

Ny viden om samspillet mellem enzymer i oxidativ nedbrydning af plantebiomasse

Oxidativ, enzymkatalyseret nedbrydning af plantebiomasse er et voksende forskningsfelt i forbindelse med enzymatisk nedbrydning og bioraffinering af lignocellulose.

Af Caio D.O.G. Silva, Anne S. Meyer og Jane W. Agger, DTU Bioengineering, Danmarks Tekniske Universitet

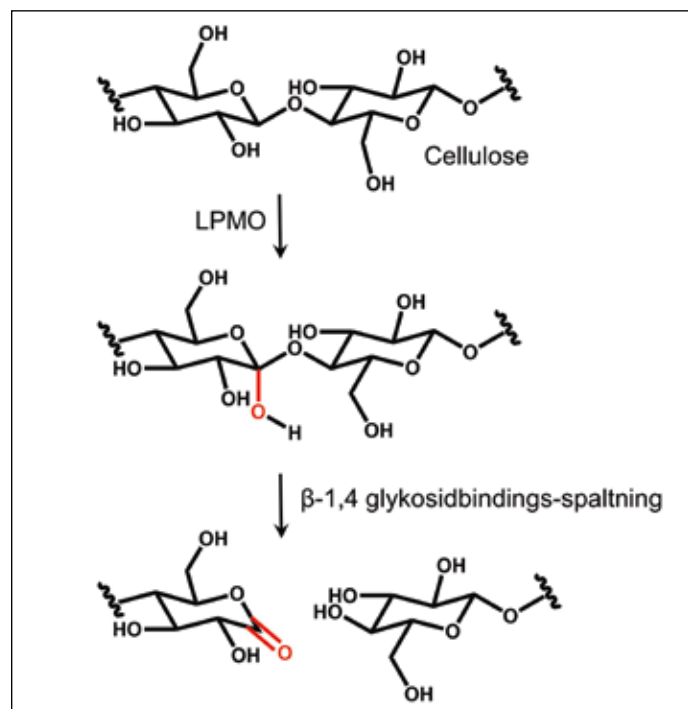
Det komplicerede samspil mellem forskellige oxidative enzymer, der udskilles af skimmelsvampe under biomasse-nedbrydning, har for nylig fået betydelig forskningsmæssig opmærksomhed. I den forbindelse er de kobberholdige lytiske polysaccharid monooxygenaser, LPMOer, en særlig interessant gruppe enzymer, idet de spiller en central rolle i katalysen af den oxidative spaltning af krystallinsk cellulose. Detaljerne i LPMOers katalytiske mekanisme er genstand for intens forskning, især for at forstå, hvordan forsyningen af elektroner, der understøtter LPMOernes katalytiske aktivitet, foregår på det molekylære niveau.

Ny forståelse af LPMOer

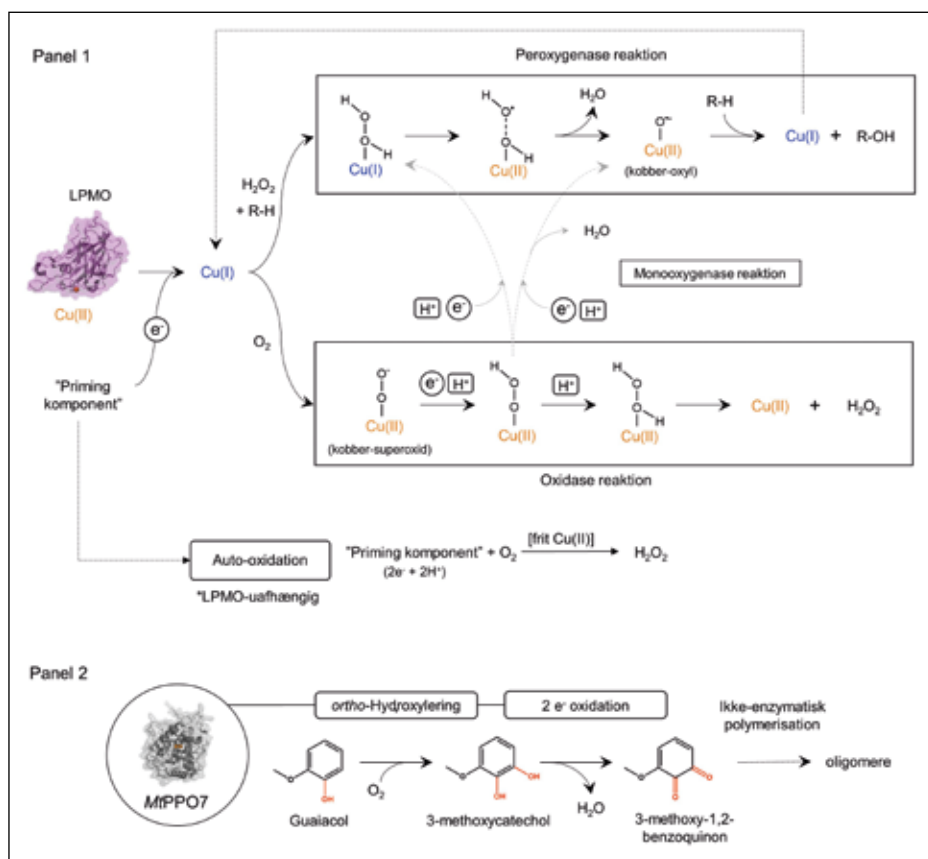
Det står nu klart, at LPMOer ikke kun er monooxygenaser, som oprindeligt beskrevet. For at katalysere monooxygenase-reaktioner skal LPMOer bruge oxygen til at indføre en hydroxylgruppe til et af C-atomerne i forbindelse med den katalytiske spaltning af en β -1,4-glykosidbinding i cellulose (figur 1). En sådan hydroxylering fører til destabilisering og efterfølgende spaltning af glykosidbindingen. For at opretholde en kontinuerlig katalyse kræver monooxygenase-reaktionen, udover ilt, en kontinuerlig tilførsel af elektroner til kobber-ionen i LPMO-enzymets aktive site, konkret kræves 2 e^- til hver katalytisk runde (figur 2).

Mens man typisk bruger askorbinsyre (vitamin C) som elektrondonor i laboratorieforsøg med LPMO-katalyserede reaktioner, vil elektronerne i naturen skulle komme fra andre kilder. Formentlig forsynes elektronerne enten fra stoffer, som er naturligt til stede i substratet, for eksempel phenoliske komponenter eller andre forbindelser; disse aktiveres sandsynligvis via andre enzymer, som skimmelsvampene udskiller, mens de vokser på plante-biomassen. Alternativt leveres elektronerne direkte fra forskellige reducerende stoffer, som skimmelsvampen secernerer. Imidlertid var det længe en gåde, hvordan eksterne elektrondonorer kontinuerligt kan levere elektroner til det aktive site i LPMOer under katalyse med O_2 , og visse detaljer er stadig uklare.

Det var et ægte paradigmeskift, da det i 2017 blev vist, at hydrogen peroxid (H_2O_2), snarere end O_2 , er det foretrukne co-substrat til LPMO-katalysen på cellulose, og at H_2O_2 samtidig eliminerer behovet for forsyningen af elektroner andetstedsfra til den kontinuerlige katalytiske oxidation [1,2]. Til denne såkaldte LPMO peroxygenase-aktivitet leverer H_2O_2 således også de elektroner, der kræves til cellulosespaltningen, dog undtaget den første indledende elektron, som kræves for at udløse reaktionen. Denne indledende elektrondonation, kaldet "priming"-reaktionen, er en initieringsreaktion, der er afgørende nødvendig for at reducere kobberionen $Cu(II)$ i enzymets aktive site fra enzymets "hviletilstand" til reaktivt $Cu(I)$, som kræves til katalysen. Priming-reaktionen antages at finde sted,



Figur 1. Glykosidbindingsspaltningsspaltningsreaktion i cellulose katalyseret af LPMO.



Figur 2. Panel 1: Skematisk oversigt over forløb af henholdsvis O_2 -drevne og H_2O_2 -drevne LPMO-reaktioner. Panel 2: Oxidativt reaktionsforløb katalyseret af visse polyphenol oxidaser (eksemplificeret ved MtPPO7 fra *Myceliophthora thermophila*) på guaiacol, et lignin-derivat. Catechol-intermediatet er velegnet til priming af LPMO-enzymet.

inden enzymet binder til cellulose. Vi har for nylig vist, at hvis både cellulose og H_2O_2 er til stede, kan flere spaltningscyklusser udfolde sig efter en enkelt priming-reduktion, fordi $Cu(I)$ -tilstanden opretholdes ved afslutningen af hver cyklus (figur 2) [3].

At opfattelsen oprindeligt var, at LPMO'er var oxygenaser, som primært brugte O_2 som substrat, skyldes, at de LPMO-enzymet, som ikke er bundet til cellulose, tilsyneladende selv kan levere små mængder H_2O_2 via oxidation, såfremt O_2 og reduktionsmidler er til stede. Det har senere vist sig, at andre enzymer som svampen udskiller samtidig, for eksempel laccase, ligeledes kan producere små mængder H_2O_2 [4]. Det er klart en mulighed, at denne type H_2O_2 -produktion kan sætte gang i peroxygenase LPMO-reaktionen (figur 2). Samlet set indikerer disse observationer, at den oprindelige monooxygenase-aktivitet, som har lagt navn til LPMO-aktiviteten, i virkeligheden er et resultat af peroxygenase-reaktioner, der er drevet af H_2O_2 genereret *in situ* [2].

H_2O_2 spiller central rolle

I vores studier af disse enzymreaktioner på DTU har vi for nylig opnået resul-

tater, der bekræfter paradigmet om, at peroxygenase dominerer over monooxygenaseaktivitet i LPMO'er [3]. Vores resultater viser, at diphenoler (typisk i form af dihydroxybenzener), effektivt fremmer LPMO-primings-reaktionen, men *ikke* hverken H_2O_2 -dannelse via



Foto: Pixabay

autooxidation eller LPMO-monoxygenase aktivitet. Disse data understøtter dermed, at der kræves H_2O_2 til den LPMO-katalyserede cellulosespaltning. Når diphenoler anvendes som reduktionsmidler, er cellulosespaltning med LPMO alene således kun mulig ved eksogen H_2O_2 -tilførsel.

Det særligt interessante ved dette er, at diphenoler såsom 3-methoxycatechol og 3,4-dihydroxy-5-methoxybenzoesyre let kan dannes fra lignin-afledte monophenoler såsom guaiacol og vanilinsyre via en ortho-hydroxyleringsreaktion katalyseret af fungale polyphenol oxidaser - i vores arbejde konkret med en polyphenoloxidase, MtPPO7, fra skimmelsvampen *Myceliophthora thermophila* (svampen kaldes også *Thermothelomyces thermophilus*). Den konkrete polyphenoloxidase MtPPO7 katalyserer omdannelsen af methoxylede monophenoler, der typisk produceres under svampens lignin nedbrydning. Vores data tyder på, at polyphenoloxidase-reaktionen kan spille sammen med LPMO'er i cellulosenedbrydning, udover at aktiviteten i sig selv kan katalysere nye kemiske funktionaliseringer på lignin og lignin-afledte forbindelser. Opdagelsen betyder med andre ord, at polyphenoloxidasen spiller en rolle i "priming" af LPMO-enzymernes kobber, at polyphenoloxidasen ikke deltager i den videre understøttelse af LPMO-aktiviteten, men samtidig kan være et redskab til at funktionalisere lignin-komponenter.

Afsløringen af disse reaktioner, er *de facto* også opdagelsen af en ny skalérbar metode til at kontrollere H_2O_2 -forsyningen til LPMO-katalyse. En kontrolleret forsyning af H_2O_2 reducerer risikoen for enzyminaktivering, der typisk observeres, når overskydende H_2O_2 akkumuleres i reaktionen. Yderligere viden venter forhåbentlig, når vi dykker endnu dybere ned i samspillet mellem forskellige typer oxidative enzymer, der er involveret i at nedbryde plantebiomasse.

E-mail:

Anne S. Meyer: asme@dtu.dk

Referencer/yderligere læsning

1. B. Bissaro, A.K. Røhr, G. Müller, P. Chylensky, M. Skaugen, Z. Forsberg, S.J. Horn, G. Vaaje-Kolstad, V.G.H. Eijsink, *Nat Chem Biol.* **2017**, 13, 1123-1128.
2. B. Bissaro, V.G.H. Eijsink, *Essays Biochem.* **2023**, 67, 575-584.
3. C. De Oliveira, G. Silva, M. Vuillemin, M.A. Kabel, W.J.H. Van Berkel, A.S. Meyer, J.W. Agger, *ChemSusChem* **2023**, e202300559.
4. V. Perna, A.S. Meyer, J. Holck, L.D. Eltis, V.G.H. Eijsink, J.W. Agger, *ACS Sust Chem Eng.* **2020**, 8, 831-841.