

# Biorazgradnja lignina pomoću bakterija

---

**Rukavina, Matea**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:178709>

*Rights / Prava:* [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-08**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski studij Nutricionizam**

**Matea Rukavina  
0058213532**

**BIORAZGRADNJA LIGNINA POMOĆU BAKTERIJA  
ZAVRŠNI RAD**

**Predmet: Biološka razgradnja organskih spojeva**

**Mentor: doc. dr. sc. Dijana Grgas**

**Zagreb, 2022.**

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski sveučilišni studij Nutricionizam

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo  
Laboratorij za biološku obradu otpadnih voda

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Nutricionizam

**Biorazgradnja lignina pomoću bakterija**

**Matea Rukavina, 0058213532**

**Sažetak:**

Lignin je složen polimer vrlo kompleksne strukture, sastavni je dio stanične stijenke biljaka i nastaje u velikim količinama tijekom proizvodnje papira. Lignin je vrijedan izvor za proizvodnju industrijski važnih spojeva, aromatskih spojeva te energije. Obzirom da je fizikalno-kemijska razgradnja lignina neekonomična, te stvara polutante, interes znanstvenika je sve više usmjeren na mikrobnu razgradnju lignina. Biorazgradnja lignina se uglavnom provodi pomoću funga, iako i bakterijaka razgradnja lignina ima svoje prednosti. U biorazgradnji lignina sudjeluju ekstracelularni enzimi lignin peroksidaza, mangan ovisna peroksidaza, lakaza, svestrana peroksidaza i peroksidaza dekolizacije boje. Biorazgradnja lignina pomoću bakterija se odvija pomoću  $\alpha$ -proteobakterija,  $\gamma$ -proteobakterija, nekih Firmikuta i aktinomiceta. Različite bakterije upotrebljavaju različite puteve razgradnje lignina.

**Ključne riječi:** lignin, depolimerizacija, mineralizacija, bakterije

**Rad sadrži:** 23 stranice, 5 slika, 50 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

**Mentor:** doc. dr. sc. Dijana Grgas

**Komentor:**

**Pomoć pri izradi:**

**Datum obrane:** srpanj 2022.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
University undergraduate study Nutrition

Department of Food-technology engineering  
Laboratory for biological wastewater treatment

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Nutrition

**Biodegradation of lignin by bacteria**

**Matea Rukavina, 0058213532**

**Abstract:** Lignin is a complex polymer with a very complex structure, it is a part of the cell wall of plants and is produced in large quantities during paper production. Lignin is a valuable source for the production of industrially important compounds, aromatic compounds and energy. Given that the physico-chemical degradation of lignin is uneconomical and produces pollutants, the interest of scientists is increasingly focused on the microbial degradation of lignin. Biodegradation of lignin is mainly carried out with fungi, although bacterial decomposition of lignin also has its advantages. Extracellular enzymes lignin peroxidase, manganese-dependent peroxidase, laccase, versatile peroxidase and dye decolorization peroxidase participate in the biodegradation of lignin. Biodegradation of lignin by bacteria takes place with  $\alpha$ -proteobacteria,  $\gamma$ -proteobacteria, some Firmicutes and actinomycetes. Different bacteria use different lignin degradation pathways.

**Keywords:** lignin, depolymerisation, mineralization, bacteria

**Thesis contains:** 23 pages, 5 figures, 50 references

**Original in:** Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

**Mentor:** Dijana Grgas, PhD, Assistant Professor

**Thesis defended:** July, 2022

## Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. LIGNIN.....	2
2.2. RAZGRADNJA LIGNINA.....	7
2.3. BIOLOŠKA RAZGRADNJA LIGNINA.....	8
2.4. RAZGRADNJA LIGNINA POMOĆU FUNGA.....	10
2.5. RAZGRADNJA LIGNINA POMOĆU BAKTERIJA.....	12
2.5.1. Bakterijski lignin enzimi.....	13
2.5.2. Primjeri razgradnje lignina pomoću bakterija.....	13
3. ZAKLJUČCI.....	18
4. POPIS LITERATURE .....	19

## 1. UVOD

Lignin je polimer vrlo kompleksne strukture sastavljen od velikog broja aromatskih jedinica (Boerjan i sur., 2003). Lignin čini oko 30 % organskog ugljika na Zemlji, dio je lignocelulozne biomase, sastavni je dio stanične stijenke, i glavni nusproizvod iz industrije papira i pulpe (Tuomela i sur., 2000).

U posljednje vrijeme sve je više naglasak na kružnoj ekonomiji i održivosti, pa se tako lignin razmatra kao potencijal za proizvodnju biogoriva, zatim kao alternativa u proizvodnji kemikalija a koje se dobivaju iz derivata nafte, te se proizvode preparati lignina u širokom spektru djelatnosti, poput farmaceutske, prehrambene i građevinske industrije (Calvo-Flores i Dobado, 2010).

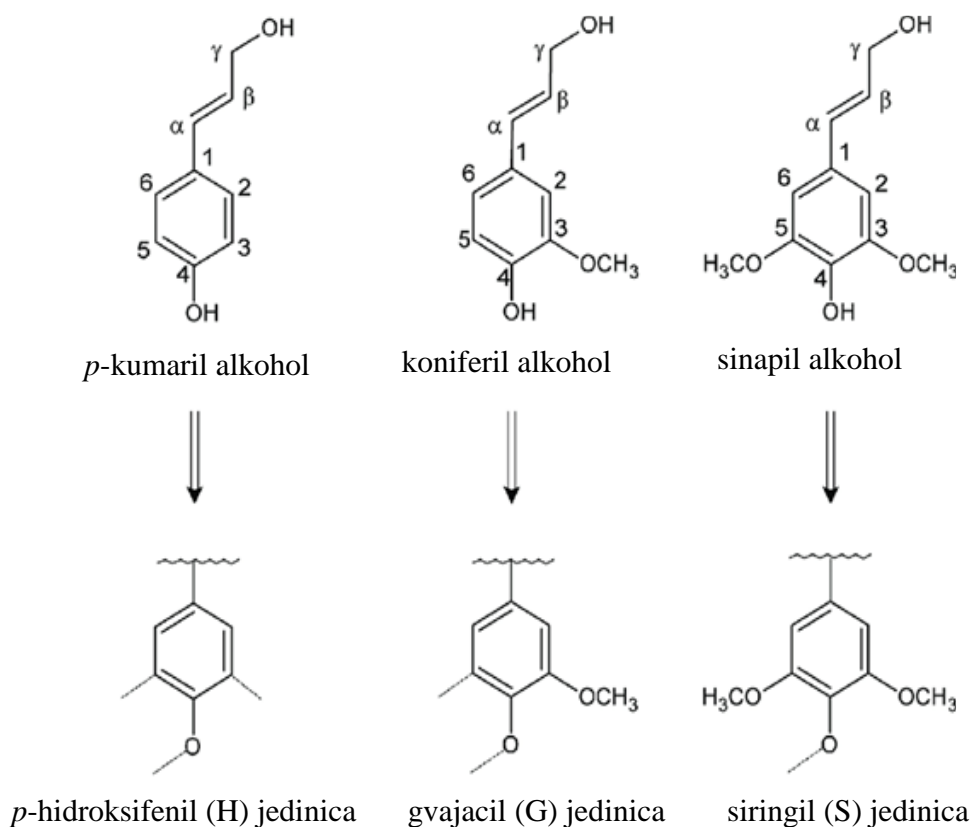
Biološka razgradnja lignina je jeftina i ekološki prihvatljiva opcija, i povoljnija u odnosu na fizikalno-kemijske postupke. Provodi se pri blagim uvjetima i tako se smanjuje potreba za energijom i učinak na okoliš (Christopher i sur., 2014). Biološka razgradnja lignina se može provoditi pomoću bakterija i funga. Bijele i smeđe funge truljenja se često koriste za razgradnju lignina jer imaju mogućnost lučenja ekstracelularnih lignolitičkih enzima (Sánchez, 2009). Neke bakterije koje mogu razgrađivati lignin su *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6, *Nocardia*, *Streptomyces viridosporus* T7A, *Comamonas*, *Rhodococcus* i sulfat reducirajuće bakterije (Yadav i sur., 2022).

Cilj ovog rada je bio literaturni pregled znanstvenih radova razgradnje lignina pomoću bakterija.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. LIGNIN

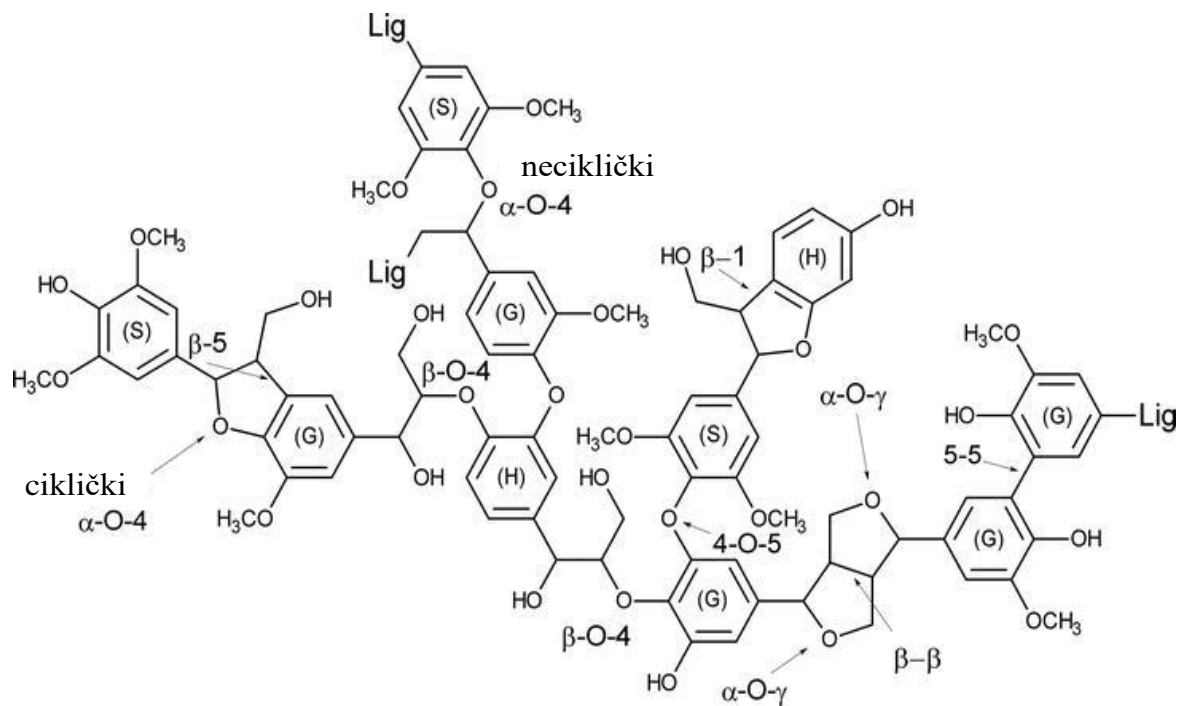
Lignini su kompleksne racemične molekule aromatske strukture. Kemijski sastav lignina se uglavnom sastoji od tri monomera hidroksicinamil-alkohola: koniferil alkohol, sinapil alkohol i *p*-kumaril alkohol. Nakon što se monolignoli ugrade u polimer lignina, nastaju *p*-hidroksifenil (H), gvajacil (G), i siringil (S) fenilpropanoid (slika 1). Lignin se ne može opisati jednom strukturnom formulom, već se svojstva lignina opisuju funkcionalnim skupinama, elementima i kombinacijom skupina (Schoenherr i sur., 2018; Boerjan i sur., 2003).



**Slika 1.** Kemijska struktura monolignola i odgovarajućih građevnih jedinica lignina (prema Schoenherr i sur., 2018)

Lignin je sastavni dio stanične stijenke biljaka. Dvosupnice koje pripadaju skupini kritosjemenjača (tvrdo drvo, *engl. hardwood*) uglavnom se sastoje od G i S jedinica, a vrlo malo od H jedinica. Golosjemenjače (meko drvo, *engl. softwood*) sadrže lignine pretežno

sastavljene od G jedinica s vrlo malim udjelom H jedinica. Jednosupnice sadrže G i S jedinice u približno jednakim omjerima, a H jedinica sadrže znatno više u odnosu na dvosupnice (Boerjan i sur., 2003). Budući da je lignin racemične strukture, ove strukture prikazuju bilijune fizički različitih izomera. Mnogi fenoli su monomeri lignina, te njihovim međusobnim povezivanjem nastaju polimeri kompleksne strukture (slika 2) (Schoenherr i sur., 2018).

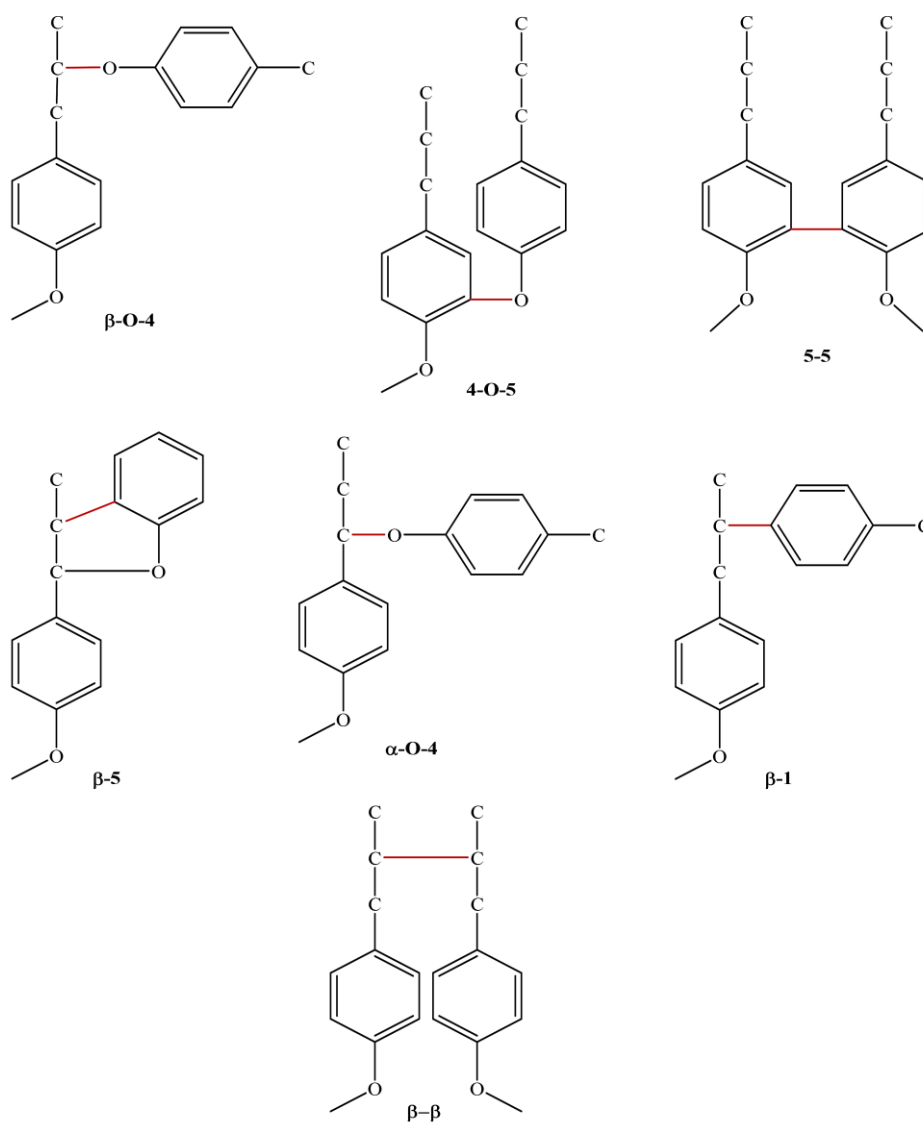


**Slika 2.** Prikaz hipotetske strukture lignina (prema Schoenherr i sur., 2018)

Biosinteza monolignola započinje deaminacijom fenilalanina te uključuje reakcije hidroksilacije aromatskog prstena nakon čega slijedi O-metilacija i pretvorba karboksilnog bočnog lanca u alkoholnu skupinu (Boerjan i sur., 2003). Zatim slijedi prijenos jedinica monolignola do stanične stijenke. Tamo prolaze kroz procese oksidacije i polimerizacije. Unutar kambijalnog tkiva golasjemenjača, te manjeg broja kritosjemenjača nalaze se visoke koncentracije monolignol-4-O-β-D-glukozida za kojeg se smatra da je skladišni ili transportni oblik monolignola. Također, smatra se da su za skladištenje monolignola koji posljedično tvore strukturu lignina zadužene tri molekule. To su uridin-difosfat-glukoza, koniferil-alkohol glukoziltransferaza (Förster i sur., 2001) i koniferin-β-glukozidaza

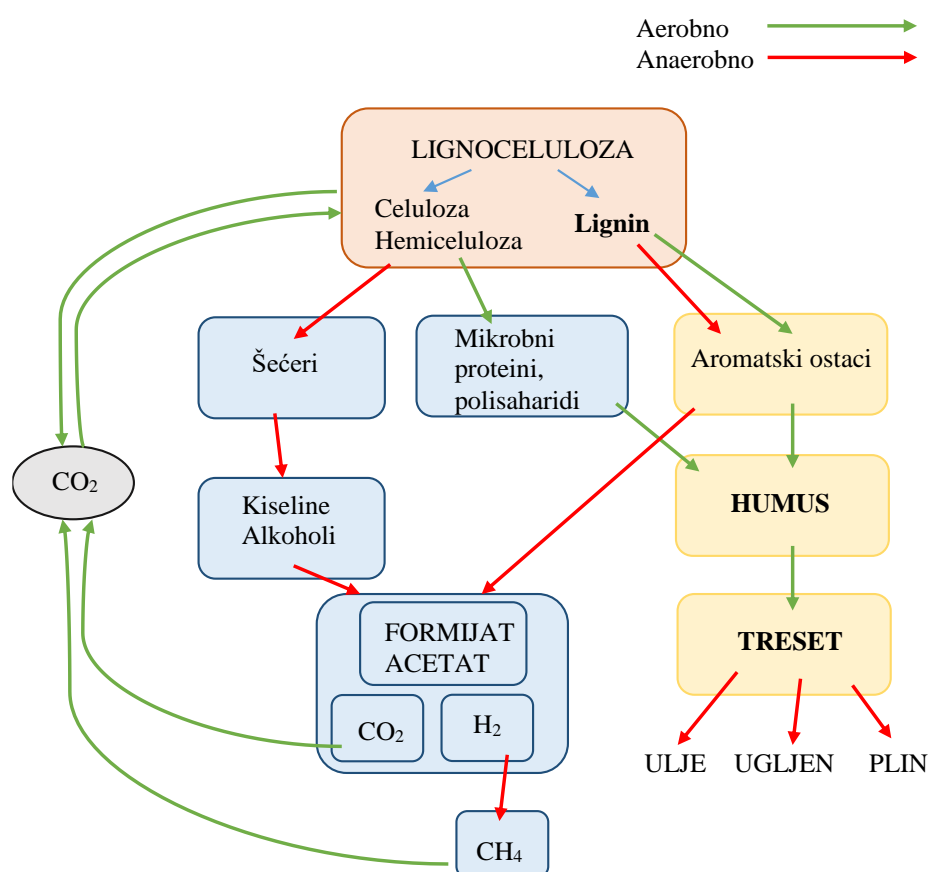


(Dharmawardhana i sur., 2002). Nakon transporta jedinica, slijedi proces dehidrogenacije kojeg kontroliraju enzimi poput peroksidaze, lakaze, polifenol-oksidge te koniferil alkohol oksidge (Boerjan i sur., 2003). Lignifikacija je proces prilikom kojega se novi monomer (obično monolignol) veže na rastući polimer (sve veze su  $\beta$  veze). Nakon što se radikali povežu, proces lignifikacije je isključivo kemijske prirode, nije uvjetovan ni enzimima ni proteinima (Boerjan i sur., 2008). Spajanje formiranih oligomera tvori jedinice povezane 5-5 vezama ili 5-O-4 vezama. Najčešće formirana veza je  $\beta$ -O-4 ( $\beta$ -aril-eter) veza. Kemijski se vrlo lako cijepa. Ostale veze prisutne u ligninu su znatno otpornije na kemijsko djelovanje. To su  $\beta$ -5,  $\beta$ - $\beta$ , 5-5 i 5-O-4 veze, te  $\beta$ -1 veza (Boerjan i sur., 2003) (slika 3).



**Slika 3.** Kemijske veze unutar molekule lignina (Algahtani i sur., 2022)

Položaj formiranja veza se odražava na otpornost lignina. Tako su primjerice lignini s G jedinicama otporniji od lignina sa S jedinicama. Iako nastaju brojni stereocentri svaki put kada se monomeri lignina povežu  $\beta$  vezama, krajnji polimer je optički inaktivan. Skupine koje su stalno prisutne u strukturnim analizama lignina su cinamil i benzil aldehidne grupe. U ligninima kritosjemenjača aldehidi su vrlo gusto zbijeni, dok unutar golosjemenjača tvore vrlo rijetke veze. Lignin zajedno sa celulozom i hemicelulozom sudjeluje u izgradnji stanične stijenke, te održavanju njezina integriteta. Okolišni uvjeti također utječu na kemijski sastav i količinu lignina (Boerjan i sur., 2003). Ovisno o biljnoj vrsti, varira i sastav i udio lignina (Calvo-Flores i Dobado, 2010). Tako se najveća koncentracija lignina nalazi unutar golosjemenjača, te potom nešto manje unutar kritosjemenjača. U zeljastim biljkama nalazi se u vrlo niskim koncentracijama (Buranov i Mazza, 2008). Lignin, zajedno sa celulozom i hemicelulozom predstavlja glavni izvor nefosilnog ugljika i doprinosi kruženju ugljika u prirodi (slika 4) (Boerjan i sur., 2003).



**Slika 4.** Globalni ciklus ugljika (prema Tuomela i sur., 2000)

Danas se na tržištu mogu pronaći brojni preparati lignina dobiveni procesima ekstrakcije i izolacije. Preparati lignina imaju primjenu u širokom spektru djelatnosti obzirom da se razlikuju po kemijskom sastavu, fizikalnim karakteristikama te molekulskoj masi, a primjeri su kraft lignin, lignosulfonati, organosolv lignin, te lignin eksploDIRAN parom (Calvo-Flores i Dobado, 2010).

Većina proizvedene pulpe u svijetu se dobiva iz Kraft procesa u kojem se drvo obradi te se iz njega dobije pulpa. Prilikom procesa dolazi do odvajanja krute faze koju čini celuloza, i tekuće faze jer se dodaje otopina  $\text{Na}_2\text{S}/\text{NaOH}$  pri temperaturi 155 - 175 °C. Delignifikacijom nastaje kraft lignin. Dolazi do taloženja tekuće faze, te se potom dodaje kisela otopina zbog neutralizacije te naposljetku suši do postizanja čvrstog oblika. Kraft lignin karakterizira niža molekulska masa u usporedbi s klasičnim ligninom, a nastali lignin je modificiran, netopiv je u vodi, i topiv u jakoj bazi. Većina komercionalnog lignina ima kemijsku strukturu koja nastaje stvaranjem kemijske reakcije između alkalnog lignina s natrijevim sulfitom i formaldehidom (Calvo-Flores i Dobado, 2010).

Lignosulfonati su produkti nastali iz otpadne tekućine iz drva golosjemenjača koja nastaje tijekom ekstrakcije lignina i pri čemu se koriste sulfiti i bisulfiti. Lignosulfati su i hidrofobne i hidrofilne molekule. U svojoj strukturi mogu sadržavati sulfonatne skupine, ugljikohidratne skupine, neorganske komponente te određene drvne ekstrakte. Proces sinteze je puno blaži u usporedbi s Kraft procesom, a sama molekulska masa završnih proizvoda ove reakcije je viša od molekulske mase kraft lignina (Calvo-Flores i Dobado, 2010).

Organosolv lignini predstavljaju skupinu lignina koji se dobivaju nakon što se lignin ekstrahira iz biomase koristeći organska otapala, među kojima su najkorišteniji alkoholi koji se kombiniraju s drugim otapalima ili reagensima. Postupak se odvija pri uvjetima visoke temperature i visokog tlaka. Većina ovih lignina u svojoj kemijskoj strukturi ne sadrže sumpor (Calvo-Flores i Dobado, 2010).

Lignin eksploDIRAN parom se dobiva postupkom u kojem se drvo obrađuje parom pri visokoj temperaturi (180 - 200 °C) i pri visokom tlaku, prilikom čega se dodaju i određene kemikalije. Do smanjenja molekulske mase lignina dolazi zbog parcijalne hidrolize lignina. Da bi se proizveli ugljikohidrati za proces fermentacije često se ovdje primjenjuje i enzimaska hidroliza (Calvo-Flores i Dobado, 2010).

Lignin i njegovi derivati mogu uzrokovati specifične promjene u živim organizmima. Tako

primjerice neki derivati lignina imaju antioksidativna svojstva, zatim antibakterijska, antikancerogena te antivirusna svojstva *in vitro*, nadalje, prebiotičko djelovanje u stočnoj hrani, a neki imaju baktericidna svojstva (Calvo-Flores i Dobado, 2010). Biopolimeri na bazi lignina imaju mogućnost smanjenja genotoksičnosti lijekova te smanjenja razvoja nuspojava. Dijetalna vlakna koja su otporna na probavu, a za koje se smatra da sadrže lignin su važna u apsorpciji žučne kiseline i tako utječu na metabolizam lipida (Eastwood i Kritchevsky, 2005). Ligninosulfonat je bezopasan sastojak mnogih disperzanata, emulgatora, sekvestranata. Koristi se za izradu i zadržavanje specifičnih svojstava građevinskih materijala, u proizvodnji određenih briketa, za proizvodnju ekološki prihvatljivih materijala, kao dekontaminant vode i tla. Obzirom na nisku toksičnost, dodaje se stočnoj hrani, te u udjelu od samo 2 % omogućuje nutritivno adekvatnu ishranu stoke. Omogućuje dotok određenih iona tj. mikronutrijenata koji su potrebni za rast biljke (Calvo-Flores i Dobado, 2010).

Lignin se koristi za proizvodnju ekološki prihvatljivih materijala, primjerice bioplastike. Bioplastiku čine lignini s niskim udjelom sumpora u kombinaciji sa biljnim vlaknima te voskom. Dodatkom aditiva poput voska poboljšavaju se svojstva, te kontakt s vodom neće uzrokovati štetu, budući da su lignini s niskim udjelom sumpora topivi u vodi (Calvo-Flores i Dobado, 2010).

Kada se na ligninu naprave modifikacije, mogu se dobiti visoko vrijedni proizvodi, poput vanilina, dimetil sulfoksida, aktivnog ugljena, karbonskih vlakana. Vanilin je glavna komponenta prirodnog ekstrakta vanilije. Dimetil sulfoksid je nisko toksično polarno otapalo. Nastaje oksidacijom dimetil sulfida koji je nusproizvod kraft procesa (*engl. Kraft pulping*). Za proizvodnju aktivnog ugljena kao sirovina se koristi kraft lignin, uz različite druge biljne materijale i  $H_3PO_4$ . Aktivni ugljen dobiven iz lignina pokazuje bolja adsorpcijska svojstva u odnosu na aktivni ugljin dobiven drugim postupcima. Lignin također predstavlja sirovinu za proizvodnju karbonskih vlakana (Calvo-Flores i Dobado, 2010).

## **2.2. RAZGRADNJA LIGNINA**

Razgradnja lignina se može provoditi kemijski (Ma i sur., 2008), termalno (Brebu i Vasile., 2010), naprednim oksidacijskim procesima – fotokatalitički (Kansal i sur., 2008), pirolizom, elektrokemijski (Jing i sur., 2020) ili enzimskim putem (Yadav i sur., 2022).

Lignin se ne može razgraditi većinom metoda razgradnje (Yadav i sur., 2022) zbog kompleksne i nepravilne strukture i zato što nema standardne ponavljajuće kovalentne veze (Zhu i sur., 2017), što ga čini rekalcitrantnim materijalom (Kansal i sur., 2008).

Biološkim metodama razgradnje lignina se daje prednost u odnosu na kemijske procese zato što kod bioloških procesa nema gubitka iskorištenja kao primjerice kod termalne razgradnje lignina, te zbog mogućnosti da se u biološkim metodama upravlja biorazgradnjom lignina na način da se koriste selektivni lignolitički enzimi i mikroorganizmi, te se na taj način izbjegava nastanak neželjenih nusprodukata. Biološke postupke karakteriziraju blagi uvjeti provedbe procesa što smanjuje potrebu za energijom i učinak na okoliš (Christopher i sur., 2014).

### 2.3. BIOLOŠKA RAZGRADNJA LIGNINA

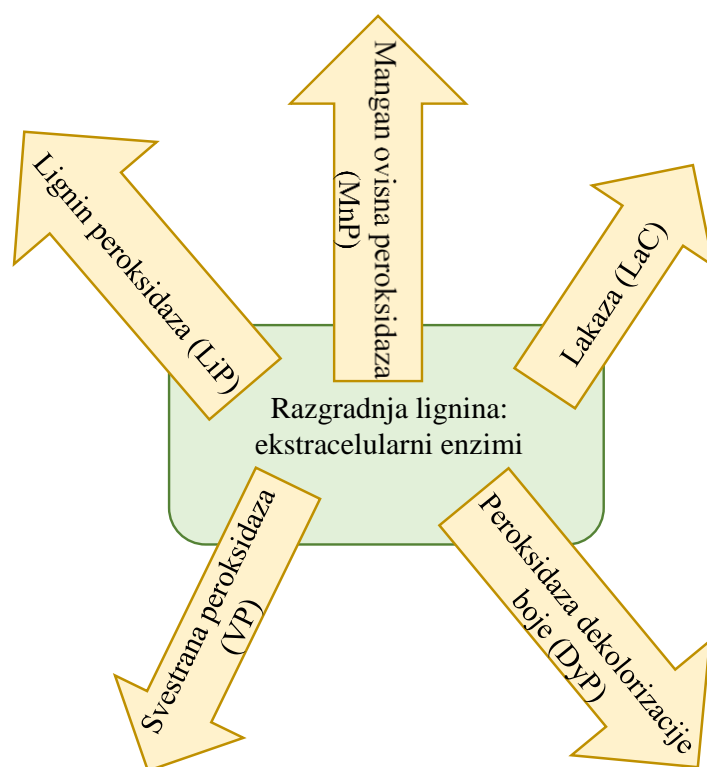
Lignin karakterizira razgranata trodimenzionalna struktura (slika 2) i C-C i C-O eter veze (slika 3) pa hidrolitički enzimi ne mogu pocijepati lignin (Abdel-Hamid i sur., 2013). Također, oksidoreduktaze niskog potencijala poput biljnih oksidaza koje iniciraju polimerizaciju lignina, ne mogu oksidirati ne-fenolne aromatske podjedinice lignina. Takav sastav lignina je rezultirao razvojem funga i bakterija koje su razvile nekoliko skupina enzima koji imaju lignolitičku aktivnost (Brown i Chang, 2014; Abdel-Hamid i sur., 2013; Bugg i sur., 2011).

Biorazgradnja lignina je oksidativan proces za koji je potrebna proizvodnja ekstracelularnih lignolitičkih enzima (slika 5), i to lignin peroksidaza (LiP), mangan peroksidaza (MnP), lakaza (LaC), svestrana peroksidaza (VP, *engl. versatile peroxidase*) i peroksidaza dekolorizacije boje (DyP) (Yadav i sur., 2022).

Vezujući afinitet lignin razgrađujućih enzima je povezan sa strukturom i vrstom lignina. Interakcije između aminokiselina i lignina u enzimima uključuju tri osnovne nekovalentne veze: hidrofobne veze, elektrostatske veze i vodikove veze (Guo i sur., 2014).

Budući da je sastav lignina jako varijabilan, kao i korišteni enzimi za razgradnju lignina, produkti razgradnje također variraju (Fisher i Fong, 2014). Tijekom višestrukih biokemijskih transformacija dolazi do cijepanja C-C i C-O monomerskih veza, hidroksilacija, demetilacije, modifikacija bočnih lanaca i drugo. Sve transformacije se događaju uglavnom istovremeno

(Sánchez, 2009).



**Slika 5.** Ekstracelularni enzimi koji sudjeluju u razgradnji lignina (prema Yadav i sur., 2022)

Biološka razgradnja lignina se može provoditi pomoću funga i bakterija (Asina i sur., 2016), pri čemu funge i bakterije ne proizvode sekundarno onečišćenje, te predstavlja zeleni i prijateljski proces za okoliš (Niu i sur., 2021). Bijele i smeđe funge truljenja imaju važnu ulogu u razgradnji lignocelulozne biomase zbog lučenja ekstracelularnih lignolitičkih enzima (Sánchez, 2009). Različite funge bijelog truljenja proizvode različite kombinacije enzima, primjerice LiP i MnP, MnP i lakaza, LiP i lakaza. Funge smeđeg truljenja mogu uspješno razgrađivati celulozu i hemicelulozu, ali mogu ograničeno razgrađivati lignin (Tuomela i sur., 2000).

Razgradnja lignina se odvija u dvije faze (Bugg i sur., 2011). Tijekom prve faze homociklički aromatski spojevi se konvertiraju u protokatehinsku kiselinu i katehol. Tijekom druge faze nastaje serija intermedijata zbog cijepanja središnjeg prstena. Tijekom biokemijske konverzije lignina, proizvedeni aromatski spojevi (katehol i protokatehinska kiselina) su

glavni intermedijati. Prvi korak razgradnje lignina je cijepanje uglavnom  $\beta$ -O-4 aril eter veze u fenilen jedinici (Niu i sur., 2021).

Jedan od procesa u kojem se odvija biorazgradnja lignina je kompostiranje. Tijekom kompostiranja aktivna je mješovita mikrobna zajednica prisutna u kompostnoj hrpi. Tijekom procesa kompostiranja mikroorganizmi prevode organski materijal u kompost (humus), ugljikov dioksid, vodu i toplinu. Pretpostavlja se da je humus formiran uglavnom iz lignina, polisaharida i dušikovih spojeva, tako da tijekom procesa kompostiranja ne dolazi do potpune mineralizacije lignina. Tijekom kompostiranja razvija se temperatura i doseže termofilnu fazu koja pridonosi brzom razgradnji lignoceluloze. Tijekom kompostiranja za razgradnju lignina zaslužne su termofilne mikrofungi i aktinomicete (Tuomela i sur., 2000).

## 2.4. RAZGRADNJA LIGNINA POMOĆU FUNGA

Basidiomicete su najviše korištene za istraživanje modifikacija i razgradnje lignina, posebno na fungama bijelog truljenja i nešto manje na fungama smeđeg truljenja (Fisher i Fong, 2014). Aerobne funge bijelog truljenja mogu provesti potpunu razgradnju lignina (Knežević i sur., 2013). U istraživanjima je najčešće korištena funga bijelog truljenja *Phanerochaete chrysosporium*, ali i druge vrste poput *Pleurotus ostreatus*, *Coriolus versicolor*, *Cyathus stercoreus*, *Ceriporiopsis subvermispota* (Abdel-Hamid i sur., 2013). Strogi uvjeti rasta funga ograničavaju njihovu industrijsku primjenu, koja zahtjeva visoko iskorištenje i produktivnost (Niu i sur., 2021).

U lignolitičke enzime primarno spadaju obitelji peroksidaza i lakaze (slika 5) (Fisher i Fong, 2014).

Lignin peroksidaza (LiP) može oksidirati mjesta posebno visokog redoks potencijala uključujući umjereno aktivne aromatske prstenove ne-fenol modelnih lignin spojeva koji mogu činiti do 90 % polimera (Fisher i Fong, 2014). LiP sadrži željezove ione. Veličina lignin supstrata utječe na katalitičku učinkovitost LiP, jer se manji lignin supstrati mogu lakše razgraditi. LiP posreduje prilikom fenol hidroksil razgradnje (Niu i sur., 2021).

Mangan-ovisna peroksidaza (MnP) ne može oksidirati ne-fenolne lignin modelne spojeve, ali može reducirati amine, boje i fenolne lignin modelne spojeve (Zhu i sur., 2017). Također sadrži željezove ione. MnP može ukloniti metilne skupine na fenol hidroksil skupinama i

pridonosi narednim koracima razgradnje do stvaranja malih molekula (Niu i sur., 2021).

Svestrana peroksidaza (VP) ima svojstva LiP i MnP katalitičke aktivnosti, može cijepati nefenole visokog redoks potencijala i aromatske spojeve i amine nižeg potencijala (Perez-Boada i sur., 2005).

Funge bijelog truljenja luče pomoćne enzime poput aril-alkohol oksidaze iz *Pleurotus eryngii* i glioksal oksid iz *P. chrysosporium* koje proizvode vodikov peroksid potreban peroksidazama (Fisher i Fong, 2014).

Brojne funge luče oksidoreduktaze poput kinin oksidoreduktaze, i celobioze dehidrogenaze koje mogu reducirati radikalne metoksi-skupine spojeva deriviranih iz lignina (Fisher i Fong, 2014).

Lakaza je bakar oksidaza koju proizvode brojni organizmi: funge, bakterije, biljke, insekti. Lakaze mogu oksidirati aromatske fenole i amine, uništavajući stabilnost aromatskog prstena. Tako lakaze dekarboksiliraju, demetiliraju i demetoksiliraju fenolne i metoksifenolne kiseline. Fungalne lakaze imaju viši redoks potencijal od bakterijskih lakaza (Fisher i Fong, 2014). Lakaza je sekundarni metabolit koji se proizvodi u uvjetima koji limitiraju rast, posebno pri ograničenju dušikom, što ima negativan učinak na iskorištenje enzima (Christopher i sur., 2014). LaC može učinkovito razgraditi G-lignin. Lakaze i peroksidaze razgrađuju lignin preko slobodnih radikala niske molekularne mase, poput hidroksila, koji depolimerizira polimere lignina koji sadrže fenolne i nefenolne skupine, i također mineralizira netopivi lignin (Janusz i sur., 2017). Ti enzimi nisu specifični i oksidiraju različite fenolne aromatske spojeve i različite ne-fenolne lignin spojeve (Yadav i sur., 2022). Lakaze posjeduju široku supstratnu specifičnost te mogu koristiti atmosferski kisik kao elektron donor umjesto vodikovog peroksida kojeg koriste peroksidaze. Ponekad se koriste i medijatori za lakaze za učinkovitiju razgradnju lignina (Christopher i sur., 2014). Medijator je mali kemijski spoj kojeg lakaza kontinuirano oksidira i supstrat reducira. Budući da je supstrat prevelik za aktivno mjesto lakaze, uloga medijatora je prijenos elektrona između enzima i supstrata i na taj način se rješava sterički problem između njih. Primjeri medijatora su: 3-hidroksi antranilinska kiselina, 4-hidroksibenzojeva kiselina, fenolsulfonftalein, acetosiringon, siringaldehid, vanilin, metil siringat (Christopher i sur., 2014).

Peroksidaza dekolorizacije boje (DyP) ima drugačiju strukturu i karakteristike koje se povezuju s biljnim odnosno mikrobnim peroksidazama (Falade i sur., 2017). DyP peroksidaza



potencijalno razgrađuje lignin. Ima sposobnost oksidiranja boja, ne-fenolnih lignin spojeva poput veratril alkohola i  $\beta$ -O-4 veze (Arapova i sur., 2020). Razgradnja lignina pomoću funga smeđeg truljenja uključuje oksidacijske reakcije pomoću ne-enzimskih metoda koje proizvode –OH radikale pomoću Fenton kemije (Purnomo i sur., 2010).

## 2.5. RAZGRADNJA LIGNINA POMOĆU BAKTERIJA

Bakterijski metabolizam lignina nije toliko detaljno proučen kao fungalni metabolizam lignina (Zhu i sur., 2017). Bakterije se također mogu primijeniti za razgradnju lignina zbog njihove izuzetne prilagodljivosti na okoliš, raznolike biokemije i proizvodnje enzima (Raj i sur., 2007). U odnosu na funge, bakterije mogu tolerirati širi raspon vrijednosti pH, temperature i dostupnosti kisika, te je njima lakše upravljati (Niu i sur., 2021). Lignolitičke bakterije su pronađene u zemlji, kompostu, sedimentima, životinjama, želudcu insekata i kanalizaciji (Yadav i sur., 2022; Zhu i sur., 2017).

Razgradnja lignina je oksidativna iako bi redukcijske reakcije mogle slično doprinjeti (Janusz i sur., 2020). Genomska i proteomska istraživanja lignin-reducirajućih bakterija su pokazala postojanje bakterijskih lakaza i DyP peroksidaza i nedostatak LiP, MnP i VP enzima (De Gonzalo i sur., 2016).

Različite bakterije koriste različite puteve razgradnje lignina (Ahmad i sur., 2010). Tako primjerice postoje bakterije koje posjeduju oksidativne enzime za modifikaciju lignina pomoću hidroksilacije ili demetilacije poput citokrom P450 monooksigenaze (P450s), peroksidaze za dekolorizaciju boje (DyP), lakaze, mangan superoksid dismutaze (Rashid i sur., 2015). Neke bakterije u odsutnosti vodikovog peroksida koriste  $\beta$ -ketoacid put ( $\beta$ -KAP) za razgradnju lignina, poput *Rhodococcus jostii* RHA1 (Ahmad i sur., 2010).  $\beta$ -KAP put uključuje razgradnju aril-prstena pomoću enzima, pri čemu se aromatski spojevi prevode u metabolite ciklusa tri karboksilne kiseline s devet esencijalnih enzima i intermedijata (Wells i Ragauskas, 2012).

Nekim bakterijama je za razgradnju lignina potreban još jedan izvor ugljika, poput *Enterobacter lignolyticus* SCF1 kojoj je potrebna ksiloza (DeAngelis i sur., 2013). Kako je razgradnja lignina prespora da bi lignin služio kao izvor energije, mikrobna razgradnja lignina zahtijeva izvor energije, unatoč tome što je potpuna razgradnja lignina visoko

egzotermna. Zbog toga mnogi mikroorganizmi ne mogu koristiti lignin kao jedini izvor ugljika ili energije (Zhu i sur., 2017).

Primjena psihotrofnih bakterija koje imaju sposobnost razgradnju lignina je obećavajući način za razgradnju lignina u hladnim podnebljima za vraćanje agrikulturnih ostataka na zemljište (Jiang i sur., 2019).

### 2.5.1. Bakterijski lignin enzini

Bakterije koje imaju sposobnosti modificiranja i razgradnje lignina spadaju u  $\alpha$ -proteobakterije,  $\gamma$ -proteobakterije, neke Firmikute i aktinomicete (Brown i Chang, 2014; Bugg i sur., 2011; Ahmad i sur., 2010).

Primjeri bakterija koje razgrađuju lignin i koje spadaju u *Actinomycetes* su *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6, *Nocardia*, *Streptomyces viridosporus* T7A, *Comamonas*, *Rhodococcus* i sulfat reducirajuće bakterije. Kada se te bakterije uzgajaju na lignocelulozi luče ekstracelularne peroksidaze i razgrađuju i lignin i ugljikohidratnu komponentu lignoceluloze (Yadav i sur., 2022). Široka skupina bakterija može razgraditi lignin i 'C-označen dihidroksi fenol, poput aktinomiceta (*Nocardia*, *Streptomyces*, *Thermomonospora*, *Micromonospora*) i eubakterija (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Xantomonas*, *Bacillus*, *Aeromonas*) (Yadav i sur., 2022). Neke bakterije koje pokazuju sposobnost razgradnje lignina su *Pandoraea sp. B-6*, *Novosphingobium sp. B-7*, *Bacillus sp. Strains CS-1&CS-2*, *Citrobacter freundii* (FJ581026), *Citrobacter sp.* (FJ581023), *Pandoraea sp.*, *Streptomyces spp. strains F-6*, *Streptomyces spp. strains F-7* (Asina i sur., 2016). Najproučavanija bakterija koja razgrađuje lignin, *Streptomyces viridosporus* T7A, proizvodi nekoliko ekstracelularnih peroksidaza koje depolimeriziraju lignin na način da cijepaju  $\beta$ -aril eter vezu što rezultira otpuštanjem fenola niske molekularne mase (Fisher i Fong, 2014). *Pseudomonas putida* mt-2 i *Rhodococcus jostii* RHA1 su prepoznate kao vrste sposobne za razgradnju lignina (Ahmad i sur., 2011; Ahmad i sur., 2010).

Iako su fungalni sustavi učinkovitiji u razgradnji lignina od bakterijskih sustava, bakterijski sustavi imaju neke sposobnosti da modificiraju lignin i otpuste manje aromatske spojeve koji bi mogli biti uvezani u stanicu i metabolizirani preko aromatskog katabolizma (Brown i Chang, 2014).

Aktinomicete su bakterije koje formiraju višestanične filamente pa nalikuju fungama. Ova skupina bakterija tolerira više vrijednosti pH i temperature u odnosu na funge. Aktinomicete mogu razgraditi celulozu i otopiti lignin. Ipak, sposobnost aktinomiceta da razgrađuju lignin i celulozu je slabija od funga. Aktinomicete razgrađuju lignin u sklopu primarnog metabolizma i pri visokim koncentracijama dušika, u odnosu na funge bijelog truljenja, koje uglavnom razgrađuju lignin u sklopu sekundarnog metabolizma (Tuomela i sur., 2000).

Bakterijske lakaze, u odnosu na fungalne lakaze, su stabilnije pri višim vrijednostima pH i temperature. Bakterijske lakaze imaju viši optimalni pH od fungalnih, kojima više odgovara kiselija vrijednost pH. Bakterijske lakaze su uglavnom intracelularne, a fungalne lakaze su i intra- i ekstracelularne (Christopher i sur., 2014).

### 2.5.2. Primjeri razgradnje lignina pomoću bakterija

Učinkovita razgradnja kraft lignina tijekom kratkog vremena inkubacije je postignuta uglavnom bakterijskim sojevima (30-81,4 %) jer je obrada fungama često nestabilna kada se provodi grubom industrijskim obradama (Lv i sur., 2014).

Asina i sur. (2016) su proveli pokuse razgradnje visoke koncentracije lignina od 13,3 g/L tijekom 54 dana pomoću funga *Coriolus versicolor* i *Trametes gallica*, bijele funge truljenja, bakterija *Streptomyces* sp. i *Microbacterium* sp., i pročišćenog enzima lakaze. Ekspresija enzima koji modificiraju lignin ovisi o fazi rasta mikroorganizma i o pojavljivanju sekundarnog metabolizma, pa suptilne promjene u ravnoteži između aktivno rastuće i umiruće biomase može dovesti do varijacija u opsegu aktivnosti ekstracelularnih enzima tijekom vremena (Winqvist i sur., 2008). Aktivnost lakaze kod oba soja funga je bila značajno viša u odnosu na bakterijske sojeve (Asina i sur., 2016). Većina bakterijskih lakaza se ekspresiraju intracelularno, ali neki sojevi *Streptomyces* sp. proizvode ekstracelularne lakaze (Sharma i sur., 2007). Aktivnost ekstracelularne lakaze značajno varira u ovisnosti o pH vrijednosti otopine i sastavu kao rezultat ometanja elektrostatskih interakcija i vodikovih veza unutar tercijalne strukture proteina (Margot i sur., 2013). Tijekom cijelog pokusa sva četiri istraživana soja su pokazala značajnu aktivnost MnP, a LiP aktivnost nije zabilježena niti kod jednog soja. Mineralizacija kraft lignina je bila značajnija pomoću funga a bakterije su djelomično razgradile i modificirale lignin. Doseg repolimerizacije je izraženiji prilikom razgradnje lignina pomoću lakaze i funga. Funge su pokazale sposobnost cijepanja visoko

umreženih frakcija lignina, sa finom ravnotežom između umrežavanja polimerizacijom i razgradnje. Nakon bakterijske obrade lignina zabilježena je akumulacija fenolnih monomera bez njihovog daljnjeg katabolizma (Asina i sur., 2016).

Zhu i sur. (2017) su istraživali razgradnju lignina i uklanjanje boje pomoću alkalne halotolerantne bakterije *Bacillus ligniniphilus* L1 tijekom 7 dana pokusa. Metabolite razgradnje su pratili pomoću GC-MS (*engl. Gas Chromatography-Mass Spectrometry*) analize pri 50 °C kao optimalnom temperaturom za istraživani soj za razgradnju lignina, s ligninom kao jedinim izvorom ugljika, i u kombinaciji glukoza-lignin kao izvorom ugljika. Nakon 7 dana inkubacije istraživanog soja s ligninom kao jedinim izvorom ugljika zabilježili su 38,9 % razgradnje lignina i 30 % uklanjanje boje (Zhu i sur., 2017). Kako se pretpostavlja da mangan peroksidaza i lakaza uklanjaju boju lignina (Shintani i sur., 2002), Zhu i sur. (2017) sugeriraju da *Bacillus ligniniphilus* L1 može lučiti lakazu ili mangan peroksidazu da bi razgradila lignin. GS-MS analizom je pokazano da je tijekom 7 dana inkubacije istraživanog soja sa ligninom identificirano 15 aromatskih spojeva, a 9 aromatskih spojeva je indentificirano u kontrolnom uzorku (neinokulirani uzorak). Metabolit lignina koji je najviše detektiran je vanilinska kiselina, i to 44,2 % od svih proizvedenih aromatskih metabolita. Slijede 4'-hidroksiacetofenon sa 14,5 %, vanilin sa 8,7 % i 4-hidroksifeniloctena kiselina sa 7,2 %. Autori smatraju da je soj L1 lignin razgrađivao ali i da je razgrađivao i aromatske spojeve iz lignina ili koristio kao izvor ugljika ili energije. Osim detektiranih 15 aromatskih spojeva sa jednim fenil prstenom, autori pretpostavljaju da bi moglo biti i mnogo drugih aromatskih spojeva koji nisu detektirani pomoću GC-MS jer su prisutni u niskim koncentracijama ispod granice detekcije. Rezultati dobiveni kombinacijom podataka GC-MS i genoma, upućuju da bi mogla postojati 3 puta razgradnje lignina u soju L1: gencijat put, put benzojeve kiseline i  $\beta$ -ketodiatpat put (Zhu i sur., 2017).

Jiang i sur. (2019) su istraživali biorazgradnju lignina pomoću psihotrofne bakterije *Arthrobacter* sp. C2 izolirane iz zemlje. *Arthrobacter* vrste se mogu pronaći i izolirati na kontaminiranom okolišu, i predstavljaju važnu ulogu u biorazgradnji organskih tvari (Jiang i sur., 2019). Ta vrsta je sveprisutna zbog raznolike prehrane i otpornosti na stres iz okoliša, kao što su dugotrajno gladovanje, promjene osmotskog tlaka, promjene temperature, oksidativni stres, visoke koncentracije iona teških metala, toksične kemikalije (Guo i sur., 2019; Niewerth i sur., 2012). *Arthrobacter* sp. C2 pokazuje aktivnost LiP i MnP. Kao supstrat su koristili natrijev lignin sulfonat. Uvjeti enzimske aktivnosti soja su optimizirani

korištenjem RSM (*engl. Response surface methodology*) na temelju BBD (*engl. Box-Behnken design*). Za enzimsku aktivnost optimalni uvjeti su bili početna vrijednost pH 6,47, temperatura 14,9 °C, inkubacijsko vrijeme 6,87 dana i veličina inokuluma 2,23 %. Za razgradnju lignina bile su zaslužne lignin peroksidaza i mangan peroksidaza, i postignuto je 40,1 % razgradnje lignina. Brzina razgradnje lignina je određena pomoću UV (*engl. ultra violet*, hrv., ultraljubičasto) spektrofotometrije i produkti biorazgradnje su motreni pomoću GC-MS i FTIR (*engl. Fourier transform infrared spectroscopy*), i detektirane su kiseline, fenoli, aldehidi i alkoholi. Razgradnja lignina pomoću psihotrofnih bakterija omogućava razgradnju lignina i u hladnim podnebljima, ali i predstavlja uštedu energije prilikom proizvodnje korisnih kemikalija (Jiang i sur., 2019). Hladno adaptirani enzimi iz psihotrofnih bakterija, u usporedbi s istom vrstom mezofilnih i termofilnih enzima, pokazuju višu katalitičku učinkovitost i slabu termalnu stabilnost (Zhang i sur., 2015). Procesi u kojima se primjenjuju hladno adaptirani enzimi su brzi i ekonomični, pa se ostvaruju uštede u energiji i proizvodnim troškovima (Struvay i Feller, 2012).

Yang i sur. (2018) su istraživali biorazgradnju lignina, i to alkalni lignin i sirovi lignocelulozni materijal (stabljika kukuruza, svičnjak, pšenična slama), pomoću bakterije *Pseudomonas* sp. Q18, izolirane iz trulog drveta u Kini. Razgradnju alkalnog lignina su pratili nakon 3 i nakon 7 dana inkubacije. Proces razgradnje lignina je praćen metodama gel-permeacijskom kromatografijom (GPC, *engl. gel-permeation chromatography*), skenirajućim elektronskim mikroskopom-emisija kroz polje (FE-SEM, *engl. field-emission scanning electron microscope*) i GC-MS. U uzorcima sirovog lignina, nakon obrade sa *Pseudomonas* sp. Q18 količina preostalog lignina je bila smanjena, pri čemu je količina preostalog materijala u odnosu na sveukupni lignin bila niža za svičnjak nego za stabljiku kukuruza i pšeničnu slamu. Obrada svičnjaka je rezultirala najvećim gubitkom mase od suhe biomase, skoro 25 %, u odnosu na stabljiku kukuruza i pšeničnu slamu. FE-SEM analiza pšenične slame nakon obrade sa *Pseudomonas* sp. Q18 je pokazala narušenu strukturu stabljike i brojne male fragmente na površini u odnosu na izgled pšenične slame prije razgradnje. Analiza GPC alkalnog lignina je pokazala smanjenje molekulske mase nakon obrade istraživanim sojem, što se podudara sa sadržajem lignina nakon obrade. Rezultati GPC sugeriraju da su čestice alkalnog lignina visoke molekulske mase depolimerizirane u manje čestice nakon obrade. FE-SEM analiza alkalnog lignina je pokazala da je nakon obrade glatka površina lignina potpuno erodirala nakon obrade. Analiza pomoću GC-MS je pokazala da su nakon inkubacije lignina

sa *Pseudomonas* sp. Q18 značajno poraste koncentracije aromatskih spojeva s fenolnim prstenom, što upućuje na razgradnju lignina. Depolimerizacija lignina, aromatski katabolizam i proizvodnja koprodukata su se odvijali istovremeno. Tijekom procesa razgradnje alkalnog lignina, količina organskih kiselina i estera je rasla, poput oksalne kiseline, etil acetata i 3-acetiloksibutanske kiseline etil ester. Taj porast moguće odražava kemijske reakcije među primarnim mikrobnim metabolitima ili cijepanje intermedijata lignina nakon razgradnje. Autori istraživanja pretpostavljaju da soj Q18 posjeduje DyP peroksidazu, na temelju analize lignin-deriviranih metabolita. Ovaj soj ima potencijala za primjenu u rafineriji za biorazgradnju lignoceluloze (Yang i sur., 2018).

Niu i sur. (2021) su istraživali razgradnju lignina pomoću *Brevibacillus thermoruber*, pri temperaturama 37 °C i 55 °C. Bakterija *Brevibacillus thermoruber* ima sposobnost lučenja MnP, LaC i LiP i izolirana je iz aerobnog komposta od stabljike kukuruza i mulja prehrambene tvornice. *Bacillus* posjeduju široke fiziološke karakteristike, visoku adaptabilnost, kratak ciklus proliferacije, te mogu proizvesti termostabilne enzime. Za analizu lignina prije i nakon razgradnje korištene su AFM (*engl. Atomic force microscopy*), FTIR i UHPLC-QTOF/MS (*engl. Ultra-High-Performance Liquid Chromatography–Quadrupole Time-of-Flight–Tandem Mass spectrometry*). Tijekom biorazgradnje lignina, tijekom 7 dana pomoću bakterije *Brevibacillus thermoruber* postignuto je 81,97 % razgradnje lignina, slično kao što se postiže razgradnjom lignina pomoću funga. Pri 37 °C put razgradnje lignina (G i H monomeri) se odvijao preko  $\beta$ -ketodiatat puta. Pri 55 °C produkt razgradnje lignina (S monomer) je bio uglavnom benzojeva kiselina, odnosno, put razgradnje lignina se odvijao preko puta benzojeve kiseline. Ekstracelularni enzimi koje je lučila *Brevibacillus thermoruber* su se adsorbirali na površinu lignina, što je narušilo strukturu lignina, povećalo hrapavost površine, smanjilo veličinu površine, povećalo specifičnu površinu i povećalo broj aktivnih mjesta, što je potpomoglo razgradnju lignina. Produkti razgradnje lignina su analizirani i uspoređeni s Metlin bazom podataka, pri čemu je identificirano 40 spojeva. Količina produkata razgradnje lignina se mijenjala tijekom vremena i u ovisnosti o temperaturi pri kojoj se odvijala razgradnja. Učinkovitost razgradnje lignina je rasla s porastom temperature (Niu i sur., 2021).

### 3. ZAKLJUČCI

Iz ovog rada proizlaze zaključci:

1. Lignin kao dio lignoceluloze je visokovrijedna sirovina, ima veliki potencijal za proizvodnju biogoriva, alternativni je izvor kemikalija kao zamjena za kemikalije dobivene iz derivata nafte, te u brojnim preparatima lignina koji imaju primjenu u širokom spektru područja, primjerice kao antioksidansi, prebiotici u stočnoj hrani, briketi ugljena, šperploča, iverice, disperzirajući agensi za pesticide, emulgatori
2. Bakterijska razgradnja lignina se primjenjuje zbog izuzetne prilagodljivosti bakterija na okoliš, raznolike biokemije i proizvodnje enzima. U odnosu na funge, bakterije mogu tolerirati širi raspon vrijednosti pH, temperature i dostupnosti kisika, te je njima lakše upravljati
3. Bakterije koje imaju sposobnosti modificiranja i razgradnje lignina spadaju u  $\alpha$ -proteobakterije,  $\gamma$ -proteobakterije, neke Firmikute i aktinomicete, a lignolitičke bakterije su pronađene u zemlji, kompostu, sedimentima, životinjama, želudcu insekata i kanalizaciji
4. Biorazgradnja lignina se provodi ekstracelularnim enzimima: lignin peroksidaza, mangan peroksidaza, lakaza, svestrana peroksidaza i peroksidaza dekolorizacije boje
5. Budući da je sastav lignina jako varijabilan, kao i korišteni enzimi za razgradnju lignina, produkti razgradnje lignina također variraju

#### 4. POPIS LITERATURE

Abdel-Hamid AM, Solbiati JO, Cann IKO (2013) Insights into lignin degradation and its potential industrial applications. *Adv Appl Microbiol* **82**, 1–28. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407679-2.00001-6>

Ahmad M, Bugg TDH, Hardiman EM, Rahmanpour R (2011) Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi. *Nat Prod Rep* **28**, 1883–1896. <https://doi.org/10.1039/C1NP00042J>

Ahmad M, Taylor CR, Pink D, Burton K, Eastwood D, Bending GD, i sur. (2010) Development of novel assays for lignin degradation: Comparative analysis of bacterial and fungal lignin degraders. *Mol Biosys* **6**, 815–821. <https://doi.org/10.1039/b908966g>

Algahtani A, Bera SP, Choudhary N, Dashti MG, Gupta N, Islam S, i sur. (2022) Recent advances in synthesis and degradation of lignin and lignin nanoparticles and their emerging applications in nanotechnology. *Materials* **15**, 953. <https://doi.org/10.3390/ma15030953>

Arapova OV, Chistyakov AV, Tsodikov MV, Moiseev II (2020) Lignin as a Renewable Resource of Hydrocarbon Products and Energy Carriers (A Review). *Pet Chem* **60**, 227–243. <https://doi.org/10.1134/S0965544120030044>

Asina F, Brzonova I, Voeller K, Kozliak E, Kubátová A, Yao B, i sur. (2016) Biodegradation of lignin by fungi, bacteria and laccases. *Bioresour Technol* **220**, 414–424. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.016>

Boerjan W, Ralph J, Baucher M (2003) Lignin biosynthesis. *Annu Rev Plant Biol* **54**, 519–546. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134938>

Boerjan W, Brunow G, Dixon RA, Harris PJ, Ralph J, Schatz PF (2008) Lignification: are Lignins Biosynthesized via simple Combinatorial Chemistry or via Proteinaceous Control and Template Replication? U: Daayf F, Lattanzio V (ured.) Recent Advances in Polyphenol Research, 1. izd., Blackwell Publishing Ltd, United Kingdom, str. 36–66.

Brebu M, Vasile C (2010) Thermal Degradation of Lignin—A Review. *Cellul Chem Technol.* **44**, 353–363.

Brown ME, Chang MCY (2014) Exploring bacterial lignin degradation. *Curr Opin Chem*



*Biol* **19**, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.11.015>

Bugg TDH, Ahmad M, Hardiman EM, Rahmanpour R (2011) Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi. *Nat Prod Rep* **28**, 1883-1896. <https://doi.org/10.1039/c1np00042j>

Buranov AU, Mazza G (2008) Lignin in straw of herbaceous crops. *Ind Crops Prod* **28**, 237-259. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.03.008>

Calvo-Flores FG, Dobado JA (2010) Lignin as renewable raw material. *Chem Sus Chem* **3**, 1227-1235. <https://doi.org/10.1002/cssc.201000157>

Christopher LP, Yao B, Ji Y (2014) Lignin biodegradation with laccase-mediator system. *Front Energy Res* **2**, 1-13. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2014.00012>

De Gonzalo G, Colpa DI, Habib MHM, Fraaije MW (2016) Bacterial enzymes involved in lignin degradation. *J Biotechnol* **236**, 110–119. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.08.011>

DeAngelis KM, Sharma D, Varney R, Simmons B, Isern NG, Markillie LM, i sur. (2013) Evidence supporting dissimilatory and assimilatory lignin degradation in *Enterobacter lignolyticus* SCF1. *Front Microbiol* **4**, 280. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00280>

Dharmawardhana D, Douglas C, Ellis B, Mansfield S, Rensing K, Samuels A (2002) Cellular machinery of wood production: differentiation of secondary xylem in *Pinus contorta* var. *latifolia*. *Planta* **216**, 72–82. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0884-4>

Eastwood M, Kritchevsky D (2005) Dietary fiber: how did we get where we are? *Ann Rev Nutrition* **25**, 1 – 8. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.25.121304.131658>

Falade AO, Nwodo UU, Iweriebor BC, Green E, Mabinya LV, Okoh AI (2017) Lignin peroxidase functionalities and prospective applications. *Microbiologyopen* **6**, e00394. <https://doi.org/10.1002/mbo3.394>

Fisher AB, Fong SS (2014) Lignin biodegradation and industrial implications. *AIMS Bioeng* **1**, 92-112. <https://doi.org/10.3934/bioeng.2014.2.92>

Förster H, Pommer U, Savidge R, Steeves V (2001) Coniferyl alcohol metabolism in conifers — I. Glucosidic turnover of cinnamyl aldehydes by UDPG: coniferyl alcohol glucosyltransferase from pine cambium. *Phytochemistry* **57**, 1085-1093.

[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00107-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00107-8)

Guo FF, Shi WJ, Sun W, Li XZ, Wang FF, Zhao J, i sur. (2014) Differences in the adsorption of enzymes onto lignins from diverse types of lignocellulosic biomass and the underlying mechanism. *Biotechnol Biofuels* **7**, 38. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-38>

Guo X, Xie C, Wang L, Li Q, Wang Y (2019) Biodegradation of persistent environmental pollutants by *Arthrobacter* sp. *Environ Sci Pollut Res Int* **26**, 8429–8443. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04358-0>

Janusz G, Pawlik A, Sulej J, Świdarska-Burek U, Jarosz-Wilkołazka A, Paszczyński A (2017) Lignin degradation: Microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution. *FEMS Microbiol Rev* **41**, 941–962. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux049>

Janusz G, Pawlik A, Świdarska-Burek U, Polak J, Sulej J, Jarosz-Wilkołazka A, i sur. (2020) Laccase Properties, Physiological Functions, and Evolution. *Int J Mol Sci* **21**, 966. <https://doi.org/10.3390/ijms21030966>

Jiang C, Cheng Y, Zang H, Chen X, Wang Y, Zhang Y, i sur. (2019) Biodegradation of lignin and the associated degradation pathway by psychrotrophic *Arthrobacter* sp. C2 from the cold region of China. *Cellulose* **27**, 1423-1440. <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02858-3>

Jing H, Xue A, Wang Z, Xia R, Wang L, Tang Y, i sur. (2020) Electrochemical degradation of lignin by ROS. *Sustain Chem* **1**, 345-360. <https://doi.org/10.3390/suschem1030023>

Kansal SK, Singh M, Sud D (2008) Studies on TiO<sub>2</sub>/ZnO photocatalysed degradation of lignin. *J Hazard Mater* **153**, 412-417. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.08.091>

Knežević A, Milovanović I., Stajić M, Lončar N, Brčeski I, Vukojević J, i sur. (2013) Lignin degradation by selected fungal species. *Bioresour Technol* **138**, 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.182>

Lv Y, Chen Y, Sun S, Hu Y (2014) Interaction among multiple microorganisms and effects of nitrogen and carbon supplementations on lignin degradation. *Bioresour Technol* **155**, 144–151. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.012>

Ma Y-S, Chang C-N, Chiang Y-P, Sung H-F, Chao AC (2008) Photocatalytic degradation

of lignin using Pt/TiO<sub>2</sub> as the catalyst. *Chemosphere* **71**, 998–1004.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.10.061>

Margot J, Bennati-Granier C, Maillard J, Blázquez P, Barry DA, Holliger C (2013) Bacterial versus fungal laccase: potential for micropollutant degradation. *AMB Express* **3**, 63. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-3-63>

Niewerth H, Schuldes J, Parschat K, Kiefer P, Vorholt JA, Daniel R, i sur. (2012) Complete genome sequence and metabolic potential of the quinaldine-degrading bacterium *Arthrobacter* sp. Rue61a. *Bmc Genom* **13**, 534–534.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-534>

Niu J, Li X, Qi X, Ren Y (2021) Pathway analysis of the biodegradation of lignin by *Brevibacillus thermoruber*. *Bioresour Technol* **341**, 125875.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125875>

Pérez-Boada M, Ruiz-Dueñas FJ, Pogni R, Basosi R, Choinowski T, Martínez MJ, i sur. (2005) Versatile peroxidase oxidation of high redox potential aromatic compounds: Site-directed mutagenesis, spectroscopic and crystallographic investigation of three long-range electron transfer pathways. *J Mol Biol* **354**, 385–402.  
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.09.047>

Purnomo AS, Mori T, Kondo R (2010) Involvement of Fenton reaction in DDT degradation by brown-rot fungi. *Int Biodeterior Biodegrad* **64**, 560–565.  
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.06.008>

Raj A, Krishna Reddy MM, Chandra R (2007) Identification of low molecular weight aromatic compounds by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) from kraft lignin degradation by three *Bacillus* sp. *Int Biodeter Biodegr* **59**, 292–296.  
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2006.09.006>

Rashid GMM, Taylor CR, Liu Y, Zhang X, Rea D, Fülöp V, i sur. (2015) Identification of manganese superoxide dismutase from *Sphingobacterium* sp. T2 as a novel bacterial enzyme for lignin oxidation. *ACS Chem Biol* **10**, 2286–2294.  
<https://doi.org/10.1021/acschembio.5b00298>

Sánchez C (2009) Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol Adv* **27**, 185 – 194. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.001>

Schoenherr S, Ebrahimi M, Czermak P (2018) Lignin degradation processes and the purification of valuable products. 29-63. <https://dx.doi.org/10.5772/intechopen.71210>

Sharma P, Goel R, Capalash N (2007) Bacterial laccases. *World J Microbiol Biotechnol* **23**, 823–832. <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9305-3>

Shintani N, Sugano Y, Shoda M (2002) Decolorization of kraft pulp bleaching effluent by a newly isolated fungus, *Geotrichum candidum* Dec 1. *J Wood Sci* **48**, 402–408. <https://doi.org/10.1007/BF00770700>

Struvay C, Feller G (2012) Optimization to Low Temperature Activity in Psychrophilic Enzymes. *Int J Mol Sci* **13**, 11643–11665. <https://doi.org/10.3390/ijms130911643>

Tuomela M, Vikman M, Hatakka A, Itävaara M (2000) Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresour Technol* **72**, 169–183. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00104-2](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00104-2)

Wells T, Ragauskas AJ (2012) Biotechnological opportunities with the  $\beta$ -ketoadipate pathway. *Trends Biotechnol* **30**, 627–637. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.09.008>

Winqvist E, Moilanen U, Mettälä A, Leisola M, Hatakka A (2008) Production of lignin modifying enzymes on industrial waste material by solid-state cultivation of fungi. *Biochem Eng J* **42**, 128–132. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.06.006>

Yadav VK, Gupta N, Kumar P, Dashti MG, Tirth V, Khan SH, i sur. (2022) Recent Advances in Synthesis and Degradation of Lignin and Lignin Nanoparticles and Their Emerging Applications in Nanotechnology. *Materials* **15**, 953. <https://doi.org/10.3390/ma15030953>

Yang C, Yue F, Cui Y, Xu Y, Shan Y, Liu B, i sur. (2018) Biodegradation of lignin by *Pseudomonas* sp. Q18 and the characterization of a novel bacterial DyP-type peroxidase. *J Ind Microbiol Biotechnol* **45**, 913–927. <https://doi.org/10.1007/s10295-018-2064-y>

Zhang R, Zhou J, Gao Y, Guan Y, Li J, Tang X, i sur. (2015) Molecular and biochemical characterizations of a new low-temperature active mannanase. *Folia Microbiol* **60**, 483–492. <https://doi.org/10.1007/s12223-015-0391-1>

Zhu D, Zhang P, Xie C, Zhang W, Sun J, Qian WJ, i sur. (2017) Biodegradation of alkaline lignin by *Bacillus ligniniphilus* L1. *Biotechnol Biofuels* **10**, 44. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0735-y>

## Izjava o izvornosti

Ja Matea Rukavina izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Matea Rukavina  
Vlastoručni potpis