

Enzimaska hidroliza celulozne biomase

Žerjav, Marko

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:159:544793>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-04**



Repository / Repozitorij:

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



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

Marko Žerjav
0058215110

ENZIMSKA HIDROLIZA CELULOZNE BIOMASE

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biotehnologija 2

Mentor: prof. dr. sc. Sunčica Beluhan

Zagreb, 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Enzimska hidroliza celulozne biomase

Marko Žerjav, 0058215110

Sažetak: Celulaze (EC 3.2.1.4) kataliziraju hidrolizu β -1,4-D-glikozidnih veza u celulozi i imaju značajnu ulogu u prirodi reciklirajući ovaj polisaharid, koji je glavna komponenta stanične stijenke biljke. Ogroman potencijal koji celulaze imaju u biotehnologiji, pokretačka je snaga za stalna osnovna i primijenjena istraživanja ovih biokatalizatora iz gljiva i bakterija. Celulaze djeluju sinergistički s drugim hidrolitičkim enzimima kako bi se postigla potpuna razgradnja polisaharida do topljivih šećera, naime celobioze i glukoze, koje stanica zatim asimilira. Nekoliko vrsta plijesni proizvodi velike količine izvanstaničnih celulolitičkih enzima, dok bakterijski i nekoliko anaerobnih sojeva viših gljiva uglavnom proizvode celulolitičke enzime u kompleksu povezanom sa staničnom stijenkom koji se naziva celulosom. Celulaze i celulosomi imaju veliki potencijal za industrijsku primjenu i u središtu su napora da se stvori idealan mikroorganizam za pretvorbu celulozne biomase u vrijedne proizvode.

Ključne riječi: celulaze, celulosomi, celulozna biomasa, bakterije, fungi

Rad sadrži: 28 stranica, 10 slika, 1 tablica, 43 literaturnih navoda, 0 priloga

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: prof. dr. sc. Sunčica Beluhan

Datum obrane: x. rujna 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Biochemical Engineering, Industrial Microbiology, Malting and Brewing Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass

Marko Žerjav, 0058215110

Abstract: Cellulases (EC 3.2.1.4) catalyze the hydrolysis of β -1,4- D-glycosidic linkages in cellulose and play a significant role in nature by recycling this main polysaccharide component of the plant cell wall. The enormous potential cellulases have in biotechnology is the driving force for continuous basic and applied research on these biocatalysts from fungi and bacteria. Cellulases work in synergy with other hydrolytic enzymes to obtain the complete degradation of the polysaccharide to soluble sugars, namely cellobiose and glucose, which are then assimilated by the cell. Several fungi produce large amounts of extracellular cellulolytic enzymes, whereas bacterial and a few anaerobic fungal strains mostly produce cellulolytic enzymes in a complex associated with the cell wall called cellulosome. Cellulases and cellulosomes hold immense potential for industrial application and are the focus of much effort to engineer an ideal microorganism for converting cellulosic biomass to valuable products.

Keywords: cellulases, cellulosomes, cellulosic biomass, bacteria, fungi

Thesis contains: 28 pages, 10 figures, 1 tables, 43 references, 0 supplements

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: Sunčica Beluhan, PhD, Full Professor

Thesis defended: September x, 2022

SADRŽAJ

1.UVOD	1
2.TEORIJSKI DIO.....	3
2.1..CELULOZA	3
2.1.1. STRUKTURA I GRAĐA BILJNE STANIČNE STIJENKE	3
2.1.2. STRUKTURA CELULOZE	5
2.1.3. KRISTALINIČNOST CELULOZE	6
2.1.4. ALOMORFNE STRUKTURE CELULOZE	8
2.2..RAZGRADNJA CELULOZE	10
2.2.1. MIKROORGANIZMI KOJI RAZGRADJUJU CELULOZU	10
2.2.1.1. CELULOLITIČKI ENZIMI IZ EKSTREMNIH SREDINA	12
2.2.2. RAZGRADNJA CELULOZE CELULOSOMIMA	13
2.2.3. RAZGRADNJA CELULOZE NE CELULOSOMSKIM ENZIMIMA	15
2.2.4. STRUKTURA CELULAZA	15
2.2.5. BIORAZGRADNJA CELULOZE	16
2.2.5.1. MEHANIZMI BIORAZGRADNJE CELULOZE	17
2.3..CELULAZE	18
2.3.1. ENDOGLUKANAZE	20
2.3.2. EGZOGLUKANAZE	21
2.3.3. B-GLUKOZIDAZE	22
2.3.4. SINERGISTIČKO DJELOVANJE CELULAZA	22
3.ZAKLJUČCI.....	23
4.POPIS LITERATURE	24

1. UVOD

Celuloza je najobilniji obnovljivi polimer na zemlji i smatra se gotovo neiscrpnom sirovinom. Kao najzastupljenija organska molekula na planeti, sastavni je dio stanične stijenke biljaka i algi, a neke životinje, poput plaštenjaka, te pojedine bakterije također mogu biti proizvođači te značajne sirovine (Lynd i sur., 2002). Na molekularnoj razini, to je linearni polimer glukoze koji se sastoji od anhidro-glukoznih jedinica povezanih β -1,4-glikozidnim vezama. Broj jedinica glukoze u molekuli celuloze varira od 250 do 10000, ovisno o izvoru i prethodnoj obradi lignocelulozne sirovine. Razlog zbog kojeg ne dolazi do njene akumulacije u okolišu je postojanje celulolitičkih bakterija, plijesni i viših gljiva kod kojih su prisutni enzimi poput lakaza, celulaza i hemicelulaza, a koji djeluju tako da sporo razgrađuju određene sastojke stanične stijenke biljaka, točnije, lignin, celulozu i hemicelulozu (Dashtban i sur., 2009; Baldrian i Valášková, 2008). U biljnim staničnim stijenkama celulozni mikrofibrili obavijeni su ligninom i hemicelulozom, tvoreći tako kompleksnu strukturu koja, uz kristaliničnu strukturu celuloze, utječe na otpornost neobrađene celulozne biomase na hidrolizu fermentabilnih šećera (Wada i sur., 2008). Učinkovita razgradnja polisaharida do fermentabilnih šećera mogla bi utjecati na unaprjeđenje proizvodnje biogoriva, a porast potrošnje energije, iscrpljivanje rezervi fosilnih goriva, te nastojanja da se očuva i zaštititi okoliš, samo su neki od razloga zbog kojih je težište stavljeno na korištenje i proizvodnju biogoriva (Quiroz-Castañeda i sur., 2011).

Celulozni materijali posebno su privlačni zbog svoje relativno niske cijene. Kao najobilniji polisaharid u prirodi, razgradnja celuloze igra ne samo ključnu ulogu u ciklusu ugljika u prirodi, već također pruža veliki potencijal za veliki broj primjena, ponajprije proizvodnju biogoriva i kemikalija (Ejaz i sur., 2021). Glavna tehnološka zapreka široj proizvodnji je opći nedostatak jeftine tehnologije za prevladavanje izrazite kemijske i fizikalne stabilnosti celuloznih biomasa. Obecavajuća strategija za prevladavanje ove prepreke uključuje proizvodnju celulolitičkih enzima, hidrolizu celuloze i fermentaciju dobivenih šećera u jednom koraku procesa korištenjem mikrobnih ili enzimskih bioprocasa.

Općenito, postoje dva sustava celulolitičkih enzima u mikroorganizmima. U prvom organizam proizvodi skup slobodnih enzima koji sinergistički djeluju na razgradnju stanične stijenke biljke. U drugom su razgradni enzimi organizirani u enzimске komplekse. Aerobne bakterije i više gljive ekstracelularno izlučuju celulaze, dok anaerobne bakterije i plijesni

pokazuju veliku sklonost prijanjanju na polisaharid, pa tako proizvode i celulaze u enzimskim kompleksima zvanim celulosom. Međutim, potpuna razgradnja celuloze odvija se putem složene interakcije između različitih celulolitičkih enzima. Opće je prihvaćeno da tri vrste enzima, uključujući endoglukanaze (EC 3.2.1.4), egzoglukanaze (EC 3.2.1.91) i β -glukozidaze (EC 3.2.1.21) djeluju sinergistički na hidrolizu celuloze do β -glukoze (Singhania i sur., 2009).

U ovom je radu objašnjena celulazna razgradnja celuloze s ciljem oslobađanja šećera iz biomase, a opisani su i struktura celuloze, alomorfni oblici celuloze te njezina hidroliza celulolitičkim organizmima. Prikazani su molekularni i biotehnološki aspekti ovih enzima, klasifikacija te njihovo sinergističko djelovanje.

2. TEORIJSKI DIO

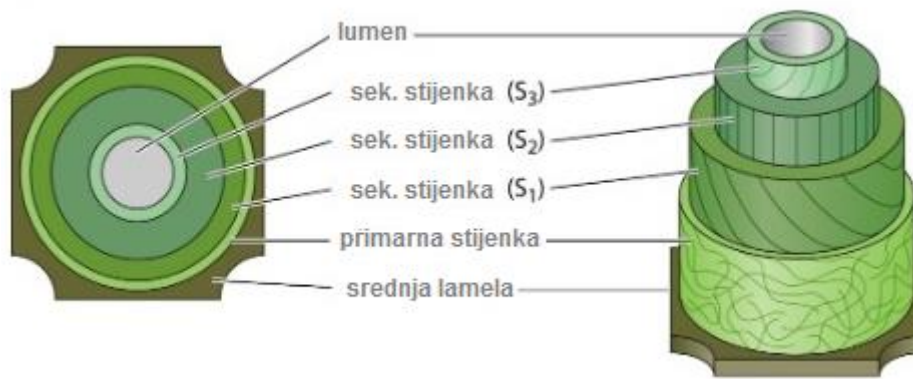
2.1. CELULOZA

2.1.1. STRUKTURA I GRAĐA BILJNE STANIČNE STIJENKE

Biljke koje koriste sunčevu energiju za pretvaranje CO₂ u polisaharide i druge složene molekule, imaju ogroman potencijal kao održive sirovine za biotehnološku proizvodnju. Procjenjuje se da neto fiksacija CO₂ u kopnenim biljkama godišnje iznosi približno $5,6 \times 10^{10}$ tona te da su kopnene biljke zaslužne za proizvodnju biomase koja na svjetskoj razini iznosi $1,7-2,0 \times 10^{11}$ tona. Od toga, procjenjuje se, čak 70 % čini stanična stijenka biljaka (Quiroz-Castañeda i Folch-Mallol, 2013).

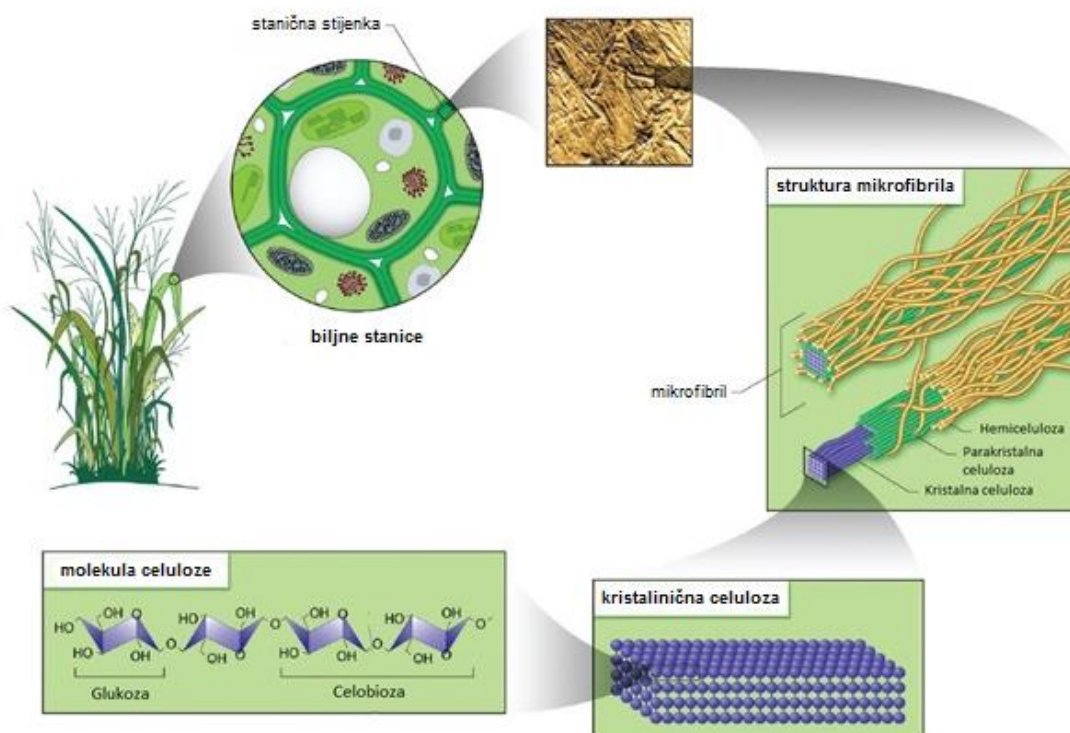
Lignoceluloza je obnovljiva organska sirovina te glavna sastavnica svih biljnih stanica. Biljna lignocelulozna biomasa sastavljena je od 3 ključne komponente: celuloze (40-50 %), hemiceluloze (20-40 %) i lignina (20-30 %). Uz njih, prisutni su još i neki proteini, lipidi, pektin, topljivi šećeri te minerali. Debljina stanične stijenke iznosi približno od 0,1 do 10 μm. Za usporedbu, debljina stanične membrane koju čine proteini i fosfolipidi iznosi manje od 0,1 μm. Primjeri takve biomase su kritosjemenjače, golosjemenjače te zeljaste biljke poput pšenice i trsta. Stanična stijenka ima širok spektar različitih i ponekad oprečnih uloga: stanici omogućava otpornost na mehanički stres koji je nužan za sam oblik stanice, ali i zaštitu od patogena, a osim toga, u isto vrijeme osigurava zadovoljavajuću fleksibilnost zbog sila smicanja, kao i permeabilnost, nužnu za prolaz signalnih molekula u stanicu (Levy i sur., 2002).

Struktura biljne stanične stijenke je prikazana na slici 1. Srednja lamela (0,5-2 μm) uglavnom se sastoji od lignina (70 %), povezanog s malim količinama hemiceluloze, pektina i celuloze. Primarna stijenka, koja se često teško razlikuje od srednje lamele, vrlo je tanka (30-100 nm) a sastoji se od lignina (50 %), pektina i hemiceluloze. Sekundarna stijenka je glavni dio biljke. Njezina glavna komponenta je celuloza i sastoji se od tri sloja: vanjskog, S1 (100–200 nm), središnjeg, S2 (najdeblji sloj od 0,5–8 μm) i unutarnjeg ili tercijarnog sloja, S3 (70–100 nm) koji se nalazi blizu lumena (Rytioja i sur., 2014).



Slika 1. Shematski prikaz strukture biljne stanične stijenke (Rytioja i sur., 2014)

Celuloza sadrži visoko uređena područja poznata kao kristalinični dio, kao i manje uređena, amorfna područja. Celulozni lanac ima jaku tendenciju stvaranja inter i intramolekularnih vodikovih veza među podjedinicama šećera, unutar i između celuloznih lanaca, potičući agregaciju u kristaliničnu strukturu (slika 2).

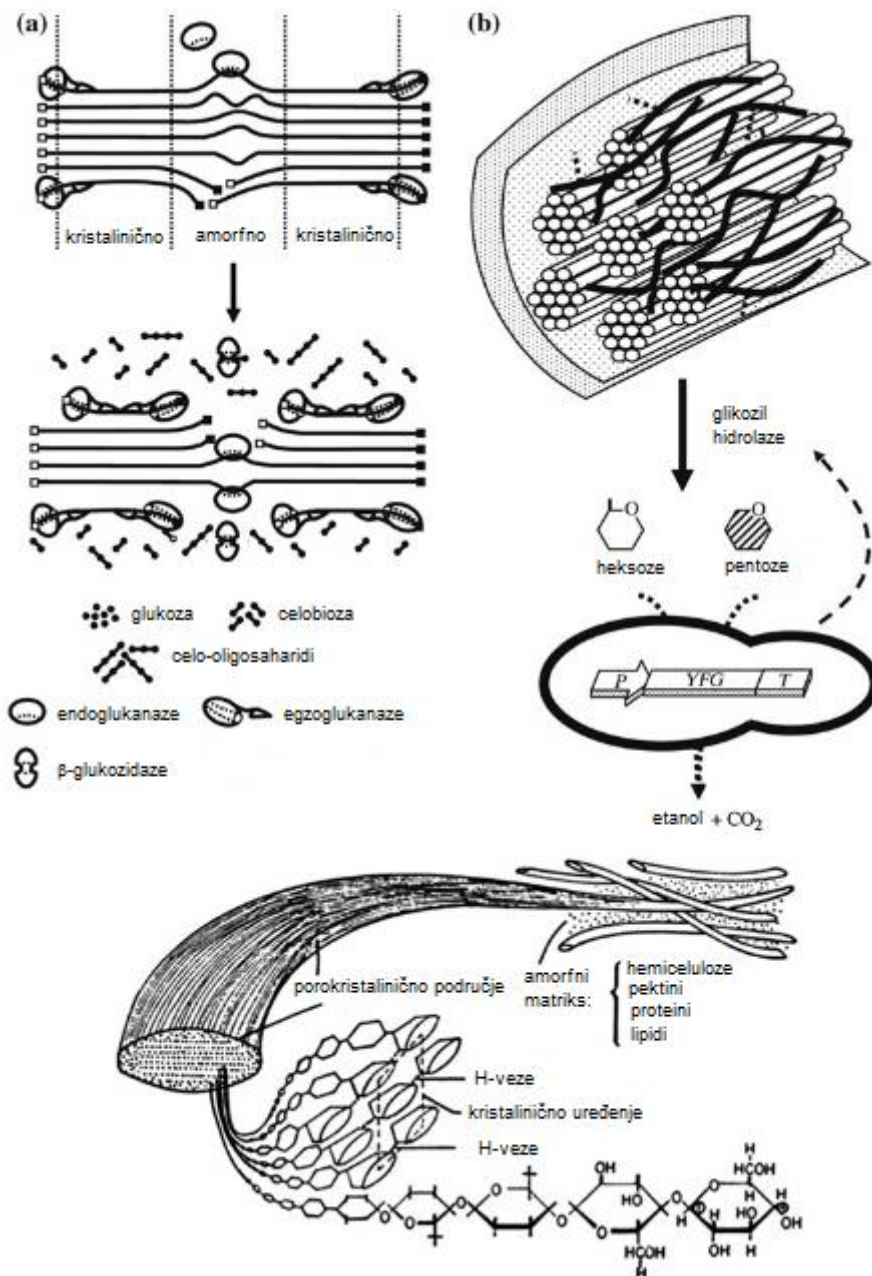


Slika 2. Molekularna struktura biljne stanične stijenke (Quiroz-Castañeda i Folch-Mallol, 2013).

2.1.2. STRUKTURA CELULOZE

Celuloza je polimer ugljikohidrata — dugih lanaca povezanih molekula glukoze zvanih celodekstrini, koji oblikuju kristalinične svežnjeve. Istraživači su karakterizirali nekoliko različitih kristalografskih oblika celuloze, uključujući prirodne oblike koji se nalaze u staničnoj stijenci biljaka, te razne kristalinične oblike nastale obradom prirodne celuloze s kemikalijama poput amonijaka ili ionskih tekućina (Ling i sur., 2017).

Celuloza je ključna komponenta stanične stijenke biljaka, a građena je od usporednih ne razgranatih jedinica D-glukopiranoze, međusobno povezanih β -1,4-glikozidnim vezama. Tako povezane jedinice formiraju visoko organizirane kristalinične mikrofibrile pomoću brojnih inter i intramolekulskih vodikovih veza te van der Waalsovih sila, a područja gdje su te veze prekinute i gdje je narušena kristalinična struktura celuloze su tzv. amorfna područja celuloze. Uzastopno ponovljene molekule glukoze duž lanaca u kristaliničnoj celulozi zakrenute su za 180 stupnjeva. Na krajevima celuloznog lanca nalaze se različite završne skupine; na jednom kraju svakog lanca zastupljena je nereducirajuća skupina gdje je prisutna zatvorena prstenasta struktura, dok se na drugom kraju nalazi reducirajuća skupina s alifatskim ostatkom i karbonilnom grupom. Dakle, celulozni lanac je polarizirana molekula, a elongacija lanca provodi se dodatkom novih glukoznih ostataka na nereducirajući kraj lanca (slika 3).



Slika 3. Kristalinična i amorfna struktura celuloze (Mohamed i Hassabo, 2015)

2.1.3. KRISTALINIČNOST CELULOZE

Kod biljaka, celuloza se sintetizira aktivnošću CESA (celuloza sintaza) proteina koji su prisutni u plazmatskoj membrani te se tamo nalaze u skupinama heksamernog oblika (Kimura, 1999). Kristali celuloze smatraju se nesavršenim kristalinitima te se klasični dvofazni model celuloze zasniva na postojanju kristaliničnih (uređenih) i amorfni (manje uređenih) regija. Kristalinična struktura celuloze podrazumijeva strukturni raspored u kojem je svaki

atom fiksiran na diskretnom položaju u odnosu na druge atome. Bitna značajka kristalinične strukture su čvrsto pakirane molekule svakog pojedinačnog mikrofibrila, s ciljem sprječavanja penetracije enzima te malih molekula poput vode. Visoko uređena kristalinična područja protkana su manje uređenim, odnosno amorfnim regijama celuloze, a te nisko uređene regije čine od 5 do 10 % od ukupnih mikrofibrila. Rezultati mnogih istraživanja pokazali su da ta amorfnna područja lakše podliježu hidrolizi od kristaliničnih područja celuloze te ta činjenica podupire tezu o važnosti inicijalnog stupnja kristaliničnosti prilikom određivanja enzimske razgradnje uzorka celuloze. Kristaliničnost, kao molekulska masa kristaliničnih područja, jedno je od najznačajnijih mjerljivih svojstava koja utječu na enzimsku razgradnju celuloze te se za opisivanje relativne količine kristaliničnog sadržaja u celulozi koristi tzv. indeks kristaliničnosti (*eng.* Crystallinity Index; CI). Općenito, indeks kristaliničnosti u prirodi varira od 40 % do 95 %, dok ostatak čini amorfnna celuloza. Brojem monomernih jedinica u polimernoj molekuli definiran je tzv. stupanj polimerizacije (*eng.* Degree of Polymerization; DP) te se on u celulozi najčešće kreće od 500 do 15000, ovisno o supstratu (tablica 1).

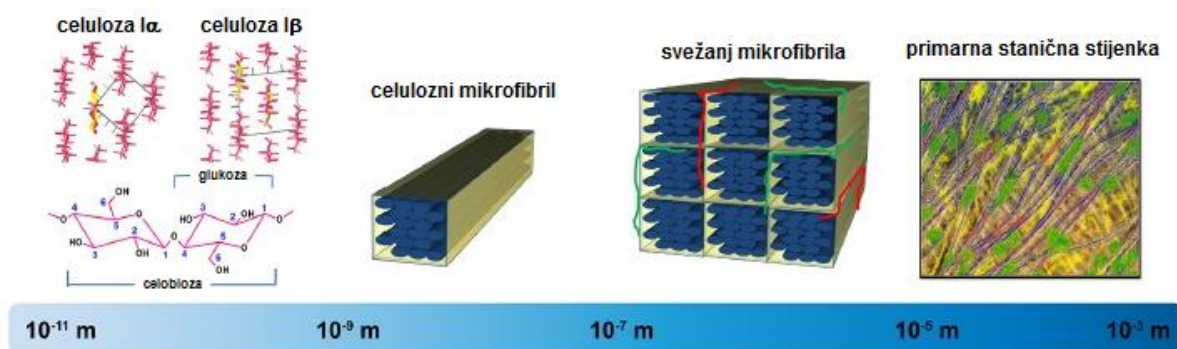
Tablica 1. Neka fizikalna svojstva celuloznih supstrata (Quiroz-Castañeda i Folch-Mallol, 2013).

Supstrat	Indeks kristaliničnosti	Stupanj polimerizacije
Karboksimetil celuloza ^a	N/A	100-2000
Celodekstrini ^a	N/A	2-6
Avicel ^b	0.5-0.6	300
BC ^b	0.76-0.95	2000
PASC ^b	0-0.04	100
Pamuk ^b	0.81-0.95	1000-3000
Filtar papir ^b	0-0.45	750
Drvna celuloza ^b	0.5-0.7	500-1500
Fluka Avicel PH-101 ^b	0.56-0.91	200-240*
Fluka celuloza ^b	0.48-0.82	280*
Sigma α -celuloza ^b	0.64	2140-2420*

*Prema podacima proizvođača. ^a, topljivo; ^b, netopljivo.

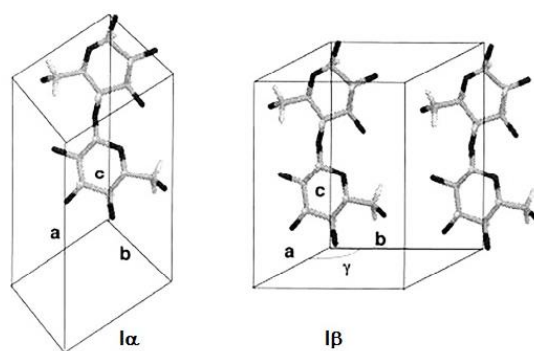
2.1.4. ALOMORFNE STRUKTURE CELULOZE

Proteklih desetljeća analizirani su mnogi podaci o polimorfizmu celuloze te su predstavljene najpouzdanije činjenice još od 1984., kada su objavljeni rezultati NMR istraživanja celuloze. Ponavljajuća jedinica celulozne makromolekule sadrži šest hidroksilnih (OH) grupa te tri atoma kisika. Shodno tome, zastupljenost šest donora vodikove veze i devet akceptora te veze nudi razne mogućnosti za nastajanje vodikovih veza. Zbog različitog rasporeda piranoznih prstenova i potencijalnih konformacijskih promjena hidroksimetilne skupine, celulozni lanci prisutni su u različitim kristaliničnim oblicima (Kovalenko, 2010). Na temelju karakterističnih rendgenskih difrakcijskih uzoraka i ^{13}C NMR spektara identificirana su 4 različita alomorfa celuloze: celuloza I, II, III (III_I, III_{II}) i IV (IV_I, IV_{II}). Najzastupljeniji oblik u prirodi je celuloza I, mješavina dvaju različitih kristaliničnih oblika: celuloze I_α, oblika koji dominira, izoliranog iz bakterije *Komagaetobacter xylinum* i slatkovodne alge *Glaucozystic nostochinearum*, te celuloze I_β koja je primarni oblik kod viših biljaka poput pamuka (Wada i sur., 2008). Celuloza iz morskih algi *Claudophora* sp. i *Valonia venticulata* također je mješavina ova dva tipa, uz dominaciju oblika I_α. Trenutno su poseban naglasak i pozornost stavljeni na celulozu I, a razlog za to je njena potencijalna primjena u proizvodnji bioenergije (slika 4).



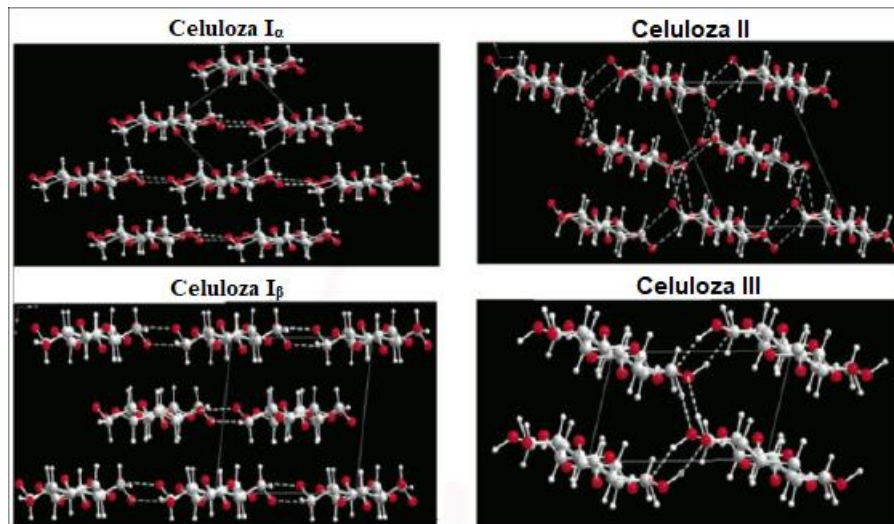
Slika 4. Modeli celuloze I i primarne stanične stijenke (Rongpipi i sur., 2019)

Celulozu I_α obilježava triklinska jednolančana struktura u kojoj su usporedni celulozni lanci poslagani djelovanjem van der Waalsovih sila, uz postupno smicanje usporedno s osi lanca. Kod celuloze I_β karakteristična je monoklinska dvolančana struktura te, shodno tome, usporedni celulozni lanci poslagani uz izmjenično smicanje (slika 5).



Slika 5. Strukture triklnskog i monoklnskog oblika celuloze I (Quiroz-Castañeda i Folch-Mallol, 2013).

Celuloza II je najkristaličniji termodinamički stabilan oblik celuloze, a može se dobiti iz celuloze I na dva različita načina: mercerizacijom (alkalna obrada) i regeneracijom (otapanje i potom rekristalizacija). Celuloza II, baš kao i celuloza I_{β} , ima monoklinsku jediničnu strukturu (prostorna grupa P21), a različiti raspored lanaca (paralelni u celulozi I_{β} te antiparalelni u celulozi II) najznačajnija je razlika između ova dva polimorfna oblika. Postojanje trodimenzionalne mreže vodikovih veza i C-O-C veza između glukopiranoznih prstena čini celulozu iznimno krutom makromolekulom, a izostankom tih mreža vodikovih veza lanci postaju mnogo fleksibilniji. Upravo vodikove veze snose odgovornost za slabu topljivost celuloze, ali i za različitu reaktivnost hidroksilnih skupina u reakcijama esterifikacije (Kovalenko, 2010). Tretmanom celuloze I i celuloze II s amonijakom, u reverzibilnoj reakciji, mogu se dobiti celuloza III_I i III_{II} . Obrada amonijakom, osim dobivanja spomenutih alomorfa, također može utjecati na neke fizičke karakteristike celuloze, poput stupnja kristaliničnosti i tako pojačati pristup celulazama i kemijsku reaktivnost. Sam stupanj konverzije iz celuloze I u celulozu III ovisi o vremenu reakcije te temperaturi u posljednjoj fazi obrade. Kristalinična struktura celuloze III određena je primjenom sinkrotronskih X-zraka i difrakcijskom analizom neutronske vlakna, a rezultati su pokazali da celuloza III ima nižu gustoću pakiranja od celuloze I_{α} i I_{β} (slika 6) (Wada i sur., 2004).



Slika 6. Projekcije kristaliničnih struktura celuloze I (α i β), II i III (Wada i sur., 2004).

Najjednostavnija metoda za pripremu celuloze IV je zagrijavanje celuloze III te su tako i njena dva polimorfa; celuloza IV_I i IV_{II} dobivena iz celuloze III_I i III_{II}. Celuloza IV općenito se može dobiti tretmanom u glicerolu pri 260 °C, nakon transformacije u celulozu II ili III. Celuloza I ne može se izravno prevesti u celulozu IV (Wada i sur., 2004). Celuloza IV, zbog fibrilacije, nije prikladna za kristalografsku analizu, odnosno, interpretacija celuloze IV kao kristala je otežana. Unatoč postignutom značajnom napretku u analizi kristalinične strukture celuloze u mikrofibrilima, mnoga su pitanja još uvijek ostala neodgovorena te je tek potrebno provesti istraživanja kako bi se još bolje razumjela struktura celuloze.

2.2. RAZGRADNJA CELULOZE

2.2.1. MIKROORGANIZMI KOJI RAZGRAĐUJU CELULOZU

S obzirom da je jako teško razgraditi celulozu kao komponentu stanične stijenke biljaka, tek je nekoliko mikroorganizama u stanju provesti razgradnju stanične stijenke i pritom hidrolizirati celulozu. U tu skupinu ubrajaju se određeni anaerobni i aerobni rodovi bakterija te poneke gljive. Općenito gledano, prisutna su dva sustava mikrobne razgradnje stanične stijenke. U prvom, organizam proizvodi set slobodnih enzima koji zajedno sinergistički djeluju u razgradnji stanične stijenke biljaka. U drugom su tipu razgradni enzimi smješteni na staničnoj površini te su organizirani u enzimski kompleks – celulosom, koji vrlo učinkovito

razgrađuje staničnu stijenku biljaka. Anaerobne i aerobne bakterije koriste različite pristupe za razgradnju svojih celulozičkih supstrata: dok anaerobne bakterije razgrađuju celulozu aktivnošću celulosoma, aerobne bakterije ekstracelularno izlučuju enzime koji slobodno difundiraju do celuloze te ju hidroliziraju. Anaerobne bakterije iz reda *Clostridiales* uglavnom su prisutne u tlu, trulim biljnim ostacima, buragu preživača, kompostu, otpadnoj vodi, a mogu se pronaći i u crijevima insekata poput termita, knjiških moljaca te su u tom simbiotskom odnosu odgovorne za razgradnju celuloze. Anaerobna hidroliza čini 5 % - 10 % od ukupne celulozne razgradnje (Ransom-Jones i sur., 2012). Aerobne bakterije s celulozičkom aktivnošću iz reda *Actinomycetales* zastupljene su u tlu, vodi, humusu, poljoprivrednom otpadu (šećerna trska), i trulom lišću, a karakterizira ih izlučivanje enzima (celulaza) koji su u stanju razgraditi celulozu (Doi, 2008). U aerobnih bakterija poput *Pseudomonas fluorescens*, *Streptomyces lividans* te *Cellulomonas fimi* također su uočeni sustavi za celulozičku razgradnju. Anaerobne bakterije s celulozičkom aktivnošću su *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Clostridium cellulovorans*, *C. cellulolyticum* i *C. thermocellum*. Zbog značajnih fizioloških razlika između celulozičkih bakterija, ponekad ih je teško klasificirati striktno kao aerobne i anaerobne. Iz tog je razloga uspostavljena nova podjela te se stoga bakterije mogu smjestiti u 3 različite fiziološke grupe: (1) fermentativni anaerobi, obično Gram-pozitivne (*Clostridium* i *Ruminococcus*), ali i neke Gram-negativne vrste (*Butyrivibrio* i *Acetivibrio*) filogenetski bliske sa skupinom *Clostridium* (*Fibrobacter*); (2) aerobne Gram-pozitivne bakterije (*Cellulomonas* i *Thermobifida*); (3) fakultativno aerobne bakterije (*Cytophaga* i *Sporocytophaga*) (Ransom-Jones i sur., 2012; Lynd i sur., 2002).

Sposobnost iskorištavanja lignoceluloznog materijala široko je rasprostranjena među višim gljivama, od hitridiomiceta do bazidiomiceta. Danas je poznato više od 14000 gljiva s celulozičkom aktivnošću (Baldrian i Valášková, 2008). Od gljiva, bazidiomicete, kao ključni razlagači organskog materijala, najučinkovitije koriste drvo kao supstrat te su stoga često smatrani glavnom taksonomskom skupinom koja provodi aerobnu razgradnju drva i svih njegovih komponenata. Te aerobne gljive proizvode ekstracelularne enzime poput lakaza, hemicelulaza i celulaza, koji provode lignoceluloznu razgradnju, a određene gljive iz razreda askomiceta također mogu provoditi razgradnju celuloznog materijala. Neke anaerobne gljive iz skupine hitridiomiceta, za razliku od aerobnih gljiva, imaju multienzimske komplekse poput celulosoma u bakterija. Razmatranjem taksonomskog sastava celulozičkih gljiva koje obitavaju na trulom lišću i drvetu u šumama utvrđeno je da je od zigomiceta zastupljen samo

jedan rod, *Mucor*, a od bazidiomiceta prisutni su rodovi *Chaetomium*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Coriolus*, *Phanerochaete*, *Schizophyllum*, *Volvariella*, *Pycnoporus* i *Bjerkandera*. Zbog njihovog industrijskog značaja, dvije najizučavanije gljive su *Trichoderma reesei* i *Phanerochaete chrysosporium* (Baldrian i Valášková, 2008).

2.2.1.1. CELULOLITIČKI ENZIMI IZ EKSTREMNIH SREDINA

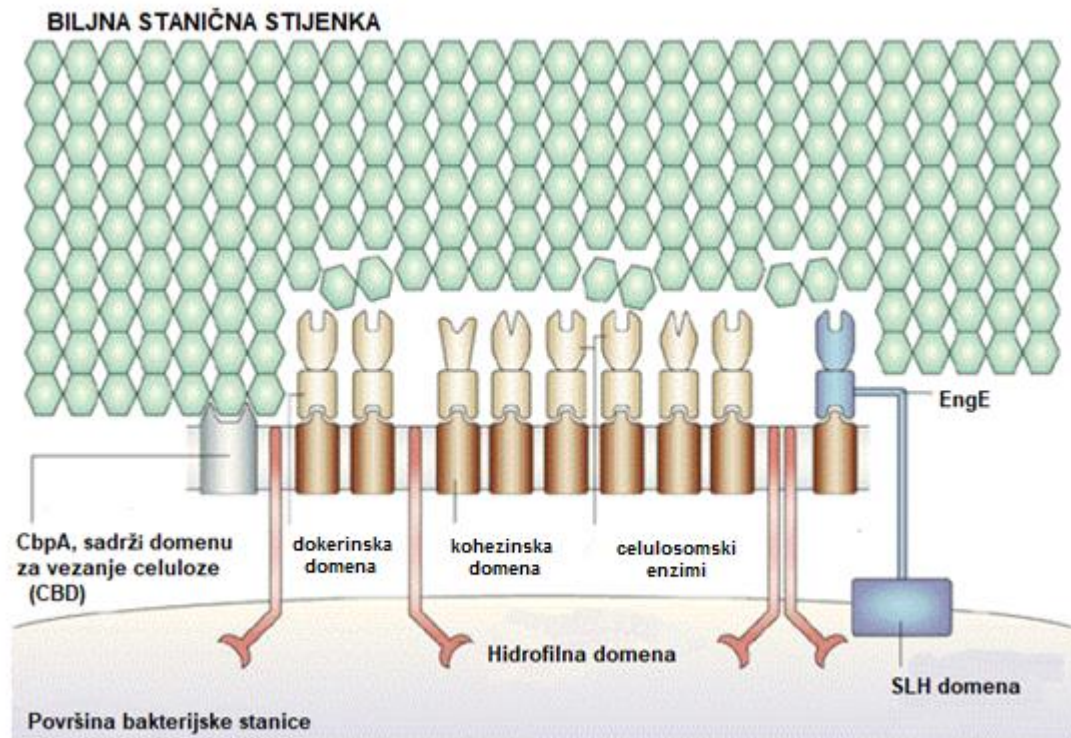
Unaprjeđenje svojstava novijih enzima koji se koriste u industriji nužno je kako bi se učinkovito podnijeli ekstremni uvjeti temperature, pH i saliniteta. Mikroorganizmi koji obitavaju u takvim ekstremnim uvjetima, tzv. ekstremofili, potencijalni su izvori enzima za biotehnološku primjenu. U ekstremnim uvjetima mogu biti aktivni brojni celulolitički mikroorganizmi, poput Gram-negativne antarktičke bakterije *Pseudoalteromonas haloplanktis*. Spomenuta je bakterija prisutna u morskoj vodi, a karakteristična je po tome što izlučuje psihrofilnu celulazu Cel5G. Riječ je o celulazi koja je prilagođena hladnim uvjetima te pri niskim i umjerenim temperaturama pokazuje visoku specifičnu aktivnost, ali i prilično visoku termosenzibilnost zbog smanjenja intramolekulskih interakcija (Sonan i sur., 2007). Ekstremni termofili od posebnog su interesa u biotehnologiji zbog prisutnosti vrlo termostabilnih enzima. U skupinu termofilnih celulolitičkih prokariota ubrajaju se dvije aerobne vrste, *Rhodothermus marinus* i *Acidothermus cellulolyticus*, te brojne anaerobne iz rodova *Caldicellulosiruptor*, *Clostridium*, *Spirochaeta*, *Fervidobacterium* i *Thermotoga*. Sve vrste iz roda *Caldicellulosiruptor* ekstremni su termofili, celulolitički i nesporogeni Gram-pozitivni anaerobi, a mogu fermentirati različite tipove ugljikohidrata. Izolirane su uglavnom iz neutralnih ili blago alkalnih geotermalnih izvora na Novom Zelandu, Islandu i u Kaliforniji (Miroshnichenko i sur., 2008). Nedavno je zabilježena prisutnost termostabilnih celulaza i u termofilnoj bakteriji *Geobacillus* sp. R7 koja, kada raste na prethodno obrađenim poljoprivrednim ostacima (kukuruzovina, prerijska vrpca), proizvodi celulaze s visokim hidrolitičkim potencijalom. Štoviše, analiza je pokazala da *Geobacillus* sp. R7 provodi fermentaciju lignoceluloze u etanol u samo jednom koraku te stoga ima ulogu u unaprjeđenju i smanjenju troškova proizvodnje bioetanola. Termofilna bakterija *Anaerocellum thermophilum* razgrađuje neobrađenu lignoceluloznu biomasu, kristaliničnu celulozu te ksilan (Yang i sur., 2009). Iako su celulaze uvelike rasprostranjene u gljivama i bakterijama, uočeno je prisustvo tek jedne arhealne celulaze, endoglukanaze iz *Pyrococcus furiosus*. Riječ je o enzimu koji posjeduje značajnu hidrolitičku aktivnost naspram kristalinične celuloze, unatoč

nedostatku domene za vezanje celuloze (CBD), no s obzirom na nemogućnost rasta arheja na celulozi, sama uloga tog intracelularnog enzima još uvijek nije razjašnjena. U plijesni otpornih na lužine, poput *Penicillium citrinum*, pronađene su termostabilne i na lužinu otporne celulaze, koje nalaze potencijalnu primjenu kao dodaci deterdžentima za pranje rublja (Dutta i sur., 2008). S ciljem unaprjeđenja celulazne aktivnosti konstruirani su hibridi hipertermostabilnih glikozidaza. Primjerice, rekombinacijom DNK dviju strukturno usklađenih hipertermostabilnih glikozidaza iz *P. furiosus* CelB i *Sulfolobus solfataricus*, konstruirana je knjižnica hibrida. Ova je analiza pokazala da se ekstremno termostabilni enzimi s ograničenom homologijom i različitim mehanizmima stabilizacije mogu učinkovito rekombinirati/miješati kako bi formirali stabilne hibride s poboljšanim katalitičkim svojstvima. Alkalofilne, termofilne i halofilne mikrobnе vrste imaju potencijal za dobivanje novih dragocjenih proizvoda za biotehnoško industriju. Alkalofilni enzimi koji razgrađuju polimere, poput proteaza, lipaza i celulaza, najčešće su izolirani iz roda *Bacillus*. Celulaze i lipaze značajne su i kao komponente deterdženata za pranje, a imaju primjenu i u farmaceutskoj, prehrambenoj, kemijskoj i kožnoj industriji te industriji za obradu otpada (Dutta i sur., 2008).

2.2.2. RAZGRADNJA CELULOZE CELULOSOMIMA

Selekcijski pritisak evolucije pokretačka je sila koja „prisiljava“ mikroorganizme da se prilagode novom okolišu. U anaerobnim uvjetima nužno je postojanje sustava za ekstracelularnu razgradnju supstrata, poput teško razgradivih kristaliničnih komponenata stanične stijenke biljaka. Iz tog razloga anaerobi nastoje usvojiti različite pristupe za razgradnju biljnih komponenata, a od tih pristupa svojom upečatljivošću ističe se razgradnja celulosomima. Prisutnost celulosoma prvi je put uočena kod termofilne bakterije *C. thermocellum*, a do danas je detektirana i opisana u raznim mezofilnim anaerobnim bakterijama te u ponekim anaerobnim gljivama, poput *Piromyces* sp. (Doi, 2008). Celulosomi su veliki izvanstanični enzimski kompleksi koji mogu razgraditi celulozu, hemicelulozu i pektin. Jedni su od najvećih enzimskih kompleksa pronađenih u prirodi te veličine pojedinačnih celulosoma variraju od 0,65 MDa do 2,5 MDa, dok je kod policelulosoma zabilježena veličina i do 100 MDa (Doi i Kosugi, 2004). Strukturu celulosoma obilježavaju dvije komponente: (a) neenzimski proteini nosači (*eng.* scaffold proteins) s kohezijskim domenama – mjestima za vezanje enzima, (b) enzimi sa dokerinskim proteinima u interakciji

s kohezinima proteina nosača (Slika 7).



Slika 7. Struktura celulosoma (Fontes i Gilbert, 2010).

Proteini skele, ovisno o bakterijskoj vrsti, variraju u broju kohezina i modula za vezanje celuloze (CBM) koji čvrsto veže celulosom za supstrat i tako koncentrira enzime na određenom mjestu supstrata. Također je otkrivena i kompleksnija struktura celulosoma sa višestrukim proteinima skele u međusobnoj interakciji koji omogućuju vezanje više enzima (Doi, 2008). Kohezijsko-dokerinski kompleks međusobno povezuje različite komponente nosača, pri čemu specifičnosti pojedinačnih kohezijsko-dokerinskih kompleksa utječu na sveukupnu supramolekulsku strukturu sudjelujućih komponenti. Enzimski celulosomski sustav u stanju je premašiti potencijal ne celulosomskih sustava za razgradnju, a neki od razloga su strukturalna organizacija, učinkovitost vezanja za supstrat te raznolikost hidrolitičkih enzima koji djeluju sinergistički. Prisutnost celulosoma nije zabilježena u arheja i bakterija koje rastu iznad 65 °C (Blumer-Schuetz i sur., 2008).

2.2.3. RAZGRADNJA CELULOZE NE CELULOSOMSKIM ENZIMIMA

Aerobne celulolitičke bakterije i više gljive za razgradnju celuloze koriste sustav koji se sastoji od više topljivih celulaza. Tijekom rasta raznih mikroorganizama na celuloznim materijalima, dolazi do sinteze celuloznih supstrata koji induciraju aktivnost celulaza. Ti mikroorganizmi mogu biti aerobni, anaerobni, mezofilni ili termofilni. Najiscrpnije ispitivani proizvođači celulaza su iz rodova *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Thermomonospora*, *Trichoderma* i *Aspergillus* (Sun i Cheng, 2002). Mehanizam djelovanja aerobnih celulaza razvio se u kopnenih mikroorganizama koji koloniziraju čvrste supstrate i potom izlučuju celulaze kako bi došlo do razgradnje supstrata. Zbog teško razgradive biljne stanične stijenke, neki celulolitički mikroorganizmi tijekom rasta na biomasi ili celulozi izlučuju i do 50 % svojih ukupnih proteina (Ransom-Jones i sur., 2012; Fontes i Gilbert, 2010). Celulaze, kao modularni enzimi, sastoje se od neovisnih te strukturno i funkcionalno zasebnih jedinica – domena. Fungalne celulaze, inače strukturno jednostavnije od bakterijskih celulosoma, sadrže dvije neovisne domene: katalitičku domenu (CD) i domenu za vezanje celuloze (CBD). Domena za vezanje celuloze kratkom je peptidnom vezom spojena s katalitičkom domenom na N-terminalnom kraju. CBD se sastoji od otprilike 35 aminokiselina, a regija za vezanje bogata je serinom i treoninom. Izvjesno je da je uloga CBD povezivanje enzima i celuloze kako bi katalitička domena bila bliže supstratu te uz to daje katalitičkoj domeni dovoljno vremena da pomakne lanac u svoje aktivno mjesto prije nego enzim difundira dalje od celuloze. Smjesa slobodnih celulaza tijekom razgradnje kristalinične celuloze djeluje sinergistički, čime se postiže specifična aktivnost i do 15 puta veća u odnosu na aktivnost individualnih celulaza (Kuhad i sur., 2011).

2.2.4. STRUKTURA CELULAZA

Kompleksna molekularna struktura dviju zasebnih i međusobno povezanih jedinica (katalitička domena (CD) i jedna ili više domena za vezanje celuloze, CBD) bitno je obilježje proteina s hidrolitičkom aktivnošću, poput celulaza i hemicelulaza. Više od 70 % ukupne proteinske sekvence čini katalitička domena, a sekvencijskom analizom uočene su značajne varijabilnosti između tih domena u različitim celulazama. Aktivno mjesto enzima može postojati u različitim trodimenzionalnim formacijama: u obliku tunela za procesnu egzo razgradnju i u obliku rascjepa za endo razgradnju. Katalitička domena je N-glikozilirana te je

odgovorna za cijepanje glikozidne veze kiselinskom hidrolizom, uz nazočnost donora protona i nukleofila ili baze poput glutaminske i asparaginske kiseline (Lynd i sur., 2002; Bhat i Bhat, 1997). Domena za vezanje celuloze (CBD) pospješuje hidrolizu tako što katalitičku domenu drži u blizini supstrata, stoga je nazočnost te domene izrazito bitna za pokretanje celulazne aktivnosti i procesiranje. Ta je domena obično *O*-glikozilirana te sadrži od 30 do 200 aminokiselina, a u proteinu može postojati u jednostrukom, dvostrukom ili trostrukom obliku. U proteinu se može pronaći i na C i na N terminalnom kraju lanca, a povremeno je smještena i u sredini. Domena za vezanje celuloze dovodi enzim bliže supstratu i produžuje trajanje njihova kontakta te tako pospješuje efikasnost katalize. CBD najučinkovitije djeluje prilikom razgradnje supstrata, a uklanjanjem modula za vezanje celuloze (CBM) iz enzima ili proteina nosača iz celulosoma, drastično se smanjuje aktivnost domene za vezanje celuloze, a time i enzimska aktivnost. Tijekom veze između CBD i celuloze, neki ne polarni ostaci, uglavnom triptofan i tirozin, ravnom stranom svog aromatskog prstena ostaju izloženi prema piranoznom prstenu, a polarni ostaci koji tvore vodikove veze stabiliziraju tu interakciju (Teeri i sur., 1998). Hemicelulaze, endomananaze i acetilksilan esteraze još su neki enzimi koji razgrađuju polisaharide, a u kojima je zastupljena CBD. Vezni peptid je aminokiselinska sekvenca koja povezuje domenu za vezanje celuloze s katalitičkom domenom. Može sadržavati od 6 do 59 aminokiselina, a djeluje kao fleksibilan zglobov te tako omogućava neovisno djelovanje svake domene. Sekvenca veznog peptida ovisi o enzimu, međutim obično je bogata prolinom, treoninom i serinom. Serinski i treoninski ostaci veznog peptida su *O*-glikozilirani i time su zaštićeni od proteolize, a ukoliko je vezni peptid odsutan ili prekratak, obje domene (CBD i CD) ometaju jedna drugu i afinitet se smanjuje. S obzirom na sličnosti veznih peptida kod različitih celulaza, predložen je model fleksibilnog zglobova koji pospješuje neovisno djelovanje dviju domena (Lynd i sur., 2002).

2.2.5. BIORAZGRADNJA CELULOZE

Iako je do danas prijavljeno više vrsta gljiva koje razgrađuju celulozu (poput *T. viride*, *T. reesei*, *F. solani*, *A. niger*, *A. terreus*, *P. chrysosporium*, *B. adusta* i *P. sanguineus*) (Dashtban i sur., 2009), a prisutnost celulaza detektirana je i u nematodama (*Bursaphelencus xylophilus*), kvascima (*Aureobasidium pullulans*), te morskim bakterijama (*Saccharophagus degradans*), i dalje se intenzivno traga za novim izvorima celulaza. To je dovelo do izrade metagenomskih

knjižnica i bioistraživanja („bioprospektinga“) u nekoliko potpuno različitih okruženja poput bivoljeg buraga, čvrstog šumskog drveta, crijeva viših termita, protozoa preživača, raspadajućih drvnih komadića topole. Sva djelovanja i postupci u konačnici teže pronalasku i identifikaciji novih gena i organizama s celulolitičkom aktivnošću (Mahmood i sur., 2008).

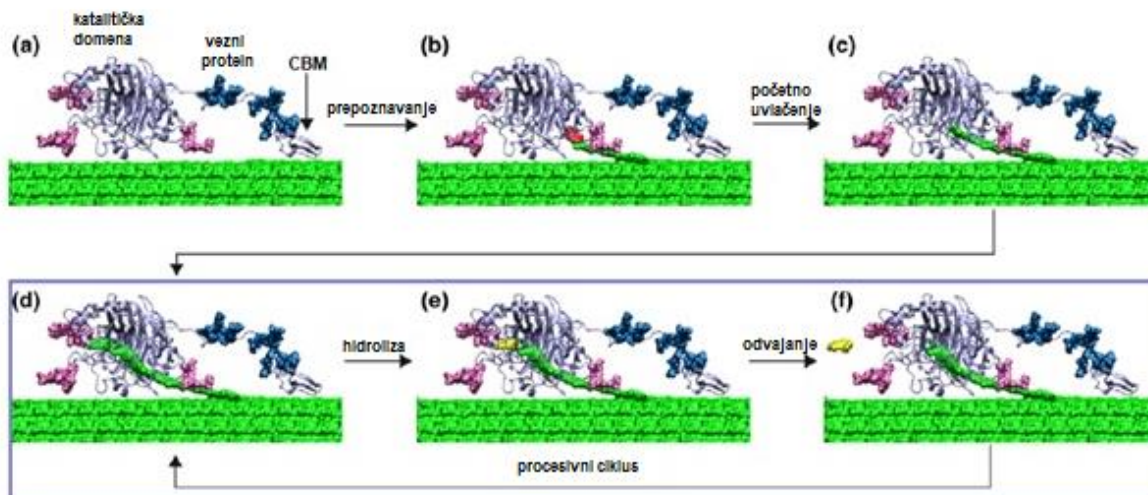
2.2.5.1. MEHANIZMI BIORAZGRADNJE CELULOZE

Nakon što celulaza prepozna slobodni kraj lanca, provlači ga kroz tunel kako bi se formirao katalitički aktivan kompleks (CAC). S obzirom da je dekrystalizacija celuloze u vodi energetski nepovoljan proces, tuneli i pukotine celulazne katalitičke domene sadrže hidrofobne i polarne ostatke koji uspostavljaju kontakte s lancem. Više provedenih istraživanja pokazalo je da je prisutnost hidrofobnih ostataka u tunelima i pukotinama katalitičke domene celulaza i hitinaza (strukturno slične celulazama) nužna za uspješnu razgradnju kristalinične celuloze. Osim toga, dokazano je i da odsustvo hidrofobnih ostataka u tunelima katalitičke domene celulaza i hitinaza može dovesti do porasta broja procesiranja na dostupnijim polimerima. Nakon formiranja katalitički aktivnog kompleksa (CAC) između celulaze i celodekstrinskog lanca, ovisno o usmjerenju enzima, do hidrolize obično dolazi mehanizmom retencije ili mehanizmom inverzije. Nakon reakcije proizvod se izdvaja, a uvlačenjem nove celobiozne jedinice u katalitičku domenu formira se novi katalitički aktivan kompleks (CAC) (Horn i sur., 2012).

U većini slučajeva, hidroliza glikozidne veze katalizirana je sa dva aminokiselinska ostatka enzima: kiselina (donor protona) i nukleofil/baza. Ovisno o prostornom rasporedu tih kiselinskih ostataka, do hidrolize dolazi zbog retencije ili inverzije anomernog ugljikovog atoma (slika 8).

Mehanizam retencijske glikozid hidrolaze cijepanjem dovodi do retencije konfiguracije anomernog ugljikovog atoma (C1) molekule supstrata. Hidrolizom glikozidnih veza dobije se produkt iste konfiguracije anomernog ugljika kao što ju je molekula supstrata imala i prije hidrolize.

Mehanizam inverzijske glikozid hidrolaze cijepanjem dovodi do inverzije konfiguracije anomernog ugljikovog atoma (C1) molekule supstrata. To se provodi pomoću mehanizma nukleofilne supstitucije, gdje se hidrolizom β -glikozidne veze dobije produkt β -konfiguracije i obratno (Beckham i sur., 2011).



Slika 8. (a) vezanje Cel7A na celulozu, (b) prepoznavanje reducirajućeg kraja celuloznog lanca, (c) početno uvlačenje celuloznog lanca u katalitički tunel, (d) uvlačenje i formiranje katalitički aktivnog kompleksa, (e) hidroliza, (f) odvajanje produkta i uvlačenje nove celobioze (Beckham i sur., 2011).

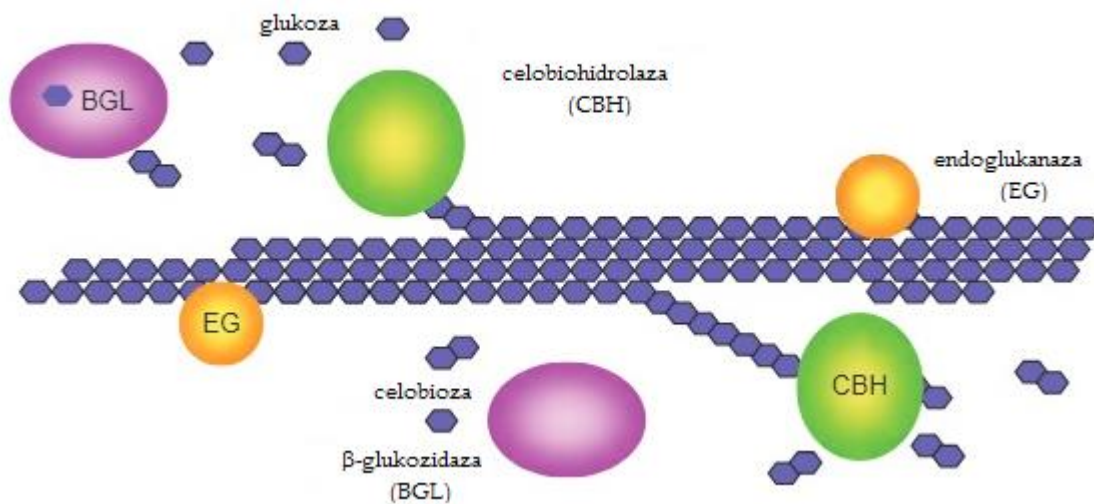
2.3. CELULAZE

Do danas je otkriveno više različitih modularnih celulaza, uključujući i najmanje dvije egzo- β -glukanaze ili celobiohidrolaze (CBH I i CBH II), četiri endoglukanaze (EG I, EG II, EG III, EG V) te jedna β -glukozidaza (BG) (Lynd i sur., 2002).

Celulaze pripadaju skupini *O*-glukozid hidrolaza (GH, EC 3.2.1.), široko rasprostranjenoj grupi enzima koju karakterizira hidroliza β -1,4-glikozidnih veza između dvije ugljikohidratne jedinice ili između ugljikohidrata i neugljikohidratne jedinice. Podjela glukozid hidrolaza na celulazne obitelji vrši se na temelju sličnosti u slijedu aminokiselina. S obzirom na postojanje izravne veze između slijeda aminokiselina i sličnosti aminokiselinskog savijanja/smatanja proteina, ta podjela odražava strukturne značajke tih enzima bolje od supstrate specifičnosti te se stoga koristi za utvrđivanje evolucijskih odnosa između ovih enzima. Celulaze ne predstavljaju jedan enzim, već kompleks tri glavne vrste celulaza: celobiohidrolaza (CBH ili β -1,4-D-glukan celobiohidrolaza, EC 3.2.1.91), endo-glukanaza (EG ili endo- β -1,4-D-glukan glukanohidrolaza, EC 3.2.14) i β -glukozidaza (BG, EC 3.2.1.21), koje djeluju sinergistički na proizvodnju oligosaharida i glukoze. Celulaza hidrolizira celulozu do glukoze, celobioze i oligosaharida kao primarnih proizvoda. Slika 9 prikazuje djelovanje različitih komponenti

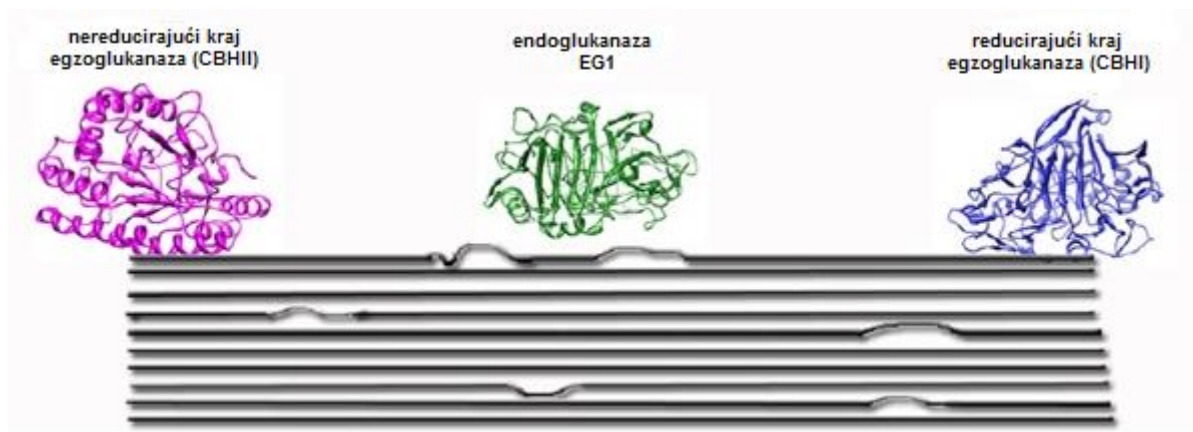
celulaze koje djeluju sinergistički kako bi se hidrolizirala celuloza. Endoglukanaza prvo djeluje na vlakna amorfnе celuloze i nasumično napada između lanaca, kako bi se oslobodila mala vlakna sa slobodnim reducirajućim i nereducirajućim krajevima. Zatim egzoglukanaza djeluje na slobodne krajeve i oslobađa celobiozu, koju β -glukozidaza hidrolizira da krajnjeg proizvoda, glukoze.

Ukupna aktivnost celulaznih enzimskih sustava puno je veća od zbroja aktivnosti njegovih pojedinačnih podjedinica, a riječ je o pojavi poznatoj kao sinergizam. Stoga se ti celulazni sustavi ne smiju smatrati kao jednostavni konglomerati enzima sa komponentama iz sva tri tipa celulaza, već kao smjesa koja učinkovito hidrolizira celulozna vlakna (Singhania, 2009).



Slika 9. Djelovanje različitih komponenti celulaznog kompleksa (Singhania, 2009)

Endoglukanaze nasumično hidroliziraju dostupne intramolekularne β -1,4-glikozidne veze celuloznih lanaca čime se dobiju novi krajevi lanca. Egzoglukanaze procesivnim cijepanjem celuloznih lanaca na reducirajućim i nereducirajućim krajevima dovode do oslobađanja topljive celobioze ili glukoze, a β -glukozidaze pak razgrađuju celobiozu na molekule glukoze kako bi se onemogućila inhibicija s celobiozom (Quiroz-Castañeda i Folch-Mallol, 2013). Istovremeno odvijanje ove 3 hidrolitičke reakcije prikazano je na slici 10.



Slika 10. Celulazne aktivnosti. Egzoglukanaze djeluju na reducirajućim i nereducirajućim krajevima, hidrolizirajući pritom kristalinični dio celuloze, dok endoglukanaza djeluje na amorfni dio celuloze (Quiroz-Castañeda i Folch-Mallol, 2013).

2.3.1. ENDOGLUKANAZE

Ovi enzimi cijepaju unutarnje veze amornih celuloznih filamenata te time daju oligosaharide različitih veličina i formiraju nove krajeve lanaca koji potom mogu biti napadnuti od strane egzoglukanaza. Celulolitički proces započinje nasumičnim endoglukanaznim cijepanjem unutarnjih veza amornih regija celuloznih vlakana i formiranjem novih reducirajućih i nereducirajućih krajeva koji su zatim podložni djelovanju celobiohidrolaza. Endoglukanaze su monomerni enzimi molekulske mase u rasponu od 22 do 45 kDa, premda su kod nekih gljiva, poput *Sclerotium rolfsii* i *Gloeophyllum sepiarium*, detektirane endoglukanaze dvostruko veće molekulske mase od uobičajene. Endoglukanaze uglavnom nisu glikozilirane, no ponekad mogu imati relativno malu količinu ugljikohidrata, najčešće od 1 % do 12 % (Baldrian i Valášková, 2008). Kod većine endoglukanaza zabilježen je pH optimum od 4 do 5, dok je jedina endoglukanaza s neutralnim pH optimumom ona iz bazidiomicete *Volvariella volvacea*, eksprimirana u rekombinantnom kvascu. Optimalna temperatura endoglukanaza uglavnom varira od 50 do 70 °C (Valášková i Baldrian, 2006).

Prilikom hidrolize celuloze također je potrebno djelovanje β -glukozidaze (BGL, EC 3.2.1.21) koja hidrolizom celobioze daje dvije molekule glukoze i time osigurava ugljik koji se lako metabolizira. Izvori tih enzima su gljive koje uzrokuju bijelu i smeđu trulež, mikorizne gljive te biljni patogeni (Baldrian i Valášková, 2008).

Primarna hidroliza endoglukanazama i egzoglukanazama odvija se na površini čvrstih supstrata i dovodi do oslobađanja topljivih šećera sa stupnjem polimerizacije (DP) do 6 u tekuću fazu. Taj depolimerizacijski korak koji provode endoglukanaze i egzoglukanaze je korak koji određuje (ograničava) brzinu cijelog procesa hidrolize celuloze. Druga hidroliza prvenstveno obuhvaća razgradnju celobioze na glukozu i ta je reakcija katalizirana β -glukozidazama, premda neke β -glukozidaze hidroliziraju i dulje celodekstrine. Tijekom vremena, uzajamnim djelovanjem endoglukanaza i egzoglukanaza dolazi do modifikacije površinskih karakteristika celuloze, a što rezultira naglim promjenama brzine hidrolize (Percival Zhang i sur., 2006). Za analizu endoglukanazne aktivnosti primjenjuje se karboksimetil celuloza (CMC), a riječ je o topljivom amorfnom obliku celuloze koji je odličan supstrat endoglukanaze te za njegovu hidrolizu nije potrebna domena za vezanje celuloze (CBD) (Bhat i Bhat, 1997).

2.3.2. EGZOGLUKANAZE

Ovi enzimi, također poznati i kao celobiohidrolaze, provode hidrolizu ostataka sa reducirajućih i nereducirajućih krajeva celuloze, a kao glavni produkt te reakcije koji se oslobađa je celobioza. Celobiozu kasnije hidroliziraju β -glukozidaze. Egzoglukanaze mogu hidrolizirati kristaliničnu celulozu, a čine od 40 do 70 % od ukupnih komponenata celuloznog sustava. Pokazuju specifičnost na krajevima celuloze, pa tako i celobiohidrolaze (CBH) I i II, prisutne u plijesni *T. reesei*, koje djeluju na reducirajućim i nereducirajućim krajevima celuloznog lanca. Ovi enzimi su monomerni proteini molekulske mase u rasponu od 50 do 65 kDa, iako su u nekim gljivama, poput *Sclerotium rolfsii*, uočene i manje varijante (41,5 kDa). Kod egzoglukanaza je zabilježena niska razina glikozilacije (od oko 12 % ili pak može potpuno izostati); pH optimum je od 4 do 5, a optimalna temperatura od 37 do 60 °C, ovisno o specifičnoj kombinaciji enzim-supstrat. Egzoglukanaze su sastavni dio celulolitičkog sustava gljiva uzročnika bijele i meke truleži, a mogu se naći i u nekim bazidiomicetama koje uzrokuju smeđu trulež, poput *Fomitopsis palustris* (Teeri i sur., 1998).

Kristalinična celuloza (Avicel, bakterijska celuloza ili filter papir), kao osnovni oblik celuloze u većini biljnih staničnih stijenki, zbog niskog stupnja polimerizacije (DP) i relativno niske dostupnosti, odličan je supstrat za ispitivanje egzoglukanazne aktivnosti (Song i sur., 2008).

2.3.3. β -GLUKOZIDAZE

β -glukozidaze, s ciljem sprječavanja inhibicije s celobiozom, provode hidrolizu topljivih celobioza i ostalih celodekstrina sa stupnjem polimerizacije do 6, uz nastajanje glukoze u vodenoj fazi. To su enzimi molekulske mase koja varira od 35 do 640 kDa, a mogu biti monomeri ili pak mogu postojati u homo-oligomernom obliku, kao što je to slučaj kod β -glukozidaze iz kvasca *Rhodotorula minuta*. Većina β -glukozidaza je glikozilirana; u nekim slučajevima, kao kod β -glukozidaze (molekulske mase 300 kDa) iz *Trametes versicolor*, glikozilacija može biti veća i od 90 %. Optimalni pH β -glukozidaza je između 3,5 i 5,5, a temperaturni je optimum u rasponu od 45 do 75 °C. Aktivnost β -D-glukozidaze može se odrediti pomoću celobioze koja nije hidrolizirana endoglukanazama i egzoglukanazama (Dashtban i sur., 2009).

2.3.4. SINERGISTIČKO DJELOVANJE CELULAZA

Iako sami molekularni mehanizmi još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni, utvrđeno je da je sinergističko djelovanje između celulaza jedan od preduvjeta za učinkovitu hidrolizu celuloze. Sinergističko je djelovanje ustanovljeno između dvije različite celobiohidrolaze te između endoglukanaza, a predloženo je više sinergističkih mehanizama djelovanja (Ejaz i sur., 2021).

Sinergija između endo i egzoglukanaza, započinje djelovanjem endoglukanaza, pri čemu nastaju slobodni krajevi celuloznog lanca koji postaju dostupni egzoglukanazama. Sinergiju egzo-egzo karakterizira progresivno djelovanje egzoglukanaza na reducirajućim i nereducirajućim krajevima celuloznog lanca. Sinergijskim djelovanjem između egzoglukanaza i β -glukozidaza procesira se celobioza koja je dobivena kao finalni proizvod egzoglukanaznog djelovanja. Također je uočena i intramolekularna sinergija između celulaznih domena: katalitičke domene i domene za vezanje celuloze. Za učinkovitu degradaciju polisaharida biljne stanične stijenke, uz sinergističko djelovanje celulaza, potrebno je i sudjelovanje ostalih degradirajućih enzima poput ksilanaza. Primjerice, saharifikacija pšenične slame za proizvodnju bioetanola rezultat je uočenog sinergističkog djelovanja između celulaza i ksilanaza. Prilikom razgradnje hitina uočen je potpuno novi oblik sinergizma između hidrolitičkih enzima i enzima koji reakcijama oksidacije cijepaju

glikozidne veze (Vaaje-Kolstad i sur., 2010).

Iako je do danas prikupljena značajna količina informacija vezanih uz djelovanje celulaza i mehanizme razgradnje celuloze, biorazgradnja kristalinične celuloze je zbog netopivosti supstrata i teške dostupnosti enzimima još uvijek spor proces. Za prevladavanje tog problema, znanstvenici su optimiranjem odnosa celulolitičkih enzima utvrdili da se najbolja saharifikacija kristalinične celuloze postiže smjesom enzima 60:20:20 (CBHI:CBHII:EGI), uz zasićenje β -glukozidazama zbog sprječavanja inhibicije celobiozom. Prije same celulazne aktivnosti, a s ciljem poboljšanja procesa saharifikacije, predlaže se korištenje proteina koji djeluju na način da opuštaju strukture biljne stanične stijenke (Baker i sur., 1998).

3. ZAKLJUČCI

Unatoč istraživanjima koja datiraju zadnjih nekoliko desetljeća i relativnom mirovanju u ovom području tijekom prošlog desetljeća, očekuje se da će razvoj naprednih mikroskopskih, kristalografskih i spektroskopskih tehnika omogućiti poboljšanje rezolucije kristalinične strukture celuloze i na molekularnoj i na atomskoj razini. Precizne kristalografske analize pružaju nove informacije o strukturama i funkcijama različitih tipova celulaza i njihovih katalitičkih domena ili modula. Novi celo-oligomerni derivati predstavljaju vrijedan alat za određivanje supstratnih specifičnosti i katalitičkih mehanizama djelovanja celulaza. Pojava multienzimskih celulosomskih kompleksa potvrđena je u povećanom broju mikrobnih enzimskih sustava. Primjena bioinformatike omogućila je predviđanje funkcionalnosti važnih celuloznih sustava. No, unatoč svim napredcima u načinu istraživanja i dobivenim rezultatima, još uvijek se očekuje napredak u preciznom razumijevanju odnosa između kristalinične strukture celuloze i enzimske hidrolize. S biotehnološkog gledišta, jedan od najvažnijih i najzahtjevnijih tehnoloških izazova jest prevladavanje teške razgradivosti prirodnih celuloznih materijala koje je potrebno enzimski hidrolizirati kako bi se dobili fermentabilni šećeri.

Pomno praćenje promjena relevantnih strukturnih sastojaka biomase tijekom enzimske hidrolize nužno je za bolje razumijevanje unutarnjih mehanizama enzimske hidrolize i interakcije između celulaza i komponenata biljne stanične stijenke, čime se u konačnici smanjuju troškovi povezani s enzimskom hidrolizom celuloznih sirovina.

4. POPIS LITERATURE

Baker JO, Ehrman CI, Adney WS, Thomas SR, Himmel ME (1998) Hydrolysis of cellulose using ternary mixtures of purified celluloses. *Appl Biochem Biotechnol* 72:395-403. doi: 10.1007/BF02920154

Baldrian P, Valášková V (2008) Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiol Rev* 32(3):501-521. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00106.x

Bayer EA, Shoham Y, Lamed R (2013) Lignocellulose-Decomposing Bacteria and Their Enzyme Systems. U: Rosenberg E, DeLong F, Iory S, Stackebrandt E, Thompson, F (ured.) *The Procariotes: Procaryotic Physiology and Biochemistry*, 4. izd, Springer Reference, Heidelberg/New York/Dordrecht/London, str. 215-266.

Beckham GT, Bomble YJ, Bayer EA, Himmel ME, Crowley MF (2011) Applications of computational science for understanding enzymatic deconstruction of cellulose. *Curr Opin Biotechnol* 22(2):231-238. doi: 10.1016/j.copbio.2010.11.005

Berlin A, Maximenko V, Gilkes N, Saddler J (2007) Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis. *Biotechnol Bioengin* 97(2):287-296. doi: 10.1002/bit.21238

Bhat M, Bhat S (1997) Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnol Adv* 15:583-620. doi: 10.1016/s0734-9750(97)00006-2

Blumer-Schuette SE, Kataeva I, Westpheling J, Adams MW, Kelly RM (2008) Extremely thermophilic microorganisms for biomass conversion: status and prospects. *Curr Opin Biotechnol* 19(3):210-217. doi: 10.1016/j.copbio.2008.04.007

Dashtban M, Schraft H, Qin W (2009) Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Opportunities & Perspectives. *Int J Biol Sci* 5(6):578-594. doi: 10.7150/ijbs.5.578

Doi R (2008) Cellulases of mesophilic microorganisms: cellulosome & non-cellulosome producers. *Ann NY Acad Sci* 1125:267-279. doi: 10.1196/annals.1419.002

Doi R, Kosugi A (2004) Cellulosomes: plant cell wall degrading enzyme complexes. *Nat Rev Microbiol* 2:541-251. doi: 10.1038/nrmicro925

Dutta T, Sahoo R, Sengupta R, Ray SS, Bhattacharjee A, Ghosh S (2008) Novel cellulases from an extremophilic filamentous fungi *Penicillium citrinum*: production and characterization. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35(4):275-282. doi: 10.1007/s10295-008-0304-2

Ejaz U, Sohail M, Ghanemi A (2021) Cellulases: From Bioactivity to a Variety of Industrial Applications. *Biomimetics* 6: 44. <https://doi.org/10.3390/biomimetics6030044>

Fontes CMGA, Gilbert HJ (2010) Cellulosomes: Highly Efficient Nanomachines Designed to Deconstruct Plant Cell Wall Complex Carbohydrates. *Annu Rev Biochem* 79(1):655-681. doi: 10.1146/annurev-biochem-091208-085603

Horn SJ, Vaaje-Kolstad G, Westereng B, Eijsink VG (2012) Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnol Biofuels* 5(1):45. doi: 10.1186/1754-6834-5-45

Jalak J, Kurashin M, Teugjas H, Valjamae P (2012) Endo-exo synergism in cellulose hydrolysis revisited. *J Biol Chem* 25:25. doi: 10.1074/jbc.M112.381624

Kimura S (1999) Immunogold labeling of rosette terminal cellulose-synthesizing complexes in the vascular plant *Vigna angularis*. *Plant Cell* 11:2075-2085. doi: 10.1105/tpc.11.11.2075

Kovalenko VI (2010) Crystalline cellulose: structure and hydrogen bonds. *Russ Chem Rev* 79(3):231-241. doi: 10.1070/RC2010v079n03ABEH004065

Kuhad RC, Gupta R, Singh A (2011) Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. *Enzyme Res* 11:1-10. doi: 10.4061/2011/280696.

Levy I, Shani Z, Shoseyov O (2002) Modification of polysaccharides and plant cell wall by endo-1,4-[beta]-glucanase and cellulose-binding domains. *Biomol Eng* 19(1):17-30. doi: 10.1016/s1389-0344(02)00007-2

Ling Z, Chen S, Zhang X, Takabe K, Xu F (2017) Unraveling variations of crystalline cellulose induced by ionic liquid and their effects on enzymatic hydrolysis. *Sci Rep* 7:10230. doi: 10.1038/s41598-017-09885-9

Lynd LR, Weimer PJ, Van Zyl WH, Pretorius IS (2002) Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev* 66(3):506-77. doi: 10.1128/MMBR.66.3.506-577.2002

Quiroz-Castañeda R., Folch-Mallol J (2013) Hydrolysis of Biomass Mediated by Cellulases for the Production of Sugars. U: Chandel A., da Silva SS (ured.) Sustainable degradation of lignocellulosic biomass – techniques, applications and commercialization, InTech, Rijeka Hrvatska, str. 127-155. <http://dx.doi.org/10.5772/1490>

Quiroz-Castañeda R, Martinez-Anaya C, Cuervo-Soto L, Segovia L, Folch-Mallol J (2011) Loosenin, a novel protein with cellulose-disrupting activity from *Bjerkandera adusta*. *Microb Cell Factories* 10(1):8. doi: 10.1186/1475-2859-10-8

Mahmood R, Ali I, Husnain T, Riazuddin S (2008) RNA interference: The story of gene silencing in plants and humans. *Biotechnol Adv* 26(3):202-209. doi: 10.1016/j.biotechadv.2007.12.002

Miroshnichenko ML, Kublanov IV, Kostrikina NA, Tourova TP, Kolganova TV, Birkeland NK, Bonch-Osmolovskaya EA (2008) *Caldicellulosiruptor kronotskyensis* sp. nov. and *Caldicellulosiruptor hydrothermalis* sp. nov., two extremely thermophilic, cellulolytic, anaerobic bacteria from Kamchatka thermal springs. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:1492-1496. doi: 10.1099/ijs.0.65236-0

Mohamed A, Hassalo A (2015) Flame Retardant of Cellulosic Materials and Their Composites. U: Visakh PM, Arao Y (ured.) Flame Retardants, Springer International Publishing, str. 247-314. doi: 10.1007/978-3-319-03467-6 10

Onishi N, Tanaka T (1996) Purification and properties of a galacto- and gluco-

oligosaccharide- producing betaglycosidase from *Rhodotorula minuta* IFO879. *J Ferment Bioeng* 82:439–443. doi: 10.1016/S0922-338X(97)86979-6

Percival Zhang YH, Himmel ME, Mielenz JR (2006) Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnol Adv* 24(5):452-481. doi: 10.1016/j.biotechadv.2006.03.003

Ransom-Jones E, Jones D, McCarthy A, McDonald J (2012) The Fibrobacteres: an important phylum of cellulose-degrading bacteria. *Microb Ecol* 63(2):267-281. doi: 10.1007/s00248-011-9998-1

Rongpipi S, Ye D, Gomez ED, Gomez EW (2019) Progress and Opportunities in the Characterization of Cellulose – An Important Regulator of Cell Wall Growth and Mechanics. *Front Plant Sci* Volume 9 | Article 1894. doi: 10.3389/fpls.2018.01894

Rytioja J, Hildén K, Yuzon J, Hatakka A, de Vries RP, Mäkelä MR (2014) Plant-Polysaccharide-Degrading Enzymes from Basidiomycetes. *Microbiol Mol Biol Rev* 78(4): 614–649. doi: 10.1128/MMBR.00035-14.

Singhania RR (2009) Cellulolytic Enzymes. U: Singh nee' P, Pandey A (ured.) *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*. Springer Science+Business Media B.V., str. 371-381. doi: 10.1007/978-1-4020-9942-7_20

Sonan G, Receveur-Brechot V, Duez C, Aghajari N, Czjzek M, Haser R, Gerday C (2007) The linker region plays a key role in the adaptation to cold of the cellulase from an Antarctic bacterium. *Biochem J* 407:293–302. doi: 10.1042/BJ20070640

Song BC, Kim KY, Yoon JJ, Sim SH, Lee K, Kim YS, Kim YK, Cha CJ (2008) Functional analysis of a gene encoding endoglucanase that belongs to glycosyl hydrolase family 12 from the brown-rot basidiomycete *Fomitopsis palustris*. *J Microbiol Biotechnol* 18(3):404-409.

Sun Y, Cheng J (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour Technol* 83(1):1-11. doi: 10.1016/s0960-8524(01)00212-7

Teeri T, Koivula A, Linder M, Wohlfahrt G, Divne C, Jones T (1998) *Trichoderma reesei* cellobiohydrolases: why so efficient on crystalline cellulose? *Biochem Soc Trans* 26:173–178. doi: 10.1042/bst0260173

Vaaje-Kolstad G, Westereng B, Horn SJ, Liu Z, Zhai H, Sørli M, Eijsink VGH (2010) An Oxidative Enzyme Boosting the Enzymatic Conversion of Recalcitrant Polysaccharides. *Science* 330(6001):219-222. doi: 10.1126/science.1192231

Valásková V, Baldrian P (2006) Degradation of cellulose and hemicelluloses by the brown rot fungus *Piptoporus betulinus* – production of extracellular enzymes and characterization of the major cellulases. *Microbiology* 152: 3613–3622. doi: 10.1099/mic.0.29149-0

Wada M, Chanzy H, Nishiyama Y, Langan P (2004) Cellulose III Crystal Structure and Hydrogen Bonding by Synchrotron X-ray and Neutron Fiber Diffraction. *Macromolecules* 37(23):8548-8555. doi: 10.1021/ma0485585

Wada M, Heux L, Sugiya J (2004) Polymorphism of cellulose I family: Reinvestigation of cellulose IV₁. *Biomacromolecules* 5:1385-1391. doi: 10.1021/bm0345357

Wada M, Nishiyama Y, Chanzy H, Forsyth T, Langan P (2008) The structure of celluloses. *Powder Diffr* 23, No. 2, (2):92-95. doi: 10.1154/1.2912442

Yang SJ, Kataeva I, Hamilton-Brehm SD, Engle NL, Tschaplinski TJ, Doepcke C, Davis M, Westpheling J, Adams MW (2009) Efficient degradation of lignocellulosic plant biomass, without pretreatment, by the thermophilic anaerobe "Anaerocellum thermophilum" DSM 6725. *Appl Environ Microbiol* 75(14):4762-4769. doi: 10.1128/AEM.00236-09

Xiros C, Topakas E, Christakopoulos (2016) Hydrolysis and Fermentation for Cellulosic Ethanol Production. U: Lund PD, Byrne J, Berndes G, Vasalos IA (ured) *Advances in Bioenergy: The Sustainability Challenge*. John Wiley and Sons, Ltd, United Kingdom, str. 54-87. <https://doi.org/10.1002/9781118957844.ch2>

Izjava o izvornosti

Ja Marko Žerjav 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.

Marko Žerjav

Vlastoručni potpis