

## 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  $\beta$ -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  $\alpha$  oraz  $\beta$ , spośród których to I $\beta$  jest trwalsza. Tworzy ona podwójny jednoskośny łańcuch, natomiast mniej stabilna forma I $\alpha$  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  $\beta$ -1,4-glikozydowe pomiędzy cząsteczkami glukozy w łańcuchu polimeru. Podstawowe typy celulaz to: endoglukanazy, egzoglukanazy,  $\beta$ -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.  $\beta$ -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 „zwarłego” 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  $\beta$ -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