

Enzimológia

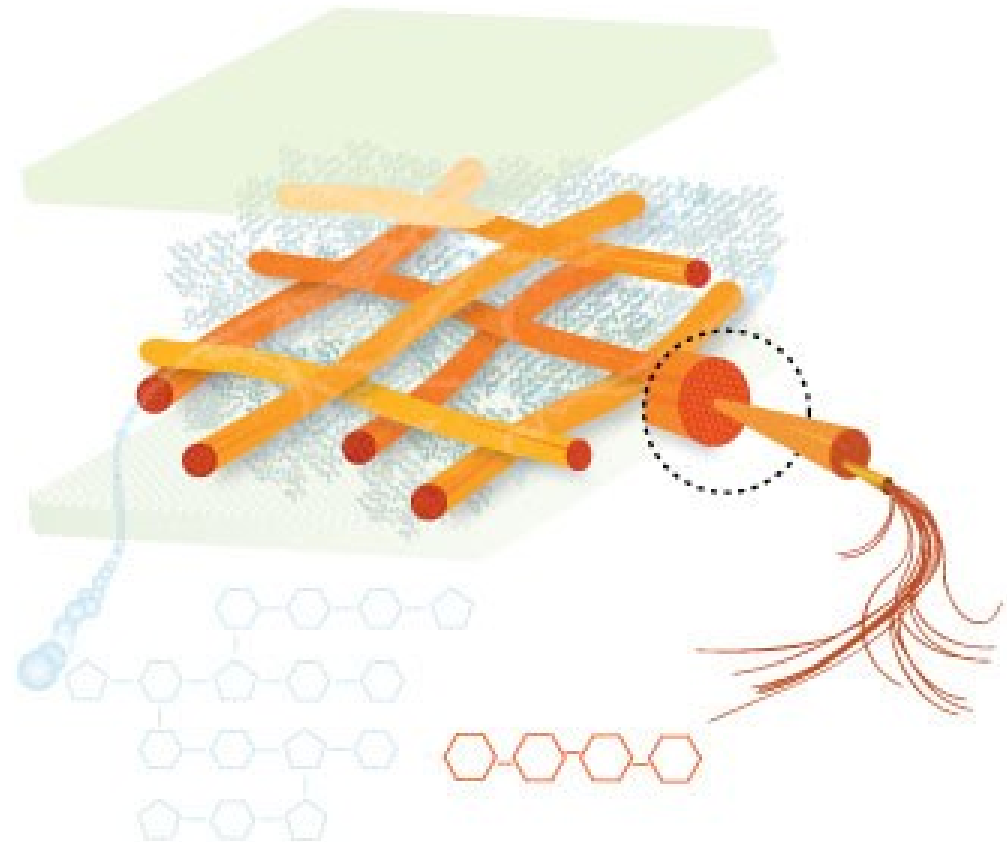
Celluláz enzimek

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék



Cellulóz

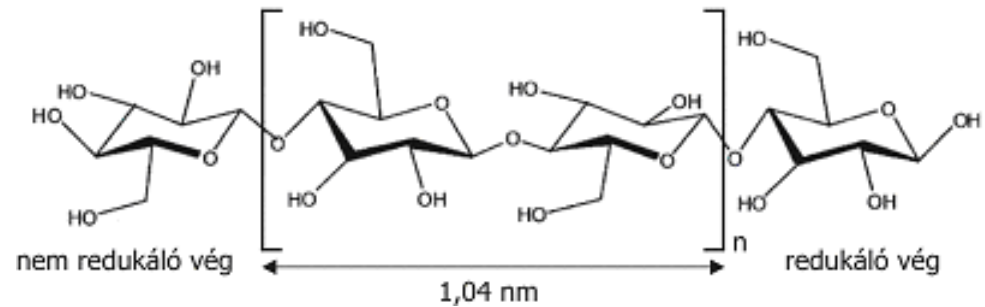
- lineáris homopolimer
- monomer: **glükóz**
- **β -1,4-es kötés**
- egy-egy cellulózlánc hossza **2.000-15.000 glükóz egység** (DP, polimerizációs fok)
- a fa szárazanyag-tartalmának **35-50%**-át teszi ki
- az elsődleges sejt falban és a
- a többrétegű másodlagos sejt falban is
a fibrillák eltérő orientációt mutatnak a másodlagos sejt fal egyes rétegeiben





Cellulóz

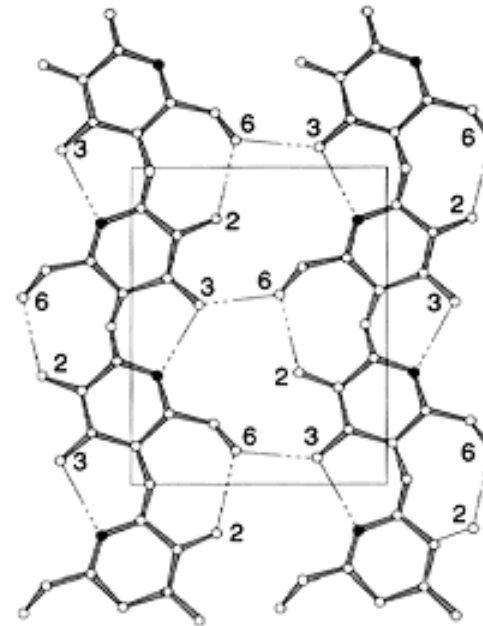
- monomer: **glükóz**
- egymáshoz képest 180°-kal elfordulva
- ismétlődő egység: **cellobióz**





Cellulóz

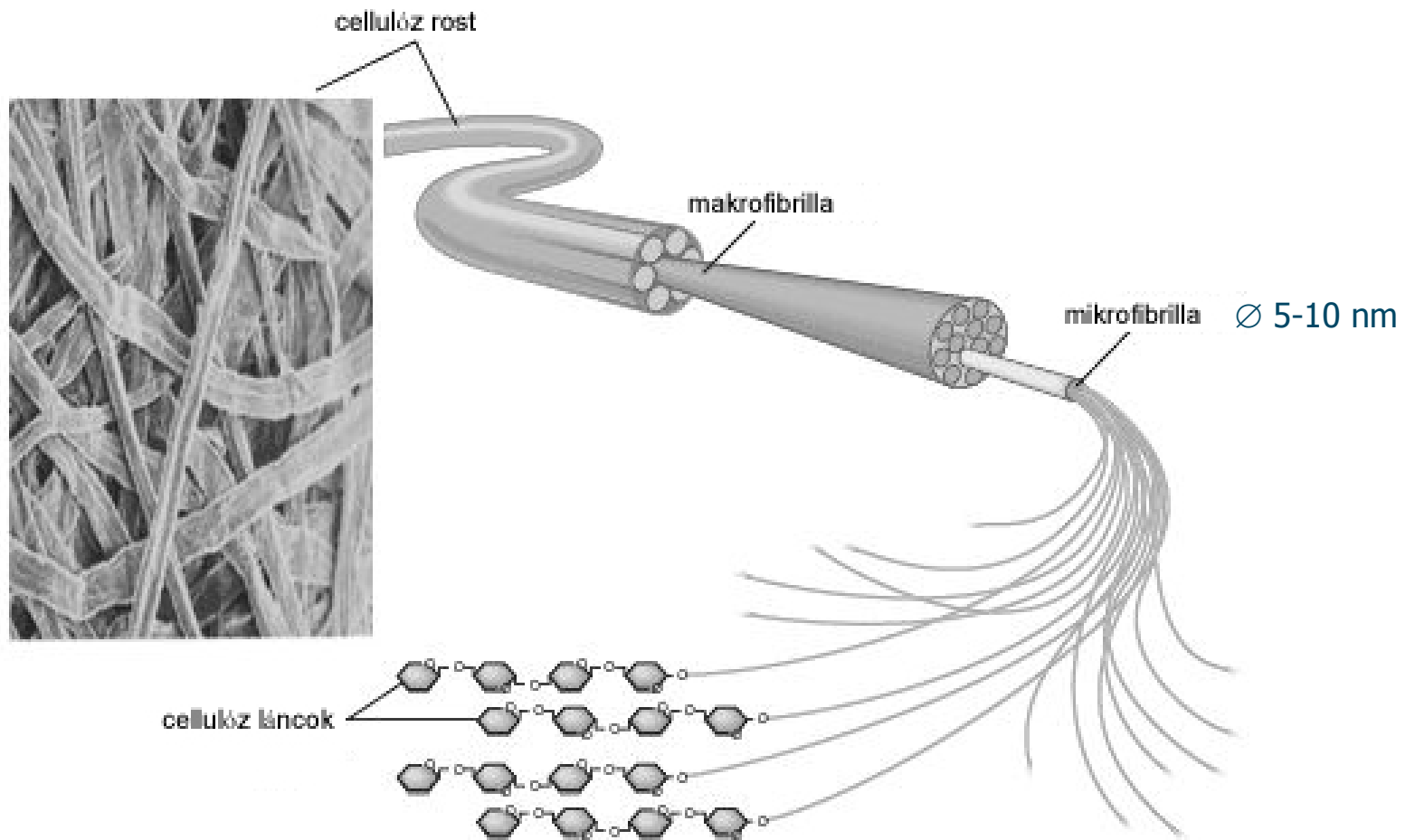
- szomszédos cellulózláncok között
H-kötések és **van der Waal's erők**
- láncon belül:
intramolekuláris H-kötések
- nagy számban:
rendezett **kristályos** szerkezet
kevésbé rendezett:
amorf, kevésbé ellenálló
- kristályosság foka
= f (növény)
ált. 50-90%
kristályossági index CI 0.5-0.9





Cellulóz

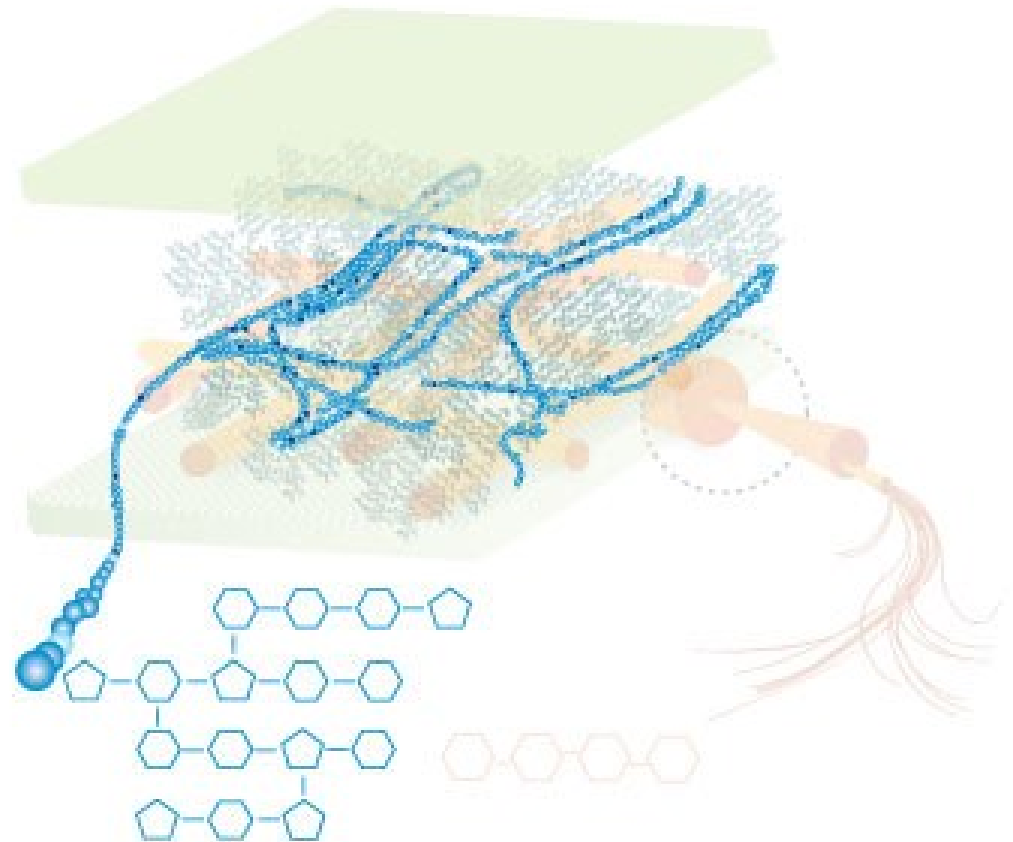
Cellulose





Hemicellulóz

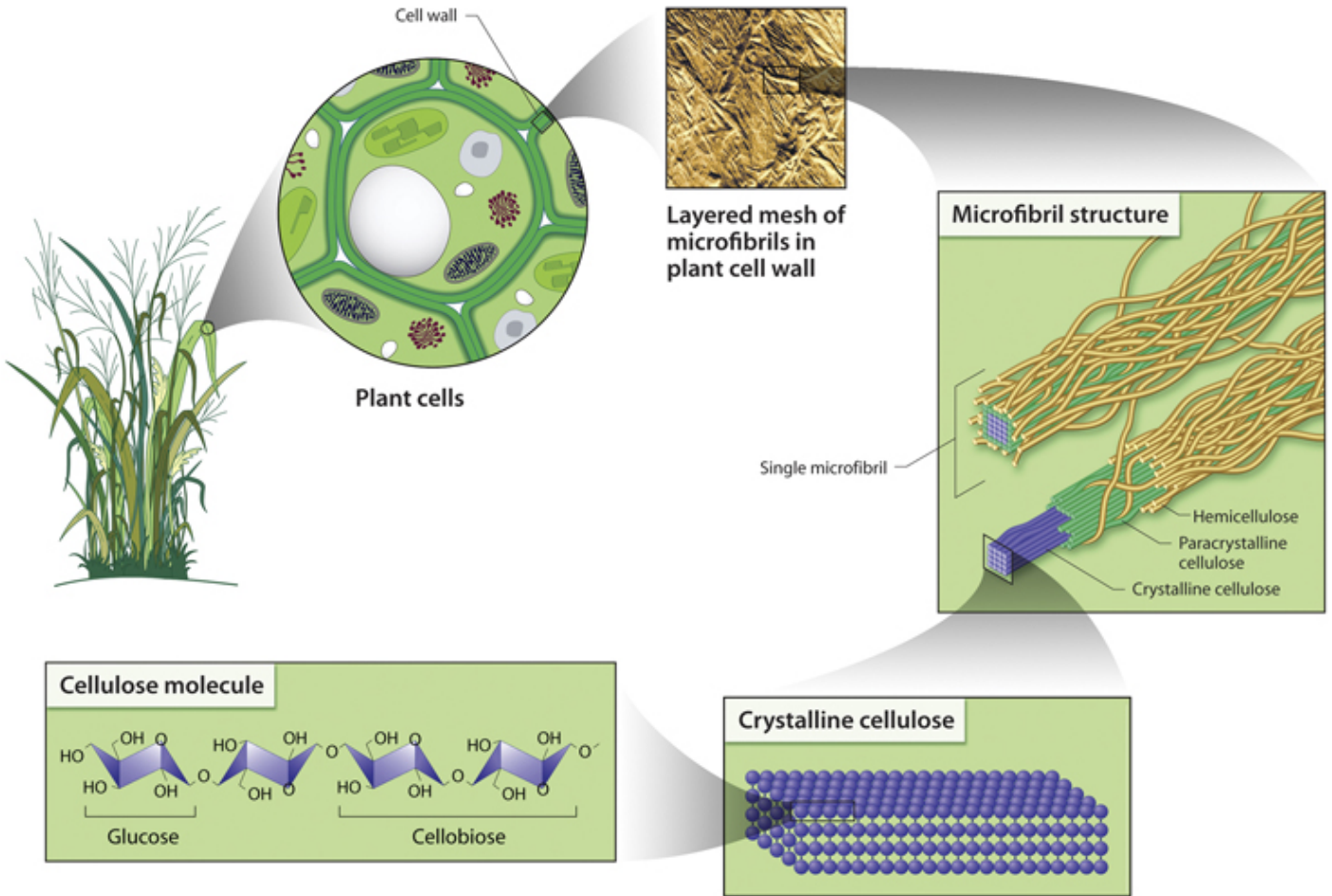
- **alkáli-oldható** növényi poliszacharidok
- **elágazó heteropolimerek**
- monomer: glükóz, xilóz, mannóz, galaktóz, arabinóz
- acetyl-, metil-csoportok
- vázban β -**1,4** (néha **1,3**) kötés oldalláncnál α -**1,2**; **1,3**; **1,6**
- egy-egy polimerlánc hossza **100-200** monomer egység (**DP**, polimerizációs fok)
- a fa szárazanyag-tartalmának **15-25%**-át teszi ki
- főleg az elsődleges sejtfalban
- cellulózzal H-kötés (és van der Waal's) kapcsolat





Növényi sejtfal

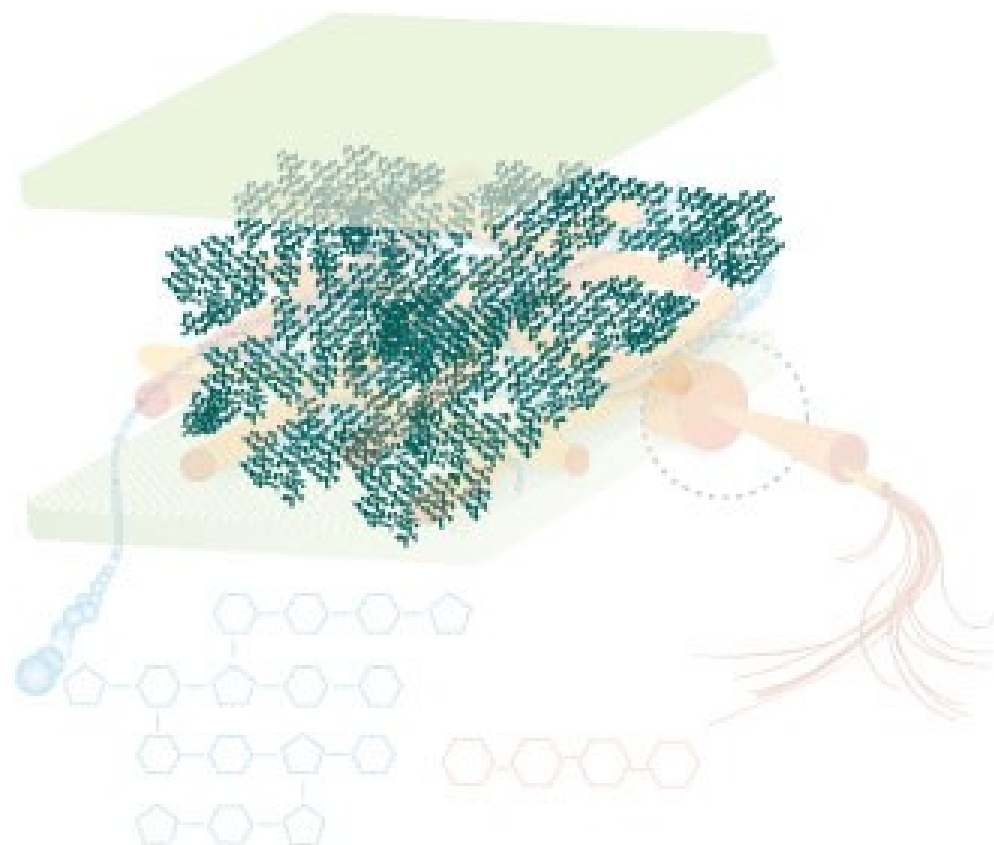
Plant cell wall





Lignin

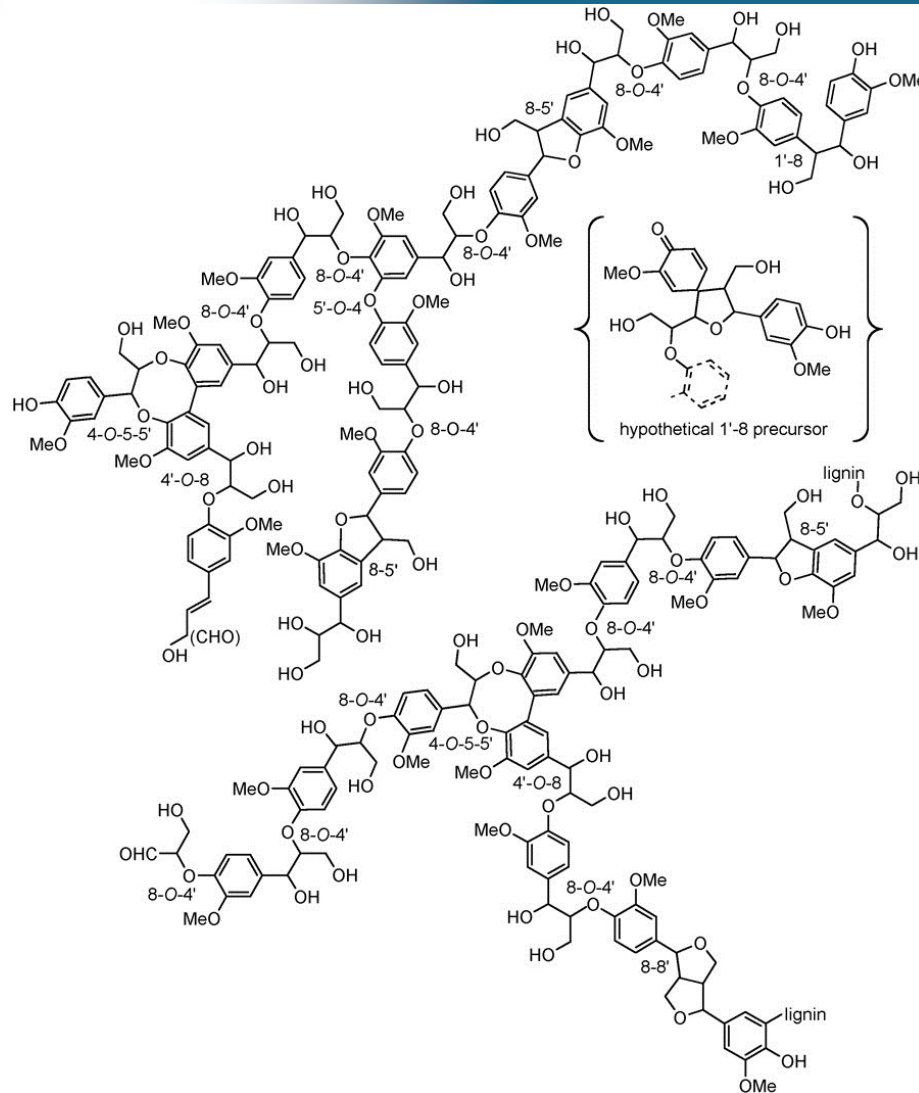
- szilárd, ellenálló
- **hidrofób makromolekula**
- **fenil-propán váz**
- felépítésében 3 fahéj-alkohol származék vesz részt:
 - p-kumáralkohol
 - koniferilalkohol
 - szinapilalkohol
- dehidrogenáz → makromolekuláris lignin
- észter kötések
- tűlevelű és keményfa esetén eltérő számú metoxi-csoport
- a fa szárazanyag-tartalmának **20-25%-át teszi ki**
- észterkötések a hemicellulózokkal





Lehetséges lignin szerkezet

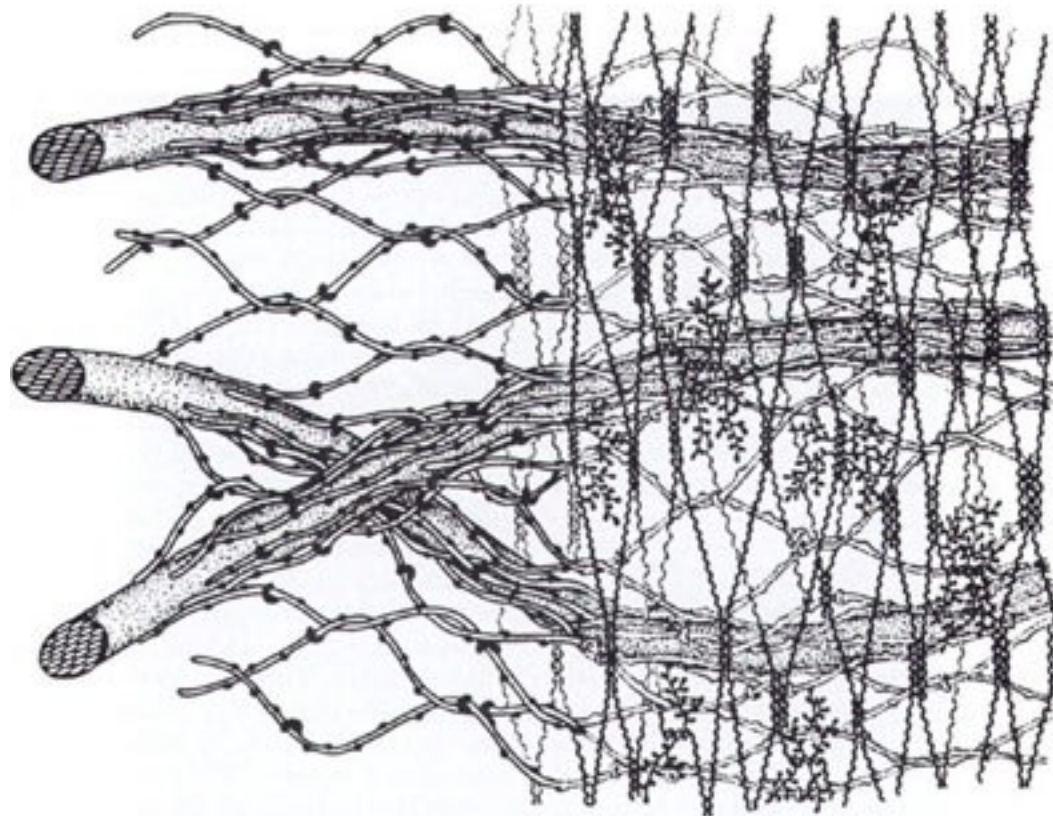
Possible lignin structure



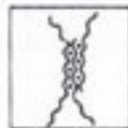


Elsődleges sejtfal

Primary cell wall



Xyloglucan



PGA junction zone



RG I with arabinogalactan side-chains

Elsődleges sejtfal

- **egyrétegű**
- a cellulóz fibrillák orientációja rendezetlen
- **fiatal sejtekre** jellemző
- **80-90% poliszacharid**
 - cellulóz
 - hemicellulóz (glükánok)
 - pektin
 - PGA – poligalakturonsav
 - RG - ramnogalakturonán
- **10-20% fehérje**

Másodlagos sejtfal

Secondary cell wall

Másodlagos sejtfal

- **többrétegű**
- a cellulóz fibrillák orientációja rétegenként **rendezett**
- **érett sejtekre jellemző**
- kevesebb pektin
- több **cellulóz**
- más felépítésű **hemicellulózok** (xilánok)
- **lignin**

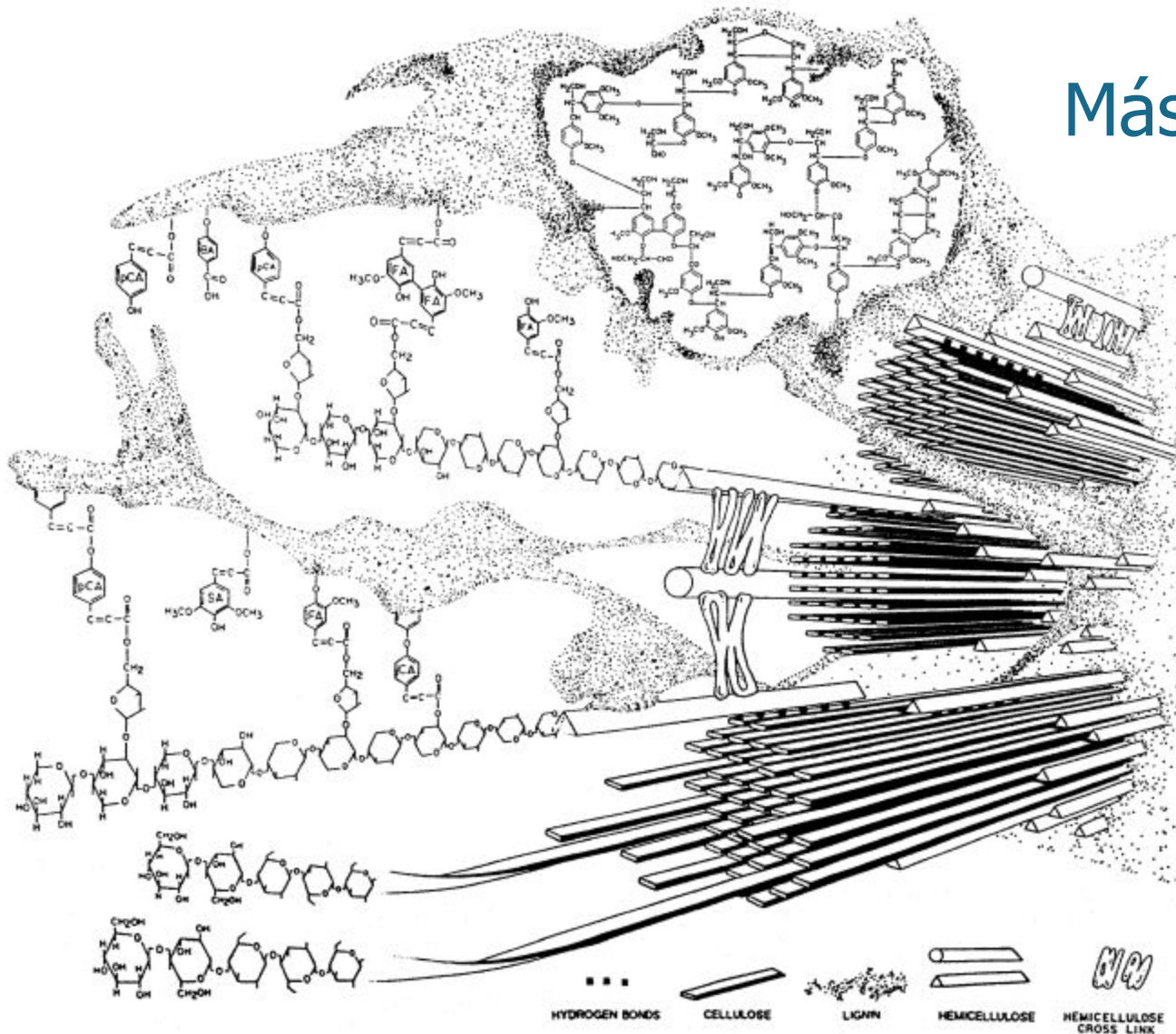
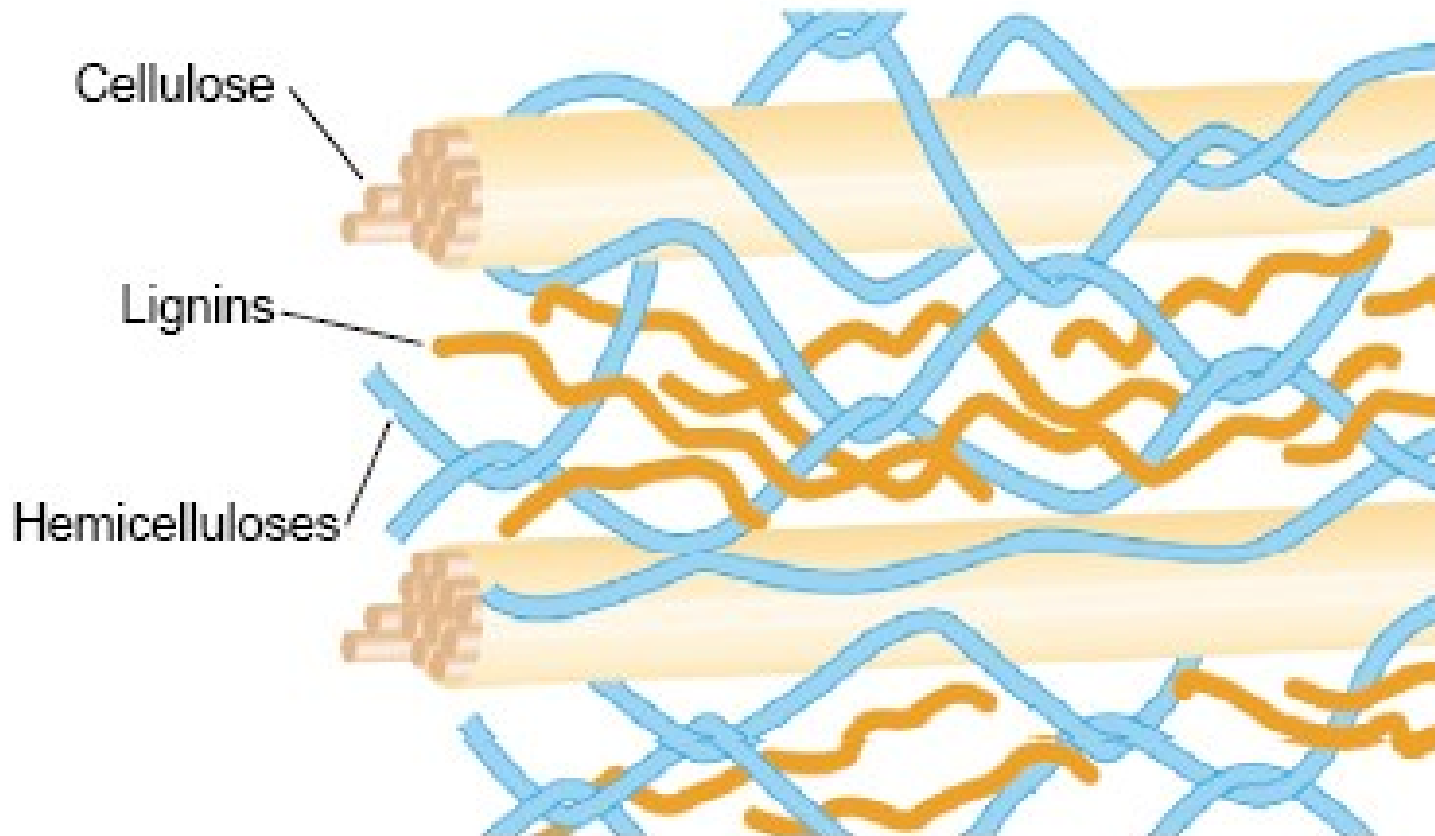


Figure 1. Secondary cell-wall (CW) structure. Components are arranged so that the cellulose microfibrils and hemicellulosic chains are embedded in lignin. Specific linkages and components of non-core lignin are shown for a generalized grass secondary CW. Non-core lignin components include *p*-coumaric (*pCA*), ferulic (*FA*), *p*-hydroxybenzoic (*BA*), sinapic (*SA*), and cinnamic (*CA*) acids.



Lignocellulózok szerkezete





Celluláz termelő mikroorganizmusok

Baktériumok:

- Aerob: *Pseudomonas*, *Actinomyces*
- Fakultatív aerob: *Bacillus*, *Cellulomonas*
- Anaerob: *Clostridium*

Gombák:

- Aerob: ***Trichoderma***, ***Penicillium***, ***Aspergillus***, ***Sporotrichum***,



***Trichoderma reesei* RUTC30**

- lágy rothasztó gomba
- mutáns törzs (jobb celluláz termelés)

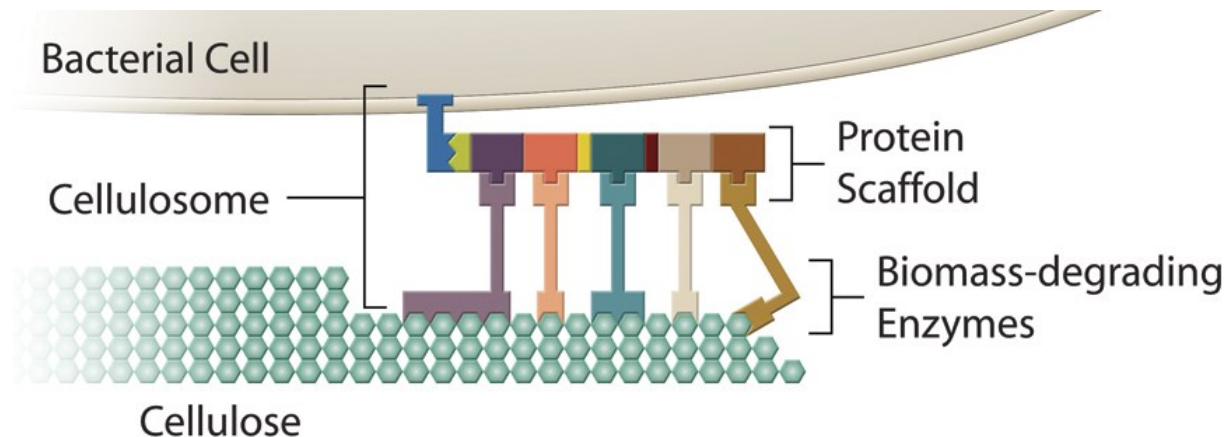


A lignocellulóz **mikrobiális** bontása

Microbial lignocellulolytic machinery

Baktériumok

- sejthez kötött enzimek, **celluloszóma**: multienzim komplex
- mind cellulóz-, mind hemicellulóz-bontó enzimek
- pl. *Clostridium thermocellum*
- a glikozid-hidrolázok egy tartó-fehérjéhez kapcsolódnak, mely egyidejűleg a cellulóz felszínéhez és a baktérium sejthez is kötődik
- a szinergizmusban működő enzimek optimálisan helyezkednek el
- a sejt-szubsztrát kapcsolatnak köszönhetően a termék a baktérium sejt közelében képződik





A lignocellulóz mikrobiális bontása

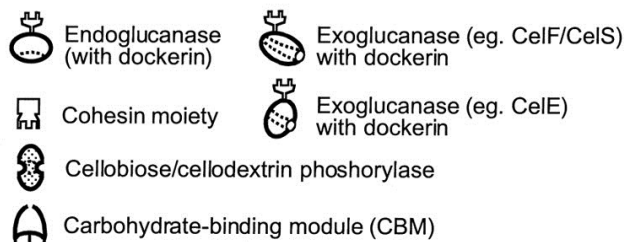
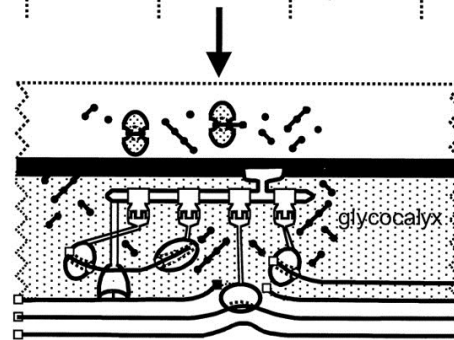
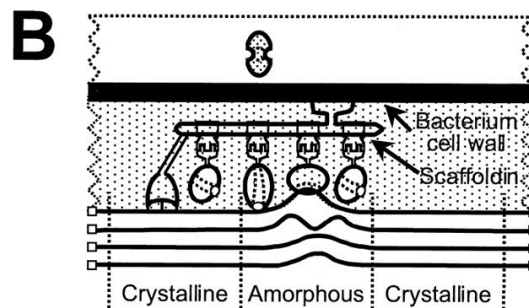
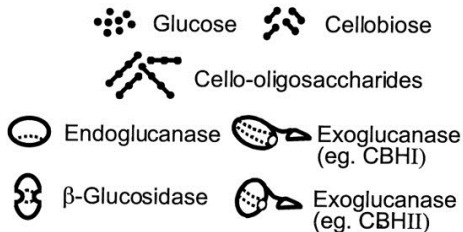
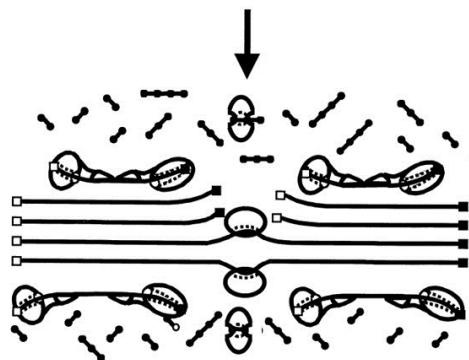
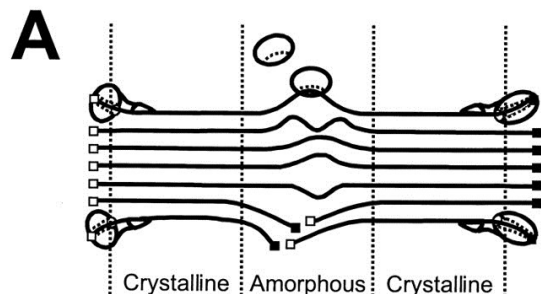
Microbial lignocellulolytic machinery

Gombák

- gombafajok széles spektrumára jellemző
- *Trichoderma*, *Penicillium* és *Aspergillus* fajok
- Mandels és Sternberg 14.000 gombafaj gyűjtése és jellemzése
- a legtöbb gomba az általa termelt cellulolitikus enzimeket kiválasztja
→ **extracelluláris**
⇒ szélesebb körben vizsgált
- a fa lebontásában szerepet játszó gombafajok
 - lág,
 - barna és
 - fehér korhadást okozó gombák
- lág és barna: a lignint nem vagy csak kismértékben képesek lebontani
- fehér: a lignin teljes lebontása oxidatív úton
lignin-peroxidáz, mangán-peroxidáz, H₂O₂-képző enzimek (glükóz-oxidáz), lakkázok

A lignocellulóz mikrobiális/enzimes bontása

Microbial lignocellulolytic machinery



Schematic representation of the hydrolysis of amorphous and microcrystalline cellulose by noncomplexed (A) and complexed (B) **cellulase systems**. The solid squares represent **reducing ends**, and the open squares represent nonreducing ends. **Amorphous** and **crystalline** regions are indicated. Cellulose, enzymes, and hydrolytic products are not shown to scale.



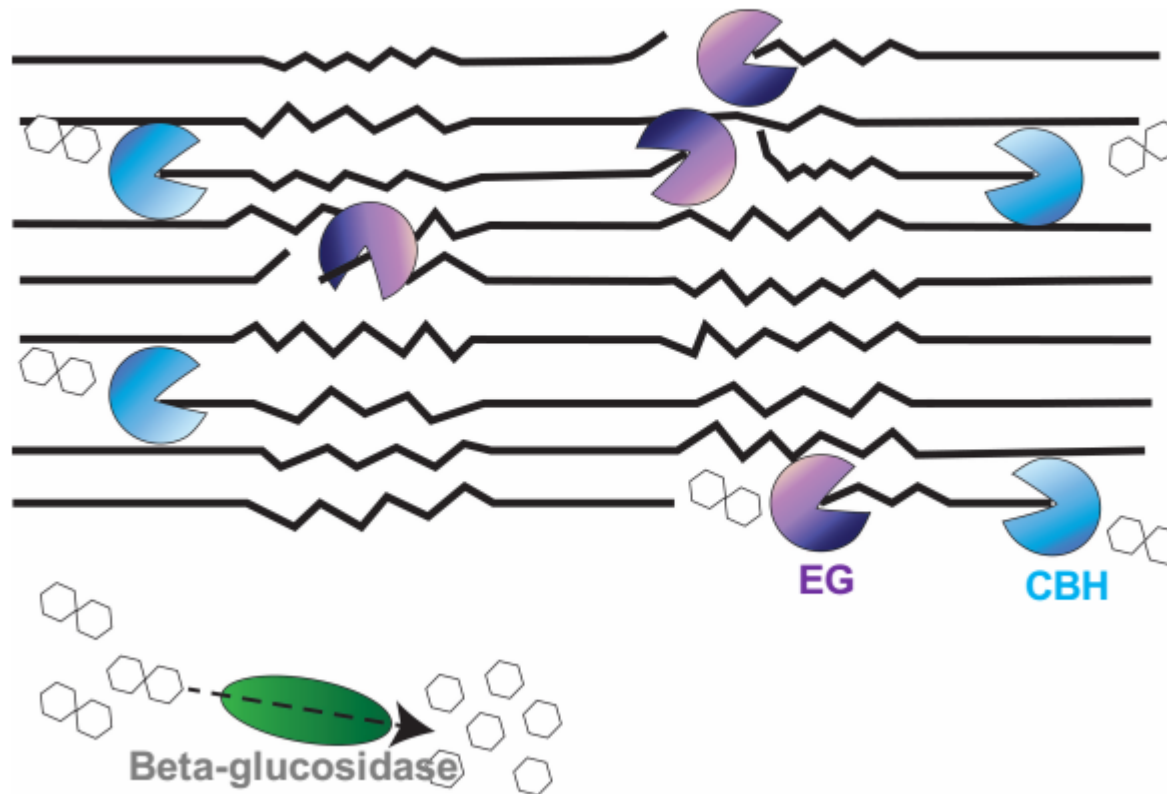
Celluláz enzimrendszer

Enzim neve	EC kód	További elnevezések	Működés
Endo-(1,4)- β -D-glükanáz	EC 3.2.1.4	Endoglükanáz (EG I és II)	Az amorf cellulózt és cellulodextrineket támadják véletlenszerűen.
Exo-(1,4)- β -D-glükanáz	EC 3.2.1.91	Cellobiohidroláz (CBH I és II)	A kristályos cellulózt támadják, cellobiózt hasítanak le a molekula végéről.
1,4- β -D-glükózidáz	EC 3.2.1.21	Cellobiáz	Cellobiózból glükózt szabadít fel.

A lignocellulóz mikrobiális/enzimes bontása

Microbial lignocellulolytic machinery

Enzymatic hydrolysis of cellulose



A lignocellulóz mikrobiális/enzimes bontása

Microbial lignocellulolytic machinery

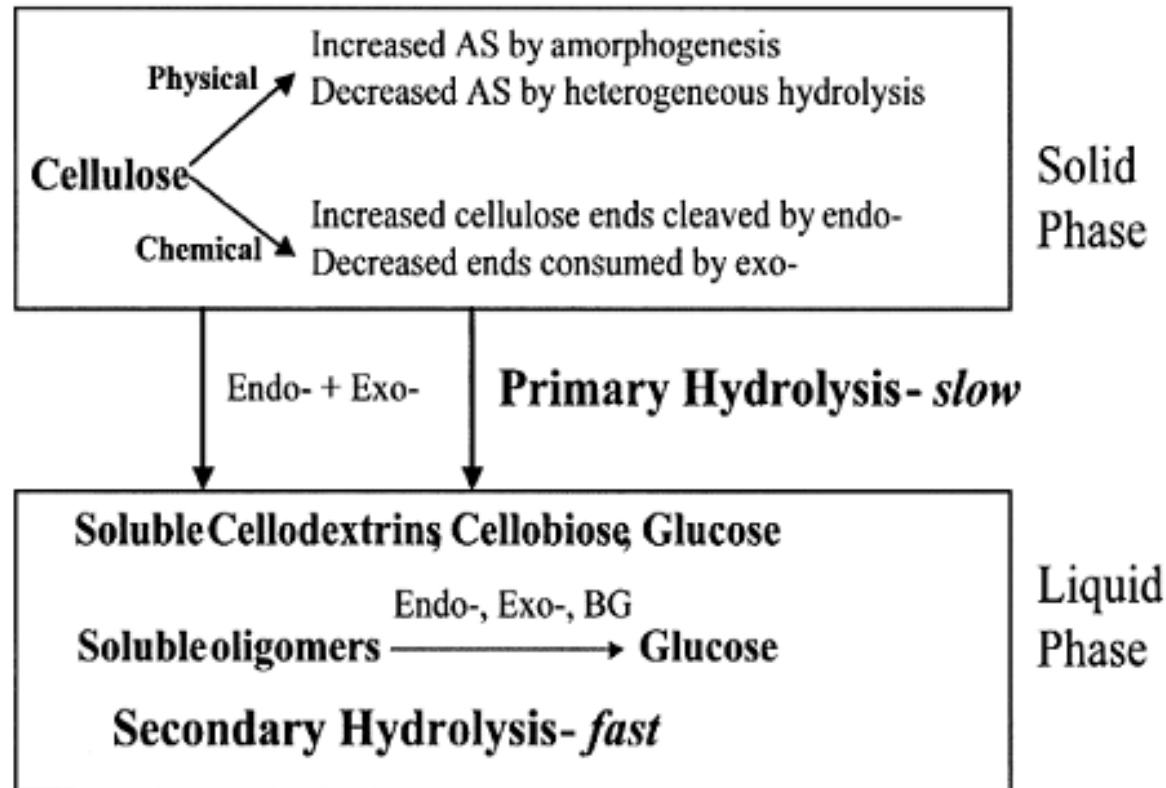


Figure 3. Mechanistic hypothesis of enzymatic hydrolysis for cellulose by *T. reesei* cellulase.



Hogyan mérjük az enzimek mennyiségét?

Enzimaktivitás, az enzimek legfontosabb tulajdonsága

IUPAC 1 Ee:

1 ml enzimoldat

1 μ mol termék képződését katalizálja

1 perc alatt



- 1.) Laktóz + H₂O $\xrightarrow{\beta\text{-galaktozidáz}}$ glükóz + galaktóz
- 2.) Keményítő + H₂O $\xrightarrow{\alpha\text{-amiláz}}$ n glükóz
- 3.) cellobióz + H₂O $\xrightarrow{\beta\text{-glükozidáz}}$ 2 glükóz

Enzim aktivitás meghatározásához definiálni kell a **körülményeket**:

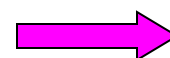
E, S, T, pH, t, Termék

Celluláz aktivitás mérése



Probléma:

- komplex celluláz rendszerek
- heterogén cellulóz szubsztrátok.



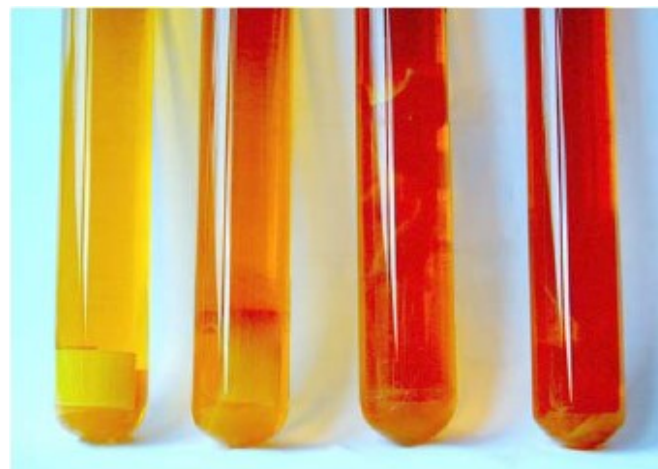
Különböző mérési módszerek.

1984. IUPAC: Standard mérési módszerek kidolgozása.

FPA (Filter Paper Activity)

CMC-áz

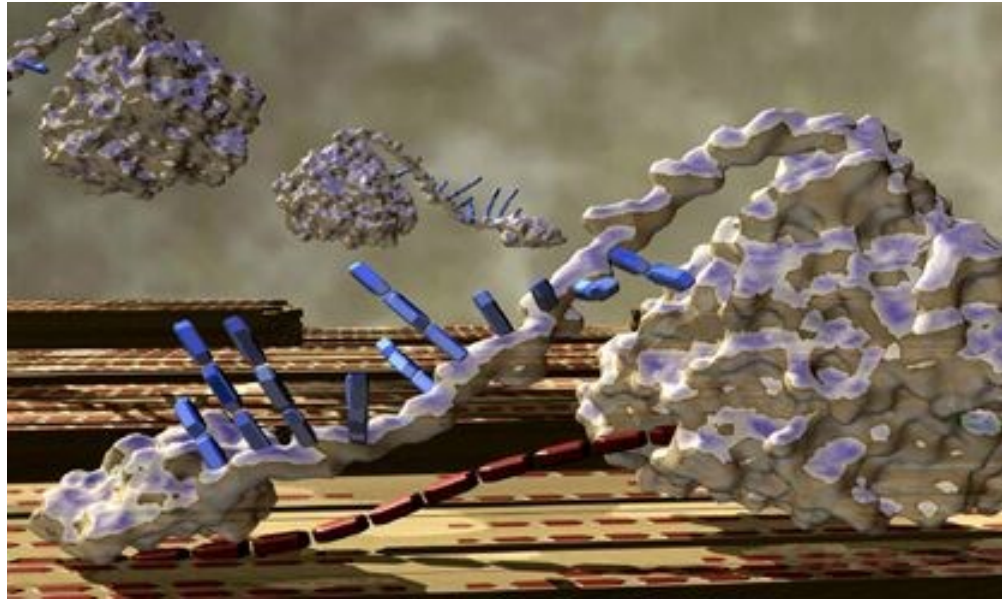
Termék redukáló cukortartalom meghatározása DNS módszerrel





Domén szerkezet

szubsztrát-kötő domén – kapocs régió – katalitikus domén



A cellulóz-kötő domén (CBD/CBM) szerepe:

- nem csak a kristályos cellulózhoz való kötődés (a katalitikus domén is adszorbeálódik)
- a kristályos szerkezet fellazítása - az egyes cellulóz láncok „kiemelése” a rendezett szerkezetből, mely ezáltal hozzáférhetővé válik a CD számára



Cellulázok csoportosítása

Classification of cellulases

A hasítás helye szerint / By type of reaction catalyzed

- Exoglükánázok / cellobiohidrolázok (CBH) Enzyme Commission: EC 3.2.1.91
- Endoglükánázok (EG) EC 3.2.1.4
- β -glükozidázok (BGL) / cellobiázok EC 3.2.1.21

Termelő szervezetek szerint / Occurance

- gomba eredetű / fungal
- bakteriális eredetű / bacterial

A katalitikus alegység aminosav sorrendje szerint / AA sequence of CD

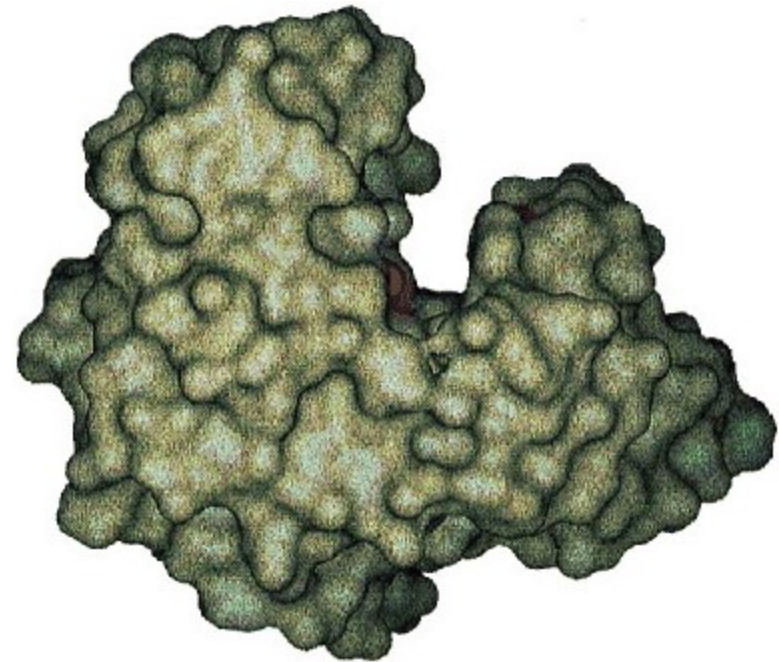
- glikozid-hidroláz enzimek csoportosítása
- tükrözi a szerkezeti homológiát és az egyes enzimek közti fejlődéstörténeti kapcsolatot
- <http://www.cazy.org/>
- jelenleg 118 GH családot különböztetnek meg
- a családokon belül
 - azonos elrendezésű enzim molekulák
 - a katalitikus AA-maradékok helyzete egységes
 - nem csak endo- ill. exoenzimeket tartalmaznak (molekula-szerkezet \neq hasítási mód)



Endoglükánázok

Endoglucanases

- **aktív centrum** a katalitikus domén **árokszerű** részében
- **random** hasítás
(néhány processzív módon)
- **amorf cellulóz**, oligomerek, cellulózszármazékok hidrolízise
- egy adott mikroba által termelt többféle EG: eltérő pI érték, méret, CBD megléte/hiánya
- glikozilált enzimek
- méret kb. 4x4x2 nm
1 glükóz egység kb. 0.5 nm
⇒ kb. 10 glükóz egység hosszúak

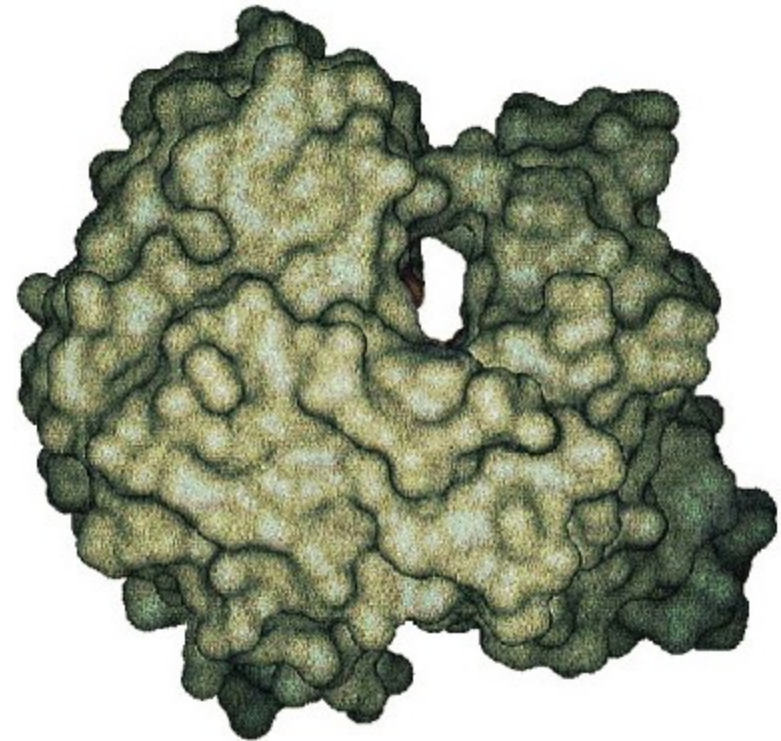




Cellobiohidrolázok

Cellobiohydrolases

- aktív **kristályos cellulózon**
itt a **CBD szerepe** meghatározó
- **processzív** működés
a láncon folyamatosan haladva
- lassú DP csökkenés
- **aktív centrum az „alagútban”**
bizonyos körülmények között felnyílhat
endo aktivitást eredményezve
- fő termék: **cellobióz**
kis mennyiségben: glükóz és cellotrióz
- két csoport:
redukáló vagy **nem-redukáló** végről
- **Trichoderma** legnagyobb mennyiségben
termelt celluláza
- cellobióz **termékinhibíció**
- glikozilált enzimek





β -glükózidázok

β -glucosidas

- **cellulózon nem aktív**
- **cellobióz (és DP 3-6) hidrolízise**
 - ⇒ CBH és EG termékgátlás csökkentése
- transzglykolízis (glikozidkötés létrehozása)
- szerep a celluláz indukcióban
- Trichoderma kis mennyiségben termeli
gyakran elégtelen mennyiségben
 - ⇒ **általában a cellulázok külső BGL kiegészítést igényelnek**



Trichoderma reesei

***Trichoderma* fonalas gombafajok**

- a talaj domináns mikroorganizmusai szinte minden éghajlaton
- legtöbb *Trichoderma* törzs aszexuális spórákkal szaporodik, teleomorfja a *Hypocrea* (aszkomicitesz nemzetség)

***Trichoderma reesei* mezofil lágy-korhasztó gomba**

- talajban és növényi hulladékon
- egyike a legjobb extracelluláris celluláz-termelőknek, széles körben tanulmányozott
- II. világháború idején izolálták, vad típusú törzse: **QM6a**
- eredeti elnevezése: *Trichoderma viride*, de a törzs eltér, új fajként, *T. reesei* néven azonosították
- A *Trichoderma reesei* anamorf (ivartalan szaporodás), teleomorf (ivaros szaporodás) párja: *Hypocrea jecorina*
- legtöbbet alkalmazott *T. reesei* törzsek:
 - **QM9414 mutáns** (ATCC 26921): 1970-es évek elején izolálták a QM6a-hoz képest kétszeres enzimaktivitás és produktivitás
 - **Rut C30 mutáns** (ATCC 56765): produktivitása jelentősen meghaladja a QM6a-ét a celluláz-expresszió nem glükóz-represszált ⇒ glükóz-tartalmú táptalajon is termel cellulázt



Trichoderma reesei cellulázok

Cellobiohidrolázok (CBH)

CBHI (Cel7A, Swiss-Prot P62694)

- *T. reesei* teljes expresszált cellulázok **közel 60%-a**
- a cellulózlánc **redukáló** végéről indul
- CD: 10 kötőhely, alagútja kb. 50 Å hosszú
- **terméke kristályos cellulózon:** cellobióz (80-90%), glükóz (10-15%), cellotrióz (néhány %)

CBHII (Cel6A, Swiss-Prot P07987)

- a *T. reesei* által termelt cellulolitikus enzimek **kb. 20%-a**
- a cellulózlánc **nem-redukáló végére** specifikus
- kevésbé processzív mint a CBHI
- CD: 4 kötőhely, alagútja kb. 20 Å hosszú



Trichoderma reesei cellulázok

Endoglükanázok (EG)

EGI (Cel7B, Swiss-Prot P07981)

- *a T. reesei* teljes expresszált cellulázok közel **5-10%-a**
- **oldható cellulóz-származékokon** (CMC, HEC) mutatja fő aktivitását (glikozil-transzferáz és xilanáz aktivitás is)
- CD: 4 kötőhely, AA sorrend nagyfokú homológia a CBHI (Cel7A)-ével (kb. 45% azonosság)

EGII (Cel5A, Swiss-Prot P07982, eredetileg EGIII-ként jelölve)

- termelt mennyisége *a T. reesei* cellulázok **1-10%-a**
- glikoprotein, a molekula 15%-át szénhidrát teszi ki
- teljes aktivitás **oldható szubsztrátokon**, jelentősen csökkent aktivitást mikrokrisztályos cellulózon
- CD: 5 kötőhely

EGIII (Cel12A, Swiss-Prot O00095)

- termelt mennyisége csupán tized %-a a teljes celluláz proteineknek
- **nem rendelkezik CBD-vel és linker régióval**
- kapcsolódó szénhidrát nincs a fehérjén, nem glikoprotein
- kis molekulatömeg
- semleges (neutrális) izoelektromos pont (pI)

EGIV, EGV



Trichoderma reesei cellulázok

β -glükózidázok (BGL)

BGLI (Cel3A)

- **extracelluláris cellobiáz**
- >50% a sejtfalhoz kötve marad
- katalizálja a cellobióz hidrolízisét, cellooligoszacharidok nem redukáló végéről glükóz egységeket hasít le
- mennyiségének növelése a cellulóz bontása során növeli a redukáló cukor keletkezésének sebességét \Rightarrow a teljes celluláz komplex β -glükózidáz aktivitása limitálja a cellulóz teljes hidrolízisét
- szerepet játszik az **oldható inducer keletkezésében** (szoforóz)

BGLII (Cel1A)

- **intracelluláris β -glükózidáz**
- a cellobióz mellett hidrolizálja a cellotriózt és -tetraózt, kis mértékben a szoforózt is bontja
- cellotetraózból glükóz és cellotrióz \Rightarrow nem bontja a belső, **csak a szélső glikozidos kötést**
- transzglykoziláz aktivitással rendelkezik, a cellobiózból elsősorban cellotriózt, glükózból szoforózt és cellobiózt állít elő
- semleges pH optimum (\leftrightarrow extracelluláris *T. reesei* cellulázok)



Trichoderma reesei

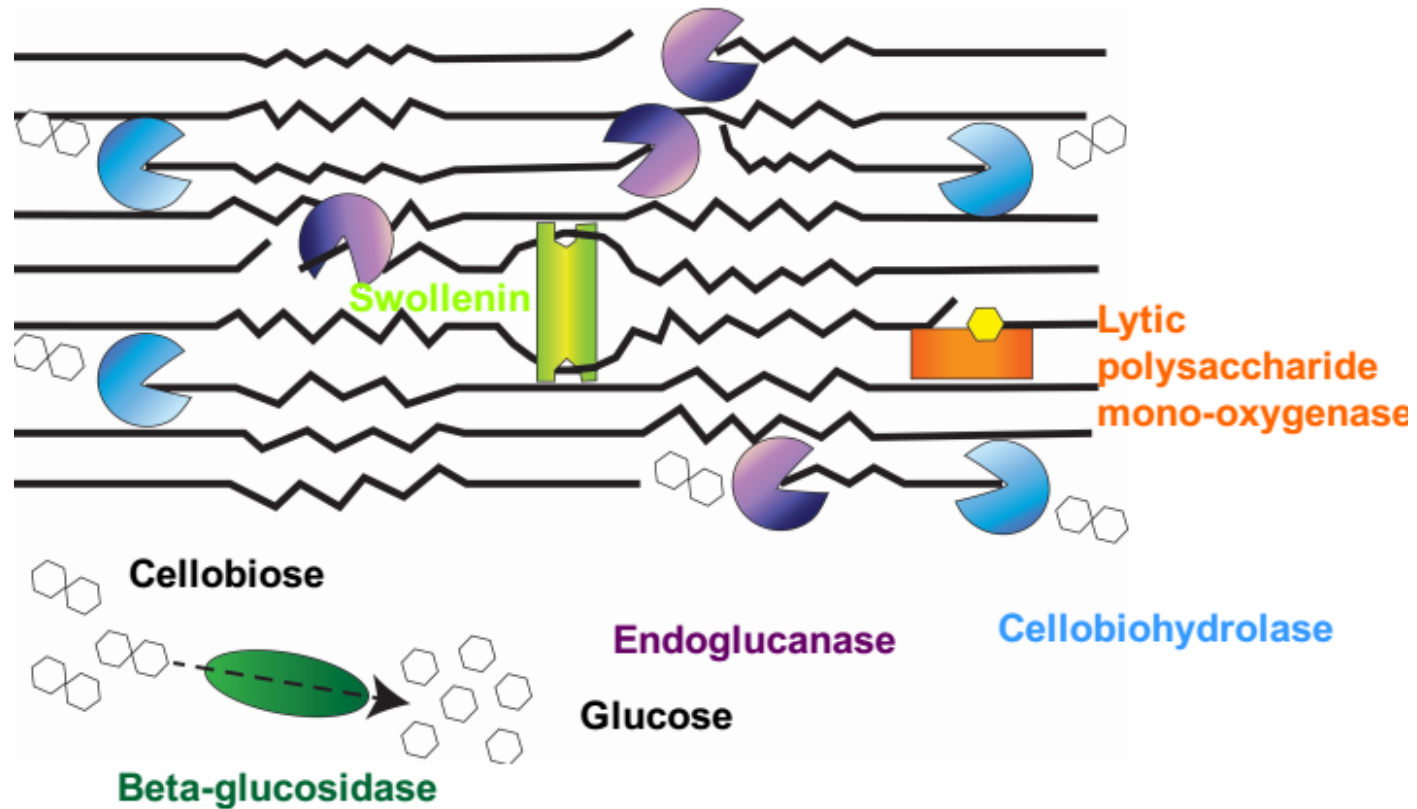
Optimális sejtnövekedési hőmérséklet: 32-35°C, enzimtermelés: 25-28°C.
Általában 28 °C-on végzik a fermentációt.

indukálni kell az enzimtermelést, lehetséges induktorok:
cellulóz, cellobióz, laktóz, szoforóz (glükóz diszaharid β -1,2-kötéssel).

- pH optimum: 4,8-6,0 között.
- Életciklusa: lag, exponenciálisan növekvő (pH~3), stacionárius és hanyatló fázis. A fermentáció 4-5. napja körül az enzimaktivitás állandósul. A kezdeti szakaszban alacsony β -glükozidáz aktivitás mérhető.
- Az extracelluláris enzimek aggregátumot képezhetnek. (Hat fehérjéből áll, celluláz, β -glükozidáz és xilanáz aktivitást mutat.)



The new paradigm for cellulose hydrolysis





Lytic polysaccharide mono-oxygenase

- Oxidative action that depends on the presence of divalent metal ions and an electron donor
- Flat substrate-binding surface
- Capable of cleaving crystalline cellulose
- Bacterial LPMOs classified as CMB33, now reclassified to AA10
- Fungal LPMOs classified as GH61, now classified to AA9

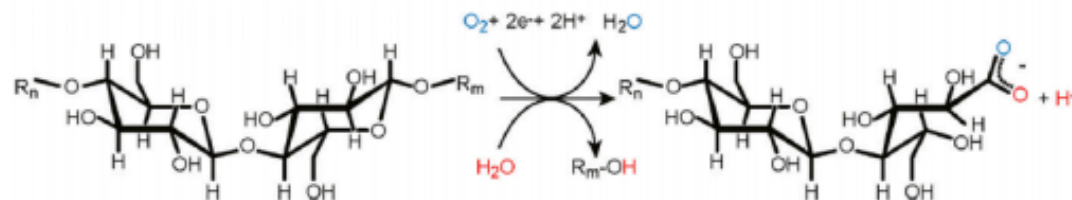


Figure 3 Summary of the oxidative cleavage of cellulose. In the case of cleavage by CelS2, a CBM33, and *PcGH61D* [17] the only oxidized sugars observed are aldonic acids, as indicated in this figure. Other members of the GH61 family seem to generate additional oxidized species, with oxidation at C4 or C6 (see Quinlan et al. [13] and Phillips et al. [16] for further discussion).





Cellulázok alkalmazása

- Élelmiszeripar
- Takarmányozás
- Textil ipar
- Papír ipar
- Vegyipar
- Gyógyszeripar
- Bioüzemanyag





Textilipar

- farmerkoptatás, végkikészítés

Cellulóz- és papírgyártás

- rostosítás, fehérítés, szilárdság, víztelenedés fokozása, festéktelenítés

Mosószeripar

- bolyhosodás csökkentése

Takarmány

- emészthetőség javítása

Élelmiszeripar

- sütőipar: tészta minőségének és a termék eltarthatóságának javítása
- kávémagok csírázásának gyorsítása
- olívaolaj préselés
- gyümölcsle: sejtfal megbontása → kinyert gyümölcsle mennyisége↑
- sör, bor: minőségjavítás, termelés fokozása

Második generációs üzemanyag alkohol előállítás



Farmerruházat koptatása / Ageing of denim

kőkoptatás / stone-washing

- 1980-as évek eleje
- habkő → gép- és termék-rongálódás, portermelőedés
- savas mosás: részben jobb, de más problémák

bio-koptatás / biostoning

- **1980-as évek** végétől (első kereskedelmi termék 1987 Novo)
- először **habkővel együtt, a fakítás gyorsítására**
- **savas EG-okkal:** a felületi szálak gyengítése, a szálvégek „levágása”
- → indigó festék fellazul → mechanikai hatással eltávolítják a felületről + **a puhaságot is növelik**
- 1980-as évek közepén véletlenül fedezték fel a fakító-hatást, amikor puhításra használták
- probléma: festékrészecskék visszatapadása / back staining + farmeranyag gyengül, szilárdság ↓
- *T. reesei* EGII
- **ma: semleges EG-okkal**
- lakkázokkal





Textíliák végkikészítése / Finishing

- enzimes kezelés → növeli a puhaságot
- főleg **mesterséges szálaknál**, melyek megfelelő kikészítés nélkül **durva tapintásúak**
- Lyocell: fonál szerves oldószerben (N-metilmorfolin N-oxid) oldott fa cellulózból (mint a Viszkóz, de ott NaOH+CS₂)
fibrillák enzimes hidrolízise → foszlásra való hajlam csökkentése

A használat okozta bolyhosodás megszüntetése / Biopolishing, biofinishing

- bolyhosodás megelőzése ill. megszüntetése
- mosószerekben
- főleg savas endoglükanáz enzimekkel
- kilógó rövid szálak, mikrofibrillák „**levágása**” → simább felület, élénkebb szín

döntően *Trichoderma* és *Humicola* eredetű enzimek



Textilipar

cellulase enzymes for textile industry

„Ecostone” celluláz

- semleges és savas cellulázok (endoglükanázok)

„Ecostone” lakkáz

- oxidálja az indigó festéket, koptatásra vagy fehéritésre

Cellusoft, DeniMax, Novoprime, Valumax

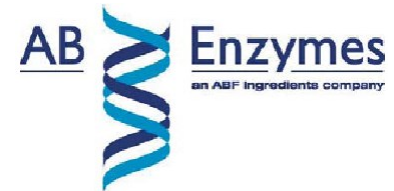
- celluláz / endoglükanáz

DeniLite, Novoprime Base

- lakkáz

Aquazym, Novoprime D

- α -amiláz
keményítő adagolása a szövetszálak védelmére
feldolgozás után enzimmel kíméletesen, szelektíven eltávolítható





Cellulóz- és papíripar

enzymes for pulp and paper industry

- **Bio-mechanikai rostosítás**

kismértékű bontás a **mechanikai rostosítás energia-igényének csökkentésére** első őrlés után (akkor jobb az enzim hozzáférése)

- **Bio-fehérités**

oxidáz enzimekkel (lignin-peroxidáz, lakkáz, mangán-peroxidáz) **roncsolják a rostok lignin-tartalmát** hemicellulázokkal fokozzák a **lignin eltávolítását** (indirekt hatás) *T. reesei* EGI (xilanáz aktivitása miatt)

- **A festékeltávolítása hulladékpapírból**

ma főleg: vegyszeres technológia lúgos pH – sárgulás

fejlesztés: festékrészecskék leválasztása a **cellulóz részleges hidrolízisével**

- **Szekunder rostok víztelenedésének javítása**

nagy vízkötő képességű anyagok hidrolízise



Víztelenedés javítása

drainage improvement

▪ Enzim

- teljes celluláz / hemicelluláz komplex – *T. reesei*
- hemicellulázok – hatástalanok / csekély hatás
- cellobiohidrolázok – hatásuk nem jelentős
- **endoglükánázok – kulcskomponens**

▪ Mechanizmus

- **finom rostok hidrolízise** (nagy fajlagos felület, könnyen támadható)
- rost külső rétegének, ill. az azon elhelyezkedő mikrofibrillák hidrolízise: „**peeling effect**”
- **rostok felületén lévő** amorf, gélszerű poliszacharid réteg hidrolízise
- az enzim, mint fehérje (retenciós szerekhez hasonlóan) → kis **rostok flokkulálódása**

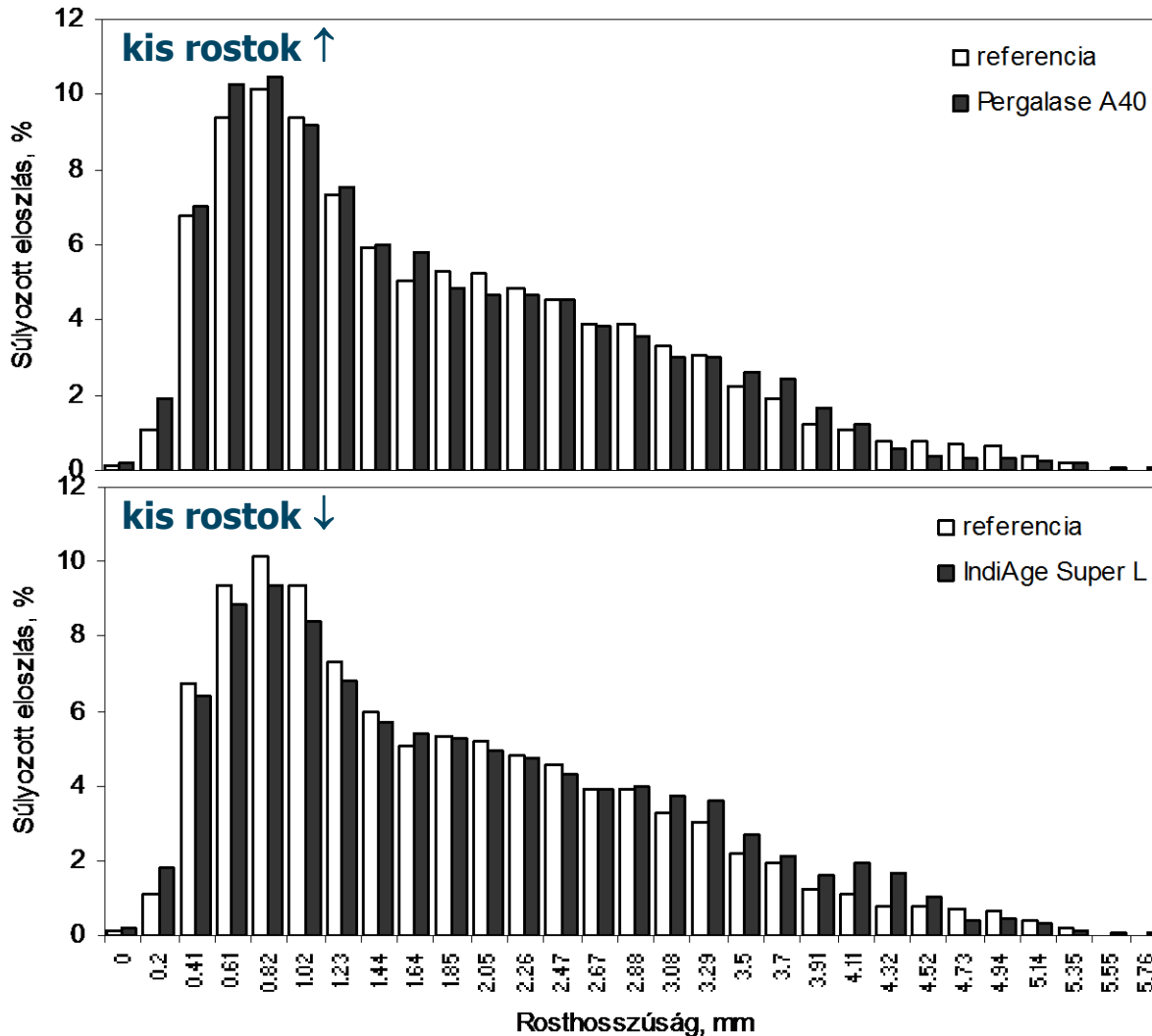
▪ Eredmény

- őrlés fokozása – szilárdság növelése
gyengébb minőségű alapanyag felhasználása
- nagyobb hígítás - a lapszerkezet javítása
- gyorsabb víztelenedés - a papírgép sebességének növelése



Cellulóz- és papíripar

enzymes for pulp and paper industry



Kisméretű rostok hidrolízise

rosthossz-eloszlás
(Kajaani rost-analízis)

- **Pergalase A40 (Genencor)**

papíripar: szekunder rostok víztelenedésének javítására

teljes celluláz / hemicelluláz komplex

- **IndiAge S. L (Genencor)**

textilipar: farmerárak végkikészítése („biostoning”)

endoglükánáz (EGIII, TrCel12A)

savas endoglükánáz (pH 5-6)
CBD nélkül, 25 kDa





Cellulóz- és papíripar

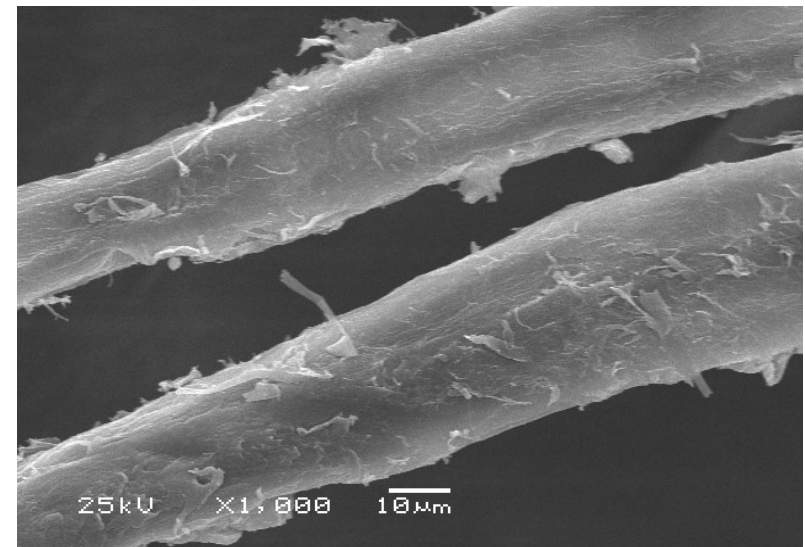
enzymes for pulp and paper industry

Felületi mikrofibrillák hidrolízise
pásztázó elektron mikrográf

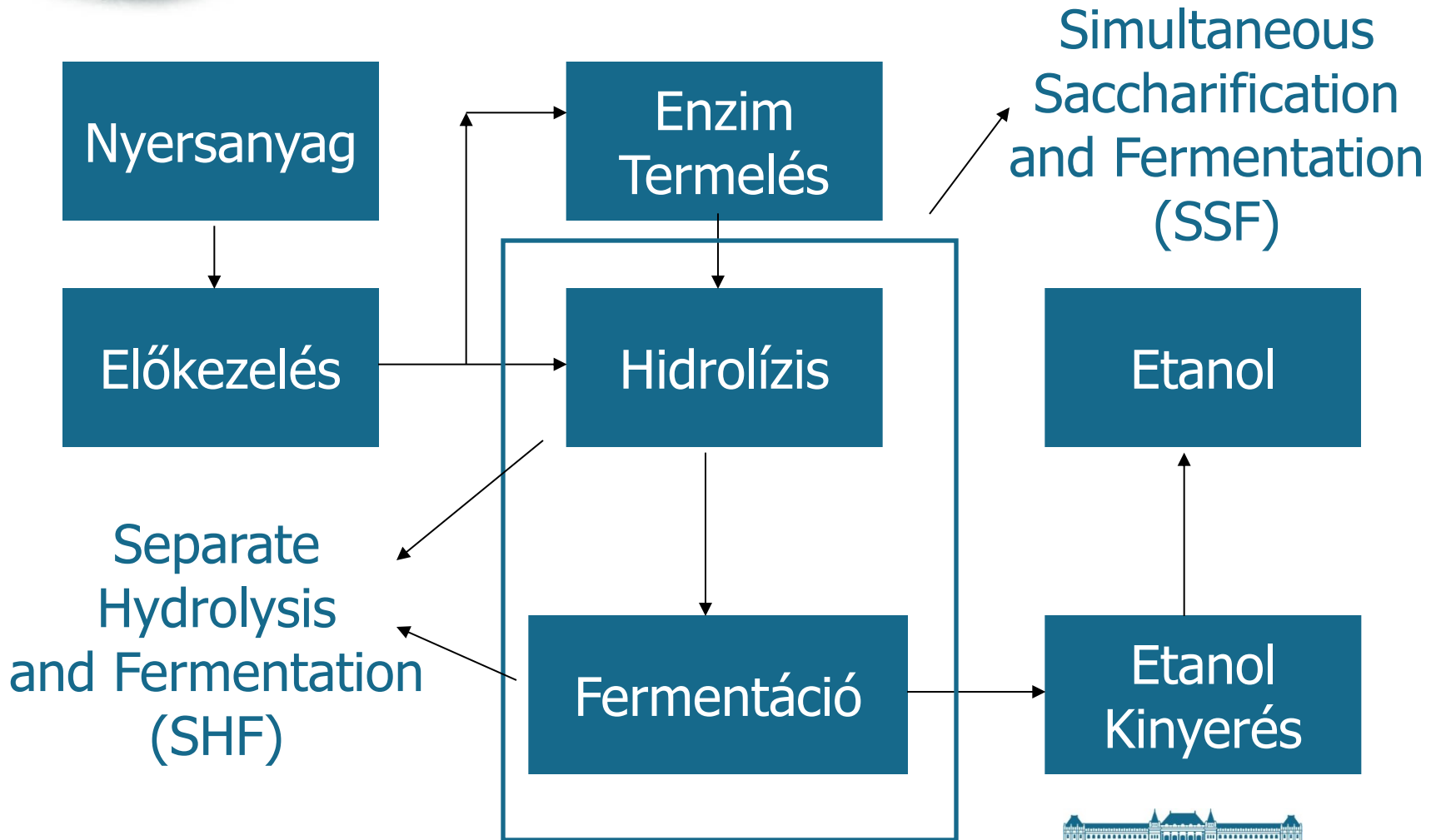
Referencia – enzimes kezelés nélkül



IndiAge Super L – TrCel12A (EGIII)
10-szeres E dózis



Bioüzemanyag előállítás





Üzemanyagalkohol lignocellulózokból

- A jövőben nagy jelentőségű ipar lehet
- Jelenleg komoly kutatás és fejlesztés
- Kísérleti üzemek, félüzemek, demonstrációs üzemek már vannak
- Az USA-ban 2015-ben már 8,3 millió liter lignocellulóz alapú üzemanyag etanolt gyártottak (58 milliárd liter kukorica alapú etanol mellett)
- Az EU-ban Olaszországban (Crescentino) épült fel a világ eddigi legnagyobb lignocellulóz alapú üzemanyag alkohol gyára, 2013 októberében adták át 75 millió liter/év tervezett kapacitással. Tervezett feldolgozandó nyersanyagok: búzaszalma, rizsszalma, Arnudo donax (nád).