

Jerzy Rogalski

Zakład Biochemii UMCS w Lublinie

Jerzy Jamroz

Zakład Biologicznych Podstaw Technologii Żywności AR w Lublinie

3.1.10

Niniejszą pracę poświęcamy pamięci Pana Profesora dr. hab. Czesława Szajera, zawsze nam życzliwego oraz oddanego sprawom młodzieży i środowiska — w imieniu Wychowanków i Przyjaciół, którym bliska była Jego życiowa filozofia lub dyscyplina naukowa.

Prace Profesora były inspiracją do napisania tego artykułu.

Potencjalne możliwości wykorzystania surowców ligninocelulozowych

Szacuje się, że energia słoneczna gromadzona w ciągu roku w postaci biomasy roślinnej przewyższa 10-krotnie jej zużycie. W przeliczeniu na jednego mieszkańca rocznie wynosi to około 25–50 ton [39]. Niewątpliwie jej wykorzystanie ograniczają sezonowe zmiany w pozyskiwaniu ilościowym, duże rozproszenie w terenie oraz stosunkowo wysokie koszty transportu i przechowywania. Około 90% wytworzonej biomasy stanowi ligninoceluloza, która może być przerabiana na paszę, żywność, nośniki energii i inne produkty użyteczne dla człowieka na drodze fizykochemicznej oraz mikrobiologicznej [19, 24]. Ogólna ilość biomasy — licząc suchą masę, która powstaje na terenie Polski — wynosi około 2×10^8 ton rocznie. Należą tu zboża, ziemniaki, buraki, trawy, warzywa, owoce, drewno, słoma, liście itp. [21]. Zastosowanie metod biologicznych do przetwarzania ligninocelulozy jest ekonomicznie bardziej opłacalne, gdyż umożliwia otrzymywanie ściśle określonych produktów bez substancji ubocznych. Największe zainteresowanie badaczy skupia się na możliwości transformacji celulozy do paliw płynnych stosowanych jako substytuty ropy naftowej i benzyny.

Produkcja alkoholu etylowego na świecie szacowana jest na około 20 mld litrów rocznie. Podstawową przeszkodą w szerszym zastosowaniu etanolu jako paliwa była jego cena, która była wyższa od ceny benzyny. Sytuacja ta zmieniła się w II półroczu 1990 r. w związku z kryzysem w Zatoce Perskiej. Cena benzyny na rynku międzynarodowym w październiku 1990 r. wzrosła do ponad 400 USD/t, a więc była wyższa

od ceny alkoholu etylowego [22]. W latach osiemdziesiątych oceniano, że koszt produkcji etanolu wynosił 4 USD za galon, natomiast w ostatnich latach obniżył się do 1,8 USD/galon. Analizując bieżące wyniki badań naukowych, etanol z surowców ligninocelulozowych można by otrzymać po kosztach poniżej 1 USD/galon [21]. Wykorzystanie procesów enzymatycznej hydrolizy w degradacji kompleksu ligninocelulozowego oraz pełniejsza utylizacja produktów ubocznych pozwoliłyby na zmniejszenie ceny etanolu do 20 centów za litr [13 za 21].

Ligninocelulozy składają się z trzech zasadniczych biopolimerów: celulozy — średnio występującej w około 40%, hemicelulozy — około 20–30% oraz z ligniny — od 21 do 27%. Procentowy udział poszczególnych składników w surowcach ligninocelulozowych jest zmienny i zależy od rodzaju roślin i technologii otrzymywania poszczególnych biopolimerów. W ewentualnym procesie biodegradacyjnym budowa przestrzenna kompleksu ligninocelulozowego przysparza wiele trudności. Obecnie wiadomo, że najlepiej poznane procesy związane są z rozkładem celulozy i hemicelulozy. Oba biopolimery występują zwykle w kompleksie z ligniną, która stanowi jakby barierę zabezpieczającą składniki węglowodanowe przed kontaktem z enzymatycznymi układami hydrolitycznymi [12].

Surowcem ligninocelulozowym, który może być wykorzystany w procesie technologicznym, najczęściej jest słoma i drewno. Słoma, która do tej pory w Polsce była raczej surowcem odpadowym (roczny zbiór wynosił około 21–23 mln t [39]), obecnie — w związku ze wzrostem cen nawozów oraz obniżeniem dochodów z produkcji żywności — używana jest bezpośrednio w gospodarstwach rolnych. Jedynie słoma rzepakowa w ilości około 2 mln ton rocznie mogłaby służyć jako źródło ligninocelulozy [39]. Drewno po wykorzystaniu przez różne gałęzie przemysłu drzewnego dostarcza odpady między innymi w postaci trocin, które są potencjalnie najbogatszym źródłem ligninocelulozy. Ten cenny materiał odpadowy może być wykorzystany w procesach biotechnologicznych. Według danych Zakładu Prognozowania Instytutu Technologii Drewna w latach dziewięćdziesiątych powstanie corocznie około 1,4 mln m³ trocin iglastych, 0,6 mln m³ drobnicy liściastej, 0,4 mln m³ odpadów liściastych i 0,28 mln m³ trocin liściastych [39]. Ilość stałych odpadów komunalnych w Polsce wynosi około 40 mln m³/rok, z czego 25% to odpady zawierające celulozę [39]. Całkowite wykorzystanie ligninocelulozy jako surowca wymaga udziału co najmniej trzech kompleksów enzymatycznych, tj. celulaz, hemicelulaz i enzymów ligninolitycznych.

Oдноśnie celulaz — najlepszymi producentami tych enzymów okazały się grzyby z rodzaju *Trichoderma*, *Sporotrichum* (*Phanerochaete*), *Fusarium* i *Aspergillus* [1]. W skład kompleksu enzymów celulolitycznych wchodzi: 1,4- β -glukan glukanohydrolazy — znane jako endoglukanazy hydrolizujące wiązanie β -1,4-glikozydowe w łańcuchu celulozy w sposób przypadkowy oraz 1,4- β -glukan celobiohydrolazy — znane jako egzoglukanazy. W grupie tych enzymów wyróżnia się glukocelulazę — która odcina glukozę z nieredukującego końca łańcucha celulozy, egzocelobiohydro-

lazę (EC 3.2.1.91), odcinającą celobiozę z nieredukującego końca łańcucha celulozy, oraz β -1,4-glukozydazę (EC 3.2.1.21), zwaną celobiazą hydrolizującą celobiozę i rozpuszczalne w wodzie celulodekstryny do glukozy i kwasu celobionowego lub glukozy i galaktomannanu [10].

Szybkość reakcji hydrolitycznych uzależniona jest od ilościowego składu kompleksu enzymatycznego oraz od rodzaju celulozy i formy, w jakiej ona występuje (forma krystaliczna czy forma amorficzna). Poza tym zależy również od stopnia polimeryzacji (im niższy stopień polimeryzacji, tym łatwiej celuloza ulega hydrolizie) oraz powierzchni właściwej, a przede wszystkim od stopnia związania z ligninami [11].

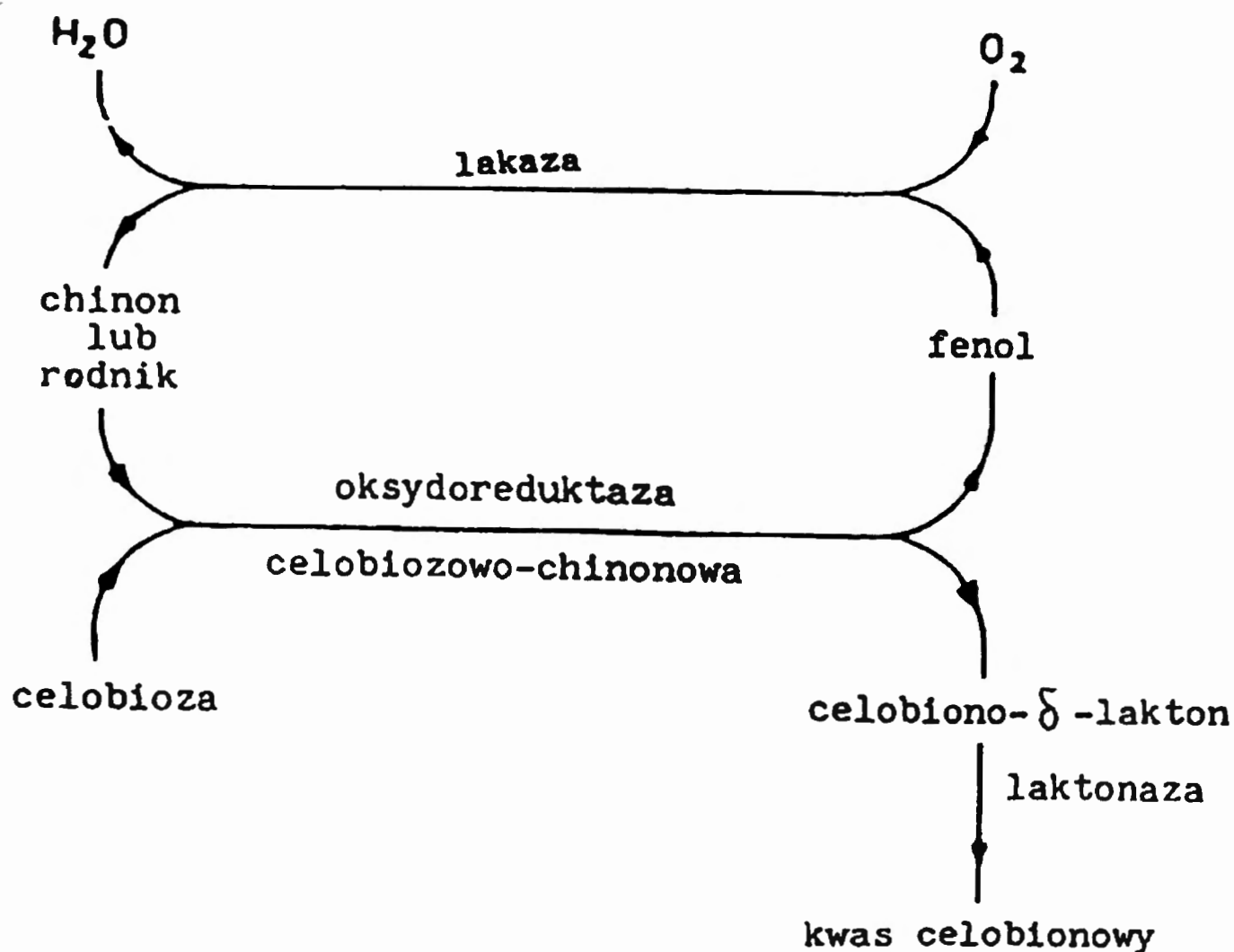
W celu oczyszczenia celulozy i obniżenia polimeryzacji, jak i powiększenia powierzchni właściwej stosowane są różne techniki określane powszechnie jako wstępna obróbka surowców ligninocelulozowych. Należy tutaj wymienić metody obróbki na zimno — a więc poddawanie surowców mieleniu (np. młyny kulowe) [43], działaniu czynników chemicznych (ługi, woda utleniona, ozonowanie itp.) [44]. Zabiegi te mają na celu rozluźnienie struktury ligniny z celulozą i powiększenie powierzchni właściwej samej celulozy.

Inne metody dotyczą termicznej obróbki surowca. Polegają one na ogrzewaniu masy ligninocelulozowej do temperatury 120–270°C pod ciśnieniem i następnie szybkie jej ekspandowanie. W wyniku tych procesów uzyskuje się dobre rozdzielanie lignin od celulozy i znaczne rozluźnienie struktury celulozy. Tak preparowane surowce ligninocelulozowe ulegają scukrzeniu nawet do 90% [1].

Jednym z głównych produktów działalności celulaz jest celobioza. Nagromadzenie się tego cukru w mieszaninie reakcyjnej może powodować zahamowanie aktywności enzymów celulolitycznych. Wood i McCrae [53] wykazali, że stężenie celobiozy wynoszące 0,01% było wystarczające, by spowodować 79% inhibicję celulaz otrzymanych z *T. koningi*. Glukoza jest również inhibitorem enzymów celulolitycznych, jednak nie tak silnym jak celobioza [53]. Poza tym aktywność β -glukozydazy w preparatach enzymatycznych celulaz jest wyraźnie niższa i dlatego obserwuje się nagromadzenie przede wszystkim celobiozy. Można cytować wiele prac dotyczących poszukiwania drobnoustrojów syntetyzujących β -glukozydazę, by w ten sposób przyspieszyć procesy rozpadu celobiozy do glukozy [17, 23].

Jak wykazały badania Erikssona i wsp., nagromadzenie celobiozy w środowisku reakcji enzymatycznych może spowodować pojawienie się enzymów katalizujących reakcje utleniania celobiozy do kwasu celobionowego i następnie dalej do laktonu celobiozy (rys. 1). Produkty te wywołują kataboliczną represję syntezy enzymów celulolitycznych, jak również powodują obniżenie aktywności celulaz, wpływając istotnie na ekonomikę całego procesu technologicznego [50].

Jakie istnieją możliwości wykorzystania produktów hydrolizy surowców ligninocelulozowych? Początkowo niektórzy badacze przypuszczali, że będzie można tak pokierować procesami hydrolizy celulozy, by produktem końcowym była glukoza [5]. Jednakże okazało się, że ze względów ekonomicznych jest to proces nieopłacalny.



Rysunek 1. Mechanizm współdziałania oksydoreduktazy celobiozowo-chinonowej i lakazy [46]

Niemniej w latach osiemdziesiątych były prowadzone badania, szczególnie w b. Związku Radzieckim, nad produkcją glukozy z odpadów powstałych przy przerobieniu bawełny.

Wiele uwagi poświęcono również wykorzystaniu grzybów celulolitycznych do produkcji białka z surowców ligninocelulozowych, również w Polsce pracowano nad tym zagadnieniem jeszcze w latach osiemdziesiątych [32]. Jednak cena białka grzybowego otrzymanego ze źródeł ligninocelulozowych wielokrotnie przekracza cenę białka sojowego i z tych powodów ten kierunek badań zarzucono w wielu ośrodkach naukowych. Jednym z obiecujących obecnie kierunków badań jest wykorzystanie ligninocelulozy do produkcji etanolu. Stosowanym kompleksem enzymatycznym są najczęściej celulazy produkowane przez grzybnię *T. viride*. W największym skrócie schemat produkcji etanolu przedstawia się następująco:

- a) hodowla grzybów celem uzyskania celulaz,
- b) hydroliza celulozy,
- c) fermentacja "scukrzonego przesącza".

Jednakże rozdzielenie procesu hydrolizy enzymatycznej od procesu fermentacji ma pewne ujemne strony. Jak wiadomo, enzymatyczny proces hydrolizy celulozy prze-

biega wolno, a nagromadzanie się celobiozy i glukozy hamuje ten proces. Umiejętne usuwanie tych produktów hydrolizy ze środowiska może zapewnić wysoką wydajność procesu hydrolizy [42].

W roku 1982 ukazały się pierwsze prace nad klonowaniem enzymów grzybowych u bakterii np. *E. coli*, dokonali tego Whitle i Hilburn [51], przenosząc geny celulazy z *Cellulomonas*. W roku 1983 Wilson i Colmer [52] uzyskali rekombinanta *E. coli* z endoglukanazą *Thermonospora*. Podobne prace były prowadzone w wielu ośrodkach Japonii, Francji, Kanady, Włoch, Stanów Zjednoczonych AP i Wielkiej Brytanii, a nawet Indii. W większości przypadków uzyskano ekspresję genów celulaz, a nawet produkty tych genów ulegały wydzielaniu z komórek. Jedną z niewiadomych jest bardzo duża liczba genów kodujących poszczególne rodzaje aktywności celulolitycznych. Na przykład u *Clostridium* sklonowano 15 różnych genów kodujących endoglukanazy [40]. Wyjaśnienie występowania tych wielokrotnych kopii oraz powiązanie ich z poszczególnymi rodzajami aktywności enzymatycznych może dać nieocenione usługi w przyszłych procesach technologicznych. W pracy przeglądowej Gilkesa i wsp. [1991] cytowanych jest 56 pozycji literatury dotyczących przenoszenia aktywności celulolitycznych z bakterii do *E. coli* [14]. W połowie lat osiemdziesiątych rozpoczęto w ośrodku VTT (Centralny Ośrodek Biotechnologii) w Finlandii prace nad izolacją materiału genetycznego kodującego enzymy celulolityczne, pochodzącego z materiału grzybowego (*Eucariota*). Pierwszym sukcesem było wyizolowanie genu β -glukozydazy z *Aspergillus niger* [37], a następnie celobiohydrolazy i endoglukanazy z *Trichoderma reesei* [35, 36]. Założeniem projektu badawczego była konstrukcja komórek *Saccharomyces cerevisiae*, u których wyrazi się aktywność celulolityczna. Fakt efektywnego wydzielania do podłoża przetransformowanych aktywności sugeruje, że można otrzymać nowe odmiany drożdży, zdolne — przy zachowaniu właściwości podstawowej komórki drożdżowej, to znaczy zdolności fermentacji cukrów — do produkowania pojedynczych enzymów celulolitycznych. Takie zmodyfikowane genetycznie drożdże są w stanie nie tylko przyspieszyć proces hydrolizy, lecz także usuwać ze środowiska glukozę — czynnik hamujący zarówno procesy przemiany enzymatycznej celobiozy do glukozy, jak i hamowania aktywności celulaz.

Równoległe z syntezą celulaz, u większości grzybów rosnących na substratach ligninocelulozowych, syntetyzowane są układy enzymatyczne, powodujące hydrolytyczny rozpad hemicelulozy. Ze względu na bardziej skomplikowaną budowę chemiczną i konformację przestrzenną hemiceluloz — garnitur enzymów biorących udział w depolimeryzacji tych heteroglikanów jest bardzo różnorodny. Enzymy biorące udział w transformacji hemiceluloz do cukrów prostych określa się zbiorową nazwą hemicelulaz. W zależności od mechanizmu działania enzymy te można podzielić na endo- i egzohemicelulazy. Endohemicelulazy hydrolizują wiązanie glukozydowe w łańcuchu hemicelulozy w sposób przypadkowy, tnąc go początkowo na mniejsze fragmenty i uwalniając w końcowej fazie cukry redukujące. Egzohemicelulazy odszczepiają sukcesywnie pojedyncze lub podwójne reszty cukrowe z nieredukują-

cego końca cząsteczki. Biorąc pod uwagę strukturę hemicelulozy, enzymy rozkładające ten polimer można podzielić na grupę enzymów ksylanolitycznych oraz mannanolitycznych. W skład ksylanaz zdolnych do całkowitej degradacji acetyloksylanu niezbędne są: endo- β -1,4-ksylanaza [EC 3.2.1.8], β -ksylozydaza [EC 3.2.1.37], α -glukuronidaza [EC 3.2.1.], α -L-arabinofuranozydaza [EC 3.2.1.55] oraz acetyloesteraza [EC 3.1.1.6] [35]. Natomiast do całkowitej hydrolizy mannanów zawartych w drewnie niezbędne są następujące enzymy: endo- β -1,4-D-mannanaza [EC 3.2.1.78], β -mannozydaza [EC 3.2.1.25], β -glukozydaza [EC 3.2.1.21] oraz α -galaktozydaza [EC 3.2.1.22] [9]. Podstawowymi produktami mikrobiologicznej degradacji hemiceluloz są cukry proste wchodzące w skład tego polimeru, a wśród nich ksyloza — cukier zalecany dla diabetyków. Metodami chemicznymi otrzymuje się z niego furfural, stosowany w przemyśle petrochemicznym jako doskonały rozpuszczalnik olejów i smarów lub jako wyjściowy półprodukt do otrzymywania różnych jego pochodnych, jak np. furan, alkohol furylowy, pochodne do produkcji poliuretanów oraz preparaty o działaniu grzybobójczym i owadobójczym [24]. Obecne badania mikrobiologicznego rozkładu pentozanów mają na celu pozyskiwanie z nich monomerów do wytwarzania cennych produktów, jak np. krystaliczna ksyloza, ksylitol, aceton, butanol, biomasa drobnoustrojów zasobnych w białko, etanol, kwasy organiczne lub pasza węglowodanowo-azotowa po kondensacji z moczniakiem w obecności kwasu fosforowego [24]. Najwięcej prac poświęcono wykorzystaniu pentoz do produkcji paliw ciekłych, w tym głównie etanolu, dzięki wyselekcjonowaniu gatunków drobnoustrojów zdolnych do fermentacji pentoz [2, 9]. Większość znanych gatunków drożdży jest zdolna w warunkach tlenowych do wzrostu i produkcji biomasy. Jak wynika z badań Sliningera i wsp. — zarówno *C. shechatae*, jak i *P. stipitis* w warunkach tlenowych, przy stężeniu ksylozy 100 i 150 g/l, dawały wydajności rzędu 0,41–0,45 g z 1 g ksylozy [41]. Zmiana warunków na beztlenowe powoduje utratę zdolności do wzrostu na bazie pentoz i fermentacji tych cukrów przez większość organizmów. Przyczyną tego zjawiska jest brak specyficznych kinaz białkowych oraz aktywności izomerazy ksylozy lub arabinozy [41]. Wśród nielicznych organizmów zdolnych do fermentacji pentoz można wymienić następujące: *Candida shechatae*, *Pichia stipitis*, *Kluveromyces cellobiovorus*, a nawet niektóre szczepy *Saccharomyces cerevisiae*. Poza drożdżami zdolność do fermentacji pentoz wykazują również niektóre gatunki grzybów nitkowatych, jak *Erwinia chrysanthemi* i *Fusarium oxysporum*, a z bakterii *Bacillus macerans*, *Klebsiella pneumoniae* i *Clostridium thermosaccharalyticum* [2]. W 1985 r. Ueng i wsp. opublikowali wyniki badań nad klonowaniem genu ksylozo-izomerazy z *E. coli* do drożdży *S. cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe*. Otrzymywane szczepy drożdży zdolne były do bezpośredniej fermentacji ksylozy do etanolu [49].

Trzecim strukturalnym komponentem surowców ligninocelulozy (obok celulozy i hemicelulozy) jest lignina. Stanowi główny składnik blaszki środkowej tkanki roślinnej oraz ściany wtórnej. Pod względem chemicznym lignina jest polimerem podjednostek fenylopropanowych i należy do najbardziej złożonych związków che-

micznych występujących w stanie naturalnym. Według Kirka jest to największy magazyn związków aromatycznych na ziemi i może stanowić ważne źródło dla przemysłu związków chemicznych [26]. Wykorzystanie mikroorganizmów do przekształcenia odpadów ligninowych w użyteczne produkty, w tym białko, jest jednym z ważnych problemów czekających na racjonalne rozwiązania. Pomimo intensywnych badań postęp wiedzy zarówno w dziedzinie badań podstawowych, jak i rozwiązań biotechnologicznych, dotyczący rozkładu ligniny, jest zbyt powolny i niedostateczny. Znikoma jest zwłaszcza wiedza w zakresie enzymologii lignolizy. Z drugiej strony — coraz bardziej powszechne jest przekonanie, że znajomość powyższych zagadnień stanowi warunek rosnącego zapotrzebowania na zagospodarowanie odpadów ligninowych.

Procesami biologicznej degradacji lignin zajmowano się od dawna; do 1970 roku opracowano ponad 5 hipotez tłumaczących biologiczną degradację ligniny na przykładzie dwóch enzymów — peroksydazy i lakazy [31]. Dziś wiadomo, że w degradacji lignin uczestniczy wiele grup enzymów, przy czym w każdej z nich może występować wiele izoenzymów. W badaniach nad degradacją lignin poważnym osiągnięciem było wprowadzenie do doświadczeń syntetycznych związków modelowych (lignin) i opracowanie metod otrzymywania lignin naturalnych ze znakowanymi atomami węgla i wodoru w łańcuchach bocznych, jak i w pierścieniu aromatycznym. Radioaktywne ligniny wprowadzono do badań w latach 1974–1977, a metodyka opracowana była w USA przez Kirka i Crawforda [4, 28], w Europie zaś przez Haidera i Trojanowskiego [15].

Aktualnie grzybem wzorcowym w badaniach nad rozpadem ligniny jest szczep *Phanerochaete chrysosporium*, który charakteryzuje się bardzo aktywnym rozkładem lignin. Grzyb ten spełnia podobną rolę jak *T. reesei* w badaniach nad celulazami. Drugim drobnoustrojem wprowadzonym do badań nad biodegradacją lignin jest *Streptomyces viridosporus*.

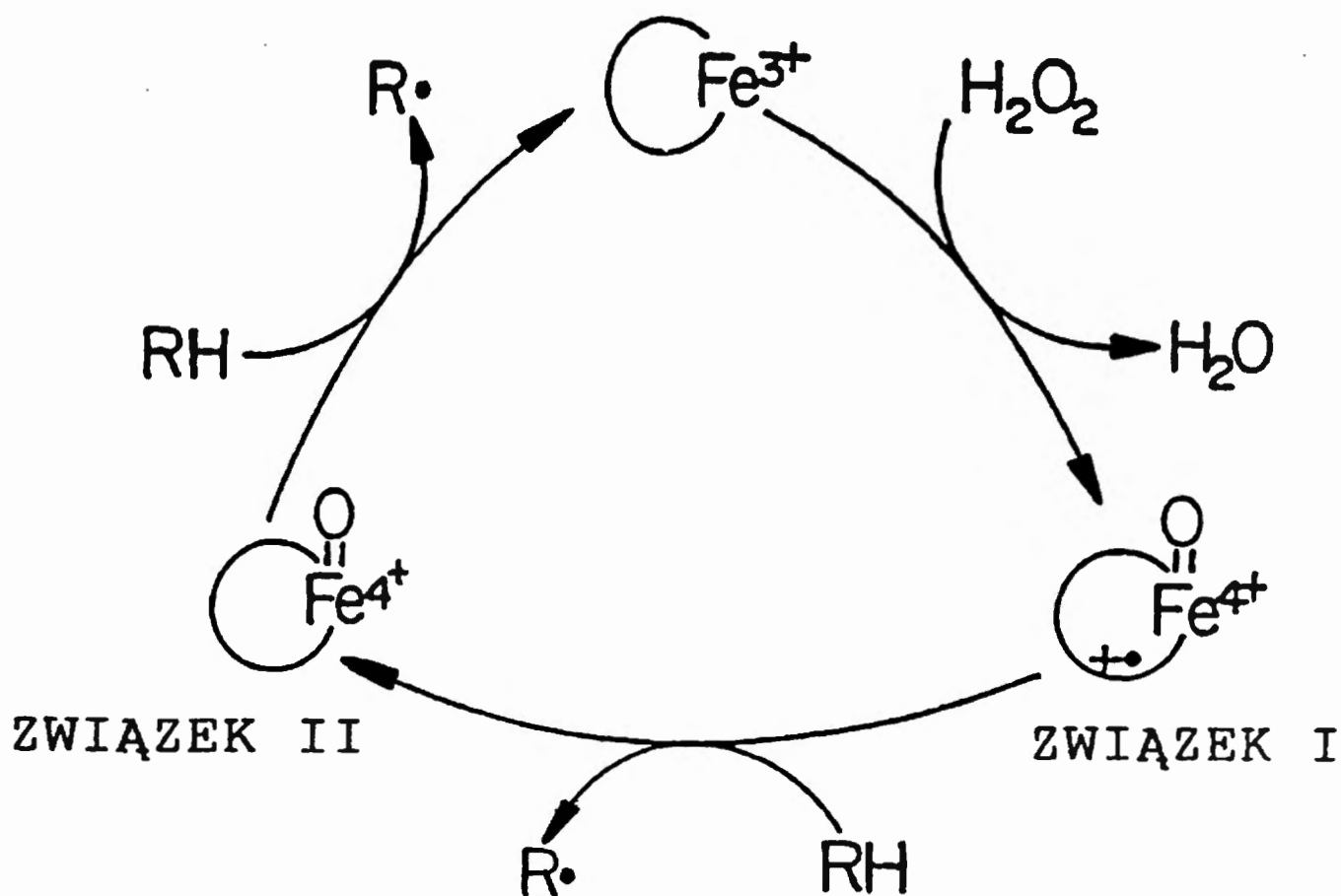
Do czego zmierzają badania nad poznaniem mechanizmu degradacji lignin? Wielu badaczy na pierwszy plan wysuwa coraz częściej problem ochrony środowiska przed skażeniem wód ługami sulfitowymi z papierni, wytwórni płyt i elementów drewnopochodnych [50]. Na drugim miejscu koncentrują się badania nad delignifikacją odpadów rolniczych. Usunięcie nawet nieznacznych ilości ligniny za pomocą mutantów Cel^- (nie wytwarzających celulaz) może spowodować wzrost przyswajalności wielu odpadów ligninocelulozowych przez przeżuwacze [6].

Najważniejszym kierunkiem badań jest poszukiwanie mutantów zdolnych do degradacji lignin do określonego etapu, a następnie ekstrahowanie z tak rozłożonych lignin metodami chemicznymi np. produktów ważnych dla przemysłu. Warunkiem osiągnięcia opłacalnych technologii jest kierowanie tymi procesami, co wiąże się z poznaniem mechanizmu enzymatycznego rozkładu różnych typów lignin.

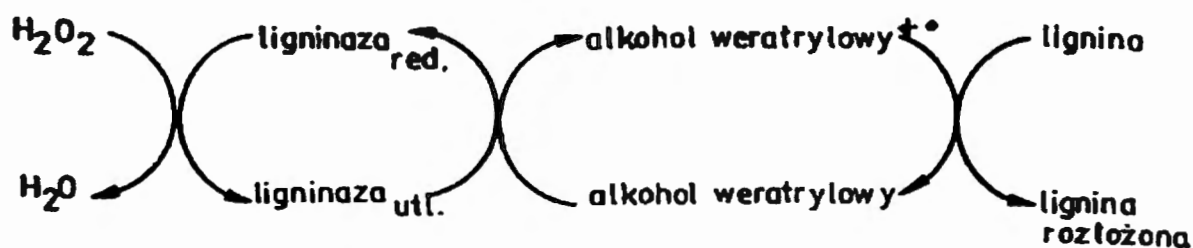
Jak wynika z prac prowadzonych przez Kirka i Erikssona, Crawforda, Fiechtera i innych, można wyróżnić kilka istotnych reakcji chemicznych, odgrywających zna-

czną rolę w procesach rozpadu biopolimeru ligniny [7, 19, 26]. Należą do nich demetylacja grup aromatycznych, hydroksylacja aromatycznych pierścieni oraz rozrywanie wiązań pomiędzy pierwszym i drugim węglem łańcucha propylenu. Jak wynika z badań grupy Kirka [28], ta ostatnia rola ma bardzo istotne znaczenie. Wielu badaczy jest zgodnych co do tego, że w procesach degradacji ligniny zasadniczą rolę odgrywają enzymy typu oksydaz i że enzymy te są enzymami pozakomórkowymi [7, 8, 20, 28, 31]. Do niedawna przypuszczano, że enzymy ligninolityczne związane są ze ścianą komórkową [3]. Ostatnie badania przy zastosowaniu protoplastów — przeprowadzone przez Trojanowskiego i Wesselsa — wykazały, że protoplasty otrzymane z grzyba *Fomes annosus* degradowały ligniny syntetyczne i kwasy ligninosulfonowe [48]. Stwierdzono między innymi znaczną aktywność wobec grup metoksylowych.

Bardzo ważnym stwierdzeniem w badaniach nad degradacją lignin było wyizolowanie w 1983 roku z bezkomórkowych płynów pochodzących z enzymu, który wprowadzony do mieszaniny reagującej powodował depolimeryzację badanej ligniny [46]. Enzym ten jest hematoproteiną zawierającą w cząsteczce $1,02 \pm 0,2$ atomów żelaza oraz 20% węglowodanów [34]. Masa cząsteczkowa enzymu, izolowanego z *Phanerochaete chrysosporium*, wynosi 42 kD. Do czynności katalitycznej enzym wymaga nadtlenu wodoru i katalizuje bez stereospecyficzności wiele reakcji utleniania w alkilowym łańcuchu bocznym związków ligninowych. Oprócz rozrywania wiązań pomiędzy atomami węgla $C\alpha-C\beta$ łańcuchów bocznych w podjednostkach strukturalnych ligniny katalizuje rozrywanie wiązania eterowego, utlenianie benzylo-owych grup alkoholowych do odpowiednich aldehydów bądź ketonów, intradiolowe rozrywanie struktur fenyloglikolowych oraz hydroksylację grup metylenobenzylo-owych [47]. Ligninaza powoduje również polimeryzację i kopolimeryzację połączeń fenolowych, podobnie jak lakaza i peroksydaza. Wszystkie reakcje wymagają nadtlenu wodoru, chociaż dwie reakcje, tj. rozerwanie wiązania $C\alpha-C\beta$ i hydroksylacja grup metylenobenzylo-owych, mają charakter oksygenacji substratowej, a tlen włączany do substratu pochodzi z tlenu atmosferycznego, nie zaś z nadtlenu wodoru. W tych zatem przypadkach ligninaza zachowuje się jak wyjątkowa oksygenaza wymagająca do czynności nadtlenu wodoru [47]. Do najlepiej poznanych reakcji katalizowanych przez ligninazę należy utlenianie alkoholu weratrylowego. Kirk i wsp. [29] stwierdzili, że na jedną zużytą cząsteczkę nadtlenu wodoru przypada jedna cząsteczka powstałego aldehydu weratrylowego. Badanie szybkości początkowej, przy systematycznej zmianie koncentracji obydwu substratów, sugeruje występowanie reakcji typu "ping-pong". W reakcji tej pierwszy substrat reaguje z enzymem, dając pierwszy produkt i zmodyfikowany enzym. Następnie zmodyfikowany enzym reaguje z drugim substratem, w wyniku czego powstaje drugi produkt [45]. Przemiany kofaktora hemowego w cząsteczce ligninazy podczas reakcji katalizowanej przez ten enzym przedstawia rysunek 2.



Rysunek 2. Katalityczna aktywność ligninazy pokazująca poszczególne stany utlenienia kofaktora hemowego [41]



Rysunek 3. Degradacja ligniny z udziałem ligninazy i alkoholu weratrylowego [15]

Ligninaza może utleniać wiele substratów bezpośrednio. Wyniki Harvey i wsp. [16] sugerują również udział w tym procesie alkoholu weratrylowego, który spełnia funkcję wysokoenergetycznego pośrednika (rys. 3).

Innym enzymem wyizolowanym również z płynu pochodzącego *Phanerochaete chrysosporium* jest peroksydaza manganozależna (Mn-zależna peroksydaza). Jej masa cząsteczkowa wynosi 46 kD. Do sprawnego działania enzym wymaga obecności H_2O_2 i Mn^{2+} . Zawiera protochem IX z wysokospinowym jonem żelazowym, który bierze udział w utlenianiu Mn^{2+} do Mn^{3+} [16, 30]. Mn-zależna peroksydaza wyodrębniona z *Phanerochaete chrysosporium* zawiera 17% obojętnych węglowodanów oraz znaczny procent kwaśnych aminokwasów [34]. Bliższe badania Paszczyńskiego i wsp. [33] wykazały, że w określonych warunkach manganozależna peroksydaza współpracuje z tlenem atmosferycznym i nie wymaga do czynności katalitycznej

nadtlenku wodoru, a przeciwnie — produkuje ten związek np. podczas utleniania glutationu, ditiotreitolu bądź NADPH. W obecności H_2O_2 enzym utlenia typowe dla peroksydazy donatory wodoru, nie utlenia natomiast alkoholu weratrylowego, czym różni się zasadniczo od typowych ligninaz. Z drugiej strony, działając demetylująco na niektóre połączenia metoksyłowe, enzym przejawia aktywność istotną z punktu widzenia transformacji ligniny, produkowany zaś przezeń w określonych warunkach nadtlenek wodoru może być, jak sugerują autorzy, substratem dla ligninaz [33].

Obecny stan wiedzy nad rozkładem ligninocelulozy pozwala sądzić, że proces biodegradacji może przebiegać jedynie przy współdziałaniu wielu enzymów uczestniczących w przemianach głównych składników kopolimeru [38]. Procesy enzymatycznej hydrolizy na poziomie glukozy lub celobiozy mogą wykazywać współdziałanie przy udziale oksydazy glukozy, oksydazy celobiozowo-chinonowej czy oksydazy celobiozowej. Uzdolnienia grzybów takich jak *Phanerochaete chrysosporium* [31] oraz *Phlebia radiata* [38] do zewnątrzkomórkowego wydzielania tych enzymów wpływają w wyraźny sposób na zwiększenie tempa rozkładu kompleksu ligninocelulozowego.

Literatura

-
- [1] Bujak S., Targoński Z. 1988. Mikrobiologiczna degradacja materiałów ligninocelulozowych. *Post. Mikrobiol.* **27**: 211–241.
 - [2] Bujak S., Targoński Z. 1990. Mikrobiologiczna degradacja hemiceluloz. *Post. Mikrobiol.* **29**: 77–90.
 - [3] Crawford D.L., Crawford R.L. 1976. Microbial degradation of lignocellulose: the lignin component. *Appl. Environ. Microbiol.* **21**: 714–717.
 - [4] Crawford D.L., Crawford R.L., Pometto III A.L. 1977: Preparation of specifically labelled ^{14}C -[lignin]- and ^{14}C -[glucan]-lignocelluloses and their decomposition by the microflora of soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**: 1247–1251.
 - [5] Deschamps F., Hunet M.C. 1984. β -Glucosidase production by *Aspergillus floenicis* in solid state fermentation. *Biot. Letters* **1**: 55–60.
 - [6] Eriksson K.E. 1978. Enzyme mechanisms involved in cellulose hydrolysis by the rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. *Biotech. Bioeng.* **20**: 317–332.
 - [7] Eriksson K.E. 1985. Potential use of microorganisms in wood bioconversion. The Marcus Wallenberg Foundation Symposia Proceedings "New horizons for biotechnological utilization of the forest resource, Falun, Sweden, September 12: 9–26.
 - [8] Eriksson K.E. 1985. Swedish developments in biotechnology related to the pulp and paper industry. *Tappi* **68**: 46–55.
 - [9] Eriksson K.E., Blanchette R.A., Ander P. 1990. Biodegradation of hemicelluloses. W: Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components, Timell T.E. (red.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong: 181–224.
 - [10] Eriksson K.E., Wood T.M. 1985 Biodegradation of cellulose. W: Biodegradation of Cellulose in Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components, Higuchi T. (red.), Academic Press, New York: 469–503.
 - [11] Fan L.T., Gharpuray M.M., Lee Y.H. 1986. Enzymatic Hydrolysis. W: Cellulose Hydrolysis, Fan L.T., Gharpuray M.M., Lee Y.H. (red.), Springer-Verlag, Berlin: 21–120.

- [12] Fengel D. 1971. Ultrastructural organization of the cell wall components. *J. Polym. Sci. C* **36**: 383–392.
- [13] Foody B. 1988. Technical and Economics Potential for Large Scale Production from Cellulose. Materiały z Konferencji "Bioconversion of Ligninocellulosics, czerwiec 1988: 83.
- [14] Gilkes N.R., Kilburn D.G., Miller Jr. R.C., Warren R.A.J. 1991. Bacterial Cellulases. *Bioresource Technology* **36**: 21–35.
- [15] Haider K., Trojanowski J. 1975. Decomposition of specifically ¹⁴C-labelled phenols and dehydropolymers of coniferyl alcohol as models for lignin degradation by soft and white rot fungi. *Arch. Microbiol.* **105**: 33–41.
- [16] Harvey P.J., Schoemaker H.E., Palmer J.M. 1986. Veratryl alcohol as a mediator and the role of radical cations in lignin biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letter* **195**: 242–246.
- [17] Hidalgo M., Steiner J., Eyzaguirre J. 1992. β -Glucosidase from *Penicillium purpurogenum*: Purification and Properties. *Biotechnol. and Appl. Biochem.* **15**: 185–191.
- [18] Huyhn V.B., Crawford R.L. 1985. Novel extracellular enzymes (ligninases) of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiol. Lett.* **28**: 119–123.
- [19] Jamroz J., Kalbarczyk J. 1989. Możliwości wykorzystania grzybów wyższych do produkcji białka z surowców odpadowych. *Przemysł Spożywczy* **6**: 151–153.
- [20] Janshekar H., Fiechter A. 1983. Lignin: Biosynthesis, Application and Biodegradation. W: Pentoses and Lignin, Chan Y.K., Fiechter A. (red.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo: 119–179.
- [21] Jarosz K. 1989. Wykorzystanie surowców ligninocelulozowych po produkcji etanolu i innych związków chemicznych. Materiały II Konferencji Naukowo-Technicznej "Biotechnologia w gospodarce żywnościowej" 27.04.1989 Olsztyn: 77–91.
- [22] Jarosz K. 1991. Niektóre uwagi o możliwości wykorzystania spirytusu jako paliwa do pojazdów w Polsce. *Przem. Ferm. Owoc.-Warzyw.* **4**: 8.
- [23] Katayeva I.A., Golovchenko N.P., Chuvilskaya N.A., Akimenko V.K., 1992. *Clostridium thermocellum* β -glucosidases A and B: Purification, properties, localization, and regulation of biosynthesis. *Enzyme Microb. Technol.* **14**: 407–412.
- [24] Kin Z. 1980. Hemicelulozy — chemia i wykorzystanie. Lesiak T., Surewicz W. (red.), PWRiL Warszawa: 1–226.
- [25] Kirk T.K. 1983. Degradation and Conversion of Lignocelluloses. W: The Filamentous Fungi, Smith J.E., Berry D.R., Kristiansen B. (red.), Edward Arnold, London: 266–295.
- [26] Kirk T.K. 1985. The discovery and promise of lignin-degrading enzymes. The Marcus Wallenberg Foundation Symposia Proceedings "New horizons for biotechnological utilization of the forest resource, Falun, Sweden, September 12: 27–42.
- [27] Kirk T.K., Connors W.J., Bleam R.D., Hackett W.F., Zeikus J.G. 1975. Preparation and microbial decomposition of synthetic ¹⁴C-lignins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **72**: 2515–2519.
- [28] Kirk T.K., Farrell R.L. 1987. Enzymatic "Combustion": The microbial degradation of lignin. *Ann. Rev. Microbiol.* **41**: 465–505.
- [29] Kirk T.K., Tien M., Croan S., McDonagh T., Farrell R.L. 1986. Production of ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*. W: Proc. Botechnology in the Pulp and Paper Industry, The 3rd International Conference, Stockholm, June 16–19: 5–6.
- [30] Kuwahara M., Glenn J.K., Morgan M.A., Gold M.H. 1984. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett.* **169**: 247–250.
- [31] Leonowicz A., Wojtaś-Wasilewska M., Rogalski J., Luterek J. 1988. Biological decomposition of lignocellulose. W: Progress in Biotechnology 4, Blazej A., Zemek J. (red.), Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo: 415–451.

- [32] Leonowicz A., Wojtaś-Wasolewska M., Rogalski J., Luterek J. 1991. Higher fungi as a potential feed and food source from lignocellulosic wastes. W: Environmental Biotechnology, Blazej A., Privarova V. (red.), Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo: 229–255.
- [33] Paszczyński A., Huyhn V.B., Crawford R. 1985. Enzymatic activities of an extracellular manganese-dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiol. Lett.* **29**: 37–41.
- [34] Paszczyński A., Huynh V.B., Crawford R. 1986. Comparison of ligninase-I and peroxidase-M2 from the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* **244**: 750–765.
- [35] Penttilä M.E. 1987. Construction and characterisation of cellulolytic yeasts. Ph.D. Disertation, Technical Research Centre of Finland, 39, Espoo.
- [36] Penttilä M.E., Andre L., Lehtovaara P., Bailey M., Teeri T.T., Knowles J.K.C. 1988. Efficient secretion of two fungal cellobiohydrolases by *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **63**: 103–112.
- [37] Penttilä M.E., Nevalainen K.M.H., Raynal A., Knowles J.K.C. 1984. Cloning of *Aspergillus niger* genes in yeast. Expression of the gene coding *Aspergillus* β -glucosidase. *Mol. Gen Genet.* **194**: 494–499.
- [38] Rogalski J. 1992. Badania nad biotransformacją ligninocelulozy u grzybów białej zgnilizny drewna na przykładzie *Phlebia radiata*. Rozprawa habilitacyjna UMCS, ISBN 0860-7702, Lublin.
- [39] Rzędowski W., Sroka W. 1986. Wykorzystanie celulozy jako źródeł energii. *Przemysł Spożywczy* **40**: 200–204.
- [40] Schwarz W., Bronnenmeier K., Staudenbauer W.L. 1985. Molecular cloning of *Clostridium thermocellum* genes involved in β -glucan degradation in bacteriophage lambda. *Biotechnol. Lett.* **7**: 859–864.
- [41] Slininger P.J., Bothost R.J., Olws H., Ladish M.R., Serence A.R. 1985. Comparative evaluation of ethanol production by xylose-fermenting yeasts presented high xylose concentration. *Biot. Letters* **6**: 431–436.
- [42] Szczodrak J. 1989. The use of cellulases from a β -glucosidase-hyperproducing mutant of *Trichoderma reesei* in simultaneous saccharification and fermentation of wheat straw. *Biotech. Bioeng.* **33**: 1112–1116.
- [43] Szczodrak J., Rogalski J., Ilczuk Z. 1984. Cellulolytic Activity of Moulds. III. Enzymatic Hydrolysis of Cellulose Preparation from *Aspergillus terreus* F-413. *Acta Microbiol. Polon.* **33**: 207–216.
- [44] Szczodrak J., Ilczuk Z., Rogalski J., Leonowicz A. 1986. Intensification of Oak Sawdust Enzymatic Hydrolysis by Chemical or Hydrothermal Pretreatment. *Biotech. Bioeng.* **28**: 504–510.
- [45] Tien M. 1987. Properties of ligninase from *Phanerochaete chrysosporium* and their possible applications. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* **15**: 141–168.
- [46] Tien M., Kirk T.K. 1983. Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. *Science* **221**: 661–663.
- [47] Tien M., Kirk T.K. 1984. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **81**: 2280–2284.
- [48] Trojanowski J., Huttermann A., Haider K., Wessels J. 1985. Degradation of lignin and lignin related compounds by protoplasts isolated from *Fomes annosus*. *Arch. Microbiol.* **40**: 326–330.
- [49] Ueng P.P., Volpp K.J., Tucker J.V., Gong C.S., Chen L.F. 1985. Molecular cloning of the *Escherichia coli* gene encoding xylose isomerase. *Biotechnol Lett.* **7**: 153–158.
- [50] Westermark U., Eriksson K.E. 1974. Cellobiose: quinone oxidoreductase, a new wood-degrading enzyme from white-rot fungi. *Acta. Chem. Scand. B* **28**: 209–214.
- [51] Whittle D.J., Kilburn D.G., Warren R.A.J., Miller R.C., 1982. Molecular cloning of a *Cellulomonas fimi* cellulase gene in *Escherichia coli*. *Gene* **17**: 139–145.
- [52] Wilson D.B., Collmer A. 1983. Cloning and expression of a *Termonospora YX* endocellulase gene in *E. coli*. *Bio/Technol.* **1**: 594–601.
- [53] Wood T.M., McCrae S.J. 1975. W: Symposium on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose. Bailay M., Linko T.M. (red.), The Finish National Fund for Research and Development, Helsinki.