

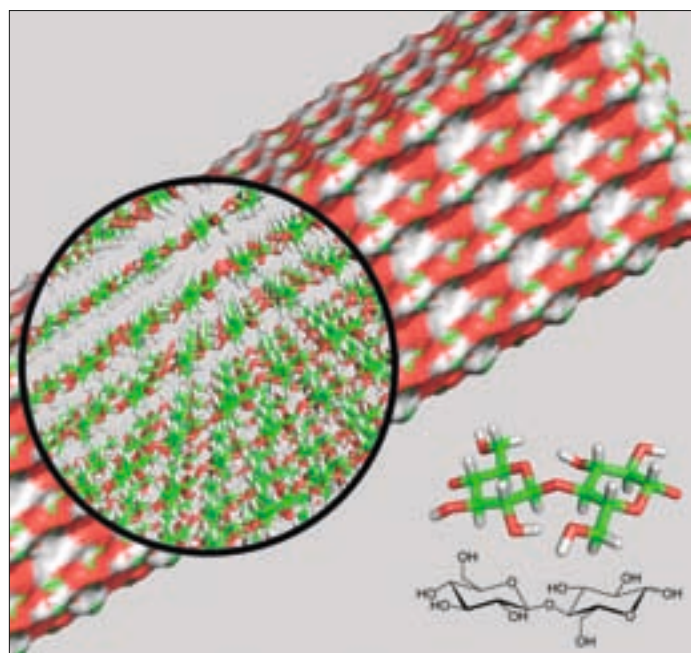
Enzymatisk nedbrydning af polysaccharider

Forståelsen af, hvordan forskellige enzymer er nødvendige for at forsukre diverse polysaccharider, er blevet kraftigt revideret i de seneste år. Det skyldes opdagelsen af en omfattende gruppe af kobber metallo-enzymet som via oxidativ katalyse nedbryder glycosidbindinger.

Af Leila Lo Leggio, Kemisk Institut, Københavns Universitet; Morten Tovborg, Novozymes A/S og Katja S. Johansen, Industriel Bioteknik, Chalmers Tekniske Universitet

Biosfæren er domineret af landplanter, hvoraf 30-60% af tørvægten består af cellulose. Dermed udgør cellulose langt det største biologiske reservoir af CO₂. Udviklingen af cellulose var et resultat af det selektionspres fra f.eks. tyngdekraft, vind og udtørring som primitive vandplanter måtte overvinde for at få fodfæste på land. Pga. den meget langsomme ukatalyserede nedbrydning af cellulose, som er estimeret til millioner af år, er enzymatisk nedbrydning af cellulose af vital betydning i naturens kredsløb.

Glycosidbindinger er generelt kemisk stabile, men det er velbeskrevet, hvordan tre typer af glycosylhydrolaser (endo-aktive, exo-aktive og de som spalter disaccharider) er ansvarlige for størstedelen af nedbrydningen af polysaccharider i naturen.



Figur 1. En tegning af krystallinsk cellulose og (nederst til højre) cellobiose, som er den repeterede enhed i cellulose. (Koordinater fra Cellulose builder Thiago Gomes & Munir Skaf 2012).

Opløselige polysaccharider spaltes effektivt af disse glycosylhydrolaser, som bryder glycosidbindinger via klassiske syre-base-mekanismer ved forbrug af vand. Den særlige udfordring, når det gælder cellulose, ligger i, at de enkelte cellulosekæder, som er uopløselige fra en kædelængde på mere end seks glukoseenheder, findes naturligt i form af krystallinske mikrofibriller, figur 1. Det begrænser adgangen for glycosylhydrolaserne til substratet og medfører en kraftig nedsat enzymeffektivitet. I laboratoriet er det muligt at kompensere for dette ved f.eks. at fosforsyrebehandle cellulose (resultatet kaldes phosphoric acid swollen cellulose, PASC), hvilket gør det muligt at lave en opslæmning af substratet, som i denne form omsættes langt hurtigere af enzymerne. Den bedre tilgængelighed til PASC betyder, at enzymerne synergistiske effekt udnyttes, hvorimod de forskellige typer enzymer er i konkurrence med hinanden om adgang til glucosidbindingerne, når substratet er krystallinsk.

Den manglende brik

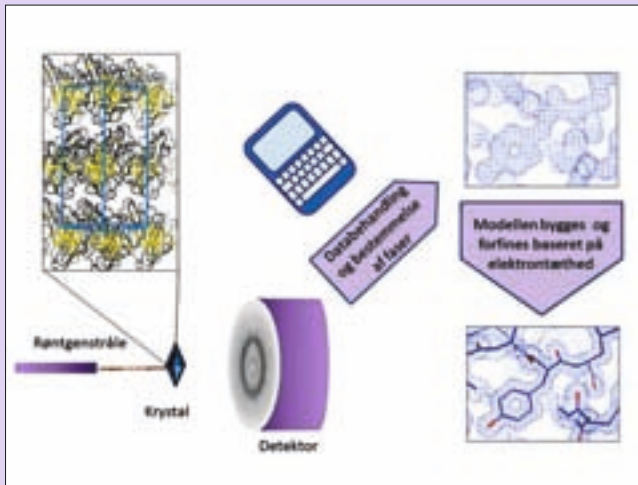
Allerede for 60 år siden blev det påpeget af Reese & Mandels, at der manglede en brik i billedet over enzymatisk nedbrydning af cellulose microfibriller. De forudså, at en dengang ukendt enzymaktivitet er ansvarlig for at gøre det muligt for de kendte glycosylhydrolaser at få adgang til substratet i form af enkelte cellulosekæder. Videnskabelige artikler fra 2010-11 [1-3], som beskriver enzymatisk kobber-assisteret oxidativ spaltning af glycosidbindinger i cellulose og chitin, synes at beskrive den manglende brik. Enzymerne, som har denne rolle, blev tidligere fejlklassificeret som enten bindingsdomæner uden katalytisk aktivitet eller som medlemmer af glycosylhydrolase familien GH61 med knapt målbar aktivitet. Det er nu vist, at de er oxidative kobberenzymet, og de benævnes lytic polysaccharide monoxygenases (LPMO).

Figur 2 (se næste side) viser et eksempel på, hvordan tilsætning af LPMO til en cocktail af hydrolytiske enzymer fører til langt hurtigere forsukring og til et udbytte, som er forbedret fra ca. 16 til 22 g glukose/L. Der er dog også en bagside af medaljen og i nogle situationer har det vist sig, at LPMO-aktivitet kan føre til inaktivering af enzymer og dermed en suboptimal forsukringsproces. Det skyldes, at enzymet under nogle omstændigheder vil frigøre hydrogenperoxid eller andre reaktive oxygen-specier til reaktionsblandingen. Heldigvis kan den negative effekt opvejes ved at tilsætte enzymet catalase, som nedbryder hydrogenperoxid til vand. Som det fremgår af eksemplet, figur 2, leder det til en yderligere forbedring af glukoseudbyttet, som er på knap 27 g glukose/L under disse betingelser [4].

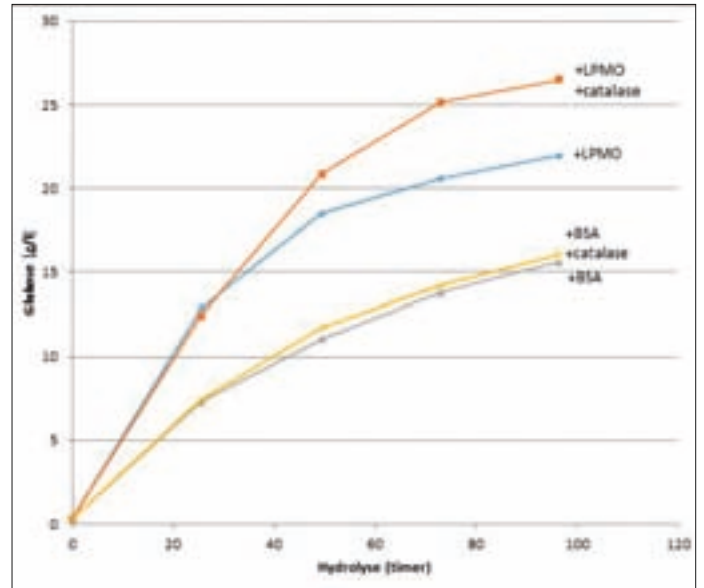
Røntgenkrystallografi

Den tredimensionelle struktur af enzymer er helt afgørende for deres funktion. Den hyppigst anvendte teknik til strukturbestemmelse af enzymer er røntgenkrystallografi. Til dette anvendes monokromatiske røntgenstråler, dvs. røntgenstråler ved en enkelt bølgelængde, og enzymkrystallen er typisk nedkølet til 100-120 K for at minimere stråleskade. Langt de fleste enzymstrukturer bliver bestemt ved at anvende store faciliteter, synkrotroner som f.eks. MAX IV, der lige er blevet bygget i Lund, Sverige.

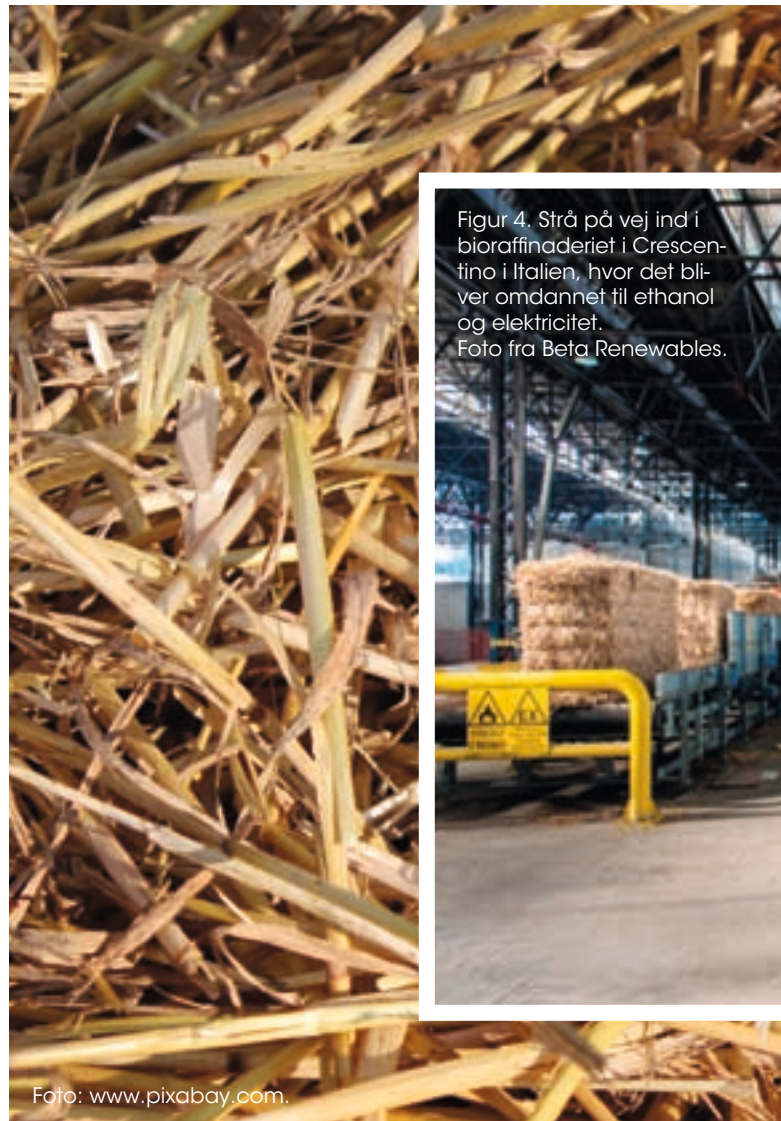
Først skal enzymerne dog fældes ud som krystaller. Disse krystaller kan monteres på et goniometer og placeres i røntgenstråling. Når man har mange molekyler arrangeret i et krystalgitter, kan man derefter aflæse et diffraktionsmønster. Den enhed, som repeteres ved translation i en krystal, hedder enhedscellen og vises i figuren, som en blå kasse inde i krystallen.



For at opnå 3D-information skal krystallen bestråles fra forskellige vinkler. Krystallen bliver derfor typisk roteret omkring en akse, mens man optager forskellige diffraktionsbilleder på en detektor. På disse diffraktionsbilleder kan man se ”prikker” af forskellige intensiteter, som kaldes reflektioner. Positionen af reflektionerne på billedet afhænger af enhedscellens form og dimensioner, såvel som detektorpositionen i forhold til krystallen og andre parametre i dataopsamling, mens intensiteten afhænger af selve strukturen i enhedscellen. Når man optager et diffraktionsbillede, måles amplituden af de diffrakterede stråler, men man mister essentiel information - de såkaldte faser - som er nødvendige for at beregne elektrontætheden. For at kunne genskabe krystallens elektrontæthed og derfra videre til en atomar model for enzymstrukturen, skal der foretages en del dataanalyse, herunder bestemmelse af faserne. Ofte bruges metoden *Molecular replacement* til at bestemme nye strukturer for proteiner med >30% primær sekvenslighed med et enzym, hvor strukturen allerede er bestemt.



Figur 2. Effekten af at tilsætte LPMO og catalase ved enzymatisk forsykning af cellulose. Eksperimentet blev udført med 10% tør-vægt af damp-forbehandlet hvedestrå som substrat. Enzymcocktailen bestod af: 80% Celluclast, 10% β -glucosidase og 10% LPMO eller 10% enert protein (BSA) som negativ kontrol. (Data fra [4]).



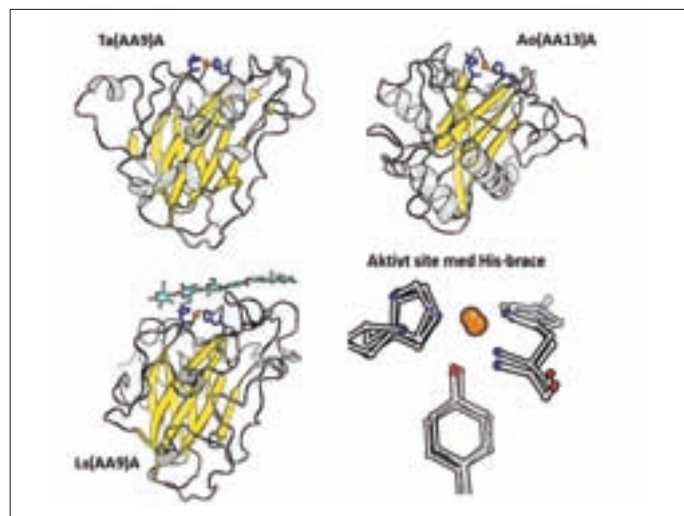
Figur 4. Strå på vej ind i bioraffinaderiet i Crescentino i Italien, hvor det bliver omdannet til ethanol og elektricitet. Foto fra Beta Renewables.

Fakta om LPMO'er

Gener for LPMO findes bredt i den mikrobielle verden. De ses hos virus, bakterier og i særdeleshed i svampe. LPMO'erne er indtil videre grupperet i fire enzymfamilier i databasen for kulhydrataktive enzymer (CAZY), hvor de fleste fungale LPMO'er er medlemmer af AA9 (Auxillary Activity family 9). De fleste bakterielle, hvoraf mange har aktivitet overfor chitin, er i AA10. I denne familie findes også LPMO'er fra virus og et enkelt eksemplar fra archaea. Desuden er AA11 en LPMO-familie, hvor det enkelte velbeskrevne eksemplar har aktivitet overfor chitin og indtil videre er kun stivelsesaktive LPMO'er beskrevet blandt medlemmerne af AA13.

LPMO'er er relativt små globulære polypeptider med en molekylvægt på 15-35 kDa, og i lighed med hydrolaserne findes det katalytiske domæne ofte forbundet til kulhydratbindende domæner, som kan give en indikation om enzymets substratspecificitet. Den tredimensionelle struktur af de katalytiske domæner, som primært er opklaret ved anvendelse af røntgenkrystallografi, se faktaboks, består hovedsageligt af en β -sandwich arkitektur, hvor aminosyrerester i β -streng konformation, i gult i figur 3, danner to β -plader, som tilsammen danner kernen af proteinet. Katalysen finder sted ved et mononukleært kobbercenter, som fastholdes af en histidin-brace i en yderlig position på den ene flade af enzymet. Dette er et særligt kendetegn for LPMO'er, figur 3. Denne konfiguration er fundamentalt forskel-

lig fra de tunneller og kløfter, som findes i den tertiære struktur af glycosylhydrolaserne, og den muliggør direkte aktivitet på overfladen af ordnede (krystallinske) substrater.



Figur 3. LPMO-strukturer. Strukturerne er visualiserede med programmet Pymol ved anvendelse af Protein DataBank koordinater 3ZUD, 4OPB og 4ACI, som svarer til strukturer af LPMO'er fra *Thermoascus aurantiacus* (AA9), *Aspergillus oryzae* (AA13) og *Lentinus similis* (AA9) i kompleks med cellohexaose. I gult vises β -strengene, som danner kernen af enzymstrukturen. På trods af store forskelle i resten af de sekundære strukturer i de tre enzymer, er metalcentret med His-brace næsten identisk.

Indtil for nyligt har der kun været ganske lidt detaljeret information om vekselvirkning mellem LPMO'er og deres substrat tilgængeligt. I begyndelsen af året blev det første billede på atomart niveau af vekselvirkninger mellem en LPMO og cellose fragmenter (cellooligosaccharider) opnået, i form af krystalstrukturer i højopløsning af en LPMO fra *Lentinus similis*, Ls(AA9)A, figur 3. For at opnå dette resultat blev krystaller af denne LPMO, som kan nedbryde opløselige substrater, overført til en opløsning af oligosaccharider. Derefter blev krystalstrukturen bestemt, se faktaboks. Baseret på strukturinformationen sammenholdt med EPR-spektroskopi, kunne en reaktionsmekanisme for enzymet foreslås [5].

LPMO'er er i dag en integreret del af de kommercielle enzymprodukter, som anvendes til konvertering af plantebiomasse til ethanol, figur 4. Der udvikles løbende nye og forbedrede LPMO'er, der er skræddersyede til betingelserne under de industrielle lignocellulose dekomponeringsprocesser.

E-mail:

Katja S. Johansen: skatja@chalmers.se

Referencer

- Harris, P.V., et al., *Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61: structure and function of a large, enigmatic family*. Biochemistry, 2010. **49**(15): p. 3305-3316.
- Vaaje-Kolstad, G., et al., *An Oxidative Enzyme Boosting the Enzymatic Conversion of Recalcitrant Polysaccharides*. Science, 2010. **330**(6001): p. 219-222.
- Quinlan, R.J., et al., *Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011. **108**(37): p. 15079-15084.
- Scott, B.R., et al., *Catalase improves saccharification of lignocellulose by reducing lytic polysaccharide monooxygenase-associated enzyme inactivation*. Biotechnology letters, 2015: p. 1-10.
- Frandsen, K.E.H., et al., *The molecular basis of polysaccharide cleavage by lytic polysaccharide monooxygenases*. Nature Chemical Biology, 2016. **12**:p. 298-303.

