

CELULOSOMI IN CELULAZNI KONZORCIJ

Ruminococcus flavefaciens 007C¹Maša VODOVNIK²Delo je prispelo 24. novembra 2014, sprejeto 12. decembra 2014.
Received November 24, 2014; accepted December 12, 2014.*Celulosomi in celulazni konzorcij Ruminococcus flavefaciens* 007C

Ruminococcus flavefaciens sodi med najpomembnejše celulositične bakterijske vrste v vampu prežvekovalcev in debelem črevesu monogastričnih rastlinojedih sesalcev. Njena izjemna učinkovitost pri anaerobni razgradnji (hemi) celuloznih substratov je povezana s sintezo zunajceličnih multiencimskih kompleksov celulosomov. V pričujočem delu smo preučili genomski potencial za sintezo celulosomov in celulaz seva 007C, izražanje slednjih pa analizirali z encimogrami. V osnutku genoma tega seva smo identificirali v celoti ohranjeno gručo genov, ki kodirajo skafoldine, na osnovi njihove modularne zgradbe pa smo predvideli zgradbo celulosomov tega seva. Nabor genov za celulaze, ki smo jih identificirali v genomu seva 007C, obsega po en zapis za encima s katalitskima domenama GH48 in GH44 ter širok spekter domnevnih endoglukanaz iz družin GH9 in GH5. Pri večini teh encimov smo identificirali dokersinske domene, kar kaže na to, da so vezani v celulosome. Module za vezavo na celulozo smo identificirali le v kombinaciji s katalitskimi domenami GH9. Ugotovili smo tudi, da se večje endoglukanaze izražajo konstitutivno, manjše encime pa smo zaznali le v supernatantu kultur, ki so daljši čas rasle na mikrokristalinični celulozi.

Ključne besede: mikrobiologija / molekularna genetika / *Ruminococcus flavefaciens* / celulosomi / glikozid hidrolaze / anaerobna razgradnja celuloze

Ruminococcus flavefaciens 007C cellulosomes and cellulase consortium

Ruminococcus flavefaciens is among the most important cellulolytic bacterial species in rumen and gastrointestinal tract of monogastric herbivorous animals. Its efficiency in degradation of (hemi)cellulosic substrates is associated with the production of remarkably intricate extracellular multi-enzyme complexes, named cellulosomes. In the present work we investigated the cellulolytic system of 007C. The bioinformatic analysis of the draft genome sequence revealed identical organization of *sca* gene cluster as has previously been found in four other strains of *R. flavefaciens*. The cluster consists of five genes in the following order: *scaC-scaA-scaB-cttA-scaE*. The cellulases of *R. flavefaciens* 007C belong to four families of glycoside hydrolases, namely GH48, GH44, GH9 in GH5. Majority of these enzymes are putative endoglucanases, belonging to families GH5 and GH9, whereas only one gene encoding GH44 and GH48 was found. Apart from catalytic domains, most of these proteins also contain dockerins – signature sequences, which indicate their attachment to cellulosomes. On the other hand, carbohydrate-binding modules were only found coupled to GH9 catalytic domains. Zymogram analysis showed that larger endoglucanases were mostly constitutively expressed, whereas smaller enzymes were only detected in later phases of Avicel-grown cultures.

Key words: microbiology / molecular genetics / *Ruminococcus flavefaciens* / cellulosomes / glycoside hydrolases / anaerobic cellulose degradation

¹ Prispevek je del doktorske disertacije z naslovom »Celulositični sistem sevov 007C in 007S bakterije *Ruminococcus flavefaciens*«, ki jo je doc. dr. Maša Vodovnik izdelala pod mentorstvom prof. dr. Romane Marinšek Logar / This article is a part of the doctoral dissertation »Cellulolytic system of bacterium *Ruminococcus flavefaciens* strains 007C and 007S«, issued by Maša Vodovnik, supervisor Prof. Romana Marinšek Logar, Ph.D.

² Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., Odd. za zootehniko, Katedra za mikrobiologijo in mikrobnobiotehnologijo, Groblje 3, 1230 Domžale, Slovenija, e-naslov: masa.vodovnik@bf.uni-lj.si

1 UVOD

Razgradnja rastlinske biomase je ključnega pomena v kmetijstvu ter procesih recikliranja odpadne organske biomase iz agroživilskega sektorja in papirne industrije, poleg tega pa v zadnjem času predstavlja vse pomembnejšo alternativno možnost proizvodnje bioenergije, ki bi lahko delno nadomestila (po mnogih napovedih kmalu izčrpana) fosilna goriva. Iz celuloznih odpadkov je namreč mogoče z mikrobno hidrolizo polimerov in nato fermentacijo nastalih produktov pridobivati energetsko bogata topila, kot so etanol, propanol ali butanol (Lütke-Eversloh, 2011; Chandel in sod., 2012). Okolju prijazen nadomestek tekočim gorivom predstavlja tudi bioplin (metan), ki ga pridobivajo z optimizirano mikrobno razgradnjo organskih odpadkov v anaerobnih razmerah (Čater in sod., 2014). Po vizijah Evropske unije naj bi uporaba bio-goriv leta 2030 predstavljala približno 25 % vseh transportnih energentov (Jeihanipour in sod., 2010).

Med najzahtevnejše tehnološke izzive, s katerimi se sooča energetska biotehnologija, sodi optimizacija encimske hidrolize (ligno)celuloze do sladkornih monomerov, ki predstavljajo neposredni substrat za kasnejšo fermentacijo. Omejujoči dejavnik razgradnje je hidroliza celuloznih regij z visoko stopnjo urejenosti, t.i. kristaliničnih regij (Beckham in sod., 2011). Večina pristopov k optimizaciji hidrolize celuloznih substratov temelji na uporabi spoznanj, ki izvirajo iz preučevanja encimskih sistemov, ki so se med evolucijo razvili v naravi. V okoljih z nizkim redoks potencialom je učinkovita izraba substratov še posebno pomembna, zato ni presenetljivo, da so najbolj dovršene sisteme za razgradnjo celuloze našli prav pri nekaterih anaerobnih mikroorganizmih. Slednji encime, ki sodelujejo pri razgradnji rastlinskih celičnih sten povezujejo v komplekse, imenovane celulosomi, kar omogoča boljše sodelovanje med njimi (Fontes in Gilbert, 2010; Zorec in sod. 2014). Do danes najkompleksnejši znani celulosomski sistem so pred nedavnim odkrili pri vampni bakteriji *Ruminococcus flavefaciens*. Kljub temu da je bila vrsta prvotno izolirana iz vampa govedi (Stewart in sod., 1981), so bližnje sorodnike kasneje našli tudi v prebavilih konj (Julian in sod., 1999), nekaterih divjih rastlinojedih živali (Matsui in sod., 2010) in celo ljudi (Chassard in sod., 2011). Trenutno je *R. flavefaciens* edina znana vampna bakterijska vrsta, za katero so uspeli dokazati, da tvori celulosome (Brulc in sod., 2011).

Največ informacij o celulosomih *R. flavefaciens* izhaja iz molekularnih in biokemijskih študij seva 17, ki so jim sledile primerjalne analize nukleotidnih zaporedij seva FD-1. Te so pokazale, da je ogrodje celulosomov pri omenjenih sevih sestavljeno iz večjega števila

strukturnih proteinov, ki jih kodira gruča genov *sca*, ta pa je v različni meri ohranjena pri vsaj še štirih drugih sevih vrste *R. flavefaciens* (Jindou in sod., 2008). Pri obeh bolje preučeni sevih so ugotovili, da imata ključno vlogo pri vezavi encimskih podenot v komplekse dva velika glikozilirana skafoldina, ScaA in ScaB, ki se med seboj razlikujeta po številu vezavnih mest za encime (kohezinov). Pri obeh sevih se na kohezine ScaA poleg encimov lahko veže tudi najmanjši skafoldin, ScaC, ki deluje kot vmesnik in lahko spremeni nabor encimov, vezanih v kompleks. Poleg tega so pri obeh sevih identificirali še t.i. sidrni skafoldin, ScaE. Ta ima le en koheziv, s katerim kovalentno veže C-končni del skafoldina ScaB, preko njega pa celoten celulosom na površino celice (Rincon in sod., 2001; Rincon in sod., 2004; Rincon in sod., 2005). Pri nobenem od skafoldinov *R. flavefaciens* 17 in FD-1 niso odkrili strukturnih značilnosti že poznanih modulov za vezavo na celulozo (CBM), kar kaže na drugačen mehanizem pritrdjanja na substrat, kot ga imajo opisani celulosomi klostridijev. Predpostavljajo, da pri tem sodeluje več dejavnikov, med drugim tudi protein CttA in pili tipa IV (Vodovnik in sod. 2013)..

Korak naprej v razkrivanju (hemi)celulolitičnega sistema *R. flavefaciens* je bila nedavna analiza genoma seva FD-1. Ta je razkrila več kot 200 zapisov za proteine z ohranjenimi dokerinskimi domenami (Dok), od katerih je približno polovica vsebovala še CBM in/ali katalitske domene, pri polovici pa niso odkrili nobenega drugega ohranjenega molekularnega podpisa, iz katerega bi lahko sklepali na njihovo funkcijo. Poleg celulosomskih encimov so našli tudi zapise za nekatere proste glikozid hidrolaze (GH), polisaharid liaze in ogljikohidrat esteraze, ki najverjetneje prav tako sodelujejo pri razgradnji rastlinskih celičnih sten (Rincon in sod., 2010).

Kljub precejšnjemu naboru informacij, ki razkrivajo zgradbo celulosomov *R. flavefaciens* ter velik potencial za sintezo (hemi)celulaz pri omenjenih sevih, nekatera vprašanja o funkcionalnih vidikih razgradnje različnih celuloznih substratov ostajajo odprta, čemur med drugim botrujejo neuspehi pri poskusih genske manipulacije teh mikroorganizmov (Flint in sod., 2008). Eno takšnih vprašanj se nanaša na posebnosti mehanizma razgradnje bombažnih vlaken – oblike celuloze z visoko stopnjo polimerizacije in velikim deležem kristaliničnih regij, ki jo lahko razgrajujejo le redki anaerobni sevi. Med slednjimi je tudi sev 007C, katerega potencial za sintezo celulaz in celulosomov smo preučili v pričujočem delu. Da bi ugotovili, kolikšen delež celuloznih genov se (v različnih pogojih) tudi izraža, smo v drugem delu z encimogrami analizirali še proteinske frakcije.

2 MATERIALI IN METODE

2.1 GOJENJE SEVA

Sev smo gojili v anaerobnih razmerah z Bryantovo modifikacijo Hungatove tehnike (Bryant, 1972). Kulture smo precepili v gojili pod zaščitnim plinom (100 % CO₂), iz katerega smo sledove kisika odstranili tako, da smo ga vodili preko kolone z bakrovimi opilki, segretimi na 350 °C. Shranjevali smo ga na vbojnih M2GSC pri -20 °C in jih pred vsakim poskusom najprej prenesli v tekoča gojišča M2GSC (Hobson, 1969). V njem smo jih namnožili do OD₆₅₄ 0,8 ± 0,1 in nato precepili v gojišče po Hungate-u in Stack-u (Bryant in Robinson, 1961; Hungate in Stack, 1982), obogatim z 5 % (v/v) vampnim sokom (OHS) ter dodanimi posameznimi viri ogljika. Vse kulture smo inkubirali pri 37 °C.

2.2 IDENTIFIKACIJA CELULAZ IN SKAFOLDINOV V GENOMU *R. FLAVEFACIENS* 007C

Genom *R. flavefaciens* seva 007C je bil sekvenciran na inštitutu Sanger (Wellcome Trust) s 55x pokritostjo. 39 genomskih odsekov je dostopnih na lokalnem omrežju inštituta: <ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/pathogens/Ruminococcus/flavefaciens/007c/Rflav007c.091211.seq>.

Nukleotidna zaporedja smo prenesli v program Bioedit in ustvarili lokalno podatkovno bazo, v kateri smo nato iskali gene za celulaze in skafoldine. Gensko gručo *sca* smo poiskali tako, da smo s programom tBlastn znotraj genoma 007C iskali zaporedja z zapisi za proteine, homologne skafoldinom sevov 17 in FD-1 (ki smo jih pridobili iz baze NCBI Protein Database) in analizirali njihovo okolico s kombinacijo programov ORF Finder in Blast.

Pred začetkom iskanja celulaz smo v podatkovni bazi CAZy (Carbohydrate-Active enZyme database) najprej preverili, v katere družine GH se uvrščajo encimi, ki razgrajujejo celulozo pri različnih vrstah rodu *Ruminococcus*. Nato smo AK zaporedja vseh celulaz, ki so bila dostopna v bazah NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>) in CAZy (<http://www.cazy.org/>), uporabili za iskanje podobnih zaporedij znotraj lokalne baze z odseki genomskega zaporedja seva 007C. Pri tem smo uporabili programa tBlastn BioEdit (Hall in sod., 2011) in ORF Finder (NCBI). Prevedena zaporedja odprtih bralnih okvirjev smo nato analizirali z orodji BlastP, Conserved domains (NCBI) in Interproscan 5β2 (z izbranimi opcijami HMMPfam, BlastProDom, HMMSMART, HMMPIR, Superfamily, SignalPHMM/NN, TMHMM, pattern Scan (Prosite), HMMPanther, HMMSMART). Področje cepitve signalnih peptidov smo ugotovili s programom SignalP (Petersen in sod., 2011). Molekulske mase (Mw) in izoelektrične točke

(pI) domnevnih proteinov smo izračunali s programom Compute pI/Mw (ExPASy).

2.3 PRIPRAVA PROTEINSKIH FRAKCIJ ZA ENCI-MOGRAME

Za ločitev frakcij na celične stene vezanih proteinov (pCs) in proteinov supernatanta (pSup) smo uporabili prilagojeni postopek, ki so ga opisali Ding in sodelavci (2001). Sev smo gojili v 600 ml modificiranih gojišč OHS_AVI (1 % Avicel), OHS_KSIL (0,4 % ksilan) in OHS_CB (0,4 % celobioza). Za analizo izražanja endoglukanaz (karboksimetil celulaz, CMC-az) v odvisnosti od faze rasti na mikrokristalinični celulozi smo seva gojili 1, 3, 5, 7, 9 in 12 dni. Za primerjavo izražanja v odvisnosti od substrata pa smo izbrali po tri časovne točke za vsak substrat, kjer so bile kulture v primerljivih fazah rasti (OHS_CB: 14, 24, 48 h; OHS_KSIL: 26, 42, 54 h; OHS_AVI: 7, 9, 12 dni). V vsaki od časovnih točk smo kulture dobro premešali, razdelili v 200 ml centrifugirke in 15 minut centrifugirali pri 9000 x g in 4 °C. Supernatant smo nato 50x skoncentrirali z ultrafiltracijo (v koncentradorjih Amicon, Millipore), mu dodali po 5 µl/ml mešanice proteaznih inhibitorjev (P2714, Sigma) ter ga takoj zamrznili (frakcija pSup). Pred uporabo smo vzorcem v razmerju 1:1 dodali 2x nanašalni pufer s sestavo: 12,5 % (v/v) 0,5 M TrisHCl, pH = 6,8, 20 g/l NaDS, 10 % (v/v) glicerol, 5 % (v/v) 2-merkaptetanol, 0,0625 g/l bromfenol modro. Sedimente smo najprej sprali s po 40 ml NaFP, ter jih nato resuspendirali v enaki količini pufera, ki smo mu dodali 2 mM DTT. Pred uporabo smo jih dvakrat zamrznili (pri -20 °C) in odmrznili. Alikvote (po 1 ml) smo ponovno centrifugirali pri 16000 x g in sediment resuspendirali v 250 µl 2x nanašalnega pufera (frakcija pCs). Vzorce, pomešane z nanašalnim pufrom, smo denaturirali pri 65 °C 20 min, čemur je sledilo 5 min segrevanja pri 85 °C. Sočasno smo 5 min pri 100 °C segrevali tudi proteinski standard, pri katerem je proizvajalec navedel, da je to potrebno (NaDS 6H2, Sigma).

2.4 PRIPRAVA ENCI-MOGRAMOV IN ZAZNAVANJE ENDOGLUKANAZNE AKTIVNOSTI LOČENIH PROTEINOV

Dvofazne poliakrilamidne gele (z 8 % zamežjenostjo v ločevalnem delu) smo pripravili po standardnem postopku (Laemmli, 1970). Za dokazovanje endoglukanazne aktivnosti smo vanje vključili še 0,2 % (w/v) CMC. Po 25 µl proteinskih frakcij v nanašalnem pufru (v razmerju 1:1) smo nanесли na gele in jih ločili z elektroforezo pri 40 mA, dokler fronta ni dosegla fazne meje med geloma, nato pa pri 220 V do konca. Ločene encime smo po končani

elektroforezi renaturirali in razvili encimogramevpo postopku, kot so ga opisali v Saul in sodelavci (1990).

3 REZULTATI

3.1 IDENTIFIKACIJA IN BIOINFORMACIJSKA ANALIZA GRUČE GENOV *sca*

V genomu *R. flavefaciens* smo identificirali gručo genov, ki kodirajo celulosomske ogrodne proteine (skafoldine). Izkazalo se je, da je gruča genov *sca* sestavljena iz petih genov, ki si sledijo v naslednjem vrstnem redu: *scaC-scaA-scaB-cttA-scaE*. Analiza AK zaporedij prevedenih genov *sca* je pokazala različne stopnje podobnosti s homologji iz sorodnih sevov, pri čemer je bila ta največja s proteini seva 17 (od 99–100 %) in najmanjša s skafoldini seva FD-1 (od 58–77 %) (pregl. 1). Podobnost se je odražala tudi v modularni zgradbi proteinov. Na N-koncu prevedenega zapisa za ScaC smo tako identificirali kohezini, na C-koncu pa dokerin tipa III. V zapisu za skafoldin ScaA smo identificirali tri kohezine tipa III (ki pri sevu 17 vežejo dokerine nekaterih hidrolitičnih encimov ali skafoldin ScaC). V dostopnem osnutku genoma je nukleotidno zaporedje gena, ki kodira skafoldin ScaB razdeljeno med dva odseka, med katerima manjka del povezovalne regije, kar je onemogočilo neposredno analizo dela zaporedja. V dostopnem delu (2834 bp) smo identificirali 4 enake kohezine tipa III. Podobnost dostopnega dela AK zaporedja ScaB s homolo-

gom seva 17 pa je bila 99,1 %. Znotraj prevedenega zaporedja *cttA* smo identificirali dva enaka CBM in N-končni tandem X-Dok (ohranjena domena neznane funkcije, ki ji sledi dokerin tipa II). Aminokislinsko zaporedje proteina CttA kaže 99,1 % podobnost s homologom seva 17 in le 71,9 % podobnost s homologom seva FD-1. V zaporedju prevedenega gena *scaE* smo identificirali kohezini tipa II in N-končni motiv LPXTG, ki ga prepoznava sortaza. Tudi pri tem proteinu smo ugotovili največjo podobnost s homologom seva 17 (99,1 %), najmanjšo pa s homologom seva FD-1 (71,9 %) (pregl. 1).

3.2 ZAPISI ZA CELULAZE V GENOMU SEVA 007C

Katalitske domene encimov, ki katalizirajo hidrolizo β -1,4 vezi v molekulah celuloze, se pri *R. flavefaciens* uvrščajo v družine GH 5, 9, 44 in 48. V genomu seva *R. flavefaciens* 007C smo identificirali 8 zapisov za GH 5, 16 zapisov za GH 9 ter po 1 zapis za GH44 in GH48 (pregl. 2). Izračunane molekule mase (Mw(i)) produktov teh genov so med od 36617 in 121269 Da, izoelektrične točke (pI(i)) pa med 4,36 in 5,15.

Vsi produkti genov s katalitskimi domenami GH5 imajo Mw(i) manjše od 86 kDa, ter vsebujejo molekularne podpise BglC, značilne za endoglukanaze. Poleg tega smo v zaporedju *cel5_3* identificirali še motiv Bgl_B, ki je značilen za β -glukozidaze in β -galaktozidaze. Štirje encimi s katalitsko domeno GH5 imajo na C-koncu še Dok-

Preglednica 1: Genska gruča *sca* v genomu seva *R. flavefaciens* 007C in enakost (podobnost) aminokislinskih zaporedij genskih produktov s homologji iz sorodnih sevov (navedeni v oklepaju)

Table 1: *R. flavefaciens* 007C *sca* gene cluster with identity (similarity) of putative gene products to homologues from different strains

| Odprt bralni okvir | Genomski odsek | Koordinate znotraj genomskih odsekov | | Genski produkt | Dostopne kode homolognih proteinov iz sorodnih sevov | E-vrednost | Enakost (podobnost) AK zaporedij |
|--------------------------|-------------------|---|--------|--|---|------------|--|
| <i>scaC</i> | 00019 | 4779 | 5627 | celulosomski skafoldin (ScaC) | CAE51046.2 (17) | 3e-157 | 100,0 % (100 %) |
| | | | | | CAQ16964.1 (JM1) | 3e-116 | 75,5 % (90,5 %) |
| | | | | | CAO00728.1 (C94) | 5e-102 | 65,4 % (87,9 %) |
| | | | | | ZP_06144572.1 (FD-1) | 4e-86 | 52,0 % (77,2 %) |
| <i>scaA</i> | 00019 | 2039 | 4681 | celulosomski skafoldin (ScaA) | CAC34384.3 (17) | 0,0 | 98,6 % (99,2 %) |
| | | | | | CAO00729.1 (C94) | 2e-147 | 45,8 % (72,1 %) |
| | | | | | ZP_06144573.1 (FD-1) | 1e-74 | 30,7 % (58,3 %) |
| <i>scaB</i> | 00019 | 1 | 2007 | celulosomski | CAC34385.1 (17) | 0,0 | 98,9 % (99,1 %) |
| | 00018 | 115883 | 116710 | skafoldin (ScaB) | CAO00730.1 (C94) | 0,0 | 57,2 % (82,4 %) |
| | | | | | ZP_06144574.1 (FD-1) | 2e-102 | 43,4 % (74,7 %) |
| <i>cttA</i> | 00018 | 113280 | 115496 | protein za vezavo na celulozo (CttA) | CAH18995.2 (17) | 0,0 | 98,3 % (99,1 %) |
| | | | | | CAO00731.1 (C94) | 0,0 | 51,8 % (80,2 %) |
| | | | | | ZP_06144575.1 (FD-1) | 2e-177 | 44,2 % (71,9 %) |
| <i>scaE</i> | 00018 | 112270 | 112976 | celulosomski pritrditveni skafoldin (ScaE) | CAH18996.1 (17) | 1e-87 | 98,7 % (99,1 %) |
| | | | | | CAO00732.1 (C94) | 7e-43 | 61,2 % (82,4 %) |
| | | | | | ZP_06144576.1 (FD-1) | 1e-27 | 49,4 % (70,3 %) |

Preglednica 2: Celulaze v genomu seva *R. flavefaciens* 007C. Mw(i): izračunana Mw, pI(i): izračunana pI. SP: signalni peptid, GHx: katalitska domena glikozid hidrolaze, ki se uvršča v družino x, Dok-1: dokerinska domena tipa I, CBM_x: modul za vezavo na celulozo, ki se uvršča v družino x, CelD_N: N-končna imunoglobulinski podobna domena, značilna za celulaze, PLN00119: domena, značilna za endoglukanaze; Bgl_C: zaporedje, značilno za endoglukanaze; Bgl_B: zaporedje, značilno za β -glukozidaze, β -galaktozidaze in 6-fosfo- β -glukozidaze. TonB_box: ohranjeno zaporedje, ki je značilno za receptorje, povezane s proteinom TonB

Table 2: Cellulases identified in *R. flavefaciens* 007C genome. Mw(i): calculated Mw, pI(i): calculated pI. SP: signal peptide, GHx: glycoside hydrolase catalytic domain from family x, Dok-1: dockerin type I domain, CBM_x: cellulose binding module from family x, CelD_N: N-terminal immunoglobulin-like domain (signature sequence found in cellulases), PLN00119: signature sequence found in endoglucanases; Bgl_C: signature sequence found in endoglucanases; Bgl_B: signature sequence found in β -glucosidases, β -galaktosidases and 6-fosfo- β -glukosidases. TonB_box: conserved motif, found in TonB-associated receptors

| Odprt bralni okvir | Družina GH in pripisana funkcija genskega produkta | Mw(i) (Da) | pI(i) | Ohranjeni molekularni podpisi (domene, motivi) | Dostopne kode (domnevnih) proteinov z najbolj podobnimi AK zaporedji | Enakost (podobnost) AK zaporedij |
|----------------------------------|--|---------------|-------|--|--|---|
| <i>cel5_1</i> | GH5, endo- 1,4 β -glukanaza | 36617 | 4,94 | SP, GH5[pfam00150] BglC[COG2730] | ZP_06142079.1 ACA61162.1 YP_004104924.1 | 65 % (78 %) 56 % (71 %) 49 % (64 %) |
| <i>cel5_2</i> | GH5, endo- 1,4 β -glukanaza | 49241 | 4,48 | SP, GH5[pfam00150] BglC[COG2730], Dok-1 | ZP_06143373.1 YP_003844565.1 CBK96759.1 | 67 % (81 %) 47 % (64 %) 53 % (70 %) |
| <i>cel5_3</i> | GH5, endo- 1,4- β -glukanaza | 49926 | 4,93 | GH5[pfam00150], BglB[COG2723], BglC[COG2730] | ADX05698.1 YP_003842446.1 YP_003769498.1 | 75 % (85 %) 48 % (64 %) 49 % (64 %) |
| <i>cel5_4</i> | GH5, endo- 1,4 β -glukanaza | 62539 | 4,59 | SP, GH5[pfam00150], BglC[COG2730] | ZP_06145410.1 AAT48117.1 YP_004104209.1 | 75 % (79 %) 85 % (86 %) 58 % (63 %) |
| <i>cel5_5</i> | GH5, endo- 1,4 β -glukanaza | 70150 | 4,77 | SP, GH5 [pfam00150], BglC[COG2730], Dok-1 | ZP_06145411.1 ZP_07327095.1 YP_001039263.1 | 59 % (63 %) 62 % (65 %) 65 % (69 %) |
| <i>cel5_6</i> | GH5, endo- 1,4 β -glukanaza | 76748 | 4,66 | SP, GH5[pfam00150], BglC[COG2730] | ZP_06143262.1 YP_004105745.1 YP_004309759.1 | 52 % (69 %) 46 % (64 %) 43 % (64 %) |
| <i>endA</i> | GH5, endo- 1,4 β -glukanaza | 80375 | 4,52 | SP, GH5 [pfam00150], BglC[COG2730], Dok-1 | CAB05881.1 ZP_06144331.1 ZP_06142925.1 | 94 % (96 %) 56 % (62 %) 55 % (63 %) |
| <i>cel44A</i> (<i>endB</i>) | GH44, endo- 1,4 β -glukanaza | 84550 | 4,56 | SP, GH44, Dok-1 | CAC83072.1 ZP_06143384.1 AAA95959.1 | 99 % (99 %) 84 % (84 %) 76 % (84 %) |
| <i>cel5_7</i> | GH5, endoglukanaza | 85013 | 5,15 | SP, GH5 [pfam00150], BglC[COG2730], Dok-1 | ZP_06141962.1 ADD61809.1 ZP_04745187.2 | 54 % (69 %) 52 % (73 %) 52 % (73 %) |
| <i>cel9_1</i> | GH9, endo- 1,4 β -glukanaza | 85053 | 4,63 | SP, GH9 [pfam00759], PLN00119[PLN00119], CBM_3a[pfam00942] | ZP_06144437.1 CBL16391.1 CAP78918.2 | 74 % (86 %) 48 % (61 %) 51 % (67 %) |
| <i>cel9_2</i> | GH9, endo- 1,4 β -glukanaza | 85138 | 4,84 | SP, GH9 [pfam00759], PLN00119[PLN00119], CBM_3a[pfam00942], Dok-1 | ZP_06144448.1 CBL18389.1 ZP_07329007.1 | 64 % (75 %) 51 % (65 %) 47 % (62 %) |
| <i>cel9_3</i> | GH9, endo- 1,4 β -glukanaza | 87559 | 4,74 | SP, GH9[pfam00759], PLN02613[PLN02613], CBM_3a[pfam00942], Dok-1 | ZP_06142678.1 YP_004105562.1 ZP_08160908.1 | 69 % (82 %) 62 % (74 %) 64 % (76 %) |

Nadaljevanje na naslednji strani / Continued overleaf

| | | | | | | |
|------------------------------------|--|--------|------|--|---|---|
| <i>cel9_4</i> | GH9, endo-1,4 β -glukanaza | 87629 | 4,63 | SP, GH9[pfam00759], PLN00119[PLN00119] | ZP_08159634.1 YP_004104704.1 ZP_07837901.1 | 58 % (64 %) 57 % (62 %) 46 % (61 %) |
| <i>cel9_5</i> | GH9, endo-1,4 β -glukanaza | 87882 | 4,68 | SP, GH9[pfam00759], PLN00119[PLN00119], CBM_3a[pfam00942] | ZP_06144437.1 CBL16391.1 YP_001036864.1 | 74 % (86 %) 48 % (61 %) 51 % (67 %) |
| <i>cel9_6</i> | GH9, endo-1,4 β -glukanaza | 88900 | 4,63 | SP, CBM_4_9[pfam02018], GH9[pfam00759], CelD_N[pfam02927], Dok-1 | ZP_06141671.1 CBL16782.1 ZP_07837973.1 | 72 % (82 %) 62 % (75 %) 52 % (68 %) |
| <i>cel9_7</i> | GH9, endo-1,4 β -glukanaza | 91719 | 4,86 | SP, GH9[pfam00759], PLN00119[PLN00119], Dok-1 | ZP_06142866.1 CBL17554.1 ZP_06143411.1 | 51 % (63 %) 50 % (64 %) 45 % (60 %) |
| <i>cel48</i> (<i>cel48A</i>) | GH48, ekso-1,4 β -glukanaza | 91995 | 4,73 | SP, TonB_box [PS00430] GH48[pfam02011], Dok-1 | ZP_06145360.1 CBL17316.1 ZP_08158497.1 | 67 % (78 %) 49 % (63 %) 41 % (56 %) |
| <i>cel9_8</i> | GH9, endo-1,4 β -glukanaza | 92177 | 4,46 | SP, GH9[pfam00759], PLN00119[PLN00119], CBM_3a[pfam00942], Dok-1 | ZP_06142593.1 BAB64431.1 YP_004104243.1 | 73 % (82 %) 72 % (80 %) 72 % (80 %) |
| <i>cel9_9</i> | GH9, endo-1,4 β -glukanaza | 94917 | 4,64 | SP, GH9[pfam00759], CelD_N[pfam02927], PLN00119[PLN00119], CBM_4_9[pfam02018] | ZP_06141900.1 YP_004104210.1 ZP_08159524.1 | 71 % (82 %) 64 % (77 %) 64 % (78 %) |
| <i>cel9_10</i> | GH9, endo-1,4 β -glukanaza | 97381 | 4,59 | SP, GH9[pfam00759], PLN00119[PLN00119], CBM_3a[pfam00942], Dok-1 | ZP_06142598.1 ZP_08159963.1 YP_004104517.1 | 74 % (83 %) 46 % (60 %) 46 % (60 %) |
| <i>cel9_11</i> | GH9, endo-1,4 β -glukanaza | 106291 | 4,68 | SP, GH9[pfam00759], CelD_N[pfam02927], Dok-1 | YP_004103692.1 YP_004105561.1 ZP_08160859.1 | 43 % (58 %) 42 % (57 %) 42 % (57 %) |
| <i>cel9_12</i> (<i>cel9B</i>) | GH9, endo-1,4 β -glukanaza | 108900 | 4,87 | SP, GH9[pfam00759], CelD_N[pfam02927], CBM_4_9[pfam02018], Dok-1 | YP_004105561.1 ZP_08160859.1 ZP_06142679.1 | 55 % (65 %) 51 % (64 %) 54 % (59 %) |
| <i>cel9_13</i> | GH9, endo-1,4 β -glukanaza | 108032 | 4,62 | SP, GH9[pfam00759], CelD_N[pfam02927] | ZP_08160859.1 AAR01216.1 YP_004105561.1 | 42 % (58 %) 43 % (58 %) 42 % (57 %) |
| <i>cel9_16</i> | GH9, endo-1,4 β -glukanaza; GH16, 1,3-1,4- β -glukanaza | 121269 | 4,36 | SP, GH9[pfam00759], PLN00119[PLN00119], GH16[cd02175] | ZP_06142866.1 CBL17554.1 ZP_06141843.1 | 73 % (82 %) 53 % (67 %) 74 % (83 %) |

1, pri nobenem pa nismo odkrili ohranjene regije CBM. Med geni, ki kodirajo GH5 smo identificirali tudi homolog gena *endA* seva *R. flavefaciens* 17. Podobnost med AK zaporedjem encima EndA in prevedenim zaporedjem homologa seva 007C je 99 %.

Izračunane molekulske mase produktov s katalitskimi domenami GH9 so večje od 85 kDa. Pri večini od njih (9 od 14) smo na C-koncu identificirali Dok-1. Poleg tega smo v zaporedjih šestih genov identificirali tudi ohranjena zaporedja za CBM_3a, pri treh pa CBM_4_9. Pri

vseh smo zaznali tudi motive, značilne za endoglukanaze PLN00119, PLN02613, PLN2927, CelD_N. Pri največji od celuloz seva 007C smo poleg katalitske domene GH9 in ohranjenega motiva, značilnega za endoglukanaze, identificirali še drugo katalitsko domeno (GH16), značilno za encime z 1,3-1,4- β -glukanazno funkcijo.

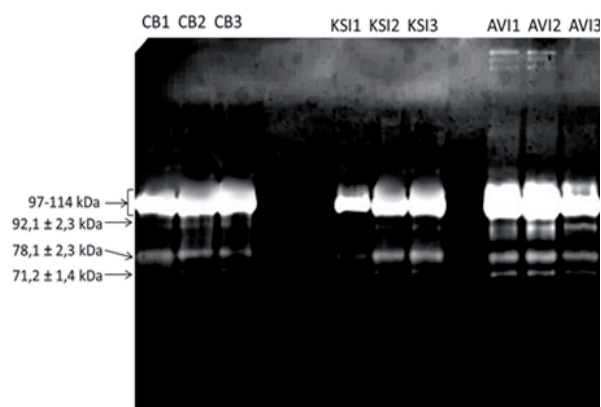
Poleg zapisov za encime s katalitskimi domenami GH5 in GH9 smo identificirali tudi en zapis za encim s katalitsko domeno GH44 in Dok-1 (homolog endoglukanaze *Cel44A* *R. flavefaciens* 17). Identificirali smo tudi en

zapis za encim s katalitsko domeno GH48 in Dok-1 (*cel48*) in motivom, ki je značilen za receptorje, povezane s proteinom TonB (TonB_box). Pri vseh celulaznih genih, z izjemo *cel5_3*, smo zaznali tudi signalna zaporedja.

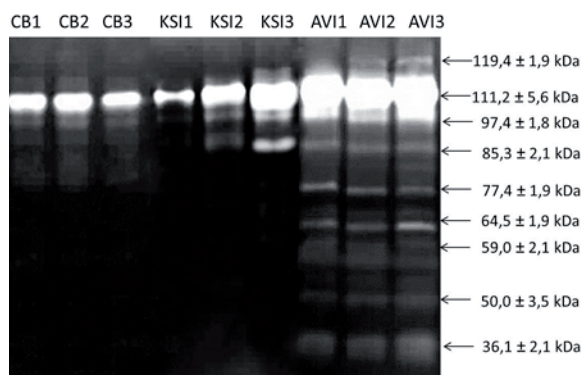
3.3 IZRAŽANJE ENDOGLUKANAZ V ODVISNOSTI OD SUBSTRATA

Za analizo izražanja endoglukanaz v odvisnosti od substrata, smo seva gojili v gojiščih z Avicelom, celobiozo ali ksilanom kot edinim virom ogljika ter analizirali CMC-azne profile kultur v primerljivih fazah rasti (Vodovnik, 2012).

V frakciji pCs smo neodvisno od substrata in časa inkubacije najmočnejšo CMC-azno aktivnost zaznali v območju proteinov z navideznimi Mw med 97 in 114 kDa (znotraj tega je program ob manjši količini nanešenih proteinov zaznal tri slabo ločene vrhove aktivnosti, ki bi po Mw lahko ustrezali produktom *cel9_10*, *cel9_11*, *cel9_12*, *cel9_13*). Neodvisno od substrata se je izražala tudi endoglukanaza z navidezno Mw $78,1 \pm 2,3$ kDa, aktivnost dveh drugih encimov z navideznima Mw $71,2 \pm 1,4$ kDa in $92,1 \pm 2,3$ kDa pa je bila nekoliko močnejše izražena v vzorcih kultur, ki so rasle v gojiščih z Avicelom. Po Mw sodeč bi lahko šlo za produkta genov *cel5_5* in *cel9_8*. Aktivnost v območju med 250 in 300 kDa (kar ne ustreza navidezni Mw nobenega produkta predvidenih celulaznih genov,



Slika 1: Primer encimograma, ki prikazuje izražanje na celice vezanih endoglukanaz (frakcija pCs) *R. flavefaciens* 007C v odvisnosti od vira ogljika v gojišču. Proge CB 1, 2, 3: vzorci kultur, ki so 14, 24 in 48 h rasle v gojišču s celobiozo; KSI 1, 2, 3: vzorci kultur, ki so 26, 42 in 54 h rasle v gojišču s ksilanom; AVI 1, 2, 3 vzorci kultur, 7, 9 in 12 dni rasle v gojišču z Avicelom
Figure 1: Zymogram showing substrate-related expression patterns of cell-bound endoglucanases (fraction pCs) *R. flavefaciens* 007C. Lines CB 1, 2, 3: cultures grown on cellobiose for 14, 24 and 48 hours; KSI 1, 2, 3: cultures grown on xylan for 26, 42 and 54 hours; AVI 1, 2, 3: cultures grown on Avicel for 7, 9 and 12 days



Slika 2: Primer encimograma, ki prikazuje izražanje endoglukanaz v supernatantu *R. flavefaciens* 007C (pSup) v odvisnosti od razpoložljivega vira ogljika v gojišču. Proge CB 1, 2, 3: vzorci kultur, ki so 14, 24 in 48 h rasle v gojišču s celobiozo; KSI 1, 2, 3: vzorci kultur, ki so 26, 42 in 54 h rasle v gojišču s ksilanom; AVI 1, 2, 3 vzorci kultur, 7, 9 in 12 dni rasle v gojišču z Avicelom
Figure 2: Zymogram showing substrate-related expression patterns of endoglucanases found in supernatant of *R. flavefaciens* 007C (fraction pSup). Lines CB 1, 2, 3: cultures grown on cellobiose for 14, 24 and 48 hours; KSI 1, 2, 3: cultures grown on xylan for 26, 42 and 54 hours; AVI 1, 2, 3: cultures grown on Avicel for 7, 9 and 12 days

zato sklepamo, da gre verjetno za ostanke protenskih kompleksov) smo zaznali le pri vzorcih kultur, ki so rasle v gojiščih, kjer je vir ogljika predstavljal Avicel (slika 1).

Večja raznolikost izražanja endoglukanaz v odvisnosti od vira ogljika se je pokazala pri analizi supernatanta *R. flavefaciens* 007C, iz katere je bilo razvidno, da Avicel inducira izražanje najširšega spektra celulaz z navideznimi molekulskimi masami od 36 do 120 kDa. Te ustrezajo Mw(i) produktov genov, ki kodirajo tako encime s katalitskimi domenami GH5 (*cel5_1*, *cel5_2*, *cel5_3*, *cel5_4*, *cel5_5* in *cel5_7*), kot GH9 (*cel9_1*, *cel9_2*, *cel9_10*, *cel9_11*, *cel9_12*, *cel9_13* in *cel9_16* (slika 2). Medtem ko smo encime z navideznimi Mw večjimi od 80 kDa zaznali že v prvih treh dneh inkubacije, je aktivnost manjših encimov prag detekcije dosegla šele po 7 dneh rasti na Avicelu (rezultati niso prikazani). V supernatantih kultur, ki so kot vir ogljika uporabljale celobiozo ali ksilan, smo ne glede na čas inkubacije, ponovljivo zaznali le prisotnost ene močnejše in dveh šibkih lis, ki nakazujejo celulazno aktivnost encimov z navideznimi Mw med 85 in 115 kDa (kar ustreza Mw(i) produktov genov *cel9_1*, *cel9_2*, *cel9_10*, *cel9_11*, *cel9_12* oz. *cel9_13*).

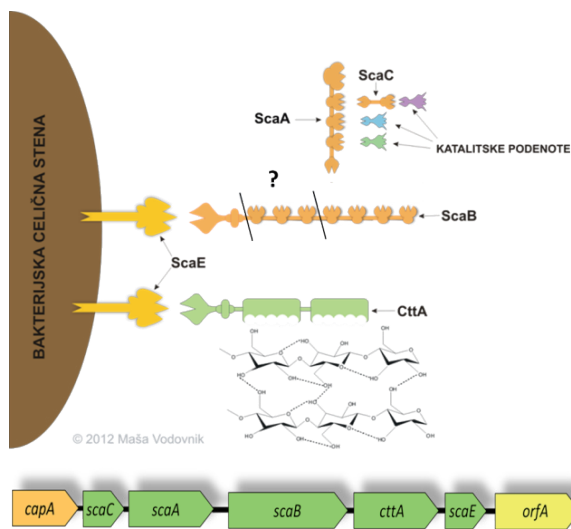
4 DISKUSIJA

Dosedanje študije so pokazale, da imajo različni sevi vrste *R. flavefaciens* kljub ohranjeni osnovni zgradbi najverjetneje precej raznoliko sestavljene celulosome.

Slednje je razvidno tako iz razlik v številu zapisov za skafoldine in njihovi modularni zgradbi kot tudi iz nabora razpoložljivih encimov, ki se nanje lahko vežejo. Informacije o specifičnosti zgradbe celulosomskih sistemov posameznih sevov v povezavi z informacijami o njihovem delovanju bi lahko omogočile razkritje nekaterih funkcionalnih vidikov razgradnje celuloze (Jindou in sod., 2008; Berg Miller in sod., 2009).

V opisani raziskavi smo v genomu seva 007C poiskali zapise za sintezo celulosomskih ogrodnih proteinov (skafoldinov) in celulaz ter analizirali modularno zgradbo njihovih produktov in podobnost s proteini iz sorodnih sevov in vrst. Analiza osnutka genoma je pokazala, da ima *R. flavefaciens* 007C enako ureditev gruče genov *sca*, kot so jo do sedaj potrdili še pri štirih drugih sevih te vrste: 17, FD-1, C94 in JM1 (Jindou in sod., 2008). Gruča je v celoti ohranjena in jo v zapisanem zaporedju sestavljajo geni *scaC-scaA-scaB-cttA-scaE*, katerih produkti so po aminokislinskih zaporedjih skoraj identični skafoldinom seva 17 (podobnost je v vseh primerih večja od 99 %) (pregl. 1). Ker se v slednjih zrcali tudi modularna zgradba proteinov, od katere je odvisno sestavljanje celulosomov, smo na osnovi teh podatkov lahko predvideli zgradbo celulosomov, kot jo prikazuje slika 3. Pri tem smo predpostavili, da v manjkajočem delu zaporedja gena *scaB* ni večjih razlik, ki bi vplivale na modularno zgradbo tega skafoldina.

Nabor genov za celulaze, ki smo jih identificirali v osnutku genoma seva 007C, obsega po en zapis za encima s katalitskima domenama GH48 in GH44 ter širok spekter domnevnih endoglukanaz iz družin GH9 (14 zapisov) in GH5 (8 zapisov) (pregl. 2). Za vse encime, ki spadajo v prvo od obeh družin, je značilna katalitska domena s 3D strukturo sodčka (α/α)₆ ter invertni mehanizem hidrolize, medtem ko v družino 5 spadajo encimi s strukturo sodčka (β/α)₈ in ohranitvenim mehanizmom delovanja (Begu in Lamaire, 1996). Ohranjenost strukturnih značilnosti in mehanizma delovanja encimov znotraj posamezne družine GH kaže na evolucijsko povezanost med njimi, zato lahko domnevamo, da sta se široka spektra encimov s katalitskimi domenami, ki spadajo v družini 5 in 9 verjetno razvila s podvajanjem in kopičenjem mutacij v dveh izvornih genih. Pri tem so nastali encimi, ki se le malo razlikujejo v specifičnosti in kinetičnih lastnostih in za *R. flavefaciens* očitno predstavljajo evolucijsko prednost, saj se v nasprotnem primeru dolgoročno ne bi ohranili v genomu. Pomembno vlogo raznolikega spektra GH5 in GH9 za preživetje širše skupine celulosomskih predstavnikov reda *Clostridiales* potrjuje tudi dejstvo, da zapisi za te encime številčno prevladujejo tudi v genomu *C. thermocellum* (Flint in sod., 2008; Berg Miller in sod., 2009). Pri večini celulaz *R. flavefaciens* 007C smo poleg katalitskih domen identificirali tudi dokerinske, kar



Slika 3: genska gruča, ki kodira skafoldine in model celulosoma *R. flavefaciens* 007C, kot smo ga predvideli na osnovi njihove modularne zgradbe ter podobnosti s sevom 17

Figure 3: *Sca* gene cluster and *R. flavefaciens* 007C cellulosome model as predicted from modular architecture of scaffoldins and comparison with strain 17

kaže, da so encimi povezani v celulosome. Po drugi strani smo module za vezavo na substrat zaznali izključno v kombinaciji s katalitskimi domenami GH9. Podobno kot pri sevu FD-1, tudi pri encimih seva 007C številčno prevladujejo moduli za vezavo na kristalinično celulozo (CBM_3a), čeprav smo pri nekaterih našli tudi takšne, ki se vežejo le na amorfne oblike tega substrata (CBM_4_9). Pri petih endoglukanazah smo poleg katalitske domene zaznali tako Dok-1 kot CBM, kar nakazuje potencialno vlogo teh encimov pri pritrjanju celulosomov na substrat. Multimodularnost, ki je značilna za celulaze seva *R. flavefaciens* 007C, kaže, da so v njihovem evolucijskem razvoju (poleg podvajanja genov in točkovnih mutacij) pomembno vlogo odigrali tudi dogodki, kot sta premeščanje domen in združevanje genov (Flint in sod., 2008; Berg Miller in sod., 2009; Fontes in Gilbert 2010).

Da se širok nabor zapisov za endoglukanaze, ki jih najdemo v genomu *R. flavefaciens*, tudi izraža (in ne gre zgolj za pseudogene, ki se še niso odstranili iz genoma), smo potrdili na encimogramih. Podobno kot pri sevu 007S (Vodovnik in Marinšek Logar, 2012) lahko endoglukanaze mutante 007C glede na vzorec izražanja razdelimo na (vsaj štiri) konstitutivno izražene in (vsaj sedem) inducibilnih (tiste, katerih izražanje je bilo specifično povezano z rastjo na celulozi) (sliki 1, 2). V začetnih fazah rasti na celulozi je bila večina endoglukanaz vezanih na celice ter je po Mw ustrezala celulosomskim GH9 (ter dvema celulosomskima GH5), v kasnejših fazah rasti (po 7 dneh) pa se je spekter razširil še na encime, katerih na-

videzne Mw so manjše od 77 kDa in v večini sovpadajo z Mw(i) prostih GH5 (Vodovnik, 2012). Te smo zaznali izključno v supernatantu. Če ne gre za posttranslacijsko spremenjene ali proteolitično razcepljene encime, lahko domnevamo, da igrajo v začetnih fazah hidrolize mikrokristalinične celuloze pomembnejšo vlogo encimi, ki so povezani v celulosome (predvsem endoglukanaze iz družine GH9), medtem ko proste GH5 najverjetneje cepijo šele produkte kasnejših faz razgradnje, ki se sprostijo z netopnega substrata v gojišče. Poleg razlik v specifičnosti in mehanizmih hidrolize predstavnikov različnih družin endoglukanaz je zgodnje izražanje GH9 lahko povezano tudi z dejstvom, da ima večina teh encimov CBM, ki sodelujejo pri pritrjanju encimskih kompleksov in amorfoogenezi celuloznih vlaken, kar je še posebno pomembno v začetnih fazah razgradnje kristaliničnih regij (Fontes in Gilbert, 2010). Po drugi strani odsotnost CBM (in Dok-1) pri manjših GH5 ter dejstvo, da smo jih zaznali le v supernatantu, nakazuje, da bi lahko šlo za celodekstrinaze, katerih primarna funkcija je cepitev (topnih) produktov hidrolize celuloznih vlaken, ki so se s substrata sprostili v prvi fazi razgradnje, a so še preveliki za neposreden prenos v celice. Zgornja hipoteza je skladna tudi z ugotovitvijo, da encimov, katerih Mw bi ustrezale prostim GH5, nismo zaznali v nobeni od frakcij kultur, ki so rasle na celobiozi ali ksilanu, medtem ko se je večina večjih endoglukanaz izražala neodvisno od substrata. Konstitutivno izražanje izbranih celulaz, katerih delovanje je ključno za začetne stopnje razgradnje celuloze, je energetsko varčnejše kot sočasno izražanje celotnega nabora encimov tudi kadar celuloznega substrata ni na razpolago, po drugi strani pa celicam omogoča, da ob stiku z njim pride do sproščanja manjših količin produktov cepitve, ki lahko vzpodbudijo izražanje preostalih encimov, potrebnih za učinkovitejšo razgradnjo substrata (Gold in Martin, 2007). Molekularni mehanizem zaznavanja vira ogljika in prenosa signalov, ki uravnavajo izražanje genov celololitičnega sistema pri *R. flavefaciens* še ni pojasnjen. Domnevajo, da gre za večkomponentni sistem (trans)membranskih in citoplazemskih proteinov, preko katerih se zunajcelični signal do DNK prenaša s fosforilacijo in defosforilacijo, podobno kot pri široko razširjenih dvokomponentnih sistemih, preko katerih večina bakterij zaznava različne druge zunanje dejavnike (Vercoe in sod., 2003). Naše ugotovitve kažejo, da je izražanje širšega spektra celulaz inducirano z rastjo na celulozi, ne pa tudi celobiozi (disaharid, ki neposredno vstopa v celice) ali ksilanu (polisaharid, ki se razcepi v ksilo-oligosaharide in ksilozo), iz česar lahko sklepamo, da imajo specifično vlogo signalnih molekul v tem sistemu najverjetneje celodekstrini s stopnjo polimerizacije večjo od 2. Pri sevu *R. flavefaciens* FD-1 so ugotovili, da izražanje celodekstrinaze in nekaterih drugih celulaz do določene mere inducira celotrioza, vendar je

stopnja indukcije večja, kadar je prisotna netopna celuloza, kar nakazuje na to, da izražanje teh genov uravnavajo tudi večje molekule (Zhang in sod., 2005). Kako velike so molekule, ki (še lahko) sprožijo izražanje širšega spektra celulaz *R. flavefaciens* in po kateri poti poteka prenos signala do DNK, so vprašanja, ki jih bo v prihodnje potrebno bolje raziskati.

Izsledki naše raziskave pomembno prispevajo v mozaik razumevanja izražanja celulaz v enem najkompleksnejših do danes opisanih celololitičnih sistemov. Ta predstavlja model razgradnje celuloznih substratov s široko uporabnostjo v različnih biotehnoških panogah, od papirniške in krmilne industrije, do bioenergetike.

5 VIRI

- Bayer E.A., Lamed R., White B., Flint, H.J. 2008. From celulosomes to celulosomics. *Chemical record*, 8: 364–77, doi:10.1002/tcr.20160
- Beckham G.T., Matthews J.F., Peters B., Bomble Y.J., Himmel M.E., Crowley M.F. 2011. Molecular-level origins of biomass recalcitrance: decrystallization free energies for four common cellulose polymorphs. *The Journal of Physical Chemistry B*, 115: 4118–4127, doi:10.1021/jp1106394
- Béguin P., Lemaire M. 1996. The celulosome: an exocellular, multiprotein complex specialized in cellulose degradation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 31: 201–236, doi:10.3109/10409239609106584
- Berg Miller M.E. in sod. 2009. Diversity and Strain Specificity of Plant Cell Wall Degrading Enzymes Revealed by the Draft Genome of *Ruminococcus flavefaciens* FD-1. *PLoS ONE* 4, 8: e6650
- Brulc J.M. in sod. 2011. Celulosomics, a Gene-Centric Approach to Investigating the Intraspecific Diversity and Adaptation of *Ruminococcus flavefaciens* within the Rumen. *PLoS ONE* 6: e25329, doi:10.1371/journal.pone.0025329
- Bryant M.P., Robinson I.M. 1961. Some Nutritional Requirements of the Genus *Ruminococcus*. *Applied microbiology*, 9: 91–5
- Bryant M.P. 1972. Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. *American Journal of Clinical Nutrition*: 1324–1328
- CAZY. The Carbohydrate Active enZYmes database. <http://www.cazy.org/>
- Chandel A.K., Chandrasekhar G., Silva M.B., Da Silva S.S. 2012. The realm of cellulases in biorefinery development. *Critical Reviews in Biotechnology*, 32/3: 187–202, doi:10.3109/07388551.2011.595385
- Chassard C., Delmas E., Robert C., Lawson P.A., Bernalier-Donadille A. 2011. *Ruminococcus champanellensis* sp. nov., a cellulose-degrading bacteria from the human gut microbiota. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62: 138–143, doi:10.1099/ijs.0.027375-0
- Čater M., Zorec M., Marinšek Logar R. 2014 Methods for improving anaerobic lignocellulosic substrates degradation

- for enhanced biogas production. Springer science reviews, in press
- Ding S.Y. in sod. 2001. Cellulosomal scaffoldin-like proteins from *Ruminococcus flavefaciens*. Journal of Bacteriology, 183: 1945–1953, doi:10.1128/JB.183.6.1945-1953.2001
- Flint H.J., Bayer E. A., Rincon M.T., Lamed R., White B.A. 2008. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. Nature reviews: Microbiology, 6: 121–131, doi:10.1038/nrmicro1817
- Fontes C.M., Gilbert H.J. 2010. Cellulosomes: highly efficient nanomachines designed to deconstruct plant cell wall complex carbohydrates. Annual review of biochemistry, 79: 655–681, doi:10.1146/annurev-biochem-091208-085603
- Gold N.D., Martin V.J.J. 2007. Global View of the *Clostridium thermocellum* Cellulosome Revealed by Quantitative Proteomic Analysis. Journal Of Bacteriology, 189: 6787–6795, doi:10.1128/JB.00882-07
- Hall T. 2011. BioEdit Software. Informer Technologies Inc, <http://software.informer.com/>
- Hungate R.E., Stack R.J. 1982. Phenylpropanoic Acid: Growth Factor for *Ruminococcus albus*. Applied and Environmental Microbiology, 44: 79–83
- Jeihanipour A., Karimi K., Taherzadeh M.J. 2010. Enhancement of ethanol and biogas production from high-crystalline cellulose by different modes of NMO pretreatment. Biotechnology and Bioengineering, 105: 469–476, doi:10.1002/bit.22558
- Jindou S. in sod. 2008. Cellulosome gene cluster analysis for gauging the diversity of the ruminal cellulolytic bacterium *Ruminococcus flavefaciens*. FEMS microbiology letters, 285: 188–194, doi:10.1111/j.1574-6968.2008.01234.x
- Jullian V., De Vaux A., Millet L., Fonty G. 1999. Identification of *Ruminococcus flavefaciens* as the predominant cellulolytic bacterial species of the equine cecum. Applied and Environmental Microbiology, 65: 3738–3741
- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680–685, doi:10.1038/227680a0
- Lütke-Eversloh T., Bahl H. 2011. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum*: recent advances to improve butanol production. Current Opinion in Biotechnology, 22: 1–14, doi:10.1016/j.copbio.2011.01.011
- Matsui H. in sod. 2010. Microbial diversity in ostrich ceca as revealed by 16S ribosomal RNA gene clone library and detection of novel *Fibrobacter* species. Anaerobe, 16: 83–93, doi:10.1016/j.anaerobe.2009.07.005
- Petersen T.N., Brunak S., Von Heijne G., Nielsen H. 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. Nature Methods, 8: 785–786, doi:10.1038/nmeth.1701
- Rincon M.T. in sod. 2003. Novel organization and divergent dockerin specificities in the cellulosome system of *Ruminococcus flavefaciens*. Journal of Bacteriology, 185: 703–713, doi:10.1128/JB.185.3.703-713.2003
- Rincon M.T. in sod. 2004. ScaC, an Adaptor Protein Carrying a Novel Cohesin That Expands the Dockerin-Binding Repertoire of the *Ruminococcus flavefaciens* 17 Cellulosome. Journal of Bacteriology 186: 2576–2585, doi:10.1128/JB.186.9.2576-2585.2004
- Rincon M.T. in sod. 2005. Unconventional mode of attachment of the *Ruminococcus flavefaciens* cellulosome to the cell surface. Journal of bacteriology, 187, 7569–7578, doi:10.1128/JB.187.22.7569-7578.2005
- Rincon M.T. in sod. 2007. A novel cell surface-anchored cellulose-binding protein encoded by the sca gene cluster of *Ruminococcus flavefaciens*. Journal of bacteriology, 189: 4774–83, doi:10.1128/JB.00143-07
- Rincon M.T. in sod. 2010. Abundance and Diversity of Dockerin-Containing Proteins in the Fiber-Degrading Rumen Bacterium, *Ruminococcus flavefaciens* FD-1. PLoS ONE, 5/8: e12476–e12476, doi:10.1371/journal.pone.0012476
- Rincon M.T., McCrae S.I., Kirby J., Scott K.P., Flint H.J. 2001. EndB, a multidomain family 44 cellulase from *Ruminococcus flavefaciens* 17, binds to cellulose via a novel cellulose-binding module and to another *R. flavefaciens* protein via a dockerin domain. Applied and Environmental Microbiology, 67: 4426–4431, doi:10.1128/AEM.67.10.4426-4431.2001
- Saul D.J. in sod. 1990. *celB*, a gene coding for a bifunctional cellulase from the extreme thermophile "*Caldocellum saccharolyticum*". Applied and Environmental Microbiology, 56: 3117–3124
- Stewart C., Duncan S., McPherson C.A., Richardson A., Flint H.J. 1990. The implications of the loss and regain of cotton-degrading activity for the degradation of straw by *Ruminococcus flavefaciens* strain 007. Journal of Applied Microbiology, 68: 349–356
- Stewart C.S., Duncan H.S., Flint H.J. 1990. The properties of forms of *Ruminococcus flavefaciens* which differ in their ability to degrade cotton cellulose. FEMS Microbiology Letters, 1–2: 47–50, doi:10.1111/j.1574-6968.1990.tb03859.x
- Stewart C.S., Paniagua C., Dinsdale D., Cheng K.J., Garrow S.H. 1981. Selective isolation and characteristics of *Bacteriodes succinogenes* from the rumen of a cow. Applied and Environmental Microbiology, 41: 504–510
- Vercoe P.E., Kocherginskaya, S.A., White B.A. 2003. Differential protein phosphorylation-dephosphorylation in response to carbon source in *Ruminococcus flavefaciens* FD-1. Journal of applied microbiology, 94: 974–980, doi:10.1046/j.1365-2672.2003.01929.x
- Vodovnik M., Marinšek Logar R. 2012. Expression patterns of *Ruminococcus flavefaciens* revealed by zymogram approach. Folia microbiologica, 57, 4: 367–370, doi:10.1007/s12223-012-0144-3
- Vodovnik M. in sod. 2013. Expression of cellulosome components and type IV pili within the extracellular proteome of *Ruminococcus flavefaciens* 007. PLOS ONE, 8, 6: 1–11, doi:10.1371/journal.pone.0065333
- Wilkesman J., Kurz L. 2009. Protease analysis by zymography: a review on techniques and patents. Recent patents on biotechnology, 3/3: 175–184, doi:10.2174/187220809789389162
- Zhang Y.-H.P., Lynd L.R. 2005. Regulation of Cellulase Synthesis in Batch and Continuous Cultures of *Clostridium thermocellum*. Journal Of Bacteriology, 187: 99–106, doi:10.1128/JB.187.1.99-106.2005
- Zorec M., Vodovnik M., Marinšek Logar R. 2014. Cellulose and hemicellulose degradation by rumen bacteria. Food Technology and Biotechnology, 52/2: 210–221