

MIKROORGANIZMY W DEGRADACJI CELULOZY

Agata Terebieniec, Natalia Filipowicz

Streszczenie: Celuloza jest podstawowym składnikiem komórek roślinnych. Włókna celulozowe są bardzo ciasno upakowane w ścianach komórek, przez co utrudniają dostęp enzymom celulolitycznym oraz cząsteczkom wody. Najważniejszą rolę w procesie rozkładu celulozy pełnią celulazy, które należą do rodziny hydrolaz glikozydowych. Zdolność do hydrolizy celulozy i hemicelulozy wykazują mikroorganizmy celulolityczne. Prezentują one dwa różne mechanizmy degradacji: hydroliza przy zastosowaniu enzymów skompleksowanych w celulosomie oraz enzymów nietworzących celulosomów.

Słowa kluczowe: celuloza, enzymy celulolityczne, celulosom

1. Opis zagadnienia

Jednym z najpowszechniej występujących w przyrodzie naturalnym polimerem jest celuloza. Jej pojedynczy łańcuch składa się z reszt D-glukopiranozydowych połączonych wiązaniami β -1,4 glikozydowymi. Stabilizację struktury polisacharydu zapewniają wewnątrz - i zewnątrz łańcuchowe wiązania wodorowe oraz oddziaływania Van der Waalsa. Występują dwie formy natywnej celulozy – krystaliczna i amorficzna (bezpociągowa) [Brown, 2004]. Krystaliczna celuloza występuje w dwóch postaciach – celulozy I i II. W środowisku naturalnym przeważa forma I, w której łańcuchy polisacharydowe są ułożone równolegle. Ponadto celuloza I występuje w formach α oraz β , spośród których to I β jest trwalsza. Tworzy ona podwójny jednoskośny łańcuch, natomiast mniej stabilna forma I α ma postać pojedynczego trójskośnego łańcucha [Festucci – Buselli et al. 2007].

Kluczową rolę w procesie rozkładu celulozy pełnią enzymy celulolityczne, które należą do rodziny hydrolaz glikozydowych. Hydrolizują one wiązania β -1,4-glikozydowe pomiędzy cząsteczkami glukozy w łańcuchu polimeru. Podstawowe typy celulaz to: endoglukanazy, egzoglukanazy, β -glukozydazy [Lynd et al. 2002].

Endoglukanazy hydrolizują łańcuch polisacharydowy w przypadkowych amorficznych miejscach wewnątrz struktury celulozy. Generują w ten sposób cząsteczki oligosacharydów o różnych długościach. Egzoglukanazy, wśród których wyróżnia się glukanohydrolazy i celobiohydrolazy, hydrolizują cząsteczki celulozy, działając na końcach redukujących i nieredukujących łańcucha. Produktami reakcji są cząsteczki glukozy lub celobiozy. β -glukozydazy rozkładają celodekstryny i celobiozę do glukozy [Lynd et al. 2002].

Struktura segmentowa jest cechą charakterystyczną większości enzymów celulolitycznych. Enzym zawiera jednostkę katalityczną oraz jednostkę wiążącą węglowodany - CBM (carbohydrate binding module). CBM wiąże enzym na powierzchni łańcucha celulozy. Najprawdopodobniej, dzięki zbliżeniu do siebie powierzchni polisacharydu z domeną katalityczną, rozkład celulozy jest ułatwiony [Lynd et al. 2002].

Ze względu na to, że celuloza jest jednym z najpowszechniej występujących w przyrodzie biopolimerów, istnieje szereg wysoko wyspecjalizowanych organizmów zdolnych do jej degradacji. Pełnią one ważną rolę w obiegu węgla w przyrodzie. Spontaniczna degradacja celulozy w naturze jest zjawiskiem bardzo powolnym. Odpowiadają za nią organizmy celulolityczne - bakterie i grzyby. Mają one zdolność do degradacji krystalicznej formy celulozy, są to np. *Trichoderma reesei*, *Clostridium thermocellum*, *Thermobifida fusca* [Sandgren et al. 2004].

W zależności od sposobu organizacji enzymów, mikroorganizmy celulolityczne można podzielić na dwie grupy. Przedstawiciele pierwszej z nich posiadają multienzymatyczne kompleksy zwane celulosomami. Przykładami organizmów posiadających celulosomy są *Clostridium thermocellum*, czy *Clostridium cellulolyticum*. Kolejną grupę stanowią bakterie i grzyby nietworzące celulosomów. W ich przypadku enzymy działają w sposób kooperatywny, dzięki czemu efektywność hydrolizy jest znacznie wyższa. Przykładami takich drobnoustrojów są: *Trichoderma reesei*, *Hemicella grisea*, czy *Streptomyces lividans* [Sandgren et al. 2004].

Celulosomy to multienzymatyczne kompleksy, ulokowane na powierzchni komórek mikroorganizmów. W zależności od stopnia skomplikowania celulosomu, wyróżnia się proste i złożone systemy. W systemach prostych występuje jedna cząsteczka CBM, pojedyncze kohezyny oraz od jednego do kilku modułów X2. Te ostatnie to hydrofobowe cząsteczki, co do których uważa się, że mogą mieć udział w wiązaniu kompleksu

enzymów do ściany komórkowej. Złożone systemy zawierają kilka połączonych ze sobą skafoldyn. Przynajmniej jedna ze skafoldyn pełni funkcję głównej [Doi and Kosugi 2004].

Skafoldyna stanowi podstawowy element każdego celulosomu. Jest to białko fibrylarne, zawierające kohezyny - miejsca wiązania enzymów celulolitycznych oraz cząsteczki lub domeny wiążące celulozę (oznaczanych jako CBM lub CBD). Większość skafoldyn zawiera od 6 do 9 różnych kohezyn, które mają zdolność do związania nawet 26 enzymów celulolitycznych. Z drugiej strony enzymy celulolityczne wchodzące w skład celulosomów posiadają miejsca wiązania kohezyn, zwane dokerynami. Oddziaływanie pomiędzy kohezynami a dokerynami to ważny czynnik w procesie składania celulosomu. W wiązaniu kohezyny z dokeryną pośredniczą oddziaływania hydrofobowe. Dokładna budowa skafoldyn różni się pomiędzy poszczególnymi gatunkami bakterii [Doi and Kosugi 2004].

Jak wspomniano wcześniej, nie wszystkie mikroorganizmy celulolityczne wytwarzają celulosomy, część nie posiada „zwartego” kompleksu enzymatycznego. Przedstawicielem tej grupy są aerobowe grzyby. Taki system enzymatyczny reprezentuje *Trichoderma reesei*. *T. reesei* produkuje przynajmniej dwie egzoglukanazy: celobiohydrolazę I (CBHI) i celobiohydrolazę II (CBHII), pięć endoglukanaz (EG): EGI, EGII, EGIII, EGIV, EGV oraz dwie β -glukozydazy (BGL): BGLI i BGLII. Konieczność występowania dwóch egzoglukanaz wynika ze specyfiki ich działania. CBHI hydrolizuje końce redukujące, a CBHII nieredukujące łańcuchów celulozy. Celbioza to podstawowy produkt degradacji celulozy w wyniku działania CBHI. Aktywność enzymatyczna celobiohydrolaz jest podstawą degradacji mikrokrystalicznej celulozy. Niemniej jednak enzymy te nie mają zdolności do szybkiej depolimeryzacji sacharydu. Za ten proces odpowiadają endoglukanazy, rozcinające łańcuchy celulozy w miejscach o strukturze amorficznej. W ten sposób tworzą nowe końce łańcuchów. Współdziałanie enzymów jest podstawą funkcjonowania systemu celulolitycznego *T. reesei*. Jednakże mikroorganizm ten, podobnie jak niektóre *Clostridia* posiada cząsteczki odpowiadające za związanie celulozy (CBM), co ułatwia degradację polisacharydów. CBM znajdują się na powierzchni komórki. Należą do rodziny CBM1 i wiążą się do krystalicznej celulozy [Lynd et al. 2002; Y.- H. P. Zhang, L. R. Lynd 2004].

Enzymy celulolityczne są wykorzystywane w wielu gałęziach przemysłu, takich jak przemysł tekstylny, spożywczy czy produkcja biopaliw. W procesie depolimeryzacji celulozy często stosowane są kultury mieszane drobnoustrojów (np. kilku szczepów bakterii). W tym przypadku ważny jest sposób doboru mikroorganizmów, tak by ich hodowlę można było prowadzić w jednym reaktorze. Ponadto wymagane jest także, by drobnoustroje posiadały różny skład enzymów celulolitycznych, aby zapewnić jak najwydajniejszą degradację celulozy.

2. Literatura

Brown R.M., JR. 2004. Cellulose Structure and Biosynthesis: What is in Store for the 21 st Century? Journal of polymer science Part A Polymer Chemistry 42: 487-495

Doi R.H., Kosugi A. 2004. Cellulosomes: Plant-Cell-Wall Degrading Enzyme Complexes. Nature Reviews Microbiology 2: 541-551

Festucci-Buselli R.A., Otoni W.C., Joshi C.P. 2007. Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants Brazilian Journal of Plant Physiology 19: 1-13

Lynd L.R., Weimer P.J., van Zyl W.H., Pretorius I.S. 2002. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology Microbiology and Molecular Biology Reviews 66: 506-577

Sandgren M., Gualfetti P.J., Shaw A., Gross L.S., Saldajeno M., Day A.G., Jones T.A., Mitchinson C. 2003. Comparison of family 12 glycoside hydrolases and recruited substitutions important for thermal stability. Protein Science 12: 848-860

Zhang Y-H.P., Lynd L.R. 2004. Toward an Aggregated Understanding of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: Noncomplexed Cellulase Systems. Biotechnology and bioengineering 88: 797-824

Nazwa instytucji: Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny, Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii

Opiekun naukowy: dr hab. inż. Hubert Cieśliński

Adres do korespondencji: terebieniecagata@gmail.com