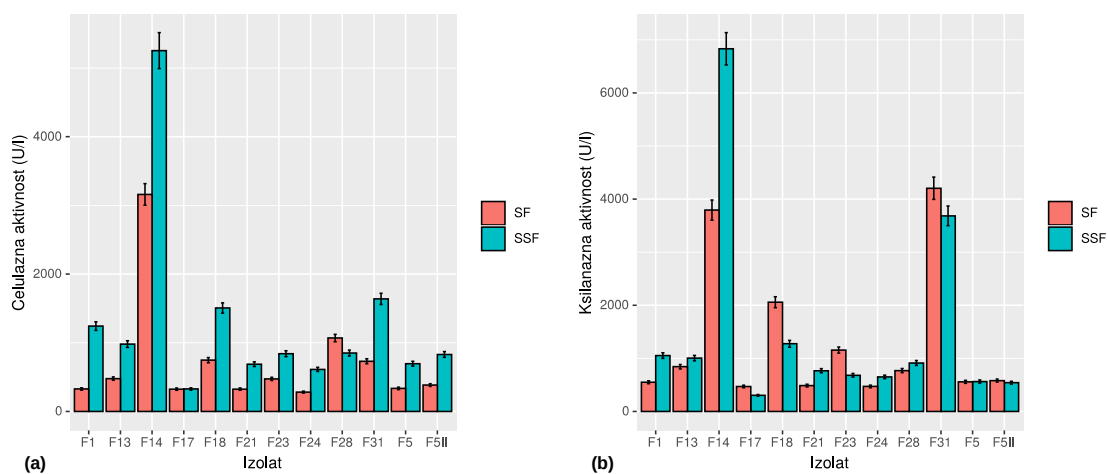




Slika 18: Ligninolitička aktivnost izolovanih gljiva dobijena na čvrstom supstratu (SSF) i tečnom supstratu (SF): a) lakazna aktivnost, b) aktivnost mangan zavisnih peroksidaza; c) aktivnost verzatil peroksidaza (mangan nezavisnih peroksidaza) i d) aktivnost lignin peroksidaza.

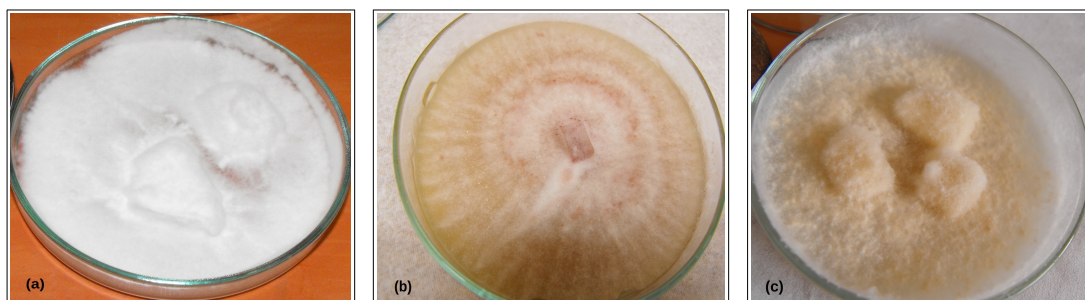
Aktivnost hidrolitičkih enzima, celulaza i ksilanaza, su ispoljili svi izolati (slika 19). U testu celulazne aktivnosti je korišćena karboksimetil celuloza. Samo jedan izolat, F14, se isticao izuzetno visokim vrednostima cellulazne aktivnosti. Zabeleženo je  $5253,42 \pm 262,67$  U/l na čvrstom supstratu i  $3159,98 \pm 158,00$  U/l u tečnom medijumu sa ovim izolatom. Izolat F14 je ispoljio i najbolju ksilanaznu aktivnost (slika 19), na čvrstom supstratu je zabeleženo  $6831,15 \pm 304,15$  U/l, u tečnom supstratu  $3792,97 \pm 189,65$  U/l. Još jedan izolat, F31, je pokazao jaku ksilanaznu aktivnost, vrednost zabeležena na čvrstom supstratu je iznosila  $3683,54 \pm 184,18$  U/l, u tečnom supstratu  $4203,31 \pm 210,17$  U/l. Svi

ostali izolati su ispoljili umerenu ili slabu hidrolitičku aktivnost. U testu ksilanazne aktivnosti je korišćen ksilan bukve.



Slika 19: Aktivnost hidrolitičkih enzima proizvedenih kultivacijom na čvrstom supstratu (SSF) ili u tečnom supstratu (SF): a) celulazna aktivnost, b) ksilanazna aktivnost.

Najbolje karakteristike ligninolitičkih i/ili hidrolitičkih aktivnosti su ispoljili izolati F13, F14 i F28 koji su dalje identifikovani molekulskim putem i/ili na osnovu morfoloških karakteristika micelijuma i plodonosnog tela. Slika 20 prikazuje izgled micelijuma ova tri izolata.

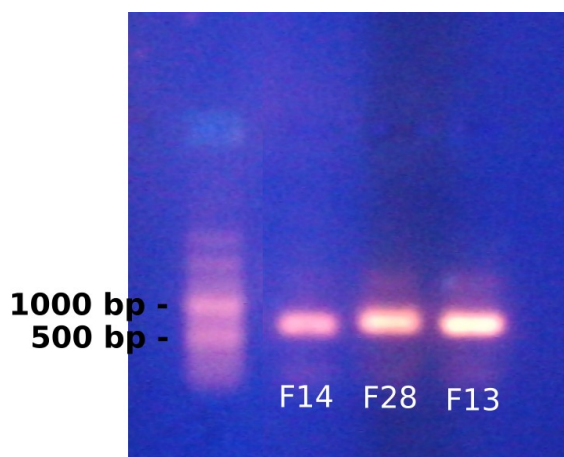


Slika 20: Izgled 7 dana starih micelijuma izolata a) *T. hirsuta* F13, b) *M. fulvopruinatum*, b) *S. gausapatum* gajenih na krompir dekstroznom agaru.

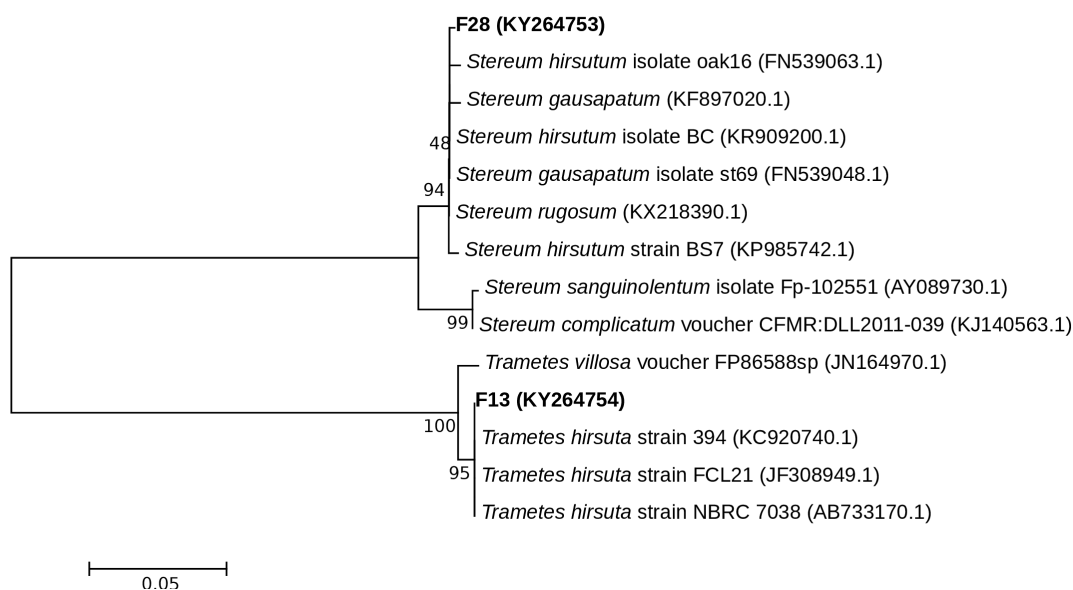
## 4.2. Identifikacija izolata sa najboljim aktivnostima ligninolitičkih i hidrolitičkih enzima

U molekularnoj identifikaciji najboljih izolata su korišćene ITS sekvence. PCR proizvodi ITS sekvenci su vizuelizovani na gel elektroforezi pomoću etidijum bromida (slika 21). Gde je bilo potrebno, u identifikaciji su bile primenjene i mikroskopske karakteristike micelijuma i morfološke karakteristike plodonosnog tela.

U identifikaciji pomoću ITS sekvenci je korišćen NCBI BLAST algoritam [209]. Identičnost veća od 98% i preklapanje upitnih sekvenci veće od 95% su smatrani identifikacijom na nivou vrste (tabela 12). Urađena je i uporedna filogenetska analiza izolata F13 i F28 sa njima srodnim vrstama/izolatima (slika 22)



*Slika 21: Gel elektroforeza sa PCR proizvodima ITS sekvenci.*



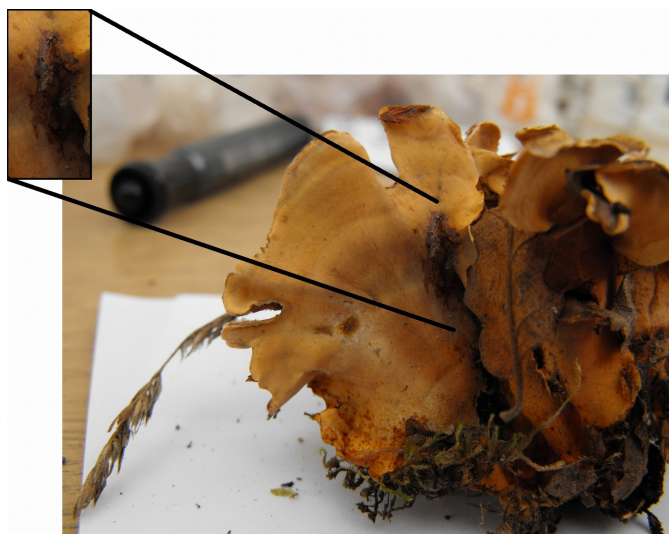
Slika 22: Komparativna filogenetska analiza izolata *T. hirsuta* F13 i *S. gausapatum* F28 i njima bliskih vrsta/izolata bazirana na ITS sekvencama. Parametri korišćeni za konstruisanje filogenetskog stabla su: Tamura-Nei model, test filogenije primenom "bootstrap" metode, broj replikacija je bio 1000. NCBI pristupni brojevi su dati u zagradi.

ITS sekvenca izolata F13 (prilog 1) je pokazala najveću sličnost sa *Trametes hirsuta* soj 394 (100% preklapanja i 100% sličnosti) i minimum 99% sličnosti sa drugim sojevima vrste *T. hirsuta* (tabela 12). ITS sekvenca izolata F14 (prilog 3) je pokazala najveću sličnost sa *Myrmaecium fulvopruinatum* soj VF1 (100% preklapanja i 100% sličnosti) i minimum 99,49% sa drugim sojevima vrste *M. fulvopruinatum* (tabela 12). ITS sekvenca izolata F28 (prilog 2) je pokazala visoki stepen sličnosti sa dvema vrstama kompleksa *Stereum hirsutum*: *S. hirsutum* i *S. gausapatum* (tabela 12). Pokrivenost upitnih sekvenci sa *S. hirsutum* je bila 100%, a sličnost 99%. Pokrivenost upitnih sekvenci sa *S. gausapatum* je bila 99%, a sličnost 99%.

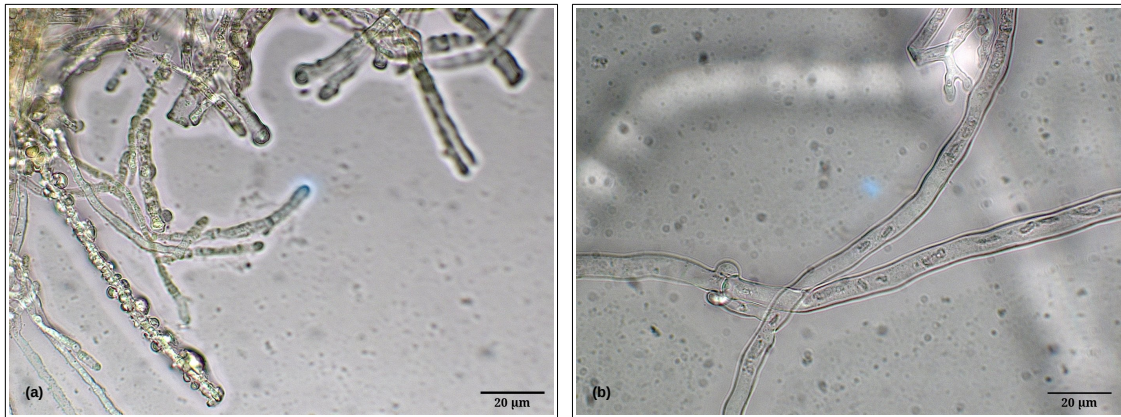
Tabela 12: Sojevi/izolati koji su pokazali najveću sličnost sa izolatima F13, F14 i F28

Identifikovani izolati	GenBank pristupni broj	Molekularna identifikacija pomoću BLAST algoritma		
		Soj/izolat gljive (pristupni broj)	Pokrivenost /%	Sličnos t/%
<i>Trametes hirsuta</i> isolate F13	KY264754	<i>T. hirsuta</i> strain 394 (KC920740)	100	100
		<i>T. hirsuta</i> strain FCL21 (JF308949)	100	99
		<i>T. hirsuta</i> strain NBRC 7038 (AB733170)	100	99
		<i>T. villosa</i> voucher FP86588sp (JN164970)	97	99
<i>Stereum gausapatum</i> isolate F28	KY264753	<i>S. hirsutum</i> isolate BC (KR909200)	100	99
		<i>S. hirsutum</i> isolate oak16 (FN539063)	100	99
		<i>S. hirsutum</i> strain BS7 (KP985742)	100	99
		<i>S. gausapatum</i> (KF897020)	99	99
		<i>S. gausapatum</i> isolate st69 (FN539048)	96	99
		<i>S. rugosum</i> (KX218390)	90	99
		<i>S. sanguinolentum</i> isolate Fp-102551 (AY089730)	97	96
		<i>S. complicatum</i> voucher CFMR:DLL2011-039 (KJ140563)	94	96
<i>Myrmaecium fulvopruinatum</i> isolate F14	MF521930	<i>Myrmaecium fulvopruinatum</i> strain VF1 (KP687859)	100	100
		<i>Myrmaecium fulvopruinatum</i> CBS 139058 ( NR_145390)	100	99,66
		<i>Myrmaecium fulvopruinatum</i> strain VFQ (KP687863)	100	99,66
		<i>Myrmaecium fulvopruinatum</i> strain VFJ (KP687861)	100	99,66
		<i>Myrmaecium fulvopruinatum</i> strain VFB (KP687860)	100	99,49

Vrste *S. hirsutum* kompleksa je teško razlikovati samo na osnovu morfoloških karakteristika. Ovom kompleksu pripadaju vrste *S. hirsutum*, *S. complicatum*, *S. styracifluum*, *S. subtomentosum*, *S. versicolor* i *S. gausapatum*. Neki mikolozi ih čak posmatraju kao različite varijetete vrste *S. hirsutum* [210], a nekoliko istraživanja je publikovano kao pomoć u razlikovanju *S. gausapatum* od *S. hirsutum* [211, 212]. *S. gausapatum* pripada grupi takozvanih "krvavih gljiva", kojoj pripadaju još i *S. sanguinolentum*, vrsta koja raste gotovo isključivo na četinarima, i *S. rugosum*, vrsta koja raste i na četinarima i na listopadnom drveću [213]. Na mestima fizičkih oštećenja iz ovih gljiva curi crvena tečnost nalik krvi [213] po čemu je i cela grupa dobila naziv. Ovo nije karakteristika *S. hirsutum* vrste. Na plodonosnom telu izolata F28 na mestu oštećenja je bila primetna tamno crvena zona nastala od sasušene tečnosti (slika 23). Hife gljive *S. gausapatum* se karakterišu kukičastim konekcijama koje mogu biti proksimalne (slika 24) i distalne [211]. Još jedna karakteristika ove vrste su pigmentne kapi (slika 24) kojih može biti unutar hifa ili na površini [211]. Na osnovu svih dobijenih i analiziranih parametara, od molekulskih do mikroskopskih, potvrđeno je da se radi o vrsti *S. gausapatum*.

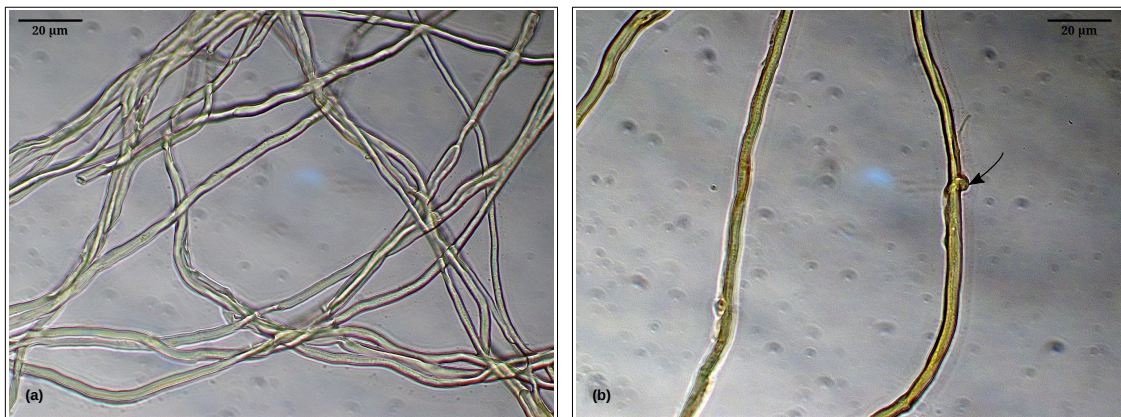


Slika 23: Izgled plodonosnog tela i oštećenja na plodonosnom telu izolata F28 (*S. gausapatum*).



Slika 24: Mikroskopske karakteristike micelijuma *S. gausapatum* F28 izolata: a) pigmentne kapi na površini i unutar hifa, b) generativne hife sa dvostrukim kukičastim konekcijama. (Uvećanje 100x)

Analiza ITS sekvenci je jednoznačno potvrdila da je izolat F13 vrsta *T. hirsuta* (tabela 12). Međutim urađena je i mikroskopska analiza micelijuma gljive. Hife vrste *T. hirsuta* su staklaste i mogu biti generativne, skeletne ili vezivne [214, 215]. Staklaste generativne hife su uočene kod izolata F13 (slika 25). *T. hirsuta* se takođe odlikuje jednostrukim kukičastim nastavcima [215], što je takođe uočeno i kod izolata F13 (slika 25).



Slika 25: Mikroskopske karakteristike micelijuma izolata *T. hirsuta* F13 (a) generativne hife i (b) jednostruka kukičasta konekcija (obeležena strelicom). (Uvećanje 100x)

I u slučaju izolata F14 analiza ITS sekvenci je jednoznačno potvrdila da se radi o gljivi *M. fulvopruinatum* (tabela 12). Ova vrsta je do sada slabo izučavana, a najveći broj istraživanja je obuhvatao filogenetska i taksonomska istraživanja [216–218]. Međutim

dosadašnja istraživanja nisu pažnju poklanjala mikroskopskim analizama micelijuma, uglavnom je analizirano plodonosno telo vrste. Mikroskopskom analizom izolata F14 uočeno je prisustvo skeletnih i generativnih hifa (slika 26).



Slika 26: Skeletne (a) i generativne (b) hife izolata *M. fulvopruinatum* F14. (Uvećanje 40x)

*T. hirsuta* i *S. gausapatum* pripadaju razdelu Basidiomycota (prilog 4 i prilog 5) kom pripadaju gljive sa najboljim ligninolitičkim aktivnostima [219, 220]. I *T. hirsuta* i *S. gausapatum* pretežno rastu na mrtvom drvetu i uzrok su takozvanog belog truljenja. Iako pripadaju saprofitima, neki istraživači ih smatraju fakultativnim parazitima [221, 222]. *S. gausapatum* prati distribuciju *Quercus spp.* u severnoj Evropi [212, 223] i na Balkanskom poluostrvu [224]. *T. hirsuta* je široko rasprostranjena i česta je u Srbiji. Raste na različitim supstratima lignoceluloznog porekla, pretežno na drvetu *Quercus spp.*, *Salix spp.*, *Alnus glutinosa*, *Prunus spp.*, *Populus spp.* i druga [225]. Ranija istraživanja su prijavila prisustvo ove vrste u Srbiji samo na teritoriji Beograda. Istraživanje distribucije vrste *S. gausapatum* u Srbiji je pokazalo prisustvo ove vrste na lokaciji Topčider u Beogradu [224]. Nedavno je *S. gausapatum* pronađen i u Botaničkoj bašti Jevremovac [226]. Istraživanje sprovedeno tokom izrade ove disertacije je prvi put zabeležilo prisustvo vrste *S. gausapatum* na jugu Srbije, na teritoriji grada Leskovca. *T. hirsuta* F13 je izolovana sa grane višnje (*Prunus cerasus*), a *S. gausapatum* F28 sa grane hrasta (*Quercus sp.*).

*M. fulvopruinatum* pripada razdelu Ascomycota (prilog 6). Ova vrsta se može naći na osunčanoj strani panjeva i grana različitog četinarskog ali i širokolisnog drveća [218, 227]. Rasprostranjena je u Sjedinjenim Američkim Državama, ali i u Evropi. Kao i ostali predstavnici reda Valsariales i *M. fulvopruinatum* se nalazi na prostorima sa toplom klimom i dužim sušnim periodima, a u vreme globalnog zagrevanja očekuje se veće



rasprostranjenje ovih gljiva [218]. Izolat *M. fulvopruinatum* F14 je izolovan sa grane hrasta (*Quercus sp.*). Dosadašnja istraživanja su se bavila gotovo isključivo taksonomskim i filogenetskim analizama ove vrste kao i čitavog reda Valsariales [216–218, 227]. Ispitivanje njegove ligninolitičke i hidrolitičke aktivnosti nisu sprovedena.

### **4.3. Hidrolitički i ligninolitički potencijal odabranih izolata**

Početno istraživanje je pokazalo da su *T. hirsuta* F13 i *S. gausapatum* F28 sa velikim potencijalom za primenu u tretmanu lignoceluloznog supstrata zbog svoje izrazite lakazne i mangan peroksidazne aktivnosti, ali i umereno jake hidrolitičke aktivnosti. *M. fulvopruinatum* F14 je pokazao izuzetno jaku celulaznu i ksilanaznu aktivnost i zanemarljivu lignin peroksidaznu aktivnost, dok se lakazna i mangan peroksidazna aktivnost nisu ispoljile kod ovog izolata.

U narednom segmentu istraživanja je ispitan hidrolitički i ligninolitički potencijal identifikovanih izolata.

#### **4.3.1. Potencijal izolata *M. fulvopruinatum* F14**

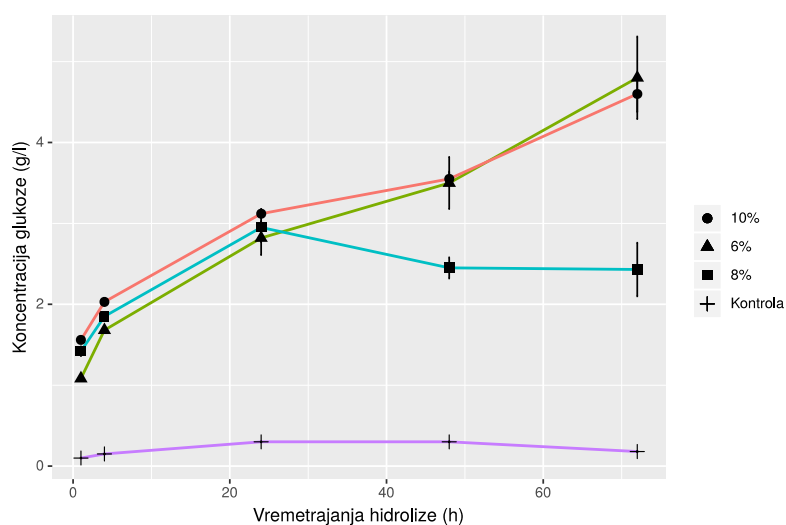
Još jednom je testirana ligninolitička i hidrolitička aktivnost izolata *M. fulvopruinatum* F14. Ni ovoga puta nisu zabeležene lakazna i verzatil peroksidazna aktivnost (tabela 13). Slaba aktivnost mangan zavisnih peroksidaza od  $2,7 \pm 0,5$  U/l, kao i slaba lignin peroksidazna aktivnost od  $1,80 \pm 0,06$  U/l su dobijene SSF kultivacijom, dok SF kultivacija nije dala mangan peroksidaznu aktivnost, a aktivnost lignin peroksidaza je bila približna zabeleženoj u SSF-u ( $1,76 \pm 0,08$  U/l). Kao i tokom selekcije, najbolje aktivnosti su bile CMCazna ( $5682 \pm 327$  U/l) i ksilanazna ( $7721 \pm 293$  U/l) proizvedene SSF kultivacijom (tabela 13). Sve ovo je potvrdilo da bi se ova gljiva mogla primenjivati u proizvodnji industrijski važnih hidrolitičkih enzima. S tim u vezi je ispitan hidrolitički potencijal ove gljive primenom enzimskih ekstrakata u hidrolizi celuloznog otpada.

Enzimski ekstrakti korišćeni u hidrolizi celuloznog supstrata su proizvedeni SSF kultivacijom na piljevini bukve kojoj je dodat Mandals medijum (kultivacioni usovi za proizvodnju hidrolitičkih enzima su dati u poglavlju 3.3.3). Vlažnost supstrata je bila 70%. Hidrolitički potencijal je proveravan hidrolizom starih novina enzimskim ekstraktima. Količina enzima korišćenog u hidrolizi bila je ekvivalentna 3 FPU, odnosno

18 CMCU. Količina enzima korišćena u hidrolizi je određena metodom koju je predložio Ghose [168]. Nakon 72 h hidrolize (slika 27) najbolje rezultate su pokazali uzorci sa početnim udelom supstrata od 6% w/v (4,8 g/l) i 10% w/v (4,6 g/l), dok je sa početnim udelom supstrata od 8% dobijeno najmanje šećera (2.48 g/l), što je verovatno posledica inaktivacije dela enzima uzrokovana nekim spoljnim faktorom.

Tabela 13: Aktivnost ligninolitičkih i hidrolitičkih enzima izolata *M. fulvopruinatum* F14 dobijena SSF i SF kultivacijom (LiP – lignin peroksidaze; MnP – mangan peroksidaze; VP – verzatil peroksidaze).

Tip kultivacije	Enzimska aktivnost (U/l)					
	Lakaza	MnP	VP	LiP	CMCaza	Ksilanaza
SSF	–	2,70±0,50	–	1,80±0,06	5682±327	7721±293
SF	–	–	–	1,76±0,08	3715±699	4519±121



Slika 27: Koncentracija oslobođenih šećera tokom hidrolize enzimskim ekstraktima.

Rezultati hidrolize enzimskim ekstraktima izolata *M. fulvopruinatum* F14 se mogu uporediti sa, recimo, rezultatima hidrolize postignutim komercijalnim enzimom tretiranog i netretiranog celuloznog materijala tekstilnog porekla (doza enzima 700 EGU/g supstrata) [228]. Naime, u zavisnosti od toga da li je tekstil prethodno prošao kroz proces predtretmana ili ne, koncentracija oslobođenog šećera je bila u opsegu 4,5-8,2 g/l nakon 72 h hidrolize komercijalnim enzimom [228]. Proces proizvodnje celulaza izolatom

*M. fulvopruinatum* F14 kao i proces hidrolize bi trebalo optimizovati kako bi se povećala efikasnost hidrolize, ali rezultati hidrolize celuloznog otpada potvrđuju da ova gljiva ima visok potencijal za primenu u proizvodnji hidrolitičkih enzima.

#### 4.3.2. Potencijal izolata *T. hirsuta* F13 i *S. gausapatum* F28

Izolati *T. hirsuta* F13 i *S. gausapatum* F28 su ispoljili jaku ligninolitičku aktivnost i umerenu hidrolitičku aktivnost. Kako je vrednost hidrolitičke aktivnosti ovih izolata bila značajno niža nego aktivnost koju je ispoljio izolat *M. fulvopruinatum* F14 ( $p < 0,05$ ), u daljem radu je ispitan ligninolitički potencijala *T. hirsuta* F13 i *S. gausapatum* F28. Ispitan je uticaj kultivacionih uslova (SF ili SSF), vlažnost supstrata i dodatak minerala na ligninolitičku aktivnost, kao i stepen selektivnosti razgradnje lignoceluloznog supstrata. U istraživanju je korišćena piljevina bukve – supstrat koji se odlikuje visokim udelom lignina. Tabela 14 prikazuje karakteristike korišćene lignocelulozne biomase.

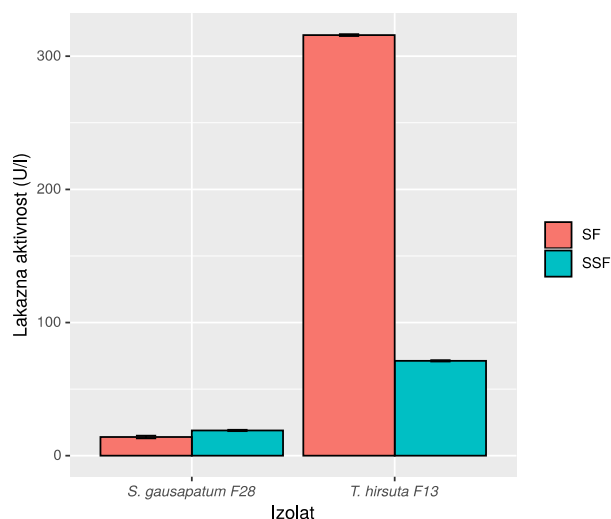
Tabela 14: Struktura korišćene lignocelulozne biomase

<b>Struktura suve mase bukve</b>	
<b>Komponenta</b>	<b>Udeo u biomasi (%)</b>
Lignin	28,01
• Klasonov lignin	25
• Lignin rastvoran u kiselinama	3,01
Holoceluloza	76
Pepeo	<0,4
Ukupni ekstrakti	3,23
• Ekstrakti rastvorni u vodi	2,34
• Ekstrakti rastvorni u etanol-acetonu	0,89
<b>Struktura ukupne mase supstrata bukve</b>	
Suva masa	93
Lignin	26,05
• Klasonov lignin	23,25
• Lignin rastvoran u kiselinama	2,80
Holoceluloza	70,68
Pepeo	<0,37
Ukupni ekstrakti	3
• Ekstrakti rastvorni u vodi	2,18
• Ekstrakti rastvorni u etanol-acetonu	0,83

### Uticaj kultivacionih uslova

Kultivacioni uslovi su imali značajan uticaj na ligninolitičku aktivnost izolata *T. hirsuta* F13 i *S. gausapatum* F28. Slika 28 pokazuje da su kultivacioni uslovi imali značajan uticaj na lakaznu aktivnost ovih izolata ( $p < 0,001$ ). Razlika u lakaznoj aktivnosti između izolata se takođe značajno razlikovala i u SF ( $F_{1;3,1}=3459,5$ ,  $p < 0,05$ ) i u SSF ( $F_{1;4}=1612,9$ ,  $p < 0,05$ ) kultivacionim uslovima.

Najbolja aktivnost, vrednost od  $315,9 \pm 0,7$  U/l, je zabeležena pod SF kultivacionim uslovima izolatom *T. hirsuta* F13, značajno viša nego aktivnost zabeležena pod SSF kultivacionim uslovima istom gljivom ( $p < 0,05$ ), mada je i aktivnost postignuta SSF kultivacijom bila visoka ( $71,2 \pm 0,5$  U/l). Razlika u lakaznoj aktivnosti dobijena gljivom *S. gausapatum* F28 tokom SSF and SF kultivacije je takođe bila statistički značajna ( $p < 0,05$ ), ali je, za razliku od izolata F13, aktivnost zabeležena pod SSF uslovima ( $18,9 \pm 0,5$  U/l) bila viša nego pod SF uslovima ( $14,0 \pm 1,0$  U/l).



Slika 28: Uticaj kultivacionih uslova na lakaznu aktivnost izolata *T. hirsuta* F13 i *S. gausapatum* F28.

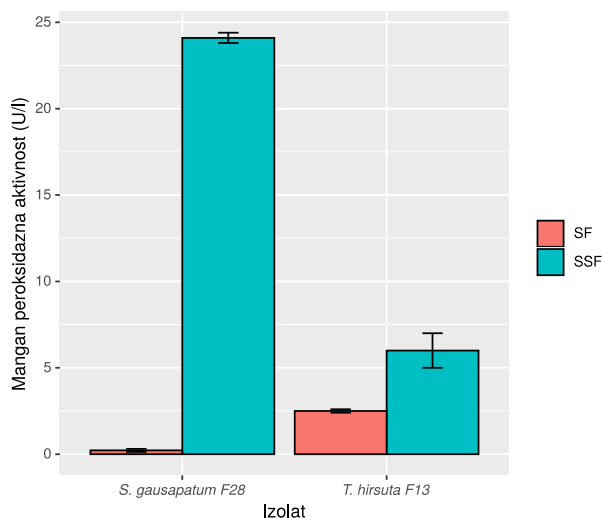
Za bolje razumevanje značaja postignutih vrednosti, lakazna aktivnost dobijena izolatima F13 i F28 je upoređena sa lakaznom aktivnošću gljive *T. versicolor* testiranom različitim reagensima (ABTS, 2,6-dimetoksifenol, siringaldazin i gvajakol) [207]. Iako su svi pomenuti reagensi, ABTS, 2,6-dimetoksifenol, siringaldazin i gvajakol, pogodni za testiranje lakazne aktivnosti, u zavisnosti od korišćenog reagensa se razlikuje osetljivost

testa zbog čega postoje razlike u dobijenim vrednostima lakazne aktivnosti [207]. S obzirom na to da različita istraživanja koriste po jedan, eventualno dva reagensa iz ove grupe, nije uvek moguće uporediti sposobnost različitih organizama da proizvode lakazu. Istraživanje koje su sproveli Margot i sar, [207] jedno od retkih istraživanja koje koristi sva četiri reagensa, a kako *T. versicolor* pripada gljivama sposobnim da proizvedu jake lakaze, bilo je pogodno za primenu za utvrđivanje potencijala izolata *T. hirsuta* F13 i *S. gausapatum* F28. To je posebno značajno kada se uzme u obzir činjenica da su u dosadašnjim istraživanjima gljive *T. hirsuta* korišćeni ABTS i siringaldazin [229, 230], a da lakzna ili bilo koja druga ligninolitička aktivnost vrste *S. gausapatum* ranije nije ispitivana. U istraživanju sprovedenom tokom rada na ovoj disertaciji korišćen je gvajakol test, koji je najmanje osetljiv i sa kojim se dobijaju najniže vrednosti; međutim poređenje sa istraživanjem koje su sproveli Margot i sar. [207] je pokazalo da oba izolata, i *T. hirsuta* F13 i *S. gausapatum* F28, karakteriše jaka lakazna aktivnost i da se mogu kategorisati kao proizvođači lakaze sa potencijalom za industrijsku upotrebu.

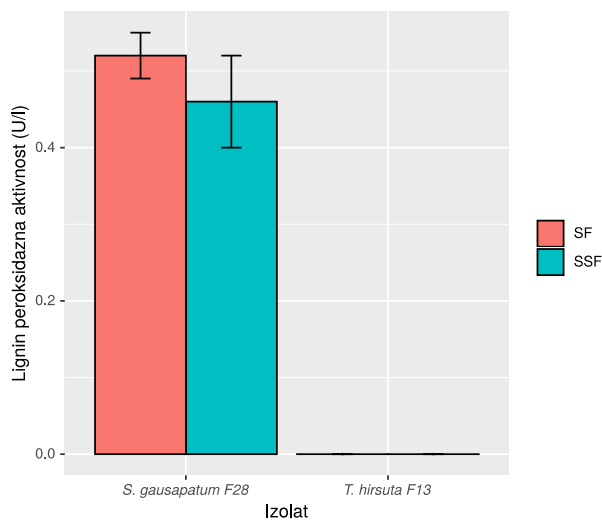
Kultivacioni uslovi su imali značajan uticaj i na mangan peroksidaznu aktivnost izolata F13 i F28 ( $p < 0,05$ ). Slika 29 pokazuje ukupnu mangan peroksidaznu aktivnost koju su dala ova dva izolata. SSF kultivacija je značajno više pogodovala proizvodnji mangan peroksidaza nego SF kultivacija. Statistički značajna razlika u ispoljenim aktivnostima je uočena i među izolatima i u slučaju SSF ( $F_{1,5,6}=1548,2$ ,  $p < 0,05$ ) i SF ( $F_{1,10}=1753,9$ ,  $p < 0,05$ ) kultivacije. Najveću aktivnost od  $24,1 \pm 0,3$  U/l je pokazao izolat F28. Ova aktivnost je zabeležena za SSF kultivaciju. U istim uslovima izolat F13 je ispoljio aktivnost od  $6 \pm 1$  U/l. Proizvodnja mangan peroksidaza u SF uslovima je bila slaba, izmerene aktivnosti su bile niže od 3 U/l. Na osnovu dobijenih rezultata se može zaključiti da se ovi izolati ne bi mogli koristiti u submerznoj kultivaciji u tehnološkim procesima koji zahtevaju mangan peroksidaznu aktivnost. Takođe, može se zaključiti na osnovu rezultata postignutih SSF kultivacijom da *S. gausapatum* F28 pripada proizvođačima mangan peroksidaza sa potencijalom za industrijsku upotrebu.

Lignin peroksidaznu aktivnost je teško detektovati pomoću ekstrakata dobijenih iz prirodnog supstrata korišćenog u proizvodnji ligninaza gljiva [231]. Lignin peroksidazna aktivnost zabeležena izolatom *S. gausapatum* F28 je bila na nivou statističke greške (slika 30), vrednosti su bile niže od 1 U/l. Razlika u vrednostima dobijenim SF i SSF kultivacijom nije bila statistički značajna ( $F_{1,3,07}=2,22$ ,  $p > 0,05$ ). Zbog male aktivnosti

ispoljene u ovim testovima, kao i tokom skrininga, lignin peroksidazna aktivnost nije ispitivana u daljem istraživanju.



Slika 29: Uticaj kultivacionih uslova na mangan peroksidaznu aktivnost izolata *T. hirsuta* F13 i *S. gausapatum* F28.



Slika 30: Uticaj kultivacionih uslova na lignin peroksidaznu aktivnost izolata *T. hirsuta* F13 i *S. gausapatum* F28.

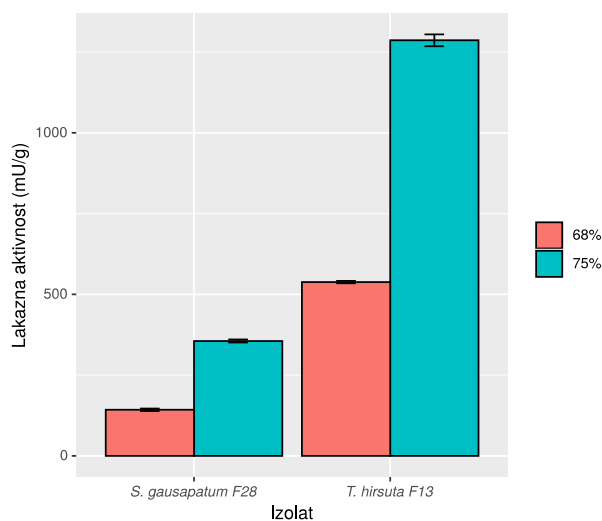
Prethodne studije su pokazale da *T. hirsuta* proizvodi veoma aktivne lakaze [232, 233], što je primećeno i kod izolata *T. hirsuta* F13. Međutim, F13 nije ispoljio lignin peroksidaznu aktivnost. Analiza ekstracelularnih proteina koju su sproveli Vasina i sar. [229] je pokazala da ova vrsta ne proizvodi lignin peroksidaze, ali da proizvodi lakaze i

mangan peroksidaze. Oni su takođe zabeležili da je pretežno zastupljen karakteristični protein lakaza u ligninolitičkom sistemu vrste *T. hirsuta* lakaza, što se može potvrditi i za izolat F13. U ovom istraživanju je prvi put detektovana lignin peroksidazna aktivnost vrste *S. gausapatum*, dok su lakaznu i mangan peroksidaznu aktivnost prijavile i prethodne studije [234].

### ***Uticaj vlažnosti supstrata***

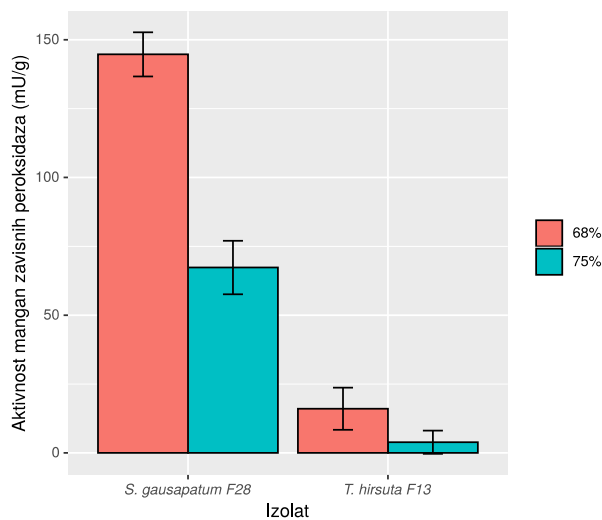
U nastavku istraživanja je ispitan uticaj vlažnosti na lakaznu i mangan peroksidaznu aktivnost (aktivnost mangan zavisnih i mangan nezavisnih peroksidaza), dok lignin peroksidazna aktivnost više nije razmatrana.

U SSF kultivaciji vlažnost supstrata može varirati od 20-85% [235, 236], mada je visoka lakazna aktivnost uglavnom zabeležena na supstratu sa 60% do 80% vlažnosti [237–239]. U ovom istraživanju uticaj vlažnosti je ispitan supstratima čija je inicijalna vlažnost bila 68% i 75%. Kao što se vidi na slici 31, više vrednosti lakazne aktivnosti su dobijene na supstratu čija je inicijalna vlažnost bila 75%. Razlika je bila statistički značajna ( $p < 0,05$ ). Zabeležene su aktivnosti od  $1290 \pm 20$  mU/g suvog supstrata za izolat *T. hirsuta* F13 i  $350 \pm 5$  mU/g suvog supstrata za izolat *S. gausapatum* F28. U istraživanju uticaja vlažnosti supstrata i veličine čestica na proizvodnju lakaze gljivom *Daedalea flavida*, Meehnian i sar [239] su zabeležili  $4.26 \pm 0.38$  U/g pomoću ABTS testa za uslove vlažnosti supstrata od 75%. Poređenjem ove vrednosti sa vrednostima zabeleženim u gvajakol testu može se zaključiti da su oba izolata i F13 i F28 ispoljila jaku lakaznu aktivnost uslovima vlažnosti supstrata od 75%.



Slika 31: Uticaj vlažnosti na lakaznu aktivnost izolata *T. hirsuta* F13 i *S. gausapatum* F28.

Visoka vlažnost supstrata je imala suprotan ili zanemarljiv efekat na mangan peroksidaznu aktivnost (slika 32). Oba izolata su pokazala bolju aktivnost mangan zavisnih peroksidaza na supstratu sa nižim sadržajem vlage, međutim razlika u vrednostima je bila statistički značaja samo u slučaju izolata *S. gausapatum* F28 ( $p < 0,05$ ), dok u slučaju *T. hirsuta* F13 razlika nije bila statistički značajna ( $p > 0,05$ ).

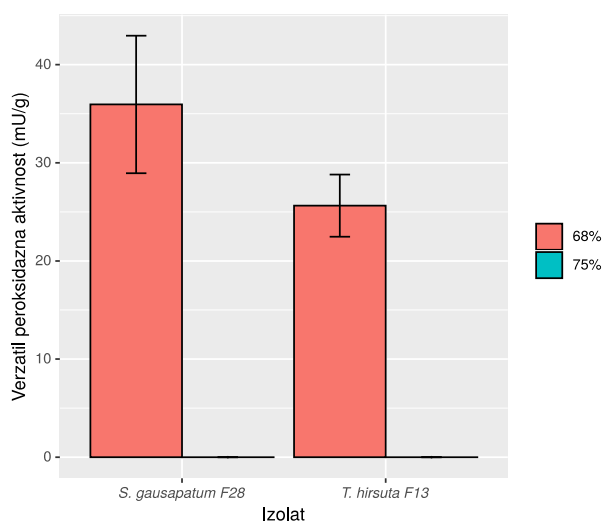


Slika 32: Uticaj vlažnosti na aktivnost mangan zavisnih peroksidaza izolata *T. hirsuta* F13 i *S. gausapatum* F28

Vlažnost je uticala i na aktivnost verzatil peroksidaza. Dok je na supstratu sa inicijalnom vlažnošću od 68% zabeležena aktivnost od  $35 \pm 7$  mU/g suvog supstrata



izolatom F28, a  $26 \pm 3$  mU/g suvog supstrata izolatom F13, na supstratu čiji sadržaj vlage je bio 75% nije zabeležena ova aktivnost ni sa jednim izolatom (slika 33).



Slika 33: Uticaj vlažnosti na aktivnost mangana nezavisnih (vertatil) peroksidaza izolata *T. hirsuta* F13 i *S. gausapatum* F28

### **Uticaj dodatka mineralnog medijuma i vremena inkubacije na ligninolitičku aktivnost**

Aktivnosti enzima proizvedenih na supstratu kome je dodat mineralni medijum (LMS) su upoređene sa aktivnostima enzima proizvedenih na supstratu bez dodatka minerala (SSdS). Vlažnost supstrata je bila 75%, vlažnost na kojoj su oba izolata i F13 i F28 pokazala izuzetno jaku lakaznu aktivnost. Ovaj deo istraživanja je sproveden sa ciljem da se ispita da li odabrani izolati mogu da rastu na jednostavnom supstratu, tj. supstratu kome nisu dodati minerali, kako bi kasnije mogli da se primene u delignifikaciji lignoceluloznog otpada. U zavisnosti od vrste gljive, kultivacionih uslova i vremena inkubacije ligninolitička aktivnost može značajno oscilovati [163]. Tabela 15 pokazuje da su varijacije aktivnosti ligninolitičkih enzima zavisile od vremena inkubacije, kao i to da je dodatak minerala imao značajan uticaj na tu zavisnost ( $p < 0,05$ ).

Tabela 15: Enzimaska aktivnost i proizvodnja proteina po jedinici mase supstrata i specifična aktivnost dobijena na lignoceluloznom supstratu sa dodatim mineralnim medijumom (LMS) i supstratu bez mineralnog medijum (SSdS) izolatima *T. hirsuta* F13 i *S. gausapatum* F28.

Enzim	Izolat	Supstrat	Vreme inkubacije (dani)			
			3	5	7	10
<b>Aktivnost (mU/g suve mase supstrata)</b>						
Lakaza	<i>T. hirsuta</i>	LMS	481±1	1120±50	(1290±20) <sup>e</sup>	(1324±7) <sup>e</sup>
	izolat F13	SSdS	(389,2±0,8) <sup>a</sup>	621±1	(815±5) <sup>d</sup>	(830±5) <sup>d</sup>
	<i>S. gausapatum</i>	LMS	(137±3) <sup>b</sup>	252±5	(356±7) <sup>a</sup>	(355±5) <sup>a</sup>
	izolat F28	SSdS	(104,4±0,8) <sup>bc</sup>	(144,4±0,8) <sup>b</sup>	(74±1) <sup>c</sup>	(63±1) <sup>c</sup>
MnP	<i>T. hirsuta</i>	LMS	-	(6±1) <sup>a</sup>	-	(1,37±0,01) <sup>a</sup>
	izolat F13	SSdS	(12±1) <sup>a</sup>	(8±2) <sup>a</sup>	(8,7±0,2) <sup>a</sup>	(12±1) <sup>a</sup>
	<i>S. gausapatum</i>	LMS	(6,18±0,01) <sup>a</sup>	(27,8±0,5) <sup>b</sup>	67±9	(3,4±0,1) <sup>a</sup>
	izolat F28	SSdS	(5,8±0,5) <sup>a</sup>	(25±1) <sup>bc</sup>	39±1	(20,3±0,5) <sup>c</sup>
VP	<i>T. hirsuta</i>	LMS	6±1	-	-	-
	izolat F13	SSdS	-	8±2	-	-
	<i>S. gausapatum</i>	LMS	-	-	-	-
	izolat F28	SSdS	-	-	-	-
<b>γ<sub>m</sub>(mg proteina/g suve mase supstrata)</b>						
	<i>T. hirsuta</i>	LMS	2,0±0,2	2,2±0,2	2,6±0,4	2,8±0,6
	izolat F13	SSdS	2,4±0,2	2,4±0,7	(4,2±0,4) <sup>*</sup>	2,7±0,3
	<i>S. gausapatum</i>	LMS	3,3±0,4	2,8±0,1	2,5±0,2	3,5±0,1
	izolat F28	SSdS	(3,9±0,2) <sup>*</sup>	3,2±0,2	(5,9±0,4) <sup>*</sup>	(4,2±0,2) <sup>*</sup>
<b>Aktivnost(mU/mg proteina)</b>						
Lakaza	<i>T. hirsuta</i>	LMS	(150±20) <sup>a</sup>	(410±20) <sup>d</sup>	510±30	(380±10) <sup>d</sup>
	izolat F13	SSdS	(99±5) <sup>e</sup>	190±10	(140±10) <sup>a</sup>	197±9
	<i>S. gausapatum</i>	LMS	(41±5) <sup>b</sup>	(91±4) <sup>e</sup>	(141±9) <sup>a</sup>	(101±4) <sup>e</sup>
	izolat F28	SSdS	(27±1) <sup>c</sup>	(45±2) <sup>b</sup>	(12,4±0,8) <sup>c</sup>	(15,0±0,7) <sup>c</sup>
MnP	<i>T. hirsuta</i>	LMS	-	(2,11±0,09) <sup>a</sup>	-	(0,39±0,01) <sup>a</sup>
	izolat F13	SSdS	(3,0±0,1) <sup>a</sup>	(2,6±0,1) <sup>a</sup>	(1,46±0,09) <sup>a</sup>	(2,9±0,1) <sup>a</sup>
	<i>S. gausapatum</i>	LMS	(1,9±0,2) <sup>a</sup>	(10,0±0,4) <sup>b</sup>	27±2	(0,97±0,03) <sup>a</sup>
	izolat F28	SSdS	(1,48±0,07) <sup>a</sup>	(7,8±0,4) <sup>cb</sup>	(6,5±0,4) <sup>c</sup>	(4,8±0,2) <sup>ac</sup>
VP	<i>T. hirsuta</i>	LMS	1,8±0,2	-	-	-
	izolat F13	SSdS	-	2,3±0,1	-	-
	<i>S. gausapatum</i>	LMS	-	-	-	-
	izolat F28	SSdS	-	-	-	-

\*Izmerene vrednosti koncentracije proteina koje su se značajno razlikovale od ostalih izmerenih vrednosti ( $p<0,05$ ). Razlike u aktivnosti određenih enzima su bile statistički značajne ( $p<0,05$ ). Istim slovom u superskriptu su obeležene vrednosti koje se nisu međusobno značajno razlikovale. MnP=mangan zavisna peroksidaza, VP=Verzatil peroksidaza.

Oba izolata su pokazala visoku lakaznu aktivnost na SSdS. Izmerene aktivnosti su se razlikovale u zavisnosti od dana inkubacije (tabela 15). Najveća vrednost od  $1324 \pm 7$  mU/g supstrata (LMS) i  $830 \pm 5$  mU/g supstrata (SSdS) su zabeležene desetog dana inkubacije. Razlika je bila statistički značajna ( $p < 0,05$ ), ali je i vrednost lakazne aktivnosti zabeležena na SSdS bila veoma visoka. U slučaju izolata *S. gausapatum* F28, u zavisnosti od toga da li su u supstrat dodati ili ne minerali, razlikovalo se vreme postizanja maksimalne aktivnosti. Tako je na LSM supstratu maksimum lakazne aktivnosti od  $355 \pm 5$  mU/g supstrata zabeležen desetog dana inkubacije, dok je na SSdS supstratu maksimalna vrednost  $144,4 \pm 0,8$  mU/g supstrata postignuta petog dana inkubacije.

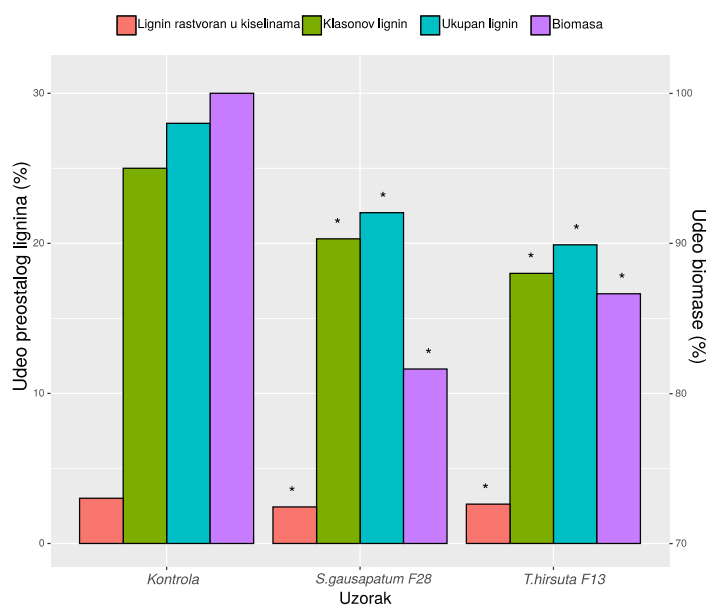
Kao što je očekivano, više vrednosti mangan peroksidazne aktivnosti su zabeležena sa izolatom *S. gausapatum* F28 u odnosu na izolat *T. hirsuta* F13. Vrednosti mangan peroksidazne aktivnost su se menjale sa vremenom inkubacije (Tabela 15). Uočene razlike su bile statistički značajne ( $p < 0,05$ ). Sa izolatom F28 je postignuta maksimalna aktivnost sedmog dana inkubacije i na LMS ( $67 \pm 9$  mU/g supstrata) i na SSdS ( $39 \pm 1$  mU/g supstrata). Razlika u aktivnostima postignuta dodavanjem minerala u supstrat u odnosu na uslove bez dodatka, je bila statistički značajna ( $p < 0,05$ ), ali postignuti rezultati potvrđuju da *S. gausapatum* F28 izolat ispoljava jaku mangan peroksidaznu aktivnost i na jednostavnom supstratu, i da se podešavanjem kultivacionih uslova ova aktivnost može još unaprediti. *T. hirsuta* F13 je ispoljila bolju mangan peroksidaznu aktivnost na SSdS, mada je zabeležena aktivnost bila niska (tabela 15). Izolat *S. gausapatum* F28 nije ispoljio verzatil peroksidaznu aktivnost ni jednog dana inkubacije. Razlog mogu biti neadekvatni uslovi vlažnosti supstrata, s obzirom na to da je u prethodnim analizama tek na 68% vlažnosti ovaj izolat ispoljio aktivnost mangan nezavisnih peroksidaza. U slučaju izolata *T. hirsuta* F13, verzatil peroksidazna aktivnost je detektovana jedino trećeg dana na LMS supstratu ( $6 \pm 1$  mU/g supstrata) i petog dana na SSdS supstratu ( $8 \pm 2$  mU/g supstrata).

Izmerena proizvodnja proteina po masi supstrata tokom različitih dana inkubacije je služila za određivanje specifične aktivnosti enzima (tabela 15). Specifična aktivnost je mera čistoće enzima [240]. Viša aktivnost i manja proizvodnja proteina ukazuje na to da je manje neželjenih proizvoda proteinskog porekla dobijeno [240]. U ovom istraživanju, na LMS-u su zabeležene statistički značajno više vrednosti enzimskih aktivnosti ( $p < 0,05$ ), dok su na SSdS-u zabeležene više vrednosti mase proteina po jedinici mase supstrata (mg

proteina/g mase supstrata). Rezultati su pokazali da dodavanje minerala u lignocelulozni supstrat može značajno da unapredi kvalitet proizvoda ukoliko je cilj proizvodnja enzima. Maksimalna specifična aktivnost lakaze od  $197 \pm 9$  mU/mg (*T. hirsuta* F13) i  $45 \pm 2$  mU/mg (*S. gausapatum* F28) i mangan peroksidazna aktivnost od  $3,0 \pm 0,1$  mU/mg (*T. hirsuta* F13) i  $7,8 \pm 0,4$  mU/mg (*S. gausapatum* F28) postignute na SSdS (tabela 15) potvrđuju da su ova dva izolata dobar izvor jakih ligninolitičkih enzima i da bi se mogli koristiti u tretmanu lignoceluloznog supstrata radi uklanjanja lignina.

### Redukcija biomase i lignina

U ispitivanju sposobnosti delignifikacije lignoceluloznog materijala izolatima F13 i F28 korišćena je piljevina bukve, otpad iz drvoprerađivačke industrije. Ovaj otpad je jeftin i široko rasprostranjen u Srbiji. Ovaj supstrat je sastavljen od malih čestica zbog čega nije potrebno dodatno ulaganje energije za njegovu pripremu. Takođe, on se ponaša kao induktor nekih ligninolitičkih enzima, kao što je lakaza, i odlikuje se velikim udelom lignina zbog čega je pogodan za ispitivanje sposobnosti gljiva za razgradnju lignocelulozne biomase [241]. Supstrati su inokulisani izolatima zasebno, i inkubirani 35 dana u mraku na 30 °C. Nakon biološkog predtretmana je određen maseni udeo (%) preostalog lignina i biomase (slika 34).



Slika 34: Razgradnja lignina i biomase izolatima *T. hirsuta* F13 i *S. gausapatum* F28. Stupci na grafiku predstavljaju procenat mase suvog supstrata, udeo Klasonovog lignina,

*lignina rastvornog u kiselinama i ukupnog lignina u suvoj masi supstrata pre i posle tretmana. Asteriskom su obeležene statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ) između preostalog lignina (lignina nakon predtretmana) i kontrole (inicijalne mase lignina), kao i preostale mase supstrate (mase supstrata nakon predtretmana) i inicijalne mase supstrata (kontrole). Sve vrednosti su računane u odnosu na inicijalnu masu.*

Vrste *T. hirsuta* i *S. gausapatum* pripadaju grupi gljiva koje izazivaju belo truljenje. Ovoj grupi pripadaju selektivni razgrađivači lignoceluloznog supstrata (gljive koje brže razgrađuju lignin nego holocelulozu) i neselektivni razgrađivači (gljive koje simultano uklanjaju i holocelulozu i lignin). Selektivna razgradnja gljive *T. hirsuta* je već demonstrirana [230]. Ovaj tip razgradnje lignoceluloznog supstrata je poželjniji u predtretmanu jer obezbeđuje da se očuva više holoceluloze. Ligninolitička aktivnost vrste *S. gausapatum* ranije nije istraživana. Studije koje su se bavile analizama trulog drveta sa kog je prikupljen *S. gausapatum* su zaključile da ova vrsta izaziva simultanu razgradnju lignoceluloznog materijala [242]. Međutim, s obzirom na to da je u pitanju primarni kolonizator grana hrasta, od vrste *S. gausapatum* se očekivalo da poseduje dobru ligninolitičku aktivnost [243].

Oba izolata, i *T. hirsuta* F13 i *S. gausapatum* F28, su redukovala biomasu (slika 34). Redukcija inicijalne biomase je bila statistički značajna ( $p < 0,05$ ). Nakon 35 dana predtretmana izolatom F13 zabeležen je gubitak biomase od 19%, dok je gubitak zabeležen nakon predtretmana izolatom F28 iznosio 24%. Bez obzira na to što je *S. gausapatum* F28 smanjio inicijalnu biomasu više nego *T. hirsuta* F13, razlika nije bila statistički značajna ( $p > 0,05$ ). Kao što je i očekivano, oba izolata su razgradila deo lignina. Redukcija ukupnog lignina je bila značajna. Ukupan gubitak lignina nakon tretmana izolatom F13 je bio 33,8%, dok je tretmanom izolatom F28 uklonjeno 28,8% lignina. *T. hirsuta* F13 je bolje razgradila Klasonov lignin (gubitak lignina 28%) nego lignin rastvoran u kiselinama (gubitak 19%), dok je *S. gausapatum* više razgradio lignin rastvoran u kiselinama (gubitak 24%) nego Klasonov lignin (19%). Veća redukcija biomase i manja razgradnja lignina postignuti izolatom F28 su verovatno posledica veće razgradnje holoceluloze. Za analizu efikasnosti uklanjanja lignina neophodno je bilo iskoristiti indeks selektivnosti. Indeks selektivnost je izračunat kao odnos ukupnog gubitka lignina prema ukupnom gubitku biomase ( $m_l/m_i$ ) [231]. Viša vrednost indeksa je dobijena za izolat F13 (1,7) nego za F28 (1,1) što je ukazalo na veću selektivnost

razgradnje lignoceluloznog materijala izolatom F13. U istraživanju koje sproveo Fukasawa i sar. [244], vršena je razgradnja japanske bukve različitim izolatima, među kojima je bila i vrsta *T. hirsuta*. Tom prilikom je zabeležen indeks selektivnosti 1,0 za gljivu *T. hirsuta*. Prema Liers i sar. [231],  $m_t/m_i$  odnos između 1,0 i 1,9 ukazuje na visoku efikasnost razgradnje lignina, što ukazuje na visoku efikasnost razgradnje lignina oba izolata, i *T. hirsuta* F13 i *S. gausapatum* F28.

Zbog veće selektivnosti u tretmanu lignoceluloznog supstrata, izolat *T. hirsuta* F13 je procenjen kao povoljniji za primenu u predtretmanu zbog čega je odabran za dalje istraživanja.

#### **4.4. Unapređenje ligninolitičke aktivnosti izolata *T. hirsuta* F13 primenom eksperimentalnog dizajna i suplementacijom melasnom džibrom**

U nastavku istraživanja je ispitana mogućnost primene melasne džibre kao suplementa za unapređenje ligninolitičke aktivnosti izolata *T. hirsuta* F13 i izvršena je optimizacija uslova predtretmana piljevine bukve ovom gljivom. Izolat *T. hirsuta* F13 je odabran kao najpovoljniji za primenu u predtretmanu lignocelulozne biomase na osnovu stepena selektivnosti ispoljenog prilikom razgradnje ove vrste supstrata.

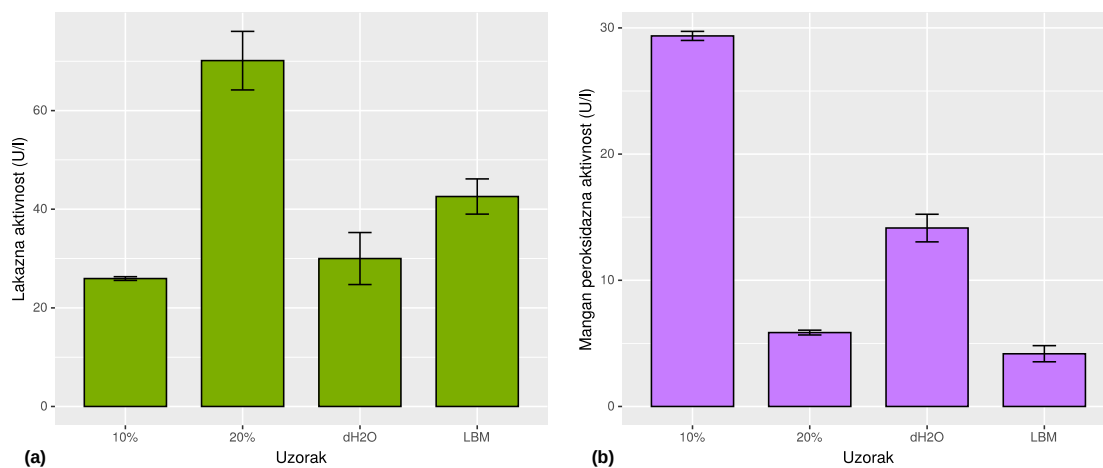
##### **4.4.1. Melasna džibra kao suplement za unapređenje ligninolitičke aktivnosti**

S obzirom na to da su prethodne analize pokazale da se dodatkom mineralnog medijuma (LBM) u lignocelulozni supstrat može značajno unaprediti ligninolitička aktivnost izolata *T. hirsuta* F13, naredni korak je bio pokušaj primene melasne džibre – otpada iz industrije alkohola – kao suplementa za unapređenje ligninolitičke aktivnosti odabranog izolata. Cilj ove faze istraživanja je bio razvijanje jeftine metode unapređenja predtretmana lignoceluloznog otpada koja u isto vreme daje doprinos rešavanju problema skladištenja otpadne melasne džibre – jednog od najvećih zagađivača vodotokova.

Preliminarne analize su pokazale da melasna džibra ima veliki potencijal kao suplement za unapređenje ligninolitičke aktivnosti izolata *T. hirsuta* F13. Kultivacioni

uslovi u preliminarnim analizama su uključivali inkubaciju na temperaturi od 30 °C i vlažnost lignocelulaznog supstrata (piljevine bukve) od 70% koja je podešena dodavanjem odgovarajuće zapremine destilovane vode, LBM, 20% rastvora melasne džibre ili 10% rastvora melasne džibre. pH vrednost LBM i rastvora džibre su podešeni na 5,5 kako bi se postigli što uniformniji uslovi za adekvatno poređenje.

Sa dodatkom melasne džibre su dobijeni značajno bolji rezultati nego sa dodatkom LBM ili samo primenom destilovane vode (slika 35), ali je i uočeno da su različite koncentracije džibre različito uticale na ispoljavanje lakazne ili mangan peroksidazne aktivnosti. Ono što se moglo zaključiti već na osnovu preliminarnih analiza je da je za postizanje jake lakazne aktivnosti potrebno koristiti rastvor melasne džibre veće koncentracije nego za postizanje visoke mangan peroksidazne aktivnosti. Međutim, preliminarnе analize su pokazale i da nerazblažena džibra deluje inhibitorно na rast gljive, zbog čega je bilo neophodno pronaći odgovarajuće razblaženje ovog agensa kako bi se dobili željeni rezultati. Ranija istraživanja u kojima je ispitivana mogućnost korišćenja ligninolitičkih gljiva u tretmanu melasne džibre radi smanjenja njenog negativnog efekta na vodene ekosisteme su takođe koristila različita razblaženja ovog agensa radi postizanja dobrih rezultata [143, 245, 246].



Slika 35: Poređenje lakazne (a) i mangan peroksidazne aktivnosti (b) primenom različitih agenasa: 10% rastvora džibre, 20% rastvora džibre, destilovane vode (dH<sub>2</sub>O) i mineralnog medijuma (LBM)

Nakon potvrde u preliminarnim analizama da bi melasna džibra mogla da posluži kao suplement za unapređenje željene ligninolitičke aktivnosti, primenjene su metode eksperimentalnog dizajna radi daljeg ispitivanja i optimizacije kultivacionih uslova.

#### **4.4.2. Frakcionisani faktorijski dizajn**

Frakcionisani faktorijski dizajn (FFD) je korišćen za selekciju kultivacionih faktora koji imaju najveći uticaj na proizvodnju lignocelulolitičkih enzima izolata *T. hirsuta* F13. Eksperimentima su obuhvaćeni sledeći faktori: veličina inokuluma, koncentracija džibre, vlažnost supstrata, temperatura i pH vrednost. Glavni fokus FFD je bio na lakaznoj aktivnosti i aktivnosti mangan zavisnih peroksidaza jer su u pitanju dominantne ligninolitičke aktivnosti ovog izolata koje je potrebno optimizovati da bi se postigla efikasnost u tretmanu lignoceluloznog otpada. Uticajni faktori su odabrani primenom  $2^{5-2}$ -FFD koji je dopunjen preklopnim dizajnom čime je rezolucija III povećana na V [181, 193] i omogućeno nepristrasno procenjivanje uticaja glavnih efekata.

U analizi uticaja glavnih efekata korišćena je ANOVA (tabela 16). Rezultati su pokazali da su vlažnost supstrata i temperatura imali najveći uticaj na lakaznu aktivnost, dok je koncentracije džibre najviše uticala na aktivnost mangan zavisnih peroksidaza (MnP). Ova analiza nije pokazala značajan uticaj vlažnosti supstrata na MnP aktivnost, što može biti posledica uskog opsega vrednosti ovog faktora koji je korišćen u eksperimentima. Prethodne analize su već pokazale da vlažnost supstrata značajno utiče i na MnP i na lakaznu aktivnost izolata *T. hirsuta* F13; kada su vrednosti iznad 75% dominira lakazna aktivnost, dok su vrednosti ispod 70% mnogo povoljnije za MnP aktivnost (poglavlje 4.3.2).

Pomoću skrining dizajna su koncentracija džibre, vlažnost supstrata i temperatura identifikovani kao faktori sa najvećim uticajem na ukupnu ispitanu ligninolitičku aktivnost izolata *T. hirsuta* F13 i odabrani za dalja ispitivanja i optimizaciju.



Tabela 16: Značajnost regresionih koeficijenata glavnih efekata dobijenih za za linearno fitovan model preklopnog dizajna: A – veličina inokuluma, B – koncentracija melasne džibre, C – vlažnost supstrata, D – temperatura, E – inicijalna pH.

<b>Lakazna aktivnost</b>				
	<b>Procena</b>	<b>Std. Greška</b>	<b>t vrednost</b>	<b>Pr(&gt; t )</b>
(Presek)	69,2719	6,8764	10,074	1,49e-06 ***
A	-6,3331	6,8764	-0,921	0,37874
B	8,2719	6,8764	1,203	0,25671
C	14,7631	6,8764	2,147	0,05736 .
D	-21,8881	6,8764	-3,183	0,00977 **
E	-0,3744	6,8764	-0,054	0,95765

Kodovi značajnosti: 0 '\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.' 0,1 '.' 1

<b>MnP aktivnost</b>				
	<b>Procena</b>	<b>Std. Greška</b>	<b>t vrednost</b>	<b>Pr(&gt; t )</b>
(Presek)	16,86688	0,98444	17,133	9,68e-09 ***
A	0,71312	0,98444	0,724	0,4854
B	-1,81063	0,98444	-1,839	0,0957 .
C	-0,08313	0,98444	-0,084	0,9344
D	0,24563	0,98444	0,250	0,8080
E	-0,83187	0,98444	-0,845	0,4179

Kodovi značajnosti: 0 '\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.'

#### 4.4.3. Centralni kompozitni dizajn

Uticaj interakcija odabranih faktora na lakaznu i MnP aktivnost je dalje ispitivan primenom centralnog kompozitnog dizajna (CCD). Matrica centralnog kompozitnog dizajna sa kodiranim i stvarnim vrednostima ispitivanih faktora, kao i predviđene i izmerene vrednosti lakazne i MnP aktivnosti prikazane su u tabeli 17.

Tabela 17: Matrica centralnog kompozitnog dizajna sa predviđenim i izmerenim vrednostima odgovora (lakazne aktivnosti i MnP aktivnosti). Podaci su prikazani standardnim redosledom eksperimenata: A je koncentracija džibre (%), B je vlažnost supstrata (%), C je temperatura inkubacije (°C). Originalne vrednosti faktora su date u zagradi pored odgovarajućih kodiranih vrednosti.

Eksp.	A (%)	B (%)	C (°C)	Lakazna aktivnost - izmerena (U/l)	Lakazna aktivnost - predviđena (U/l)	MnP aktivnost- izmerena (U/l)	MnP aktivnost- predviđena (U/l)
1	-1 (8)	-1 (60)	-1 (24)	67,73	74,60	80,50	75,32
2	$-\alpha^a$ (4,34)	0 (70)	0 (27)	73,20	73,26	70,45	68,55
3	1 (18)	-1 (60)	-1 (24)	70,03	64,07	73,40	74,23
4	$\alpha^a$ (21,66)	0 (70)	0 (27)	63,80	70,35	78,00	75,49
5	-1 (8)	1 (80)	-1 (24)	143,10	131,94	16,30	18,43
6	0 (13)	$-\alpha^a$ (53)	0 (27)	<b>30,70<sup>b</sup></b>	<b>24,75<sup>b</sup></b>	69,50	69,10
7	1(18)	1 (80)	-1 (24)	105,10	101,16	7,40	4,04
8	0 (13)	$\alpha^a$ (87)	0 (27)	146,00	<b>158,55<sup>b</sup></b>	<b>4,45<sup>b</sup></b>	<b>0,44<sup>b</sup></b>
9	-1 (8)	-1 (60)	1 (30)	34,60	33,59	21,40	28,07
10	0 (13)	0 (70)	$-\alpha^a$ (22)	56,20	61,97	44,30	49,14
11	1(18)	-1 (60)	1 (30)	54,80	61,01	49,30	50,48
12	0 (13)	0 (70)	$\alpha^a$ (33)	75,00	75,83	38,30	29,05
13	-1 (8)	1 (80)	1 (30)	150,00	151,00	16,50	18,98
14	0 (13)	0 (70)	0 (27)	62,90	62,59	<b>88,20<sup>b</sup></b>	<b>82,51<sup>b</sup></b>
15	1(18)	1 (80)	1 (30)	<b>170,00<sup>b</sup></b>	158,17	19,60	28,09
16	0 (13)	0 (70)	0 (27)	60,10	62,59	70,90	82,51
17	0 (13)	0 (70)	0 (27)	89,40	82,08	87,30	71,09
18	0 (13)	0 (70)	0 (27)	84,60	62,59	75,20	82,51
19	0 (13)	0 (70)	0 (27)	57,40	82,08	59,50	71,09
20	0 (13)	0 (70)	0 (27)	63,50	82,08	65,40	71,09
21	0 (13)	0 (70)	0 (27)	98,20	82,08	85,40	71,09

<sup>a</sup> $\alpha=1,73$

<sup>b</sup>minimalne i maksimalne predviđene i izmerene vrednosti odgovora.

Opseg vrednosti vlažnosti supstrata je proširen u odnosu na opseg primenjen u FFD eksperimentima sa ciljem da se prikupi više informacija o uticaju ovog faktora na ligninolitički sistem izolata *T. hirsuta* F13, posebno na MnP aktivnost. Faktori koji nisu

ispoljili značajan efekat tokom FFD su držani na nižoj vrednosti zbog ekonomičnosti samog procesa (pH je održavana na 5, a veličina inokuluma je bila 3 diska).

Da bi se mogla objasniti korelacija koja postoji između odgovora (lakazna aktivnost i MnP aktivnost) i primenjenih kultivacionih faktora, generisane su polinomalne jednačine drugog reda (jednačine 27 i 28):

$$\hat{y} Lacc = 82,08 - 19,49 \cdot Blok - 0,84 \cdot A + 38,62 \cdot B + 4,0 \cdot C - 5,06 \cdot A \cdot 9,49 \cdot A \cdot C + 15,02 \cdot B \cdot C + 3,07 \cdot A^2 + 9,69 \cdot B^2 + 2,10 \cdot C^2 \quad (27)$$

$$\hat{y} MnP = 71,09 + 11,42 \cdot Blok + 2,01 \cdot A - 19,82 \cdot B - 5,80 \cdot C - 3,33 \cdot A \cdot 5,88 \cdot A \cdot C + 11,95 \cdot B \cdot C - 3,4980 \cdot A^2 - 15,91 \cdot B^2 - 14,47 \cdot C^2 \quad (28)$$

gde je Blok efekat blokiranja, A je koncentracija džibre, B je vlažnost supstrata, C je temperatura inkubacije,  $\hat{y} Lacc$  je predviđena vrednost lakazne aktivnosti, a  $\hat{y} MnP$  je predviđena vrednost aktivnosti mangan zavisnih peroksidaza.

### ***Analiza kvaliteta modela***

Kvalitet generisanih modela i statistička značajnost regresionih koeficijenata su ispitani primenom regresione analize i ANOVA analize (tabela 18 i tabela 19). P-vrednost niža od 0.05 je uzeta kao prag statističke značajnosti efekta. P-vrednost dobijena za model lakazne aktivnosti iznosi 0,00034 (F=11,29), dok p-vrednost dobijena za model MnP aktivnosti iznosi 0,00017 (F=13,15) što ukazuje na to da su oba modela statistički značajna.

Vrednosti višestrukog i prilagođenog  $R^2$  dobijene za model lakazne aktivnosti iznose redom  $\approx 0,92$  i  $\approx 0,84$ , dok vrednosti višestrukog i prilagođenog  $R^2$  dobijene za model MnP aktivnosti iznose redom  $\approx 0,93$  i  $\approx 0,86$ . U slučaju oba modela razlika između višestrukog i prilagođenog  $R^2$  nije velika kada se uzme u obzir da se radi o prirodnom sistemu. Regresiona i ANOVA analiza su pokazale da je Blokiranje imalo značajan uticaj na ispitivani sistem zbog čega je koeficijent procenjen za Blok bilo potrebno uključiti u jednačine 27 i 28. F-vrednost od 0,5902 dobijena za lakaznu aktivnost i 0,5379 za MnP aktivnost pokazuju da nedostatak fitovanja (eng. *lack of fit*) nije bio statistički značajan, tj. pokazuju da se dobijeni podaci dobro uklapaju u model.

Tabela 18: Test značajnosti regresionih koeficijenata i ANOVA analiza modela lakazne aktivnosti: A – koncentracija džibre; B – vlažnost supstrata; C – temperatura.

<b>Analiza modela lakazne aktivnosti</b>				
<b>Test značajnosti regresionih koeficijenata</b>				
	<b>Procena</b>	<b>Std. greška</b>	<b>t vrednost</b>	<b>Pr(&gt; t )</b>
(Presek)	82,08071	6,58959	12,4561	2,055e-07 ***
Blok	-19,48833	6,87623	-2,8342	0,01773 *
A	-0,84152	4,16763	-0,2019	0,84403
B	38,62468	4,16763	9,2678	3,177e-06 ***
C	4,00018	4,16763	0,9598	0,35978
A:B	-5,0625	5,51325	-0,9182	0,38011
A:C	9,4875	5,51325	1,7209	0,11601
B:C	15,02	5,51325	2,7243	0,02140 *
A <sup>2</sup>	3,07048	3,84654	0,7982	0,44327
B <sup>2</sup>	9,68714	3,84654	2,5184	0,03047 *
C <sup>2</sup>	2,10381	3,84654	0,5469	0,59642

---

Kodovi značajnosti: 0 '\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.' 0,1 '' 1

Višestruki R-kvadrat: 0,9186, Prilagođeni R-kvadrat: 0,8372

F-statistika: 11,29 on 10 and 10 DF, p-vrednost: 0,00034

Značajan

#### **ANOVA analiza**

	<b>Stepeni slobode</b>	<b>Suma Kvadrata</b>	<b>Sredina zbira kvadrata</b>	<b>F vrednost</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>	
Blok	1	1953,2	1953,2	8,0325	0,01773	
FO(A, B, C)	3	21120,1	7040	28,9513	3,036E-05	
TWI(A, B, C)	3	2729,9	910	3,7422	0,04889	
PQ(A, B, C)	3	1644	548	2,2536	0,14464	
Reziduali	10	2431,7	243,2			
Nedostatak fitovanja	5	902,5	180,5	0,5902	0,71158	Nije značajan
Čista greška	5	1529,2	305,8			

Tabela 19: Test značajnosti regresionih koeficijenata i ANOVA analiza modela mangan peroksidazne aktivnosti: A – koncentracija džibre; B – vlažnost supstrata; C – temperatura.

<b>Analiza modela MnP aktivnosti</b>				
<b>Test značajnosti regresionih koeficijenata</b>				
	<b>Procena</b>	<b>Std. greška</b>	<b>t vrednost</b>	<b>Pr(&gt; t )</b>
(Presek)	71,0905	4,5465	15,6363	2,344e-08 ***
Blok	11,4222	4,7443	2,4076	0,0368347 *
A	2,0055	2,8755	0,6975	0,5014112
B	-19,8193	2,8755	-6,8926	4,232e-05 ***
C	-5,7995	2,8755	-2,0169	0,0713505 .
A:B	-3,325	3,8039	-0,8741	0,4025622
A:C	5,875	3,8039	1,5445	0,1535044
B:C	11,95	3,8039	3,1415	0,0104827 *
A^2	-3,498	2,6539	-1,3181	0,2168784
B^2	-15,9147	2,6539	-5,9967	0,0001327 ***
C^2	-14,473	2,6539	-5,4534	0,0002795 ***

---

Kodovi značajnosti: 0 '\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.' 0,1 '.' 1

Višestruki R-kvadrat: 0,9293, Prilagođeni R-kvadrat: 0,8587

F-statistika: 13,15 on 10 and 10 DF, p-vrednost: 0,0001743

Značajan

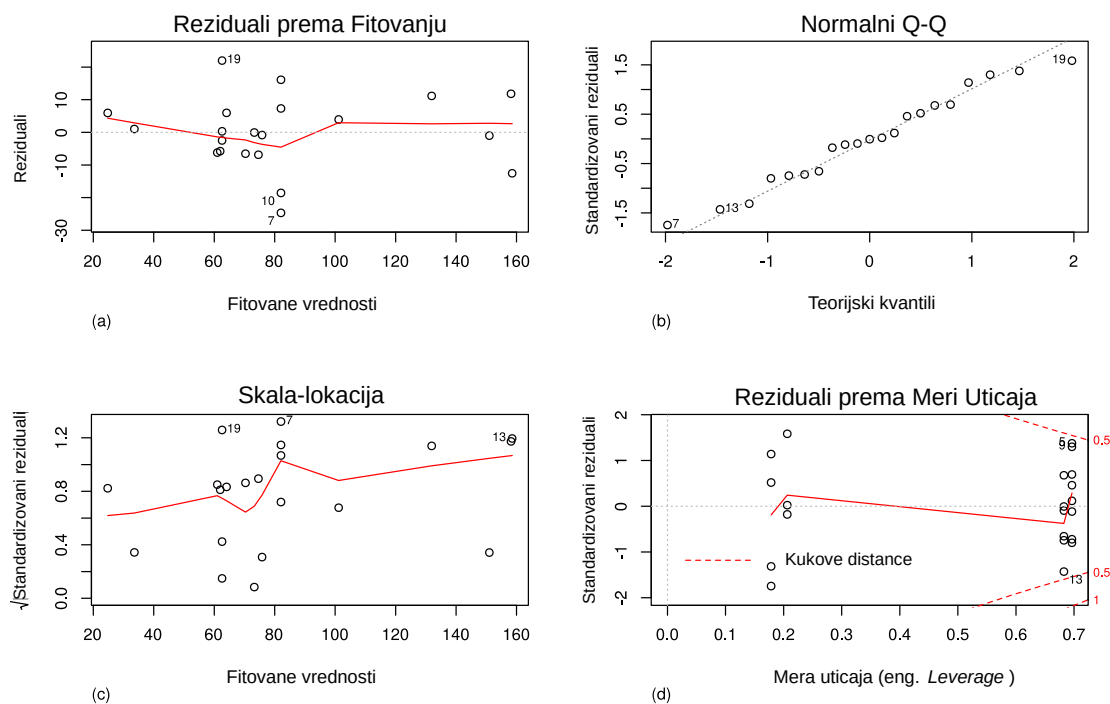
#### ANOVA analiza

	<b>Stepeni slobode</b>	<b>Suma Kvadrata</b>	<b>Sredina zbira kvadrata</b>	<b>F vrednost</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>
Blok	1	671	670,97	5,7965	0,0368347
FO(A, B, C)	3	6026,4	2008,81	17,354	0,0002735
TWI(A, B, C)	3	1507	502,33	4,3396	0,0334201
PQ(A, B, C)	3	7018,7	2339,56	20,2113	0,0001446
Reziduali	10	1157,6	115,76		
Nedostatak fitovanja	5	404,9	80,97	0,5379	0,743691
Čista greška	5	752,7	150,54		

Procenjena AP vrednost pokazuje dobar signal oba modela. AP vrednost meri odnos signala i šuma i pomaže da se proceni prosečna greška predviđanja. AP vrednost veća od 4 se preporučuje [247], a vrednosti dobijene za lakazni i MnP model iznose redom 11,85 and 10,54.

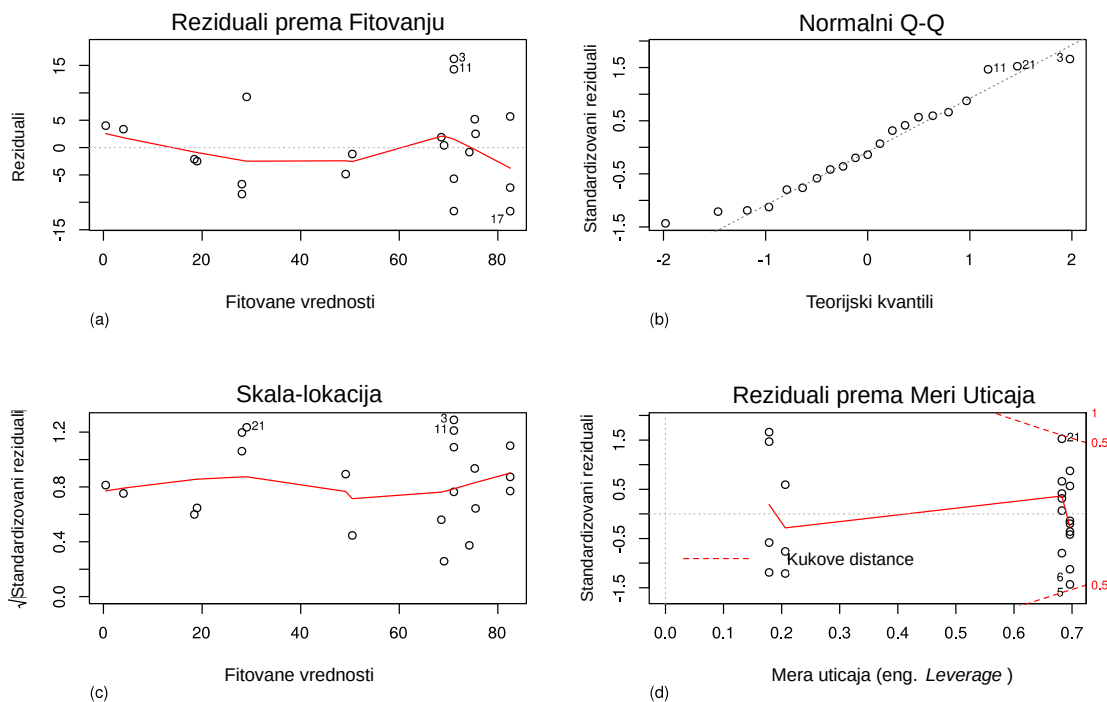
Grafici dijagnostike regresije modela lakazne i MnP aktivnosti (slike 36 i 37) su potvrdili pretpostavke regresionog modela [248]: linearnost, normalnu distribuciju, homoskedastičnost i prisustvo/odsustvo uticajnih tačaka.

Na slikama 36a) i 37a) se uočava da horizontalna linija nema konkretan oblik, tj. ne pokazuje neki trend. Većina tačaka MnP modela (slika 37a) je smeštena na desnoj polovini grafika dok su tačke lakaznog modela (slika 36a) pretežno u centru grafika, međutim nema većih rezidualnih tačaka kao i tačaka ekstrema (eng. *outliers*) zbog čega se može potvrditi *linearnost* modela [248].



Slika 36: Grafici dijagnostike regresije modela lakazne aktivnosti: a) Rezidual prema Fitovanju (eng. *Residuals vs. Fitted*) grafik ispituje linearnu vezu među promenljivim; b) Normalni Q-Q (eng. *Normal Q-Q*) grafik ispituje distribuciju podataka modela; c) Skala-

lokacija (eng. *Scale-location*) grafik ispituje homoskedastičnost modela; d) Reziduali prema Meri Uticaja (eng. *Residuals vs. Leverage*) ispituje uticajne tačke, vrednosti Kukovih distanci (eng. *Cook's distances*) su manje od 0.5.



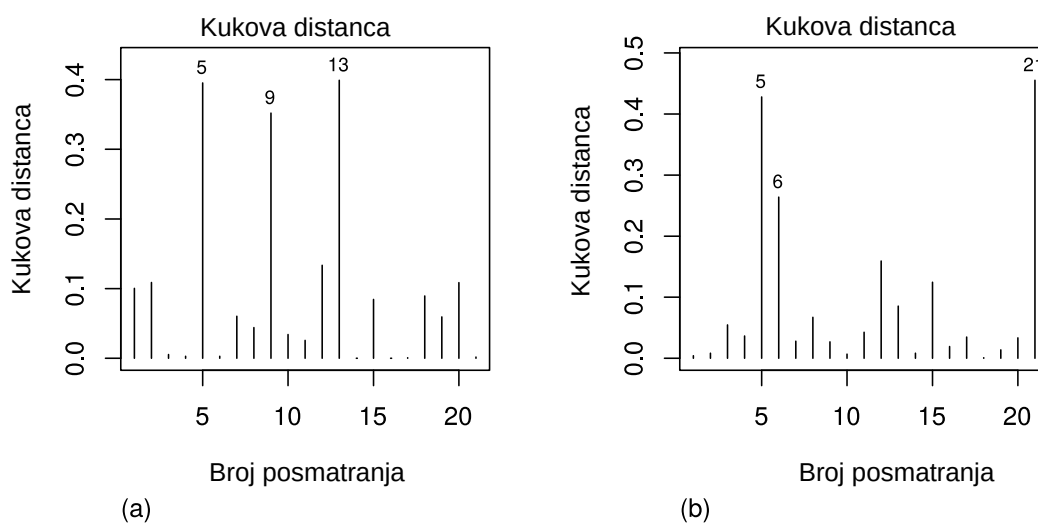
Slika 37: Grafici dijagnostike regresije modela MnP aktivnosti: a) Rezidual prema Fitovanju (eng. *Residuals vs. Fitted*) grafik ispituje linearnu vezu među promenljivim; b) Normalni Q-Q (eng. *Normal Q-Q*) grafik ispituje distribuciju podataka modela; c) Skala-lokacija (eng. *Scale-location*) grafik ispituje homoskedastičnost modela; d) Reziduali prema Meri Uticaja (eng. *Residuals vs. Leverage*) ispituje uticajne tačke, vrednosti Kukovih distanci (eng. *Cook's distances*) su manje od 0.5.

Normalni Q-Q grafik (eng. *Normal Q-Q*) ispituje da li je raspodela reziduala normalna [248]. Generalno gledano reziduali lakaznog i MnP modela (slike 36b i 37b) većinom leže na pravoj liniji zbog čega se može potvrditi normalna raspodela za generisane modele [248].

Skala-lokacija (eng. *Scale-Location*) grafici prikazani na slikama 36c) i 37c) ispituju homoskedastičnost [248]. Slučajna raspodela kvadratnog korena standardizovanih reziduala je evidentna i, bez obzira na uticaj dve tačke koji se uočava na desnoj strani

Skala-lokacija grafika lakaznog modela prikazanog na slici 36c, ni jedna strana nije viša u odnosu na drugu i pretpostavka homoskedastičnosti može biti potvrđena.

Poslednji grafik (Reziduali prema meri uticaja; eng. *Residuals vs. Leverage*) ispituje prisustvo uticajnih tačaka. Sve tačke bi trebalo da budu na distanci manjoj od 0,5 (Kukova distanca; eng. *Cook's distances*) [248]. Slike 36d i 37d ne pokazuju uticajne tačke ni u slučaju lakaznog ni MnP modela. Kukove distance svih tačaka i modela lakazne aktivnosti i modela MnP aktivnosti su manje od 0,5 (slika 38).

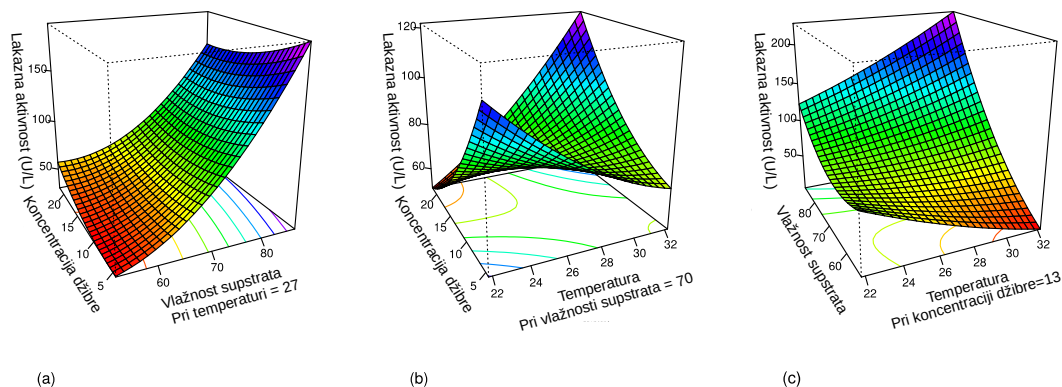


Slika 38: Vrednosti Kukovih distanci rezidualnih tačaka modela lakazne aktivnosti (a) i modela MnP aktivnosti (b)

### ***Uticaj ispitivanih faktora na lakaznu i mangan peroksidaznu aktivnost izolata *T. hirsuta* F13***

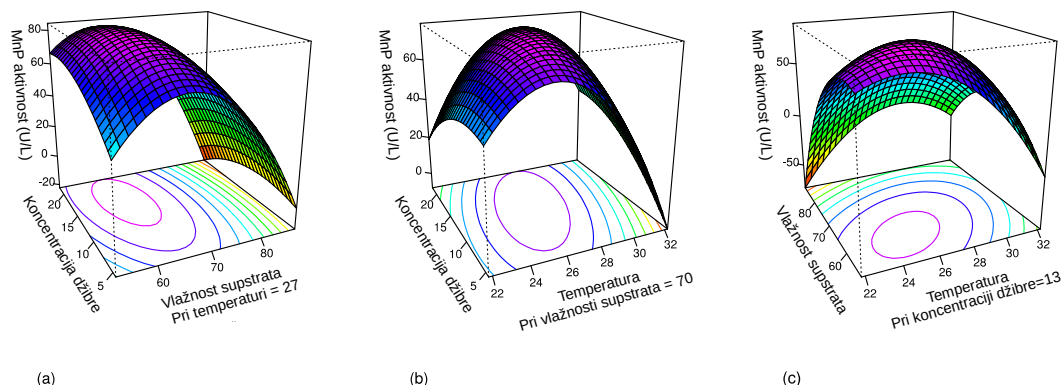
Za bolje razumevanje efekata koje faktori i faktorske interakcije imaju na lakaznu i MnP aktivnost, konstruisani su 3D grafici i grafici kontura (slike 39 i 40) crtanjem vrednosti odgovora u odnosu na bilo koja dva faktora dok je treći faktor zadržan na svom centralnom nivou (0). Analiza odgovora površine je pokazala da su zahtevi za proizvodnju lakaza i MnP kontradiktorni i da se, u zavisnosti od željenog finalnog rezultata, kultivacionim uslovima može manipulirati radi unapređenja proizvodnje jednog ili drugog enzima.





Slika 39: 3D grafici i grafici kontura pokazuju uticaj (a) koncentracije džibre i vlažnosti supstrata pri temperaturi 27 °C, (b) koncentracije džibre i temperature pri vlažnosti 70%, (c) vlažnosti supstrata i temperature pri koncentraciji džibre 13% na lakaznu aktivnost izolata *T. hirsuta* F13.

Minimaks oblik grafika odgovora površine [181] dobijen za model lakazne aktivnosti (slika 39) sa stacionarnim tačkama koje uključuju koncentraciju džibre od 19,47%, vlažnost supstrata od 62,4% i temperaturu inkubacije od 23,54%, ukazuju na to da lakazna aktivnost, tj. da proizvodnja lakaze, može dodatno da se unapredi. Ova aktivnost brzo raste sa porastom vlažnosti supstrata i u uslovim visoke vlažnosti supstrata (80% ili više) varijacije koncentracije džibre neznatno utiču na lakaznu aktivnost (slika 39a). Lakazna aktivnost brzo raste i sa simultanim povećanjem temperature i koncentracije džibre (slika 39b), kao i sa simultanim povećanjem vlažnosti supstrata i temperature (slika 39c). Na osnovu analize odgovora površine, visoke vrednosti koncentracije džibre (više od 20%), vlažnosti supstrata (preko 80%) i temperature (preko 28 °C) su potrebni za postizanje visoke lakazne aktivnosti izolata *T. hirsuta* F13. Najbolja aktivnost zabeležena u eksperimentima 170 U/l je postignuta u uslovima koncentracije džibre od 18%, vlažnosti supstrata od 80% i temperature od 30 °C (tabela 17 eksperiment 15).



Slika 40: 3D grafici i grafici kontura pokazuju uticaj (a) koncentracije džibre i vlažnosti supstrata pri temperaturi 27 °C, (b) koncentracije džibre i temperature pri vlažnosti 70%, (c) vlažnosti supstrata i temperature pri koncentraciji džibre 13% na MnP aktivnost izolata *T. hirsuta* F13.

Za razliku od lakazne aktivnosti, znatno niže vrednosti koncentracije džibre, vlažnosti supstrata i temperature su potrebne za proizvodnju MnP. Sa grafika odgovora površine konstruisanih za model MnP aktivnosti (slika 40) evidentno je da vlažnost supstrata (slika 40a) ili temperatura (slika 40b) znatno više utiču na MnP aktivnost nego koncentracija džibre. MnP aktivnost ubrzano opada sa porastom temperature preko 28 °C i vlažnosti supstrata preko 70%, dok se neznatno menja sa promenama koncentracije melasne džibre. Stacionarne tačke grafika odgovora površine konstruisanih za model MnP aktivnosti su koncentracija džibre od 14,36%, vlažnost supstrata od 61,65% i temperatura od 25,53 °C. Ove tačke definišu uslove za postizanje najviših vrednosti MnP aktivnosti. U ovom slučaju stacionarne tačke se nazivaju tačkama maksimuma i smatraju se optimalnim uslovima za ispitivani odgovor [181]. Najviša aktivnost zabeležena u eksperimentima je postignuta centralnim vrednostima ispitivanih faktora (tabela 17 eksperiment 14) koje su smeštene u stacionarnom regionu modela MnP aktivnosti. Dobijene vrednosti optimalne vlažnosti supstrata i temperature se podudaraju sa literturnim podacima, s obzirom na to da su je opseg 60-66% često prijavljivan kao optimalna vlažnost supstrata, a temperatura između 25 i 30 °C kao optimalna temperatura proizvodnje MnP, mada konkretna vrednost zavisi od vrste gljiva [249–252]. Niža koncentracija džibre je potrebna za

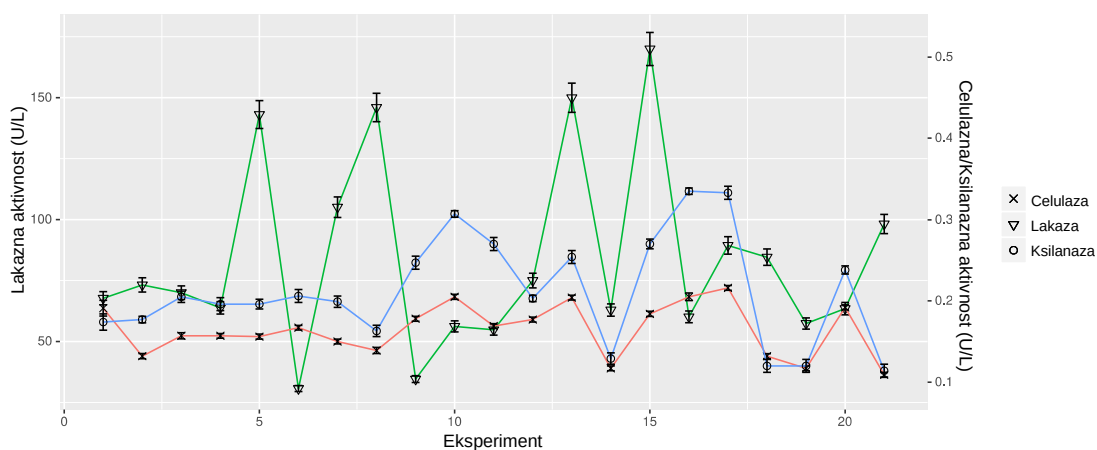
proizvodnju MnP u odnosu na lakazu. Ipak, ova koncentracija treba da bude iznad 12% da bi se osigurala visoka MnP aktivnost (slika 40a i b).

#### **4.4.4. Optimizacija predtretmana primenom funkcije poželjnosti i genetičkog algoritma**

Odabir odgovarajućih organizama i optimizacija procesnih parametara su obavezni za efikasnu biokonverziju lignoceluloznog predtretmana [253]. Optimizacija procesa predtretmana u ovom istraživanju je vršena primenom metode optimizacije višestrukih odgovora. Korišćen je organizam koji se pokazao kao najefikasniji u tretmanu lignoceluloznog materijala. Cilj optimizacije višestrukih odgovora je bio maksimizacija lakazne i MnP aktivnosti odabranog izolata. Međutim, RSM analiza je otkrila da su zahtevi za postizanje visokih lakaznih i MnP aktivnosti izolata *T. hirsuta* F13 u međusobnoj kontradikciji. S tim u vezi, za postizanje željenog unapređenja konverzije biomase, primenjen je pristup optimizacije višestrukih odgovora koji je uključivao upravljanje i unapređenje ligninolitičkih aktivnosti uzimajući u obzir njihov uticaj na hidrolitičku aktivnost i značaj za razgradnju lignina. Zbog toga je za upravljanje i selekciju najboljih uslova predtretmana primenjena optimizacija višestrukih odgovora pomoću funkcije poželjnosti (prema Derindžeru i Suču) kombinovane sa genetičkim algoritmom (GA). GA je metoda koja omogućava dobijanje optimalnog rešenja direktnim korišćenjem globalne funkcije poželjnosti [198]. Iz objavljene naučne literature može se uočiti da je malo je radova koji pokušavaju da optimizuju proces biološkog predtretmana primenom metode optimizacije višestrukih odgovora. Optimizacija uglavnom uzima u obzir samo jedan odgovor (uklanjanje lignina ili količinu oslobođenog šećera) i RSM je najčešća metoda koje se koristi u ovim optimizacijama [254–256]. Funkcija poželjnosti uparena sa GA još uvek nije korišćena za upravljanje željenim ligninolitičkim aktivnostima, kao i njihovo unapređenje, sa ciljem poboljšanja konverzije lignoceluloze ili na bilo koji drugi način u biološkom predtretmanu lignoceluloznog supstrata do sada. U ovom istraživanju je ova metoda korišćena za predtretman piljevine bukve izolatom *T. hirsuta* F13 kako bi se ispitala pouzdanost predviđanja, kao i za unapređenje biokonverzije lignoceluloze koje se može postići ovim putem.

Vrsta *T. hirsuta* je selektivni razgrađivač lignoceluloznog supstrata verovatno zbog visoko aktivne lakaze, što je dobro poznata karakteristika ove vrste [257–259].

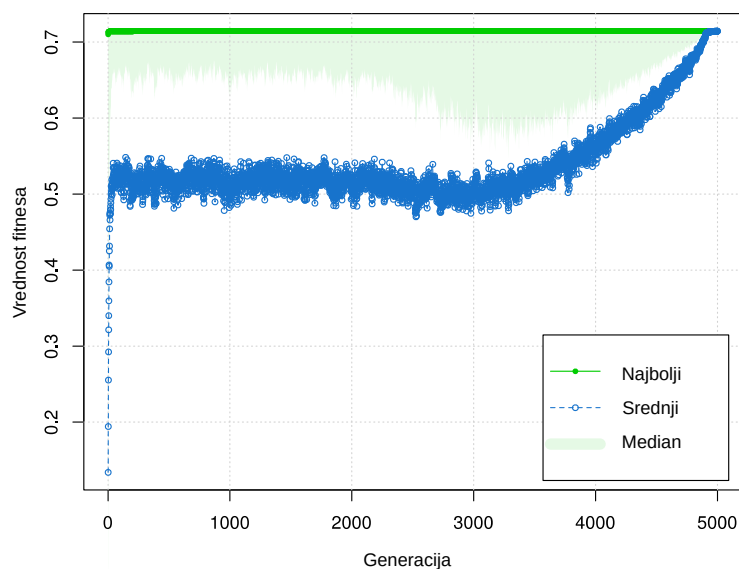
Naime, ranija istraživanja su demonstrirala inhibitorni efekat visoke lakazne aktivnosti na aktivnost hidrolitičkih enzima [260, 261] što ukazuje na to da visoka lakazna aktivnost može obezbediti da se sačuva više glukoze nakon tretmana gljivom, a samim tim i više fermentabilnog šećera. RSM analiza je pokazala da je sa porastom lakazne aktivnosti iznad 50 U/l, aktivnost CMCaza i ksilanaza opadala značajno (slika 41). To je bio glavni kriterijum za postavljanje minimalne vrednosti lakazne aktivnosti na 50 U/l. Gornji limit je postavljen na 245 U/l. S obzirom na to da su sve vrednosti iznad 50 U/l prihvatljive, faktor skaliranja (tj. težinski koeficijent) je postavljen na 0,1. Peroksidaze nemaju inhibitorni uticaj na hidrolitičku aktivnost [260]. Međutim one su neophodne u razgradnji lignina, posebno u oksidaciji nefenolnih komponenti lignina, koje čine većinu lignina [262]. Gornji limit je postavljen na 90 U/l, a za donji limit je odabrano 50 U/l kao prihvatljiva vrednost, kako bi bilo moguće obezbediti dovoljno prostora za optimizaciju. S obzirom na to da MnP ima ključnu ulogu u razgradnji lignina [95], težinski koeficijent je postavljen na 3 da bi obezbedio brzo dostizanje visoke MnP aktivnosti. Odabrane gornje granične vrednosti su lakazna i MnP aktivnost koje, kada su transformisane pomoću funkcije maksimizacije (jednačina 23), daju maksimalnu moguću  $d_i$  vrednost ispod 1 (vrednost koja teži jedinici, ali je ne dostiže), da bi bilo moguće dobijanje jedinstvenog objektivnog rešenja za kultivacione uslove.



Slika 41: Varijacije lakazne –  $\nabla$ , ksilanazne –  $\circ$  i celulazne –  $\times$  aktivnosti u različitim eksperimentima (pod različitim kultivacionim uslovima).

Očekivano kompromisno rešenje je podrazumevalo kultivacione uslove koji mogu dati lakaznu aktivnost iznad 50 U/l (da bi se uticalo na hidrolitičku aktivnost) i MnP

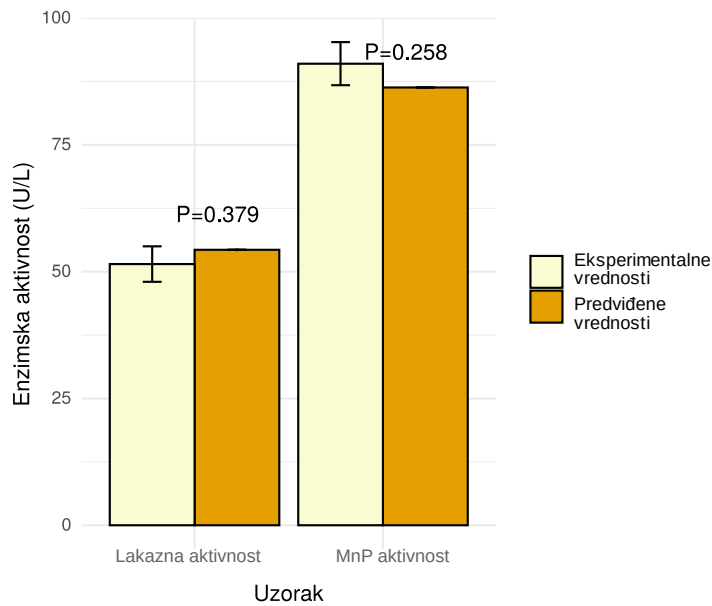
aktivnost blizu ili iznad 88,2 U/l, što je najviša zabeležena aktivnost izolatom *T. hirsuta* F13 u ovom istraživanju (tabela 17). Potraga za odgovarajućim (poželjnim) uslovima je izvedena pomoću genetičkog algoritma (GA). Optimalni uslovi dobijeni primenom ove metode bili su koncentracija džibre 13%, vlažnost supstrata 63% i temperatura 25 °C. Dobijena vrednost globalne funkcije poželjnosti iznosila je 0,714 (slika 42). Ova kombinacija faktora predviđa lakaznu aktivnost od 54.3 U/l i MnP aktivnost od 86.3 U/l.



Slika 42: Simulacija genetičkog algoritma – promene u populaciji do postizanja najbolje vrednosti generalne funkcije poželjnosti.

#### 4.4.5. Validacija predviđenih optimuma i doprinos melasne džibre ligninolitičkoj aktivnosti

Primena koncepta upravljanja ligninolitičkim aktivnostima prilikom optimizacije predtretmana pokazala je visoku pouzdanost predviđanja. Nakon sedam dana inkubacije pod optimalnim uslovima dobijenim pomoću funkcije poželjnosti i GA, lakazna aktivnost je iznosila  $51,5 \pm 3,5$  U/l, a MnP aktivnost  $91 \pm 4,24$  U/l (slika 43). Dobijene vrednosti odgovaraju predviđenim vrednostima od 54,3 U/l za lakaznu i 86,3 U/l za MnP aktivnost. Razlika nije statistički značajna ( $p > 0,05$ ; slika 43).



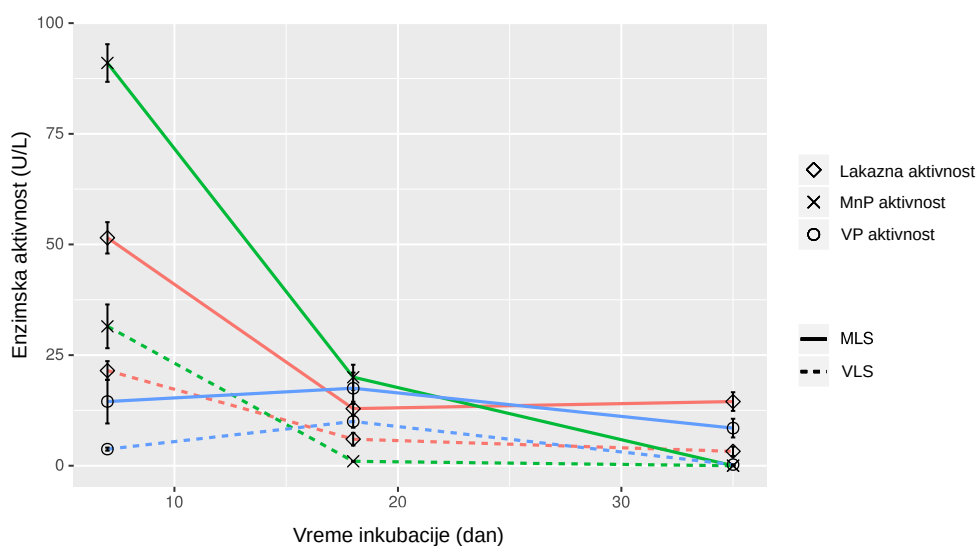
Slika 43: Validacija odabranih optimalnih uslova ( $p > 0,05$ ; razlika statistički nije značajna).

Dodatak melasne džibre je značajno doprineo unapređenju ligninolitičke aktivnosti izolata *T. hirsuta* F13. Optimalna temperatura i vlažnost supstrata korišćeni u validaciji modela primenjeni su i na lignocelulozni supstrat kom je vlažnost podešena destilovanom vodom, bez dodatka melasne džibre (VLS). Nakon sedam dana inkubacije, zabeležena lakazna aktivnost je bila ~2,4 puta niža ( $21,5 \pm 2,12$  U/l), dok je MnP aktivnost bila ~3 puta niža ( $31,5 \pm 4,9$  U/l) nego na supstratu kom je dodata melasna džibra. Razlika je bila statistički značajna ( $p < 0,05$ ). Unapređenje postignuto melasnom džibrom je uporedivo sa unapređenjima postignutim nekim drugim induktorima u ranijim istraživanjima. Studije u kojima su korišćeni *P. ostreatus*, *T. trogii*, *T. gibbosa*, *T. suaveolens*, *T. versicolor*, *Daedaleopsis confragosa*, and *Fomes fomentarius*, su prijavili unapređenje lakazne aktivnosti od oko 3,5 do 5,8 puta primenom različitih induktora. Bakar sulfat i različita kompleksna jedinjenja bakra su najčešće ispitivani induktori lakazne aktivnosti. Nivoi unapređenja su se razlikovali zavisno od vrste gljive i tipa induktora [263–265]. Studije u kojima je korišćena *Bjerkandera adusta* su postigle unapređenje MnP aktivnosti od oko 2 do 4 puta primenom mineralnog medijuma za proizvodnju ligninolitičkih enzima ili induktora poput selena [266, 267].

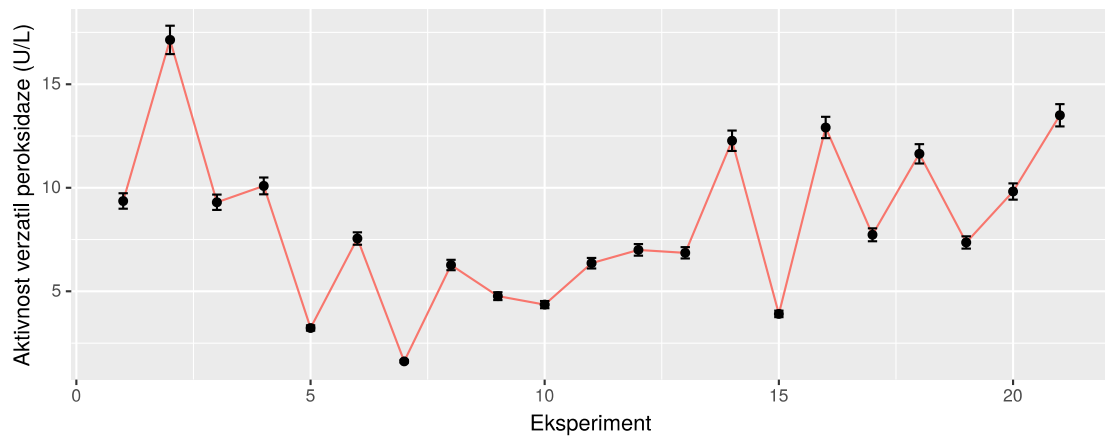
Induktori ligninolitičke aktivnosti mogu biti prirodni, sintetički, ili metali [268], ali je upotreba prirodnih induktora ili otpadnih materijala za unapređenje ligninolitičke

aktivnosti poželjnija da bi se obezbedila ekonomičnost biološkog predtretmana. Melasna džibra pripada grupi poželjnih supstanci. U pitanju je jeftin otpad koji bi mogao da održi ekonomičnost predtretmana lignocelulozne biomase. Melasna džibra je u ovom istraživanju pokazala dobar potencijal kao suplement za unapređenje ligninolitičke aktivnosti.

Sa dodatkom melasne džibre, zabeleženo je statistički značajno unapređenje ( $p < 0,05$ ) lakazne aktivnosti čak i nakon 35 i 18 dana inkubacije (slika 44). Nakon 35 dana VP aktivnost nije detektovana, dok je VP aktivnost od  $8,5 \pm 2,12$  U/l zabeležena na supstratu u prisustvu melasne džibre. Ovo je moguće očekivati, s obzirom na to da postoje varijacije u ligninolitičkoj aktivnosti tokom inkubacije kod lignocelulolitičkih gljiva [269, 270]. VP aktivnost nije uzeta u razmatranje prilikom modelovanja i optimizacije zbog niskih vrednosti (slika 45), mada su promene VP aktivnosti praćene, s obzirom na to da je VP zadužena za oksidaciju nefenolnih komponenti lignina [262]. Dodatak melasne džibre je imao pozitivan uticaj na VP aktivnost. Zabeležene vrednosti su bile niske, ali su u odsustvu melasne džibre aktivnosti bile na nivou statističke greške (slika 44).



Slika 44: Lakazna, MnP i VP aktivnosti dobijene nakon 7, 18 i 35 dana inkubacije pod optimalnim uslovima. VLS – lignocelulozni supstrat kome je vlažnost supstrata podešena samo destilovanom vodom; MLS – lignocelulozni supstrat kome je vlažnost supstrata podešena dodavanjem melasne džibre.



Slika 45: Promene aktivnosti verzatil peroksidaze (VP) tokom pod različitim kultivacionim uslovima, tj. tokom različitih eksperimenata.

#### 4.4.6. Enzimaska hidroliza i redukcija lignina

Efekat primenjenog koncepta na predtretman je ispitan proverom efikasnosti hidrolize i stepena redukcije Klasonovog lignina. Dobijeni rezultati su pokazali da je enzimaska hidroliza značajno unapređena primenom predtretmana (slika 46). Najbolji rezultati su dobijeni sa 18 i 35 dana tretmana supstrata suplementisanog melasnom džibrom (dobijene koncentracije šećera su, redom,  $63,58 \pm 1,47$  mg/ml i  $69,74 \pm 1,53$  mg/ml nakon 24 h saharifikacije) i sa 18 dana tretmana supstrata kome nije dodavana džibra ( $53,63 \pm 2,16$  mg/ml nakon 24 h saharifikacije). Ove koncentracije su bile, redom, 8, 8,8 i 6,8 puta više nego koncentracije netretiranog supstrata (NTS). Enzimskom hidrolizom NTS dobijeno je  $7,88 \pm 1,02$  mg/ml ekvivalenta glukoze nakon 24 h. Razlika je bila statistički značajna ( $p < 0,05$ ). Čak je i unapređenje saharifikacije postignuto sa sedam dana inkubacije bilo statistički značajno ( $p < 0,05$ ). Koncentracija šećera dobijena nakon 7 dana tretmana MLS supstrata je bila 2,5 puta koncentracije postignute netretiranim supstratom ( $20,54 \pm 0,80$  mg/ml nakon 24h), dok je 7 dana tretmana VLS dalo dvostruku koncentraciju šećera postignutu saharifikacijom NTS ( $16,84 \pm 0,30$  mg/ml nakon 24 h).

Razlika između tretiranog MLS i VLS je bila takođe statistički značajna ( $p < 0,05$ ). Unapređenje zabeleženo za MLS u odnosu na VLS ukazuje na to da ukoliko bi se melasna džibra primenjivala u predtretmanu, konverzija lignoceluloznog supstrata do fermentabilnih šećera bi mogla značajno da se unapredi. Ovakav rezultat ne iznenađuje s



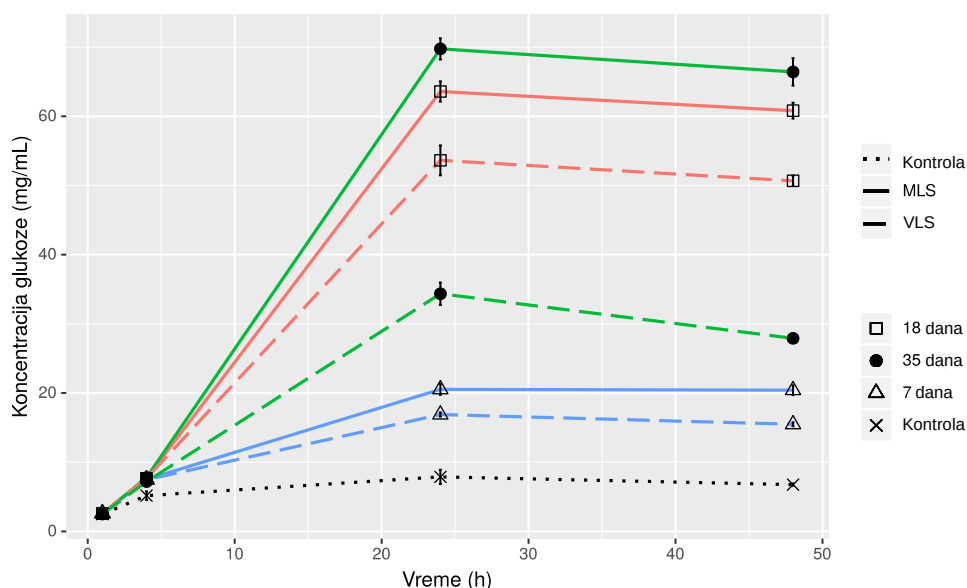
obzirom na to da je dodatak melasne džibre održao lakaznu i MnP aktivnost duže i na višem nivou nego u slučaju nego VLS (44), što je za posledicu imalo veću redukciju lignina nego kada džibra nije korišćena. Naime, redukcija Klasonovog lignina postignuta predtretmanom MLS supstrata je iznosila 29,23%, dok je predtretmanom VLS supstrata lignin redukovan za 23,48% (tabela 20). Koeficijent selektivnosti postignut tretmanom MLS je takođe bio viši (1,9) nego koeficijent selektivnosti postignut predtretmanom VLS (1,68), zbog čega ne iznenađuje i veća efikasnost hidrolize 18 dana tretiranog MLS. Najveća koncentracija šećera je oslobođena iz MLS tretiranog 35 dana, međutim razlika nije bila statistički značajna ( $p>0,05$ ). Redukcija lignina takođe nije bila značajno veća, naime nakon 35 dana razgrađeno je 32,67% Klasonovog lignina (tabela 20), čiji je udeo u tretiranom MLS bio viši nego nakon 18 dana tretmana. S obzirom na visoku efikasnost hidrolize, verovatno je tokom predtretmana dodatno razgrađena hemiceluloza čime je omogućeno da celulaza lakše priđe celulozi i rezultiralo većom efikasnošću hidrolize. Sa druge strane, efikasnost hidrolize 35 dana tretiranog VLS je bila slaba iako je redukcija lignina bila ~29% (tabela 20), što može ukazivati na nešto veće prisustvo kompleksnih veza između lignina i hemiceluloze.

Tabela 20: Redukcija biomase i lignina nakon 18 i 35 dana predtretmana MLS i VLS.

Supstrat	Redukcija biomase (%)	Redukcija Klasonovog lignina (%)	Udeo lignina (%)
<i>18 dana predtretmana</i>			
MLS	15	29,23	21,06
VLS	13,9	23,48	22,22
<i>35 dana predtretmana</i>			
MLS	22	32,67	21,6
VLS	19,6	29,11	22

Primena induktora ligninolitičkih enzima je pristup koji može da unapredi konverziju lignoceluloznog supstrata, ali je podataka na ovu temu još uvek nedovoljno. Mishra, V. i Jana, A.K. su koristili galnu kiselinu i  $\text{CuSO}_4$  u predtretmanu slatkog sirka pomoću gljive *Coriolus versicolor* što je unapredilo hidrolizu 2,2 puta [271]. Song, L. i sar. su ispitivali uticaj dodatka mangana (Mn) na predtretman kukuruznog otpada, koji se koristi u stočnoj hrane (eng. *corn stover*), pomoću gljive *Irpex lacteus* i postigli su značajno

unapređenje hidrolize biomase nakon 28 dana predtretmana [272]. Potumarthi, R. i sar. su tretirali pirinčane ljuske pomoću *Phanerochete chrysosporium*. Studija je kombinovala lignocelulozni otpad sa mineralnim medijumom za proizvodnju ligninolitičkih enzima i postignuti su dobri rezultati nakon 18 dana inkubacije [273]. U istraživanju sa izolatom *T. hirsuta* F13 izvedenom tokom izrade ove disertacije je korišćena melasna džibra kao dodatak i tom prilikom je unapređenje hidrolize uočeno nakon 18 dana, ali i nakon 7 dana inkubacije. Ovo je prvi izveštaj o unapređenju biokonverzije lignoceluloznog supstrata kao posledice primene melasne džibre kao suplementa, koje u isto vreme nudi i opciju za iskorišćenje ovog otpadnog agensa koji je još uvek nedovoljno iskorišćena i ukoliko se ne prečisti pre ispuštanja, predstavlja značajan zagađivač akvatičnih ekosistema.



Slika 46: Koncentracija redukujućih šećera ekvivalentna koncentraciji glukoze zabeležena nakon 1h, 4h, 24h i 48h saharifikacije kontrole (x), 7 dana (Δ), 18 dana (□) i 35 dana (●) tretiranog supstrata. (MLS – je supstrat kome je dodata melasna džibra pre tretmana izolatom *T. hirsuta* F13; VLS – supstrat kome nije dodavana melasna džibra pre tretmana izolatom *T. hirsuta* F13, vlažnost supstrata je podešena destilovanom vodom)

## 5. Zaključak

Tokom rada na ovoj disertaciji ispitivana je ligninolitička i hidrolitička aktivnost izolovanih autohtonih gljiva Srbije radi procene njihovog potencijala za primenu u biotehnološkim procesima na lignoceluloznom supstratu, kao i mogućnost unapređenja ligninolitičke aktivnosti odabranog izolata sa najvećim potencijalom za primenu u predtretmanu lignocelulozne biomase dodatkom melasne džibre poreklom od šećerne repe. Rezultati istraživanja su pokazali sledeće:

- Od 12 uspešno izolovanih gljiva, tri izolata identifikovana kao *Trametes hirsuta* F13, *Stereum gausapatum* F28 i *Myrmaecium fulvopruinatum* F14 su ispoljila najbolju ligninolitičku i/ili hidrolitičku aktivnost. Lignocelulolitički potencijal dve od tri istražene vrste, *S. gausapatum* i *M. fulvopruinatum*, je prvi put detaljnije ispitan tokom rada na ovoj disertaciji.
- *M. fulvopruinatum* F14 je bio izolat sa najboljom aktivnostima CMCaza i ksilanaza, ali je aktivnost ligninolitičkih enzima ovog izolata bila zanemarljiva zbog čega se ova gljiva nije podesna za korišćenje u tretmanu otpada lignoceluloznog porekla sa ciljem uklanjanja lignina. Međutim, ovaj izolat je pokazao visok potencijal kao proizvođač jakih celulaza i ksilanaza. Maksimalna aktivnost CMCaza od  $5682 \pm 327$  U/l i ksilanaza od  $7721 \pm 293$  U/l postignuta je na piljevini bukve SSF kultivacijom. Visok potencijal hidrolitičke aktivnosti ovog izolata je demonstriran hidrolizom celuloznog otpada ekstraktima njegovih enzima – oslobođeno je 4,6-4,8 g/l redukujućih šećera redukcijom 6% (w/v) i 10% (w/v) suspenzije otpadnih novina u acetatnom puferu pri koncentraciji enzima od 3 FPU, odnosno 18 CMCU.
- *T. hirsuta* F13 i *S. gausapatum* F28 su izolati sa jakim ligninolitičkim enzimima, dok su ispoljene hidrolitičke aktivnosti ovih izolata bile umerene (oko 1000 U/l). Ova dva izolata se razlikuju prema tipu dominantne enzimске aktivnosti. *S. gausapatum* F28 je bolji proizvođač mangan zavisnih peroksidaza, dok je *T. hirsuta* F13 bolji proizvođač lakaza. Iako je, generalno, SSF kultivacija pogodnija za postizanje visoke ligninolitičke aktivnosti, *T. hirsuta* F13 je uspešna u proizvodnji lakaze i u tečnom medijumu. Najbolja lakazna aktivnost zabeležena

ovim izolatom ( $315,9 \pm 0,7$  U/l) postignuta je nakon 7 dana inkubacije u tečnom mineralnom medijumu u statičkim uslovima pri čemu je piljevina bukve korišćena kao izvor ugljenika.

- Vlažnost supstrata se pokazala kao jedan od značajnijih faktora koji utiču na tip ligninolitičke aktivnosti izolata *T. hirsuta* F13 i *S. gausapatum* F28. Naime, pri nižim vlažnostima supstrata (ispod 68%) je dominantna bila mangan peroksidazna aktivnost, a pri višim vlažnostima (iznad 75%) lakazna aktivnost. Bolja ligninolitička aktivnost izolata *S. gausapatum* F28 je zabeležena pri nižim vlažnostima supstrata, što ne iznenađuje jer je dominantni enzim ligninolitičkog sistema ovog izolata mangan zavisna peroksidaza, ali je uočeno i da je za postizanje visoke lakazne aktivnosti ovog izolata potrebna niža vlažnost supstrata za razliku od izolata *T. hirsuta* F13. Promene u tipu ispoljene ligninolitičke aktivnosti povezane sa promenama vlažnosti supstrata bile su izraženije u eksperimentima sa izolatom *T. hirsuta* F13 nego *S. gausapatum* F28.
- Ispitivanjem potencijala za primenu u predtretmanu lignocelulozne biomase utvrđeno je da oba izolata i *T. hirsuta* F13 i *S. gausapatum* F28 mogu efikasno razgraditi lignocelulozu. U slučaju oba izolata postignuta je selektivna razgradnja, koeficijent selektivnosti je bio iznad 1, ali je značajno bolju selektivnost ispoljio izolat *T. hirsuta* F13 (koeficijent selektivnosti 1,7) u odnosu na *S. gausapatum* F28 (koeficijent selektivnosti 1,1). Dobijene vrednosti koeficijenata selektivnosti su pokazale da *T. hirsuta* F13 brže razgrađuje lignin, a sporije celulozu u odnosu na *S. gausapatum* F28 što ga čini boljim kandidatom za primenu u predtretmanu lignocelulozne biomase, zbog čega je odabran za dalje istraživanje tokom rada na ovoj disertaciji.
- Tokom istraživanja je utvrđeno da primena mineralnog medijuma može značajno unaprediti ligninolitičku aktivnost gljiva, kao i da primena otpadne melasne džibre može biti adekvatna zamena mineralnom medijumu ako se primenjuje kao suplement. Takođe uočeno je da se pri različitim koncentracijama melasne džibre razlikuje dominantni tip ligninolitičke aktivnosti.
- Primena metode odgovora površine je potvrdila da su uslovi vlažnosti supstrata potrebni za proizvodnju lakaza i mangan zavisnih peroksidaza suprotni, ali da isto

važi i za koncentraciju džibre i temperaturu inkubacije. Analize su pokazale da koncentracije melasne džibre više od 20%, vlažnost supstrata viša od 80% i temperatura inkubacije viša od 28 °C pogoduje proizvodnji lakaze izolata *T. hirsuta* F13, dok koncentracija džibre oko 14%, vlažnost supstrata oko 62% i temperatura inkubacije oko 25 °C pogoduje više proizvodnji mangan zavisnih peroksidaza.

- Tokom istraživanja je uočeno da pri aktivnostima lakaze izolata *T. hirsuta* F13 višim od 50 U/l, aktivnost CMCaza i ksilanaza drastično opada. Ovaj podatak je bio značajan pri optimizaciji kultivacionih uslova koji bi se primenjivali u predtretmanu piljevine bukve, ili generalno lignoceluloznog materijala, posebno zbog činjenice da su uslovi za proizvodnju lakazne i mangan peroksidazne aktivnosti kontradiktorni. Poželjno kompromisno rešenje optimizacije je podrazumevalo uslove koji mogu dati minimum 50 U/l lakazne aktivnosti (zbog inhibitornog dejstva na hidrolitičke enzime), kao i mangan peroksidaznu aktivnost približno ili iznad 88,2 U/l. Primenom funkcije poželjnosti i genetičkog algoritma kao kompromisno rešenje dobijeni su sledeći uslovi: koncentracija džibre 13%, vlažnost supstrata 63% i temperatura 25 °C. Vrednost globalne funkcije poželjnosti bila 0,714. Predviđene vrednosti lakazne i MnP aktivnosti za odabrane kultivacione uslove su bile, redom, 54.3 U/l i 86.3 U/l, dok su eksperimentalne vrednosti dobijene primenom preporučenih parametara bile, redom, 51,5±3,5 U/l i 91±4,24 U/l.
- Dodatak melasne džibre pod dobijenim optimalnim kultivacionim uslovima je značajno unapredio lakaznu i mangan peroksidaznu aktivnost. Nakon sedam dana inkubacije dobijena lakazna aktivnost je bila ~2,4 puta veća kada je melasna džibra korišćena kao suplement, dok je MnP aktivnost bila ~3 puta veća nego kada nije korišćena kao suplement. Razlika je bila statistički značajna ( $p < 0,05$ ).
- Primena melasne džibre pod optimalnim kultivacionim uslovima je značajno unapredila i predtretman, što je rezultiralo povećanom efikasnošću hidrolize. Nakon 24 h hidrolize supstrata, tretiranog 18 i 35 dana glijivom *T. hirsuta* F13 u prisustvu melasne džibre, industrijskim enzimom Cellic CTec2 oslobođeno je, redom, 63,58±1,47 mg/ml i 69,74±1,53 mg/ml redukujućih šećera, dok je iz

supstrata bez dodate džibre tretiranog 18 dana izolatom dobijeno  $53,63 \pm 2,16$  mg/ml redukujućih šećera. Ove koncentracije su 8, 8,8 i 6,8 puta više od koncentracije šećera oslobođenog iz netretiranog supstrata ( $7,88 \pm 1,02$  mg/ml). Hidrolizom sedam dana tretiranog supstrata suplementisanog i nesuplementisanog melasnom džibrom dobijene su, redom  $\sim 2,5$  i  $\sim 2$  puta više koncentracije redukujućih šećera u odnosu na netretiran supstrat.

- Dodatak melasne džibre je uticao na poboljšanu selektivnosti razgradnje lignoceluloze. Nakon 18 dana koeficijent selektivnosti postignut predtretmanom supstrata suplementisanog melasnom džibrom je bio (1,9), dok je na supstratu bez suplementacije razgradnja supstrata bila manje selektivna (1,68) zbog čega ne iznenađuje veća efikasnost hidrolize supstrata tretiranog u prisustvu džibre. Nakon 35 dana inkubacije, koeficijent selektivnosti predtretiranog supstrata sa dodatkom melasne džibre je bio niži nego nakon 18 dana i približne vrednosti kao i supstrat kome nije dodata džibra, ali je redukcija lignina bila nešto viša, a i efikasnost hidrolize je bila bolja kod supstrata koji je tretiran u prisustvu džibre, što može ukazivati na nešto veće prisustvo kompleksnih veza između lignina i hemiceluloze u supstratu koji je tretiran u odsustvu džibre.

Ostvareni doprinos ove disertacije:

- Izolovane su i identifikovane autohtone gljive Srbije sa visokim potencijalom za primenu u različitim tehnološkim procesima, od predtretmana lignoceluloznog supstrata, do proizvodnje hidrolitičkih enzima i primene u hidrolizi celuloznog materijala.
- Ispitana je i potvrđena mogućnost primene otpadne džibre poreklom od šećerne repe za unapređenje ligninolitičke aktivnosti odabranog izolata.
- Razvijen je model primene džibre u predtretmanu lignocelulozne biomase gljivom *T. hirsuta* F13 čime je ponuđeno jedno od mogućih rešenja problema odlaganja ovog opasnog otpada.
- Pokazano je da se primenom eksperimentalnog dizajna, funkcije poželjnosti i genetičkog algoritma može optimizovati biološki proces tretmana lignoceluloznog

otpada pomoću gljive *T. hirsuta* F13, što je rezultiralo olakšanoj enzimskoj hidrolizi.

- Primjenjena metoda predtretmana nije zahtevala dodatno ulaganje hemikalija, ili prečišćavanje opasnih sporednih proizvoda, koje dodatno poskupljuju proces. Kao finalni rezultat disertacije je ekološki i ekonomski povoljna biološka metoda.

Budući pravci istraživanja:

- Ispitivanje potencijalne primene izolata *T. hirsuta* F13 i *S. gausapatum* F13 u razgradnji toksičnih komponenti slične strukture ligninu (pesticida, fenola...).
- Ispitivanje uslova predtretmana široko rasprostranjenog lignoceluloznog otpada poreklom iz poljoprivrede izolovanim ligninolitičkim gljivama.
- Proizvodnja, karakterizacija, imobilizacija i primena ligninolitičkih enzima izolata *T. hirsuta* F13 i *S. gausapatum* F28 u bioremedijaciji zemljišta ili otpadnih voda.
- Optimizacija proizvodnje hidrolitičkih enzima izolata *M. fulvopruinatum* F14, izolacija, karakterizacija i primena ovih enzima u proizvodnji biotenola umesto skupih komercijalnih enzima.

## 6. Literatura

- [1] Srirangan, K.; Akawi, L.; Moo-Young, M. and Chou, C.P.: Towards sustainable production of clean energy carriers from biomass resources, *Applied Energy*, **100** (2012), pp. 172–186.
- [2] Malik, A.S.: Sustainable development: ecology and economic growth, *Handbook of Climate Change Mitigation*, Springer US, New York, NY, 2012, pp. 197–233.
- [3] Martínez de Alegría Mancisidor, I.; Vicente Molina, M.A. and Larrea Basterra, M.: Promotion of renewables and energy efficiency by politics: case study of the European Union, *Handbook of Climate Change Mitigation*, Springer US, New York, NY, 2012, pp. 277–318.
- [4] Semenčenko, V.V.; Mojović, L.V.; Petrović, S.D. and Očić, O.J.: Novi trendovi u proizvodnji bioetanol, *Hemijska industrija*, **65** (2011), no. 2, pp. 103–114.
- [5] Mojović, L.; Šiler-Marinković, S.; Rakin, M.; Vukašinović, M.; Povrenović, D.; Skala, D.; Orlović, A.; Nikolić, S.; Pejin, D.; Popov, S. and others: *Bioetanol kao gorivo: stanje i perspektive : monografija*, Tehnološki fakultet, 2007.
- [6] Ghaemi, F.; Abdullah, L.C. and Ariffin, H.: Chapter 2 - Lignocellulose structure and the effect on nanocellulose production, *Lignocellulose for Future Bioeconomy*, Elsevier, 2019, pp. 17–30.
- [7] Chandel, A. and Da Silva, S.S.: Sustainable degradation of lignocellulosic biomass: techniques, applications and commercialization, IntechOpen, 2013.
- [8] Tiwari, P.; Misra, B.N. and Sangwan, N.S.:  $\beta$ -Glucosidases from the fungus *Trichoderma*: An efficient cellulase machinery in biotechnological applications, *BioMed Research International*, <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/203735/>, accessed 13 May 2020.



- [9] Jönsson, L.J. and Martín, C.: Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects, *Bioresource Technology*, **199** (2016), pp. 103–112.
- [10] Sperandio, G.B. and Ferreira Filho, E.X.: Fungal co-cultures in the lignocellulosic biorefinery context: A review, *International Biodeterioration & Biodegradation*, **142** (2019), pp. 109–123.
- [11] Chang, C.-W. and Webb, C.: Production of a generic microbial feedstock for lignocellulose biorefineries through sequential bioprocessing, *Bioresource Technology*, **227** (2017), pp. 35–43.
- [12] Taherzadeh, M.J. and Karimi, K.: Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review, *International Journal of Molecular Sciences*, **9** (2008), no. 9, pp. 1621–1651.
- [13] Thakur, I.S.: *Industrial biotechnology: problems and remedies*, I.K. International Publishing House Pvt. Limited, 2013.
- [14] Maza, M.; Pajot, H.F.; Amoroso, M.J. and Yasem, M.G.: Post-harvest sugarcane residue degradation by autochthonous fungi, *International Biodeterioration & Biodegradation*, **87** (2014), pp. 18–25.
- [15] Kapoor, A.; Viraraghavan, T. and Cullimore, D.R.: Removal of heavy metals using the fungus *Aspergillus niger*, *Bioresource Technology*, **70** (1999), no. 1, pp. 95–104.
- [16] Acosta-Rodríguez, I.; Cárdenas-González, J.F.; Rodríguez Pérez, A.S.; Oviedo, J.T. and Martínez-Juárez, V.M.: Bioremoval of different heavy metals by the resistant fungal strain *Aspergillus niger*, *Bioinorganic Chemistry and Applications*, <https://www.hindawi.com/journals/bca/2018/3457196/>, accessed 13 May 2020.
- [17] Yan, G. and Viraraghavan, T.: Heavy-metal removal from aqueous solution by fungus *Mucor rouxii*, *Water Research*, **37** (2003), no. 18, pp. 4486–4496.

- [18] D'Annibale, A.; Rosetto, F.; Leonardi, V.; Federici, F. and Petruccioli, M.: Role of autochthonous filamentous fungi in bioremediation of a soil historically contaminated with aromatic hydrocarbons, *Applied and Environmental Microbiology*, **72** (2006), no. 1, pp. 28–36.
- [19] Siripong, P.; Oraphin, B.; Sanro, T. and Duanporn, P.: Screening of fungi from natural sources in Thailand for degradation of polychlorinated hydrocarbons., *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science*, **5** (2009), no. 4, pp. 466–472.
- [20] Field, J.A.; de Jong, E.; Feijoo Costa, G. and de Bont, J.A.: Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white rot fungi., *Applied and Environmental Microbiology*, **58** (1992), no. 7, pp. 2219–2226.
- [21] Agrawal, N.; Verma, P. and Shahi, S.K.: Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (phenanthrene and pyrene) by the ligninolytic fungi *Ganoderma lucidum* isolated from the hardwood stump, *Bioresources and Bioprocessing*, **5** (2018), no. 1, p. 11.
- [22] Takada, S.; Nakamura, M.; Matsueda, T.; Kondo, R. and Sakai, K.: Degradation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans by the white rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624., *Applied and Environmental Microbiology*, **62** (1996), no. 12, pp. 4323–4328.
- [23] Mori, T. and Kondo, R.: Degradation of 2,7-dichlorodibenzo-p-dioxin by wood-rotting fungi, screened by dioxin degrading ability, *FEMS Microbiology Letters*, **213** (2002), no. 1, pp. 127–131.
- [24] Cerniglia, C.E. and Sutherland, J.B.: Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi, *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, Springer, Berlin, Heidelberg, 2010, pp. 2079–2110.
- [25] Tigini, V.; Prigione, V.; Di Toro, S.; Fava, F. and Varese, G.C.: Isolation and characterisation of polychlorinated biphenyl (PCB) degrading fungi from a historically contaminated soil, *Microbial Cell Factories*, **8** (2009), p. 5.

- [26] Cvančarová, M.; Křesinová, Z.; Filipová, A.; Covino, S. and Cajthaml, T.: Biodegradation of PCBs by ligninolytic fungi and characterization of the degradation products, *Chemosphere*, **88** (2012), no. 11, pp. 1317–1323.
- [27] Pizzul, L.; Castillo, M. del P. and Stenström, J.: Degradation of glyphosate and other pesticides by ligninolytic enzymes, *Biodegradation*, **20** (2009), no. 6, p. 751.
- [28] Purnomo, A.S.; Mori, T. and Kondo, R.: Involvement of Fenton reaction in DDT degradation by brown-rot fungi, *International Biodeterioration & Biodegradation*, **64** (2010), no. 7, pp. 560–565.
- [29] Ulčnik, A.; Kralj Cigić, I. and Pohleven, F.: Degradation of lindane and endosulfan by fungi, fungal and bacterial laccases, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **29** (2013), no. 12, pp. 2239–2247.
- [30] Harmsen, P.F.H.; Huijgen, W.; Bermudez, L. and Bakker, R.: Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass, Wageningen UR - Food & Biobased Research, 2010.
- [31] Mussatto, S.I.; Ballesteros, L.F.; Martins, S. and Teixeira, J.A.: Use of agro-industrial wastes in solid-state fermentation processes, *Industrial Waste*, (2012), pp. 121–140.
- [32] Lee, D.K.; University, S.D.S. and Initiative, S.G.: Composition of herbaceous biomass feedstocks, North Central Sun Grant Center, South Dakota State University, 2007.
- [33] Teeri, T.T.: Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases, *Trends in Biotechnology*, **15** (1997), no. 5, pp. 160–167.
- [34] Wada, M.; Nishiyama, Y.; Chanzy, H.; Forsyth, T. and Langan, P.: The structure of celluloses, *Powder Diffraction*, **23** (2008), no. 2, pp. 92–95.
- [35] Agarwal, V.; Huber, G.W.; Conner, W.C. and Auerbach, S.M.: Simulating infrared spectra and hydrogen bonding in cellulose I $\beta$  at elevated temperatures, *The Journal of Chemical Physics*, **135** (2011), no. 13, p. 134506.

- [36] Jacobsen, S.E. and Wyman, C.E.: Cellulose and hemicellulose hydrolysis models for application to current and novel pretreatment processes, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **84** (2000), no. 1, pp. 81–96.
- [37] Fang, Z. ed.: *Pretreatment techniques for biofuels and biorefineries*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2013.
- [38] Pure lignin environmental technology's | Pure Lignin Environmental Technology's. invest in the future, <https://www.purelignin.com>, accessed 2 May 2020.
- [39] Chabannes, M.; Ruel, K.; Yoshinaga, A.; Chabbert, B.; Jauneau, A.; Joseleau, J.-P. and Boudet, A.-M.: In situ analysis of lignins in transgenic tobacco reveals a differential impact of individual transformations on the spatial patterns of lignin deposition at the cellular and subcellular levels, *The Plant Journal*, **28** (2001), no. 3, pp. 271–282.
- [40] Marković, J.P.; Radović, J.B.; Štrbanović, R.T.; Bajić, D.S. and Vrvic, M.M.: Changes in the infrared attenuated total reflectance (ATR) spectra of lignins from alfalfa stem with growth and development, *Journal of the Serbian Chemical Society*, **74** (2009), nos. 8–9, pp. 885–892.
- [41] Vanholme, R.; Demedts, B.; Morreel, K.; Ralph, J. and Boerjan, W.: Lignin biosynthesis and structure, *Plant Physiology*, **153** (2010), no. 3, pp. 895–905.
- [42] Gupta, V.K. and Tuohy, M.G. eds.: *Biofuel technologies: recent developments*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2013.
- [43] Ralph, J.; Lapierre, C.; Marita, J.M.; Kim, H.; Lu, F.; Hatfield, R.D.; Ralph, S.; Chapple, C.; Franke, R.; Hemm, M.R.; Van Doorselaere, J.; Sederoff, R.R.; O'Malley, D.M.; Scott, J.T.; MacKay, J.J.; Yahiaoui, N.; Boudet, A.-M.; Pean, M.; Pilate, G.; Jouanin, L. and Boerjan, W.: Elucidation of new structures in lignins of CAD- and COMT-deficient plants by NMR, *Phytochemistry*, **57** (2001), no. 6, pp. 993–1003.
- [44] Huang, J.; Fu, S. and Gan, L. eds.: Chapter 2 - Structure and characteristics of lignin, *Lignin Chemistry and Applications*, Elsevier, 2019, pp. 25–50.

- [45] Chundawat, S.P.S.; Beckham, G.T.; Himmel, M.E. and Dale, B.E.: Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals, *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, **2** (2011), no. 1, pp. 121–145.
- [46] Chang, V.S. and Holtzapple, M.T.: Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **84** (2000), no. 1, pp. 5–37.
- [47] Agbor, V.B.; Cicek, N.; Sparling, R.; Berlin, A. and Levin, D.B.: Biomass pretreatment: fundamentals toward application, *Biotechnology Advances*, **29** (2011), no. 6, pp. 675–685.
- [48] Zheng, Y.; Pan, Z. and Zhang, R.: Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production, *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, **2** (2009), no. 3, pp. 51–68.
- [49] Miao, Z.; Grift, T.E.; Hansen, A.C. and Ting, K.C.: Energy requirement for comminution of biomass in relation to particle physical properties, *Industrial Crops and Products*, **33** (2011), no. 2, pp. 504–513.
- [50] Zhu, J.Y. and Pan, X.J.: Woody biomass pretreatment for cellulosic ethanol production: technology and energy consumption evaluation, *Bioresource Technology*, **101** (2010), no. 13, pp. 4992–5002.
- [51] Kucharska, K.; Rybarczyk, P.; Hołowacz, I.; Łukajtis, R.; Glinka, M. and Kamiński, M.: Pretreatment of lignocellulosic materials as substrates for fermentation processes, *Molecules*, **23** (2018), no. 11, p. 2937.
- [52] Wang, K.; Xiong, X.; Chen, J.; Chen, L.; Su, X. and Liu, Y.: Comparison of gamma irradiation and steam explosion pretreatment for ethanol production from agricultural residues, *Biomass and Bioenergy*, **46** (2012), pp. 301–308.
- [53] Karthika, K.; Arun, A.B.; Melo, J.S.; Mittal, K.C.; Kumar, M. and Rekha, P.D.: Hydrolysis of acid and alkali presoaked lignocellulosic biomass exposed to electron beam irradiation, *Bioresource Technology*, **129** (2013), pp. 646–649.

- [54] Kunaver, M.; Jasiukaitytė, E. and Čuk, N.: Ultrasonically assisted liquefaction of lignocellulosic materials, *Bioresource Technology*, **103** (2012), no. 1, pp. 360–366.
- [55] Keshwani, D.R.; Cheng, J.J.; Burns, J.C.; Li, L. and Chiang, V.: Microwave pretreatment of switchgrass to enhance enzymatic hydrolysis, *Conference Presentations and White Papers: Biological Systems Engineering*, (2007).
- [56] Ding, T.Y.; Hii, S.L. and Ong, L.: Comparison of pretreatment strategies for conversion of coconut husk fiber to fermentable sugars, *BioResources*, **7** (2012), no. 2, pp. 1540–1547.
- [57] Nomanbhay, S.M.; Hussain, R. and Palanisamy, K.: Microwave-assisted alkaline pretreatment and microwave assisted enzymatic saccharification of oil palm empty fruit bunch fiber for enhanced fermentable sugar yield, *Journal of Sustainable Bioenergy Systems*, **3** (2013), no. 1, pp. 7–17.
- [58] Xiao, R.; Chen, X.; Wang, F. and Yu, G.: Pyrolysis pretreatment of biomass for entrained-flow gasification, *Applied Energy*, **87** (2010), no. 1, pp. 149–155.
- [59] Hjorth, M.; Gränitz, K.; Adamsen, A.P.S. and Møller, H.B.: Extrusion as a pretreatment to increase biogas production, *Bioresource Technology*, **102** (2011), no. 8, pp. 4989–4994.
- [60] Lamsal, B.; Yoo, J.; Brijwani, K. and Alavi, S.: Extrusion as a thermo-mechanical pre-treatment for lignocellulosic ethanol, *Biomass and Bioenergy*, **34** (2010), no. 12, pp. 1703–1710.
- [61] Garrote, G.; Domínguez, H. and Parajó, J.C.: Hydrothermal processing of lignocellulosic materials, *Holz als Roh- und Werkstoff*, **57** (1999), no. 3, pp. 191–202.
- [62] Ma, M.-G.; Jia, N.; Zhu, J.-F.; Li, S.-M.; Peng, F. and Sun, R.-C.: Isolation and characterization of hemicelluloses extracted by hydrothermal pretreatment, *Bioresource Technology*, **114** (2012), pp. 677–683.
- [63] Sun, Y. and Cheng, J.: Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review, *Bioresource Technology*, **83** (2002), no. 1, pp. 1–11.

- [64] Mosier, N.; Wyman, C.; Dale, B.; Elander, R.; Lee, Y.Y.; Holtzapple, M. and Ladisch, M.: Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass, *Bioresource Technology*, **96** (2005), no. 6, pp. 673–686.
- [65] Horn, S.J.; Estevez, M.M.; Nielsen, H.K.; Linjordet, R. and Eijsink, V.G.H.: Biogas production and saccharification of *Salix* pretreated at different steam explosion conditions, *Bioresource Technology*, **102** (2011), no. 17, pp. 7932–7936.
- [66] Teymouri, F.; Laureano-Pérez, L.; Alizadeh, H. and Dale, B.E.: Ammonia fiber explosion treatment of corn stover, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **115** (2004), no. 1, pp. 951–963.
- [67] Hu, F. and Ragauskas, A.: Pretreatment and lignocellulosic chemistry, *BioEnergy Research*, **5** (2012), no. 4, pp. 1043–1066.
- [68] Alizadeh, H.; Teymouri, F.; Gilbert, T.I. and Dale, B.E.: Pretreatment of switchgrass by ammonia fiber explosion (AFEX), *Twenty-Sixth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*, Humana Press, Totowa, NJ, 2005, pp. 1133–1141.
- [69] Alvira, P.; Tomás-Pejó, E.; Ballesteros, M. and Negro, M.J.: Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review, *Bioresource Technology*, **101** (2010), no. 13, pp. 4851–4861.
- [70] Zheng, Y.; Lin, H.-M. and Tsao, G.T.: Pretreatment for cellulose hydrolysis by carbon dioxide explosion, *Biotechnology Progress*, **14** (1998), no. 6, pp. 890–896.
- [71] Narayanaswamy, N.; Faik, A.; Goetz, D.J. and Gu, T.: Supercritical carbon dioxide pretreatment of corn stover and switchgrass for lignocellulosic ethanol production, *Bioresource Technology*, **102** (2011), no. 13, pp. 6995–7000.
- [72] Srinivasan, N. and Ju, L.-K.: Pretreatment of guayule biomass using supercritical carbon dioxide-based method, *Bioresource Technology*, **101** (2010), no. 24, pp. 9785–9791.

- [73] García-Cubero, M.T.; González-Benito, G.; Indacoechea, I.; Coca, M. and Bolado, S.: Effect of ozonolysis pretreatment on enzymatic digestibility of wheat and rye straw, *Bioresource Technology*, **100** (2009), no. 4, pp. 1608–1613.
- [74] Silverstein, R.A.; Chen, Y.; Sharma-Shivappa, R.R.; Boyette, M.D. and Osborne, J.: A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks, *Bioresource Technology*, **98** (2007), no. 16, pp. 3000–3011.
- [75] Haghghi Mood, S.; Hossein Golfeshan, A.; Tabatabaei, M.; Salehi Jouzani, G.; Najafi, G.H.; Gholami, M. and Ardjmand, M.: Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **27** (2013), pp. 77–93.
- [76] Bahcegul, E.; Toraman, H.E.; Ozkan, N. and Bakir, U.: Evaluation of alkaline pretreatment temperature on a multi-product basis for the co-production of glucose and hemicellulose based films from lignocellulosic biomass, *Bioresource Technology*, **103** (2012), no. 1, pp. 440–445.
- [77] Yamashita, Y.; Shono, M.; Sasaki, C. and Nakamura, Y.: Alkaline peroxide pretreatment for efficient enzymatic saccharification of bamboo, *Carbohydrate Polymers*, **79** (2010), no. 4, pp. 914–920.
- [78] Banerjee, G.; Car, S.; Scott-Craig, J.S.; Hodge, D.B. and Walton, J.D.: Alkaline peroxide pretreatment of corn stover: effects of biomass, peroxide, and enzyme loading and composition on yields of glucose and xylose, *Biotechnology for Biofuels*, **4** (2011), no. 1, p. 16.
- [79] Itoh, H.; Wada, M.; Honda, Y.; Kuwahara, M. and Watanabe, T.: Bioorganosolve pretreatments for simultaneous saccharification and fermentation of beech wood by ethanolysis and white rot fungi, *Journal of Biotechnology*, **103** (2003), no. 3, pp. 273–280.
- [80] Balan, V.; da Costa Sousa, L.; Chundawat, S.P.S.; Vismeh, R.; Jones, A.D. and Dale, B.E.: Mushroom spent straw: a potential substrate for an ethanol-based



- biorefinery, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **35** (2008), no. 5, pp. 293–301.
- [81] Yu, J.; Zhang, J.; He, J.; Liu, Z. and Yu, Z.: Combinations of mild physical or chemical pretreatment with biological pretreatment for enzymatic hydrolysis of rice hull, *Bioresource Technology*, **100** (2009), no. 2, pp. 903–908.
- [82] Hatakka, A.: Biodegradation of lignin, *Biopolymers Online*, American Cancer Society, 2005.
- [83] Isroi; Millati, R.; Syamsiah, S.; Niklasson, C.; Cahyanto, M.N.; Lundquist, K. and Taherzadeh, M.J.: Biological pretreatment of lignocelluloses with white-rot fungi and its applications: a review., *BioResources*, **6** (2011), no. 4, pp. 5224–5259.
- [84] Gore, A.B. and Gore, R.B.: *Environmental research at the leading edge*, Nova Science Publishers, 2007.
- [85] Monroy, M.; Ortega, I.; Ramírez, M.; Baeza, J. and Freer, J.: Structural change in wood by brown rot fungi and effect on enzymatic hydrolysis, *Enzyme and Microbial Technology*, **49** (2011), no. 5, pp. 472–477.
- [86] Jin, L.; Schultz, T.P. and Nicholas, D.D.: Structural characterization of brown-rotted lignin, *Holzforschung*, **44** (1990), no. 2, pp. 133–138.
- [87] Blanchette, R.A.; Held, B.W.; Jurgens, J.A.; McNew, D.L.; Harrington, T.C.; Duncan, S.M. and Farrell, R.L.: Wood-destroying soft rot fungi in the historic expedition huts of Antarctica, *Applied and Environmental Microbiology*, **70** (2004), no. 3, pp. 1328–1335.
- [88] Bayer, E.A.; Shimon, L.J.W.; Shoham, Y. and Lamed, R.: Cellulosomes—structure and ultrastructure, *Journal of Structural Biology*, **124** (1998), no. 2, pp. 221–234.
- [89] Ritschkoff, A.-C.: *Decay mechanisms of brown-rot fungi*, VTT Technical Research Centre of Finland, 1996.

- [90] Gupta, P.; Lakes, A. and Dziubla, T.: Chapter one - A free radical primer, *Oxidative Stress and Biomaterials*, Academic Press, 2016, pp. 1–33.
- [91] Youn, H.-D.; Hah, Y.C. and Kang, S.-O.: Role of laccase in lignin degradation by white-rot fungi, *FEMS Microbiology Letters*, **132** (1995), no. 3, pp. 183–188.
- [92] Lundell, T.; Wever, R.; Floris, R.; Harvey, P.; Hatakka, A.; Brunow, G. and Schoemaker, H.: Lignin peroxidase L3 from *Phlebia radiata*, *European Journal of Biochemistry*, **211** (1993), no. 3, pp. 391–4020.
- [93] Eriksson, K.-E.L. and Bermek, H.: Lignin, lignocellulose, ligninase, *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)*, Academic Press, Oxford, 2009, pp. 373–384.
- [94] Blodig, W.; Smith, A.T.; Winterhalter, K. and Piontek, K.: Evidence from spin-trapping for a transient radical on tryptophan residue 171 of lignin peroxidase, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **370** (1999), no. 1, pp. 86–92.
- [95] Hofrichter, M.: Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP), *Enzyme and Microbial Technology*, **30** (2002), no. 4, pp. 454–466.
- [96] Paice, M.G.; Reid, I.D.; Bourbonnais, R.; Archibald, F.S. and Jurasek, L.: Manganese peroxidase, produced by *Trametes versicolor* during pulp bleaching, demethylates and delignifies kraft pulp, *Applied and Environmental Microbiology*, **59** (1993), no. 1, pp. 260–265.
- [97] Wong, D.W.S.: Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **157** (2009), no. 2, pp. 174–209.
- [98] Koduri, R.S. and Tien, M.: Oxidation of guaiacol by lignin peroxidase. Role of veratryl alcohol, *Journal of Biological Chemistry*, **270** (1995), no. 38, pp. 22254–22258.
- [99] Mansfield, S.D.; De Jong, E. and Saddler, J.N.: Cellobiose dehydrogenase, an active agent in cellulose depolymerization, *Applied and Environmental Microbiology*, **63** (1997), no. 10, pp. 3804–3809.

- [100] Henriksson, G.; Zhang, L.; Li, J.; Ljungquist, P.; Reitberger, T.; Pettersson, G. and Johansson, G.: Is cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium* a lignin degrading enzyme?, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, **1480** (2000), no. 1, pp. 83–91.
- [101] Henriksson, G.; Johansson, G. and Pettersson, G.: A critical review of cellobiose dehydrogenases, *Journal of Biotechnology*, **78** (2000), no. 2, pp. 93–113.
- [102] Roy, B.P.; Dumonceaux, T.; Koukoulas, A.A. and Archibald, F.S.: Purification and characterization of cellobiose dehydrogenases from the white rot fungus *Trametes versicolor*, *Applied and Environmental Microbiology*, **62** (1996), no. 12, pp. 4417–4427.
- [103] Sweeney, M.D. and Xu, F.: Biomass converting enzymes as industrial biocatalysts for fuels and chemicals: recent developments, *Catalysts*, **2** (2012), no. 2, pp. 244–263.
- [104] Semêdo, L.T.A.S.; Gomes, R.C.; Bon, E.P.S.; Soares, R.M.A.; Linhares, L.F. and Coelho, R.R.R.: Endocellulase and exocellulase activities of two *Streptomyces* strains isolated from a forest soil, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **84** (2000), no. 1, pp. 267–276.
- [105] Kaur, J.; Chadha, B.S.; Kumar, B.A.; Ghatora, S.K. and Saini, H.S.: Purification and characterization of  $\beta$ -glucosidase from *Melanocarpus* sp. MTCC 3922, *Electronic Journal of Biotechnology*, **10** (2007), no. 2, pp. 0–0.
- [106] Varnaitė, R. and Raudonienė, V.: Destruction of hemicellulose in rye straw by micromycetes, *Ekologija*, **54** (2008), no. 3.
- [107] Vivanco, J.M. and Baluska, F. eds.: *Secretions and exudates in biological systems*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2012.
- [108] Krisana, A.; Rutchadapornng, S.; Jarupan, G.; Lily, E.; Sutipa, T. and Kanyawim, K.: Endo-1,4- $\beta$ -xylanase B from *Aspergillus cf. niger* BCC14405 isolated in Thailand: purification, characterization and gene isolation, *BMB Reports*, **38** (2005), no. 1, pp. 17–23.

- [109] Young, R.A. and Akhtar, M.: Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry, J. Wiley, 1998.
- [110] Lee, J.: Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol, Journal of Biotechnology, **56** (1997), no. 1, pp. 1–24.
- [111] Bak, J.S.; Ko, J.K.; Choi, I.-G.; Park, Y.-C.; Seo, J.-H. and Kim, K.H.: Fungal pretreatment of lignocellulose by *Phanerochaete chrysosporium* to produce ethanol from rice straw, Biotechnology and Bioengineering, **104** (2009), no. 3, pp. 471–482.
- [112] Phutela, U.G.; Kaur, K.; Gangwar, M. and Khullar, N.K.: Effect of *Pleurotus florida* on paddy straw digestibility and biogas production, International Journal of Life Sciences, **6** (2012), no. 1, pp. 14–19.
- [113] Feng, X. and del Pilar Castillo, M.: Fungal pretreatment of straw for enhanced biogas yield, SGC Rapport, 2013.
- [114] Mahmoud, Y. a.-G.: Biodegradation of water hyacinth by growing *Pleurotus ostreatus* and *P. sajor-cajuand* trial for using in production of mushroom spawn, Acta Alimentaria, **35** (2006), no. 1, pp. 63–72.
- [115] Wan, C. and Li, Y.: Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass, Biotechnology Advances, **30** (2012), no. 6, pp. 1447–1457.
- [116] Nazarpour, F.; Abdullah, D.K.; Abdullah, N.; Motedayen, N. and Zamiri, R.: Biological pretreatment of rubberwood with *Ceriporiopsis subvermispora* for enzymatic hydrolysis and bioethanol production, BioMed Research International, <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/268349/>, accessed 4 May 2020.
- [117] Membrillo, I.; Sánchez, C.; Meneses, M.; Favela, E. and Loera, O.: Effect of substrate particle size and additional nitrogen source on production of lignocellulolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* strains, Bioresource Technology, **99** (2008), no. 16, pp. 7842–7847.

- [118] Wan, C. and Li, Y.: Microbial pretreatment of corn stover with *Ceriporiopsis subvermispora* for enzymatic hydrolysis and ethanol production, *Bioresource Technology*, **101** (2010), no. 16, pp. 6398–6403.
- [119] Pejin, D.J.; Mojović, L.V.; Pejin, J.D.; Grujić, O.S.; Markov, S.L.; Nikolić, S.B. and Marković, M.N.: Increase in bioethanol production yield from triticale by simultaneous saccharification and fermentation with application of ultrasound, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, **87** (2012), no. 2, pp. 170–176.
- [120] Wang, F.-Q.; Xie, H.; Chen, W.; Wang, E.-T.; Du, F.-G. and Song, A.-D.: Biological pretreatment of corn stover with ligninolytic enzyme for high efficient enzymatic hydrolysis, *Bioresource Technology*, **144** (2013), pp. 572–578.
- [121] Alriksson, B.; Sjöde, A.; Nilvebrant, N.-O. and Jönsson, L.J.: Optimal conditions for alkaline detoxification of dilute-acid lignocellulose hydrolysates, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **130** (2006), no. 1, pp. 599–611.
- [122] Palmqvist, E. and Hahn-Hägerdal, B.: Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification, *Bioresource Technology*, **74** (2000), no. 1, pp. 17–24.
- [123] Serna-Saldívar, S.O.; Chuck-Hernández, C.; Pérez-Carrillo, E. and Heredia-Olea, E.: Sorghum as a multifunctional crop for the production of fuel ethanol: current status and future trends, *Bioethanol*, (2012).
- [124] Senthilkumar, V. and Gunasekaran, P.: Bioethanol production from cellulosic substrates: engineered bacteria and process integration challenges., *Journal of Scientific & Industrial Research*, **64** (2005), no. 11.
- [125] Lin, Y. and Tanaka, S.: Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **69** (2006), no. 6, pp. 627–642.
- [126] Nikolić, S.; Mojović, L.; Pejin, D.; Rakin, M. and Vukašinović, M.: Production of bioethanol from corn meal hydrolyzates by free and immobilized cells of

- Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*, *Biomass and Bioenergy*, **34** (2010), no. 10, pp. 1449–1456.
- [127] Nikolić, S.; Mojović, L.; Rakin, M.; Pejin, D. and Nedović, V.: Effect of different fermentation parameters on bioethanol production from corn meal hydrolyzates by free and immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, **84** (2009), no. 4, pp. 497–503.
- [128] Viikari, L.; Vehmaanperä, J. and Koivula, A.: Lignocellulosic ethanol: from science to industry, *Biomass and Bioenergy*, **46** (2012), pp. 13–24.
- [129] Fujitomi, K.; Sanda, T.; Hasunuma, T. and Kondo, A.: Deletion of the PHO13 gene in *Saccharomyces cerevisiae* improves ethanol production from lignocellulosic hydrolysate in the presence of acetic and formic acids, and furfural, *Bioresource Technology*, **111** (2012), pp. 161–166.
- [130] Wyman, C.E.: Ethanol from lignocellulosic biomass: technology, economics, and opportunities, *Bioresource Technology*, **50** (1994), no. 1, pp. 3–15.
- [131] Olson, D.G.; McBride, J.E.; Joe Shaw, A. and Lynd, L.R.: Recent progress in consolidated bioprocessing, *Current Opinion in Biotechnology*, **23** (2012), no. 3, pp. 396–405.
- [132] Christofolletti, C.A.; Escher, J.P.; Correia, J.E.; Marinho, J.F.U. and Fontanetti, C.S.: Sugarcane vinasse: environmental implications of its use, *Waste Management*, **33** (2013), no. 12, pp. 2752–2761.
- [133] Wilkie, A.C.; Riedesel, K.J. and Owens, J.M.: Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks, *Biomass and Bioenergy*, **19** (2000), no. 2, pp. 63–102.
- [134] de Oliveira, B.G.; Carvalho, J.L.N.; Cerri, C.E.P.; Cerri, C.C. and Feigl, B.J.: Soil greenhouse gas fluxes from vinasse application in Brazilian sugarcane areas, *Geoderma*, **200–201** (2013), pp. 77–84.

- [135] Carmo, J.B. do; Filoso, S.; Zotelli, L.C.; Neto, E.R. de S.; Pitombo, L.M.; Duarte-Neto, P.J.; Vargas, V.P.; Andrade, C.A.; Gava, G.J.C.; Rossetto, R.; Cantarella, H.; Neto, A.E. and Martinelli, L.A.: Infield greenhouse gas emissions from sugarcane soils in Brazil: effects from synthetic and organic fertilizer application and crop trash accumulation, *GCB Bioenergy*, **5** (2013), no. 3, pp. 267–280.
- [136] Yeşilada, E.: Genotoxic activity of vinasse and its effect on fecundity and longevity of *Drosophila melanogaster*, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **63** (1999), no. 5, pp. 560–566.
- [137] Navarro, A.R.; del C. Sepúlveda, M. and Rubio, M.C.: Bio-concentration of vinasse from the alcoholic fermentation of sugar cane molasses, *Waste Management*, **20** (2000), no. 7, pp. 581–585.
- [138] Santana, V.S. and Fernandes Machado, N.R.C.: Photocatalytic degradation of the vinasse under solar radiation, *Catalysis Today*, **133–135** (2008), pp. 606–610.
- [139] Pant, D. and Adholeya, A.: Biological approaches for treatment of distillery wastewater: A review, *Bioresource Technology*, **98** (2007), no. 12, pp. 2321–2334.
- [140] Algur, Ö.F. and Kadioğlu, A.: The effects of vinasse on the growth, biomass and primary productivity in pea (*Pisum sativum*) and sunflower (*Helianthus annuus*), *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **39** (1992), no. 3, pp. 139–144.
- [141] Ramana, S.; Biswas, A.K.; Kundu, S.; Saha, J.K. and Yadava, R.B.R.: Effect of distillery effluent on seed germination in some vegetable crops, *Bioresource Technology*, **82** (2002), no. 3, pp. 273–275.
- [142] Satyawali, Y. and Balakrishnan, M.: Wastewater treatment in molasses-based alcohol distilleries for COD and color removal: A review, *Journal of Environmental Management*, **86** (2008), no. 3, pp. 481–497.
- [143] Sun, W.; Xu, M.; Xia, C.; Li, A. and Sun, G.: Enhanced production of laccase by *Coriolus hirsutus* using molasses distillery wastewater, *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, **7** (2013), no. 2, pp. 200–210.

- [144] Lutosławski, K.; Cibis, E.; Krzywonos, M.; Lutosławski, K.; Cibis, E. and Krzywonos, M.: The effect of temperature on the efficiency of aerobic biodegradation of sugar beet distillery stillage: Removal of pollution load and biogens, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, **34** (2017), no. 4, pp. 985–996.
- [145] Decloux, M. and Bories, A.: Stillage treatment in the French alcohol fermentation industry., *International Sugar Journal*, **104** (2002), no. 1247, pp. 509–517.
- [146] Fuess, L.T. and Garcia, M.L.: Implications of stillage land disposal: a critical review on the impacts of fertigation, *Journal of Environmental Management*, **145** (2014), pp. 210–229.
- [147] Espinosa, A.; Rosas, L.; Ilangovan, K. and Noyola, A.: Effect of trace metals on the anaerobic degradation of volatile fatty acids in molasses stillage, *Water Science and Technology*, **32** (1995), no. 12, pp. 121–129.
- [148] R Core Team: R: a language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, <https://www.r-project.org/>.
- [149] Grömping, U.: R package FrF2 for creating and analyzing fractional factorial 2-level designs, *Journal of Statistical Software*, **56** (2014), no. 1, pp. 1–56.
- [150] Lenth, R.V.: Response-surface methods in R, using rsm, *Journal of Statistical Software*, **32** (2009), no. 1, pp. 1–17.
- [151] Kuhn, M.: desirability: function optimization and ranking via desirability functions. R package version 2.1, <https://CRAN.R-project.org/package=desirability>.
- [152] Scrucca, L.: GA: a package for genetic algorithms in R, *Journal of Statistical Software*, **53** (2013), no. 1, pp. 1–37.
- [153] Pointing, S.: Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by tropical fungi, *Fungal Diversity*, **2** (1999), pp. 17–33.



- [154] Chand, P.; Aruna, A.; Maqsood, A.M. and Rao, L.V.: Novel mutation method for increased cellulase production, *Journal of Applied Microbiology*, **98** (2005), no. 2, pp. 318–323.
- [155] Mandels, M. and Weber, J.: The production of cellulases, *Cellulases and their applications*, American Chemical Society, 1969, pp. 391–414.
- [156] Gardes, M. and Bruns, T.D.: ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts, *Molecular Ecology*, **2** (1993), no. 2, pp. 113–118.
- [157] Waterborg, J.H.: The lowry method for protein quantitation, *The Protein Protocols Handbook*, Humana Press, Totowa, NJ, 2002, pp. 7–9.
- [158] Masumoto, H. and Degawa, Y.: The effect of surface sterilization and the type of sterilizer on the genus composition of lichen-inhabiting fungi with notes on some frequently isolated genera, *Mycoscience*, **60** (2019), no. 6, pp. 331–342.
- [159] Burgdorf, R.J.; Laing, M.D.; Morris, C.D. and Jamal-Ally, S.F.: A procedure to evaluate the efficiency of surface sterilization methods in culture-independent fungal endophyte studies, *Brazilian Journal of Microbiology*, **45** (2014), no. 3, pp. 977–983.
- [160] Abd El Monssef, R.A.; Hassan, E.A. and Ramadan, E.M.: Production of laccase enzyme for their potential application to decolorize fungal pigments on aging paper and parchment, *Annals of Agricultural Sciences*, **61** (2016), no. 1, pp. 145–154.
- [161] Hosoya, T.: Turnip peroxidase IV. The effect of pH and temperature upon the rate of reaction, *The Journal of Biochemistry*, **48** (1960), no. 2, pp. 178–189.
- [162] Kuwahara, M.; Glenn, J.K.; Morgan, M.A. and Gold, M.H.: Separation and characterization of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*, *FEBS Letters*, **169** (1984), no. 2, pp. 247–250.

- [163] Arora, D.S. and Gill, P.K.: Production of ligninolytic enzymes by *Phlebia floridensis*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **21** (2005), no. 6, pp. 1021–1028.
- [164] Yedidia, I.; Benhamou, N. and Chet, I.: Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*, *Applied and Environmental Microbiology*, **65** (1999), no. 3, pp. 1061–1070.
- [165] Archibald, F.S.: A new assay for lignin-type peroxidases employing the dye azure B., *Applied and Environmental Microbiology*, **58** (1992), no. 9, pp. 3110–3116.
- [166] Arora, D.S. and Gill, P.K.: Comparison of two assay procedures for lignin peroxidase, *Enzyme and Microbial Technology*, **28** (2001), no. 7, pp. 602–605.
- [167] Miller, G.L.: Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Analytical Chemistry*, **31** (1959), no. 3, pp. 426–428.
- [168] Ghose, T.K.: Measurement of cellulase activities, *Pure and Applied Chemistry*, **59** (1987), no. 2, pp. 257–268.
- [169] Swinehart, D.F.: The Beer-Lambert law, *Journal of Chemical Education*, **39** (1962), no. 7, p. 333.
- [170] Yuan, J.; Li, M. and Lin, S.: An improved DNA extraction method for efficient and quantitative recovery of phytoplankton diversity in natural assemblages, *PLOS ONE*, **10** (2015), no. 7, p. e0133060.
- [171] Clark, K.; Karsch-Mizrachi, I.; Lipman, D.J.; Ostell, J. and Sayers, E.W.: GenBank, *Nucleic Acids Research*, **44** (2016), no. D1, pp. D67–D72.
- [172] NCBI Resource Coordinators: Database resources of the National Center for Biotechnology Information, *Nucleic Acids Research*, **44** (2016), no. D1, pp. D7–D19.
- [173] Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M. and Kumar, S.: MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood,

- evolutionary distance, and maximum parsimony methods, *Molecular Biology and Evolution*, **28** (2011), no. 10, pp. 2731–2739.
- [174] Sluiter, A.; Hames, B.; Hyman, D.; Payne, C.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, J.; Templeton, D. and Wolfe, J.: Determination of total solids in biomass and total dissolved solids in liquid process samples laboratory analytical procedure (LAP) : issue date, 3/31/2008 /, National Renewable Energy Laboratory, Golden, Colo. :, 2008.
- [175] Sluiter, A. and National Renewable Energy Laboratory (U.S.) eds.: Determination of extractives in biomass: laboratory analytical procedure (LAP): issue date, 7/17/2005, National Renewable Energy Laboratory, Golden, Colo, 2008.
- [176] Templeton, D. and Ehrman, T.: Determination of acid-insoluble lignin in biomass, Laboratory Analytical Procedure No. 003, National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO, (1995).
- [177] Ehrman, T.: Determination of acid-soluble lignin in biomass, Laboratory Analytical Procedure No. 004, National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO, (1996).
- [178] Rowell, R.M. and Rowell, J.: Paper and composites from agro-based resources, Taylor & Francis, 1996.
- [179] Sluiter, A.; Hames, B.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, J. and Templeton, D.: Determination of ash in biomass: laboratory analytical procedure (LAP) : Issue Date, 7/17/2005, National Renewable Energy Laboratory, 2008.
- [180] Moore, W.E.; Johnson, D.B. and Laboratory (U.S.), F.P.: Procedures for the chemical analysis of wood and wood products (as used at the U.S. forest products laboratory), Forest Products Laboratory, Forest Service, U.S. Department of Agriculture, 1967.
- [181] Box, G.E.P.; Hunter, J.S. and Hunter, W.G.: Statistics for experimenters: design, innovation, and discovery, Wiley-Interscience, 2005.

- [182] Dunn, K.: Process improvement using data, 2020.
- [183] Antony, J.: 6 - Full factorial designs, Design of Experiments for Engineers and Scientists (Second Edition), Elsevier, Oxford, 2014, pp. 63–85.
- [184] Antony, J.: 7 - Fractional factorial designs, Design of Experiments for Engineers and Scientists (Second Edition), Elsevier, Oxford, 2014, pp. 87–112.
- [185] Dunn, K.: pid: process improvement using data, 2018.
- [186] Das, A.K. and Dewanjee, S.: Chapter 3 - Optimization of extraction using mathematical models and computation, Computational Phytochemistry, Elsevier, 2018, pp. 75–106.
- [187] Hariri-Ardebili, M.A.; Seyed-Kolbadi, S.M. and Noori, M.: Response surface method for material uncertainty quantification of infrastructures, Shock and Vibration, <https://www.hindawi.com/journals/sv/2018/1784203/>, accessed 13 April 2020.
- [188] Barton, R.R.: Response surface methodology, Encyclopedia of Operations Research and Management Science, Springer US, Boston, MA, 2013, pp. 1307–1313.
- [189] Allen, T.T. ed.: DOE: Response surface methods, Introduction to Engineering Statistics and Lean Sigma: Statistical Quality Control and Design of Experiments and Systems, Springer, London, 2010, pp. 315–350.
- [190] Wagner, J.R.; Mount, E.M. and Giles, H.F.: 25 - Design of experiments, Extrusion (Second Edition), William Andrew Publishing, Oxford, 2014, pp. 291–308.
- [191] NIST/SEMATECH: e-Handbook of statistical methods, <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook>, 2013.
- [192] Ferreira, S.L.C.; Bruns, R.E.; Ferreira, H.S.; Matos, G.D.; David, J.M.; Brandão, G.C.; da Silva, E.G.P.; Portugal, L.A.; dos Reis, P.S.; Souza, A.S. and dos Santos, W.N.L.: Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods, *Analytica Chimica Acta*, **597** (2007), no. 2, pp. 179–186.

- [193] Mee, R.: A comprehensive guide to factorial two-level experimentation, Springer-Verlag, New York, 2009.
- [194] Derringer, G. and Suich, R.: Simultaneous optimization of several response variables, *Journal of Quality Technology*, **12** (1980), no. 4, pp. 214–219.
- [195] Meyer-Baese, A. and Schmid, V.: Chapter 5 - Genetic algorithms, *Pattern recognition and signal analysis in medical imaging (Second Edition)*, Academic Press, Oxford, 2014, pp. 135–149.
- [196] Forrest, S.: Genetic algorithms: principles of natural selection applied to computation, *Science*, **261** (1993), no. 5123, pp. 872–878.
- [197] García-Martínez, C.; Rodríguez, F.J. and Lozano, M.: Genetic algorithms, *Handbook of Heuristics*, Springer International Publishing, Cham, 2018, pp. 431–464.
- [198] Xuemei Sun; Dakun Zhang; Yong Chen and You Zhao: GA-based multi-response desirability function optimization approach, 2008 IEEE International Conference on Service Operations and Logistics, and Informatics, conference ‘2008 IEEE International Conference on Service Operations and Logistics, and Informatics’, 2008, pp. 1771–1773.
- [199] Thongsook, S.: Using the GA package in R program and desirability function to develop a multiple response optimization procedure in case of two responses, *Thailand Statistician*, **16** (2018), no. 1, pp. 64–76.
- [200] Hosoya, T.: Turnip peroxidase II. The reaction mechanisms of turnip peroxidases A1, A2, and D, *The Journal of Biochemistry*, **47** (1960), no. 6, pp. 794–803.
- [201] Belinky, P.A.; Flikshtein, N. and Dosoretz, C.G.: Induction of lignin peroxidase via reactive oxygen species in manganese-deficient cultures of *Phanerochaete chrysosporium*, *Enzyme and Microbial Technology*, **39** (2006), no. 2, pp. 222–228.
- [202] Rothschild, N.; Levkowitz, A.; Hadar, Y. and Dosoretz, C.G.: Manganese deficiency can replace high oxygen levels needed for lignin peroxidase formation by

- Phanerochaete chrysosporium*, Applied and Environmental Microbiology, **65** (1999), no. 2, pp. 483–488.
- [203] Leppänen, K.; Andersson, S.; Torkkeli, M.; Knaapila, M.; Kotelnikova, N. and Serimaa, R.: Structure of cellulose and microcrystalline cellulose from various wood species, cotton and flax studied by X-ray scattering, Cellulose, **16** (2009), no. 6, pp. 999–1015.
- [204] Medve, J.; Karlsson, J.; Lee, D. and Tjerneld, F.: Hydrolysis of microcrystalline cellulose by cellobiohydrolase I and endoglucanase II from *Trichoderma reesei*: Adsorption, sugar production pattern, and synergism of the enzymes, Biotechnology and Bioengineering, **59** (1998), no. 5, pp. 621–634.
- [205] Lynd, L.R.; Weimer, P.J.; Zyl, W.H. van and Pretorius, I.S.: Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology, Microbiology and Molecular Biology Reviews, **66** (2002), no. 3, pp. 506–577.
- [206] Robles, A.; Lucas, R.; de Cienfuegos, G.A. and Gálvez, A.: Phenol-oxidase (laccase) activity in strains of the hyphomycete *Chalara paradoxa* isolated from olive mill wastewater disposal ponds, Enzyme and Microbial Technology, **26** (2000), no. 7, pp. 484–490.
- [207] Margot, J.; Bennati-Granier, C.; Maillard, J.; Blánquez, P.; Barry, D.A. and Holliger, C.: Bacterial versus fungal laccase: potential for micropollutant degradation, AMB Express, **3** (2013), p. 63.
- [208] Sheikhi, F.; Roayaei Ardakani, M.; Enayatizamir, N. and Rodriguez-Couto, S.: The determination of assay for laccase of *Bacillus subtilis* WPI with two classes of chemical compounds as substrates, Indian Journal of Microbiology, **52** (2012), no. 4, pp. 701–707.
- [209] Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W. and Lipman, D.J.: Basic local alignment search tool, Journal of Molecular Biology, **215** (1990), no. 3, pp. 403–410.
- [210] Tura, D.; Zmitrovich, I.V.; Wasser, S.P. and Nevo, E.: The genus *Stereum* in Israel, Mycotaxon, **106** (2008), pp. 109–26.

- [211] Herrick, J.A.: A microscopical study of the mycelium of *Stereum gausapatum* Fries, Transactions of the American Microscopical Society, **58** (1939), no. 4, pp. 377–384.
- [212] Chamuris, G.P.: On distinguishing *Stereum gausapatum* from the ‘*S. hirsutum*-complex’, On distinguishing *Stereum gausapatum* from the «*S. hirsutum*-complex», **22** (1985), no. 1, pp. 1–12.
- [213] *Stereum gausapatum*, [https://www.messiah.edu/Oakes/fungi\\_on\\_wood/crust%20and%20parchment/species%20pages/Stereum%20gausapatum.htm](https://www.messiah.edu/Oakes/fungi_on_wood/crust%20and%20parchment/species%20pages/Stereum%20gausapatum.htm), accessed 11 February 2020.
- [214] Carranza, J. and Ruiz-Boyer, A.: Cultural studies on some genera of Basidiomycetes (Basidiomycota) from Costa Rica, Harvard Papers in Botany, **6** (2001), no. 1, pp. 57–84.
- [215] Mycobank: Record #12805, <http://www.mycobank.org/BioloMICS.aspx?TargetKey=14682616000002126&Rec=12805>, accessed 13 February 2020.
- [216] Pem, D.; Hyde, K.D.; Doilom, M.; Camporesi, E.; Hongsanan, S.; Rampadarath, S.; Bhoyroo, V. and Jeewon, R.: Multigene phylogenetic analyses to establish new *Valsaria* species and taxonomic significance of spore ornamentation, PLOS ONE, **14** (2019), no. 6, p. e0217982.
- [217] Jiang, N.; Li, J.; Piao, C.G.; Guo, M.W. and Tian, C.M.: Identification and characterization of chestnut branch-inhabiting melanocratic fungi in China, Mycosphere, **9** (2018), no. 6, pp. 1268–1289.
- [218] Jaklitsch, W.M.; Fournier, J.; Dai, D.Q.; Hyde, K.D. and Voglmayr, H.: *Valsaria* and the Valsariales, Fungal Diversity, **73** (2015), no. 1, pp. 159–202.
- [219] Worrall, J.J.; Anagnost, S.E. and Zabel, R.A.: Comparison of wood decay among diverse lignicolous fungi, Mycologia, **89** (1997), no. 2, pp. 199–219.

- [220] Fukasawa, Y.; Osono, T. and Takeda, H.: Wood decomposing abilities of diverse lignicolous fungi on nondecayed and decayed beech wood, *Mycologia*, **103** (2011), no. 3, pp. 474–482.
- [221] Županić, M.; Matošević, D.; Pernek, M. and Diminić, D.: Lignicolous fungi on *Pedunculata oak* in lowland forests of Central Croatia, *Periodicum biologorum*, **111** (2009), no. 4, pp. 397–403.
- [222] Fischer, M. and García, V.G.: An annotated checklist of European basidiomycetes related to white rot of grapevine (*Vitis vinifera*), *Phytopathologia Mediterranea*, **54** (2015), no. 2, pp. 281–298.
- [223] O’Hanlon, R. and Harrington, T.J.: The macrofungal diversity and community of Atlantic oak (*Quercus petraea* and *Q. robur*) forests in Ireland, *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, **69** (2012), no. 1, pp. 107–117.
- [224] Tortić, M.: The family Stereaceae (Basidiomycetes) in Yugoslavia, *Acta Botanica Croatica*, **47** (1988), no. 1, pp. 107–126.
- [225] Erkkilä, R. and Niemelä, T.: Polypores in the parks and forests of the City of Helsinki, *Karstenia*, **26** (1986), no. 1, pp. 1–40.
- [226] Vukojević, J.; Hadžić, I.; Knežević, A.; Stajić, M.; Milovanović, I. and Čilerdžić, J.: Diversity of macromycetes in the Botanical Garden “Jevremovac” in Belgrade, *Botanica Serbica*, **40** (2016), no. 2, pp. 249–259.
- [227] Friebes, G. and Wendelin, I.: Wer suchet, der findet: Seltene und interessante Ascomycota vom Jägerberg (Steiermark, Österreich), *Joannea Botanik*, **12** (2015), pp. 5–38.
- [228] Nikolić, S.; Lazić, V.; Veljović, Đ. and Mojović, L.: Production of bioethanol from pre-treated cotton fabrics and waste cotton materials, *Carbohydrate Polymers*, **164** (2017), pp. 136–144.



- [229] Vasina, D.V.; Pavlov, A.R. and Koroleva, O.V.: Extracellular proteins of *Trametes hirsuta* st. 072 induced by copper ions and a lignocellulose substrate, *BMC Microbiology*, **16** (2016), no. 1, p. 106.
- [230] Knežević, A.; Stajić, M.; Jovanović, V.M.; Kovačević, V.; Čilerdžić, J.; Milovanović, I. and Vukojević, J.: Induction of wheat straw delignification by *Trametes* species, *Scientific Reports*, **6** (2016), no. 1, pp. 1–12.
- [231] Liers, C.; Arnstadt, T.; Ullrich, R. and Hofrichter, M.: Patterns of lignin degradation and oxidative enzyme secretion by different wood- and litter-colonizing basidiomycetes and ascomycetes grown on beech-wood, *FEMS Microbiology Ecology*, **78** (2011), no. 1, pp. 91–102.
- [232] Couto, S.R.; Rodríguez, A.; Paterson, R.R.M.; Lima, N. and Teixeira, J.A.: Laccase activity from the fungus *Trametes hirsuta* using an air-lift bioreactor, *Letters in Applied Microbiology*, **42** (2006), no. 6, pp. 612–616.
- [233] Liu, J.; Liu, W.; Cai, Y.; Liao, X.; Huang, Q. and Liang, X.: Laccase production by *Trametes hirsuta*, characterization, and its capability of decoloring chlorophyll. - Abstract - Europe PMC, *Polish Journal of Microbiology*, **63** (2014), no. 3, pp. 323–333.
- [234] Hiscox, J.; Baldrian, P.; Rogers, H.J. and Boddy, L.: Changes in oxidative enzyme activity during interspecific mycelial interactions involving the white-rot fungus *Trametes versicolor*, *Fungal Genetics and Biology*, **47** (2010), no. 6, pp. 562–571.
- [235] Krishna, C.: Solid-state fermentation systems—an overview, *Critical Reviews in Biotechnology*, **25** (2005), nos. 1–2, pp. 1–30.
- [236] Patel, H. and Gupte, A.: Optimization of different culture conditions for enhanced laccase production and its purification from *Tricholoma giganteum* AGHP, *Bioresources and Bioprocessing*, **3** (2016), no. 1, p. 11.
- [237] Aydınoğlu, T. and Sargin, S.: Production of laccase from *Trametes versicolor* by solid-state fermentation using olive leaves as a phenolic substrate, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **36** (2013), no. 2, pp. 215–222.

- [238] Yasmeen, Q.; Asgher, M.; Sheikh, M.A. and Nawaz, H.: Optimization of ligninolytic enzymes production through response surface methodology, *BioResources*, **8** (2013), no. 1, pp. 944–968.
- [239] Meehnian, H.; Jana, A.K. and Jana, M.M.: Effect of particle size, moisture content, and supplements on selective pretreatment of cotton stalks by *Daedalea flavida* and enzymatic saccharification, *3 Biotech*, **6** (2016), no. 2, p. 235.
- [240] Punekar, N.S.: Quantification of catalysis and measures of enzyme purity, *ENZYMES: Catalysis, Kinetics and Mechanisms*, Springer, Singapore, 2018, pp. 143–153.
- [241] Babič, J. and Pavko, A.: Enhanced enzyme production with the pelleted form of *D. squalens* in laboratory bioreactors using added natural lignin inducer, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **39** (2012), no. 3, pp. 449–457.
- [242] Ortiz, R.; Navarrete, J.; Oviedo, C.; Párraga, M.; Carrasco, I.; de la Vega, E.; Ortiz, M. and Blanchette, R.A.: White rot Basidiomycetes isolated from Chiloé National Park in Los Lagos region, Chile, *Antonie van Leeuwenhoek*, **104** (2013), no. 6, pp. 1193–1203.
- [243] Boddy, L.; Bardsley, D.W. and Gibbon, O.M.: Fungal communities in attached ash branches, *New Phytologist*, **107** (1987), no. 1, pp. 143–154.
- [244] Fukasawa, Y.; Osono, T. and Takeda, H.: Decomposition of Japanese beech wood by diverse fungi isolated from a cool temperate deciduous forest, *Mycoscience*, **46** (2005), no. 2, pp. 97–101.
- [245] Sirianuntapiboon, S.; Zohsalam, P. and Ohmomo, S.: Decolorization of molasses wastewater by *Citeromyces sp.* WR-43-6, *Process Biochemistry*, **39** (2004), no. 8, pp. 917–924.
- [246] Moriya, K.; Iefuji, H.; Shimoi, H.; Sato, S.-I. and Tadenuma, M.: Treatment of distillery wastewater discharged from beet molasses-spirits production using yeast, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **69** (1990), no. 2, pp. 138–140.

- [247] Anderson, M.J. and Whitcomb, P.J.: RSM simplified: optimizing processes using response surface methods for design of experiments, 2nd Edition ed., Productivity Press, 2016.
- [248] Fox, J. and Weisberg, S.: An R companion to applied regression, SAGE Publications, 2011.
- [249] Šnajdr, J. and Baldrian, P.: Temperature affects the production, activity and stability of ligninolytic enzymes in *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor*, *Folia Microbiologica*, **52** (2007), no. 5, pp. 498–502.
- [250] Asgher, M.; Ahmed, N. and Iqbal, H.M.N.: Hyperproductivity of extracellular enzymes from indigenous white rot fungi (*Phanerochaete chrysosporium*) by utilizing agro-wastes, *BioResources*, **6** (2011), no. 4, pp. 4454–4467.
- [251] Zhang, B.; Zhou, J.; Li, Q.; Gan, B.; Peng, W.; Zhang, X.; Tan, W.; Jiang, L. and Li, X.: Manganese affects the growth and metabolism of *Ganoderma lucidum* based on LC-MS analysis, *PeerJ*, **7** (2019).
- [252] Martani, F.; Beltrametti, F.; Porro, D.; Branduardi, P. and Lotti, M.: The importance of fermentative conditions for the biotechnological production of lignin modifying enzymes from white-rot fungi, *FEMS Microbiology Letters*, **364** (2017), no. 13.
- [253] Tsegaye, B.; Balomajumder, C. and Roy, P.: Microbial delignification and hydrolysis of lignocellulosic biomass to enhance biofuel production: an overview and future prospect, *Bulletin of the National Research Centre*, **43** (2019), no. 1, p. 51.
- [254] Kamcharoen, A.; Champreda, V.; Eurwilaichitr, L. and Boonsawang, P.: Screening and optimization of parameters affecting fungal pretreatment of oil palm empty fruit bunch (EFB) by experimental design, *International Journal of Energy and Environmental Engineering*, **5** (2014), no. 4, pp. 303–312.
- [255] Gao, W.; Tabil, L.G.; Dumonceaux, T.; Espinel Ríos, S. and Zhao, R.: Optimization of biological pretreatment to enhance the quality of wheat straw pellets, *Biomass and Bioenergy*, **97** (2017), pp. 77–89.

- [256] Sreemahadevan, S.; Roychoudhury, P.K. and Ahammad, S.Z.: Optimization of submerged cultivation parameters for a novel biological pretreatment of rice straw to enhance enzymatic hydrolysis, *Environmental Progress & Sustainable Energy*, **38** (2019), no. 3, p. e13020.
- [257] Sun, F.; Li, J.; Yuan, Y.; Yan, Z. and Liu, X.: Effect of biological pretreatment with *Trametes hirsuta* yj9 on enzymatic hydrolysis of corn stover, *International Biodeterioration & Biodegradation*, **65** (2011), no. 7, pp. 931–938.
- [258] Yang, J.; Li, W.; Ng, T.B.; Deng, X.; Lin, J. and Ye, X.: Laccases: production, expression regulation, and applications in pharmaceutical biodegradation, *Frontiers in Microbiology*, **8** (2017).
- [259] Vasina, D.V.; Mustafaev, O.N.; Moiseenko, K.V.; Sadovskaya, N.S.; Glazunova, O.A.; Tyurin, A.A.; Fedorova, T.V.; Pavlov, A.R.; Tyazhelova, T.V.; Goldenkova-Pavlova, I.V. and Koroleva, O.V.: The *Trametes hirsuta* 072 laccase multigene family: genes identification and transcriptional analysis under copper ions induction, *Biochimie*, **116** (2015), pp. 154–164.
- [260] Badon, M.M.; Tekverk, D.G.; Vishnosky, N.S. and Woolridge, E.M.: Establishing the oxidative tolerance of *Thermomyces lanuginosus* xylanase, *Journal of Applied Microbiology*, **127** (2019), no. 2, pp. 508–519.
- [261] Yu, H.; Li, X.; Xing, Y.; Liu, Z. and Jiang, J.: A sequential combination of laccase pretreatment and enzymatic hydrolysis for glucose production from furfural residues, *BioResources*, **9** (2014), no. 3, pp. 4581–4595.
- [262] Qin, X.; Sun, X.; Huang, H.; Bai, Y.; Wang, Y.; Luo, H.; Yao, B.; Zhang, X. and Su, X.: Oxidation of a non-phenolic lignin model compound by two *Irpex lacteus* manganese peroxidases: evidence for implication of carboxylate and radicals, *Biotechnology for Biofuels*, **10** (2017), no. 1, p. 103.
- [263] Patel, H.; Gupte, A. and Gupte, S.: Effect of different culture conditions and inducers on production of laccase by a basidiomycete fungal isolate *Pleurotus*

- ostreatus* hp-1 under solid state fermentation, *BioResources*, **4** (2009), no. 1, pp. 268–284.
- [264] Kostadinova, N.; Krumova, E.; Boeva, R.; Abrashev, R.; Miteva-Staleva, J.; Spassova, B. and Angelova, M.: Effect of copper ions on the ligninolytic enzyme complex and the antioxidant enzyme activity in the white-rot fungus *Trametes trogii* 46, *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, **152** (2018), no. 5, pp. 1128–1133.
- [265] Vrsanska, M.; Voberkova, S.; Langer, V.; Palovcikova, D.; Moulick, A.; Adam, V. and Kopel, P.: Induction of laccase, lignin peroxidase and manganese peroxidase activities in white-rot fungi using copper complexes, *Molecules*, **21** (2016), no. 11, p. 1553.
- [266] Şeker, U.Ö.Ş.; Catal, T.; Taptık, Y.; Tamerler, C. and Bermek, H.: Enhanced production of manganese-peroxidase by the white-rot fungus *Bjerkandera adusta* using media engineering, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, **22** (2008), no. 3, pp. 844–848.
- [267] Catal, T.; Liu, H. and Bermek, H.: Selenium induces manganese-dependent peroxidase production by the white-rot fungus *Bjerkandera adusta* (Willdenow) P. Karsten, *Biological Trace Element Research*, **123** (2008), no. 1, pp. 211–217.
- [268] Vrsanska, M.; Buresova, A.; Damborsky, P. and Adam, V.: Influence of different inducers on ligninolytic enzyme activities, *Journal of Metallomics and Nanotechnologies*, **2** (no date), no. 3.
- [269] Kumar, M.; Singhal, A. and Thakur, I.S.: Comparison of submerged and solid state pretreatment of sugarcane bagasse by *Pandora sp.* ISTKB: Enzymatic and structural analysis, *Bioresource Technology*, **203** (2016), pp. 18–25.
- [270] Salvachúa, D.; Katahira, R.; Cleveland, N.S.; Khanna, P.; Resch, M.G.; Black, B.A.; Purvine, S.O.; Zink, E.M.; Prieto, A.; Martínez, M.J.; Martínez, A.T.; Simmons, B.A.; Gladden, J.M. and Beckham, G.T.: Lignin depolymerization by fungal secretomes and a microbial sink, *Green Chemistry*, **18** (2016), no. 22.

- [271] Mishra, V. and Jana, A.K.: Fungal pretreatment of sweet sorghum bagasse with combined CuSO<sub>4</sub>-gallic acid supplement for improvement in lignin degradation, selectivity, and enzymatic saccharification, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **183** (2017), no. 1, pp. 200–217.
- [272] Song, L.; Ma, F.; Zeng, Y.; Zhang, X. and Yu, H.: The promoting effects of manganese on biological pretreatment with *Irpex lacteus* and enzymatic hydrolysis of corn stover, *Bioresource Technology*, **135** (2013), pp. 89–92.
- [273] Potumarthi, R.; Baadhe, R.R.; Nayak, P. and Jetty, A.: Simultaneous pretreatment and saccharification of rice husk by *Phanerochete chrysosporium* for improved production of reducing sugars, *Bioresource Technology*, **128** (2013), pp. 113–117.
- [274] Mycobank: *Trametes hirsuta*, <http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&Rec=27412&Fields=All>, accessed 14 February 2020.
- [275] Mycobank: *Stereum gausapatum*, <http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&Rec=26407&Fields=All>, accessed 14 February 2020.
- [276] Mycobank: *Myrmaecium fulvopruinatum*, <http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&Rec=543247&Fields=All>, accessed 14 February 2020.

## 7. Prilozi

### 7.1. ITS sekvence

>KY264754.1 Trametes hirsuta isolate F13 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

```
TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAACGAGTTTTGAAACGGGTTGT
TGCTGGCCTTCCGAGGCAT
GTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCACTTACTGTAGGTTGGCG
TGGGTTTCTAGCCTCCGG
GTTGGAAGCATTCTGCCGGCCTATGTACACTACAACTCTTAAAGTATCAGA
ATGTAAACGCGTCTAACG
CATCTTAATAACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAG
AACGCAGCGAAATGCGAT
AAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCT
TGCCTCCTTGGTATTCC
GAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATGAAATTCTCAACCCATAAATCCTTGT
GATCTATGGGCTTGGATT
TGGAGGCTTGCTGGCCCTAGCGGTCGGCTCCTCTTGAATGCATTAGCTTGAT
TCCGTGCGGATCGGCTCT
CAGTGTGATAATTGTCTACGCTGTGACCGTGAAGCGTTTTGGCAAGCTTCTA
ACCGTCCATTAGGACAAT
TTTATAACATCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCAT
ATCAATAAGCGGAGGA
```

*Prilog 1: ITS sekvence izolata T. hirsuta F13 (FASTA dokument)*

>KY264753.1 *Stereum gausapatum* isolate F28 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

```
CCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAATGAAATTTATGACTGGAGTTG
TAGCTGGCCTTTAAAAACG
GCATGTGCACGCTCCTTTCACCTAATCCACACACACCTGTGCACCTTCGCGGG
GGTCTCTTCGTTAACTCG
AAGAGGCTCGCGTCCCTTTACACACCCTTTGTATGTCTTAAGAATGTCTACT
CGATGTAATAAAACGCAT
CTAATACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACG
CAGCGAAATGCGATAAGT
AATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCG
CCCTTTGGTATTCCGAAG
GGCACACCTGTTTGAGTGTCGTGAAATTCTCAACCCTCTTCACTTTTGTGAA
CGTAGTGGATTGGACTTG
GAGGCTTTGCCGGGCTTCACCGCTCGGCTCCTCTCAAATGCATTAGTGCCTC
TTGTTGCGACGTGCGCCT
CGGTGTGATAATTATCTACGCTGTGGTGTGCTTGCTTCTGTGGAGACGCGCT
TCCTAACCGTCCGAAAGG
ACAGCTTTCATCGAACTTTGACCTCAAATCAGGTGGGACTACCCGCTGAAC
TTAAGCATATCAATAAGCG
GAGGA
```

*Prilog 2: ITS sekvenga izolata S. gausapatum F28 (FASTA dokument)*



>MF521930.1 Myrmaecium fulvopruinatum isolate F14 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

```
TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAACAGAGATCGGCGCCGTCCCC
CTTGTGGGGACGCGCGACC
CCTCCCAACCCCTTGAATCGTTACACCCGACCTGGTTGTTCCCGCCGTCCGC
GGCGGGGACTCCATAAA
AACTCATGTCTTGAAACATTGCTGTCTGAGTCGATATGACAAATCAATCAA
ACTTTCAACAACGGATCT
CTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGA
ATTGCAGAATTCAGTGAAT
CATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGCATTCCGAGGGGCACAT
CTGTTTCGAGCGTCATTACA
CCCCTCAAGCTCTGCTTGGTCTTGGGCGCCCTCGTCCCCTAGCCCCTCCCTG
GGGCAGGCGGACGCGCCT
CAAACCTCCTCGGCGGTCCACACCGGCTTCGAGCGTAGCAATTACACCTCGC
TCTTGGAGTCCTGGCGTGT
GCCCGGCCGTATGACAGCAAACCTATTTTCAATTTTGAAGGTTGACCTCGGATC
AGATGGGGATAACCCGCTG
AACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
```

*Prilog 3: ITS sekvenca izolata M. fulvopruinatum F14 (FASTA dokument)*

## 7.2. Taksonomija i sistematika

**Regnum** Fungi

**Subregnum** Dikarya

**Divisio** Basidiomycota

**Subdivisio** Agaricomycotina

**Classis** Agaricomycetes

**Ordo** Polyporales

**Familia** Polyporaceae

**Genus** *Trametes*

**Species** *T. hirsuta*

Prilog 4: Taksonomija i sistematika vrte *T. hirsuta* [274].

**Regnum** Fungi

**Subregnum** Dikarya

**Divisio** Basidiomycota

**Subdivisio** Agaricomycotina

**Classis** Agaricomycetes

**Ordo** Russulales

**Familia** Stereaceae

**Genus** *Stereum*

**Species** *S. gausapatum*

Prilog 5: Taksonomija i sistematika vrte *S. gausapatum* [275].

**Regnum** Fungi

**Divisio** Ascomycota

**Subdivisio** Pezizomycotina

**Classis** Dothideomycetes

**Ordo** Valsariales

**Familia** Valsariaceae

**Genus** *Myrmaecium*

**Species** *M. fulvopruinatum*

*Prilog 6: Taksonomija i sistematika vrte M. fulvopruinatum [276].*

## 7.3. Optimizacija – genetički algoritam (GA)

```
gaControl("real-valued")
gaControl("real-valued"=list(selection = "gareal_sigmaSelection"))
gaControl("real-valued"=list(crossover = "gareal_blxCrossover"))
gaControl("real-valued"=list(mutation = "gareal_rsMutation"))

rsmFit <- function(x, d1Lacc, d2MnP) {

d1Lacc <- dMax(50,245, scale=0.1)

d2MnP <- dMax(50,90, scale = 3)

Block=0.5

yLaccF <- 82.08071-19.48833*Block-0.84152*x[1]+
38.62468*x[2]+4.00018*x[3]-5.06250*x[1]*x[2]+
9.48750*x[1]*x[3]+15.02000*x[2]*x[3]+3.07048*x[1]^2+9.68714*
x[2]^2+2.10381*x[3]^2

yMnPF <- 71.0905+11.4222*Block+2.0055*x[1]-19.8193*x[2]-
5.7995*x[3]-3.3250*x[1]*x[2]+ 5.8750*x[1]*x[3]+
11.9500*x[2]*x[3]-3.4980*x[1]^2-15.9147*x[2]^2-14.4730*x[3]^2

outd1Lacc <- predict(d1Lacc, data.frame(yLaccF=yLaccF))

outd2MnP <- predict(d2MnP, data.frame(yMnP=yMnP))

r1=1
r2=1
D <- ((outd1Lacc)*(outd2MnP))^(1/(r1+r2))
if(any(abs(x) > 1.7)) {
  D <- 0
}
return(D)
}
```

#postavljanje genetičkih operatora selekcije, rekombinacije i mutacije.

# Definisanje fitnes funkcije

#uslovi individualne funkcije poželjnosti za model lakazne aktivnosti

#uslovi individualne funkcije poželjnosti za model mangan peroksidazne aktivnosti

#model lakazne aktivnosti dobijen primenom eksperimentalnog dizajna

#model mangan peroksidazne aktivnosti dobijen primenom eksperimentalnog dizajna

#vrednost individualne funkcije poželjnosti lakazne aktivnosti

#vrednost individualne funkcije poželjnosti MnP aktivnosti

#globalna funkcija poželjnosti

```
CCD_GA <- ga(type = c("real-valued"), fitness = rsmFit, lower = c(- #genetički algoritam
1.7, -1.7, -1.7), upper = c(1.7, 1.7, 1.7), popSize = 1000, pcrossover
= 0.8, pmutation = 0.2, elitism = 2, maxiter = 5000)

summary(CCD_GA) # rezultati genetičkog algoritma

plot(CCD_GA) #grafička simulacija rezultata
genetičkog algoritma.
```

*Prilog 7: R skripta primenjenog genetičkog algoritma.*

## **Biografija autora**

Jelena Jović je rođena 08.07.1981. godine u Leskovcu. Nakon završene osnovne škole „Vuk Kradžić“ u Leskovcu, upisala je i završila gimnaziju „Stanimir Veljković – Zele“ (danas samo Gimnazija) takođe u Leskovcu, smer Prirodno-matematički. Po završetku gimnazije upisala je Prirodno-matematički fakultet u Nišu, Odsek za biologiju i ekologiju, smer Diplomirani biolog-ekolog. Diplomirala je februara 2009. godine sa prosečnom ocenom 8.24 odbranivši rad na temu „Kvalitativno-kvantitativni sastav makrozoobentosa u donjem toku reke Veternice“ sa ocenom 10 i stekla zvanje diplomirani biolog-ekolog. Doktorske studije na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju, Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, je upisala školske 2010/11 godine. Položila je sve ispite predviđene planom i programom doktorskih studija sa prosečnom ocenom 9,5 i odbranila završni ispit na temu „Ispitivanja predtretmana lignocelulozne biomase za tehnološke procese proizvodnje bioetanola ili mlečne kiseline“ sa ocenom 10.

Od septembra 2013. godine Jelena Jović se aktivno bavi naučnoistraživačkim i eksperimentalnim radom u oblasti primene gljiva i njihovih enzima za konverziju lignocelulozne biomase u okviru doktorskih studija. Od 2018. godine učestvuje u radu na projektu sa NR Kinom „Razvoj novih bioloških postupaka za dobijanje proizvoda sa dodatnom vrednošću na agro-industrijskom otpadu“ (rukovodilac prof. dr Ljiljana Mojović), koji finansira MPNTR Srbije. U zvanje istraživač pripravnik izabrana je u oktobru 2018. godine. Univerzitet u Beogradu je na sednici 25.03.2019. godine dao saglasnost na predlog teme doktorske disertacije pod nazivom "Lignocelulolitička aktivnost odabranih izolata autohtonih gljiva Srbije".

Kandidat Jelena Jović ima objavljen dva rada u istaknutom međunarodnom časopisu (kategorije M22), jedan rad u međunarodnom časopisu (kategorije M23) i jedan rad predstavljen na skupu međunarodnog značaja (rad štampan u izvodu - kategorija M34). Iz oblasti istraživanja kojoj pripada tema doktorske disertacije, Jelena Jović je objavila jedan rad u istaknutom međunarodnom časopisu (kategorije M22), jedan rad u međunarodnom časopisu (M23 kategorije), na kojima je prvi autor, i predstavila rad na skupu međunarodnog značaja (rad štampan u izvodu M34) na kom je takođe prvi autor.

## **Spisak objavljenh naučnih radova i saopštenja:**

### **1. Radovi objavljeni u časopisima međunaodnog značaja – M20**

#### Rad u istaknutim međunarodnom časopisu (M22)

1. **Jelena Jović**, Aneta Buntić, Neda Radovanović, Bojan Petrović and Ljiljana Mojović, Lignin-Degrading Abilities of Novel Autochthonous Fungal Isolates *Trametes hirsuta* F13 and *Stereum gausapatum* F28, *Food Technology and Biotechnology*, Vol. 56/3 (2018), ISSN:1330-9862, IF(2018) = 1.517, DOI:10.17113/ftb.56.03.18.5348

2. Neda Radovanović, Milica Milutinović, Katarina Mihajlovski, **Jelena Jović**, Branislav Nastasijević, Mirjana Rajilić-Stojanović, Suzana Dimitrijević-Branković, Biocontrol and plant stimulating potential of novel strain *Bacillus* sp. PPM3 isolated from marine sediment, *Microbial Pathogenesis*, Vol. 120 (2018) pp. 71-78, ISSN: 0882-4010, IF(2017)=2.332, DOI: 10.1016/j.micpath.2018.04.056.

#### Rad u međunarodnom časopisu (M23)

1. **Jelen Jović**, Jelena Pejin, Sunčica Kocić-Tanackov, Ljiljana Mojović, Primena gljiva koje razgrađuju lignocelulozu za proizvodnju bioetanol iz obnovljive biomase, *Hemijska Industrija*, Vol. 69/6 (2015) pp. 627-641, ISSN: 2217-7426, IF(2015) = 0.437, DOI:10.2298/HEMIND140916086J

### **2. Zbornici međunarodnih naučnih skupova – M30**

#### Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu (M34)

1. **Jelena Jović**, Ljiljana Mojović, Indigenous lignocellulose degrading fungi: new isolates for technological and environmental use, *The 6th International Scientific Meeting: Mycology, Mycotoxicology, and Mycoses*, Matica Srpska, Novi Sad, September 27–29, 2017, ISBN 978-86-7946-194-0

# Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Јелена Јовић

Број индекса 4037/2017

## Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

"Лигноцелулолитичка активност одабраних изолата аутохтоних гљива Србије"

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

**Потпис аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_



# Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Јелена Јовић

Број индекса 4037/2017

Студијски програм Биохемијско инжењерство и биотехнологија

Наслов рада "Лигноцелулолитичка активност одабраних изолата аутохтоних гљива Србије"

Ментор Проф. др Љиљана Мојовић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

"Лигноцелулолитичка активност одабраних изолата аутохтоних гљива Србије"  
која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

**Потпис аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.