

## ASPECTS ON IMPROVING THE QUALITY OF PLANT BIOMASS FOR BIOETHANOL PRODUCTION

Lea-Denisa GAVRILĂ, Estera RĂDOI\*, Nicoleta IANOVICI

West University of Timisoara, Faculty of Chemistry, Biology, Geography, Department of Biology-Chemistry, Pestalozzi 16, Timișoara

\*Corresponding author e-mail: estera.radoi98@e-uvf.ro

Received 18 May 2020; accepted 5 June 2020

### ABSTRACT

*In this article, we present the traits of raw plant materials for the bioethanol industry and the molecular biotechnology strategies employed to improve them. Here, we show the means by which this information can be used to manipulate these mechanisms for commercial uses: saccharification improvement of starch and cellulose, decrease in cell wall recalcitrance through lignin modification, and increase in plant biomass.*

**KEYWORDS:** *bioethanol, plant biomass, saccharification.*

Cerințele vaste de energie ale societății moderne sunt satisfăcute prin utilizarea combustibilului fosil, cum ar fi gazul natural, cărbunele, petrolul și derivatele sale, cum ar fi benzina și motorina. Utilizarea acestor surse de energie au impact nociv asupra mediului, cum ar fi poluarea aerului, apei și solului în sistemele de extracție, conducte și rafinării și mobilizarea antropică a milioane de tone de carbon din subsol în atmosferă, unul dintre principalii factori care duc la încălzirea globală (Blunden & Arndt, 2016; Peña-Castro et al, 2017). În plus, țările producătoare de combustibili fosili se confruntă cu conflicte, distorsiuni economice pe termen lung și lipsa diversității tehnologice asociate fluctuațiilor pe piața energiei și dependenței de petrol (Fouquet, 2016).

Biocombustibilii sunt propuși ca o alternativă la combustibilii fosili, în special etanolul produs ca produs final al fermentației drojdiilor consumatoare de carbohidrați naturali (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis* sau *Kluyveromyces marxianus*) și bacterii (cum ar fi *Zymomonas mobilis*). Tulpini mutante și modificate genetic ale acestor microorganisme (și altele, de exemplu *Pichia pastoris* sau *Escherichia coli*) au fost propuse pentru îmbunătățirea randamentului etanolului prin creșterea fermentației pentozelor, îmbunătățirea toleranței la etanol și utilizarea amidonului sau celulozei ca substraturi (Zabed et al, 2017).

Productia de bioetanol poate utiliza plante de cultură bogate de amidon, cum ar fi porumb, grâu, orz, cartofi, cassava, secară, sorg și triticale. A doua mare materie primă pentru producerea de bioetanol este porumbul, utilizat pe scară largă în SUA. Grâul și sfecla de zahăr sunt materii prime dominante în

Europa. Sucul trestiei de zahar este materia primă vegetală utilizată în producția de biocombustibili în Brazilia. Această țară este pionierul în utilizarea bioetanolului ca și combustibil în activitățile de transport (Albers et al; 2016). În trestia de zahăr, zaharoza este carbohidratul liber eliberat ușor prin extracția mecanică. În amidonul de porumb, monomerii zahărului trebuie eliberați prin căldură și hidroliză enzimatică, pregătindu-i astfel pentru fermentație. Acest proces se numește zaharificare (Vanholme et al., 2013).

În Brazilia, după lansarea programului Proalcool în 1975, producția a crescut considerabil, de la 600 de milioane de litri în 1975, la 11,8 miliarde de litri de etanol în 1986. În recolta 2016/2017, Brazilia a produs 27,2 miliarde litri de etanol. Pentru a atinge o țintă stabilită de Brazilia de aproximativ 50 de miliarde de litri de etanol până în 2030, există mai multe opțiuni: extinderea suprafeței de cultivare, îmbunătățirea producției agricole sau industriale, introducerea de noi prelucrări industriale căi care includ îmbunătățiri în prima (conversia zaharurilor) sau a doua generație (conversie lignocelulozică a biomasei) de prelucrare industrială a etanolului (Jonker și colab., 2015).

În ultimul deceniu, celuloza a fost testată ca materie primă pentru producția de bioetanol. Celuloza necesită să fie supusă procesului de zaharificare pentru a-și elibera monomerii de hexoză și pentoză. Amidonul este un polimer cu recalitrantă scăzută de zaharificare în comparație cu celuloza care necesită mai multe etape de procesare deoarece este legată de lignin. Lignina este un polimer vegetal compus din monomeri aromatici greu de descompus. Astfel sunt necesare procese mecanice, chimice și enzimatiche diferite pentru zaharificarea celulozei (Chundawat et al, 2011).

Tehnologiile actuale de producție de bioetanol se bazează pe conversia glucidelor derivate din trestia de zahăr, sfeclă de zahăr, porumb sau cereale. În plus, bioetanolul poate fi derivat dintr-o serie de alte mărfuri agricole, reziduuri sau deșeuri din alte procese agroindustriale, inclusiv melasa de trestie sau sfeclă și resturi de amidon. Materialele lignocelulozice pot fi împărțite în șase grupe: reziduuri de cultură, lemn tare, lemn moale, deșeuri de celuloză, deșeuri solide și biomasă erbacee. Cassava (*Manihot esculenta* spp. *esculenta*) este utilizată în industria alimentară și ca hrană pentru animale, din cauza conținutului ridicat de amidon. Producția de producție este de aproximativ 20 de tone / ha. Poate fi cultivată în regiuni tropicale și subtropicale, adică în Africa, unele părți din Asia (Thailanda, China, aproximativ 400 000 ha) și America Latină. Producția de etanol anhidru variază în funcție de conținutul de amidon din rădăcini, dar este de aproximativ 200 litri / tonă de rădăcini, cu alte cuvinte sunt necesare aproximativ 6,6 tone de rădăcini pentru producerea unei tone de bioetanol Tulpina și frunzele plantei pot fi colectate și utilizate ca materie primă lignocelulozică pentru producția de etanol (Jansson et al, 2009).

Studiile asupra producției bioetanolului au atras atenția în ultimii ani. Astfel aceste aspecte implică toate etapele procesului, de la bioingineria fermentației până la îmbunătățirea tulpinilor microbiene, ingineria enzimelor de zaharificare și îmbunătățirea genetică a materiei prime vegetale. Dacă carbohidrații liberi, amidonul / celuloza zaharificată sau utilizarea diverselor combinații sunt utile pentru creșterea eficienței utilizării biomasei vegetale pentru producția de bioetanol, atunci este necesară îmbunătățirea conținutului acestor molecule în plantele crescute pentru industria bioetanolului (Furtado et al., 2014, Welker et al., 2015).

### **Biomasa vegetală și producția de bioetanol**

Biomasa vegetală a fost folosită de secole ca sursă de energie, de exemplu lemnul pentru încălzire. Având în vedere cererea în creștere de materiale regenerabile utilizate pentru înlocuirea produselor industriale, biomasa vegetală este considerată o resursă strategică pentru producția biocombustibililor, în special a bioetanolului (FAO, 2008). În plus, biomasa vegetală poate fi, de asemenea, o sursă de alte molecule chimice de interes precum lactatul, acetona, furfuralul, lubrifianții și combustibil pentru avioane (Balakrishnan et al., 2015).

Producția de etanol prin fermentarea zaharurilor din plante pentru producția vinului, berii și a altor băuturi alcoolice este un proces bine cunoscut de toate civilizațiile. Știm acum că substraturile acestui proces sunt zaharurile libere sau polimerizate. Fiecare dintre aceste molecule are propria dinamică în acumularea, compartimentarea și funcția specifică (Bahaji et al., 2014).

Acumularea de zaharuri libere este extrem de importantă în plante, datorită rolului lor în producția de energie, când sunt folosite de celule pentru a obține ATP și NADH prin glicoliză. Recent, carbohidrații au fost, de asemenea, determinați ca indicatori ai capacității fotosintetice a plantei (Wahl et al., 2013). Astfel, o proporție ridicată de zaharoză/ trehaloză-6-fosfat indică o capacitate fotosintetică bună, în timp ce o proporție scăzută indică influența factorilor de stres (Kretzschmar et al., 2015). Detaliile proteinelor direct implicate în proces rămân neclare. Unul dintre cei mai plauzibili candidați pentru medierea acestui proces de obținere a energiei este enzima sucroză nefermentată-1 legată de kinază (SnRK1) care acționează ca un senzor receptor al țințelor proteice (Figueroa & Lunn, 2016).

Amidonul este principalul carbohidrat nestructural care joacă un rol crucial ca moleculă de stocare a energiei. Este compus din amilopectină (70–80%) și amiloză (20-30%); ambii polimeri sunt compuși din D-glucoză. Amiloza este o moleculă înlănțuită liniar și legată prin legături  $\alpha$ -1,4, în timp ce amilopectina este un polimer ramificat, legat prin legături  $\alpha$ -1,6. Amidonul are o structură

semicristalină și insolubilă. Formează structuri superioare, și anume, granule care variază ca mărime și formă (poligonale, sferice și lenticulare), raport amiloză / amilopectină, nanostructura și cristalinitate. Atât amiloza cât și amilopectina formează 95-99% din greutatea uscată a granulelor de amidon (Grudnicki & Ianovici, 2014).

Celuloza și hemiceluloza (un polimer de pentoze, în principal xiloza) sunt principalii polimeri de carbohidrați care formează pereții celulelor vegetale. În plus, lignina este un polimer al monomerilor fenolici sintetizați din aminoacizii aromatici și este încrucișată cu fibrilele celulozei și hemicelulozei. Proporțiile acestor trei componente variază în funcție de stadiul de dezvoltare al plantelor, organelor și speciilor. Peretele celular este principala structură implicată în creșterea plantelor, suport pentru greutate și protecție mecanică împotriva agenților patogeni (Ianovici, 2010; Vanholme et al. 2013).

#### **Distribuția de carbon și supraviețuirea plantelor**

Pe parcursul istoriei, plantele au evoluat dezvoltându-și mecanisme sofisticate de adaptare la mediu și strategii care să le asigure supraviețuirea. Mișcarea plantelor este extrem de restricționată datorită naturii lor sesile, astfel locul unde ele germinează va fi cel mai probabil locația lor permanentă și trebuie să prospere cu resursele disponibile, abundente sau rare, pentru a obține energie. În procesul de luare a deciziilor, diferite variabile, precum lungimea zilei, calitatea luminii, temperatura, direcția gravitației și moleculele interne sau externe trebuie să fie luate în considerare iar în funcție de aceste variabile sunt declanșate germinarea, rata de consum de energie, viteza de creștere, arhitectura organelor, și tranziția juvenil / maturitate (Bishopp et al, 2006).

Amidonul este molecula preferată pentru stocarea energiei sub forma legăturilor chimice. Homeostasia dintre sinteza și consumul amidonului este esențială pentru supraviețuirea plantelor (Bahaji et al., 2014). În timpul zilei prin fotosinteză, cloroplastul captează continuu electroni prin NADPH și restaurează legăturile fosfat cu energie mare sub forma ATP-ului; ambele molecule sunt utilizat pentru a fixa CO<sub>2</sub>-ul atmosferic în carbohidrați. Zaharurile derivate din fotosinteză pot fi utilizate ca monomeri pentru sinteza structurală a polizaharidelor care susțin acumularea biomaselor (celuloză și hemiceluloză), sunt implicate în transferul energiei în mitocondrii pentru realizarea metabolismului primar sau sunt depozitate sub formă de amidon în cloroplast (Tiessen & Padilla-Chacon, 2013).

Folosind *Arabidopsis thaliana*, cercetările curente indică faptul că plantele sălbatice preferă strategiile conservatoare pentru gestionarea homeostaziei energetice (Paparelli et al., 2013). Fluxul și distribuția carbonului din atmosferă în amidon sunt un pivot important pentru a asigura supraviețuirea plantelor în

timpul nopții până zori (Sulpice et al., 2014). Dacă nu este distribuit corect, plantele se pot confrunta cu severe simptome de înfometare cu impact negativ asupra productivității (Graf et al, 2010). Acest control se realizează printr-o rețea elaborată de mecanisme interconectate la diferite niveluri în ceea ce privește fluxul genetic de informații:

- controlul expresiei circadiene pentru a obține expresia precisă a enzimelor catabolice (zi) și anabolice (noaptea),
- reglarea enzimelor alosterice care să permită un răspuns rapid al produselor și al altelor căi,
- relații de sincronizare pentru a optimiza transportul de zahăr pe distanțe lungi și pentru a regla creșterea,
- reciclarea nutrienților din frunze senescente,
- mobilizarea de nutrienți care implică alți metaboliți importanți precum aminoacizii,
- semnalizarea moleculară pentru a stabili capacitatea metabolică la nivelul celulei și la nivelul întregului organism (Smith et al., 2004; Baena-Gonzalez, 2007; Delatte et al., 2011; Tiessen & Padilla-Chacon, 2013; Mugford et al., 2014; Ren et al, 2014).

Doar când resursele acumulate și construcția plantei indică existența unei structuri fotosintetice robuste, planta prioritizează alocarea resurselor sale pentru a satisface cerințele energetice ale etapelor de reproducere (Paparelli et al., 2013). În cazuri extreme, atunci când acumularea de resurse nu este disponibilă, planta se concentrează pe stadiul de reproducere în condiții suboptimale, riscând succesul descendenților decât să nu aibă loc reproducerea (Wahl et al., 2014).

### **Biotehnologia în alocarea carbonului**

Domesticirea plantelor a stat la baza agriculturii moderne pentru susținerea alimentației umane. Acest aspect a fost obținut prin selecția indivizilor cu un răspuns modificat la unul sau mai multe dintre strategiile de alocare a carbonului. De exemplu, plantele de porumb modern concentrează producția fotosintetice pe câteva unități de reproducere față de tipul sălbatic care se reproducea în mai multe unități (Wills et al., 2013). Culturile de grâu au o biomasă vegetativă mai mică, capabilă să susțină stadiile de reproducere (Stamm et al, 2013). Trestia de zahăr a înlocuit amidonul cu zaharoză, ca moleculă de stocare primară (Wang et al, 2013). Unele soiuri de fasole sunt insensibile la controlul fotoperiodic al înfloririi (Kwak et al, 2008). Toate aceste realizări au modificat strategiile naturale utilizate pentru conservarea și alocarea resurselor de carbon (Bennett et al, 2012).

Strategiile utilizate de plantele domesticite au prezentat un risc ridicat în ceea ce privește gestionarea energiei și a carbonului, deoarece acestea nu au succes decât pe câmpuri datorită practicilor agricole moderne, fiind supravegheate de oameni. Câteva exemple în acest sens sunt selecția anotimpurilor de plantare, distanțarea între indivizii plantelor, asigurarea deplină a nevoilor nutriționale, limitarea ierbivorelor și a agenților patogeni și îndepărtarea concurenților pentru energia solară cât și a reziduurilor din generația anterioară. Prin aceste strategii, pericolele naturale care au inhibat apariția anumitor trăsături îndrăznețe în plantele sălbatice, de-a lungul evoluției naturale, sunt acum controlate artificial (Bennett et al, 2008).

Noile fenotipuri vegetale sunt necesare pentru adaptarea la provocările moderne apărute, precum populația umană în creștere sau efectele încălzirii globale: secete, inundații și diverși prădători noi. Pentru rezolvarea acestei probleme, plantele pot fi modificate pentru a investi mai multă energie asupra mecanismelor de protecție. Recent au fost raportate creșteri promițătoare ale productivității biomasei vegetale prin modificarea mecanismelor extrem de conservatoare de fotoprotecție la plante (Kromdijk et al., 2016). Mickelbart și colab. (2015) au evidențiat alte exemple de succes aplicate culturilor comestibile. Majoritatea aplicațiilor sunt direcționate către soluții pentru industria alimentară și controlul patogenilor (Hilscher et al, 2015).

În plantele cultivate pentru bioetanol, carbonul trebuie să fie alocat în carbohidrați și pus la dispoziție cu ușurință prin zaharificare pentru fermentația ulterioară (Vanholme et al. 2013, Stamm et al, 2012). Există deja culturi tradiționale cu strategii de alocare de carbon care favorizează amidonul sau acumularea liberă de zaharuri în țesuturi specifice plantelor, cum ar fi porumbul și trestia de zahăr; etanolul produs din acest tip de biomasă se numește *bioetanol de primă generație* (Waclawovsky et al, 2010). Cu toate acestea, unele sectoare ale societății sunt îngrijorate de această posibilitate tehnologică, deoarece trestia de zahăr și porumbul sunt, de asemenea, surse de produse comestibile elementare, astfel crește controversa „mâncare versus combustibil” care implică concurență în utilizarea terenului și impactul asupra prețurilor viitoare ale produselor alimentare (Ehrlich & Harte, 2015). Biomasa reziduurilor agricole sau plantele întregi care nu sunt utilizate pentru consumul uman, cum ar fi ierburi și copaci care cresc deja în terenuri neagricole, pot fi conservate, gestionate și utilizate în producția bioetanolului. Acesta se numește *bioetanol de a doua generație* (Jungers et al, 2016).

Diferite strategii au fost implementate pentru a identifica noi modele de acumulare și distribuție de carbon și îmbunătățirea aspectelor zaharificării la plantele destinate producția de bioetanol, cum ar fi inhibarea constitutivă sau temporală a enzimelor degradante ale amidonului, întârzierea timpului de

înflorire prin factori de transcripție, expresia endogenă a enzimelor degradante ale peretelui celular și inhibarea enzimelor biosintetizatoare de lignină (Chuck et al., 2011; Nigorikawa et al, 2012; Cass et al., 2015).

Dezvoltarea în condiții suboptimale și lipsa nutrienților necesari trebuie evitate pentru că diminuează producția de biomasă. Sunt necesare noi strategii pentru reglarea fină a fluxurilor de carbon, evitând impactul negativ asupra etapelor critice de dezvoltare, compromiterea integrității țesuturilor și supraexpunerea plantei la riscuri patogene. Desigur, plantele au deja mecanisme de asigurare pentru aceste dezavantaje, de exemplu, mecanismele exprimate în cazul expunerii la un nivel scăzut la oxigen (Baena-Gonzalez et al, 2007) sau la lumină fluctuantă (Kromdijk et al. 2016).

### **Strategii pentru îmbunătățirea zaharificării biomasei vegetale**

Au fost testate diferite strategii pentru a îmbunătăți zaharificarea la plante, și, în consecință, randamentul bioetanolului. În prezent, acestea pot fi clasificate prin manipularea timpului / localizării factorilor de transcriere (TF) și a enzimelor pentru a atinge unul sau mai multe dintre următoarele obiective: întârzierea timpului de înflorire, conservarea amidonului, scăderea recalcitrantei de zaharificare a componentelor moleculare ale peretelui celular. În plus, utilizarea diversității genetice vegetale este, de asemenea, explorată pentru a descoperi noi factori genetici cu impact pozitiv asupra acestor aplicații.

*Factori de transcriere (TF)* sunt proteine care se pot lega reversibil de ADN și simultan promovează și / sau inhibă expresia de gene multiple. Unii TF au fost descoperiți pentru a controla mai multe etape ale biosintezei ligninei, de exemplu, familia de proteine MYB (Zhou et al., 2009). Utilizarea proteinelor MYB exprimate în mod constitutiv au fost testate pe trestia de zahăr. Doi factori de transcriere (TF) au fost analizați pentru a determina care ar putea inhiba simultan mai multe gene biosintetice ale peretelui celular. Interesant, s-a constatat, că un MYB ar putea crește zaharoza liberă (Poovaiah et al., 2016). A fost explorată de asemenea și capacitatea a doi factori de răspuns ai etilenei (ERF) implicați în mod natural în răspunsul plantelor la stresul de inundații, rezultând un fenotip în care conservarea amidonului a fost dublată, în special în stadiile de preînflorire. Pe de altă parte, efectul secundar al acestei strategii a fost acumularea de biomasă mai mică după înflorire (Nunez-Lopez et al., 2015).

*Enzime* diferite au fost testate ca instrumente biotehnologice pentru a îmbunătăți zaharificarea. S-a descoperit că diferite glucoziltransferaze (GTs) participă la mai multe etape biosintetice ale ligninei. Pentru a îmbunătăți zaharificarea la *Populus deltoides*, un arbore cu trăsături bioenergetice de dorit în stadiul juvenil, a fost testată reducerea selectivă a genelor GTs. S-a observat că, conținutul de lignină nu s-a schimbat la acești mutanți dar proporția chimică

a componentelor sale s-a modificat iar biomasa și zaharificarea au crescut până la 38% și, respectiv, 10% (Biswal *et al.*, 2015).

Cafeoil shikimat esteraza (CSE) este o genă de codificare pentru o enzimă implicată în biosinteza ligninei. CSE cu pierderi de funcții a crescut zaharificarea peretelui celular până la 300%, dar sistemul vascular a suferit defecte biomecanice severe (Vanholme *et al.*, 2013). Pentru a rezolva acest dezavantaj, Vargas *et al.* (2016) au exprimat CSE sub controlul promotorilor sistemului vascular la plantele de *Arabidopsis*. Această abordare a reparat vasculatura plantelor și a păstrat trăsătura de zaharificare îmbunătățită.

O altă genă de codificare pentru o enzimă biosintetică a ligninei care a fost utilizată în biotehnologia zaharificării este acidul cafeic O-metiltransferaza (COMT). Pentru a evita fenotipurile vegetale nedorite, a fost testată o strategie de "reducere la tăcere" a genelor, în care expresia genelor nu este complet suprimată, ci doar scăzută. Plantele cu COMT "reduse la tăcere" nu au avut o sensibilitate crescută la agenți patogeni sau la defecte biomecanice, dar conținutul de lignină a scăzut, iar cantitatea de substanță uscată și zaharificare a crescut, cu o îmbunătățire totală a producției de bioetanol cu până la 25% în comparație cu cea din plantele de tip sălbatic (Baxter *et al.*, 2014). Aceste date au fost obținute în studiile de teren, o caracteristică remarcabilă a acestei cercetări, deoarece puține strategii de îmbunătățire a zaharificării au fost testate la acest nivel (Baxter *et al.*, 2015). Recent, această strategie a fost pusă în aplicare în trestie de zahăr prin mutageneza multialelică mediată a COMT cu rezultate similare (Jung & Altpeter, 2016).

Ingineria proteinelor este un instrument biotehnologic inovator folosit recent pentru a modula sinteza ligninei. Yang *et al.* (2016) au analizat și construit proteine himerice care combină domeniile de legare a carbohidraților și domeniile de legare pentru fier. În acest fel, proteina himerică a capturat fierul și l-a concentrat *in vivo* în peretele celular unde a acționat ca un catalizator anorganic pentru zaharificare.

O altă alternativă explorată este controlul enzimatic al expansiunii celulelor. Plantele au strategii de alocare a carbonului, nu își exprimă întregul potențial de a spori creșterea cu scopul de a menține rezervele de energie atunci când se confruntă cu un stres neașteptat. Acidul giberelic (GA) este un fitohormon care reglează în principal alungirea celulelor în plante și, în consecință, angajamentul de carbon și energie în procese (Paparelli *et al.*, 2013). Cu aceste cunoștințe, Do *et al.* (2016) a supraexprimat în mod constitutiv gena de porumb giberelin 20-oxidază (GA20Ox), de codificare pentru o enzimă biosintetică a GA, la *Panicum virgatum* iar plantele s-au dublat în greutatea uscată. Biomasa tulpinilor a fost triplă la *Populus* (Jeon *et al.*, 2016). Este de așteptat ca, creșterile biomasei să îmbunătățească producția de etanol a acestor culturi.



O abordare inedită este de a căuta alți polimeri de carbohidrați vegetali mai puțin recalcitranți la zaharificare. O opțiune este glucanul cu legătură mixtă care este ușor supus zaharificării prin amestecuri enzimatiche comerciale. Cu toate acestea, acumularea în celulele plantelor provoacă efecte severe în dezvoltare.

*Diversitatea genetică naturală și mutageneza.* Un instrument clasic care poate fi folosit în cercetarea culturilor de bioenergie este screening-ul diversității induse sau naturale pentru trăsături interesante. Li et al. (2015) au indus diversitatea genetică în orez prin mutageneză chimică sau mutageneză biologică și au găsit mutanți cu zaharificare mai mare. Acest lucru deschide posibilitatea de a utiliza organe necomestibile pentru producția de bioetanol. Folosind specia *Brachypodium distachyon* ca model, Marriott et al. (2014) au creat o populație mutagenizată chimic și au izolat un set de mutanți cu randamente mai mari de zaharificare variind de la 20 la 60% mai mult decât la plantele de tip sălbatic. Mutanții cu randamente scăzute de zaharificare au fost, de asemenea, izolați, furnizând material genetic pentru experimente menite să descopere noi rute biochimice pentru industrie. Stamatiou et al. (2013) au proiectat o examinare în masă a mutanților *Arabidopsis* cunoscuți și noi, și au izolat un set de fenotipuri cu zaharificare crescută cauzată de defecte ale enzimelor degradante ale amidonului, de transportul auxinelor modificate și de alte mecanisme care nu au fost încă identificate.

Microalgele sunt, de asemenea, organisme fotosintetice, iar utilizarea lor în industria bioenergiei s-a concentrat pe materii prime biodiesel, datorită conținutului ridicat de lipide. Cu toate acestea, studii recente au arătat că, în diversitatea genetică a microalgelor, există diferite mecanisme de acumulare de carbon care diferă de cele ale plantelor terestre și care ar putea fi de interes viitor pentru biotehnologia etanolului (Simas-Rodrigues et al., 2015). Biomasa microalgelor nu are lignină, ceea ce facilitează procesul de extracție a carbohidraților și, în cele din urmă, ar trebui să contribuie la dezvoltarea proceselor de producție de bioetanol, mai curate și mai sigure. Carbohidrații din microalge pot fi prezenți într-o varietate de forme (celuloză, amidon și / sau glicogen) și localizați în diferite regiuni ale celulelor. Tipul, locația și concentrația de carbohidrați vor depinde puternic de condițiile de cultivare și de exploatare, cu concentrații cuprinse între 15% și 50%. Trebuie parcurse mai multe etape pentru obținerea bioetanolului din această biomasă. În primul rând, diferite metode (fizico-mecanice, chimice și / sau o combinație a acestora) pot fi folosite pentru a perturba peretele celular și pentru a elibera carbohidrații. După aceea, ar putea fi necesară hidroliza enzimatică pentru a transforma carbohidrații în zaharuri simple. În cele din urmă, o etapă de fermentare a drojdiei sau a bacteriilor este realizată pentru a transforma aceste zaharuri în etanol. Cu toate acestea, este imperativ ca parametrii principali ai acestor etape diferite să fie

optimizați în timpul producției de bioetanol înainte de implementarea industrială, fiind necesare mai multe cercetări privind analiza economică și a ciclului de viață pentru a asigura fezabilitatea economică a procesului (Martín-Juárez *et al.*, 2017).

Diversitatea naturală a mecanismelor de auto-deconstrucție a peretelui celular exprimate de plante ar trebui să fie, de asemenea, de interes pentru dezvoltarea tehnologiei, de exemplu, formarea aerenchimului în timpul scufundării/imersiunii, remobilizarea nutrienților din frunzelor deteriorate cu vârsta și detașarea lor naturală, și extinderea peretelui celular în timpul maturizării fructelor și creșterea organelor. În aceste activități, pot fi găsite noi enzime capabile să degradeze diferiți polimeri de plante (Tavares *et al.*, 2015).

### CONCLUZII

Trecerea de la economia noastră actuală cu un consum ridicat de hidrocarburi, la un viitor cu impact redus asupra mediului, necesită dezvoltarea de noi tehnologii, cum ar fi bioetanolul. Componentele biomasei vegetale (amidonul, celuloza, hemiceluloza și alți polimeri de carbohidrați) au un impact direct asupra calității necesare pentru ca această industrie să reușească. Înțelegerea diferiților factori genetici (enzime, TF-uri și promotori) care controlează anabolismul și catabolismul polimerilor de carbohidrați vegetali este primul pas către dezvoltarea biotehnologiilor. Strategiile evidențiate aici se bazează pe manipularea moleculară a distribuției carbonului în plante, iar dovada conceptului s-a demonstrat cu succes în plantele model. Unele dintre aceste cunoștințe au fost testate în plante de importanță industrială și în condiții de teren. Un alt pas este de a consolida cercetarea plantelor de la tropice, în special sorg, trestie de zahăr, și ierburi necomestibile. Toate aceste exemple biotehnologice inovatoare sunt de interes nu numai pentru industria bioetanolului, ci și pentru îmbunătățirea speciilor utilizate pentru nutriția umană. Ambele pot fi combinate pentru a satisface concomitent cererea tot mai mare de materii prime vegetale în scopuri alimentare și energetice.

### BIBLIOGRAFIE

- Albers S. C., Berklund A. M., Graff G. D. 2016. The rise and fall of innovation in biofuels, *Nature Biotechnology*, 34 (8): 814–821
- Baena-Gonzalez E., Rolland F., Thevelein J. M., Sheen J. 2007. A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling, *Nature*, 448 (7156): 38–942
- Bahaji A., Li J., Sanchez-Lopez A. M. *et al.* 2014. Starch biosynthesis, its regulation and biotechnological approaches to improve crop yields, *Biotechnology Advances*, 32 (1): 87–106

- Balakrishnan M., Sacia E. R., Sreekumar S. et al. 2015. Novel pathways for fuels and lubricants from biomass optimized using life-cycle greenhouse gas assessment, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112 (25):7645–7649
- Baxter H. L., Mazarei M., Labbe N. et al. 2014. Two-year field analysis of reduced recalcitrance transgenic switchgrass, *Plant Biotechnology Journal*, 12 (7): 914–924
- Baxter H. L., Poovaiah C. R., Yee K. L. et al. 2015. Field Evaluation of Transgenic Switchgrass Plants Overexpressing PvMYB4 for Reduced Biomass Recalcitrance, *Bioenergy Research*, 8 (3): 910–921
- Bennett E., Roberts J. A., Wagstaff C. 2012. Manipulating resource allocation in plants, *Journal of Experimental Botany*, 63 (9): 3391–3400
- Bishopp A., Mahonen A. P., Helariutta Y. 2006. Signs of change: Hormone receptors that regulate plant development, *Development*, 133 (10): 1857–1869
- Biswal A. K., Hao Z., Pattathil S. et al. 2015. Downregulation of GAUT12 in *Populus deltoides* by RNA silencing results in reduced recalcitrance, increased growth and reduced xylan and pectin in a woody biofuel feedstock,” *Biotechnology for Biofuels*, 8 (1): article no. 41
- Blunden J., Arndt D.S. 2016. State of the Climate in 2015, *Bulletin of the American Meteorological Society*, 97 (8): Si–S275.
- Cass C. L., Peraldi A., Dowd P. F. et al. 2015. Effects of Phenylalanine Ammonia Lyase (PAL) knockdown on cell wall composition, biomass digestibility, and biotic and abiotic stress responses in *Brachypodium*, *Journal of Experimental Botany*, 66 (14): 4317–4335
- Chuck G. S., Tobias C., Sun L. et al. 2011. Overexpression of the maize *Corngrass1* microRNA prevents flowering, improves digestibility, and increases starch content of switchgrass, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 (42): 17550–17555
- Chundawat S. P. S., Beckham G. T., Himmel M. E., Dale B.E. 2011. Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals, *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 2: 121–145, 2011.
- Delatte T. L., Sedijani P., Kondou Y. et al. 2011. Growth arrest by trehalose-6-phosphate: An astonishing case of primary metabolite control over growth by way of the SnRK1 signaling pathway, *Plant Physiology*, 157 (1): 160–174
- Do P. T., De Tar J. R., Lee H., Folta M. K., Zhang Z. J. 2016. Expression of *ZmGA20ox* cDNA alters plant morphology and increases biomass production of switchgrass (*Panicum virgatum* L.), *Plant Biotechnology Journal*, 14 (7): 1532–1540
- Ehrlich P. R., Harte J. 2015. Opinion: To feed the world in 2050 will require a global revolution, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112 (48): 14743-14744
- Figueroa C. M., Lunn J. E. 2016. A tale of two sugars: Trehalose 6-phosphate and sucrose, *Plant Physiology*, 172 (!): 7–27
- Food and Agriculture Organization, *The State of Food and Agriculture 2008*, FAO, Rome, Italy, 2008
- Fouquet R. 2016. Path dependence in energy systems and economic development, *Nature Energy*, 1 (8), Article ID 16098
- Furtado A., Lupoi J. S., Hoang N. V. et al. 2014. Modifying plants for biofuel and biomaterial production, *Plant Biotechnology Journal*, 12 (9): 1246–1258
- Graf A., Schlereth A., Stitt M., Smith A. M. 2010. Circadian control of carbohydrate availability for growth in *Arabidopsis* plants at night, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107 (20): 9458–9463
- Grudnicki M., Ianovici N. 2014. Noțiuni teoretice și practice de Fiziologie vegetală, Ed. Mirton, Timișoara, 289 p.

- Hilscher J., Burstmayr H., Stoger E. 2017. Targeted modification of plant genomes for precision crop breeding,” *Biotechnology Journal*, 12 (1): Article ID 1600173
- Ianovici N. 2010. Citohistologie și morfoanatomia organelor vegetative, Ed. Mirton, Timișoara, 385 p.
- Jansson C., Westerbergh A., Zhang J., Hu X., Sun C. 2009. Cassava, a potential biofuel crop in (the) People’s Republic of China. *Applied Energy*. 86, Supplement 1: S95-S99. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2009.05.011>
- Jeon H.-W., Cho J.-S., Park E.-J., Han K.-H., Choi Y.-I., Ko J.-H. 2016. Developing xylem-preferential expression of PdGA20ox1, a gibberellin 20-oxidase 1 from *Pinus densiflora*, improves woody biomass production in a hybrid poplar, *Plant Biotechnology Journal*, 14 (4): 1161–1170
- Jonker W.D. 2015. Biofuel implications of a green economy transition in the Western Cape province of South Africa: A system dynamics modelling approach to biofuel. Masters thesis, Stellenbosch University. <http://hdl.handle.net/10019.1/97865>
- Jung J. H., Altpeter F. 2016. TALEN mediated targeted mutagenesis of the caffeic acid O-methyltransferase in highly polyploid sugarcane improves cell wall composition for production of bioethanol, *Plant Molecular Biology*, 92 (1-2): 131–142
- Jungers J. M., Fargione J. E., Sheaffer C. C., Wyse D. L., Lehman C. 2013. Energy potential of biomass from conservation grasslands in Minnesota, USA, *PLoS ONE*, 8 (4): 4, Article ID e61209
- Kretzschmar T., Pelayo M. A. F., Trijatmiko K. R. et al. 2015. A trehalose-6-phosphate phosphatase enhances anaerobic germination tolerance in rice, *Nature Plants*, 1, Article ID 15124
- Kromdijk J., Głowacka K., Leonelli L. et al. 2016. Improving photosynthesis and crop productivity by accelerating recovery from photoprotection, *Science*, 354 (6314): 857–861
- Kwak M., Velasco D., Gepts P. 2008. Mapping homologous sequences for determinacy and photoperiod sensitivity in common bean (*Phaseolus vulgaris*), *Journal of Heredity*, 99 (3): 283–291
- Li F., Zhang M., Guo K. et al. 2015. High-level hemicellulosic arabinose predominately affects lignocellulose crystallinity for genetically enhancing both plant lodging resistance and biomass enzymatic digestibility in rice mutants, *Plant Biotechnology Journal*, 13 (4): 514–525
- Marriott P. E., Sibout R., Lapierre C. et al. 2014. Range of cellwall alterations enhance saccharification in *Brachypodium distachyon* mutants, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111 (40): 14601–14606
- Martín-Juárez J., Markou G., Muylaert K., Lorenzo-Hernando A., Bolado S. 2017. Breakthroughs in bioalcohol production from microalgae. Solving the hurdles. 183-207. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101023-5.00008-X>
- Mickelbart M.V., Hasegawa P. M., Bailey-Serres J. 2015. Genetic mechanisms of abiotic stress tolerance that translate to crop yield stability, *Nature Reviews Genetics*, 16 (4): 237–251
- Mugford S. T., Fernandez O., Brinton J. et al. 2014. Regulatory properties of ADP glucose pyrophosphorylase are required for adjustment of leaf starch synthesis in different photoperiods, *Plant Physiology*, 166 (4): 1733–1747
- Nigorikawa M., Watanabe A., Furukawa K., Sonoki T., Ito Y. 2012. Enhanced saccharification of rice straw by overexpression of rice exo-glucanase, *Rice*, 5 (1)
- Nunez-Lopez L., Aguirre-Cruz A., Barrera-Figueroa B. E., Pena-Castro J.M. 2015. Improvement of enzymatic saccharification yield in *Arabidopsis thaliana* by ectopic expression of the rice SUB1A-1 transcription factor, *PeerJ*, 2015 (3): article no. e817

- Paparelli E., Parlanti S., Gonzali S. et al. 2013. Nighttime sugar starvation orchestrates gibberellin biosynthesis and plant growth in Arabidopsis, *Plant Cell*, 25 (10): 3760–3769, 2013.
- Peña-Castro J.M., del Moral S., Núñez-López L., Barrera-Figueroa B., Amaya-Delgado L. 2017. Biotechnological Strategies to Improve Plant Biomass Quality for Bioethanol Production. BioMed Research International. Volume 2017, Article ID 7824076
- Poovaiah C. R., Bewg W. P., Lan W., Ralph J., Coleman H. D. 2016. Sugarcane transgenics expressing MYB transcription factors show improved glucose release,” *Biotechnology for Biofuels*, 9 (1): article no. 143
- Ren C., Liu J., Gong Q. 2014. Functions of autophagy in plant carbon and nitrogen metabolism, *Frontiers in Plant Science*, 5, article no. 301, 2014.
- Simas-Rodrigues C., Villela H. D. M., Martins A. P., Marques L. G., Colepicolo P., Tonon A. P. 2015. Microalgae for economic applications: Advantages and perspectives for bioethanol, *Journal of Experimental Botany*, 66 (14): 4097–4108
- Smith S. M., Fulton D. C., Chia T. et al. 2004. Diurnal changes in the transcriptome encoding enzymes of starch metabolism provide evidence for both transcriptional and posttranscriptional regulation of starch metabolism in Arabidopsis leaves, *Plant Physiology*, 136 (1): 2687–2699
- Stamatiou G., Vidaurre D. P., Shim I. et al. 2013. Forward genetic screening for the improved production of fermentable sugars from plant biomass, *PLoS ONE*, 8 (1): Article ID e55616
- Stamm P., Verma V., Ramamoorthy R., Kumar P. P. 2012. Manipulation of plant architecture to enhance lignocellulosic biomass, *AoB Plants*, 2012, Article ID pls026.
- Sulpice R., Flis A., Ivakov A. A. et al. 2014. Arabidopsis coordinates the diurnal regulation of carbon allocation and growth across a wide range of Photoperiods, *Molecular Plant*, 7 (1): 137–155
- Tavares E. Q. P., De Souza A. P., Buckeridge M. S. 2015. How endogenous plant cell-wall degradation mechanisms can help achieve higher efficiency in saccharification of biomass, *Journal of Experimental Botany*, 66 (14): 4133–4143
- Tiessen A., Padilla-Chacon D. 2013. Subcellular compartmentation of sugar signaling: Links among carbon cellular status, route of sucrolysis, sink-source allocation, and metabolic partitioning, *Frontiers in Plant Science*, 3, article no. 306
- Vanholme B., Desmet T., Ronsse F. et al. 2013. Towards a carbonnegative sustainable bio-based economy, *Frontiers in Plant Science*, 4, article no. 174
- Vanholme R., Cesarino I., Rataj K. et al. 2013. Caffeoyl shikimate esterase (CSE) is an enzyme in the lignin biosynthetic pathway in arabidopsis, *Science*, 341 (6150): 1103–1106
- Vargas L., Cesarino I., Vanholme R. et al. 2016. Improving total saccharification yield of Arabidopsis plants by vessel-specific complementation of caffeoyl shikimate esterase (cse) mutants, *Biotechnology for Biofuels*, 9(1): article no. 139
- Waclawovsky A. J., Sato P.M., Lembke C. G., Moore P.H., Souza G. M. 2010. Sugarcane for bioenergy production: an assessment of yield and regulation of sucrose content, *Plant Biotechnology Journal*, 8 (3): 263–276
- Wahl V., Ponnu J., Schlereth A. et al. 2013. Regulation of flowering by trehalose-6-phosphate signaling in Arabidopsis thaliana, *Science*, 339 (6120): 704–707
- Wahl V., Ponnu J., Schlereth A. et al. 2013. Regulation of flowering by trehalose-6-phosphate signaling in Arabidopsis thaliana, *Science*, 339 (6120): 704–707
- Wang J., Nayak S., Koch K., Ming R. 2013. Carbon partitioning in sugarcane (*Saccharum* species), *Frontiers in Plant Science*, 4, article 201, pp. 1–6, 2013.

**GAVRILĂ** *et al.*: Aspects on improving the quality of plant biomass for bioethanol production

- Welker C. M., Balasubramanian V. K., Petti C., Rai K. M., De Bolt S., Mendu V. 2015. Engineering plant biomass lignin content and composition for biofuels and bioproducts, *Energies*, 8(8): 7654–7676
- Wills D. M., Whipple C. J., Takuno S. et al. 2013. From many, one: genetic control of prolificacy during maize domestication, *PLoS Genetics*, 9 (6): Article ID e1003604, 2013
- Yang H., Wei H., Ma G. et al. 2016. Cell wall targeted iron accumulation enhances biomass conversion and seed iron concentration in Arabidopsis and rice, *Plant Biotechnology Journal*, 14 (1): 1998–2009
- Zayed H., Sahu J., Suely A., Boyce A., Faruq G. 2017. Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 71: 475–501
- Zhou J., Lee C., Zhong R., Ye Z.-H. 2009. MYB58 and MYB63 are transcriptional activators of the lignin biosynthetic pathway during secondary cell wall formation in Arabidopsis, *Plant Cell*, 21 (1): 248–266