

Marta Wesołowska-Trojanowska, Zdzisław Targoński

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

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

CELULAZY – WŁAŚCIWOŚCI, OTRZYMYWANIE I ZASTOSOWANIE

Streszczenie: Celulazy są enzymami produkowanymi głównie przez mikroorganizmy, które wykorzystują celulozę jako źródło węgla i energii. Degradacja natywnej celulozy prowadzona jest przez kompleks enzymów działających synergistycznie, w którym kluczową rolę odgrywają zarówno endo-, jak i egzo- β -1,4-glukanazy. Preparaty celulaz otrzymywane są w wyniku hodowli grzybów, spośród których gatunek *Trichoderma reesei* odgrywa kluczową rolę. Celulazy znajdują coraz szersze zastosowanie. W przemyśle spożywczym są używane przy produkcji soków, win, piw, a w piekarnictwie – do wypieku chleba i ciast. Są dodawane do pasz w celu poprawienia strawności składników odżywczych w nich zawartych. Powszechnie stosowane są także w przemyśle papierniczym do odbarwiania i odwadniania papieru. Cieszą się również zainteresowaniem producentów odzieży, szczególnie zajmujących się obróbką tkanin jeansowych, a w przemyśle chemicznym znajdują wykorzystanie jako dodatek do proszków do prania.

Słowa kluczowe: celulazy, biosynteza, właściwości, *Trichoderma reesei*, zastosowanie.

DOI: 10.15611/nit.2014.2.10

1. Wstęp

Celuloza jest jednym z najobficiej występujących związków organicznych w biosferze, stanowi bowiem podstawowy składnik materiału roślinnego. Celuloza zbudowana jest z łańcuchów utworzonych z jednostek β -D-glukozy, połączonych wiązaniami β -1,4-glikozydowymi. Podstawową jednostką w łańcuchu celulozy jest disacharyd celobioza. W przyrodzie zachodzi ciągły proces biosyntezy celulozy w roślinach i jej biodegradacji prowadzony głównie przez drobnoustroje wytwarzające enzymy celulolityczne.

Kompleks enzymatyczny hydrolizujący celulozę, wytwarzany przez grzyby strzępkowe złożony jest z trzech podstawowych enzymów. Endo- β -1,4-glukanaza hydrolizuje wiązania β -1,4-glikozydowe wewnątrz łańcucha celulozowego. Egzo- β -1,4-glukanaza odszczepia jednostki celobiozy lub glukozy od nieredukujących końców celulozy. Beta-glukozydaza (celobiaza) katalizuje reakcję hydrolizy celobiozy do dwóch cząsteczek glukozy i odszczepia cząsteczki glukozy od nieredukujących końców celooligosacharydów [Janas, Targoński 2001].

Wyselekcjonowane szczepy mikroorganizmów, zazwyczaj mutanty, mają genetycznie uwarunkowaną zdolność do nadprodukcji i wydzielania stosunkowo dużych ilości enzymów celulolitycznych. Produkcja enzymów zależy także od warunków technologicznych prowadzenia procesu, a w szczególności optymalnego składu pożywki.

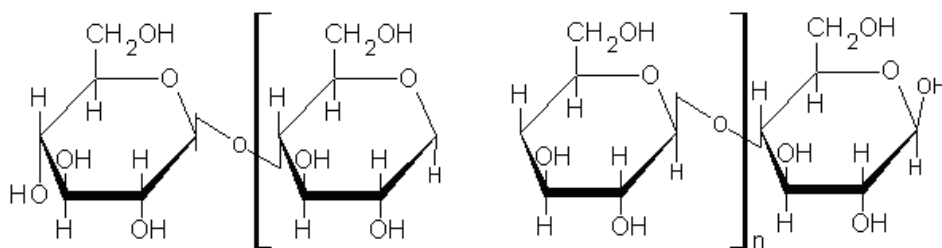
Preparaty celulolityczne są wykorzystywane w różnych gałęziach przemysłu spożywczego, m.in. w technologii soków owocowych, w piekarnictwie. Zważywszy na obecność w tych preparatach nie tylko celulaz, ale także hemicelulaz, proteaz i innych enzymów, są one wykorzystywane przy produkcji pasz. Celulazy znalazły zastosowanie także w przemyśle papierniczym, włókienniczym, chemicznym (dodatki do proszków do prania) i w produkcji etanolu.

2. Celuloza – substrat hydrolizowany przez celulazy

Budowa celulozy

Celuloza stanowi jeden z najbardziej rozpowszechnionych biopolimerów na kuli ziemskiej i produkowana jest głównie przez rośliny wyższe, ale również przez algi i grzyby. Jest głównym produktem procesu fotosyntezy. Resztki roślin w glebie zawierają od 45% do 90% celulozy. Ma ona zatem, obok dwutlenku węgla, istotne znaczenie dla obiegu węgla w biosferze. Jedynie w ciągu jednego roku syntetyzowane i degradowane jest około 10^{15} kg celulozy [Kumar, Sompal Singh, Singh 2008].

Łańcuchy celulozy, łącząc się ze sobą wiązaniami wodorowymi i siłami Van der Waalsa, tworzą fibryle. Dzięki prostemu łańcuchowi tworzonemu przez wiązania β -1,4-glikozydowe włókna celulozowe wykazują dużą wytrzymałość na rozciąganie. Celulozie przypisuje się budowę krystaliczno-bezpostaciową (rys. 1), w której włókna celulozy składają się z obszarów krystalicznych i bezpostaciowych, amorficznych. Pierwsze, w których łańcuchy celulozy ułożone są równolegle, tworzą strukturę krystaliczną. Natomiast drugie to regiony amorficzne, w których łańcuchy



Rysunek 1. Schemat budowy celulozy

Źródło: [<http://mymen3.w.interia.pl/cukry/12.html>].

Figure 1. Cellulose structure

Source: [<http://mymen3.w.interia.pl/cukry/12.html>].

są ułożone nieregularnie. Strefy krystaliczne cechują się zdecydowanym pleomorfizmem. Stopień krystaliczności celulozy uzależniony jest od jej pochodzenia i źródła pozyskiwania. Wskaźnik krystaliczności celulozy kształtuje się od 0% dla amorficznej celulozy (napęczniała celuloza pod wpływem stężonego kwasu fosforowego) do niemalże 100% dla celulozy naturalnej wyizolowanej z komórek glonu *Valonia macrophysa* [Russel, Górski, Wyczółkowski 2005].

3. Charakterystyka enzymów celulolitycznych

3.1. Aktywność celulaz

Pomiar aktywności celulaz dokonuje się na podstawie jednej z trzech metod; są nimi: (1) oznaczenie ilości nagromadzanych produktów po hydrolizie, (2) redukcji ilości substratu po hydrolizie enzymatycznej i (3) zmiany we właściwościach fizycznych substratu. Najczęściej jako substrat wykorzystuje się bibułę filtracyjną (FPA) i karboksymetylocelulozę (CMC) [Dashtban i in. 2010]. Testy z użyciem bibuły filtracyjnej pokazują zdolność enzymów do hydrolizy celulozy do cukrów redukujących. Testy te są szczególnie zalecane do badania surowych preparatów celulaz produkowanych przez grzyby z rodzaju *Trichoderma* oraz innych preparatów z wysokim poziomem zawartości celobiohydrolaz. Z kolei CMC jest użyteczna do oznaczania aktywności wielu endoglukanaz, które mają zdolność do degradacji tego substratu. W tym teście można dokonać pomiaru zmian lepkości roztworu karboksymetylocelulozy spowodowanej działaniem celulaz.

Endoglukanazy są zdolne do degradacji celulozy amorficznej i rozpuszczalnej w wodzie, celobiohydrolazy zaś najaktywniej działają na krystaliczną celulozę w kompleksie z endoglukanazami [Bhat 2000].

3.2. Mechanizm reakcji hydrolizy enzymatycznej

Początkową fazą działania enzymu jest adsorpcja celulazy na powierzchni celulozy. Szybkość adsorpcji zależy od lepkości środowiska reakcji. W rozcieńczonym, dobrze zmieszonym układzie równowaga powinna nastąpić w czasie 5 minut. Równowaga procesu adsorpcji jest opisana empirycznie za pomocą izotermy adsorpcji Langmuira [Ooshima, Sakata, Harano 1998]:

$$P_{ads} = \frac{K_p P_{max} P_L}{1 + K_p P_L},$$

gdzie:

P_{ads} – zaadsorbowane białko [mg/g celulozy],

P_{max} – stała nasycenia [mg/g celulozy],

P_L – białko w roztworze [ml/mg],

K_p – stała adsorpcji [ml/mg].

Dla naturalnych substratów, takich jak celuloza, wartość P_{max} wynosi 10mg/g. Celuloza poddana obróbce chemicznej, jak np. pulpa drzewna, ma wyższą wartość P_{max} ze względu na większą powierzchnię właściwą celulozy w stosunku do celulozy natywnej. Dodatek celulaz w dawkach przewyższających wartość P_{max} ma niewielki wpływ na szybkość reakcji enzymatycznej hydrolizy celulozy [Tolan, Foody 1999].

Proces enzymatycznej hydrolizy poprzedzony jest adsorpcją kompleksu celulaz na celulozie. W skład kompleksu pochodzącego z *Trichoderma reesei* wchodzi dwie celobiohydrolazy, co najmniej pięć endoglukanaz i celobiaza [Wang i in. 2004]. Celobiohydrolaza I atakuje łańcuch celulozy od nieredukującego końca, celobiohydrolaza II powoduje zaś degradację celulozy od redukującego końca. Z kolei endoglukanazy atakują losowo łańcuch celulozy od środka. Kompleks endoglukanaz i celobiohydrolaz działa ze sobą w sposób synergistyczny, intensyfikując degradację celulozy [Tolan, Foody 1999]. Ostatnio wykazano, że w procesie degradacji celulozy istotną rolę odgrywają lityczne polisacharydowe monoooksygenazy, które katalizują utlenianie nierozpuszczalnych polisacharydów [Isaksen i in. 2014].

Działanie celulaz jest hamowane przez produkty hydrolizy celulozy, czyli przez celbiozę i glukozę. W przypadku surowego preparatu celulaz wytwarzanego przez szczep *Trichoderma reesei* zahamowanie hydrolizy celulozy ma miejsce, gdy stężenia glukozy w mieszaninie reagującej wynosi 69g/L, a celbiozy – 3,3g/l. Enzymy celulolityczne mogą być również inhibitowane albo inaktywowane przez rozmaite związki, należą do nich silne oksydanty i reduktory, związki fenolowe, rozpuszczalniki i surfaktanty [Ximenes i in. 2010]. Wiązanie enzymów przez celulozę chroni je przed wymienionymi substancjami. Dla większości materiałów celulozowych istnieje górna granica stopnia konwersji ze względu na ograniczoną dostępność celulozy dla enzymów z racji jej struktury porowatej lub obecności niecelulozowych składników. Opisany spadek szybkości hydrolizy celulozy nazywany jest oporem substratu [Sun, Cheng 2002].

Do scharakteryzowania kinetyki reakcji enzymu lub kompleksu enzymatycznego korzysta się m.in. z modelu reakcji Michaelisa-Menten [Juturu, Wu 2014]. Jest on słuszny dla β -glukozydazy, która hydrolizuje rozpuszczoną celbiozę do glukozy. Natomiast dla celulaz rozkładających celulozę do celbiozy wskazany model reakcji się nie sprawdza. Istotnie, jest kilka czynników, z powodu których celulazy atakują nierozpuszczalną celulozę wbrew kinetyce modelu reakcji Michaelisa-Menten. Jednym z nich jest fakt adsorpcji celulaz na substracie, gdyż jedynie zaadsorbowane enzymy mają możliwość hydrolizy celulozy. Sporna jest także kwestia, czy należy w badaniach uwzględniać cały substrat, czy tylko jego część mającą kontakt z enzymem [Zhang, Himmel, Mielenz 2006].

3.3. Znaczenie temperatury i pH dla aktywności celulaz

Po adsorpcji celulaz na substracie rozpoczyna się reakcja enzymatyczna. Istotne znaczenie dla jej przebiegu mają temperatura i pH. Na ogół pomiar aktywności celulolitycznej przeprowadza się w przedziale temperatur 50–60°C. Pewne szczepy

termofilne, rosnące w przedziale temperatur 45-50°C wytwarzają celulazy, których maksimum aktywności jest w przedziale 50-78°C [Wojtczak i in. 1987]. Przekroczenie temperatury maksymalnej powoduje dość szybki spadek aktywności celulaz i ich inaktywację. Ważnym parametrem, charakteryzującym enzymy jest ich termostabilność. Celulazy takich gatunków, jak *Penicillium purpurogenum*, *Pleurotus Xorida* i *Pleurotus cornucopiae*, wykazywały maksimum aktywności w temperaturze 50°C, zaś aktywność celulaz: CMCazy, FPazy i β -glukozydazy obniżyła się po 48-godzinnej inkubacji w temperaturze 40°C odpowiednio do 98%, 59% i 76 % [Kumar, Sompal Singh, Singh 2008].

Dla większości celulaz pochodzenia grzybowego optymalne pH mieści się w przedziale 4,5-5,5. Kim i in. [2009] wykazali, że dla celulaz z *Aspergillus phoenicus* maksymalna adsorpcja ma miejsce, gdy pH wynosi 4,8-5,5, co odpowiada także maksymalnej aktywności enzymów. Jeżeli wartość pH się zmienia, zmianie mogą ulec także właściwości substrat, a w szczególności jego składniki jonowe. Z tych powodów profil temperatury i pH dla danego enzymu może być odmienny w przypadku różnych substratów. W pewnym stopniu przebieg reakcji enzymatycznych zależy również od zastosowanej dawki enzymu. Jeśli ilość używanego enzymu zmniejszy o połowę, to jego aktywność zmniejszy się czterokrotnie [Bayer i in. 1998; Percival i in. 2006].

4. Produkcja celulaz przez grzyby gatunku *Trichoderma reesei*

4.1. Charakterystyka grzyba gatunku *Trichoderma reesei*

Trichoderma reesei, znany również jako *Hypocrea jecorina* (rys. 2), należy do mezofilnych grzybów nitkowatych z klasy *Ascomycetes* [Druzhinina i in. 2010]. Jest uważany za jednego z najbardziej wydajnych producentów ksylanaz i celulaz. Charakteryzuje się zdolnością do wydzielania dużych ilości białek do podłoża hodowlanego. Dlatego *T. reesei* i jego mutanty są jednym z podstawowych producentów celulaz i ksylanaz w skali przemysłowej. Preparaty enzymatyczne zawierające te enzymy znalazły zastosowania w przemyśle spożywczym i paszowym, a ostatnio są również wykorzystywane w przemyśle włókienniczym oraz celulozowo-papierniczym [Nakari-Setälä, Penttilä 1995; Wang i in. 2004; Xiong i in. 2004].

Dzięki inżynierii genetycznej jest możliwa modyfikacja *Trichoderma reesei* z wykorzystaniem techniki rekombinacji DNA. Modyfikacje genetycznie ukierunkowane są na zwiększenie produkcji celulaz, w szczególności zwiększenie produkcji endoglukanazy I lub eliminację niektórych enzymów, np. cellobiohydrolazy II [Janas, Targoński 2001]. Umożliwiają także uzyskanie odpowiedniej proporcji poszczególnych enzymów kompleksu celulaz i dostosowanie składu kompleksu enzymatycznego do określonych zastosowań. Modyfikacje genetyczne oraz optymalizacja hodowli *Trichoderma reesei* umożliwiają wytworzenie do 40 g białka w litrze podłoża hodowlanego [Nakari-Setälä, Penttilä 1995; Wang i in. 2004; Xiong i in. 2004].



Rysunek 2. *Trichoderma reesei*

Źródło: [<http://genome.jgi-psf.org/Trire2/t.reesei.jpg>].

Figure 2. *Trichoderma reesei*

Source: [<http://genome.jgi-psf.org/Trire2/t.reesei.jpg>].

Tabela 1. Enzymy celulolityczne wytwarzane przez grzyba *Trichoderma reesei*

Table 1. Cellulolytic enzymes produced by fungus of *Trichoderma reesei*

Enzym	Udział w kompleksie [%]
CBHI (EC 3.2.1.91)	50
CBHII (EC 3.2.1.91)	20
EGI (EC 3.2.1.4)	10
EGII (EC 3.2.1.4)	5
EGIII (EC 3.2.1.4)	<5
EGIV (EC 3.2.1.4)	<5
β -glukozydaza (EC 3.2.1.21)	1-2
Inne (nie celulazy)	10

Źródło: [Tolan, Foody 1999].

Source: [Tolan, Foody 1999].

4.2. Przebieg produkcji celulaz

Większość enzymów celulolitycznych produkowana jest na skalę przemysłową w procesie fermentacji wglębnej przez grzyby z rodzaju *Trichoderma*, *Humicola*, *Aspergillus* i *Penicillium* [Kuhad i in. 1999; Sun, Cheng 2002; Sukumaran, Singhan, Pandey 2005; Kuhad i in. 2010].

Produkcja celulaz jest silnie uzależniona od obecności w podłożu hodowlanym induktora oraz podlega represji w obecności łatwo przyswajanego źródła węgla, jakim jest np. glukoza [Targoński, Szajer 1979; Aro, Pakula, Penttilä 2005]. Najlepszym induktorem dla enzymów celulolitycznych jest celuloza. Pożądana jest celuloza czysta, o odpowiedniej strukturze krystalicznej, a także podatności na działanie enzymów. Problem jednak stanowi jej koszt, wynikający z wysokiej ceny i ograniczonej dostępności. W kręgu zainteresowania znalazły się również materiały ligninocelulozowe, jak trociny trzewne, słoma zbóż, makulatura. Trudności w ich stosowaniu wynikają z obecności ligniny przyczyniającej się do obniżenia wydajności pozyskiwania celulaz. Z tego powodu uwagę skupiono na laktozie wchodzącej w skład serwatki jako materiale tanim i o dużej dostępności. Ponadto serwatka zawiera azot, sole mineralne i witaminy istotne dla wzrostu drobnoustrojów [Wesołowska-Trojanowska, Targoński, Udeh 2005].

Oprócz źródła węgla wiele czynników środowiskowych oraz stan fizjologiczny grzybni wpływają na produkcję białka. Należą do nich pH podłoża hodowlanego, obecność światła, temperatura hodowli [Janas, Targoński 1995], specyficzna szybkość wzrostu, stężenie grzybni w podłożu, stopień natleniania pożywki. Jako źródło azotu wykorzystuje się mocznik i siarczan amonowy. Substancje odżywcze, zazwyczaj w ilości 5-25g/L, są dostarczane w postaci namoku kukurydzianego, ale często dodawany jest również ekstrakt drożdżowy. Do podłoża dodaje się surfaktanty, takie jak Tween 80, oraz substancje antypieniące [Kuhad, Singh, Ericsson 1997; Percival Zhang, Kimmel, Mielenz 2006; Deswal, Khasa, Kuhad 2011].

Proces produkcji celulaz jest przeprowadzany w warunkach tlenowych, aseptycznych i zgodnych ze standardami produkcji enzymów czy antybiotyków. Objętość bioreaktora używanego do produkcji na skalę przemysłową wynosi od 100 000 litrów do 300 000 litrów. Hodowla wymaga dużych ilości tlenu, który jest dostarczany poprzez bełkotkę w ilości 0,3-1,2 objętości zbiornika na minutę. Sterylizacja odbywa się zazwyczaj w temperaturze 121°C i trwa 20 minut. Wprowadzane gazy są filtrowane [de Carvalho, de Castro, da Silva 2003; Percival Zhang, Kimmel, Mielenz 2006].

Temperatura i pH w zbiorniku fermentacyjnym są monitorowane i kontrolowane w czasie trwania hodowli. Dla grzyba z rodzaju *Trichoderma* optymalne warunki do wzrostu to temperatura 28-30°C i pH 4-5 [Bayer i in. 1994; Singh 1999]. Hodowla okresowa trwa na ogół kilka dób z zachowaniem sterylności.

4.3. Izolacja i oczyszczanie enzymu

Po zakończeniu hodowli grzybnia jest oddzielana od filtratu zazwyczaj za pomocą filtra próżniowego. Na ogół stężenie enzymów w filtracie jest zbyt niskie od wymaganej dla zastosowań przemysłowych. Masa molekularna większości celulaz wynosi od 25 do 75 kDa, dlatego też do ich zagęszczenia można zastosować ultrafiltrację na membranach o masie cząsteczkowej odcięcia wynoszącej 5000 Da. Aby zwiększyć czystość enzymu, można zastosować dializę [Kubicek 1993; Sang-Mok, Koo 2001].

W produkcji stałych preparatów enzymatycznych ultrafiltracja jest prowadzona do uzyskania od 10% do 40% zawartości suchej masy. Materiał jest poddawany suszeniu rozpyłowemu i granulowany z dodatkiem stabilizatora. Typowymi stabilizatorami są cukry, dekstryny, skrobia, poliole, jony metali, sole. Inne dodawane substancje, jak cytryniany czy fosforany, mają na celu utrzymanie pH preparatu na etapie sporządzania roztworu wodnego. Surfaktanty, takie jak Triton X-100, poprawiają aktywność enzymów stosowanych w przemyśle tekstylnym i w produkcji detergentów. Estrы kwasów tłuszczowych, guma arabska i inne naturalne gumy są stosowane do uzyskania pożądanej tekstury oraz zapobiegają pyleniu granulatu. W celu osiągnięcia odpowiedniego stężenia enzymu w preparacie dodawany jest siarczan sodu jako wypełniacz. Ponadto dąży się do jak najmniejszej ilości wilgoci w stałych preparatach enzymatycznych [Kuhad, Manchanda, Singh 1999; Sukumaran, Singhanina, Pandey 2005; Kuhad i in. 2010b].

Ciekle preparaty enzymatyczne stabilizowane są sorbitolem, glicerolem lub glikolem propylenowym [Misset 1992]. Substancje te dodawane są w ilości od 10% do 50% w celu stabilizacji pełnej aktywności preparatu enzymatycznego w okresie kilku miesięcy. Aby zabezpieczyć preparat przed rozwojem mikroorganizmami, stosuje się dodatek chlorku sodowego oraz konserwanty, takie jak benzoosan sodu i sorbinian potasu. Bufory i surfaktanty mogą być także dodawane, ale w mniejszej ilości niż do preparatów stałych [Bayer, Morag, Lamed 2004].

5. Zastosowanie enzymów celulolitycznych

5.1. Obróbka tkanin z jeansu

Stonewashing denim to nazwa procesu obróbki wstępnej tkanin jeansowych. Polegał on na tym, że tkaninę prano z udziałem kamiennego pumeksu, który ścierał i szlifował odzież. W rezultacie jeansy były delikatniejsze, a zatem gotowe do nałożenia w czasie zakupu. Po 1980 r. enzymy celulolityczne stały się alternatywą dla procesu *stonewashing denim*. Zastosowanie enzymów celulolitycznych zdominowało branżę producentów jeansów, pozwoliło bowiem uzyskać wyroby o pożądanym wyglądzie i miękkości. Poza tym enzymy były konkurencyjne cenowo, co sprzyjało ich rozpowszechnieniu [Heikinhei i in. 2000; Hebeish, Ibrahim 2007; Karmakar, Ray 2011].

Celulaza, mająca zastosowanie w tym przemyśle, to surowy enzym produkowany przez mikroorganizmy z rodzaju *Trichoderma* i *Humicola*, zwane potocznie kwaśną celulazą (pH 4-5) i „neutralną celulazą (pH 6-7) [Singh, Kuhad, Ward 2007]. Celulaza, pochodząca od grzyba z rodzaju *Trichoderma*, zawiera pełny zestaw enzymów zdolnych do przeprowadzenia całkowitej hydrolizy celulozy. Działają one dużo szybciej i są w stanie w znacznym stopniu spowodować ścieranie i zanikanie niebieskiego barwnika, a efekt obróbki jest zadowalający. Celulaza produkowana przez grzyba z rodzaju *Humicola* działa na odzież delikatniej, co daje większą wytrzymałość i możliwość przechowywania materiału przez dłuższy czas. Neutralny zakres pH dla działania tych celulaz ułatwia dostosowanie do pH środków piorących, które wykazują nieznacznie alkaliczny odczyn [Bhat 2000]. Korzyści przemawiają za stosowaniem enzymów wytwarzanych przez grzyby z rodzaju *Humicola*, ale enzymy produkowane przez *Trichoderma reesei* są nadal szeroko stosowane [Galante, DeConti, Monteverdi 1998; Uhli 1998; Anish, Rahman, Rao 2006].

W połowie lat 90. kilka nowych preparatów enzymatycznych znalazło zastosowanie w obróbce tkanin z jeansu. Niższy stopień utraty wytrzymałości tkaniny osiągnięto za pomocą zestawienia poszczególnych komponentów celulaz. Celulaza produkowana przez rodzaj *Trichoderma*, zastosowana w kombinacji z protezą dawała efekty obróbki tkanin zbliżone do celulaz wytwarzanych przez rodzaj *Humicola*. Niektóre specjalne celulazy są używane do zminimalizowania smug barwnika na tkaninie, mogą też powodować większe ścieranie w pobliżu szwów lub inne pożądane efekty [Sreenath i in. 1996; Miettinen-Oinonen, Suominen 2002; Hebeish; Ibrahim i in. 2011].

5.2. Środki piorące

W 1993 r. zastosowano preparat celulazy pochodzącej z grzyba *Humicola insolens* w proszkach do prania celem usuwania zmechaconych mikrofibryli, które pojawiają się na bawełnianych ubraniach podczas wielokrotnego noszenia i prania w pralkach automatycznych [Bhat 2000]. W rezultacie tkaniny dłużej zachowują swój pierwotny wygląd, kolory nie blakną i nie tracą swojej intensywności. Celulaza działa również zmiękczająco na włókna tkaniny, co pozwala zachować odzież przyjemną w dotyku strukturę, gładką, cenioną przez konsumentów. Stosowanie enzymów celulozowych eliminuje konieczność dodawania kationowych substancji zmiękczających tkaniny, co pozwala obniżyć koszty produkcji środków piorących, nie zmniejszając ich skuteczności [Singh, Kuhad, Ward 2007].

Pranie w pralkach automatycznych odbywa się w środowisku alkalicznym (pH 8-9,5), a więc celulaza powinna być aktywna w tym zakresie pH. Z tych powodów celulaza wytwarzana przez grzyby z rodzaju *Trichoderma* nie znalazła zastosowania w tym procesie. Enzym powinien być odporny na potencjalne inhibitory i inaktywatory, takie jak proteazy, surfaktanty i wybielacze. Z tego powodu potrzebna była modyfikacja grzyba z rodzaju *Humicola*, aby uzyskać enzym o korzystnych właści-

wościach. Dzięki zastosowanym zmianom uzyskano enzym odporny na inhibicję powodowaną przez anionowe surfaktanty, proteazy i wybielacze, a także o wyższej zdolności do adsorpcji na celulozie [Sukumaran, Singhanian, Pandey 2005; Karmakar, Ray 2011].

Inne enzymy celulolityczne stosowane w środkach piorących, obejmujące cellulazy aktywne w środowisku alkalicznym są produkowane m.in. przez bakterie z rodzaju *Bacillus*. Efektywnie usuwają zabrudzenia, nie niszcząc włókien bawełnianych [Ito 1996].

5.3. Biopolishing – obróbka enzymatyczna tkanin

Enzymy celulolityczne usuwają zmechacenia z tkanin, zapobiegają ich powtórnemu powstawaniu i poprawiają jakość tkaniny. Wiele tkanin, szczególnie mieszanki bawełny i innych włókien nie wykonanych z bawełny, podczas szycia i tkania ulega mechaceniu. Jest to zjawisko negatywnie oceniane przez użytkowników, ponieważ pogarsza wygląd ogólny odzieży, a także ostrość kolorów. *Lyocell*, czyli sztuczne włókna celulozowe, mieszanki włókien bawełnianych i wełnianych, są szczególnie podatne na mechacenie [Anish, Rahman, Rao 2006; Hebeish; Ibrahim i in. 2011].

Preferowaną metodą usuwania zmechaceń jest użycie enzymów celulolitycznych. Proces ten zwykle przebiega następujących warunkach: pH – 5, temperatura – 40-50°C, czas – 15-30 min [Bhat 2000].

Większość barwników używanych do sztucznych włókien celulozowych jest stabilniejsza w kwaśnym pH niż w alkalicznym. Z tej przyczyny stosowana jest cellulaza produkowana przez grzyba z rodzaju *Trichoderma* [Cortez, Eblis, Bishop 2002; Ibrahim i in. 2011].

5.4. Pasze dla zwierząt

Po raz pierwszy preparat cellulazy zastosowano w przemysłowej produkcji pasz z jęczmienia i pszenicy do żywienia brojlerów i trzody chlewnej. Jęczmień i pszenica zawierają rozpuszczalne β – glukany, które zwiększają lepkość masy w przewodzie pokarmowym zwierząt. Skutkiem tego jest wchłanianie wody, co zmniejsza dostępność węglowodanów i witamin, które są zawarte w paszy. Oprócz tego wzrost lepkości przyczynia się do dolegliwości ze strony przewodu pokarmowego zwierząt [Godfrey, West 1996; Dhiman i in. 2002].

Po zastosowaniu dodatku enzymów celulolitycznych do pasz stwierdzono polepszenie wartości rzeźnej brojlerów nimi żywionych. Cechy fizykochemiczne mięśni piersiowych także okazały się korzystniejsze. Test sprawnościowy przeprowadzony w warunkach laboratoryjnych wykazał, że kompleks enzymów celulolitycznych spowodował wzrost strawności frakcji włókna pokarmowego oraz podstawowych składników odżywczych [Lin, Tanaka 2006; Shrivastava i in. 2011; Karmakar, Ray 2011].

Prowadzono także badania, które miały na celu określenie skutków żywienia kur niosek mieszkanką z jęczmieniem z dodatkiem celulaz. Wynika z nich, że wprowadzenie enzymów do paszy wpłynęło na poprawę nieśności kur o 9%. Zaobserwowano również korzystny wzrost produkcji jaj o 6,5% oraz polepszenie barwy żółtka [Cowan 1996; Galante i in. 1998; Pascual 2001; Pazarlioglu, Sariis,ik, Telefonu 2005; Wang i in. 2004].

5.5. Produkcja soków owocowych

Produkcji soków owocowego i warzywnych przebiega na ogół z niską wydajnością, jeżeli nie przeprowadzi się maceracji enzymatycznej pulpy otrzymanej po rozdrobnieniu owoców lub warzyw. Dlatego dąży się do daleko posuniętej degradacji składników ścian komórkowych za pomocą enzymów pektynolitycznych, celulolitycznych i hemicelulaz. Nierozłożone cząstki stałe są oddzielane od moszczu za pomocą filtracji i wirowania. Wydajność soku zależy w dużej mierze od rodzaju owocu, z którego produkowany jest sok, ale także od składu enzymów macerujących miazgę, które również mają wpływ na jego stabilność [Minussi, Pastore, Dur'an 2002; de Carvalho, de Castro, da Silva 2008].

Preparaty enzymów celulolitycznych rozkładają celulozę, hemicelulozy i β -glukan, które wchodzi w skład ściany komórkowej roślin. Prowadzi to do zmniejszenia lepkości przecieru lub moszczu i zwiększenia wydajności ekstrakcji soku z miazgi. Hydroliza celulozy i β -glukanu do cukrów rozpuszczalnych w wodzie prowadzi do wzrostu wydajności soku. Dzięki stosowaniu celulaz zostają również ograniczone koszty usuwania osadu z soku [Nowak, Huong 2006; Singh, Kuhad, Ward 2007; de Carvalho, de Castro, da Silva 2008].

Zastosowanie preparatów macerujących polepsza także klarowność soku poprzez poprawę rozpuszczalności małych cząsteczek. Wydobyte z przecieru przy pomocy enzymów związki aromatyczne i smakowe wzmacniają smak i zapach soku. Poprawia to jego właściwości organoleptyczne i wpływa na atrakcyjność produktu [Grassini, Fauquembergue 1996; Rai i in. 2007].

Zastosowanie preparatów enzymatycznych zawierających m.in. enzymy celulolityczne w technologii piwa i wina wpływa na kształtowanie smaku tych produktów. Jest to związane ze zwiększoną ekstrakcją związków smakowych, co pozwala utrzymać stały, powtarzalny smak charakterystyczny dla danego gatunku piwa lub wina [Galante, DeConti, Monteverdi 1998; Sukumaran, Singhanian, Pandey 2005; Anish, Rahman, Rao 2006; Bamforth 2009].

Większość preparatów celulaz stosowanych do obróbki soków pochodzi z grzyba z rodzaju *Trichoderma*, ponieważ moszcze mają zazwyczaj niskie pH. Stosuje się także preparaty celulaz wytwarzane m.in. przez pleśnie z gatunku *Aspergillus niger* [Canales i in. 1988; Bamforth 2009].

5.6. Piekarnictwo

Enzymy celulolityczne znajdują zastosowanie także w piekarnictwie. Preparaty enzymatyczne, zawierające m.in. celulazy i hemicelulazy, są wykorzystywane do degradacji gum roślinnych. Ma to na celu wytworzenie odpowiedniej struktury ciasta, co pozwala na lepszy wzrost pieczywa i poprawia jego smakowość. Jednakże zbyt duża aktywność celulaz może zniszczyć strukturę ciasta. Preparaty celulaz produkowane przez grzyby z rodzaju *Trichoderma* odznaczają się zbyt agresywnym działaniem w przypadku produkcji pieczywa, dlatego ich zastosowanie ogranicza się do wypieku krakersów [Dourado i in. 2002; Grassin, Fauquembergue 1996].

Najpowszechniej stosowanymi celulazami są preparaty otrzymywane z hodowli grzyba z rodzaju *Aspergillus*. Mają one duże znaczenie w produkcji zarówno chleba, jak i ciast [Bhat 2000].

5.7. Odbarwianie i odwadnianie papieru

Odbarwianie to proces, w którym tusz jest usuwany z papieru, co pozwala na jego recykling. Klasyczny sposób odbarwiania przeprowadzany jest przez flotację. Pulpa papieru, zawieszona w wodzie w stężeniu od 5% do 20%, zostaje przepompowana do basenu, gdzie powietrze jest doprowadzane przez inżektora. Dzięki dodanym surfaktantom tusz migruje zgodnie z kierunkiem nawiewanego powietrza i wypływa na powierzchnię basenu. Tusz zostaje odłuszczone i odbarwiona pulpa kierowana jest do bielienia, które przeprowadza się za pomocą nadtlenu wodoru lub bardziej agresywnych wybielaczy, jak dwutlenek chloru czy ozon [Akhtar 1994; Park, Park 1998; Pere i in. 2001, Mai, Kues, Militz 2004].

Preparat celulaz jest dodawany podczas odbarwiania w celu zwiększenia ilości usuwanego tuszu z włókien. Dzięki temu arkusze papieru stają się jaśniejsze i czystsze. Ponadto zastosowanie celulaz pozwala ograniczyć ilość używanych surfaktantów i wybielaczy chemicznych. Mechanizm enzymatycznego odbarwiania nie jest do końca poznany. Preferowane dla tej obróbki są więc celulazy wytwarzane przez grzyby z rodzaju *Humicola* i *Aspergillus*, charakteryzujące się wyższym optymalnym pH działania niż z pochodzące z *T. reesei* [Dienes, Egyh'azi, R'eczey 2004; Mansfield i in. 1996; Viesturs i in. 1999].

Enzymy celulolityczne zwiększają szybkość odwadniania pulpy, skracają czas procesu i poprawiają jego ekonomikę. Celulaza degradowuje większe cząsteczki do mniejszych, co pozwala na uwolnienie i usunięcie uwięzionej wody. Dodawana jest do tanku z zawiesiną pulpy przed operacją tłoczenia. Zazwyczaj czas potrzebny na jej efektywne działanie to jedna godzina. Stosowane są preparaty wytwarzane przez grzyba z rodzaju *Trichoderma*, dla których optymalne pH działania zawiera się w przedziale od 4 do 5 [Kantelinen, Jokinen, Sarkki 1995; Karnis 1995; Stork, Puls 1996].

5.8. Produkcja etanolu

Biomasa roślinna stanowi najbardziej obfite naturalne źródło związków organicznych na naszej planecie. Dzięki temu jest uznawana za najatrakcyjniejsze źródło odnawialnej energii. Jednym z kierunków jej zagospodarowania i efektywnego wykorzystania jest wytwarzanie etanolu na bazie materiałów, takich jak odpady rolne i leśne, makulatura oraz odpady przemysłowe. Ze względu na ich powszechną dostępność i niskie ceny paliwo na bazie etanolu pozyskiwanego z celulozy i hemiceluloz może się stać alternatywą dla paliw kopalnych [Fujita i in. 2002; Sukumaran, Singhania, Pandey 2005; Gupta, Khasa, Kuhad 2011].

W ostatnich latach nastąpił wzrost produkcji bioetanolu, jednak głównie na bazie skrobi zawartej w kukurydzy i sacharozy z trzciny cukrowej. Znaczący wzrost produkcji bioetanolu na cele paliwowe wymaga jednak korzystania z surowców nie wykorzystywanych w produkcji żywności. Takimi surowcami są materiały ligninocelulozowe. Celuloza jest rozkładana do glukozy, a hemicelulozy są rozkładane głównie do ksylozy. Następnie w procesie fermentacji prowadzonej przy użyciu modyfikowanych genetycznie bakterii lub drożdży cukry metabolizowane są do etanolu. [Ghosh, Singh 1993; Wyman i in. 2005; Lin, Tanaka 2006; Kuhad, Gupta, Khasa 2010].

Obróbka wstępna materiałów celulozowych ma na celu zniszczenie struktury włókien i umożliwienie celulazom kontaktu z substratami. Proces ten zazwyczaj zachodzi w temperaturze 180-250°C, w obecności 0,5-2-procentowego kwasu siarkowego, czas jego trwania waha się od kilku sekund do kilku minut. Po obróbce materiał ma postać wodnistej zawiesiny, w której zawartość celulozy waha się w ilości 35%-55%. Preparaty enzymatyczne zawierające celulazy i hemicelulazy dodawane są do wstępnie modyfikowanych materiałów ligninocelulozowych, uwalniając z nich glukozę, celobiozę, ksylozę i inne cukry. Enzymy celulolityczne są dodane w ilości od 5 do 25 jednostek FPA na 1 gram celulozy. Proces trwa do 1 doby do 3 dób. Następnie prowadzona jest fermentacja etanolowa, a po niej odzysk etanolu na drodze odparowania i rektyfikacji. Do enzymatycznej hydrolizy biomasy najczęściej wykorzystuje się preparaty pochodzące z mutantów lub rekombinantów *Trichoderma reesei*, biorąc pod uwagę nie tylko aktywny kompleksu celulaz wytwarzany przez ten gatunek, ale także obecność hemicelulaz, wzbogacanych o β -glukozydazy pochodzące z innych źródeł. Optymalne warunki dla działania tych enzymów to temperatura 50°C i pH 5 [Gupta, Khasa, Kuhad 2011; Kuhad i in. 2010]. Nagromadzające się podczas hydrolizy cukry, tj. glukoza, a w szczególności celobioza, powodują hamowanie hydrolizy enzymatycznej celulozy. Aby ograniczyć ten proces zaproponowano proces SSF (*simultaneous saccharification and fermentation*), polegający na jednoczesnej enzymatycznej hydrolizie i fermentacji. W procesie SSF glukoza jest fermentowana przez drożdże, co prowadzi do spadku ilości glukozy inhibującej β -glukozydazę. Pozwala to na kontynuowanie hydrolizy celobiozy. Ujemną stroną procesu SSF są trudności w wyborze najkorzystniejszej temperatury dla jego

przebiegu. Optymalna temperatura dla namnażania drożdży wynosi 28°C, natomiast dla działania celulaz jest to 50°C. Najczęściej stosuje się temperaturę 37°C, która mieści się w zakresie tolerancji zarówno drożdży, jak i enzymów celulolitycznych [Kuhad, Singh 1993; Sun, Cheng 2002; Mosier, Wyman, Dale 2005].

6. Podsumowanie

Enzymy celulolityczne znajdują coraz szersze zastosowanie w różnych gałęziach przemysłu spożywczego, tekstylnego, fermentacyjnego, jako dodatki do pasz, środków piorących i innych. Jednak największe nadzieje na ich wielkotonażowe wykorzystanie wiąże się z biodegradacją materiałów ligninocelulozowych i pozyskaniem cukrów prostych, takich jak glukoza i ksyloza, stanowiących źródło węgla i energii dla wielu procesów biotechnologicznych, w tym produkcji etanolu jako dodatku do paliw, czy wielu chemikali.

Dominującym mikroorganizmem wykorzystywanym do produkcji enzymów celulolitycznych na skalę przemysłową jest grzyb *Trichoderma reesei*. Koszty produkcji preparatów celulolitycznych stanowią jeden z ważnych czynników kosztotwórczych otrzymywania cukrów z biomasy lignocelulozowej. Dlatego też prowadzi się wielokierunkowe prace badawcze, których celem jest intensyfikacja produkcji celulaz przez *Trichoderme reesei*.

Przegląd piśmiennictwa wskazuje na wzrastające możliwości aplikacji preparatów celulolitycznych, którym towarzyszą inne enzymy, w szczególności hemicelulozy. Biorąc pod uwagę rosnącą konkurencyjność biopaliw i biochemikali w stosunku do produktów z ropy naftowej, można się spodziewać w najbliższych latach dużego zapotrzebowania na preparaty bogate w enzymy celulolityczne.

Literatura

- Akhtar M., *Biochemical pulping of aspen wood chips with three strains of Ceriporiopsis subvermispora*, "Holzforschung" 1994, vol. 48, s. 199-202.
- Anish R., Rahman M.S., Rao M., *Application of cellulases from an alkalothermophilic Thermomonospora sp. in biopolishing of denim*, "Biotechnology and Bioengineering" 2006, vol. 96, no. 1, s. 48-56.
- Aro N., Pakula T., Penttilä M., *Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi*, FEMS Microbiol Rev. 2005, vol. 29(4), s. 719-739.
- Bamforth C.W., *Current perspectives on the role of enzymes in brewing*, "Journal of Cereal Science" 2009, vol. 50, no. 3, s. 353-357.
- Bayer E. A., Belaich J. P., Shoham Y., Lamed R., *The cellulosomes: Multienzyme machines for degradation of plant cell wall polysaccharides*, "Annual Review of Microbiology" 2004, vol. 58, s. 521-554.
- Bayer E. A., Chanzy H., Lamed R., Shoham Y., *Cellulose, cellulases and cellulosomes*, "Current Opinion in Structural Biology", 1998, vol. 8, no. 5, s. 548-557.
- Bayer E.A., Morag F., Lamed R., *The cellulosome-a treasure-trove for biotechnology*, "Trends in Biotechnology" 1994, vol. 12, no. 9, s. 379-386.

- Bhat M.K., *Cellulases and related enzymes in biotechnology*, "Biotechnology Advances" 2000, vol. 18, no. 5, s. 355-383.
- Canales A.M., Garza R., Sierra J.A., Arnold R., *The application of beta-glucanase with additional side activities in brewing*, "MBAA Technical Quarterly" 1988, vol. 25, s. 27-31.
- Carvalho L.M.J., Deliza R., Silva C.A.B., Miranda R.M., Maia M.C.A., *Identifying the adequate process conditions by consumers for pineapple juice using membrane technology*, "Journal of Food Technology" 2003, vol. 1, s. 150-156.
- Cortez J. M., Eblis J., Bishop D.P., *Using cellulases to improve the dimensional stability of cellulosic fabrics*, "Textile Research Journal" 2002, vol. 72, nr 8, s. 673-680.
- Cowan W.D., *Animal feed*, [w:] *Industrial Enzymology*, red. T. Godfrey, S. West, Macmillan Press, London 1996, s. 360-371.
- de Carvalho L.M.J., de Castro I.M., da Silva C.A.B., *A study of retention of sugars in the process of clarification of pineapple juice (Ananas comosus, L. Merrill) by micro- and ultra-filtration*, "Journal of Food Engineering" 2008, vol. 87, no. 4, s. 447-454.
- Dashtban M., Maki M., Leung K.T., Canquan Mao C., Qin W., *Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison*, "Critical Reviews in Biotechnology" 2010, s. 1-8.
- Deswal D., Khasa Y.P., Kuhad R.C., *Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis sp. RCK2010* under Solid State Fermentation*, "Bioresource Technology" 2011, vol. 102, nr 10, s. 6065-6072.
- Dhiman T.R., Zaman M.S., Gimenez R.R., Walters J.L., Treacher R., *Performance of dairy cows fed forage treated with fibrolytic enzymes prior to feeding*, "Animal Feed Science and Technology" 2002, vol. 101, no. 1-4, s. 115-125.
- Dienes D., Egyh'azi A., R'eczey K., *Treatment of recycled fiber with *Trichoderma cellulases**, "Industrial Crops and Products" 2004, vol. 20, nr 1, s. 11-21.
- Dorado F., Bastos M., Mota M., Gama F.M., *Studies on the properties of Celluclast/Eudragit L-100 conjugate*, "Journal of Biotechnology" 2002, vol. 99, no. 2, s. 121-131.
- Druzhinina I.S., Komoń-Zelazowska M., Atanasova L., Seidl. Kubicek V.C. P., *Evolution and ecophysiology of the industrial producer *Hypocrea jecorina* (Anamorph *Trichoderma reesei*) and a new sympatric agamospecies, related to it*. 2010 PLoS One 5:e9191.
- Fujita Y., Takahashi Sh., Ueda M., Tanaka A., Okada H., Morikawa Y., Kawaguchi T., Arai M., Fukuda H., Kondo A., *Direct and Efficient Production of Ethanol from Cellulosic Material with a Yeast Strain Displaying Cellulolytic Enzymes*, "Applied and Environmental Microbiology" 2002, vol. 68, no. 10, s. 5136-5141.
- Galante Y.M., DeConti A., Monteverdi R., *Application of *Trichoderma* enzymes in food and feed industries*, [w:] G.F. Harman, Kubicek C.P., *Trichoderma and Gliocladium – Enzymes*, "Biological Control and Commercial Applications" 1998, vol. 2, s. 311-326.
- Ghosh P., Singh A., *Physicochemical and biological treatments for enzymatic/microbial conversion of lignocellulosic biomass*, "Advances in Applied Microbiology" 1993, vol. 39, s. 295-333.
- Godfrey T., West S., *Textiles*, [w:] *Industrial Enzymology*, 2nd edition, Macmillan Press, London 1996, s. 360-371.
- Grassin C., Fauquembegue P., *Fruit juices*, [w:] *Industrial Enzymology*, red. T. Godfrey, S. West, 2nd edition, Macmillan Press, London 1996, s. 22-264.
- Gupta R., Khasa Y.P., Kuhad R.C., *Evaluation of pretreatment methods in improving the enzymatic saccharification of cellulosic materials*, "Carbohydrate Polymers" 2011, vol. 84, s. 1103-1109.
- Hebeish A., Ibrahim N.A., *The impact of frontier sciences on textile industry*, "Colourage" 2007, vol. 54, s. 41-55.
- Heikinhei L., Buchert J., Miettinen-Oinonen A., Suominen P., *Treating denim fabrics with *Trichoderma Reesei* cellulases*, "Textile Research Journal" 2000, vol. 70, no. 11, s. 969-973.
- Himmel M.E., Ruth M.F., Wyman C.E., *Cellulase for commodity products from cellulosic biomass*, "Current Opinion in Biotechnology" 1999, vol. 10, no. 4, s. 358-364.

- <http://genome.jgi-psf.org/Trire2/t.reesei.jpg>
<http://upload.wikimedia.org>
<http://www.innovia.pl>
<http://www.kdnnbiotech.com/ProductView.aspx?TID=1270>
- Ibrahim N.A., El-Badry K., Eid B.M., Hassan T.M., *A new approach for biofinishing of cellulose-containing fabrics using acid cellulases*, "Carbohydrate Polymers" 2011, vol. 83, no. 1, s. 116-121.
- Isaksen T., Westereng B., Aachman F.L., Agger J.W., Kracher D., Kittil R., Ludwig R., Haltrich R., Haltrich D., Eijsink V.G., Horn S.J., *A C4-oxidizing lytic polysaccharide monoxygenase cleaving both cellulose and cell-oligosaccharides*, J. Biol. Chem. 2014, 289, s. 2632-42.
- Ito S., *Alkaline cellulases from alkaliphilic Bacillus: Enzymatic properties, genetics, and application to detergents*, "Extremophiles" 1996, vol. 1, no. 2, s. 61-66.
- Janas P., Targoński Z., *Karboksyhydrolazy Trichoderma reesei: budowa, mechanizm działania, regulacja i zastosowanie*, Post. Mikrobiol. 2001, vol. 40, s. 375-396.
- Janas P., Targoński Z., *Effect of temperature on the production of cellulases, xylanases and lytic enzymes by selected Trichoderma reesei mutants*, "Acta Mycologica" 1995, vol. 30 (2), s. 255-264.
- Juturu V., Wu J.Ch., *Microbial cellulases: Engineering, production and applications*, "Renewable and Sustainable Energy Reviews" 2014, vol. 33, s. 188-203.
- Kantelinen A., Jokinen O., Sarkki M.-L., *Effects of enzymes on the stability of colloidal pitch*, Proceedings of the 8th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry, Helsinki 1995, vol. 1, s. 605-61.
- Karmakar M., Ray R.R., *Current trends in research and application of microbial cellulases*, "Research Journal of Microbiology" 2011, vol. 6, no. 1, s. 41-53.
- Karnis A., *The role of latent and delatent mechanical pulp fines in sheet structure and pulp properties*, "Paperi Ja Puu- Paper Timber" 1995, vol. 77, s. 491-497.
- Kim Y., Hendrickson R., Mosier N.S., Ladisch M.R., *Liquid hot water pretreatment of cellulosic biomass*, "Methods in Molecular Biology" 2009, 581, s. 93-102.
- Kubicek C.P., *From cellulose to cellulose inducers: facts and fiction*, Proceedings of the 2nd symposium *Trichoderma reesei* cellulases and other hydrolases (Tricel 93), red. P. Suominen, T. Reinikainen, *Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research*, Espoo 1993, vol. 8, s. 181-188.
- Kuhad R.C., Gupta R., Khasa Y.P., *Bioethanol production from lignocellulosic biomass: an overview*, [w:] *Wealth from Waste Lal B.*, Teri Press, New Delhi 2010.
- Kuhad R.C., Gupta R., Khasa Y.P., Singh A., *Bioethanol production from Lantana camara (red sage): Pretreatment, saccharification and fermentation*, "Bioresource Technology" 2010a, vol. 101, no. 21, s. 8348-8354.
- Kuhad R.C., Manchanda M., Singh A., *Hydrolytic potential of extracellular enzymes from a mutant strain of Fusarium oxysporum*, "Bioprocess Engineering" 1999, vol. 20, no. 2, s. 133-135.
- Kuhad R.C., Mehta G., Gupta R., Sharma K.K., *Fed batch enzymatic saccharification of newspaper cellulose improves the sugar content in the hydrolysates and eventually the ethanol fermentation by Saccharomyces cerevisiae*, "Biomass and Bioenergy" 2010b, vol. 34, no. 8, s. 1189-1194.
- Kuhad R.C., Singh A., *Lignocellulose biotechnology: current and future prospects*, "Critical Reviews in Biotechnology" 1993, vol. 13, no. 2, s. 151-172.
- Kuhad R.C., Singh A., Ericsson K.E., *Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls*, "Advances in Biochemical Engineering Biotechnology" 1997, vol. 57, s. 45-125.
- Kumar J., Sompal Singh S., Singh O.V., *Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives*, J Ind. Microbiol Biotechnol 2008, vol. 35, s. 377-391.
- Lin Y., Tanaka Sh., *Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects*, "Applied Microbiology and Biotechnology" 2006, vol. 69, no. 6, s. 627-642.
- Mai C., Kues U., Militz H., *Biotechnology in the wood industry*, "Applied Microbiology and Biotechnology" 2004, vol. 63, no. 5, s. 477-494.

- Mansfield S.D., Wong K.K.Y., De Jong E., Saddler J.N., *Modification of Douglas-fir mechanical and kraft pulps by enzyme treatment*, "Tappi Journal" 1996, vol. 79, no. 8, s. 125-132.
- Miettinen-Oinonen A., Suominen P., *Enhanced production of Trichoderma reesei endoglucanases and use of the new cellulase preparations in producing the stonewashed effect on denim fabric*, "Applied and Environmental Microbiology" 2002, vol. 68, no. 8, s. 3956-3964.
- Minussi R.C., Pastore G.M., Dur'an N., *Potential applications of laccase in the food industry*, "Trends in Food Science and Technology" 2002, vol. 13, no. 6-7, s. 205-216.
- Misset, O. Stability of industrial enzymes. Proceedings of an International Symposium held in Maastricht, The Netherlands, 1992, s. 22-25.
- Mosier N., Wyman C., Dale B., *Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass*, "Bioresource Technology" 2005, vol. 96, no. 6, s. 673-686.
- Nakari-Setälä T., Penttilä M., *Production of Trichoderma reesei cellulases on glucose-containing media*, "Environmental Microbiology" 1995, vol. 61, no. 10, s. 3650-3655.
- Nowak D., Huong H.T.T., *Wpływ degradacji enzymatycznej błonnika pokarmowego na jego właściwości sorpcyjne*, "Acta Agrophysica" 2006, vol. 8, no. 4, s. 893-901.
- Ooshima H., Sakata M., Harano Y., *Adsorption of cellulase from Trichoderma viride on cellulose*, Biotechnol and Bioeng. 1998, vol. 25, s. 3103-3114.
- Park J.W., Park K.N., *Biological de-inking of waste paper using modified cellulase with polyoxyethylene*, "Biotechnology Techniques" 1998, vol. 13, no. 1, s. 49-53.
- Pascual J.J., *Recent advances on early weaning and nutrition around weaning*, Proceedings of the 2nd Meeting of COST 848 Working Group 4, Gödöllő, Hungary, 2001, s. 31-36.
- Pazarlioglu N.K., Sarişik M., Telefonu A., *Treating denim fabrics with immobilized commercial cellulases*, "Process Biochemistry" 2005, vol. 40, no. 2, s. 767-771.
- Percival Zhang Y.H., Kimmel M.E., Mielenz J.R., *Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies*, "Biotechnology Advances" 2006, vol. 24, no. 5, s. 452-481.
- Pere J., Puolakka A., Nousiainen P., Buchert J., *Action of purified Trichoderma reesei cellulases on cotton fibers and yarn*, "Journal of Biotechnology" 2001, vol. 89, no. 2-3, s. 247-255.
- Rai P., Majumdar G. C., Das Gupta S., De S., *Effect of various pretreatment methods on permeate flux and quality during ultrafiltration of mosambi juice*, "Journal of Food Engineering" 2007, vol. 78, no. 2, s. 561-568.
- Russel S., Górska E.B., Wyczółkowski A.J., *Enzymy biorące udział w hydrolizie celulozy*, Acta Agrophysica, Rozprawy i Monografie 2005, vol. 3, s. 27-36.
- Sang-Mok L., Koo Y.M., *Pilot-scale production of cellulose using Trichoderma reesei Rut C-30 in fed-batch mode*, "Journal of Microbiology and Biotechnology" 2001, vol. 11, no. 2, s. 229-233.
- Shrivastava B., Thakur S., Khasa Y.P., Gupte A., Puniya A.K., Kuhad R.C., *White-rot fungal conversion of wheat straw to energy rich cattle feed*, "Biodegradation" 2011, vol. 22, no. 4, s. 823-831.
- Singh A., *Engineering enzyme properties*, "Indian Journal of Microbiology" 1999, vol. 39, no. 2, s. 65-77.
- Singh A., Kuhad R.C., Ward O.P., *Industrial application of microbial cellulases*, [w:] *Lignocellulose Biotechnology: Future Prospects*, red. R.C. Kuhad, A. Singh, I.K. International Publishing House, New Delhi 2007, s. 345-358.
- Sreenath H.K., Shah A.B., Yang V.W., Gharia M.M., Jeffries T.W., *Enzymatic polishing of jute/cotton blended fabrics*, "Journal of Fermentation and Bioengineering" 1996, vol. 81, no. 1, s. 18-20.
- Stork G., Puls J., *Changes in properties of different recycled pulps by endoglucanase treatments*, Proceedings of the International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, *Recent Advances in Applied and Fundamental Research*, red. E. Srebotnik, K. Mesner, Facultas-Universitätsverlag, Vienna, Austria, 1996, vol. 1, s. 145-150.
- Sukumaran R.K., Singhania R.R., Pandey A., *Microbial cellulases-production, applications and challenges*, "Journal of Scientific and Industrial Research" 2005, vol. 64, no. 11, s. 832-844.

- Sun Y., Cheng J., *Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review*, "Biore-source Technology" 2002, vol. 83, no. 1, s. 1-11.
- Targoński Z., Szajer Cz., *The dynamics of cellulase synthesis in Fusarium cultures. II Influence of cel-lulose concentration in the culture media*, Biotechnol. Letters 1979, vol. 1, s. 439-444.
- Tolan J.S., Foody B., *Cellulase from submerged fermentation*, "Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology" 1999, vol. 65, s. 41-67.
- Uhli H., *Industrial Enzymes and Their Applications*, vol. 3, John Wiley & Sons, New York 1998, s. 601-603.
- Viesturs U., Leite M., Eisimonte M., Eremeeva T., Treimanis A., *Biological deinking technology for the recycling of office waste papers*, "Bioresource Technology" 1999, vol. 67, no. 3, s. 255-265.
- Wang T.H., Liu T., Wu Z.H., Liu Sh. L., Lu Y., Qu Y.B., *Novel Cellulase Profile of Trichoderma reesei Strains Constructed by cbh1 Gene*, 2004.
- Wesołowska-Trojanowska M., Targoński Z., Udeh K., *Porównanie hodowli okresowych Trichoderma reesei M-7 na podłożu z czystą laktozą i surową serwatką*, Acta Scientiarum Polonorum, „Biotech-nologia” 2005, vol. 4, 1-2, s. 21-32.
- Wojtczak G., Breuil C., Yamuda J., Saddler J.N., *A comparison of the thermostability of cellulose from various thermophilic fungi*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 1987, vol. 27, s. 82-87.
- Wyman C.E., Dale B.E., Elander R.T., Holtzapple M., Ladisch M.R., Lee Y.Y., *Coordinated develop-ment of leading biomass pretreatment technologies*, "Bioresource Technology" 2005, vol. 96, no. 18, s. 1959-1966.
- Ximenes E., Kima Y., Mosiera N., Diend D., Ladisch M., *Inhibition of cellulases by Phenols*, "Enzyme and Microbial Technology" 2010, vol. 46, s. 170-176.
- Xiong H., von Weymarn N., Leisola M., Turunen O., *Influence of pH on the production of xylanases by Trichoderma reesei Rut C-30*, "Process Biochemistry" 2004, vol. 39, no. 6, s. 729-733.
- Zhang P., Himmel M.E., Mielenz J.R., *Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies*, "Biotechnology Advances" 2006, no. 24, s. 452-481.

CELLULASES – PROPERTIES, APPLICATION AND PRODUCTION

Summary: Cellulases are enzymes produced mainly by microorganisms which use cellulose as a source of carbon and energy. The degradation of native cellulose is performed by a complex of synergistically acting enzymes in which both endo- and exo- β -1,4-glucanases play a key role. Cellulase preparations are obtained from fungal cultures and the fungal species *Trichoderma reesei* plays the major role in cellulase production. Cellulases find wider and wider application. In the food industry, they are used in the production of juice, wine, beer, and in the bakery industry to bake bread and cakes. They are added to animal feed to improve the digestibility of nutrients contained in it. They are also commonly used in the paper industry for bleaching and dewatering of paper. They also attract the interest of clothing manufacturers, in particular those involved in denim processing, whereas in the chemical industry they find application as an additive to washing powders.

Keywords: cellulases, biosynthesis, *Trichoderma reesei*, properties, application.