

**Andrzej Leonowicz,
Maria Wojtaś-Wasilewska,
Jerzy Rogalski,
Jolanta Luterek**

Zakład Biochemii,
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
Lublin

Enzymatyczna transformacja ligninocelulozy

Zasoby różnych form ligninocelulozy na kuli ziemskiej są tak olbrzymie, że porównać je można jedynie do globalnych zasobów wody. Według Bellamy'ego (1) światowa produkcja ligninocelulozy przez rośliny wynosi 24 tony rocznie, w przeliczeniu na osobę (1,2). Wziąwszy pod uwagę fakt, że jest to substancja organiczna, wydaje się, że tylko jeden krok dzieli nas od uczynienia zeń źródła żywności i problem głodu na ziemi byłby rozwiązany.

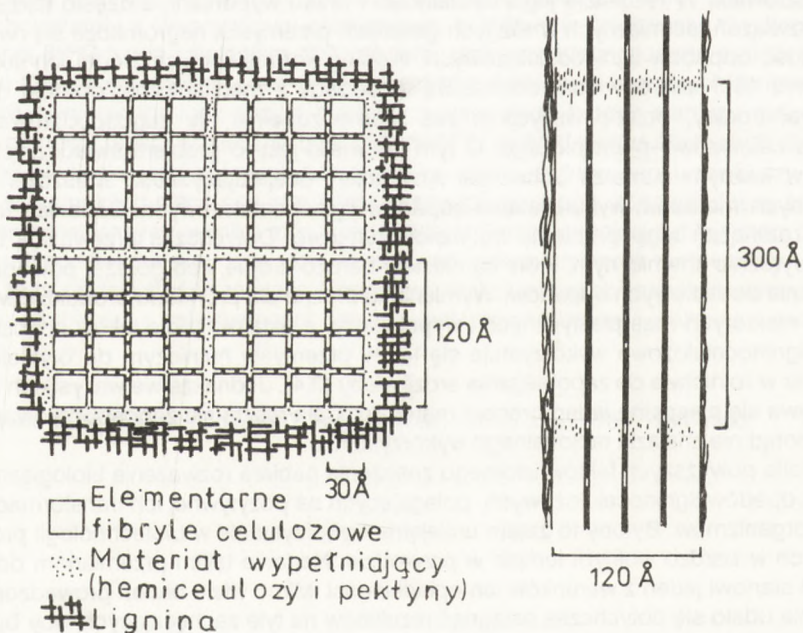
Ten niestety nietławy krok to przekształcenie ligninocelulozy na produkty łatwo przyswajalne przez organizmy zwierzęce, ale jak wykonać ten krok? A może należałoby podpatrzeć w tym względzie samą przyrodę? Okazuje się, że gdyby nie działalność niektórych bakterii i grzybów mielibyśmy na powierzchni ziemi niemalże wyłącznie ligninocelulozę. Tak jednakże nie jest, bowiem surowiec ten jest nieustannie przerabiany przez mikroorganizmy na produkty służące im jako źródło pokarmu. Niestrawione przez drobnoustroje resztki wzbogacają glebę w próchnicę oraz różne niskocząsteczkowe związki typu fenoli i węglowodanów. Próchnica jednak nie nagromadza się w glebie w nadmiarze. Dowiedziono, że ma ona także swoich odbiorców w postaci mikroorganizmów, które przerabiają ją stopniowo w połączenia coraz bardziej proste, aż do dwutlenku węgla i wody.

Niestety, w ustaloną od tysiącleci równowagę tych procesów – często w sposób brutalny – wkracza człowiek. W rezultacie jego działalności i braku wyobraźni, a często także niedoskonałości rozwiązań technicznych w różnych gałęziach przemysłu, nagromadza się na świecie olbrzymia ilość odpadów ligninocelulozowych. Według kompetentnych źródeł ich ilość przekracza obecnie 150 miliardów ton rocznie. Są to odpady z mechanicznej obróbki drewna, np. gałęziówka, trociny, przede wszystkim zaś prawie zupełnie nie zagospodarowane odcieki przemysłu celulozowo-papierniczego. O tym jak wielki jest to problem świadczy cały osobny rozdział, w każdym numerze „Chemical Abstracts”, obejmujący setki streszczeń publikacji, poświęconych metodom wykorzystania odpadów ligninocelulozowych. Badania i sugerowane sposoby rozwiązań tego problemu są wielokierunkowe. Dotychczas przeważają technologie o profilu wyraźnie chemicznym, które są niestety bardzo drogie, i co gorsza, powodują z reguły powstawanie dodatkowych odpadów. Wymienić tu można dla przykładu produkcję waniliny, wytwarzanie niektórych mas plastycznych i wypełniaczy, a ostatnio także leków onkostatycznych. Odpady ligninocelulozowe wykorzystuje się też w przemyśle hutniczym do brykietowania rud miedzi oraz w rolnictwie do zapobiegania erozji gleby (3,4). Jednakże we wszystkich tych procesach zużywa się niespełna jeden procent materiału. Cała reszta nie zagospodarowanych odpadów, jak dotąd nie znalazła racjonalnego wykorzystania.

W świetle powyższych faktów istotnego znaczenia nabiera rozważenie biologicznych metod utylizacji odpadów ligninocelulozowych, polegających na pozytywnej ich transformacji przy użyciu mikroorganizmów. Byłoby to zatem umiejętne wykorzystanie w biotechnologii procesów zachodzących w bardzo wolnym tempie w przyrodzie. Nadanie takim przemianom odpowiedniej szybkości stanowi jeden z warunków ich opłacalności. Mimo wielu badań prowadzonych w tym zakresie nie udało się dotychczas osiągnąć rezultatów na tyle zachęcających, aby były możliwe do zastosowania na szerszą skalę. Prace rozpoznawcze prowadzone są w dwóch kierunkach. Jeden z nich – to bezpośrednie zbiałczanie odpadów ligninocelulozowych na drodze hodowli

wyselekcjonowanych grzybów lub bakterii, których biomasę można by przeznaczyć bądź na paszę, bądź do spożycia przez ludzi (1,5–7). Drugi, – to stopniowa transformacja obu składników kompleksu ligninocelulozy w niskocząsteczkowe związki użyteczne dla przemysłu organicznego, jak np. glukoza (8), etanol (4) lub metanol (9). Oba te kierunki są w równym stopniu atrakcyjne. Jednakże autorzy tego opracowania skoncentrują się głównie na zagadnieniach związanych z drugim kierunkiem.

Na wstępie warto sobie uświadomić dlaczego proces degradacji ligninocelulozy w przyrodzie odbywa się tak niezmiernie wolno. Martin i wsp. (10) podają, że całkowita biodegradacja ligninowego składnika kompleksu trwa od 9 do 21 lat. Wynika to z budowy kompleksu, którego zadaniem jest nadawanie roślinom niezbędnej sztywności. Ligninoceluloza stanowi rodzaj „żelbetonu” w świecie roślin. O tym jak dalece solidny jest to budulec może świadczyć fakt, że gdyby na przykład jeden z najwyższych wieżowców świata, 107-piętrowy *The World Trade Center* w Nowym Jorku miał fundamenty drewniane to byłyby one stokrotnie lżejsze od tradycyjnego betonu, a sam budynek, tzn. przynajmniej jedno z jego bliźniaczych skrzydeł, mogłoby z powodzeniem być posadowione na dwudziestu palach o średnicy nie przekraczającej jednego metra. Wnioskując dalej, gdyby wieżowiec zbudowany był z drewna, to przy takim obwodzie mógłby być dziesięciokrotnie wyższy, czyli miałby ponad tysiąc pięter. Skąd taka odporność ligninocelulozy? Przyjrzyjmy się bliżej strukturze tego naturalnego kopolimeru (rys. 1). Jest to zwarty, niemal krystaliczny monolit. Jego polisacharydowe składniki, występujące w formach mikrofibrilli, są ściśle „upakowane” w warstwach ligniny, która chroni je przed działaniem enzymów hydrolitycznych i innych czynników zewnętrznych, a także wybitnie stabilizuje strukturę kompleksu. Doszukując się analogii z żelbetonem, fibryle celulozy można by przyrównać do stalowych prętów wkomponowanych w ligninę, stanowiącą rodzaj betonu. Obraz przedstawiony na rys. 1 narzuca przypuszczenie, że wynalazca żelbetonu musiał się wcześniej konsultować ze specjalistami ds. struktury drewna. Jest jasne, że tak silnie „upakowany” kompleks musi być odporny na atak mikrobiologiczny. Jest to szczególnie istotne dla składnika celulozowego, który otoczo-

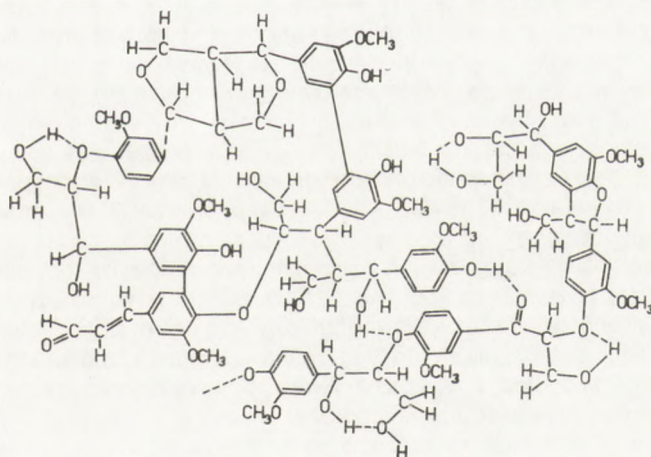


Rys. 1. Model organizacji ultrastruktury składników ściany komórkowej drewna (11).

ny szczelnie bardzo stabilnymi cząsteczkami ligniny może pełnić wyznaczoną mu funkcję biologiczną bez obawy o biodegradację. Tutaj rysuje się zasadniczy problem dla biotechnologii, tj. jak sforsować „barierę ligninową” by dostać się do glukozodajnej celulozy? Biotransformacja wolnej celulozy bądź hemiceluloz do cukrów prostych jest procesem znanym od lat i przebiega stosunkowo łatwo. Wiele znanych celulolitycznych gatunków grzybów dysponuje pełnym garniturem hydrolaz, zdolnych do wydajnej produkcji cukrów prostych ze wszystkich polisacharydowych składników ligninocelulozy, pod warunkiem jednak, że składniki te nie występują w kompleksie z ligniną. Na przykład, kompleks hydrolaz z *Aspergillus terreus terreus* F-413, immobilizowany w naszym laboratorium na aktywowanym nośniku szklanym, uwalniał monosacharydy ze wszystkich badanych celulozowych substratów (12).

Problemem jest zatem lignina i stworzona przez nią bariera dla enzymów hydrolitycznych. Stąd prowadzone między innymi wieloletnie badania nad biologiczną transformacją tego polimeru. Celem ich jest jednak nie tylko sforsowanie wspomnianej już bariery, ale również uczynienie z mało pożytecznej ligniny wartościowych substratów dla biotechnologii. Ma to szczególne znaczenie w odniesieniu do produktów odpadowych, powstających w przemyśle celulozowo-papierniczym. Odpadem w tym przypadku jest właściwie cała lignina zawarta w drewnie stosowanym jako surowiec, nieco tylko zmieniona chemicznie w wyniku stosowanej technologii (tzw. kwasy lignosulfonowe). Zagospodarowanie tych odpadów jest wielkim problemem bieżącego stulecia (4).

Lignina jest wysoce odporna na wszelkiego rodzaju transformacje. Wynika to z jej zwartej struktury przestrzennej. Polimer ten jest zbudowany z aromatyczno-alfatycznych podjednostek fenylopropanowych, połączonych między sobą silnymi wiązaniami chemicznymi typu C-C oraz C-O-C, a także słabymi wiązaniami wodorowymi, co daje w efekcie „upakowany” w przestrzeni monolit (rys. 2). Atomy węgla budulcowych podjednostek, zarówno w pierścieniu aromatycznym jak i łańcuchu bocznym, mogą wiązać grupy metoksyłowe, hydroksyłowe, karbonyłowe i karboksyłowe. Stwarza to niemal nieograniczoną możliwość tworzenia wiązań wodorowych pomiędzy różnymi fragmentami makrocząsteczki, i nadaje ligninie, prawie przysłowiową już stabilność.



Rys. 2. Fragment struktury przestrzennej makrocząsteczki ligniny z uwzględnieniem wiązań wodorowych wg Braunsa (13).

Pomimo tak dużej odporności lignina, a co za tym idzie i cały kompleks ligninocelulozy, może być transformowany przez pewne mikroorganizmy, zwłaszcza zaś grzyby. To, że niektóre zwierzęta posiadają również tę zdolność (np. termity) jest rezultatem działania ich flory jelitowej. Zdolność degradacji drewna przez grzyby wynika nie tylko z organizacji ich strzępek, umożliwiającej łatwiejszą penetrację grzyba w głąb ściany komórkowej rośliny, lecz także z obecności enzymów rozkładających celulozę, hemicelulozy, ligninę i inne substancje wchodzące w skład kompleksu. Enzymy dyfundują przez ścianę komórkową grzyba do otaczającego podłoża i tam spełniają swoją funkcję, polegającą na przetwarzaniu składników polisacharydowych oraz ligniny. Transformacja ligninocelulozy jest zatem procesem biochemicznym, a enzymy biorące w nim udział mogą być indukowane składnikami podłoża. Lakaza grzybowa (oksydaza polifenolowa) indukuje się preparatami ligniny (14) bądź niskocząsteczkowymi produktami jej rozkładu (15–19), np. kwasami metoksyfenolowymi. Obecność tych kwasów w podłożu, jak wykazano w naszym laboratorium, powoduje tworzenie mRNA swoistego dla syntezy indukcyjnych form enzymu (20–22). Podobne wyniki uzyskano dla dioksygenazy protokatechanowej, indukującej się związkami o charakterze ortodifenoli (23), oraz celulaz indukowanych hydrolizatami celulozy (8). Taki mechanizm nie zawsze jest regułą, np. odkryta niedawno ligninaza (ligninowa peroksydaza) (24,25) nie indukuje się ligniną zawartą w podłożu, aczkolwiek jest również enzymem indukcyjnym. Nasuwa się pytanie czy jest to indukcja substratem? Chyba nie, jeżeli mechanizm nie potwierdza się we wszystkich badanych przypadkach. Być może w omawianych przykładach chodzi o obronę organizmu przed toksycznym działaniem składnika podłoża, jak to się dzieje podczas indukcji lakazy. Wykazano, że efekty metaboliczne oddziaływania na grzybnię trucizn w rodzaju pięciochlorofenolu, są bardzo zbliżone do efektów obserwowanych podczas działania związków fenolowych, będących substratami, a zarazem induktorami lakazy (26). W obu przypadkach wraz ze stymulacją aktywności enzymu następowało uwalnianie nieorganicznych fosforanów, znaczne obniżenie tempa procesów fosforylacyjnych, a w końcu zahamowanie syntezy ATP. Po pewnym czasie, który można skrócić dodając do kultury glukozę, energetyczne procesy wracały do normy przy jednoczesnym obniżeniu aktywności lakazy, co wskazuje, że stymulacja lub hamowanie syntezy tego enzymu wiąże się z energetyczną gospodarką ustroju. Jeżeli pierwotny stosunek fosforu do tlenu zostanie zakłócony działaniem związku fenolowego lub innej trucizny, organizm zdobywa się na wzmożoną produkcję enzymu unieszkodliwiającego toksyczny czynnik (26,27). Niektóre produkty utleniania toksycznych związków fenolowych przez lakazę, np. kwasu ferulowego, mogą oddziaływać stymulująco na vegetację grzybów. Byłoby to zatem swoiste pozytywne sprzężenie zwrotne pozwalające na przekształcenie trucizny w substancję pożyteczną dla organizmu (18,20). W tym świetle zrozumiałe jest dlaczego lignina, jako związek mało aktywny i nietoksyczny, w przeciwieństwie do niskocząsteczkowych fenolopochodnych nie indukowała ligninazy (28,29), zaś taki proces wymuszały warunki głodu (30,31), bądź działanie niektórych niskocząsteczkowych połączeń aromatycznych, np. alkoholu weratrylowego (32–34). Mechanizm indukcji enzymów funkcjonujących w transformacji ligninocelulozy jest więc być może kluczem do wyjaśnienia tego procesu.

Jak enzymy wydostają się na zewnątrz strzępki grzybni? Grzyby rozkładające drewno wrastają zwykle w strefę zdrewniałych komórek. Grzyby tzw. „miękkiej zgnilizny drewna” rosną we wtórnej ścianie włókna drewna i tworzą cylindryczne otwory o stożkowatych zakończeniach. Grzyby „brunatnej” i „białej zgnilizny drewna” rosną w świetle komórki. Ich strzępki penetrują (migrują) od jednej komórki do drugiej przez otwory normalnie występujące w drewnie lub przez kanały wydrążone wcześniej w ścianie komórkowej.

„Miękką zgnilizną” powoduje zmiękczenie powierzchniowej warstwy drewna, stąd wywodzi się nazwa dla tej grupy grzybów. Proces polega na wstępnej transformacji obu składników drewna wg mechanizmu, który nie jest jeszcze znany (35). Przedstawicielem tej grupy jest *Chaetomium globosum*, gatunek rosnący na drewnie zanurzone w wodzie, np. na palach podtrzymujących drewniane konstrukcje wodne. W naszym laboratorium wykazano, że inny gatunek

„miękkiej zgnilizny” *Chaetomium piluliferum* syntetyzuje demetylazę kwasu weratrowego oraz dioksygenazę protokatechanową, enzymy czynne w transformacji ligniny (23, 73).

Grzyby „białej” i „brunatnej zgnilizny” drewna wydajnie skracają trójwęglowe łańcuchy boczne, demetylują i rozrywają aromatyczne pierścienie w jednostkach strukturalnych ligniny, przy czym dominującą rolę w tych procesach przypisuje się raczej „białej zgniliznie drewna” (36). Przedstawicielami tej grupy, znanymi destruktorami ligniny, są *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* i *Pleurotus ostreatus*. Ostatni gatunek, jako jadalny, był w naszym laboratorium badany pod kątem przydatności do produkcji biomasy grzybowej na różnych odpadach, między innymi z produkcji celulozy (37). Z komórek tego grzyba wyodrębniono też i oczyszczono enzym rozrywający pierścień aromatyczny w kwasie protokatechowym (38).

Atak grzybów „brunatnej zgnilizny” charakteryzuje się stopniowym zmniejszaniem grubości ścian komórki, co spowodowane jest enzymatyczną hydrolizą polisacharydów, z nieznacznym tylko naruszeniem struktury składnika ligninowego (39). Bardziej znanym przedstawicielem tej grupy grzybów jest *Lenzites trabea*. Nazwa „brunatna zgnilizna” pochodzi od obserwowanego brunatnienia podłoża przez gatunki tej grupy na skutek rozkładu jasnej celulozy, a pozostawienia brunatnej ligniny. „Biała zgnilizna” działa na odwrót, powodując rozjaśnienie podłoża dzięki transformacji brunatnej ligniny.

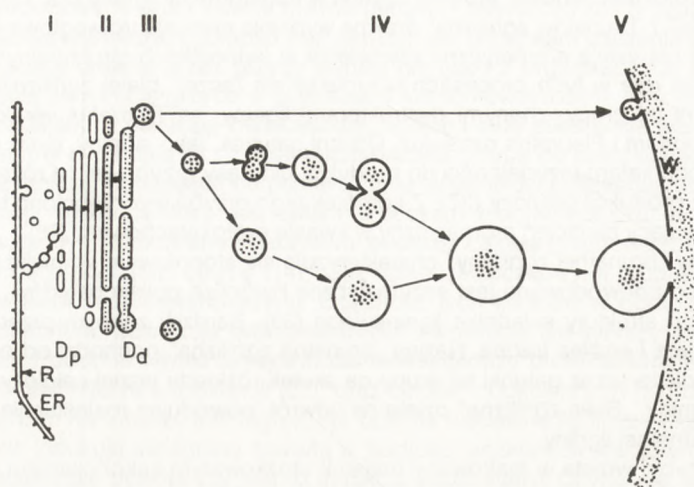
Strzępek grzybni wrasta w atakowany materiał stożkowatym zakończeniem wydłużonej komórki o kształcie wrzeciona. Jest to szczytowa strefa komórki, gdzie notuje się najszybszy przyrost strzępki, której długość nie przekracza zwykle dziesięciu mikrometrów. Powyżej tej odległości od szczytu praktycznie nie stwierdza się już żadnego wchłaniania przetworzonych substratów do wnętrza komórki. Obszar wierzchołkowy strzępki wyróżnia się bardzo wyraźnie pod względem cytologicznym i funkcjonalnym od dalszych jej segmentów. W strefie szczytowej tego fragmentu komórki znajdują się liczne pęcherzyki cytoplazmatyczne, pełniące funkcje transportowe dla substratów i enzymów uczestniczących w tworzeniu ściany komórkowej, a także enzymów wydzielanych poza komórkę.

Pęcherzyki cytoplazmatyczne tworzą się w tzw. diktiozomach aparatu Golgiego, położonych w pobliżu reticulum endoplazmatycznego. Fazą przejściową są cysterny, wytwarzające się z błony reticulum, które stopniowo wypełniają się treścią, a następnie dzielą się na mniejsze fragmenty – pęcherzyki. Od diktiozomów pęcherzyki podążają do szczytu wierzchołka strzępki, gdzie mogą przenikać bądź do obszaru syntezy systemu własnej ściany komórkowej, bądź też wydzielać swoją zawartość na zewnątrz komórki, jak to przedstawia schemat Grove i wsp. (40; rys. 3).

Mechanizm tworzenia pęcherzyków, ich migracji i ostatecznego wydzielenia treści na zewnątrz komórki nie jest dotychczas bliżej poznany. Wiadomo natomiast, że enzymy produkowane tą drogą i wydzielane do środowiska są trwale i zdolne do funkcjonowania poza komórką. Panuje pogląd, że takie jest pochodzenie większości enzymów transformujących lignino-celulozę.

Szukając odpowiedzi na pytanie w jaki sposób mikroorganizmy rozkładają składniki zdrewniałych części roślin oparto się na założeniu, że jest to proces enzymatyczny, a także, że kluczowym jego zadaniem jest transformacja ligninowej części kompleksu. Już w latach trzydziestych czyniono pierwsze próby delignifikacji drewna przez grzyby białej zgnilizny. Badania Campbella (41) i Wiertelaka (42) z tego okresu wykazały, że najaktywniej delignifikująco oddziałują na drewno grzyby *Trametes versicolor* i *Trametes pini*. W kilkanaście lat później przeprowadzono bardziej szczegółową analizę postępu delignifikacji trocin bukowych przez takie gatunki białej zgnilizny jak *Polyporus abietinus*, *Stereum rugosum* i *Marasmius scorodionius* (43). W pracach tych po raz pierwszy wykazano równoległość delignifikacji i rozkładu celulozy. Pogląd ten utrzymuje się aż dotąd, nie zostały bowiem potwierdzone doniesienia Gottlieba i wsp. z roku 1950 o możliwości wzrostu grzybni na ligninie jako jedynym źródle węgla (44).

Do bliższego poznania etapów transformacji ligniny przyczynił się postęp w zakresie technik analitycznych. W 1960 r. Fukuzumi (45) stosując chromatografię bibulową zidentyfikował w kul-



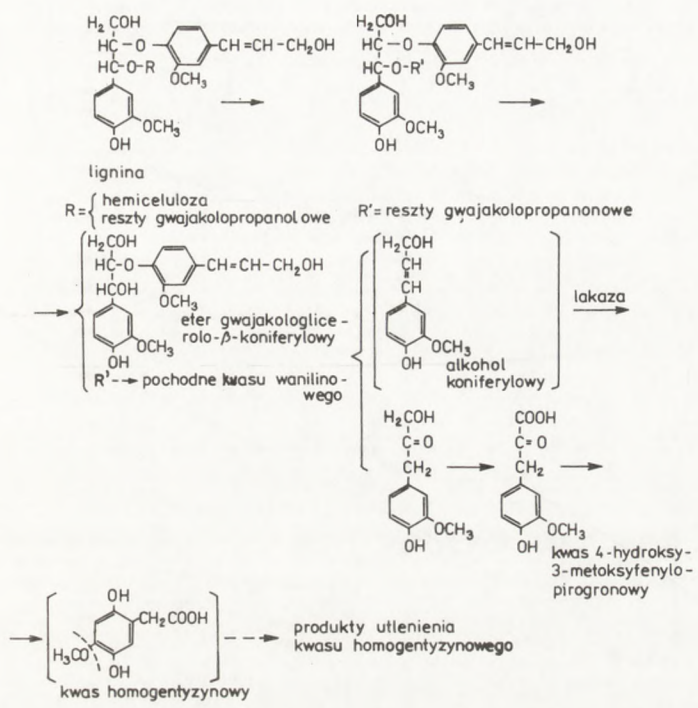
Rys. 3. Schemat ruchu pęcherzyków. ER—endoplasmatic reticulum—retikulum endoplazmatyczne, R—ribosoms—rybosomy, Dp—dictyosome pole — strefa tworzenia cystern, Dd—dictyosome displaced — strefa tworzenia pęcherzyków z cystern (40).

turze grzyba *Poria subacida*, hodowanego na pożywce płynnej z dodatkiem ligniny Norda bądź mączki drzewnej, kwasy 4-hydrokso-3-metoksyfenylopirogonowy i wanilinowy oraz eter gwajakologlicerolo- β -koniferylowy. Na podstawie tych i wcześniejszych danych autor wysunął pierwszą koncepcję mechanizmu biologicznego rozkładu ligniny (rys. 4).

Założył, że pierwszymi produktami depolimeryzacji są gwajakolopropanony, które pod wpływem oksydaz przechodzą w związki pozbawione łańcucha propanowego, na przykład w kwas wanilinowy. Udział lakazy według tego schematu sprowadza się do utlenienia grup hydroksylowych w alkoholu koniferolowym.

W trzy lata później w pracowni Norda w filtratach po hodowli kilku gatunków „białej zgnilizny drewna”, rosnących na podłożach z ligniną, zidentyfikowano eter gwajakologlicerolo- β -koniferylowy, aldehyd koniferylowy, kwas ferulowy, kwas 4-hydrokso-3-metoksyfenylopirogonowy, aldehyd p-hydroksycynamonowy, kwas p-hydroksycynamonowy i gwajakolo glicerol (46). W następnej pracy autorzy wykazali u grzyba *Fomes fomentarius* przemianę eteru gwajakologlicerolo- β -gwajakolowego na gwajakologlicerol, wanilinę i kwas wanilinowy (47). Powstawanie produktów o skróconym łańcuchu bocznym przypisano działaniu lakazy bądź peroksydazy. Enzymy te wyodrębniono z kultury *Fomes fomentarius* (48). W oparciu o te wyniki autorzy grupy Norda zaproponowali kolejny mechanizm rozkładu ligniny, w którym za pierwsze produkty depolimeryzacji substratu przyjęto gwajakologlicerol i alkohol koniferylowy (47).

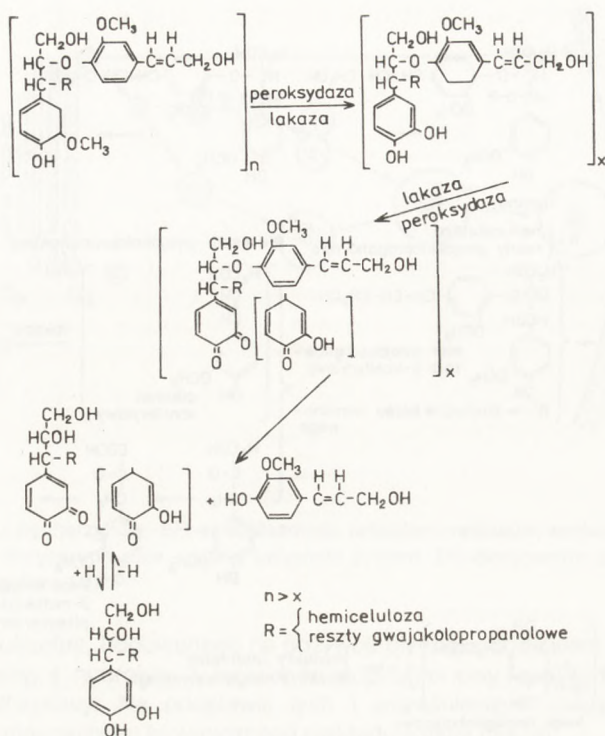
Omówione schematy nie uwzględniały bardzo ważnego procesu chemicznego, któremu ulega lignina podczas biologicznego rozkładu, mianowicie demetylacji. W naszej pracowni wykazano, że proces ten mogą katalizować peroksydaza, względnie lakaza w trakcie utleniania ligniny bądź jej metoksyfenolowych podjednostek takich jak np. kwas wanilinowy (14,49–51). W oparciu o te i inne dane zaproponowano schemat rozkładu ligniny (rys. 5), w którym podstawową rolę w depolimeryzacji przypisano demetylacji, a następnie utlenieniu wytworzonych ortodifenoli do odpowiednich ortochinonów przez peroksydazę bądź lakazę (49,51). Rozrywanie wiązań ete-



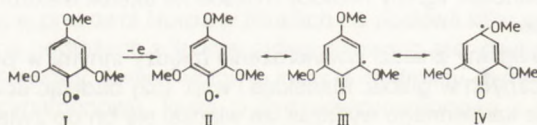
Rys. 4. Schemat rozkładu ligniny wg Fukuzumi (45).

rowych wiążących podjednostki ligniny miałyby miejsce na skutek elektronofilnego oddziaływania grup ortochinonowych.

Ten model rozkładu ligniny znalazł potwierdzenie między innymi w pracy dotyczącej przemian związków aromatycznych w glebie. Manskaja i wsp. (52) badając sorpcję germanu w procesie powstawania węgla kamiennego wykazali, że włączał się on do związków aromatycznych na etapie rozkładu ligniny związanym z powstawaniem ugrupowań chinonowych. Również Harkin i Obst (53) potwierdzili proponowany przez naszą pracownię model. Wykazali oni, że lakaza bądź peroksydaza utleniając 2,4,6-trimetoksyfenol tworzą szereg rodników (rys. 6), które łączą się najpierw w dimery, dalej zaś w trakcie utleniania do odpowiednich dichinonów rozpadają się na monomery oraz ulegają demetylacji (rys. 7). Powyższa praca świadczyłaby o możliwości rozrywania przez lakazę bądź peroksydazę wiązań eterowych łączących aromatyczne podjednostki ligniny oraz potwierdzałaby rolę demetylacji i powstawanie układów chinonowych w tym procesie. Późniejsze badania wielokrotnie udowodniały demetylacyjną czynność lakazy oraz peroksydazy (50,54-59). Jako przykład może służyć reakcja demetylacji kwasu syringowego katalizowana przez lakazę (54; rys. 8). Ander i wsp. (58) nawiązując do demetylacyjnej czynności lakazy w odniesieniu do kwasu wanilinowego podali mechanizm możliwej transformacji tego połączenia aż do rozerwania pierścienia aromatycznego i wytworzenia ketokwasów (rys. 9). Do udziału lakazy bądź peroksydazy w transformacji ligniny wielokrotnie jeszcze nawiązywano



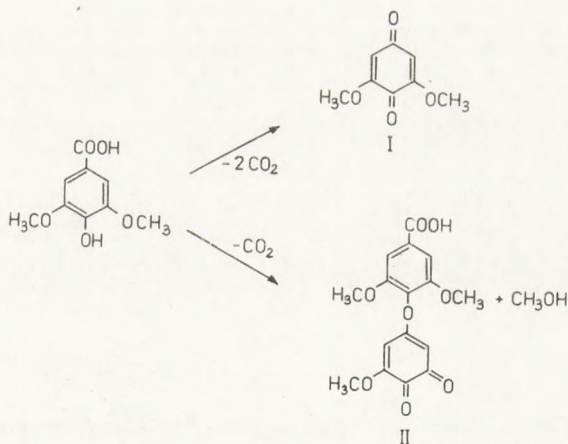
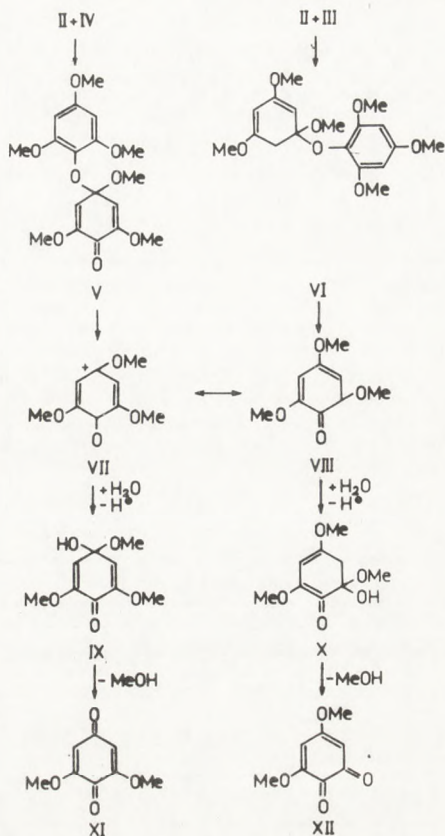
Rys. 5. Udział lakazy i peroksydazy w depolimeryzacji ligniny wg Leonowicza i Trojanowskiego oraz Trojanowskiego i wsp. (49,51).



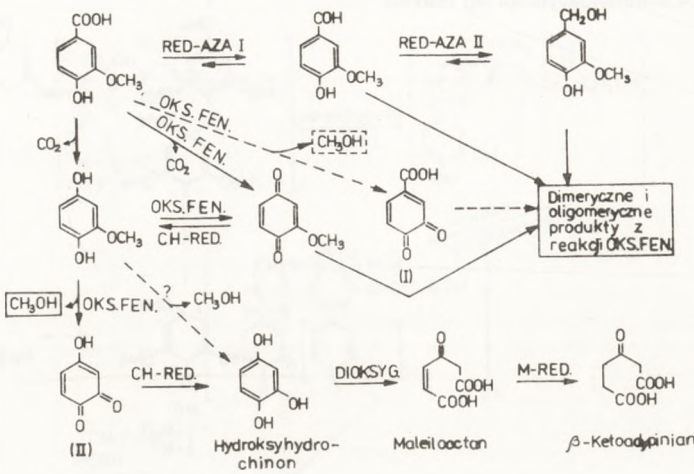
Rys. 6. Rodniki tworzące się na skutek oddziaływań lakazy bądź peroksydazy na 2,4,6-trimetoksyfenol wg Harkina i Obsta (53).

w piśmiennictwie. W pracowni Erikssona wykazano, że mutant *Sporotrichum pulverulentum* pozbawiony lakazy nie transformował ligniny, podczas gdy szczep dziki wydajnie rozkładał ten polimer (60). Według Kirka i wsp. (61) lakaza *Trametes versicolor* i *Stereum frustulatum* rozkładała związek modelowy ligniny, eter syringiloglikol- β -gwajakolowy, do podjednostek metoksyfenylopropanowych, a następnie po odłączeniu dwuwęglowego łańcucha bocznego, do 2,6-dimetoksy-p-benzochinonu (rys. 10). Autorzy japońscy Ishihara i Miyazaki (62) wykazali później, że 2,6-dimetoksy-p-benzochinon powstaje w wyniku oddziaływania lakazy *Trametes versicolor* na ligninę Bjorkmana. Inni japońscy uczeni (Konishi i Inoue; 63) zaproponowali nieco odmienny

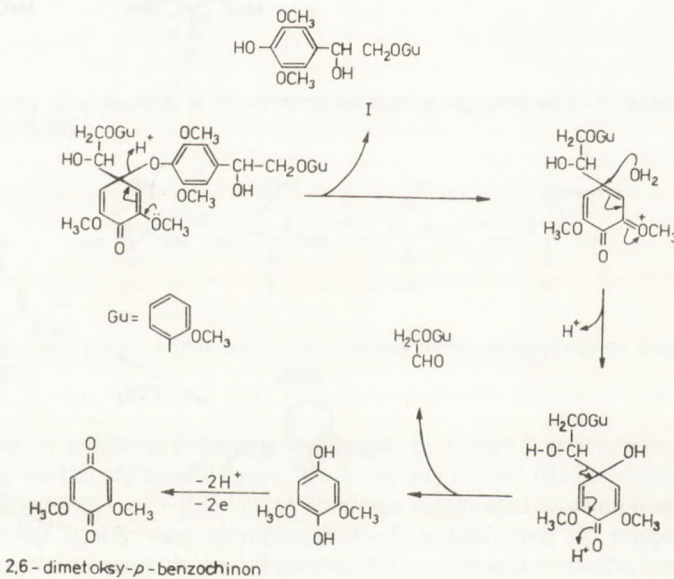
Rys. 7. Rozkład, utlenianie i demetylacja dimerów utworzonych z rodników powstających działaniem lakazy na 2,4,6-trimetoksyfenol wg Harkina i Obsta (54).



Rys. 8. Demetylacja kwasu syringowego przez lakazę *Trametes versicolor* wg Ishihara i Ishihara (54).



Rys. 9. Proponowany schemat metabolizmu kwasu wanilinowego do β -ketoadypianu przez *Sporotrichum pulverulentum*. RED-AZA – reduktaza, OKS.FEN.– oksydaza fenolowa, CH-RED.– reduktaza chinonowa, DIOKSYG.– dioksygenaza, M-RED.– reduktaza maleilooctanu, orto-chinon II – struktura hipotetyczna (58).

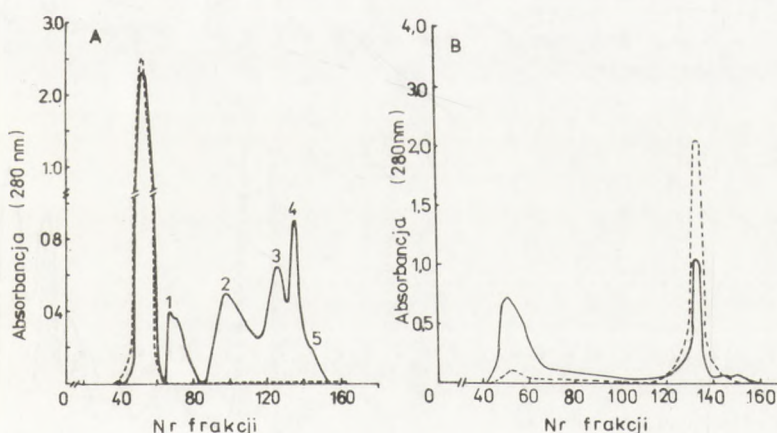


Rys.10. Rozkład eteru syryngiloglikolo- β -gwayakolowego przez lakazę *Trametes versicolor* wg Kirka i wsp. (61).

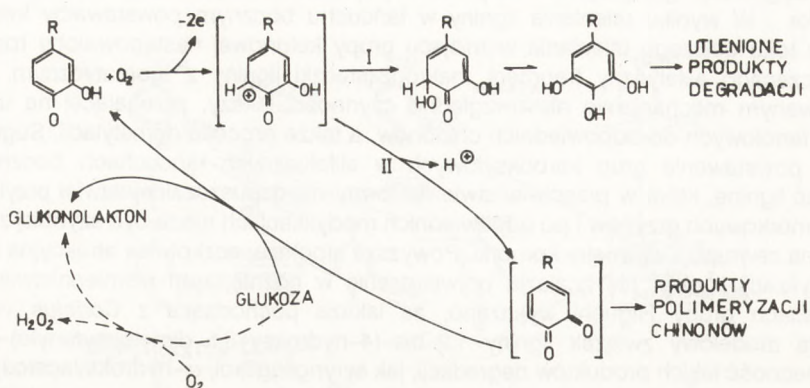
mechanizm degradacji ligniny Bjorkmana przez lakazę B izolowaną przez nich z grzybni *Trametes versicolor*. W wyniku utleniania ligniny w łańcuchu bocznym powstawałby ketoeter, a następnie w toku dalszego utleniania w miejscu grupy ketonowej następowałoby rozerwanie wiązania łączącego alifatyczny fragment makrocząsteczki ligniny z aromatycznym. Autorzy w proponowanym mechanizmie nie uwzględnili czynności lakazy, polegającej na utlenianiu ugrupowań fenolowych do odpowiednich chinonów, a także procesu demetylacji. Sugerowane przez nich powstawanie grup karboksylowych w alifatycznych łańcuchach bocznych ma solubilizować ligninę, która w przeciwieństwie do formy nierozpuszczalnej łatwiej przyłącza się do ścian komórkowych grzybów i po odpowiednich modyfikacjach może być szybciej zużyta jako pokarm na zewnątrz i wewnątrz komórki. Powyższa hipoteza, aczkolwiek atrakcyjna z punktu widzenia utylizacji ligniny, nie znalazła potwierdzenia w późniejszym piśmiennictwie. W nowszych pracach grupy Higuchi wykazano, że lakaza pochodząca z *Coriolus versicolor* degradowała modelowy związek ligniny 1,2-bis-(4-hydroksy-3,5-dimetoksyfenilo)-propan-1,3-diol. Obecność takich produktów degradacji, jak syryngiloglikol, α -hydroksyacetosyryngon, aldehyd syryngowy i 2,6-dimetoksy-p-benzochinon dowodziła, że w substracie miało miejsce rozerwanie wiązania $C\alpha-C\beta$ (64). Zaobserwowano ponadto, że wyizolowany z *C. versicolor* enzym posiadał zdolność rozrywania aromatycznego pierścienia w modelu ligniny 4,6-di-(tetra-butyl)gwajakolu. Produktami reakcji były pochodne mukonolaktonu. Udowodniono, że w toku reakcji dearomatyzacji, katalizowanej przez lakazę, do substratu wbudowywany był tlen cząsteczkowy (65). W naszym zakładzie wykazano, że lakaza grzybowa zarówno polimeryzuje, jak i depolimeryzuje makrocząsteczkę ligniny (66; rys. 11).

Wydajny przebieg procesu depolimeryzacji uwarunkowany jest szybkim usuwaniem ze środowiska reaktywnych rodników względnie chinonów tworzących się w wyniku oddziaływania lakazy na ugrupowania fenolowe bądź metoksyfenolowe. Wspomniano już, że obecność tego typu rodników wykazali Harkin i Obst podczas oddziaływania lakazy lub peroksydazy na 2,4,6-trimetoksyfenol (54). Rodniki mogą samorzutnie łączyć się, tworząc w rezultacie oligomery i polimery o różnych masach cząsteczkowych.

Okazało się, że czynnikiem skutecznie redukującym rodniki i chinony, a więc usuwającym te połączenia ze środowiska reakcji lakazy, jest oksydaza glukozy. Enzym oddziaływać może

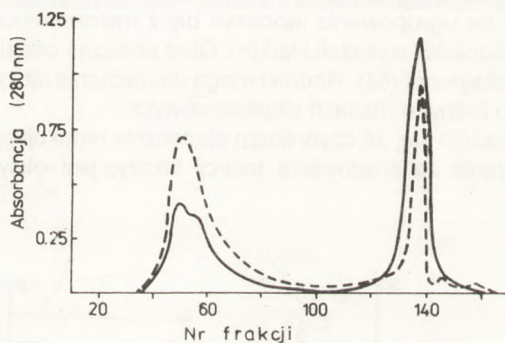


Rys. 11. Depolimeryzacja (A) i polimeryzacja (B) frakcji lignosulfonianów sodu przez lakazę *Trametes versicolor*. Profile elucji przed (linia przerywana) i po inkubacji z lakazą (linia ciągła) wg Leonowicza i wsp. (66).

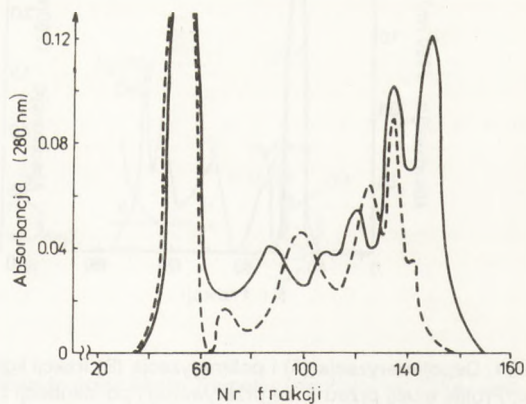


Rys.12. Utlenianie glukozy kosztem chinonów wytwarzanych przez lakazę (67).

Rys.13. Profile elucji niskocząsteczkowych frakcji lignosulfonianów sodu z kolumny Sephadex G-50 po inkubacji z lakazą (linia przerywana) oraz lakazą i oksydazą glukozy (linia ciągła) (70).



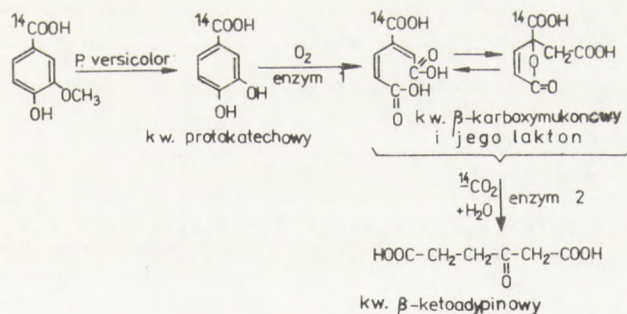
Rys.14. Profile elucji wysokocząsteczkowej frakcji lignosulfonianów sodu z kolumny Sephadex G-50 po inkubacji z lakazą (linia przerywana) oraz lakazą i oksydazą glukozy (linia ciągła) (70).



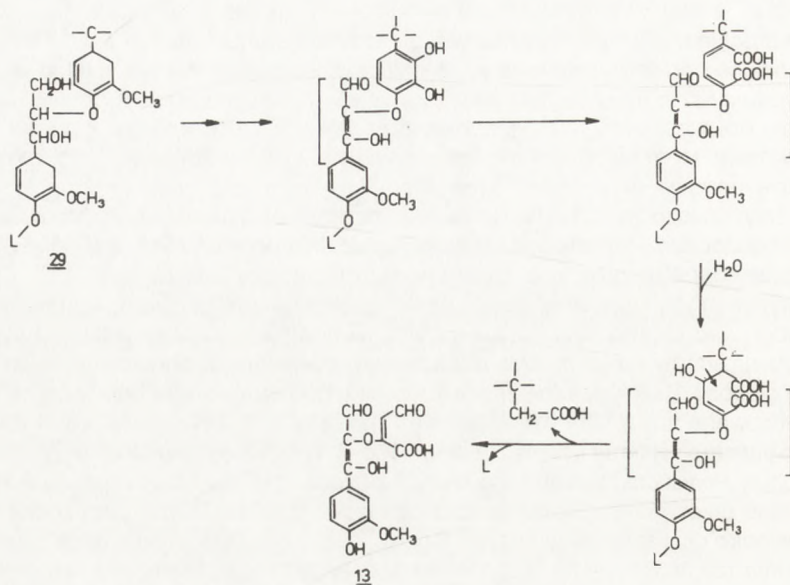
według mechanizmu zaproponowanego w roku 1977 przez Grøena (67), w którym rolę donatora tlenu w utlenianiu glukozy pełni nie tlen cząsteczkowy, lecz chinony bądź rodniki wytworzone działaniem lakazy na związki fenolowe (rys. 12). Podobny przebieg reakcji zaobserwowali również Alberti i Klibanov (68) w odniesieniu do *p*-benzochinonu, który oksydaza glukozy redukowała do *p*-hydrochinonu. W naszej pracowni przebadano wpływ szeregu związków fenolowych na sekwencyjne oddziaływanie lakazy i oksydazy glukozy (69). We wszystkich badanych przypadkach produkty chinonowe wytwarzane działaniem lakazy znikaly ze środowiska reakcji po wprowadzeniu do mieszaniny reakcyjnej oksydazy glukozy. Obserwowane zjawisko byłoby zatem prawidłowością, które być może ma zastosowanie również w odniesieniu do transformacji ligniny. Dalsze badania przy użyciu lignosulfonianów jako adekwatnego modelu ligniny, potwierdziły to przypuszczenie (70). Okazało się, że dodanie oksydazy glukozy do mieszaniny zawierającej lignosulfoniany i lakazę skutecznie przeciwdziała polimeryzacji tych połączeń oraz przyspiesza procesy depolimeryzacyjne, katalizowane przez lakazę (rys. 13 i 14).

Powyższe wyniki mogą sugerować jeszcze inny przebieg depolimeryzacji, w którym istotną rolę mogłyby odgrywać dioksygenazy, czyli enzymy rozrywające pierścień aromatyczny. Substratami dla tych enzymów mogłyby być ortodifenole wytwarzane z odpowiednich chinonów przez oksydazę glukozy. Dioksygenazy, znane już dość dawno w materiale bakteryjnym, zostały również zidentyfikowane u grzybów rozkładających ligninę, np. dioksygenaza protokatechanowa wykryta u *Polystictus versicolor* przez Haidera i wsp. (71). Stosując radioaktywny kwas wanilinowy i filtrat kultury *Polystictus versicolor* autorzy prześledzili główne etapy degradacji substratu zapoczątkowane przez dioksygenazę protokatechanową (rys. 15). Enzym ten został później wyizolowany i wysoko oczyszczony w naszym laboratorium z grzybów *Chaetomium piluliferum* i *Pleurotus ostreatus* (23,38,72-74). W latach osiemdziesiątych w pracowni Kirka przeprowadzono bliższe badania funkcji dioksygenaz w rozkładzie ligniny (75). W oparciu o nie sformułowano tezę, zgodnie z którą enzymy te mogą oddziaływać na peryferyjne aromatyczne fragmenty polimeru ligninowego, powodując ich dearomatyzację. Podstawą tej koncepcji była identyfikacja, w środowisku wzrostu grzyba *Phanerochaete chrysosporium* na wiórach świerkowych, kwasu 2-*o*-(4-hydroksy-3-metoksy- β -oksofenetoksy)-2-hydroksy-4-okso-2-butenowego, przypuszczalnego produktu dioksygenacji peryferyjnych aromatycznych fragmentów ligniny (75; rys. 16).

Autorzy dopuszczają możliwość wcześniejszej demetylacji substratu oraz wytworzenie (za pomocą dodatkowej hydroksylacji) ugrupowań ortodifenolowych, pomiędzy którymi następowaloby rozszczepienie pierścienia aromatycznego. Ta interesująca hipoteza została potwierdzona w naszym laboratorium przy użyciu 3,4-dioksygenazy protokatechanowej oczyszczonej z grzyba *Pleurotus ostreatus* (72,74). Efekt oddziaływania rozpuszczalnego enzymu oraz jego formy immobilizowanej na wysokocząsteczkową frakcję lignosulfonianów sodu (adekwatny mo-



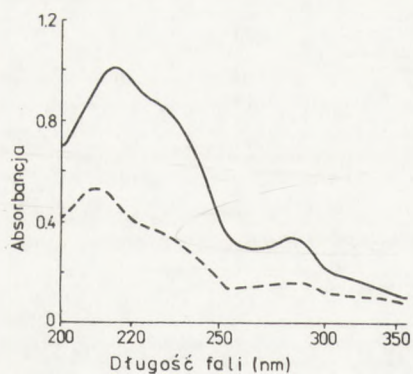
Rys.15. Dioksygenacja kwasu protokatechowego przez ekstrakt grzybni *Polystictus versicolor* wg Haidera i wsp. (71).



Rys.16. Hipotetyczny przebieg degradacji pierścienia aromatycznego w peryferijnym fragmencie struktury ligniny (L) wg Chena i wsp. (75). Zidentyfikowana przez autorów i omówiona w tekście pochodna kwasu butenowego oznaczona jest w schemacie liczbą 13.

del struktury ligniny) śledzono w oparciu o pomiar widma absorpcji w ultrafiolecie (rys. 17). Zaobserwowane obniżenie absorpcji w regionie odpowiadającym cząsteczkom aromatycznym, to jest przy 280 nm, świadczy o degradacji tych struktur w badanym modelu ligniny przez dioksygenazę. Potwierdza to słuszność tezy prezentowanej przez grupę Kirka (75).

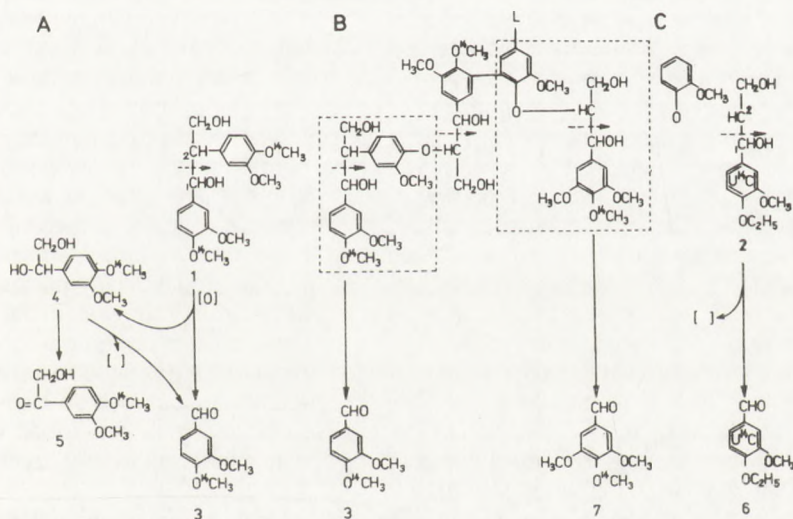
Według naszych, jeszcze nie opublikowanych badań, frontálną dioksygenazę makrocząsteczki ligniny można osiągnąć także na drodze kooperacji trzech enzymów, tj. czynnika deme-



Rys.17. Absorbancja w ultrafiolecie wysokocząsteczkowej frakcji lignosulfonianu sodu (ok. 97 kD) przed inkubacją z 3,4-dioksygenazą protokatechanową (linia ciągła) i po 3 godzinnej inkubacji z immobilizowaną formą enzymu (linia przerywana) (74).

tylującego i wytwarzającego ugrupowania ortodifenolowe, oksydazy glukozy, zapobiegającej dalszemu ich utlenianiu, oraz dioksygenazy, rozrywającej pierścień aromatyczny pomiędzy ugrupowaniami ortodifenolowymi. Badania ubiegłego dziesięciolecia przyniosły jednak rewelację, którą trudno jeszcze w tej chwili właściwie ocenić – odkryto poszukiwaną od wielu lat „ligninazę” ligninowa peroksydaza. Enzym został zidentyfikowany w filtracie kultury *Phanerochaete chrysosporium* i opisany w tym samym czasie przez trzy niezależne grupy badaczy, tj. z pracowni Kirka (24) i Golda (25) i Higuchi (100). Ligninazę można indukować u *Ph. chrysosporium* warunkami głodu węglowego lub azotowego. Enzym, o masie cząsteczkowej 42 kD, wymaga do czynności katalitycznej nadtlenu wodoru i katalizuje bez stereospecyficzności szereg reakcji utleniania w alkilowym łańcuchu bocznym związków ligninowych, rozrywanie wiązań pomiędzy atomami węgla C α -C β łańcuchów bocznych w podjednostkach strukturalnych ligniny, utlenianie benzylovych grup alkoholowych do odpowiednich aldehydów bądź ketonów, intradiolowe rozrywanie struktur fenyloglikolowych oraz hydroksylację grup metylenobenzylowych (76). Ligninaza powoduje również polimeryzację i kopolimeryzację połączeń fenolowych, podobnie jak peroksydaza i lakaza. Wszystkie czynności wymagają nadtlenu wodoru, chociaż dwie reakcje, tj. rozerwanie wiązania C α -C β i hydroksylacja grup metylenobenzylowych mają charakter oksygenacji substratowej, a tlen włączany do substratu pochodzi z tlenu atmosferycznego, nie zaś z nadtlenu wodoru. W tych zatem przypadkach ligninaza zachowuje się jak wyjątkowa oksygenaza wymagająca do czynności nadtlenu wodoru. Niektóre z opisanych reakcji katalizowanych przez ligninazę, w odniesieniu do maksymalnie zmetylowanego preparatu ligniny Bjorkmana i modelowych związków ligniny ilustruje rys. 18.

Optimum aktywności enzymu przypada poniżej pH 3. Enzym jest wysoce specyficzny tylko wobec substratów sztucznie maksymalnie zmetylowanych, bądź substratów pochodzenia natu-



Rys.18. Aktywność ligninazy w stosunku do preparatu ligniny ze znakowanymi ¹⁴C grupami metoksyłowymi oraz dwóch dimerycznych modeli ligniny. Przerwanymi strzałkami zaznaczono miejsca rozrywania wiązań między podjednostkami. A i C odpowiednio związki modelowe 1 i 2; B makrocząsteczka ligniny; 3-7 produkty degradacji (24).

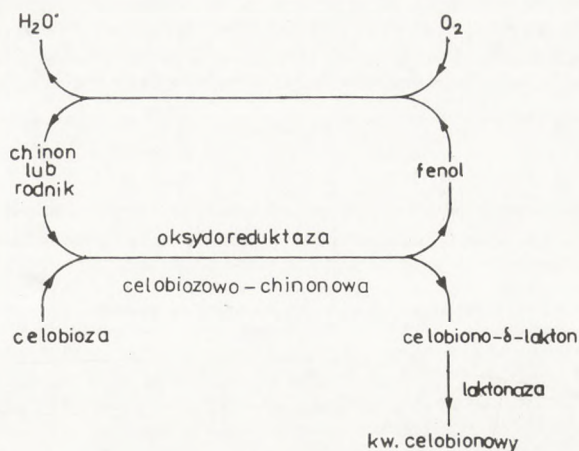
ralnego o wysokim stopniu zmetylowania, jak np. lignina izolowana z drewna osiki (24). Zanieczyszczenie substratu związkami zawierającymi fenolowe grupy OH powoduje przestawienie swoistości enzymu na czynność utleniająco-polimeryzacyjną, jak to ma miejsce w przypadku peroksydazy. Substrat ligninazy, alkohol weratrylowy, którego utlenianie do aldehydu jest dla wielu autorów miarą aktywności ligninazy, musi być dodatkowo oczyszczony od śladowych nawet ilości połączeń fenolowych. Ligninaza jest zatem enzymem o charakterze peroksydazy (ta sama masa cząsteczkowa, hematynowy charakter białka, wymaganie nadtlenu wodoru do czynności) i dodatkowej specyficzności depolimeryzacyjnej przy niskich wartościach pH. Dotychczas znane peroksydazy nie wykazywały takiej specyficzności, aczkolwiek w niektórych pracach można się tego doszukać. Na przykład, peroksydaza izolowana z grzyba *Trametes versicolor* obok wyraźnego efektu polimeryzacyjnego w pH 3 katalizowała również, chociaż w niewielkim stopniu, depolimeryzację niskocząsteczkowej frakcji lignosulfonianów (77). Być może, podobnie jak w przypadku lakazy, szybka polimeryzacja wytwarzanych przez peroksydazę rodników i chinonów uniemożliwiała bardziej wyraźną rejestrację efektu depolimeryzacyjnego. Istotnie, w późniejszej publikacji Łoborzewski i Paszczyński (78) wykazali, że w układzie zawierającym oksydazę glukozy obok celulaz i peroksydazy, a także ligninocelulozę jako substrat dla obu enzymów, można osiągnąć degradację kompleksu do niskocząsteczkowych połączeń fenolowych i kwasu glukonowego. Być może oksydaza glukozy (podobnie jak w przypadku lakazy) redukując reaktywne chinony, wytwarzane działaniem peroksydazy, zapobiegała tym samym repolimeryzacji produktu.

Przy obecnym stanie wiedzy trudno definitywnie rozstrzygnąć, czy ligninazy (a znanych jest już ich cały szereg) i tradycyjne peroksydazy – to całkiem odrębne grupy enzymów, czy różnice pomiędzy nimi polegają jedynie na większej lub mniejszej aktywności w odniesieniu do substratu ligninowego. Na przykład, w zespole Leisoli (34,79,80) znaleziono cztery różniące się właściwościami ligninazy i dwie peroksydazy, przy czym wszystkie zidentyfikowane enzymy zawierały cząsteczkę hemu silniej lub słabiej związaną z białkiem. Badacze grupy Golda, Kuwahara i wsp. (81) oraz nieco później Huynh i Crawford (82) opisali peroksydazę, której czynność uwarunkowana jest obecnością jonów manganowych. Po bliższym przebadaniu enzymu przez Paszczyńskiego i wsp. (83) w pracowni Crawforda okazało się, że w określonych warunkach współpracuje on z tlenem atmosferycznym nie wymagając do czynności nadtlenu wodoru, a przeciwnie, produkuje ten związek podczas utleniania glutationu, ditiotreitolu bądź NADPH. Enzym posiada masę cząsteczkową 45–47 kD, a zatem nieco większą od ligninazy I odkrytej przez grupę Kirka. W obecności H_2O_2 utlenia typowe dla peroksydazy donatory wodoru, jak np. syryngaldazynę, gwajakol i kwas syryngowy, nie utlenia natomiast alkoholu weratrylowego, czym różni się zasadniczo od typowych ligninaz. Z drugiej strony, działając demetylująco na niektóre połączenia metoksyłowe, jak np. kwas 2-metoksy-3-fenylobenzoesowy, enzym przejawia aktywność istotną z punktu widzenia transformacji ligniny, zaś produkowany przezeń w określonych warunkach nadtlenuk wodoru może być, jak sugerują autorzy, substratem dla ligninaz.

Wynika z tego, że zarówno peroksydazy – jak też ich nowo odkryta podgrupa–ligninazy – są aktywne w odniesieniu do ligniny, chociaż ta aktywność przejawia się w sposób zróżnicowany. Nie podważa to jednak faktu, że obie grupy enzymów awansowały ostatnio do czynników odgrywających zasadniczą rolę w degradacji ligniny. Potwierdzałoby to słuszność wysuniętej przed laty w naszym zespole koncepcji transformacji ligniny zapoczątkowanej czynnością demetylacijną peroksydazy bądź lakazy (49,51).

W świetle współczesnej wiedzy o strukturze makrocząsteczki ligniny trudno sobie wyobrazić by biopolimer ten mógł być skutecznie degradowany przez jeden tylko enzym, nawet o tak szerokiej specyficzności jak ligninaza. W odniesieniu do znanych ligninaz nie może być chyba mowy o jakimś kompleksie enzymatycznym, z uwagi na ich stosunkowo niską masę cząsteczkową. Wydaje się zatem logiczną koncepcją o kooperacji kilku oddzielnych enzymów w degradowaniu ligniny. Wiadomo na przykład, że tak stosunkowo prosty w budowie (w porównaniu z ligniną)

Rys.19. Proponowany mechanizm oddziaływania oksydoreduktazy celobiozowo-chinonowej (89).



biopolimer jak celuloza, wymaga do transformacji szeregu enzymów działających sukcesywnie w miarę postępu procesu hydrolizy. Z ligniną może być podobnie. Niektóre elementy współpracy kilku enzymów aktywnych w odniesieniu do ligninowego polimeru już przedstawiono. Udowodniono też ponad wszelką wątpliwość, że degradację ligniny akceleruje obecność w podłożu drugiego składnika kompleksu, to jest celulozy bądź jej oligomerów (84–90). Idea współzależności procesów delignifikacji i degradacji celulozy była po raz pierwszy postulowana przez Westermarcka i Erikssona (88–90). Hipoteza ta jest nadal wiążąca, gdyż wcześniejsze doniesienia Gottlieba i wsp. z roku 1950 (44) o możliwości wzrostu grzybni na ligninie jako jedynym źródle węgla nie zostały dotąd potwierdzone. W naszej pracowni wykazano, że produkty częściowej hydrolizy materiału drzewnego wyraźnie indukują systemy enzymatyczne degradujące oba składniki kompleksu ligninocelulozowego. Według oceny autorów z grupy Erikssona, procesy depolimeryzacji zarówno celulozy, jak i ligniny zależą od siebie w pewnych punktach i wzajemnie wspomagają (88–90). Badacze tej grupy odkryli enzym oksydoreduktazę celobiozowo-chinonową, która na zasadzie sprzężenia zwrotnego współdziała z lakazą i celulazami podczas depolimeryzacji obu składników kompleksu ligninocelulozowego. Enzym zidentyfikowano w przesączu kultur *Polyporus versicolor* i *Sporotrichum pulverulentum*, rosnących na celulozie jako jedynym źródle węgla (89), a następnie wysoko oczyszczono z filtratu kultury *Polyporus versicolor* (90). Redukował on chinony produkowane przez lakazę do odpowiednich fenoli oraz utleniał celobiozę wytwarzaną przez kompleks celulazowy do laktonu- δ -celobionowego (89; rys. 19). Lakaza w omawianym systemie, pełni według autorów, funkcję ogniwa w ekstrakcelularnym transporcie elektronów.

W chwili odkrycia oksydoreduktazy celobiozowo-chinonowej nie znane były jeszcze ligninazy, którym obecnie przypisuje się zasadniczą rolę w degradacji ligniny. Enzymy te, jak wiadomo, wymagają do czynności katalitycznej nadtlenu wodoru, który nie jest jednak produkowany w systemie omówionej oksydoreduktazy. W związku z tym należałoby znaleźć naturalne układy wytwarzające ten czynnik. W naszym zespole rozpatrywaliśmy różne możliwości, analizując między innymi funkcję szeregu enzymów cytozolu grzybowego, jak np. oksydazy alkoholowej, peroksydazy zależnej od manganu czy oksydazy glukozy, z których jedynie peroksydaza i oksydaza glukozy mogą funkcjonować zarówno w cytoplazmie, jak i pozakomórkowo. Są to enzymy stosunkowo trwale i odporne na działanie czynników zewnętrznych. Wykazano, że oksydaza

glukozy daje się łatwo immobilizować (91), co dodatkowo zwiększa jej trwałość i rozszerza zakres działania. Enzym ten występuje u gatunków znanych z aktywności w odniesieniu do ligninocelulozy (92; tab. 1), czego nie można powiedzieć o manganozależnej peroksydazie, którą znaleziono dotychczas jedynie u *Phanerochaete chrysosporium* (81, 83) *Trametes versicolor* (93) i *Phlebia radiata* (94).

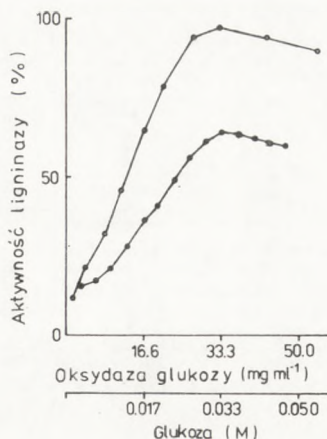
Tabela 1

Aktywność pozakomórkowej oksydazy glukozy niektórych grzybów klasy Basidiomycetes oraz ich zdolność do transformacji ligninocelulozy i produkcji lakazy wg danych literaturowych (92)

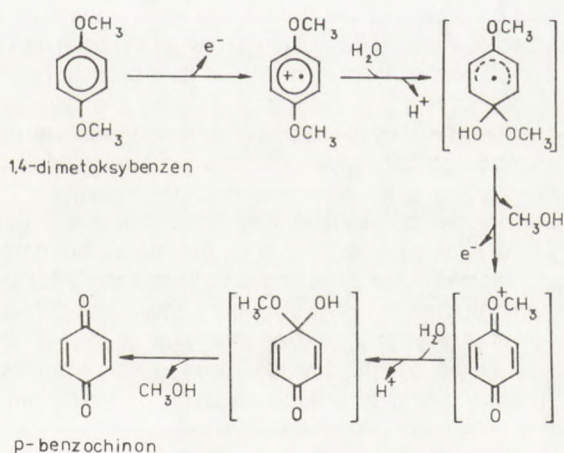
Grzyby	Aktywność oksydazy glukozy (nM glukozy/(min/ml))	Zdolność do transformacji ligninocelulozy (dane literaturowe)	Zdolność do produkcji lakazy (dane literaturowe)
<i>Coriolus versicolor</i> (Linnaeus ex Fries/Quel)	3,1	tak	tak
<i>Kuechneromyces mutabilis</i> (Schaeffer ex Fries) Singer et Smith	8,1	tak	tak
<i>Merulius lacrymans</i> Wulfen ex Fries	0,0	nie	nie
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> Burdshall	1,3	tak	tak
<i>Pholiota mutabilis</i> (Schaeffer ex Fries)Quel	5,6	tak	tak
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacquin ex Fries)Kummer	29,0	tak	tak
<i>Polystrictus abietinus</i> Cooke	0,0	nie	nie
<i>Polystrictus versicolor</i> Fries	4,2	tak	tak
<i>Poria crustina</i> Bresadola	0,0	nie	nie
<i>Sporotrichum pulverulentum</i> Novobranova	39,3	tak	tak
<i>Trametes pubescens</i> (Schummer ex Fries)Pilát	12,4	tak	tak
<i>Trametes versicolor</i> (Linnaeus ex Fries)Pilát	21,1	tak	tak

Dodatkową cechą wyróżniającą oksydazę glukozy spośród innych donorów nadtlenu wodoru, także od peroksydazy manganozależnej, jest omówiona już możliwość współpracy z lakazą. Przejawia się to w zdolności do redukcji rodników i chinonów wytwarzanych przez lakazę podczas oddziaływania na ligninę i jej niskocząsteczkowe prekursorzy fenolowe (69,70). Możliwa jest również współpraca oksydazy glukozy z ligninazą w zakresie wytwarzania nadtlenu wodoru. W pracowni Golda wykazano taką kooperację podczas degradacji aromatycznych dimerów przez ligninazę (25). Oksydaza glukozy może być także donorem nadtlenu wodoru przy utlenianiu przez ligninazę alkoholu weratrylowego, która to reakcja jest miarą aktywności lignolitycznej (rys. 20). Z drugiej strony wykazano, że mutant *Phanerochaete chrysosporium* pozbawiony oksydazy glukozy nie rozkładał ligniny, co według Ramasany i wsp.(96) oznacza, że *in vivo* oksydaza glukozy jest u tego gatunku niezbędna do współpracy z ligninazą. Oksydaza glukozy

Rys.20. Wpływ stężenia glukozy oraz oksydazy glukozy na aktywność lignolityczną ligninazy wyizolowanej z przesączu kultury *Phanerochaete chrysosporium* (95).

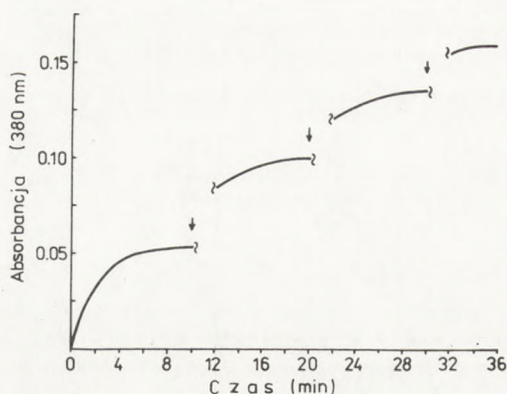


współdziała również z kompleksem celulaz utleniając glukozę wytwarzaną przez te enzymy podczas hydrolizy celulozy (97). W pierwszej fazie tej reakcji glukoza utleniana jest do glukonolaktanu z jednoczesną redukcją sprzężonego z enzymem FAD do FADH₂. W drugiej fazie następuje utlenienie FADH₂ kosztem tlenu atmosferycznego do FAD z wytworzeniem nadtlenu wodoru (57). Wspomniano już, że tlen, niezbędny do drugiej fazy reakcji, może być dostarczony przez rodniki bądź chinony wytwarzane działaniem lakazy na związki fenolowe, bądź metoksyfenolowe (69,70). W świetle badań Kerstena i wsp. (98) również czynność ligninazy może wiązać się z powstawaniem chinonów. Autorzy działając ligninazą z *Ph. chrysosporium* na 1,4-dimetoksybenzen stwierdzili powstawanie kationowego rodnika, do którego następnie zostaje włączona cząsteczka wody zgodnie z mechanizmem przedstawionym na rys. 21. Produktami reakcji są metanol i p-benzochinon.



Rys.21. Reakcja demetylacji 1,4-dimetoksybenzenu katalizowana przez ligninazę (98).

Rys.22. Przebieg utleniania lignosulfonianów przez lakazę (70).

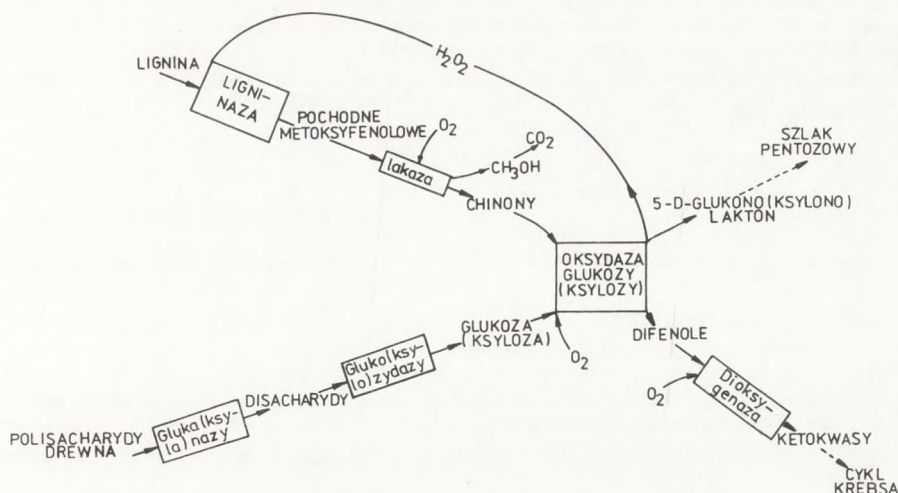


Demetylacyjna czynność ligninazy, w tym przypadku jest unikatowa w porównaniu z innymi biologicznymi mechanizmami demetylacji. Aktywność O-demetylazowa wyrażająca się w reakcji katalizowanej przez monoooksygenazy, np. cytochrom P-450, prowadzi do utworzenia formaldehydu i ugrupowania fenolowego, nie zaś metanolu i chinonu (99).

W naszej pracowni wykazano, że chinonowe produkty działania lakazy na monomery fenolowe inaktywują ten enzym (69). Nagromadzające się produkty utlenienia np. lignosulfonianów przez lakazę hamują przebieg reakcji. Nowe porcje enzymu wprowadzane do środowiska przyspieszają reakcję, jednakże w coraz mniejszym stopniu (70; rys. 22). Można zatem powiedzieć, że dzięki czynności oksydazy glukozy następuje odtruwanie środowiska, co pozwala lakazie na dalsze pełnienie jej funkcji. Powyższe cechy wyróżniają zatem oksydazę glukozy nie tylko jako donora nadtlenu wodoru, ale także jako enzym, którego funkcja ma istotne znaczenie w transformowaniu ligninocelulozy. Cech tych w dużej mierze brakuje peroksydazie zależnej od manganu.

Biorąc pod uwagę omówione wyniki własnych badań oraz innych autorów można wnosić, że koncepcja komplementarności rozkładu celulozy i ligniny oraz istnienia układów enzymatycznych łączących te procesy, postulowana przez grupę Erikssona, jest nadal aktualna. W organizmach, w których funkcjonują ligninazy rolę układu działającego na zasadzie sprzężeń zwrotnych pełniłaby produkująca nadtlenek wodoru oksydaza glukozy, zaś proces rozkładu ligninocelulozy mógłby mieć przebieg następujący: glukoza, powstająca jako produkt hydrolizy celulozy przez kompleks celulaz, byłaby substratem dla oksydazy glukozy, zaś tlen niezbędny do reakcji pochodziłby częściowo z chinonów, produkowanych działaniem lakazy na oligomery ligniny. Wytworzony w wyniku utleniania glukozy glukonolakton, po odpowiednich przekształceniach, mógłby zasilać metabolizm grzyba w cyklu pentozowym, bądź w glikolizie. Z kolei nadtlenek wodoru produkowany w wyniku reakcji katalizowanej przez oksydazę glukozy aktywowałby ligninazę, która oddziałując na ligninę powodowałby jej rozkład do aromatycznych oligomerów zawierających ugrupowania metoksyłowe. Na te ostatnie działałaby lakaza demetylując je i degradując do jeszcze niższych fragmentów. Wytwarzaniu nadmiernej ilości chinonów i wtórnej ich polimeryzacji przeciwdziałałaby oksydaza glukozy redukując je do odpowiednich fenoli. Te ostatnie z kolei mogłyby się stać substratami dla dioksygenaz grzybowych rozrywających pierścienie aromatyczne. Produkty dioksygenacji, po dalszych przekształceniach, w formie ketokwasów łatwo znajdowałyby drogę do cyklu Krebsa (rys. 23).

Sugerowany mechanizm mógłby mieć miejsce u organizmów grzybowych dysponujących wszystkimi wymienionymi enzymami. Do takich należy między innymi grzyb *Phanerochaete chrysosporium*. U gatunków, w których nie znaleziono ligninaz, a jednak wydajnie transformują-



Rys.23. Hipotetyczny mechanizm transformacji ligninocelulozy przez enzymy grzybowe (92).

cych ligninocelulozę, mógłby funkcjonować mechanizm zaproponowany przez grupę Erikssona z oksydoreduktazą celobiozowo–chinonową jako enzymem centralnym (88–90). Jest również prawdopodobne, że oba systemy działają równolegle i wzajemnie się uzupełniają. Rzecz jasna nie można wykluczyć istnienia jeszcze innych, nie odkrytych dotychczas mechanizmów, a także enzymów, czy systemów działających na zasadzie sprzężeń zwrotnych w procesach transformacji ligninocelulozy. Dokładne poznanie tych procesów pozwoli szybciej rozwiązać problem właściwego wykorzystania zapasów ligninocelulozy, gromadzących się na skutek działalności człowieka. Jest to jednak problem, jak należy sądzić, na miarę przyszłego wieku.

Literatura

- Bellamy W. D., (1974), *Biotech. Bioeng.*, 16, 869–880.
- Seaman J. F., (1977), *Proc. Int. Symp. on Olean Fuels from Biomass and Wastes*, Orlando, 25–28 January, 1977, 153–168.
- Kin Z., (1985), *Chem. Technol.*, 7, 11–20.
- Eriksson K.-E., (1985), *Tappi*, 68, 46–55.
- Hatakka A. I., Pirhonen T. I., (1985), *Agricult. Wastes*, 12, 81–97.
- Ek M., Eriksson K.-E., (1977), *Proc. Int. Symp. on Bioconversion*, Haus Khas, New Dehli, Indie, 21–23 February, 1977, 1–6.
- Tanaka M., Matsuno R., (1985), *Enzyme Microb. Technol.*, 7, 197–206.
- Szczodrak J., Ilczuk Z., Rogalski J., Leonowicz A., (1986), *Biotech. Bioeng.*, 28, 504–510.
- Ander P., Eriksson M. E. R., Eriksson K.-E., (1985), *Physiol. Plant.*, 65, 317–321.
- Martin J. P., Haider K., (1977), *Proc. Int. Symp. of Soil Organic Matter Studies*, (ed. Freemann S.) Int. Ener. Agency and Agrochim.
- Fengel D., (1971), *J. Polym. Sci.*, C 36, 383–392.
- Rogalski J., Szczodrak J., Dawidowicz A., Ilczuk Z., Leonowicz A., (1985), *Enzyme Microb. Technol.*, 7, 395–400.
- Brauns F.E., (1962), *Holzforsch.*, 16, 97–102.
- Trojanowski J., Leonowicz A., (1969), *Microbios*, 3, 247–251.

15. Bollag J.-M., Leonowicz A., (1984), *Appl. Env. Microbiol.*, 48, 849-854.
16. Leonowicz A., Trojanowski J., (1975), *Acta Biochim. Polon.*, 22, 291-295.
17. Leonowicz A., Trojanowski J., (1975), *Microbios*, 13, 167-174.
18. Leonowicz A., Trojanowski J., Orlicz B., (1978), *Acta Biochim. Polon.*, 25, 369-378.
19. Leonowicz A., (1975), *Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Lublin (C)* 30, 43-50.
20. Leonowicz A., Trojanowski J., (1978), *Acta Biochim. Polon.*, 25, 147-156.
21. Leonowicz A., Trojanowski J., Nowak G., (1972), *Microbios*, 6, 23-28.
22. Leonowicz A., (1974), *Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Lublin (C)*, 29, 11-30.
23. Wojtaś-Wasilewska M., Paszczyński A., Trojanowski J., (1982), *Microbios*, 35, 79-90.
24. Tien M., Kirk T. K., (1983), *Science*, 221, 661-663.
25. Glenn J. K., Morgan M. A., Mayfield M. B., Kuwahara M., Gold H., (1983), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 114, 1077-1083.
26. Leonowicz A., (1975), *Rozprawa habilitacyjna, Uniwersytet M. Curie-Skłodowskiej, Lublin*, 1-102.
27. Grabbe K., Koenig R., Haider K., (1968), *Arch. Mikrobiol.*, 63, 133-153.
28. Keyser P., Kirk T. K., Zeikus J. G., (1978), *J. Bacteriol.*, 135, 790-797.
29. Kirk T. K., Shimada M., (1985), *Biosynthesis and Biodegradation of wood Components*, (ed. T. Higuchi), 579-605, Academic Press, San Diego, CA.
30. Leisola M. S. A., Ulmer D., Haltmeier T., Fiechter A., (1983), *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 17, 117-120.
31. Jeffries T. W., Choi S., Kirk T. K., (1981), *Appl. Env. Microbiol.*, 42, 290-296.
32. Faison B. D., Kirk T. K., Fartel R. L., (1986), *Appl. Env. Microbiol.*, 52, 251-254.
33. Kirk T. K., Croan S., Tien M., (1986), *Enzyme Microb. Technol.*, 8, 27-31.
34. Leisola M. S. A., Meussdoerffer F., Waldner R., Fiechter A., (1985), *J. Biotechnol.*, 2, 379-382.
35. Eriksson K.-E., (1981), *Trends in the Biology of Fermentations for Fuels and Chemicals*, (ed. Hollaender A., Rabson R., Pietro R., Wolfe V.), 19-32, Plenum Publishing Corporation, New York.
36. Ander P., Eriksson K.-E., (1978), *Progress in Industrial Microbiology*, (ed. Bull M.T.), 1-58, Elsevier, Amsterdam.
37. Leonowicz A., Wojtaś-Wasilewska M., Paszczyński A., (1975), *Polish Technical Review*, 3, 6-7.
38. Wojtaś-Wasilewska M., Trojanowski J., Luterek J., (1983), *Acta Biochim. Polon.*, 30, 291-302.
39. Trojanowski J., Haider K., Szczodrak J., Kochmańska J., Ginalska G., (1984) *Soil Biology and Conversion of the Biosphere*, (ed. Szegi J.), 375-380, Hung. Acad. Sci., Budapest.
40. Grove S. N., Bracker C. E., Morre D. J., (1970), *Amer. J. Bot.*, 57, 245-266.
41. Campbell W. G., (1930), *Biochem. J. (Cambridge)*, 24, 1235-1243.
42. Wiertelak J., (1932), *Bull. Int. Acad. Polon. Sci. Lettr., Cl., Sci. Math. Nat., Kraków (B)*, 1, 19-36.
43. Fahraeus G., Nilsson R., Nilsson G., (1949), *Svensk Bot. Tidskr.*, 43, 343-356.
44. Gottlieb S., Day W. C., Pelczar M. J. Jr., (1950), *Phytopathol.*, 40, 926-935.
45. Fukuzumi T., (1960), *Bull. Agr. Soc. Japan*, 24, 728-736.
46. Ishikawa H., Schubert W. J., Nord F. F., (1963), *Arch. Biochem. Biophys.*, 100, 131-139.
47. Ishikawa H., Schubert W. J., Nord F. F., (1963), *Arch. Biochem. Biophys.*, 100, 140-149.
48. Ishikawa H., Schubert W. J., Nord F. F., (1963), *Biochem. Zeitsch.*, 338, 153-163.
49. Leonowicz A., Trojanowski J., (1965), *Acta Microb. Polon.*, 14, 55-61.
50. Leonowicz A., Grzywnowicz K., Malinowska M., (1979), *Acta Biochim. Polon.*, 26, 431-434.
51. Trojanowski J., Leonowicz A., Hampel B., (1966), *Acta Microbiol. Polon.*, 15, 17-22.
52. Manskaja S. M., Kodina L. A., Gienierałowa W. N., Krawcowa R. P., (1972), *Gieochimia*, 5, 600-609.
53. Harkin J. M., Obst J. R., (1974), *Tappi*, 57, 118-121.
54. Ishihara T., Ishihara M., (1976), *Mokuzai Gakkaishi*, 22, 371-375.
55. Ishihara T., (1983), *Mokuzai Gakkaishi*, 29, 801-805.
56. Lundquist K., Kristersson P., (1985), *Biochem. J.*, 229, 277-279.
57. Bergbom S., Karlsson G., Lundquist K., (1981), *Svensk Papperstidn.*, 84, R146-R151.
58. Ander P., Eriksson K.-E., You H.-s., (1983), *Arch. Microbiol.*, 136, 1-6.
59. Ander P., Eriksson K.-E., (1985), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 21, 96-102.
60. Ander P., Eriksson K.-E., (1976), *Arch. Microbiol.*, 109, 1-8.
61. Kirk T. K., Harkin J. M., Cowling E. B., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, 165, 145-163.
62. Ishihara T., Miyazaki M., (1974), *Mokuzai Gakkaishi*, 18, 415-419.
63. Konishi K., Inoue Y., Higuchi T., (1974), *Mokuzai Gakkaishi*, 20, 26-30.

64. Kawai S., Umezawa T., Shimada M., Higuchi T., Koide K., Nishida T., Morohoshi N., Haraguchi T., (1987), *Mokuzai Gakkaishi*, 33, 792-797.
65. Kawai S., Umezawa T., Shimada M., Higuchi T., (1988), *FEBS Lett.*, 236, 309-311.
66. Leonowicz A., Szklarz G., Wojtaś-Wasilewska M., (1985), *Phytochem.*, 24, 393-396.
67. Green T. R., (1977), *Nature*, 268, 78-80.
68. Alberti B. N., Klibanow A. M., (1982), *Enzyme Microb. Technol.*, 4, 47-49.
69. Rogalski J., Leonowicz A., (1985), dane nie publikowane.
70. Szklarz G., Leonowicz A., (1986), *Phytochem.*, 25, 2537-2539.
71. Haider K., Ľim S.-Uk., Flaig W., (1962), *Landwirtsch. Forsch.*, 15, 196-204.
72. Wojtaś-Wasilewska M., Luterek J., (1987), *Phytochem.*, 26, 2671-2674.
73. Wojtaś-Wasilewska M., Trojanowski J., (1980), *Acta Biochim. Polon.*, 27, 21-34.
74. Wojtaś-Wasilewska M., Luterek J., Dawidowicz A., Leonowicz A., (1987), *Biotechnol. Bioeng.*, 29, 507-511.
75. Chen C.-L., Chang H.-m., Kirk T. K., (1983), *J. Wood Chem. Technol.*, 3, 35-57.
76. Tien M., Kirk T. K., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 2280-2284.
77. Łobarzewski J., Trojanowski J., Wojtaś-Wasilewska M., (1982), *Holzforsch.*, 36, 173-176.
78. Łobarzewski J., Paszczyński A., (1985), *Enzyme Microb. Technol.*, 7, 564-566.
79. Leisola M. S. A., Thanei-Wyss U., Fiechter A., (1985), *J. Biotechnol.*, 3, 97-107.
80. Haemmerli S. D., Leisola M. S. A., Fiechter A., (1986), *FEMS Microbiol. Lett.*, 35, 33-36.
81. Kuwahara M., Glenn J. K., Morgan M. A., Gold M., (1984), *FEBS Lett.*, 169, 247-250.
82. Huynh V. B., Crawford R. L., (1985), *FEMS Microbiol. Lett.*, 28, 119-128.
83. Paszczyński A., Huynh V.-B., Crawford R. L., (1985), *FEMS Microbiol. Lett.*, 29, 37-41.
84. Hatakka A. J., Uusi-Rauva A. K., (1983), *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 17, 235-242.
85. Ander P., Eriksson K.-E., (1975), *Svensk Papperstidn.*, 78, 643-652.
86. Hiroi T., Eriksson K.-E., Stenlund B., (1976), *Svensk Papperstidn.*, 79, 162-166.
87. Hiroi T., Eriksson K.-E., (1976), *Svensk Papperstidn.*, 79, 157-161.
88. Westermark U., Eriksson K.-E., (1974), *Acta Chem. Scand.*, B28, 204-208.
89. Westermark U., Eriksson K.-E., (1974), *Acta Chem. Scand.*, B28, 209-214.
90. Westermark U., Eriksson K.-E., (1975), *Acta Chem. Scand.*, B29, 419-424.
91. Garwood G. A., Mortland M. M., Pinnavaia T. J., (1983), *J. Mol. Cat.*, 22, 153-163.
92. Leonowicz A., Rogalski J., Szczodrak J., Fiedurek J., (1986), *Proc. 3rd Intern. Conf. Biotechnol. Pulp Paper Ind.*, Sztokholm, Szwecja, 16-19 June, 1986, 160-162.
93. Johansson T., Nyman P. O., (1987), *Acta Chem. Scand.*, B41, 762-765.
94. Hatakka A., Mohammadi O., Lundell T., (1989), *Food Biotechnol.*, 3, 45-58.
95. Leonowicz A., Sarkar J. M., Bollag J.-M., (1986), dane nie publikowane.
96. Ramasamy K., Kelley R. L., Reddy C. A., (1985), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 131, 436-441.
97. Leonowicz A., Rogalski J., (1986), dane nie publikowane.
98. Kersten P. J., Tien M., Kalyanaraman B., Kirk T. K., (1985), *J. Biol. Chem.*, 260, 2609-2612.
99. Haugen D. A., Van der Hoeven T. A., Coon M. J., (1975), *J. Biol. Chem.*, 250, 3567-3571.
100. Shimada M., Higuchi T., (1983), *Recent Advances in Lignin Biodegradation Research*, (ed. Higuchi T., Chang H.-m., Kirk T.K.), 195-208, Uni Publishers, Tokyo.

Enzymatic transformation of lignocellulose

Summary

Biodegradation of lignocellulose materials by wood-rotting fungi as well as the enzymology and the mechanisms of this process are reviewed.

Adres dla korespondencji:

Andrzej Leonowicz, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Zakład Biochemii,
pl. M. Curie-Skłodowskiej 3, 20-031 Lublin.