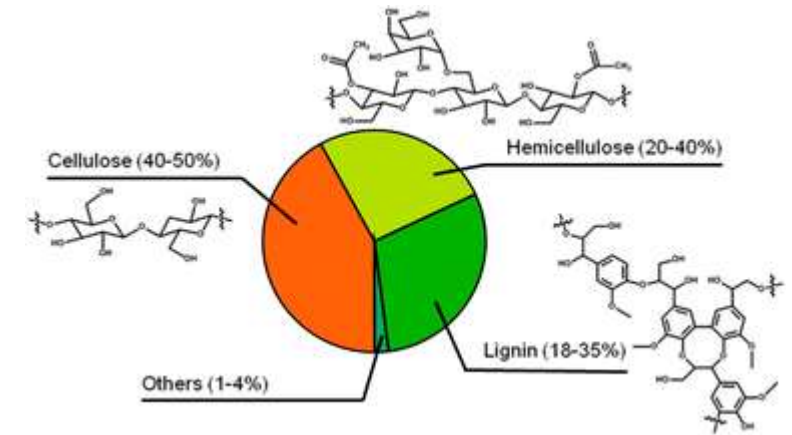


# Pretvorba lignocelulozne biomase

Rastlinski material v veliki meri sestavljajo celuloza, hemiceluloza in lignin v različnih razmerjih. Predstavljajo strukturno oporo rastlin, v kmetijstvu in gozdarstvu pa je to večinski odpadki, ki ga je treba varno odstraniti in/ali ponovno uporabiti.

Lignocelulozne surovine razvrščamo v tri razrede:

- primarni viri: rastline, ki jih gojimo predvsem zaradi celulozih sestavin in so pomembni zaradi strukturnih lastnosti ali za krmo (bombaž, gradbeni les, seno);
- lignocelulozni odpadki iz kmetijstva (slama, koruzni storži, riževe luščine, hlevski gnoj, lesni odpadki);
- celulozni komunalni odpadki (papir).



Chem. Commun., 2011,47, 1405-1421

Table 13.8 Typical composition of various lignocellulosic materials

Raw material	Amount (%) of:		
	Lignin	Cellulose	Hemicellulose
Pine wood	27.8	44.0	26.0
Birch wood	19.5	40.0	39.0
Sugar cane bagasse	18.9	33.4	30.0
Rice straw	12.5	32.1	24.0
Cotton	None	80-95	5-20

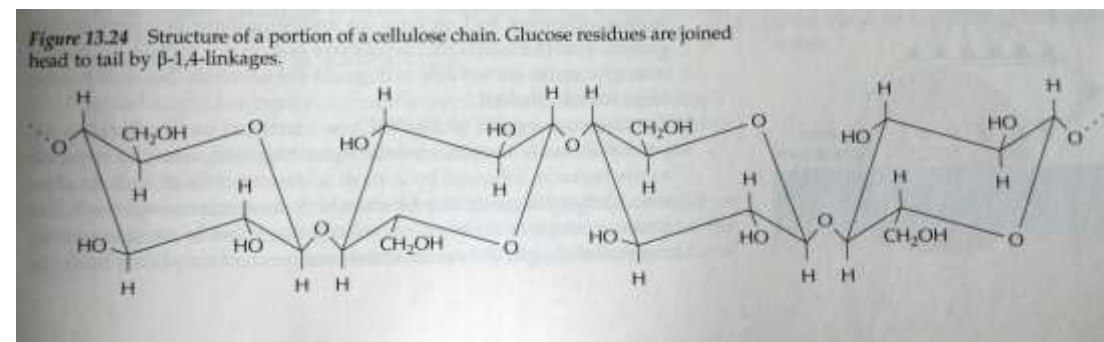
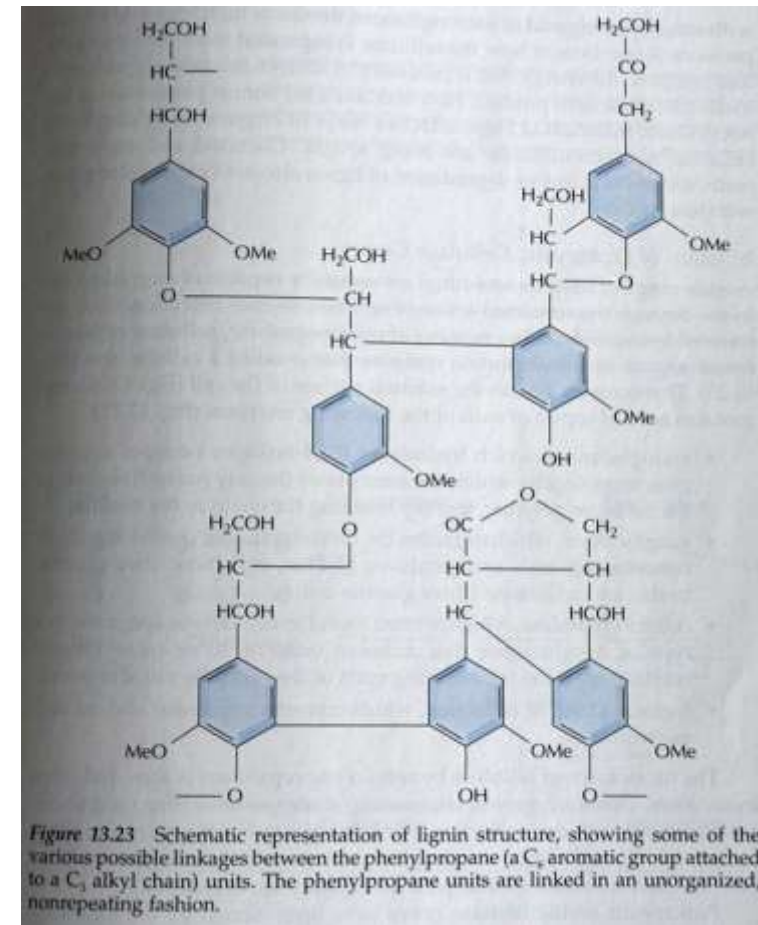
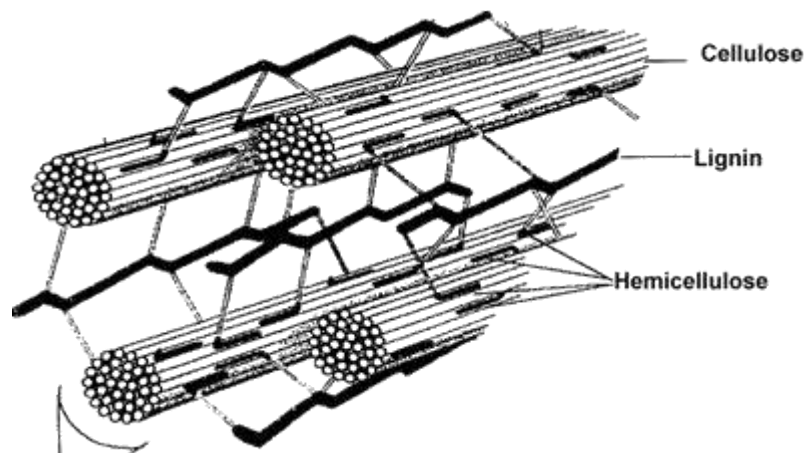
Adapted from Brown, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* 300:305-322, 1983.

# Lastnosti lignoceluloznih surovin

Lignin je 3D polimer iz fenilpropanskih podenot brez ponavljajočih se struktur in  $M \sim 10$  kDa. Vezi je zelo težko hidrolizirati, polimer pa je netopen v vodi. Zadnja stopnja v biosintezi je naključno neencimsko povezovanje enot na osnovi prostih radikalov. V rastlinah je vezan na hemicelulozo in zapolnjuje prostore med celuloznimi snopi. Rastlini zagotavlja rigidnost, zaščito pred mehanskim stresom in napadom mikroorganizmov.

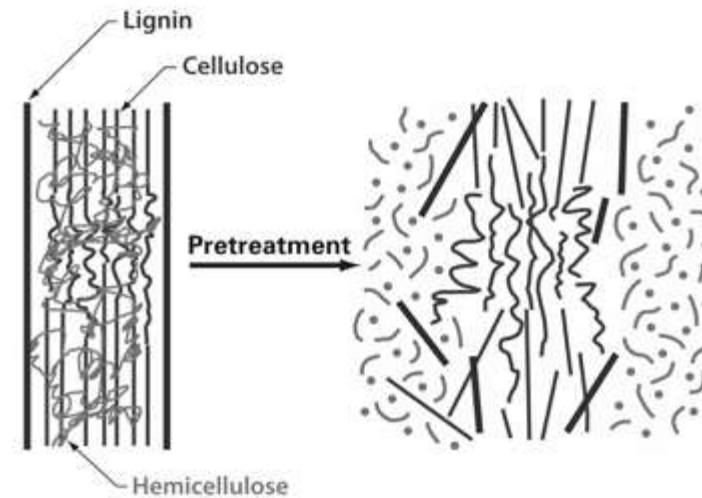
Hemiceluloza so kratke verige iz med seboj povezanih različnih heksoz in pentoz. Najpogostejši tipi so ksilani (poli- $\beta$ -1,4-ksilan s stranskimi skupinami), manani (iz glukoze ali galaktoze) in arabinogalaktani. Trdi lesovi imajo največ ksilanov, mehki pa glukomananov.

Celuloza je najpogostejši polimer v biosferi in ga sestavlja glukoza, medsebojno povezana z  $\beta$ -1,4-vezmi. Polimer je linearen in tesno pakiran v snope, da voda nima dostopa, zato je odporen proti hidrolizi.

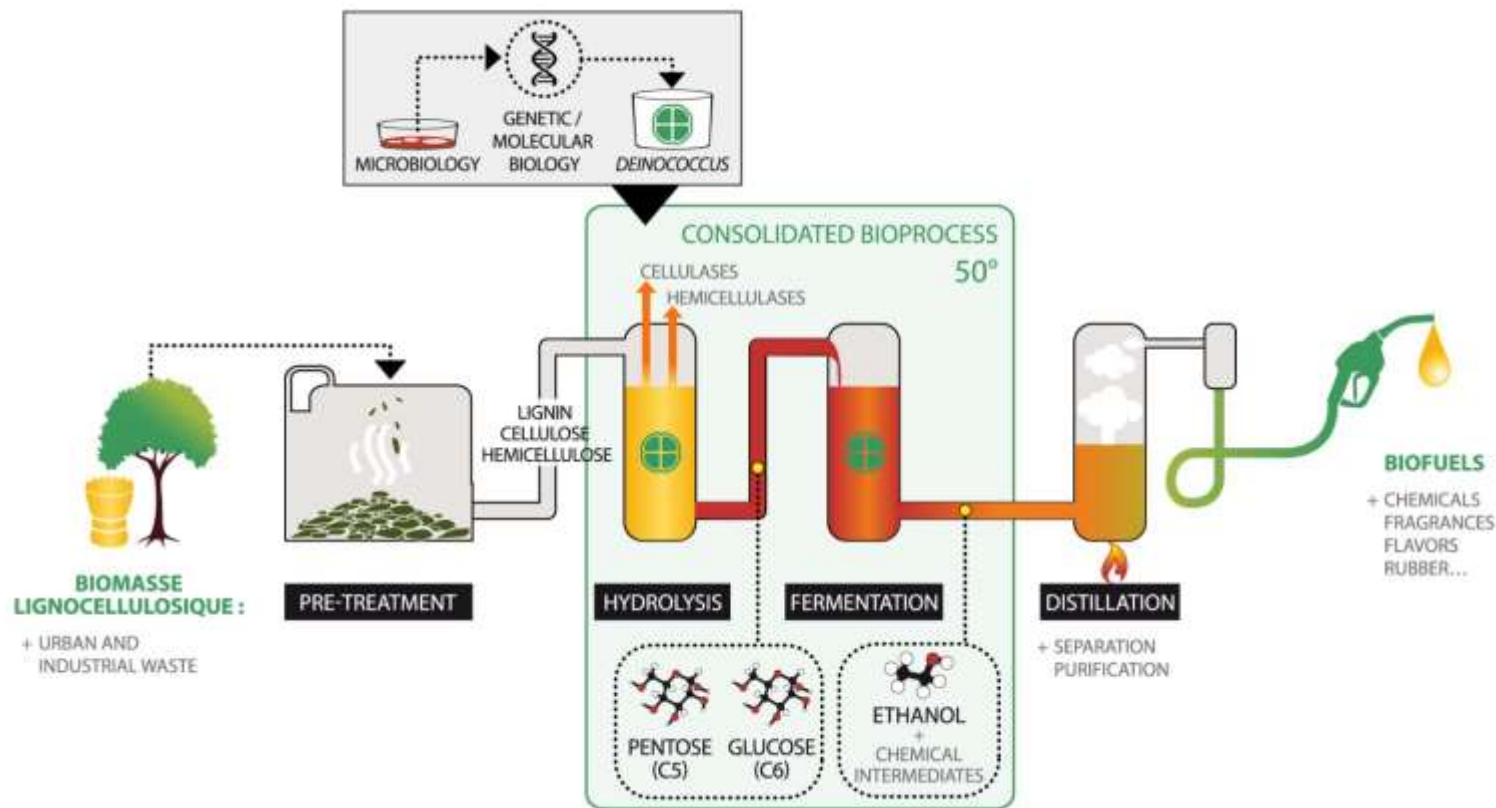


# Razgradnja lignoceluloznih surovin

Celulozo lahko uporabimo kot vir glukoze šele po tem, ko celulozo sprostimo iz kompleksov s hemicelulozo in ligninom. To večinoma dosežemo z močno kislino ali bazo ali pri povišani temperaturi in tlaku, kar bistveno prispeva k proizvodnim stroškom.

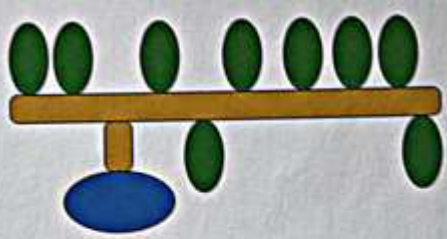


International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation. 2013, 1(1), 20-25



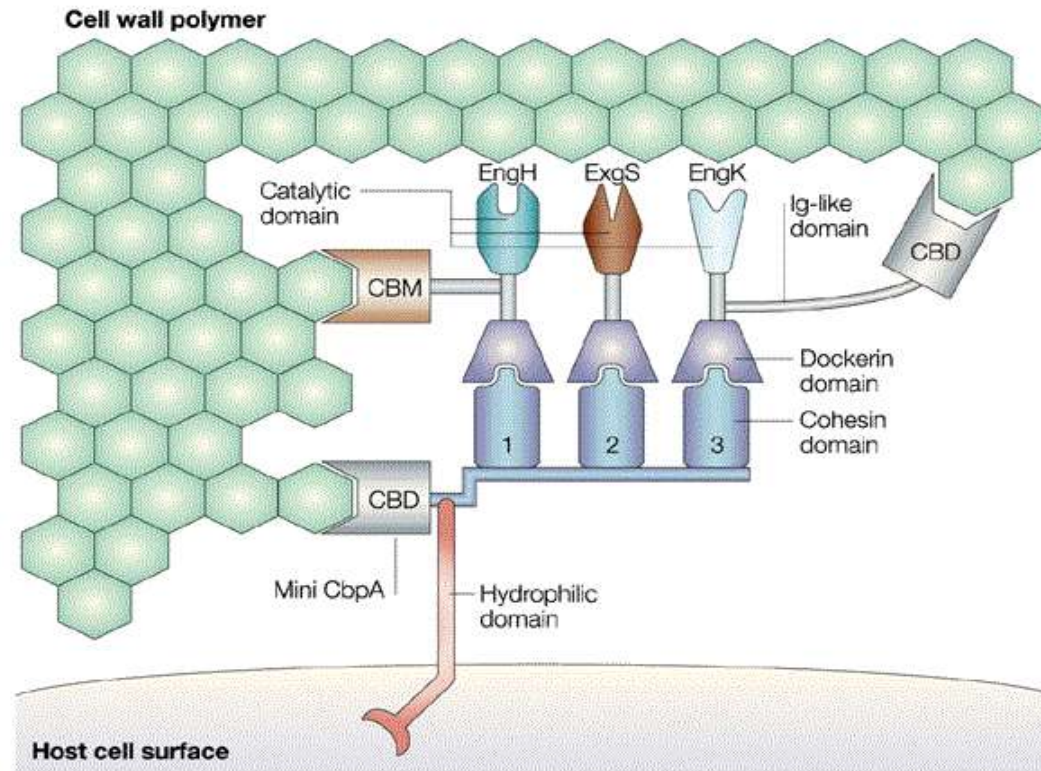
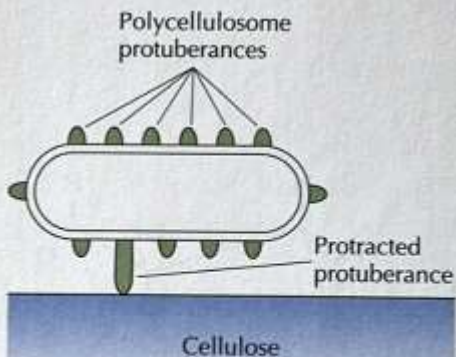
# Celulaza

Številne bakterije in glive so sposobne razgraditi celulozo, za kar je potrebno delovanje več encimov s skupnim imenom celulaza. Celulazno aktivnost pogosto najdemo v multiproteinskih kompleksih celulosomih, ki so vezani na zunanjo površino celice in vsebujejo po več kopij encimov, vezanih na nosilni proteinski skelet.



**Figure 13.25** Schematic representation of a cellulosome protein complex. The catalytic subunits are green, the scaffolding proteins are brown, and the cellulose binding domain is blue.

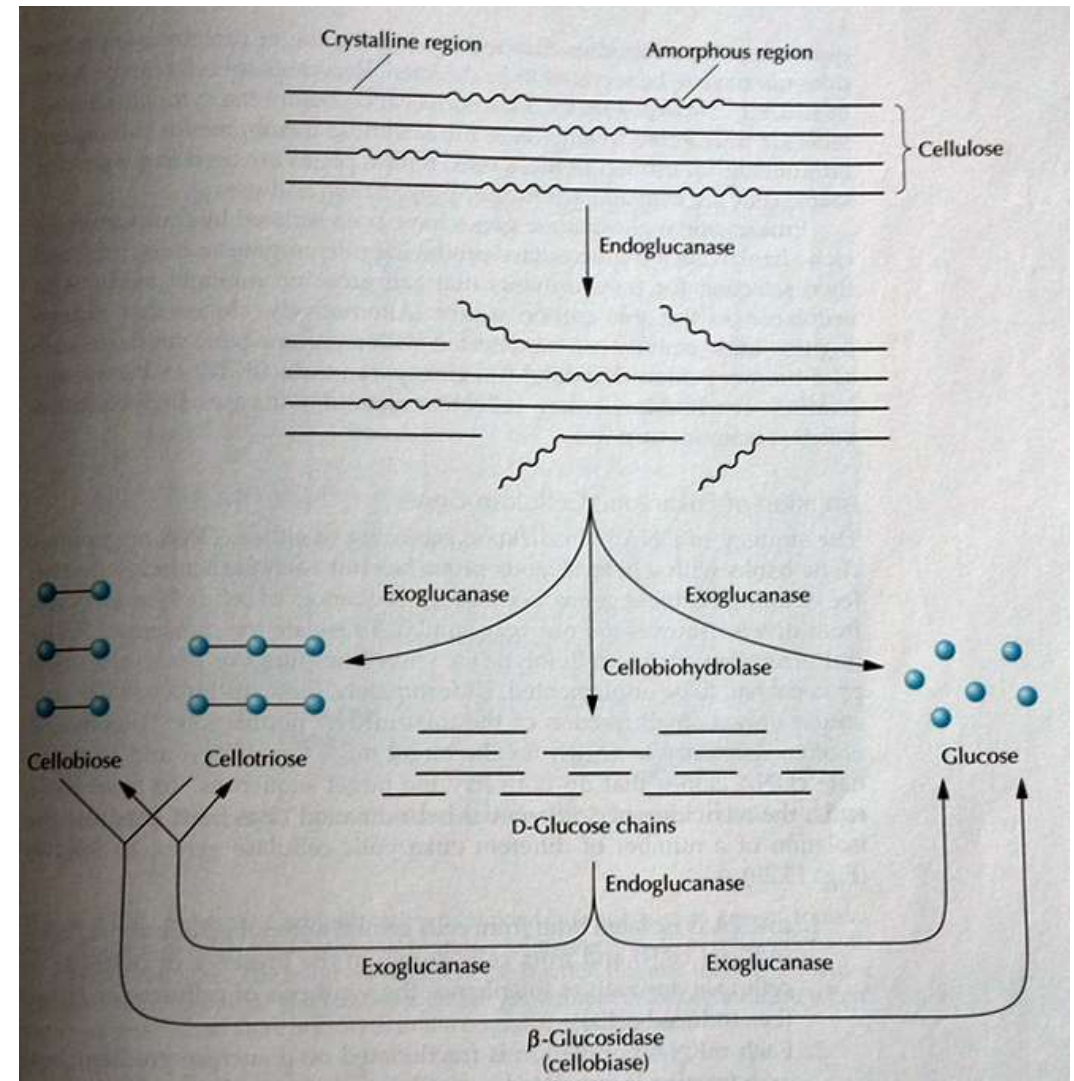
**Figure 13.26** The interaction of a cellulolytic bacterium with cellulose. The bacterial cell surface has protuberance-like structures that contain multiple copies of the cellulosome (polycellulosome protuberances). On contact with the cellulose substrate, some of the polycellulosome protuberances protract dramatically and deposit their cellulosomes along the surface of the cellulose.



# Komponente celulaze

Celulaza vsebuje po več kopij 4 tipov encimov:

- endoglukanazo, ki cepi  $\beta$ -1,4-vezi v amorfnih (razrahljanih) regijah celuloznih polimerov  $\rightarrow$  cepi sredi molekul;
- eksoglukanazo, ki cepi predhodno načete verige z nereducirajočega konca in odceplja glukozo, celobiozo (2 glu) in celotriozo (3 glu); celobiohidrolazo, pogosto pri celulolitičnih glivah, ki odceplja po  $\geq 10$  celuloznih enot z nereducirajočega konca;
- $\beta$ -glukozidazo (celobiazno), ki cepi celobiozo in celotriozo do glukoze.



# Izolacija genov za prokariontske celulaze

Ker je mikrobna razgradnja celuloze pogosto nepopolna in počasna, so pripravili več izboljšanih oblik encima. Najprej pa je bilo treba izolirati gene za različne encimske funkcije iz pro- in evkariontov.

Kloniranje prokariontskih endoglukanaz:

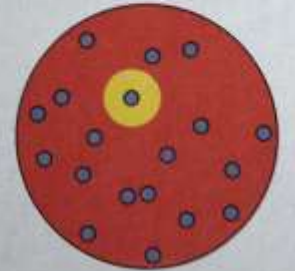
1. Pripravili so gensko knjižnico celulozitične bakterije v *E. coli*.
2. Kolonije so prekrili z agarjem, ki je vseboval karboksimetilcelulozo (CMC) in plošče inkubirali več ur; medtem se je substrat lahko razgradil, če se je izražal in izločal iz celic aktiven encim.
3. Nanesli so barvilo kongo rdeče. CMC se obarva rdeče, razgradni produkti pa rumeno. Speremo z NaCl, da stabiliziramo vezavo barvila.

Na ta način so identificirali endoglukanazne gene iz številnih rodov bakterij.

Eksoglukanaz ni mogoče identificirati na enak način, zato so klone v ekspresijski knjižnici pregledovali s protitelesi. Za to tehniko ni nujno, da se rekombinantni protein izloča iz celic, saj celice lahko liziramo s parami kloroforma, nato pa proteine prenesemo na NC membrano.

Gene za  $\beta$ -glukozidaze so izolirali iz genomskih knjižnic mikroorganizmov, ki jih proizvajajo, pri tem pa so selekcijo opravili na gojiščih, ki kot edini vir ogljika vsebujejo celobiozo, ali pa so uporabili kromogeni substrat BCIP (5-bromo-4-kloro-3-indolil-glukopiranozid), ki so ga dodali v gojišče ( $\rightarrow$  rdeče obarvanje) oziroma MacConkeyev celobiozni agar (vsebuje barvilo nevtralnno rdeče, ki se v prisotnosti produktov razgradnje zaradi znižanja pH obarva, v alkalnem, brez aktivnosti, pa ne).

*Figure 13.28* Detection of an *E. coli* clone expressing a bacterial endoglucanase gene. The yellow halo on a red background indicates the presence of a positive clone which results from the degradation of the soluble cellulose (CMC) in the medium in the vicinity of the clone by the secreted endoglucanase.



# Izolacija genov za evkariontske celulaze

Celulazni encimi pri različnih evkariontih so si med seboj lahko zelo različni, zato uporaba univerzalnih sond za iskanje klonov v genomskih ali cDNA-knjižnicah ni možna. Razen tega mRNA za celulazne encime predstavlja pri rastlinah in glivah zelo majhen del vseh mRNA v celicah, zato so razvili postopek ‚diferencialne hibridizacije‘:

1. Celice gojimo v paralelkah, enkrat na gojišču s celulozo (pospešimo sintezo mRNA za celulazne encime), enkrat brez.
2. Izoliramo mRNA in jo frakcioniramo v saharoznem gradientu. Vsako frakcijo uporabimo za in vitro translacijo. Sintetizirane proteine analiziramo s PAGE in primerjamo vzorca iz induciranih in neinduciranih celic. S tem identificiramo frakcije, ki so zanimive za nadaljnjo analizo.
3. Iz izbranih frakcij mRNA pretvorimo v cDNA.
4. Dobljeno cDNA iz induciranih celic vstavimo v vektorje, te pa vnesemo v *E. coli*. Pripravimo replike plošč s kolonijami ter analiziramo z radioaktivno označeno mešano sondo, cDNA enkrat iz induciranih, enkrat pa neinduciranih celic.
5. Iz pozitivnih klonov izoliramo DNA in jo hibridiziramo s celokupno mRNA iz induciranih celic. Tisto mRNA, ki se je vezala, ponovno uporabimo za in vitro translacijo, nastale proteine pa pregledamo s protitelesi proti celulaznim encimom.
6. Preverimo nukleotidno zaporedje pozitivnih klonov, da izločimo tiste, ki se pojavijo večkrat.

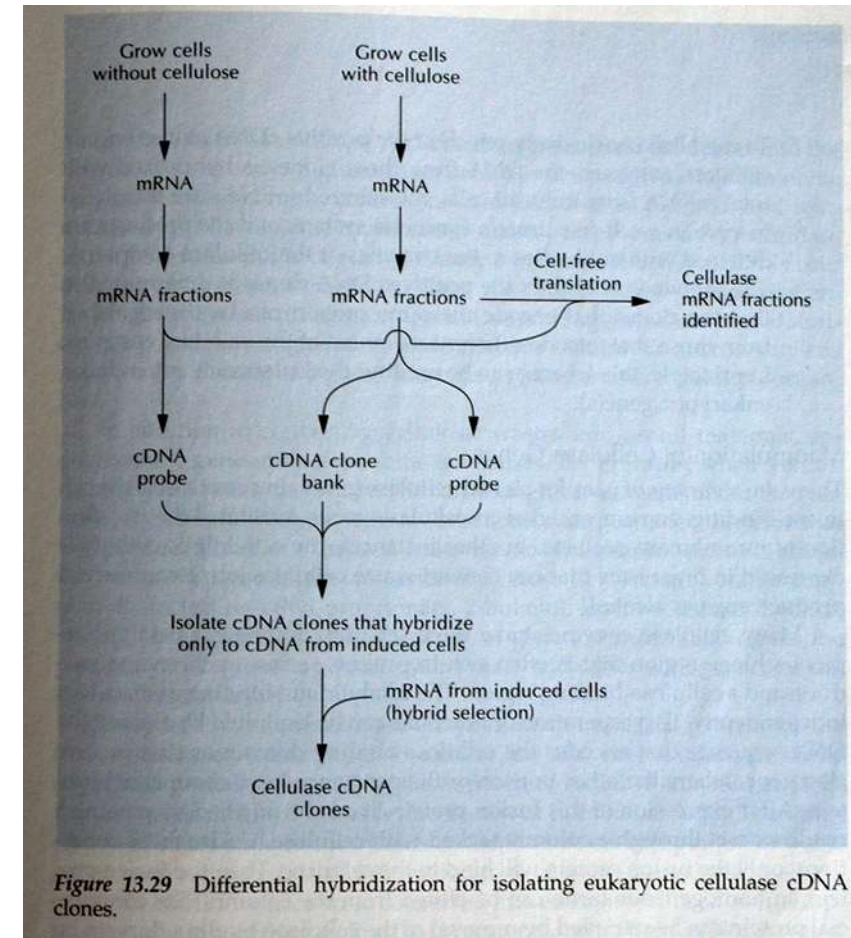
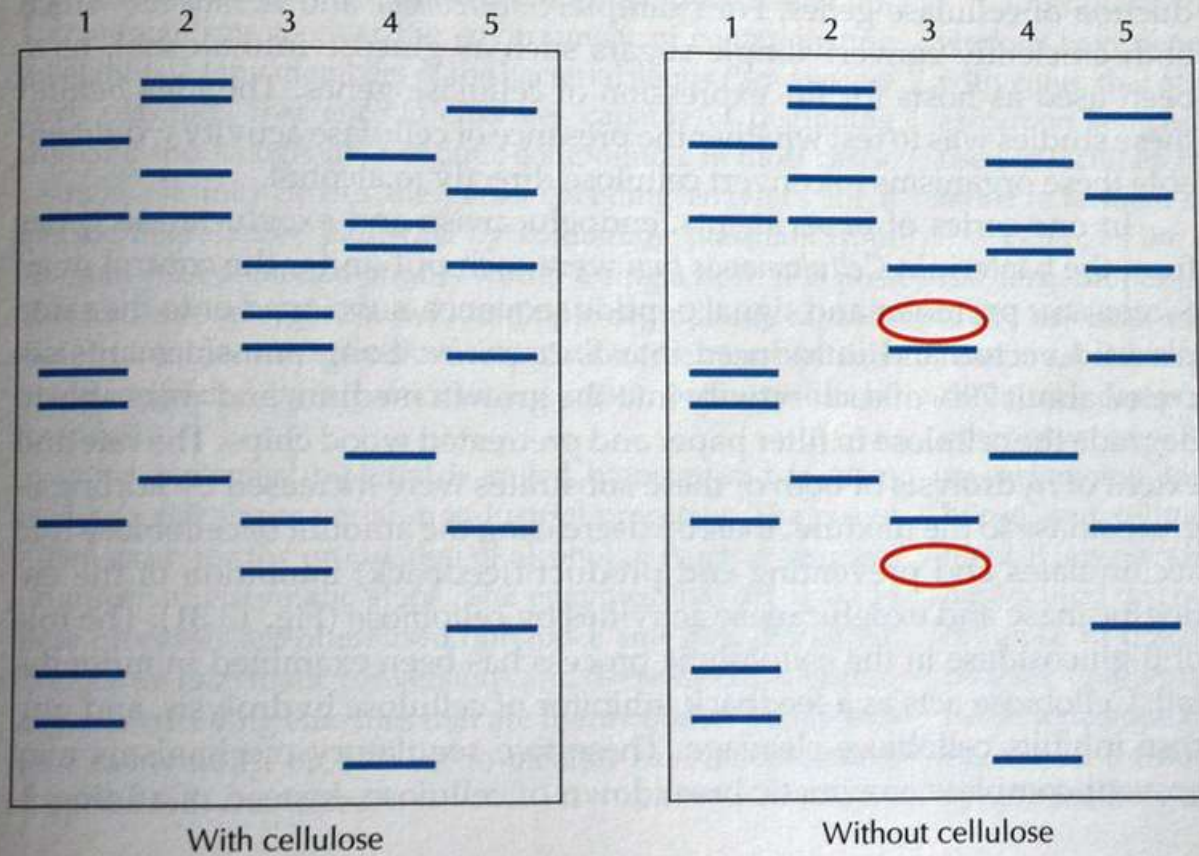


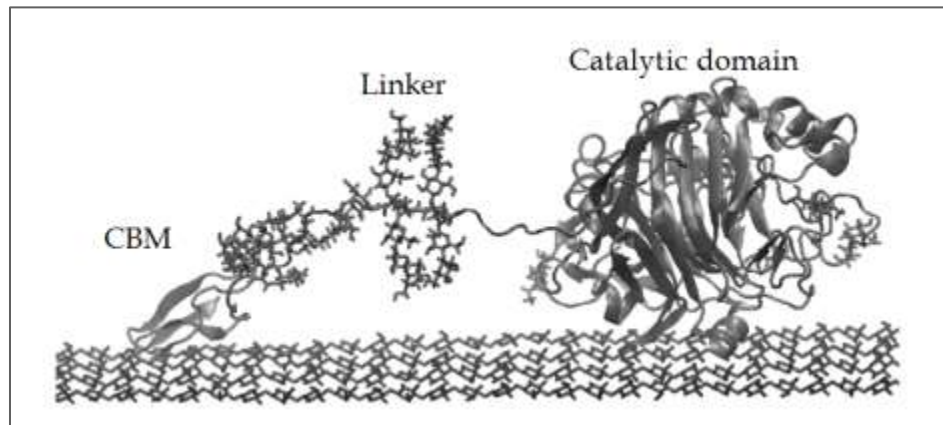
Figure 13.29 Differential hybridization for isolating eukaryotic cellulase cDNA clones.

**Figure 13.30** Schematic representation of stained polyacrylamide gels of translation products of mRNA fractions, i.e., proteins, following growth of cells either with or without cellulose. The numbers represent the fraction number following sucrose gradient centrifugation. The red ovals on the gel without cellulose indicate where bands appear when there is growth in the presence of cellulose.





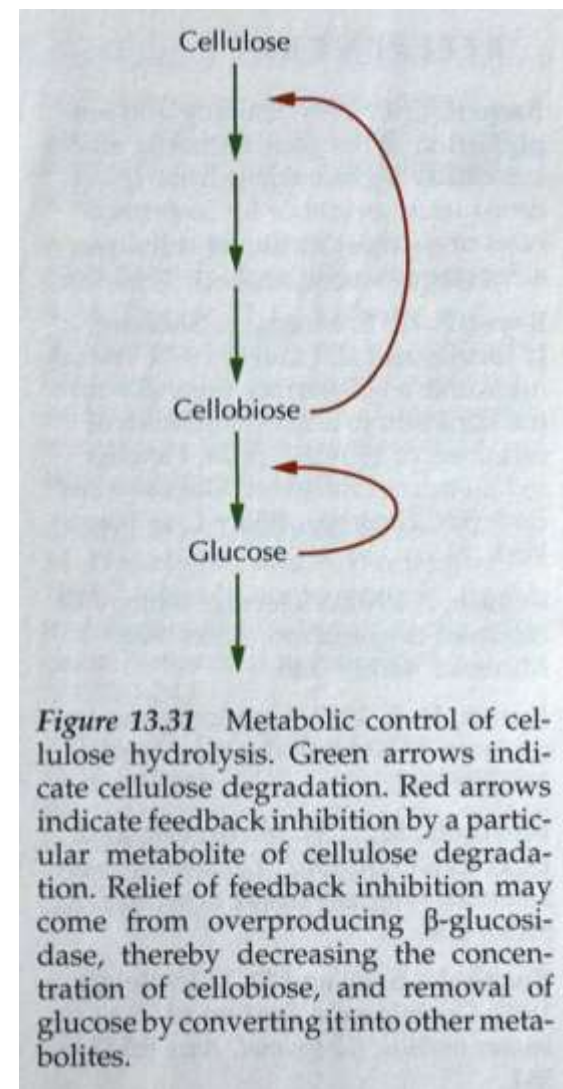
# Izboljšani celulazni encimi



Številni celulazni encimi so sestavljeni iz 3 domen: katalitične, povezovalne in vezavne.

Zapis za vezavno domeno uporabimo za pripravo ekspresijskih vektorjev, saj fuzije s CBM olajšajo izolacijo rekombinantnih proteinov.

Celulazne gene običajno kloniramo in izrazimo najprej v *E. coli*. Sledi prenos v biotehnološko zanimive organizme in seve, npr. take, ki so že sicer sposobni pretvorbe sladkorjev v alkohol, npr. *S. cerevisiae* ali *Z. mobilis*. V eni od raziskav so gena za endoglukanazo in eksoglukanazo bakterije *Cellulomonas fimi* vstavili v ekspresijski vektor za kvasovke, kjer sta bila pod kontrolo promotorja za *S. cerevisiae*, ki mu je sledilo signalno zaporedje. Ko so konstrukt vnesli v kvasovke, so identificirali transformante, ki so ~70 % izraženih encimov izločali v gojišče, s čimer so bili sposobni razgraditi celulozo v filter papirjih in predhodno obdelane lesne sekance. Izplen so povečali s tem, da so v mešanico dodajali  $\beta$ -glukozidazo in s tem znižali koncentracijo celobioze, ki se je nabirala in preko povratne zanke inhibirala delovanje obeh rekombinantnih glukanaz.



# Pomen celulaz v različnih prevorbnih procesih

V pretvorbi celuloze kot negativni povratni regulator deluje tudi glukoza, ki zavira hidrolizo celobioze. Zaradi dveh negativnih povratnih zank razgradnja celuloze ni bila popolna. Za cilj so si zadali, da bi - namesto dodajanja izolirane  $\beta$ -glukozidaze v gojišče - v kvasovke vstavili gen za ta encim iz celulolitične glive *Trichoderma reesei*. Najprej so gen vstavili v vektor z večjim številom kopij na celico in z njim transformirali izhodiščni sev glive. Aktivnost encima in vitro se je povečala za 5,5-krat, razgradnja Avicela (celuloznega derivata) pa se je pospešila za tretjino.



Endoglukanaze pa niso uporabne samo pri pretvorbi celuloznih odpadkov, temveč tudi drugje. V vinarstvu na primer kvasovke z dodanim genom za endoglukanazo (pod kontrolo konstitutivnega aktinskega promotorja) proizvedejo vino, ki ima bolj sadno aromo. Ugotovili so, da se je v tako pridobljenem vinu povečala vsebnost 12 različnih hlapnih spojin (etilpropionat, 2-propanol, izoamilacetat, izoamilalkohol, izomaslena kislina ipd.). Tako je mogoče z inženirskimi kvasovkami pridobiti vina s posebnimi značilnostmi.

Celulaze so uporabili tudi za pretvorbo odpadnega papirja v glukozo (dodane izolirane celulaze, 45 °C) in naprej s kvasovkami v etanol. Če bi v velikem merilu dosegli izkoristke, izmerjene v malem, bi iz 1 tone odpadnega papirja pridobili 400 l etanola. Ker v Severni Ameriki letno zavržejo 100 mio t papirja, bi s pretvorbo zadostili 16 % potreb po gorivih.

Molekularna biotehnologija:  
biogoriva  
metabolno inženirstvo

# Biogoriva

Biološka goriva so tista, ki jih proizvajamo iz biološkega materiala in izvira in fiksacije ogljika. Običajno izhajamo iz biomase, ki jo pretvorimo v termičnih, kemijskih ali encimskih reakcijah do molekul ali zmesi, ki jih lahko uporabljamo za pogon strojev ali za kurjavo. Najpogostejši biogorivi sta bioetanol in biodizel, obstajajo pa še številni drugi (bioplin, biobutanol, biovodik).

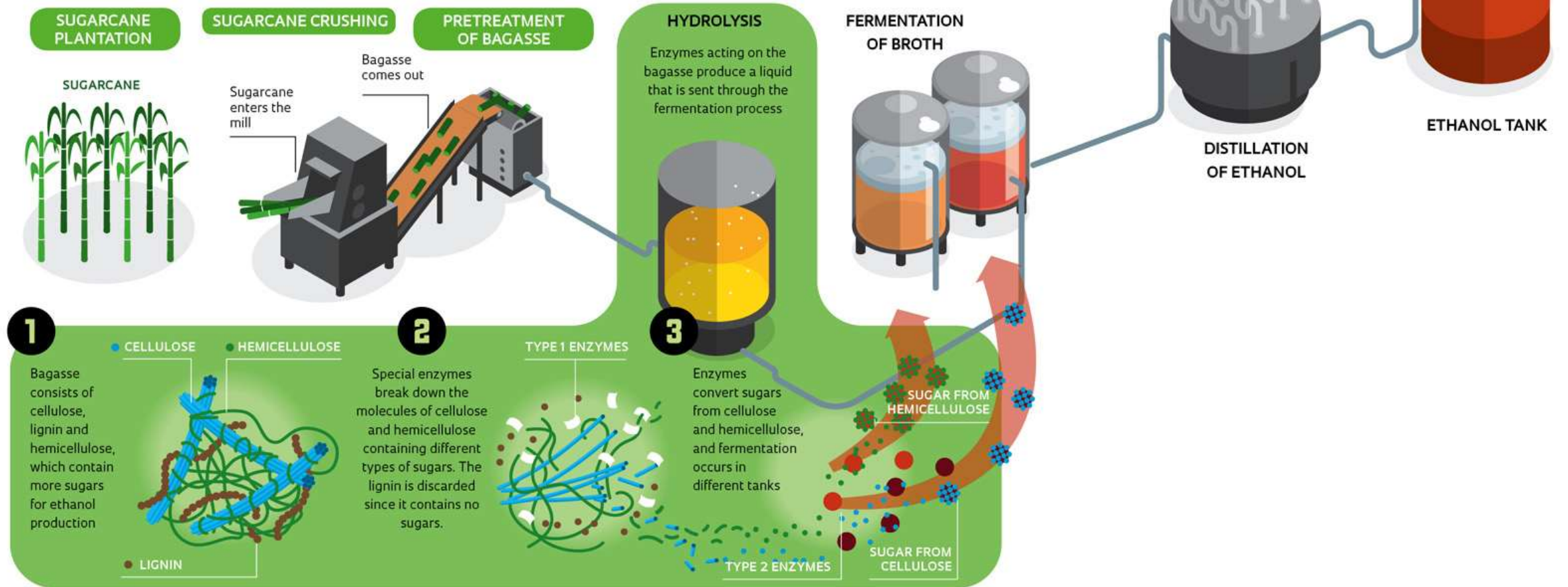
Poznamo več generacij biogoriv. Biogoriva prve generacije (konvencionalna biogoriva) izhajajo iz sladkorja, škroba ali rastlinskih olj. Zaradi proizvodnje biogoriv prve generacije je prišlo do hitrega dviga cen hrane, saj za njihovo proizvodnjo uporabljajo surovine, ki jih lahko uporabimo tudi za prehrano.

Biogoriva druge generacije (napredna biogoriva) proizvajajo iz biomase, ki je ni mogoče uporabiti za prehrano (lignoceluloza, odpadki,...). Načeloma je pretvorba v goriva bolj zapletena in zato dražja kot pri konvencionalnih biogorivih.

<u>Type of biofuel</u>	<u>1st generation</u>	<u>2nd generation</u>
<b>biodiesel</b>	edible crops, e.g. soybean, sunflower, palm oil	nonedible biomass, waste cooking oil
<b>bioethanol, biobutanol</b>	edible crops, e.g. sugar cane, maize, wheat	nonedible crops
<b>biogas</b>	edible crops, e.g. maize, grass, sugar beet	nonedible biomass (manure, slurry, food waste, sewage)
<b>biosyngas</b>	(coal)	municipal waste, waste wood, dry crop residues

# The future in second-generation ethanol

After the sugarcane broth is used in the first generation, the bagasse and leaves are utilized in the hydrolysis process. The final stage involves traditional fermentation by yeasts that convert the sugars into ethanol



# 1000 g (total mass) of food waste/vegetable waste

930 g of moisture  
or 93% of vegetable waste is moisture

Ratio of VS (volatile solids) to TS (total solids) in this case is  $65.45\text{g}/70\text{g} = 0.935$  i.e. **VS:TS = 0.935**. Compare to sewage sludge where VS:TS is around 0.6, i.e. much lower. "The TS:VS ratio tells you how much of your sample is organic material and thus would combust in a bomb calorimeter."

70g = **TS** (total solids)

Is what is left over in a drying oven at 105°C until constant weight has been reached, e.g. over night. Total solids is  $\%TS = (70\text{g}/1000\text{g}) \times 100 = 7\%$

$$\%TS = \frac{\text{mass of dried sample}}{\text{mass of sample before drying}} \times 100$$

**VS (volatile solids) = 65.45 g** i.e. 93.5 % of TS  
 $\%VS_{\text{based on TS}} = \frac{\text{mass after } 550^\circ\text{C muffle furnace}}{\text{mass of sample after } 105^\circ\text{C drying}} \times 100$

i.e. 93.5 % of 70g is  $0.935 \times 70\text{g} = 65.45\text{g}$   
(there is another definition of VS with mass of sample before drying !)  
**VS is also known as = organic dry matter ODM = loss on ignition LOI**

**Ash = 4.55 g** or **6.5 % of TS**

Is what is left over in a muffle furnace at 550°C after 2 hours; ash contains silicone

**Carbohydrates:**  
biogas yield 830 m<sup>3</sup>/t

(1)

**Lipids = fats and oils:**  
biogas yield 1444 m<sup>3</sup>/t

(2)

**Proteins:**  
biogas yield 793 m<sup>3</sup>/t

(3)

**hemicellulose**  
Sum of hemicellulose and cellulose is called **holocellulose**

**cellulose**

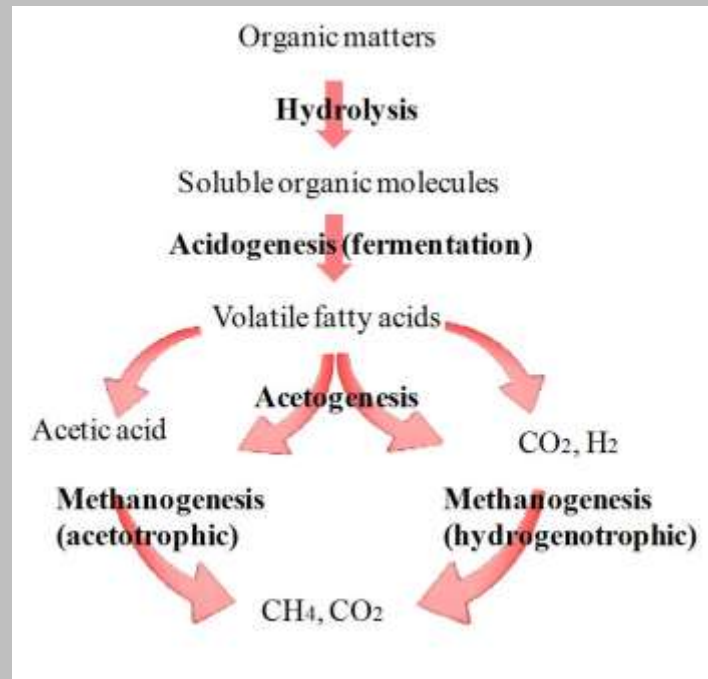
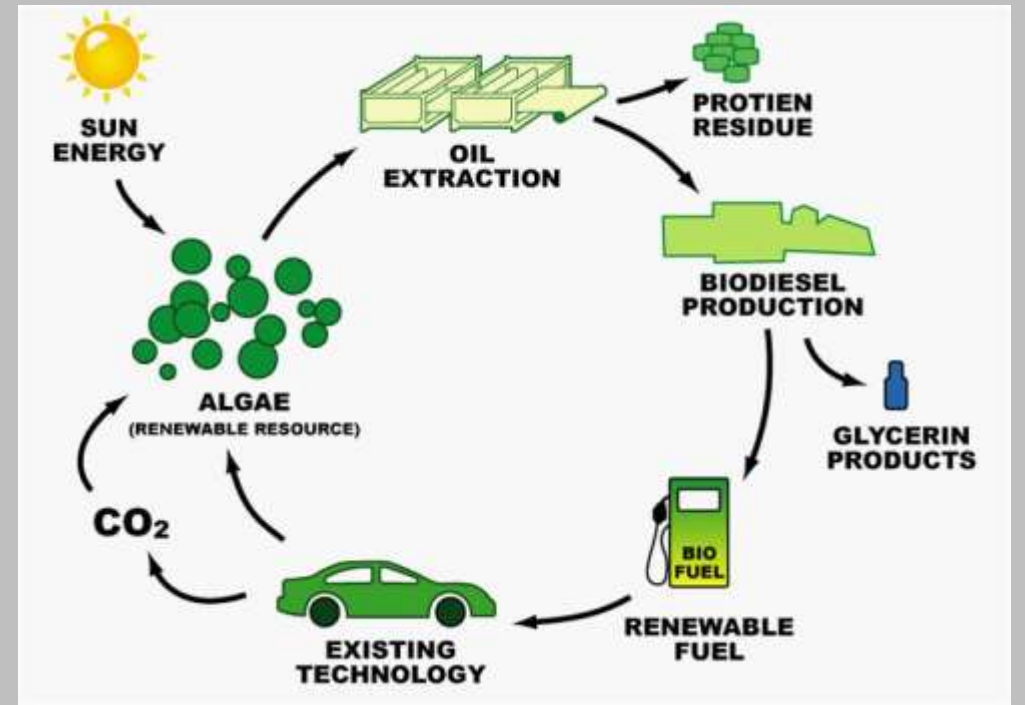
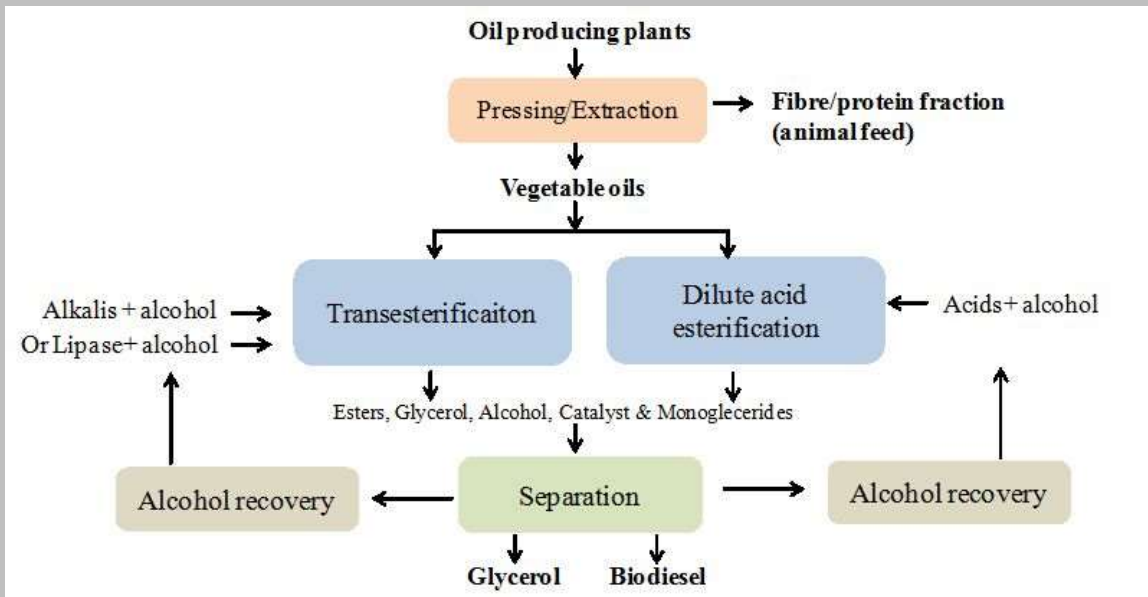
**lignin**

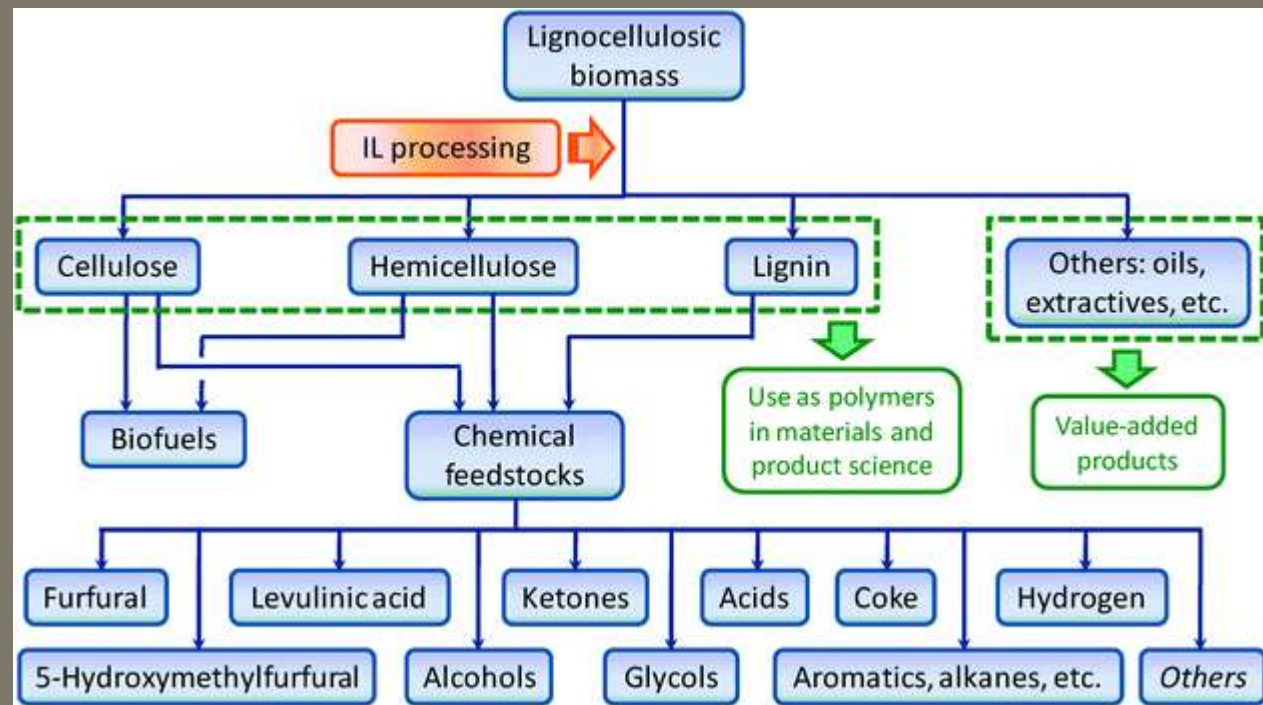
Lignocellulosic fibre (cellulose inside lignin is the problem)

Lignocellulose is **non-biodegradable** or **recalcitrant**. It consists of biopolymers (cellulose, hemicellulose and lignin - they form an insoluble three-dimensional network with micro- and microfibrils and wall-layers.

**(4) Fibers** (give structure to the biomass)

**These 4 components characterise your organic feedstock (e.g. food waste, or manure)**





Chem. Commun., 2011, 47, 1405-1421



# Cyanobacterial biomass as carbohydrate and nutrient feedstock for bioethanol production by yeast fermentation

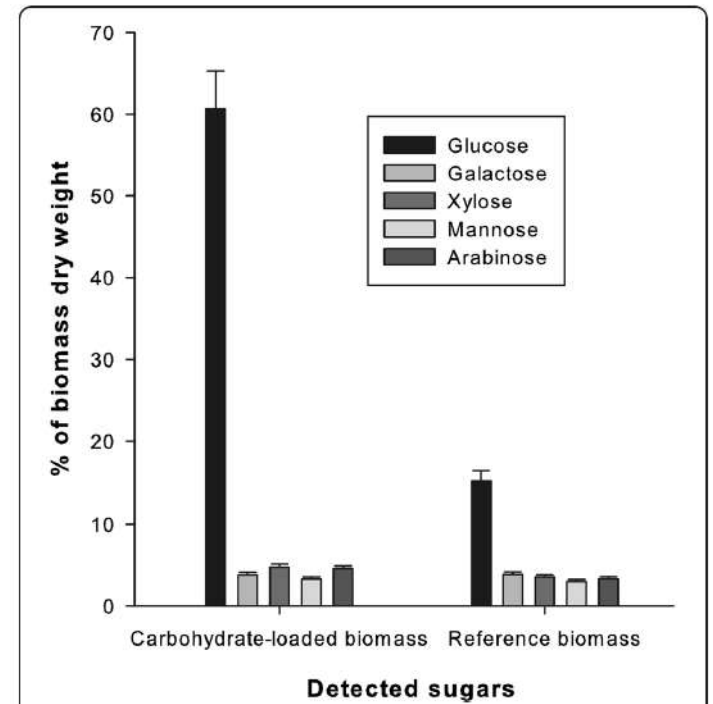
K Benedikt Möllers<sup>1</sup>, David Cannella<sup>2</sup>, Henning Jørgensen<sup>2,3</sup> and Niels-Ulrik Frigaard<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Background:** Microbial bioconversion of photosynthetic biomass is a promising approach to the generation of biofuels and other bioproducts. However, rapid, high-yield, and simple processes are essential for successful applications. Here, biomass from the rapidly growing photosynthetic marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002 was fermented using yeast into bioethanol.

**Results:** The cyanobacterium accumulated a total carbohydrate content of about 60% of cell dry weight when cultivated under nitrate limitation. The cyanobacterial cells were harvested by centrifugation and subjected to enzymatic hydrolysis using lysozyme and two alpha-glucanases. This enzymatic hydrolysate was fermented into ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* without further treatment. All enzyme treatments and fermentations were carried out in the residual growth medium of the cyanobacteria with the only modification being that pH was adjusted to the optimal value. The highest ethanol yield and concentration obtained was 0.27 g ethanol per g cell dry weight and 30 g ethanol L<sup>-1</sup>, respectively. About 90% of the glucose in the biomass was converted to ethanol. The cyanobacterial hydrolysate was rapidly fermented (up to 20 g ethanol L<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>) even in the absence of any other nutrient additions to the fermentation medium.

**Conclusions:** Cyanobacterial biomass was hydrolyzed using a simple enzymatic treatment and fermented into ethanol more rapidly and to higher concentrations than previously reported for similar approaches using cyanobacteria or microalgae. Importantly, as well as fermentable carbohydrates, the cyanobacterial hydrolysate contained additional nutrients that promoted fermentation. This hydrolysate is therefore a promising substitute for the relatively expensive nutrient additives (such as yeast extract) commonly used for *Saccharomyces* fermentations.



**Figure 3 Monosaccharide analysis of *Synechococcus* biomass.** Cells were cultivated for 48 hours with either low (0.24 g NaNO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>) or high (1.0 g NaNO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>) initial nitrate concentrations to generate 'carbohydrate-loaded biomass' or 'reference biomass', respectively.

V pogojih nizke konc. dušika cianobakterije akumulirajo glikogen, ki lahko predstavlja tudi 60 % suhe teže celic. Celice razgradijo z lizocimom v hipotoničnih pogojih, nato polimere cepijo z  $\alpha$ -glukanazami, hidrolizat pa uporabijo za rast kvasovk in alkoholno fermentacijo.

Poti do novih proizvodov in nove poti do obstoječih proizvodov (ceneje, več, hitreje,...) so možne z izboljšavo sevov [*strain improvement*]. To je mogoče doseči na dva načina:

- z naključno mutagenozo
- z metabolnim inženirstvom

Klasičen način je z naključno mutagenozo in presejanjem velikega števila preživelih ‚klonov‘. Usmerjena mutageneza omogoča ožje iskanje in boljše definirane seve – pogosto jo uporabimo kot orodje v metabolnem inženirstvu.

Metabolno inženirstvo temelji na natančnem poznavanju metaboličnih poti in modelih, ki jih na osnovi dosedanjega znanja lahko pripravimo. Koristno je poznavanje procesov tudi pri drugih organizmih (donorji genov). Predvidimo potrebne spremembe (lastnosti obstoješih encimov in regulatorjev, vnos novih genov, delecije regulatorjev, povečanje števila kopij...), ki jih uvedemo z genskim inženirstvom. Dobljenim GS sevom izmerimo vrednosti, pomembne za metabolično pot (konc. mRNA, pretoki metabolitov) in dobljene vrednosti primerjamo z modelom.

Spremembe, ki jih vnašamo:

odstranjevanje transkripcijskih ovir za ključne encime (npr. zamenjava inducibilnega s konstitutivnim promotorjem), odstranjevanje alosteričnih regulatorjev in negativnih povratnih zank, izboljšava kinetičnih lastnosti ključnih encimskih stopenj, genetsko blokiranje konkurenčnih poti, zagotavljanje gradnikov za metabolično pretvorbo do želenega produkta, pospešitev vnosa substratov in izločanja produktov, ...

Cilje lahko dosežemo tudi z zamenjavo proizvodnega sistema (tipa celic, seva), kar pa vedno vključuje genetsko inženirstvo.

# Strain Selection and Evolution

# Omics and Flux Analysis

