



Enzymy rozkładające ksylan – charakterystyka i zastosowanie w biotechnologii

Joanna Tokarzewska-Zadora¹, Jerzy Rogalski¹, Janusz Szczodrak²

¹Zakład Biochemii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

²Zakład Mikrobiologii Przemysłowej, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

Xylan-degrading enzymes – characterization and application in biotechnology

Summary

Xylans as compounds of plant lignocellulosics seem to be a very useful feedstock for an effective utilization in biotechnology. This is due to their abundance and renewability as well as the possibility of producing various chemical by-products, fuels, fodder and food products from this source. On the other hand, an enzymatic removal of xylans from cellulosic pulps and coffee extracts by xylanases is very important for the production of high quality paper and coffee. This review article presents new trends in the investigations on plant xylans and their enzymatic hydrolysis by xylanases of different origin. Special attention has been paid to catalytic properties of different enzymes of xylanolytic complex, to their synergistic interactions, and to the mechanisms of their regulation, as well as molecular structure of the genes encoding particular enzymes. Most promising prospects for the practical applications of xylanases are also discussed.

Key words:

lignocellulose, xylans, enzymatic hydrolysis, xylanases, catalytic properties, regulation, practical applications.

Adres do korespondencji

Jerzy Rogalski,
Zakład Biochemii,
Uniwersytet Marii
Curie-Skłodowskiej,
Plac M. Curie-Skłodowskiej 3,
20-031 Lublin.

1. Wprowadzenie

Ksylan jest jednym z najważniejszych składników hemiceluloz, które razem z ligniną i celulozą wchodzi w skład kompleksu ligninocelulozowego w ścianach komórkowych roślin. Będąc istotnym

składnikiem drewna, szczególnie twardego, a także roślin jednorocznych, ksylan jest brany pod uwagę jako ważny surowiec do wykorzystania na drodze biokonwersji bowiem powstające w wyniku jego hydrolizy enzymatycznej produkty mogą stanowić punkt wyjścia do produkcji pasz, paliw, żywności i chemikaliów [1]. Ważne zagadnienie stanowi także wykorzystanie enzymów ksylanolitycznych w przemyśle celulozowo-papierniczym. Jednakże efektywna eksploatacja ksylanu jako taniego surowca w biotechnologii wymaga pełnego zrozumienia procesów enzymatycznych warunkujących degradację tego złożonego heteropolimeru, jak również interakcji pomiędzy poszczególnymi enzymami kompleksu ksylanolitycznego. W ostatnich latach wzrost zainteresowania rozkładem ksylanów znajduje odbicie w obszernym piśmiennictwie dotyczącym tego tematu. Szeroko omawiane są zarówno możliwości zastosowania enzymów rozkładających ksylene, jak i właściwości ksylanaz pochodzących z różnych źródeł [2-4].

2. Charakterystyka ksylanów roślinnych

Ksylany należą do heteropolisacharydów roślinnych ścian komórkowych – hemiceluloz. Ich głównymi składnikami są tworzące łańcuch reszty ksylopiranozowe połączone wiązaniami β -1,4-glikozydowymi. Zależnie od pochodzenia tych polimerów, ich łańcuch główny może być podstawiony bocznymi grupami L-arabinofuranozowymi, acetylowymi lub 4-O-metyloglukuronowymi oraz kwasem ferulowym lub *p*-kumarowym. Grupy boczne ksylanów mogą uczestniczyć w wiązaniu ligniny poprzez tworzenie wiązań estrowych pomiędzy resztami kwasu 4-O-metyloglukuronowego a ligniną lub eterowych między cząsteczką ligniny a grupami arabinozowymi ksylanu [5].

Ksylany występują w drewnie miękkim drzew iglastych, drewnie twardym drzew liściastych, trawach oraz nasionach wielu roślin. Najbardziej zasobne w te związki jest drewno twarde i rośliny jednoroczne, w których zawartość ksylanów w suchej masie może dochodzić nawet do 35% [6]. Rzadko spotykaną formą ksylanu jest homoksylian. Składa się on, w odróżnieniu od heteroksylianu, wyłącznie z reszt ksylozy. Formę taką spotyka się m. in. w łądych tytoniu.

2.1. Ksylany drewna twardego

Głównym składnikiem hemiceluloz drewna twardego jest *O*-acetylo-4-*O*-metyloglukurono- β -D-ksylan, zwany najczęściej glukuronoksylianem. Jego ilość w tym rodzaju drewna waha się od 15 do 30%, a stopień polimeryzacji wynosi około 200. Łańcuch glukuronoksylianu składa się z podjednostek D-ksylopiranozowych połączonych wiązaniami typu β -1,4. Przeciętnie, co dziesiąta reszta ksylozy posiada odgałęzienie w postaci kwasu 4-*O*-metyloglukuronowego przyłączonego w pozycji C-2 ksylozy. Ksylian drewna twardego jest wysoko acetylowany. Średnio siedem na dziesięć podjednostek łańcucha jest podstawionych grupami acetylowymi w pozycjach

C-2 lub C-3 lub w obu jednocześnie. Natomiast jedna reszta kwasu 4-O-metylo- α -D-glukuronowego występuje przeciętnie na dziesięć jednostek ksylozy przyłączona wiązaniem typu α -1,2. Ksyłan drewna twardego zawiera również mniejsze ilości reszt ramnozy i kwasu galakturonowego na redukującym końcu łańcucha [7,8].

Istnieją również inne formy ksyłanów. Rzadko spotykanym rodzajem heteroksyłanu, występującym między innymi w drewnie eukaliptusa, jest 2-O- α -D-galaktopiranozo-4-O-metylo- α -D-glukurono-D-ksyłan, złożony z reszt galaktozowych, 4-O-metyloglukuronowych i ksylozowych w proporcji 1:3:30 [9].

2.2. Ksyłany drewna miękkiego

Wszystkie ksyłany drewna miękkiego zbudowane są ze szkieletu reszt β -1,4-D-ksylopiranozy. Charakteryzują się dużą zawartością kwasu 4-O-metyloglukuronowego i dlatego też są to przede wszystkim arabino-4-O-metyloglukuronoksyłany. Polisacharydy tego typu stanowią od 7 do 10% suchej masy miękkiego drewna. Przeciętnie siedem na dziesięć reszt ksylozy jest podstawionych resztami kwasu 4-O-metyloglukuronowego przyłączonego w pozycji C-2. Jedna reszta arabinofuranozy występuje średnio na osiem do dziewięciu reszt ksylozy [8]. Ksyłany drewna miękkiego różnią się od ksyłanów drewna twardego tym, że nie są acetylowane oraz wykazują obecność podstawników arabinozowych połączonych wiązaniami α -1,3-glikozydowymi z łańcuchem głównym ksyłanu. Poza tym mają one krótsze łańcuchy (stopień polimeryzacji 70-130) i są mniej rozgałęzione od ksyłanów drewna twardego [10]. Reszty β -1,4-D-ksylopiranozy, kwasu 4-O-metylo- α -D-glukuronowego i L-arabinozy występują w ksyłanach drewna miękkiego w stosunku 100:20:13 [11].

2.3. Ksyłany roślin jednorocznych

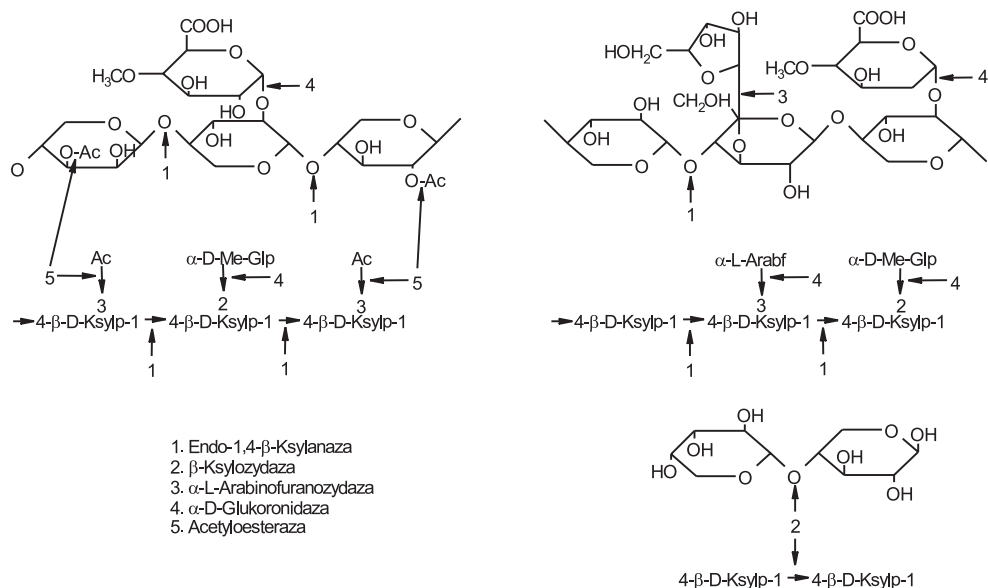
Ksyłan jest ważnym składnikiem roślin jednorocznych, w tym gatunków uprawnych. W wyniku kwasowej hydrolizy słomy, a także łusek pszenicy, jęczmienia i ryżu można uzyskać około 20% ksylozy w suchej masie materiału roślinnego [12]. Z kolei pentozany żyta mogą tworzyć z białkami trwałe kompleksy, których udział w białku ogólnym ziarniaka może dochodzić do 40%. Kompleksy te są tylko w niewielkim stopniu dostępne dla enzymów proteolitycznych w przewodzie pokarmowym, stąd najczęściej gorsza jest strawność białka jak i samych pentozanów [102].

Ksyłany roślin jednorocznych są zbudowane podobnie jak ksyłany drewna. Zawierają jednak mniejsze ilości kwasów uronowych, są bardziej rozgałęzione, a także wykazują większą zawartość reszt L-arabinofuranozowych występujących zwykle w pozycji C-3 ksylozy. Jedna na siedem reszt ksylozowych posiada boczny łańcuch w postaci L-arabinofuranozy [8]. Reszty L-arabinozy podstawione jako grupy terminalne występują w formie furanozy. Zwykle w mniejszych ilościach obecne są także

reszty kwasu D-glukuronowego lub/i 4-D-metyloglukuronoksydanu. Ksylany roślin jednorocznych są również acetylowane. Wśród traw istnieje duża różnorodność ksylianów w zależności od gatunku i tkanki w jakiej występują.

3. Enzymatyczny rozkład ksylianów

W celu całkowitego rozkładu rozgałęzionego acetyloksylanu konieczne jest działanie następujących enzymów hydrolitycznych: endo- β -1,4-ksylanazy, egzo- β -1,4-D-ksylozydazy, α -D-glukuronidazy, α -L-arabinofuranozydazy, esterazy octanowej lub acetyloksyloesterazy. Endo- β -1,4-ksylanaza i egzo- β -1,4-D-ksylozydaza odgrywają zasadniczą rolę w hydrolizie ksylianu degradując go do ksylooligosacharydów. Z kolei α -D-glukuronidaza, α -L-arabinofuranozydaza i esteraza octanowa biorą udział w odszczepianiu bocznych grup i łańcuchów heteroksylianu. Grupy boczne w ksylianie są czynnikami ograniczającymi osiągnięcie efektywnej hydrolizy substratu [13], dlatego niezbędna jest kooperacja wszystkich wymienionych enzymów. W proponowanym dla *Trichoderma reesei* mechanizmie degradacji ksylianu zakłada się, że endoksylianaza, rozpoczynając proces hydrolizy produkuje rozpuszczalne podstawione ksylooligosacharydy, degradowane następnie przez pozostałe enzymy do monomerów cukrowych [14]. Hipotetyczny schemat ksylianu i miejsc działania poszczególnych enzymów przedstawiono na rysunku.



Rys. Hipotetyczny rozkład ksylianu roślinnego oraz miejsca działania poszczególnych enzymów ksylianolitycznych (15).

U niektórych bakterii, biorących udział w degradacji ligninocelulozy, odkryto wielofunkcyjny i wieloenzymatyczny kompleks nazwany celulosomem. U *Clostridium thermocellum* jest on odpowiedzialny za przyleganie (adherencję) bakterii do celulozy i za hydrolizę substratu. W 1991 r. Lin i Thomson [16] wprowadzili analogiczne pojęcie ksyłanosomu. Opisany przez nich kompleks, występujący u *Butyrivibrio fibrisolvens*, złożony jest z 11 białkowych podjednostek o aktywności ksyłanazy oraz z 3 podjednostek o aktywności endoglukanazy. Również Pohlschroder i wsp. [17] opisali u *C. papyrosolvens* multikompleks odpowiedzialny za hydrolizę zarówno celulozy, jak i ksyłanu. Złożony jest on z przynajmniej siedmiu różnych substancji białkowych.

4. Enzymy kompleksu ksyłanolitycznego

4.1. Endo- β -1,4-ksylanaza

Endo- β -1,4-ksylanaza (ksylanohydrolaza 1,4- β -D-ksylanu; EC 3.2.1.8) atakuje w sposób przypadkowy łańcuch ksyłanu, rozszczepiając liniowe wiązania glikozydowe typu β -1,4. Efektem jej działania są podstawione lub nie podstawione oligomery, ksylobioza lub ksyloza.

Endoksyłanazy są klasyfikowane w obrębie dwóch głównych ewolucyjnych rodzin hydrolaz glikozyłowych (F lub 10 i G lub 11). Rodzina 10 jest większa, bardziej rozbudowana, a produktami działania enzymów z tej rodziny są krótkie oligosacharydy. Enzymy rodziny 11 są bardziej specyficzne w stosunku do ksyłanu. Szczególne zainteresowanie wzbudza ich wytrzymałość na ekstremalne temperatury, co spowodowało że ksyłanazy tego typu znalazły przede wszystkim zastosowanie w przemyśle [18,19]. Właściwości fizykochemiczne wybranych endoksyłanaz zestawiono w tabeli 1.

Tabela 1

Charakterystyka wybranych grzybowych i bakteryjnych endo- β -1,4-ksylanaz

Pochodzenie enzymu	Masa cząsteczkowa (kDa)	Punkt izoelektryczny	Optymalne pH	Optymalna temperatura (°C)	K_m (mg/ml)	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{mg}$)	Literatura
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Aspergillus oryzae</i>	21,0	–	6,0	58	5,1	–	[20]
<i>Clostridium absonum</i>							
I	150,0	–	6,5-7,5	75	1,1	454,5	[21]
II	95,0	–	7,5	80	1,4	363,6	

1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Trichoderma reesei</i>							
I	20,0	9,0	5,0-5,5	–	3,0 (a) 3,8 (b) 6,8 (c)	40,7 (a) 23,6 (b) 12,8 (c)	[22]
II	19,0	5,5	4,0-4,5	–	14,8 (a) 22,3 (b) 18,9 (c)	4736 (a) 5129 (b) 1190 (c)	

a) określone wobec acetyloglukuronoksyłanu; b) deacetylowanego glukuronoksyłanu; c) niepodstawionego ksyłanu

4.2. Egzo- β -1,4-D-ksylozydaza

Egzo- β -1,4-D-ksylozydaza (ksylanohydrolaza β -1,4-D-ksylanu; EC 3.2.1.37) uwalnia reszty D-ksylozy z końca ksylooligosacharydów. Mechanizm jej działania na substrat jest podobny do endoksyłanazy, ale w odróżnieniu od niej, egzo- β -1,4-D-ksylozydaza hydrolizuje liniowe wiązania ksylooligosacharydów, rozpoczynając od nieredukującego końca. Egzoksylozydaza jest zwykle wytwarzana równocześnie z endoksyłanazą. Atakuje ona ksylooligosacharydy, uwalniając cząsteczki ksylozy aż do momentu, kiedy dalsze działanie enzymu nie zostanie zablokowane przez podstawniki arbinofuranozowe lub 4-O-metyloglukuronowe [14].

Za pomocą chromatografii cienkowarstwowej wykazano, że β -D-ksylozydaza z *Bacillus pulmus* hydrolizowała ksylotetrozę do triozy, a później do ksylobiozy, co oznacza, że ksylobioza nie była otrzymywana bezpośrednio z ksylotetrozy [23]. Masa cząsteczkowa egzo- β -1,4-D-ksylozydazy najczęściej osiąga wartość ponad 100 kDa.

Dekker [24] był jednym z pierwszych, który wykazał znaczący udział egzo- β -1,4-D-ksylozydazy w pełnej hydrolizie ksyłanów przez ksyłanazy *T. reesei*. Rola tego enzymu w produkcji ksylozy została również wyraźnie zaakcentowana w pracy Kit-preechavanich i wsp. [25]. Wydajnym źródłem egzo- β -1,4-D-ksylozydazy jest wiele gatunków bakterii i grzybów, z których enzym ten został oczyszczony. Podstawowe właściwości niektórych egzoksylozydaz przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2

Charakterystyka wybranych egzo- β -1,4-D-ksylozydaz

Pochodzenie enzymu	Masa cząsteczkowa (kDa)	Punkt izoelektryczny	Optymalne pH	Optymalna temperatura (°C)	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{mg}$)	Literatura
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Aspergillus carbonarius</i>	100	4,4	4,0	60	0,2 (a)	–	[26]
<i>Aspergillus nidulans</i>	180	–	5,0	50	1,1 (a)	25,6 (a)	[27]

1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Aspergillus oryzae</i>							
Xyl1	190	–	4,5-5,5	75	6,5 (a) 13,8 (b)	–	[28]
Xyl2	120	–	5,0-5,5	75	1,4 (a) 3,9 (a)	–	
Xyl3	180	–	4,5-5,5	55	3,3 (a)	–	
<i>Candida utilis</i>	92	5,6	6,0	40	–	–	[29]
<i>Trichoderma koningii</i>	100	4,6	3,5-4,0	55-60	0,04 (a)	–	[30]

a) określone wobec p-nitrofenylo- β -D-ksylozydu, b) określone wobec ksylobiozy

4.3. α -L-Arabinofuranozydaza

α -L-Arabinofuranozydaza (arabinofuranohydrolaza α -L-arabinofuranozydów; EC 3.2.1.55) jest kolejnym enzymem niezbędnym do pełnej hydrolizy rozgałęzionych heteropolimerów hemicelulozowych, ponieważ katalizuje hydrolityczne usunięcie z nich reszt L-arabinofuranozowych z nieredukujących końców [31].

α -L-Arabinofuranozydaza hydrolizuje w arabinoksyłanach wiązania zarówno α -1,3-jak i α -1,5-arabinofuranozowe. Enzym pochodzący z *Aspergillus niger* atakuje najpierw reszty arabinofuranozowe przyłączone wiązaniami α -1,3, a następnie hydrolizuje wiązania α -1,5. Hydroliza następuje aż do całkowitej konwersji arabinianu do arabinozy. Reszty arabinofuranozowe są zwykle dołączone do łańcucha głównego arabinoksyłanów, α -L-arabinofuranozydów, arabanów i arabinogalaktanów, a usunięcie ich przez α -L-arabinofuranozydazę zwykle ułatwia atak na szkielet ksyłanu endo- β -1,4-ksylanazom [32]. Reszty L-arabinozydowe występują w heteropolisacharydach i związkach glukozydopodobnych, jednak ilość L-arabinozy i L-arabanów w żywych tkankach jest stosunkowo mała. Częstotliwość występowania L-arabinofuranozy jest różna. Według jednych autorów na 7-13 reszt D-ksylopiranozy przypada jedna reszta L-arabinofuranozy, według innych przypada ona na 20-40 tego typu reszt. Mimo niewielkiej zawartości reszt L-arabinozydowych w łańcuchu ksylozydowym, hamują one jednak znacznie wydajność enzymatycznej hydrolizy hemicelulozy przy udziale endo- β -1,4-ksylanaz [33].

Masa cząsteczkowa α -L-arabinofuranozydaz może osiągać nawet 495 kDa, przy czym mogą one występować w formie mono-, di-, tetra-, hekso- i oktameru. Właściwości niektórych α -L-arabinofuranozydaz pochodzenia bakteryjnego i grzybowego podano w tabeli 3.

Tabela 3

Charakterystyka wybranych α -arabinofuranozydaz

Pochodzenie enzymu	Masa cząsteczkowa (kDa)	Punkt izoelektryczny	Optymalne pH	Optymalna temperatura (°C)	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{mg}$)	Literatura
<i>Aspergillus awamori</i>	65	3,6 3,2	4,6	50	1,4	–	[34]
<i>Aureobasidium pullulans</i>	210	–	4,0-4,5	75	0,3	–	[35]
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	94	8,2	5,0-5,5	–	4,0	36,4	[36]
<i>Pichia capsulata</i>	72	5,1	6,0	50	–	–	[37]
<i>Streptomyces purpurascens</i>	495	3,9	6,5	–	0,08	–	[38]

4.4. α -D-Glukuronidaza

α -D-Glukuronidaza (glukuronohydrolaza α -D-glukuronozydów; EC 3.2.1) hydrolizuje wiązania glikozydowe pomiędzy resztą kwasu α -D-glukopiranozowego i D-ksylozy lub resztą kwasu 4-O-metylo- α -D-glukopiranozowego i D-ksylozy, uwalniając w ten sposób kwas D-glukuronowy lub kwas 4-O-metylo- α -D-glukuronowy.

Ilość reszt kwasu 4-O-metyloglukuronowego w drewnie miękkim jest większa niż w drewnie twardym. W ksylenie brzozy przeciętnie jedna reszta kwasu 4-O-metyloglukuronowego przypada na dwanaście reszt ksylozy, natomiast w ksylenie sosny i świerku jedna reszta tego kwasu przypada na siedem reszt ksylozy.

α -D-Glukuronidaza jest najmniej zbadanym enzymem z biorących udział w rozkładzie ksylianów. Masa cząsteczkowa oczyszczonej α -D-glukuronidazy wynosi zwykle około 100 kDa. Reszty kwasu 4-O-metylo-D-glukuronowego, odszczepiane przez enzym z podstawionych kwasowych ksylooligomerów, są związane z łańcuchem ksylianowym w pozycji 1-2, tworząc odgałęzienia. Prawdopodobnie właśnie te rozgałęzienia stanowią przestrzenną przeszkodę dla działania endo- β -1,4-ksylanaz hydrolizujących łańcuch ksylicy [39].

α -D-Glukuronidaza z *T. reesei* wykorzystuje jako substraty niskocząsteczkowe ksylooligomery. Enzym ten działa prawie wyłącznie na wiązania między resztą kwasu glukuronowego a ksylozą na nieredukującym końcu łańcucha [40]. Także α -D-glukuronidaza z *A. tubingensis* jest zdolna do uwalniania kwasu 4-O-metylo- α -D-glukuronowego tylko z tych fragmentów glukuronoksylicy brzozy, w których kwas ten jest przyłączony do nieredukującego końca [41]. Aktywność α -D-glukuronidazy została wykryta zarówno w kulturach bakterii jak i grzybów. Po raz pierwszy jej obecność stwierdzono u *T. reesei* [42]. W 1987 r. Puls i wsp. [43] donieśli o produkcji α -D-glukuronidazy przez *Agaricus bisporus* i *Pleurotus ostreatus*, zaś po raz pierwszy enzym ten został oczyszczony z kultury *Thermoascus aurantiacus* [44]. Właściwości niektórych α -D-glukuronidaz zebrano w tabeli 4.

Tabela 4

Charakterystyka wybranych α -glukuronidaz

Pochodzenie enzymu	Masa cząsteczkowa (kDa)	Punkt izoelektryczny	Optymalne pH	Temperatura optymalna (°C)	K_m (mM)	V_{max} (mmol/min \times mg)	Literatura
<i>Schizophyllum commune</i>	125	3,6	4,5-5,5	–	–	–	[45]
<i>Aspergillus tubingensis</i>	107-112	5,1	4,5-6,0	70	–	–	[46]
<i>Trichoderma reesei</i>	91	5,0-6,2	4,5-6,0	40	–	–	[47]
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	78	5,3	6,5	40	0,78	15,3	[48]

4.5. Esterazy uczestniczące w rozkładzie ksyłanu

Esterazy biorące udział w degradacji polisacharydów dzielą się na dwie grupy zależnie od ich specyficzności i roli fizjologicznej. Pierwsza grupa obejmuje esterazę octanową i acetyloksylanoesterazę. Oba enzymy usuwają grupy acetylowe z krótkich i z długich łańcuchów ksyłanu, co powoduje większą podatność tego substratu na działanie endo- β -1,4-ksylanaz. Do grupy drugiej należą esterazy zdolne do uwalniania z ksyłanu kwasów aromatycznych (ferulowego i kumarowego). Kwasy te tworzą mostki pomiędzy łańcuchami polisacharydów oraz łączą ligninę ze składnikami węglowodanowymi [49].

4.5.1. Esteraza octanowa

Esteraza octanowa (acetyloesteraza estrów octowych; EC 3.1.1.6) odszczepia kwas octowy zwłaszcza od trzeciego węgla łańcucha.

Obecność grup acetylowych jako podstawników w różnych roślinnych polisacharydach, szczególnie hemicelulozach i pektynach, została stwierdzona wiele lat temu. Na przykład ksyłan brzozy zawiera 2 grupy acetylowe na 3 reszty ksylozy. Z kolei w metyloglukuronoksyłanie średnio 7 na 10 podjednostek łańcucha jest podstawionych grupami acetylowymi w pozycjach C-2 lub C-3 lub w obu jednocześnie. Aktywność tego enzymu jest szczególnie ważna podczas degradacji drewna twardego, w którym 60-70% reszt ksylopiranozy jest acetylowana. Podstawniki acetylowe uniemożliwiają pełną biodegradację ksyłanu przez endo- β -1,4-ksylanazy, dlatego niezbędne jest synergiczne działanie wszystkich enzymów ksyłanolitycznych. Do tej pory scharakteryzowano wiele esteraz octanowych występujących u grzybów i bakterii (tab. 5).

Tabela 5

Charakterystyka wybranych esteraz octanowych

Pochodzenie enzymu	Masa cząsteczkowa (kDa)	Punkt izoelektryczny	Optymalne pH	Temperatura optymalna (°C)	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{mg}$)	Literatura
<i>Aspergillus awamori</i>	31	–	7,0	–	–	–	[50]
<i>Candida guilliermondii</i>	67	7,6	7,5	50-60	2,63	213,3	[51]
<i>Termitomyces clypeatus</i>	–	–	6,5	50	0,83	48	[52]

4.5.2. Acetyloksylanoesteraza

Acetyloksylanoesteraza (EC 3.2.1.72) nazywana jest też inaczej esterazą acetyloksylanu. Jej wytwarzanie przez grzyby opisano po raz pierwszy w roku 1985 [53]. Od tego czasu zainteresowanie tym enzymem ciągle wzrasta. Wcześniejsze trudności w badaniu aktywności acetyloksylanoesterazy spowodowane były brakiem odpowiednich substratów. Obecnie używany jest do tego celu najczęściej acetylowany ksylan brzozy lub modrzewia. Pomimo że ksylan w formie natywnej jest wysoko acetylowany, większość ksylanów używana do oznaczania aktywności enzymów ksylanolitycznych była znacznie deacetylowana podczas procesu ekstrakcji alkalicznej [54]. Podstawowe właściwości fizykochemiczne niektórych acetyloksylanoesteraz zostały zamieszczone w tabeli 6.

Tabela 6

Charakterystyka wybranych acetyloksylanoesteraz

Pochodzenie enzymu	Masa cząsteczkowa (kDa)	Punkt izoelektryczny	Optymalne pH	Temperatura optymalna (°C)	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{mg}$)	Literatura
<i>Orpinomyces</i> sp.	35	–	9,0	30	0,9	785	[55]
<i>Penicillium purpurogenum</i>							
AXEI	48	7,5	5,3	50	–	–	[56]
AXEII	23	7,8	5,5-6,0	55-60			
<i>Bacillus pumilus</i>	40	4,8	8,0	55	1,54	360	[57]
<i>Thermoanaerobacterium</i> sp.							
AXEI	195	4,2	7,0	80	0,45	–	[58]
AXEII	106	4,3	7,5	84	0,52	–	

4.5.3. Esterazy ferulanowa i *p*-kumarylowa

Esterazy ferulanowa i *p*-kumarylowa są znane również jako esterazy cynamonowe. Esteraza ferulanowa hydrolizuje wiązania estrowe pomiędzy grupami arabinozy w łańcuchu ksyłanu a resztami kwasu ferulowego, natomiast esteraza *p*-kumarylowa – między resztami arabinozy a resztami kwasu kumarowego. Esteraza ferulanowa wraz z esterazą *p*-kumarylową stanowią podklasy w grupie karboksyoesteraz (EC 3.1.1.1) [59].

Kwas ferulowy, obecny jako podstawnik w węglowodanach budujących hemicelulozy, spełnia bardzo ważną rolę czynnika łączącego hemicelulozy z makrocząsteczką ligniny. Kwasy ferulowy (4-hydroksy-3-metoksy-cynamonowy) i *p*-kumarowy (4-hydroksy-cynamonowy) są utlenionymi formami odpowiednich alkoholi: koniferylowego i *p*-kumarowego (prekursorów w biosyntezie ligniny). Są one powszechnymi podstawnikami w strukturach ścian komórkowych wielu roślin. W słomie jęczmiennej jedna na 15 reszt arabinozy jest estryfikowana kwasem ferulowym i jedna na 31 reszt arabinozy jest estryfikowana kwasem *p*-kumarowym, podczas gdy w otrębach pszennych, jedna na 150 pentoz jest ferulowana [60].

Kwasy ferulowy i *p*-kumarowy są przyłączone wiązaniami estrowymi do reszt arabinofuranozowych arabinoksyłanów występujących w trawach. Kwas ferulowy jest również estryfikowany do reszt galaktozy w pektynach szpinaku i w pozycji C-4 reszt ksylopiranozowych ksyloglukanów bambusa [61]. Również niektóre reszty arabinozowe są estryfikowane kwasem ferulowym i *p*-kumarowym i w ten sposób mogą tworzyć dimery włączone w wiązania pomiędzy cząsteczkami ksyłanu. Są również dowody na to, że reszty ferulowa i *p*-kumarowa mogą być włączone w wiązania ksyłanu z ligniną. Z powodu wyjątkowej roli, jaką pełnią te reszty, sugeruje się, że mają one znaczący udział w zapewnieniu stabilności komórki roślinnej i jej odporności na enzymatyczną hydrolizę.

Dimery kwasu ferulowego występują nie tylko w ścianach komórkowych roślin, gdzie wiążą one wiązaniem poprzecznym polimery arabinoksyłanów. Dimery te są również tworzone w wyniku utleniającego działania peroksydaz i są włączone w mechaniczną regulację wzrostu komórki [62].

Esterazy ferulanowe uwalniają kwas ferulowy z arabinoksyłanów, co zwiększa podatność ściany komórkowej na dalszy atak enzymatyczny. Tylko niektóre esterazy ferulanowe mogą działać pojedynczo na ścianę komórkową uwalniając kwas ferulowy. Inne wymagają dodatkowej aktywności endoksyłanazowej [60]. Charakterystykę niektórych esteraz ferulowych przedstawiono w tabeli 7.

Tabela 7

Charakterystyka wybranych esteraz ferulanowych

Pochodzenie enzymu	Masa cząsteczkowa (kDa)	Punkt izoelektryczny	Optymalne pH	Temperatura optymalna (°C)	K _m (mM)	V _{max} (μmol/min × mg)	Literatura
<i>Penicillium expansum</i>	57,5	–	5,6	37	2,6	27,1	[61]
<i>Aspergillus niger</i>	36	3,3	5,0	55-60	2,1	175	[62]
<i>Clostridium stercorarium</i>	33	–	8,0	65	0,04	131	[63]

5. Biosynteza i synergizm enzymów ksylanolitycznych

Mechanizm stymulacji syntezy endo-β-1,4-ksylanaz został opracowany w wyniku badań zainicjowanych przez grupę Petera Biely nad drożdżami *Cryptococcus albidus*. Obecnie przyjmuje się, że indukcja tych enzymów zachodzi głównie poprzez produkty ich własnego działania [15,66]. U *C. albidus* do całkowitej asymilacji ksylanu jako źródła węgla konieczne są trzy enzymy: pozakomórkowa endo-β-1,4-ksylanaza, permeaza β-ksylozydowa odpowiedzialna za transport ksylobiozy i innych ksylooligomerów do wnętrza komórki oraz wewnątrzkomórkowa egzo-β-1,4-D-ksylozydaza. Synteza endo-β-1,4-ksylanaz jest indukowana poprzez naturalne i pewne sztuczne izomery β-1,4-ksylooligosacharydowe, spośród których ksylobioza stanowi jedyny naturalny składnik, który nie jest degradowany pozakomórkowo [67]. Za interesujący należy uznać fakt, że syntetyczne izomery ksylobiozy stymulują produkcję endo-β-1,4-ksylanazy tylko w przypadku, jeśli zostały one przemienione przez endo-β-1,4-ksylanazę do β-1,4-ksylobiozy, co stanowi odwrotną sytuację do tej jaką obserwowano w przypadku użycia soforyzy do indukcji celulaz. Jednak od tego modelu regulacji ekspresji genów odpowiedzialnych za syntezę enzymów ksylanolitycznych mogą być wyjątki. W przypadku *Bacillus subtilis* produkt genu *xynA*, endo-β-1,4-ksylanaza, produkowany jest konstytutywnie i nie podlega represji przez glukozę. W przeciwieństwie do tego egzo-β-1,4-D-ksylozydaza, izomeraza D-ksylozy i ksylokinaza są indukowane przez ksylan i produkty jego hydrolizy, a jednocześnie enzymy te ulegają represji przez glukozę [68].

Li i Ljungdahl [69], badając gen kodujący endo-β-1,4-ksylanazę (*xynA*) u *Aureobasidium pullulans* wykazali, że ma on otwartą ramkę odczytu kodującą 221-aminokwasowy polipeptyd o masie 23,5 kDa i zawiera 34-aminokwasowy peptyd sygnałowy naprzeciwko końca N dojrzałego enzymu. Wysoko aktywne endo-β-1,4-ksylanazy, APX-I i APX-II, wydzielane przez ten organizm są kodowane przez jeden gen, a w kodującym regionie był obecny jeden intron składający się z 59 par zasad. Stwierdzono też istnienie homologii pomiędzy sekwencją aminokwasową *xynA* i niektórymi innymi bakteryjnymi i grzybowymi endo-β-1,4-ksylanazami. Wspomniani autorzy wykazali ponadto, że ekspresja genów endo-β-1,4-ksylanazy jest kontrolowana na poziomie transkrypcji, a nie na poziomach translacji i potranslacyjnym. Glukoza w tym

przypadku zachowywała się jak represor. Ksylan oraz D-ksyloza jako końcowy produkt degradacji ksylanu, są w stanie indukować transkrypcję jedynie przy braku glukozy w podłożu lub gdy jej stężenie w środowisku osiągnie stosunkowo niski poziom. Dlatego regulacja ekspresji genu endo- β -1,4-ksylanazy u *A. pullulans* nie jest analogiczna do ekspresji genu celulazy u grzybów celulolitycznych, takich jak *T. reesei*, u którego glukoza, końcowy produkt degradacji celulozy, zupełnie hamuje transkrypcję genów celulolitycznych.

W trakcie badań nad syntezą hydrolaz rozkładających polisacharydy roślinnych ścian komórkowych zauważono, że prawie wszystkie mikroorganizmy produkujące endo- β -1,4-ksylanazy, wytwarzają również celulazy i *vice versa* [7]. Eriksson i Goodell [70], na podstawie badań z udziałem grzyba *Polyporus adustus* zasugerowali, że celulazy, mannanazy i endoksylianazy znajdują się pod kontrolą jednego genu regulatorowego. Autorzy oparli swoją sugestię na badaniach, które doprowadziły do izolacji pojedynczego białka regulatorowego kierującego indukcją celulazy, mannanazy i endoksylianazy. Wspólna indukcja celulaz i endoksylianaz potwierdzona została również przez innych badaczy [71,72].

W przeciwieństwie do tych doniesień Hrmová [73] stwierdziła w swoich badaniach, że mimo, iż ksylanazy towarzyszą zawsze celulazom, to ich synteza u *T. reesei* QM 9414 jest regulowana przez różne geny. Niezależna regulacja enzymów degradujących celulozę i ksylan została również zaobserwowana u *A. terreus* i *A. niger* [74]. Do podobnych wniosków doszli również Morosoli i wsp. [75] w odniesieniu do *Streptomyces lividans*. Z kolei Godden i wsp. [76] donieśli, że w dzikim izolacie *Streptomyces* aktywności endo- β -1,4-ksylanazy i egzo- β -1,4-D-ksylozydazy były wyraźnie stymulowane przez dodatek do podłoża ksylanu, ksylobiozy, ligniny Krafta i kwasu syryngowego, przy czym związki te nie indukowały syntezy enzymów celulolitycznych.

Badania nad regulacją ekspresji endoksylianazy i celulaz u grzybów komplikują się z uwagi na fakt równoczesnej produkcji tych enzymów, a także ze względu na wykazywanie przez nie tzw. „krzyżowej aktywności substratowej”. Zauważono bowiem, że kiedy grzyby rosną tylko na ksylanie, większość gatunków produkuje specyficzne endoksylianazy z niewielką ilością (lub bez) celulaz, natomiast kiedy mikroorganizmy rosną na celulozie, to razem z celulazami produkowane są ksylanazy. Stwierdzono również, że wysoko oczyszczone frakcje enzymów celulolitycznych posiadają pewną niewielką aktywność wobec substratów hemicelulozowych, a oczyszczone enzymy ksylanolityczne są aktywne wobec substratów celulozowych [73]. Również Sachslehner i wsp. [77] opisali równoczesną syntezę ksylanaz, celulaz oraz mannanaz, przy czym próba indukcji syntezy jednych enzymów powodowała jednoczesną stymulację syntezy pozostałych.

W tym kontekście możliwa jest jednak izolacja mutantów produkujących enzymy, które nie posiadają aktywności celulaz, a także takich, które nie posiadają aktywności celulaz i ksylanaz jednocześnie [78]. Wysoka specyficzność ksylanaz wolnych od aktywności celulozowych jest wysoce pożądana w przemyśle papierniczym,

gdzie konieczne jest usunięcie hemiceluloz bez naruszenia struktury celulozy. Ponadto, ksylanazy pozbawione aktywności celulozowych, jak i celulazy wolne od aktywności ksylanazowych, mogą odegrać znaczącą rolę w dokładnym poznaniu struktury ścian komórkowych [79].

Genetyczna różnorodność enzymów ksylanolitycznych była obserwowana w co najmniej trzech różnych aspektach. Po pierwsze, bez względu na pochodzenie (organizmy anaerobowe, aerobowe, bakterie czy grzyby), genomy wielu mikroorganizmów zawierają po kilka niepolიცистronowych kopii loci, które kodują białka o pokrywających się funkcjach [80]. Jedynie w kilku przypadkach, szczególnie u *Eucaryota*, wielość polipeptydów o aktywności ksylanazy jest rezultatem zróżnicowania posttranslacyjnego [15].

Po drugie, w kilku przypadkach jeden gen koduje kilka domen katalitycznych. Produktem genu *xynC* u *Fibrobacter succinogenes* jest jeden polipeptyd z dwiema domenami katalitycznymi o aktywnościach ksylanazowych [81]. Podobny fakt został opisany w przypadku zduplikowanego genu u *Neocallimastix patriciarum*, gdzie loci *xyn* kodują polipeptydy o dwóch domenach katalitycznych [82].

Wreszcie po trzecie, u wielu mikroorganizmów kopie loci są fizycznie zgrupowane lub polიცистronowe. U *Caldocellum saccharolyticum* fragment DNA wielkości 6 kb zawiera pięć otwartych ramek odczytu kodujących endoksylianazę (*xynA*), egzo- β -1,4-D-ksylozydazę, (*xynB*), esterazę octanową (*xynC*) i dwie otwarte ramki odczytu o niezidentyfikowanych funkcjach [83]. Podobnie u *Bacteroides ovatus* fragment DNA wielkości 3,8 kb zawiera trzy otwarte ramki odczytu kodujące endo- β -1,4-ksylianazę, egzo- β -1,4-D-ksylozydazę i α -L-arabinofuranozydazę [84]. Dwie z tych aktywności (egzo- β -1,4-D-ksylozydazy i α -L-arabinofuranozydazy) są związane z jednym polipeptydem.

Poznanie struktury genów kodujących enzymy ksylanolityczne może być pierwszym krokiem w kierunku ekspresji sklonowanych genów w innych organizmach, uzyskania enzymów genetycznie ulepszonych, czy produkcji ich w większych ilościach, a w konsekwencji zastosowania ich na szeroką skalę.

Oddziaływania synergiczne pomiędzy enzymami ksylanolitycznymi nie zostały poznane i opisane w tak dokładny sposób jak w przypadku enzymów celulolitycznych. Grupy boczne w ksylanie są czynnikami znacznie ograniczającymi osiągnięcie efektywnej hydrolizy substratu [85]. W natywnej hydrolizie ksylanu obserwowane jest zjawisko synergizmu pomiędzy enzymami działającymi na główny łańcuch ksylanu, takimi jak endo- β -1,4-ksylianaza, a enzymami działającymi na boczne odgałęzienia łańcucha.

Wykazano, że mieszaniny esterazy i endoksylianazy lub α -D-glukuronidazy i endoksylianazy są bardziej efektywne w uwalnianiu odpowiednich podstawników niż esteraza lub α -D-glukuronidaza działające osobno. Fakt ten można wytłumaczyć występowaniem podstawników L-arabinofuranozowych i 4-O-metyloglukuronowych, które w sąsiedztwie reszt ksylozowych zapobiegają wiązaniu się esterazy lub α -D-glukuronidazy. Ograniczenie to znika jednakże po hydrolizie ksylooligomerów przez endoksylianazy [8].

Synergizm może również występować pomiędzy różnymi formami endoksyłanaz. Przykładem może być *F. succinogenes*, który produkuje dwie endo- β -1,4-ksylanazy. W przeciwieństwie do drugiej endoksyłanazy, endoksyłanaza pierwsza posiada również zdolność uwalniania arabinozy z łańcucha ksylanu. Wykazano, że uwolnienie arabinozy poprzedza hydrolizę łańcucha ksylanu do ksylooligosacharydów [86]. U *B. stearothermophilus* zaobserwowano synergizm pomiędzy endo- β -1,4-ksylanazą, egzo- β -1,4-D-ksylozydazą i esterazą octanową [87], a także między endo- β -1,4-ksylanazą, egzo- β -1,4-D-ksylozydazą i α -L-arabinofuranozydazą [88]. Efekt synergizmu zależny jest również znacznie od rodzaju użytego substratu. Proponowany przez Poutanen i Puls [14] mechanizm rozkładu ksylanu przez *T. reesei* zakłada, że endo- β -1,4-ksylanaza, rozpoczynając proces hydrolizy produkuje rozpuszczalne oligosacharydy degradowane następnie do monomerów. Niezbędne jest zatem współdziałanie różnych enzymów ksylanolitycznych.

Ogólnie rzecz biorąc esterazy degradujące ścianę komórkową roślin wykazują synergiczne działanie z innymi enzymami, takimi jak: endo- β -1,4-ksylanazy, α -L-arabinofuranozydazy, a także galaktozydazy, mannanazy, poligalakturonazy i ramnogalakturonazy.

Acetyloksylanoesteraza działając wspólnie z endo- β -1,4-ksylanazami zwiększa wyraźnie wydajność hydrolizy ksylanu, przy czym zakres działania synergicznego tych enzymów zależny jest od stopnia acetylacji substratu [89]. Esteraza acetyloksylanu odgrywa ważną rolę w rozkładzie naturalnego ksylanu przez tworzenie niepodstawionych miejsc w łańcuchu tego polimeru i liniowych β -ksylooligosacharydach. Dlatego w zaproponowanym mechanizmie hydrolizy ksylanu z udziałem enzymów *T. reesei*, endo- β -1,4-ksylanaza hydrolizuje ksylan do podstawionych ksylooligomerów, w których dostępne grupy *O*-acetylowe są atakowane przez acetyloksylanoesterazę. Z kolei grupy acetylowe zablokowane przez przyległe podstawniki kwasu 4-*O*-metyloglukuronowego stają się dostępne dla esterazy acetyloksylanu po wcześniejszym zadziałaniu α -D-glukuronidazy [14].

W doświadczeniach, w których ksylan pochodzący z twardego drewna inkubowano z oczyszczoną α -D-glukuronidazą nie zaobserwowano żadnego efektu działania enzymu na badany rodzaj substratu. Enzym ten nie był bowiem zdolny do usunięcia bocznych grup kwasu 4-*O*-metylo-D-glukuronowego z nieuszkodzonych ksylanów, ale był wysoce aktywny wobec fragmentów glukuronoksyłanu po wcześniejszym poddaniu ich działaniu endo- β -1,4-ksylanazy [90]. Podobne efekty synergistyczne zaobserwowano również pomiędzy α -D-glukuronidazą, endo- β -1,4-D-ksylanazą, egzo- β -1,4-D-ksylozydazą i α -L-arabinofuranozydazą [91].

7. Perspektywy zastosowania ksylanaz w przemyśle

Istnieje wiele możliwości praktycznego wykorzystania preparatów opisanych wcześniej enzymów ksylanolitycznych. Mogą one być użyte w różnych gałęziach

przemysłu, m.in. do wytwarzania pulpy drzewnej i zmiękczenia włókien roślinnych [92], zwiększania strawności pasz zwierzęcych [93] czy przetwarzania żywności [15]. Ksyłanazy są szczególnie użyteczne w obróbce mąki pszennej z powodu dużej zawartości w niej ksyłanów, a szczególnie arabinoksyłanów. Dowiedziono również, że enzymy te, dodawane do mąki w trakcie wypieku pieczywa znacznie podwyższają jego jakość [94]. Z kolei enzymatyczny rozkład ksyłanów zawartych w odpadach przemysłu rolnego może być z powodzeniem wykorzystany do produkcji ksylozy i dalszej jej przemiany do innych związków chemicznych, a szczególnie do wytwarzania na drodze fermentacji etanolu służącego do celów paliwowych i technicznych [95]. Obecnie ponad 80% produkowanego w kraju spirytusu otrzymywane jest z żyta. Z przeprowadzonych badań wynika, że zastosowanie enzymów ksyłanolitycznych do przerobu tego surowca pozwala w znacznym stopniu (nawet o 6%) zwiększyć wydajność otrzymywanego etanolu [102].

Uzyskana w procesie biokonwersji ksyłanu ksyloza może być efektywnie spożytkowana jako źródło węgla do produkcji pasz dla zwierząt [15]. Możliwe jest również otrzymanie z ksylozy ksyłitolu, używanego do celów medycznych jako substytutu cukru w leczeniu diabetyków. Należy także zaznaczyć, że niektóre grzybowe ksyłanazy są zaangażowane w uruchamianie odpowiedzi obronnej roślin na atak patogenów i w indukcji biosyntezy etylenu [96]. Wykonano również udane próby zastosowania unieruchomionych enzymów ksyłanolitycznych, np. do klarowania soków owocowo-warzywnych [97]. Ksyłanazy są ponadto wykorzystywane w procesach ekstrakcji kawy, produkcji olejów roślinnych i skrobi, gdzie zwiększają wydajność i jakość uzyskiwanych produktów [98].

Wzmożony wzrost zainteresowania enzymami ksyłanolitycznymi zaobserwowano w ciągu ostatnich dziesięciu lat, co wynika głównie z ich potencjalnego zastosowania w przemyśle papierniczym [19]. Jakość papieru zależy od czystości mas celulozowych i ilości zanieczyszczeń lignino-hemicelulozowych, które są odpowiedzialne za żółknięcie papieru. Mimo że istnieje kilka chemicznych metod oczyszczania mas celulozowych z zanieczyszczeń lignino-hemicelulozowych, to, jak się wydaje, metody enzymatycznej degradacji ligniny i hemiceluloz mogą znacznie polepszyć jakość produkowanego papieru. Ponieważ dotychczas nie są znane metody chemiczne pozwalające na selektywne usuwanie ksyłanu z mas celulozowych tak, by nie nastąpiło równoczesne naruszenie struktury celulozy, badania nad wykorzystaniem do tego celu enzymów ksyłanolitycznych nabierają szczególnego znaczenia.

Wytwarzanie pulpy drzewnej z użyciem metod biologicznych stwarza realną alternatywę dla obecnie stosowanych technik, pociągających za sobą degradację środowiska i wysokie koszty [99]. Wyniki doświadczeń uzyskanych z hodowli *Ceriporiopsis subvermispora* na drewnie osiki i sosny wykazały oszczędności energii przy produkcji wysokiej jakości papieru, rzędu, odpowiednio 47 i 37%, w porównaniu z użyciem do tego celu tradycyjnych metod chemicznych [100]. Enzymy ksyłanolityczne znalazły ponadto zastosowanie w zmniejszaniu zużycia dwutlenku chloru w procesie wybielania pulpy drzewnej bez uszkodzania włókien celulozowych papieru [101]. Ponadto prze-

mysł celulozowo-papierniczy wytwarza duże ilości odpadów (m.in. tzw. ługi posulfitowe), które mogą być utylizowane metodami biologicznymi przy znacznie zredukowanych kosztach. Surowce te, w postaci odpowiednio wzbogaconych hydrolizatów, mogą być przetwarzane przez drobnoustroje ksylanolityczne na białko lub etanol. W procesach tych są również wykorzystywane β -D-ksylanazy, pochodzące z grzybów lub bakterii.

Acetyloksylanoesteraza i esteraza ferulanowa usuwają selektywnie podstawniki i hydrolizują niektóre wiązania chemiczne w trakcie wytwarzania pulpy drzewnej, przez co ułatwiają rozpuszczenie kompleksów lignina-węglowodany. Po usunięciu grup acetylowych hemiceluloza krystalizuje i tworzy więcej struktur podobnych do celulozy, wpływając przez to na rozpuszczalność i spoistość pulpy. Enzymy te mogą być zatem pomocne w usuwaniu ligniny z pulpy celulozowej, a także wpływać na rozpuszczalność ligniny przez rozszczepianie wiązań estrowych między kwasami aromatycznymi i ligniną z jednej strony, a ligniną i hemicelulozami z drugiej. Jeśli esterazy są używane razem z endoksylianazami lub innymi enzymami ksylanolitycznymi w procesie wytwarzania pulpy drzewnej i jej bielenia, to mogą one częściowo rozrywać i rozluźniać strukturę ściany komórkowej. W tych warunkach kompleks lignina-węglowodany jest bardziej wrażliwy na atak enzymatyczny, a produkty jego degradacji są bardziej rozpuszczalne w roztworach alkalicznych. Zwiększona podatność ligniny na ługowanie powoduje z jednej strony obniżenie zużycia chloru w etapie wybielania, zaś z drugiej prowadzi do otrzymania jaśniejszej pulpy [36].

8. Podsumowanie

Z dokonanego przeglądu piśmiennictwa wynika, że enzymatyczna hydroliza ksylanów pochodzenia roślinnego oraz wykorzystanie zasobów cukrowych tkwiących w tych biopolimerach stanowi nadal aktualny i ważny problem biotechnologiczny. Jego rozwiązanie może przynieść duże korzyści ekonomiczne w przemyśle celulozowo-papierniczym, fermentacyjnym, paszowym i spożywczym. W ostatnich latach dokonał się duży postęp w oczyszczaniu ksylanaz, poznaniu ich struktury molekularnej oraz zbadaniu genów odpowiedzialnych za syntezę tych enzymów. Poświęcono również wiele uwagi określeniu zarówno liczby, jak i właściwości enzymów ksylanolitycznych. Jednakże dotychczas niewiele jest doniesień na temat oddziaływań synergistycznych pomiędzy poszczególnymi enzymami kompleksu ksylanolitycznego. Kontynuacja tych badań zmierza w kierunku lepszego zrozumienia mechanizmów regulacji syntezy ksylanaz, poprawy ich stabilności oraz otrzymania genetycznie zmodyfikowanych mikroorganizmów ukierunkowanych na szybką i wydajną produkcję tych enzymów w skali technicznej.

Literatura

1. Leonowicz A., Matuszewska A., Luterek J., Ziegenhagen D., Wojtaś-Wasilewska M., Cho N.-S., Hoffrichter M., Rogalski J., (1999), *Fung. Genet. Biology*, 27, 175-185.
2. Bajpai P., (1999), *Biotechnol. Progr.*, 15, 147-157.
3. Saha B. C., (2003), *J. Indust. Microb. Biotechnol.*, 30, 279-291.
4. Shallom D., Shoham Y., (2003), *Cur. Opin. Microbiol.*, 6, 219-228.
5. Tenkanen M., (2004), *Hemicelluloses: Sc. Technol.*, 864, 292-311.
6. Puls J., Poutanen K., (1989), in: *Enzyme Systems for Lignocellulose Degradation*, Ed. Coughlan M. P., Elsevier Applied Science, London, New York, 151-165.
7. Eriksson K.-E. L., Blanchette R. A., Ander P., (1990), *Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components*, Ed. Timell T. E., Springer-Verlag Berlin, 181-224.
8. Puls J., (1997), *Chemistry and biochemistry of hemicelluloses: Relationship between hemicellulose structure and enzymes required for hydrolysis*, *Macromol. Symp.*, 120, 183-196.
9. Shatalov A. A., Evtuguin D. V., PascoalNeto C., (1999), *Carbohydr. Res.*, 320, 93-99.
10. Poutanen K., (1988), *Diss. Techn. Res. Centre, Finland, Publications*, 47, 1-59.
11. Puls J., Schuseil J., (1993), *Hemicelluloses and Hemicellulases*, Eds. Coughlan M. P., Hazlewood G. P., Portland Press, London, 1-27.
12. Puls J., (1982), *Energy from Biomass*, 2nd E. C. Conference, Eds. Stubb A., Chartier P., Schleser G., Applied Science Publishers, London, 863-867.
13. Debeire P., Strecker B., Vignon M., (1990), *Eur. J. Biochem.*, 187, 573-580.
14. Poutanen K., Puls J., (1989), *Plant Cell Wall Polymers: Biogenesis and biodegradation*, Eds. Lewis N. G., Paice M. G., ACS Symp. Ser. 399, American Chemical Society, Washington, 630-640.
15. Biely P., (1985), *Trends Biotechnol.*, 3, 286-290.
16. Lin L. L., Thomson J. A., (1991), *FEMS Microbiol. Lett.*, 84, 197-204.
17. Pohlschroder M., Leschine S. B., Canale-Parola E., (1994), *J. Bacteriol.*, 176, 70-76.
18. Whitmire D., Maiti B., (2002), *Chem. Eng. Commun.*, 189, 608-622.
19. Spiridon I., Duarte A. P., Curto J., (2003), *Cellulose Chem. Technol.*, 37, 497-504.
20. Kimura T., Suzuki H., Furuhashi H., Aburatani T., Morimoto K., Kanta S., Sakka K., Ohmiya K., (2000), *Biotechnol. Biochem.*, 64, 2734-2738.
21. Rani D. S., Nand P., (2001), *Anaerobe*, 7, 45-53.
22. Tenkanen M., Puls J., Poutanen K., (1992), *Enzyme Microb. Technol.*, 14, 566-574.
23. van Doorslaer E., Kersters-Hilderson H., de Brune C. K., (1985), *Carbohydr. Res.*, 140, 342-346.
24. Dekker R. F. H., (1983), *Biotechnol. Bioeng.*, 25, 1124-1146.
25. Kitpreechavanich V., Hayashi M., Nagai S., (1986), *J. Ferment. Technol.*, 62, 63-69.
26. Kiss T., Kiss L., (2000), *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 16, 465-470.
27. Kumar S., Ramon D., (1996), *FEMS Microbiol. Lett.*, 135, 287-293.
28. Hashimoto T., Morishita M., Iwashita K., Shimoi H., Nakata Y., Tsuji Y., Ito K., (1999), *J. Biosci. Bioeng.*, 88, 479-483.
29. Yanai T., Sato M., (2001), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65, 527-533.
30. Li Y. K., Yao H. J., Cho Y., (2000), *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 31, 119-125.
31. Kaji A., Schimokawa K., (1984), *Agric. Biol. Chem.*, 48, 67-72.
32. Renner M. J., Breznak J. A., (1998), *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 43-52.
33. Poutanen K., (1988), *J. Biotechnol.*, 7, 271-282.
34. Wood T. M., McCrae S. I., (1996), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 45, 538-545.
35. Saha B. C., Bothast R. J., (1998), *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 216-220.
36. Lee S. F., Forsberg C. W., (1987), *Can. J. Microbiol.*, 33, 1011-1016.
37. Yanai T., Sato M., (2000), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64, 1181-1188.
38. Komae K., Kaji A., Sato M., (1982), *Agric. Biol. Chem.*, 46, 1899-1905.
39. Golan G., Shallom D., Teplitsky A., Zaide G., Shulami S., Baasov T., Stojanoff V., Thompson A., Shoham Y., Shoham G., (2004), *J. Biol. Chem.*, 279, 3014-3024.
40. Siika-aho M., Tenkanen M., Buchert J., Puls J., Yikari L., (1994), *Enzyme Microb. Technol.*, 16, 813-819.

41. Biely P., de Vries R. P., Vršanská M., Visser J., (2000), *BBA – Gen. Subjects*, 1474, 360-364.
42. Dekker R. F. H., (1985), *Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components*, Ed. Higuchi T., Acad. Press, Orlando, 505-533.
43. Puls J., Schmidt O., Granzow C., (1987), *Enzyme Microb. Technol.*, 9, 83-88.
44. Khandke K. M., Vithayathil P. J., Murthy S. K., (1989), *Arch. Biochem. Biophys.*, 247, 511-517.
45. Tenkanen M., Siika-aho M., (2000), *J. Biotechnol.*, 78, 149-161.
46. de Vries R., Poulsen C. H., Madrid S., Visser J., (1998), *J. Bacteriol.*, 180, 243-249.
47. Siika-aho M., Tenkanen M., Buchert J., Puls J., Viikari L., (1994), *Enzyme Microb. Technol.*, 16, 813-819.
48. Choi I. D., Kim H. Y., Choi Y. J., (2000), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64, 2530-2537.
49. Smith M. M., Hartley R. D., (1983), *Carbohydr. Res.*, 118, 65-80.
50. Koseki T., Furuse S., Iwano K., Sakai H., Matsuzawa H., (1997), *Biochem. J.*, 326, 485-490.
51. Basaran P., Hang Y. D., (2000), *Let. Appl. Microbiol.*, 30, 167-171.
52. Mukhopadhyay A., Hazra P. P., Sengupta T., Ghosh A. K., Sengupta S., (1997), *Biotechnol. Lett.*, 19, 159-161.
53. Biely P., Puls J., Schneider H., (1985), *FEBS Lett.*, 186, 80-84.
54. Sunna A., Antranikian G., (1997), *Crit. Rev. Biotechnol.*, 17, 36-69.
55. Blum D. L., Li X. L., Chen H. Z., Ljungdahl L. G., (1999), *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 3990-3995.
56. Egana L., Gutiérrez R., Caputo V., Peirano A., Steiner J., Eyzaguirre J., (1996), *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 24, 33-39.
57. Degrassi G., Okeke B. C., Bruschi C. V., Yenturi V., (1998), *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 789-792.
58. Shao W., Wiegel J., (1995), *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 729-733.
59. Williamson G., Kroon P. A., Faulds C. B., (1998), *Microbiology*, 144, 2011-2023.
60. Christov L. P., Prior B. A., (1993), *Enzyme Microb. Technol.*, 15, 460-475.
61. Helm R. F., Ralph J., Halfield R. D., (1992), *Carbohydr. Res.*, 229, 183-194.
62. Fry S. C., (1982), *Biochem. J.*, 203, 493-504.
63. Donaghy J. A., McKay A. M., (1997), *J. Appl. Microbiol.*, 83, 718-726.
64. Faulds C. B., Williamson G., (1994), *Microbiology – Engl. Tr.*, 140, 779-787.
65. Donaghy J. A., Bronnenmeier K., Soto-Kelly P. F., McKay A. M., (2000), *J. Appl. Microbiol.*, 88, 458-466.
66. Defaye J., Guillot J. M., Biely P., Vrsanska M., (1992), *Carbohydr. Res.*, 228, 47-64.
67. Biely P., Petráková E., (1984), *J. Bacteriol.*, 160, 408-412.
68. Linder C., Stülke J., Hecker M., (1994), *Microbiology*, 140, 753-757.
69. Li X. L., Ljungdahl L. G., (1994), *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 3160-3166.
70. Eriksson K.-E. L., Goodell E. W., (1974), *Can. J. Microbiol.*, 20, 371-378.
71. McKenzie C. R., Bilous D., Schneider H., Johnston K. G., (1987), *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 2835-2839.
72. Steiner W., Lafferty R. M., Gomes I., Esterbauer H., (1987), *Biotechnol. Bioeng.*, 30, 169-178.
73. Hrmová M., Biely P., Vršanská M., (1986), *Arch. Microbiol.*, 144, 307-311.
74. Hrmová M., Biely P., Vršanská M., (1989), *Enzyme Microb. Technol.*, 11, 610-616.
75. Morosoli R., Bertrand J.-L., Mondou F., Shareck F., Kluepfel D., (1986), *Biochem. J.*, 239, 587-592.
76. Godden B., Legon T., Helvenstein P., Pennincks M., (1989), *J. Gen. Microbiol.*, 135, 285-292.
77. Sachslehner A., Nidetzky B., Kulbe K., Haidrich D., (1998), *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 594-600.
78. Morosoli R., Bertrand J.-L., Mondou F., Shareck F., Kluepfel D., (1986), *Biochem. J.*, 239, 587-592.
79. Wood T. M., McCrae S. I., (1986), *Carbohydr. Res.*, 148, 331-334.
80. Ali B. R. S., Zhou L., Graves F. M., Freedman R. B., Black G. W., Gilbert H. J., Hazlewood G. P., (1995), *FEMS Microbiol. Lett.*, 125, 15-22.
81. Zhu H., Paradis F. W., Krell P. J., Phillips J. P., Forsberg C. W., (1994), *J. Bacteriol.*, 176, 3885-3894.
82. Gilbert H. J., Hazlewood G. P., Laurie J. L., Orpin C. G., Xue G. P., (1992), *Mol. Microbiol.*, 6, 2065-2072.
83. Lüthi E., Love D. R., Mcanulty J., Wallace C., Caughey P. A., Saul D., Bergquist P. L., (1990), *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1017-1024.

84. Whitehead T. R., Hespell R. B., (1990), *J. Bacteriol.*, 172, 2408-2412.
85. Debeire P., Strecker B., Vignon M., (1990), *Eur. J. Biochem.*, 187, 573-580.
86. Matte A., Forsberg C. W., (1992), *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 157-168.
87. Suh J. H., Choi Y. J., (1996), *J. Microbiol. Biotechnol.*, 6, 173-178.
88. Suh J. H., Choi, Y. J., (1996), *J. Microbiol. Biotechnol.*, 6, 179-183.
89. Biely P., McKenzie C. R., Puls J., Schneider H., (1986), *Bio/Technology*, 4, 731-733.
90. Smith D. C., Forsberg C. W., (1991), *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 3552-3556.
91. Castanares A., Hay A. J., Gordon A. H., McCrae S. L., Wood T. M., (1995), *J. Biotechnol.*, 43, 183-194.
92. Sharma H. S. S., (1987), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 26, 358-362.
93. Wong K. K. Y., Tan L. U. L., Saddler J. N., (1988), *Microbiol. Rev.*, 52, 305-317.
94. Grajek W., Malepszy S., (1998), *Przem. Spoż.*, 52, 13-16.
95. Ferreira-Filho E. X., (1994), *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 27, 1093-1109.
96. Dean J. F. D., Andersen J. D., (1991), *Plant Physiol.*, 95, 316-323.
97. Allenza P., Scherl D. S., Detroy R. W., Leathers T. D., (1986), *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, 17, 425-433.
98. Wong K. K. Y., Saddler J. N., (1993), *Hemicelluloses and Hemicellulases*, Eds. Coughlan M. P., Hazlewood G. P., Portland Press, London, 127-143.
99. Breen A., Sigleton F. L., (1999), *Curr. Opin. Biotechnol.*, 10, 252-258.
100. Messner K., Srebotnik E., (1994), *FEMS Microbiol. Rev.*, 13, 351-364.
101. Ragauskas A. J., (2002), *Progress in Biotechnology*, Eds. Viikari L., Lantto R., Elsevier, Amsterdam, 7-12.
102. Czarnecki Z., Nowak J., (2001), *Food Science and Technology*, 4, 1-9.