

Krzysztof Poszytek^{1*}

¹ Pracownia Analizy Skażeń Środowiska, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

Wpłynęło w maju 2015 r.
Zaakceptowano w grudniu 2015 r.

1. Wprowadzenie. 2. Charakterystyka celulozy. 3. Mikroorganizmy celuloリティczne. 4. Enzymy celuloリティczne. 4.1. Podział systemów celuloリティcznych. 4.2. Zasady funkcjonowania wolnych i skompleksowanych enzymów celuloリティcznych. 4.3. Biologia molekularna oraz inżynieria genetyczna celulaz. 5. Ekologiczny i praktyczny aspekt utylizacji celulozy. 6. Podsumowanie

Microbial cellulose utilization

Abstract: Lignocellulosic biomass, consisting of lignin, cellulose and hemicellulose, can be utilized as a substrate in the production of biofuels. Before application, lignocellulosic material requires preliminary treatment. Biological pretreatment, which can be an alternative to the physical and chemical methods, is based on the activity of microorganisms, mainly bacteria and fungi. They produce cellulolytic enzymes, cellulases, which can effectively degrade lignocellulosic biomass and other materials containing cellulose. At least three major groups of cellulases are involved in the hydrolysis process: endoglucanases, exoglucanases and β -glucosidases. Various types of cellulases exist in a free form or as complexes, known as cellulosomes. In order to increase the activity, cellulolytic enzymes can be modified by means of genetic engineering. The final results are intended to increase the efficiency of hydrolysis of lignocellulosic biomass and thus the process of biochemical changes in the context of biofuel production.

1. Introduction. 2. Characteristics of cellulose. 3. Cellulolytic microorganisms. 4. Cellulolytic enzymes. 4.1. Classification of cellulolytic enzymes. 4.2. Operating principles of free and complexed cellulolytic enzymes. 4.3. Molecular biology and genetic engineering of cellulases. 5. Ecological and practical aspects of cellulose utilization. 6. Summary

Słowa kluczowe: biomasa ligninocelulozowa, mikroorganizmy celuloリティczne, enzymy celuloリティczne, celulosomy

Key words: lignocellulosic biomass, cellulolytic microorganisms, cellulolytic enzymes, cellulosomes

1. Wprowadzenie

W ostatnich latach zaobserwowano wzrost zainteresowania pozyskiwaniem przyjaznej dla środowiska energii otrzymywanej z biopaliw uzyskanych z biodegradowalnych materiałów. Uwzględniając aspekty ekonomiczne, substraty takie mają być przede wszystkim tanie i przyjazne dla środowiska a uzyskane biopaliwa takie jak biogaz czy bioetanol, zapobiegać rozwojowi problemów związanych z ochroną środowiska [78].

Jednym z najważniejszych substratów wykorzystywanych do produkcji biopaliw jest biomasa „ligninocelulozowa”, która jest szeroko rozpowszechniona i łatwo dostępna. Ligninoceluloza jest głównym składnikiem ściany komórkowej roślin i składa się z trzech polimerów: celulozy, hemicelulozy i ligniny, powiązanych ze sobą za pomocą wiązań kowalencyjnych i innych [8]. W roślinach masa ligninocelulozowa występuje głównie w liściach, łodygach i pędach. Źródłem ligninocelulozy w procesie produkcji biopaliw są nie tylko rośliny energetyczne takie jak: kukurydza, ryż, rzepak, sorgo, trawy, ale także różnego rodzaju odpady przemysłowe i rolnicze [27]. Przykładowe zawartości celulozy, hemicelulozy i ligniny w różnych odpadach i źródłach biomasy przedstawione są w tabeli I [85].

Wysoka wartość ligninocelulozy, jako substratu w procesach pozyskiwania biopaliw związana jest z jej powszechnym występowaniem wśród roślin, niską ceną uzyskiwania energii, kosztem pozyskiwania substratu, niewielką toksycznością oraz możliwością użycia surowców odpadowych [34].

Wykorzystując szerokie i różnorodne grupy mikroorganizmów mające zdolności do rozkładu ligninocelulozy w procesach m.in. fermentacji alkoholowej, metanowej oraz procesach kompostowania nastąpił znaczący postęp badań, oraz rozwój gospodarki, związany z pozyskiwaniem biopaliw na drodze degradacji, a dokładniej na etapie hydrolizy, biomasy ligninocelulozowej.

Celuloza, jako główne źródło węgla stanowi blisko 50% wartości substancji, wytworzonej w procesie fotosyntezy [3]. Dla mikroorganizmów wykorzystujących biomasę ligninocelulozową, celuloza jest składnikiem odżywczym, natomiast dla człowieka mikroorganizmy celuloリティczne mogą stanowić istotny środek do pozyskiwania biopaliw i w następstwie energii, na drodze przemian biochemicznych.

W niniejszej pracy dokonano przeglądu dotychczasowej wiedzy na temat rozkładu celulozy przez mikroorganizmy celuloリティczne, umożliwiające degradację biomasy ligninocelulozowej. W pracy opisano aspekty

* Autor korespondencyjny: Pracownia Analizy Skażeń Środowiska, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; e-mail: kposzytek@biol.uw.edu.pl

Tabela I
Przykładowe procentowe zawartości celulozy, hemicelulozy i ligniny w różnych odpadach i źródłach biomasy

Materiał ligninocelulozowy	Procentowa zawartość węglowodanów w suchej masie		
	Celuloza	Hemiceluloza	Lignina
Liściaste łodygi	45–50	25–35	25–35
Drewniane łodygi	40–55	24–40	18–25
Liście	15–20	80–85	0
Trawy	25–40	35–50	10–30
Rzepak	27,30	20,50	14,20
Kolby kukurydzy	32,3–45,6	39,8	6,7–13,9
Słoma kukurydziana	35,1–39	20,7–24,6	11–19,1
Słoma pszenna	35–39	22–30	12–16
Słoma jęczmienna	36–43	24–33	6,3–9,8
Słoma sorgo	32–35	24–27	15–21
Słoma ryżowa	29,2–34,7	23–25,9	17–19
Słoma owsiana	31–35	20–26	10–15
Bambus	49–50	18–20	23
Łupiny orzechów	25–30	25–30	30–40
Włosy nasion bawełny	80–95	5–20	0
Odpady z hodowli trzody chlewnej	6	28	0
Obornik bydłocy	1,6–4,7	1,4–3,3	2,7–5,7
Pierwotne odpady ściekowe	8–15	0	24–29
Papier celulozowy	85–99	0	0–15
Gazeta	40–55	24–39	18–30

taksonomii drobnoustrojów celulolitycznych, enzymatyki (w tym biologii molekularnej oraz inżynierii genetycznej enzymów celulolitycznych), mikrobiologii przemysłowej oraz biotechnologii procesu hydrolizy materiału roślinnego.

2. Charakterystyka celulozy

Głównym składnikiem biomasy ligninocelulozowej jest celuloza, w mniejszym stopniu hemiceluloza oraz lignina [3]. Hemiceluloza to heteropolimer składający się głównie z pentoz (D-ksylozy, D-arabinozy) oraz heksoz (D-mannozy, D-glukozy, D-galaktozy). Lignina, to polimer, którego monomerami są związki organiczne będące pochodnymi alkoholi fenolowych (alkohol koniferylowy, synapinowy i kumarylowy). Ligniny, ze względu na ich strukturę, cechuje wysoka oporność na rozkład, tym samym stanowią barierę fizycznochemiczną dla degradacji celulozy.

Celuloza jest nierozgałęzionym polisacharydem, którego łańcuchy zawierają od 3000 do 14000 reszt D-glukozy połączonych wiązaniami β -1,4 glikozydowymi [3]. Cząsteczki celulozy (ok. 30 fragmentów) montowane są w duże jednostki – włókna elementarne (profibryle), które są pakowane w większe struktury

zwane mikrofibrylami, te z kolei są składane do znanych powszechnie włókien celulozowych. Ułożone równolegle włókna celulozowe stabilizowane są poprzez liczne wiązania wodorowe występujące pomiędzy sąsiednimi grupami hydroksylowymi, co prowadzi do powstania obszarów krystalicznej struktury celulozy. Ponadto wpływ na tak solidną konstrukcję włókien celulozy mają oddziaływania Van der Waalsa, które wynikają ze specyfiki geometrii krótkich wiązań wodorowych węgiel-wodór. Ze względu na łączny efekt wspomnianych wiązań, umożliwiają odpowiednią konformację i dużą stabilność cząsteczkom polimeru. Liczba wiązań zmniejsza się podczas hydrolizy celulozy prowadzonej przez mikroorganizmy celulolityczne, co powoduje zwiększenie się odstępów między jej cząsteczkami, zmiany konformacji i tworzenie amorficznych regionów cząsteczki celulozy. Poszczególne składowe mikrofibryl krystalicznej formy celulozy, pakowane są wystarczająco ściśle, aby zapobiec penetracji nie tylko przez różnorodne enzymy, ale nawet małe cząsteczki, takie jak woda [68]. Oprócz regionów krystalicznych i amorficznych, włókna celulozowe zawierają różne nieprawidłowości np. załamania, skręty mikrofibryl lub puste przestrzenie, czyli mikropory. Całkowita powierzchnia włókna celulozy jest znacznie większa, niż powierzchnia idealnie gładkiego włókna o takich samych wymiarach [17].

W badaniach nad hydrolizą celulozy oraz mikroorganizmami celulolitycznymi, wykorzystuje się oczyszczone celulozy, różniące się pewnymi cechami strukturalnymi od celulozy naturalnej. Komercyjnie dostępna holoceluloza Solka Floc, wytwarzana jest w procesie delignifikacji z drewna lub innych materiałów biomasy ligninocelulozowej i charakteryzuje się podwyższoną zawartością hemicelulozy. Celuloza mikrokryształiczna (np. Aviceli Sigmacell) jest prawie czystą celulozą. Ze względu na trudności związane ze zmiennością struktury czystej celulozy oraz problemami rozpuszczalności tych substratów, doszło do szerokiego stosowania wysoce rozpuszczalnej karboksymetylocelulozy – eteru stosowanego w badaniach nad produkcją i aktywnością endoglikanaz [20].

Wykorzystanie biomasy roślinnej jest bardziej skomplikowane niż użycie czystej celulozy, nie tylko z powodu kompozycji (np. obecności hemicelulozy i ligniny), ale przede wszystkim ze względu na różnorodność struktury, rozmiaru i organizacji komórek oraz tkanek roślinnych. Oprócz ograniczeń związanych z występowaniem różnych struktur celulozy, dodatkowym problemem może być dyfuzja i transport enzymów celulolitycznych do miejsca ich działania [53].

3. Mikroorganizmy celulolityczne

Taksonomia drobnoustrojów celulolitycznych opiera się na filogenetyce, a pokrewieństwa poszczególnych grup mikroorganizmów klasyfikowane są na podstawie sekwencji genów kodujących rRNA (u prokariotów 16S rRNA i 18S rRNA u eukariotów).

Przykładowe drzewo filogenetyczne dla bakterii celulolitycznych zostało przedstawione na Rys. 1.

U bakterii, najszerszą grupą zdolną do degradacji celulozy są tlenowe *Actinobacteria* oraz beztlenowe *Firmicutes*, głównie *Clostridia*. Na podstawie cech fizjologicznych mikroorganizmów celulolitycznych, wyróżnić można następujące grupy, zróżnicowane pod względem prowadzonego metabolizmu:

(i) fermentacyjne beztlenowce – zazwyczaj bakterie Gram-dodatnie takie jak *Clostridium*, *Ruminococcus* i *Caldicellulosiruptor*, a także przedstawiciele bakterii gramujemnych, z których większość spokrewniona jest z *Clostridium* np. *Butyvirbio* i *Acetovibrio*

(ii) tlenowe bakterie gramdodatnie – najważniejsi przedstawiciele to *Cellulomonas* i *Thermobifida*

(iii) tlenowe bakterie śluzowe takie jak *Cytophaga* i *Sporocytphaga*.

Powszechnie występująca celuloza może być, degradowana przez bakterie w różnych warunkach środowiska, uwzględniając m.in. zapotrzebowanie na tlen, szeroki zakres tolerancji na temperaturę i zasolenie [53]. Poszczególne grupy bakterii tlenowych i beztle-

nowych mają odmienne strategie rozkładu celulozy. Beztlenowce degradują celulozę przez system skompleksowanych enzymów występujący w celulosomach, dobrze scharakteryzowanych u termofilnych: *Clostridium thermocellum* [80]. Natomiast w przypadku bakterii tlenowych enzymy występują najczęściej w formie wolnych enzymów wytwarzanych zewnątrzkomórkowo, które można łatwo odzyskać z hodowli. Czasem mogą występować w różnych kompleksach na powierzchni komórek. Poszczególne enzymy często wykazują synergistyczne działanie podczas hydrolizy celulozy. W trakcie rozkładu celulozy przez bakterie tlenowe kontakt komórek z celulozą nie jest konieczny, mimo to większość mikroorganizmów przylega do degradowanego materiału [53].

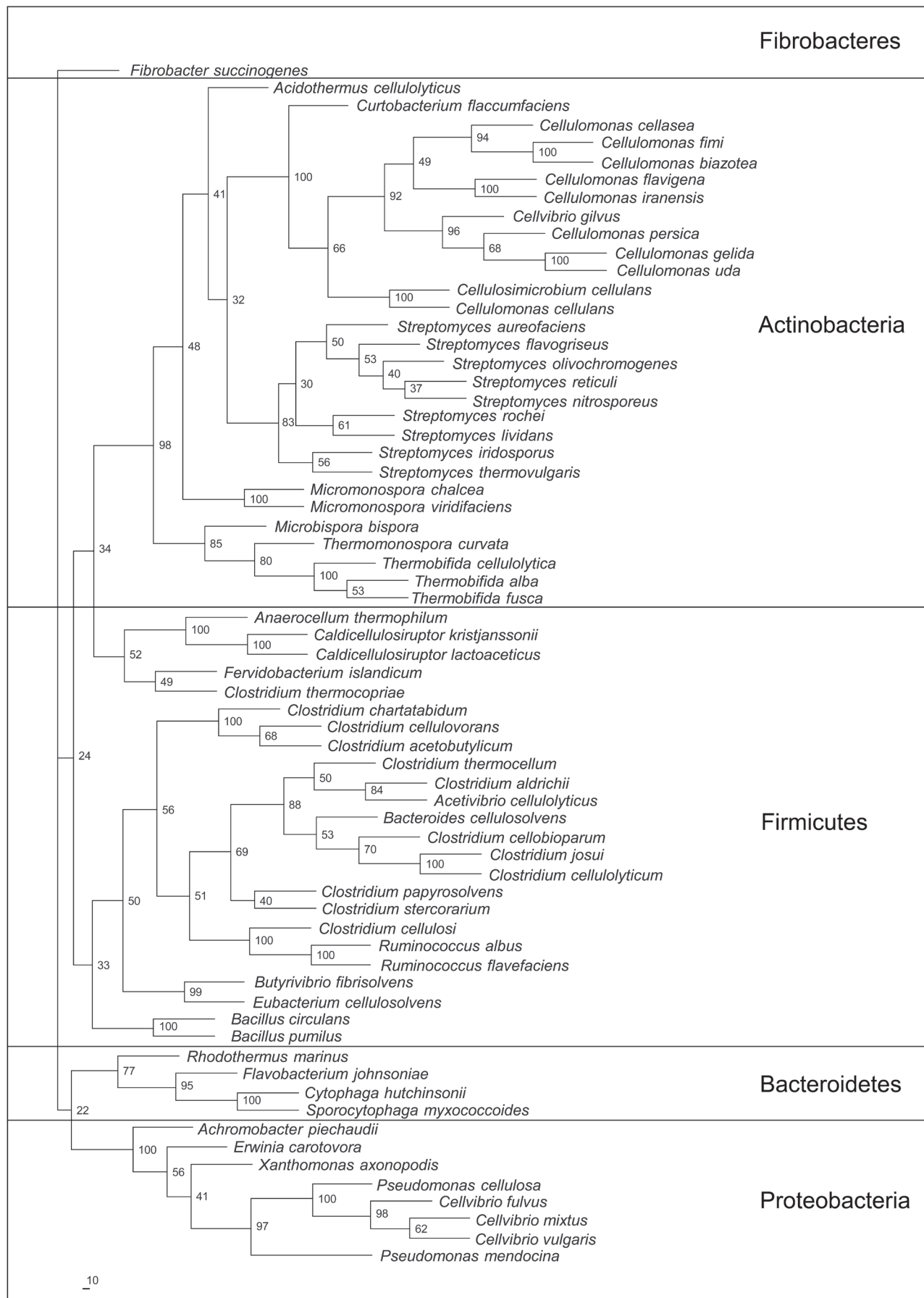
Część z tlenowych bakterii celulolitycznych to typowe gatunki glebowe, znane przede wszystkim z produkcji wtórnych metabolitów (*Streptomyces*, *Bacillus* i *Micromonospora*) lub tworzenia odrębnych form przetrwalnych np. endospor i egzospor (*Bacillus*, *Micromonospora*, *Thermobifida*) [53].

Istnieją także bakterie zawierające w genomie sekwencje kodujące enzymy celulolityczne, które nie ulegają ekspresji z powodu niesprawnej sekwencji genu promotora. Przykładem jest bakteria *Clostridium acetobutylicum* [80].

W przypadku grzybów, wykorzystanie celulozy jest powszechne w całym królestwie – od prymitywnych protista, jak *Chytridomycetes* – do zaawansowanych podstawczaków [53]. Grzyby charakteryzujące się zdolnością hydrolizy celulozy zostały wymienione w tabeli II.

Systematyka grzybów opiera się głównie na morfologii grzybni i struktur rozrodczych podczas różnych etapów grzybiczego cyklu życia. Wyróżnić można grzyby brązowej, białej i miękkiej zgnilizny. Grzyby brązowej zgnilizny atakują głównie celulozę, a białej i miękkiej, degradują zarówno celulozę jak i ligniny. Grzyby białej zgnilizny, do której należą *Basidiomycetes*, to najskuteczniejsza grupa hydrolizująca materiał ligninocelulozowy [18, 79].

Zarówno grzyby jak i bakterie są intensywnie eksploatowane w procesach rozkładu biomasy ligninocelulozowej. Grzyby mają zdolność do przenikania w materiale ligninocelulozowym dzięki występowaniu nitkowatych filamentów grzybni (strzępek). Bakterie natomiast często mają szybsze tempo wzrostu, co umożliwia uzyskanie większej ilości enzymów. Dodatkowo, bakteryjne hydrolazy często występują w formie enzymatycznych kompleksów, zapewniając wyższą skuteczność hydrolizy. Izolacja drobnoustrojów celulolitycznych z różnorodnych środowisk (w tym ekstremalnych) umożliwia selekcję mikroorganizmów wyjątkowo opornych na stesy środowiskowe, produkujących stabilne enzymy w trudnych warunkach jakie



Rys. 1. Drzewo filogenetyczne bakterii celulozycznych.

Tabela II
Systematyka grzybów posiadających właściwości celulolityczne

Nazwa gatunku grzyba	Pod-królestwo	Typ	Klasa	Rząd	Rodzina	
<i>Trichoderma reesei</i> (<i>Hypocrea jecorina</i>)	Dikarya	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Hypocreaceae	
<i>Trichoderma viride</i>					Nectriaceae	
<i>Acremonium cellulolyticus</i>					Sordariales	Sordariaceae
<i>Fusarium oxysporum</i>						Chaetomiaceae
<i>Neurospora crassa</i>				Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae
<i>Chaetomium globosum</i>						Trichocomaceae
<i>Aspergillus japonicus</i>						
<i>Penicillium verruculosum</i>						
<i>Penicillium funiculosum</i>						
<i>Penicillium janthinellum</i>						
<i>Penicillium occitanis</i>		Basidiomycota	Agaricomycetes	Polyporales	Phanerochaetaceae	
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>					Polyporaceae	
<i>Ceriporia lacerata</i>						
<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>						
<i>Pycnoporus</i> sp.				Agaricales		Pleurotaceae
<i>Trametes versicolor</i>						
<i>Pleurotus ostreatus</i>						
<i>Neocallimastix patriciarum</i>	Neocallimastigomycota				Neocallimastigomycetes	
<i>Orpinomyces</i> sp.						
<i>Piromyces</i> sp.						

mogą wystąpić podczas biokonwersji materiału ligninocelulozowego. Obecnie prowadzonych jest wiele badań dotyczących wykorzystywania, poprawy wydajności i aktywności enzymów oraz mikroorganizmów celulolitycznych znajdujących zastosowanie w przemyśle (m.in. produkcji biopaliw) [55].

4. Enzymy celulolityczne

Celulazy to klasa enzymów celulolitycznych warunkujących hydrolizę wiązań β -1,4 glikozydowych we włóknach celulozy. Mimo, iż rozkład celulozy wymaga rozszczepienia jednego typu wiązania, to w praktyce mikroorganizmy celulolityczne wytwarzają wiele różnorodnych i komplementarnych enzymów [3].

Celulazy zbudowane są z niezależnie powstałych, składanych i funkcjonalnie odrębnych jednostek zwanych domenami lub modułami. Typowe bakteryjne wolne celulazy składają się z domeny wiążącej węglowodany (CBM, Cellulose Binding Module) zlokalizowanej na C-termialnej części enzymu, połączonej za pomocą krótkiego łącznika z domeną katalityczną na N-terminalnym końcu [55]. Domena CBM warunkuje wiązanie z powierzchnią celulozy, w celu ułatwienia

hydrolizy poprzez domenę katalityczną położoną w bliskim sąsiedztwie. Wiązanie domeny CBM z celulozą jest bardzo stabilne, lecz mimo to pozwala dyfundować enzymowi w poprzek powierzchni celulozy. Obecność CBM jest szczególnie istotna w przypadku rozpoczęcia hydrolizy przez egzoglukanazy [53].

Zbadane są dwa sposoby przeprowadzania hydrolizy celulozy przez enzymy. Pierwszy z nich polega na inwersji lub utrzymaniu konfiguracji atomu węgla (C1) na końcu redukującym celulozy. Drugi oparty na typowej reakcji katalizy kwasowo-zasadowej [55].

4.1. Podział systemów celulolitycznych

Uwzględniając strukturę celulaz oraz ich aktywność enzymatyczną można wyróżnić [53]:

(i) Endoglukanazy, endo-1,4- β -D-glukanazy (EC 3.2.1.4). Działają w wewnętrznej, amorficznej części celulozy rozkładając długie łańcuchy celulozy i generując nowe łańcuchy oligosacharydów o różnej długości.

(ii) Egzoglukanazy, glukan-1,4- β -glukozydazy (EC 3.2.1.74) oraz egzo-1,4- β -celobiozydazy (celobiohydrolazy) (EC 3.2.1.91). Działają na zewnętrznych częściach cząsteczki celulozy krystalicznej. Mogą odczepiać pojedyncze jednostki glukozy lub celbiozę (podwójne

jednostki glukozy połączone wiązaniem 1,4- β glikozydowym). Wyróżnia się dwa rodzaje celobiohydrolaz. Celobiohydrolaza I (CBI) działa na nieredukującym końcu, natomiast celobiohydrolaza II (CBII) na redukującym końcu łańcucha.

(iii) β -glukozydazy, β -glukozydowe glukohydrolazy (EC 3.2.1.21). Degradują jednostki celobiozy oraz oligodekstryn do glukozy.

Między enzymami endo- i egzo- obserwuje się różnice pod kątem architektury i budowy miejsca aktywnego enzymu. Endoglukanazy charakteryzują się głęboką szczeliną, zdolną do pomieszczenia łańcucha celulozy w dowolnym jej punkcie. Natomiast miejsce aktywne egzoglukanaz ma postać rozszerzonej pętli, która stanowi rodzaj tunelu dla jednego z hydrolizowanych końców celulozy [3, 12].

System enzymów celulolitycznych działa w ściśle skoordynowany sposób. Endoglukanazy hydrolizują długie łańcuchy celulozy a wolne końce krótszych łańcuchów polisacharydów są trawione przez egzoglukanazy na redukującym i nieredukującym końcu oligosacharydu. W efekcie powstaje coraz krótszy łańcuch celulozy oraz pojedyncze jednostki celobiozy i glukozy. W wyniku działalności β -glukozydazy, następuje rozszczepienie jednostki celobiozy. Często β -glukozydazy związane z powierzchnią komórek mikroorganizmów celulolitycznych hydrolizują celobiozę do glukozy, przed lub w trakcie transportu do wnętrza komórki. Efektem końcowym złożonego procesu degradacji cząsteczki celulozy jest powstanie jednostek glukozy, wykorzystywanej w dalszych procesach biochemicznych [13, 87].

Mimo, iż podział celulaz na podstawie rodzaju aktywności enzymatycznej jest dosyć czytelny to coraz częściej okazuje się niewystarczający. Niektóre enzymy zdolne są do działania zarówno, jako endo- i egzoglukanazy, co wskazuje, że sposób degradacji może być niezależny od homologii sekwencji i struktury [3, 75].

Systematyka enzymów celulolitycznych jest dość problematyczna. Początkowo podstawowym kryterium klasyfikacji enzymów celulolitycznych, przyjętym przez Komisję Enzymatyczną (EC) i Komitet Nazewnictwa Międzynarodowej Unii Biochemii i Biologii Molekularnej (IUB), był typ substratu i sposób, w jaki dany enzym oddziałuje z podłożem. Enzymy te pogrupowano zgodnie z reakcjami, jakie one katalizowały np. celulazy, ksylanazy, chitynazy. Klasyfikacja taka była niewystarczająca [3]. Innym, sposobem na uporządkowanie celulaz, jest podział na podstawie podobieństwa sekwencji aminokwasowej. Zazwyczaj istnieje zależność między sekwencją aminokwasową, pofałdowaniem enzymu i strukturą trzeciorzędową białka. Klasyfikacja ta jest aktualizowana, jednak ze względu na dużą liczbę badanych i odkrywanych hydrolaz są problemy z bieżącą aktualizacją [11, 32]. W bieżącej aktualizacji

z 2001 roku hydrolazy glikozydowe są pogrupowane w 86 rodzin. Taki system klasyfikacji zapewnia cenne informacje i uzupełnia dane zgromadzone przez IUB. Henrissat i wsp. w 1998 opracowali i zaproponowali inną systematykę dla hydrolaz, w którym pierwsze trzy litery oznaczają pożądaną i najbardziej korzystny substrat, kolejne cyfry mają wyznaczać rodzinę hydrolaz i kolejne litery oznaczają kolejność, w której celulazy po raz pierwszy opisano [33]. Przykładem mogą być enzymy występujące u *Trichoderma reesei*: CBHI, CBHII i EGI, które są odpowiednio oznaczone Cel7A (CBHI), Cel6A (CBHII) i Cel6B (EGI). W przypadku, gdy występuje więcej niż jedna domena katalityczna w enzymie, to również przekłada się na nazwy, takie jak Cel9A – Cel48A dla dwóch domen katalitycznych celulazy CelA z *Caldocellulosiruptor saccharolyticus*. System ten jednak zawiera pewne wady np: brak stabilności i wahania, co do zaproponowanej nomenklatury oraz brak specyficzności substratowej dla egzo- i endoglukanaz, w związku, z czym system ten nie jest jeszcze w pełni akceptowany [53].

4.2. Zasady funkcjonowania wolnych i skompleksowanych enzymów celulolitycznych

Pierwszą strategią hydrolizy celulozy jest produkcja różnorodnych wolnych enzymów, które nie tworzą stabilnych kompleksów o wysokiej masie cząsteczkowej. Ten sposób wykorzystują najczęściej grzyby nitkowate oraz promieniowce. Strzępki i komórki drobnoustrojów przenikają przez kapilary i pory materiału celulozowego, penetrując podłoże udostępniając cząsteczkę celulozy, bezpośrednio produkowanym i dostarczanym enzymom [15].

Przykładem produkcji systemu wolnych enzymów jest *T. reesei* (forma telomorficzna: *Hypocrea jecorina*), która była przedmiotem badań przez około 50 lat [71, 56]. Grzyb ten wytwarza, co najmniej pięć endoglukanaz, dwie egzoglukanazy (celobiohydrolazy) oraz dwie β -glukozydazy. Wytwarzane celobiohydrolazy stanowią 80% całkowitej ilości białek systemu enzymów celulolitycznych [98]. Niektóre endoglukanazy mają szeroką specyficzność substratową np. aktywność dla ksylanazy [44]. W przypadku endoglukanaz, w odróżnieniu od egzoglukanaz, obecność CBM nie jest niezbędna dla aktywności tych enzymów. Istotnym czynnikiem dotyczącym zasady działania wszystkich wolnych enzymów jest obecność celobiozy, która hamuje działanie endoglukanaz i egzoglukanaz [35]. Dlatego tak ważna jest obecność, co najmniej dwóch β -glukozydaz, które warunkują rozkład celobiozy oraz innych krótkich oligosacharydów do glukozy. Część β -glukozydaz, która została wyizolowana z hodowli *T. reesei* pozostawała związana ze ścianą komórkową grzyba, co prawdopodobnie ograniczała straty w transporcie glukozy do

wnętrza komórki [58, 90]. β -glukozydazy są produkowane przez *T. reesei* na stosunkowo niskim poziomie w porównaniu do innego grzyba *Aspergillus* sp. Działalność ich jest hamowana przez glukozę, podczas gdy te z gatunku *Aspergillus* są bardziej tolerancyjne na obecność monocukru [72, 95]. Celulazy z *T. reesei* oraz z *Aspergillus* są najczęściej stosowanymi preparatami używanymi do rozkładu i utylizacji celulozy [72]. U innego przedstawiciela grzybów – *Phanerochaete chrysosporium* zaobserwowano, że oprócz produkcji wielu wolnych enzymów, które mogą być wzajemnymi homologami bądź homologami białek pochodzących z innych gatunków, produkuje on dehydrogenazę celobiozy. Enzym ten redukuje chinony w obecności celobiozy lub laktozy, ale nie wykazuje tej zdolności w obecności glukozy [31, 91]. Biologiczna funkcja tego enzymu nie została wyjaśniona, lecz jego wiązanie do celulozy krystalicznej oraz zdolność enzymu do wytwarzania wolnych rodników, zwiększa proces jej degradacji. Ponadto może pomóc w depolimeryzacji celulozy i ligniny [31].

W przypadku celulolitycznych bakterii tlenowych produkujących wolne enzymy, najbardziej poznanymi są *Cellulomonas* i *Thermobifida*. *Cellulomonas* wytwarza, co najmniej sześć endoglukanaz oraz jedną egzoglukanazę [9]. Natomiast z ciepłolubnej nitkowatej bakterii *Thermobifida* występującej w glebie, wyizolowano sześć celulaz: trzy endoglukanazy, dwie egzoglukanazy oraz nietypową celulazę mającą właściwości zarówno endoglukanazy i egzoglukanazy [39].

Drugim sposobem rozkładu celulozy, wykorzystywanym najczęściej przez bakterie beztlenowe, jest budowa kompleksu enzymów tzw. celulosomów. Prawdopodobnie spowodowane jest to brakiem zdolności przenikania bakterii do materiału celulozowego, wysoką konkurencyjnością ze strony innych mikroorganizmów oraz ograniczoną dostępnością energii w postaci ATP. Zaletą tej strategii jest silny synergizm pomiędzy celulazami zawartymi w celulosomach oraz kontakt komórki bakteryjnej z degradowaną cząsteczką celulozy, a w konsekwencji ułatwiony transport produktów hydrolizy do wnętrza komórki [3, 53, 80].

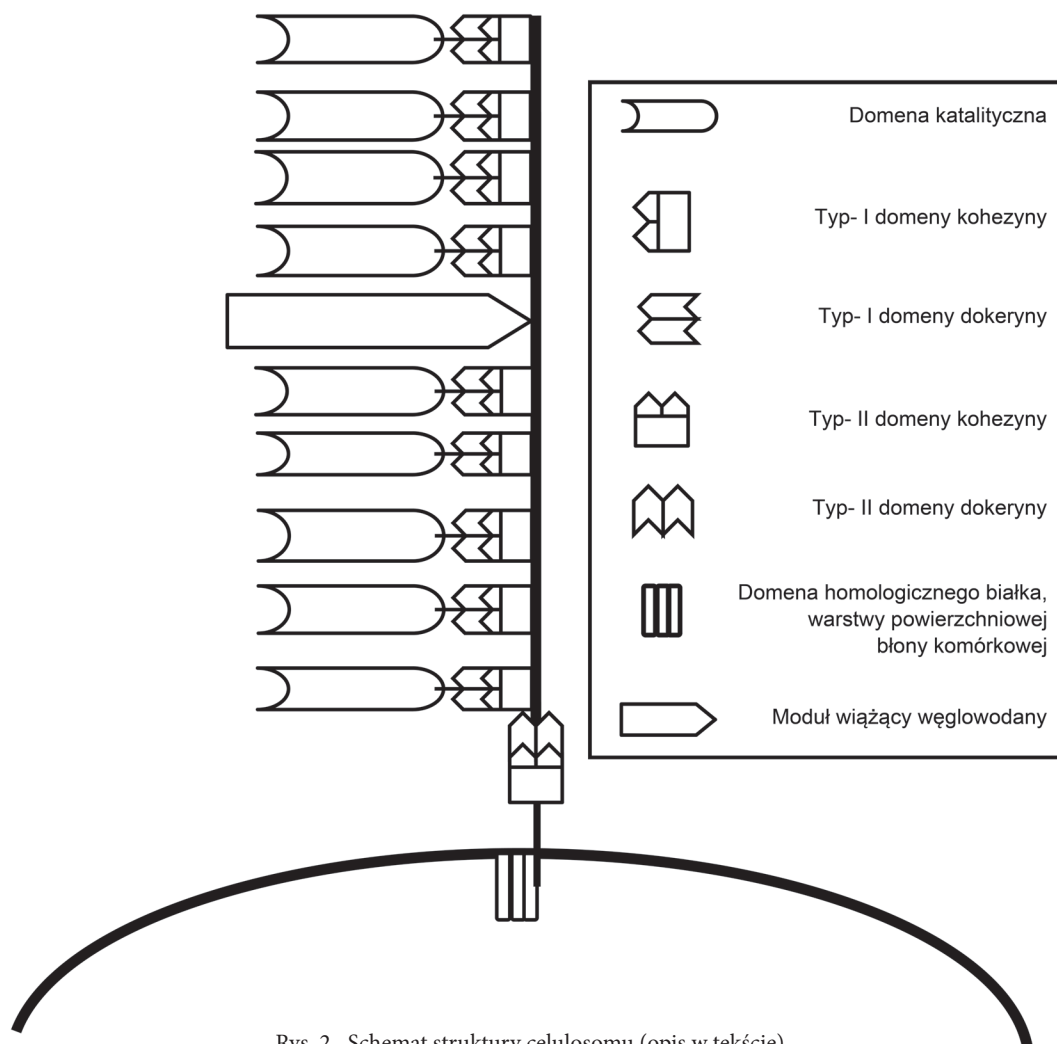
Wielkość celulosomów może wahać się od 2 do 16 MDa. Wysoka zawartość grup glikozyłowych na powierzchni celulosomów (od 6 do 13% zawartości węglowodanów), chroni przed szkodliwym działaniem innych enzymów takich jak proteazy, a także ma wpływ na wiązania kohezyny-dokeryny [53].

Dzięki połączeniom technik biochemicznych, immunochemicznych, badań ultrastrukturalnych i genetycznych możliwym stało się poznanie ich struktury. Wykazano, że struktura celulosomu przypomina pięść, która otwiera się w kontakcie z celulozą. Celulosomy tworzą wypukłości ściany bakteryjnej. Są one stosunkowo silnie z nią związane, ale na tyle elastycznie, aby

równie silnie przylegać do celulozy mikrokrystalicznej [53]. Pomiędzy celulosomem, a ścianą komórkową jest przestrzeń zapewniająca kontakt z wnętrzem komórki. Dzięki temu możliwy jest transport powstałych produktów do wnętrza komórki ograniczając tym samym dyfuzję do środowiska zewnętrznego [3, 80]. Struktura celulosomów jest podobna u większości bakterii, choć w zależności od gatunku mogą występować drobne różnice. Po raz pierwszy budowa tych kompleksów została opisana w 1983 roku u beztlenowca *C. thermocellum* [46]. Celulosomy występują także u innych laseczek z rodzaju *Clostridium* (np. *C. cellulolyticum*, *C. cellulovorans*, *C. perfringens*, *C. josui*) oraz bytujących w żwaczu bydła – *Ruminococcus albus*, *Fibrobacter succinogenes*. Termofilne *Thermotoga* i *Caldicellulosiruptor*, produkują termostabilne kompleksy enzymów hydrolitycznych o budowie domenowej i charakterze multikatalitycznym. Tak zwane „megazymy” mogą zawierać różnorodne celulazy i hemicelulazy, różniące się rozmieszczeniem i budową domen katalitycznych [14, 53]. Ponadto, występowanie celulosomów zaobserwowano również u niektórych gatunków grzybów beztlenowych: *Neocallimastix* i *Piromyces* [19, 48].

Przykładowa budowa celulosomu została opisana na podstawie kompleksów wyizolowanych z *C. thermocellum*. Celulosomy składają się z dużego niekatalitycznego białka (197 kDa) – skafoldyny (CipA), które jest zbudowane z wielu domen i obejmuje dziewięć kohezyn, cztery moduły hydrofilowe oraz moduł wiążący węglowodany (CBM). Skafoldyna jest przymocowana do ściany komórkowej przy pomocy domeny kohezyny typu II. Kompleksy enzymatyczne mogą zawierać nawet 22 rodzaje enzymów z czego co najmniej dziewięć wykazuje aktywność endoglukanazy (CelA, CelB, CelD, CelE, CelF, CelG, CelH, CelN i CelP), cztery aktywność egzoglukanazy (CbhA, CelK, CelO, CelS), 5 aktywność hemicelulaz (XynA, XynB, XynV, XynY, XynZ), jeden aktywność chitynaz (ManA), oraz jeden o aktywności lichenazy (LicB). Wszystkie moduły zawierają dokeryny umożliwiające wiązanie się z kohezyną białka skafoldyny tworząc w ten sposób jednolitą strukturę celulosomu. Schemat organizacji celulosomu przedstawiono na Rys. 2.

Układ modułów katalitycznych w skafoldynie, ich skład, synergiczne działanie są wciąż słabo poznane. Zakłada się, że skład celulosomu może się zmieniać, a domeny katalityczne nie wiążą się ze specyficznymi kohezynami. Można jedynie domniemywać o ich korzystnych relacjach zbliżeniowych [53, 4]. Główną endoglukanazą w celulosomie jest CelA, natomiast główną egzoglukanazą zawsze występującą w celulosomie jest CelS. Białko CelS jest aktywne wobec mikrokrystalicznej i amorficznej celulozy z wykluczeniem karboksymetylocelulozy. Produktem funkcjonowania CelS jest celobioza, która na zasadzie sprzężenia zwrot-



Rys. 2. Schemat struktury celulosomu (opis w tekście)

nego działa hamująco na jej aktywność [43]. Wyjątkowość i efektywność celulosomu wynika między innymi: (i) ze zdolności jednoczesnego działania endoglukanaz wewnątrz łańcucha celulozy, (ii) aktywności egzoglukanaz działających w przeciwnych kierunkach na ich końcach, przymocowanych do białka skafoldyny, (iii) odpowiednim stosunku pomiędzy katalitycznymi domenami, które optymalizują synergizm między nimi, (iv) odpowiednimi odstępami między poszczególnymi składnikami celulosomu, oraz (v) obecności wielu różnych enzymów w tym chitynaz i hemicelulaz, które umożliwiają rozkład innych składników ścian komórkowych roślin [53].

Niektóre elementy i właściwości celulosomów, poszczególnych gatunków bakterii są zadziwiająco podobne, co może świadczyć, że geny kodujące te kompleksy mogą być przenoszone za pomocą horyzontalnego transferu genów i mogą pochodzić od wspólnego przodka. Wykazano, że niecelulolityczny *C. acetobutylicum* zawiera geny kodujące składniki celulosomu i ich odpowiednia aktywacja umożliwia hydrolizę karboksymetylocelulozy [86].

4.3. Biologia molekularna oraz inżynieria genetyczna celulaz

Dotychczasowe badania molekularne nad enzymami celulolitycznymi mikroorganizmów pozwoliły na ustalenie pewnych informacji dotyczących organizacji genów, regulacji produkcji oraz duplikacji i horyzontalnego transferu genów.

Zarówno w przypadku grzybów jak i bakterii geny kodujące celulazy znajdują się na chromosomie [88]. Geny te są rozłożone losowo jak w przypadku np. *C. thermocellum* lub skupione w genomie (np. u *C. cellolyticum*, *C. cellulovorans*, *C. acetobutylicum*) [6, 28].

Duża liczba homologicznych genów kodujących celulazy, u mikroorganizmów celulolitycznych, powiązanych ze sobą lub występujących w tym samym środowisku (np. żwacz), sugeruje, że rearanżacje genów chromosomowych oraz horyzontalny transfer genów, przyczynił się do obecnego bogatego spektrum systemów celulaz [53]. Przykładem mogą być geny kodujące celobiohydrolazy (Cel7D) w genomie *P. chrysosporium* oraz wysoce homologiczne geny kodujące celulazy CelK i CbhA w genomie

C. thermocellum [10, 101]. Ponadto wykazano, że powstawanie celulaz z tej samej rodziny w obrębie gatunku, lecz o różnej aktywności, takich jak endoglukanaza – Cel6B i celobiohydrolaza – Cel6A w genomie *T. reesei*, może być spowodowane duplikacją genów i następczym różnicowaniu ich specyficzności w zależności od podłoża, na którym występował gatunek [53].

Na podstawie badań genomów stwierdzono, że grzyby beztlenowe nabyły geny kodujące enzymy celulolityczne od bakterii. Potwierdza to brak intronów w genach hydrolaz glikozydowych grzybów beztlenowych oraz bakterii. Zjawisko to tłumaczy się wysokim zagęszczeniem komórek oraz bliskością między komórkami bakterii i grzybów występujących w zwacu. Grzyby tlenowe w sekwencjach kodujących geny hydrolaz glikozydowych zawierają już takie introny [24, 63].

Regulacja ekspresji genów oraz produkcja celulaz zależy od podłoża, na jakim występują drobnoustroje. Enzymy celulolityczne produkowane są tylko w obecności substratu (celuloza), a hamowane, gdy dostępne są monosacharydy łatwo nadające się do wykorzystania np. glukoza [81]. Celobioza, δ -celobiozo-1,5-lakton i inne utlenione produkty hydrolizy celulozy (nawet ksylobioza w wyniku hydrolizy ksylanu) nie zostały wykluczone, jako naturalne induktory. Celobioza może funkcjonować zarówno, jako induktor jak i inhibitor przy jej wysokim stężeniu [44]. Ekspresja genów celulaz *T. fusca* regulowane są na poziomie transkrypcji i ulegają indukcji w obecności celobiozy oraz represji katabolicznej w obecności glukozy. Represorem jest białko CelR, które hamuje produkcję celulaz w przypadku braku celulozy lub celobiozy. Celobioza działa, jako induktor, a także unieszkodliwia CelR, co ułatwia jego oddysocjowanie od promotora, pozwalając na transkrypcję genów enzymów z tych promotorów. W przypadku braku celobiozy i obecności w podłożu glukozy, białko CelR blokuje promotor, co uniemożliwia transkrypcję tych genów [84].

Rozwój badań genetycznych oraz postęp technik molekularnych, skłonił naukowców do modyfikacji istniejących enzymów, wykorzystując narzędzia inżynierii genetycznej. Głównym celem i założeniem, była poprawa efektywności, wydajności i aktywności istniejących enzymów. Pomimo szerokiego spektrum izolowanych celulaz bądź mikroorganizmów celulolitycznych, dotychczas żadne nie spełniają wszystkich wymagań procesu przemysłowego. Jednakże enzymy te, są dobrym punktem wyjścia do poprawy ich aktywności oraz zastosowaniu w mikrobiologii przemysłowej. Istnieją dwie główne metody umożliwiające modyfikacje enzymów: (i) świadome i ukierunkowane projektowanie enzymów dzięki mutagenzie oraz (ii) ukierunkowana ewolucja celulaz.

Racjonalne projektowanie enzymów oparte jest na odpowiednim wyborze modyfikowanego enzymu,

wskazania miejsc aminokwasów, które mają podlegać zmianom oraz charakterystyce mutantów. Użycie tej metody wymaga dokładnej znajomości sekwencji aminokwasów w miejscu aktywnym białka oraz zależności struktury białka od funkcji. Wiedza ta pozwala na zmiany w sekwencji genów kodujących aminokwasy, będące częścią miejsca aktywnego i ostatecznie na zmianę struktury białka, a nawet wymianę całych domen takiego białka [69]. Zmiany w sekwencji można uzyskać poprzez ukierunkowaną mutagenezę typu non-sens, insercje, bądź obcinanie fragmentów genów.

W przeciwieństwie do ukierunkowanego projektowania i konstrukcji enzymów, drugi sposób oparty jest na ewolucji enzymów, selekcji naturalnych białek i rozwoju pożądanych cech celulaz. Najczęściej stosowanymi technikami są podatne na błędy epPCR (Error-prone Polymerase Chain Reaction) i tasowanie fragmentów DNA (DNA shuffling). Metody te powodują powstanie różnych mutacji punktowych, w losowych miejscach (epPCR), generowanie dużej biblioteki wariantów wielu kopii genów kodujących jedno białko, ale nieznacznie różniących się pomiędzy sobą. Metoda wykorzystująca „ukierunkowaną ewolucję” ma tą przewagę, że jest niezależna od struktury enzymów i interakcji między enzymem i substratem. Głównym wyzwaniem jest jednak opracowanie technik do oznaczania wydajności i selekcji mutantów. Przykłady niektórych enzymów celulolitycznych poddanych modyfikacjom zostały przedstawione w tabeli III.

5. Ekologiczny i praktyczny aspekt utylizacji celulozy

Różnorodne środowiska, w których celuloza jest powszechnie dostępna, sprzyjały rozwojowi wielu sposobów utylizacji celulozy przez mikroorganizmy. Dostępność wody, tlenu, potencjał redoks, zmiany temperatury i składników odżywczych to główne czynniki, które wpływały na zróżnicowanie oraz istotną ewolucję tych strategii [53].

W glebach, celuloza jest dostępna przede wszystkim w postaci ściółki, która jest stosunkowo oporna na rozkład, ze względu na wysoki stopień polimeryzacji lignin. Braki azotu w postaci dostępnych aminokwasów, białek i innych składników odżywczych stymulujących wzrost mikroorganizmów, pozwoliły na dominację grzybów w tych środowiskach [52]. Grzyby opracowały strategię degradacji materiału ligninocelulozowego opartą na wytwarzaniu zewnątrzkomórkowych enzymów celulolitycznych i ligninowych produkowanych w obecności aktywnych cząsteczek tlenu. Podobną strategię odnotowuje się również u niektórych bakterii z rodzaju *Cytophyga*, *Bacillus* i *Cellulomonas* [92].

W środowisku wodnym, dominującą grupą mikroorganizmów celulolitycznych są bakterie. W warstwach

Tabela III
Przykłady modyfikacji genetycznych niektórych enzymów celulolitycznych

Gatunek bakterii	Modyfikowany enzym	Zmiany właściwości	Metoda	Literatura
Ukierunkowana mutanogeneza				
<i>Acidothermus cellulolyticus</i>	Endoglukanaza	rodzaj uwolnionego produktu	ukierunkowana mutacja	[73]
<i>Acidothermus cellulolyticus</i>	Endoglukanaza	redukcja inhibicji enzymu przez produkt	ukierunkowana mutacja	[2]
<i>Pectobacterium chrysanthami</i>	Endoglukanaza	aktywność	mutacja nonsens	[51]
<i>Pectobacterium chrysanthami</i>	Endoglukanaza	aktywność	obcięcie insercji	[67]
<i>Thermobifida fusca</i>	Procesualna endoglukanaza	aktywność	ukierunkowana mutacja	[16]
<i>Thermotoga maritima</i>	Endoglukanaza	aktywność	ukierunkowana mutacja, inżynieria CBD	[54]
Ukierunkowana ewolucja				
<i>Agrobacterium</i> sp.	zmutowana α -glukozydaza	aktywność	epPCR	[42]
<i>Bacillus subtilis</i>	Endoglukanaza	aktywność	tasowanie DNA	[41]
<i>Clostridium cellulovorans</i>	Endoglukanaza	termiczna stabilność	tasowanie rodzin	[64]
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	α -D-glukozydaza	termiczna stabilność	epPCR	[26]
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	α -D-glukozydaza	termiczna stabilność	epPCR + tasowanie rodzin	[1]
<i>Pyrococcus furiosus</i>	α -glukozydaza	aktywność	tasowanie rodzin	[40]
<i>Thermotoga neapolitana</i>	α -D-glukozydaza	aktywność	epPCR	[57]

osadu detrytusu panują głównie warunki z ograniczonym dostępem tlenu, dlatego bakterie beztlenowe wykształciły ekonomiczną strategię wychwytywania produktów hydrolizy celulozy a ich enzymy celulolityczne występują w formie kompleksów (celulosomów) [53]. Podobnym środowiskiem jest przewód pokarmowy zwierząt roślinożernych, gdzie panują trudne warunki beztlenowe z wysoką konkurencją innych mikroorganizmów oraz enzymów gospodarza. Dodatkowym ograniczeniem jest czas przejścia materiału przez układ pokarmowy żywiciela. Mikroorganizmy musiały, więc zoptymalizować swój czas regeneracji oraz wyspecjalizować czynniki ochronne przed enzymami gospodarza.

Przeprowadza się wiele badań oraz izolacji drobnoustrojów celulolitycznych i ich enzymów, ze środowisk ekstremalnych (temperatura, zasolenie itp.). Przykładem może być *Paenibacillus campinasensis* BL11, szczep o właściwościach celulolitycznych, wyizolowany w 2006 roku z czarnego ługu w procesie roztwarzania Krafta. Warunki tam panujące są silnie alkaliczne, więc zdecydowanie niekorzystne dla wzrostu bakterii. Izolacja mikroorganizmów celulolitycznych o szerokim zakresie tolerancji na pH może być dodatkowym atrybutem podczas zaburzonych warunków wzrostowych dla mikroorganizmów w trakcie wstępnej obróbki ligninocelulozy [26]. Z gorących źródeł termalnych wyizolowano, termostabilny szczep *Bacillus subtilis* DR wykazujący 70% swojej aktywności celulolitycznej nawet w 75°C [49]. Inny termofilny gatunek *Brevibacillus* sp. JXL wyizolowany z rolniczych odpadów hodowli

trzody chlewnej, charakteryzuje się wysokim spektrum substratów takich jak krystaliczna celuloza, CMC, ksyłan, celobioza, glukoza i ksyloza. Enzymy tego szczepu były aktywne przez 1 godzinę nawet w 100°C [50].

W przyrodzie utylizacja i wykorzystanie celulozy prowadzone są głównie przez wiele celulolitycznych oraz niecelulolitycznych drobnoustrojów. Mikroorganizmy w takich konsorcjach często konkurują o związki odżywcze, ale wiele z nich również współpracuje na zasadzie komensalizmu, protokooperacji lub syntrofii. Komensalizm, czyli współzależność, w wyniku, której jeden z gatunków czerpie wyraźne korzyści, polega głównie na przeprowadzeniu przez mikroorganizmy celulolityczne substratów, nieprzyswajalnych przez partnera (ligninoceluloza), w produkty, które już może wykorzystać, jako składniki odżywcze (glukoza). W przypadku protokooperacji interakcja międzygatunkowa charakteryzuje się czerpaniem obustronnych korzyści przez organizmy, lecz nie jest wymagana do egzystencji monokultur tych drobnoustrojów. Polega głównie na wzajemnym dostarczaniu związków odżywczych, w tym metabolitów wtórnych (np. witamin), przetwarzaniu białek oraz rozkładzie złożonych węglowodanów.

Syntrofia w procesie metanogenezy opiera się na ścisłej współpracy różnych grup mikroorganizmów w procesie katabolizmu beztlenowego. Metan jest produkowany przez archeony metanogenne w procesie redukcji dwutlenku węgla lub octanu wodorem powstałym w fermentacji związków organicznych (takich jak maślan, propionian, mrówczan, etanol). Praktycznie

Tabela IV
Przykłady interakcji mikroorganizmów celulolitycznych i niecelulolitycznych

Mikroorganizmy		Substrat	Warunki hodowli	Efekt kooperacji	Literatura
celulolityczne	niecelulolityczne				
<i>Clostridium thermocellum</i>	<i>Methanobacterium thermautotrophium</i>	Mikrokrystaliczna celuloza/celobioza	Hodowla wsadowa, 60°C	Zwiększona szybkość degradacji celulozy; zmiany produktu końcowego z etanolu na metan	[96]
	<i>C. thermosaccharolyticum</i>	Solka Floc	Hodowla wsadowa,	3-krotny wzrost wydajności produkcji etanolu	[65]
	<i>C. thermohydrosulfuricum</i>	Celuloza	Hodowla wsadowa, 60°C	Zwiększona szybkość degradacji celulozy	[62]
	<i>C. thermohydrosulfuricum</i>	Wytłoki z Osiki	Hodowla wsadowa, 60°C	Zwiększona produkcja etanolu	[94]
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	<i>Selenomonas ruminantium</i>	Celuloza	Hodowla wsadowa, 60°C	Zwiększona degradacja celulozy, konwersja bursztynianu do propionianu	[77]
<i>Ruminococcus albus</i>	<i>Methanobrevibacter smithii</i>	Mikrokrystaliczna celuloza	Hodowla ciągła, 37°C	Metanogeneza dzięki międzygatunkowym interakcjom mikroorganizmom wodorowym	[68]
<i>F. succinogenes</i> lub <i>Ruminococcus flavefaciens</i>	<i>Prevotella ruminicola</i>	Trawa kupkówka pospolita lub lucerna	Hodowla wsadowa, 38°C	Zwiększony stopień rozkładu celulozy	[23]
<i>F. succinogenes</i> / <i>Buytrivibrio fibrisolvens</i>	<i>Treponema bryantii</i>	Słoma jęczmienna	Hodowla wsadowa, 39°C	Zwiększenie szybkości trawienia słomy jęczmiennej, ale nie czystej celulozy	[45]
<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Clostridium butyricum</i>	Celuloza	Hodowla	Produkty hydrolizy tlenowej celulozy wykorzystywane przez beztlenowe <i>Clostridium</i> sp. wiążące N ₂	[93]
<i>Cellulomonas flavigena</i>	<i>Azospirillum brasilense</i>	Filtr papierowy, słoma pszenicy	Hodowla wsadowa, 30°C	Fizyczne oddziaływania bakterii degradujących celulozę z wiążącym azotem <i>Azospirillum</i>	[30]
<i>Cellulomonas flavigena</i>	<i>Xanthomonas</i> sp.	Wytłoki z trzciny cukrowej	Hodowla ciągła, 30–40°C	Wydajniejszy wzrost w wspólhodowli niż w monokulturze	[70]

wszystkie związki organiczne mogą być ostatecznie przekonwertowane w metan, w wyniku syntrofii bakterii fermentacyjnych i metanogenów. Konsumentami produkowanego wodoru mogą być wspomniane metanogeny, ale także, obecne bakterie homoacetogenne i bakterie redukujące siarczany. Procesy fermentacyjne i produkcja metanu muszą pozostawać w równowadze gdyż nadmierne gromadzenie w hodowli produktów fermentacji, w tym wodoru może być toksyczne dla różnych grup mikroorganizmów przeprowadzających proces fermentacji metanowej [22, 60]. Przykładowe wyniki prowadzonych badań nad interakcjami mikroorganizmów celulolitycznych oraz niecelulolitycznych przedstawione są w tabeli IV.

W hodowli mikroorganizmów, stosowanej w procesie utylizacji ligninocelulozy na ogół otrzymuje się mieszaninę produktów, które mogą zawierać glukozę, kwas octowy, dwutlenek węgla. W obecności innych grup drobnoustrojów ich różnorodność, może zostać zredukowana do ostatecznych produktów. W zależności

od grupy fizjologicznej prokariotów wchodzących w skład zespołu mikroorganizmów (beztlenowe bakterie fermentacyjne, archeony metanogenne) ostatecznymi produktami mogą być: etanol i metan wchodzący w skład wartościowego biogazu. Proces metanogenezy jest powszechnie stosowany w oczyszczalniach ścieków, w celu wytworzenia biogazu, aby zrównoważyć koszt pracy oczyszczalni [36, 59, 89].

Zastosowanie enzymów oraz drobnoustrojów celulolitycznych (również tych modyfikowanych genetycznie) może mieć ogromny wpływ na poprawę efektywności hydrolizy, co za tym idzie zoptymalizowaniu oraz obniżeniu kosztów produkcji biopaliw.

Biopaliwa, w obecnej chwili mogą być najważniejszymi alternatywnymi źródłami energii. W biotechnologii wyróżnia się dwie możliwości otrzymywania paliw z biomasy ligninocelulozowej. Pierwszy proces SHF (Separate Hydrolysis and Fermentation), oparty jest na oddzielnych etapach hydrolizy oraz fermentacji. Substraty są degradowane przez enzymy celuloli-

tyczne, hemicelulolityczne, ligninolityczne w wyniku hydrolizy, a następnie produkty te ulegają przemianom biochemicznym do ostatecznych produktów np. do metanu. Drugi proces tzw. „skonsolidowany bioprocessing” (CBP, Consolidated Bioprocessing), oparty jest na połączeniu dwóch wymienionych etapów, w jeden nierozłączny proces przeprowadzany w jednym bioreaktorze. Obecnie wciąż poszukuje się takich bakterii, które efektywnie radziłyby sobie zarówno z procesem hydrolizy jak i fermentacji. W tym celu próbuje się stosować metody inżynierii genetycznej. Proces „skonsolidowanego bioprocessingu” boryka się z dwoma głównymi problemami. Pierwszy z nich to optymalna temperatura dla hydrolizy biomasy ligninocelulozowej (ok. 30°C) oraz fermentacji (w przypadku fermentacji metanowej – 37°C). Drugi problem polega na utrzymaniu stabilnej struktury mikroorganizmów tlenowych i beztlenowych, umożliwiającą kontrolę przebiegu procesów biochemicznych przeprowadzanych przez dane grupy mikroorganizmów i prowadzących do powstawania wartościowych biopaliw w procesie przemysłowym.

6. Podsumowanie

Istnieje ogromna ilość odpadów o niskiej wartości lub też materiałów lignocelulozowych, które są zwyczajowo marnowane. Wykorzystanie materiałów lignocelulozowych, takich jak pozostałości rolniczych, przemysłowych, traw, odpadów leśnych, jak również roślin energetycznych, może znacznie przyczynić się do poprawy bioenergetyki w skali światowej. Dzięki mikroorganizmom celulolitycznym możliwe jest wykorzystanie zgromadzonych zapasów energii i ich biokonwersja w użyteczne źródła energii [97].

Procesem kluczowym, często limitującym szybkość biokonwersji, jest właśnie reakcja hydrolizy materiału ligninocelulozowego. W celu ułatwienia szybkiej i skutecznej degradacji ligninocelulozy wymagana jest wstępne przygotowanie biomasy. Alternatywą dla znanych metod fizycznych i chemicznych, są metody biologiczne wykorzystujące aktywność mikroorganizmów, głównie grzybów i bakterii, produkujących enzymy celulolityczne.

Izolowane drobnoustroje celulolityczne różnią się m.in budową i postacią występowania enzymów, szybkością i zakresem aktywności celulolitycznej, aktywnością pomocniczych enzymów oraz losami produktów powstałych podczas hydrolizy materiału ligninocelulozowego. Wspomniane wyżej mutualistyczne interakcje mikroorganizmów celulolitycznych z niecelulolitycznymi mają znaczące konsekwencje w środowisku naturalnym oraz w procesach wykorzystywanych przez człowieka.

Równoczesny proces utylizacji celulozy oraz metanogenezy bądź fermentacji alkoholowej prowadzony przez liczne drobnoustroje, prowadzi do otrzymania biogazu i bioetanolu.

Wiedza na temat utylizacji celulozy, enzymów i mikroorganizmów celulolitycznych a także znajomość zachodzących procesów biochemicznych, stwarza szerokie możliwości dotyczące rozwoju oraz optymalizacji procesów pozyskiwania ekologicznej energii.

Podziękowania

Artykuł powstał w ramach programu Projektu Badań Stosowanych NCBR nr 177481 pt. „Optymalizacja pracy dwustopniowego reaktora do wytwarzania wysokometanowego biogazu – opracowanie biostarterów i biomarkerów fermentacji metanowej”.

Piśmiennictwo

1. Arrizubieta M.J, Polaina J.: Increased thermal resistance and modification of the catalytic properties of a beta-glucosidase by random mutagenesis and *in vitro* recombination. *J. Biol. Chem.* **275**, 28843–28848 (2000)
2. Baker J.O., McCarley J.R., Lovett R., Yu C.H., Adney W.S., Rignall T.R., Vinzant T.B., Decker S.R., Sakon J., Himmel M.E.: Catalytically enhanced endocellulase Cel5A from *Acidothermus cellulolyticus*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* (**121–124**), 129–140 (2005)
3. Bayer E.A., Chanzy H., Lamed R., Shoham Y.: Cellulose, cellulases and cellulosomes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 548–557 (1998)
4. Beguin P., Alzari P.M.: The cellulosome of *Clostridium thermocellum*. *Biochem. Soc. Trans.* **26**, 178–185 (1998)
5. Beguin P., Aubert J.P.: The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol. Rev.* **13**, 25–58 (1994)
6. Belaich J.P., Belaich A., Fierobe H.P., Gal L., Gaudin C., Page's S., Reverbel-Leroy C., Tardif C.: The cellulolytic system of *Clostridium cellulolyticum* (W) Genetics, biochemistry and ecology of cellulose degradation. red. K. Ohmiya, K. Hayashi, K. Sakka, Y. Kobayashi, S. Karita, T. Kimura *Uni Publishers*, Tokyo, 1999 s. 479–487
7. Carlile, M.J., Watkinson S.C.: The fungi, *Academic Press*, New York, N.Y. 269275 (1997)
8. Carpita, N.C., Gibeaut D.M.: Structural models of primary cell walls in flowering plants: Consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* **3**, 1–30 (1993)
9. Chaudhary P., Kumar N.N., Deobagkar D.N.: The glucanases of *Cellulomonas*. *Biotechnol. Adv.* **15**, 315–331 (1997)
10. Covert S.F., Bolduc J., Cullen D.: Genomic organization of a cellulase gene family in *Phanerochaete chrysosporium*. *Curr. Genet.* **22**, 407–413 (1992)
11. Coutinho P.M., Henrissat B.: The modular structure of cellulases and other carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach (W) Genetics, biochemistry and ecology of cellulose degradation, red. K. Ohmiya, K. Hayashi, K. Sakka, Y. Kobayashi, S. Karita, T. Kimura, *Uni Publishers Co.*, Tokyo, 1999 s. 15–23
12. Davies G., Henrissat B.: Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* **3**, 853–859 (1995)
13. Din N., Damude H.G., Gilkes N.R., Miller R.C., R. Warren A.J., Kilburn D.G.: C1-Cx revisited: intramolecular synergism in a cellulase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 11383–11387 (1994)

14. Ding S.Y., Rincon M.T., Lamed R., Martin J.C., McCrae S.I., Aurilia V., Shoham Y., Bayer E.A., Flint H.J.: Cellulosomal scaffoldin-like proteins from *Ruminococcus flavefaciens*. *J. Bacteriol.* **183**, 1945–1953 (2001)
15. Eriksson K.E.L., Blanchette R.A., Ander P.: Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components, Springer-Verlag, New York, N.Y. 1990
16. Escovar-Kousen J.M., Wilson D., Irwin D.: Integration of computer modeling and initial studies of site-directed mutagenesis to improve cellulase activity on Cel9A from *Thermobifida fusca*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **113–116**, 287–297 (2004)
17. Fan, L.T., Lee Y.H., Beardmore D.H.: Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose: effects of major structural features of cellulose on enzymatic hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.* **22**, 177–199 (1980)
18. Fan, L.T., Gharpuray, M.M., Lee, Y.H.: Cellulose Hydrolysis Biotechnology Monographs 57, Springer, Berlin, 1987
19. Fanutti C., Ponyi T., Black G.W., Hazlewood G.P., Gilbert H.J.: The conserved noncatalytic 40-residue sequence in cellulases and hemicellulases from anaerobic fungi functions as a protein docking domain. *J. Biol. Chem.* **270**, 29314–29322 (1995)
20. Fields, M.W., Russell J.B., Wilson D.B.: The role of ruminal carboxymethylcellulases in the degradation of β -glucans from cereal grain. *FEMS Microbiol. Ecol.* **27**, 261–268 (1998)
21. Fields M.W., Mallik S., Russell J.B.: *Fibrobacter succinogenes* S85 ferments ball-milled cellulose as fast as cellobiose until cellulose surface area is limiting. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**, 570–574 (2000)
22. Fondevila M., Dehority B.A.: Degradation and utilization of forage hemicellulose by rumen bacteria, singly and in coculture or added sequentially. *J. Appl. Bacteriol.* **77**, 541–548 (1994)
23. Fondevila M., oraz Dehority B.A.: Interactions between *Fibrobacter succinogenes*, *Prevotella ruminicola*, and *Ruminococcus flavefaciens* in the digestion of cellulose from forages. *J. Anim. Sci.* **74**, 678–684 (1996)
24. Gaudin C., Belaich A., Champ S., Belaich J.P.: CelE, a multidomain cellulase from *Clostridium cellulolyticum*: a key enzyme in the cellulosome? *J. Bacteriol.* **182**, 1910–1915 (2000)
25. Ghose T.K.: Measurement of cellulase activities. *Pure Appl. Chem.* **59**, 257–268 (1987)
26. Gonzalez-Blasco G., Sanz-Aparicio J., Gonzalez B., Hermoso J.A., Polaina J.: Directed evolution of beta -glucosidase A from *Paenibacillus polymyxa* to thermal resistance. *J. Biol. Chem.* **275**, 13708–13712 (2000)
27. Greene N.: Growing energy. How biofuels can help end America's oil dependence. Natural Resources Defense Council, New York, 2004, s. 1–86
28. Guglielmi G., Beguin P.: Cellulase and hemicellulase genes of *Clostridium thermocellum* from five independent collections contain few overlaps and are widely scattered across the chromosome. *FEMS Microbiol. Lett.* **161**, 209–215 (1998)
29. Halldorsdottir S., Thorolfsdottir E.T., Spilliaert R., Johansson M., Thorbjarnardottir S.H., Palsdottir A., Hreggvidsson G.O., Kristjansson J.K., Holst O., Eggertsson G.: Cloning, sequencing and overexpression of a *Rhodothermus marinus* gene encoding a thermostable cellulase of glycosyl hydrolase family 12. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**, 277–284 (1998)
30. Halsall D.M. oraz Goodchild D.J.: Nitrogen fixation associated with development and localization of mixed populations of *Celulomonas* sp. and *Azospirillum brasilense* grown on cellulose or wheat straw. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 849–854 (1986)
31. Henriksson G., Johansson G., Pettersson G.: A critical review of cellobiose dehydrogenases. *J. Biotechnol.* **78**, 93–113 (2000)
32. Henrissat B., Bairoch A.: Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* **316**, 695 – 696 (1996)
33. Henrissat B., Teeri T.T., Warren R.A.J.: A scheme for designating enzymes that hydrolyse the polysaccharides in the cell walls of plants. *FEBS Lett.* **425**, 352–354 (1998)
34. Hill J., Nelson E., Tilman D., Polasky S., Tiffany D.: Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **314**, 1598–1600 (2006)
35. Holtzapple M., Cognata M., Shu Y., Hendrickson C.: Inhibition of *Trichoderma reesei* cellulase by sugars and solvents. *Biotechnol. Bioeng.* **36**, 275–287 (1990)
36. Horvan B., Rieu-Lesme F., Fonty G., Gouet P.: *In vitro* interaction between rumen H₂-producing cellulolytic microorganisms and H₂-utilizing acetogenic and sulfate-reducing methanogenic bacteria. *Anaerobe*, **2**, 175–180 (1996)
37. Hu G., Heitmann J.A., Rojas O.J.: Quantification of cellulase activity using the quartz crystal microbalance technique. *Anal. Chem.* **81**, 1872–1880 (2009)
38. Ilmen M., Saloheimo A., Onnela M.L., Penttila M.E.: Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 1298–1306 (1997)
39. Irwin D.C., Spezio M., Walker L.P., Wilson D.B.: Activity studies of eight purified cellulases: specificity, synergism, and binding domain effects. *Biotechnol. Bioeng.* **42**, 1002–1013 (1993)
40. Kaper T., Lebbink J.H., Pouwels J., Kopp J., Schulz G.E., van der Oost J., de Vos W.M.: Comparative structural analysis and substrate specificity engineering of the hyperthermostable beta-glucosidase CelB from *Pyrococcus furiosus*. *Biochemistry*, **39**, 4963–4970 (2000)
41. Kim Y.S., Jung H.C., Pan J.G.: Bacterial cell surface display of an enzyme library for selective screening of improved cellulose variants. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 788–793 (2000)
42. Kim Y.W., Lee S.S., Warren R.A., Withers S.G.: Directed evolution of a glycosynthase from *Agrobacterium* sp. increases its catalytic activity dramatically and expands its substrate repertoire. *J. Biol. Chem.* **279**, 42787–42793 (2004)
43. Kruus K., Andreatchi A., Wang W.K., Wu J.H.D.: Product inhibition of the recombinant CelS, an exoglucanase component of the *Clostridium thermocellum* cellulosome. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**, 399–404 (1995)
44. Kubicek C.P., Penttila M.E.: Regulation of production of plant polysaccharide degrading enzymes by *Trichoderma*. (W) *Trichoderma* and *Glucidium*, red. G.E. Harman and C.P. Kubicek, vol. 2. Taylor & Francis Ltd., London, 1998, s. 49–72
45. Kudo H., Cheng K.J., Costerton J.W.: Interactions between *Treponema bryantii* and cellulolytic bacteria in the *in vitro* degradation of straw cellulose. *Can. J. Microbiol.* **33**, 244–248 (1987)
46. Lamed R., Setter E., Kenig R., Bayer E.A.: The cellulosome: a discrete cell surface organelle of *Clostridium thermocellum* which exhibits separate antigenic, cellulose-binding and various cellulolytic activities. *Biotechnol. Bioeng.* **13**, 163–181 (1983)
47. Lewis, N.G., and E. Yamamoto: Lignin: Occurrence, biogenesis and biodegradation. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* **41**, 455–496 (1990)
48. Li X.L., Chen H., Ljungdahl L.G.: Two cellulases, CelA and CelC, from the polycentric anaerobic fungus *Orpinomyces* strain PC-2 contain N-terminal docking domains for a cellulase-hemicellulase complex. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4721–4728 (1997)
49. Li W., Zhang W.W., Yang M.M., Chen Y.L.: Cloning of the thermostable cellulase gene from newly isolated *Bacillus subtilis* and its expression in *Escherichia coli*. *Mol. Biotechnol.* **2**, 195–201 (2008)
50. Liang Y., Yesuf J., Schmitt S., Bender K., Bozzola J.: Study of cellulases from a newly isolated thermophilic and cellulolytic *Brevibacillus* sp. strain JXL. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* (2009)

51. Lim W.J., Hong S.Y., An C.L., Cho K.M., Choi B.R., Kim Y.K., An J.M., Kang J.M., Lee S.M., Cho S.J., Kim H., Yun H.D.: Construction of minimum size cellulase (Cel5Z) from *Pectobacterium chrysanthemi* PY35 by removal of the C-terminal region. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **68**, 46–52 (2005)
52. Lynch J.M.: The terrestrial environment. (W) Microorganisms in action: concepts and applications in microbial ecology, red. J.M. Lynch, J.E. Hobbie, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, 1988, s. 103–131
53. Lynd L.R., Weimer P.J., van Zyl W.H., Pretorius I.S.: Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **66**, 506–577 (2002)
54. Mahadevan S.A., Wi S.G., Lee D.S., Bae H.J.: Site-directed mutagenesis and CBM engineering of Cel5A (*Thermotoga maritima*). *FEMS Microbiol. Lett.*, **287**, 05–211 (2008)
55. Maki M., Leung K.T., Qin W.: The prospects of cellulose – producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. *Int. J. Biol. Sci.* **5**, 500–516 (2009)
56. Mandels M., Reese E.T.: Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. *J. Bacteriol.* **73**, 269–278 (1957)
57. McCarthy J.K., Uzelac A., Davis D.F., Eveleigh D.E.: Improved catalytic efficiency and active site modification of 1,4-beta-D-glucan glucohydrolase A from *Thermotoga neapolitana* by directed evolution. *J. Biol. Chem.* **279**, 11495–11502 (2004)
58. Messner R., Hagspiel K., Kubicek C.P.: Isolation of a beta-glucosidase-binding and activating polysaccharide from cell walls of *Trichoderma reesei*. *Arch. Microbiol.* **154**, 150–155 (1990)
59. Miller T.L., Currenti E., Wolin M.J.: Anaerobic bioconversion of cellulose by *Ruminococcus albus*, *Methanobrevibacter smithii*, and *Methanosarcina barkeri*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**, 494–498 (2000)
60. Miron J. oraz Ben-Ghedalia D.: The degradation and utilization of wheat-straw cell wall monosaccharide components by defined ruminal cellulolytic bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 432–437 (1992)
61. Montegut D., Indictor N., Koestler R.J.: Fungal deterioration of cellulosic textiles: a review. *Int. Biodeterior.* **28**, 209–226 (1991)
62. Mori Y.: Nutritional interdependence between *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* and *Clostridium thermocellum*. *Arch. Microbiol.* **164**, 152–154 (1995)
63. Morrison M.: Do ruminal bacteria exchange genetic material? *J. Dairy Sci.* **79**, 1476–1486 (1996)
64. Murashima K., Kosugi A., Doi R.H.: Thermostabilization of celulosomal endoglucanase EngB from *Clostridium cellulovorans* by *in vitro* DNA recombination with non-celulosomal endoglucanase EngD. *Mol. Microbiol.* **45**, 617–626 (2002)
65. Ng T.K., Ben-Bassat A., Zeikus J.G.: Ethanol production by thermophilic bacteria: fermentation of cellulosic substrates by cocultures of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**, 1337–1343 (1981)
66. Palonen H., Tenkanen M., Linder M.: Dynamic interaction of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolases Cel16A and Cel17A and cellulose at equilibrium and during hydrolysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 5229–5233 (1999)
67. Park S.R., Cho S.J., Kim M.K., Ryu S.K., Lim W.J., An C.L., Hong S.Y., Kim J.H., Kim H., Yun H.D.: Activity enhancement of Cel5Z from *Pectobacterium chrysanthemi* PY35 by removing C-terminal region. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **291**, 425–430 (2002)
68. Pavlostathis S.G., Miller T.L., Wolin M.J.: Cellulose fermentation by continuous cultures of *Ruminococcus albus* and *Methanobrevibacter smithii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 109–116 (1990)
69. Percival Zhang Y.H., Himmel M.E., Mielenz J.R.: Outlook for cellulose improvement: screening and selection strategies. *Biotechnol. Adv.* **24**, 452–481 (2006)
70. Ponce-Noyola T. oraz de la Torre M.: Interactions of a mixed culture composed of *Cellulomonas flavigena* and *Xanthomonas sp.* growing in continuous culture on sugar cane bagasse. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**, 531–534 (1993)
71. Reese E.T., Mandels M.: Enzymatic degradation. (W) Cellulose and cellulose derivatives. red. N.M. Bikales and L. Segal, Wiley Interscience, New York, 1079–1094 (1971)
72. Reczey K., Brumbauer A., Bollok M., Szengyel Z., Zacchi G.: Use of hemicellulose hydrolysate for beta-glucosidase fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **72**, 225–235 (1998)
73. Rignall T.R., Baker J.O., McCarter S.L., Adney W.S., Vinzant T.B., Decker S.R., Himmel M.E.: Effect of single active-site cleft mutation on product specificity in a thermostable bacterial cellulase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **98–100**, 383–394 (2002)
74. Rouvinen J., Bergfors T., Teeri T., Knowles J.K., Jones T.A.: Three-dimensional structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. *Science*, **249**, 380–386 (1990)
75. Sakon J., Irwin D., Wilson D.B., Karplus P.A.: Structure and mechanism of endo/exocellulase E4 from *Thermomonospora fusca*. *Nature Struct. Biol.* **4**, 810–818 (1997)
76. Sakon J., Adney W.S., Himmel M.E., Thomas S.R., Karplus P.A.: Crystal structure of thermostable family 5 endocellulase E1 from *Acidothermus cellulolyticus* in complex with cellotetraose. *Biochemistry*, **35**, 10648–10660 (1996)
77. Scheifinger C.C., Wolin M.J.: Propionate formation from cellulose and soluble sugars by combined cultures of *Bacteroides succinogenes* and *Selenomonas ruminantium*. *Appl. Microbiol.* **26**, 789–795 (1973)
78. Schneider S.H.: The Greenhouse Effect: Science and Policy. *Science*, **243**, 771–781 (1989)
79. Schurz J.: Bioconversion of Cellulosic Substances into Energy Chemicals and Microbial Protein Symposium Proceedings, IIT, New Delhi, 37 (1978)
80. Schwarz W.H.: The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**, 634–649 (2001)
81. Seiboth B., Hakola S., Mach R.L., Suominen P., Kubicek C.P.: Role of four major cellulases in triggering cellulase gene expression in *Trichoderma reesei*. *J. Bacteriol.* **179**, 5318–5320 (1997)
82. Sharrock K.R.: Cellulase assay methods: a review. *J. Biochem. Biophys. Methods*. **17**, 81–105 (1988)
83. Shoham Y., Lamed R., Bayer E.A.: The cellulosome concept as an efficient microbial strategy for the degradation of insoluble polysaccharides. *Trends Microbiol.* **7**, 275–281 (1999)
84. Spiridonov N.A., Wilson D.B.: Characterization and cloning of *celR*, a transcriptional regulator of cellulase genes from *Thermomonospora fusca*. *J. Biol. Chem.* **274**, 13127–13132 (1999)
85. Sun Y., Cheng J.: Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*. **83**, 1–11 (2002)
86. Tamaru Y., Karita S., Ibrahim A., Chan H., Doi R.H.: A large gene cluster for the *Clostridium cellulovorans* cellulosome. *J. Bacteriol.* **182**, 5906–5910 (2000)
87. Teeri T.T.: Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. *Trends Biotechnol.* **15**, 160–167 (1997)
88. Tomme P.R., Warren A.J., Gilkes N.R.: Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Adv. Microb. Physiol.* **37**, 1–81 (1995)
89. Tong X.G., Smith L.H., McCarty P.L.: Methane fermentation of selected lignocellulosic materials. *Biomass*, **21**, 239–255 (1990)
90. Usami S., Kirimura K., Imura M., Morikawa S.: Cellular localization of the constitutive β -glucosidase in *Trichoderma viride*. *J. Ferment. Bioeng.* **70**, 185–187 (1990)

91. Vallim M.A., Janse B.J.H., Gaskell J., Pizzirani-Kleiner A.A., Cullen D.: *Phanerochaete chrysosporium* cellobiohydrolase and cellobiose dehydrogenase transcripts in wood. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 1924–1928 (1998)
92. Vardavakis E.: Seasonal fluctuations of aerobic cellulolytic bacteria, and cellulase and respiratory activities in a soil profile under a forest. *Plant Soil.* **115**, 145–150 (1989)
93. Veal D.A., oraz Lynch J.M.: Associative cellulolysis and nitrogen fixation by co-cultures of *Trichoderma harzianum* and *Clostridium butyricum*: the effects of ammonium nitrogen on these processes. *J. Appl. Bacteriol.* **63**, 245–253 (1987)
94. Wang D.I.C., Avgerinos G.C., Biocic I., Wang S.D., Fang H.Y.: Ethanol from cellulosic biomass. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser.* **300**, 323–333 (1983)
95. Watanabe T., Sato T., Yoshioka S., Koshijima T., Kuwahara M.: Purification and properties of *Aspergillus niger* -glucosidase. *Eur. J. Biochem.* **209**, 651–659 (1992)
96. Weimer P.J. oraz Zeikus J.G.: Fermentation of cellulose and cellobiose by *Clostridium thermocellum* in the absence and presence of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**, 289–297 (1977)
97. Wheals A.E., Basso L. C., Alvesand D.M.G., Amorim H.V.: Fuel ethanol after 25 years. *Trends in Biotechnol.* **17**, 482–487 (1999)
98. Wittrup K.D., Bailey J.E.: A single-cell assay of β -galactosidase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cytometry*, **9**, 394–404 (1988)
99. Wood T.M.: Fungal cellulases. *Biochem. Soc. Trans.* **20**, 46–53 (1992)
100. Wood T.M., Bhat K.M.: Methods for measuring cellulase activities. *Methods Enzymol.* **160**, 87–117 (1988)
101. Zverlov V.V., Velikodvorskaya G.A., Schwarz W.H., Kellermann J., Staudenbauer W.L.: Duplicated *Clostridium thermocellum* cellobiohydrolase gene encoding cellulosomal subunits S3 and S5. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**, 852–859 (1999)