

Gljive *Fomes fomentarius* i *Trametes versicolor* kao producenti ligninolitičkih enzima u toku čvrste kultivacije na ječmenoj slami

Lignoceluloznu biomasu čine različiti biljni ostaci poreklom iz poljoprivrede, šumarstva kao i nekih prerađivačkih industrija. Ovaj materijal predstavlja globalno najrasprostranjeniji obnovljivi resurs. Hemijske karakteristike strukturnih komponenti čine lignocelulozu veoma vrednim biotehnoškim supstratom za dobijanje hrane, hraniva, papirne pulpe ili bioenergenata. Kako celulozni etanol predstavlja alternativu tečnim fosilnim gorivima, savremena istraživanja su usmerena ka pronalazaženju efikasnih metoda kojima bi se dobio visok prinos šećera. Jedan od preduslova da se lignoceluloza može koristiti u dobijanju bioetanola predstavlja uklanjanje lignina kao sastavne komponente, pri čemu gljive koje su izazivači belog truljenja mogu imati značajnu ulogu, zbog produkcije ligninolitičkih enzima. Cilj ovog istraživanja je određivanje kapaciteta vrsta *Fomes fomentarius* i *Trametes versicolor* da produkuju lakaze i Mn-oksidujuće peroksidaze u toku čvrste kultivacije na ječmenoj slami, radi potencijalne primene u pretretmanu delignifikacije. Proučavane vrste su pokazale različit stepen aktivnosti lakaza, MnP i MnIP nakon sedmodnevne čvrste kultivacije na ječmenoj slami kao izvoru ugljenika. Vrsta *Fomes fomentarius* se na osnovu dobijenih rezultata pokazala kao znatno efikasniji producent ligninolitičkih enzima u poređenju sa *T. versicolor*.

Uvod

Lignoceluloznu biomasu čine različiti biljni ostaci poreklom iz poljoprivrede, šumarstva kao i nekih prerađivačkih industrija. Kontinuirani rast svetske populacije je praćen povećanjem poljoprivredne i industrijske proizvodnje, što za posledicu ima stvaranje velike količine raznovrsnih biljnih ostataka i drugog otpada (Knežević 2015). Lignocelulozni kompleks se sastoji od lignina (10-20%), hemiceluloze (25-30%) i celuloze (30-35%), međusobno povezanih kovalentnim i nekovalentnim vezama (Sánchez *et al.* 2009). Hemijske karakteristike strukturnih komponenta lignocelulozu čine veoma vrednim biotehnoškim supstratom za dobijanje hrane, hraniva, papirne pulpe ili bioenergenata, ali njena primena zahteva uklanjanje lignina i oslobađanje fermentabilnih šećera iz složenijih polisaharida. Zbog toga su savremena istraživanja usmerena ka pronalazaženju efikasne metode kojom se može dobiti visok prinos šećera, odnosno etanola, kao alternative fosilnim gorivima. Bioetanol se u najvećoj meri danas dobija iz skrobnih i šećernih sirovina koje se koriste u ishrani, pa bi primena otpadnih sirovina, poput lignoceluloznog otpada, mogla da obezbedi nižu cenu, a zalihe hrane ne bi bile ugrožene. Procenjuje se da se iz neiskorišćenog poljoprivrednog otpada može proizvesti oko 490 milijardi litara bioetanola godišnje (Jović *et al.* 2015).

Potencijal lignoceluloze da se koristi u proizvodnji bioenergenata se zasniva na činjenici da u njen sastav ulaze polisaharidi koje nakon depolimerizacije različiti mikroorganizmi mogu da metabolišu do etanola i metana. U tom smislu, dva ključna faktora su depolimerizacija celuloze i hemiceluloze (saharifikacija) i alkoholna fer-

Teodora Savić (2001), *Priboj, Limska 36, učenica 2. razreda Gimnazije u Priboju*

MENTOR: dr Aleksandar Knežević, naučni saradnik, *Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu*

mentacija različitim vrstama mikroorganizama (Achinas i Euverink 2016). Kako je zbog svojih fizičko-hemijskih karakteristika lignoceluloza otporna na različite biodegradacione procese, potrebni su različiti pretretmani da bi mogla da se koristiti kao sirovina u biotehnološkim procesima. Osnovni cilj pretretmana je delignifikacija, nakon koje celuloza i hemiceluloza postaju dostupne celulolitičkim enzimima (Janušić *et al.* 2008).

U ječmu (*Hordeum vulgare* L.), koji je česta poljoprivredna kultura, može se naći oko 25-43% celuloze, 24-50% hemiceluloze, 10-30% lignina (Jović *et al.* 2015), što ovaj ječmeni otpad čini potencijalnom sirovinom za dobijanje celuloznog etanola. Ovaj otpad je jeftin, lako dostupan, ima ga u velikim količinama, ne igra važnu ulogu u poljoprivredi i industriji, te najčešće biva spaljen, što dodatno zagađuje životnu sredinu.

Gljive izazivači belog truljenja, predstavljaju jedne od najefikasnijih razlagača lignina u prirodi. Najveći broj, oko 1500 vrsta, pripada razdelu Basidiomycota, a manji broj razdelu Ascomycota (Schwarze 2007). Kako bi koristile celulozu i hemicelulozu kao izvore ugljenika, ove gljive moraju najpre da uklone lignin tako što proizvode ligninolitičke enzime kao što su lakaza, Mn-oksidujuće peroksidaze i lignin peroksidaze (Gedikli *et al.* 2010). U tom smislu, ovi organizmi se mogu koristiti u prvom koraku dobijanja biogoriva – delignifikaciji lignoceluloznih sirovina. Važan faktor u primeni ovih gljiva je pojedinačna sposobnost vrsta i sojeva da neselektivno ili selektivno razlažu lignin. Selektivna ligninoliza je od izuzetnog značaja, jer na taj način nakon znatnog uklanjanja lignina veći deo celuloze ostaje u sirovini (Sarkar *et al.* 2012). Među gljivama izazivačima belog truljenja najčešće se u biotehnološkim procesima lignoceluloznog pretretmana koriste vrste iz rodova *Fomes*, *Pleurotus* i *Trametes* (Knežević 2015).

Rod *Trametes* Fr., pripada familiji Polyporaceae, obuhvata vrste širokog rasprostranjenja sa dobro razvijenim ligninolitičkim enzimskim sistemom i značajnim kapacitetom u sintezi raznovrsnih biološki aktivnih jedinjenja, zbog čega sve više nalazi primenu u mnogobrojnim biotehnološkim procesima (Knežević 2015). Vrsta *Trametes versicolor*, u narodu poznata kao čuranov rep, je gljiva izazivač belog truljenja (Jović *et al.* 2015). Nastanjuje mrtva stabla i panjeve. Vrlo je česta i može se naći tokom cele

godine. Rasprostranjena je u Evropi, Aziji i Severnoj Americi (Knežević 2015). Utvrđeno je da ove gljive imaju potencijal za neselektivnu razgradnju lignina (Jović *et al.* 2015).

Fomes Fr. je rod koji pripada familiji Polyporaceae i formira višegodišnja plodonosna tela drvenaste konzistencije. Vrsta *Fomes fomentarius*, u narodu poznata kao trud, je lignikolna gljiva koja je po načinu života parazit ili saprob. Najčešće parazitira na listopadnom drveću (bukva i breza), a ređe na četinarima (Vunduk *et al.* 2017). Spada u gljive izazivače belog truljenja koje su sposobne za neselektivnu razgradnju lignina (Jović *et al.* 2015).

Cilj ovog istraživanja je bio određivanje kapaciteta vrsta *Fomes fomentarius* i *Trametes versicolor* da proizvode lakaze i Mn-oksidujuće peroksidaze u toku čvrste kultivacije na ječmenoj slami radi potencijalne primene u pretretmanu delignifikacije.

Materijal i metode

Kulture gljiva *Fomes fomentarius* i *Trametes versicolor* gajene na malt agru 7 dana, inkulisane su u sintetički medijum koji je sadržao usitnjenu i sterilisanu ječmenu slamu i inkubirane 7 dana. Nakon inkubacije, ligninolitički enzimi su ekstrahovani. Ekstrakti su korišćeni za određivanje aktivnosti ligninolitičkih enzima: lakaze i Mn-oksidujućih peroksidaza kako bi bio ustanovljen potencijal ovih gljiva za pretretman delignifikacije.

Organizmi. Kulture proučavanih vrsta dobijene su iz Kolekcije kultura Instituta za botaniku Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu (tabela 1). Kulture se čuvaju na malt-agar (MA) medijumu na 4°C i presejavaju se na svakih 6 meseci.

Tabela 1. Proučavane vrste

Vrsta	Oznaka soja	Poreklo soja
<i>Trametes versicolor</i> (L.) Lloyd	BEOFB321	Suva planina
<i>Fomes fomentarius</i> (L.) Fr.	BEOFB800	Suva planina

Priprema lignoceluloznog materijala. Kao lignocelulozni materijal korišćena je ječmena slama, prikupljena sa njive u okolini IS Petnica, čija se priprema sastojala iz: (i) usitnjavanja; (ii) ispiranja toplom destilovanom vodom ($T \approx 50^\circ\text{C}$) i (iii) sušenja.

Priprema inokuluma i uslovi kultivacije. Inokulum je pripreman inokulacijom 100 mL sintetičkog medijuma (glukoza, 10.0 g/L; NH_4NO_3 , 2.0 g/L; K_2HPO_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 ($\varnothing 0.5$ cm, sa 7 dana starom kulturom gajenom na malt agru). Inkubacija je vršena na sobnoj temperaturi ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) na rotacionom šejkeru (100 rpm) 7 dana. Dobijena biomasa je ispirana destilovanom vodom (dH_2O) i homogenizovana u laboratorijskom mikseru dodatkom sterilne dH_2O do ukupne zapremine od 100 mL.

Čvrsta kultivacija vršena je u erlenmajerima zapremine 100 mL koji su sadržali po 2 g usitnjene slame prelivene sa 10 mL modifikovanog sintetičkog medijuma (bez glukoze), sterilisanih u autoklavu na 121°C , 25 min. Inokulacija je vršena u sterilnim uslovima korišćenjem 3 mL homogenizovanog tečnog inokuluma, a kultivacija se odvijala u toku 7 dana u mraku na 25°C .

Ligninolitički enzimi su ekstrahovani mešanjem uzoraka sa 50 mL dH_2O na magnetnoj mešalici u toku 15 min na sobnoj temperaturi. Dobijeni ekstrakti su filtrirani kroz laboratorijska sita, a tečna faza centrifugirana (3000 rpm, 4°C , 10 min). Supernatanti su korišćeni za određivanje aktivnosti lakaza i mangan-oksidujućih peroksidaza (Mn-zavisne peroksidaze – MnP i Mn-nezavisne peroksidaze – MnIP) kao i sadržaja ukupnih proteina.

Određivanje aktivnosti ligninolitičkih enzima. Aktivnost lakaze i Mn-oksidujućih peroksidaza određena je spektrofotometrijski i izražavana u jedinicama enzimske aktivnosti po litru (U/L). Enzimska aktivnost od 1 U je definisana je kao količina enzima koja transformiše 1 μmol supstrata u minuti.

Aktivnost lakaze je određena praćenjem promene apsorbance na 436 nm koja je uslovljena stopom oksidacije 50 Mm rastvora 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonske kiseline (ABTS) u 0.1 M fosfatnom puferu (pH 6.0). Reakciona smeša ($V_{\text{tot}} = 1.0$ mL) sadržala je uzorak, pufer i ABTS. Kao slepa proba je korišćena reakciona smeša bez uzorka. Aktivnost Mn-za-

visne peroksidaze (MnIP) i Mn-nezavisne peroksidaze (MnP) je određena korišćenjem 3 mM fenol crvenog kao supstrata u sukcinatnom puferu (pH 4.5). Reakciona smeša ($V_{\text{tot}} = 1.0$ mL) je sadržala uzorak, sukcinatni pufer, 2 mM H_2O_2 i fenol crveno sa ili bez 2 mM MnSO_4 (za određivanje aktivnosti Mn-zavisne peroksidaze, odnosno Mn-nezavisne peroksidaze). Reakcija je zaustavljena dodavanjem 2 M NaOH. Kao slepa proba je korišćena reakciona smeša u kojoj je 2 M NaOH dodavan pre fenol crvenog.

Određivanje sadržaja ukupnih proteina. Koncentracija ukupnih proteina je određena Bradford-ovom metodom. Apsorbanca je merena nakon 5 min na 595 nm. Reakciona smeša za određivanje koncentracije ukupnih proteina sadržala je Bradfordov reagens i uzorak (Bradford 1976). Koncentracija ukupnih proteina (mg/mL) korišćena je za određivanje specifične enzimske aktivnosti (U/mg).

Rezultati i diskusija

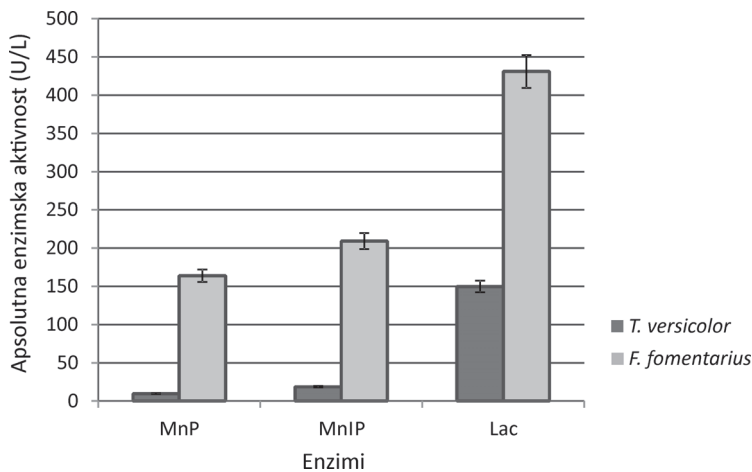
Proučavane vrste su pokazale različit stepen aktivnosti lakaza, MnP i MnIP nakon sedmodnevne čvrste kultivacije na ječmenoj slami kao izvoru ugljenika (slika 1). Može se uočiti da je *F. fomentarius* bio efikasniji producent svih ispitivanih enzima u poređenju sa *T. versicolor*.

Obe ispitivane vrste su bolje produkovale lakaze u odnosu na Mn-oksidujuće peroksidaze, a najviša aktivnost lakaze (430 ± 30 U/L) ustanovljena je kod vrste *F. fomentarius*, dok je aktivnost ovog enzima kod *T. versicolor* iznosila 150 ± 30 U/L (slika 1).

Kod *F. fomentarius* su zabeležene znatno veće vrednosti MnP i MnIP (160 ± 40 U/L odnosno 210 ± 40 U/L) u odnosu na *T. versicolor* (10 ± 5 U/L odnosno 18 ± 2 U/L) (slika 1).

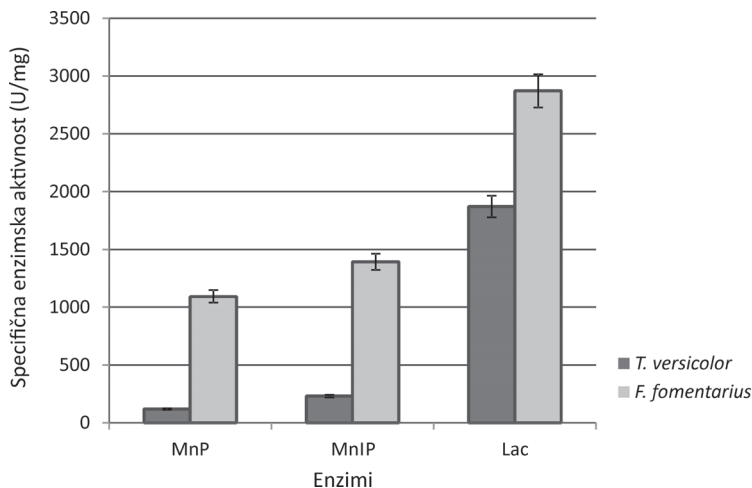
Specifične aktivnosti ispitivanih enzima su potvrdile trend njihovih apsolutnih aktivnosti (slika 2). Vrednosti specifičnih enzimskih aktivnosti su se kretale u opsegu od 2900 ± 200 U/mg (za lakazu kod *F. fomentarius*) do 120 ± 70 U/mg (za MnP kod *T. versicolor*)

U ranijim istraživanjima je pokazano da je slama poreklom od različitih poljoprivrednih kultura dobar supstrat za rast *T. versicolor* ali i drugih gljiva izazivača belog truljenja, iako u stanišnim uslovima nije supstrat za njihov razvoj (Knežević *et al.* 2013; Xu *et al.* 2015). Rezultati su pokazali da se ječmena slama za period kulti-



Slika 1. Aktivnost lakaze i Mn-oksidiujućih peroksidaza nakon 7 dana čvrste kultivacije *Trametes versicolor* i *Fomes fomentarius* na ječmenoj slami

Figure 1. Activity of laccase and Mn-oxidizing peroxidases after 7 days of solid-state cultivation of *Trametes versicolor* and *Fomes fomentarius* on barley straw



Slika 2. Specifična aktivnost lakaze i Mn-oksidiujućih peroksidaza nakon 7 dana čvrste kultivacije *Trametes versicolor* i *Fomes fomentarius* na ječmenoj slami

Figure 2. Specific activity of laccase and Mn-oxidizing peroxidases after 7 days of solid-state cultivation of *Trametes versicolor* and *Fomes fomentarius* on barley straw

vacije od 7 dana pokazala kao bolji izvor ugljenika za *F. fomentarius*, vrstu koja je u datom periodu proizvela najveću količinu enzima. Rezultati prethodnih istraživanja sugeriraju da produkcija ligninolitičkih enzima i efikasnost procesa delignifikacije u velikoj mjeri zavise od vrste organizma koja je korišćena kao i od uslova kultivacije i oksidativnog mehanizma samih enzima (Wan i Li 2010). Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima koje su dobili Lekounougou *et al.* (2008) za *T. versicolor*, pokazavši da Mn-oksidiujuće peroksidaze nisu uključene u inicijalnim fazama degradacije drvnog materijala, što objašnjava znatno veće aktivnosti lakaza kod obe ispitivane vrste nakon sedam dana kultivacije.

Međutim, aktivnost bilo kog pojedinačnog enzima ne može biti odgovorana za proces delignifikacije u celosti. Udeo ova tri ligninolitička enzima u delignifikaciji varira od gljive do gljive. U jednom organizmu kombinacija LiP-lakazne aktivnosti dovodi do delignifikacije, ali kod nekih drugih vrsta kombinacije MnP-lakazna ili LiP-MnP-lakazne aktivnosti dovode do delignifikacije (Arora *et al.* 2002). Takođe, Knežević *et al.* (2013) ukazuju da stepen ligninolize nije nužno u korelaciji sa nivoom enzimske aktivnosti. Pored toga, visoka proizvodnja enzima lakaza sa velikim brojem izoformi i niska proizvodnja peroksidaza ne mora nužno dovesti do visoke razgradnje lignina. Pošto u radu nije praćen broj izoformi enzima kao i procenat razgrađenih

komponentata lignoceluloze, ne može se sa sigurnošću utvrditi koja je od gljiva pogodnija za pretretman delignifikacije.

Zaključak

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je *F. fomentarius* znatno efikasniji producent ligninolitičkih enzima u poređenju sa *T. versicolor*, s obzirom na to da je za isto vreme inkubacije sa ovom gljivom razgrađena veća količina lignina nego sa *T. versicolor*. Međutim, kako su obe vrste neselektivne u uklanjanju lignina, ne može se sa sigurnošću utvrditi koja od navedenih gljiva je pogodnija za pretretman delignifikacije.

Buduća istraživanja treba da budu usmerena ka određivanju procenta razgrađenih komponentata lignoceluloze kako bi se utvrdio potencijal primene vrste *F. fomentarius* u pretretmanu ječmene slame.

Literatura

Achinas S., Euverink G. J. W. 2016. Consolidated briefing of biochemical ethanol production from lignocellulosic biomass. *Electronic Journal of Biotechnology*, **23**: 44.

Arora D. S., Chander M., Gill P. K. 2002. Involvement of lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase in degradation and selective ligninolysis of wheat straw. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **50** (2): 119.

Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**: 249.

Gedikli S., Aytar P., Ünal A., Yamaç M., Çabuk A., Kolankaya N. 2010. Enhancement with inducers of laccase production by some strains and application of enzyme to dechlorination of 2, 4, 5-trichlorophenol. *Electronic Journal of Biotechnology*, **13**: 2

Jović M. J., Pejin D. J., Kocić-Tanackov D. S., Mojović V. Lj. 2015. Primena gljiva koje razgrađuju

lignocelulozu za proizvodnju bioetanola iz obnovljive biomase. *Hemijska Industrija*, **69**: 627.

Janušić V., Ćurić D., Krička T., Voća N., Matin A. 2008. Predtretmani u proizvodnji bioetanola iz lignocelulozne biomase. *Poljoprivreda*, **14** (1): 53.

Knežević A., Milovanović I., Stajić M., Lončar N., Brčeski I., Vukojević J., Ćilerdžić J. 2013. Lignin degradation by selected fungal species. *Bioresource Technology*, **138**: 117.

Knežević Z. A. 2015. Ligninolitički potencijal i medicinska svojstva ekstraktata vrsta roda *Trametes* Fr. Doktorska disertacija. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, Studentski trg 16, Beograd

Lekounougou S., Mounougou S., Dumarçay S., Rose C., Courty P. E., Garbaye J., Gérardin P., Jacquot J. P., Gelhaye E. 2008. Initial stages of *Fagus sylvatica* wood colonization by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*: Enzymatic characterization. *International Biodeterioration and Biodegradation*, **61**: 287.

Sánchez C. 2009. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, **27**: 185.

Sarkar N., Ghosh S. K., Bannerjee S., Aikat K. 2012. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable Energy*, **37**: 19.

Schwarze F. W. M. R. 2007. Wood decay under the microscope. *Fungal Biology Reviews*, **30**: 1-38.

Vunduk J. 2017. *Hemijska karakterizacija i biološka svojstva polisaharidnih ekstraktata gljiva *Fomes fomentarius*, *Auricularia auricula-judae* i *Sparassis crispa**. Beograd: Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu

Xu C., Singh D., Dorgan K. M., Zhang X., Chen S. 2015. Screening of ligninolytic fungi for biological pretreatment of lignocellulosic biomass. *Canadian Journal of Microbiology*, **61** (10): 745.

Wan C., Li Y. 2010. Microbial delignification of corn stover by *Ceriporiopsis subvermispora* for improving cellulose digestibility. *Enzyme and Microbial Technology*, **47**: 31.

Teodora Savić

Fomes fomentarius and *Trametes versicolor* as Ligninolytic Enzyme Producers During Solid State Cultivation on Barley Straw

Lignocellulosic biomass consists of different plant residues from agriculture and forestry, as well as from the processing industry. This material represents the most widespread renewable resource. Chemical characteristics of the structural components make it a very valuable biotechnological substrate for obtaining food, nutrients, paper pulp or bioenergies. Cellulose ethanol is an alternative to liquid fossil fuels, so modern research is focused on finding an effec-

tive method for obtaining a high yield of sugar. One precondition for using lignocelluloses in the production of bioethanol is the removal of lignin, as an integral component whereby fungi-causing agents of white rot for the production of ligninolytic enzymes may play a significant part. The aim of this experiment was to determine the capacities of the species *Fomes fomentarius* and *Trametes versicolor* to produce the ligninolytic enzymes during solid state on the barley straw for potential application in delignification pretreatment. The studied species showed a varying degree of activity of lacasse, MnP and MnIP after seven days of solid cultivation on barley straw as a source of carbon. The species *Fomes fomentarius*, on the basis of the obtained results, proved to be a significantly more efficient producer of ligninolytic enzymes compared to *T. versicolor*.

