

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Milica M. Galić

**POTENCIJAL LIGNOCELULOLITIČKIH  
GLJIVA ZA RAZLAGANJE BILJNOG OTPADA  
I DOBIJANJE BIOETANOLA**

doktorska disertacija

Beograd, 2021

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Milica M. Galić

**POTENTIAL OF LIGNOCELLULOLYTIC FUNGI  
FOR PLANT RESIDUES DEGRADATION AND  
BIOETHANOL PRODUCTION**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021

Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije:

---

Dr Mirjana Stajić, redovni profesor, mentor

Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

---

Dr Jasmina Čilerdžić, viši naučni saradnik, mentor

Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

---

Dr Ilija Brčeski, vanredni profesor, član komisije

Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet

---

Dr Jelena Vukojević, redovni profesor, član komisije

Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

*Eksperimentalni deo doktorske disertacije realizovan je na Katedri za Algologiju, mikologiju i lihenologiju, Instituta za botaniku i Botaničke bašte „Jevremovac“ Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, pod mentorstvom Prof. dr Mirjane Stajić i višeg naučnog saradnika Jasmine Čilerdžić uz podršku Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, koje je finansiralo projekat.*

*Ovom prilikom želela bih da se najiskrenije zahvalim svojim mentorima, Prof. dr Mirjani Stajić i dr Jasmini Čiledžić, na stručnom vođenju eksperimentalnog rada i angažovanju u svim fazama izrade disertacije, a posebno na ukazanom poverenju, izdvojenom vremenu u davanju korisnih sugestija i neizmernoj podršci tokom pisanja ove disertacije.*

*Zahvalnost dugujem i članovima komisije, Prof. dr Jeleni Vukojević i Prof. dr Iliji Brčeskom, koji su važnim sugestijama u značajnoj meri doprineli kvalitetu teksta ove disertacije. Zahvaljujem se i svojim kolegama sa Katedre za Algologiju, mikologiju i lihenologiju na korisnim savetima i pomoći tokom perioda doktorskih studija.*

*Posebnu zahvalnost dugujem svojim roditeljima, Zdenki i Milanu, vereniku Vladimiru, kao i najbližim prijateljima na razumevanju, strpljenju i velikoj podršci tokom prilično zahtevnog perioda izrade disertacije. Beskrajnu zahvalnost dugujem svojoj sestri Jeleni, čije mi je ohrabrenje i nesebična podrška nezamenljiva.*

Milica Galić



## SAŽETAK

Lignoceluloza ima ogroman potencijal kao sirovina za proizvodnju hrane, hraniva, biogoriva i dr. Gljive su najefikasniji organizmi u konverziji lignoceluloznog otpada do fermentabilnih šećera zbog njihovog složenog enzimskog sistema. Međutim, jedna vrsta retko može da sintetiše sve enzime potrebne za razgradnju ovog materijala, pa se ko-kultivacijom dve ili više vrsta može doći do optimalnog sistema.

Ciljevi ovog istraživanja su bili određivanje potencijala odabranih makro- i mikromiceta za razlaganje lignoceluloznog otpada iz poljoprivrede i šumarstva radi utvrđivanja najefikasnijeg delignifikatora odnosno producenta celulaza, kao i njihove kompatibilnosti za fermentaciju supstrata u ko-kulturi.

27 vrsta makromiceta i 11 vrsta mikromiceta kao i 8 vrsta otpada je testirano u ovoj studiji. Kolorimetrijskim metodama i izoelektričnim fokusiranjem okarakterisani su proučavani enzimi dok je stepen depolimerizacije supstrata određen standardnim metodama.

Pšenična slama je bila najoptimalniji supstrat za sintezu ligninolitičkih enzima a *Pleurotus pulmonarius* HAI 573 se pokazao njenim visoko efikasnim i selektivnim degraderom (50,4% lignina; 3,8% celuloze i 15,3% hemiceluloze). *Trichoderma harzianum* BEOFB 1230m je visoko efikasan producent pre svega ksilanaza (4184,2 U/L) i endocelulaza (2299,7 U/L) i mineralizator hemiceluloze (33,0%) i celuloze (23,9%). U poređenju sa mono-kulturama *P. pulmonarius* i *T. harzianum*, u njihovoj ko-kulturi zabeležene su više aktivnosti ksilanaza (10553,4 U/L), endocelulaza (2911,8 U/L), egzocelulaza (224,5 U/L) i  $\beta$ -glukozidaza (464,6 U/L).

Rezultati istraživanja su pokazali postojanje kompatibilnosti odabranih vrsta za sintezu enzima i fermentaciju lignoceluloze u ko-kulturi što ukazuje na mogućnost njihove primene u procesu dobijanja bioetanola.

**Ključne reči:** gljive belog truljenja, ligninolitički enzimi, celulolitički enzimi, gljive producenti celulaza, delignifikacija, lignocelulozni otpad, ko-kultivacija.

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Algologija i mikologija

## ABSTRACT

Lignocellulose has huge potential as a raw material for the production of food, feed, biofuels etc. Fungi are the most efficient organisms in the conversion of lignocellulose to fermentable sugars due to their complex enzyme system. However, one species can rarely synthesize all required enzymes, so co-cultivation of two or more species can lead to an optimal system.

The goals of this study were to determine potential of selected macro- and micromycetes for the depolymerization of agro-forestry residues to determine the most efficient delignifier and cellulase producer, as well as their compatibility for substrate fermentation in co-culture.

27 species of macromycetes and 11 species of micromycetes, as well as 8 lignocellulosics were tested in this study. The studied enzymes were characterized by colorimetric methods and isoelectric focusing, while the degree of substrate depolymerization was determined by standard methods.

Wheat straw was the most optimal substrate for the synthesis of ligninolytic enzymes and *Pleurotus pulmonarius* HAI 573 proved to be its highly efficient and selective degrader (50.4% lignin; 3.8% cellulose and 15.3% hemicellulose). *Trichoderma harzianum* BEOFB 1230m is a highly efficient producer primarily of xylanase (4184.2 U/L) and endocellulase (2299.7 U/L) and a mineralizer of hemicellulose (33.0%) and cellulose (23.9%). Compared with mono-cultures of *P. pulmonarius* and *T. harzianum*, their co-culture showed higher activities of xylanases (10553.4 U/L), endocellulases (2911.8 U/L), exocellulases (224.5 U/L) and  $\beta$ -glucosidases (464.6 U/L).

These results showed the existence of compatibility of selected species for enzyme synthesis and lignocellulose fermentation in co-culture, which indicates possibility of their application in bioethanol production.

**Key words:** white-rot fungi, ligninolytic enzymes, cellulolytic enzymes, cellulase-producing fungi, delignification, lignocellulose residues, co-cultivation.

**Scientific field:** Biology

**Scientific subfield:** Algology and mycology

## LISTA SKRAĆENICA

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

ADF – vlakna dobijena nakon tretmana kiselim deterdžentom

ADS – rastvor kiselog deterdženta

ANOVA – jednofaktorska analiza varijanse

BEOFB – Institut za botaniku i Botanička bašta „Jevremovac”, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

BSA – albumin telećeg seruma

CBB R – Coomassie brilliant blue-R

CBH – celobiohidrolaza

CFU – broj ćelija koje formiraju koloniju

CMC – karboksimetil celuloza

CTAB – cetiltrimetilamonijum bromid

dH<sub>2</sub>O – destilovana voda

DNS – dinitro-salicilni reagens

EDTA – etilendiamintetrasirćetna kiselina

FAO – Organizacija za hranu i poljoprivredu

HAI – Institut za evoluciju, Univerzitet u Haifi, Izrael

IEF – izoelektrično fokusiranje

LC – sadržaj lignina

LiP – lignin peroksidaza

MA – malt agar

MnIP – Mn-nezavisna peroksidaza

MnP – Mn-zavisna peroksidaza

NDF – vlakna dobijena nakon tretmana neutralnim deterdžentom

NDS – rastvor neutralnog deterdženta

ob/min – broj obrtaja u minuti

pH – mera aktivnosti vodonikovih jona

pI – izoelektrična tačka

SDS – natrijum-dodecilsulfat

SI – indeks selektivnosti

TCA – trihlorsirćetna kiselina

U – jedinica enzimske aktivnosti

VA – veratril alkohol

VP – verzatil peroksidaza

# SADRŽAJ

1. Uvod .....	1
1.1. Biomasa kao obnovljivi izvor energije.....	1
1.2. Lignocelulozna biomasa.....	2
1.2.1. Fizičke i hemijske karakteristike lignocelulozne biomase.....	3
1.2.1.1. <i>Lignin</i> .....	3
1.2.1.2. <i>Celuloza</i> .....	4
1.2.1.3. <i>Hemiceluloza</i> .....	4
1.3. Gljive kao razlagači lignocelulozne biomase.....	5
1.3.1. Ligninolitički mehanizmi gljiva izazivača belog truljenja.....	5
1.4. Enzimski sistemi gljiva .....	6
1.4.1. Ligninolitički enzimi .....	7
1.4.1.1. <i>Lignin-peroksidaze</i> .....	7
1.4.1.2. <i>Mn-oksidujuće peroksidaze</i> .....	7
1.4.1.3. <i>Lakaze</i> .....	8
1.4.2. Celulolitički enzimi .....	9
1.4.3. Hemicelulolitički enzimi.....	10
1.5. Dobijanje bioetanola iz lignocelulozne biomase .....	10
1.5.1. Pre-tretman.....	10
1.5.1.1. <i>Faktori koji utiču na pre-tretman lignoceluloze</i> .....	11
1.5.2. Enzimaska hidroliza pretretiranog lignoceluloznog materijala.....	12
1.5.3. Primena ko-kultivacije gljiva u degradaciji lignoceluloznog materijala .....	13
1.5.4. Fermentacija hidrolizata.....	13
<b>2. Ciljevi istraživanja.....</b>	<b>15</b>
<b>3. Materijal i metode .....</b>	<b>16</b>
<b>3.1. Proučavane vrste/sojevi makro- i mikromiceta.....</b>	<b>16</b>
<b>3.2. Karakterizacija proučavanih lignocelulolitičkih enzima.....</b>	<b>17</b>
3.2.1. Priprema inokuluma makromiceta i uslovi kultivacije.....	17
3.2.2. Priprema suspenzije spora mikromiceta i uslovi kultivacije .....	18
3.2.3. Određivanje aktivnosti ligninolitičkih enzima .....	18
3.2.3.1. <i>Određivanje aktivnosti lakaza</i> .....	18
3.2.3.2. <i>Određivanje aktivnosti Mn-oksidujućih peroksidaza</i> .....	18
3.2.3.3. <i>Elektroforeza</i> .....	19
3.2.4. Određivanje aktivnosti celulolitičkih enzima.....	19
3.2.4.1. <i>Određivanje aktivnosti endocelulaza i egzocelulaza</i> .....	19
3.2.4.2. <i>Određivanje aktivnosti <math>\beta</math>-glukozidaza</i> .....	19
3.2.4.3. <i>Određivanje aktivnosti ksilanaza</i> .....	19
3.2.4.4. <i>Određivanje efikasnosti fermentacije</i> .....	20
<b>3.3. Određivanje sadržaja ukupnih proteina.....</b>	<b>20</b>
<b>3.4. Određivanje sadržaja lignina, celuloze i hemiceluloze .....</b>	<b>20</b>
3.4.1. Određivanje sadržaja hemiceluloze.....	20
3.4.2. Određivanje sadržaja celuloze i lignina.....	21
<b>3.5. Statistička analiza.....</b>	<b>21</b>
<b>4. Rezultati i diskusija .....</b>	<b>22</b>

<b>4.1. Ligninolički potencijal gljiva.....</b>	<b>22</b>
4.1.1. Potencijal odabranih makromiceta za razgradnju čestih lignoceluloznih ostataka .....	22
4.1.1.1. Aktivnost Mn-oksidujućih peroksidaza i lakaza.....	22
4.1.1.2. Potencijal proučavanih makromiceta da depolimerizuju lignocelulozne ostatke .	27
4.1.1.3. Varijabilnost izoenzimskih profila lakaza kod <i>Pleurotus spp.</i> .....	37
4.1.2. Potencijal odabranih makromiceta da depolimerizuju pšeničnu slamu.....	39
4.1.3. Potencijal odabranih mikromiceta da depolimerizuju pšeničnu slamu.....	45
<b>4.2. Celulolitički potencijal gljiva .....</b>	<b>47</b>
4.2.1. Dinamika aktivnosti celulaza <i>Trichoderma viridae</i> na pšeničnoj slami pretretiranoj sa <i>Pleurotus pulmonarius</i> .....	47
4.2.1.1. Potencijal <i>Trichoderma viridae</i> za depolimerizaciju pšenične slame pretretirane sa <i>Pleurotus pulmonarius</i> .....	48
4.2.2. Aktivnost celulolitičkih enzima odabranih mikromiceta nakon fermentacije pšenične slame i piljevine hrasta pretretiranih sa <i>Pleurotus pulmonarius</i> .....	49
4.2.2.1. Potencijal odabranih mikromiceta za depolimerizaciju pšenične slame i piljevine hrasta pretretirane sa <i>Pleurotus pulmonarius</i> .....	52
4.2.3. Celulolitička aktivnost <i>Pleurotus eryngii</i> i <i>P. pulmonarius</i> tokom fermentacije odabranog poljoprivrednog otpada.....	54
<b>4.3. Dinamika aktivnosti lignocelulolitičkih enzima tokom ko-kultivacije <i>Trichoderma harzianum</i> i <i>Pleurotus pulmonarius</i> na pšeničnoj slami .....</b>	<b>55</b>
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>60</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>62</b>

## 1. Uvod

Demografska ekspanzija kao i sve veća industrijalizacija i urbanizacija imaju za posledicu globalno povećanje potrebe za energijom čija je potrošnja u XX veku povećana čak 17 puta. Izvori energije se mogu podeliti na primarne koji obuhvataju neobnovljive i obnovljive izvore energije i sekundarne koji transformacijom primarne ili neke druge forme energije daju električnu, toplotnu ili hemijsku energiju. Prema proceni Ujedinjenih Nacija očekuje se da će se svetska populacija do 2050. godine povećati na oko 10 milijardi, čime će se povećati potreba za energentima na najmanje 24 milijarde tona ekvivalenta uglja godišnje što je dvostruko više od današnje potrošnje. Takođe, stopa potrošnje nafte je porasla za 1,9 miliona barela dnevno, što je gotovo dvostruko više od proseka koji je zabeležen 2014. godine. Uprkos znatnom povećanju cene energenata kao i nizu štetnih efekata koje imaju na životnu sredinu, upotrebom fosilnih goriva se danas dobija čak 88% potrebne energije (Dashtban i dr., 2009; Nigam i Singh, 2011; Sharma i dr., 2019; Tabatabaei i dr., 2020). S ciljem prevazilaženja problema izazvanih ograničenošću konvencionalnih resursa baziranih na fosilnim gorivima, neophodno je preduzeti mere koje podrazumevaju racionalno korišćenje već postojećih energetskih izvora i nalaženje alternativnih. Poslednjih godina obnovljivi izvori energije (energija vodotokova, vetra, neakumulirana sunčeva energija, biomasa, geotermalna energija i dr.) dobijaju sve veći značaj pa se procenjuje da će se u 2030. i 2040. godini iz ovih izvora dobijati preko 30% odnosno 40% energije, dok se za 2100. godinu očekuje da se udeo ovih izvora u globalnoj potrošnji energije poveća do čak 80% (Tabatabaei i dr., 2020; Cuong i dr., 2021). S obzirom da obnovljivi izvori energije i tehnologije njihovog korišćenja podrazumevaju smanjenu emisiju ugljen-dioksida (CO<sub>2</sub>) i drugih štetnih jedinjenja, budući razvoj energetike i društva bi trebalo da se bazira i na njihovom korišćenju. Prema podacima Republičkog zavoda za statistiku Republike Srbije iz 2017. godine, proizvodnja obnovljive energije je iznosila 81669 TJ, pri čemu su najveći udeo imala drvena biomasa (45395 TJ), potom hidroelektrična energija (35107 TJ) i energija biogasa (723 TJ), dok su geotermalna energija, energija vetra i solarna energija imale znatno manji udeo (222 TJ, 175 TJ, odnosno 47 TJ). Pored težnje za realizacijom ciljeva održivog razvoja, odnosno razvoja ekološki prihvatljive proizvodnje koja će biti i ekonomski opravdana, obnovljivi izvori energije u Srbiji do danas nemaju veliki značaj u ukupnom energetskom bilansu.

### 1.1. Biomasa kao obnovljivi izvor energije

Najveći potencijal među obnovljivim izvorima energije ima biomasa koja predstavlja jedinstveni obnovljivi izvor ugljenika iz kog se različitim procesima transformacije mogu dobiti čvrsta, tečna i gasovita goriva (Rastogi i Shrivastava, 2017). Biomasa predstavlja ostatke iz poljoprivrede i šumarstva, otpad iz nekih industrija, kao i biorazgradive delove komunalnog otpada (Balat i Ayar, 2005; Predojević, 2010; Tabatabaei i dr., 2020). Prema podacima Cuong i dr. (2021), približno 40% svetske populacije (~3,1 milijarda) upotrebljava biomasu na tradicionalan način u vidu energije za grejanje i/ili pripremanje hrane, naročito deo populacije iz ruralnih delova zemalja u razvoju. S obzirom na procene da će do 2050. godine 90% svetske populacije naseljavati ove regione, korišćenje biomase i njenog energetskog potencijala postaće značajnije (Chairprasert, 2011). Izvori biomase koji se mogu koristiti za dobijanje energije se kategorizuju na savremene i tradicionalne, međutim danas se akcenat posebno stavlja na upotrebu savremenih resursa s ciljem sve veće zamene konvencionalnih izvora energije.

Prema navodima Rastogi i Shrivastava (2017) i Edeh (2020), preradom različitih vrsta biomase proizvode se biogoriva koja se mogu podeliti na četiri generacije:

- (i) prva generacija - proizvedena uglavnom iz poljoprivrednih ostataka bogatih škrobom, šećerima ili uljem;
- (ii) druga generacija - proizvedena iz lignocelulozne biomase;
- (iii) treća generacija - proizvedena iz biomase mikroorganizama i algi;

- (iv) četvrta generacija - dobijena primenom metaboličkog inženjeringa s ciljem unapređenja proizvodnje treće generacije biogoriva i povećanja proizvodnje specifičnih jedinjenja. Dobijanje ovog tipa biogoriva je još uvek predmet opsežnih istraživanja.

Bioetanol je značajan obnovljivi izvor energije koji se dobija fermentacijom biomase bogate šećerima ili produkata dobijenih prethodnom enzimskom ili hemijskom konverzijom lignoceluloze (Semečenko i dr., 2011; Jović i dr., 2015; Aditiya i dr., 2016).

Globalno zagrevanje atmosfere nastalo sagorevanjem fosilnih goriva i oslobađanjem CO<sub>2</sub> i azotnih oksida koji pojačavaju efekat „staklene bašte” predstavlja značajan ekološki problem svetskih razmera. Stoga Rastogi i Shrivastava (2017) ističu da su glavne prednosti korišćenja biogoriva široka distribucija bioresursa i smanjena emisija CO<sub>2</sub>, oksida azota i sumpora, kao i polutanata poput policikličnih aromatičnih ugljovodonika što daje značajan doprinos u očuvanju životne sredine i poboljšanju kvaliteta života i zdravlja stanovništva. Kako bi se utvrdio doprinos sagorevanja goriva efektu „staklene bašte” neophodno je definisati njegov „životni ciklus”. Za razliku od fosilnih goriva, ukupan bilans emisije CO<sub>2</sub> pri sagorevanju bioetanola je jednak nuli bez obzira na vrstu prirodnog izvora iz kog je dobijen (Mojović i dr., 2007). Tako su Aditiya i dr. (2016) saopštili da bi se zamenom benzina bioetanolom emisija CO<sub>2</sub> u atmosferu smanjila čak i do 80%. Takođe, sagorevanje bioetanola je praktično bez oslobađanja sumpora ali uz oslobađanje značajne količine toplotne energije. Isti autori su istakli da je u 2011. godini svetska proizvodnja bioetanola bila veća od 100 milijardi litara što ga je uvrstilo među najpoželjnije alternative fosilnim gorivima. Na osnovu svega navedenog, proizvodnja bioetanola predstavlja jedan od prioriteta u razvoju koncepta održivog razvoja na globalnom nivou. Iako ima 68% niži sadržaj energije od benzina, visok sadržaj kiseonika u bioetanolu čini njegovo sagorevanje „čistijim” tj. rezultira manjom emisijom toksičnih jedinjenja. Pored biorazgradivosti i manje toksičnosti, tržišna cena bioetanola je niža što predstavlja još jednu prednost njegove upotrebe (Walker, 2010). Međutim, postoje i nedostaci u proizvodnji i upotrebi bioetanola kao što su: (i) neodrživost izvora biomase; (ii) nepovoljni energetske bilans; (iii) različita efikasnost mikroorganizama uključenih u proces fermentacije; (iv) nemogućnost konvencionalnih motora da u potpunosti pređu sa fosilnih goriva na bioetanol itd. Enguídanos i dr. (2002) predlažu rešenje poslednjeg problema kroz korišćenje smeše fosilnog goriva i bioetanola s njegovim maksimalnim udelom do 22% čime bi se izbegla modifikacija motora.

Za proizvodnju bioetanola na industrijskom nivou potrebno je uzeti u obzir više faktora kao što su koncentracija ugljenih hidrata u biomasi, odnosno njihova iskoristivost koja se ogleda u količini etanola dobijenog iz jedinice mase sirovine i dostupnost i cena sirovine koje zavise od geografskog porekla i utiču na ekonomski aspekt proizvodnje etanola (Enguídanos i dr. 2002). Bioetanol se uglavnom proizvodi iz poljoprivrednih ostataka, međutim s aspekta kompeticije za izvorima hrane, već sada a pogotovo u budućnosti, njegova proizvodnja bi mogla da predstavlja problem. Za razliku od sirovina na bazi šećera i skroba, korišćenje lignocelulozne biomase je ekološki i ekonomski opravdanije pošto se ta biomasa ne koristi direktno kao hrana (Ludwig i dr., 2013).

## 1.2. Lignocelulozna biomasa

Lignoceluloza je jedan od najzastupljenijih biopolimera u prirodi i važan obnovljivi izvor energije. Godišnje se širom sveta proizvede velika količina ove biomase (~150 milijardi tona), a dominantna lignocelulozna sirovina koja se koristi u različitim biotehnološkim procesima se razlikuje od regiona do regiona (Asim i dr., 2015; Gupta i Verma 2015). Proizvodnja ove vrste otpada je značajna i u Srbiji gde je prema podacima Banković i dr. (2009) 46,4% teritorije pokriveno poljoprivrednim usevima a 29,1% šumama. Ako se ovome doda biomasa trava i/ili korova, komunalnog i otpada iz prehrambene industrije dobija se ogromna količina otpada koji predstavlja ozbiljan balast za životnu sredinu. Neadekvatno upravljanje otpadom, odnosno njegovo odlaganje na deponije ili spaljivanje vodi zagađenju životne sredine što ima loš uticaj na zdravlje ljudi (Stajić i dr., 2016). Međutim, lignocelulozna biomasa ima ogroman potencijal kao sirovina za



proizvodnju hemikalija (ksilitol, ksiloza, glukoza, furfural), energije, enzima, papira, biogoriva i dr. što potvrđuje ekološku opravdanost njenog korišćenja (Millati i dr., 2011; Stajić i dr., 2016).

Lignocelulozne sirovine se po sastavu, strukturi i poreklu svrstavaju u nekoliko grupa: (i) poljoprivredni otpad (pšenična i pirinčana slama, ostaci nakon žetve kukuruza, reznice voća i sl.); (ii) otpad iz šumarstva; (iii) celulozni otpad (novine, papir i sl.); (iv) komunalni čvrsti otpad; (v) biomasa trava i korova (Hu i dr., 2008; Sánchez i Cardona, 2008; Zheng i dr., 2009). Poljoprivredni ostaci predstavljaju jedan od najvećih obnovljivih izvora što se može demonstrirati količinom ostataka iz proizvodnje pirinča i pšenice na svetskom nivou ( $104507 \times 10^4$  tona odnosno  $98104 \times 10^4$  tona). Ne treba zanemariti komunalni i industrijski otpad kao potencijalne sirovine za proizvodnju bioetanola, kao ni ostatke iz šumarstva koji se smatraju najznačajnijim sirovinama za dobijanje biogoriva druge generacije (Gupta i Verma, 2015). Zbog velike dostupnosti i niske cene ovih sirovina, danas se poseban akcenat stavlja na razvoj i unapređenje tehnologije za njihovu konverziju do fermentabilnih šećera. Međutim, kompleksnost hemijske strukture lignocelulozne biomase usložnjava njenu pripremu za proces fermentacije čime se povećavaju troškovi procesa proizvodnje (Arenas-Cárdenas i dr., 2017).

### 1.2.1. Fizičke i hemijske karakteristike lignocelulozne biomase

Lignoceluloza se sastoji iz celuloze, hemiceluloze i lignina koji čine glavne komponente ćelijskih zidova vaskularnih biljaka. Njihova zastupljenost u lignoceluloznom otpadu iznosi oko 80% suve mase, a sastav varira u zavisnosti od biljne vrste, klimatskih uslova, uslova rasta i faze razvoja biljke (Barakat i dr., 2013). Pored lignina, celuloze i hemiceluloze, lignocelulozni otpad sadrži male količine pepela, cikličnih ugljovodonika, proteina, vitamina, lipida i drugih jedinjenja (prosti fenoli, smola, tanini, vosak, pektini i dr.) (Sánchez, 2009; Abdolali i dr., 2014). Sadržaj pepela varira između 1% i 20% u zavisnosti od razvojnog stadijuma biljke (oko 15% u slami pirinča), dok su sadržaji proteina i lipida relativno niski (na primer u slami 2-8% proteina i 1-2% lipida) (Chen, 2014). Glavni ograničavajući faktor primene lignocelulozne biomase u procesu dobijanja bioetanola je prisustvo lignina, najrezistentnijeg polifenolnog jedinjenja koje gradi mrežu oko hemiceluloze i celuloze kao glavnih izvora fermentabilnih šećera onemogućavajući njihovu razgradnju (Sánchez, 2009; Millati i dr., 2011). Visok sadržaj lignina (10-25% u zavisnosti od vrste sirovine) takođe nepovoljno utiče na svarljivost lignoceluloznih ostataka smanjujući njihovu hranljivu vrednost (Ramos, 2003). Međutim, pored same prirode lignina mnogi drugi faktori kao što su kristalna struktura celuloze, stepen polimerizacije, veličina čestica biomase i broj acetil grupa povezanih u polimerni lanac hemiceluloze, ograničavaju svarljivost celuloze i hemiceluloze (Millati i dr., 2011).

#### 1.2.1.1. Lignin

Lignin je najpostojanije prirodno polifenolno jedinjenje koje u biljnom ćelijskom zidu zajedno sa hemicelulozom gradi matriks u koji su uronjena vlakna celuloze (Hammel, 1997; Ponnusamy i dr., 2019). Njegove glavne funkcije su zaštita polisaharida ćelijskog zida kao i efikasan transport vode i nutrijenata i obezbeđivanje čvrstine biljaka. Pored celuloze, lignin predstavlja najzastupljeniji obnovljivi izvor ugljenika na Zemlji pa samim tim ima važnu ulogu u procesu njegovog kruženja u prirodi. Međutim, da bi se održao prirodni tok ugljenika, lignin mora biti razgrađen delovanjem različitih organizama (Hammel, 1997). Sam proces razgradnje utiče na humifikaciju zemljišta jer se tokom njega oslobađaju aromatični prekursori humusa, tanini, flavonoidi i dr. Temperatura, kiselost i vlažnost zemljišta su važni spoljašnji faktori koji utiču na ligninolitički proces u prirodnim ekosistemima. Naime, u nekim oblastima naslage stelje mogu biti jako debele zbog niske pH vrednosti podloge i male količine padavina tokom leta što nepovoljno utiče na aktivnost mikroorganizama za razliku od tropskih šuma gde visoka vlažnost i temperatura ubrzavaju proces razgradnje (Hammel, 1997).

Lignin je po svom hemijskom sastavu granati polimer sa fenilpropanskim jedinicama povezanim međusobno C-C vezama koje su unutar molekula zastupljene sa 70% i C-O-C vezama

sa zastupljenošću od 30%. Ispitivanjem strukture lignina, otkriveno je 11 vrsta veza unutar molekula, od kojih je  $\beta$ -O-4 etarska veza najzastupljenija sa 40-60% (Li, 1996). Glavne komponente lignina su *p*-kumaril-, koniferil- i sinapil alkohol, koji nastaju od fenilalanina u opštem fenilpropanoidnom i specifičnom monolignolnom putu. Ove komponente se u ligninu javljaju u formi fenilpropanoida i to *p*-hidroksifenila (H), gvajacila (G) i siringila (S). Međutim, koniferil aldehid, 5-hidroksikoniferil alkohol i acetilovani monolignoli su takođe monomerne jedinice lignina (Ponnusamy i dr., 2019). Enzimi poput lakaza ili peroksidaza katalizuju reakciju njihove jednoelektronske oksidacije u prisustvu peroksida, gradeći fenoksi radikale koji se potom polimerizuju formirajući različite konfiguracije (Hammel, 1997; Kirk i Cullen, 1998; Boerjan, 2003; Marković i dr., 2009; Harmsen i dr., 2010). Zbog svoje složenosti, molekulska masa i relativna gustina lignina su varijabilne i zavise od metode ekstrakcije (od nekoliko stotina do više hiljada kDa odnosno od 1,35 do 1,50 kg/m<sup>3</sup>) (Chen, 2014).

Na osnovu fizičko-hemijskih karakteristika, mogu se izdvojiti tri osnovna tipa lignina: (i) G-lignin - lignin mekog drveta ili golosemenica koji isključivo sadrži ostatke izvedene iz koniferil alkohola; (ii) GS-lignin - lignin tvrdog drveta ili skrivenosemenica koji sadrži ostatke izvedene iz koniferil i sinapil alkohola; (iii) HGS-lignin - lignin trava i zeljastih biljaka koji sadrži sve tri glavne komponente lignina. Kao posledica fizičko-hemijskih osobina, lignin tvrdog drveta je podložniji konverziji u odnosu na lignin mekog drveta (Ramos, 2003).

### **1.2.1.2. Celuloza**

Celuloza je najzastupljeniji biopolimer sa godišnjom produkcijom procenjenom na  $1,5 \times 10^{12}$  tona, što je čini neiscrpnim izvorom sirovine za proizvodnju energije. Ona predstavlja glavnu komponentu biljnog ćelijskog zida i njen sadržaj varira u zavisnosti od vrste biljke i njene starosti kao i uslova spoljašnje sredine. Generalno, zastupljenost celuloze u biljnim ćelijama se kreće između 23% i 53% suve mase (Liu i Sun, 2010).

Celuloza (C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>)<sub>n</sub> je linearni homopolimer sastavljen od D-glukopiranoznih jedinica međusobno povezanih  $\beta$ -1,4-glikozidnim vezama čiji stepen polimerizacije može ići čak do 15000 dok dužina lanca zavisi od vrste izvora (Hallac i Ragauskas, 2011; Chen, 2014; Oberlerchner i dr., 2015). Nekoliko paralelnih lanaca glukoze formiraju fibrile koji se grupišu u snopove gradeći mikrofilamentoznu strukturu, dok više mikrofilamenata obrazuje makrofilamente. U regionima gde dolazi do uspostavljanja vodoničnih veza između molekula fibrila celuloza ima kristalnu strukturu dok je preostali deo amorfan (Zhbankow, 1992; Alvira, 2010; Liu i Sun, 2010; Grujić, 2016). U biljnom ćelijskom zidu hemiceluloza ispunjava prostor između fibrila dok su mikrofilamenti okruženi ligninom (Ramos, 2003). Celuloza je nerastvorljiva u vodi kao i razblaženim kiselinama što doprinosi njenoj hemijskoj i mehaničkoj stabilnosti i otpornosti (Zugenmaier, 2001). Takođe, zbog visokog stepena polimerizacije, rezistentnosti kristalne strukture i veze sa hemicelulozom i ligninom, celuloza je otporna na dejstvo različitih hemikalija i enzima što negativno utiče na efikasnost enzimske hidrolize (Alvira, 2010).

### **1.2.1.3. Hemiceluloza**

Hemiceluloza je posle celuloze najrasprostranjeniji biopolimer u prirodi (Ren i Sun, 2010; Limayem i Ricke, 2012). Za razliku od celuloze, hemiceluloza je granati polisaharid koga grade pentoze i heksoze (D-ksiloza, L-arabinoza, D-manoza, D-galaktoza, D-glukoza, kao i 4-O-metil glukuronska, D-glukuronska i D-galakturonska kiselina) međusobno povezane  $\beta$ -1,4 i  $\beta$ -1,3 glikozidnim vezama. Hemiceluloza nije kristalno uređena zahvaljujući razgranatoj strukturi i acetil grupama vezanim za polimerni lanac. S obzirom na razgranatu strukturu hemiceluloze, na glavnom lancu ili granama su prisutni supstituenti male molekulske mase i niskog stepena polimerizacije (80-200 jedinica). Jedna od glavnih uloga hemiceluloze je organizacija celuloze u ćelijskom zidu kao i obezbeđivanje njegove čvrstine zahvaljujući interakciji sa celulozom i ligninom (Arenas-Cárdenas i dr., 2017).

Hemiceluloza se klasifikuje u četiri grupe: (i) ksilani - najznačajniji i široko rasprostranjeni polimeri koji zbog svoje strukture imaju značajnu primenu u različitim biotehnološkim procesima; (ii) ksiloglukani – prisutni u primarnom ćelijskom zidu viših biljaka i vezani za celulozu; (iii) manani - prisutni u sekundarnom ćelijskom zidu mekog drveta; (iv) grupa sagrađena od različito povezanih  $\beta$ -glukana najčešće prisutna u ćelijskom zidu trava (Schädel i dr., 2009; Ren i Sun, 2010; Limayem i Rieke, 2012).

### 1.3. Gljive kao razlagači lignocelulozne biomase

Organizmi koji jedini imaju sposobnost da razlažu lignocelulozu su bakterije i gljive, s tim da su gljive efikasniji razlagači ostataka sa većim udelom lignina pošto su bolji producenti ligninaza u odnosu na bakterije. Međutim, određene vrste rodova *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Pseudomonas* i pojedine Actinomycetes poput nekih vrsta roda *Streptomyces* imaju sposobnost razlaganja drvene mase (Hatakka, 2005; Eriksson i dr., 2012; Rezanian i dr., 2020).

**Gljive izazivači belog truljenja** predstavljaju jedne od glavnih razlagača lignoceluloze u prirodi zahvaljujući složenom ligninolitičkom enzimskom sistemu što ih čini glavnim učesnicima prve faze tretmana biljne mase, tj. depolimerizacije i mineralizacije lignina (Sánchez, 2009; Stajić i dr., 2009; Wan i Li, 2012). Ove vrste istovremeno razlažu sve komponente ćelijskog zida počev od lumena ka srednjoj lameli zbog čega biljno tkivo postaje sve krtije i svetlije kako proces napreduje (D'Souza i dr., 1999; Stajić i dr., 2010). Kao najefikasniji razlagači lignina u prirodi, gljive belog truljenja imaju ključnu ulogu u procesu kruženja ugljenika. Najveći broj ovih vrsta pripada podrazdelu Basidiomycotina i to klasi Hymenomycetes dok je manji broj predstavnika iz podrazdela Ascomycotina (familija Xylariaceae). Međutim, pored gljiva izazivača belog truljenja u prirodi postoje i vrste braon i mekog truljenja.

**Gljive izazivači braon truljenja** razlažu celulozu i hemicelulozu dok lignin modifikuju procesom metilacije. Hatakka (2005) je saopštio da ove gljive mnogo brže depolimerizuju celulozu i hemicelulozu nego što mogu da iskoriste nastale hidrolizate pa dolazi do nakupljanja neiskorišćenih šećera. Sa druge strane modifikovani lignin je reaktivniji u odnosu na prirodni zbog većeg sadržaja karbonilnih, karboksilnih, fenolnih i hidroksilnih grupa (Sun i dr., 2009). Zbog zaostalog lignina drvo dobija smeđu boju, gubi mehanička svojstva, postaje lomljivo i brzo puca. Gljive braon truljenja daju veliki doprinos razgradnji drvene mase i formiranju zemljišta jer ostavljaju modifikovani lignin koji predstavlja važan prekursor humusa (Hammel, 1997). Ovoj grupi pripada oko 10% ukupnog broja vrsta gljiva koje mogu da razlažu lignoceluloznu biomasu i koje pripadaju podrazdelu Basidiomycotina, uglavnom familiji Polyporaceae (Rayner i Boddy, 1988).

**Gljive izazivači mekog truljenja** razlažu polisaharidne komponente drvene mase i to prevashodno one zasićene vlagom i s visokom koncentracijom azota. Aktivnost ovih gljiva je ograničena na demetilaciju lignina zbog čega ga u manjoj meri modifikuju. Sporiji su i manje agresivni razlagači drvene mase u odnosu na prethodne dve grupe (Kirk i Cullen, 1998). Prema izgledu drvene mase nakon delovanja ovih gljiva mogu se razlikovati dva tipa mekog truljenja: (i) **tip 1** - odlikuje ga obrazovanje cilindričnih šupljina u sekundarnom ćelijskom zidu; (ii) **tip 2** - erozivni tip degradacije sekundarnog ćelijskog zida. Gljive mekog truljenja uglavnom pripadaju podrazdelima Ascomycotina i Deuteromycotina, kao što su vrste rodova *Penicillium*, *Chaetomium*, *Alternaria* i mnoge druge (Hammel, 1997; Kirk i Cullen, 1998).

#### 1.3.1. Ligninolitički mehanizmi gljiva izazivača belog truljenja

Zbog jedinstvenih ligninolitičkih sposobnosti gljiva belog truljenja, njihov mehanizam razlaganja lignina je predmet velikog broja istraživanja. Ovi organizmi imaju sposobnost da sintetišu jedan ili više tipova enzima iz grupe lignin-modifikujućih enzima. Kod ove grupe gljiva Kirk i Cullen (1998) su opisali dva glavna mehanizma razlaganja lignina: (i) **simultano razlaganje** - celuloza, hemiceluloza i lignin se razgrađuju gotovo istovremeno pri čemu se ćelijski zidovi

postepeno tanje od lumena prema srednjoj lameli. *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Irpex lacteus*, *Xylaria hypoxylon* su neke od vrsta koje na ovaj način vrše razlaganje drvene mase; (ii) **selektivno razlaganje** - lignin i hemiceluloza podležu razgradnji pre celuloze. Neki od predstavnika koji delignifikuju biomasu na ovaj način su *Dichomitus squalens*, *Ganoderma australe*, *Phlebia tremellos* i dr. (Martínez i dr., 2005). Kako Kirk i Cullen (1998) ističu, razlike u tipu razgradnje lignina postoje kako između različitih vrsta gljiva tako i između sojeva iste vrste. Interesantno je pomenuti da u nekim slučajevima ista vrsta na različitim biljnim delovima može izazvati različite tipove razlaganja.

Zahvaljujući postojanosti lignina, gljive ga razlažu specifičnim mehanizmima. Postoji nekoliko različitih mehanizama koje odlikuje nastanak slobodnih radikala lignina koji zbog svoje nestabilnosti podležu nizu spontanijih cepajućih reakcija (Hammel, 1997). Gljive koje vrše razlaganje lignina suočene su sa nekoliko problema: (i) krupan i jako razgranat polimer zbog čega ligninolitički mehanizam mora biti **ekstracelularan**; (ii) postojanje stabilnih etarskih i ugljeničnih veza između subjedinica zbog čega je mehanizam razgradnje **oksidativan** a ne hidrolitički; (iii) lignin je kombinacija stereo-iregularnih jedinica zbog čega se ligninolitički enzimi moraju odlikovati **širokom specifičnošću**; (iv) nerastvorljivost lignina u vodi što proces razgradnje čini **sporim** (Kirk i Cullen, 1998).

Nakon brojnih studija sprovedenih tokom više od 30 godina, razjašnjeni su mehanizmi razgradnje lignina kako gljivama izazivačima belog truljenja tako i drugim grupama gljiva (Lundell i dr., 2010). Prema Janusz i dr. (2017) mehanizam razgradnje lignina prvi put je opisan kod vrste *Phanerochaete chrysosporium*, gljive belog truljenja koja sintetiše lignin- i Mn-oksidujuće peroksidaze ali ne i lakaze. Kod ove vrste ligninoliza se odvija tokom sekundarnog metabolizma u uslovima smanjene količine azota u medijumu, dok se kod vrsta rodova *Bjerkandera* i *Pleurotus* vrši i u prisustvu značajne količine ovog elementa (Hammel, 1997; Stajić i dr., 2006a).

#### 1.4. Enzimski sistemi gljiva

Razgradnja lignocelulozne biomase gljivama omogućena je širokim spektrom enzima čiji se mehanizmi delovanja mogu podeliti na oksidativne i hidrolitičke. Leonowicz i dr. (1999) i Sánchez (2009) su izvršili podelu enzima gljiva izazivača belog truljenja na: (i) enzime koji razlažu celulozu, hemicelulozu i lignin, tj. lignocelulolitičke enzime u čiji sastav ulaze ligninaze, celulaze i hemicelulaze; (ii) enzime koji funkcionišu u sadejstvu sa enzimima prve grupe ali ne i samostalno; (iii) enzime povratne sprege koji su indirektno uključeni u delignifikaciju a direktno u razgradnju celuloze.

Enzimi uključeni u degradaciju lignina se generalno mogu podeliti na **hem peroksidaze** koje uključuju lignin- i Mn-oksidujuće peroksidaze i **polifenol-oksidaze** tj. lakaze (Dashtban i dr., 2010). Važnu grupu čine „pomoćni” enzimi koji nemaju sposobnost da sami učestvuju u razlaganju lignina ali su neophodni za završetak procesa. Njihova uloga se ogleda u sekvencijalnom dejstvu nekoliko redoks enzima čijim delovanjem dolazi do stvaranja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. U ovu grupu spadaju glioksal oksidaze, aril-alkohol oksidaze, piranoza-2-oksidaze, glukozo oksidaze i celobiozo-dehidrogenaze. U ligninolitičkom procesu kao medijatori aktivno učestvuju metaboliti gljiva kao što su fenolna i druga aromatična jedinjenja, peptidi male molekulske mase, metalni joni i dr. (Levansseur i dr., 2008; Lundell i dr. 2010; Janusz i dr., 2013).

Kompleks celulolitičkih enzima čine tri grupe enzima koje deluju sinergistički: (i) endocelulaze ili endo-β-1,4-glukanaze koje cepaju veze u unutrašnjem delu lanca celuloze; (ii) egzocelulaze ili celobiohidrolaze koje „napadaju” krajeve polimera oslobađajući celobiozu; (iii) β-glukozidaze koje katalizuju razgradnju celobioze na dva molekula glukoze (Sun i Cheng, 2002; Juturu i Wu, 2014; Aditiya i dr., 2016).

Tokom procesa hidrolize, hemicelulaze olakšavaju celulazama pristup supstratu. Kako Sánchez (2009) navodi, hemicelulaze su neophodne za potpunu razgradnju hemiceluloze do monomernih šećera i sirćetne kiseline. Ova grupa enzima uključuje endo-1,4-β-ksilanaze koje katalizuju raskidanje veza u ksilanu i nastanak oligosaharida i ksilan-1,4-β-ksilozidaze koje hidrolizuju

oligosaharide do ksiloze. Pomoćni enzimi koji deluju sinergistički i vrše hidrolizu ksilana i manana su ksilan esterase, ferulične i *p*-kumarične esterase,  $\alpha$ -4-O-metilglukuronozidaze i  $\alpha$ -1-arabinofuranozidaze.

### 1.4.1. Ligninolitički enzimi

#### 1.4.1.1. Lignin-peroksidaze

Lignin-peroksidaze (LiP; EC1.11.1.14) su prvi otkriveni lignin-modifikujući enzimi i to kod *Phanerochaete chrysosporium* dok su kasnije otkriveni i kod *Trametes versicolor*, *Bjerkandera* sp. i *Phlebia tremellosa*. Međutim, dokazano je da neke vrste gljiva belog truljenja kao što su *Dichomitus squalens*, *Ceriporiopsis subvermispota* i *Pleurotus* spp. ne sintetišu ove enzime (Johansson i Nyman 1993; Kirk i Cullen, 1998; Aarti i dr., 2015). LiP predstavljaju moćne oksidanse koji zbog visokog redoks potencijala oksiduju i uobičajene peroksidazne supstrate (fenole i aniline) ali i niz nefenolnih jedinjenja čija je struktura slična onoj kod jedinica lignina. Jedan od nefenolnih supstrata ovih enzima je veratril alkohol (VA) koji je ujedno i redoks medijator u procesima oksidacije lignina (Kirk i Cullen, 1998; Wong, 2009). Ovi enzimi sadrže dva jona kalcijuma koji su esencijalni za njihovu aktivnost, molekulska masa im je u opsegu između 35 i 48 kDa a pH optimalna za njihovu aktivnost od 3,1 do 4,7 (Santhanam i dr., 2012; Sigoillot i dr., 2012; Ilić-Đurđić, 2020). Sintetišu se u više izoformi koje se razlikuju po stepenu glikozilacije, izoelektričnim tačkama (pI), supstratnoj specifičnosti i stabilnosti. Na početku svakog katalitičkog ciklusa nativni enzim sadrži gvožđe u feri stanju ( $\text{Fe}^{3+}$ ) koje se oksiduje pomoću  $\text{H}_2\text{O}_2$  kao akceptora elektrona do **jedinjenja I** ( $\text{Fe}^{4+}$ - okso-porfirin-radikal intermedijer [ $\text{Fe(IV)} = \text{O}^{\bullet+}$ ]) uz otpuštanje molekula vode (Wong, 2009). S obzirom da jedinjenje I ima deficit od dva elektrona u odnosu na nativni enzim, njegova redukcija se odvija u dva koraka tako što prvo dolazi do jednoelektronske oksidacije prvog molekula supstrata, poput VA kao donora elektrona, i formiranja **jedinjenja II** [ $\text{Fe(IV)} = \text{O}$ ] i veratril katjon radikala. Jedinjenje II dalje oksiduje drugi molekul supstrata vraćajući se u nativno stanje za početak novog katalitičkog ciklusa (Wong, 2009).

#### 1.4.1.2. Mn-oksidujuće peroksidaze

Ova grupa enzima obuhvata Mn-zavisne peroksidaze (MnP; EC1.11.1.13) i Mn-nezavisne/verzatil peroksidaze (MnIP/VP; EC1.11.1.16). MnP predstavljaju značajne lignin-modifikujuće enzime prvi put detektovane pre više od 30 godina kod *Ph. chrysosporium* a kasnije i kod većine vrsta izazivača belog truljenja (Kirk i Cullen, 1998; Janusz i dr., 2017). Njihova molekulska struktura je slična onoj kod LiP ali su slabiji oksidansi zbog manjeg deficita elektrona u porfirinskom prstenu. Ovi enzimi su  $\text{H}_2\text{O}_2$ -zavisni hem-glikoproteini sa gvožđe protoporfirin IX prostetičkom grupom čija je glavna funkcija oksidacija  $\text{Mn}^{2+}$  u visoko reaktivan  $\text{Mn}^{3+}$  koji je medijator u procesu oksidacije organskog supstrata poput lignina, fenola i dr. (Hofrichter, 2002) Sintetišu se u različitom broju izoformi koji varira od vrste do vrste, na primer kod *Ceriporiopsis subvermispota* zabeleženo je čak 11 izoformi (Hofrichter, 2002). Njihova molekulska masa je u opsegu od 38,0 do 62,5 kDa (najčešće oko 45,0 kDa), a pI od 2,9 do 7,1 (Hofrichter, 2002; Sigoillot i dr., 2012). Katalitički ciklusi MnP i LiP su veoma slični, međutim MnP su jedinstvene po tome što je kod njih  $\text{Mn}^{2+}$  obligatni donor elektrona pri redukciji enzima kome nedostaje jedan elektron da bi prešao u nativno stanje. Ciklus započinje elektronskom oksidacijom nativnog enzima sa  $\text{H}_2\text{O}_2$  pri čemu dolazi do formiranja **jedinjenja I** ( $\text{Fe}^{4+}$ - okso-porfirin-radikal kompleks) i oslobađanja molekula vode. Jedinjenje I se u prisustvu supstrata, fenola ili  $\text{Mn}^{2+}$  dalje redukuje do **jedinjenja II** ( $\text{Fe}^{4+}$ - okso-porfirin kompleks) koje se redukuje do nativnog enzima u prisustvu  $\text{Mn}^{2+}$  iz lignoceluloze koji se oksiduje u  $\text{Mn}^{3+}$  uz oslobađanje drugog molekula vode (Hofrichter, 2002; Martínez, 2002). U reakciji oksidacije ovih enzima nastaju mali difuzibilni molekuli koji napadaju fenolnu komponentu lignina oslobađajući reaktivne fenoksi radikale koji učestvuju u raskidanju veze između aromatičnog prstena i  $\alpha$ -ugljenika (Martínez, 2002; Martínez i dr., 2005). Međutim, pri

visokoj koncentraciji H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> može biti reverzibilni inhibitor MnP formirajući katalitički neaktivno **jedinjenje III** (Hofrichter, 2002).

MnIP/VP su prvi put izolovane nakon tečne kultivacije *Pleurotus eryngii* u glukoza/pepton/ekstrakt kvasca medijumu (Martínez i dr., 1996). Kasnije su Stajić i dr. (2010), Čilerdžić i dr. (2011) i Janusz i dr. (2013) zabeležili ove enzime i kod vrsta rodova *Bjerkandera*, *Ganoderma*, *Trametes* i dr. S obzirom da ovi enzimi katalizuju oksidativne reakcije karakteristične za MnP (oksidacija Mn<sup>2+</sup> u Mn<sup>3+</sup>) smatrani su izoenzimima MnP (Martínez i dr., 1996; Giardina i dr., 2000). Međutim, oni katalizuju i oksidativne reakcije koje su karakteristične za LiP, odnosno oksidaciju niza fenolnih i nefenolnih aromatičnih supstrata zbog čega ih Caramelo i dr. (1999) smatraju LiP-MnP hibridima. Zbog kombinacije katalitičkih mehanizama imaju sposobnost da oksiduju širok spektar supstrata različitog redoks potencijala (Pérez-Boada i dr., 2005; Sigoillot i dr., 2012). To su glikoproteini sa dva jona kalcijuma koji se produkuju u više izoformi, molekulske mase u rasponu od 40 do 45 kDa i pI od 3,4 do 3,9 (Mester i Field, 1998).

#### 1.4.1.3. Lakaze

Lakaze (EC1.10.3.2) su prvi put izolovane iz japanskog drveta *Rhus vernicifera*, a nešto kasnije su otkrivene i kod mnogih drugih vrsta biljaka, insekata i bakterija (Yoshida, 1883; Claus, 2004; Dashtban i dr., 2010). Međutim, prema navodima Thurston (1994) i Dashtban i dr. (2010) najbolji producenti ovih enzima su gljive izazivači belog truljenja poput *Cerrena unicolor*, *Lentinus tigrinus*, *Ph. chrisosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes* spp. i dr. Takođe, i neke vrste izazivači braon truljenja kao što su *Chaetomium thermophile*, *Coniophora puteana*, *Melanocarpus albomyces*, *Neurospora crassa* i dr., produkuju ove enzime. Utvrđeno je da lakaze kod gljiva imaju ulogu u pigmentaciji, formiranju plodonosnih tela i ekspresiji patogenosti (Hoshida i dr., 2001).

Lakaze gljiva su ekstracelularni glikoproteini molekulske mase od 60 do 80 kDa i kisele do približno neutralne pI koje se sintetišu u nekoliko izoformi čiji broj zavisi od vrste, uslova kultivacije kao i prisustva, odnosno odsustva inducera u medijumu, a regulišu ih familije strukturno povezanih gena (de Souza i dr., 2004; Baldrian, 2006; Morozova i dr., 2007). Katalizuju četiri uzastopne jedno-elektronske oksidacije brojnih organskih i neorganskih supstrata, uključujući fenolna i nefenolna aromatična jedinjenja, do odgovarajućih radikala koristeći molekularni kiseonik kao akceptor elektrona koji se redukuje do vode (Thurston, 1994; Morozova i dr., 2007). Oksidacija supstrata može biti ili direktna, interakcijom sa katalitičkim centrom enzima, ili indirektna, preko hemijskih medijatora (2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina (ABTS), 1-hidroksibenzotrijazol i dr.) (Claus, 2004; Riva, 2006; Canas i Camarero, 2010)

Lakaze gljiva su polifenol-oksidge sa jednim do četiri atoma bakra raspoređena u tri aktivna centra (T1, T2 i T3) koji se redukuju uporedo sa oksidacijom supstrata igrajući ključnu ulogu u katalitičkom ciklusu (Thurston, 1994; Janusz i dr., 2017). Prema podacima Alcade (2007) atom Cu unutar T1 aktivnog centra je primarni akceptor elektrona. Nakon prelaska elektrona na T2 i T3 centre i redukcije enzima dolazi do vezivanja dva atoma kiseonika i formiranja peroksida kao intermedijera. Na kraju katalitičkog ciklusa peroksid se u potpunosti oksiduje a kiseonik redukuje do molekula vode. Međutim, neke vrste gljiva, kao što je *Coprinus cinereus*, ne sadrže sva četiri atoma Cu u molekulu lakaze što uzrokuje nepotpunu katalitičku aktivnost enzima (Ducros i dr., 1998). Sa druge strane kod pojedinih vrsta gljiva lakaze umesto Cu mogu da vežu i druge metale (Zn, Fe ili Mn) ali se tada ne svrstavaju u takozvane „plave” lakaze (Palmieri i dr., 1997; Min i dr., 2001). Ovo je zabeleženo kod izoforme (POXA1) koju sintetiše *P. ostreatus* i koja sadrži jedan atom Cu, jedan atom Zn i dva atoma Fe, a zbog odsustva karakteristične plave boje je svrstana u tzv. „bele” lakaze. Široka supstratna specifičnost i korišćenje O<sub>2</sub> kao krajnjeg akceptora elektrona daje im prednost za primenu u brojnim biotehnološkim procesima, uključujući i proizvodnju bioetanola (Dashtban i dr., 2010).

#### 1.4.2. Celulolitički enzimi

Pored lignin-modifikujućih enzima, gljive sintetišu i celulaze i hemicelulaze koje hidrolizuju delignifikovani materijal do šećera, tj. iskoristivih izvora energije zbog čega imaju značajnu ulogu u brojnim biotehnološkim procesima kao što je proizvodnja bioetanol (Jututru i Wu, 2014; Zeng i dr., 2014). Pored gljiva sreću se i kod bakterija, biljaka i nekih beskičmenjaka, a poređenjem njihovih aminokiselinskih sekvenci i kristalnih struktura klasifikuju se u više različitih familija (Xi i dr., 2013; Zhang i Zhang, 2013). Kao i sve glikozid-hidrolaze, celulaze vrše raskidanje  $\beta$ -1,4-glikozidnih veza u molekulu celuloze oslobađajući glukozu. Ono što razlikuje celulaze od drugih klasa enzima jeste sposobnost hidrolize nerastvorljivog supstrata. Celulaze čine kompleks tri enzima: (i) endocelulaze ili endo- $\beta$ -glukanaze (EG; 3.2.1.4), (ii) egzocelulaze ili celobiohidrolaze (CBH; EC3.2.1.91) i (iii)  $\beta$ -glukozidaze (EC3.2.1.21), čijim se sinergističkim dejstvom dobija glukozu kao glavni proizvod hidrolize celuloze (Zhang i Lynd, 2004; Buckeridge i Goldman, 2011; Paramjeet i dr., 2018).

Endocelulaze predstavljaju enzime koji nasumično hidrolizuju  $\beta$ -1,4-veze u celuloznim lancima, smanjujući na taj način stepen polimerizacije lanaca pri čemu dolazi do stvaranja oligosaharida sa redukujućim i neredukujućim krajevima na koje dalje deluju egzocelulaze (Singh i Hayashi, 1995; Xi i dr., 2013). Takav način razgradnje celuloze je od velikog značaja jer omogućava da endocelulaze pristupe manje uređenim ili delimično zaštićenim delovima amorfnog celuloze. Sweeney i Xu (2012) su istakli značaj sinergizma endo- i egzocelulaza u industrijskim procesima efikasne transformacije biomase. Aktivno mesto ovih enzima je u obliku pukotine, unutar koje enzim vezuje i razgrađuje celulozne lance. Međutim, kod endocelulaza gljiva celulozno-vezujući domen može da odsustvuje (Várnai i dr., 2014; Grujić i dr., 2015).

Egzocelulaze ili celobiohidrolaze su enzimi koji hidrolizuju lance celuloze sa redukujućih (CBH I) i neredukujućih (CBH II) krajeva oslobađajući celobiozu ili celotetrozu. Teeri (1997) je saopštio da CBH I i CBH II imaju sposobnost da kompletno hidrolizuju kristalnu celulozu čak i bez delovanja endocelulaza ali je tada proces veoma spor. CBH sadrže aktivno mesto nalik tunelu kroz koje je omogućeno provlačenje krajeva celuloznih lanaca i oslobađanje celobioze. Nakon toga egzocelulaze nastavljaju da klize niz lanac celuloze gde započinju sledeći korak hidrolize (Vocadlo i Davies, 2008; Liu i dr., 2011). *Trichoderma reesei* je jedan od najboljih producenata celulalaza i hemicelulaza i ima široku industrijsku primenu (Xu i dr., 2009). Od ukupnih celulaza, egzocelulaze kod ove vrste čine 80% (CBH I:CBH II = 60%:20%), dok endocelulaze i  $\beta$ -glukozidaze čine svega 15,5% (15%:0,5%) (Nummi i dr., 1983; Merino i Cherry, 2007).

Nakon delovanja endo- i egzocelulaza,  $\beta$ -glukozidaze hidrolizuju celobiozu do glukoze. Ovi enzimi imaju glavnu ulogu u regulaciji celulolitičkog procesa i predstavljaju limitirajući faktor celokupnog procesa hidrolize celuloze (Sweeney i Xu, 2012; Paramjeet i dr., 2018). Poznato je da akumulacija glukoze i celobioze, kao krajnjih produkata hidrolize, inhibira celulaze i utiče na smanjenje prinosa glukoze. Od celulolitičkih enzima uključenih u proces hidrolize lignoceluloznog supstrata najviše su inhibirane endocelulaze i celobiohidrolaze, dok su  $\beta$ -glukozidaze manje osetljive na visoke koncentracije monosaharida (Hsieh i dr., 2014). Zbog toga  $\beta$ -glukozidaze imaju presudni značaj u sprečavanju drastičnog usporavanja hidrolize (Merino i Cherry, 2007). Za razliku od endo- i egzocelulaza,  $\beta$ -glukozidazama u većini slučajeva nedostaje celulozno-vezujući domen, dok im je aktivno mesto u obliku džepa koje omogućava delovanje na neredukujuće jedinice glukoze (Langston i dr., 2006).

Generalno, celulaze poseduju celulozno-vezujući domen koji je neophodan za adheziju enzima za supstrat, čime se katalitičkom domenu omogućava vršenje funkcije (Jørgensen i dr., 2007). Iako celulozno-vezujući domen nije uključen u proces hidrolize, Bayer i dr. (1998) ističu da bi njegovo uklanjanje značajno umanjilo efikasnost hidrolize celuloze. Međutim, iako se ovaj domen smatrao veoma značajnim za delovanje celulaza, novija genetska istraživanja su pokazala da mnogim celulazama on nedostaje (Várnai i dr., 2014). Takođe, noviji podaci su potvrdili da njegovo prisustvo nije neophodno za delovanje celulaza već da može da utiče na povećanje koncentracije enzima na površini supstrata. Štaviše, isti autori su saopštili da je upotreba celulaza sa ili bez

celulazno-vezujućeg domena bila podjednako efikasna u industrijskim procesima koji zahtevaju visoke koncentracije supstrata i male količine vode.

### 1.4.3. Hemicelulolitički enzimi

Ksilan predstavlja najzastupljeniji polisaharid u hemicelulozi čineći više od 30% suve mase ćelijskog zida vaskularnih biljaka (Paramjeet i dr., 2018). Retko se javlja u vidu linearnog homopolimera izgrađenog od  $\beta$ -1,4-vezanih ksilopiranoznih jedinica, već se kod najvećeg broja biljaka nalazi u obliku heteropolimera kod koga su C<sub>2</sub> i C<sub>3</sub> atomi ksiloze supstituisani nizom bočnih grupa kao što su arabinoza, acetil grupa, glukuronska kiselina, *p*-kumarinska i ferulinska kiselina (Bastawde, 1992; Scheller i Ulvskov, 2010).

Sánchez (2009) je saopštio da efikasna hidroliza hemiceluloze zahteva sinergističko delovanje nekoliko enzima, ne samo zbog njene strukture već i veze sa ostalim komponentama ćelijskog zida. Glavni hemicelulolitički enzimi su **endo-1,4- $\beta$ -ksilanaze** koje hidrolizuju lance  $\beta$ -1,4-ksilana oslobađajući oligosaharide i **egzo-1,4- $\beta$ -ksilozidaze** koje cepaju ksilobiozu i ksilo-oligosaharide oslobađajući ksilozu. Pored ksilanaza i ksilozidaza u razgradnju hemiceluloze uključeni su i tzv. „pomoćni” enzimi (acetilksilanska-esteraza, ferulinska esteraza,  $\alpha$ -arabinofuranozidaza i dr.) (Moreira i Filho, 2008). Tako je za potpunu razgradnju arabinoksilana, kao jedne od komponenti ćelijskog zida pšenične slame neophodno delovanje  $\alpha$ -arabinofuranozidaza koje dovode do raskidanja kovalentnih veza između  $\alpha$ -arabinoze i D-ksiloze i uklanjanja ksiloznih ostataka (de Vries i dr., 2000).

## 1.5. Dobijanje bioetanola iz lignocelulozne biomase

Sánchez (2009) je proces dobijanja bioetanola iz lignoceluloznih ostataka podelio na tri faze: (i) pre-tretman tj. delignifikacija lignoceluloze; (ii) enzimaska hidroliza tj. saharifikacija pretretirane biomase; (iii) fermentacija hidrolizata.

### 1.5.1. Pre-tretman

Proces konverzije lignoceluloznog otpada do fermentabilnih šećera zahteva skup i složen pre-tretman, neophodan za uklanjanje rezistentnog lignina, čime se povećava dostupnost celuloze enzimima i omogućava njena efikasna hidroliza. Zbog kompleksnosti prirode lignoceluloznog materijala, ovaj proces predstavlja jedan od najvažnijih ali i najkritičnijih koraka u procesu konverzije lignoceluloze do etanola (Sánchez i Cardona, 2008; Hadar, 2013; Kumar i Sharma, 2017). Efikasnost saharifikacije, tj. prevođenje polisaharida u proste šećere, kao i prinos etanola zavise od pre-tretmana. Uprkos činjenici da je pre-tretman veoma skupa faza u proizvodnji bioetanola (čak 33% ukupnih troškova) pokazano je da efikasan pre-tretman povećava prinos etanola do čak 70%, što opravdava napore za razvoj novih metoda ovog postupka u cilju isplativosti dobijanja bioetanola (Alizadeh i dr., 2005; Merino i Cherry, 2007). Metode pre-tretmana koje se najčešće koriste u procesu dobijanja bioetanola mogu biti fizičke, hemijske, fizičko-hemijske, biološke i kombinovane (Kumari i Singh, 2018). Wan i Li (2012) su pokazali da se tretmanom lignoceluloze baziranom na kombinaciji fizičkih i hemijskih metoda uz učešće gljiva izazivača belog truljenja iskoristivost celuloze može povećati i do 20%. Međutim, uprkos povećanoj iskoristivosti celuloze, hemijsko-fizičko-biološki tretman zahteva upotrebu hemikalija i značajan utrošak energije. Zbog toga bi „idealni” pre-tretman podrazumevao isključivanje energetsko-ekonomski zahtevnih procesa, ubrzavanje hidrolize, povećanje prinosa šećera i sprečavanje nastanka inhibitornih jedinjenja (Gupta i Verma, 2015). Sve ove karakteristike su svojstvene biološkom tretmanu koji ipak ima i određena ograničenja kao što su dužina trajanja procesa (od nekoliko nedelja do nekoliko meseci) i manji prinos krajnjeg produkta zbog čega je njegova primena na industrijskom nivou još uvek ograničena (Millati i dr., 2011; Mauria i dr., 2015; Sindhu i dr., 2016; Rezania i dr., 2020). Selektivnost lignoceluloznog razlagača je takođe veoma bitan



parametar u ovom procesu. Tako su Wan i Li (2012) pokazali da je *Ph. chrysosporium* za samo nekoliko dana kultivacije u velikoj meri delignifikovala supstrat ali nije pokazala selektivnost, dok je *P. ostreatus* kao selektivnom i efikasnom delignifikatoru bilo potrebno nekoliko nedelja. Međutim, ovo se može prevazići direktnom upotrebom ligninolitičkih enzima čime bi se rešio problem paralelne degradacije holoceluloze do koje dolazi tokom fermentacije supstrata gljivama (Rodrigues i dr., 2008).

#### 1.5.1.1. Faktori koji utiču na pre-tretman lignoceluloze

Efikasna konverzija lignoceluloznog otpada u prisustvu gljiva izazivača belog truljenja zavisi od niza faktora, od kojih je odabir vrste jedan od najznačajnijih (Stajić i dr., 2004, 2006a,b; Čilerdžić i dr., 2011, 2017). Gljive se međusobno razlikuju po selektivnosti degradacije lignoceluloznog materijala, tj. po afinitetu da u većoj meri razlože lignin i hemicelulozu u odnosu na celulozu (Wan i Li, 2012). Pored vrste i soja gljive, efikasnost pre-tretmana zavisi i od fizičko-hemijskih svojstava lignocelulozne biomase kao i od uslova njene fermentacije (Millati i dr., 2011; Wan i Li, 2012; Čilerdžić i dr., 2016a, 2017; Stajić i dr. 2006b, 2017). Tako, neke vrste roda *Pleurotus* efikasno razgrađuju lignin iz slame, ali ne i lignin tvrdog drveta poput breze ili mekog drveta kao što je bor (Millati i dr., 2011). Brojne studije su takođe pokazale da je proces delignifikacije znatno efikasniji u uslovima čvrste fermentacije koja ima niz prednosti u odnosu na tečnu: (i) viši nivo kiseonika koji pospešuje proces delignifikacije koji je u potpunosti oksidativan; (ii) relativno niska vlažnost koja pogoduje sintezi specifičnih jedinjenja; (iii) sličnost uslova čvrste fermentacije sa uslovima prirodnih staništa gljiva (Mussato i dr., 2012; Pinto i dr., 2012; Čilerdžić i dr., 2011, 2017). Međutim, glavni nedostatak čvrste fermentacije je u odsustvu slobodne vode što ograničava transfer hranljivih materija i enzima kao i provodljivost biljnog materijala, što rezultuje temperaturnim gradijentom unutar supstrata usled metaboličke aktivnosti gljiva (Wan i Li, 2012). Važan faktor koji utiče na produkciju visoko aktivnih formi enzima a time i na efikasnost razgradnje lignoceluloze je izvor azota kao i njegova koncentracija (Millati i dr., 2011; Čilerdžić i dr. 2019). Tako su Mikiashvili i dr. (2006) pokazali da je *P. ostreatus* sintetisao visoko aktivne ligninolitičke enzime u medijumu sa organskim izvorima azota ali ne i u prisustvu neorganskih. Izvori i koncentracija ugljenika u medijumu takođe utiču na produkciju ligninolitičkih enzima kod gljiva izazivača belog truljenja (Mikiashvili i dr., 2005; Wang i dr., 2008; Stajić i dr., 2006a). Mikiashvili i dr. (2005) su pokazali da su celobioza i manitol dobri izvori ugljenika za sintezu lakaza kod *Trametes versicolor* ali znatno slabiji u odnosu na koru mandarine koja je kao jedini izvor ugljenika indukovala produkciju čak 7 puta aktivnije forme ovog enzima. Slične rezultate dobili su i Stajić i dr. (2006a) i Čilerdžić i dr. (2011) koji su pokazali da su kore mandarina i piljevina vinove loze znatno efikasnije indukovali aktivnost lakaza kod *Pleurotus* spp. odnosno kod *T. hirsuta* kod koga je optimalan supstrat za sintezu visoko aktivnih formi MnP bila pšenična slama. S druge strane, D-glukoza je stimulisala sintezu MnP i kod *T. versicolor* i kod *Ph. chrysosporium* ali u znatno manjoj meri u odnosu na lignocelulozu (Mikiashvili i dr., 2005; Wang i dr., 2008). Takođe, dodavanjem mikroelemenata kao što su  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  i dr. i inducera, poput aromatičnih jedinjenja, može se stimulisati produkcija ligninolitičkih enzima i razgradnja biomase (Bonnarme i Jeffries, 1990; Stajić i dr. 2006b; Millati i dr., 2011; Wan i Li, 2012; Čilerdžić i dr., 2019). Tako je u studijama Bonnarme i Jeffries (1990), Palmieri i dr. (2000), Baldrian i Gabriel, (2002) dodavanje  $Mn^{2+}$  indukovalo sintezu MnP kod *Ph. chrysosporium*, *Phlebia* spp., *Lentinula edodes* i *Phellinus pini* ali inhibiralo produkciju LiP, dok je dodavanje  $Cu^{2+}$  stimulisalo aktivnost lakaza. Sa druge strane, Stajić i dr. (2006b) su pokazali da  $Cu^{2+}$  i  $Mn^{2+}$  imaju različite efekte na proizvodnju lakaza i peroksidaza kod odabranih vrsta roda *Pleurotus*, čiji efekat zavisi od vrste, uslova kultivacije kao i njihove koncentracije.

Brojne studije su pokazale da je i nivo aeracije važan parametar efikasne degradacije lignoceluloze koja je u potpunosti oksidativan proces. Naime, Zdražil i dr. (1991) su visokim nivoom kiseonika stimulisali delignifikaciju slame tokom njene čvrste fermentacije sa *Stropharia rugosio-anulata*. Međutim, pokazano je da koncentracija kiseonika nije u pozitivnoj korelaciji sa

selektivnošću degradacije (Lee, 1997). Vlažnost medijuma od 60% do 80%, blago kisela pH i temperatura u rasponu od 15 do 35 °C su optimalni uslovi za efikasan pre-tretman lignocelulozne biomase (Lee, 1997; Hölker i Lenz, 2005; Mitchell i dr., 2006; Shi i dr., 2008; Millati i dr., 2011; Wan i Li, 2012). S obzirom na veliki potencijal ligninolitičkih enzima gljiva izazivača belog truljenja danas se poseban akcenat stavlja na optimizaciju uslova delignifikacije radi što efikasnije i jeftinije transformacije lignoceluloznih ostataka u hranu i hranivo, papir i biogorivo (Stajić i dr., 2009).

### 1.5.2. Enzimaska hidroliza pretretiranog lignoceluloznog materijala

Celulaze su relativno skupi enzimi pa je značajno smanjenje troškova njihove proizvodnje ključno kako bi cena bioetanol dobijenog iz lignocelulozne biomase postala konkurentna ceni fosilnih goriva ili bioetanol dobijenog iz skrobne biomase. Proizvodnja ovih enzima iz jeftinih supstrata kao i povećanje njihove produktivnosti i termičke stabilnosti neophodni su kako bi se proces hidrolize učinio najkonkurentnijim za dobijanje bioetanol (Zhang i dr., 2006a; Semečenko i dr., 2011). Enzimaska hidroliza celuloze u poređenju sa kiselom, odnosno baznom, hidrolizom ima brojne prednosti: (i) blagi reakcioni uslovi (45-50 °C, pH 4,8); (ii) visok prinos redukujućih šećera; (iii) visoka selektivnost; (iv) niži troškovi; (v) odsustvo korozivnih uticaja (Predojević, 2010; Semečenko i dr., 2011). Modelovanje kinetike enzima uključenih u hidrolizu celuloze je jedna od mogućnosti optimizacije ovog procesa (Bansal i dr., 2009). Interakcija celulaza sa supstratom kao i identifikacija ograničavajućih faktora brzine njihovog delovanja su najvažniji parametri u razumevanju kinetike procesa hidrolize. Enzimaska hidroliza pretretiranih lignoceluloznih ostataka predstavlja ključni korak u celokupnoj proizvodnji bioetanol, s obzirom da se tokom njega oslobađaju fermentabilni šećeri koji predstavljaju supstrat za alkoholnu fermentaciju (Juturu i Wu, 2014). Enzimaska hidroliza se odigrava kroz dva procesa: (i) **primarnu** koja se generalno odvija na površini supstrata i u toku koje dolazi do nastanka međuproizvoda, odnosno rastvorljivih šećera sa stepenom polimerizacije manjim od 6; (ii) **sekundarnu** u toku koje dolazi do hidrolize intermedijera na manje molekule koji se dalje hidrolizuju do glukoze pomoću  $\beta$ -glukozidaza (Predojević, 2010; Yoon i dr., 2014).

Efikasnost procesa hidrolize zavisi od nekoliko faktora: (i) stabilnosti enzima; (ii) efikasnosti vezivanja enzima za supstrat; (iii) količine nastalih inhibitornih jedinjenja; (iv) fizičko-hemijskih karakteristika lignocelulozne biomase; (v) sinergizma unutar enzimskog kompleksa (Gusakov i dr., 2007; Heinzelman i dr., 2009; Singhania i dr., 2010). S obzirom da se vrste rodova *Trichoderma* i *Aspergillus* najčešće koriste za proizvodnju komercijalnih celulolitičkih enzima, sinergistički mehanizam hidrolize opisan je kod *T. reesei* (Zhang i Lynd, 2006). Na ovom modelu je pokazano simultano odvijanje procesa koji otpočinje delovanjem endocelulaza koje naizmenično hidrolizuju celulozne veze smanjujući stepen polimerizacije kreirajući tako nova mesta za vezivanje egzocelulaza čijom se aktivnošću dobijaju celobiozne jedinice koje su i induceri i supstrat za produkciju  $\beta$ -glukozidaza. *T. reesei* proizvodi nekoliko  $\beta$ -glukozidaza koje razlažu celobiozu do glukoze, krajnjeg produkta sinergizma enzimskog kompleksa (Lynd i dr., 2002; Zhang i dr., 2006b; Zhang i Lynd, 2006). Pored navedenih vrsta, važni producenti celulolitičkih enzima su i vrste rodova *Chaetomium*, *Helotium*, *Coriolus*, *Phanerochaete*, *Schizophyllum*, *Serpula*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Myrothecium*, *Paecilomyces*, *Penicillium* i dr. (Lynd i dr., 2002).

S ciljem povećanja prinosa celulolitičkih enzima do industrijskog nivoa potrebno je optimizovati različite parametre ovog procesa uključujući i odabir supstrata, s obzirom da se zna da su vlažnost, pH i temperatura kao i priroda biljnog otpada (kristalna struktura celuloze, stepen polimerizacije, sadržaj lignina) važni faktori koji utiču na proizvodnju ovih enzima (Hendriks i Zeeman, 2009; Yoon, 2014). Pored korišćenja u konverziji lignocelulozne biomase, celulaze imaju široku primenu i u prehrambenoj, papirnoj, tekstilnoj i hemijskoj industriji (Juturu i Wu, 2014).

Iako razgradnjom hemiceluloze može da se dobije značajna količina fermentabilnih šećera, njena hidroliza je dosta složenija u odnosu na celulozu zbog strukture i potrebe za učešćem više enzima, što je čini ekonomski neisplativom (Quintero-Ramirez, 2014). Ovome treba dodati i

činjenicu da su produkti hidrolize hemiceluloze (ksiloza, ksilo-oligosaharidi, galaktoza i manosa) snažni inhibitori celulaza i  $\beta$ -glukozidaza (Aditiya i dr., 2016).

### 1.5.3. Primena ko-kultivacije gljiva u degradaciji lignoceluloznog materijala

Prema navodima Sharma i dr. (2019), jedan organizam retko može da sintetiše sve enzime koji su potrebni za potpunu razgradnju lignoceluloznog materijala. Tako, većina vrsta podrazdela Ascomycotina nema sposobnost da vrši delignifikaciju biljnog otpada ali ima razvijen celulolitički enzimski sistem nasuprot gljivama izazivačima belog truljenja koje su uglavnom veoma dobri degraderi lignina. Stoga, današnji trend u savremenim istraživanjima podrazumeva ko-kultivaciju dve ili više vrsta iz pomenutih grupa gljiva i pronalaženje optimalnog sistema sa sinergističkim ili aditivnim efektom na mineralizaciju lignoceluloze (Sperandio i Ferreira Filho, 2019). Kako su Qi-He i dr. (2011) saopštili, primena ovakvih sistema omogućila bi ne samo razgradnju lignoceluloznog otpada već bi bila i veoma efikasna u procesima bioremedijacije, proizvodnje hrane, enzima, farmaceutskih proizvoda, bioetanola i brojnih hemikalija. Iako se ko-kultivacija proučava i primenjuje u brojnim biotehnološkim procesima već više decenija, najveći izazovi za dobijanje optimalne kombinacije organizama su razlike u njihovim genotipovima, u tipovima enzima i njihovoj produkciji, kao i ekološke niše (Sharma i dr., 2019). U prirodnim staništima većina organizama stupa u međusobne interakcije koje mogu biti pozitivne, poput simbioze i komensalizma, ili negativne, kao što su parazitizam i kompeticija (Ricklefs, 2006). Sperandio i Ferreira Filho (2019) su istakli da je za razumevanje interakcija više različitih vrsta gljiva pod kontrolisanim uslovima, odnosno međusobnog uticaja na ekspresiju, produkciju i aktivnost njihovih enzima, važno upravo poznavanje njihovih prirodnih odnosa. Kompatibilnost vrsta i količina korišćenog inokuluma su jedni od glavnih faktora koji utiču na efikasnost ko-kultivacije pa im treba posvetiti veliku pažnju pri proučavanjima (Dwivedi i dr., 2011; Rabello i dr. 2014). Jedna od najvažnijih karakteristika gljiva koja utiče na uspešnost ko-kultivacije je stopa rasta koja se razlikuje od vrste do vrste i zavisi od uslova kultivacije. Različita stopa rasta predstavlja ozbiljan problem pri ko-kultivaciji pošto vrsta sa višom stopom rasta može u potpunosti da potroši resurse neophodne drugoj vrsti pa i da inhibira njen rast sintezom i sekrecijom nekih metabolita (Sperandio i Ferreira Filho, 2019). Iz tog razloga, neophodno je optimizovati vreme inokulacije vrsta kao i količinu inokuluma (Stoilova i dr., 2005). Rabello i dr. (2014) su zabeležili značajno više aktivnosti endoglukanaza pri čvrstoj ko-kultivaciji *Aspergillus niger* i *Trichoderma reesei* kada su količine njihovih inokuluma bile u odnosu 3:1, dok je za sintezu  $\beta$ -glukozidaza optimalan odnos inokuluma bio 1:3. Generalno, degradacija lignoceluloznog materijala ko-kultivacijom dve ili više vrsta gljiva je složen proces i njihova metabolička interakcija još uvek nije u potpunosti razjašnjena. Međutim, ko-kultivacija dve kompatibilne vrste je isplativa pošto je efikasnost ovakvog sistema slična sa nekim komercijalnim proizvodima ili čak superiornija od njih (ul-Haq i dr., 2005). Smanjivanje troškova proizvodnje enzima bi uticalo na cenu bioetanola povećavajući na taj način potencijal biorafinerija kao važne karike u novoj bioekonomiji. Dosadašnja istraživanja su pokazala značajan potencijal primene ko-kultura u biotehnološkim procesima zbog čega će istraživanja na ovom polju biti još aktuelnija u budućnosti.

### 1.5.4. Fermentacija hidrolizata

Fermentacija je metabolički proces konverzije šećera do alkohola, kiselina, CO<sub>2</sub> i vode. U lignoceluloznom hidrolizatu su pored glukoze prisutni i manosa, galaktoza, ksiloza, arabinoza, kao i neki oligosaharidi koji su neretko inhibitori fermentacije ili nesvarljive komponente (Aditiya i dr., 2016). Fermentaciju ovih monomernih šećera (heksoza i pentoza), nastalih u procesu saharifikacije, do bioetanola vrše različiti mikroorganizmi. S ciljem poboljšanja efikasnosti industrijske proizvodnje bioetanola, proces fermentacije može teći ili paralelno sa hidrolizom, kada se radi o simultanoj saharifikaciji i fermentaciji, ili nezavisno od hidrolize (Kang i dr., 2014). Prema Vohra i dr. (2014) i Jambo i dr. (2016) prednost dvostepenog procesa je ta što se i enzimaska hidroliza i

fermentacija odigravaju u optimalnim uslovima, dok je njegova negativna strana nagomilavanje šećera koji inhibiraju aktivnost enzima što dalje nepovoljno utiče na prinos etanola. Tokom simultane saharifikacije i fermentacije procesi se odvijaju u istom bioreaktoru i glavna karakteristika ovog postupka je brza konverzija šećera u alcohol, čime se onemogućava inhibicija supstratom ili drugim komponentama hidrolizata (Olofsson i dr., 2008; Ferreira i dr., 2010; Vohra i dr., 2014). Međutim, glavni problem ovog postupka je optimizacija različitih parametara od kojih zavisi efikasnost kako mikroorganizama tako i enzima (Hasunuma i Kondo, 2012). Ovi autori su kao jedan od primera naveli optimizaciju temperature, naime optimalna temperatura za aktivnost celulolitičkih enzima je oko 50 °C a za fermentaciju između 28 i 37 °C. Snižavanje optimalne temperature enzima metodama proteinskog inženjeringa je zahtevan proces pa je neophodno uključivanje termotolerantnih sojeva koji bi efikasno konvertovali šećere do etanola pri visokim temperaturama. Sa aspekta ekonomske opravdanosti važno je pomenuti još dva procesa dobijanja etanola, simultana hidroliza i fermentacija primenom ko-kultura poput *Saccharomyces cerevisiae*/*Fusarium oxysporum*, i konsolidovani bioproces. Međutim, i ovi koncepti proizvodnje imaju nedostatke kao što su mali prinos etanola i činjenica da još uvek nije nađen dovoljno efikasan organizam sa neophodnim fiziološkim karakteristikama (Rezić i dr., 2016; Rastogi i Shrivastava, 2017).

Fermentaciju hidrolizata do bioetanola vrši pre svega *S. cerevisiae* koji može da fermentiše samo određene mono- i disaharide kao što su glukoza, maltoza i saharoza, ali nema sposobnost asimilacije pentoza (poput ksiloze) koje nastaju hidrolizom celuloze (Aditiya i dr., 2016). Jedan od načina za prevazilaženje ovog problema je uvođenje drugih mikroorganizama kao što su *Pichia stipitis* i *Candida shahatae* koji imaju sposobnost asimilacije pentoza. Međutim, njihovom primenom se dobija pet puta manji prinos etanola u poređenju sa *S. cerevisiae*. Takođe, ove vrste zahtevaju prisustvo kiseonika, osetljive su na niže pH vrednosti i 2-4 puta su manje tolerantne na etanol u odnosu na *S. cerevisiae* (Hahn-Hägerdal i dr., 2007; Semenčenko i dr., 2011). Genetičkim inženjeringom se može prevazići i ovaj problem, naime dobija se modifikovani soj *P. stipitis* BCC15191 koji uspešno fermentiše i glukozu i ksilozu, za razliku od prirodnog soja koji fermentiše samo ksilozu (Buaban i dr., 2010). Sposobnost asimilacije i pentoza i heksoza, kao i inhibitora koji se javljaju u hidrolizatima je pokazao i *Mucor indicus* (Semenčenko i dr., 2011).

Teorijski se od 1 kg glukoze dobija 0,51 kg bioetanola i 0,49 kg CO<sub>2</sub>. Međutim, samim tim što mikroorganizmi koriste deo glukoze za svoj rast i što proces zavisi od brojnih faktora kao što su vrsta šećera koji se fermentiše, vrsta organizma i uslovi fermentacije (pH, temperatura, koncentracija drugih neophodnih izvora supstrata za metabolizam organizma, prisustvo inhibitora i dr.) prinos bioetanola je manji i kreće se od 90 do 95% teorijske vrednosti (Demirbas, 2005; Mojović i dr., 2007).

## 2. Ciljevi istraživanja

Na osnovu svega do sada predstavljenog definisani su ciljevi ove doktorske disertacije:

- (i) karakterizacija ligninolitičkih enzima 10 vrsta gljiva belog truljenja i određivanje njihovog potencijala da razlažu najprisutniji otpad iz poljoprivrede i šumarstva u Srbiji;
- (ii) određivanje kapaciteta odabranih makro- i mikromiceta da razlažu supstrat koji se pokazao najoptimalnijim u prvoj fazi istraživanja i karakterizacija njihovih ligninolitičkih enzima;
- (iii) ispitivanje uticaja supstrata pretretiranog sa vrstom koja se pokazala kao visoko selektivni delignifikator na dinamiku aktivnosti celulolitičkih i hemicelulolitičkih enzima kod *Trichoderma viride*;
- (iv) određivanje potencijala odabranih mikromiceta da depolimerizuju odabrani pretretirani otpad;
- (v) određivanje potencijala visoko efikasnih delignifikatora za hidrolizu različitog poljoprivrednog otpada;
- (vi) ispitivanje uticaja mono- i ko-kulture najefikasnijeg producenta celulaza i najefikasnijeg delignifikatora na dinamiku aktivnosti lignocelulolitičkih enzima.

### 3. Materijal i metode

#### 3.1. Proučavane vrste/sojevi makro- i mikromiceta

Proučavane vrste/sojevi makromiceta kao i njihovo poreklo prikazani su u Tabeli 1, a vrste/sojevi mikromiceta u Tabeli 2. Kulture proučavanih vrsta/sojeva makromiceta su izolovane iz plodonosnih tela sakupljenih u Srbiji ili su dobijene iz kolekcije kultura Instituta za evoluciju Univerziteta u Haifi, Izrael (HAI) dok su kulture mikromiceta deo mikoteke Instituta za botaniku i Botaničke bašte „Jevremovac”, Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu (BEOFB). Sve culture se čuvaju na malt agar (MA) medijumu na temperaturi od 4 °C.

**Tabela 1.** Proučavane vrste/sojevi makromiceta i njihovo poreklo

Naziv vrste/soja	Oznaka izolata	Poreklo izolata
<i>Auricularia-auricula judae</i>	HAI 330	Izrael, Kolekcija kultura
<i>Flammulina velutipes</i>	HAI 103	Izrael, Nacionalni park Karmel planina
<i>Ganoderma applanatum</i>	BEOFB 412	Srbija, Beograd, Botanička bašta „Jevremovac”, stablo <i>Celtis occidentalis</i>
<i>Ganoderma lucidum</i>	BEOFB 435	Srbija, Beograd, centar
<i>Ganoderma tsugae</i>	HAI 1032	Izrael, Kolekcija kultura
<i>Grifola frondosa</i>	HAI 1232	Izrael, Kolekcija kultura
<i>Hypsizigus marmoreus</i>	HAI 605	Izrael, Kolekcija kultura
<i>Hypsizigus tessulatus</i>	BEOFB 910	Srbija, stablo <i>Aesculus hippocastanum</i>
<i>Laetiporus sulphureus</i>	HAI 1040	Srbija, Beograd, Botanička bašta „Jevremovac”
<i>Lenzites betulinus</i>	BEOFB 500	Rusija, stablo <i>Populus tremula</i> .
<i>Lentinus edodes</i>	HAI 858	Poljska, Poznan
<i>Piptoporus betulinus</i>	BEOFB 1010	Rusija
<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	HAI 435	Engleska, Kolekcija kultura
<i>Pleurotus eryngii</i>	HAI 193	Ukrajina, Nacionalni park Askanija-Nova, <i>Stipa</i> sp.
<i>Pleurotus eryngii</i>	HAI 1017	Izrael, Kolekcija kultura
<i>Pleurotus eryngii</i>	HAI 507	Izrael, Kolekcija kultura
<i>Pleurotus eryngii</i>	HAI 711	Izrael, Tabor, stablo <i>Ferula</i> sp.
<i>Pleurotus florida</i>	HAI 217	USA, Florida
<i>Pleurotus ostreatus</i>	HAI 1105	Izrael, Golanska visoravan, Masada, stablo <i>Quercus calliprinos</i>
<i>Pleurotus ostreatus</i>	HAI 592	KW, A. S. Buchalo (1300)
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	HAI 573	Rusija, Soči
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	HAI 509	Izrael, Kolekcija kultura
<i>Pleurotus salignus</i>	HAI 326	Izrael, Tel Dan prirodni rezervat, stablo <i>Salix</i> sp.
<i>Psilocybe cubensis</i>	BEOFB 1020	Srbija, Beograd
<i>Trametes hirsuta</i>	BEOFB 30	Srbija, Novi Beograd, stablo <i>Prunus</i> sp.
<i>Trametes hirsuta</i>	BEOFB 300	Srbija, Suva planina, stablo <i>Fagus</i> sp.,
<i>Xylaria polymorpha</i>	BEOFB 1110	Srbija, Beograd, Botanička bašta „Jevremovac”

**Tabela 2.** Proučavane vrste/sojevi mikromiceta i njihovo poreklo

Naziv vrste/soja	Oznaka izolata	Poreklo izolata
<i>Alternaria</i> sp.	BEOFB 201m	Srbija, zrno ječma (3116)
<i>Aspergillus niger</i>	BEOFB 341m	Srbija, Beograd
<i>Aspergillus niger</i>	BEOFB 342m	Srbija, Beograd, Dvorana Kulturnog Centra
<i>Aspergillus terreus</i>	BEOFB 352m	Otpornost materijala OP2 (PQMD, 82j)
<i>Chaetomium globbosum</i>	BEOFB 740m	Srbija, Beograd, Narodna banka
<i>Cladosporium herbarum</i>	BEOFB 711m	Srbija, Beograd
<i>Clonostachys rosea</i>	BEOFB 1610m	Srbija, Beograd, Centralni institut za konzervaciju
<i>Fusarium graminearum</i>	BEOFB 820m	Srbija, Beograd, Centralni institut za konzervaciju; vazduh
<i>Penicillium solitum</i>	BEOFB 1190m	Srbija, Beograd, Centralni institut za konzervaciju; vazduh
<i>Trichoderma harzianum</i>	BEOFB 1230m	Srbija, Beograd, Rimska kamena stela
<i>Trichoderma viride</i>	BEOFB 1210m	Srbija, Beograd, Dvorana Kulturnog Centra

### 3.2. Karakterizacija proučavanih lignocelulolitičkih enzima

Tokom ove studije izvršena je karakterizacija tri ligninolitička i tri celulolitička enzima sintetisana tokom fermentacije odabranog lignoceluloznog otpada sa proučavanim vrstama makro- i mikromiceta.

#### 3.2.1. Priprema inokuluma makromiceta i uslovi kultivacije

Priprema inokuluma obuhvatala je sledeće korake: (i) inokulacija 100 mL sintetičkog medijuma (glukoza, 10,0 g/L;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 2,0 g/L;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1,0 g/L;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , 0,4 g/L;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  0,5 g/L; ekstrakt kvasca, 2,0 g/L; pH 6,5) sa 25 micelijskih diskova „majke” inokuluma ( $\varnothing$  0,5 cm, sa 7 dana stare kulture na MA) u erlenmajerima zapremine 250 mL; (ii) inkubacija u trajanju od 7 dana na sobnoj temperaturi ( $22 \pm 2$  °C) na rotacionom šejkeru (Stuart S1600C incubator, Orbital Shaker) (110 ob/min); (iii) ispiranje dobijene biomase 3 puta sterilnom destilovanom vodom ( $\text{dH}_2\text{O}$ ); (iv) homogenizacija biomase sa 100 mL  $\text{dH}_2\text{O}$  u laboratorijskom blenderu (Waring 8010 S).

Čvrsta fermentacija vršena je na 25 °C u erlenmajerima zapremine 250 mL koji su sadržali 6,0 g usitnjenog lignoceluloznog otpada (piljevina jabuke, hrasta, kupine, maline, šljive, vinove loze, pšenična slama i stabljike kukuruza) kao jedinog izvora ugljenika i 30 mL modifikovanog sintetičkog medijuma (bez glukoze). Za inokulaciju pripremljenih erlenmajera korišćeno je po 9,0 mL homogenizovanog inokuluma. Nakon 21 dana čvrste kultivacije vršena je ekstrakcija enzima sa 50 mL  $\text{dH}_2\text{O}$  na magnetnoj mešalici (Are VELP, Italy) na 4 °C u trajanju od 10 minuta. Dobijeni ekstrakti su centrifugirani na 4 °C i 3000 ob/min u trajanju od 15 minuta pomoću Hettich Universal 32R centrifuge, a dobijeni supernatanti su profiltrirani sa ciljem uklanjanja nečistoća koje bi mogle da utiču na dobijene vrednosti aktivnosti studiranih enzima i ukupnog sadržaja proteina.

Čvrsta ko-kultivacija najefikasnijeg delignifikatora i najboljeg producenta celulaza vršena je u erlenmajerima zapremine 100 mL sa po 2,0 g usitnjene pšenične slame kao izvora ugljenika i 10,0 mL modifikovanog sintetičkog medijuma (bez glukoze) na temperaturi od 25 °C. Za inokulaciju

pripremljenog supstrata korišćeno je 3,0 mL homogenizovanog inokuluma odabrane makromicete i 0,5 mL suspenzije spora odabrane mikromicete koja je dodata nakon 48 sati od inokulacije makromicete. U cilju praćenja dinamike aktivnosti ligninolitičkih i celulolitičkih enzima, merenja su vršena 7., 14., i 21. dana kultivacije. Mono-kulture odabranih vrsta su korišćene kao kontrole.

### 3.2.2. Priprema suspenzije spora mikromiceta i uslovi kultivacije

Testirane vrste mikromiceta koje su gajene na MA medijumu na sobnoj temperaturi tokom 7 dana, korišćene su za pripremanje suspenzije spora. U epruvetu sa kulturom mikromicete dodavana je određena zapremina fiziološkog rastvora uz dodatak 0,1% Tween 80 (vol/vol). Sterilnim štapićem za bris je vršeno spiranje zaostalih spora sa površine medijuma koje su proceđene kroz dvostuku sterilnu gazu i prebačene u sterilnu epruvetu. Uz pomoć hemocitometra, mikroskopa Nikon eclipse E200 i BRESSER MikroCam pro HDMI kamere određivan je broj spora po jedinici zapremine. Suspenzija spora je fiziološkim rastvorom podešena na koncentraciju od  $5 \times 10^6$  CFU/mL i čuvana je na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do upotrebe. Tako dobijena suspenzija spora (0,5 mL) korišćena je za inokulaciju pretretiranog lignoceluloznog supstrata (piljevina hrasta i pšenična slama) natopljenog modifikovanim sintetičkim medijumom do vlažnosti od približno 60%. Kultivacija je vršena u erlenmajerima od 50 mL a nakon 7, 10, 14, 17 ili 21 dana vršena je ekstrakcija enzima na isti način kao i kod makromiceta.

### 3.2.3. Određivanje aktivnosti ligninolitičkih enzima

Aktivnost odabranih ligninolitičkih enzima je određivana spektrofotometrijski (BioQuest, CECIL CE2501) pri odgovarajućim talasnim dužinama korišćenjem odgovarajućih specifičnih supstrata za pojedinačne enzime i izražena je u jedinici enzimske aktivnosti (U). Enzimska aktivnost od 1 U se definiše kao količina enzima koja transformiše 1  $\mu\text{mol}$  supstrata u toku jednog minuta. Izračunavanje apsolutne aktivnosti enzima je vršeno pomoću formule:

$$A = \frac{dA \times V_{tot.} (L) \times 10^6 \mu\text{mol} \times \text{mol}^{-1}}{\epsilon \times l (\text{cm}) \times t (\text{min}) \times V_{(\text{uzorka})} (L)} [\text{U/L}]$$

gde je:

- A - apsolutna aktivnost enzima (U/L),
- dA – optička gustina,
- $V_{tot.}$  – zapremina u kiveti (1,0 mL),
- $\epsilon$  – ekstencioni molarni koeficijent ( $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ),
- $l$  – dimenzija stranice kivete (1,0 cm),
- $t$  – vreme trajanja reakcije (min).

#### 3.2.3.1. Određivanje aktivnosti lakaza

Aktivnost lakaza je određivana korišćenjem 50 mM ABTS-a [2,2'- azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)] kao specifičnog supstrata u 0,1 M fosfatnom puferu (pH 6,0), pri temperaturi od  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  i vremenu trajanja reakcije od 2 min, na talasnoj dužini od 436 nm ( $\epsilon_{436} = 29300\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Reakciona smeša je sadržala fosfatni pufer (800  $\mu\text{L}$ ), ABTS (100  $\mu\text{L}$ ) i uzorak (100  $\mu\text{L}$ ), dok je reakciona smeša bez uzorka korišćena kao slepa proba (Stajić i dr., 2010).

#### 3.2.3.2. Određivanje aktivnosti Mn-oksidujućih peroksidaza

Aktivnosti Mn-zavisnih i Mn-nezavisnih/verzatil peroksidaza određivana je korišćenjem fenol crvenog kao specifičnog supstrata u sukcinatnom puferu pH 4,5 (natrijumova so sukcinatne kiseline, albumin telećeg seruma (BSA) i DL-natrijumova so laktatne kiseline) na  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  nakon 1,5 min trajanja reakcije, na talasnoj dužini od 610 nm ( $\epsilon_{610} = 22000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Reakciona smeša



zapremine 1,0 mL je sadržala: sukcinatni pufer (400 odnosno 450  $\mu\text{L}$ ), uzorak (400  $\mu\text{L}$ ), 2 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  (50  $\mu\text{L}$ ) i 3 mM fenol crveno (100  $\mu\text{L}$ ), sa ili bez dodatka 2 mM  $\text{MnSO}_4$  (50  $\mu\text{L}$ ) za MnP odnosno MnIP/VP. Reakcija je zaustavljena dodavanjem 100  $\mu\text{L}$  2 M NaOH. Kao slepa proba korišćena je reakciona smeša kojoj je pre fenol crvenog dodat 2 M NaOH (Stajić i dr., 2010).

### 3.2.3.3. *Elektroforeza*

Odabrani supernatanti su propuštanjem kroz Sephadex kolonu pripremani za elektroforezu. Izoelektrično fokusiranje (IEF) i određivanje izoelektričnih tačaka (pI) enzimskih izoformi su vršeni prema protokolu Čilerdžić i dr. (2016a) korišćenjem Mini IEF Cell-Model 111 (BIO-RAD). IEF je vršeno na 7,5% poliakrilamidnom gelu sa 5% amfolitima u pH opsegu od 3,0 do 10,0 u tri faze: (i) na 100 V, 15 min; (ii) na 200 V, 15 min; (iii) na 450 V, 60 min. Kao standard korišćen je pI marker pH od 3,6 do 9,3 (Sigma-Aldrich). Lakazne izoforme su detektovane inkubiranjem gela u rastvoru za vizuelizaciju (10 mM ABTS i 200 mM fosfatni pufer pH 5,0) na 25 °C. Lociranje izoformi Mn-oksidišućih peroksidaza vršeno je u rastvoru za vizuelizaciju [4-hloro-1-naftol (0,1 mg/mL), 0,05 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  i 0,1 M natrijum acetatni pufer (pH 4,5), sa ili bez  $\text{MnSO}_4$  za MnP odnosno MnIP/VP], na sobnoj temperaturi. Na mestima aktivnosti ovih enzima detektovane su obojene trake. Nakon završene elektroforeze, gelovi su fiksirani u 12% trihlorsirćetnoj kiselini (TCA) nakon čega je vršena detekcija proteinskih traka bojenjem rastvorom 0,1% Coomassie brilliant blue-R (CBB R) u fiksiru (metanol, sirćetna kiselina i  $\text{H}_2\text{O}$  u odnosu 45:10:45).

### 3.2.4. *Određivanje aktivnosti celulolitičkih enzima*

#### 3.2.4.1. *Određivanje aktivnosti endocelulaza i egzocelulaza*

Aktivnosti endo- i egzocelulaza određivane su metodom po Bernfeld (1955), pomoću karboksimetil celuloze (CMC) srednjeg viskoziteta (1%), odnosno mikrokristalne celuloze (1%) kao supstrata i glukoze kao standardom. Smeši određenog supstrata (200  $\mu\text{L}$ ) i 0,1 M citratno-fosfatnog pufera (pH 6,0; 100  $\mu\text{L}$ ) inkubiranoj 15 minuta na 39 °C, dodato je 100  $\mu\text{L}$  uzorka i nastavljena je inkubacija tokom 10 minuta za endocelulaze, odnosno 120 minuta za egzocelulaze nakon čega je reakcija zaustavljena 3,5-dinitro-salicilnim reagensom (DNS). Nakon 5 minuta u ključaloj vodi i hlađenja na ledu do sobne temperature spektrofotometrijski je na 540 nm određivana apsorbancija reakcione smeše. Jednačina standardne krive dobijene za poznate koncentracije glukoze korišćena je za izračunavanje njene koncentracije u reakcionoj smeši. Jedinica endo- i egzocelulazne aktivnosti (U) je definisana kao količina enzima neophodna za produkciju 1,0  $\mu\text{mol}$  glukoze po minutu.

#### 3.2.4.2. *Određivanje aktivnosti $\beta$ -glukozidaza*

Aktivnost  $\beta$ -glukozidaza je određivana korišćenjem 0,5 mM 4-nitrofenil- $\beta$ -D-glukopiranozida kao supstrata i *p*-nitrofenola kao standarda. Reakciona smeša (50  $\mu\text{L}$  uzorka i 800  $\mu\text{L}$  supstrata) inkubirana je 30 minuta na 37 °C nakon čega je reakcija zaustavljena dodavanjem stop reagensa (1M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Spektrofotometrijski na 405 nm određivana je apsorbancija reakcione smeše. Jednačina standardne krive dobijene za poznate koncentracije *p*-nitrofenola korišćena je za izračunavanje njegove koncentracije u reakcionoj smeši. Jedinica aktivnosti  $\beta$ -glukozidaze (U) je definisana kao količina enzima koja je potrebna da oslobodi 1,0  $\mu\text{mol}$  *p*-nitrofenola u minuti (Grujić i dr., 2015).

#### 3.2.4.3. *Određivanje aktivnosti ksilanaza*

Određivanje aktivnosti ksilanaza vršeno je u reakcionoj smeši koja je sadržala 200  $\mu\text{L}$  1% ksilana iz brezovog drveta kao supstrata, 100  $\mu\text{L}$  0,1 M citratno-fosfatnog pufera (pH 6,0) i 100  $\mu\text{L}$

uzorka, nakon inkubacije na 39 °C tokom 10 minuta i zaustavljanja reakcije DNS reagensom. Nakon inkubacije u ključaloj vodi (5 minuta) i hlađenja na ledu do sobne temperature merena je apsorbanca na 540 nm. Jednačina standardne krive dobijene za poznate koncentracije ksiloze korišćena je za izračunavanje njene koncentracije u reakcionoj smeši. Količina enzima neophodna da katalizuje konverziju 1,0 µmol ksiloze u minuti predstavlja jedinicu aktivnosti ksilanaza (U).

#### 3.2.4.4. **Određivanje efikasnosti fermentacije**

Efikasnost fermentacije definisana je na osnovu koncentracije redukujućih šećera dobijenih nakon čvrste fermentacije odabranog otpada u mono- i ko-kulturi najefikasnijeg delignifikatora i najboljeg producenta celulaza. Koncentracija redukujućih šećera određivana je pomoću DNS reagensa i glukoze kao standarda (Bernfeld, 1955).

### 3.3. **Određivanje sadržaja ukupnih proteina**

Količina ukupnih proteina je određivana pomoću jednačine standardne krive dobijene za smešu 100 µL BSA poznatih koncentracija i 5 mL Bredfordovog reagensa (Coomassie brilliant blue G-250) (de Silva i dr., 2005). Reakciona smeša je sadržala uzorak umesto BSA i nakon inkubacije na sobnoj temperaturi u trajanju od 5 minuta merena je apsorbanca na 595 nm. Sadržaj ukupnih proteina izražen je u mg/mL i korišćen je za određivanje specifične aktivnosti enzima (U/mg).

### 3.4. **Određivanje sadržaja lignina, celuloze i hemiceluloze**

Ukupni gubitak suve mase je izračunat prema sledećoj formuli i izražen u procentima:

$$\left( \frac{M_i - M_f}{M_i} \right) \times 100$$

gde je:

$M_i$  – inicijalna masa testiranog biljnog otpada,  
 $M_f$  – masa biljnog otpada nakon kultivacije gljive.

Određivanje sadržaja hemiceluloze, celuloze i lignina rađeno je sukcesivno, korišćenjem modifikovane metode po Kirk i Obst (1988) i Van Soest i dr. (1991).

#### 3.4.1. **Određivanje sadržaja hemiceluloze**

Postupak određivanja sadržaja hemiceluloze je sledeći: (i) smeša usitnjenog suvog uzorka (1,0 g), rastvora neutralnog deterdženta (NDS) (EDTA – 18,6 g/L; SDS – 30,0 g/L; 2-etoksietanol – 10,0 mL;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  – 4,56 g/L;  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$  – 6,81 g/L; pH 6,9 – 7,1),  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (0,5 g) i nekoliko kapi 1-oktanolu zagrevana je do ključanja i kuvana sat vremena u uslovima refluksije radi uklanjanja rastvorljivih šećera, proteina, pektina, lipida i vitamina iz početnog uzorka; (ii) filtracija i ispiranje uzorka (tri puta ključalom vodom i dva puta hladnim acetonom); (iii) sušenje uzorka na 105 °C tokom 8 sati; (iv) merenje mase suvog uzorka. Dobijena vrednost predstavlja masu vlakana dobijenu dejstvom neutralnog deterdženta (NDF). Rastvor kiselog deterdženta (ADS) (20 g CTAB-a rastvorenog u 1000 mL  $\text{H}_2\text{O}$  i 27,2 mL 72%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ; pH 6,9-7,0) je korišćen radi određivanja sadržaja celuloze i lignina. Smeša NDF i ADS je zagrevana do ključanja i kuvana tokom jednog sata u uslovima refluksije. Uzorak je nakon toga filtriran i ispiran ključalom vodom i acetonom. Kako bi aceton ispario uzorak je ostavljen nekoliko minuta na sobnoj temperaturi, zatim sušen na 105 °C preko noći i izmeren. Upotrebom ADS postignuto je uklanjanje hemiceluloze iz ispitivanog uzorka. Masa vlakana dobijena dejstvom kiselog deterdženta (ADF) je određivana

gravimetrijski kao masa preostalog uzorka nakon ekstrakcije. Sadržaj hemiceluloze predstavlja razliku u masi NDF i ADF.

### **3.4.2. Određivanje sadržaja celuloze i lignina**

Vlakna dobijena dejstvom kiselog deterdženta su korišćena za određivanje sadržaja celuloze i lignina. ADF je definisan kao ostatak koji je sadržao celulozu, lignin, kutin i neke minerale. Sadržaj lignina je utvrđen Klasonovom metodom ili 72%-tnom H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Kirk i Obst, 1988). Uzorak je prebačen u erlenmajer i dodata je 72% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1,0 mL/100 mg uzorka) nakon čega je vršena inkubacija u vodenom kupatilu (30 °C) tokom jednog sata uz mešanje na svakih 15 minuta. Korišćenjem kiseline vršeno je uklanjanje celuloze pri čemu je ostatak sadržao lignin i još neke primese koje su uklonjene do kraja postupka. Posle inkubacije, rastvor je razblažen dodavanjem vode (28 mL/1 mL kiseline) nakon čega je usledila sekundarna hidroliza u autoklavu na 120 °C u trajanju od 1 sata. Tako zagrejan rastvor je filtriran kroz prethodno izmeren filter papir na levku sa sinterovim staklom na Guč B4 boci, a ostaci Klasonovog lignina su ispirani ključalom dH<sub>2</sub>O. Uzorak je potom sušen na 105 °C do konstantne mase a sadržaj lignina (LC) u uzorku je izražen u procentima u odnosu na početni uzorak. Sadržaj celuloze predstavljen je razlikom u masi ADF i LC.

Ključni parametar za određivanje sposobnosti gljiva izazivača belog truljenja da selektivno razgrađuju lignin je definisan kroz indeks selektivnosti (SI) koji predstavlja odnos između uklonjenog lignina i celuloze.

### **3.5. Statistička analiza**

Svi eksperimenti su postavljeni u tri ponavljanja. Deskriptivna statistika rezultata izražena je kao srednja vrednost ± standardna greška merenja. Podaci su statistički obrađeni u programu STATISTICA, verzija 6 (StatSoft, Inc. 2001). Radi procene značaja razlika između srednjih vrednosti korišćena je analiza varijanse (ANOVA) i Tukey HSD post-hoc test, a razlike su smatrane statistički značajnim za  $p < 0,05$ .

## 4. Rezultati i diskusija

### 4.1. Ligninolitički potencijal gljiva

U ovoj fazi istraživanja određen je potencijal 10 vrsta makromiceta da depolimerizuju 8 vrsta lignoceluloznog otpada i okarakterisana su tri ligninolitička enzima odgovorna za delignifikaciju supstrata. Takođe, određen je i potencijal 4 vrste mikromiceta da mineralizuju najoptimalniji otpad za produkciju ligninolitičkih enzima.

#### 4.1.1. Potencijal odabranih makromiceta za razgradnju čistih lignoceluloznih ostataka

##### 4.1.1.1. Aktivnost Mn-oksidujućih peroksidaza i lakaza

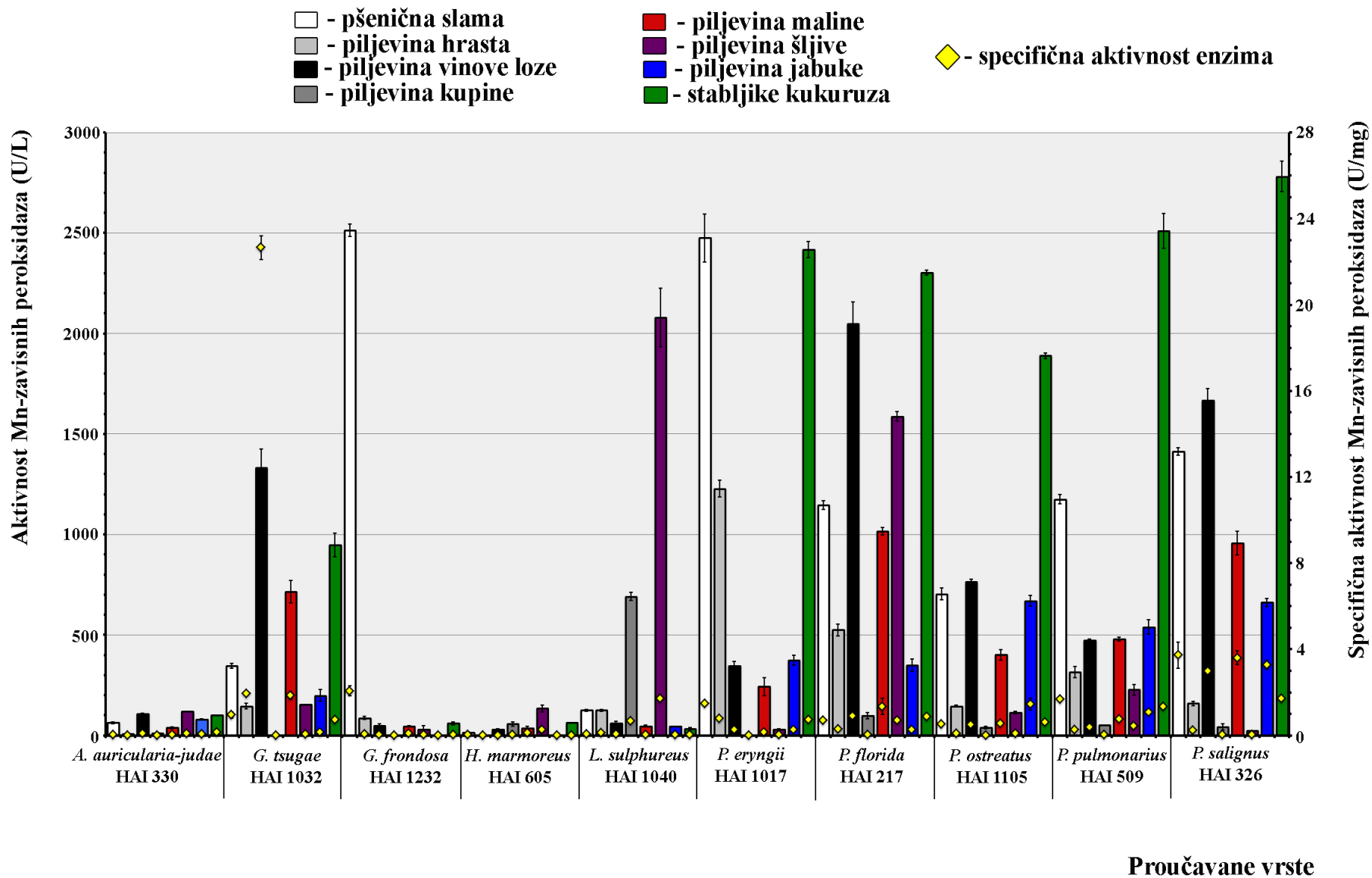
Dobijeni rezultati su pokazali značajne interspecijeske razlike u produkciji Mn-oksidujućih peroksidaza i lakaza kod proučavanih makromiceta u zavisnosti od korišćenog biljnog supstrata (Grafici 1, 2, 3).

Maksimalna aktivnost MnP zabeležena je kod *Pleurotus salignus* HAI 326 ( $2780,30 \pm 75,88$  U/L) nakon kultivacije na stabljikama kukuruza, dok su slične vrednosti izmerene i kod *P. pulmonarius* HAI 509 i *P. eryngii* HAI 1017 ( $2511,36 \pm 87,12$  odnosno  $2417,93 \pm 41,05$  U/L) pri fermentaciji istog supstrata (Grafik 1).

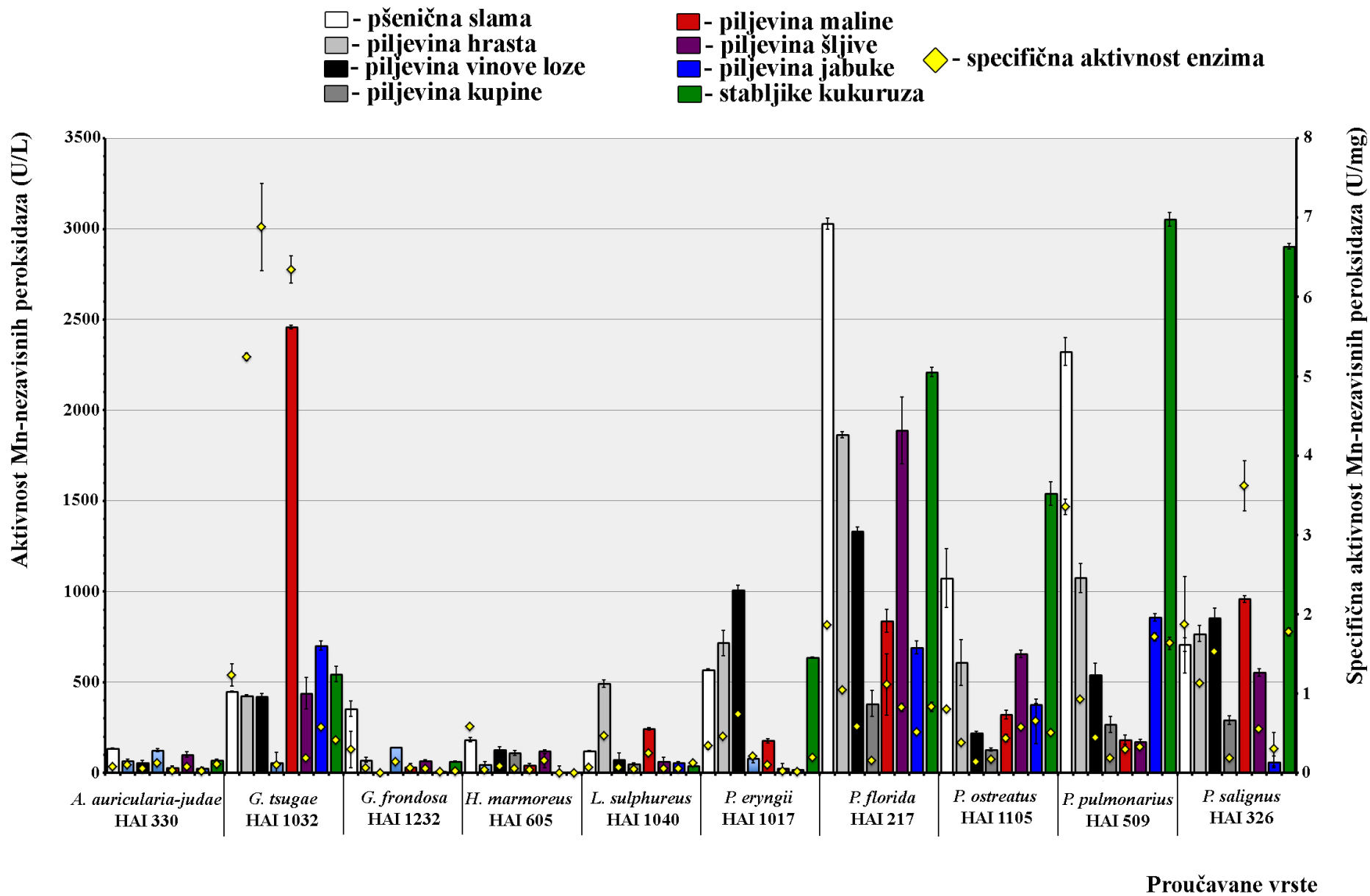
Pšenična slama se pokazala kao odličan izvor ugljenika za sintezu visoko aktivnih MnP kod *Grifola frondosa* HAI 1232 i *P. eryngii* HAI 1017 ( $2513,89 \pm 30,64$  U/L i  $2475,38 \pm 119,32$  U/L), dok je piljevina šljive indukovala visoku aktivnost ovog enzima kod *Laetiporus sulphureus* HAI 1040 ( $2079,55 \pm 145,28$  U/L). Generalno, stabljike kukuruza i pšenična slama su bili najbolji induceri MnP, dok su vrste roda *Pleurotus* bile najefikasniji producenti ovog enzima na svim testiranim lignoceluloznim ostacima. Suprotno ovom, kod *Auricularia auricula-judae* HAI 330 zabeležene su najniže MnP aktivnosti na piljevini hrasta i kupine ( $9,03 \pm 1,46$  U/L odnosno  $10,26 \pm 2,69$  U/L) koja je generalno bila loš supstrat za produkciju ovog enzima i kod ostalih proučavanih vrsta. Štaviše, kod *Ganoderma tsugae* HAI 1032, *G. frondosa* HAI 1232 i *P. eryngii* HAI 1017 MnP aktivnost nije bila detektovana nakon njihove kultivacije na piljevini kupine. Odsutvo aktivnosti je takođe zabeleženo i nakon čvrste fermentacije piljevine hrasta i jabuke sa *Hypsizygus marmoreus* HAI 605 i *G. frondosa* HAI 1232 (Grafik 1).

Kao i u slučaju MnP, stabljike kukuruza i pšenična slama su favorizovale i produkciju MnIP/VP kod većine proučavanih vrsta. Takođe, u poređenju sa ostalim vrstama najviše aktivnosti ovog enzima su zabeležene kod vrsta roda *Pleurotus* (Grafik 2). Tako je pik aktivnosti od  $3053,03 \pm 37,88$  U/L zabeležen kod *P. pulmonarius* HAI 509 nakon fermentacije stabljika kukuruza, dok je neznatno niža vrednost ( $3028,41 \pm 17,05$  U/L) izmerena na pšeničnoj slami fermentisanoj sa *P. florida* HAI 217. Ovaj soj je generalno bio najbolji producent VP na gotovo svim supstratima izuzev piljevine maline i jabuke i stabljika kukuruza. Međutim, piljevina maline je bila odličan inducer ovog enzima kod *G. tsugae* ( $2458,33 \pm 87,12$  U/L), dok su piljevine kupine i jabuke indukovale znatno niže aktivnosti ovog enzima kod testiranih vrsta a piljevina vinove loze čak u potpunosti inhibirala njegovu sintezu kod *G. frondosa* (Grafik 2).

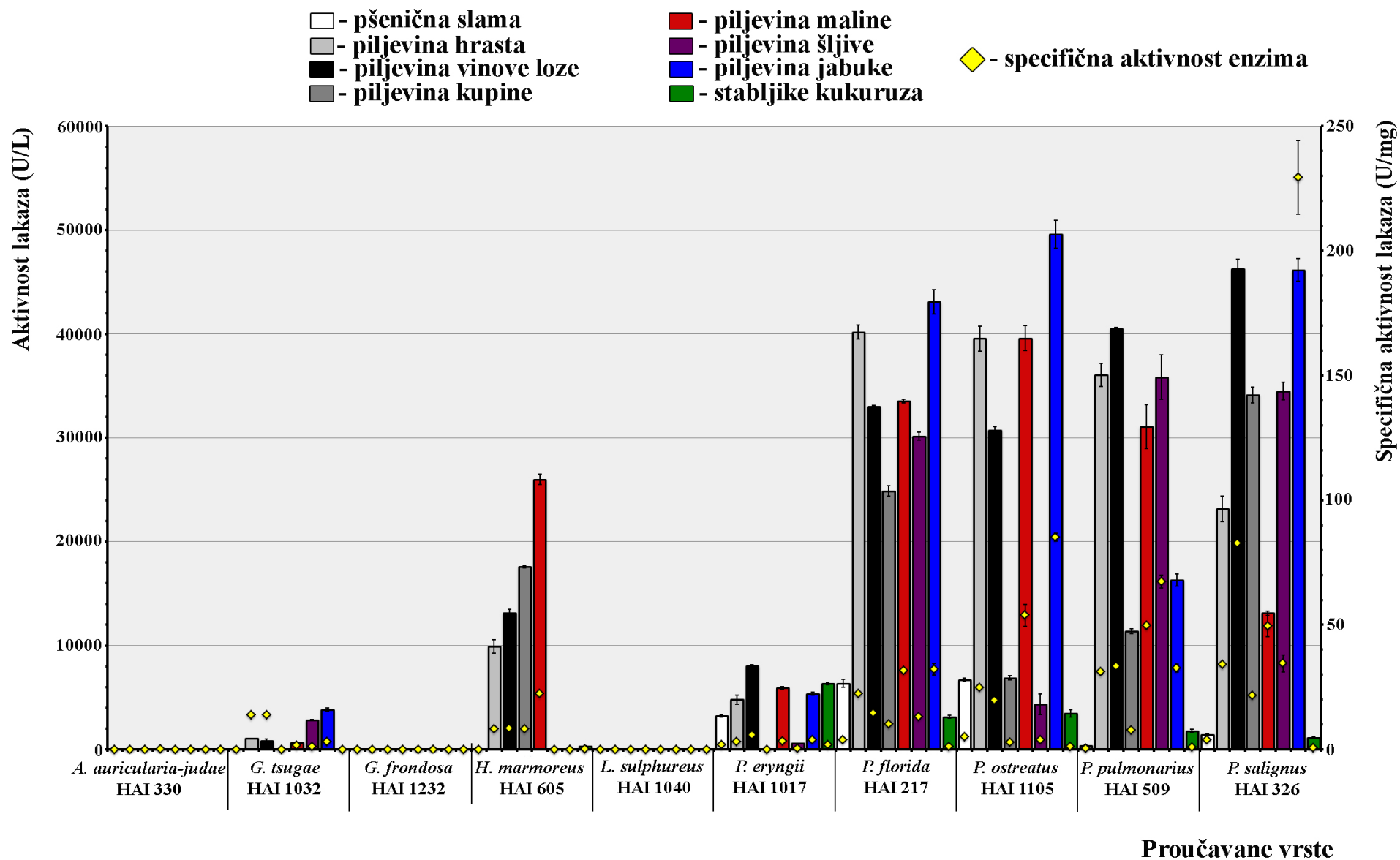
Nivo aktivnosti lakaza bio je neuporedivo viši u odnosu na aktivnosti Mn-oksidujućih peroksidaza (Grafik 3). Tako, maksimalna vrednost ovog enzima zabeležena je nakon kultivacije *P. ostreatus* HAI 1105 na piljevini jabuke ( $49601,00 \pm 1357,39$  U/L). Isti supstrat je pored piljevine vinove loze bio najbolji inducer lakazne aktivnosti i kod *P. salignus* HAI 326 ( $46154,72 \pm 1092,21$  U/L, odnosno  $46291,24 \pm 891,37$  U/L).



**Grafik 1.** Aktivnost Mn-zavisnih peroksidaza ispitivanih vrsta gljiva u zavisnosti od vrste otpada iz poljoprivrede i šumarstva



**Grafik 2.** Aktivnost Mn-nezavisnih peroksidaza ispitivanih vrsta gljiva u zavisnosti od vrste otpada iz poljoprivrede i šumarstva



**Grafik 3.** Aktivnost lakaza ispitivanih vrsta gljiva u zavisnosti od vrste otpada iz poljoprivrede i šumarstva

Visoka aktivnost ovog enzima (u opsegu od ~25000 U/L do ~43000 U/L) zabeležena je i kod *P. florida* nakon fermentacije piljevine hrasta, vinove loze, kupine, maline, šljive i jabuke. Kao i kod Mn-oksidujućih peroksidaza, vrste roda *Pleurotus* su se pokazale kao najbolji producenti lakaza (Grafik 3). *Hypsizigus marmoreus* je takođe produkovao visoko aktivne lakaze prilikom kultivacije na piljevini maline, kupine, vinove loze i hrasta, dok su piljevina šljive i jabuke kao i pšenična slama u potpunosti inhibirale sintezu ovog enzima kod ove vrste. S druge strane, kod *A. auricula-judae*, *G. frondosa* i *L. sulphureus* nijedan od testiranih supstrata nije indukovao sintezu lakaza. Generalno, za razliku od Mn-oksidujućih peroksidaza čiju su aktivnost najbolje stimulisale pšenična slama i stabljike kukuruza, sintezu lakaza su u najvećoj meri favorizovale piljevina hrasta, jabuke i vinove loze (Grafik 3).

Lignocelulozni supstrat je uticao i na produkciju ukupnih proteina kod proučavanih vrsta. Tako je najveća vrednost zabeležena kod *H. marmoreus* ( $3753,57 \pm 82,14$  mg/mL) a nešto niža kod *P. eryngii*, *P. florida* i *P. ostreatus* kao i kod *G. frondosa* i *L. sulphureus* nakon kultivacije na stabljikama kukuruza (~3000 mg/mL). Ukupan sadržaj proteina odrazio se na profil specifičnih aktivnosti enzima, pa je maksimalna specifična aktivnost MnP zabeležena nakon fermentacije piljevine vinove loze sa *G. tsugae* ( $22,65 \pm 0,55$  U/mg), dok su kod ostalih vrsta te vrednosti bile znatno niže i nisu prelazile 4,00 U/mg (Grafik 1). Najveća vrednost specifične aktivnosti MnIP zabeležena je kod iste vrste na istom supstratu ( $6,88 \pm 0,10$  U/mg) dok su neznatno niže aktivnosti bile na piljevini maline i hrasta ( $6,34 \pm 0,58$  U/mg, odnosno  $5,24 \pm 0,27$  U/mg) (Grafik 2). U poređenju sa Mn-oksidujućim peroksidazama, specifične aktivnosti lakaza su bile značajno više, pri čemu je maksimalna vrednost od  $229,50 \pm 14,76$  U/mg izmerena kod *P. salignus* nakon kultivacije na piljevini jabuke. Generalno, više vrednosti specifične lakazne aktivnosti su dobijene kod testiranih vrsta roda *Pleurotus* nego kod vrsta drugih rodova (Grafik 3).

Predstavljeni rezultati daju značajan doprinos profilisanju ligninolitickog potencijala do sada nedovoljno proučavanih vrsta makromiceta posebno ako se uzme u obzir povezanost produkcije enzima i degradacije lignina. Brojne studije su se bavile proučavanjem faktora koji utiču na ekspresiju ligninolitickog enzimskog sistema i pokazale da odabir vrste, sastav lignoceluloznog materijala, tip i dužina trajanja kultivacije značajno utiču na aktivnost ligninolitickih enzima (Richard, 1996; de Souza i dr., 1999; Arora i Gill, 2000; Fenice i dr., 2003; Songulashvili i dr., 2006). Variranjem vrste supstrata podstiče se sinteza različitih oksidujućih enzima kao i njihov pojedinačni udeo u složenim enzimskim kompleksima (Elisashvili i dr. 2008; Simonić i dr., 2010). Songulashvili i dr. (2006) su uočili da je tip supstrata bio od suštinskog značaja za produkciju MnP kod *Phanerochaete chrysosporium*, dok su i brojna druga istraživanja pokazala veliku zavisnost efikasnosti ligninolitickog enzimskog sistema gljiva, naročito kod *Pleurotus* spp., od lignoceluloznog otpada (Adebayo i Martinez-Carrera, 2015; Čilerdžić i dr., 2017). Tako su Dong i dr. (2013) zabeležili izuzetno visoku aktivnost MnP (150000 U/L) kod *P. ostreatus* nakon kultivacije na supstratu od šećerne trske a Xie i dr. (2016) nakon fermentacije stabljika ramije sa *P. eryngii* (~75000 U/L), što su daleko više vrednost od maksimalne dobijene u ovoj studiji. S druge strane, Akpinar i Urek (2014), Inácio i dr. (2015) i Wyman i dr. (2018) su saopštili znatno niže aktivnosti MnP (u opsegu od 70 do 570 U/L) koje su sintetisale *P. eryngii*, *P. pulmonarius* i *P. ostreatus* tokom kultivacije na otpadu kajsije i nara iz fabrike voćnih sokova, kori pomorandže odnosno stabljikama kukuruza. Takođe, piljevina vinove loze je u toku ovog proučavanja stimulisala produkciju znatno aktivnijih MnP kod vrsta roda *Pleurotus* u poređenju sa vrednostima zabeleženim kod sojeva *Pleurotus* spp. kultivisanim na istom supstratu od strane Stajić i dr. (2004). Takođe, *G. frondosa* HAI 1232 je bila odličan producent visoko aktivnih MnP naročito na pšeničnoj slami dok su ostali supstrati bili znatno slabiji induceri ovog enzima ali ipak bolji nego kod sojeva proučavanih u ranijim istraživanjima. Tako je piljevina hrasta i kod *G. frondosa* MBFBL 684 i kod soja PSUMCC 922 indukovala sintezu MnP višestruko niže aktivnosti i nakon dužeg perioda kultivacije ( $22,6$  U/L, odnosno  $4$  U/g) (Mikiashvili i dr., 2011; Montoya i dr., 2012). Za razliku od *G. tsugae* HAI 1032 koja je pokazala najviše aktivnosti MnP nakon kultivacije na piljevini vinove loze ( $1331,44 \pm 92,80$  U/L), kod *G. lucidum* BEOFB 431 je zabeležena skoro 4 puta viša aktivnost ovog enzima tokom tačne fermentacije piljevine hrasta (Čilerdžić i dr., 2016a) i značajno niža aktivnost ( $\leq 110$  U/L)



tokom njene kultivacije na pšeničnoj slami (Stajić i dr., 2010).

Slično kao i kod MnP, uticaj sastava biljnog otpada na aktivnost MnIP/VP brojnih vrsta gljiva belog truljenja bio je objekat brojnih radova (Stajić i dr., 2004; Palma i dr., 2016; Sekan i dr., 2019). Vrste roda *Pleurotus* proučavane u ovoj studiji su bile najbolji producenti VP čije su aktivnosti bile znatno više od onih koje su saopštili Stajić i dr. (2004) nakon tečne fermentacije kore mandarina i čvrste fermentacije piljevine vinove loze sa testiranim vrstama/sojevima ovog roda. Prema Palma i dr. (2016), aktivnost VP nakon tečne kultivacije *P. eryngii* u glukozom obogaćenom medijumu bila je ~1800 U/L, dok je nakon čvrste kultivacije na kori banana bila čak tri puta viša u odnosu na maksimalne vrednosti dobijene u našoj studiji (~10000 U/L). Međutim, *Pleurotus* spp. proučavane u ovoj disertaciji su produkovale mnogo aktivnije VP od *P. eryngii* HAI 507 i naročito *P. ostreatus* HAI 592 kultivisanih 14 dana na pšeničnoj slami (1422,77 U/L, odnosno 70,46 U/L) (Knežević i dr., 2013).

Lakaze su predmet opsežnih istraživanja već dugi niz godina, a od nedavno lakaze gljiva posebno dobijaju na značaju zbog izuzetnog potencijala za široku primenu u biotehnološkim procesima (Paramjeet i dr., 2018). Novija istraživanja su naročito usmerena ka primeni genetičkog inženjeringa s ciljem dobijanja enzima sa što boljim karakteristikama, poput veće aktivnosti, stabilnosti i prinosa. Prema navodima Autore i dr. (2009) mutirani soj *P. ostreatus* je sintetisao termostabilnije i mnogo aktivnije lakaze u odnosu na druge sojeve ove vrste gajene na različitim supstratima. Međutim, još uvek se akcenat stavlja na optimizaciju uslova kultivacije za produkciju visoko aktivnih formi lakaza kod gljiva belog truljenja za koje se zna da su dobri producenti ovog enzima. Za razliku od aktivnosti lakaza produkovanih tokom tečne kultivacije *P. eryngii*, *P. ostreatus* i *P. pulmonarius* u medijumu na bazi kore mandarina i njihove čvrste kultivacije na vinovoj lozi (Stajić i dr., 2006a), vrednosti dobijene u našoj studiji za *Pleurotus* spp. su bile znatno više. Takođe, glukoza i fruktoza su stimulisale sintezu visoko aktivnih izoformi ovog enzima kod *P. sajor-caju* (37000 U/L odnosno 36000 U/L) (Bettin i dr., 2009), ostaci šećerne trske kod *P. ostreatus* (~35000 U/L) (Dong i dr., 2013), stabljike ramije kod *P. eryngii* (~15000 U/L) (Xie i dr., 2016) a kore pomorandže kod *P. pulmonarius* (~10000 U/L) (Inácio i dr., 2015; de Freitas i dr., 2017), koje su ipak bile manje aktivne od sintetisanih u našoj studiji. Generalno, vrste roda *Pleurotus* su bile superiorne u sintezi lakaza u odnosu na druge vrste gljiva. Međutim, Songulashvili i dr. (2007) su zabeležili izuzetno visoke lakazne aktivnosti i kod *Ganoderma lucidum* HAI 447 i *G. adspersum* 845 nakon njihove tečne kultivacije u medijumu na bazi kore mandarina (35980 U/L, odnosno 27380 U/L). Piljevina hrasta je takođe indukovala sintezu visoko aktivnih izoformi ovog enzima pri tečnoj kultivaciji *G. applanatum* (Čilerdžić i dr., 2016b), koje su bile čak 10 puta aktivnije od sintetisanih nakon čvrste fermentacije istog supstrata sa *G. tsugae* HAI 1032. Uticaj sastava biljnih ostataka kao i tipa kultivacije na aktivnost sintetisanih lakaza potvrđen je i kod *Hypsizygus marmoreus*. Naime, Songulashvili i dr. (2007) su zabeležili aktivnost ovog enzima od svega 760 U/L nakon tečne kultivacije *H. marmoreus* 571 u medijumu na bazi kora mandarine što je čak oko 35 puta niža vrednost od dobijene nakon čvrste fermentacije piljevine maline sa *H. marmoreus* HAI 605. Sa druge strane, pojedini supstrati su u potpunosti inhibirali sintezu lakaza kod pojedinih vrsta što bi se moglo objasniti dužinom kultivacije. Naime, brojna istraživanja su pokazala nagli porast aktivnosti ovog enzima na samom početku kultivacije, sa dostizanjem maksimalnih vrednosti od 7. do 10. dana, nakon čega je sinteza lakaza postepeno opadala (Knežević i dr., 2011; Stajić i dr., 2017a; Thakur i dr., 2017; Méndez-Hernández i dr., 2019).

#### **4.1.1.2. Potencijal proučavanih makromiceta da depolimerizuju lignocelulozne ostatke**

Rezultati ove studije su pokazali jasnu uslovljenost stepena depolimerizacije vrstom gljive i tipom lignoceluloznog otpada (Tabela 3). Tako je kod pšenične slame i stabljika kukuruza fermentisanih sa *G. tsugae* zabeležen najveći gubitak suve mase (33,00% odnosno 31,17%), neznatno niže vrednosti su dobijene nakon fermentacije ovih otpada sa *P. florida* (24,83% odnosno 22,33%), dok su visoko efikasne bile i *P. ostreatus*, *P. pulmonarius* i *P. salignus*. *L. sulphureus* je

izazivao značajnu redukciju suve mase piljevine maline (21,50%), kupine (20,83%) i jabuke (19,83%), *G. tsugae* piljevine maline i kupine (21,47% odnosno 19,63%), dok je *A. auricula-judae* efikasno redukovala suhu masu piljevine maline (21,17%). Nasuprot tome, pšenična slama je bila najrezistentnija na dejstvo enzima *L. sulphureus* koji je redukovao svega 5,83% njene suve mase, dok je piljevina hrasta bila neznatno osjetljivija na enzimski kompleks *P. eryngii*, *G. frondosa* i *H. marmoreus* koje su uzrokovale gubitak njene suve mase od ~8%.

Kapacitet delignifikacije kao i stepen selektivnosti razgradnje testiranog otpada su se takođe razlikovali od vrste do vrste (Tabela 3). Najefikasniji delignifikatori su bili *H. marmoreus* i *G. tsugae* koji su degradovali čak 57,15% odnosno 54,78% lignina u stabljikama kukuruza. Takođe, *H. marmoreus* je uspešno depolimerizovao lignin iz piljevine jabuke (49,12%) a sličan stepen razgradnje je uočen i kod *P. pulmonarius* (46,28%) i *P. salignus* (43,01%) na stabljikama kukuruza, kod *A. auricula-judae* na piljevini kupine (43,67%) i pšeničnoj slami (46,36%) i kod *L. sulphureus* na piljevini maline (43,09%) (Tabela 3). Međutim, *G. tsugae* se pokazala i kao najuspešniji mineralizator holoceluloze iz ostataka kukuruza (40,30% celuloze i 54,91% hemiceluloze) što je indukovalo nizak stepen selektivnosti (1,36) (Tabela 3). Sa druge strane, *H. marmoreus* se pokazao kao najselektivniji razlagač piljevine hrasta (17,69) s obzirom da je degradovao 32,37% lignina i svega 1,83% celuloze. Visok indeks selektivnosti dobijen je i nakon fermentacije pšenične slame sa *P. salignus* (5,27) i *L. sulphureus* (4,55) kao i nakon kultivacije *G. frondosa* na piljevini hrasta (4,34). Međutim, mnoge vrste a naročito *Pleurotus* spp. su bile mnogo uspešniji razlagači holoceluloze u odnosu na lignin, posebno pri fermentaciji piljevine vinove loze, šljive i jabuke pa je njihov stepen selektivnosti bio manji od 1. Najniži indeks selektivnosti od samo 0,16 zabeležen je nakon kultivacije *H. marmoreus* na piljevini šljive s obzirom da je mineralizovao čak 80,86% holoceluloze i svega 5,72% lignina (Tabela 3).

Generalno, pozitivna korelacija između aktivnosti enzima i delignifikacije nije uočena u svim slučajevima u ovoj studiji, tj. veća aktivnost enzima nije značila i veći stepen depolimerizacije biljnog supstrata što je bilo u saglasnosti sa rezultatima ranijih studija (Knežević i dr., 2013, 2016; Čilerdžić et al., 2016a, 2017). Ovo se može objasniti dužinom kultivacije, tj. tačkom merenja do kada je aktivnost nekih ligninolitičkih enzima mogla značajno da opadne. Naime, kako ističu Knežević i dr. (2013) početak sinteze enzima odgovara takozvanoj fazi kolonizacije koja je povezana sa otvaranjem ćelijskog zida i inicijacijom razgradnje lignina reaktivnim vrstama kiseonika dok se enzimska delignifikacija odvija znatno kasnije. Takođe, stepen degradacije lignina u velikoj meri zavisi i od odabira vrste i tipa lignoceluloznog supstrata (Knežević i dr., 2013; Čilerdžić i dr., 2016a; Paramjeet i dr., 2018). Analiza sekvenci genoma producenata ligninolitičkih enzima pokazala je nepostojanje jedinstvenog seta ovih enzima već se njegov sastav razlikuje od vrste do vrste (Paramjeet i dr., 2018). S obzirom da kompletan mehanizam degradacije lignina još uvek nije u potpunosti razjašnjen danas se veliki broj studija bavi ovom tematikom sa ciljem kreiranja efikasnijih procesa, tj. smanjenja utroška vremena i energije a time i troškova.

**Tabela 3.** Kapacitet odabranih vrsta makromiceta da razlažu proučavani otpad iz poljoprivrede i šumarstva

Otpad iz poljoprivrede i šumarstva	Vrste	Masa uzorka nakon kultivacije (g)	Sastav polimera u uzorku (mg)			Gubitak suve mase (%)	Nivo razgradnje polimera (%)			Indeks selektivnosti
			Lignin	Celuloza	Hemiceluloza		Lignin	Celuloza	Hemiceluloza	
Pšenična slama	Kontrola*	6,00	666,00	2418,00	1692,00	/	/	/	/	/
	<i>A. auricula-judae</i> HAI 330	4,89	357,26	2070,16	1345,85	18,50 <sup>d</sup>	46,36 <sup>a</sup>	13,52 <sup>d</sup>	14,39 <sup>d</sup>	3,22 <sup>b</sup>
	<i>G. tsugae</i> HAI 1032	4,02	402,00	1603,98	964,80	33,00 <sup>a</sup>	39,64 <sup>b</sup>	33,67 <sup>a</sup>	42,98 <sup>a</sup>	1,18 <sup>d</sup>
	<i>G. frondosa</i> HAI 1232	5,30	460,75	2038,96	1488,18	11,66 <sup>e</sup>	30,82 <sup>c</sup>	15,68 <sup>d</sup>	12,05 <sup>d</sup>	1,97 <sup>c</sup>
	<i>H. marmoreus</i> HAI 605	5,13	554,26	2217,02	1339,45	14,50 <sup>d</sup>	16,78 <sup>e</sup>	8,31 <sup>e</sup>	20,84 <sup>c</sup>	2,02 <sup>c</sup>
	<i>L. sulphureus</i> HAI 1040	5,65	531,01	2310,44	1587,37	5,83 <sup>f</sup>	20,27 <sup>d</sup>	4,45 <sup>f</sup>	6,18 <sup>e</sup>	4,55 <sup>a</sup>
	<i>P. eryngii</i> HAI 1017	5,33	538,63	2250,53	1359,92	11,12 <sup>e</sup>	19,12 <sup>e</sup>	6,93 <sup>e</sup>	19,63 <sup>c</sup>	2,76 <sup>b</sup>
	<i>P. florida</i> HAI 217	4,51	446,79	1769,10	1119,22	24,83 <sup>b</sup>	32,91 <sup>c</sup>	26,84 <sup>b</sup>	33,85 <sup>b</sup>	1,23 <sup>d</sup>
	<i>P. ostreatus</i> HAI 1105	4,81	499,82	1965,65	1158,25	19,83 <sup>c</sup>	24,95 <sup>d</sup>	18,71 <sup>c</sup>	31,55 <sup>b</sup>	1,33 <sup>d</sup>
	<i>P. pulmonarius</i> HAI 509	4,81	389,45	1980,90	1096,22	19,86 <sup>c</sup>	41,52 <sup>b</sup>	18,08 <sup>c</sup>	35,21 <sup>b</sup>	2,30 <sup>c</sup>
	<i>P. salignus</i> HAI 326	4,88	434,14	2258,51	1009,75	18,67 <sup>c</sup>	34,81 <sup>c</sup>	6,60 <sup>e</sup>	40,32 <sup>a</sup>	5,27 <sup>a</sup>

Piljevina hrasta	Kontrola*	6,00	1530,00	2808,84	1159,97	/	/	/	/	/
	<i>A. auricula-judae</i> HAI 330	5,11	1113,98	2442,58	846,00	14,83 <sup>a</sup>	27,19 <sup>b</sup>	13,04 <sup>a</sup>	27,07 <sup>b</sup>	2,08 <sup>c</sup>
	<i>G. tsugae</i> HAI 1032	5,34	1142,76	2496,00	801,00	11,00 <sup>b</sup>	25,31 <sup>c</sup>	11,14 <sup>b</sup>	30,95 <sup>a</sup>	2,27 <sup>c</sup>
	<i>G. frondosa</i> HAI 1232	5,50	1165,15	2654,57	802,42	8,30 <sup>d</sup>	23,85 <sup>c</sup>	5,49 <sup>c</sup>	30,82 <sup>a</sup>	4,34 <sup>b</sup>
	<i>H. marmoreus</i> HAI 605	5,50	1034,75	2757,50	891,65	8,30 <sup>d</sup>	32,37 <sup>a</sup>	1,83 <sup>d</sup>	23,13 <sup>c</sup>	17,69 <sup>a</sup>
	<i>L. sulphureus</i> HAI 1040	5,42	1159,24	2470,15	980,48	9,70 <sup>c</sup>	24,23 <sup>c</sup>	12,06 <sup>b</sup>	15,47 <sup>c</sup>	2,01 <sup>c</sup>
	<i>P. eryngii</i> HAI 1017	5,51	1157,73	2469,82	1102,60	8,12 <sup>d</sup>	24,33 <sup>c</sup>	12,07 <sup>b</sup>	17,99 <sup>d</sup>	2,01 <sup>c</sup>
	<i>P. florida</i> HAI 217	5,34	1174,14	2593,78	1008,69	11,00 <sup>b</sup>	23,26 <sup>c</sup>	7,66 <sup>c</sup>	13,04 <sup>e</sup>	3,04 <sup>b</sup>
	<i>P. ostreatus</i> HAI 1105	5,36	1253,30	2485,18	1017,64	10,67 <sup>b</sup>	18,08 <sup>d</sup>	11,52 <sup>b</sup>	12,27 <sup>e</sup>	1,57 <sup>d</sup>
	<i>P. pulmonarius</i> HAI 509	5,20	1133,16	2474,25	951,23	13,36 <sup>a</sup>	25,94 <sup>b</sup>	11,91 <sup>b</sup>	17,99 <sup>d</sup>	2,18 <sup>c</sup>
	<i>P. salignus</i> HAI 326	5,31	1168,86	2629,94	892,58	11,50 <sup>b</sup>	23,60 <sup>c</sup>	6,37 <sup>c</sup>	23,05 <sup>c</sup>	3,70 <sup>b</sup>

Otpad iz poljoprivrede i šumarstva	Vrste	Masa uzorka nakon kultivacije (g)	Sastav polimera u uzorku (mg)			Gubitak suve mase (%)	Nivo razgradnje polimera (%)			Indeks selektivnosti
			Lignin	Celuloza	Hemiceluloza		Lignin	Celuloza	Hemiceluloza	
Piljevina vinove loze	Kontrola*	6,00	1421,41	2652,00	887,08	/	/	/	/	/
	<i>A. auricula-judae</i> HAI 330	5,07	998,59	2286,12	696,00	15,50 <sup>c</sup>	29,75 <sup>a</sup>	13,80 <sup>d</sup>	21,54 <sup>c</sup>	2,15 <sup>b</sup>
	<i>G. tsugae</i> HAI 1032	5,04	1219,44	2322,98	715,54	16,02 <sup>b</sup>	14,21 <sup>c</sup>	12,41 <sup>c</sup>	19,34 <sup>d</sup>	1,14 <sup>c</sup>
	<i>G. frondosa</i> HAI 1232	5,27	1201,79	2250,72	569,27	12,16 <sup>d</sup>	15,45 <sup>c</sup>	15,13 <sup>d</sup>	35,83 <sup>a</sup>	1,02 <sup>c</sup>
	<i>H. marmoreus</i> HAI 605	5,15	963,24	2420,97	710,84	14,15 <sup>c</sup>	32,23 <sup>a</sup>	8,17 <sup>f</sup>	19,87 <sup>d</sup>	3,94 <sup>a</sup>
	<i>L. sulphureus</i> HAI 1040	4,96	1184,24	1973,68	674,42	17,35 <sup>a</sup>	16,97 <sup>b</sup>	25,58 <sup>a</sup>	23,97 <sup>c</sup>	0,66 <sup>d</sup>
	<i>P. eryngii</i> HAI 1017	5,36	1286,88	2134,08	659,53	10,63 <sup>d</sup>	9,46 <sup>d</sup>	19,53 <sup>b</sup>	25,65 <sup>b</sup>	0,48 <sup>d</sup>
	<i>P. florida</i> HAI 217	5,15	1333,07	2177,18	756,61	14,17 <sup>c</sup>	6,21 <sup>e</sup>	17,90 <sup>c</sup>	14,71 <sup>e</sup>	0,35 <sup>e</sup>
	<i>P. ostreatus</i> HAI 1105	5,11	1362,00	2116,78	654,46	14,83 <sup>c</sup>	4,18 <sup>f</sup>	20,18 <sup>b</sup>	26,22 <sup>b</sup>	0,21 <sup>f</sup>
	<i>P. pulmonarius</i> HAI 509	5,08	1329,91	2121,77	685,26	15,40 <sup>b</sup>	6,44 <sup>e</sup>	19,99 <sup>b</sup>	22,75 <sup>c</sup>	0,32 <sup>e</sup>
	<i>P. salignus</i> HAI 326	5,13	1283,25	2160,99	600,56	14,50 <sup>c</sup>	9,72 <sup>d</sup>	18,51 <sup>c</sup>	32,30 <sup>a</sup>	0,52 <sup>d</sup>

Piljevina kupine	Kontrola*	6,00	1218,00	2712,00	1038,00	/	/	/	/	/
	<i>A. auricula-judae</i> HAI 330	4,87	686,11	2282,15	982,93	18,83 <sup>c</sup>	43,67 <sup>a</sup>	15,85 <sup>d</sup>	5,31 <sup>e</sup>	2,75 <sup>a</sup>
	<i>G. tsugae</i> HAI 1032	4,82	867,96	2271,16	790,81	19,63 <sup>b</sup>	28,74 <sup>d</sup>	16,26 <sup>d</sup>	23,81 <sup>b</sup>	1,77 <sup>b</sup>
	<i>G. frondosa</i> HAI 1232	5,21	770,40	2248,56	811,98	13,17 <sup>c</sup>	36,75 <sup>b</sup>	17,09 <sup>d</sup>	21,77 <sup>b</sup>	2,15 <sup>a</sup>
	<i>H. marmoreus</i> HAI 605	5,21	770,78	1963,42	843,70	13,17 <sup>c</sup>	36,72 <sup>b</sup>	27,60 <sup>a</sup>	18,72 <sup>c</sup>	1,33 <sup>c</sup>
	<i>L. sulphureus</i> HAI 1040	4,75	827,20	2167,82	798,67	20,83 <sup>a</sup>	32,09 <sup>c</sup>	20,07 <sup>c</sup>	23,06 <sup>b</sup>	1,60 <sup>b</sup>
	<i>P. eryngii</i> HAI 1017	5,08	827,55	2005,42	883,40	15,42 <sup>d</sup>	32,06 <sup>c</sup>	26,05 <sup>a</sup>	14,89 <sup>d</sup>	1,23 <sup>c</sup>
	<i>P. florida</i> HAI 217	5,06	895,27	2169,88	723,29	15,67 <sup>d</sup>	26,50 <sup>e</sup>	19,99 <sup>c</sup>	30,32 <sup>a</sup>	1,33 <sup>c</sup>
	<i>P. ostreatus</i> HAI 1105	5,02	988,15	2081,64	707,26	16,33 <sup>d</sup>	18,87 <sup>f</sup>	23,24 <sup>b</sup>	31,86 <sup>a</sup>	0,81 <sup>d</sup>
	<i>P. pulmonarius</i> HAI 509	4,83	907,85	2173,05	709,86	19,52 <sup>b</sup>	25,46 <sup>e</sup>	19,87 <sup>c</sup>	31,61 <sup>a</sup>	1,28 <sup>c</sup>
	<i>P. salignus</i> HAI 326	4,86	850,68	1968,71	709,71	19,00 <sup>b</sup>	30,16 <sup>d</sup>	27,41 <sup>a</sup>	31,63 <sup>a</sup>	1,10 <sup>c</sup>

Otpad iz poljoprivrede i šumarstva	Vrste	Masa uzorka nakon kultivacije (g)	Sastav polimera u uzorku (mg)			Gubitak suve mase (%)	Nivo razgradnje polimera (%)			Indeks selektivnosti
			Lignin	Celuloza	Hemiceluloza		Lignin	Celuloza	Hemiceluloza	
Piljevina maline	Kontrola*	6,00	1200,00	2160,00	1308,00	/	/	/	/	/
	<i>A. auricula-judae</i> HAI 330	4,73	761,53	1972,41	870,32	21,17 <sup>a</sup>	36,54 <sup>b</sup>	8,68 <sup>f</sup>	33,46 <sup>d</sup>	4,21 <sup>a</sup>
	<i>G. tsugae</i> HAI 1032	4,71	932,98	1767,00	881,14	21,47 <sup>a</sup>	22,25 <sup>d</sup>	18,19 <sup>b</sup>	32,63 <sup>d</sup>	1,22 <sup>d</sup>
	<i>G. frondosa</i> HAI 1232	5,15	875,16	1930,50	988,42	14,16 <sup>c</sup>	27,07 <sup>c</sup>	10,63 <sup>e</sup>	24,43 <sup>e</sup>	2,54 <sup>b</sup>
	<i>H. marmoreus</i> HAI 605	5,09	951,46	1897,82	803,90	15,20 <sup>c</sup>	20,71 <sup>e</sup>	12,14 <sup>d</sup>	38,54 <sup>c</sup>	1,71 <sup>c</sup>
	<i>L. sulphureus</i> HAI 1040	4,71	682,95	1398,87	805,41	21,5 <sup>a</sup>	43,09 <sup>a</sup>	35,24 <sup>a</sup>	38,42 <sup>c</sup>	1,22 <sup>d</sup>
	<i>P. eryngii</i> HAI 1017	5,09	962,20	1822,58	855,29	15,15 <sup>c</sup>	19,82 <sup>e</sup>	15,62 <sup>c</sup>	34,61 <sup>d</sup>	1,27 <sup>d</sup>
	<i>P. florida</i> HAI 217	4,84	1026,93	1932,76	678,16	19,33 <sup>b</sup>	14,42 <sup>f</sup>	10,52 <sup>e</sup>	48,15 <sup>a</sup>	1,37 <sup>d</sup>
	<i>P. ostreatus</i> HAI 1105	4,99	1057,24	1924,98	658,28	16,83 <sup>b</sup>	11,90 <sup>f</sup>	10,88 <sup>e</sup>	49,67 <sup>a</sup>	1,09 <sup>e</sup>
	<i>P. pulmonarius</i> HAI 509	4,67	915,32	1732,57	723,85	22,16 <sup>a</sup>	23,72 <sup>d</sup>	19,79 <sup>b</sup>	44,66 <sup>b</sup>	1,19 <sup>e</sup>
	<i>P. salignus</i> HAI 326	4,94	934,23	1823,97	726,62	17,67 <sup>b</sup>	22,15 <sup>d</sup>	15,56 <sup>c</sup>	44,45 <sup>b</sup>	1,42 <sup>c</sup>

Piljevina šljive	Kontrola*	6,00	1837,49	2544,00	1368,00	/	/	/	/	/
	<i>A. auricula-judae</i> HAI 330	4,91	1208,60	1911,16	948,21	18,17 <sup>e</sup>	34,23 <sup>a</sup>	24,88 <sup>b</sup>	30,69 <sup>e</sup>	0,73 <sup>b</sup>
	<i>G. tsugae</i> HAI 1032	4,85	1436,19	2028,14	722,95	19,13 <sup>a</sup>	21,84 <sup>b</sup>	20,28 <sup>c</sup>	47,15 <sup>c</sup>	1,08 <sup>a</sup>
	<i>G. frondosa</i> HAI 1232	5,29	1464,22	2098,54	734,45	11,83 <sup>d</sup>	20,31 <sup>c</sup>	17,51 <sup>d</sup>	46,29 <sup>c</sup>	1,16 <sup>a</sup>
	<i>H. marmoreus</i> HAI 605	5,23	1732,45	1648,71	743,23	12,62 <sup>c</sup>	5,72 <sup>e</sup>	35,19 <sup>a</sup>	45,67 <sup>c</sup>	0,16 <sup>e</sup>
	<i>L. sulphureus</i> HAI 1040	5,01	1432,29	1872,99	761,22	16,53 <sup>b</sup>	22,05 <sup>b</sup>	26,38 <sup>b</sup>	44,36 <sup>c</sup>	0,83 <sup>b</sup>
	<i>P. eryngii</i> HAI 1017	5,29	1544,39	1956,93	825,08	11,85 <sup>d</sup>	15,95 <sup>d</sup>	23,08 <sup>b</sup>	39,69 <sup>d</sup>	0,69 <sup>b</sup>
	<i>P. florida</i> HAI 217	5,22	1696,18	2155,45	594,97	13,00 <sup>c</sup>	7,69 <sup>e</sup>	15,27 <sup>d</sup>	56,51 <sup>a</sup>	0,50 <sup>c</sup>
	<i>P. ostreatus</i> HAI 1105	5,31	1719,79	1868,42	721,89	11,50 <sup>d</sup>	6,41 <sup>e</sup>	26,56 <sup>b</sup>	47,23 <sup>c</sup>	0,24 <sup>d</sup>
	<i>P. pulmonarius</i> HAI 509	5,24	1476,00	1910,78	554,91	12,75 <sup>c</sup>	19,67 <sup>c</sup>	24,89 <sup>b</sup>	59,44 <sup>a</sup>	0,79 <sup>b</sup>
	<i>P. salignus</i> HAI 326	5,27	1729,54	1919,37	680,22	12,17 <sup>c</sup>	5,87 <sup>e</sup>	24,55 <sup>b</sup>	50,28 <sup>b</sup>	0,24 <sup>d</sup>



Otpad iz poljoprivrede i šumarstva	Vrste	Masa uzorka nakon kultivacije (g)	Sastav polimera u uzorku (mg)			Gubitak suve mase (%)	Nivo razgradnje polimera (%)			Indeks selektivnosti
			Lignin	Celuloza	Hemiceluloza		Lignin	Celuloza	Hemiceluloza	
Piljevina jabuke	Kontrola*	6,00	1158,00	2808,00	1176,00	/	/	/	/	/
	<i>A. auricula-judae</i> HAI 330	4,90	887,62	2363,73	1098,50	18,33 <sup>b</sup>	23,35 <sup>c</sup>	15,82 <sup>d</sup>	6,59 <sup>d</sup>	1,48 <sup>a</sup>
	<i>G. tsugae</i> HAI 1032	4,98	916,69	2167,17	822,03	16,97 <sup>b</sup>	20,84 <sup>c</sup>	22,82 <sup>b</sup>	30,10 <sup>b</sup>	0,91 <sup>b</sup>
	<i>G. frondosa</i> HAI 1232	5,17	852,72	2253,25	821,71	13,83 <sup>c</sup>	26,36 <sup>b</sup>	19,76 <sup>b</sup>	30,13 <sup>b</sup>	1,33 <sup>a</sup>
	<i>H. marmoreus</i> HAI 605	5,08	589,16	2107,79	838,04	15,33 <sup>c</sup>	49,12 <sup>a</sup>	24,94 <sup>a</sup>	28,74 <sup>b</sup>	1,97 <sup>a</sup>
	<i>L. sulphureus</i> HAI 1040	4,81	889,48	2202,06	822,17	19,83 <sup>a</sup>	23,19 <sup>c</sup>	21,58 <sup>b</sup>	30,09 <sup>b</sup>	1,07 <sup>b</sup>
	<i>P. eryngii</i> HAI 1017	5,30	970,08	2237,02	1107,19	11,65 <sup>d</sup>	25,54 <sup>b</sup>	26,27 <sup>a</sup>	10,88 <sup>c</sup>	0,97 <sup>b</sup>
	<i>P. florida</i> HAI 217	4,85	1022,93	2419,15	814,46	19,17 <sup>a</sup>	11,66 <sup>d</sup>	13,85 <sup>c</sup>	30,74 <sup>b</sup>	0,84 <sup>c</sup>
	<i>P. ostreatus</i> HAI 1105	4,95	1043,82	2290,46	638,16	17,50 <sup>b</sup>	9,86 <sup>c</sup>	18,43 <sup>c</sup>	45,73 <sup>a</sup>	0,53 <sup>d</sup>
	<i>P. pulmonarius</i> HAI 509	5,02	999,18	2289,58	873,65	15,96 <sup>c</sup>	9,86 <sup>c</sup>	18,43 <sup>c</sup>	45,73 <sup>a</sup>	0,53 <sup>d</sup>
	<i>P. salignus</i> HAI 326	4,80	1003,41	2290,08	691,34	20,00 <sup>a</sup>	13,35 <sup>d</sup>	18,44 <sup>c</sup>	41,21 <sup>a</sup>	0,72 <sup>c</sup>

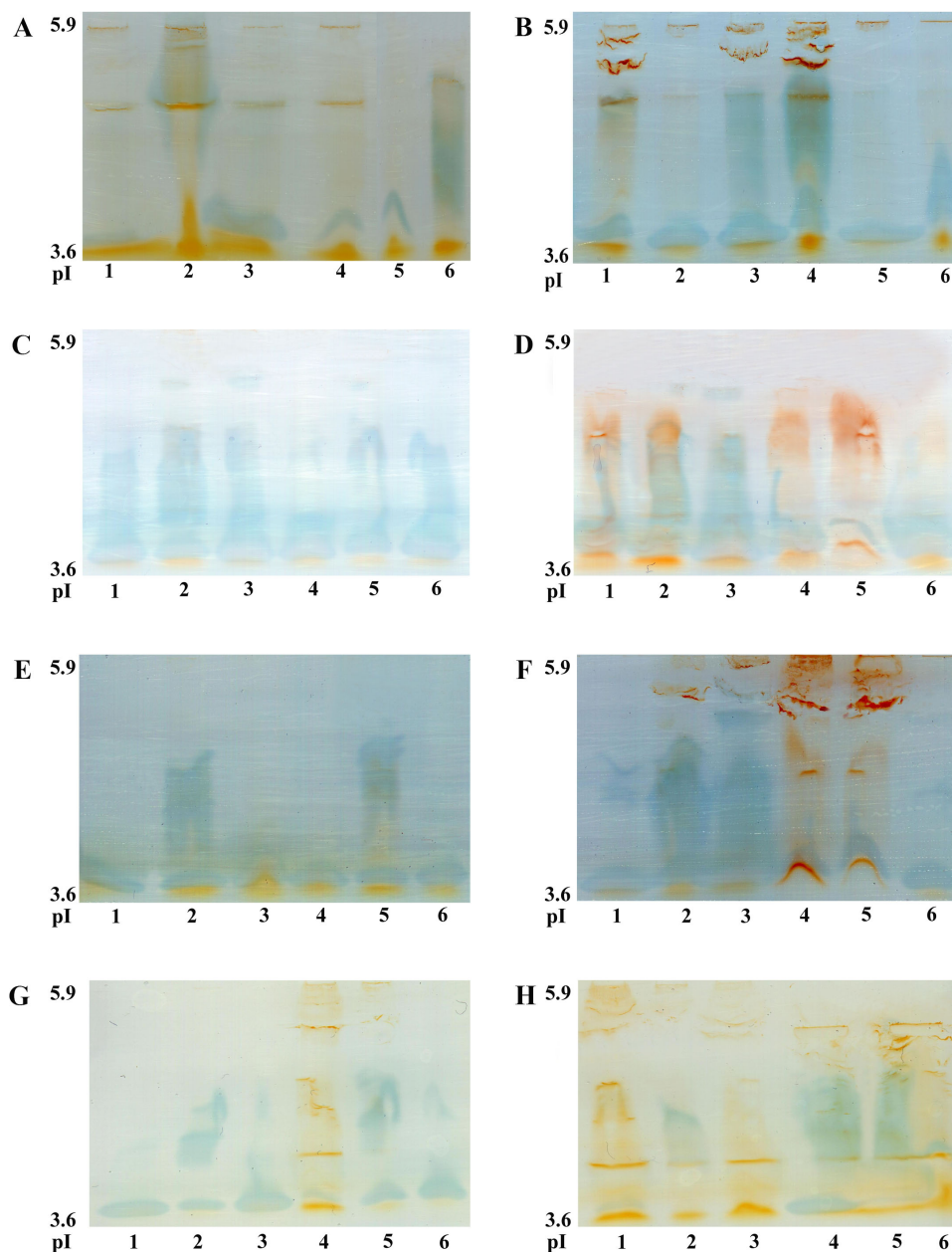
Stabljike kukuruza	Kontrola*	6,00	594,00	2796,00	1860,43	/	/	/	/	/
	<i>A. auricula-judae</i> HAI 330	5,04	372,66	2200,73	1450,37	16,00 <sup>d</sup>	37,26 <sup>c</sup>	21,29 <sup>d</sup>	22,04 <sup>e</sup>	1,75 <sup>b</sup>
	<i>G. tsugae</i> HAI 1032	4,13	268,58	1669,33	838,80	31,17 <sup>a</sup>	54,78 <sup>a</sup>	40,30 <sup>a</sup>	54,91 <sup>a</sup>	1,36 <sup>c</sup>
	<i>G. frondosa</i> HAI 1232	5,51	402,38	2530,11	1504,78	8,17 <sup>e</sup>	32,26 <sup>d</sup>	9,51 <sup>f</sup>	19,12 <sup>f</sup>	3,39 <sup>a</sup>
	<i>H. marmoreus</i> HAI 605	4,80	254,51	1863,18	1397,38	20,00 <sup>c</sup>	57,15 <sup>a</sup>	33,36 <sup>b</sup>	24,89 <sup>e</sup>	1,71 <sup>b</sup>
	<i>L. sulphureus</i> HAI 1040	5,49	395,14	2014,10	1602,00	8,50 <sup>e</sup>	33,48 <sup>d</sup>	27,97 <sup>c</sup>	13,89 <sup>g</sup>	1,19 <sup>d</sup>
	<i>P. eryngii</i> HAI 1017	5,18	522,88	2350,36	1242,48	13,72 <sup>d</sup>	11,97 <sup>f</sup>	15,94 <sup>e</sup>	33,22 <sup>d</sup>	0,75 <sup>e</sup>
	<i>P. florida</i> HAI 217	4,66	381,96	1872,52	1043,39	22,33 <sup>b</sup>	35,70 <sup>c</sup>	33,03 <sup>b</sup>	43,92 <sup>b</sup>	1,08 <sup>d</sup>
	<i>P. ostreatus</i> HAI 1105	4,76	423,91	1948,07	1105,02	20,67 <sup>c</sup>	28,64 <sup>e</sup>	30,33 <sup>c</sup>	40,60 <sup>c</sup>	0,94 <sup>e</sup>
	<i>P. pulmonarius</i> HAI 509	4,76	319,12	1967,12	1057,39	20,62 <sup>c</sup>	46,28 <sup>b</sup>	29,65 <sup>c</sup>	43,16 <sup>b</sup>	1,56 <sup>b</sup>
	<i>P. salignus</i> HAI 326	4,64	338,50	1961,45	1029,41	22,67 <sup>b</sup>	43,01 <sup>b</sup>	29,85 <sup>c</sup>	44,67 <sup>b</sup>	1,44 <sup>c</sup>

Lignocelulozni ostaci proučavani u ovoj studiji se proizvode u ogromnim količinama na godišnjem nivou. Tako, na osnovu podataka Organizacije za hranu i poljoprivredu (FAO) iz 2017. godine prinos samo jabuke i šljive u zemljama Evropske Unije bio je 10106442 t odnosno 1292856 t. Srbija kao poljoprivredna zemlja je jedna od lidera u proizvodnji mnogih kultura, pre svega maline i kupine (68500 t odnosno 27558 t) ali i jabuke (378644 t), šljive (330582 t) i grožđa (165568 t). Uprkos činjenici da ovi ostaci predstavljaju obnovljive resurse za proizvodnju bioetanol, papira, hrane, hraniva i drugih proizvoda još uvek se ne koriste u dovoljnoj meri niti su utvrđeni najefikasniji mehanizmi njihove konverzije. Delignifikacija je glavni ograničavajući faktor za uspešno korišćenje ovog otpada zbog visoke rezistentnosti lignina. Brojne studije su se bavile određivanjem potencijala mnogih vrsta gljiva izazivača belog truljenja, kao što su *Daedaleopsis* spp., *Ganoderma* spp., *Trametes* spp. i druge, da razlažu učestali biljni otpad (Stajić i dr., 2010, 2017a; Čilerdžić i dr., 2011, 2016a,b; Knežević i dr., 2013, 2016). Važno je istaći da neki lignocelulozni ostaci kao i vrste makromiceta iz ove studije do sada nisu proučavani. Tako, retki su podaci o ligninolitičkom potencijalu vrsta rodova *Auricularia*, *Hypsizigus*, *Laetiporus* i *Grifola* koje su se pokazale kao dobri delignifikatori pšenične slame, piljevine kupine, maline i jabuke kao i ostataka kukuruza. Sojevi *A. auricula-judae* i *H. marmoreus* korišćeni u ovoj studiji su bili znatno efikasniji delignifikatori ostataka kukuruza od *A. polytricha* odnosno *Irpex lacteus* i *Phanerochaete chrysosporium* proučavanih od strane Du i dr. (2011), Ma i dr. (2011) i Saha i dr. (2016). Naime, *A. polytricha* je degradovala svega 16,6% lignina nakon 15 dana kultivacije, *I. lacteus* 37,6% nakon 42 dana, a *Ph. chrysosporium* ~50% nakon 30 dana. Slično se može reći i za soj *G. frondosa* iz ove studije koji je bio čak dvostruko efikasniji u delignifikaciji piljevine hrasta od soja proučavanog od strane Mikiashvili i dr. (2011), kao i znatno selektivniji od soja iz studije Montoya i dr. (2012). Prema kategorizaciji Liers i dr. (2011), visoko selektivnim su se pokazale i *G. tsugae* i vrste roda *Pleurotus* sa indeksima selektivnosti za određene supstrate >2 što ih čini visoko efikasnim delignifikatorima, mnogo boljim od *G. lucidum*, *G. applanatum* i *Pleurotus* spp. studiranim od strane Salmones i dr. (2005), Knežević i dr. (2013) i Čilerdžić i dr. (2016a,b). Tako su *P. salignus* HAI 326, *P. eryngii* HAI 1017 i *P. pulmonarius* HAI 509 bili visoko selektivni razlagači pšenične slame i piljevine hrasta čiji su se indeksi selektivnosti nalazili u opsegu 2,01 do 5,27. Međutim, njihov kapacitet delignifikacije ova dva supstrata je bio manji od onog kod pakistanskih sojeva *P. eryngii* i *P. ostreatus* kultivisanih na stabljikama kukuruza (Asgher i dr., 2016). Ove razlike u selektivnosti razgradnje lignoceluloze mogu se pripisati poreklu i genetskoj predispoziciji vrsta/sojeva, kao i tipu supstrata, tj. odnosu lignina i holoceluloze, strukturi lignina i ćelijskog zida (Li i dr., 2012). Tako je za razliku od soja *P. florida* poreklom sa Floride testiranog u ovoj studiji, kineski soj pokazao znatno veću selektivnost u razgradnji pšenične slame i stabljika kukuruza (Rouches i dr., 2016). Sa druge strane, pirinčana slama je indukovala mnogo selektivniju razgradnju kod *P. ostreatus* DSM 11191 od svih supstrata na kojima je kultivisan naš soj HAI 1105 (Mustafa i dr., 2016). Takođe, piljevina hrasta je bila bolji inducer selektivne degradacije kod *P. florida* HAI 217 od ostataka banana korišćenih u studiji Chanakya i dr. (2015).

Generalno, rezultati dobijeni u ovoj studiji su pokazali da odabrane vrste makromiceta mogu da budu veoma uspešni i selektivni razlagači različitog lignoceluloznog otpada što je od posebnog značaja s obzirom da prinos bioetanol u velikoj meri zavisi od efikasnosti pre-tretmana. Međutim, zbog kompleksne strukture kao i otpornosti lignoceluloznog materijala potrebno je još istraživanja na polju primene gljiva i njihovih enzima u biološkom pre-tretmanu kako bi njegov potencijal bio u potpunosti iskorišćen.

#### **4.1.1.3. Varijabilnost izoenzimskih profila lakaza kod *Pleurotus* spp.**

S obzirom da su vrste roda *Pleurotus* bile najbolji producenti ligninolitičkih enzima, pre svega lakaza, sledeći cilj istraživanja je bio karakterizacija izoformi ovog enzima na svim testiranim lignoceluloznim ostacima. Na broj, intenzitet i pI zimogramski detektovanih izoformi uticali su vrsta i tip supstrata (Slika 1).



1 - *P. salignus* HAI 326

2 - *P. eryngii* HAI 193

3 - *P. florida* HAI 217

4 - *P. ostreatus* HAI 1105

5 - *P. eryngii* HAI 1017

6 - *P. pulmonarius* HAI 509

**Slika 1.** IEF profil lakaza proučavanih vrsta roda *Pleurotus* u zavisnosti od vrste otpada iz poljoprivrede i šumarstva: pšeničana slama (A), piljevina hrasta (B), piljevina vinove loze (C), piljevina kupine (D), pilevina maline (E), piljevina šljive (F), piljevina jabuke (G) i stabljike kukuruza (H)

Naime, lakazne izoforme su se razlikovale od vrste do vrste na istom supstratu kao i od supstrata do supstrata kod iste vrste. Tako su piljevina hrasta, vinove loze, kupine, maline i šljive indukovale sintezu većeg broja intenzivnijih izoformi kod svih *Pleurotus* spp. Međutim, broj i intenzitet izoformi nije uvek bio u korelaciji sa aktivnošću ovog enzima kod testiranih vrsta na svim supstratima. Ovo se može videti na primeru *P. ostreatus* koji je tokom fermentacije piljevine jabuke

sintetisao samo jednu lakaznu izoformu (pI 3,6) najveće aktivnosti, dok je tokom kultivacije na stabljikama kukuruza produkovao veći broj manje aktivnih izoformi. Nasuprot tome, kod *P. pulmonarius* HAI 509 i *P. eryngii* HAI 1017 piljevina jabuke i vinove loze je indukovala sintezu velikog broja lakaznih izoformi u pI opsegu 3,6 - 5,1 (Slika 1). Uticaj supstrata na broj i intenzitet izoformi zabeležen je kod *P. eryngii* i *P. pulmonarius*. Naime, piljevina šljive je indukovala sintezu samo jedne izoforme kod *P. eryngii* (pI 5,1) a dve izoforme kod *P. pulmonarius* (pI 4,6 i 5,1), dok je na piljevini maline *P. pulmonarius* sintetisao jednu (pI 3,6) a *P. eryngii* dve izoforme (pI 3,6 i 5,1).

U genomu gljiva postoji nekoliko gena koji kodiraju sintezu lakaza među kojima su oni koji se kontinuirano eksprimiraju i oni čija transkripcija zavisi od uslova sredine i fiziološke predispozicije vrste (Collins i Dobson, 1997; Palmieri i dr., 2000; Jiang i dr., 2013). Ranije studije su pokazale zavisnost broja produkovanih lakaznih izoformi kod *Pleurotus* spp. od tipa supstrata (Sannia i dr. 1986; Palmieri i dr. 1993; Rescigno i dr. 1993; Youn i dr. 1995; Muñoz i dr. 1997a). Tako se broj izoformi kod *P. eryngii* kretao od dva, nakon tečne kultivacije u glukoza/amonijum-tartarat medijumu i čvrste fermentacije pšenične slame (Muñoz i dr., 1997b; Čilerdžić i dr., 2017), preko tri, nakon čvrste fermentacije piljevine vinove loze (Stajić i dr., 2006a), do čak četiri nakon tečne fermentacije medijuma na bazi ekstrakata krompira i kvasca (Palmieri i dr., 1997). Slična slika je uočena i kod *P. pulmonarius* koji je sintetisao samo jednu izoformu na pšeničnoj slami a dve na pšeničnim mekinjama (Marques de Souza i Peralta, 2003; Čilerdžić i dr., 2017) i kod *P. ostreatus* kod koga su Stajić i dr. (2006a) detektovali tri izoforme nakon fermentacije piljevine vinove loze a Palmieri i dr. (1997) četiri nakon kultivacije u dekstroza/ekstrakt krompira/ekstrakt kvasca medijumu. Sa druge strane, tokom kultivacije u ovom istom medijumu *P. florida* i *P. nebrodensis* su produkovale dve odnosno tri izoforme (Das i dr., 2001; Yuan i dr., 2016).

#### 4.1.2. Potencijal odabranih makromiceta da depolimerizuju pšeničnu slamu

Sledeća faza istraživanja bila je utvrđivanje potencijala pšenične slame, kao najoptimalnijeg supstrata, da indukuje sintezu visoko aktivnih formi tri testirana ligninolitička enzima kod još nekoliko gljiva belog truljenja koje do sada nisu dovoljno proučene.

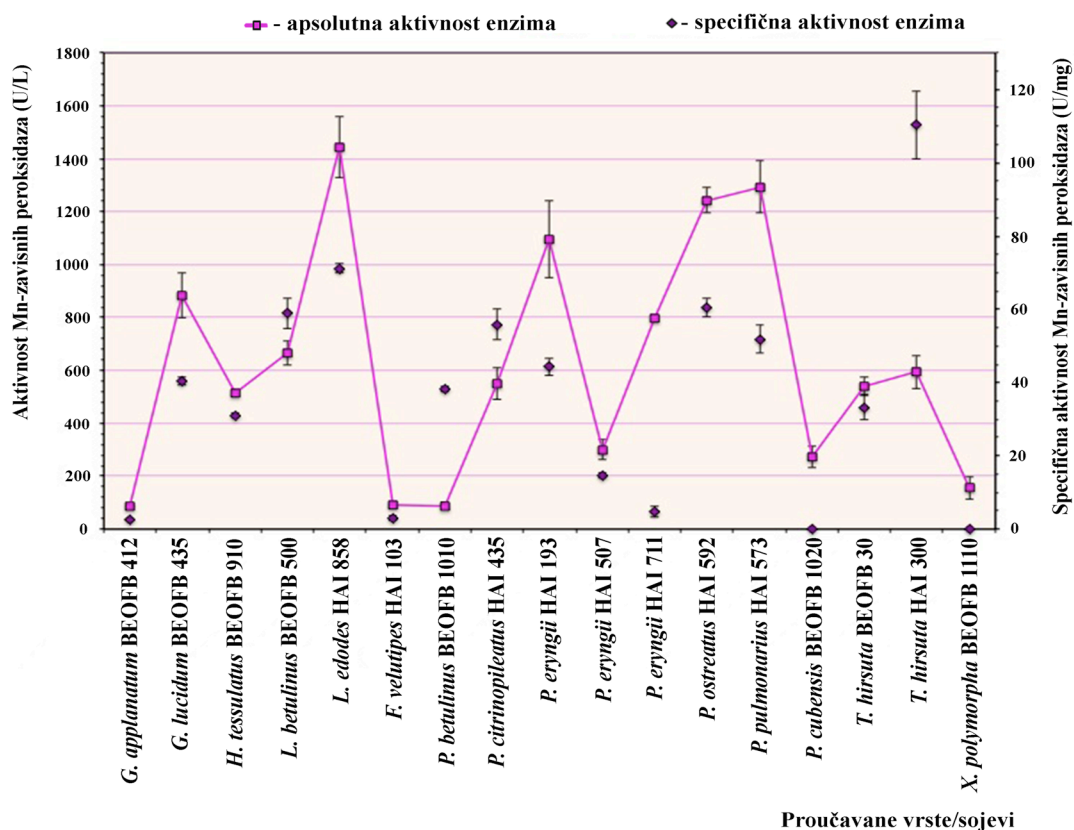
Dobijeni rezultati su pokazali značajne inter- i intraspecijske razlike u produkciji Mn-oksidujućih peroksidaza i lakaza kod proučavanih vrsta/sojeva makromiceta (Grafici 4, 5, 6).

Maksimalna vrednost aktivnosti MnP ( $1443,18 \pm 113,84$  U/L) izmerena je kod *Lentinus edodes* HAI 858. Visoka aktivnost ovog enzima zabeležena je i kod vrsta *Pleurotus pulmonarius* HAI 573 ( $1294,19 \pm 98,42$  U/L), *P. ostreatus* HAI 592 ( $1243,69 \pm 49,49$  U/L) i *P. eryngii* HAI 193 ( $1095,96 \pm 144,87$  U/L), dok je najniža vrednost zabeležena kod *Ganoderma applanatum* BEOFB 412 ( $87,12 \pm 0,00$  U/L) (Grafik 4).

Aktivnost MnIP/VP je bila na nižem nivou u poređenju sa aktivnošću MnP pa je najveća aktivnost ovog enzima izmerena kod *L. edodes* HAI 858 ( $1045,45 \pm 139,76$  U/L), dok je najniža vrednost od samo  $0,35 \pm 0,02$  U/L zaveležena kod *Flammulina velutipes* HAI 103 (Grafik 5).

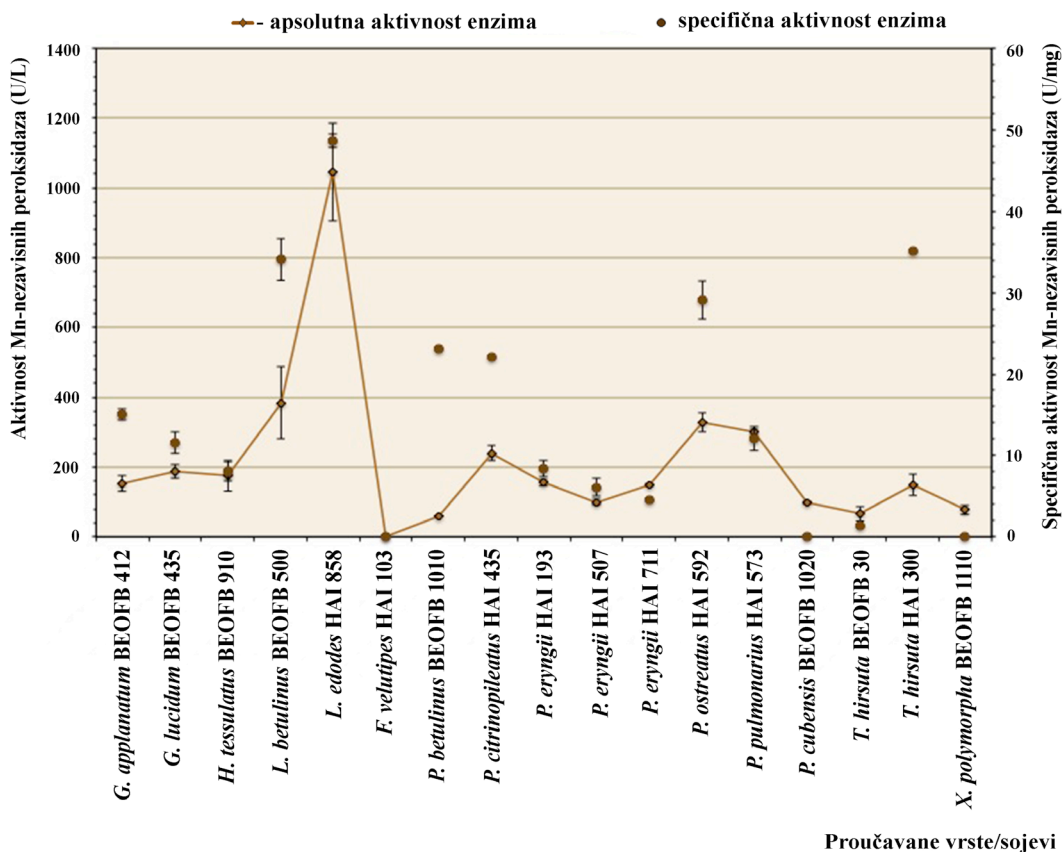
Nivo lakazne aktivnosti je bio znatno viši u odnosu na nivoe aktivnosti MnP i MnIP/VP. Kao najbolji producent lakaza pokazao se *P. eryngii* HAI 711 kod koga je izmerena maksimalna aktivnost od  $7804,32 \pm 620,73$  U/L (Grafik 6).

Ukupna produkcija proteina odrazila se na profil specifične aktivnosti enzima pa je maksimalna specifična aktivnost MnP od  $110,39 \pm 9,29$  U/mg zabeležena nakon fermentacije slame sa *Trametes hirsuta* HAI 300. Najveća vrednost specifične aktivnosti MnIP je izmerena kod *L. edodes* HAI 858 ( $48,69 \pm 2,84$  U/mg), dok je maksimalna vrednost specifične lakazne aktivnosti detektovana kod *P. ostreatus* HAI 592 ( $47,43 \pm 1,05$  U/mg).



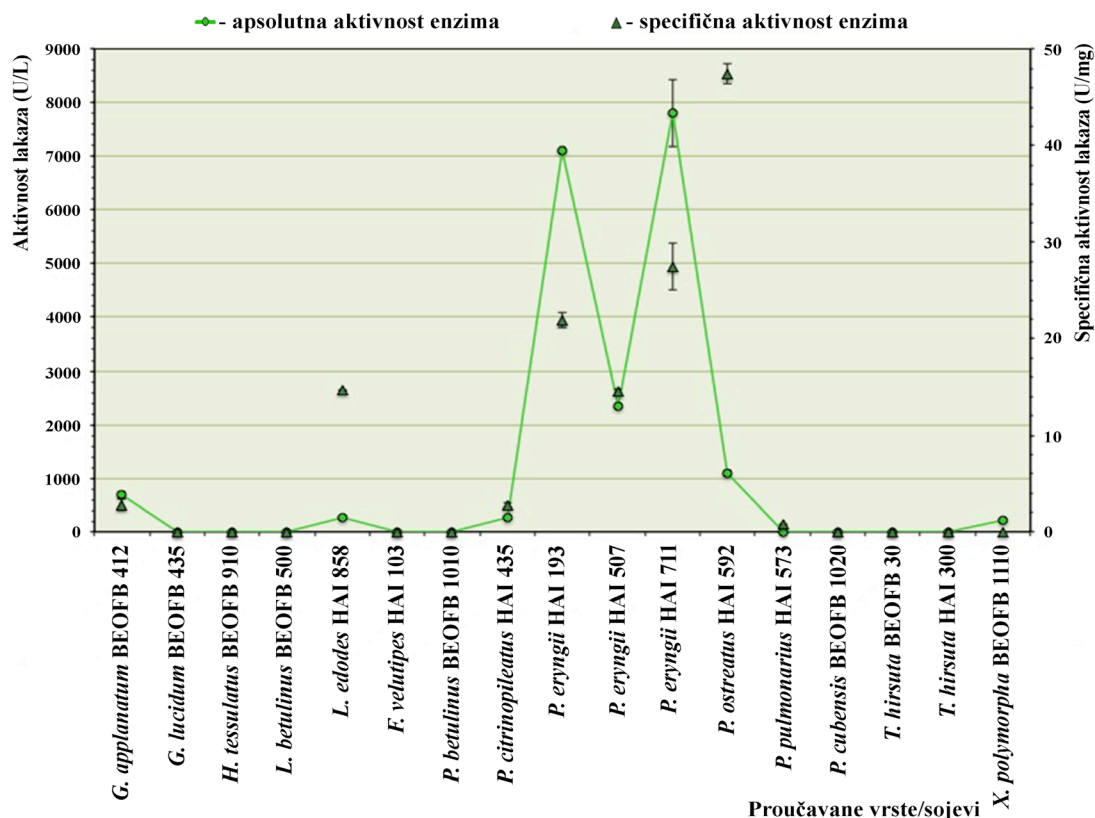
Proučavane vrste/sojevi

**Grafik 4.** Aktivnost Mn-zavisnih peroksidaza proučavanih vrsta i sojeva gljiva nakon 21 dana čvrste fermentacije pšenične slame



Proučavane vrste/sojevi

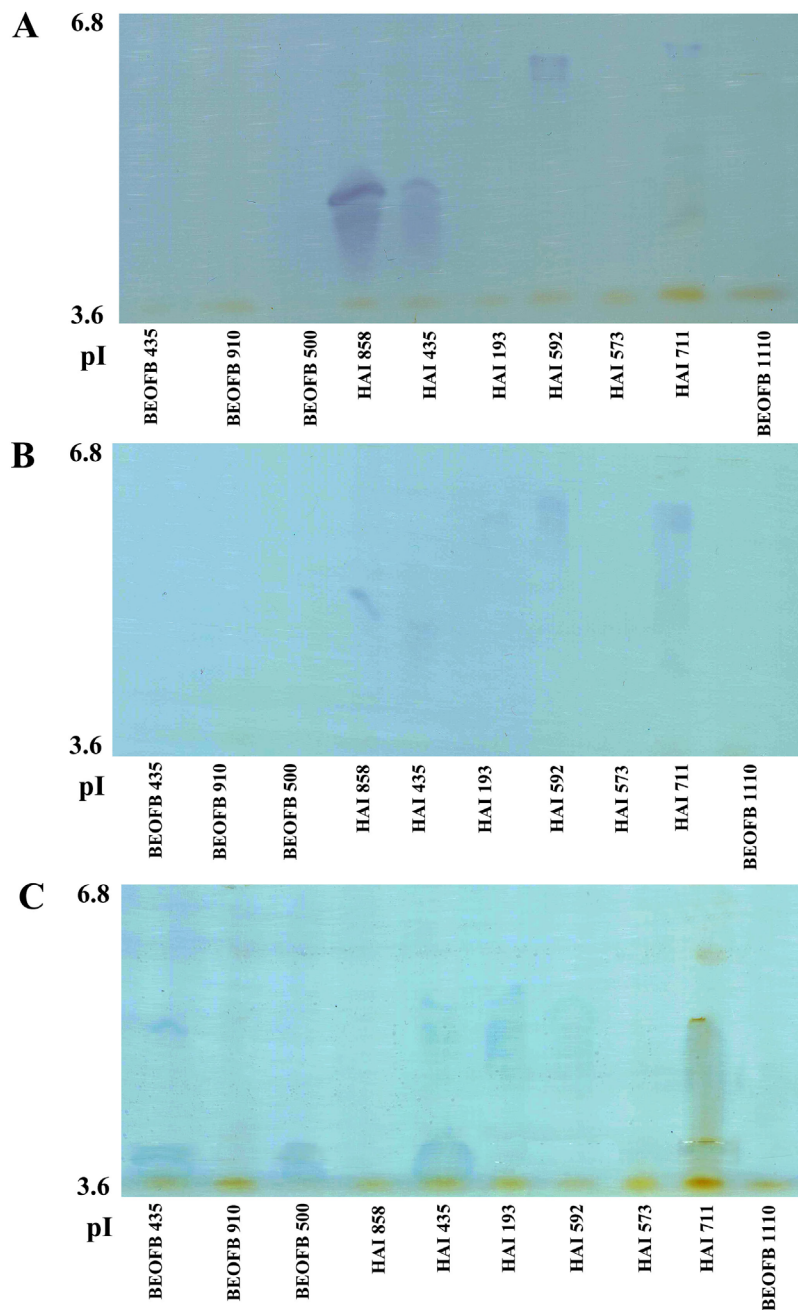
**Grafik 5.** Aktivnost Mn-nezavisnih peroksidaza proučavanih vrsta i sojeva gljiva nakon 21 dana čvrste fermentacije pšenične slame



**Grafik 6.** Aktivnost lakaza proučavanih vrsta i sojeva gljiva nakon 21 dana čvrste fermentacije pšenične slame

Izoelektričnim fokusiranjem su dobijeni različiti profili izoformi MnP, MnIP/VP i lakaza u zavisnosti od vrste odnosno soja. U slučaju MnP jedan veoma jak bend (pI 4,6) i nekoliko slabih izoformi je vizuelizovano kod *L. edodes* HAI 858 i *P. citrinopileatus* HAI 435, dok je kod *P. ostreatus* HAI 592 uočeno dva benda čiji je pI bio oko 5,9 (Slika 2A). Intraspejski diverzitet je uočen kod *P. eryngii* s obzirom da je kod soja HAI 193 vizuelizovan samo jedan slab bend pI oko 5,9 dok je kod soja HAI 711 izdvojeno tri izoforme čije su se pI nalazile u opsegu od 4,6 do 5,9. Samo po jedna MnIP/VP izoforma u pI opsegu od 3,6 do 5,9 je uočena kod svih testiranih vrsta/sojeva izuzev kod *P. eryngii* HAI 711 gde je izdvojeno nekoliko izoformi pI od oko 5,9 (Slika 2B). Lakazni zimogram je potvrdio da je ovaj enzim dominantan kod proučavanih vrsta s obzirom da je kod većine uočeno po nekoliko jakih izoformi (Slika 2C). Tri lakazna benda, jedan od pI 3,6 i dva od pI 4,6 je vizuelizovano kod *P. citrinopileatus* HAI 435, dva benda (pI 3,6 i 4,6) je dobijeno kod *G. lucidum* BEOFB 435 i *P. eryngii* HAI 193 i HAI 711, dok su preostale vrste i sojevi sintetisali ovaj enzim u samo jednoj izoformi.





**Slika 2.** IEF profili Mn-zavisnih peroksidaza (A), Mn-nezavisnih peroksidaza (B) i lakaza (C) u zavisnosti od vrste odnosno soja

Proučavane vrste su pokazale različit kapacitet degradacije pšenične slame kao i različite nivoe selektivnosti njene depolimerizacije (Tabela 4). Najveći gubitak suve mase od čak 51,20% izazvala je *Xylaria polymorpha* dok su ostale vrste bile manje efikasne uzrokujući gubitke od 9,85% (*Lenzites betulinus* BEOFB 500) do 26,70% (*G. lucidum* BEOFB 435). Najveći potencijal za razgradnju lignina pšenične slame zabeležen je kod *G. lucidum* BEOFB 435 (58,50%) a visoki procenti delignifikacije izmereni su i nakon njene fermentacije sa *P. citrinopileatus* HAI 435 (56,00%) i *L. edodes* HAI 858 (55,7%). Najmanji procenat delignifikacije dobijen je fermentacijom slame sa *L. betulinus* BEOFB 500 (33,5%) (Tabela 4). Maksimalan nivo razgradnje hemiceluloze zabeležen je takođe kod *G. lucidum* BEOFB 435 (74,8%) a najniži kod *P. eryngii* HAI 193 (2,1%). Stepenn razgradnje celuloze je bio niži u odnosu na hemicelulozu pa je maksimalan nivo od 44,0% izmeren kod *X. polymorpha* BEOFB 1110 a najniži kod *P. eryngii* HAI 711 (0,5%). Najbolji delignifikator, *G. lucidum* BEOFB 435, je bio i najselektivniji degrader pšenične slame, naime indeks selektivnosti je bio 83,57 (Tabela 4).



**Tabela 4.** Stepen razgradnje lignina, celuloze i hemiceluloze tokom čvrste fermentacije pšenične slame odabranim vrstama makromiceta

Proučavane vrste/sojevi	Gubitak suve mase (%)	Razgrađena vlakna u uzorku (%)			Indeks selektivnosti
		Lignin	Celuloza	Hemiceluloza	
<i>Ganoderma lucidum</i> BEOFB 435	26,70 <sup>d</sup>	58,50 <sup>d</sup>	0,70 <sup>a</sup>	74,80 <sup>c</sup>	83,57 <sup>c</sup>
<i>Hypsizigus tessulatus</i> BEOFB 910	25,45 <sup>d</sup>	49,40 <sup>c</sup>	20,00 <sup>c</sup>	30,60 <sup>c</sup>	2,47 <sup>b</sup>
<i>Lenzites betulinus</i> BEOFB 500	9,85 <sup>a</sup>	33,50 <sup>a</sup>	2,90 <sup>b</sup>	56,40 <sup>d</sup>	11,55 <sup>c</sup>
<i>Lentinus edodes</i> HAI 858	13,50 <sup>b</sup>	55,70 <sup>d</sup>	16,60 <sup>c</sup>	12,40 <sup>b</sup>	3,35 <sup>b</sup>
<i>Pleurotus citrinopileatus</i> HAI 435	26,60 <sup>d</sup>	56,00 <sup>d</sup>	29,20 <sup>d</sup>	30,70 <sup>c</sup>	1,92 <sup>a</sup>
<i>Pleurotus eryngii</i> HAI 193	10,30 <sup>b</sup>	36,70 <sup>a</sup>	1,40 <sup>b</sup>	2,10 <sup>a</sup>	26,21 <sup>d</sup>
<i>Pleurotus eryngii</i> HAI 711	18,90 <sup>c</sup>	34,20 <sup>a</sup>	0,50 <sup>a</sup>	51,60 <sup>d</sup>	68,40 <sup>c</sup>
<i>Pleurotus pulmonarius</i> HAI 573	20,43 <sup>c</sup>	50,40 <sup>c</sup>	3,80 <sup>b</sup>	15,30 <sup>b</sup>	13,26 <sup>c</sup>
<i>Pleurotus ostreatus</i> HAI 592	17,40 <sup>c</sup>	40,30 <sup>b</sup>	0,80 <sup>a</sup>	35,80 <sup>c</sup>	50,38 <sup>d</sup>
<i>Xylaria polymorpha</i> BEOFB 1110	51,20 <sup>e</sup>	42,90 <sup>b</sup>	44,00 <sup>c</sup>	54,90 <sup>d</sup>	0,97 <sup>a</sup>

Generalno, studirane vrste su pokazale visok kapacitet selektivne razgradnje pšenične slame što ih čini potencijalnim učesnicima u važnom delu procesa dobijanja bioetanola. Inter- i intraspecijska varijabilnost kako u karakteristikama proučavanih ligninolitičkih enzima tako i u stepenu mineralizacije pšenične slame ispitivanim vrstama su u saglasnosti sa rezultatima ranijih proučavanja. Tako su Camarero i dr. (1996), Stajić i dr. (2004) i Čilerdžić i dr. (2011) pokazali interspecijski diverzitet u produkciji MnP i lakaza između *Coriolus hirsutus* i *C. pubescens*, *Ganoderma lucidum* i *G. carnosum*, kao i između brojnih vrsta roda *Pleurotus*. Takođe, zabeležili su i razlike u stepenu delignifikacije pšenične slame sa 4 *Pleurotus* vrste (*P. pulmonarius*, *P. floridanus*, *P. ostreatus* i *P. sajor-caju*). S druge strane, pokazane su i izuzetne intraspecijske razlike u nivoima aktivnosti lakaza i MnP unutar *Cerrena maxima*, *G. lucidum* i mnogih vrsta roda *Pleurotus* (Camarero i dr., 1996; Stajić i dr., 2004; de Silva i dr., 2005; Manavalan i dr., 2012; Čilerdžić i dr., 2014). Naime, de Silva i dr. (2005) su zabeležili značajne razlike u lakaznim aktivnostima tokom tečne fermentacije pšeničnih mekinja sa četiri soja *G. lucidum* čije su se vrednosti kretale u opsegu od 0,58 U/L do 49,52 U/L. Nasuprot tome, nakon 14 dana kultivacije četiri soja iste vrste na supstratu od pšenične slame, Čilerdžić i dr. (2014) su izmerili mnogo više aktivnosti lakaza u rasponu od 153,5 U/L, kod soja BEOFB 432, do čak 5921,5 U/L, kod BEOFB 434. Aktivnost MnP detektovana nakon 21-og dana čvrste fermentacije šećerne trske sa sojem *G. lucidum* proučavanim od strane Manavalan i dr. (2012) je bila znatno niža u poređenju sa dobijenom vrednošću kod soja BEOFB 435 proučavanog u ovoj studiji (70 U/g supstrata prema 450 U/g supstrata). Stajić i dr. (2004) i Songulashvili i dr. (2007) su takođe potvrdili postojanje intraspecijske varijabilnosti u aktivnostima ligninolitičkih enzima kod *G. applanatum* i *T. versicolor* nakon tečne fermentacije kora mandarina, kod *L. edodes* i *T. versicolor* nakon čvrste kultivacije na pšeničnoj slami kao i kod vrsta roda *Pleurotus* nakon čvrste fermentacije piljevine vinove loze.

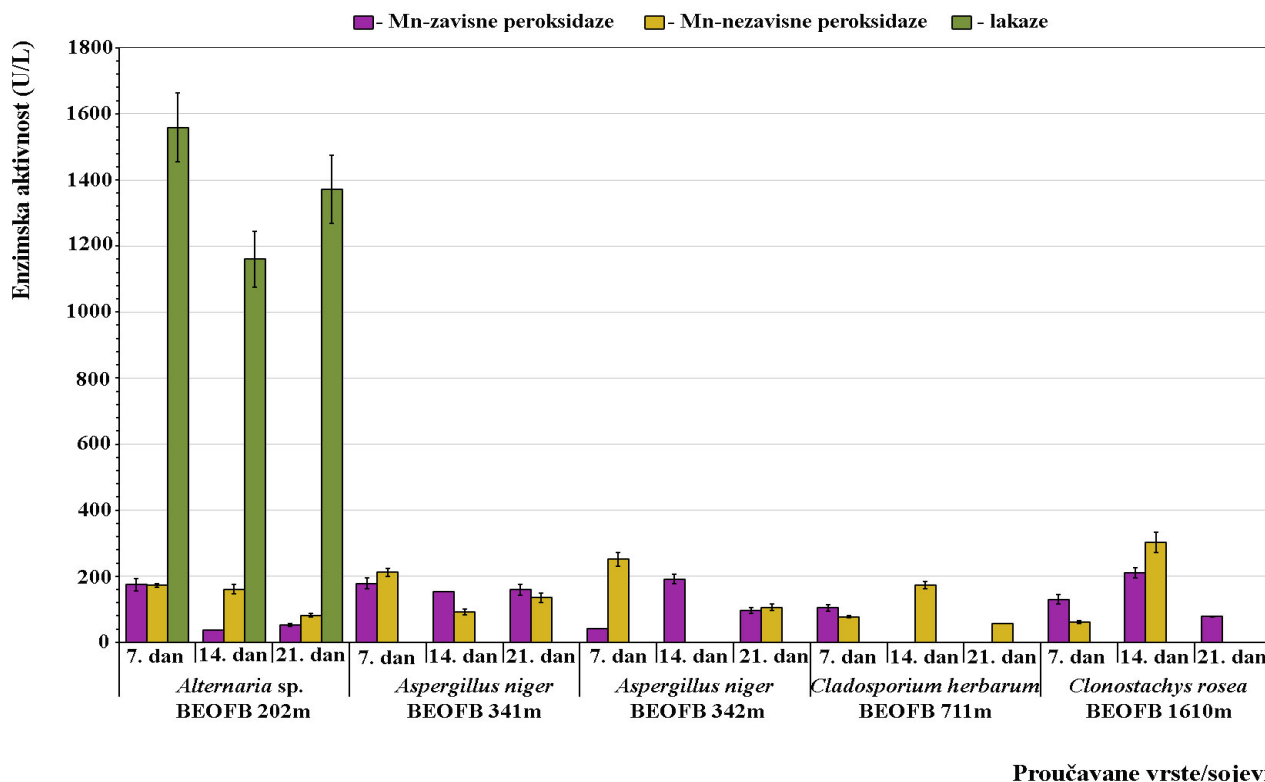
Brojni rezultati su takođe demonstrirali značajne razlike u MnP i lakaznoj aktivnosti između sojeva *P. ostreatus* u zavisnosti od njihovog geografskog porekla, tipa supstrata i uslova kultivacije (Dong i dr., 2013; Sergentani i dr. 2016; Ergun i Urek, 2017). Tako su Dong i dr. (2013) nakon tečne fermentacije ostataka šećerne trske zabeležili izuzetno visoku aktivnost MnP (150000 U/L) ali i odsustvo lakazne aktivnosti, dok su Sergentani i dr. (2016) nakon tečne kultivacije *P. ostreatus* na pšeničnim mekinjama dobili visoko aktivne izoforme lakaza (4730 U/L) ali ne i MnP. S druge strane, čvrsta kultivacija ovih *P. ostreatus* sojeva je indukovala dobru produkciju visoko aktivnih enzima nezavisno od vrste supstrata. Naime, tokom fermentacije kora krompira Ergun i Urek (2017) zabeležili su izuzetno visoke aktivnosti i MnP i lakaza (~1000 U/L odnosno ~2000 U/L) koje su bile slične dobijenim u ovoj studiji sa sojem *P. ostreatus* HAI 592 (1243,7 U/L odnosno 1085,9 U/L). Nasuprot navedenoj sličnosti, u slučaju *X. polymorpha* postojale su velike razlike u aktivnosti lakaza između soja proučavanog u ovoj studiji i soja proučavanog od strane Liers i dr. (2007) koji je nakon tečne fermentacije soka od paradajza proizveo čak pet puta aktivnije lakaze.

Uslovljenost izoenzimskih profila od genetičke osnove vrsta/sojeva pokazana je i u dosadašnjim istraživanjima (de Souza i dr., 1996; Ko i dr., 2001; Stajić i dr., 2010; Manavalan i dr., 2012; Čilerdžić i dr., 2014, 2016a). Tako, nasuprot samo dve lakazne izoforme sintetisane tokom kultivacije *G. lucidum* u maltoznom medijumu (de Souza i dr., 1996) i tri izoenzima detektovana nakon tečne fermentacije glukoza/pepton/ekstrakt kvasca medijuma sa korejskim sojem ove vrste (Ko i dr., 2001), Manavalan i dr. (2012) su vizuelizovali čak pet izoformi nakon čvrste kultivacije testiranog soja na supstratu od šećerne trske. Stajić i dr. (2010) i Čilerdžić i dr. (2014) su potvrdili da genetika ima veoma značajan uticaj na izoenzimski profil. Naime, dva soja *G. lucidum* različitog porekla (HAI 447 i BEOFB 431) sintetisala su četiri odnosno tri lakazne izoforme prilikom kultivacije pod istim uslovima tj. pri čvrstoj kultivaciji na pšeničnoj slami obogaćenoj amonijum nitratom. U slučaju MnP, za razliku od *G. lucidum* BEOFB 435 kod koje nije detektovana ni jedna izoforma nakon čvrste fermentacije pšenične slame, Manavalan i dr. (2012) su izolovali jednu izoformu (pI 4,2) nakon fermentacije šećerne trske sa proučavanim sojem a Čilerdžić i dr. (2016a) dve bliske izoforme (pI od 3,6 i 3,7) nakon tečne fermentacije pšenične slame sa sojem BEOFB 431. Inter- i intraspecijski diverzitet u izoenzimskim profilima u okviru roda *Pleurotus* takođe je demonstrirao veći broj autora. Naime, Muñoz i dr. (1997a,b) su detektovali dva benda sa aktivnošću lakaza kod *P. eryngii* nakon kultivacije u medijumu koji je sadržao glukoza i amonijum tartarat, dve izoforme su izdvojili Stajić i dr. (2006a) nakon tečne fermentacije kora mandarina sa sojem HAI 616, dok su sojevi HAI 711 i HAI 193 proizveli dva odnosno tri izoenzima. U slučaju *P. ostreatus*, nasuprot soju HAI 592 koji je proizveo lakazu u samo jednoj izoformi, Stajić i dr. (2006a) su detektovali tri izoforme kod sojeva HAI 493 i HAI 494 nakon čvrste kultivacije na piljevini vinove loze, a Guardina i dr. (1996) i Palmieri i dr. (1997) čak četiri izoforme (POXA1b, POXA1w, POXA2 i POXC) kod soja poreklom sa Floride nakon tečne kultivacije u krompir/glukoza/ekstrakt kvasca medijumu.

Ranije studije su pokazale i značajne razlike između vrsta i sojeva u kapacitetu i selektivnosti degradacije lignoceluloze (Dong i dr. 2013; Knežević i dr. 2013; Čilerdžić i dr., 2016a, b). Proučavane vrste su se pokazale kao bolji degraderi u odnosu na brojne prethodno testirane vrste i sojeve. Tako je *G. lucidum* BEOFB 435 razgradila ~38% više lignina od soja BEOFB 432 i oko 35% više od *G. applanatum*, dok su sojevi *P. eryngii* HAI 193 i HAI 711 bili više nego duplo bolji delignifikatori od soja HAI 507 (Knežević i dr., 2013; Čilerdžić i dr., 2016a, b). U slučaju *P. ostreatus*, soj HAI 592 je bio selektivniji degrader pšenične slame nakon njene čvrste fermentacije od soja proučavanog od strane Dong i dr. (2013) nakon submerzne fermentacije šećerne trske (40,3% lignina, 35,8% hemiceluloze i 0,8% celuloze u odnosu na 50% : 35% : 5%).

#### 4.1.3. Potencijal odabranih mikromiceta da depolimerizuju pšeničnu slamu

Testirane četiri vrste mikromiceta su se razlikovale po profilima ligninolitičkih enzima, dinamici njihove produkcije i nivou aktivnosti (Grafik 7). Proučavane vrste nisu proizvodile sve studirane ligninolitičke enzime. Tako je sinteza lakaza zabeležena samo kod *Alternaria* sp. BEOFB 202m sa maksimalnom aktivnošću od  $1558,59 \pm 104,42$  U/L koja je izmerena nakon 7 dana čvrste fermentacije pšenične slame. Za razliku od lakaza, aktivnosti MnP i MnIP su bile značajno niže kod studiranih izolata na svim tačkama merenja (Grafik 7).

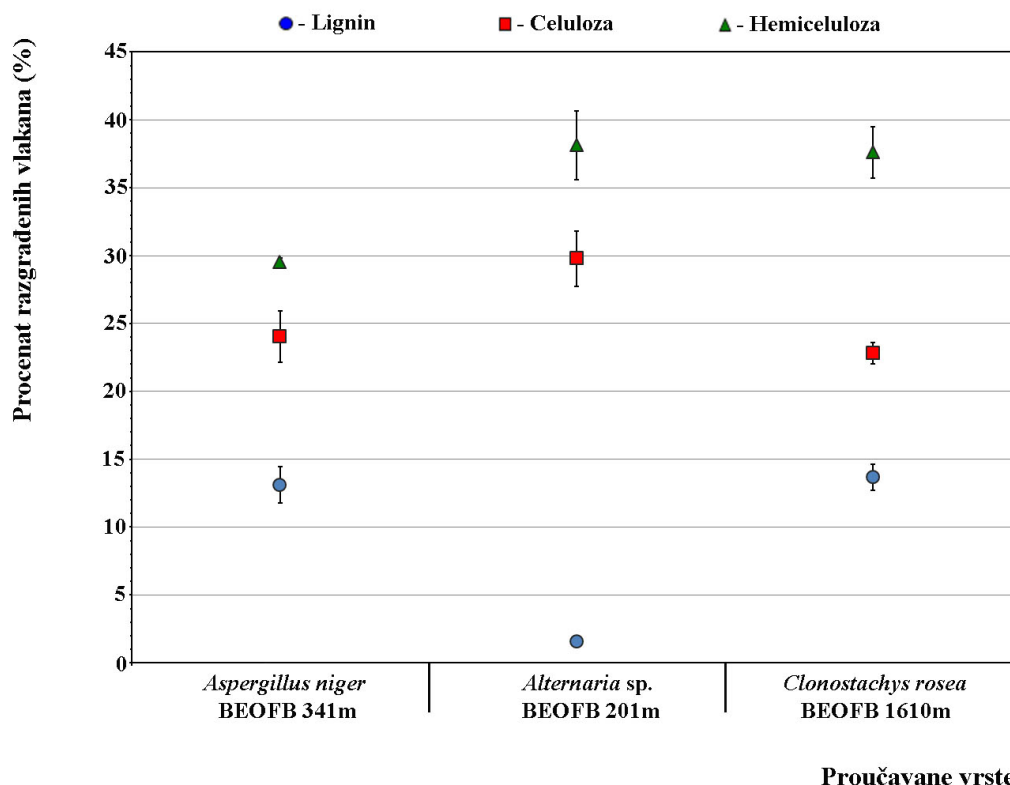


**Grafik 7.** Dinamika aktivnosti Mn-zavisnih i Mn-nezavisnih peroksidaza i lakaza ispitivanih mikromiceta u toku čvrste fermentacije pšenične slame

Najviša aktivnost MnP detektovana je 14. dana kultivacije *Clonostachys rosea* BEOFB 1610m ( $210,23 \pm 16,05$  U/L) a neznatno niža kod *Aspergillus niger* BEOFB 342m ( $191,29 \pm 13,92$  U/L). Međutim, nasuprot *Alternaria* sp., *C. rosea* i *A. niger* BEOFB 341m koji su sintetisali MnP tokom celog perioda kultivacije, *Cladosporium herbarum* BEOFB 711m je proizvodio ovaj enzim samo na početku kultivacije. Konstantno visoka MnP aktivnost tokom celog perioda fermentacije pšenične slame, sa tendencijom blagog smanjenja do 21. dana uočena je kod *A. niger* BEOFB 341m ( $178,03$  U/L 7. dana,  $153,41$  U/L 14. dana i  $159,09$  U/L 21. dana), dok je *Alternaria* sp. sintetisala MnP najniže aktivnosti od svega  $37,88 \pm 0,00$  U/L nakon 14 dana kultivacije (Grafik 7). *C. rosea* se pokazao najboljim producentom MnIP nakon 14 dana kultivacije kada je izmerena maksimalna aktivnost od  $303,03 \pm 30,3$  U/L, dok je nešto manje aktivnu izoformu sintetisao *A. niger* BEOFB 342m 7. dana kultivacije ( $251,89 \pm 20,75$  U/L). Međutim, odabrani supstrat je bio loš izvor ugljenika za produkciju MnIP kod *C. herbarum* kod koga je 21. dana kultivacije izmerena najniža aktivnost ovog enzima od samo  $56,82 \pm 0,00$  U/L (Grafik 7).

Najveći sadržaj ukupnih proteina zabeležen je nakon 21-og dana čvrste fermentacije slame sa sojevima *A. niger* ( $123,14$  mg/mL kod BEOFB 341m i  $120,13$  mg/mL kod BEOFB 342m), dok je najslabiji producent bio *C. herbarum* ( $16,26$  mg/mL). Ovakav profil produkcije proteina reflektovao se na specifične aktivnosti enzima. Najveću specifičnu aktivnost imale su lakaze *Alternaria* sp. i to 14. dana kultivacije ( $1,31$  U/mg), dok specifične aktivnosti Mn-oksidujućih peroksidaza svih testiranih izolata tokom celog kultivacionog perioda nisu bile veće od  $1,0$  U/mg.

Značajne razlike u kapacitetu redukcije ukupne suve mase pšenične slame nisu zabeležene kod odabranih vrsta pošto je kod svih bio ~20%. Dobijeni rezultati su pokazali različitu sposobnost mikromiceta da depolimerizuju ovaj supstrat, kao i različit stepen selektivnosti razgradnje polimera. Gotovo isti procenat razgrađenog lignina zabeležen je kod *A. niger* BEOFB 341m i *C. rosea* (~13,0%), dok se *Alternaria* sp. pokazala kao najslabiji degrader jer je gubitak lignina pšenične slame iznosio svega 1,53%. Nasuprot tome, ova vrsta je bila izuzetno efikasna u uklanjanju holoceluloze (38,15% hemiceluloze i 29,77% celuloze). Minimum depolimerizacije celuloze (22,81%) detektovan je nakon fermentacije pšenične slame sa *C. rosea*, dok je najmanji procenat razgrađene hemiceluloze uočen kod *A. niger* BEOFB 341m (Grafik 8). Testirane vrste su se razlikovale po selektivnosti depolimerizacije pšenične slame pa se indeks selektivnosti kretao od 0,05 kod *Alternaria* sp. do 0,6 kod *C. rosea*.



**Grafik 8.** Kapacitet odabranih mikromiceta da razlažu pšeničnu slamu u uslovima čvrste fermentacije

Nekoliko ranijih studija je saopštilo različite profile ligninolitičkih enzima kao i lignocelulolitičke potencijale brojnih vrsta mikromiceta. Naime, Khelifi i dr. (2009) su zabeležili znatno niže aktivnosti lakaza i MnP (~80 U/L odnosno ~10 U/L) nakon kultivacije *Aspergillus alliaceus* u tečnom medijumu obogaćenom piljevinom hrasta i pšeničnim mekinjama. Takođe, *Fusarium moniliforme* je pokazao značajno manju sposobnost sinteze aktivnih formi MnP tokom fermentacije pirinčane slame, pa je tako aktivnost od 9,67 U/g izmerena nakon 10 dana čvrste fermentacije ovog supstrata dok je nakon 7 dana tečne kultivacije bila samo 0,04 U/g (Chang i dr., 2012). Pirinčana slama je bila najbolji supstrat i za sintezu lakaza kod *Aspergillus heteromorphus* (Singh i dr., 2010). Naime, pik enzimske aktivnosti od 6,6 U/mL je dostignut nakon 16 dana tečne kultivacije što je za oko 26% više nego u slučaju fermentacije pšenične slame i čak 56% više u poređenju sa fermentacijom šećerne trske.

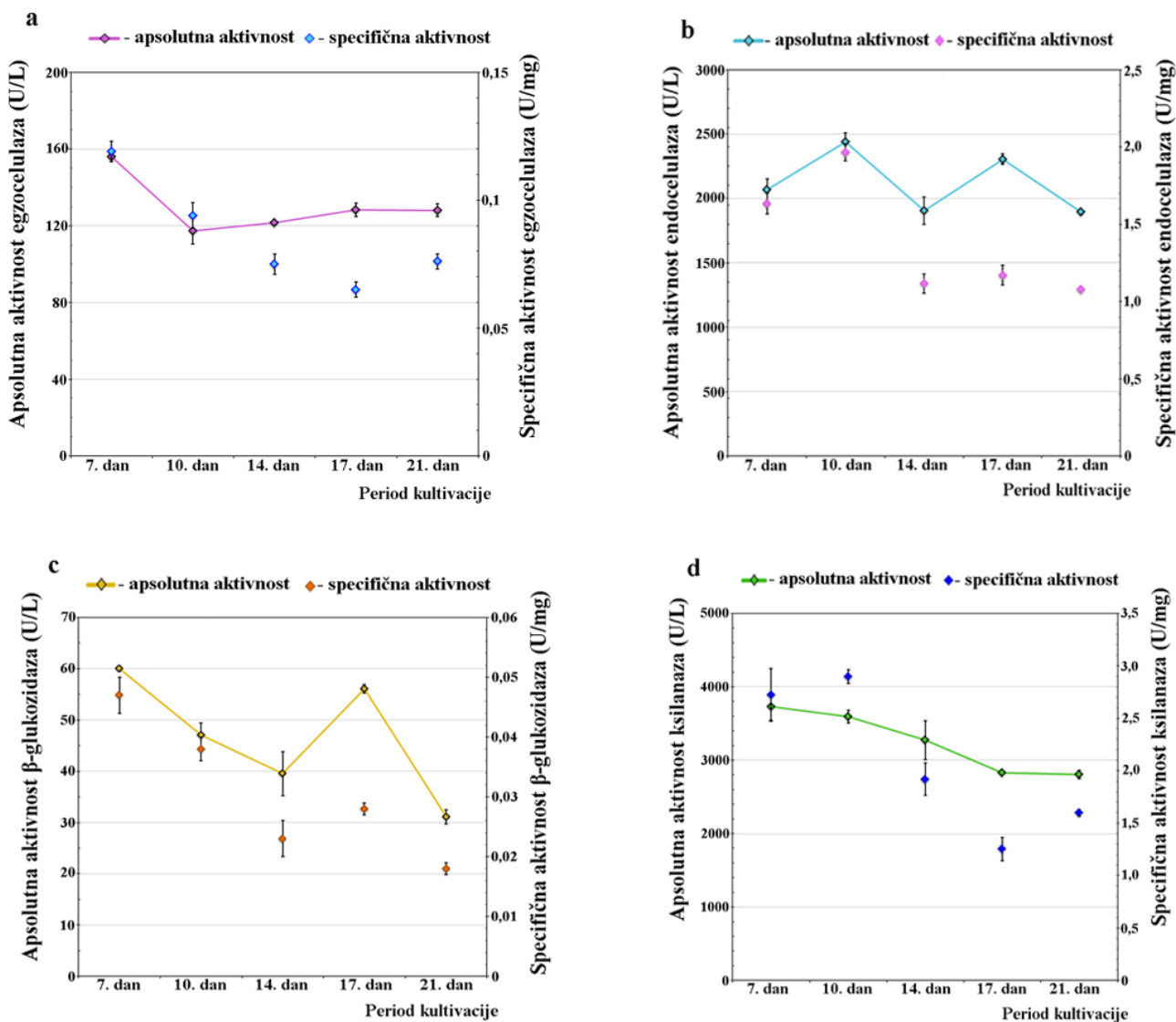
Značajno viši kapacitet degradacije lignina saopštili su Chang i dr. (2012) i Baltierra-Trejo i dr. (2015) kod *Aspergillus fumigatus* i *Fusarium moniliforme* koji su mineralizovali čak 33% lignina nakon 28 dana tečne fermentacije pšenične slame, odnosno 34,7% nakon 10 dana tečne fermentacije pirinčane slame. Isti autori su saopštili značajno variranje kapaciteta pomenutih vrsta da razgrađuju holocelulozu, krećući se od 2,1% kod *F. moniliforme* do čak 32% kod *A. fumigatus*.

Bez obzira što su testirane mikromicete u ovoj studiji bile slabi delignifikatori, naročito *Alternaria* sp., neosporno je da se testirane vrste odlikuju selektivnošću u razgradnji polimera, što je posebno značajno u korišćenju različitih lignoceluloznih supstrata u brojnim biotehološkim procesima a pre svega dobijanju bioetanola.

## 4.2. Celulolitički potencijal gljiva

### 4.2.1. Dinamika aktivnosti celulaza *Trichoderma viridae* na pšeničnoj slami pretretiranoj sa *Pleurotus pulmonarius*

Celulolitički enzimi *T. viride* BEOFB 1210m sintetisani tokom čvrste fermentacije pšenične slame pretretirane sa *P. pulmonarius* HAI 573 kao visoko selektivnim degraderom, su se značajno razlikovali i po dinamici sinteze i po aktivnosti (Grafik 9).



**Grafik 9.** Dinamika aktivnosti egzocelulaza (A), endocelulaza (B),  $\beta$ -glukozidaza (C) i ksilanaza (D) *Trichoderma viride* BEOFB 1210m u toku čvrste fermentacije pšenične slame pretretirane sa *Pleurotus pulmonarius* HAI 573

Međutim, ako se posmatra svaki enzim pojedinačno onda dužina kultivacije nije značajno uticala na njihovu aktivnost. Maksimalna aktivnost egzocelulaza izmerena je 7. dana kultivacije ( $155,83 \pm 0,48$  U/L), nakon čega se smanjivala do  $\sim 117,00$  U/L 10. dana odnosno  $128,00$  U/L na kraju

perioda kultivacije (Grafik 9A). U slučaju endocelulaza, aktivnost se kretala od  $1894,19 \pm 18,93$  U/L 21. dana fermentacije pretretirane slame do  $2439,55 \pm 68,45$  U/L 10. dana fermentacije, mada su i na drugim tačkama merenja vrednosti bile visoke,  $\sim 2000$  U/L (Grafik 9B). U poređenju sa egzo- i endocelulazama, pretretirana pšenična slama je bila najslabiji inducer  $\beta$ -glukozidaza čije su aktivnosti bile višestruko niže, sa najvišom vrednošću od  $59,98 \pm 0,43$  U/L izmerenom 7. dana kultivacije (Grafik 9C). S druge strane, aktivnost ksilanaza je bila na značajno višem nivou u odnosu na endocelulaze a naročito egzocelulaze i  $\beta$ -glukozidaze (Grafik 9D). Tako je pik aktivnosti ovog enzima od  $3730,10 \pm 188,08$  U/L dostignut već 7. dana kultivacije nakon čega je zabeležen postepen pad aktivnosti do 21. dana kada je izmerena vrednost od  $2806,46 \pm 55,24$  U/L. Generalno, testirani celulolitički enzimi su bili najaktivniji na početku fermentacionog procesa (Grafik 9).

Tokom fermentacionog perioda i sinteza proteina je varirala što se odrazilo na specifične aktivnosti ovih enzima (Grafik 9). Tako se ukupni sadržaj proteina kretao u opsegu od  $1,26 \pm 0,12$  mg/mL 7. dana do  $2,08 \pm 0,19$  mg/mL 17. dana kultivacije. Specifične aktivnosti ksilanaza i endocelulaza su imale značajne vrednosti 7. odnosno 10. dana ( $2,72 \pm 0,25$  U/mg odnosno  $1,97 \pm 0,06$  U/mg) dok su kod preostala dva enzima one bile  $< 1,0$  U/mg.

Poređenjem ovih rezultata sa rezultatima Adsul i dr. (2004), koji su hemijski tretiranu šećernu trsku fermentisali sa *T. viridae* NCIM 1171 10 dana i dobili očekivano aktivnije ksilanaze odnosno endocelulaze i  $\beta$ -glukozidaze ( $\sim 80000$  U/L,  $\sim 22000$  U/L odnosno  $330$  U/L), može se zaključiti da sastav supstrata, genetička osnova vrste odnosno soja kao i tip pretretmana i period hidrolize imaju odlučujuću ulogu u zastupljenosti i aktivnosti celulolitičkih enzima. S druge strane, *T. harzianum* je proizvela celulaze znatno niže aktivnosti tokom hidrolize pšenične slame pretretirane ligninolitičkim koktelom *G. lucidum*, naime izmerene aktivnosti njenih celulaza su se kretale u opsegu od  $39,0 \pm 2,2$  U/mL do  $53,5 \pm 1,24$  U/mL (Asgher i dr., 2014). Soj *T. harzianum* koga su koristili Grujić i dr. (2015) za hidrolizu istrošenog komposta nakon kultivacije *Agaricus bisporus* je sintetisao visoko aktivne izoforme ksilanaza ( $> 2,0$  U/mL) kao i *T. atroviride* T42 koja je bila i odličan producent endocelulaza ( $\sim 0,8$  U/mL), dok je najbolji producent  $\beta$ -glukozidaza u ovoj studiji bila *T. koningi* TK1 ( $\sim 6,0$  U/mL). Međutim, pri fermentaciji pšenične slame sa sojem *T. viridae* korišćenim u studiji Vázquez i dr. (2019) tokom celog fermentacionog perioda beležene su značajno niže vrednosti endo- i posebno egzocelulaza u poređenju sa *T. viridae* BEOFB 1210m. Ova vrsta je proizvela i ksilanaze veoma niske aktivnosti tokom tečne fermentacije različitih poljoprivrednih ostataka, kao što su ostaci pšenice, sirka i kukuruza (Goyal i dr., 2008). Generalno, vrste roda *Trichoderma* su se pokazale lošim producentima  $\beta$ -glukozidaza koje su neophodne za potpunu depolimerizaciju celuloze pre svega zbog toga što krajnji produkti hidrolize supstrata, tj. glukoza i celobioza, inhibiraju sintezu ovih enzima (Garcia-Kirchner i dr., 2005; Singhanian i dr., 2011).

#### **4.2.1.1. Potencijal *Trichoderma viridae* za depolimerizaciju pšenične slame pretretirane sa *Pleurotus pulmonarius***

Zahvaljujući sposobnosti da sintetiše celulolitičke enzime, *T. viridae* BEOFB 1210m je bila dobar degrader pretretirane pšenične slame sa različitom efikasnošću mineralizacije njenih polimera. Gubitak suve mase pšenične slame se kretao od 23,75% 7. dana fermentacije do 36,25% 21. dana, dok se stepen mineralizacije celuloze neznatno povećavao od 30,56% do 33,74% (Tabela 5). Nivo razgradnje hemiceluloze se linearno povećavao od 10. do 21. dana kultivacije (od 25,21% do 49,87%) a takođe je zabeleženo i blago smanjenje koncentracije lignina što ukazuje i na izvesni ligninolitički potencijal ove mikromicete (Tabela 5).

**Tabela 5.** Kapacitet *Trichoderma viridae* BEOFB 1210m da razlaže pretretiranu pšeničnu slamu

Period kultivacije	Proučavan soj	Masa uzorka (g)	Sastav polimera u uzorku (mg)			Gubitak suve mase (%)	Razgrađena vlakna u uzorku (%)		
			Lignin	Celuloza	Hemiceluloza		Lignin	Celuloza	Hemiceluloza
7. dan	Kontrola* BEOFB 1210m	0,80	70,79	329,60	182,40	/	/	/	/
		0,61	69,97	228,89	137,54	23,75 <sup>a</sup>	1,16 <sup>a</sup>	30,56 <sup>a</sup>	24,59 <sup>a</sup>
10. dan	Kontrola* BEOFB 1210m	0,80	70,79	329,60	182,40	/	/	/	/
		0,60	66,00	228,84	136,41	25,00 <sup>a</sup>	6,77 <sup>b</sup>	30,57 <sup>a</sup>	25,21 <sup>a</sup>
14. dan	Kontrola* BEOFB 1210m	0,80	70,79	329,60	182,40	/	/	/	/
		0,58	65,28	224,67	127,66	27,50 <sup>b</sup>	7,78 <sup>b</sup>	31,83 <sup>a</sup>	30,01 <sup>b</sup>
17. dan	Kontrola* BEOFB 1210m	0,80	70,79	329,60	182,40	/	/	/	/
		0,54	64,80	220,66	106,08	32,50 <sup>c</sup>	8,46 <sup>b</sup>	33,05 <sup>a</sup>	41,84 <sup>c</sup>
21. dan	Kontrola* BEOFB 1210m	0,80	70,79	329,60	182,40	/	/	/	/
		0,51	63,58	218,41	91,43	36,25 <sup>c</sup>	10,19 <sup>c</sup>	33,74 <sup>a</sup>	49,87 <sup>d</sup>

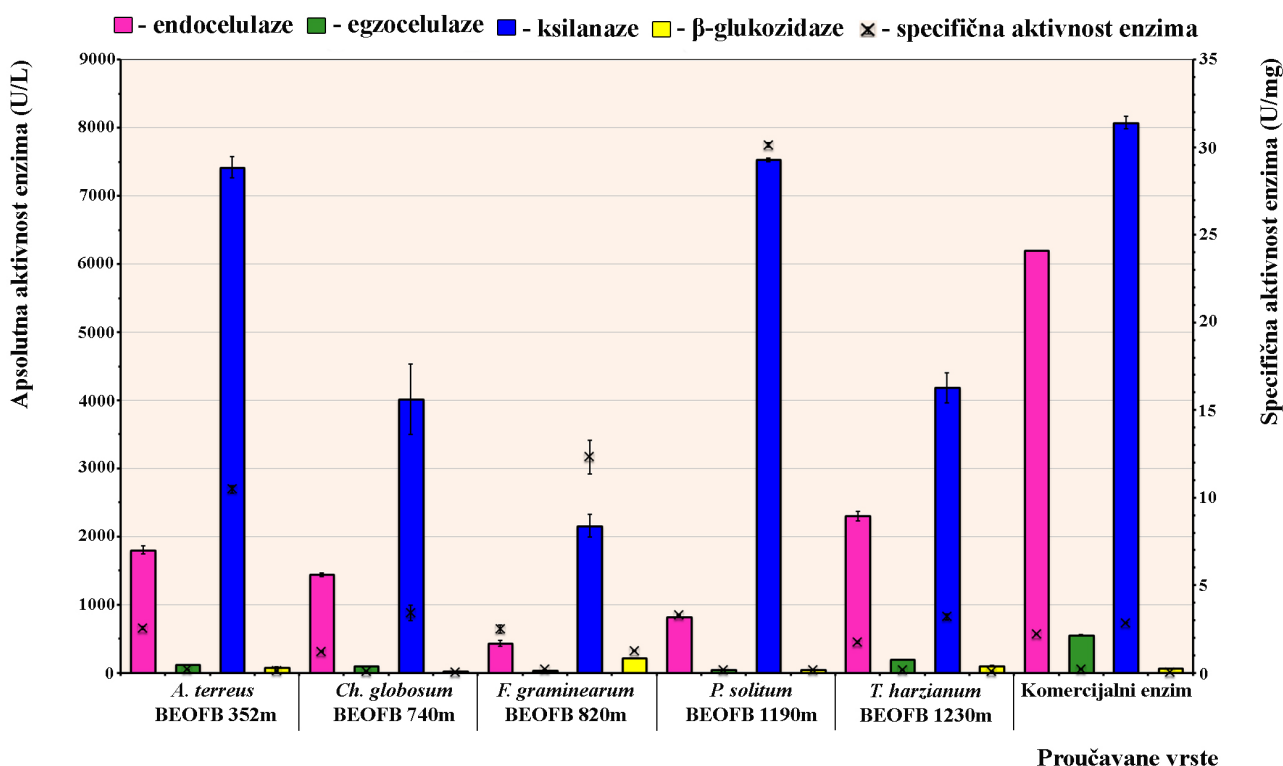
Bowen i Harper (1990) su analizom mikrobiote pšenične slame, koja se koristila kao prirodno organsko đubrivo za obradivo zemljište, našli brojne populacije *Fusarium culmorum*, *Trichoderma* spp. i *Chaetomium globosum* koji je bio i njen najefikasniji degrader. U poređenju sa objavljenim rezultatima, *T. viridae* BEOFB 1210m nije bila efikasni mineralizator pšenične slame. Naime, *Penicillium expansum* W4 je degradovao 59,06% celuloze i 78,75% hemiceluloze nakon 10 dana fermentacije slame (Wang i Fan, 2010), dok je *T. harzianum* nakon samo 5 dana hidrolize pšenične slame pretretirane ligninolitičkim koktelom *Ganoderma lucidum* mineralizovala čak 88,3% celuloze (Asgher i dr., 2014). Sa druge strane, *Myrothecium verrucaria*, *Galactomyces geotrichum* i *Mortierella verticillata* su depolimerizovali ~92% hemiceluloze ražane slame nakon čak 60 dana kultivacije (Varnaitė i Raudonienė, 2008).

#### 4.2.2. Aktivnost celulolitičkih enzima odabranih mikromiceta nakon fermentacije pšenične slame i piljevine hrasta pretretiranih sa *Pleurotus pulmonarius*

Analizom dobijenih rezultata vidi se da je pšenična slama bila daleko povoljniji supstrat od piljevine hrasta za sintezu testiranih enzima kod odabranih vrsta mikromiceta. Takođe, interspecijski diverzitet u aktivnosti produkovanih celulaza pri fermentaciji oba testirana supstrata je jasno uočljiv (Grafici 10 i 11). Ksilanaze su dominantni enzimi na pšeničnoj slami sa maksimalnim aktivnostima izmerenim kod *Penicillium solitum* BEOFB 1190m ( $7532,36 \pm 89,37$  U/L) i *Aspergillus terreus* BEOFB 352m ( $7421,35 \pm 152,72$  U/L), sa skoro dvostruko nižim vrednostima kod *Chaetomium globosum* BEOFB 740m i *Trichoderma harzianum* BEOFB 1230m, dok se *Fusarium graminearum* BEOFB 820m pokazao najslabijim producentom ovih enzima ( $2155,91 \pm 166,66$  U/L) (Grafik 10). Međutim, *T. harzianum* je bila najbolji producent endocelulaza čija je aktivnost na pšeničnoj slami iznosila čak  $2299,70 \pm 72,17$  U/L. Nešto niže vrednosti su izmerene kod *A. terreus* i *Ch. globosum*, dok su višestruko manje aktivnosti zabeležene kod *P. solitum* i *F. graminearum* ( $822,20 \pm 5,78$  U/L odnosno  $436,35 \pm 42,28$  U/L). Sa druge strane, pšenična slama je bila prilično slab inducer sinteze egzocelulaza i  $\beta$ -glukozidaza (Grafik 10). Najaktivnije egzocelulaze produkovala je *T. harzianum* ( $195,66 \pm 4,64$  U/L), dok je *F. graminearum* sintetisao izoforme najniže aktivnosti ( $32,15 \pm 1,22$  U/L). Međutim, kod ove vrste je zabeležena najviša aktivnost  $\beta$ -glukozidaza ( $215,69 \pm 3,13$  U/L), čak dvostruko viša od one izmerene kod *T. harzianum* ( $103,36 \pm 5,88$  U/L) i više nego 10 puta veća od one kod *Ch. globosum* ( $18,89 \pm 1,52$  U/L) (Grafik 10). Komercijalni enzimski preparat, Celulase from *Trichoderma reesei* (Sigma - Aldrich), je očekivano bio efikasniji u endo- i egzocelulaznoj aktivnosti, neznatno



efikasniji kada su u pitanju ksilanaze a čak slabiji u poređenju sa  $\beta$ -glukozidazama proučavanih mikromiceta (Grafik 10).

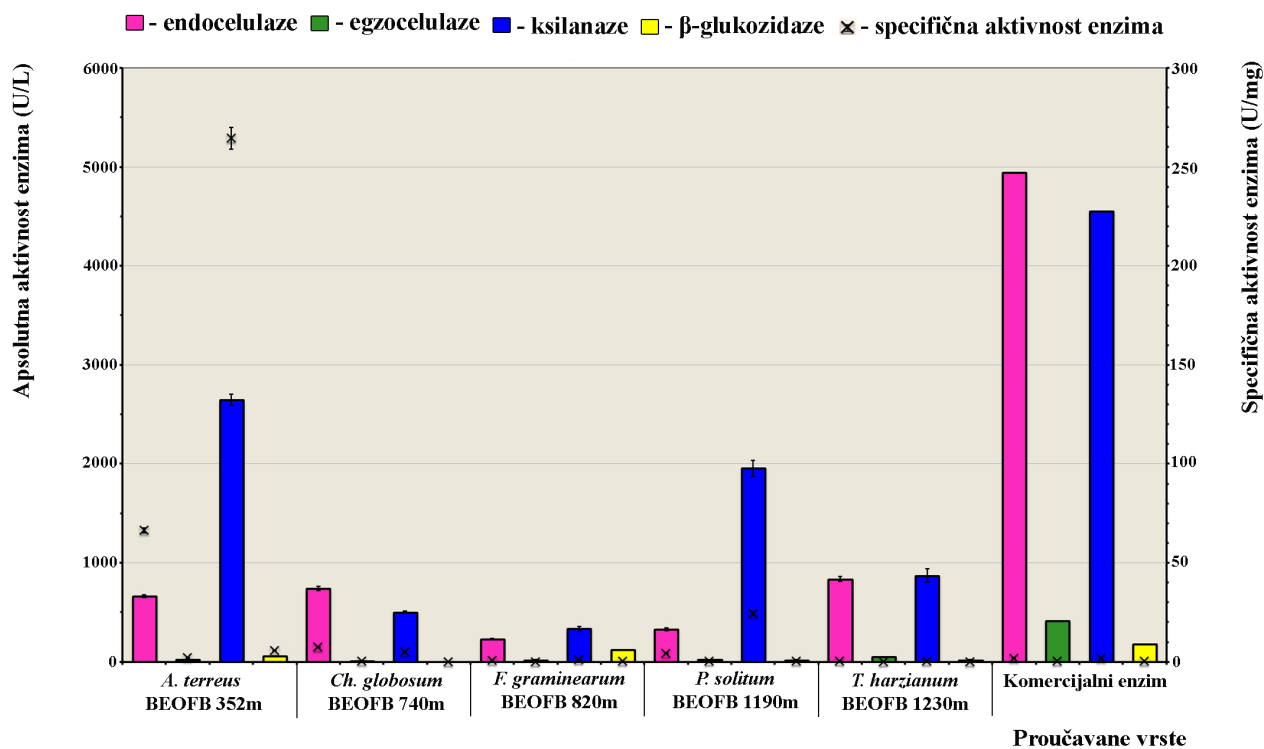


**Grafik 10.** Aktivnost celulolitičkih enzima ispitivanih vrsta mikromiceta nakon 7 dana čvrste fermentacije pšenične slame pretretirane sa *Pleurotus pulmonarius* HAI 573

Nasuprot pšeničnoj slami, piljevina hrasta je indukovala sintezu manje aktivnih formi svih testiranih enzima (Grafik 11). Maksimalne aktivnosti ksilanaza ( $2645,62 \pm 55,07$  U/L), endocelulaza ( $835,39 \pm 22,66$  U/L) i egzocelulaza ( $50,03 \pm 0,20$  U/L) su takođe detektovane kod *A. terreus* i *T. harzianum*, dok su kod *Ch. globosum* zabeležene najniže aktivnosti egzocelulaza i ksilanaza, značajne aktivnosti endocelulaza, dok aktivnost  $\beta$ -glukozidaza nije zabeležena nakon 7 dana fermentacije ovog supstrata. Slično kao i na pšeničnoj slami, *F. graminearum* je bio najbolji producent  $\beta$ -glukozidaza ( $119,81 \pm 1,94$  U/L). Izuzev  $\beta$ -glukozidaza kod *F. graminearum* kada je efikasnost komercijalnog enzimskog preparata bila neznatno viša, u svim ostalim slučajevima ona je bila višestruko veća (Grafik 11).

Nivo produkcije proteina je zavisio od vrste mikromicete i tipa supstrata i reflektovao se na profil specifičnih aktivnosti ovih enzima (Grafici 10 i 11). Nakon fermentacije pšenične slame, najveći sadržaj proteina detektovan je kod *T. harzianum* ( $1,31 \pm 0,13$  mg/mL) a najniži kod *F. graminearum* ( $0,18 \pm 0,01$  mg/mL). Nakon kultivacije na piljevini hrasta, sadržaj proteina kretao se u opsegu od  $0,01$  mg/mL kod *A. terreus* do  $3,10$  mg/mL kod *T. harzianum*. Dobijene koncentracije proteina uslovile su specifične aktivnosti enzima. Tako su na pšeničnoj slami maksimalne vrednosti za ksilanaze i endocelulaze od  $30,13 \pm 0,12$  U/mg odnosno  $3,29 \pm 0,02$  U/mg zabeležene kod *P. solitum*, dok su najviše vrednosti za egzocelulaze ( $0,18 \pm 0,01$  U/mg) kao i  $\beta$ -glukozidaze ( $1,23 \pm 0,02$  U/mg) detektovane kod *F. graminearum*. Tokom kultivacije na piljevini hrasta, najviše specifične aktivnosti ksilanaza, endo- i egzocelulaza kao i  $\beta$ -glukozidaza zabeležene su kod *A. terreus* ( $264,56 \pm 5,51$  U/mg,  $66,33 \pm 1,25$  U/mg,  $1,98 \pm 0,27$  U/mg odnosno  $5,62 \pm 0,02$  U/mg) (Grafik 11).





**Grafik 11.** Aktivnost celulolitičkih enzima ispitivanih vrsta mikromiceta nakon 7 dana čvrste fermentacije piljevine hrasta pretretirane sa *Pleurotus pulmonarius* HAI 573

Dobijeni rezultati su pokazali efikasnu produkciju celulolitičkih enzima kod 5 vrsta mikromiceta u uslovima čvrste fermentacije pre svega pšenične slame, čija upotreba u procesu konverzije celuloze u etanol može biti alternativa korišćenju skupih komercijalnih enzimskih preparata koji zahtevaju prečišćavanje, dodavanje pufera, stabilizatora i konzervansa, liofilizaciju kao i pakovanje.

Poređenjem rezultata sve testirane vrste mikromiceta su proizvele znatno aktivnije forme celulaza, na oba testirana supstrata, u odnosu na vrste korišćene u studijama Kurbanmuratovich i Ismailovna (2018) i Vázquez i dr. (2019). Naime, soj *T. harzianum* korišćen u studiji Kurbanmuratovich i Ismailovna (2018) je nakon 6 dana fermentacije filter papira proizveo celulaze čija je aktivnost bila svega 0,84 U/mL, dok je soj iz studije Vázquez i dr. (2019) nakon fermentacije pšenične slame sintetisao endo- i egzocelulaze još niže aktivnosti (0,002 U/mL odnosno 0,06 U/mL). Sa druge strane, naše vrste su proizvele celulaze znatno niže aktivnosti u poređenju sa vrstama i sojevima iz brojnih drugih radova. Tako su aktivnosti endo- i egzocelulaza,  $\beta$ -glukozidaza kao i ksilanaza proizvedenih nakon sedmodnevne čvrste fermentacije pšenične slame sa *Aspergillus niger* N402 bile višestruko veće od vrednosti dobijenih u ovoj disertaciji ( $5,70 \pm 0,21$  U/mL,  $1,31 \pm 0,05$  U/mL,  $5,34 \pm 0,13$  U/mL odnosno  $21,8 \pm 1,77$  U/mL) (Pensupa i dr., 2013). Visoko aktivne forme egzocelulaza (10,96 U/g) sintetisao je i soj *A. terreus* koga su za fermentaciju pirinčane slame koristili Narra i dr. (2012). Visoko aktivne endocelulaze od čak  $278,00 \pm 1,66$  U/mL sintetisala je i *T. harzianum* nakon kultivacije na pšeničnoj slami prethodno hemijski tretiranoj (Iqbal i dr., 2010). Međutim, bez obzira što se hemijskim pretretmanom efikasno uklanjaju lignin i hemiceluloza i pospešuje hidroliza, korišćenje enzimskih koktela gljiva ima višestruke prednosti i potencijal za preuzimanje glavne uloge u procesu dobijanja bioetanol (Pandey, 2008; Gupta i Verma, 2015).

#### 4.2.2.1. *Potencijal odabranih mikromiceta za depolimerizaciju pšenične slame i piljevine hrasta pretretirane sa Pleurotus pulmonarius*

Odabrane vrste mikromiceta su depolimerizovale pretretiranu pšeničnu slamu i piljevinu hrasta u različitom stepenu (Tabela 6). Mnogo veći gubici suve mase zabeleženi su nakon fermentacije pšenične slame testiranim vrstama i kretali su se u opsegu od 16,26% sa *F. graminearum* do 36,25% sa *T. harzianum*, u odnosu na vrednosti zabeležene za piljevinu hrasta (od 16,00% do 20,00%). Najbolji mineralizatori celuloze iz pšenične slame bili su *A. terreus* i *T. harzianum* koji su razložili 39,3% odnosno 23,9% celuloze što je bilo u pozitivnoj korelaciji sa izmerenim aktivnostima celulaza, dok su najefikasniji u depolimerizaciji hemiceluloze bili *Ch. globosum* i *T. harzianum* sa 39,3% odnosno 33,0%. Tokom degradacije piljevine hrasta, *Ch. globosum* je bio najefikasniji u mineralizaciji celuloze (17,3%) a *F. graminearum* u mineralizaciji hemiceluloze (43,8%). Međutim, iako je tokom pretretmana testiranog supstrata uklonjen značajan procenat lignina, pojedine vrste mikromiceta su vršile dodatnu delignifikaciju. Naime, *Ch. globosum* je mineralizovao čak 27,8% lignina iz pšenične slame a *P. solitum* 23,0% iz piljevine hrasta (Tabela 6).

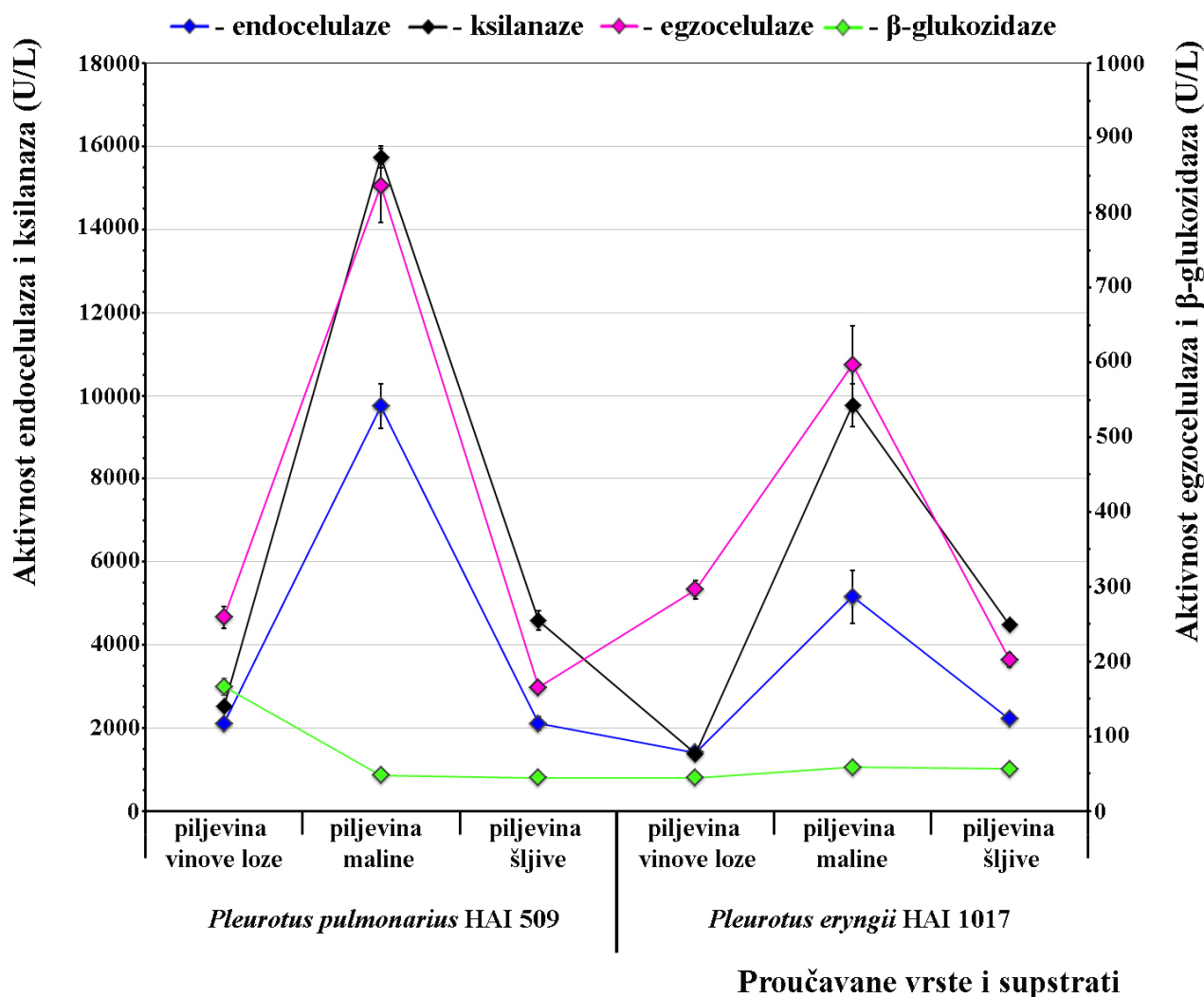
Prema Varnaitė i Raudonienė (2008), *Ch. globosum* je bio i visoko efikasan mineralizator hemiceluloze ražane slame, pošto je za 30 dana degradovao 87% a za 60 dana čak 94% ovog polimera. Vrste roda *Trichoderma* su se i ranije pokazale efikasnim depolimerizatorima celuloze pšenične slame. Naime, Nawaz i dr. (2018) su zabeležili gubitak celuloze u pšeničnoj slami hidrolizovanoj sa *T. viridae* od čak 83%. U poređenju sa *Aspergillus fumigatus* SK1 i *Trichoderma* sp. koje su za degradaciju stajnjaka koristili Zulkifli i dr. (2018), *A. terreus* BEOFB 352m i *T. harzianum* BEOFB 1230m su bili efikasniji u smanjenju sadržaja celuloze pšenične slame, dok su njihovi kapaciteti za degradaciju hemiceluloze bili slični. Singh i dr. (2008) su takođe pokazali sposobnost *Trichoderma citronoviridae* da vrši delignifikaciju pre svega slame šećerne trske ali zabeležen gubitak lignina od 8% je bio znatno niži od dobijenog nakon fermentacije pšenične slame i piljevine hrasta sa *Ch. globosum* BEOFB 740m i *P. solitum* BEOFB 1190m. Međutim, uprkos brojnim rezultatima dalja istraživanja su neophodna pre svega zbog različitih fizičko-hemijskih svojstava supstrata i njihove osetljivosti na enzimske sisteme uključene u delignifikaciju i hidrolizu kao dva uslovljena procesa (Kadarmoidheen i dr., 2012).

**Tabela 6.** Stepen depolimerizacije pretretirane pšenične slame i piljevine hrasta odabaranim vrstama mikromiceta

Otpad iz poljoprivrede i šumarstva	Provačavana vrsta	Masa uzorka (g)	Sastav polimera u uzorku (mg)			Gubitak suve mase (%)	Nivo razgradnje (%)		
			Lignin	Celuloza	Hemiceluloza		Lignin	Celuloza	Hemiceluloza
Pšenična slama	Kontrola*	0,80	46,40	124,00	88,00	/	/	/	/
	<i>T. harzianum</i>	0,51	43,10	94,40	59,00	36,25 <sup>b</sup>	7,10 <sup>b</sup>	23,90 <sup>c</sup>	33,00 <sup>c</sup>
	<i>F. graminearum</i>	0,67	46,40	135,10	67,20	16,26 <sup>a</sup>	0,10 <sup>a</sup>	0,00 <sup>a</sup>	23,60 <sup>b</sup>
	<i>A. terreus</i>	0,53	43,10	75,20	66,30	33,75 <sup>b</sup>	7,00 <sup>b</sup>	39,30 <sup>d</sup>	24,70 <sup>b</sup>
	<i>P. solitum</i>	0,65	40,40	138,90	73,00	18,75 <sup>a</sup>	12,90 <sup>c</sup>	0,00 <sup>a</sup>	17,00 <sup>a</sup>
	<i>Ch. globosum</i>	0,54	33,50	107,50	53,50	32,50 <sup>b</sup>	27,80 <sup>d</sup>	13,30 <sup>b</sup>	39,30 <sup>d</sup>
Piljevina hrasta	Kontrola*	1,00	106,50	222,60	72,70	/	/	/	/
	<i>T. harzianum</i>	0,82	90,00	195,80	57,20	18,00 <sup>b</sup>	15,50 <sup>b</sup>	12,10 <sup>b</sup>	0,00 <sup>a</sup>
	<i>F. graminearum</i>	0,84	92,20	219,10	32,10	16,00 <sup>a</sup>	13,40 <sup>a</sup>	1,60 <sup>a</sup>	43,80 <sup>c</sup>
	<i>A. terreus</i>	0,84	86,40	215,60	62,90	16,00 <sup>a</sup>	18,90 <sup>b</sup>	3,10 <sup>a</sup>	0,00 <sup>a</sup>
	<i>P. solitum</i>	0,84	82,00	220,10	37,70	16,00 <sup>a</sup>	23,00 <sup>c</sup>	1,10 <sup>a</sup>	34,20 <sup>b</sup>
	<i>Ch. globosum</i>	0,80	95,20	184,00	40,00	20,00 <sup>b</sup>	10,60 <sup>a</sup>	17,30 <sup>c</sup>	30.10 <sup>b</sup>

#### 4.2.3. Celulolitička aktivnost *Pleurotus eryngii* i *P. pulmonarius* tokom fermentacije odabranog poljoprivrednog otpada

*Pleurotus eryngii* HAI 1017 i *P. pulmonarius* HAI 509 su sintetisali sve testirane celulolitičke enzime tokom 21 dana fermentacije piljevine vinove loze, šljive i maline (Grafik 12). Međutim, *P. pulmonarius* se pokazao kao apsolutno dominantan u produkciji ovih enzima. Piljevina maline je u najvećoj meri indukovala sintezu endo- i egzocelulaza kao i ksilanaza, dok se piljevina vinove loze pokazala kao najpovoljniji supstrat za sintezu  $\beta$ -glukozidaza. Ksilanaze su bile najaktivnije sa vrednostima od čak  $15746,35 \pm 266,44$  U/L kod *P. pulmonarius* i  $9771,53 \pm 449,82$  U/L kod *P. eryngii* nakon fermentacije piljevine maline. Nasuprot tome, aktivnost ovog enzima je u značajnoj meri bila niža nakon kultivacije ovih vrsta na druga dva otpada, sa minimumom od svega  $1371,65 \pm 50,21$  U/L nakon fermentacije vinove loze sa *P. eryngii* (Grafik 12).



**Grafik 12.** Uticaj vrste poljoprivrednog otpada na aktivnost celulolitičkih enzima *Pleurotus pulmonarius* HAI 509 i *P. eryngii* HAI 1017

Piljevina maline indukovala je sintezu visoko aktivnih formi endocelulaza, naročito kod *P. pulmonarius* sa izmerenom vrednošću od  $9741,56 \pm 535,25$  U/L koja je skoro dvostuko viša u odnosu na izmerenu aktivnost kod *P. eryngii*. Takođe, značajno niže aktivnosti ovog enzima detektovane su nakon kultivacije obe vrste na piljevini vinove loze i šljive, koje su se kretale u rasponu od  $1447,16 \pm 35,68$  U/L do  $2216,33 \pm 7,93$  U/L. Obe vrste roda *Pleurotus* na sva tri supstrata su pokazale višestuko niže nivoe aktivnosti egzocelulaza u poređenju sa endocelulazama i ksilanazama, ali je vrsta supstrata različito uticala na aktivnost ovog enzima. Tako su pikovi

aktivnosti egzocelulaza kod *P. pulmonarius* ( $836,62 \pm 49,95$  U/L) i *P. eryngii* ( $597,17 \pm 52,18$  U/L) izmereni nakon fermentacije piljevine maline, dok je piljevina šljive najslabije stimulisala sintezu ovog enzima ( $165,37 \pm 0,23$  U/L odnosno  $202,29 \pm 9,42$  U/L). Svi testirani lignocelulozni otpadi nisu bili povoljni za sintezu  $\beta$ -glukozidaza čije su se aktivnosti na piljevini vinove loze nalazile u opsegu od svega  $44,47 \pm 1,82$  U/L kod *P. eryngii* do  $166,11 \pm 11,18$  U/L kod *P. pulmonarius* na istom supstratu (Grafik 12).

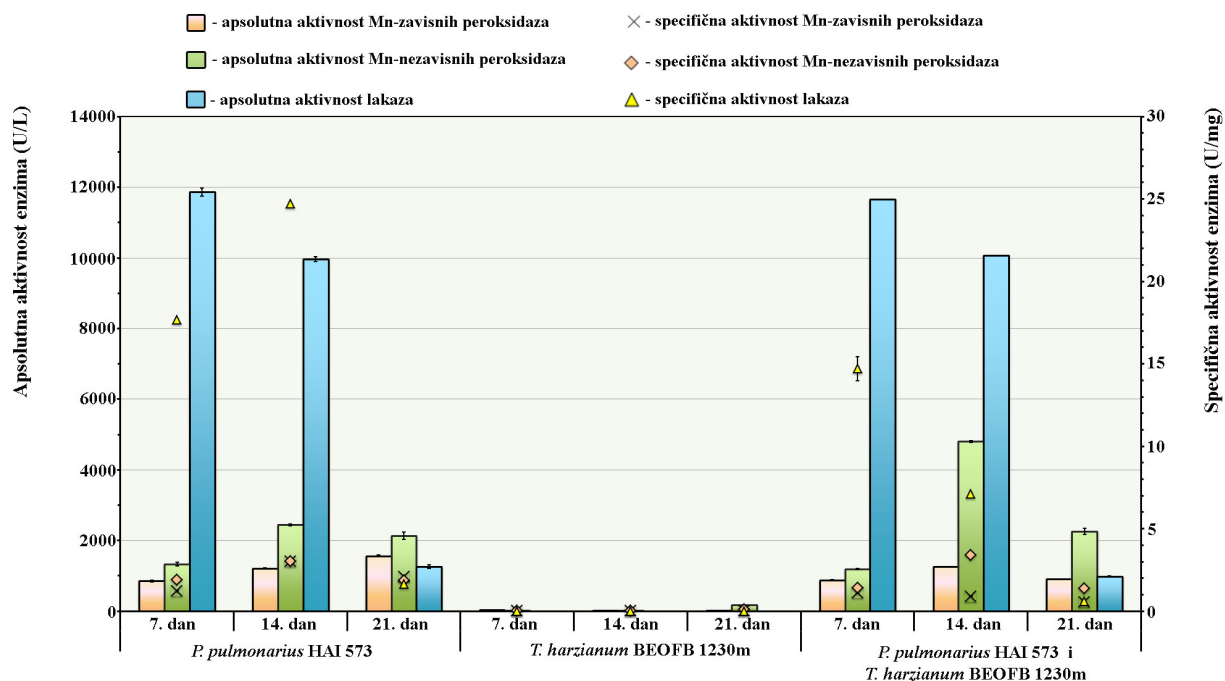
Ranije studije su već pokazale da vrste roda *Pleurotus* poseduju potencijal za hidrolizu različitog lignoceluloznog otpada (Zhang i dr., 2002; Salmones i dr., 2005; Alborés i dr., 2006; Goyal i Sony, 2011). Tako su Goyal i Sony (2011) zabeležili sposobnost sinteze endo- i egzocelulaza kao i  $\beta$ -glukozidaza kod *P. florida*, *P. ostreatus* i *P. sajor-caju* tokom tečne kultivacije u sintetičkom medijumu sa karboksimetil celulozom ili pšeničnom slamom kao izvorima ugljenika. Međutim, *P. florida* se pokazala najboljim producentom pre svega visoko aktivnih  $\beta$ -glukozidaza čija je aktivnost 5. dana kultivacije dostizala vrednost od čak 1066 U/L. Sa druge strane, Ekundayo i dr. (2017) su pokazali visoki potencijal *P. pulmonarius* DBUI002 i *P. ostreatus* DBUI14 da nakon 9 dana fermentacije klipova kukuruza i pirinčanih mekinja sintetišu visoko aktivne endocelulaze ( $\sim 9000$  U/L odnosno  $15000$  U/L), egzocelulaze ( $\sim 9000$  U/L odnosno  $13000$  U/L) i posebno  $\beta$ -glukozidaze ( $\sim 32000$  U/L). Međutim, soj *P. pulmonarius* koji su koristili Inácio i dr. (2015) je produkovao višestruko manje aktivne endocelulaze (600 U/L) kao i ksilanaze (700 U/L) nakon čak 45 dana kultivacije na kori pomorandže. Sherief i dr. (2010) su takođe detektovali niske aktivnosti  $\beta$ -glukozidaza kod *P. ostreatus* (90 U/L) i *P. sajor-caju* (87 U/L) nakon čvrste fermentacije kora banana.

Uočene razlike u aktivnosti celulolitičkih enzima vrsta roda *Pleurotus* mogu se objasniti genetičkom osnovom vrste/soja, tipom i sastavom supstrata kao i dužinom njegove fermentacije. Tako su Jørgensen i dr. (2007) i Goyal i Sony (2011) pad ili čak gubitak aktivnosti ovih enzima u određenom periodu kultivacije objasnili njihovom inaktivacijom, denaturacijom ili degradacijom.

#### **4.3. Dinamika aktivnosti lignocelulolitičkih enzima tokom ko-kultivacije *Trichoderma harzianum* i *Pleurotus pulmonarius* na pšeničnoj slami**

Dobijeni rezultati su pokazali različit uticaj mono- i ko-kultivacije *T. harzianum* BEOFB 1230m (kao najefikasnijeg producenta celulaza) i *P. pulmonarius* HAI 573 (kao najefikasnijeg delignifikatora) kao i dužine kultivacije na sintezu lignocelulolitičkih enzima (Grafici 13-17). Aktivnosti Mn-oksidujućih peroksidaza zabeležene su kako u mono- tako i u ko-kulturi ovih vrsta na sve tri tačke merenja. Maksimalna aktivnost MnP od  $1559,34 \pm 26,36$  U/L zabeležen je u mono-kulturi *P. pulmonarius* nakon 21 dana fermentacije pšenične slame, što je neznatno viša vrednost od zabeležene 14. dana mono-kulture ali i ko-kulture sa *T. harzianum* ( $1213,10 \pm 11,50$  U/L odnosno  $1256,34 \pm 12,20$  U/L). U poređenju sa mono-kulturom, nešto viša aktivnost izmerena je i 7. dana ko-kultivacije. Izuzetno niske aktivnosti MnP dobijene su u mono-kulturi *T. harzianum* i kretale su se u opsegu od  $20,83$  U/L 14. dana do  $30,30$  U/L 7. dana kultivacije (Grafik 13). U poređenju sa MnP, aktivnosti VP/MnIP, kako u mono- tako i u ko-kulturama, su bile značajno više (Grafik 13). Pik aktivnosti od čak  $4801,00 \pm 27,15$  U/L izmeren je 14. dana ko-kultivacije ove dve vrste što je više od duplo iznad maksimalne vrednosti dobijene u mono-kulturi *P. pulmonarius* i višestruko iznad dobijene u mono-kulturi *T. harzianum* ( $2443,58 \pm 27,53$  U/L odnosno  $178,03 \pm 3,09$  U/L). Kada su u pitanju sinteza i aktivnost lakaza, u mono-kulturi *P. pulmonarius* i pri njenoj ko-kultivaciji sa *T. harzianum* sintetisale su se izoforme slične aktivnosti, za razliku od mono-kulture *T. harzianum* gde aktivnost nije zabeležena (Grafik 13).

Maksimalna lakazna aktivnost od  $11868,13 \pm 113,12$  U/L zabeležena je 7. dana fermentacije pšenične slame sa *P. pulmonarius*, dok je ko-kultivacija ove vrste sa *T. harzianum* indukovala sintezu lakaza slične aktivnosti 7. dana a nešto niže 14. dana ( $11658,13 \pm 1,13$  U/L odnosno  $10065 \pm 0,68$  U/L). Očekivano, uočen je pad lakazne aktivnosti do kraja kultivacionog perioda pa je minimum izmeren 21. dana ko-kultivacije ( $983,17 \pm 12,18$  U/L).

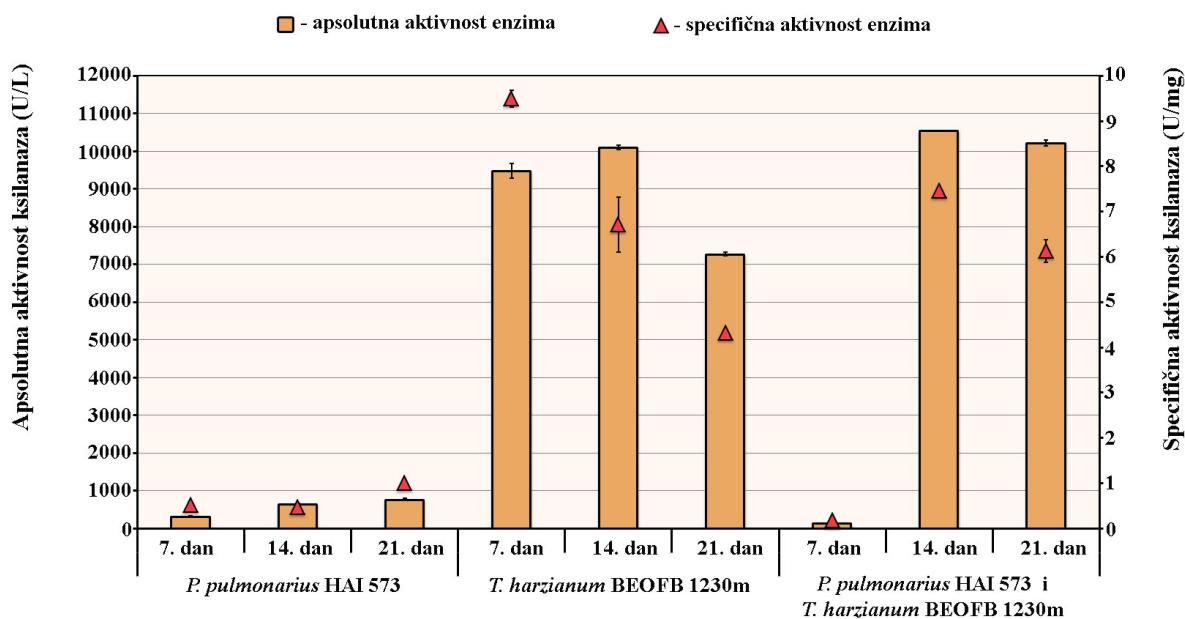


Proučavane vrste u mono- i ko-kulturi

**Grafik 13.** Dinamika aktivnosti ligninolitičkih enzima tokom mono- i ko-kultivacije *Trichoderma harzianum* BEOFB 1230m i *Pleurotus pulmonarius* HAI 573 na pšeničnoj slami

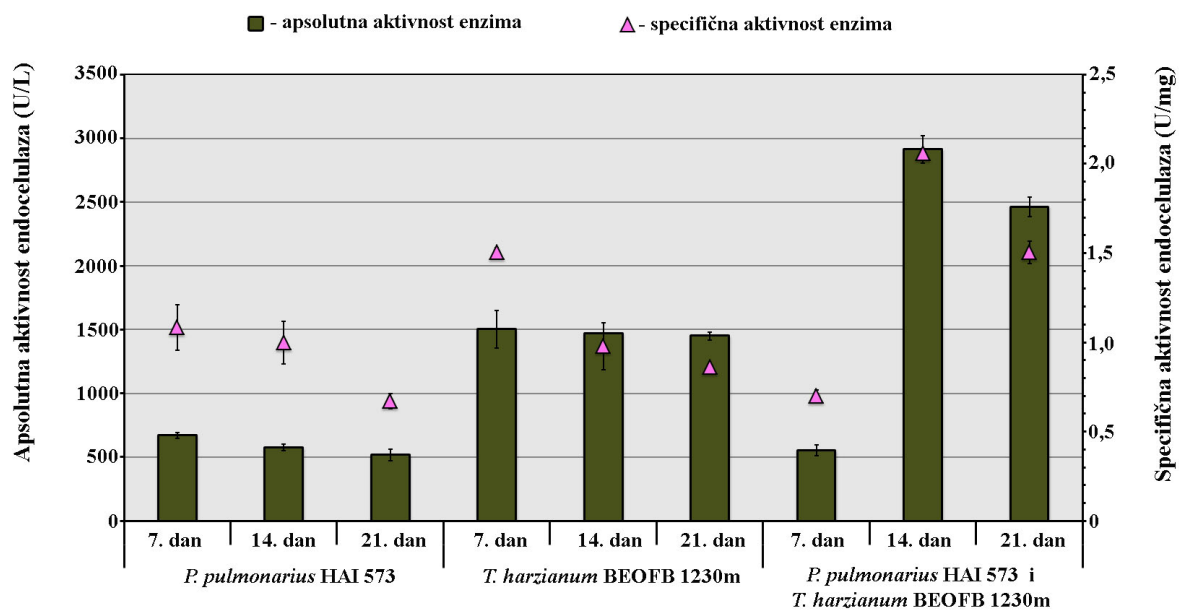
Ko-kultivacija *P. pulmonarius* i *T. harzianum* na pšeničnoj slami je imala još izraženiji efekat na aktivnost testiranih celulolitičkih enzima (Grafici 14-17). Najaktivniji enzimi u ko-kulturi bile su ksilanaze, sa vrednošću od  $10553,35$  U/L izmerenom 14. dana i tek nešto nižom na kraju kultivacionog perioda ( $10028,13 \pm 77,45$  U/L). Visoko aktivne ksilanaze sintetisala je i *T. harzianum* u mono-kulturi, i njihove aktivnosti su bile u opsegu od  $7270,83$  U/L do  $10102,36$  U/L, dok su u mono-kulturi *P. pulmonarius* zabeležene višestruko niže vrednosti sa minimumom od samo  $319,72 \pm 19,98$  U/L na početku kultivacije (Grafik 14).

Kada su u pitanju endocelulaze, ko-kultivacija studiranih vrsta je u još većoj meri pospešila njihovu sintezu i aktivnost, s obzirom da je maksimum od  $2911,83 \pm 108,70$  U/L bio duplo veći od vrednosti zabeležene u mono-kulturi *T. harzianum* i čak 6 puta veći od minimalne vrednosti zabeležene u mono-kulturi *P. pulmonarius* ( $516,28 \pm 46,40$  U/L) (Grafik 15).



Proučavane vrste u mono- i ko-kulturi

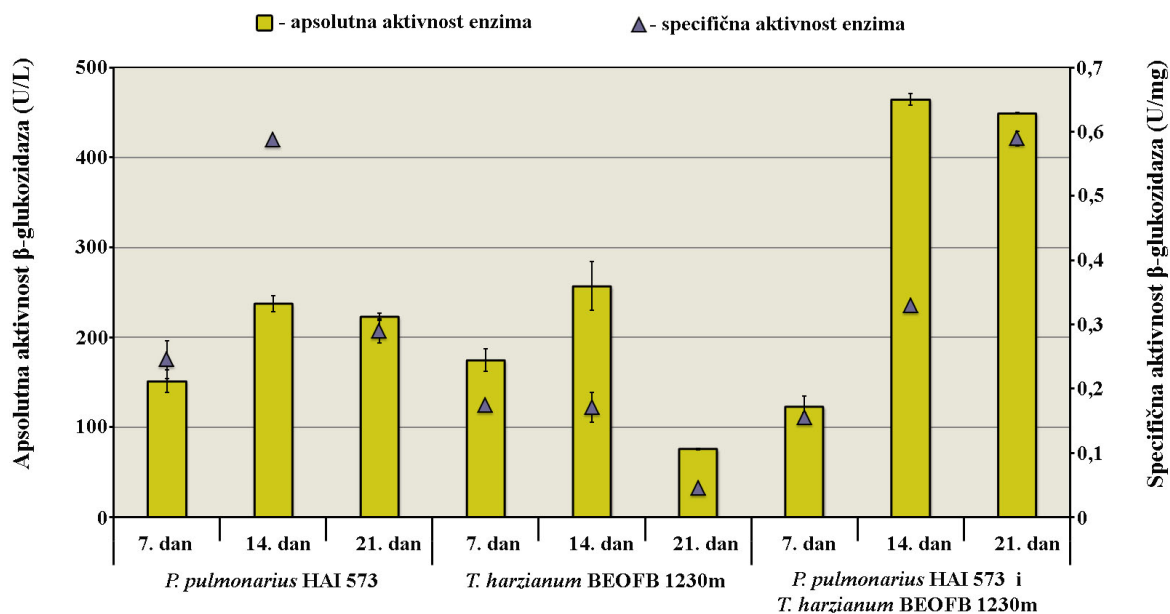
**Grafik 14.** Dinamika aktivnosti ksilanaza tokom mono- i ko-kultivacije *Trichoderma harzianum* BEOFB 1230m i *Pleurotus pulmonarius* HAI 573 na pšeničnoj slami



Proučavane vrste u mono- i ko-kulturi

**Grafik 15.** Dinamika aktivnosti endocelulaza tokom mono- i ko-kultivacije *Trichoderma harzianum* BEOFB 1230m i *Pleurotus pulmonarius* HAI 573 na pšeničnoj slami

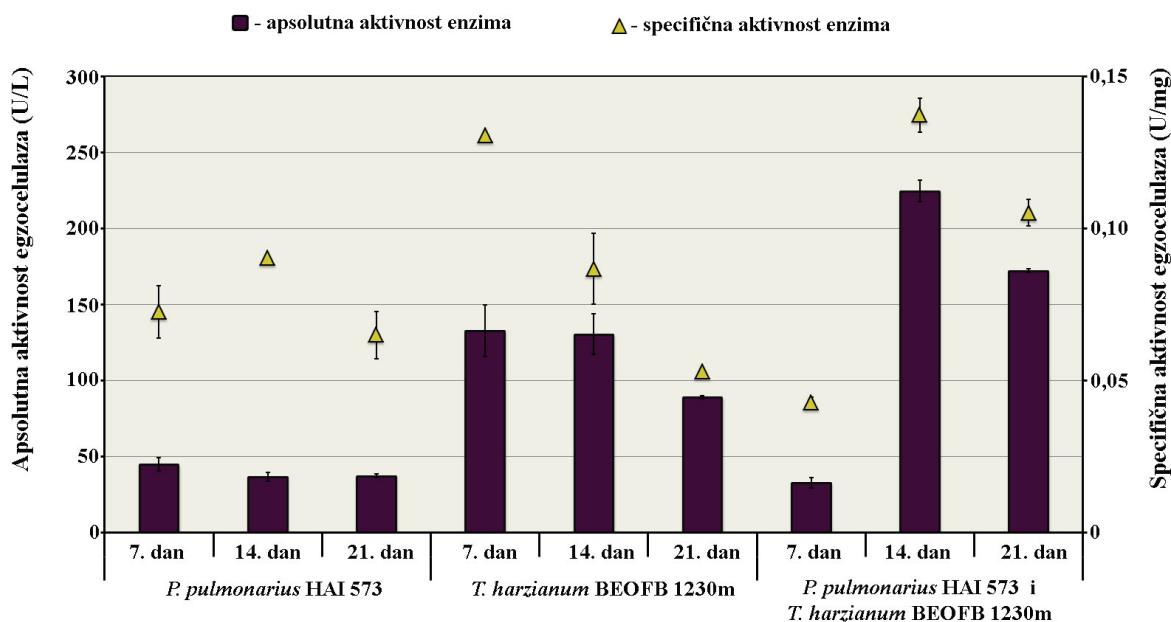
Slična slika dobijena je i za  $\beta$ -glukozidaze, s obzirom da je njihova maksimalna aktivnost od  $464,59 \pm 6,66$  U/L detektovana 14. dana ko-kultivacije ovih vrsta što je dvostruko više od maksimalnih vrednosti zabeleženih u njihovim mono-kulturama (Grafik 16). Za razliku od ostalih celulaza, *T. harzianum* je u mono-kulturi produkovala najneaktivniju formu ovog enzima ( $75,69 \pm 1,14$  U/L).



Proučavane vrste u mono- i ko-kulturi

**Grafik 16.** Dinamika aktivnosti  $\beta$ -glukozidaza tokom mono- i ko-kultivacije *Trichoderma harzianum* BEOFB 1230m i *Pleurotus pulmonarius* HAI 573 na pšeničnoj slami

Pšenična slama je bila najslabiji inducer sinteze egzocelulaza kako u mono-kulturama studiranih vrsta tako i u njihovoj ko-kulturi (Grafik 17).



Proučavane vrste u mono- i ko-kulturi

**Grafik 17.** Dinamika aktivnosti egzocelulaza tokom mono- i ko-kultivacije *Trichoderma harzianum* BEOFB 1230m i *Pleurotus pulmonarius* HAI 573 na pšeničnoj slami



Pik aktivnosti ovog enzima ( $224,54 \pm 7,13$  U/L) je zabeležen, kao i za ostale celulaze, 14. dana ko-kultivacije studiranih vrsta što je bila skoro duplo veća vrednost od zabeležene u mono-kulturi *T. harzianum* ( $130,42 \pm 13,52$  U/L) i višestruko iznad one u mono-kulturi *P. pulmonarius* gde je detektovan minimum od svega  $36,43 \pm 2,89$  U/L.

Kokultivacija ove dve vrste je pozitivno uticala i na efikasnost saharifikacije, tj. na koncentraciju redukujućih šećera. Naime, količina redukujućih šećera nakon fermentacije pšenične slame sa *P. pulmonarius* HAI 573 je iznosila 0,34 mg/mL, sa *T. harzianum* BEOFB 1230m 0,80 mg/mL dok je u ko-kulturi ove dve vrste ta vrednost bila skoro duplo veća i iznosila 1,51 mg/mL.

Rezultati ovog dela studije su jasno pokazali da je ko-kultura bila visoko efikasna u produkciji lignocelulolitičkih enzima i zbog sinergističkih interakcija njihova upotreba, kao i korišćenje lignoceluloznog otpada poput pšenične slame, imaju ogroman potencijal u procesu dobijanja bioetanol. Takođe, pokazano je postojanje kompatibilnosti testiranih vrsta što je jedan od odlučujućih faktora za uspešnost fermentacije u uslovima ko-kulture.

I prethodne proučavanja su demonstrirala potencijal ko-kultivacije vrsta za povećanje efikasnosti lignocelulolize u odnosu na mono-kulture i samim tim njen značaj u brojnim biotehnološkim procesima kao i uticaj na ekonomsku dobit na lokalnom i globalnom nivou. Adekvatan odabir vrsta gljiva za ko-kultivaciju može indukovati bolju iskoristivost lignoceluloznog supstrata, produkciju određenih metabolita, bolju prilagodljivost na promene uslova sredine kao i veću otpornost na moguće kontaminante (Wen i dr., 2005; Hu i dr., 2011; Mewada i dr., 2017; Sperandio i Ferreira Filho, 2019). Tako su Wen i dr. (2005), Hu i dr. (2011) i Sperandio i Ferreira Filho (2019) pokazali da je *Trichoderma reesei* odličan producent celulaza ali veoma slab producent  $\beta$ -glukozidaza kao i da bi njena ko-kultivacija sa nekom od vrsta roda *Aspergillus* kao odličnim producentima  $\beta$ -glukozidaza bila opravdana u cilju efikasnije degradacije celuloze. Slična istraživanja su radili Kshirsagar i dr. (2020) i pokazali su da su različite kombinacije *T. reesei*, *T. viride*, *A. flavus* i *Phanerochate chrysosporium* produkovale visoko aktivne ksilanaze pri kultivaciji na pšeničnoj slami a da je najefikasnija bila ko-kultura *T. viride* i *Ph. chrysosporium* čije su ksilanaze imale aktivnost i do 11290,00 U/L. Dobijena vrednost je bila višestruko veća u poređenju sa maksimalnom koju je Khalil (2002) zabeležio u mono-kulturi *Ph. chrysosporium* BKM-f-1767 nakon trodnevne tečne fermentacije šećerne trske (515 U/L). Takođe, ko-kulture *A. niger* i *A. oryzae*, *A. niger* i *Ph. chrysosporium* kao i *A. niger* i *Magnaporthe grisea* su uspešno fermentisale pšenične mekinje pre svega zbog visokih aktivnosti  $\beta$ -glukozidaza i egzocelulaza (Hu i dr., 2011). Međutim, ovi autori su pokazali da se efikasnost ko-kulture *A. niger* i *Ph. chrysosporium* zasnivala i na produkciji visoko aktivnih lakaza. Još su Zhang i dr. (2006b) pokušali da razviju strategiju bio-kontrole produkcije lakaza zasnovanu na ko-kultivaciji različitih vrsta kombinujući vrste rodova *Trametes*, *Lentinus* i *Pleurotus* sa vrstama roda *Trichoderma* čime su uspeli da poboljšaju prinos visoko aktivnih lakaza. Produkciju visoko aktivnih lakaza zabeležio je i Baldrian (2004) u ko-kulturi *T. harzianum* i *Trametes versicolor* kao i Stoilova i dr. (2005) koji su dobili čak dvostruko aktivnije lakaze u ko-kulturi *Thermoascus aurantiacus* i *A. niger* od onih sintetisanih u mono-kulturama ovih vrsta. Pored lakaza, ko-kultivacija vrsta roda *Trichoderma* sa vrstama izazivačima belog truljenja stimulisala je i sintezu visoko aktivnih Mn-oksidujućih peroksidaza što su demonstrirali Velázquez-Cedeño i dr. (2004) tokom fermentacije pšenične slame ko-kulturom *P. ostreatus* i *T. longibrachatum*. Sa druge strane, Meehnian i dr. (2017) su pokazali i da ko-kultivacija dve vrste belog truljenja može poboljšati sintezu ligninolitičkih enzima. Naime ovi autori su ko-kultivacijom *Daedalea flavida* i *Phlebia radiata* na stabljikama pamuka zabeležili produkciju značajno aktivnijih formi Mn-oksidujućih peroksidaza i lakaza u poređenju sa mono-kulturama ovih vrsta.

## 5. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata istraživanja mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Svojstva testiranih ligninolitičkih enzima prvenstveno zavise od proučavanih vrsta gljiva, kao i vrste otpada iz poljoprivrede i šumarstva korišćenog kao supstrat;
  - vrste roda *Pleurotus* su najefikasniji producenti svih proučavanih enzima na većini testiranih lignoceluloznih ostataka;
  - pšenična slama i stabljike kukuruza su najbolji induceri aktivnosti Mn-oksidujućih peroksidaza, a piljevine jabuke, hrasta i vinove loze aktivnosti lakaza;
  - lakaze su ključni enzim u ligninolizi, i njihova maksimalna aktivnost je zabeležena nakon fermentacije piljevine jabuke sa *Pleurotus ostreatus* HAI 1105 (49601,00 U/L);
  - profil lakaznih izoformi zavisio je od vrste roda *Pleurotus* i tipa supstrata. Broj, intenzitet i pI zimogramski detektovanih izoformi razlikovao se od vrste do vrste na istom supstratu kao i od supstrata do supstrata kod iste vrste.
- Zabeležena je značajna interspecijska varijabilnost u depolimerizaciji testiranih lignoceluloznih ostataka;
  - najefikasniji delignifikator bio je *Hypsizygus marmoreus* HAI 605 koji je uklonio 57,15% lignina iz stabljika kukuruza;
  - *Ganoderma tsugae* HAI 1032 je bila najuspešniji mineralizator holoceluloze pošto je razložila 40,30% celuloze i 54,91% hemiceluloze iz stabljika kukuruza;
- Zabeležen je značajan inter- i intraspecijski diverzitet u aktivnosti ligninolitičkih enzima i degradaciji pšenične slame kao najoptimalnijeg supstrata;
  - lakaze su dominantni enzim kod proučavanih vrsta sa maksimalnom aktivnošću zabeleženom kod *Pleurotus eryngii* HAI 711;
  - *Lentinus edodes* HAI 858 je sintetisao najaktivnije izoforme Mn-oksidujućih peroksidaza;
  - uočen je inter- i intraspecijski diverzitet u profilima izoformi Mn-oksidujućih peroksidaza i lakaza;
  - *Pleurotus pulmonarius* HAI 573 se izdvojio kao najefikasniji i najselektivniji delignifikator pšenične slame;
- Proučavane vrste mikromiceta nisu pokazale značajan ligninolitički potencijal tokom fermentacije intaktne pšenične slame;
- Zabeležene su značajne razlike u dinamici sinteze i aktivnosti proučavanih celulolitičkih enzima kod *Trichoderma viride* BEOFB 1210m tokom čvrste fermentacije pšenične slame pretretirane sa *Pleurotus pulmonarius* HAI 573;
  - celulolitički enzimi su najaktivniji na početku fermentacionog procesa;
  - ksilanaze su dominantni enzimi (3730,10 U/L 7. dana fermentacije pretretirane slame);
  - maksimalan stepen mineralizacije celuloze (33,74%) i hemiceluloze (49,87%) zabeležen je na kraju fermentacionog perioda (21. dana);
- U poređenju sa piljevinom hrasta, pšenična slama je bila optimalan supstrat za sintezu visoko aktivnih formi celulaza i kod drugih proučavanih vrsta mikromiceta;
  - *Penicillium solitum* BEOFB 1190m se pokazao kao najbolji producent ksilanaza a *Trichoderma harzianum* BEOFB 1230m endocelulaza;
  - *Trichoderma harzianum* BEOFB 1230m je bila i visoko efikasan mineralizator celuloze (23,9%) i hemiceluloze (33,0%) pšenične slame;
- Vrste roda *Pleurotus* kao najefikasnije gljive belog truljenja su pokazale i izuzetan celulolitički potencijal tokom fermentacije odabranog poljoprivrednog otpada;
  - *Pleurotus pulmonarius* HAI 509 je proizvodio visoko aktivne pre svega ksilanaze i endocelulaze pri fermentaciji piljevine maline;

- U poređenju sa mono-kulturama *Pleurotus pulmonarius* HAI 573 i *Trichoderma harzianum* BEOFB 1230m, njihova ko-kultivacija na pšeničnoj slami je stimulisala sintezu lignocelulolitičkih enzima i efikasnost saharifikacije supstrata;
  - maksimalne aktivnosti celulaza zabeležene su 14. dana ko-kultivacije ovih vrsta;
  - rezultati pokazuju postojanje kompatibilnosti testiranih vrsta što je odlučujući faktor za uspešnost fermentacije u uslovima ko-kultivacije i dalje za isplativost procesa dobijanja bioetanola.
  - količina redukujućih šećera kao prekursora bioetanola produkovanih u ko-kulturi je značajno veća od onih u njihovim mono-kulturama što je još jedan pokazatelj opravdanosti kreiranja sistema za dobijanje bioetanola na bazi ko-kulture gljive izazivača bele truleži i celulolitičke vrste.
- Biomasa na bazi lignoceluloze je odličan resurs za produkciju bioetanola. Rezultati ove studije su pokazali visoku efikasnost i selektivnost različitih vrsta gljiva u razgradnji ove biomase što je od vitalnog značaja u procesu konverzije u bioetanol. Iako je u dosta slučajeva zabeležena visoka aktivnost lignocelulolitičkih enzima različitih makro- i mikromiceta kako u mono- tako i ko-kulturi, dobijanje enzima kao komercijalnih proizvoda po niskoj ceni i dalje ostaje izazov budućim istraživanjima.

## 6. LITERATURA

- Aarti, C., Arasu, M.V., Agastian, P. (2015):** Lignin degradation: A microbial approach. *Indian Journal of Biological Sciences*, 1: 119–27.
- Abdolali, A., Guo, W.S., Ngo, H.H., Chen, S.S., Nguyen, N.C., Tung, K.L. (2014):** Typical lignocellulosic wastes and by-products for biosorption process in water and wastewater treatment: a critical review. *Bioresource Technology*, 160: 57–66.
- Adebayo, E.A. i Martínez-Carrera, D. (2015):** Oyster mushrooms (*Pleurotus*) are useful for utilizing lignocellulosic biomass. *African Journal of Biotechnology*, 14(1): 52–67.
- Aditiya, H.B., Mahlia, T.M.I., Chong, W.T., Nur, H., Sebayang, A.H. (2016):** Second generation bioethanol production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 66: 631–653.
- Adsul, M.G., Ghule, J.E., Singh, R., Shaikh, H., Bastawde, K.B., Gokhale, D.V., Varma, A.J. (2004):** Polysaccharides from bagasse: applications in cellulase and xylanase production. *Carbohydrate Polymers*, 57(1): 67–72.
- Akpinar, M. i Urek, R.O. (2014):** Extracellular ligninolytic enzymes production by *Pleurotus eryngii* on agroindustrial wastes. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 44(8): 772–81.
- Alborés, S., Pianzola, M.J., Soubes, M., Cerdeiras, M.P. (2006):** Biodegradation of agroindustrial wastes by *Pleurotus* spp. for its use as ruminal feed. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9: 215–20.
- Alcalde, M. (2007):** Laccases: Biological Functions, Molecular Structure and Industrial Applications, In: Polaina, J., MacCabe, A.P. (Eds.), *Industrial Enzymes*. Springer, Dordrecht, pp. 461–76.
- Alizadeh, H., Teymouri, F., Gilbert, T.I., Dale, B.E. (2005):** Pretreatment of switch grass by ammonia fiber explosion (AFEX). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 124: 1133–41.
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Negro, M.J. (2010):** Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, 101: 4851–61.
- Arenas-Cárdenas, P., López-López, A., Moeller-Chávez, G.E., León-Becerril, E. (2017):** Current pretreatments of lignocellulosic residues in the production of bioethanol. *Waste and Biomass Valorization*, 8(1): 161–81.
- Arora, D.S., i Gill, P.K. (2000):** Laccase production by some white rot fungi under different nutritional conditions. *Bioresource Technology*, 73: 283–85.
- Asgher, M., Bashir, F., Iqbal, H.M.N. (2014):** A comprehensive ligninolytic pre-treatment approach from lignocellulose green biotechnology to produce bioethanol. *Chemical Engineering Research and Design*, 92(8): 1571–8.
- Asgher, M., Khan, S.W., Bilal, M. (2016):** Optimization of Lignocellulolytic Enzyme Production by *Pleurotus eryngii* WC 888 Utilizing Agro-industrial Residues and Bio-ethanol Production. *Romanian Biotechnological Letters*, 21(1): 11133.
- Asim, N., Emdadi, Z., Mohammad, M., Yarmo, M.A., Sopian, K. (2015):** Agricultural solid wastes for green desiccant applications: an overview of research achievements, opportunities and perspectives. *Journal of Cleaner Production*, 91: 26–35.
- Autore, F., Del Vecchio, C., Fraternali, F., Giardina, P., Sannia, G., Faraco, V. (2009):** Molecular determinants of peculiar properties of a *Pleurotus ostreatus* laccase: analysis by site-directed mutagenesis. *Enzyme and Microbial Technology*, 45(6–7): 507–13.
- Balat, M. i Ayar, G. (2005):** Biomass energy in the world, use of biomass and potential trends. *Energy sources*, 27(10): 931–40.
- Baldrian, P. i Gabriel, J. (2002):** Variability of laccase activity in the white-rot basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Folia Microbiologica*, 47(4): 385–90.
- Baldrian, P. (2004):** Increase of laccase activities during interspecific interactions of white-rot fungi. *FEMS microbiology ecology*, 50: 245–53.

- Baldrian, P. (2006):** Fungal laccase-occurrence and properties. *FEMS microbiology reviews*, 30(2): 215–42.
- Baltierra-Trejo, E., Sánchez-Yáñez, J.M., Buenrostro-Delgado, O., Márquez-Benavides, L. (2015):** Production of short-chain fatty acids from the biodegradation of wheat straw lignin by *Aspergillus fumigatus*. *Bioresource Technology*, 196: 418–25.
- Banković, S., Medarević, M., Pantić, D., Petrović, N., Šljukić, B., Obradović, S. (2009):** The growing stock of the Republic of Serbia: State and problems. *Glasnik Šumarskog fakulteta*, (100): 7–29.
- Bansal, P., Hall, M., Realff, M.J., Lee, J.H., Bommarius, A.S. (2009):** Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates. *Biotechnology Advances*, 27: 833–48.
- Barakat, A., de Vries, H., Rouau, X. (2013):** Dry fractionation process as an important step in current and future lignocellulose biorefineries: a review. *Bioresource Technology*, 134: 362–73.
- Bastawde, K.B. (1992):** Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 8(4): 353–68.
- Bayer, E.A., Chanzy, H., Lamed, R., Shoham, Y. (1998):** Cellulose, cellulases and cellulosomes. *Current Opinion in Structural Biology*, 8:548–57.
- Bernfeld, P. (1955):** Amylases,  $\alpha$  and  $\beta$ . *Methods in Enzymology*, 1:149-158.
- Bettin, F., Montanari, Q., Calloni, R., Gaio, T.A., Silveira, M.M., Dillon, A.J. (2009):** Production of laccases in submerged process by *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 in relation to carbon and organic nitrogen sources, antifoams and Tween 80. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(1): 1–9.
- Boerjan, W., Ralph, J., Baucher, M. (2003):** Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 54: 519–546.
- Bonnarme, P. i Jeffries, T.W. (1990):** Mn(II) regulation of lignin peroxidases and manganese-dependent peroxidases from lignin-degrading white rot fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(1): 210–17.
- Bowen, R.M. i Harper, S.H.T. (1990):** Decomposition of wheat straw and related compounds by fungi isolated from straw in arable soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 22(3): 393-99.
- Buaban, B., Inoue, H., Yano, S., Tanapongpipat, S., Ruanglek, V., Champreda, V., Pichyangkura, R., Rengpipat, S., Eurwilaichitr, L. (2010):** Bioethanol production from ball milled bagasse using an on-site produced fungal enzyme cocktail and xylose-fermenting *Pichia stipitis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110: 18–25.
- Buckeridge, M.S., i Goldman, G.H. (Eds.) (2011):** *Routes to Cellulosic Ethanol*. Springer-Verlag, New York.
- Camarero, S., Bockle, B., Martinez, M.J., Martinez, A.T. (1996):** Manganese-mediated lignin degradation by *Pleurotus pulmonarius*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(3): 1070–2.
- Canas, A.I., i Camarero, S. (2010):** Laccases and their natural mediators: biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. *Biotechnology Advances*, 28: 694-705.
- Caramelo, L., Martínez, M.J., Martínez, Á.T. (1999):** A Search for Ligninolytic Peroxidases in the Fungus *Pleurotus eryngii* Involving  $\alpha$ -Keto- $\gamma$ -Thiomethylbutyric Acid and Lignin Model Dimers. *Applied and environmental microbiology*, 65(3): 916–22.
- Chaiprasert, P. (2011):** Biogas production from agricultural wastes in Thailand. *Journal of Sustainable Energy & Environment Special Issue*, 63–65.
- Chanakya, H.N., Malayil, S., Vijayalakshmi, C. (2015):** Cultivation of *Pleurotus* spp. on a combination of anaerobically digested plant material and various agro-residues. *Energy for Sustainable Development*, 27: 84–92.
- Chang, A.J., Fan, J., Wen, X. (2012):** Screening of fungi capable of highly selective degradation of lignin in rice straw. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 72: 26–30.
- Chen, H. (2014):** *Biotechnology of lignocellulose: theory and practice*. Springer, Netherlands.

- Claus, H. (2004):** Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron: The international research and review journal for microscopy*, 35: 93–96.
- Collins, P.J. i Dobson, A. (1997):** Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(9): 3444–50.
- Cuong, T.T., Le, H.A., Khai, N.M., Hung, P.A., Linh, L.T., Thanh, N.V., Tri, N.D., Huan, N.X. (2021):** Renewable energy from biomass surplus resource: potential of power generation from rice straw in Vietnam. *Scientific reports*, 11(1): 792.
- Ćilerdžić, J., Stajić, M., Vukojević, J., Duletić-Laušević, S., Knežević, A. (2011):** Potential of *Trametes hirsuta* to produce ligninolytic enzymes during degradation of agricultural residues *BioResources*, 6(3): 2885–95.
- Ćilerdžić, J., Stajić, M., Vukojević, J., Lončar, N. (2014):** Intraspecific diversity in the production and characterization of laccase within *Ganoderma lucidum*. *BioResources*, 9: 5577–87.
- Ćilerdžić, J., Stajić, M., Vukojević, J. (2016a):** Activity of Mn-oxidizing peroxidases of *Ganoderma lucidum* depending on cultivation conditions. *BioResources*, 11(1): 95–104.
- Ćilerdžić, J., Stajić, M., Vukojević, J. (2016b):** Degradation of wheat straw and oak sawdust by *Ganoderma applanatum*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 114: 39–44.
- Ćilerdžić, J., Galić, M., Vukojević, J., Brčeski, I., Stajić, M. (2017):** Potential of selected fungal species to degrade wheat straw, the most abundant plant raw material in Europe. *BMC plant biology*, 17(2): 75–81.
- Ćilerdžić, J., Galić, M., Ivanović, Ž., Brčeski, I., Vukojević, J., Stajić, M. (2019):** Stimulation of Wood Degradation by *Daedaleopsis confragosa* and *D. tricolor*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 187(4): 1371–83.
- Das, N., Chakraborty, T.K., Mukherjee, M. (2001):** Purification and characterization of a growth regulating laccase from *Pleurotus florida*. *Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms*, 41(5): 261–67.
- Dashtban, M., Schraft, H., Qin, W. (2009):** Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Opportunities & Perspectives. *International Journal of Biological Sciences*, 5(6): 578–95.
- Dashtban, M., Schraft, H., Syed, T.A., Qin, W. (2010):** Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 1(1): 36–50.
- Demirbas, A. (2005):** Bioethanol from Cellulosic Materials: A Renewable Motor Fuel from Biomass. *Energy Sources*, 27(4): 327–37.
- de Freitas, E.N., Bubna, G.A., Brugnari, T., Kato, C.G., Nolli, M., Rauen, T., Muniz Moreira, R.F.P., Peralta, P.A., Bracht, A., de Souza, C.G.M., Peralta, P.A. (2017):** Removal of bisphenol A by laccases from *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius* and evaluation of ecotoxicity of degradation products. *Chemical Engineering Journal*, 330: 1361–9.
- de Silva, C.M.M., De Melo, I.S., De Oliveira, P.R. (2005):** Ligninolytic enzyme production by *Ganoderma* spp. *Enzyme and Microbial Technology*, 37(3): 324–9.
- de Souza, T.M., Boominathan, K., Reddy, C.A. (1996):** Isolation of laccase gene – specific sequences from white rot and brown fungi by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 3739–44.
- de Souza, T.M., Merritt, C.S., Reddy, C. A. (1999):** Lignin-modifying enzymes of the white-rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 5307–13.
- de Souza, C.G., Tychanowicz, G.K., de Souza, D.F., Peralta, R.M. (2004):** Production of laccase isoforms by *Pleurotus pulmonarius* in response to presence of phenolic and aromatic compounds. *Journal of Basic Microbiology*, 44(2):129–36.
- de Vries, R.P., Kester, H.C., Poulsen, C.H., Benen, J.A., Visser, J. (2000):** Synergy between enzymes from *Aspergillus* involved in the degradation of plant cell wall polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 327: 401–10.

- Dong, X.Q., Yang, J.S., Zhu, N., Wang, E.T., Yuan, H.L. (2013):** Sugarcane bagasse degradation and characterization of three white-rot fungi. *Bioresource Technology*, 131: 443–51.
- Du, W., Yu, H., Song, L., Zhang, J., Weng, C., Ma, F., Zhang, X. (2011):** The promoting effect of byproducts from *Irpex lacteus* on subsequent enzymatic hydrolysis of bio-pretreated cornstalks. *Biotechnology for biofuels*, 4(1): 1–8.
- Ducros, V., Brzozowski, A.M., Wilson, K.S., Brown, S.H., Østergaard, P., Schneider, P., Yaver, D.S., Pedersen, A.H., Davies, G.J. (1998):** Crystal structure of the type-2 Cu depleted laccase from *Coprinus cinereus* at 2.2 Å resolution. *Nature Structural Biology*, 5(4):310–16.
- Dwivedi, P., Vivekanand, V., Pareek, N., Sharma, A., Singh, R.P. (2011):** Co-cultivation of mutant *Penicillium oxalicum* SAU(E)-3.510 and *Pleurotus ostreatus* for simultaneous biosynthesis of xylanase and laccase under solid-state fermentation. *New Biotechnology*, 28(6): 616–26.
- Edeh, I. (2020):** Bioethanol Production: An Overview. *Bioethanol*, <https://www.intechopen.com/online-first/bioethanol-production-an-overview>.
- Ekundayo, F.O., Ekundayo, E.A., Ayodele, B.B. (2017):** Comparative studies on glucanases and  $\beta$ -glucosidase activities of *Pleurotus ostreatus* and *P. pulmonarius* in solid state fermentation. *Mycosphere*, 8(8): 1051–9.
- Elisashvili, V., Penninckx, M., Kachlishvili, E., Tsiklauri, N., Metreveli, E., Kharziani, T., Kvesitadze, G. (2008):** *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and soil-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. *Bioresource Technology*, 99: 457–62.
- Enguádanos, M., Soria, A., Kavalov, B., Jensen, P. (2002):** *Techno-economic Analysis of Bioalcohol Production in the EU: A Short Summary for Decision Makers*. European Commission Joint Research Centre Report EUR 20280 EN.
- Ergun, S.O. i Urek, R.O. (2017):** Production of ligninolytic enzymes by solid state fermentation using *Pleurotus ostreatus*. *Annals of Agrarian Science*, 15: 273–7.
- Eriksson, K.E.L., Blanchette, R., Ander, P. (2012):** *Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Fenice, M., Giovannozzi Sermanni, G., Federici, F., D’Annibale A. (2003):** Submerged and solid-state production of laccase and Mn-peroxidase by *Panus tigrinus* on olive mill wastewater-based media. *Journal of Biotechnology*, 100: 77–85.
- Ferreira, V., de Oliveira Faber, M., da Silva Mesquita, S., Pereira Junior, N. (2010):** Simultaneous saccharification and fermentation process of different cellulosic substrates using a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* harbouring the  $\beta$ -glucosidase gene. *Electron Journal of Biotechnology*, 13(2): 5-6.
- Garcia-Kirchner, O., Segura-Granados, M., Rodriguez-Pascual, P. (2005):** Effect of media composition and growth conditions on production of  $\beta$ -glucosidase by *Aspergillus niger* C-6, In: Davison B.H., Evans B.R., Finkelstein M., McMillan J.D. (Eds.), *Twenty-Sixth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*, ABAB Symposium, Humana Press.
- Giardina, P., Palmieri, G., Fontanella, B., Riviaccio, V., Sannia, G. (2000):** Manganese peroxidase isoenzymes produced by *Pleurotus ostreatus* grown on wood sawdust. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 376: 171–9.
- Goyal, M., Kalra, K.L., Sareen, V.K., Soni, G. (2008):** Xylanase production with xylan rich lignocellulosic wastes by a local soil isolate of *Trichoderma viride*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(3): 535–41.
- Goyal, M. i Soni, G. (2011):** Production and characterization of cellulolytic enzymes by *Pleurotus florida*. *Mycosphere*, 2: 249–54.
- Grujić, M., Dojnov, B., Potočnik, I., Duduk, B., Vujčić, Z. (2015):** Spent mushroom compost as substrate for the production of industrially important hydrolytic enzymes by fungi *Trichoderma* spp. and *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 104: 290–8.

- Grujić, M.M. (2016):** Celulaze gljive *Trichoderma harzianum*: produkcija, kontrola produkcije i karakterizacija eksprimiranih enzima. Doktorska disertacija, Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Guardina, P., Aurilia, V., Cannio, R., Marzullo, L., Amoresano, A., Siciliano, R., Pucci, P., Sanna, G. (1996):** The gene, protein and glycin structures of laccase from *Pleurotus ostreatus*. *European Journal of Biochemistry*, 235: 508–15.
- Gupta, A. i Verma, J.P. (2015):** Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 41: 550–67.
- Gusakov, A.V., Salanovich, T.N., Antonov, A.I., Ustinov, B.B., Okunev, O.N., Burlingame, R., Emalfarb, M., Baez, M., Sinitsyn, A.P. (2007):** Design of highly efficient cellulase mixtures for enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, 97(5): 1028–38.
- Hadar, Y. (2013):** Sources for Lignocellulosic Raw Materials for the Production of Ethanol, In: Faraco, V. (Ed.), *Lignocellulose conversion*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 21–38.
- Hahn-Hägerdal, B., Karhumaa, K., Fonseca, C., Spencer-Martins, I., Gorwa-Grauslund, M.F. (2007):** Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Applied microbiology and biotechnology*, 74(5): 937-953.
- Hallac, B.B. i Ragauskas, A.J. (2011):** Analyzing cellulose degree of polymerization and its relevancy to cellulosic ethanol. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 5(2): 215–25.
- Hammel, K.E. (1997):** Fungal degradation of lignin. In: Gadisch, G., Giller, G. (Eds.), *Driven by nature: plant litter quality and decomposition*. CAB International, Wallingford, pp. 33–45.
- Harmsen, P.F.H., Huijgen, W., Bermudez, L., Bakker, R. (2010):** *Literature Review of Physical and Chemical Pretreatment Processes for Lignocellulosic Biomass*. Wageningen University and Research Centre—Food and Biobased Research: Wageningen, The Netherlands, pp. 1–49.
- Hasunuma, T., i Kondo, A. (2012):** Consolidated bioprocessing and simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose to ethanol with thermotolerant yeast strains. *Process Biochemistry*, 47(9): 1287–94.
- Hatakka, A. (2005):** In: Steinbüchel, A. (Ed.), *Biopolymers Online*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, pp. 129–145.
- Heinzelman, P., Snow, C.D., Wu, I., Nguyen, C., Villalobos, A., Govindarajan, S., Minshull, J., Arnold, F.A. (2009):** A family of thermostable fungal cellulases created by structure-guided recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(14): 5610–5.
- Hendriks, A.T.W.M. i Zeeman, G. (2009):** Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 100(1): 10–18.
- Hofrichter, M. (2002):** Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology*, 30: 454–66.
- Hölker, U. i Lenz, J. (2005):** Solid-state fermentation — Are there any biotechnological advantages?. *Current Opinion in Microbiology*, 8: 301–6.
- Hoshida, H., Nakao, M., Kanazawa, H., Kubo, K., Hakukawa, T., Morimasa, K., Akada, R., Nishizawa, Y. (2001):** Isolation of five laccase gene sequences from the white-rot fungus *Trametes sanguinea* by PCR, and cloning, characterization and expression of the laccase cDNA in yeasts. *Journal of bioscience and bioengineering*, 92(4): 372–80.
- Hsieh, C.W.C., Cannella, D., Jørgensen, H., Felby, C. and Thygesen, L.G. (2014):** Cellulase inhibition by high concentrations of monosaccharides. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(17): 3800–5.
- Hu, G., Heitmann, J.A., Rojas, O.J. (2008):** Feedstock pretreatment strategies for producing ethanol from wood, bark, and forest residues. *BioResources*, 3(1): 270–94.
- Hu, H.L., van den Brink, J., Gruben, B.S., Wösten, H.A.B., Gu, J.D., de Vries, R.P. (2011):** Improved enzyme production by co-cultivation of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* and with other fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(1): 248–52.
- Ilić-Đurđić, K.Ž. (2020):** Proteinski inženjering ligninolitičkih peroksidaza u cilju unapređenja degradacije tekstilnih boja. Doktorska disertacija, Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu.



- Inácio, F.D., Ferreira, R.O., De Araujo, C.A.V., Peralta, R.M., De Souza, C.G.M. (2015):** Production of Enzymes and Biotransformation of Orange Waste by Oyster Mushroom, *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quél. *Advances in Microbiology*, 5(01): 1–8.
- Iqbal, H.M., Asgher, M., Ahmed, I., Hussain, S. (2010):** Media optimization for Hyper-production of Carboxymethyl Cellulase using proximally analyzed agroindustrial-residue with *Trichoderma harzianum* under SSF. *IJAVMS*, 4(2): 47–55.
- Janusz, G., Kucharzyk, K.H., Pawlik, A., Staszczak, M., Paszczynski, A.J. (2013):** Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: gene expression and regulation. *Enzyme and Microbial technology*, 52(1): 1–12.
- Janusz, G., Pawlik, A., Sulej, J., Świdorska-Burek, U., Jarosz-Wilkołazka, A., Paszczyński, A. (2017):** Lignin degradation: microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution. *FEMS microbiology reviews*, 41(6): 941–62.
- Jambo, S.A., Abdulla, R., Azhar, S.H.M., Marbawi, H., Gansau, J.A., Ravindra, P. (2016):** A review on third generation bioethanol feedstock. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 65: 756–69.
- Jiang, M., Ten, Z., Ding, S. (2013):** Decolorization of synthetic dyes by crude and purified laccases from *Coprinus comatus* grown under different cultures: the role of major isoenzyme in dyes decolorization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 169: 660–672.
- Johansson, T. i Nyman, P.O. (1993):** Isozymes of lignin peroxidase and manganese (II) peroxidase from the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*: I. Isolation of enzyme forms and characterization of physical and catalytic properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 300(1): 49–56.
- Jørgensen, H., Kristensen, J.B., Felby, C. (2007):** Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 1(2): 119–34.
- Jović, J.M., Mojović, L.V., Pejin, J.D. and Kocić-Tanackov, S.D. (2015):** Primena gljiva koje razgrađuju lignocelulozu za proizvodnju bioetanol iz obnovljive biomase. *Hemijska Industrija*, 69(6): 627–40.
- Juturu, V. i Wu, J.C. (2014):** Microbial cellulases: engineering, production and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 33: 188–203.
- Kadarmoidheen, M., Saranraj, P., Stella, D. (2012):** Effect of cellulolytic fungi on the degradation of cellulosic agricultural wastes. *International Journal Applied Microbiology Science*, 1(2): 13–23.
- Kang, Q., Appels, L., Tan, T., Dewil, R. (2014):** Bioethanol from lignocellulosic biomass: current findings determine research priorities. *The Scientific World Journal*, 298153.
- Khalil, A.I. (2002):** Production and characterization of cellulolytic and xylanolytic enzymes from the ligninolytic white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* grown on sugarcane bagasse. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18: 753–59.
- Khelifi, E., Ayed, L., Bouallagui, H., Touhami, Y., Hamdi, M. (2009):** Effect of nitrogen and carbon sources on Indigo and Congo red decolourization by *Aspergillus alliaceus* strain 121C. *Journal of Hazardous Materials*, 163(2–3): 1056–62.
- Kirk, T.K. i Obst, J.R. (1988):** Lignin determination. *Methods in enzymology*, 161: 87-101.
- Kirk, T.K. i Cullen, D. (1998):** Enzymology and Molecular Genetics of Wood Degradation by White-Rot Fungi, In: Young, R. A. and Akhtar, M. (Eds.), *Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry*. Wiley, New York, pp. 273–307.
- Knežević, A.Z., Milovanović, I.N., Stajić, M.M., Vukojević, J.B. (2011):** Ligninolytic enzyme production by *Lenzites betulinus* on selected plant raw materials. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, 120: 333–38.
- Knežević, A., Milovanović, I., Stajić, M., Lončar, N., Brčeski, I., Vukojević, J., Čilerdžić, J. (2013):** Lignin degradation by selected fungal species. *Bioresource Technology*, 138: 117–23.

- Knežević, A., Stajić, M., Jovanović, V.M., Kovačević, V., Čilerdžić, J., Milovanović, I., Vukojević, J. (2016):** Induction of wheat straw delignification by *Trametes* species. *Scientific reports*, 6(1): 1–12.
- Ko, E.M., Leem, Y.E., Choi, H.T. (2001):** Purification and characterization of laccase isozymes from the white-rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. Berlin: Springer-Verlag.
- Kshirsagar, S., Waghmare, P., Saratale, G., Saratale, R., Kurade, M., Jeon, B.H., Govindwar, S. (2020):** Composition of Synthesized Cellulolytic Enzymes Varied with the Usage of Agricultural Substrates and Microorganisms. *Applied biochemistry and biotechnology*, 191(4): 1695–710.
- Kumar, A.K. i Sharma, S. (2017):** Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. *Bioresources and Bioprocessing*, 4(1): 1-19.
- Kumari, D. i Singh, R. (2018):** Pretreatment of lignocellulosic wastes for biofuel production: a critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 90: 877–91.
- Kurbanmuratovich, M.B. i Ismailovna, D.G. (2018):** Cellulose-destroying soil micromycetes of Uzbekistan and influence of some factors on cellulolytic activity and saccharifying ability of *Trichoderma harzianum*. *European science review*, 1–2.
- Langston, J., Sheehy, N., Xu, F. (2006):** Substrate specificity of *Aspergillus oryzae* family 3  $\beta$ -glucosidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1764(5): 972–78.
- Lee, J. (1997):** Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Journal of Biotechnology*, 56(1): 1–24.
- Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, D., Wojtás-Wasilewska, M., Cho, N., Hofrichter, M., Rogalski, J. (1999):** Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 27: 175–85.
- Levasseur, A., Piumi, F., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Asther, M., Delattre, M., Henrissat, B., Pontarotti, P., Asther, M., Recor., E. (2008):** FOLy: an integrated database for the classification and functional annotation of fungal oxidoreductases potentially involved in the degradation of lignin and related aromatic compounds. *Fungal genetics and biology*, 45(5): 638–45.
- Li, K. (1996):** Synthesis of lignin-carbohydrate model compounds and neolignans. Doctoral dissertation, Virginia Tech, Virginia.
- Li, M., Foster, C., Kelkar, S., Pu, Y., Holmes, D., Ragauskas, A., Saffron, C.M., Hodge, D.B. (2012):** Structural Characterization of Alkaline Hydrogen Peroxide Pretreated Grasses Exhibiting Diverse Lignin Phenotypes. *Biotechnology for Biofuels* 5(1): 1-15.
- Liers, C., Ullrich, R., Pecyna, M., Schlosser, D., Hofrichter, M. (2007):** Production, purification and partial enzymatic and molecular characterization of a laccase from the wood-rotting ascomycete *Xylaria polymorpha*. *Enzyme and Microbial Technology*, 41(6–7): 785–93.
- Liers, C., Arnstadt, T., Ullrich, R., Hofrichter, M. (2011):** 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(1): 91–102.
- Limayem, A. i Ricke, S.C. (2012):** Lignocellulosic biomass for bioethanol production: current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion Science*, 38: 449–67.
- Liu, C.-F., i Sun, R.-C. (2010):** Cellulose, In: Sun, R.-C. (Ed.), *Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels. Chemistry, Extractives, Lignins, Hemicellulose and Cellulose*, Elsevier, Amsterdam, pp. 131–167.
- Liu, Y.S., Baker, J.O., Zeng, Y., Himmel, M.E., Haas, T., Ding, S.Y. (2011):** Cellobiohydrolase hydrolyzes crystalline cellulose on hydrophobic faces. *Journal of Biological Chemistry*, 286(13): 11195–201.
- Ludwig, D., Amann, M., Hirth, T., Rupp, S., Zibek, S. (2013):** Development and optimization of single and combined detoxification processes to improve the fermentability of lignocellulose hydrolyzates. *Bioresource Technology*, 133: 455–61.

- Lundell, T.K., Makela, M.R., Hilden, K. (2010):** Lignin-modifying enzymes in filamentous basidiomycete—Ecological, functional and phylogenetic review. *Journal of Basic Microbiology*, 50: 5–20.
- Lynd, L.R., Weimer, P.J., Van Zyl, W.H., Pretorius, I.S. (2002):** Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and molecular biology reviews*, 66(3): 506–77.
- Ma, F., Wang, J., Zeng, Y., Yu, H., Yang, Y., Zhang, X. (2011):** Influence of the co-fungal treatment with two white rot fungi on the lignocellulosic degradation and thermogravimetry of corn stover. *Process Biochemistry*, 46(9): 1767–73.
- Manavalan, T., Manavalan, A., Thangavelu, K.P., Heese, K. (2012):** Secretome analysis of *Ganoderma lucidum* cultivated in sugarcane bagasse. *Journal of proteomics*, 77: 298–309.
- Marković, J.P., Radović, J.B., Štrbanović, R.T., Bajić, D.S. i Vrvić, M.M. (2009):** 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(8–9): 885–92.
- Marques de Souza, C.G., i Peralta, R.M. (2003):** Purification and characterization of the main laccase produced by the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state medium. *Journal of Basic Microbiology*, 43: 278–86.
- Martínez M.J., Ruiz-Dueñas F.J., Guillén F., Martínez, A.T. (1996):** Purification and catalytic properties of two manganese- peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. *European Journal of Biochemistry*, 237(2): 424–32.
- Martínez, A.T. (2002):** Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. *Enzyme and Microbial Technology*, 30: 425–44.
- Martínez, A.T., Speranza, M., Ruiz-Duenas, F.J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillen, F., Martínez, M.J., Guitierrez, A., Del Rio, J.C. (2005):** Biodegradation of lignocellulosic: microbial, chemical and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 8(3): 195–204.
- Maurya, D.P., Singla, A., Negi, S. (2015):** An overview of key pretreatment processes for biological conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol. *3 Biotech*, 5(5): 597–609.
- Meehnian, H., Jana, A.K., Jana, M.M. (2017):** Pretreatment of cotton stalks by synergistic interaction of *Daedalea flavida* and *Phlebia radiata* in co-culture for improvement in delignification and saccharification. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 117: 68–77.
- Méndez-Hernández, J.E., Loera, O., Méndez-Hernández, E.M., Herrera, E., Arce-Cervantes, O., Soto-Cruz, N.Ó. (2019):** Fungal Pretreatment of Corn Stover by *Fomes* sp. EUM1: Simultaneous Production of Readily Hydrolysable Biomass and Useful Biocatalysts. *Waste and Biomass Valorization*, 10(9): 2637-50.
- Merino, S.T., i Cherry, J. (2007):** Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. *Biofuels*, 95-120.
- Mester, T., i Field, J.A. (1998):** Characterization of a novel manganese peroxidase-lignin peroxidase hybrid isozyme produced by *Bjerkandera* species strain BOS55 in the absence of manganese. *Journal of Biological Chemistry*, 273(25): 15412–7.
- Mewada, M., Albert, S., Pandya, B. (2017):** Enhancement of Ligninolytic & Xylanolytic Enzyme Activities in *Trichoderma reesei* co-cultured with two White Rot Fungi. *International Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 13(4): 429–39.
- Mikiashvili, N., Elisashvili, V., Wasser, S.P., Nevo, E. (2005):** Carbon and nitrogen sources influence the ligninolytic enzyme activity of *Trametes versicolor*. *Biotechnology Letters*, 27: 955–9.
- Mikiashvili, N., Wasser, S. P., Nevo, E., Elisashvili, V. (2006):** Effects of carbon and nitrogen sources on *Pleurotus ostreatus* ligninolytic enzyme activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2: 999–1002.

- Mikiashvili, N.A., Isikhuemhen, O.S., Ohimain, E.I., (2011):** Lignin degradation, ligninolytic enzymes activities and exopolysaccharide production by *Grifola frondosa* strains cultivated on oak sawdust. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(3): 1101–08.
- Millati, I.R., Syamsiah, C., Niklasson, C., Cahyanto, M.N., Lundquist, K., Taherzadeh, M. (2011):** Biological pretreatment of lignocelluloses with white-rot fungi and its applications: A review. *BioResources*, 6: 5224–59.
- Min, K.L., Kim, Y.H., Kim, Y.W., Jung, H.S., Hah, Y.C. (2001):** Characterization of a Novel Laccase Produced by the Wood-Rotting Fungus *Phellinus ribis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 392: 279–86.
- Mitchell, D.A., Krieger, N., Berović, M. (Eds.) (2006):** *Solid-State Fermentation Bioreactors: Fundamentals of Design and Operation*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 447.
- Mojović, Lj., Pejin, D., Lazić, M. (2007):** *Bioetanol kao gorivo-stanje i perspektive, monografija*. Tehnološki fakultet, Leskovac.
- Montoya, S., Orrego, C.E., Levin, L. (2012):** Growth, fruiting and lignocellulolytic enzyme production by the edible mushroom *Grifola frondosa* (maitake). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4): 1533–41.
- Moreira, L.R., i Filho, E.X. (2008):** An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(2): 165–78.
- Morozova, O.V., Shumakovich, G.P., Gorbacheva, M.A., Shleev, S.V., Yaropolov, A.I. (2007):** “Blue” laccases. *Biochemistry (Moscow)*, 72(10): 1136–50.
- Muñoz, C., Guillen, F., Martínez, T.A., Martínez, J.M. (1997a):** Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: characterization, catalytic properties and participation in activation of molecular oxygen and Mn<sup>2+</sup> oxidation. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(6): 2166–74.
- Muñoz C, Guillen F, Martínez T.A., Martínez, J.M. (1997b):** Induction and Characterization of Laccase in the Ligninolytic Fungus *Pleurotus eryngii*. *Current Microbiology*, 34: 1–5.
- Mussatto, S.I., Ballesteros, L.F., Martins, S., Teixeira, J.A. (2012):** Use of Agro-Industrial Wastes in Solid-State Fermentation Processes, In: Show, K.-Y and Guo, X. (Eds.), *Industrial Waste*, IntechOpen, pp. 121–140.
- Mustafa, A.M., Poulsen, T.G., Sheng, K. (2016):** Fungal pretreatment of rice straw with *Pleurotus ostreatus* and *Trichoderma reesei* to enhance methane production under solid-state anaerobic digestion. *Applied Energy*, 180: 661–71.
- Narra, M., Dixit, G., Divecha, J., Madamwar, D., Shah, A.R. (2012):** Production of cellulases by solid state fermentation with *Aspergillus terreus* and enzymatic hydrolysis of mild alkali-treated rice straw. *Bioresource Technology*, 121: 355–61.
- Nawaz, S., Nelofer, R., Tahir, A., Syed, Q. (2018):** Production of cellulase for ethanol fermentation from pretreated wheat straw. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*, 42: 321–29.
- Nigam, P.S., i Singh, A. (2011):** Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science*, 37(1): 52–68.
- Nummi, M., Niku-Paavola, M.L., Lappalainen, A., Enari, T.M., Raunio, V. (1983):** Cellobiohydrolase from *Trichoderma reesei*. *Biochemical Journal*, 215(3): 677–83.
- Oberlerchner, J. T., Rosenau, T., Potthast, A. (2015):** Overview of methods for the direct molar mass determination of cellulose. *Molecules*, 20(6): 10313–41.
- Olofsson K, Bertilsson M, Lidén G. (2008):** A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnology for Biofuels*, 1(1): 1–14.
- Palma, C., Lloret, L., Sepúlveda, L., Contreras, E. (2016):** Production of versatile peroxidase from *Pleurotus eryngii* by solid-state fermentation using agricultural residues and evaluation of its catalytic properties. *Preparative biochemistry & biotechnology*, 46(2): 200–207.

- Palmieri, G., Giardina, P., Marzullo, L., Desiderio, B., Nitti, B., Cannio, R., Sannia, G., (1993):** Stability and activity of phenol oxidase from lignolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 39: 632–36.
- Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Scaloni, A., Capasso, A., Sannia, G. (1997):** A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *The Journal of biological chemistry*, 272(50): 31301–31307.
- Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Fontanella, B., Sannia, G. (2000):** Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(3): 920–24.
- Pandey, A. (Ed.). (2008):** *Handbook of plant-based biofuels*. CRC press. <https://doi.org/10.1201/9780789038746>.
- Paramjeet, S., Manasa, P., Korrapati, N. (2018):** Biofuels: Production of fungal-mediated ligninolytic enzymes and the modes of bioprocesses utilizing agro-based residues. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 14: 57–71.
- Pensupa, N., Jin, M., Kokolski, M., Archer, D. B., Du, C. (2013):** A solid state fungal fermentation-based strategy for the hydrolysis of wheat straw. *Bioresource Technology*, 149: 261–267.
- Pereira Ramos, L. (2003):** The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. *Química Nova*, 26: 863–871.
- Pérez-Boada, M., Ruiz-Dueñas, F.J., Pogni, R., Basosi, R., Choinowski, T., Martínez, M.J., Piontek, K., Martínez, A.T. (2005):** Versatile peroxidase oxidation of high redox potential aromatic compounds: site-directed mutagenesis, spectroscopic and crystallographic investigations of three long-range electron transfer pathways. *Journal of Molecular Biology*, 354: 385–402.
- Pinto, P.A., Dias, A.A., Fraga, I., Marques, G., Rodrigues, M.A.M., Colaco, J., Sampaio, A., Bezerra, R.M.F. (2012):** Influence of ligninolytic enzymes on straw saccharification during fungal pretreatment. *Bioresource Technology*, 111: 261–267.
- Ponnusamy, V.K., Nguyen, D.D., Dharmaraja, J., Shobana, S., Banu, J.R., Saratale, R.G., Chang, S.W., Kumar, G. (2019):** A review on lignin structure, pretreatments, fermentation reactions and biorefinery potential. *Bioresource Technology*, 271: 462–72.
- Predojević, Z.J. (2010):** Postupci pripreme lignocelulozne sirovine za dobijanje bioetanol. *Hemijska industrija*, 64(4): 283–93.
- Qi-He, C., Krügener, S., Hirth, T., Rupp, S., Zibek, S. (2011):** Co-cultured production of lignin-modifying enzymes with white-rot fungi. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 165(2): 700–18.
- Quintero-Ramirez, R. (2014):** Hydrolysis of lignocellulosic biomass. In: Barbosa Cortez, L.A. (Coord.), *Sugarcane bioethanol—R&D for Productivity and Sustainability*. Editora Edgard Blücher, São Paulo, pp. 717–32.
- Rabello, G.C., Pirola, R.D.P.B., Barros, G.O.F., Farinas, C.S. (2014):** Simultaneous biosynthesis of biomass-degrading enzymes using co-cultivation of *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei*. *Biocatalysis and Biotransformation*, 32(4): 236–43.
- Ramos, L.P. (2003):** The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. *Química Nova*, 26(6): 863–71.
- Rastogi, M. i Shrivastava, S. (2017):** Recent advances in second generation bioethanol production: An insight to pretreatment, saccharification and fermentation processes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 80: 330–40.
- Rayner, A.D.M., i Boddy, L. (1988):** *Fungal decomposition of wood: its biology and ecology*. John Wiley, Chichester, New York.
- Ren, J.L., i Sun, R.C. (2010):** Hemicellulose, In: Sun, R.C. (Ed.), *Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels. Chemistry, Extractives, Lignins, Hemicellulose and Cellulose*, Elsevier, Amsterdam, pp. 73–130.

- Rescigno, A., Sollai, F., Curreli, N., Rinaldi, A., Sanjust, E. (1993):** An extracellular laccase from *Pleurotus sajor-caju*. Italian Journal of Biochemistry, 42: 227A–228A.
- Rezania, S., Oryani, B., Cho, J., Talaiekhosravi, A., Sabbagh, F., Hashemi, B., Rupani, P.F., Mohammadi, A.A. (2020):** Different pretreatment technologies of lignocellulosic biomass for bioethanol production: An overview. Energy, 199: 117457.
- Rezić, T., Ivančić Šantek, M., Andlar, M., Pavlečić, M., Šantek, B. (2016):** Usporedba različitih tehnika proizvodnje bioetanol iz lignoceluloznih sirovina. Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam, 11(1–2): 6–17.
- Richard, T. (1996):** *The Effect of Lignin on Biodegradability*. Cornell Waste Management Institute.
- Ricklefs, R.E. (2006):** Species interactions. The Economy of Nature, 287–299.
- Riva, S. (2006):** Laccases: blue enzymes for green chemistry. Trends in Biotechnology, 24(5): 219–226.
- Rodrigues, M.A.M., Pinto, P., Bezerra, R.M.F., Dias, A.A., Guedes, C.V.M., Cardoso, V.M.G., Cone, J.W., Ferreira, L.M.M., Colaço, J., Sequeira, C.A. (2008):** Effect of enzyme extracts isolated from white-rot fungi on chemical composition and in vitro digestibility of wheat straw. Animal Feed Science and Technology, 141(3-4): 326-338.
- Rouches, E., Herpoël-Gimbert, I., Steyer, J.P., Carrere, H. (2016):** Improvement of anaerobic degradation by white-rot fungi pretreatment of lignocellulosic biomass: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 59: 179–98.
- Saha, B.C., Qureshi, N., Kennedy, G.J., Cotta, M.A. (2016):** Biological pretreatment of corn stover with white-rot fungus for improved enzymatic hydrolysis. International Biodeterioration & Biodegradation, 109: 29–35.
- Salmones, D., Mata, G., Waliszewski, K.N. (2005):** Comparative Culturing of *Pleurotus* spp. on Coffee Pulp and Wheat Straw: Biomass Production and Substrate Biodegradation. Bioresource Technology, 96(5): 537–44.
- Sánchez, O.J., i Cardona, C.A. (2008):** Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. Bioresource Technology, 99(13): 5270–95.
- Sánchez, C. (2009):** Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. Biotechnology advances, 27(2): 185–194.
- Sannia, G., Giardina, P., Luna, M., Rossi, M., Buonocore, V. (1986):** Laccase from *Pleurotus ostreatus*. Biotechnology Letters, 8(11): 797–800.
- Santhanam, N., Badri, D.V., Decker, S.R., Manter, D.K., Reardon, K.F., Vivanco, J.M. (2012):** Lignocellulose decomposition by microbial secretions, In: Baluška, F., and Vivanco, M.J. (Eds.), *Secretions and Exudates in Biological Systems*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 125–53.
- Schädel, C., Blöchl, A., Richter, A., Hoch, G. (2009):** Short-term dynamics of nonstructural carbohydrates and hemicelluloses in young branches of temperate forest trees during bud break. Tree Physiology, 29: 901–11.
- Scheller, H.V. i Ulvskov, P. (2010):** Hemicelluloses. Annual review of plant biology, 61: 263–89.
- Sekan, A.S., Myronycheva, O.S., Karlsson, O., Gryganskyi, A.P., Blume, Y. (2019):** Green potential of *Pleurotus* spp. in biotechnology. PeerJ, 7: e6664.
- Semenčenko, V., Mojović, L., Petrović, S., Očić, O. (2011):** Novi trendovi u proizvodnji bioetanol. Hemijska industrija, 65(2), 103-114.
- Sergentani, A.G., Gonou-Zagou, Z., Kapsanaki-Gotsi, E., Hatzinikolaou, D.G. (2016):** Lignocellulose degradation potential of Basidiomycota from Thrace (NE Greece). International Biodeterioration & Biodegradation, 114: 268–77.
- Sharma, H. K., Xu, C., Qin, W. (2019):** Biological pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and bioproducts: an overview. Waste and Biomass Valorization, 10(2): 235–51.
- Sherief, A.A., El-Tanash, A.B., Temraz, A.M. (2010):** Lignocellulolytic Enzymes and Substrate Utilization during Growth and Fruiting of *Pleurotus ostreatus* on Some Solid Wastes. Journal Environmental Science and Technology, 3: 18–34.

- Shi, J., Chinn, M., Sharmashivappa, R. (2008):** Microbial pretreatment of cotton stalks by solid state cultivation of *Phanerochaete chrysosporium*. *Bioresource Technology*, 99(14): 6556–6564.
- Sigoillot, J.C., Berrin, J.G., Bey, M., Lesage-Meessen, L., Levasseur, A., Lomascolo, A., Record, E., Uzan-Boukhris, E. (2012):** Fungal Strategies for Lignin Degradation, In: Jouanin, L., Lapierre, C. (Eds.) *Lignins: Biosynthesis, Biodegradation and Bioengineering*, Vol. 61. UK: Academic Press, Elsevier, pp. 263–308.
- Sindhu, R., Binod, P., Pandey, A. (2016):** Biological pretreatment of lignocellulosic biomass—An overview. *Bioresource Technology*, 199: 76–82.
- Singh, A. i Hayashi, K. (1995):** Microbial cellulases: protein architecture, molecular properties, and biosynthesis. *Advances in Applied Microbiology*, 40: 1–44.
- Singh, P., Suman, A., Tiwari, P., Arya, N., Gaur, A., Shrivastava, A.K. (2008):** Biological pretreatment of sugarcane trash for its conversion to fermentable sugars. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24: 667–673.
- Singh, A., Bajar, S., Bishnoi, N.R., Singh, N. (2010):** Laccase production by *Aspergillus heteromorphus* using distillery spent wash and lignocellulosic biomass. *Journal of hazardous materials*, 176(1–3): 1079–82.
- Singhania, R.R., Sukumaran, R.K., Patel, A.K., Larroche, C., Pandey, A. (2010):** Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, 46(7): 541–49.
- Singhania, R.R., Sukumaran, R.K., Rajasree, K.P., Mathew, A., Gottumukkala, G., Pandey, A. (2011):** Properties of a major  $\beta$ -glucosidase-BGL1 from *Aspergillus niger* NII-08121 expressed differentially in response to carbon sources. *Process Biochemistry*, 46: 1521–24.
- Simonić, J., Vukojević, J., Stajić, M., Glamočlija, J. (2010):** Intraspecific diversity within *Ganoderma lucidum* in laccase and Mn-dependent peroxidases production during plant residues fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162: 408–15.
- Songulashvili, G., Elisashvili, V., Wasser, S., Nevo, E., Hadar, Y. (2006):** Laccase and manganese peroxidase activities of *Phellinus robustus* and *Ganoderma adspersum* grown on food industry wastes in submerged fermentation. *Biotechnology Letters*, 28: 1425–29.
- Songulashvili, G., Elisashvili, V., Wasser, S.P., Nevo, E., Hadar, Y. (2007):** Basidiomycetes laccase and manganese peroxidase activity in submerged fermentation of food industry wastes. *Enzyme and Microbial Technology*, 41: 57–61.
- Sperandio, G.B. i Ferreira Filho, E.X. (2019):** Fungal co-cultures in the lignocellulosic biorefinery context: A review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 142: 109–23.
- Sun, Q.N., Qin, T.F., Li, G.Y. (2009):** Chemical groups and structural characterization of brown-rotted *Pinus massoniana* lignin. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*, 14(1): 19–33.
- Sun, Y., i Cheng, J. (2002):** Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83(1): 1–11.
- Stajić, M., Persky, L., Cohen, E., Hadar, Y., Brceski, I., Wasser, S.P., Nevo, E. (2004):** Screening of laccase, manganese peroxidase, and versatile peroxidase activities of the genus *Pleurotus* in media with some raw plant materials as carbon sources. *Applied biochemistry and biotechnology*, 117(3): 155–64.
- Stajić, M., Persky, L., Friesem, D., Hadar, Y., Wasser, S.P., Nevo, E., Vukojević, J. (2006a):** Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases activity by selected *Pleurotus* species. *Enzyme and Microbial Technology*, 38: 65–73.
- Stajić, M., Persky, L., Hadar, Y., Friesem, D., Duletic-Lausevic, S., Wasser, S. P., Nevo, E. (2006b):** Effect of copper and manganese ions on activities of laccase and peroxidases in three *Pleurotus* species grown on agricultural wastes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 128: 87–96.
- Stajić, M., Vukojević, J., Duletić-Laušević, S. (2009):** Biology of *Pleurotus eryngii* and the role in biotechnological processes: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 29(1): 55–66.

- Stajić, M., Kukavica, B., Vukojević, J., Simonić, J., Veljović-Jovanović, S., Duletić- Laušević, S. (2010):** Wheat straw conversion by enzymatic system of *Ganoderma lucidum*. *BioResources*, 5: 2362–73.
- Stajić, M., Vukojević, J., Milovanović, I., Čilerdžić, J., Knežević, A. (2016):** Role of Mushroom Mn-Oxidizing Peroxidases in Biomass Conversion, In: Gupta, V.K. (Ed.), *Microbial Enzymes in Bioconversion of Biomass*. Springer International Publishing, pp. 251–269.
- Stajić, M., Čilerdžić, J., Galić, M., Ivanović, Ž., Vukojević, J. (2017):** Lignocellulose degradation by *Daedaleopsis confragosa* and *D. tricolor*. *BioResources*, 12(4): 7195–204.
- Statistički godišnjak Srbije 2017**, Republički zavod za statistiku, Beograd, 2017.
- Stoilova, I.S., Gargova, S.A., Krastanov, A.I. (2005):** Production of enzymes by mixed culture from micelial fungi in solid-state fermentation. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 19(1): 103–8.
- Sweeney, M.D. i Xu, F. (2012):** Biomass Converting Enzymes as Industrial Biocatalysts for Fuels and Chemicals: Recent Developments. *Catalysts*, 2(2), 244–63.
- Tabatabaei, M., Aghbashlo, M., Valijanian, E., Panahi, H.K.S., Nizami, A.S., Ghanavati, H., Sulaiman, A., Mirmohamadsadeghi, S., Karimi, K. (2020):** A comprehensive review on recent biological innovations to improve biogas production, Part 1: Upstream strategies. *Renewable Energy*, 146: 1204–20.
- Teeri, T.T. (1997):** Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. *Trends in Biotechnology*, 15(5): 160–7.
- Thakur, N., Tripathi, A., Sagar, S., Kumar, P., Devi, N., Sharma, S.I., Sharma, M., Sharma, J. (2017):** Estimation of extracellular ligninolytic enzymes from wild *Auricularia polytricha*, *Helvella* sp. and *Morchella* sp. *International Journal of Advanced Research*, 5: 968-974.
- Thurston, C.F. (1994):** The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 140(1): 19–26.
- ul-Haq, I., Javed, M.M., Khan, T.S., Siddiq, Z. (2005):** Cotton saccharifying activity of cellulases produced by co-culture of *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride*. *Research Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 1(3): 241–45.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A. (1991):** Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74: 3583-3597.
- Várnai, A., Mäkelä, M. R., Djajadi, D. T., Rahikainen, J., Hatakka, A., Viikari, L. (2014):** Carbohydrate-binding modules of fungal cellulases: occurrence in nature, function, and relevance in industrial biomass conversion. *Advances in Applied Microbiology*, 88: 103–65.
- Varnaitė, R., i Raudonienė, V. (2008):** Destruction of hemicellulose in rye straw by micromycetes. *Ekologija*, 54(3): 169–72.
- Vázquez, M.A., Cabrera, E.C.V., Aceves, M.A., Mallol, J.L.F. (2019):** Cellulolytic and ligninolytic potential of new strains of fungi for the conversion of fibrous substrates. *Biotechnology Research and Innovation*, 3(1): 177–86.
- Velázquez-Cedeño, M.A., Farnet, A.M., Ferre, E., Savoie, J.M. (2004):** Variations of lignocellulosic activities in dual cultures of *Pleurotus ostreatus* and *Trichoderma longibrachiatum* on unsterilized wheat straw. *Mycologia*, 96(4): 712–19.
- Vocadlo, D.J., Davies, G.J. (2008):** Mechanistic insights into glycosidase chemistry. *Current opinion in chemical biology*, 12(5): 539–55.
- Vohra, M., Manwar, J., Manmode, R., Padgilwar, S., Patil, S. (2014):** Bioethanol production: Feedstock and current technologies. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2(1): 573–84.
- Walker, G.M. (2010):** *Bioethanol: science and technology of fuel alcohol*. BookBoon.com, London.
- Wan, C., i Li, Y. (2012):** Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. *Biotechnology Advances*, 30: 1447– 1457.



- Wang, P., Hu, X., Cook, S., Begonia, M., Lee, K.S., Hwang, H.M. (2008):** Effect of culture conditions on the production of ligninolytic enzymes by white rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* (ATCC 20696) and separation of its lignin peroxidase. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24: 2205–2212.
- Wang, H., i Fan, B. (2010):** Screening of three straw-cellulose degrading microorganism. *Wei sheng wu xue bao=Acta microbiologica Sinica*, 50(7): 870–5.
- Wen, Z., Liao, W., Chen, S. (2005):** Production of cellulase/ $\beta$ -glucosidase by the mixed fungi culture *Trichoderma reesei* and *Aspergillus phoenicis* on dairy manure. *Process Biochemistry*, 40(9): 3087–94.
- Wong, D.W. (2009):** Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Applied biochemistry and biotechnology*, 157(2): 174–209.
- Wyman, V., Henríquez, J., Palma, C., Carvajal, A. (2018):** Lignocellulosic waste valorisation strategy through enzyme and biogas production. *Bioresource Technology*, 247: 402–11.
- Xi, J., Du, W., Zhong, L. (2013):** Probing the Interaction Between Cellulose and Cellulase with a Nanomechanical Sensor, In: van de Ven, T. and Godbuot, L. (Eds.), *Cellulose-Medical, Pharmaceutical and Electronic Applications*. IntechOpen.
- Xie, C., Luo, W., Li, Z., Yan, L., Zhu, Z., Wang, J., Hu, Z., Peng, Y. (2016):** Secretome analysis of *Pleurotus eryngii* reveals enzymatic composition for ramie stalk degradation. *Electrophoresis*, 37(2): 310–20.
- Xu, Q., Singh, A., Himmel, M.E. (2009):** Perspectives and new directions for the production of bioethanol using consolidated bioprocessing of lignocellulose. *Current Opinion in Biotechnology*, 20: 364–71.
- Yoon, L.W., Ang, T.N., Ngoh, G.C., Chua, A.S.M. (2014):** Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. *Biomass and bioenergy*, 67: 319–38.
- Yoshida, H. (1883):** Chemistry of lacquer (urushi). *Journal of the Chemical Society*, 43: 472–86.
- Youn, H.D., Hah, Y. C., Kang, S.O. (1995):** Role of laccase in lignin degradation by white-rot fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 132(3): 183-188.
- Yuan, X., Tian, G., Zhao, Y., Zhao, L., Wang, H., Ng, T.B. (2016):** Biochemical Characteristics of Three Laccase Isoforms from the Basidiomycete *Pleurotus nebrodensis*. *Molecules*, 21(2): 203.
- Zadrazil, F., Galletti, G. C., Piccaglia, R., Chiavari, G., Francioso, O. (1991):** Influence of oxygen and carbon dioxide on cell wall degradation by white-rot fungi. *Animal Feed Science and Technology*, 32: 137–42.
- Zeng, Y., Zhao, S., Yang, S., Ding, S.-Y. (2014):** Lignin plays a negative role in the biochemical process for producing lignocellulosic biofuels. *Current opinion in biotechnology*, 27: 38– 45.
- Zhang, R., Li, X., Fadel, J.G. (2002):** Oyster mushroom cultivation with rice and wheat straw. *Bioresource Technology*, 82: 277–84.
- Zhang, Y.-H.P., i Lynd, L.R. (2004):** Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Biotechnology and bioengineering*, 88(7): 797–824.
- Zhang, Y.-H.P., i Lynd, L.R. (2006):** A functionally based model for hydrolysis of cellulose by fungal cellulase. *Biotechnology and bioengineering*, 94(5), 888–98.
- Zhang, Y.-H.P., Himmel, M.E., Mielenz, J.R. (2006a):** Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnology advances*, 24(5), 452–81.
- Zhang, H., Hong, Y.Z., Xiao, Y.Z., Yuan, J., Tu, X.M., Zhang, X.Q. (2006b):** Efficient production of laccases by *Trametes* sp. AH28-2 in cocultivation with a *Trichoderma* strain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(1): 89–94.
- Zhang, X.Z., i Zhang, Y.H.P. (2013):** Cellulases: characteristics, sources, production, and applications. *Bioprocessing technologies in biorefinery for sustainable production of fuels, chemicals, and polymers*, 1: 131–146.
- Zhbankov, R.G. (1992):** Hydrogen bonds and structure of carbohydrates. *Journal of Molecular Structure*, 270: 523–39.

- Zheng, Y., Pan, Z., Zhang, R. (2009):** Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 2(3): 51–68.
- Zugenmaier, P. (2001):** Conformation and packing of various crystalline cellulose fibers. *Progress in polymer science*, 26(9): 1341–417.
- Zulkifli, Z.B., Rasit, N.B., Umor, N.A., Ismail, S. (2018):** The effect of *A. fumigatus* SK1 and *Trichoderma* sp. on the biogas production from cow manure. *Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 14: 353–59.

Ukupno 269 literaturnih navoda.

## BIOGRAFIJA

Milica M. Galić rođena je 22.03.1984. u Beogradu, Republika Srbija. Osnovnu i srednju školu završila je u Beogradu. Modul Ekologija i zaštita životne sredine na Biološkom fakultetu upisala je školske 2003/2004. godine. Studije je završila sa prosečnom ocenom 8,17. Master studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, modul Biologija gljiva, upisala je školske 2013/2014. godine i završila sa prosečnom ocenom 10,00. Doktorske studije na modulu Eksperimentalna mikologija upisala je školske 2015/2016. godine. U zvanje istraživač pripravnik izabrana je 2016. godine, a 2018. godine u zvanje istraživač saradnik. Od marta 2016. godine Milica Galić je angažovana na izvođenju praktične nastave na predmetu Mikologija na osnovnim akademskim studijama Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom „Karakterizacija i primena metabolita gljiva i utvrđivanje potencijala novih biofungicida“ (ON173032) angažovana je od decembra 2019. godine od kada je i zaposlena kao istraživač-pripravnik na Katedri za algologiju, mikologiju i lihenologiju Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Naučno-istraživački rad Milice Galić iz oblasti mikologije obuhvata 10 bibliografskih jedinica: 7 naučnih radova u časopisima međunarodnog značaja, jedan rad u časopisu nacionalnog značaja i dva saopštenja na domaćim naučnim skupovima. Član je Mikološkog društva Srbije i Udruženja mikrobiologa Srbije.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Милица Галић

Број индекса Б3045/2015

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

“Потенцијал лигноцелулолитичких гљива за разлагање биљног отпада и добијање биоетанола.”

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да предложена 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 кршила ауторска права и користила интелектуалну својину других лица.

У Београду, \_\_\_\_\_

Потпис аутора

\_\_\_\_\_

Прилог 2.

## **Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада**

Име и презиме аутора: **Милица Галић**

Број индекса: **Б3045/2015**

Студијски програм: **Експериментална микологија**

Наслов рада: „**Потенцијал лигноцелулолитичких гљива за разлагање биљног отпада и добијање биоетанола.**”

Ментори: проф. др Мирјана Стајић и виши научни сарадник др Јасмина Ћилерџић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предала ради похрањивања 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.

У Београду, \_\_\_\_\_

**Потпис аутора**

\_\_\_\_\_

### Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

**Потенцијал лигноцелулолитичких гљива за разлагање биљног отпада и добијање биоетанола.** која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предала 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 одлучила.

1. Ауторство (CC BY)

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 дат је на полеђини листа).

У Београду, \_\_\_\_\_

**Потпис аутора**

\_\_\_\_\_

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.