

Marta Wesołowska-Trojanowska, Zdzisław Targoński

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

e-mail: marta.wesolowska-trojanowska@up.lublin.pl

HEMICELULAZY – WŁAŚCIWOŚCI, OTRZYMYWANIE I ZASTOSOWANIE

HEMICELLULASES – PROPERTIES, APPLICATION AND PRODUCTION

DOI: 10.15611/nit.2015.2.07

Streszczenie: Celem pracy było scharakteryzowanie właściwości, otrzymywania i zastosowania hemicelulaz. Jest to grupa enzymów, które hydrolizują hemicelulozy – polisacharydy zawarte w ścianach komórkowych roślin, składające się głównie z reszty D-glukozy, D-galaktozy, D-mannozy, D-ksylozy, L-arabiny oraz kwasów heksauronowych: glukuronowego, galakturonowego i metyloglukuronowego. Skład chemiczny hemiceluloz jest zróżnicowany i zależy przede wszystkim od rodzaju rośliny, w której występują. Do najważniejszych hemiceluloz należą ksylany, mannany, galaktany i galaktomannany; są one szeroko wykorzystywane w różnych gałęziach przemysłu. Wykorzystuje się je głównie w przemyśle celulozowo-papierniczym do bielenia pulp; piekarskim do poprawy jakości wytwarzanego pieczywa; paszowym do poprawy strawności pasz zwierzęcych; owocowo-warzywnym; winiarskim. Używa się ich także do produkcji oligosacharydów, etanolu, kawy rozpuszczalnej, środków piorących oraz w celu uzyskania odnawialnych źródeł energii i węgla.

Słowa kluczowe: hemicelulazy, hemicelulozy, ksylany, galaktany, mannany.

Summary: The aim of this review was to characterize preparation, properties, and application of hemicellulases. Hemicellulases are a group of enzymes which hydrolyze hemicelluloses, that is, polysaccharides that are found in plant cell walls, primarily consisting of the residue of Dglucose, D-galactose, D-mannose, D-xylose, L-arabinose as well hexuronic acids: glucuronic, galacturonic, and methyl glucuronic acids. The chemical composition of hemicellulases varies and primarily depends on the type of the plant in which they occur. The most important hemicellulases include xylans, galactans, and galactomannans. Hemicellulases are widely used in different branches of industry. They are used mainly in the pulp and paper industry for pulp bleaching; in the baking industry to improve the quality of bakery products; in the animal feed industry to improve the digestibility of animal feeds; in the fruit and vegetable processing industry as well as in the winemaking industry. These enzymes are also used for the production of oligosaccharides, ethanol, instant coffee, washing agents as well as to obtain renewable sources of energy and coal.

Keywords: hemicellulases, hemicelluloses, xylans, galactans, mannans.

1. Wstęp

Hemicelulazy to grupa enzymów, które hydrolizują hemicelulozy, czyli polisacharydy występujące w ścianach komórkowych roślin, składające się przede wszystkim z reszty D-glukozy, D-galaktozy, D-mannozy, D-ksylozy, L-arabinozy oraz kwasów heksauronowych: glukuronowego, galakturonowego i metyloglukuronowego. Skład chemiczny hemiceluloz jest zróżnicowany i zależy przede wszystkim od rodzaju rośliny, w której występują. Do najważniejszych hemiceluloz należą ksylany, mannany, galaktany i galaktomannany.

Ze względu na położenie wiązań, które hydrolizują, hemicelulazy można podzielić na egzohemicelulazy i endohemicelulazy, a ze względu na polisacharydy, które rozkładają, na hemicelulazy ksylanolityczne, do których należą: endo- β -(1-4)-ksylanaza, β -ksylozydaza, α -glukuronidaza, α -L-arabinofuranozydaza, acetyloesteraza, oraz mannolityczne: endo- β -(1-4)D-mannanaza, β -mannozydaza, β -glukozydaza, α -galaktozydaza.

Preparaty enzymatyczne bogate w hemicelulazy produkowane są przez mikroorganizmy, w tym: grzyby strzępkowe, przede wszystkim te z rodzaju *Aspergillus*, *Trichoderma* oraz *Penicillium*, drożdże z rodzaju *Candida*, a także bakterie z rodzaju *Bacillus*, *Streptomyces*, *Vibrio* oraz *Clostridium*.

Hemicelulazy są szeroko wykorzystywane w różnych gałęziach przemysłu. Wykorzystuje się je głównie w przemyśle celulozowo-papierniczym do bielenia pulp; piekarskim, w celu poprawy jakości wytwarzanego pieczywa; paszowym do poprawy strawności pasz zwierzęcych; owocowo-warzywnym, a także winiarskim.

2. Charakterystyka wybranych hemiceluloz

Hemicelulozy to wspólna nazwa wszystkich wielocukrów występujących, oprócz celulozy i pektyn, w ścianach komórkowych roślin wyższych, spełniających funkcję substancji matrycowych i sklejających. Niektóre z nich należą do substancji zapasowych.

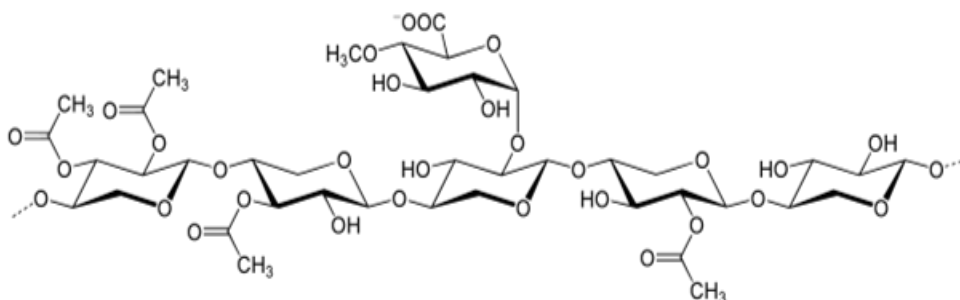
Do grupy hemiceluloz należą m.in. ksylany, mannany, galaktany oraz galaktomannany.

2.1. Ksylany

Ksylan jest bardzo ważnym składnikiem hemiceluloz, ponieważ wraz z ligniną i celulozą wchodzi w skład kompleksu ligninocelulozowego w ścianach komórkowych roślin. Należy do heteropolisacharydów roślinnych.

Łańcuchy ksylanów są kompleksem jednostek D-ksylanopiranozowych połączonych wiązaniem β -1,4 lub β -1,3 (rys. 1). W łańcuchu głównym mogą również występować wiązania mieszane β -1,4 i β -1,3. Zależnie od pochodzenia łańcuch ten może posiadać wiele podstawników, takich jak np. grupy O-acetylowe, kwas 4-O-metyloglukuronowy, ramnoza, i kwasy, takie jak ferulowy, p-kumarowy i galakturonowy [Janas 2002]. Grupy boczne ksylanu mogą uczestniczyć w wiązaniu ligniny

poprzez tworzenie wiązań estrowych pomiędzy resztami kwasu 4-O-metyloglukuronowego oraz ligniną albo eterowych między cząsteczką ligniny a grupami arabinozowymi ksyłanu [Kabel i in. 2007].



Rys. 1. Ksyłan drewna twardego

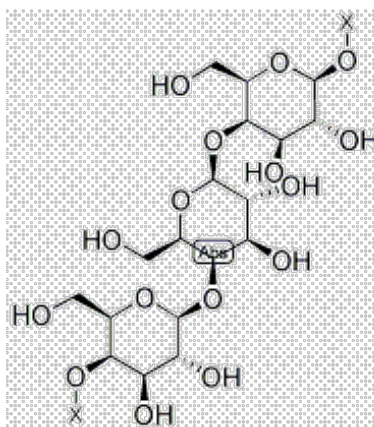
Fig. 1. Hardwood xylan

Źródło: <http://tnij.org/hardwood-xylan>.

Source: <http://tnij.org/hardwood-xylan>.

2.2. Galaktany i galaktomannany

Galaktany zawierają w swojej budowie łańcuchy boczne reszt D-galaktozy, połączonych z łańcuchem głównym wiązaniami β -1,4. Kwasy D-glukuronowy i D-galakturonowy tworzą w nich rozgałęzienia głównego łańcucha, łącząc się z nim wiązaniami



Rys. 2. Struktura galaktanu

Fig. 2. Structure of galactan

Źródło: <http://tnij.org/galactan-structure>.

Source: <http://tnij.org/galactan-structure>.

mi β -1,6-glikozydowymi (rys. 2). Arabinogalaktany stanowią odmianę galaktanów, są zbudowane z reszt D-galaktopiranozy połączonych wiązaniami β -1,3. Łańcuchy boczne odgałęziają się od łańcucha głównego przy C-2 reszt D-galaktopiranozy i L-arabinopiranozy, α -L-piranoza połączona jest natomiast wiązaniami α -1,6 [Bujak, Targoński 1990].

Galaktomannany występują przede wszystkim w nasionach roślin strączkowych, w których stanowią polisacharydy zapasowe. Łańcuch główny stanowią reszty mannozy połączone ze sobą wiązaniami β -1,4 glikozydowymi, do którego wiązaniami α -1,6 dołączone są reszty D-galaktopiranozy. Poszczególne galaktomannany różnią się od siebie stosunkiem mannozy do galaktozy. Mają one zdolność wiązania wody i tworzenia lepkich roztworów przy małych stężeniach. W obecności kationów tworzą żele.

2.3. Mannany

Mannany obecne są w drewnie twardym drzew liściastych, drewnie miękkim iglastych, nasionach niektórych roślin oraz w trawach [Predecka i in. 2005]. Można je także znaleźć w ścianach komórkowych drożdży [Bujak, Targoński 1990]. Polisacharydy te zbudowane są z reszt mannopiranozy, D-glukopiranozy i D-galaktopiranozy, połączonych wiązaniami β -1,4 glikozydowymi. Tak zbudowany typ heteropolimerów nazywa się glukomannanami. Stosunek reszt mannozy do reszt glukozy wynosi 3:1. Mannany otrzymują nazwę w zależności od tego, z jakich reszt są zbudowane. Glukomannany są to polisacharydy, w których stosunek reszt galaktozy do glukozy i mannozy wynosi 0,1:1:4. Natomiast galaktoglukomannany mają w swojej budowie dużo wyższy udział galaktozy. W przyrodzie występują także mannany o bardzo prostej budowie, składają się bowiem tylko z reszt mannopiranozy i przypominają swoją budową krystaliczną celulozę. Takie homopolimery można znaleźć np. w ziarnach kawy i nasionach niektórych gatunków *Umbelliferae* – blaszkowatych [Predecka i in. 2005].

W mannanach, w których znajdują się reszty D-galaktopiranozy, tworzą się łańcuchy boczne połączone z łańcuchem głównym wiązaniami α -1,6-glikozydowymi. Ilość galaktopiranozy zależy od gatunku rośliny, z której hemiceluloza pochodzi. Ponadto niektóre grupy hydroksylowe przy C-2 i C-3, głównie mannozy i w mniejszym stopniu glukozy, są acetylowane [Chauhan i in. 2012].

3. Enzymy kompleksu hemicelulitycznego

Hemicelulazy są zróżnicowaną grupą enzymów hydrolizujących hemicelulozy. Są one podstawowym składnikiem biorącym udział w degradacji biomasy roślinnej oraz przepływie węgla w naturze. Degradacja hemiceluloz jest prowadzona przez mikroorganizmy, które występują albo w postaci wolnej w naturze, albo w niektórych częściach przewodu pokarmowego zwierząt wyższych. Zmienna i zróżnicowa-

na struktura hemiceluloz do ich całkowitej degradacji wymaga wspólnego działania wielu enzymów [Decker i in. 2009]. Proces ten jest powolny, ponieważ nierozpuszczalna i sztywna struktura ściany komórkowej roślin ogranicza dostępność skutecznych, hemicelulolitycznych mikroorganizmów (rys. 3). W dużej części polisacharydy są albo nierozpuszczalne, albo ściśle związane z nierozpuszczalnym celulozowym matrix [Himmel i in. 2010].

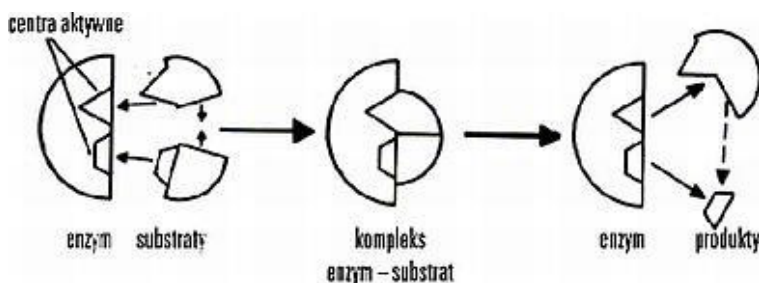
Degradacja hemiceluloz stawia mikroorganizmy przed kilkoma istotnymi wyzwaniami, ponieważ polisacharydy te mają wysoką masę cząsteczkową, są nierozpuszczalne oraz związane z celulozą i ligniną, są także wysoko zmienne w swojej strukturze i chociaż rzeczywista liczba różnych wiązań chemicznych jest ograniczona, mogą występować w różnych strukturalnych kombinacjach. Biorąc pod uwagę te wszystkie wyzwania, nie dziwi fakt, że natura stworzyła różne strategie, umożliwiające degradację roślinnej ściany komórkowej.

Strategie te można podzielić na trzy główne grupy:

- Mikroorganizmy tlenowe, takie jak grzyby – *Trichoderma* i *Aspergillus*, wydzielają w wysokich stężeniach całą gamę hemicelulaz, które potrafią pracować synergistycznie. Ta grupa enzymów całkowicie rozkłada polimery do monosacharydów albo disacharydów.
- Bakterie tlenowe, takie jak np. *Bacillus* i *Cellvibrio*, wydzielają mniej skuteczne enzymy degradujące sieć strukturalną polisacharydów. Produktami ich działalności jest stosunkowo duża liczba oligosacharydów, których całkowity rozkład prowadzony jest przez enzymy wewnątrzkomórkowe.
- Bakterie beztlenowe, takie jak *Clostridia*, rozwinęły unikatowy multienzymatyczny kompleks – celulosom, na który składa się wiele celulolitycznych i hemicelulolitycznych enzymów [Shallom, Shoham 2003].

Hemicelulazy można podzielić na:

- endohemicelulazy, które hydrolizują wiązania glikozydowe łańcucha hemicelulozy w sposób przypadkowy, tną go na początkowo mniejsze fragmenty i uwalniają w końcowej fazie cukry redukujące,



Rys. 3. Schemat reakcji enzymatycznej
Fig. 3. Scheme of the enzymatic reaction

Źródło: <http://tnij.org/enzymes>.
 Source: <http://tnij.org/enzymes>.

- egzohemicelulazy, które odszczepiają sukcesywnie pojedyncze lub podwójne reszty cukrowe od nieredukującego końca cząsteczki.
Biorąc pod uwagę strukturę hemiceluloz, enzymy rozkładające te polisacharydy można podzielić na:
 - ksylanolityczne (np. endo- β -(1-4)-ksylanaza, β -ksylozydaza, α -glukuronidaza, α -L-arabinofuranozydaza, acetyloesteraza),
 - mannolityczne (np. endo- β -(1-4)-D-mannanaza, β -mannozydaza, β -glukozydaza, α -galaktozydaza).

3.1. Hemicelulazy ksylanolityczne

Endo- β -1,4-ksylanaza

Najbardziej powszechnym i popularnym producentem endoksylianaz są grzyby. Enzymy te mogą być podzielone na dwie grupy:

- te, które uwalniają L-arabinozę przez enzymatyczną hydrolizę arabinoksylianów i arabinoglukuronoksylianów,
- te, które nie uwalniają L-arabinozy z tych substratów; oba typy są jednak zdolne do degradacji glukuronoksylianów i D-ksylanów [Ghose, Bisaria 1987].

Enzymy te hydrolizują w sposób przypadkowy wiązania β -1-4-glikozydowe w sieci strukturalnej ksylanów. Produktami reakcji są podstawione lub nie oligomery – ksyloza albo ksylobioza. Większość znanych ksylanaz należy do rodzin hydrolaz glikozydowych – 10 lub 11, a reszta jest rozproszona pomiędzy rodziny 5,8 i 43 [Shallom, Shoham 2003]. Rodzina 10 jest dużo większa, a produktami działania enzymów do niej należących są krótkie oligosacharydy. Natomiast enzymy rodziny 11 (tab. 1) wykazują większą specyficzność w stosunku do ksylanu, są także odporne na wysoką temperaturę i dlatego znalazły zastosowanie w przemyśle [Tokarzewska-Zadora i in. 2005].

Tabela 1. Charakterystyka endo- β -1-4-ksylanaz
Table 1. Characterization of endo- β -1-4-xylanase

Pochodzenie enzymu Enzyme host organism	Masa cząsteczkowa (kDa) Molecular weight (kDa)	Punkt izoelektryczny Isoelectric point	Optymalne pH Optimum pH	Optymalna temperatura (°C) Optimum temperature (°C)
<i>Aspergillus oryzae</i>	21	-	4	5
<i>Clostridium absonum</i>	150	-	6,5-7,5	75
<i>Trichoderma reesei</i>	20	9	5,0-5,5	-

Źródło: [Tokarzewska-Zadora i in. 2005].

Source: [Tokarzewska-Zadora et al. 2005].

α -L-arabinofuranozydaza

Enzym ten powoduje usunięcie z nieredukujących końców hemiceluloz reszt L-arabinofuranozowych (tab. 2). Hydrolizują one zarówno reszty połączone z łańcuchem głównym wiązaniem α -1-3, jak i α -1-5-arabinofuranozowym. Hydroliza trwa aż do momentu przemiany arabinianu do arabinozy. Usunięcie reszt arabinofuranozowych ułatwia endo- β -1-4-ksylanazom atak na łańcuch ksylanu. Częstotliwość występowania tych reszt nie jest dokładnie zbadana. Według niektórych naukowców na 20-40 reszt D-ksylopiranozy przypada tylko jedna reszta L-arabinofuranozy, według innych jedna reszta występuje na 7-13 reszt D-ksylopiranozowych. Jednak bez względu na to, ile ich jest, skutecznie hamują hydrolizę enzymatyczną hemiceluloz z udziałem endo- β -1-4-ksylanaz [Tokarzewska-Zadora i in. 2005].

Tabela 2. Właściwości niektórych α -L-arabinofuranozydaz

Table 2. Properties of some α -L-arabinofuranosidases

Pochodzenie enzymu Enzyme host organism	Masa cząsteczkowa (kDa) Molecular weight (kDa)	Punkt izoelektryczny Isoelectric point	Optymalne pH Optimum pH	Optymalna temperatura (°C) Optimum temperature (°C)
<i>Aspergillus awamori</i>	65	3,6	4,6	50
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	94	8,2	5,0-5,5	-
<i>Streptomyces purpurascens</i>	495	3,9	6,5	-

Źródło: [Tokarzewska-Zadora i in. 2005].

Source: [Tokarzewska-Zadora et al. 2005].

α -D-glukuronidaza

Enzym ten rozszczepia wiązania α -1,2-glikozydowe między resztami kwasu 4-O-metylo- α -D-glukopiranozowego, które związane są z łańcuchem ksylanowym w pozycjach 1-2 i D-ksylozy oraz α -D-glukopiranozowego i D-ksylozy. Produktem hydrolizy jest kwas 4-O-metylo- α -D-glukuronowy albo D-glukuronowy. W większości przypadków enzym ten działa na wiązania od nieredukującego końca głównego łańcucha. α -D-glukuronidaza jest mało zbadanym enzymem. Masa cząsteczkowa wynosi około 100 kDa, a aktywność tego enzymu została stwierdzona u wybranych grzybów i bakterii [Jutru, Wu 2013].

β -ksylozydaza

Enzym ten jest egzohemicelulazą. Hydrolizuje krótkie ksylooligomery do prostych jednostek ksylozy. Przestrzenne podobieństwo pomiędzy D-ksylopiranozą i L-arabinofuranozą prowadzi do tego, że ksylozydazy i arabinozydazy można znaleźć głównie w tych samych rodzinach (3, 43, 54) i z tego powodu uważa się je za enzymy pełniące dwie funkcje [Shallom, Shoham 2003]. Vocablo [2002] sugeruje, że

w β -ksylozydazie pochodzącej z *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* występuje przypadek „odwrotnej protonacji”, w którym znajdują się dwa kwasy karboksylowe funkcjonujące razem jako kwasowo-zasadowy katalizator [Vocaldo 2002]. Ten rodzaj wyjątkowego mechanizmu wcześniej sugerowano dla ksylanaz z rodziny 11 pochodzących z *Bacillus circulans* [Shallom, Shoham 2003].

Esterazy hemicelulolityczne

W skład esteraz celulolitycznych wchodzi esteraza octanowa, która odłącza kwas octowy od łańcucha głównego, acetyloksylanoesteraza, która katalizuje hydrolizę grup acetylowych w cząsteczce ksylozy, oraz esteraza ferulanowa, która hydrolizuje wiązania estrowe pomiędzy arabinozą i kwasem ferulowym. Ten ostatni ester bierze udział w sieciowaniu ksylanu do ligniny [Shallom, Shoham 2003]. Obecność esterazy octanowej jest bardzo ważna przy rozkładzie drewna twardego, którego reszty ksylopiranozy są acetylowane w ok. 60-70%. Esteraza ferulanowa odłącza kwas ferulowy z arabinoksyfanów, dzięki temu ściana komórkowa jest bardziej podatna na dalszą degradację enzymatyczną [Saha 2003].

3.2. Hemicelulazy mannolityczne

Endo- β -(1-4)-D-mannanaza

Mannanaza hydrolizuje wiązania β -1-4-glikozydowe łańcucha głównego mannanów i uwalnia krótkie β -1-4-manno-oligomery, które dalej hydrolizowane są do mannozy przez β -mannozydazę [Jutru, Wu 2012]. Proces hydrolizy mannanów wzrasta wraz z malejącą liczbą reszt galaktozowych, a skuteczność hydrolizy zależy od stopnia polimeryzacji polisacharydów.

Enzym ten jest produkowany przez drożdże, bakterie, glony, grzyby, rośliny wyższe, np. migdały, kawę i morele, oraz zwierzęta – ssaki, ostrygi i ślimaki.

β -mannozydaza

Enzym ten hydrolizuje krótkie, powstałe w wyniku działania endo- β -(1-4)-D-mannanazy- β -1-4-manno-oligomery do mannozy. Wytwarzana jest przez bakterie, np. *Bacillus sp.*, i grzyby strzępkowe, np. *Aspergillus niger*. β -mannozydazę znaleziono także u zwierząt wyższych, bierze ona udział w lizosomalnej degradacji glikoprotein. Niedobór tego enzymu u ludzi i przeżuwaczy prowadzi do opóźnienia umysłowego i zaburzenia tkanki szkieletowej [Shallom, Shoham 2003].

β -glukozydaza

Enzym ten katalizuje reakcję hydrolizy nieredukujących i końcowych reszt β -D-glukozy z glikozydów. Podzielono je na trzy grupy ze względu na ich specyficzność substratową (tab. 3):

- enzymy, które wykazują specyficzność wobec arylo- β -D-glukozydów,
- enzymy, które przede wszystkim hydrolizują celbiozę i celbiooligosacharydy,
- enzymy, które katalizują hydrolizę obu wyżej wymienionych substratów [Prendecka i in. 2005].

Tabela 3. Cechy wybranych glukozydaz**Table 3.** Properties of selected glucosidases

Pochodzenie enzymu Enzyme host organism	Masa cząsteczkowa (kDa) Molecular weight (kDa)	Punkt izoelektryczny Isoelectric point	Optymalne pH Optimum pH	Optymalna temperatura (°C) Optimum temperature (°C)
<i>Pisolithus tinctorius</i>	150	3,8	4,0	65
<i>Volvariella volvacea</i>	158	5,6	7,0	55-60
<i>Aspergillus japonicus</i>	121	4,7	5,0	60

Źródło: [Prendecka i in. 2005].

Source: [Prendecka et al. 2005].

α -galaktozydaza

Enzym ten katalizuje hydrolizę reszt α -D-galaktopiranozy w galaktozydach. Działa na oligosacharydy, które zawierają galaktozę, galaktoglukomannany i galaktolipidy, oraz uwalnia reszty galaktozy, które są przyłączone do łańcucha zbudowanego z mannozy wiązaniami α -1-6-glikozydowymi [Prendecka i in. 2005].

α -galaktozydaza produkowana jest przez organizmy takie jak bakterie, np. *Celulomonas fimi*, drożdże, np. *Mortierella vinacea*, grzyby – *Aspergillus sp.*, *Trichoderma reesei* (tab. 4).

Tabela 4. Właściwości wybranych galaktozydaz**Table 4.** Properties of selected galactosidases

Pochodzenie enzymu Enzyme host organism	Masa cząsteczkowa (kDa) Molecular weight (kDa)	Punkt izoelektryczny Isoelectric point	Optymalne pH Optimum pH	Optymalna temperatura (°C) Optimum temperature (°C)
<i>Penicillium ochrochloron</i>	60,2	-	4,5	55
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	57	5,2	4,5-5,0	65-70
<i>Aspergillus niger</i>	94	4,15	4,5	60

Źródło: [Prendecka i in. 2005].

Source: [Prendecka et al. 2005].

3.3. Hemicelulazy wielofunkcyjne

Depolimeryzacja ligninocelulozy wymaga wielu enzymów, a jedną z przeszkód do ekonomicznej biokonwersji takich produktów jest kosztowność procesów, które wymagają także dużej ilości energii. Wyzwanie stanowi opłacalne enzymatyczne scu-

krzanie biomasy ligninocelulozowej obejmujące zapotrzebowanie na zwiększenie aktywności hydrolaz oraz redukcji liczby białek niezbędnych do procesu. Wielofunkcyjny enzym XylN-DeAFc, degradujący ksylan, został stworzony przez połączenie domeny ksylanazy pochodzącej z *Clostridium thermocellum* (XylN) oraz dwufunkcyjnej arabinofuranozydazy/ksylozydazy (DeAFc) łańcuchem peptydowym. Rozpuszczalne enzymy rodzime i XylN-DeAFc były produkowane przez *E. coli*. Chimera posiada aktywność ksylanazy, endoglukanazy, arabinofuranozydazy i ksylozydazy, ma właściwości zbliżone do rodzimych enzymów – pH, optymalną temperaturę i kinetykę. Jest bardziej aktywna w hydrolizie naturalnych ksylanów niż mieszanina rodzimych enzymów.

Projektowanie enzymów posiadających wiele domen, zdolnych do katalizy dwóch lub więcej reakcji, jest możliwą drogą do redukcji liczby enzymów biorących udział w konwersji biomasy. W dodatku wielofunkcyjne hydrolazy są synergistyczne w degradacji substratów. W naturze wiele organizmów wykształciło wielofunkcyjne enzymy do degradacji polisacharydów. Naturalnym, wielofunkcyjnym enzymem zawierającym zespół enzymów jest celulosom. Ta i inne naturalne strategie zostały wykorzystane do produkcji pojedynczego enzymu ze specyficznością substratową trzech lub więcej enzymów.

4. Otrzymywanie hemicelulaz

Hemicelulazy są wytwarzane przez szerokie spektrum głównie saprofitycznych drobnoustrojów. Występują w glebie, wodzie, na owocach, warzywach, w przewodzie pokarmowym ludzi i zwierząt. Z tych naturalnych środowisk izolowani są potencjalni producenci hemiceluloz [Polizeli i in. 2005; Sizova i in. 2011]. Jednak komercyjne znaczenie ma wąska grupa drobnoustrojów, głównie są to grzyby i termofilne bakterie. Aerobowe drobnoustroje z rodzaju *Trichoderma* i *Aspergillus* wytwarzają duże ilości zewnątrzkomórkowych enzymów, w tym hemicelulaz, które degradują polimery do monosacharydów i disacharydów, a otrzymane preparaty enzymatyczne mają znaczenie komercyjne [Michelin i in. 2010; Lafond i in. 2011]. Z kolei aerobowe bakterie z rodzaju *Bacillus* i *Cellvibrio* wytwarzają kompleks enzymów degradujących hemicelulozy do oligosacharydów, a dalsza degradacja prowadzona jest przez enzymy związane ze ścianą komórkową lub enzymy wewnątrzkomórkowe. Anaerobowe bakterie, z rodzaju *Clostridium*, wytwarzają celulosomy, które mają zintegrowany kompleks celulaz i hemicelulaz. Jest rzeczą interesującą, że *C. thermocellum* wytwarzające celulosomowy kompleks celulaz i hemiceluloz, jako źródło węgla wykorzystuje celobiozę, a nie jest zdolny do utylizacji produktów hydrolizy hemiceluloz.

Wiele drobnoustrojów wytwarza zarówno celulazy, jak i ksylanazy, co związane jest ze strukturą ściany komórkowej roślin. Jednakże są drobnoustroje, które syntetyzują tylko hemicelulozy. Takim gatunkiem jest *Thermomyces lanuginosus* wytwarzająca bardzo duże ilości ksylanaz, a nie wytwarzająca celulaz [Saha 2003]. Hemi-

celulazy na ogół należą do enzymów indukcyjnych, a czynnikami indukującymi ich syntezę są produkty degradacji hemiceluloz, chociaż w niewielkim stopniu enzymy te wytwarzane są konstytucyjne, głównie w celu rozpoznania obecności hemiceluloz w podłożu.

Hemicelulazy są wytwarzane w skali przemysłowej podczas hodowli grzybów. Rozwój technologii rekombinacji DNA stwarza możliwości ekspresji enzymów na wysokim poziomie zarówno w homologicznych, jak i heterologicznych gospodarzach. Ekspresja hemicelulaz w bakteriach czy drożdżach ma liczne wady i ograniczone możliwości aplikacji, zwłaszcza w przypadku bakterii. Dużym problemem jest degradacja proteolityczna enzymów oraz tworzenie się ciał inkluzyjnych wewnątrz komórek bakterii. Ekspresja poszczególnych enzymów kompleksu hemiceluloz jest uzasadniona w przypadku grzybów strzępkowych i sprowadza się do kilku gospodarzy, tj. szczepów *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* czy *Rhizopus*. Jednak i tutaj napotyka się liczne trudności związane z nieodpowiednią glikozylacją białek, degradacją białek heterologicznych przez wewnątrzkomórkowe proteazy czy niskim poziomem ekspresji [Michelin i in. 2010].

5. Zastosowanie hemicelulaz

5.1. Zastosowanie enzymów ksylanolitycznych

Rozkład hemiceluloz do cukrów prostych

Najważniejszym zastosowaniem enzymów ksylanolitycznych jest proces hydrolizy hemicelulozy do cukrów prostych, przede wszystkim ksyozy, ksylbiozy, kwasów uronowych i ksylotriozy. Produkty takiej hydrolizy mogą być następnie wykorzystywane w różnych procesach biotechnologicznych i chemicznych do otrzymywania etanolu, furfuralu, ksylulozy, białka drobnoustrojów czy środków słodzących, np. ksylitolu, który jest otrzymywany pośrednio z hemiceluloz i stosowany jako substytut cukru dla osób chorych na cukrzycę i w celach medycznych przy leczeniu diabetyków.

Przemysł celulozowo-papierniczy

Enzymy te znalazły szerokie zastosowanie w przemyśle celulozowo-papierniczym. Stosuje się je do wybielania pulpy drzewnej. W konwencjonalnych i powszechnie stosowanych metodach wybielania proces ten był wykonywany z użyciem chloru, ozonu, dwutlenku chloru i wodorotlenku sodu [Beg i in. 2001]. Stosowanie tych związków, a szczególnie chloru, powoduje zanieczyszczenie środowiska, dlatego są niechętnie używane w tym procesie. Stosowanie preparatów enzymów ksylanolitycznych do wybielania wstępnie ogranicza zużycie chloru o 20-30%, a to z kolei obniża o 50% powstawanie organicznych związków chloru w odcieku. Dzięki metodzie enzymatycznej wybielona pulpa ma wyższą końcową jasność niż ta wybielana

metodami chemicznymi. O możliwościach stosowania preparatów enzymów ksylanolitycznych świadczy fakt, że prawie 50% produkowanej pulpy drzewnej jest wybielane. Jednak warunkiem przemysłowej przydatności tych enzymów jest to, że produkowane hemicelulazy nie mogą wykazywać aktywności celulozowej, dlatego mikroorganizmy produkujące te enzymy trzeba tak genetycznie zmodyfikować, aby prowadziły nadprodukcję ksylanazy przy zahamowaniu produkcji celulaz [Janas 2002].

Przemysł piekarniczy

Ksylanazy znalazły zastosowanie także w przemyśle piekarniczym. Mogą one zastępować składniki takie jak środki utleniające, sód jęczmienny, pszeniczny, a także emulgatory. Oceniając przydatność preparatów enzymów ksylanolitycznych, bada się korzyści, które osiąga się przy wyrabianiu ciasta, a to: objętość produktu, zdolność do gromadzenia wody oraz jak długo gotowy produkt nadaje się do spożycia. Produkt jest oceniany przede wszystkim na podstawie jego koloru, objętości, kruchości i aromatu. Ksylanazy wpływają na zwiększenie objętości produktów piekarniczych w wyniku redystrybucji wody pomiędzy fazą glutenową a pentozanową. Zwiększenie objętości fazy glutenowej wpływa na korzystniejsze rozrastanie się ciasta, z czego następnie wynika większa sprężystość w czasie pieczenia. Zwiększenie objętości właściwej produktu gotowego jest wynikiem hydrolizy dużych i nierozpuszczalnych cząstek pentozanów do rozpuszczalnych i krótszych. W mące obok hemiceluloz występują arabinoksylany, które są połączone z białkami. Odgrywają one bardzo ważną rolę w procesie pieczenia chleba żytniego oraz pszennego, bo posiadają zdolności do wiązania dużych ilości wody. Endoksylanazy prowadzą do uzyskania maksymalnej ilości pentozanów rozpuszczalnych, co wpływa hamująco na starzenie się produktu gotowego. Ksylanazy używane w przemyśle piekarniczym polepszają wilgotność, objętość oraz porowatość pieczywa [Romanowska 2003].

Przemysł owocowo-warzywny i fermentacyjny

Zostały także wykonane udane próby zastosowania preparatów enzymów ksylanolitycznych do klarowania soków, na przykład owocowych i warzywnych. Enzymy te są także wykorzystywane przy ekstrakcji kawy oraz przy produkcji skrobi i olejów roślinnych, gdzie powodują zwiększenie wydajności i jakości uzyskiwanych produktów końcowych.

Hemicelulazy aktywne w niskiej temperaturze mają znaczną przewagę w produkcji preparatów enzymatycznych, m.in. w takim procesie, jak poprawa koloru i klarowności soków [Bamforth 2009]. Na dodatek zamrożona masa ciasta gotowego do wypieku może zyskać wiele korzyści z dodatku hemicelulaz aktywnych w niskiej temperaturze. Wysoka aktywność w niskiej temperaturze i szeroki zakres pH sprawiają, że enzymy te są szczególnie użyteczne w przetwórstwie żywności, na przykład w procesie ekstrakcji soków owocowych [Bradner 1999].

Hemicelulazy, a zwłaszcza β -(1-3),(1-4)-glukanaza, znalazły zastosowanie w przemyśle piwowarskim do hydrolizy β -glukanu w jęczmieniu. Hydroliza β -glukanu ułatwia filtrację piwa oraz zapobiega powstawaniu zmętnienia.

Uzyskiwanie odnawialnych źródeł energii i węgla

Stawiającym największe wymagania zastosowaniem hemicelulaz jest rozwój procesów rozkładu materiału ligninocelulozowego w celu uzyskania odnawialnego źródła energii i węgla w biologicznych procesach z zastosowaniem biokatalizatorów enzymatycznych. Względy ekonomiczne przemawiają właśnie za tym, aby każdy surowiec zawierający hemicelulozy był wykorzystany, chociażby dlatego, żeby zmniejszyć ilość odpadów poprodukcyjnych [Shallom, Shoham 2003].

Produkcja ksylooligosacharydów

Hemicelulazy mogą być także stosowane do enzymatycznej syntezy oligosacharydów [Shallom, Shoham 2003]. Jednymi z najpowszechniej stosowanych oligosacharydów są ksylooligosacharydy. Są one używane ze względu na swoje technologiczne właściwości oraz efekty zdrowotne, jakie przynoszą. Przede wszystkim wpływają korzystnie na florę żołądkowo-jelitową. Jedną z najważniejszych funkcji ksylooligosacharydów jako składnika żywności jest ich zdolność do stymulacji wzrostu bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*, które są zaliczane do probiotyków. Z tego względu żywność, która zawiera oligosacharydy, jest prebiotykiem. Ksylooligosacharydy są zatem aktywnym składnikiem żywności funkcjonalnej, która różni się od żywności konwencjonalnej tym, że korzystnie wpływa na fizjologię człowieka i redukuje ryzyko wystąpienia chorób, których przyczyną jest pożywienie [Vazquez 2000].

Przemysł paszowy

Stosowanie enzymów w produkcji pasz jest ważne w sektorze agrobiznesu z tego względu, że roczna produkcja pasz na świecie przekracza 600 milionów ton, co daje obroty ponad 50 mld dolarów. Ksyłanazy są stosowane w żywieniu zwierząt razem z glukanazami, pektynazami, celulazami, proteazami, amylazami, fitazami, galaktozydazami i lipazami. Enzymy te rozkładają arabinoksylan zawarty w składnikach pasz, zmniejszając tym samym ich lepkość. Arabinoksylany zawarte w ścianie komórkowej ziarna mają antyodżywczy wpływ na drób. Dodanie ksyłanaz do pasz może poprawić trawienie składników odżywczych w początkowej części przewodu pokarmowego, co prowadzi do lepszego wykorzystania energii. Wspólne działanie pozostałych wymienionych enzymów powoduje powstanie strawnej mieszaniny żywnościowej [Polizeli i in. 2005].

Enzymy ksyłanolityczne zwiększają strawność pasz stosowanych do karmienia zwierząt, a uzyskana przez biokonwersję ksyloza może zostać efektywnie spożytko-

wana jako źródło węgla przy produkcji pasz. Ksyłanazy znalazły zastosowanie także w żywieniu kurcząt brojlerów. Najlepszą wartość rzeźną uzyskuje się podczas żywienia kurcząt paszami z dodatkiem endo-1,4- β -ksylanazy, celulazy i endo-1,3- β -glukanazy. Najlepsze fizykochemiczne cechy mięśni piersiowych drobiu uzyskano, stosując pasze z dodatkiem endo-1,4- β -ksylanazy produkowanej przez szczep *Thermomyces lonuginosus* [Wojnowska 2006; Rubaj, Matyka 2004].

Przemysł tekstylny

Kompleks enzymów ksylanolitycznych może być wykorzystywany w przemyśle włókienniczym do przetwarzania włókien roślinnych. W tym celu ksylanaza powinna być wolna od enzymów celulolitycznych. Proces polega na inkubacji suszonych łądyg chińskiej trawy z ksylanazą, co pozwala wydzielić długie, nienaruszone włókna celulozowe. Po użyciu tej metody nie jest potrzebne mocne bielienie, ponieważ ligniny nie ulegają utlenianiu, które prowadzi do ciemnienia włókien [Polizeli i in. 2005].

5.2. Zastosowanie enzymów mannolitycznych

Przemysł papierniczy

Dokładne poznanie tych enzymów, technik ich oczyszczania oraz izolacji miało duży wpływ na możliwości ich praktycznego wykorzystywania w różnorodnych gałęziach przemysłu [Chauhan i in. 2012]. Bardzo ważnym zastosowaniem enzymów mannolitycznych jest ich wykorzystanie w przemyśle celulozowo-papierniczym przy wyrobie papieru o bardzo wysokiej jakości. α -galaktozydaza stosowana jest przede wszystkim w przemyśle papierniczym, gdzie przyczynia się do zwiększania efektywności degradacji hemiceluloz.

Produkcja kawy rozpuszczalnej

Enzymy mannolityczne mają także zastosowanie w przemyśle spożywczym, m.in. przy produkcji kawy rozpuszczalnej. Arabinogalaktan, celuloza i mannan są głównymi polisacharydami występującymi w zielonych nasionach kawy. Najważniejszy z nich jest krystaliczny i nierozpuszczalny w wodzie mannan, który stanowi około 20-30% suchej masy nasion gatunku Arabika i Robusta. Tak duża ilość mannanu powoduje dużą lepkość ekstraktu kawy przy procesie jego zagęszczania przed procesami suszenia oraz liofilizacji. Użycie mannanaz, a co za tym idzie, zmniejszenie lepkości ekstraktu, znacznie ułatwia produkcję kawy rozpuszczalnej, ponieważ prowadzi do poprawy wydajności zagęszczania ekstraktu, a ponadto redukuje koszty suszenia. Lepkie roztwory galaktanów i mannanów są bardzo często używane w przemyśle spożywczym jako zagęstniki [Van Zyl i in. 2010].

Produkcja środków piorących

Ważnym zastosowaniem praktycznym enzymów mannolitycznych, a zwłaszcza mannanazy, jest użycie jej w środkach piorących do enzymatycznego usuwania zanieczyszczeń spożywczych, które zawierają mannany, będące środkami zagęszczającymi lub stabilizującymi w żywności [Chauhan i in. 2012].

6. Podsumowanie

Hemicelulazy są bogatym kompleksem enzymów, których skład i aktywności uzależnione są od rodzaju drobnoustroju będącego producentem enzymów, składu podłoża hodowlanego i warunków hodowlanych. Dobór preparatów enzymatycznych do hydrolizy hemiceluloz jest problemem złożonym z racji ich różnorodności w materiałach roślinnych oraz powiązań z ligniną i celulozą. Z uwagi na powszechność występowania hemiceluloz w przyrodzie zainteresowanie ich enzymatyczną degradacją ciągle rośnie. Dlatego nieustannie prowadzone są badania nad intensyfikacją produkcji hemicelulaz, a także poszerza się baza ich zastosowań w różnych obszarach przemysłu, rolnictwa i gospodarki żywnościowej.

Literatura

- Bamforth C.W., 2009, *Current perspectives on the role of enzymes in brewing*, Journal of Cereal Science, 50(3), s. 353–357.
- Beg Q.K., Kapoor M., Mahajan L., Hoondal G.S., *Microbial xylanases and their industrial applications: a review*, Appl Microbiol Biotechnol., 2001, 56, s. 326-338.
- Bradner J.R., 1999, *Hemicellulase activity of antarctic microfungi*, J. Appl. Microbiol., 87, s. 366-370.
- Bujak S., Targoński Z., 1990, *Mikrobiologiczna degradacja hemiceluloz*, Post. Mikrobiol., 1-2, s. 77-90.
- Chauhan P.S., Puri N., Sharma P., Gupta N., 2012, *Mannanases: Microbial sources, production properties and potential biotechnological applications*, Appl Microbiol Biotechnol., 93, s. 1817-1830.
- Decker S.R., Siika-Aho M., Viikari L., 2009, *Enzymatic depolymerization of plant cell wall hemicelluloses in: biomass recalcitrance: Deconstructing the plant cell wall for bioenergy*, M.E. Himmel (ed.) Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, s. 352-373.
- Fan Z., 2009, *Engineering of multifunctional hemicellulose*, Biotechnol. Lett., 31, 751-757.
- Ghose T.K., Bisaria V.S., 1987, *Measurement of hemicellulase activities. Part 1: Xylanases*, Pure & Appl. Chem., 12, s. 1739-1752.
- Himmel M.E., Xu Q., Luo Y., Ding S.Y., Lamed R., Bayer E.A., 2010, *Microbial enzyme systems for biomass conversion: emerging paradigms*, Biofuels, 1(2), s. 323-341.
- Janas P., 2002, *Zastosowanie substratów ligninocelulozowych do otrzymywania preparatów enzymów ksylanolitycznych o niskiej aktywności celulaz*, Biotechnologia, 1(1-2), s. 5-17.
- Jutru V., Wu J.C.H., 2013, *Insight into microbial hemicellulases other than xylanases; A review*, J. Chem. Technol. Biotechnol., 88, s. 353-364.
- Kabel M.A., van den Borne H., Vincken J.P., Voragen A.G.J., Schols H.A., 2007, *Structural differences of xylans affect their interaction with cellulose*, Carbohydr. Polymers, 69, s. 94-105.

- Kudah R.C., Gupta R., Singh A., 2011, *Microbial Cellulases and Their Industrial Applications*, Enzyme Research, s. 1-11.
- Lafond M., Tauzin A., Desseaux V., Bonnin E., Ajandouz el-H., Giardina T., 2011, *GH10 xylanase D from Penicillium funiculosum: biochemical studies and xylooligosaccharide production*, Microb. Cell Fact., 10, s. 20-27.
- Michelin M., Peixoto-Nogueira S.C., Betini J.H., da Silva T.M., Jorge J.A., Terenzi H.F., Polizeli M.L., 2010, *Production and properties of xylanases from Aspergillus terricola Marchal and Aspergillus ochraceus and their use in cellulose pulp bleaching*, Bioprocess Biosyst. Eng., 33(7), s. 813-21.
- Polizeli M.L.T.M., Rizzatti A.C.S., Monti R., Terenzi H.F., Jorge J.A., Amorim D.S., 2005, *Xylanases from fungi: Properties and industrial applications*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 67, s. 577-591.
- Prendecka M., Rogalski J., Szczodrak J., 2005, *Enzymatyczna hydroliza mannanów roślinnych*, Biotechnologia, 1 (68), 61-78.
- Romanowska I., 2009, *Optymalizacja procesu nagromadzenia ksylanazy przez Aspergillus niger IBT-90*, Biotechnologia, 3 (1-2), s. 13-23.
- Romanowska I., 2003, *Zastosowanie ksylanazy grzybowej w piekarnictwie*, Biotechnologia, 2 (1-2), s. 117-127.
- Rubaj J., Matyka S., 2004, *Strawność i wartość energetyczna w żywieniu kurcząt brojlerów zgranulowanego jęczmienia i żyta z dodatkiem kompleksu enzymatycznego*, Roczn. Nauk. Zoot., 31 (2), s. 271-277.
- Saha C.B., 2003, *Hemicellulose bioconversion*, J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 30, 279-291.
- Shallom D., Shoham Y., 2003, *Microbial hemicellulases*, Curr. Opin. Microbiol., 6, s. 219-228.
- Sizova M.V., Izquierdo J.A., Panikov N.S., Lynd L.R., 2011, *Cellulose- and xylan-degrading thermophilic anaerobic bacteria from biocompost*, Appl. Environ. Microbiol., 77 (7), 2282-91.
- Tokarzewska-Zadora J., Rogalski J., Szczodrak J., 2005, *Enzymy rozkładające ksylan – charakterystyka i zastosowanie w biotechnologii*, Biotechnologia, 2 (69), s. 163-182.
- Van Zyl W.H., Rose S.H., Trollope K., Gorgens J.F., 2010, *Fungal β -mannanases mannan hydrolysis, heterologous production and biotechnological applications*, Process Biochem., 45, s. 1203-1213.
- Vázquez M.J., 2000, *Xylooligosaccharides: Manufacture and applications*, Trends in Food Science & Technology, 11, s. 387-393.
- Vocadlo D.J., 2002, *A case for reverse protonation*, Biochemistry, 41, s. 9736-9746.
- Wojnowska M., 2006, *The effects of selected enzymatic preparations on the slaughter value and physical and chemical traits of muscles*, "Science for poultry practice – poultry practice for science": XVIII International Poultry Symposium PB WPSA, Rogów, 4-6 September 2006, Wydaw. SGGW, Warszawa, s. 136-139.

<http://tnij.org/enzymes>.

<http://tnij.org/galactan-structure>.

<http://tnij.org/hardwood-xylan>.