# Razgradnja celoloze celulosomom

**Bartolić, Marija**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2018**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:009245

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-03-29**

*Repository / Repozitorij:*

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Marija Bartolić

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

# RAZGRADNJA CELULOZE CELULOSOMOM

**Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Marko Močibob

Zagreb, 2018.

Datum predaje prve verzije Završnog rada: 12. kolovoza 2018.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita: 21. rujna 2018.

Mentor rada: doc. dr. sc. Marko Močibob Potpis:

# Sadržaj

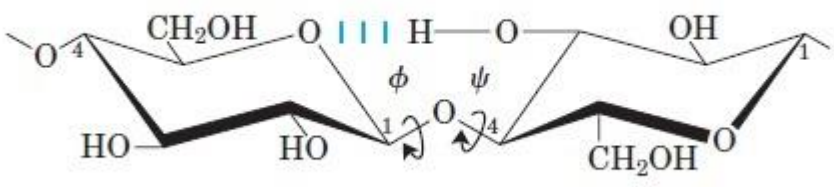
§ SAŽETAK ..... 7
§ 1. UVOD ..... 9
§ 2. CELULOSOM ..... 12
2.1. Prirodni razgrađivači celuloze ..... 12
2.2. Građa celulosoma ..... 13
*2.2.1. Proteini nosači* ..... *13*
*2.2.2. Enzimi* ..... *14*
*2.2.3. Sidrišne i kohezijske domene* ..... *16*
*2.2.4. Vezne domene za ugljikohidrate (CB domene)* ..... *17*
*2.2.5. Linkeri* ..... *17*
2.3. Proučavanje enzimske topologije i sinergističkog efekta pomoću računalne biologije ..... 18
2.4. Regulacija enzimske aktivnosti celulosomskog kompleksa ..... 18
2.5. Pojačanje enzimskog djelovanja celulosoma ..... 19
2.6. Usporedba celulosoma iz gljiva i bakterija ..... 20
§ 3. RAZVOJ UMJETNIH CELULOSOMA – RAZGRADNJA BIOMASE I DOBIVANJE BIOGORIVA ..... 22
3.1. Razgradnja biomase ..... 22
3.2. Umjetni celulosomi ..... 24
§ 4. ZAKLJUČAK ..... 26
§ 5. LITERATURNI IZVORI ..... 27

# § Sažetak

Celulosomi su multienzimski kompleksi koji razgrađuju polisaharide od kojih se sastoji stanična stijenka biljaka. Glavni sastojak stanične stijenke je celuloza, a celulosomski kompleksi posjeduju brojne celulaze koje sudjeluju u njenoj razgradnji. Celulosome proizvode neke anaerobne i aerobne bakterije i gljivice, a njihovim proučavanjem započela je i sinteza umjetnih celulosoma čiji genetski kod kodira najpovoljnije celulosomske komponente kako bismo dobili celulosome optimalne aktivnosti ovisno o zadatku koji im je predviđen da izvrše. Istraživanja vezana za celulosome danas se uglavnom baziraju na proučavanju njihovog izrazito kompleksnog sastava te pojačavanju njihovih katalitičkih svojstava. Glavnu primjenu nalaze u razgradnji biomase s ciljem dobivanja biogoriva, što ujedno rješava problem golemih količina komunalnog otpada i velikih potreba za gorivom. Osim toga, visokospecifične i vrlo jake interakcije koje se javljaju između domena u celulosomu nalaze primjenu u nekim kemijskim metodama kao što je afinitetna kromatografija.

# § 1. UVOD

Celuloza je linearni, nerazgranati homopolisaharid građen od glukoznih podjedinica međusobno povezanih (β1→4) glikozidnom vezom. Vlaknasta je, čvrsta i netopljiva u vodi te stoga ima ulogu strukturne potpore, a nalazi se u staničnim stijenkama biljnih stanica. Najstabilnija konformacija celuloze je ona u kojoj je svaki piranozni prsten glukoze zaokrenut za 180° u odnosu na susjedni čime nastaje ravan polimerni lanac te su sve hidoksilne skupine dostupne za stvaranje vodikove veze sa susjednim lancima (slika 1). Kako lanci leže jedan do drugoga, tako nastaje vrlo čvrsta struktura koju stabilizira mreža intermolekulskih i intramolekulskih vodikovih veza. Intermolekulske vodikove veze također su odgovorne za vrlo slabu higroskopnost glukoze budući da nastajanje brojnih vodikovih veza između lanaca celuloze zadovoljava njen kapacitet za stvaranje vodikovih veza.[1] Osim celuloze stanične stijenke biljnih stanica uglavnom još gradi i hemiceluloza, heteropolisaharidi koji se sastoje od brojnih i različitih šećernih monomera, u koje se ubrajaju ksilani, arabinoksilani, ksiloglukani, glukomanani i glukuronoksilani, te pektini, heteropolisaharidi bogati galaktouronskom kiselinom.[2,3,4]




Slika 1**:** Konformacija glikozidne veze u celulozi (Φ i Ψ predstavljaju diedarske kuteve).[1]

Polisaharidi čije su monomerne podjedinice međusobno povezane (α1→4) i (α1→6) glikozidnom vezom (primjerice glikogen i škrob, koji su razgranati polimeri glukoze) u životinjskom i ljudskom probavnom sustavu razgrađuju se hidrolizom pomoću enzima α-amilaze i glikozidaza. No, većina životinja, pa tako i ljudi, ne posjeduje enzime koji hidroliziraju (β1→4) glikozidne veze te im je stoga celuloza nedostupna kao izvor energije. Za njihovu razgradnju potrebne su celulaze, hidrolitički enzimi koje proizvode neke anaerobne

bakterije i gljivice. Termiti se prehranjuju drvom i drugim biljnim materijalima upravo iz razloga što u njihovom probavnom sustavu žive simbiotski mikrooganizmi (*Trichonympha*) koji luče celulazu. Stoka i ostali preživači (primjerice krave, jeleni, žirafe) također probavljaju celulozu i jedini su kralježnjaci koji celulozu mogu koristiti kao izvor energije, a zahvaljujući bakterijama i protoktistima koji luče celulazu te se nalaze u buragu.[1]

Celulaze se u bakterijama i gljivama ne pojavljuju kao jednostavni i samostalni enzimi već su dijelovi velikih multienzimskih kompleksa koji se nazivaju celulosomi. Njihov izgled i sastav od vrste do vrste jako varira zbog čega je analiza globalne strukture celulosoma praktički nemoguća. No, do danas su proučeni celulosomi brojnih bakterija, a također se istražuju i strukture gljivičnih celulosoma kako bi se usporedio njihov sastav i efikasnost. To je dovelo i do stvaranja umjetnih celulosoma u koje su ukomponirani dodatni enzimi kako bi se njihova efikasnost poboljšala. Svrha umjetnih, poboljšanih celulosoma je bolja razgradnja celuloze te iskorištavanje dobivenih produkata u industriji, pri čemu se najviše fokusira na dobivanje biogoriva.

# § 2. CELULOSOM

## 2.1. Prirodni razgrađivači celuloze

Celulosome posjeduju različite anaerobne bakterije koje mogu biti termofilne ili mezofilne. Najbolje proučavani i okarakterizirani celulosomski sustav je onaj termofilne bakterije *Clostridium thermocellum.* Njeni celulosomi sastoje se od 8 proteina nosača koji vežu i do 63 enzima. Nešto složeniji celulosomski sustav ima mezofilna bakterija *Acetivibrio cellulolyticus* kod koje je uočeno 16 proteina nosača te je uveden pojam „nosača-adaptora“ budući da njeni proteini nosači imaju sposobnost vezanja velikog broja enzimskih podjedinica u jedan jedinstveni kompleks zbog čega njihov broj raste čak i do 96. Celulosom bakterije *Ruminococcus flavefaciens* sadrži 222 proteina koji posjeduju sidrišnu domenu.[5] Pregled nekih bakterija koje proizvode jednostavne, ali i visokoorganizirane i velike celulosome dan je u tablici 1.

Tablica 1. Bakterije koje proizvode celulosome

| Vrsta | Razina strukture | Temperatura | Nalazište | Najveći celulosomski kompleks* |
|---|---|---|---|---|
| *Acetivibrio cellulolyticus* | kompleksna | mezofil | kanalizacijski mulj | 96 |
| *Pseudobacteroides cellulosolvens* | kompleksna | mezofil | kanalizacijski mulj | 110 |
| *Clostridium alkalicellulosi* | kompleksna | mezofil | alkalna jezera | 40 |
| *Clostridium clariflavum* | kompleksna | termofil | termofilni metanogeni bioreaktori | 160 |
| *Clostridium thermocellum* | kompleksna | termofil | kanalizacija, tlo, gnojiva, termalni izvori | 63 |
| *Ruminococcus champanellensis* | kompleksna | mezofil | ljudski želudac | 11 |
| *Ruminococcus flavefaciens* | kompleksna | mezofil | burag | 14 |
| *Clostridium acetobutylicum* | jednostavna | mezofil | tlo | 5 |
| *Clostridium sp. BNL1100* | jednostavna | mezofil | kukuruz | 6 |
| *Clostridium cellulolyticum* | jednostavna | mezofil | kompost | 8 |
| *Clostridium josui* | jednostavna | mezofil | kompost | 6 |
| *Clostridium papyrosolvens* | jednostavna | mezofil | tvornice papira | 6 |
| *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* | jednostavna | mezofil | tlo | 2 |
| *Clostridium termitidis* | jednostavna | mezofil | želudac termita | 5 |
| *Ruminococcus bromii* | jednostavna | mezofil | ljudski želudac | 2 |

*Broj kohezivnih domena

Značajnu ulogu u razgradnji celuloze igraju i aerobne gljivice koje se mogu naći na raspadajućem drvu i biljkama, u zemlji i u poljoprivrednom otpadu. Najproučavaniji od takvih organizama je *Trichoderma reesei* iz roda *Trichoderma* koji uključuje barem 92 vrste koje su uglavnom još neistražene. Anaerobne gljivice nalaze se u probavnom traktu velikih biljojeda. Otkrivneno je 6 rodova anaerobnih gljivica koji su *Anaeromyces*, *Caecomyces*, *Cyllamyces*, *Neocallimastix*, *Orpinomyces* i *Piromyces*. Anaerobne gljivice, za razliku od aerobnih, posjeduju velike multienzimske komplekse koji sadrže celulaze i hemicelulaze i nalik su bakterijskim celulosomima.[6]

## 2.2. Građa celulosoma

Celulosomi su veliki multienzimski kompleksi koje sačinjavaju proteini nosači, koji predstavljaju strukturne podjedinice kompleksa te nemaju katalitička svojstva, i brojne enzimske podjedinice. Okosnicu kompleksa čini protein nosač koji posjeduje brojne kohezijske domene komplementarne sidrišnim domenama katalitički aktivnih proteina koje veže. Te domene povezane su vrlo jakim nekovalentnim interakcijama.[6] Proteini nosači također mogu sadržavati sidrišne domene za druge proteine nosače zbog čega dolazi do nastanka vrlo velikih organiziranih struktura, ali i vezne domene za ugljikohidrate (eng. *carbohydrate-binding module* odnosno CB domena) koje vežu prikladne dijelove biljne stanične stijenke kako bi je enzimi kompleksa mogli početi razgrađivati. Celulosomi se dijele na dvije glavne skupine s obzirom na njihovu građu: jednostavne i kompleksne. Jednostavni celulosomi posjeduju samo jedan protein nosač dok kompleksni celulosomi imaju više proteina nosača, a time posljedično u jedan kompleks vežu i puno više enzima od jednostavnih.[5]

### *2.2.1. Proteini nosači*

Poznate su 3 vrste proteina nosača: primarni, sidrišni i nosači-adaptori. Primarni nosači su često najeksprimiraniji nosači u kompleksu te sadrže brojne kohezijske domene koje interagiraju sa sidrišnim domenama enzima. Obično sadrže CB domene kojima omogućavaju vezanje supstrata na kompleks. Celulosomi bakterije *C. cellulovorans* vežu celulozu pomoću enzima EngE koji preko svoje sidrišne domene interagira sa kohezijskom domenom primarnog nosača. EngE posjeduje i SLH-domenu (S-layer homology) koja se veže na peptidoglikane te tako može usidriti proteine nosače na površinu stanice.

Kod kompleksnih celulosoma prisutno je više proteina nosača pri čemu neki od primarnih nosača mogu posjedovati posebne sidrišne domene koje vezanjem na kohezijsku domenu

sidrišnog proteina nosača posreduju u njegovom vezanju na površinu stanice. Sidrišni proteini nosači interagiraju sa površinom stanice putem specijalne sidrišnih domena, nekovalentno preko SLH domena ili kovalentno pomoću sortaznih motiva.

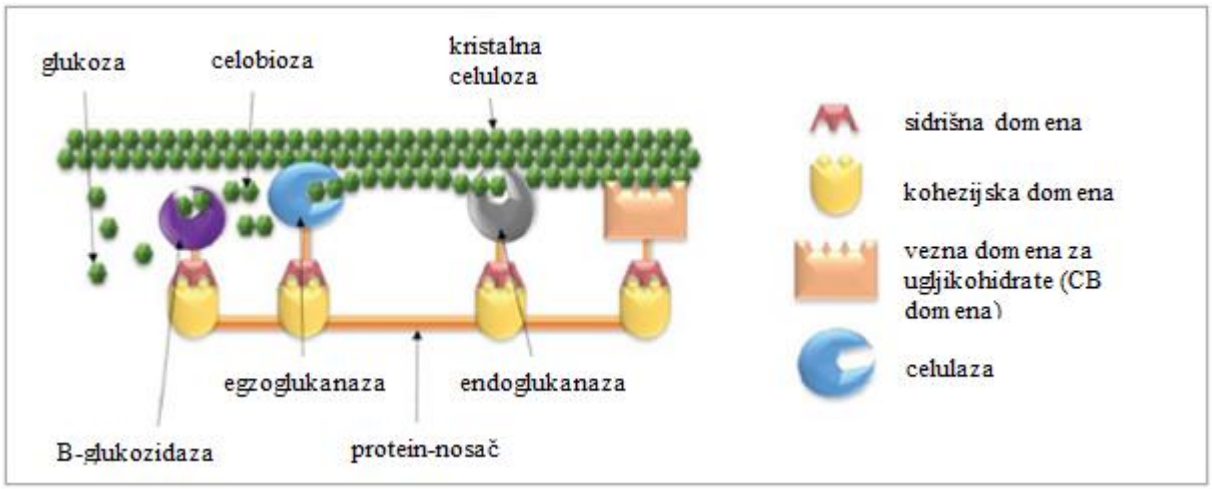
Nosači-adaptori javljaju se kod kompleksnih celulosoma gdje povezuju nosače međusobno ili nosače sa enzimima. Monovalentni nosači-adapatori posjeduju samo jednu kohezijsku domenu koja ovisno o supstratu veže različite enzime, dok kod polivalentnih nosača-adaptora postoji više kohezijskih domena zbog čega takav nosač postaje mjesto proširenja celulosomskog sustava i vezanja mnogobrojnih enzima, zbog čega se povećava i hidrolitička efikasnost cjelokupnog kompleksa.

Većina do danas opisanih celulosomskih kompleksa je vezana na površinu stanice. Glavna razlika između celulosoma koji su slobodni i onih koji su vezani za stanicu je u vrsti proteina nosača odnosno njihovoj eksprimiranosti. Kod slobodnih celulosoma proteini nosači ne posjeduju adekvatne sidrišne domene niti motive kojima bi se mogli vezati za površinu stanice.[5]

### *2.2.2. Enzimi*

Uz celulaze, koje kataliziraju kidanje celuloznih lanaca, u celulosomima su prisutni brojni drugi enzimi kao što su ksilanaze, pektinaze, mananaze i ksiloglukanaze. Među najznačajnijim celulazama su egzoglukanaze, koje kataliziraju hidrolizu jednog od slobodnih krajeva u lancu celuloze (reducirajući ili nereducirajući), endoglukanaze, koje hidroliziraju glikozidne veze na bilo kojem mjestu unutar celuloznog lanca te β-glikozidaze, koje hidroliziraju terminalne, nereducirajuće glukozne podjedinice iz celodekstrina, kratkih polimera glukoze koje su međusobno povezane (β1→4) glikozidnom vezom, a nastaju djelovanjem endoglukanaza i egzoglukanaza na celulozu. Za što efikasnije djelovanje enzima celulosoma ključnu ulogu igra sinergija. Sinergističko djelovanje dvaju enzima uvelike pospješuje rad kompleksa. Primjerice, djelovanjem endoglukanaza nastajat će više manjih polimera odnosno novih krajeva lanaca na koje onda mogu djelovati egzoglukanaze, ili, enzimskom hidrolizom jednog od dvaju isprepletenih supstrata oslobodit će se i izložiti supstrat za djelovanje drugog enzima, kao što se to može uočiti kod celulaza koje djeluju na celulozu i ksilanaza koje djeluju na ksilane. Sinergija celulaza unutar celulosoma prikazana je na slici 2.

Sve do sad otkrivene bakterije koje posjeduju celulosome proizvode i jednu karakterističnu egzoglukanazu, glikozid-hidrolaza 48 (GH48) egzoglukanaza. Ta egzonukleaza je vrlo snažno eksprimirana u tim bakterijama te je presudna za enzimsku aktivnost celulosomskog kompleksa.[5] Svaka bakterija obično posjeduje jedan gen koji kodira GH48 enzime, iako postoji mali broj bakterija kod kojih su ti enzimi kodirani sa više gena. *C. thermocellum* posjeduje dva GH48 izozima, jedan (Cel48S) posjeduje sidrišnu domenu kojom je vezan u celulosomu, dok je drugi (Cel48Y) slobodan enzim koji nije asociran u celulosomski kompleks te posjeduje CBM3 domenu kojom se veže na celulozu. Pripisane su im sljedeće aktivnosti: (β1→4) glukanazna, hitinazna, endoprocesivna celulazna te celobiohidrolazna aktivnost. Kao supstrat preferiraju amorfnu ili kristalnu celulozu više nego karboksimetilceluloze, a snažan inhibitor njihove aktivnosti je celobioza (disaharid kojeg čine dvije molekule glukoze povezane (β1→4) glikozidnom vezom). Napadaju reducirajući kraj supstrata. Iz kristalne strukture katalitičke domene GH48 enzima Cel48S iz *C. thermocellum* uočena je regija u obliku tunela koju formiraju α-zavojnice proteina, a u kojoj se nalazi vezno mjesto za supstrat. Glutaminska kiselina protonira kisik iz glikozidne veze, a pretpostavljalo se da tirozin djeluje kao baza koja oduzima proton molekuli vode kako bi ona postala dobar nukleofil za napad na anomerni ugljikov atom. Istraživanje provedeno na GH48 enzimu Cel48A iz *Thermobifide fusce* potvrdilo je da je asparaginska kiselina katalitička baza familije GH48 enzima.[8]




Slika 2. Sinergističko djelovanje enzima celulaza unutar celulosoma.[9]

### *2.2.3. Sidrišne i kohezijske domene*

Nekovalentne interakcije koje se javljaju između kohezijskih i sidrišnih domena jedne su od najjačih interakcija prisutnih u prirodi te su osnova za održavanje celulosomskog kompleksa na okupu. Tri su vrste interakcija odnosno načina povezivanja između kohezijskih i sidrišnih domena: interakcije tipa I, tipa II i tipa III.

Interakcije tipa I javljaju se između sidrišnih domena katalitičkih podjedinica (enzima) i kohezijskih domena proteina nosača. Kohezijske domene obično se sastoje od 150 aminokiselina koje čine dvije β-ploče koje sačinjava po 9 polipeptidnih lanaca, a zajedno rade cilindričnu „zarolanu“ strukturu. Kohezijske domene sva tri tipa interagiraju sa sidrišnim domenama preko β-lanaca 5, 6, 3 i 8. Sidrišne domene imaju oko 70 aminokiselina te se taj slijed izvija u dva tandemna niza koji oba uključuju $Ca^{2+}$-veznu omču te α-zavojnicu. Karakteristične aminokiseline nalaze se na mjestima 10, 11, 17 i 18 u omči te su očuvane u oba niza. Sidrišna domena sa kohezijskom interagira preko bilo koje od dvije α-zavojnice u nizu, ali ne sa obje. Stoga se bilo koji od dva simetrična niza može vezati na kohezijsku domenu preko svoje α-zavojnice, ali te dvije koformacije su zarotirane za 180° jedna u odnosu na drugu. Zbog takvog načina vezanja postoji mogućnost da se proteini koji sadrže takve sidrišne domene na kompleks mogu vezati na dva različita načina, što može smanjiti steričke smetnje unutar velikog sustava. Pokazano je da ne postoje alternacije u sidrišnoj domeni uzrokovane vezanjem na kohezijsku domenu već da se sidrišna domena odmah veže na najpovoljniji način.

Interakcije tipa II javljaju se između dva proteina nosača, obično između sidrišnog nosača i primarnog nosača. Te interakcije u *C. thermocellum* ne odvijaju se kao kod tipa I, već α-zavojnice interagiraju sa kohezijskom domenom putem nekoliko interakcija koje nastaju na površini između kohezijske i sidrišne domene.

Interakcije tipa III mogu biti dualnog tipa, ali i jednostrukog, odnosno sidrišne domene za vezanje na kohezijske domene mogu imati na raspolaganju obje α-zavojnice (ali će se vezati preko samo jedne) ili isključivo jednu. Kohezijska domena iz celulosoma u *R. flavefaciens* topološki je slična kohezijskim domenama tipa I te interagira sa sidrišnom domenom na isti način, no sadrži i dva „preklopa“ između β-lanaca 4 i 8, a slično je uočeno i kod kohezijskih domena tipa II, te također posjeduje dodatne α-zavojnice koje nisu prisutne kod ostalih tipova kohezijskih domena. Unatoč dodatnim zavojnicama u sidrišnoj domeni ne dolazi do njihove interakcije sa kohezijskom domenom već su slične onima kod tipa I.[5]

### *2.2.4. Vezne domene za ugljikohidrate (CB domene)*

Primarni nosači u principu sadrže familiju 3 CB domena (CBM3) pomoću kojih vežu celulosomske enzime specifično na celulozu zbog čega igraju važnu ulogu u njenoj razgradnji. Osim familije 3, značajne su i domene familije 2 (CBM2) koje su najčešće asocirane sa slobodnim, necelulosomskim enzimima te se dijele u dva razreda, od kojih domene jednog razreda specifično vežu celulozu, dok domene drugog razreda specifično vežu ksilane. U genomu *C. clariflavum* otkriven je protein nosač koji sadrži CBM2 domenu te su to jedini proteini nosači čije vezne domene za ugljikohidrate ne pripadaju familiji 3. Dok su kod proteina nosača tako pronađene samo dvije familije CB domena, brojni enzimi celulosoma posjeduju CB domene koje pripadaju različitim familijama zbog čega posjeduju afinitete prema različitim ugljikohidratima. Smatra se da CB domene enzima pripomažu u pozicioniranju katalitičkih domena enzima za optimalnu hidrolizu ugljikohidrata.[5]

### *2.2.5. Linkeri*

Linkeri su sekvence unutar proteina koje povezuju različite domene tog istog proteina. U celulosomskom sustavu oni su dio podjedinica koje se sastoje od više domena, bilo da je riječ o strukturnim ili katalitičkim podjedinicama, a njihove duljine variraju. Srednje dugi linkeri često sadrže ponavljajuće sekvence bogate serinom, prolinom i treoninom. Dokazano je da serinski i treoninski bočni ogranci mogu služiti kao mjesta glikozilacije u celulosomu zbog čega se celulosom može zaštititi od razornog djelovanja proteaza ili može pripomoći u prepoznavanju između proteina ili između proteina i ugljikohidrata. Također, povezivanje proteina-nosača linkerima utječe na njihovu strukturnu fleksibilnost što onda omogućava da se enzimi na njih vežu precizno u skladu s topologijom supstrata. U slučaju celulosomskog kompleksa prisutnog u *C. thermocellum* velika količina prolina može sugerirati da linkeri poprimaju izduženu formu, zbog čega prostorno razdvajaju proteine nosače zbog čega može doći do lakše i bolje interakcije između različitih podjedinica koje ti proteini nose što pak vodi do sinergističkog djelovanja njihovih katalitičkih domena.[10] Iako su prvotna istraživanja pokazivala slične aktivnosti umjetnih celulosoma bez obzira na duljinu linkera u kompleksu, kasnije je ustanovljeno da je efikasnije celulosome moguće konstruirati pomoću duljih linkera. Istraživanja provedena na sintetskim malim proteinima nosačima koji sadrže kohezijske domene sa sličnim afinitetom za određen tip sidrišnih domena različitih enzima koji su međusobno bili povezani linkerima koji se sastoje od 11 do 50 aminokiselina u nizu

pokazala su da se enzimi neće neuređeno vezati na nosače već da prisutnost jednog tipa vezanog enzima na nosaču utječe na vezanje drugog tipa enzima koji će se vezati sljedeći. Na tu usklađenost vezanja utječe duljina linkera između proteina nosača zbog koje će se njihove kohezijske domene nalaziti na nekoj određenoj udaljenosti. Na taj način linkeri utječu na asocijaciju funkcionalnog celulosomskog kompleksa.[7]

## 2.3. Proučavanje enzimske topologije i sinergističkog efekta pomoću računalne biologije

Molekularnodinamičke simulacije pokazale su da rigidnost linkera koji povezuje katalitičku domenu sa sidrišnim domenom tipa I u celulosomu iz *C. thermocellum* može utjecati na topologiju katalitičke domene kada je enzim vezan u kompleks sa supstratom. Te strukturalne promjene mogu utjecati na efikasnost enzima prije i nakon njegovog uključivanja u celulosomski kompleks. Također, molekularno modeliranje višedomenskih celulosomskih komponenti i njihovih međudomenskih linkera sugerira da elastičnost linkera povećava aktivnost katalitičkih domena koje povezuju. Proučavanjem bifunkcionalne ksilanaze (Xyn10Z) iz *C. thermocellum* koja sadrži esterazu ugljikohidrata (CE1), CB domenu familije 6, sidrišnu domenu tipa 1 i C-terminalni GH10 enzim, uočeno je da međudomenski linkeri omogućavaju veću prostornu slobodu katalitičkim domenama CE1 i GH10 koje se nalaze na suprotnim krajevima polipeptida zbog čega je njihova efikasnost veća nego kada su ti enzimi slobodni, odnosno aktivnost je dodatno povećana kada je navedeni kompleks sidrišnom domenom povezan sa kohezijskom domenom proteina nosača, što dokazuje da je katalitička efikasnost enzima veća kada su oni asocirani u celulosomski kompleks.[7]

## 2.4. Regulacija enzimske aktivnosti celulosomskog kompleksa

Enzime koji sadrže sidrišne domene kodira puno veći broj gena od broja njima dostupnih kohezijskih domena na primarnom nosaču što sugerira regulaciju enzimske aktivnosti s obzirom na dostupnost i vrstu supstrata. Sastav celulosoma odnosno njegove integrirane enzimske podjedinice i sveukupna arhitektura kompleksa ovisit će o mediju u kojem se bakterija koja taj celulosom sadrži uzgaja. Primjerice, broj GH48 egzoglukanaza porast će kada se bakterija uzgaja na celulozi u usporedbi sa istom takvom bakterijom uzgojenoj na celobiozi. Celulosomski geni snažnije su eksprimirani u prisutnosti kompleksnih prirodnih

polimera nego u prisutnosti oligosaharida, a utišani kada broj enzima koje kodiraju vrlo brzo raste, što implicira osjetljivost kompleksa na supstrate koji onda koordiniraju ekspresiju određenih celulosomskih gena. U bakteriji *C. thermocellum* neki celulosomski geni regulirani su anti-sigma i odgovarajućim sigma faktorima. U odsutnosti supstrata transmembranski anti-sigma faktor vezan je na alternativni sigma faktor u stanici. Svaki anti-sigma faktor posjeduje vanstaničnu domenu sličnu veznoj domeni za ugljikohidrate (CB domena) koja je u kontaktu sa polisaharidom u vanjskom mediju. Kada se polisaharid, odnosno supstrat, veže na tu domenu, dolazi do konformacijske promjene anti-sigma faktora zbog koje se otpušta alternativni sigma faktor koji potom interagira sa RNA-polimerazom i tako inicira transkripciju celulosomskih enzima. Slični geni za anti-sigma i sigma faktore otkriveni su i u bakterijama *C. clariflavum*, *A. cellulolyticus* i *B. cellulosolvens*, kao i u nekim bakterijama koje ne posjeduju celulosome. Opisani sustav omogućava bakteriji da osjeti u kojem stanju degradacije se nalazi stanična stijenka odnosno koji polisaharid trenutno treba razgraditi kako bi se s obzirom na to regulirala produkcija celulosomskih enzima koji su potrebni za njegovu razgradnju.[5]

## 2.5. Poboljšavanje enzimskog djelovanja celulosoma

Genomska i proteomska istraživanja celulosoma dovela su do otkrića novih celulosomskih komponenti koje ne spadaju u klasične kategorije proteina nosača, enzima i površinskih veznih domena za supstrate, već je riječ o proteinima čija je funkcija da pojačaju enzimsko djelovanje celulosoma. Genom bakterije *C. clariflavum* posjeduje kodone koji kodiraju nekatalitičke proteine koji destabiliziraju staničnu stijenku biljnih stanica tako što narušavaju mrežu vodikovih veza prisutnih u polisaharidima koji ju grade. Eksperimentalno je pokazano da se takvi proteini čvrsto vežu na mikrokristaličnu celulozu te će smanjiti napetost filter papira na koji su nanešeni, a njihovim dodatkom u smjesu nativnih i umjetnih celulosoma značajno se ubrza hidroliza i razgradnja papira.

Budući da su ovakvi nekatalitički proteini pronađeni samo u *C. clariflavum*, razvojem tehnologije stvaranja umjetnih celulosoma došlo se na ideju ugradnje raznih tipova enzima u nativne celulosome koji su inače potpuno strani tim kompleksima, primjerice oksidativnih enzima koji se ne pojavljuju u nativnim celulosomima budući da se oni nalaze uglavnom u anaerobnim bakterijama. Sidirišne domene asocirane su sa litičkom polisaharid-monooksigenazom (LPMO) i lakazom, enzimom koji razgrađuje lignine, te su navedeni

enzimi pomoću njih ukomponirani u umjetne celulosome koji sadrže glikozidaze. U oba slučaja, hidrolitička aktivnost celulosomskih enzima bila je značajno pojačana, iako se takvi oksidativni enzimi ne očekuju u prirodnom celulosomu.[7]

## 2.6. Usporedba celulosoma iz gljivica i bakterija

Bakterijski celulosomi prvotno su opisani kao diskretni, multienzimski kompleksi koji vežu celulozu te ju razgrađuju. Kompleksi su izgrađeni na velikom, nekatalitičkom proteinu nosaču čija veličina može varirati od 50kDa do 250kDa. Njihova veličina korelira s brojem kohezijskih domena na pojedinom nosaču. Kohezijske domene proteina nosača čvrsto se asociraju sa sidrišnim domenama pojedinih celulaza pri čemu nastaju kompleksi veličine od 1,5 MDa do 6 MDa. Interakcije između sidrišnih i kohezijskih domena kod bakterija su vrlo specifične ovisno o vrsti. Proteini nosači također sadrže i vezne domene za ugljikohidrate kojima vežu supstrat, a cijeli kompleks vezan je na površinu stanice pomoću SLH domene (eng. *surface layer homology*). Razvojem umjetnih celulosoma pokazano je da enzimi okupljeni u kompleksu efikasnije razgrađuju teško dostupne, netopljive kristalne supstrate od slobodnih enzima, no značajno povećanje učinka hidrolize nije uočeno u slučaju otopine pomiješanih topljivih supstrata. Iz toga je zaključeno da postojanje CB domena uz prostornu organizaciju enzima u kompleksu pridonosi povećanoj efikasnosti razgradnje supstrata. Kada se supstrat veže u CB domenu, celulaze djeluju sinergistički i tako kanaliziraju reaktante i produkte od početnog supstrata do jednostavnih šećera. Endoglukanaze započinju razgradnju i stvaraju nove slobodne krajeve u lancima na koje potom djeluju egzoglukanaze koje oslobađaju celobiozu kako se pomiču niz lanac. Ukoliko su u kompleks uključene β-glukozidaze, doći će do pretvorbe celobioze u glukozu, što je dokazano njihovom asocijacijom u male sintetske celulosome.

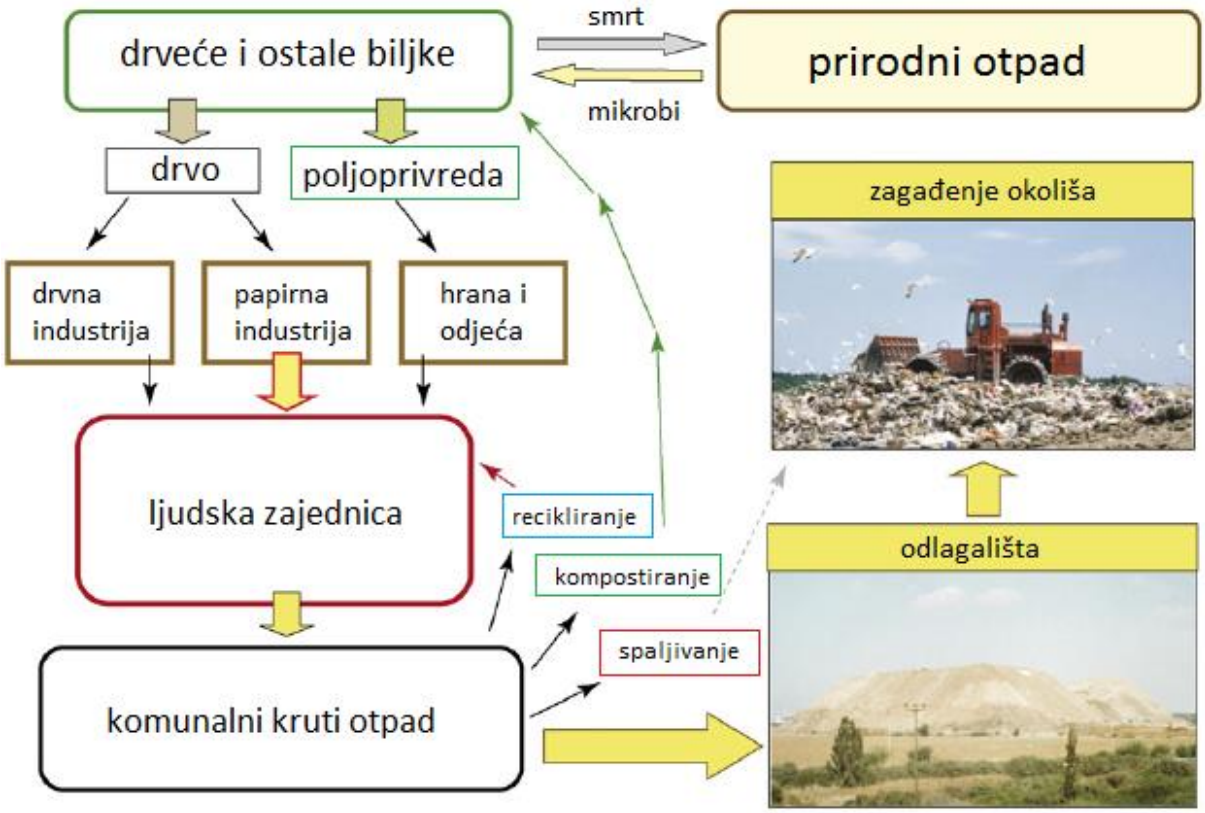
U usporedbi sa bakterijskim celulosomima, multienzimski kompleksi pronađeni u gljivicama su znatno manje istraženi. Kod njih su sidrišne domene vezane za enzime, no javljaju se u ponavljajućim tandemima bilo na N ili C-kraju enzima, dok su kod celulaza iz bakterija te domene ograničene na jednostruke kopije koje se javljaju na C-kraju. Razlog tome nije jasan, no postoje sugestije da afinitet za povezivanje unutar gljivičnih celulosoma raste porastom broja sidrišnih domena asociranih enzima. Isto tako je moguće da dvostruke sidrišne domene povećavaju specifičnost tih domena za ciljano područje na proteinu nosaču. Također, interakcije između sidrišnih i kohezijskih domena kod gljivica nisu specifične za pojedine

vrste kao što je to slučaj kod anaerobnih bakterija, već sidrišna domena jedne vrste može interagirati sa kohezijskom domenom celulosoma iz druge vrste. Veličina celulosoma kod gljivica varira ovisno o broju kohezijskih domena i asociranih enzima kao i kod bakterija; pronađeni su mali celulosomi veličine 334 kDa, ali također i ogromni kompleksi veličine 80 MDa. Protein nosač kakav postoji kod bakterijskih celulosoma kod gljivica još nije identificiran; iako je prije više od 20 godina otkrivena prva kohezijska domena kod njih, daljnja istraživanja su davala drugačije rezultate i pretpostavljala da neki drugi proteini nose te domene. Zanimljivo je što je u jednom trenutku pretpostavljeno da gljivični celulosomi posjeduju protein nosač koji je i sam katalitički aktivan, što bi bila velika prednost nad bakterijskim katalitički inaktivnim nosačima. No, budući da je identifikaciji masenom spektrometrijom prethodio Western Blot i SDS PAGE, odnosno denaturirajuća elektroforeza, uočene protein-protein interakcije ne mogu biti pravi odraz interakcija u nativnom celulosomu. Unatoč manjku razumijevanja samog principa interakcija unutar gljivičnih celulosoma te njihovog kompletnog sastava, ipak su uočene neke njihove prednosti naspram bakterijskih celulosoma. Glavni produkt razgradnje celuloze kod gljivica je glukoza, za razliku od celobioze koja je produkt razgradnje celuloze bakterijskim celulosomom. Kod anaerobnih gljivica otkrivene su dvije vrste β-glukozidaza koje to omogućavaju: slobodne (bez sidrišnih domena) i one asocirane sa celulosomskim kompleksom pomoću sidrišnih domena. Trenutno interesantna pretpostavka uzroka velikih varijacija u veličini celulosoma i strukturne heterogenosti je ta da se mali celulosomi asociraju u velike policelulosome, kao što je to uočeno kod nekih anaerobnih bakterija. Stoga identifikacija kohezijskih domena i sastava celulosoma te potencijalnog mehanizma nastanka policelulosoma postaje još veći prioritet jer bi te informacije pomogle u stvaranju umjetnih celulosoma izuzetne efikasnosti koji će lignoceluloznu biomasu razgrađivati u potpunosti, do jednostavnih šećera od kojih se sastoji.[9]

# § 3. RAZVOJ UMJETNIH CELULOSOMA – RAZGRADNJA BIOMASE I DOBIVANJE BIOGORIVA

## 3.1. Razgradnja biomase

Od 150 milijardi kilograma industrijskog i kućanskog otpada koji se u godinu dana proizvede u Sjedinjenim Američkim Državama, oko 100 milijuna kilograma otpada je biorazgradivo. Komunalni kruti otpad uglavnom se sastoji od celuloze u obliku novina, drva i kartona, a većina završi na odlagalištima gdje se za njegovu razgradnju pobrinu anaerobni prirodni procesi. Ogromne količine otpada na odlagalištima doprinose porastu populacija raznih mikroorganizama i enzimskih sustava koji onda usporavaju anaerobne biorazgradne procese. Odlagališta k tome zagađuju rijeke i jezera, a i brzo ispunjavaju dostupan kapacitet pa nastaje problem daljnjeg odlaganja otpada i potrage za alternativnim mjestima za odbacivanje otpada. Podrijetlo celuloznog otpada i njegove sudbine prikazane su na slici 3.




Slika 3. Sudbina celuloze u okolišu.[11]

Biomasa je materija biljnog ili životinjskog porijekla koja može poslužiti za dobivanje tekućeg goriva. Procjenjuje se da SAD godišnje može proizvesti 1,4 milijarde kilograma biomase, odnosno gotovo 60% godišnje potrebe za gorivom moglo bi biti zadovoljeno dobivanjem etanola iz žitarica i biomase. Pretvorba biomase odnosno celuloznog komunalnog krutog otpada u gorivo i energiju donosi očite prednosti: ne samo da bi se smanjila količina celuloznog otpada što bi naravno značilo i smanjenje njegovog utjecaja na okoliš, već bi se sam zagađivač okoliša iskoristio kao alternativni izvor energije kojim bi se pokušalo umanjiti potrebe za fosilnim gorivima.

Razgradnja komunalnog krutog otpada temelji se na biološkoj razgradnji organske tvari potpomognutoj anaerobnim mikroorganizmima, a primarni produkti te razgradnje su metan i ugljikov dioksid. Brzina biokonverzije krutog otpada, kao i drvne te biljne biomase, limitirana je hidrolizom kompleksnih polisaharida u fermentirajuće šećere. Celuloza je često zaštićena hemicelulozom te ligninom, relativno inertnim fenilpropanskim polimerom koji se ne može razgraditi u anaerobnim uvjetima, dok ga u aerobnim uvjetima razgrađuju gljiva truležnica i plijesan. Predobrada polimernih sirovina (celuloza, hemiceluloza) uključuje redukciju veličine polimernih supstrata, termokemijske obrade te obrade mješavinom različitih enzima, kao što su celulaze i lipaze. Dvofaznom digestijom potom se odvajaju faza hidrolize i dobivanja kiselina od metanogene faze kako bi se obje mogle odvijati u optimalnim uvjetima.

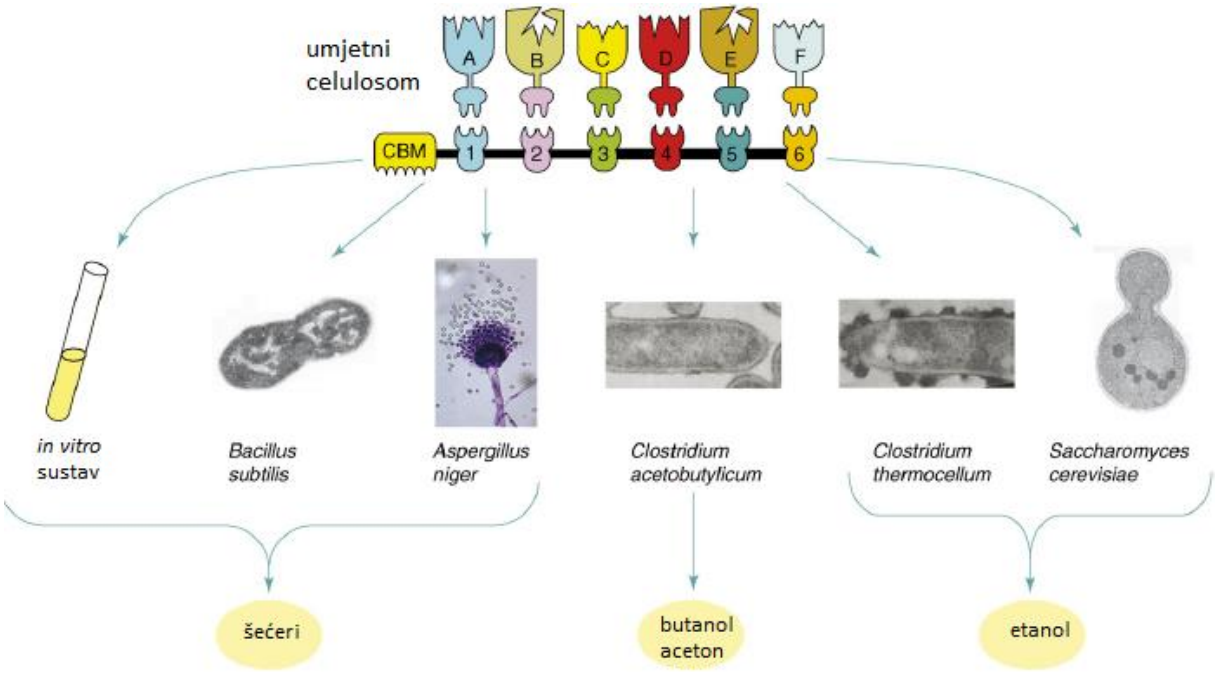
Aerobnoj razgradnji lignoceluloze prethodi termokemijska predobrada nakon koje slijedi aerobna enzimska hidroliza usitnjene ili mljevene biomase, rezultat koje je oslobađanje šećera. Prethodno obrađena topljiva frakcija biomase naziva se hidrolizat, a ukoliko sadrži netopljive materijale onda je riječ o suspenziji. U razrjeđenom kiselom hidrolizatu većina hemiceluloze je otopljena (ksiloza, arabinoza, galaktoza, manoza), no glukoza zaostaje u čvrstom stanju u obliku celuloze, koja se razgrađuje dodatkom celulaza. Nakon nekoliko dana fermentacije i saharifikacije, većina šećera bit će pretvorena u etanol. Nastala alkoholna smjesa se destilira kako bi se odvojio alkohol od vode i zaostalih krutina. Iako je poznato nekoliko mikroorganizama koji fermentiraju glukozu u etanol (npr. pivski kvasac), konverzija šećera pentoza iz hemiceluloze u etanol tek je nedavno postala moguća. Mikroorganizmi potrebni za tu pretvorbu sporo rastu na pentozama te su slabo produktivni, odnosno njihovim djelovanjem nastaje malo etanola. Stoga se brojna istraživanja zadnjih godina baziraju na pronalasku mikroorganizama koji će taj posao obavljati efikasnije.[11]

## 3.2. Umjetni celulosomi

Umjetni celulosomi dizajnirani su tako da sadrže hibridni protein nosač na kojem se nalazi CB domena i višebrojne kohezijske domene različitih specifičnosti za različite sidrišne domene kako bi se na nosač ukomponirali željeni enzimi na određena mjesta u kompleksu. Uspješno su priređeni proteini nosači sa 6 kohezijskih domena, no ispostavilo se da su to ujedno najveći nosači koji se mogu prirediti, a da kloniranje i ekspresiranje umjetnih celulosoma u bakteriji *Escherichia Coli* i dalje bude moguće. Taj problem riješen je uvođenjem adaptornih proteina nosača koji omogućuju interakciju između više proteina nosača, a time i stvaranje većih multienzimskih kompleksa. Kako bi se povećala heterogenost enzimskog sastava kompleksa te pojačala enzimska djelatnost odnosno razgradnja supstrata, umjetnim celulosomima dodaju se neki netipični enzimi koji se ne nalaze u prirodnim celulosomima, primjerice litičke polisaharid-monooksigenaze ili β-glukozidaze.[7]

Razvoj umjetnih celulosoma pomaže u proučavanju rada i efikasnosti celulosoma te principa njegove asocijacije, no također nalazi vrlo važnu primjenu u industriji bioprocesiranja lignoceluloze za dobivanje biogoriva. Za takve industrijske primjene dorađuju se mikroorganizmi koji će proizvoditi željene produkte. Geni koji kodiraju celulaze i ostale komponente umjetnih celulosoma (hibridne proteine nosače i željene enzime zajedno s njihovim sidrišnim domenama) kloniraju se u stanicu domaćina (bakterija ili gljiva), a proteini koji se proizvedu translacijom tih gena i asociraju u celulosome potom služe za razgradnju biomase unutar industrijskih reaktora (*in vitro* sustav). Također, ti geni mogu se klonirati unutar poželjne stanice domaćina, a takva transformirana stanica koja sada ima nova celulazna svojstva (necelulolitički mikrobi) ili poboljšanu već postojeću moć za ragradnju celuloze može se uzgajati direktno na celuloznoj biomasi kako bi odmah oslobađala željeni krajnji produkt (slika 4).[11] Mikroorganizmi kod kojih su umjetni celulosomi uvedeni na staničnu površinu pokazali su višestruke prednosti – osim što je dokazano da okupljanje enzima u kompleks rezultira efikasnijom razgradnjom stanične stijenke biljaka, moguće ih je i reciklirati za ponovnu uporabu centrifugiranjem, što bi moglo umanjiti trošak cijelog postupka. Primjeri takvih mikroorganizama su *C. acetobutylicum* kod kojeg je uveden celulosom za produkciju acetona ili butanola te pivski kvasac (*Saccharomyces cerevisiae*) koji je obogaćen celulosomom pomoću kojeg može direktno prevoditi biomasu u etanol. Termofilni mikroorganizmi i njihovi enzimski procesi vrlo su zanimljivi za industrijske

potrebe zbog njihove povećane stabilnosti tijekom duljeg perioda vremena, veće brzine difuzije kao i većih brzina reakcije, povećane topljivosti supstrata i manjih opasnosti od kontaminacije. Istraživanja su pokazala pojačano hidrolitičko djelovanje termofilnih celulosoma u usporedbi sa uobičajenim umjetnim celulosomima. No, problem leži u tome što dosad nije otkriven idealni termofilni mikroorganizam koji će biomasu prevoditi u biogorivo. Kao dva potencijalna kandidata nameću se *C. thermocellum* i *C. clariflavum*, oboje prirodni etanologeni mikroorganizmi koji se mogu adaptirati na visoke koncentracije etanola.[6]




Slika 4. Prerada mikroorganizama kloniranjem gena za celulosomske komponente kako bi proizvodili željene produkte.[11]

Osim za razgradnju biomase, celulosomi svoju primjenu mogu naći i u imunološkim ispitivanjima, citologiji, izolaciji i imobilizaciji, razdiobi stanica, putovanju lijekova kroz organizam i afinitetnoj kromatografiji. Vrlo jake i visokoafinitetne interakcije između kohezijskih i sidrišnih domena mogu biti temelj u brojnim istraživanjima i primjenama na temelju afiniteta. Ipak, neke od navedenih tehnika, poput afinitetne kromatografije, su i limitirane zbog činjenice što je vezanje kohezijskih i sidrišnih domena gotovo ireverzibilno, zbog čega ih je potrebno prethodno oslabiti kako bi se mogle koristiti u navedene svrhe. Genetičkim inžinjerstvom sidrišne domene iz *C. thermocellum* smanjen je njen afinitet za kohezijsku domenu što je omogućilo njenu primjenu kao proteinskog privjeska visokog afiniteta pomoću kojeg se može izvršiti pročišćavanje proteina afinitetnom kromatografijom.

Afinitet CB domena za različite polisaharide bolje je istražen te je također našao različite primjene, a proteini koji sadrže CB domene mogu se koristiti kao bioreaktori, modulatori rasta biljaka, proteinski privjesci/kolona za afinitetnu kromatografiju, biosenzori, itd.[6]

# § 4. ZAKLJUČAK

Otkriće celulosoma u bakterijama i gljivicama omogućilo je usmjeravanje znanstvenih istraživanja prema ekološki prihvatljivim načinima rješavanja problema krutog otpada. Dok odlagališta za otpada danas zauzimaju puno površine te zagađuju okoliš, većina tog otpada celuloznog podrijetla može se razgraditi do šećera, pa i etanola pomoću mikroorganizama koji posjeduju celulosome. Prerada biomase u biogorivo vrlo je važan proces jer današnje ogromne potrebe za fosilnim gorivom izazivaju velika onečišćenja, a ovakav način rješavao bi i problem otpada, i problem goriva. Osim u razgradnji biomase celulosomi nalaze primjenu i u drugim područjima, prvenstveno u usmjeravanju lijekova u metabolizmu te istraživanjima baziranima na afinitetnim interakcijama, zbog vrlo specifičnih i jakih interakcija koje se javljaju između sidrišnih i kohezijskih domena. Stoga je vrlo važno da se nastave istraživanja vezana za celulosome, od njihove građe i asocijacije komponenti u kompleks do nalaženja novih mikroorganizama koji proizvode vlastite celulosome ili su pogodni za transformaciju necelulolitičkih stanica kako bi mogli nositi umjetne, poboljšane celulosome.

# § 5. LITERATURNI IZVORI


1. A. L. Lehninger, D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger principles of biochemistry*, 5.izdanje, W. H. Freeman and Company, New York, 2008, str. 247-248.
2. https://en.wikipedia.org/wiki/Cell_wall (datum pristupa 4.kolovoza 2018.)
3. https://en.wikipedia.org/wiki/Hemicellulose (datum pristupa 4.kolovoza 2018.)
4. https://en.wikipedia.org/wiki/Pectin (datum pristupa 4.kolovoza 2018.)
5. L. Artzi, E. A. Bayer, S. Moraïs, *Nat. Rev. Microbiol* **15** (2017) 83-95
6. Y. Tamaru, H. Miyake, K. Kuroda, M. Ueda, R. H. Doi, *Environmental Technology* **31** (2010) 889-903
7. S. P. Smith, E. A. Bayer, M. Czjzek, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **44** (2017) 151–160
8. https://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside_Hydrolase_Family_48 (datum pristupa 4.kolovoza 2018.)
9. S. P. Gilmore, J. K. Henske, M. A. O'Malley, *Bioengineered* **6** (2015) 204-208
10. https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/cellulosome (datum pristupa 6.kolovoza 2018.)
11. E. A. Bayer, R. Lamed, M. E. Himmel, *Curr. Opin. Biotechnol.* **18** (2007) 237-245