

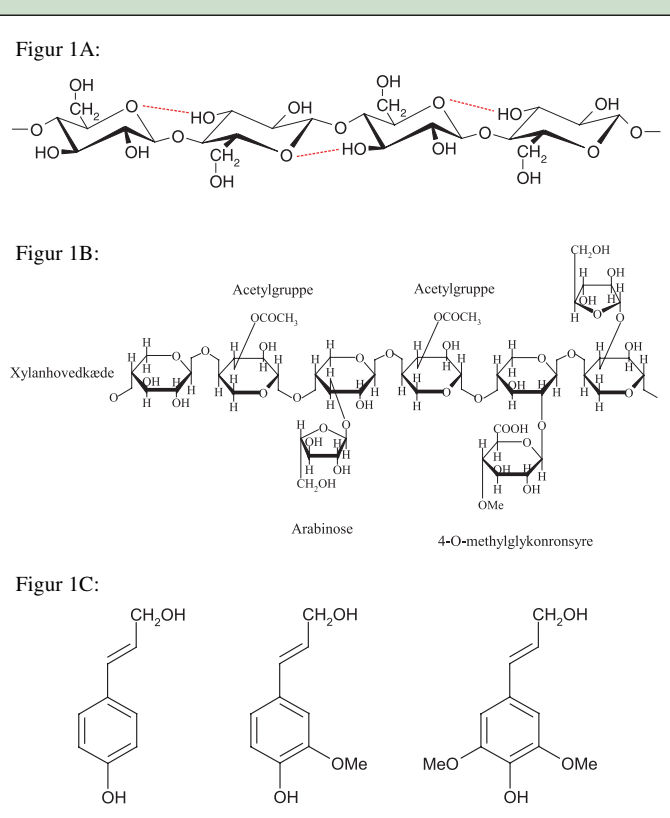
Produktion af lignocellulosenedbrydende enzymer i skimmelsvampe

Brugen af kapillarelektroforese kan øge forståelsen for, hvordan enzymproduktionen i svampe påvirkes af vækstbetingelserne. Derved kan man designe mere effektive enzymblandinger til hydrolyse af lignocellulose, som er interessant i forbindelse med produktionen af bioethanol

Af Henning Jørgensen og Lisbeth Olsson, Center for Bioteknologisk Procesforskning (CPB), BioCentrum-DTU

Interessen for fremstilling af bioethanol ud fra lignocellulose til brug som additiv i benzin har været stærkt stigende de sidste år. Specielt i USA, hvor f.eks. staten Californien har forbudt brugen af MTBE i reformuleringen af benzin fra 2003, hvilket vil betyde en kraftig stigning i efterspørgslen af ethanol. Den øgede opmærksomhed omkring global opvarmning har yderligere sat skub i forskningen i alternative og CO₂-neutrale typer af brændstof til køretøjer. I 2001 foreslog EU-Kommissionen et direktiv, der skal fremme brugen af biobrændsel i transportsektoren. Det er målet at erstatte 2% benzin og diesel med biobrændsel inden 2005 [1]. I vores naboland Sverige sælges der i dag benzinblandinger med 5% ethanol, og fra 2003 skal en pilotfabrik være klar til produktion af ethanol ud fra nåletræ [2]. Fra dansk side har den politiske interesse for bioethanol være meget begrænset, og pt. tilsættes der ikke ethanol til benzin i Danmark.

Et samarbejde mellem Forskningscenter Risø og DTU har dog resulteret i et lovende koncept for udnyttelsen af halm til ethanolproduktion [3]. Et af problemerne er, at der mangler en tilstrækkelig effektiv og billig metode, der kan nedbryde lignocellulose til de enkelte sukkermonomerer, inden disse fermenteres til ethanol. Den mest skånsomme metode med



Figur 1. Strukturen af de tre hovedbestanddele i lignocellulose. (A) Del af cellulosekæde. De røde linjer angiver hydrogenbindinger som stabiliserer strukturen. (B) Del af hemicelluloses struktur. Her er vist xylan (xylose udgør hovedkæden) med forskellige sidegrupper og modificeringer. (C) De tre monomerer, som ved polymerisering giver lignin. Fra venstre ses p-coumarylalkohol, coniferylalkohol og sinapylalkohol.

Plantetype	Cellulose	Hemicellulose	Lignin
Nåletræ	52	17	28
Løvtræ	54	21	22
Hvedehalm	39	36	10
Byghalm	44	27	7
Havrehalm	41	16	11

Tabel 1. Sammensætning af træ og halm. Indholdet af cellulose, hemicellulose og lignin er opgivet i vægtprocent af tørvægt [4,5].

Enzym	Størrelse (kDa)	Aktivitet
XYL	31	Endoxylanase
EGa	21	Endoglukanase
EGb1	53	{ Endoglukanase og endomannanase
EGb2	54	
CBHa	63	Cellobiohydrolase
CBHb	70	Cellobiohydrolase

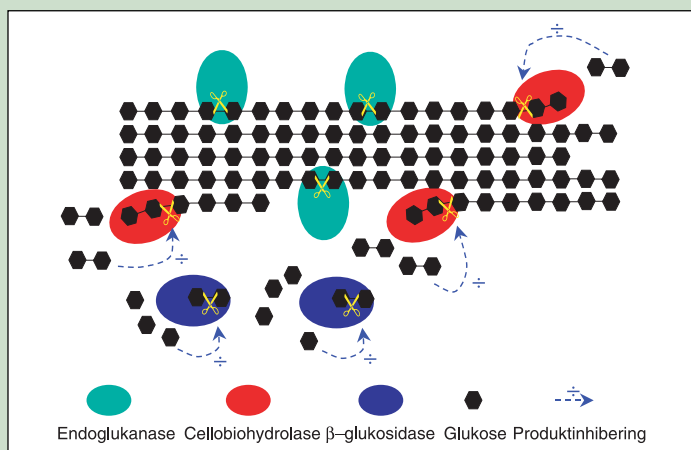
Tabel 2. Oversigt over oprensede enzymer fra *P. brasilianum* og deres aktivitet.

højest udbytte involverer en enzymatisk nedbrydning, men prisen på disse enzymer er i dag for høj til, at processen er økonomisk rentabel.

Ved Center for Bioteknologisk Procesforskning (CPB) på BioCentrum-DTU forskes der i produktionen af enzymer til brug i denne nedbrydning.

Hvad er lignocellulose?

Råmaterialet i fremstillingen af bioethanol kan være enhver form for lignocellulose, men det er typisk træ, papiraffald eller overskudsmateriale fra landbruget, f.eks. halm. For at reducere omkostningerne er det vigtigt at benytte et billigt råmateriale, og i Danmark er halm en oplagt kilde.



Figur 2. Oversigt over, hvordan de forskellige cellulaser og β -glucosidase samarbejder om at nedbryde cellulose til glucose. Endoglucanaserne (grøn) angriber hovedsageligt tilfældige β -1,4-D-glucosidbindinger inde i cellulosepolymeren, hvorimod cellobiohydrolaserne (rød) fraspalter cellobiose fra kædens ender. To forskellige cellobiohydrolaser giver mulighed for fraspaltning af cellobiose fra begge kædens ender. Det dannede cellobiose spaltes af β -glucosidase (blå) til slutproduktet glucose. Både β -glucosidaser og cellobiohydrolaser produktinhiberes af hhv. glucose og cellobiose.

Lignocellulose kan opdeles i tre hovedbestanddele – cellulose, hemicellulose og lignin.

Cellulose er lange kæder af glucoseenheder, op til 12.500, bundet sammen med β -1,4-glucosidbindinger (figur 1A).

Hemicellulose er et mere heterogent polysaccharid, der består af pentoser (xylose, arabinose) og hexoser (glucose, galactose og mannose). I modsætning til cellulose er hemicellulose forgrenet, og sukkerenhederne kan yderligere være methyleret eller acetyleret (figur 1B).

Lignin udgør et netværk dannet ved polymerisering af monomererne *p*-coumarylalkohol, coniferylalkohol og sinapylalkohol (figur 1C). Det komplekse netværk omkapsler og binder cellulose og hemicellulose sammen. Dermed forstærkes strukturen og beskytter mod enzymatisk nedbrydning, f.eks. ved svampeangreb på planten. Den gennemsnitlige sammensætning af forskellige planter ses i tabel 1. Mellem de forskellige planter er der stor forskel i sammensætningen af hemicellulose. Løvtræ indeholder totalt 20% xylose og 2% mannose i modsætning til nåletræ, som indeholder 7% xylose og 10% mannose, trods samme indhold af hemicellulose [6].

Enzymatisk nedbrydning af lignocellulose

Det første trin i fremstillingen af ethanol er nedbrydning af cellulose og hemicellulose til de respektive sukkermonomerer. I modsætning til stivelsesholdige afgrøder, f.eks. korn, er nedbrydningen af cellulose og hemicellulose til monosaccharider mere vanskelig. Det er den væsentligste grund til, at det trods den lavere pris på råmateriale endnu ikke er økonomisk

rentabelt at producere ethanol ud fra lignocellulose. Hydrolyse ved brug af enzymer medfører teoretisk det højeste udbytte af alle sukre, da hydrolysen er specifik og udføres under milde betingelser. Den komplekse struktur af lignocellulose hindrer dog en effektiv enzymatisk hydrolyse. Det er derfor nødvendigt at forbehandle materialet.

Forskningscenter Risø og DTU har sammen udviklet en ny metode til halm, som vådoxideres under alkaliske betingelser, højt tryk og temperatur (12 bar O_2 og $195^\circ C$) [3]. Processen nedbryder delvist lignin og opløser størstedelen af hemicellulose, hvorved cellulose bliver mere tilgængelig for enzymatisk hydrolyse. Metoden danner færre toksiske stoffer end den alternative sure hydrolyse.

Enzymerne

Enzymerne til den enzymatiske hydrolyse inddeles i to hovedgrupper – cellulaser og hemicellulaser. Cellulaser kan videre inddeles i endoglucanaser og exoglucanaser. Endoglucanaserne spalter tilfældige β -1,4-D-glucosidbindinger inde i cellulosekæden, hvorimod exoglucanaser, også kaldet cellobiohydrolaser, spalter cellobioseenheder fra enderne af cellulosekæden (figur 2). Det sidste trin i nedbrydningen af cellulose er spaltningen af cellobiose til to glucosemolekyler med enzymet β -glucosidase. Hemicelluloses mere heterogene struktur betyder, at der kræves et større antal enzymer for at nedbryde det fuldstændigt. Som for cellulaser findes endo- og exoenzymer, f.eks. endoxylanase, endomannanase, β -xylosidase og β -mannosidase. Endvidere findes enzymer til at fjerne sidegrupper, f.eks. α -L-arabinofuranosidase og acetylxylanesterase.

De fleste mikroorganismer kan ofte danne flere forskellige enzymer med samme aktivitet (isoenzymer). Det er ikke unormalt, at der produceres op til fem forskellige enzymer, som alle har endoglucanaseaktivitet. Isoenzymerne adskiller sig både fysisk (størrelse og isoelektrisk punkt) og i substratspecificitet. Nogle endoglucanaser har en vis grad af exoaktivitet og kan yderligere have aktivitet mod andre polysaccharider som mannan og xylan.

Forholdet mellem de forskellige enzymer skal være afstemt, hvis der skal opnås en effektiv nedbrydning af råmaterialet. F.eks. vil lav β -glucosidaseaktivitet resultere i akkumulering af cellobiose, som inhiberer cellobiohydrolaserne, hvorfor effekten af lav β -glucosidaseaktivitet forøges. Samspillet mellem endo- og exoglucanaserne giver også en tydelig synergieffekt. Endoglucanaserne bryder de lange cellulosekæder op og skaber derved nye celluloseender, som kan angribes af cellobiohydrolaserne. Figur 2 viser, hvordan de forskellige enzymer samarbejder om at nedbryde cellulose.

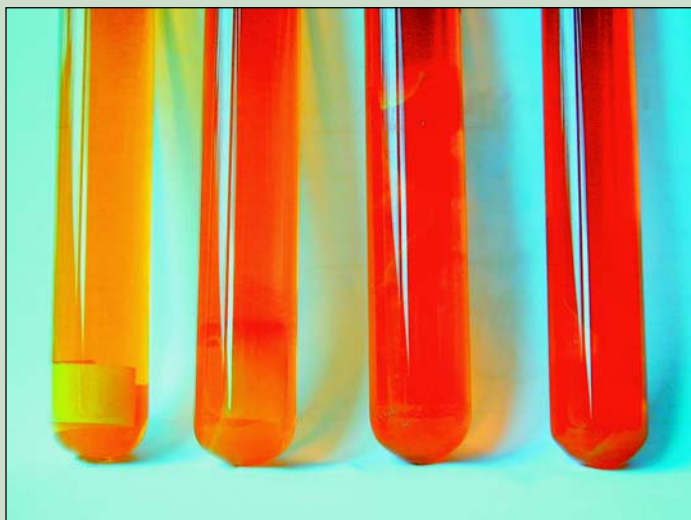
Screening og undersøgelse af nye svampe for produktion af enzymer

Cellulaser og hemicellulaser dannes af et bredt spektrum af bakterier og skimmelsvampe. Mest interessant er dog skimmel-svampe, da disse effektivt udskiller enzymerne til mediet, hvilket letter oprensningen. Slægten *Trichoderma* blev opdaget under anden verdenskrig, hvor den forårsagede nedbrydning af bomuldsbeklædning hos amerikanske soldater udstationeret i Asien. Siden har den tiltrukket sig stor opmærksomhed, da den udskiller en bred vifte af enzymer i høje koncentrationer (op til 35 g/L). For at finde den optimale enzymblanding til effektiv nedbrydning af lignocellulose er det relevant at undersøge nye skimmelsvampe for enzymer med egenskaber, som er bedre end hos allerede kendte enzymer.

Mykologigruppen på BioCentrum-DTU er i besiddelse af en stor samling skimmelsvampe tilhørende slægten *Penicillium*. En række af disse svampe er på CPB blevet undersøgt for deres



Figur 3. Skimmelsvampe på agarplade. Til venstre *Penicillium brasilianum* og til højre *Penicillium pinophilum*.



Figur 4. Assay til måling af cellulaseaktivitet. Filterpapir (cellulose) inkuberes en time med enzym, og mængden af dannede reducerende sukre måles med dinitrosalicylsyre, hvilket giver anledning til et farveskifte fra gul til rød. Eksempel på stigende mængde af enzym tilsat fra venstre mod højre. Samtidig ses direkte, at papiret opløses af cellulaserne.

produktion af cellulaser og hemicellulaser. På grundlag af forsøg udført i rystekolber med forskellige kulstofkilder (cellulose eller hemicellulose) er der fokus på tre svampe: *Penicillium pinophilum* (figur 3), *Penicillium persicinum* og *Penicillium brasilianum* (figur 3).

I øjeblikket studeres disse svampes potentiale for at producere de omtalte enzymer, og det undersøges, hvordan forskellige kulstofkilder påvirker dannelsen af de enkelte enzymer.

Brug af kapillarelektroforese til undersøgelse af enzymproduktion

Et vigtigt aspekt ved enzymproduktionen er, i hvor høj grad dannelsen af de forskellige cellulaser og hemicellulaser og de forskellige isoenzymer påvirkes af svampens vækstforhold. Det er kendt, at ved vækst på en let omsættelig kulstofkilde som glucose vil enzymdannelsen represseres. Vækst på cellulose giver hovedsageligt dannelse af cellulaser, hvorimod vækst på hemicellulose giver hemicellulaser. Der synes også at være en

vis kobling mellem induktionen af de to enzymklasser. Det er fortsat mere usikkert, om forholdet mellem de forskellige isoenzymer også påvirkes af kulstofkilden.

Klassiske målemetoder

Normalt bestemmes enzymproduktionen ved måling af enzymaktiviteten i mediet med forskellige enzymatiske assays. En klassisk metode måler aktiviteten med filterpapir (ren cellulose) som substrat. Filterpapiret nedbrydes af cellulaserne, og efterfølgende måles antallet af dannede reducerende sukre med dinitrosalicylsyre (figur 4), hvorved man får et mål for den totale cellulaseaktivitet. Det giver dog ikke nogen idé om forholdet mellem endoglucanaser og exoglucanaser og slet ikke om forholdet mellem isoenzymerne. Med mere specifikke substrater kan man alene måle endoglucanaseaktivitet i en blanding af cellulaser. Der findes derimod ikke noget substrat, som kun måler cellobiohydrolaseaktivitet. Undersøgelser af kulstofkildens indflydelse på dannelsen af de forskellige isoenzymer har derfor været hindret af manglen på analytiske metoder. Separation af enzymerne ved gelelektroforese (SDS-PAGE) muliggør detektion af de forskellige enzymer, men det er ikke en god kvantitativ metode.

Nyudviklet metode med kapillarelektroforese

På CPB er der udviklet en metode på kapillarelektroforese (CE) som giver mulighed for separation og kvantificering af enzymer, man ikke kan differentiere imellem ved brug af enzymatiske assays.

Princippet i kapillarelektroforese (CE) er analogt til traditionel gelelektroforese. I modsætning til SDS-PAGE foregår separationen ikke i en gelmatrice, men i fri opløsning, f.eks. en fosfatbuffer. Det betyder, at både størrelse og ladning af proteinerne er afgørende for separationen. For en nærmere gennemgang af CE henvises til [7,8]. Apparaturet er meget analogt til HPLC-udstyr, f.eks. er der online UV-detektion, og kørsel af et større antal prøver sker automatisk. Det er i forhold til gelelektroforese en fordel i forbindelse med kvantitative analyser.

Foreløbige resultater

Til dato er der oprenset seks enzymer fra *P. brasilianum* (tabel 1)

Boule Nordic AB, specialiseret i
udvikling af laboratorieudrustning og
reagenser til molekylærbiologi og
industriell forskning



Boule Nordic AB
Box 610, 171 81 Skövde
E-post: info@boule-nordic.se
Tel: +46 73 43 88 00
Fax: +46 73 43 88 01
www.boule-nordic.se

Vi tilbyder: Højestående tekniske rådgivningsbureauer, Højestående tekniske
rådgivningsbureauer, avanceret udstyr og laboratorieudrustning, Højestående
tekniske rådgivningsbureauer, avanceret udstyr og laboratorieudrustning

Desuden også: Højestående tekniske rådgivningsbureauer, Højestående tekniske
rådgivningsbureauer, avanceret udstyr og laboratorieudrustning

Reagenser:	Højestående tekniske rådgivningsbureauer, Højestående tekniske rådgivningsbureauer, avanceret udstyr og laboratorieudrustning
Cellulose:	Højestående tekniske rådgivningsbureauer, Højestående tekniske rådgivningsbureauer, avanceret udstyr og laboratorieudrustning
Lipid:	Højestående tekniske rådgivningsbureauer, Højestående tekniske rådgivningsbureauer, avanceret udstyr og laboratorieudrustning
Laboratorieudrustning:	Højestående tekniske rådgivningsbureauer, Højestående tekniske rådgivningsbureauer, avanceret udstyr og laboratorieudrustning

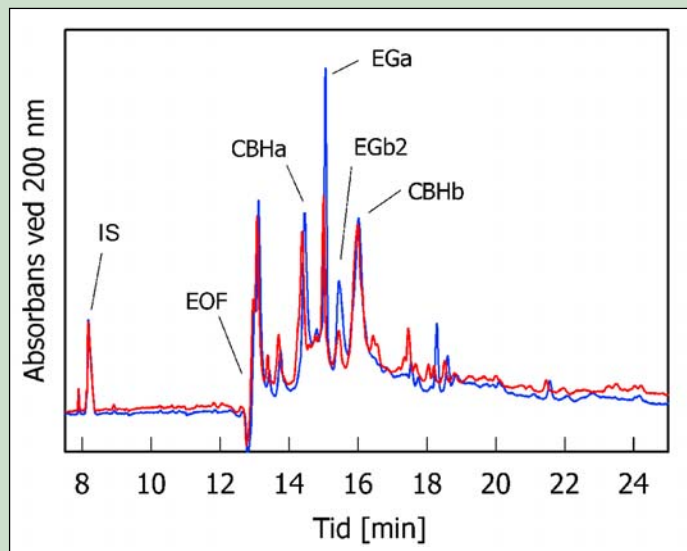
«Givning, som garanterer for de bedste forskningsresultater»

2), hvorved det er muligt at identificere og bestemme koncentrationen af disse i en ukendt kultiveringsprøve. Figur 5 viser elektroferogrammerne fra en kultivering af *P. brasilianum* på hhv. cellulose og en blanding af cellulose og hemicellulose (xylan). De oprensede enzymer udgør hovedparten af de enzymer, som udskilles af svampen. Toppene af de to cellobiohydrolaser (CBHa og CBHb) er i begge tilfælde næsten lige store. Derimod er toppene af de to endoglucanaser EGa og EGb2 mindre ved vækst på blandingen. Det er i overensstemmelse med, at den målte endoglucanaseaktivitet var 40% lavere i kultiveringen på blandingen. Den totale cellulaseaktivitet (målt med filterpapir) var næsten ens, hvilket kan skyldes, at cellobiohydrolasemængden var næsten ens i begge tilfælde.

Med blot de få oprensede enzymer ses det, at der kan hentes en betydelig mængde ekstra information ud af analyserne på CE i forhold til enzymatiske assays. Det er muligt at bestemme mængden af forskellige isoenzymer (EGa og EGb2), og man kan bestemme mængden af cellobiohydrolase. Men selv uden at kende enzymernes identitet giver CE en mængde information. Af figur 5 ses det, at tilstedeværelsen af hemicellulose resulterer i dannelsen af en række enzymer, som ikke dannes ved vækst kun på cellulose.

En stor fordel ved metoden er den relativt korte analysetid på en halv time pr. prøve, og i én kørsel er det muligt at måle mængden af mange enzymer samtidig. Ydermere foregår hele analysen automatisk. Ved enzymatiske assays kan man kun måle en enzymaktivitet ad gangen, og de fleste metoder involverer en høj grad af manuelt arbejde, hvilket gør det totale analysearbejde til en forholdsvis arbejdskrævende opgave. Anvendelse af CE bidrager derfor med en betydelig mængde information, og efterhånden som flere enzymer oprenses og identificeres, stiger mængden af information, som hver enkelt analyse giver.

CE-metoden er et nyttigt redskab til at analysere enzymproduktionen i detaljer og dermed få en bedre forståelse af reguleringen. Det er muligt at bestemme om forholdet, mellem ikke blot de forskellige enzymklasser, men også isoenzymerne ændres, afhængig af den anvendte kulstofkilde. Metoden kan også bruges til at øge forståelsen af sammenhængen mellem enzymsammensætning og effektiviteten i nedbrydningen af forskellige typer af lignocellulose. På længere sigt kan denne viden bane vejen for produktion af specialdesignede enzymblandinger, som har optimale egenskaber i forskellige applikationer, f.eks. effektiv og billig nedbrydning af lignocellulose i forbindelse med produktionen af bioethanol.



Figur 5. Analyse på kapillarelektroforese af prøver fra to kultiveringer af svampen *Penicillium brasilianum* på hhv. cellulose (blå) og blanding af cellulose og hemicellulose (rød). IS – intern standard tilsat for at forbedre kvantificering. EOF – elektroosmotisk flow. Positionen af kendte enzymer er angivet (se også tabel 2).

Projektet er finansielt støttet af Statens Teknisk-Videnskabelige Forskningsråd.

E-mail-adresser:

Henning Jørgensen: hej@biocentrum.dtu.dk

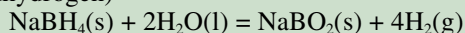
Lisbeth Olsson: lo@biocentrum.dtu.dk

Referencer:

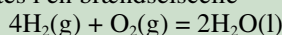
1. European Environment Agency 2002. Environmental issue report no 31 - Energy and environment in the European Union.
2. Galbe, M., Zachi, G. 2002. A review of the production of ethanol from softwood. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59, 618-628.
3. Ahring, B.K. 2000. Anaerob bioteknologi. *Dansk Kemi*, 2, 18-22.
4. Szmant, H.H. 1996. *Industrial Utilization of Renewable Resources*. Technomic Publishing Company Inc. Lancaster, Pennsylvania, USA.
5. Jackson, M.G. 1977. The Alkali Treatment of Straws. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2, 106.
6. Ostrovski, C.M., Aitken, J.C., Hayes, R.D. 1985. Hydrolysis of poplar wood using hydrofluoric acid for the production of fuel ethanol. *Energy from Biomass and Wastes IX*, edited by Klass D.L., 895-914.
7. Tjørnelund, J. 2001. Kapillarelektroforese. *Dansk Kemi*, 1, 18-21.
8. Lehmann, S.V., Bergholdt, A.B. 1999. Anvendelse af kapillarelektroforese til udvikling af nye lægemidler. *Dansk Kemi*, 4, 26-30.

Nyt om biler

Chrysler har løftet sløret for en hydridoborobil. Brændstoffet er NaBH_4 . Det kalder firmaet natriumborohydrid, vi systematikere vil foretrække navnet natriumtetrahydridoborat(1-). Stoffet reagerer med vand under dannelse af natriummetaborat og brint (dihydrogen)



Hydrogenet benyttes i en brændselscelle



som frembringer el, der driver en motor. Udstødningsgassen er derfor det bare vand. Bilen har en aktionsradius på 500 km ved kørsel med farten 110 km/h. Når al hydridoborat er omdannet til metaborat, afleverer man det til genbrug.

Bos

2001: Chrysler shows borohydride car. *Chemical & Engineering News*. 17. December: 17.

Nyt om dijerntrioxid

Taeghwan Hyeon i Seoul har meddelt en ny opskrift til fremstilling af Fe_2O_3 dijerntrioxid også kaldet jern(III)oxid.

Man begynder med jernpentacarbonyl $\text{Fe}(\text{CO})_5$, som opløses i octylether, og der tilsættes oliesyre ved 100°C . Jern(II)oleat udfældes, og der opvarmes til 300°C . Med trimethylaminoxid $(\text{CH}_3)_3\text{NO}$ oxideres oleatet til gamma-dijerntrioxid, som dannes som nanokrystaller med tværsnit mellem 4 og 16 nm.

Det er netop pointen ved al besværet. Hyeons metode giver et veldefineret stof som bittesmå krystaller af veldefineret størrelse.

Bos

DANGANI, R. 2001: A better recipe. *Chemical & Engineering News*. 24. December: 9.