

BIOTECHNOLOGICZNE I BIOMEDYCZNE ZASTOSOWANIA DEHYDROGENAZY CELOBIOZOWEJ GRZYBÓW

Katarzyna Olszewska¹, Anna Olszewska², Jerzy Rogalski¹, Justyna Sulej^{1*}

¹Katedra Biochemii i Biotechnologii, Instytut Nauk Biologicznych, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

²Katedra i Zakład Fizjologii Człowieka, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Wpłynęło we wrześniu, zaakceptowano w listopadzie 2019 r.

Streszczenie: Dehydrogenaza celobiozowa (CDH) należy do zewnątrzkomórkowych enzymów oksydoredukcyjnych, produkowanych przez grzyby rozkładające drewno, należące zarówno do *Basidiomycota* jak i *Ascomycota*. Enzym ten posiada binarną strukturę, zawierającą dwa kofaktory (FAD i hem), zlokalizowane w oddzielnych domenach połączonych proteolitycznie wrażliwym regionem zawiasowym. Ze względu na unikalną budowę oraz właściwości, CDH wykazuje ogromny potencjał aplikacyjny, zarówno biotechnologiczny jak i biomedyczny. Celem niniejszej pracy jest przegląd literatury dotyczącej właściwości katalitycznych dehydrogenazy celobiozowej oraz jej potencjalnych zastosowań.

1. Wprowadzenie. 2. Dehydrogenaza celobiozowa. 2.1. Historia odkrycia i klasyfikacja enzymu. 2.2. Struktura, mechanizm działania i właściwości. 3. Potencjał aplikacyjny dehydrogenazy celobiozowej. 3.1. Biomedyczne zastosowania. 3.2. Zastosowanie dehydrogenazy celobiozowej w procesach biotechnologicznych. 4. Podsumowanie

BIOTECHNOLOGICAL AND BIOMEDICAL APPLICATIONS OF FUNGAL CELLOBIOSE DEHYDROGENASE

Abstract: Cellobiose dehydrogenase (CDH) is an extracellular oxidoreductive enzyme produced by wood-decaying fungi belonging to the phylum *Basidiomycota* and *Ascomycota*. This enzyme has a binary structure containing two cofactors (FAD and hem), located in separate domains and connected by a proteolytically sensitive linker. Due to its unique structure and properties, CDH has great potential for application in both biotechnology and biomedical applications. The aim of this paper is to review the literature on catalytic properties of cellobiose dehydrogenase and its potential applications.

1. Introduction. 2. Cellobiose dehydrogenase. 2.1. History of discovery and classification of the enzyme. 2.2. Structure, mechanism of action and properties. 3. Application potential of cellobiose dehydrogenase. 3.1. Biomedical applications. 3.2. Application of cellobiose dehydrogenase in biotechnological processes. 4. Summary

Słowa kluczowe: antyoksydacyjny, biosensory, dehydrogenaza celobiozowa, grzyby, właściwości przeciwdrobnoustrojowe

Key words: antioxidant, biosensors, cellobiose dehydrogenase, fungi, antimicrobial properties

1. Wprowadzenie

Dynamiczny rozwój populacji ludzkiej wywiera ogromny wpływ na funkcjonowanie wszystkich ekosystemów na Ziemi. Zmieniające się środowisko powoduje modyfikacje całych organizmów, a nawet pojedynczych komórek czy organelli. Żywność i woda zanieczyszczone chemikaliami nie są obojętne dla naszego zdrowia. Często zwiększając okres przydatności pokarmów do spożycia, zmniejszamy szansę naszego organizmu na funkcjonowanie w pełnej homeostazie i utrzymanie zdolności do aktywnej obrony przed patogenami. Gleba przesycona herbicydami i sztucznymi nawozami wydaje plony, które stają się źródłem substancji niekorzystnie oddziałujących na zdrowie konsumentów. Oczyszczanie środowiska ze związków, które z założenia miały oddziaływać pozytywnie na organizmy żywe, a obecnie

są dla nich zagrożeniem, to jedno z zadań współczesnej biotechnologii. Także upowszechnienie antybiotyko-terapii oprócz działania pozytywnego ma swoje negatywne skutki. Coraz większym problemem staje się zjawisko antybiotykooporności. Naukowcy opracowują coraz to lepsze metody zwalczania drobnoustrojów i syntezy leków nowej generacji. Potencjalnym, bardzo obiecującym źródłem substancji bioaktywnych, o działaniu bakteriobójczym, są żyjące wokół nas mikroorganizmy. Dzięki rozwojowi techniki oraz osiągnięciom takich nauk jak biotechnologia, mikrobiologia czy inżynieria genetyczna, możemy nie tylko poznawać mikroorganizmy, ale także wykorzystywać je w praktyce.

Enzymy to substancje białkowe katalizujące reakcje chemiczne zachodzące w przyrodzie. Ich różnorodność zapewnia prawidłowe funkcjonowanie wszystkich procesów biochemicznych. Wykazują one określoną

* Autor korespondencyjny: dr Justyna Sulej, Katedra Biochemii i Biotechnologii, Instytut Nauk Biologicznych, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin; tel. 48 81 537 50 42; e-mail: justyna.sulej@poczta.umcs.lublin.pl; ORCID: 0000-0003-2220-7558

specyficzność substratową, reaktywność a także właściwości fizykochemiczne, katalityczne czy biologiczne, pożądane w wielu dziedzinach biotechnologii. Dzięki temu, znajdują zastosowanie w medycynie, oraz w różnych gałęziach przemysłu, usprawniając procesy technologiczne, obniżając ich koszt oraz podnosząc wydajność [1]. Według najnowszych badań, światowy rynek enzymów oszacowany w roku 2016 na 5,01 mld USD do roku 2021 osiągnie 6,32 mld [2]. Statystycznie około 65% handlowych enzymów to enzymy techniczne, 25% to enzymy spożywcze, a 10% to enzymy paszowe. Większość enzymów przemysłowych to hydrolazy, jednak to oksydoreduktazy ze względu na ogromny, nie do końca wykorzystany potencjał aplikacyjny oraz bardzo częste występowanie w przyrodzie, są obecnie w centrum zainteresowania największych zespołów badawczych na świecie.

Oksydoreduktazy to enzymy zaklasyfikowane przez Komitet Nazewnictwa Międzynarodowej Unii Biochemii i Biologii Molekularnej do klasy pierwszej (EC 1), które katalizują reakcje utleniania i redukcji. Oksydoreduktazy grzybowe, o największym znaczeniu biomedycznym i biotechnologicznym, możemy podzielić na:

- peroksydazy i peroksygenazy zawierające w swojej strukturze grupę hemową, aktywowane przez H_2O_2 jako jedyny akceptor elektronów;
- oksydazy i dehydrogenazy zawierające ugrupowanie flawinowe, aktywowane przez O_2 oraz inne utleniacze, takie jak Fe^{3+} i chinony;
- oksydazy i monooksygenazy zawierające jony miedzi [3].

Ze względu na zastosowanie, oksydoreduktazy można podzielić na techniczne (np. w biosensorach analitycznych), stosowane w specjalistycznych syntezach chemicznych (np. synteza i modyfikacja polimerów), środowiskowe (np. oksydacyjna degradacja takich zanieczyszczeń jak polichlorowane bifenyle (PCB) czy związki fenolowe), spożywcze, lecznicze oraz stosowane w segmencie środków higieny osobistej [1].

W grupie oksydoreduktaz grzybowych ostatnio znów bardzo intensywnie badanym enzymem jest dehydrogenaza celobiozowa (CDH), odkryta w latach 70. XX wieku. Ze względu na swoje niezwykle właściwości, znajduje ona coraz to nowe zastosowania w różnych gałęziach przemysłu oraz medycynie.

2. Dehydrogenaza celobiozowa

2.1. Historia odkrycia i klasyfikacja enzymu

Dehydrogenaza celobiozowa (CDH) to zewnątrzkomórkowy, ligninocelulolityczny enzym, odkryty w roku 1974 przez Ulle Westmark i Karl-Erika Eriks-

sona. Zaobserwowali oni odbarwienie płytek lignino-agarowych, w obecności celulozy, pod wpływem hodowanych kultur grzybowych, co świadczyło o produkcji przez te grzyby substancji zdolnych do rozkładu kompleksu ligninocelulozowego. Enzym, prawdopodobnie odpowiedzialny za odbarwienie płytek, został wyizolowany i oczyszczony z dwóch gatunków grzybów: *Phanerochaete chrysosporium* (dawniej *Sporotrichum pulverulentum*) i *Trametes versicolor*. Białko to posiadało w swojej strukturze ugrupowanie flawinowe i pierwotnie określone było jako oksydaza celobiozowo-chinonowa (CBQ). Przez wiele lat występowało w katalogu enzymów pod numerem EC 1.1.5.1 [4, 5]. Cztery lata później, w roku 1978 z grzyba *P. chrysosporium* wyizolowano białko o dwóch grupach prostetycznych: flawinowej i hemowej, wykazujące podobne właściwości do CBQ, i nadano mu nazwę „oksydaza celobiozowa” (CBO). Badacze sądzili wówczas, że istnieją dwa niezależne enzymy rozkładające ligninocelulozę: flawoproteina (CBQ) oraz hemoflawoproteina (CBO) [6]. W roku 1992 Jonathan D. Wood i Paul M. Wood w swojej pracy opublikowali dowody na to, że oksydaza celobiozowo-chinonowa to pozbawiona hemu część oksydazy celobiozowej. CBO w wyniku proteolizy ulega rozpadowi na nieaktywny fragment z grupą hemową oraz na posiadający grupę flawinową katalityczny fragment z centrum aktywnym [7]. Ze względu na właściwości enzymu, we wczesnych latach 90. zaproponowano zmianę nazwy tego biokatalizatora na „dehydrogenaza celobiozowa” (cellobiose dehydrogenase), w skrócie CDH [8]. Nazwa ta stosowana jest do dziś, a sam enzym został wpisany do katalogu pod numerem EC 1.1.99.18.

W oparciu o sekwencje genetyczne CDH może być filogenetycznie zaliczane do trzech klas: CDH I, CDH II i CDH III. Pierwsze dwie klasy zbiegają się z genetycznym podziałem organizmów zdolnych do produkcji dehydrogenazy celobiozowej. Klasa trzecia, zawierająca biokatalizatory dotąd niesklasyfikowane, została wprowadzona w roku 2008 [9, 10]. Do klasy I zaszeregowano enzymy syntetyzowane przez grzyby należące do *Basidiomycota*. Grupa ta obejmuje m.in. takie gatunki jak *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* i *Athelia rolfsii* (*Sclerotium rolfsii*). Do CDH II należą zaś białka wydzielane przez *Ascomycota* (m.in. *Neurospora crassa*, *Aspergillus fumigatus* i *Chaetomium atrobrunneum* [11]). Enzymy poszczególnych klas różnią się między sobą właściwościami. Klasa I charakteryzuje się słabszym utlenianiem cukrów prostych, takich jak glukoza, wydajniejszym działaniem w kwaśnym pH oraz krótszą sekwencją aminokwasową. Enzymy te w domenie flawinowej mają zlokalizowane miejsce wiązania celulozy CBD (cellulose binding domen). Miejsce to, ze względu na swoją konserwatywność, rozpoznaje jedynie celulozę, nie reaguje zaś z ksyłanem, mannanem, skrobią czy chityną [12]. Sekwencja

aminokwasowa enzymów należących do CDH II jest dłuższa, a optimum pH plasuje się w zakresie obojętnym lub zasadowym. Klasa ta została podzielona na dwie podklasy: IIA zawierającą C-końcowy moduł wiążący węglowodany i IIB bez takiego modułu. W odniesieniu do swoistości substratowej, CDH podklasy IIB wykazują mniej wyraźną specyficzność substratową w stosunku do celobiozy niż enzymy podklasy IIA [9].

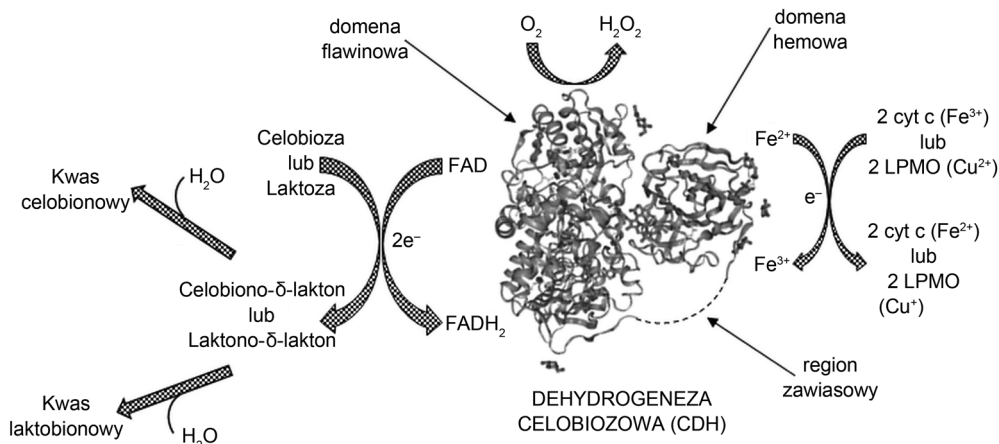
Oczyszczanie dehydrogenazy celobiozowej z kultur grzybowych, hodowanych na podłożu zawierającym celulozę, pomimo dużego stężenia białka w supernatancie, jest procesem trudnym i czasochłonnym. Zastosowanie bioinżynierii, w procesie biosyntezy CDH, z ekonomicznego punktu widzenia jest nieuniknione. Z tego też względu, w ostatnich latach opracowano kilka systemów ekspresji rekombinowanego CDH w komórkach pro- i eukariontów w celu taniej, szybkiej i bezpiecznej produkcji dużych ilości enzymu, który można łatwo oczyścić, ale także poddać modyfikacjom genetycznym [13]. Pałeczka *Escherichia coli* jest jednym z najczęściej stosowanych do produkcji białek rekombinowanych organizmów prokariotycznych. Ekspresja nieszkodzonego CDH, w tym gospodarzu, nie została do tej pory osiągnięta, co wiąże się głównie z brakiem modyfikacji potranslacyjnych (glikozylacja), które wpływają na właściwości dojrzałego białka [5]. Udokumentowanym efektem ekspresji CDH w *E. coli* była funkcjonalnie wyrażona domena flawinowa *P. chrysosporium* [14]. *Pichia pastoris* jest jednym z najczęściej używanych gospodarzy w ekspresji heterologicznej kilku CDH syntetyzowanych przez *Basidiomycota* i *Ascomycota*. Drożdże te przeprowadzają podstawowe modyfikacje potranslacyjne, wydzielając zazwyczaj duże ilości funkcjonalnych enzymów [15–17]. Rozwój nowych molekularnych narzędzi genetycznych sprawił, że również grzyby nitkowane takie jak *Aspergillus niger*, *A. oryzae* czy *Trichoderma reesei* są stosowane jako gospodarze do produkcji dużych ilości białek ekspresyjnych [18]. Do dnia dzisiejszego tylko dwie dehydrogenazy celobiozowe zostały rekombinacyjnie wyprodukowane w drodze ekspresji w *A. oryzae* [19] i w *A. niger* [17].

2.2. Struktura, mechanizm działania i właściwości

Dehydrogenaza celobiozowa najczęściej jest białkiem monomerycznym, składającym się z dwóch domen połączonych przez proteolitycznie wrażliwy region zawiasowy o długości około 20–35 reszt aminokwasowych [20]. Enzym po trawieniu papainą *In vitro* rozpada się na dwie domeny: flawinową (DH cdh) i cytochromową (CYT cdh). Większa domena (DH cdh) jest związana z dinukleotydem flawinoadeninowym, podczas gdy mniejsza domena cytochromowa (CYT cdh) wiąże się z pojedynczą cząsteczką hemu. Sekwencja domeny cytochromowej jest unikalna w porównaniu

z obecnie znanymi w przyrodzie flawocytochromami. Natomiast ze względu na sekwencję domeny flawinowej CDH, ta katalitycznie aktywna podjednostka zaliczana jest do rodziny oksydoreduktaz GMC (glukoza-metanol-cholina) [5]. Domena cytochromowa, znajdująca się na N-końcu łańcucha białkowego, zawiera hem b, który pełni funkcję kofaktora. Koniec C białka zawiera domenę flawinową, która jest niekowalencyjnie związana z fragmentem FAD [21]. Występowanie obok siebie grupy flawinowej i hemowej w jednym białku katalitycznym, jest unikalne wśród enzymów zewnątrzkomórkowych i zapewnia niezwykle właściwości CDH, które mogą mieć zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu oraz w medycynie [22].

Funkcja biologiczna dehydrogenazy celobiozowej, pomimo wielu lat badań, nadal nie została do końca wyjaśniona. Enzym ten uczestniczy w degradacji celulozy, a badania prowadzone w ciągu ostatniej dekady dowodzą, że proces ten wymaga współdziałania CDH z lityczną monoooksygenazą polisacharydową (LPMO). Celobioza jest naturalnym substratem dla dehydrogenazy celobiozowej, która utlenia ten związek do celobionolaktonu [23]. Podczas tego procesu powstają dwa elektrony, które są następnie przenoszone przez CDH na LPMO. Zredukowane LPMO może dalej reagować z tlenem i tworzyć rodniki, które atakują matrycę celulozową, co ułatwia jej penetrację i rozkład. Lityczne monoooksygenazy polisacharydowe wyróżniają się wśród oksydoreduktaz miedziowych, ponieważ są zdolne do oksydacyjnego rozbijania krystalicznej celulozy, której dezintegracja jest nadal poważnym problemem przemysłowym [3]. Wobec tego dehydrogenaza celobiozowa uczestniczy w systemie degradacji celulozy na dwa sposoby: poprzez utlenianie celobiozy i/lub funkcjonowanie jako enzym redoks integrujący działanie LPMO. Enzym CDH może również redukować Fe^{3+} do Fe^{2+} i O_2 do H_2O_2 [24]. Podczas reakcji redukcji, β -D-celobioza jest utleniana, tworząc w ten sposób celobionolakton, który jest następnie hydroli-zowany w dużej ilości wody do odpowiedniego kwasu karboksylowego. Następuje przepływ elektronów z centrum katalitycznego, przy udziale grupy FAD, która zostaje zredukowana do $FADH_2$ [25], poprzez między domenowy transfer elektronów do domeny hemowej [26]. Akceptorem elektronów jest kompleks żelazowy, prawdopodobnie z atomem Fe^{3+} . Zredukowana CDH ulega ponownemu utlenieniu przez akceptory elektronów, takie jak 1,2- lub 1,4-benzochinon, kationy ABTS oraz skompleksowane jony metali, takie jak Fe^{3+} , Cu^{2+} i Mn^{3+} lub tlen. Otrzymane jony żelaza mogą następnie uczestniczyć w reakcji Fentona, której produktami są wysoko reaktywne rodniki hydroksylowe. W nienaruszonym enzymie hem stymuluje redukcję Fe^{3+} działając jako akceptor elektronów lub bezpośrednio redukując Fe^{3+} [27] (Ryc. 1).



Ryc. 1. Schemat cyklu katalicznego oraz łańcucha transportu elektronów w dehydrogenazie celobiozowej z *Myriococcum thermophilum* [MtCDH (pdb 4QI6)] [21]

3. Potencjał aplikacyjny dehydrogenazy celobiozowej

Złożoność organizmu ludzkiego sprawia, że przy opracowywaniu nowych wyrobów biomedycznych należy uwzględnić interakcje pomiędzy substancjami wchodzącymi w skład naszego ciała, a komponentami

produktów medycznych. Działania niepożądane mogą być przyczyną nie tylko braku skuteczności działania opracowanych rozwiązań, ale także wywoływać nowe schorzenia. Aby zminimalizować ryzyko takiej sytuacji, coraz częściej stosowane są substancje pochodzenia naturalnego, pozwalające uniknąć przykrych konsekwencji zjawiska nietolerancji (Tab. I).

Tabela I
Grzyby produkujące CDH o najwyższym potencjale aplikacyjnym

Źródło enzymu	Klasa enzymu	Zastosowanie	Piśmiennictwo
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	CDH I	Biosensor laktozowy	[22, 23]
		Biosensor do detekcji katecholamin	[24]
<i>Phanerochaete sordida</i>	CDH I	Biosensor laktozowy	[25–27]
<i>Trametes villosa</i>	CDH I	Biosensor laktozowy	[22, 25]
		Bioogniwo paliwowe	[28]
<i>Sclerotium rolfsii</i> (<i>Athelia rolfsii</i>)	CDH I	Biosensor do detekcji katecholamin	[24]
		Produkcja kwasu laktobionowego	[29]
<i>Corynascus thermophilus</i>	CDH II	Bioogniwo paliwowe	[30]
		Biosensor laktozowy	[31]
		Biosensor glukozowy	[32–34]
		Język bioelektroniczny	[35]
<i>Dichomera saubinetii</i>	CDH II	Bioogniwo paliwowe	[36]
<i>Myriococcum thermophilum</i>	CDH II	Biosensor glukozowy	[37, 38]
		Język bioelektroniczny	[35]
		Synteza nadtlenu wodoru	[39]
		Wybielanie papieru	[40]
		System regeneracji przeciwutleniaczy	[41]
		Systemy przeciwdrobnoustrojowe i antybiofilmowe	[42–44]
		Detoksykacja	[45]
<i>Humicola insolens</i>	CDH II	Bioogniwo paliwowe	[46]
<i>Chaetomium cellulolyticum</i> (<i>Collariella virescens</i>)	CDH II	Degradacja celulozy	[47]
<i>Neurospora crassa</i>	CDH II	Produkcja kwasu celobionowego	[48–50]
		Język bioelektroniczny	[35]

3.1. Biomedyczne zastosowania

Doskonałymi komponentami materiałów biomedycznych, o dużym potencjale aplikacyjnym, są enzymy a w tym także dehydrogenaza celobiozowa. Perspektywa zastosowania tego biokatalizatora wynika między innymi ze specyficzności substratowej oraz zdolności do bezpośredniego transferu elektronów, co wykorzystywane jest w biosensorach i bioogniwach paliwowych. Enzymy syntetyzowane przez *Ascomycota*, posiadają moduł wiążący węglowodany, dzięki czemu wykazują szerszą specyficzność substratową niż CDH wyizolowane z *Basidiomycota*. Reagują one z mono-, di- i oligosacharydami, w tym także z glukozą, powszechnie występującą w organizmie ludzkim.

Ważnym aspektem zastosowania CDH, zarówno w procesach biotechnologicznych jak i biomedycznych, są także produkty powstające w wyniku reakcji enzymatycznych katalizowanych przez to białko. Cukry znajdujące się w organizmie ludzkim, ale także w środowisku naturalnym, mogą stanowić potencjalne substraty dla CDH, umożliwiając poprawne działanie tego enzymu. W wyniku ich utleniania powstają kwasy aldonowe, stosowane w wielu dziedzinach. Podczas reakcji enzymatycznej następuje także przeniesienie elektronów na tlen cząsteczkowy. Produktem ubocznym tej reakcji jest nadtlenek wodoru (H_2O_2), będący silnym środkiem utleniającym, wykazującym właściwości dezynfekujące oraz antyseptyczne [46].

Systemy przeciwdrobnoustrojowe i antybiofilmowe oparte na CDH

Zdolność dehydrogenazy celobiozowej do wytwarzania nadtlenu wodoru przy udziale tlenu cząsteczkowego jako akceptora elektronów uczyniła ten enzym bardzo interesującym kandydatem do opracowywania systemów antybakteryjnych, zapobiegających kolonizacji implantów lub cewników moczowych poprzez hamowanie tworzenia biofilmów [49]. Nadtlenek wodoru to związek, który już w niskich stężeniach rzędu 0,25–3% wykazuje właściwości antyseptyczne i dezynfekujące. Działa on na bakterie m.in. poprzez peroksydację i przerwanie błony komórkowej, utlenianie nukleozydów, hamowanie syntezy białek oraz inhibicję enzymów. Następstwem tych zjawisk jest śmierć komórki [58]. Niewątpliwą zaletą H_2O_2 jest jego niska stabilność w roztworze, która pozwala na precyzyjną lokalizację jego działania. Aktywność systemu wytwarzania H_2O_2 z udziałem CDH może być kontrolowana przez podawanie do środowiska reakcji odpowiedniego substratu. Co więcej wydajność powyższego układu wykazuje stechiometryczną zależność tzn. podanie do układu 2 mM celobiozy powoduje wytworzenie 2 mM nadtlenu wodoru. Prowadzone badania dowodzą, że całkowite zahamowanie wzrostu drobnoustrojów z gatunku

Escherichia coli i *Staphylococcus aureus* można osiągnąć poprzez dodanie do układu 0,8 mM celobiozy, zaś 50% redukcja zachodzi na poziomie odpowiednio 0,25 mM dla *E. coli* i 0,19 mM dla *S. aureus* [59]. W ostatnich latach przeprowadzono badania nad możliwym zastosowaniem dehydrogenazy celobiozowej do wytwarzania nadtlenu wodoru, dezynfekującego cewniki moczowe. Są one standardowymi narzędziami medycznymi stosowanymi na całym świecie. Obecnie przeprowadza się u pacjentów częstą wymianę cewników, co powoduje znaczne niedogodności i zwiększa koszty opieki zdrowotnej. Infekcje cewników powodowane są głównie przez drobnoustroje z rodzaju *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* i *Enterobacter*, które przylegają do powierzchni cewnika w złożonym biofilmie [60]. Badania wykazały, że rekombinacyjnie wytwarzany w *Pichia pastoris* CDH z *Myriococcum thermophilum* całkowicie hamuje wzrost *E. coli* i *S. aureus* zarówno w ciekłym, jak i stałym podłożu, gdy jest ono uzupełnione o 0,8 mM lub 2 mM roztwór celobiozy. W ten sam sposób wzbogacając układ w 1 mM roztwór celobiozy możemy hamować tworzenie się biofilmu na foliach silikonowych. System CDH/celobioza skutecznie hamował wiele mikroorganizmów kolonizujących cewniki, w tym lekooporne szczepy *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Proteus mirabilis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter baumannii* i *Pseudomonas aeruginosa*. Co ciekawe, CDH utleniał również zewnątrzkomórkowe polisacharydy (exPS) wytwarzane przez mikroorganizmy, generując nadtlenek wodoru w układzie nie zawierającym celobiozy. Produkcja H_2O_2 , a w konsekwencji właściwości przeciwdrobnoustrojowe i antybiofilmowe, wzmocnione zostały przez włączenie do systemu hydrolaz glikozydowych, takich jak α -amylazy. Przeprowadzały one hydrolizę polisacharydów, zwiększając liczbę końcowych substratów dla CDH i destabilizowały strukturę biofilmu [49]. Aby przetestować skuteczność tego systemu w środowisku medycznym zespół badawczy profesora G.S. Nyanhongo wyizolował bakterie powszechnie zasiedlające cewniki, a następnie inkubował je z CDH w obecności celobiozy. Testy *in vitro* wykazały, że układ zawierający 10 mM roztwór wymienionego wyżej dwucukru i CDH, całkowicie eliminuje *S. aureus* i *A. baumannii* oraz intensywnie hamuje wzrost *S. epidermidis* i *S. maltophilia*. Badane szczepy bakteryjne, podobnie jak większość organizmów tlenowych, posiadały zdolność do syntezy katalazy, enzymu rozkładającego H_2O_2 . Oznacza to, że były one wyposażone w czynnik oporności, który czynił te szczepy niewrażliwymi na nadtlenek wodoru. Wykorzystywanie celobiozy jako substratu w reakcji wytwarzania nadtlenu wodoru z udziałem CDH jest również bardzo korzystne z medycznego punktu widzenia, gdyż cukier ten nie należy do łatwo przyswajalnych źródeł węgla dla mikroorganizmów. Dzięki temu możemy już w pewien

sposób ograniczać ich wzrost. Ponadto CDH może wykorzystywać również inne substraty, takie jak oligo- i polisacharydy obecne w systemach biomedycznych [59]. Daje nam to możliwość dostosowania rodzaju substratów reakcji do typu środowiska. Zjawisko powstawania biofilmu odgrywa ogromną rolę we współczesnej walce człowieka z patogennymi mikroorganizmami. Stopień ekspansywności tej struktury bakteryjnej obrazuje fakt, iż 80% wszystkich zakażeń drobnoustrojami ma związek z powstaniem biofilmu [61]. Jego wytworzenie sprawia, że konwencjonalne środki przeciwdrobnoustrojowe stają się nieskuteczne. Proces ten zachodzi według następującego schematu: odwracalne przyłączenie bakterii do powierzchni, nieodwracalna adhezja, wzrost i podział bakterii, tworzenie zewnętrznej osłonki i powstanie biofilmu, nabycie przez biofilm struktury trójwymiarowej [62]. Główną funkcją biofilmu jest ochrona drobnoustrojów przed negatywnym wpływem środowiska zewnętrznego [63]. Mikroorganizmy tworzące biofilm są bardziej odporne na antybiotykoterapię i trudniejsze do usunięcia. Z tego względu zapobieganie powstawaniu biofilmu jest kluczowe dla udanej strategii walki z infekcjami wywoływanymi przez mikroorganizmy zasiedlające powierzchnię biomateriałów medycznych [49]. Biofilmy odporne na antybiotykoterapię stają się źródłem ciągle nawracających i przewlekłych zakażeń. Dzieje się tak dlatego, że bakterie żyjące wewnątrz tej struktury są dobrze chronione przed środkami bójczymi, które mają ograniczony dostęp do patogenów. Dochodzi do powstawania opornych fenotypów oraz modyfikacji mikrośrodowiska [64]. Jednym z rozwiązań, które możemy zastosować do walki z biofilmami, jest unieruchomienie na powierzchni chronionych struktur enzymów, które dzięki swoim właściwościom zdolne są do zakłócania ważnych dla komórek bakteryjnych procesów, hamowania ich wzrostu i podziału oraz niszczenia składników niezbędnych do osiągnięcia przez biofilm stabilności [51]. Badacze z zespołu profesora G.S. Nyanhongo przyłączyli dehydrogenazę celobiozową do powierzchni cewników moczowych wykonanych z polidimetylosiloksanu (PDMS) i obserwowali wpływ enzymu na proces tworzenia się biofilmów [59]. Enzym CDH wbudowany został w środek poślizgowy, tradycyjnie stosowany w celu zminimalizowania dyskomfortu podczas cewnikowania [49]. Badania wykazały, że immobilizowany enzym był w stanie zakłócać wczesne etapy powstawania biofilmu (próba na *S. aureus*). Żywotność komórek bakteryjnych w tym układzie była o 70% niższa niż tych pochodzących z próby kontrolnej, a całkowita biomasa zdeponowana na powierzchni cewników zmniejszyła się o 30%. Inny eksperyment pokazuje, że antybiofilmowe działanie CDH aktywne jest przez dłuższy czas, gdyż po tygodniu umieszczona na cewnikach biomasa bakteryjna zmniejszyła się o 70% [50]. Badania te pokazują, że dehydrogenaza celobio-

zowa jest enzymem, który w efektywny sposób może być wykorzystywany w takich aplikacjach jak systemy antybiofilmowe i komponenty biomateriałów.

System regeneracji przeciwutleniaczy

Rany przewlekłe, stanowiące poważny problem zdrowotny, definiuje się jako trudne do wyleczenia i pozostające w fazie zapalnej przez nieprzewidywalny czas. Dużą przeszkodą pojawiającą się podczas próby ich leczenia jest ciągle uwalnianie proteaz, wolnych rodników, w tym reaktywnych form tlenu (ROS) i reaktywnych form azotu (RNOS) oraz duże ilości wysięków sprzyjających zakażeniom mikrobiologicznym. W ostatnich latach zespół profesora Nyanhongo opracował hydrożel na bazie CDH, który może zrewolucjonizować sektor opatrunków medycznych [65]. Skonstruowano go poprzez włączenie związku fenolowego – katecholu (pełniącego funkcję przeciwutleniacza) i celobiozy do hydrożelu (alginianu i/lub żelatyny), tworząc w ten sposób wielofunkcyjny polimer pomocny w leczeniu chronicznych ran. Hydrożele te wspomagają proces gojenia w dwojaki sposób. CDH włączony do hydrożelu regeneruje cyklicznie przeciwutleniacze po tym, jak zostają one zużyte w procesie neutralizacji wolnych rodników. Równocześnie ciągła produkcja H_2O_2 hamuje rozwój mikroorganizmów i odkaża ranę. Wyniki badań wskazują, że opatrunki te mogą całkowicie zahamować wzrost *S. aureus*, *Cellulosimicrobium cellulans*, *Bacillus subtilis* oraz *Pseudomonas putida*, umożliwiając tym samym sprawne gojenie się rany [59].

Produkcja bioaktywnych cząsteczek na bazie CDH

Kwasy aldonowe, zwane także kwasami cukrowymi, to związki, które znajdują szerokie zastosowania biomedyczne. Wykorzystywane są między innymi jako środki nawilżające i bioaktywne w medycynie, a w transplantologii jako składniki roztworów do przechowywania narządów przygotowanych do przeszczepów. Z nich także w przemyśle farmaceutycznym i chemicznym syntetyzuje się biokompatybilne i biodegradowalne systemy dostarczania leków [66]. Proces ich syntezy prowadzony w sposób tradycyjny jest źródłem wielu nieprzyjaznych dla środowiska substancji takich jak wodorotlenki bromu, miedzi lub srebra [67], dlatego tak ważne jest opracowanie alternatywnych metod ich otrzymywania. Jednym z powszechnie używanych związków z tej grupy jest kwas laktobionowy (LBA). Związek ten jest obecnie najbardziej rozpowszechnionym składnikiem systemów chłodniczych stosowanych do stabilizacji narządów przed przeszczepem. Znajduje również zastosowanie w kosmetologii jako środek do wygładzania zmarszczek, ogólnej pielęgnacji skóry i jej wytworów [68, 69]. Jego syntezę można przeprowadzić z udziałem CDH, która w temperaturze 25–50°C biotransformuje laktozę

w laktono- δ -lakton, ulegający spontanicznej hydrolizie w roztworach wodnych do LBA. W tych warunkach po 2,5 godz. inkubacji zachodzi 100% przekształcenie wyjściowego cukru w kwas laktobionowy [70]. Enzymatyczne utlenianie laktozy jest znacznie wydajniejsze niż procesy chemicznego otrzymywania LBA [71]. Dehydrogenaza celobiozowa wykazuje jak dotąd najwyższą selektywność (na poziomie 100%) i wydajność (95%) spośród dotychczas testowanych enzymów [72]. Zapewnia to duży spadek kosztów procesu oraz oszczędność czasu.

Celobioza będąca naturalnym substratem dla CDH utleniana jest przez ten enzym do kwasu celobionowego. Związek ten jest wysoce higroskopijny. Właściwość ta została wykorzystana do produkcji nawilżających skórę matryc żelowych. W obecności tego enzymu zachodzą również reakcje utleniania pochodnych celulozy zawierających grupy aminowe, acetamidowe i azydowe [73]. Związki te badane są pod kątem wykorzystania jako biomedyczne systemy dostarczania leków oraz prekursorów podczas syntezy substancji pomocniczych w farmakologii [74].

Produkcja prebiotyków bez laktozy

Prebiotyk określa się jako substrat selektywnie wykorzystywany przez mikroorganizmy gospodarza, zapewniający mu korzyści zdrowotne. Termin ten może być stosowany tylko wtedy, gdy korzystny wpływ na zdrowie związany jest z modulacją mikrobioty w określonej lokalizacji [75]. Do substancji prebiotycznych zaliczamy m.in. galakto-oligosacharydy (GOS) będące złożonymi mieszaninami różnych cukrów wytwarzanych poprzez transgalaktozylację laktozy przy użyciu enzymu β -galaktozydazy [76]. Szczególnie stymulują one wzrost bakterii z grup *Bifidobacteria* i *Lactobacillus*. Przyczynia się to do zwiększonego wchłaniania minerałów przez organizm ludzki, hamowania rozwoju patogenów oraz modulacji układu odpornościowego. Jednakże komercyjne GOS-y zawierają w swoim składzie jednostki galaktolaktozy, co stanowi duży problem, ponieważ obecnie około 70% populacji światowej cierpi na niedobór β -galaktozydazy w jelicie cienkim [77]. Defekt ten powoduje zwiększoną wrażliwość na laktozę, której usunięcie z GOS jest trudne i nieopłacalne [59]. Aby rozwiązać ten problem możemy wykorzystać zdolność CDH do biotransformacji laktozy w LBA omówioną w poprzednim podrozdziale. Kwas laktobionowy wytworzony z laktozy w obecności CDH zostaje następnie usunięty z preparatu za pomocą chromatografii jonowymiennej [5].

3.2. Zastosowanie dehydrogenazy celobiozowej w procesach biotechnologicznych

Enzymy grzybowe wykazują znaczny potencjał biotechnologiczny ze względu na unikalne właściwości. Stoso-

wane są w biodegradacji związków toksycznych, konwersji polimerów czy produkcji substancji bioaktywnych.

Dehydrogenaza celobiozowa, ze względu na zdolność do rozkładu i modyfikacji składników kompleksu ligninocelulozowego, może znaleźć praktyczne zastosowanie w przemyśle celulozowo-papierniczym w procesie wybielania papieru obok powszechnie używanych do tego celu enzymów ligninolitycznych takich jak lakaza czy peroksydazy manganozależna (MnP) i ligninowa (LiP) [78, 79]. Właściwości CDH nie ograniczają się jedynie do degradacji składników drewna. Prowadzone przez grupy rosyjskich naukowców badania wykazały, że enzym ten może rozkładać różnego rodzaju związki o charakterze ksenobiotyków. Zaobserwowano zdolność CDH do biodegradacji m.in: poliakrylanu, kopolimeru akrylanowo-akrylamidowego, heksohydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazyny oraz herbicydów triazynowych (np. atrazyny). W latach 90. w Europie, jednym z najczęściej stosowanych herbicydów była atrazyna, wykazująca silne właściwości karcinogenne. Związek ten pomimo wycofania z użycia ciągle znajduje się zarówno w wodach gruntowych jak i glebie. Uzyskane wyniki wskazują na możliwość zastosowania dehydrogenazy celobiozowej w procesie usuwania zanieczyszczeń środowiska, między innymi z takich związków jak pestycydy [79, 80], co sugeruje potencjalne zastosowanie CDH w bioremediacji związków powszechnie zanieczyszczających środowisko. Zdolność CDH do usuwania toksyn wykazali także naukowcy z dwóch zaprzyjaźnionych uniwersytetów wiedeńskich poddając procesowi detoksykacji pozostałości po tłoczeniu oliwy z oliwek. Po raz pierwszy oceniali oni współdziałanie CDH i lakazy, wykorzystując odpady poddane działaniu enzymów jako substraty do produkcji biogazu [52].

W ostatniej dekadzie, wiele zespołów badawczych skupiło się na synergistycznym działaniu CDH i litycznej monoooksygenazy polisacharydowej (LPMO). Enzymy te uczestniczą w rozkładzie celulozy będącej potencjalnym substratem w produkcji biopaliw nowej generacji [81].

Dehydrogenazy celobiozowe mogą być również stosowane jako biokomponenty w biosensorach amperometrycznych lub przy konstrukcji enzymatycznych bioogniw paliwowych, ze względu na sposób przenoszenia elektronów w układzie katalitycznym, oraz specyficzność substratową biokatalizatora.

Biosensory enzymatyczne oparte na CDH

Dehydrogenazy celobiozowe to wszechstronne biokatalizatory, zdolne do wykrywania węglowodanów, a także chinonów i katecholamin. Biosensory oparte na CDH znalazły swoje zastosowanie w wielu różnych dziedzinach biotechnologii, technologii żywności, rolnictwie, ochronie zdrowia, medycynie czy monitorowaniu zanieczyszczeń [82]. W zależności od źródła z jakiego

oczyszczono białko, specyficzne właściwości katalityczne enzymu umożliwiają utlenianie różnych substratów, a zatem użycie różnych analitów w zakresie zastosowań biosensora. Klasa I CDH, syntetyzowana przez grzyby należące do *Basidiomycota*, wykazuje bardzo wysoką specyficzność w stosunku do substratów połączonych wiązaniem β -1,4-glikozydowym, a zatem są to idealne biokomponenty do wykrywania celobiozy i laktozy [83]. Pierwszy biosensor zawierający CDH skonstruowano na początku lat dziewięćdziesiątych w grupie badawczej Lindquista, na bazie węgla szklatego, CDH (*Phanerochaete chrysosporium*) oraz osmu, oznaczając ilościowo zawartość celobiozy i laktozy [84]. Ze względu na wysoką toksyczność jonów osmu, praktyczne zastosowanie takiego układu było znacznie ograniczone. Jednakże potrzeba opracowania metody szybkiej detekcji laktozy w środkach spożywczych, wynikająca z coraz częstszych nietolerancji tego disacharydów społeczeństwie, doprowadziła do intensyfikacji badań. Poszukiwano nietoksycznych substancji łączących biokatalizator do powierzchni czujnika. Zastosowanie nanorurek węglowych w analizach elektrochemicznych, doprowadziło do przełomu w badaniach. Amperometryczne biosensory trzeciej generacji, o bardzo dużej czułości, bazujące na CDH z *Trametes villosa* lub *Phanerochaete sordina* zostały opracowane do zastosowań w przemyśle mleczarskim [32, 83].

Odkrycie CDH produkowanych przez *Ascomycota*, należących do klasy II, zdolnych do utleniania także monosacharydów, stworzyło możliwość zaprojektowania bioczujnika glukozowego opartego na dehydrogenazie celobiozowej. Określono właściwości katalityczne oraz profile pH kilku CDH, jednak najbardziej obiecujące, jako składnik biosensora glukozowego, okazały się enzymy z *Corynascus thermophilus* (CtCDH) [40, 41] i *Myriococcum thermophilum* (MtCDH) [44, 45], ze względu na zdolność do bezpośredniego przeniesienia elektronów (DET – direct electron transfer) w fizjologicznym dla człowieka pH [85].

Biosensory bazujące na elektrodzie grafitowej zmodyfikowanej CDH stosowane są także do prostego i szybkiego pomiaru zawartości związków fenolowych w środowiska [86]. Możliwe jest również monitorowanie stężenia katecholoamin będących prekursorami neurotransmiterów i hormonów, w medycynie przy leczeniu zaburzeń neurologicznych i psychiatrycznych [78].

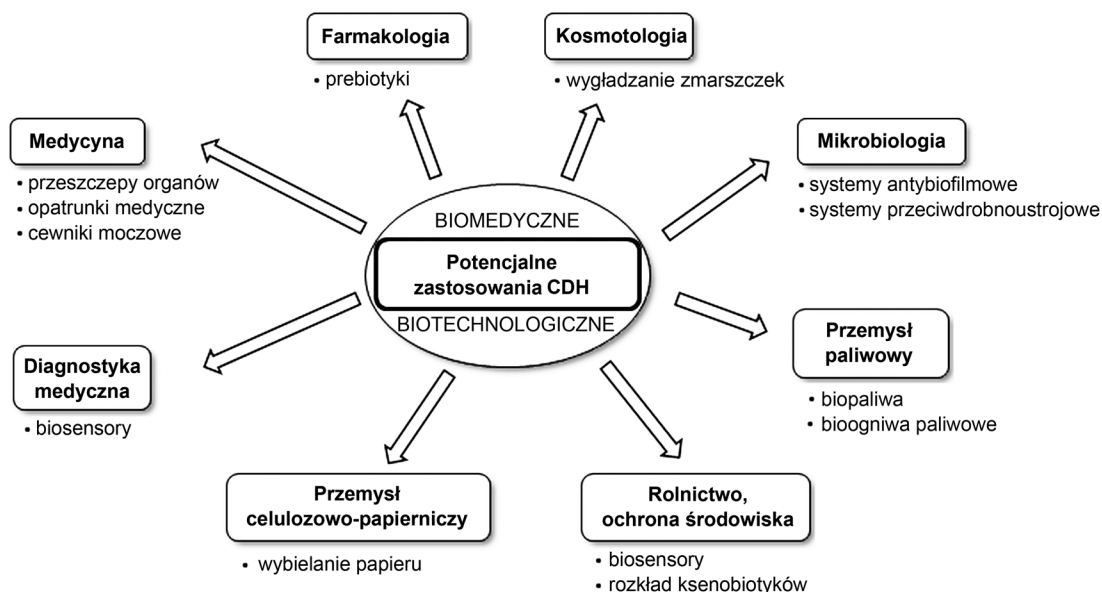
Innym, ciekawym zastosowaniem CDH jako elementu detekcyjnego, jest konstrukcja tzw. elektronicznych języków (electronics tongues, ET). Są to systemy wieloczujnikowe wykorzystujące reakcje krzyżowe, które mogą przetwarzać sygnał za pomocą zaawansowanych metod matematycznych opartych na rozpoznawaniu wzorców i/lub wielowymiarowej analizie danych. Umożliwiają one interpretację kompozycji złożonych analitów oraz odróżnianie elementów pierwotnych

od zakłócających [87]. Matryce czujnikowe, których sygnały analizowane są przez odpowiednie procedury numeryczne (tzw. elektroniczne języki) charakteryzują się odmienne w stosunku do klasycznej analizy chemicznej podejście. Zamiast oznaczania wybranych substancji w badanych próbkach, matryce najczęściej mają za zadanie określić cechy jakościowe próbek niezwiązane z jej pojedynczymi, analizowanymi oddzielnie składnikami. Dzięki temu możliwe jest na przykład określenie przydatności do spożycia, wartości odżywczej, odpowiedniego czasu leżakowania lub fermentacji. Z tego względu w ciągu ostatnich kilkunastu lat matryce czujnikowe z powodzeniem wykorzystywane były w szeregu aplikacji – od analizy żywności, przez monitoring środowiskowy i procesowy, do diagnostyki medycznej [88, 89]. Systemy ET oparte na cząsteczkach biologicznych, takich jak enzymy, nazywane są językami bioelektronicznymi (bioelectronics tongues, BioET). Zastosowanie CDH w BioET jest związane z dużą różnorodnością form enzymów pochodzących z różnych źródeł, która pozwala na dostosowanie systemu do wykrywania różnych analitycznie istotnych cukrów, takich jak np. laktoza, maltoza i celobioza. Istotna była również, niedawno odkryta zależność poziomu aktywności enzymu od obecności w środowisku kationów, a w szczególności Ca^{2+} . Właściwość ta sprawia, że białka z klasy II, które są w większym stopniu regulowane przez Ca^{2+} , mogą być używane do określania zawartości jonów wapnia w mleku. Dodatkowo wykorzystując reakcję krzyżową CDH różnego pochodzenia z laktozą i glukozą oraz interferującymi kationami Ca^{2+} można przeprowadzić rozdzielenie tych analitów [42].

Bioogniwa paliwowe oparte na CDH

Konstrukcja bioogniw paliwowych (biofuel cells, BFC) opartych na działaniu dehydrogenazy celobiozowej, to kolejna aplikacja wykorzystująca bioelektrochemiczne właściwości CDH. Enzym ten dzięki możliwości zarówno bezpośredniego (DET) jak i pośredniego (MET – mediated electron transfer) transferu elektronów, stał się interesującym składnikiem anodowej części bioogniwa paliwowego. Urządzenia te są w stanie przekształcić energię chemiczną w elektryczną przeprowadzając reakcje biochemiczne odbywające się za pomocą biokatalizatorów, katalizujących utlenianie biopaliwa i redukcję utleniacza [90]. Urządzenia zasilane bioogniwami mogą być w prosty sposób miniaturyzowane, dlatego ich potencjał aplikacyjny związany jest głównie z zasilaniem niewielkich wszczepialnych lub przenośnych urządzeń, także biomedycznych [91].

Początkowe prace nad zastosowaniem CDH w bioogniwach paliwowych oparte były na elektrodach grafitowych modyfikowanych zaadsorbowanym enzymem. Białka należące do klasy I CDH produkowane przez *Phanerochaete chrysosporium* [33, 45], *Trametes villosa*



Ryc. 2. Potencjalne zastosowania dehydrogenazy celobiozowej w procesach biomedycznych i biotechnologicznych

[29, 35] i *Dichomera saubinetii* [43] oraz klasy II CDH z *Myriococcum thermophilum* [45] i *Corynascus thermophilus* [38] zostały użyte we wstępnych badaniach z laktozą i glukozą jako paliwem anodowym [83]. Przykładem takiego bioogniwa jest zaprojektowany przez Comana i wsp. [43] model bioogniwa paliwowego, w którym dehydrogenaza celobiozowa stanowi bioanodę, natomiast na katodzie immobilizowana jest lakaza. W ostatnich latach badania nad bioogniwami paliwowymi prowadzone są bardzo intensywnie, skutkując zgłoszeniami patentowymi obiecujących mikrosystemów stosowanych w dyscyplinach medycznych i inżynierskich. Wykazano możliwość tworzenia miniaturowanych, samodzielnych biourządzeń zasilanych bioogniwem, w którym CDH unieruchomiono na anodzie a oksydazę bilirubinową (BOD) na katodzie. Ogniwko to umożliwia produkcję nowej generacji bezprzewodowych interfejsów neuronalnych znajdujących zastosowanie kliniczne. Używa się ich również w przeprowadzanych *in vivo* badaniach neurofizjologicznych. Dzięki połączeniu ogniwa i metody spektroskopii impedancyjnej (EIS) zademonstrowano sprzężenie indukcyjne między urządzeniem a neuronami mózgu szczura [85]. Kolejnym przykładem urządzeń zasilanych energią pochodzącą z BFC jest elektroniczna soczewka kontaktowa. Zastosowany w niej układ CDH/BOD do wytwarzania prądu wykorzystuje glukozę i tlen rozpuszczone we łzach [92]. Ryc. 2

4. Podsumowanie

Dehydrogenaza celobiozowa jest enzymem, który dzięki oryginalnej strukturze i właściwościom może być stosowany w wielu procesach biotechnologicznych oraz

w medycynie. Intensywnie prowadzone badania dostarczają coraz to nowych możliwości aplikacyjnych tego białka. Rozpoczynając od degradacji ligninocelulozy, będącej substratem w produkcji biopaliw, umożliwiając tym samym prowadzenie procesów technologicznych w sposób bardziej przyjazny dla środowiska. Poprzez procesy detoksykacyjne, aż do zastosowań bioelektrochemicznych związanych z detekcją lub zasilaniem wszczepialnych i przenośnych urządzeń, zwłaszcza biomedycznych. Biomedyczne zastosowania tego enzymu obejmują takie dziedziny jak antybiotykoterapia, sektor opatrunków, regeneracja przeciwutleniaczy, a przede wszystkim systemy antybiofilmowe. Właściwości antyoksydacyjne i przeciwdrobnoustrojowe CDH są obecnie intensywnie badane pod kątem nowych możliwości zastosowania w przemyśle spożywczym a dokładniej w opakownictwie. Zastosowanie tego enzymu może stać się alternatywą dla posiadającej podobne właściwości oksydazy glukozowej, stosowanej także w sektorze opakowań.

Dehydrogenaza celobiozowa używana jest również do produkcji cząsteczek bioaktywnych takich jak np. kwasy aldonowe, których zastosowanie wykracza poza obszar medycyny. Niezwykle istotna jest także możliwość zastosowania CDH w procesie produkcji prebiotyków niezawierających laktozy. Możliwości zastosowania tego biokatalizatora są bardzo szerokie i z pewnością wciąż nie do końca odkryte. Dlatego tak ważne jest nieustanne pogłębianie naszej wiedzy o tym enzymie, ale również o innych białkach katalitycznych, które mogą zrewolucjonizować przemysł i rynek produktów medycznych. Otaczające nas mikroorganizmy są źródłem substancji bioaktywnych o ogromnym potencjale aplikacyjnym.

Podziękowania

Artykuł powstał w wyniku realizacji projektu finansowanego z środków Narodowego Centrum Nauki w Krakowie przyznanych na podstawie umowy nr UMO-2015/17/D/NZ9/02066.

Piśmiennictwo

- Xu F.: Applications of oxidoreductases: recent progress. *Ind. Biotechnol.* **1**, 38–50 (2005)
- Chapman J., Ismail A., Dinu C.: Industrial applications of enzymes: recent advances, techniques, and outlooks. *Catalysts*, DOI: 10.3390/catal8060238 (2018)
- Martínez A.T., Alcande M. i wsp.: Oxidoreductases on their way to industrial biotransformations. *Biotechnol. Adv.* **35**, 815–831 (2017)
- Westermarck U., Eriksson K.-E.: Cellobiose: quinone oxidoreductase, a new wood degrading enzyme from white-rot fungi. *Acta. Chem. Scand.* **828**, 209–214 (1974)
- Zamocky M., Ludwig R., Peterbauer C., Hallberg B.M., Divne C., Nicholls P., Haltrich D.: Cellobiose dehydrogenase-a flavocytochrome from wood-degrading, phytopathogenic and saprotrophic fungi. *Curr. Protein Pept. Sci.* **7**, 255–280 (2006)
- Ayers A.R., Ayers S.B., Eriksson K.-E.: Cellobiose oxidase, purification and partial characterization of a hemoprotein from *Sporotrichum pulverulentum*. *Eur. J. Biochem.* **90**, 171–181 (1978)
- Wood J.D., Wood P.M.: Evidence that cellobiose:quinone oxidoreductase from *Phanerochaete chrysosporium* is a breakdown product of cellobiose oxidase. *Biochim. Biophys.* **1119**, 90–96 (1992)
- Cameron M.D., Aust S.D.: Cellobiose dehydrogenase – an extracellular fungal flavocytochrome. *Enzym. Microb. Technol.* **28**, 129–138 (2001)
- Harreither W., Sygmund C., Augustin M., Narciso M., Rabinovich M.L., Gorton L., Haltrich D., Ludwig R.: Catalytic properties and classification of cellobiose dehydrogenases from Ascomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 1804–1815 (2011)
- Sulej J., Janusz G., Osińska-Jaroszuk M., Rachubik P., Mazur A., Komaniecka I., Choma A., Rogalski J.: Characterization of cellobiose dehydrogenase from a biotechnologically important *Cerrena unicolor* strain. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **176**, 1638–1658 (2015)
- Schulz C.: Cellobiose dehydrogenase on electrodes-an electrochemical biosensor for various analytes tunable by positive charges. Department of Chemistry, Lund University; (2015)
- Henriksson G., Salumets A., Divne C., Pettersson G.: Studies of cellulose binding by cellobiose dehydrogenase and a comparison with cellobiohydrolase 1. *Biochem. J.* **324**, 833–838 (1997)
- Ma S., Preims M., Piumi F., Kappel L., Seiboth B., Record E., Kracher D., Ludwig R.: Molecular and catalytic properties of fungal extracellular cellobiose dehydrogenase produced in prokaryotic and eukaryotic expression systems. *Microb. Cell Fact.* **16**, 1–14 (2017)
- Ferri S., Sode K.: Functional expression of *Phanerochaete chrysosporium* cellobiose dehydrogenase flavin domain in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* **32**, 855–859. (2010)
- Bey M., Berrin J.G., Poidevin L., Sigoillot J.C.: Heterologous expression of *Pycnoporus cinnabarinus* cellobiose dehydrogenase in *Pichia pastoris* and involvement in saccharification processes. *Microb. Cell Fact.* **10**, DOI:10.1186/1475-2859-10-113 (2011)
- Harreither W., Felice A.K.G., Paukner R., Gorton L., Ludwig R., Sygmund C.: Recombinantly produced cellobiose dehydrogenase from *Corynascus thermophilus* for glucose biosensors and biofuel cells. *Biotechnol. J.* **7**, 1359–1366 (2012)
- Turbe-Doan A., Arfi Y., Record E., Estrada-Alvarado I., Levasseur A.: Heterologous production of cellobiose dehydrogenases from the basidiomycete *Coprinopsis cinerea* and the ascomycete *Podospira anserina* and their effect on saccharification of wheat straw. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 4873–4885 (2013)
- Punt P.J., van Biezen N., Conesa A., Albers A., Mangnus J., van den Hondel C.: Filamentous fungi as cell factories for metabolite production. *Trends Biotechnol.* **20**, 200–206 (2002)
- Langston J.A., Brown K., Xu F., Borch K., Garner A., Sweeney M.D.: Cloning, expression, and characterization of a cellobiose dehydrogenase from *Thielavia terrestris* induced under cellulose growth conditions. *Biochim. Biophys. Acta* **1824**, 802–812 (2012)
- Sützl L., Laurent C.V.F.P., Abrera A.T., Schütz G., Ludwig R., Haltrich D.: Multiplicity of enzymatic functions in the CAZy AA3 family. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **102**, 2477–2492 (2018)
- Bao W.J., Usha S.N., Renganathan V.: Purification and characterization of cellobiose dehydrogenase, a novel extracellular hemoflavoenzyme from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* **300**, 705–713 (1993)
- Xia Z., Mathews F.S.: Molecular structure of flavocytochrome b2 at 2.4 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **212**, 837–863 (1990)
- Qin X., Su X., Luo H., Ma R., Yao B., Ma F.: Deciphering lignocellulose deconstruction by the white rot fungus *Irpex lacteus* based on genomic and transcriptomic analyses. *Biotechnol. Biofuels*, **11**, DOI: 10.1186/s13068-018-1060-9 (2018)
- Valadares F., Gonçalves T.A., Gonçalves D.S.P.O., Segato F., Romanel E., Milagres A.M.F., Squina F.M., Ferraz A.: Exploring glycoside hydrolases and accessory proteins from wood decay fungi to enhance sugarcane bagasse saccharification. *Biotechnol. Biofuels*, **9**, DOI: 10.1186/s13068-016-0525-y (2016)
- Henriksson G., Pettersson G., Johansson G., Ruiz A., Uzcategui E.: Cellobiose oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* can be cleaved by papain into two domains. *Eur. J. Biochem.* **196**, 101–106 (1991)
- Henriksson G., Johansson G., Pettersson G.: Is cellobiose oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* a one-electron reductase? *Biochim. Biophys. Acta-Bioenerg.* **1144**, 184–190 (1993)
- Hallberg B.M., Bergfors T., Bäckbro K., Pettersson G., Henriksson G., Divne C.: A new scaffold for binding haem in the cytochrome domain of the extracellular flavocytochrome cellobiose dehydrogenase. *Structure*, **8**, 79–88 (2000)
- Rose A.S., Bradley A., Valasatava Y., Duarte J., Prlic A., Rose P.: NGL viewer: web-based molecular graphics for large complexes. *Bioinformatics*, **34**, 3755–3758 (2018)
- Stoica L., Ruzgas T., Ludwig R., Haltrich D., Gorton L.: Direct electron transfers-a favorite electron route for cellobiose dehydrogenase (CDH) from *Trametes villosa*. Comparison with CDH from *Phanerochaete chrysosporium*. *Langmuir*, **22**, 10801–10806 (2006)
- Matsumura H., Ortiz R., Ludwig R., Igarashi K., Samejima M., Gordon L.: Direct electrochemistry of *Phanerochaete chrysosporium* cellobiose dehydrogenase covalently attached onto gold nanoparticle modified solid gold electrodes. *Langmuir*, **28**, 10925–10933 (2012)
- Stoica L., Lindgren-Sjölander A., Ruzgas T., Gorton L.: Biosensor based on cellobiose dehydrogenase for detection of catecholamines. *Anal. Chem.* **76**, 4690–4696 (2004)
- Safina G., Ludwig R., Gorton L.: A simple and sensitive method for lactose detection based on direct electron transfer between immobilised cellobiose dehydrogenase and screen-printed carbon electrodes. *Electrochim. Acta* **55**, 7690–7695 (2010)
- Tasca F., Gorton L., Harreither W., Haltrich D., Ludwig R., Noll G.: Comparison of direct and mediated electron transfer

- for cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete sordida*. *Anal. Chem.* **81**, 2791–2798 (2009)
34. Tasca F., Harreither W., Ludwig R., Gooding J.J., Gorton L.: Cellobiose dehydrogenase aryl diazonium modified single walled carbon nanotubes: enhanced direct electron transfer through a positively charged surface. *Anal. Chem.* **83**, 3042–3049 (2011)
35. Stoica L., Schuhmann W. i wsp.: Membrane-less biofuel cell based on cellobiose dehydrogenase (anode)/ laccase (cathode) wired via specific os-redox polymers. *Fuel Cells*, **9**, 53–62 (2009)
36. Van Hecke W., Bhagwat A., Ludwig R., Dewulf J., Haltrich D., Langenhove H.: Kinetic modeling of a bi-enzymatic system for efficient conversion of lactose to lactobionic acid. *Biotechnol. Bioeng.* **102**, 1475–1482 (2009)
37. Ortiz R., Ludwig R., Gorton L.: Highly efficient membraneless glucose bioanode based on *Corynascus thermophilus* cellobiose dehydrogenase on aryl diazonium-activated single-walled carbon nanotubes. *Chem. Electro. Chem.* **1**, 1948–1956 (2014)
38. Coman V., Ludwig R., Harreither W., Haltrich D., Gorton L., Ruzgas T., Shleev S.: A direct electron transfer-based glucose/oxygen biofuel cell operating in human serum. *Fuel Cells*, **10**, 9–16 (2010)
39. Bollella P., Mazzei F., Favero G., Fusco G., Ludwig R., Gorton L., Antiochia R.: Improved DET communication between cellobiose dehydrogenase and a gold electrode modified with a rigid self-assembled monolayer and green metal nanoparticles: The role of an ordered nanostructuring. *Biosens. Bioelectron.* **88**, 196–203 (2017)
40. Tasca F., Zafar N.M., Harreither W., Noll G., Ludwig R., Gorton L.: A third generation glucose biosensor based on cellobiose dehydrogenase from *Corynascus thermophilus* and single-walled carbon nanotubes. *Analyst*, **136**, 2033–2036 (2011)
41. Zafar M.N., Safina G., Ludwig R., Gorton L.: Characteristics of third-generation glucose biosensors based on *Corynascus thermophilus* cellobiose dehydrogenase immobilized on commercially available screen-printed electrodes working under physiological conditions. *Anal. Biochem.* **425**, 36–42 (2012)
42. Cipri A., Schulz C., Ludwig R., Gorton L., del Valle M.: A novel bio-electronic tongue using different cellobiose dehydrogenases to resolve mixtures of various sugars and interfering analytes. *Biosens. Bioelectron.* **79**, 515–521 (2016)
43. Coman V., Vaz-Dominguez C., Ludwig R., Harreither W., Haltrich D., De Lacey A., Ruzgas T., Gordon L., Shleev S.: A membrane-, mediator-, cofactor-less glucose/oxygen biofuel cell. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **10**, 6093–6096 (2008)
44. Harreither W., Coman V., Ludwig R., Haltrich D., Gorton L.: Investigation of graphite electrodes modified with cellobiose dehydrogenase from the Ascomycete *Myriococcum thermophilum*. *Electroanalysis*, **19**, 172–180 (2007)
45. Tasca F., Gorton L., Harreither W., Haltrich D., Ludwig R., Noll G.: Highly efficient and versatile anodes for biofuel cells based on cellobiose dehydrogenase from *Myriococcum thermophilum*. *J. Phys. Chem. C*, **112**, 13668–13673 (2008)
46. Pricelius S., Ludwig R., Lant N., Haltrich D., Guebitz G.M.: Substrate specificity of *Myriococcum thermophilum* cellobiose dehydrogenase on mono-, oligo-, and polysaccharides related to in situ production of H₂O₂. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**, 75–83 (2009)
47. Flitsch A., Prasetyo E.N., Sygmund C., Ludwig R., Nyanhongo G.S., Guebitz G.M.: Cellulose oxidation and bleaching processes based on recombinant *Myriococcum thermophilum* cellobiose dehydrogenase. *Enzyme. Microb. Technol.* **52**, 60–67 (2013)
48. Nyanhongo G.S., Sygmund C., Ludwig R., Prasetyo E.N., Guebitz G.M.: An antioxidant regenerating system for continuous quenching of free radicals in chronic wounds. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **83**, 396–404 (2013)
49. Thallinger B., Argirova M., Lesseva M., Ludwig R., Sygmund C., Schlick A., Nyanhongo G.S., Guebitz G.M.: Preventing microbial colonisation of catheters: antimicrobial and antibiofilm activities of cellobiose dehydrogenase. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **44**, 402–408 (2014)
50. Thallinger B., Brandauer M., Burger P., Sygmund C., Ludwig R., Ivanova K., Nyanhongo G.S., Guebitz G.M.: Cellobiose dehydrogenase functionalized urinary catheter as novel antibiofilm system. *J. Biomed. Mater. Res. – Part B Appl. Biomater.* **104**, 1448–1456 (2016)
51. Thallinger B., Prasetyo E.N., Nyanhongo G.S., Guebitz G.M.: Antimicrobial enzymes: an emerging strategy to fight microbes and microbial biofilms. *Biotechnol. J.* **8**, 97–109 (2013)
52. Prasetyo E.N., Rodriguez R.D., Lukesch B., Weiss S., Murkovic M., Katsoyannos E., Sygmund C., Ludwig R., Nyanhongo G.S., Guebitz G.M.: Laccase – cellobiose dehydrogenase-catalyzed detoxification of phenolic-rich olive processing residues. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* **12**, 1343–1352 (2015)
53. Krikstolaityte V., Lamberg P., Toscano M.D., Silow M., Eicher-Lorka O., Ramanavicius A., Niaura G., Abariute L., Ruzgas T., Shleev S.: Mediatorless carbohydrate/oxygen biofuel cells with improved cellobiose dehydrogenase based bioanode. *Fuel Cells*, **14**, 792–800 (2014)
54. Fährnich P., Irrgang K.: Conversion of cellulose to sugars and cellobionic acid by the extracellular enzyme system of *Chaetomium cellulolyticum*. *Biotechnol. Lett.* **4**, 775–780 (1982)
55. Hildebrand A., Kasuga T., Fan Z.: Production of cellobionate from cellulose using an engineered *Neurospora crassa* strain with laccase and redox mediator addition. *PLoS One*, **10**, DOI: 10.1371/journal.pone.0123006 (2015)
56. Lin H., Hildebrand A., Kasuga T., Fan Z.: Engineering *Neurospora crassa* for cellobionate production directly from cellulose without any enzyme addition. *Enzyme. Microb. Technol.* **99**, 25–31 (2017)
57. Hildebrand A., Bennett Addison J., Kasuga T., Fan Z.: Cellobionic acid inhibition of cellobiohydrolase I and cellobiose dehydrogenase. *Biochem. Eng. J.* **109**, 236–342 (2016)
58. McDonnell G., Russell A.D.: Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**, 147–179 (1999)
59. Nyanhongo G.S., Thallinger B., Guebitz G.M. Cellobiose dehydrogenase-based biomedical applications. *Process. Biochem.* **59**, 37–45 (2017)
60. Djeribi R., Bouchloukh W., Jouenne T., Mena B.: Characterization of bacterial biofilms formed on urinary catheters. *Am. J. Infect. Control.* **40**, 854–859 (2012)
61. Römling U., Balsalobre C.: Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *J. Intern. Med.* **272**, 541–561 (2012)
62. Soto S.M.: Importance of biofilms in urinary tract infections: new therapeutic approaches. *Adv. Biol.* DOI: 10.1155/2014/543974 (2014)
63. Lequette Y., Boels G., Clarisse M., Faille C.: Using enzymes to remove biofilms of bacterial isolates sampled in the food-industry. *Biofouling*, **26**, 421–431 (2010)
64. Stewart P.S., Costerton J.W.: Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet (London, England)*, **358**, 135–138 (2001)
65. Nyanhongo G.S., Sygmund C., Ludwig R., Prasetyo E.N., Guebitz G.M.: Synthesis of multifunctional bioresponsive polymers for the management of chronic wounds. *J. Biomed. Mater. Res. – Part B Appl. Biomater.* **101 B**: 882–891 (2013)
66. Alonso S., Rendueles M., Díaz M.: Bio-production of lactobionic acid: current status, applications and future prospects. *Biotechnol. Adv.* **31**, 1275–1291 (2013)
67. Varela O.: Oxidative reactions and degradations of sugars and polysaccharides. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **58**, 307–369 (2003)

68. Green B.A., Yu R.J., Van Scott E.J.: Clinical and cosmeceutical uses of hydroxyacids. *Clin. Dermatol.* **27**, 495–501 (2009)
69. Tasic-Kostov M., Savic S., Lukic M., Tamburic S., Pavlovic M., Vuleta G.: Lactobionic acid in a natural alkylpolyglucoside-based vehicle: assessing safety and efficacy aspects in comparison to glycolic acid. *J. Cosmet. Dermatol.* **9**, 3–10 (2010)
70. Baminger U., Ludwig R., Galhaup C., Leitner C., Kulbe K.D., Haltrich D.: Continuous enzymatic regeneration of redox mediators used in biotransformation reactions employing flavoproteins. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **11**, 541–550 (2001)
71. Miyamoto Y., Ooi T., Kinoshita S.: Production of lactobionic acid from whey by *Pseudomonas sp.* LS13-1. *Biotechnol. Lett.* **22**, 427–430 (2000)
72. Dhariwal A., Mavrov V., Schroeder I.: Production of lactobionic acid with process integrated electrochemical enzyme regeneration and optimisation of process variables using response surface methods (RSM). *J. Mol. Catal. B Enzym.* **42**, 64–69 (2006)
73. Fort S., Boyer V., Greffe L., Davies G.J., Moroz O., Christiansen L., Schulein M., Cottaz S., Driguez H.: Highly efficient synthesis of β (1 \rightarrow 4)-oligo- and -polysaccharides using a mutant cellulase. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 5429–5437 (2000)
74. Chaveriat L., Stasik I., Demailly G., Beaupère D.: The direct synthesis of 6-amino-6-deoxyaldonic acids as monomers for the preparation of polyhydroxylated nylon 6. *Tetrahedron: Asymmetry*, **17**, 1349–1354 (2006)
75. Markowiak P., Ślizewska K.: The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. *Gut Pathog.* DOI: 10.1186/s13099-018-0250-0 (2018)
76. Adamczak M., Bednarski W.: Enzymatyczna synteza galaktooligosacharydów i laktulozy w permeacie po ultrafiltracji serwatki. *Żywność Nauk. Technol. Jakość.* **6**, 105–117 (2008)
77. Drouault S., Anba J., Corthier G.: *Streptococcus thermophilus* is able to produce a β -galactosidase active during its transit in the digestive tract of germ-free mice. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 938–941 (2002)
78. Henriksson G., Johansson G., Pettersson G.: A critical review of cellobiose dehydrogenases. *J. Biotechnol.* **78**, 93–113 (2000)
79. Wingate K.G., Stuthridge T., Mansfield S.D.: Colour remediation of pulp mill effluent using purified fungal cellobiose dehydrogenase: reaction optimisation and mechanism of degradation. *Biotechnol. Bioeng.* **90**, 95–106 (2005)
80. Khromonygina V.V., Saltykova A.I., Vasilchenko L.G., Kozlov Y.P., Rabinovich M.L.: Degradation of the herbicide atrazine by the soil mycelial fungus INBI 2-26 (-), a producer of cellobiose dehydrogenase. *Appl. Biochem. Microbiol.* **40**, 285–290 (2004)
81. Frommhagen M., Westphal A.H., van Berkel W.J.H., Kabel M.A.: Distinct substrate specificities and electron-donating systems of fungal lytic polysaccharide monoxygenases. *Front. Microbiol.* DOI: 10.3389/fmicb.2018.01080 (2018)
82. Solna R., Dock E., Christenson A., Winther-Nielsen M., Carlsson C., Emmneus J., et al. Amperometric screen-printed biosensor arrays with co-immobilised oxidoreductases and cholinesterases. *Anal. Chim. Acta.* **528**, 9–19 (2005)
83. Ludwig R., Ortiz R., Schulz C., Harreither W., Sygmund C., Gorton L.: Cellobiose dehydrogenase modified electrodes: advances by materials science and biochemical engineering. *Anal. Bioanal. Chem.* **405**, 3637–3658 (2013)
84. Heller A.: Electrical connection of enzyme redox centers to electrodes. *J. Phys. Chem.* **96**, 3579–3587 (1992)
85. Bollella P., Gorton L., Antiochia R.: Direct electron transfer of dehydrogenases for development of 3rd generation biosensors and enzymatic fuel cells. *Sensors*, DOI: 10.3390/s18051319 (2018)
86. Wollenberger U., Lisdat F., Rose A., Streffer K.: Phenolic biosensors (w) Bioelectrochemistry: Fundamentals, Experimental Techniques and Applications, red. Bartlett P., John Wiley and Sons, DOI: 10.1002/9780470753842, 2008
87. del Valle M.: Electronic tongues employing electrochemical sensors. *Electroanalysis*, **22**, 1539–1555 (2010)
88. Ciosek P., Wróblewski W.: Sensor arrays for liquid sensing – electronic tongue systems. *Analyst*, **132**, 963–978 (2007)
89. Riul A., Dantas C.A.R., Miyazaki C.M., Oliveira O.N.: Recent advances in electronic tongues. *Analyst*, **135**, 2481–2495 (2010)
90. Cooney M.J., Svoboda V., Lau C., Martin G., Minteer S.D.: Enzyme catalysed biofuel cells. *Energy Environ. Sci.* **1**, 320–337 (2008)
91. Xiao X., Xia H., Wu R., Bai L., Yan L., Magner E., Cosnier S., Lojou E., Zhu Z., Liu A.: Tackling the challenges of enzymatic (bio) fuel cells. *Chem. Rev.* DOI: 10.1021/acs.chemrev.9b00115 (2019)
92. Falk M., Andoralov V., Blum Z., Sotres J., Suyatin D.B., Ruzgas T., Arnebrant T., Shleev S.: Biofuel cell as a power source for electronic contact lenses. *Biosens. Bioelectron.* **37**, 38–45 (2012)