

Energimyndighetens titel på projektet – svenska Biokemisk omvandling av bark – en outnyttjad men rikligt förekommande resurs	
Energimyndighetens titel på projektet – engelska Biochemical conversion of bark – an underutilized yet abundant resource	
Universitet/högskola/företag Chalmers Tekniska Högskola	Avdelning/institution Industriell Bioteknik/Life Sciences
Adress Kemigården 4, 41296 Göteborg	
Namn på projektledare Johan Larsbrink	
Namn på ev övriga projektdeltagare Merima Hasani, Chalmers, Amanda Sörensen Ristinmaa, Chalmers, Phillip Pope, Norges Biovetenskapliga Universitet (NMBU)	
Nyckelord: 5-7 st Bark, granbark, extraktivännen, biologisk nedbrytning, förnybar biomassa, industriell sidoström	

Förord

Det här projektet ingick i programmet Energiriktad Grundforskning och har till största del finansierats av Energimyndigheten. Extra finansiering tillkom under projektet från Carl Tryggers stiftelse (CTS 21:1424) samt Adlerbertska forskningsstiftelserna vilket möjliggjorde fler ingående analyser.

Innehållsförteckning

Sammanfattning	1
Summary.....	2
Inledning/Bakgrund.....	3
Genomförande.....	3
Resultat	4
Diskussion.....	5
Publikationslista	6
Referenser, källor	7
Bilagor	7

Sammanfattning

Bark är en stor sidoström/restprodukt inom skogsindustrin som i dagsläget främst bränns för direkt energi, men förbränningen försämras av barkens höga proportioner av både fukt och mineraler som skapar stora mängder aska. Barken är den vävnad hos trädet som har högst strukturrikedom och dess intressanta molekyler skulle i stället kunna användas för att skapa nya produkter, så som biobränslen. En betydande del av barken förloras också till biologisk nedbrytning.

För att skapa nya produkter från bark via biokemiska/biologiska metoder, eller förhindra dess nedbrytning, behövs förståelse för hur barken bryts ned av naturens mikroorganismer, men denna kunskap saknas. I projektet har vi fokuserat på granbark och kartlagt hur den bryts ned över lång tid, 6 månader, dels av blandade uppsättningar av mikroorganismer och dels av enskilda svamparter. Vi har även studerat hur olika sorters enzymer kan bryta ned olika komponenter av barken: tanniner och polysackariden xylan. Våra mikrobiologiska studier har visat att särskilt hartssyror som finns i stor mängd i bark är nyckelmolekyler som måste detoxifieras av specialiserade arter innan en generell nedbrytning tar vid, och att främst bakterier verkar ha denna roll. Vi har isolerat en ny bakterieart som dominerade våra odlingar och visat att den är en effektiv nedbrytare även av rena hartssyror. För enskilda rötsvampar såg vi hur de har olika strategier för barknedbrytning, där vissa bryter ned mer eller mindre allt material samtidigt medan andra har en mer selektiv strategi, och möjliga nya enzymtyper som är viktiga vid barknedbrytning har identifierats via proteomik. De enskilda enzymer vi studerat visar på bredden av enzymatiska verktyg som krävs för nedbrytning av bark. Dessa studier har sammantaget brutit ny mark och lägger en solid grund för djupare förståelse av hur bark biokemiskt kan omvandlas, och möjliggör fortsatta mer tillämpade studier om hur barken kan uppvärderas och ge nya produkter.

Summary

Tree bark is a huge side stream/waste product in forestry that today is mostly burnt, but the combustion is inefficient due to its high moisture content and high proportion of minerals that lead to ash formation. The bark is the tissue of trees that has the greatest structural diversity and its molecules could instead be used to create new products, such as biofuels. A significant proportion of the bark is also lost to biological degradation. To create new products from bark using biochemical/biological methods, or to limit its degradation, understanding of how it is decomposed by microorganisms in nature is needed, but this knowledge is currently missing. In this project we have focused on spruce bark and mapped how it is decomposed over long time spans, 6 months, both by microbial consortia and by individual fungal species. We have also studied how different enzymes can break down bark components: tannins and the polysaccharide xylan. Our microbiological studies have shown that especially resin acids, which are found in large amounts in the bark, are key molecules to be detoxified by specialized species before a general decomposition takes place, and that this role is chiefly filled by bacteria. We have isolated a new bacterial species which dominated our cultures and shown that it is an efficient degrader of pure resin acids. For individual rot fungi we saw that they have different strategies for bark degradation, where some degrade more or less everything at the same time, while others have a more selective strategy, and possible new bark-degrading enzymes were identified using proteomics. The individual enzymes we have studied showcase the breadth of enzymatic tools needed to degrade bark. Our studies have overall made groundbreaking contributions to the field and lay a solid foundation to deeper understanding of biochemical bark conversion, and thereby enable continued and deeper studies of how bark can be valorized into new products.

Inledning/Bakgrund

Trädbark produceras i miljontals ton årligen [1], men är fortfarande en restprodukt med lågt värde. Det mesta av barken bränns upp vilket ger direkt energi till ett bruk, men det höga fukt- och mineralinnehållet minskar effektiviteten i processen. Om barkens kemiska strukturrikedom i stället skulle kunna tas till vara skulle den mer effektivt kunna omvandlas till energibärare eller diverse högvärdesprodukter som kan konkurrera med fossila alternativ. Till skillnad från trä innehåller barken en stor andel s.k. extraktivämnena som har diverse egenskaper [2], men många av dem är toxiska/giftiga och bidrar till barkens skyddande effekt mot yttre påverkan. Extraktivämnena och den annorlunda strukturen jämfört med trä gör dock barken till ett material som inte används på något avancerat sätt i skogsbruken idag.

Biokemiska metoder för omvandling av biomassa räknas ofta som de mest hållbara, och kräver inte skadliga lösningsmedel eller höga temperaturer för att vara effektiva. Att biokemiskt omvandla bark vore därmed en möjlig framtida väg att gå för att uppvärdera barken och särskilt dess extraktivämnena, men ett hinder är att det finns ytterst lite information om hur bark bryts ned. Vilka arter dominerar denna process? Via vilka steg går nedbrytningen? Vilka enzymer används? I stort sett det enda som är känt är att bark bryts ned eftersom den inte ansamlas i naturen, och denna kunskapslucka förhindrar utveckling av biologiska omvandlingsmetoder. I en ny rapport från RISE fastslags också att av den bark som produceras/skördas årligen försvinner över 10% till mikrobiell nedbrytning (<https://www.bioinnovation.se/projekt/omradesanalys-for-kartlaggning-av-biogenakolfloden/>), dvs omvandlas till koldioxid och ger varken material eller energi. Även här vore en grundläggande kunskap viktig för att kunna förhindra förluster.

I detta projekt, som genomfördes på Chalmers Tekniska Högskola mellan 2019-2023 har vi studerat hur bark kan brytas ned av olika sorters mikroorganismer och deras enzymer. En doktorand har haft projektet som sin huvudsakliga uppgift och disputerade i september 2023 på ämnet. Doktoranden var verksam på avdelningen för Industriell Bioteknik vid institutionen för Life Sciences men utförde en del av arbetet vid avdelningen för Skogsindustriell Kemiteknik vid institutionen för Kemi och Kemiteknik. Projektet har finansierats av Energimyndigheten inom ramen Energiriktad Grundforskning.

Genomförande

För mikrobiella nedbrytningsstudier använde vi främst granbark som vi fick från företaget Holmen AB, och för att kunna utföra kontrollerade studier maldes denna och steriliserades sedan med hjälp av gammastrålning som inte förstör barkstrukturen nämnvärt. Sedan inokulerades barken med antingen ett konsortium (blandning) av mikroorganismer från en industriell barkhög, eller enskilda arter av rötsvampar, och eftersom barknedbrytning förväntades vara en långsam process följdes den över sex månader. För konsortiet gjordes dels DNA-

sekvenseringsstudier för att ta reda på vilka arter som fanns i materialet och i vilka proportioner, och dels kemiska analyser för att se vad som samtidigt hände i själva barken. För svampstudierna gjordes liknande materialanalyser medan tillväxten av svamp mättes och sedan följdes upp med ingående proteomikstudier av den bäst växande svampen (vitrötearten *Dichomitus squalens*) för att ta reda på vilka proteiner som producerades under tillväxt på bark. Dessa studier genomfördes delvis tillsammans med Norges Biovetenskapliga Universitet (NMBU) för proteomik och delvis tillsammans med Åbo Akademi för vissa materialanalyser.

För enzymstudier karakteriserades enzymer som bryter ned tannin – en vanlig beståndsdel i diverse barktyper, både från barr- och lövved – samt enzymer som bryter ned xylan – en vanlig polysackarid (komplex kolhydrat) i både trä och bark. Enzymer valdes ut från genomiska studier eftersom proteomikstudierna blev försenade på grund av covid-pandemin, och fokuserade på både bakterie- och jäst- enzymer.

Resultat

Ett första intressant resultat var att hartssyror och andra delar av bark förväntas delvis brytas ned/modifieras via oxidation, men vi kunde se att den bark som vi steriliserat och använde som kontrollprov knappt påverkades alls under våra experiment, vilket tyder på att barknedbrytning eller hartssyreoxidation inte är en spontan kemisk process utan en biologisk.

Studierna av nedbrytning av granbark av mikrobiella konsortium visade förvånande nog endast en begränsad nedbrytning av kolhydrater, tvärt emot hypotesen att dessa skulle utgöra den främsta näringskällan. I stället såg vi att det främst var extraktivämnena som bröts ned, särskilt i början av nedbrytningen. Via DNA-sekvensering av markörgener för bakterier och svampar (eukaryoter) kunde vi se att den biologiska diversiteten i konsortiet gick ned i början av nedbrytningen, vilket innebär att det fanns ett stort selektivt tryck som gjorde att alla arter från startkulturen inte kunde växa till. Diversiteten ökade igen i samband med att hartssyrorna tydligt börjat omvandlas/metaboliseras, vilket tyder på att de utgör en stark påverkan under tidiga nedbrytningsfaser. Vi sekvenserade ett av de tidiga proverna med metagenomik för att få en djupare inblick i vilken sorts arter som dominerade, och kunde återskapa 15 genomsekvenser där vi såg en korrelation mellan antal gener som kodar för hartssyrenedbrytande enzymer och allmän förekomst i provet. Den rikligast förekommande bakteriearten lyckades vi sedan isolera genom att odla på agarplattor med hartssyror som kolkälla, och denna genomsekvenserades och karakteriserades och döptes till *Pseudomonas abieticivorans* (ätare av abietinsyra). Den isolerade arten visade sig kunna växa på olika typer av hartssyror vilket tidigare visat sig vara en ovanlig egenskap hos bakterier [1].

Från studierna av enskilda rötsvampar som växer på granbark kunde vi i stället se att dessa främst verkar bryta ned just kolhydrater, men även extraktivämnena. Vi såg dock skillnader mellan olika arter, som var av vitröte-, brunröte-, och mjukrötetyp samt mögel (whiterot, brownrot, softrot, mold), där vissa arter bröt

ned de flesta av barkens polymerer medan andra endast kunde bryta ned vissa kolhydrater. Vi såg också att vissa arter verkar kunna helt bryta ned hartssyror medan andra endast delvis modifierar dem, vilket kan tyda på att i stället för att helt omvandla dem så utför de en detoxifiering för att underlätta tillväxt. Den bäst växande arten, vitrötan *Dichomitus squalens*, studerades djupare med proteomik, vilket visade på ett mer komplext proteom (producerade proteiner, inkl. enzymer) vid tillväxt på intakt bark jämfört med extraktivämnescfri bark eller rena polysackarider. Några av dessa identifierade proteiner representerar troligtvis nya typer av enzymer som är viktiga under barknedbrytning.

Från enzymstudierna har vi i detalj karakteriserat tre tannaser (tannin-nedbrytande enzymer) från bakterien *Clostridium butyricum*, vilken återfinns både i jord och i mag-tarmfloran. Varför denna bakterie har tre tannaser var oklart före studien, och multiplicitet av tannaser har inte studerats tidigare. Vi såg att dessa tannaser hade olika biokemiska egenskaper samt 3D-struktur (en struktur löstes via röntgenkristallografi), vilket tyder på olika biologiska roller vid tannin-nedbrytning. Alla tannaser kunde utöver syntetiska modellsubstrat även bryta ned tanniner från ekbark. De xylanaser vi studerade från olika jästarter, varav en isolerad från bark, hade på liknande sätt olika egenskaper. Själva jästerna visade sig, liksom mögelsvamparna ovan, ha olika strategier vid nedbrytning av xylan, där vissa var synnerligen effektiva medan andra inte satte igång sitt nedbrytningsmaskineri utan att små xylan-fragment fanns i odlingen, vilket tyder på att de inte är primära nedbrytare utan är beroende av mer aktiva nedbrytare i sin närhet.

Diskussion

Vi har visat i dessa studier dels hur biologisk barknedbrytning är en långsam process om den får fortgå under relativt ”naturliga” förhållanden, och att nedbrytningen verkar domineras av bakterier när det kommer till komplexa artsammansättningar. Hartssyrorna verkar vara nyckelmolekyler som måste brytas ned innan flertalet arter kan börja växa och därmed bryta ned barken effektivt. Vi ser också att det är just mikroorganismerna som driver den här processen och inte spontana kemiska processer. Barken är utvecklad för att förhindra angrepp, och extraktivämnena ses här som viktiga och giftiga beståndsdelar som förhindrar eller åtminstone försinkar nedbrytningen, men vissa arter kan trots det bryta ned den. Vissa arter har ett komplett enzymatiskt maskineri för att bryta ned bark medan andra verkar vara begränsade och även ha en högre känslighet för de inhibitoriska molekylerna som återfinns bland barkens extraktivämnena.

För energiändamål kan de här studierna vara användbara för att 1) utveckla enzymatiska metoder för att modifiera extraktivämnena och skapa nya högvärdesprodukter, 2) utveckla enzymatiska eller biologiska förbehandlingsmetoder för att detoxifiera barken och möjliggöra t.ex. hydrolys och jäsning till biobränslen vilket också till stor del kringgår problemet med den höga fukthalten i barken vid förbränning, 3) minska materialförluster vilket vi visat beror på biologisk nedbrytning och inte spontana kemiska processer. Genom utveckling av mer avancerade metoder för att använda särskilt barkens

extraktivämnen skulle den kunna användas mer effektivt, och utveckling av högvärdesprodukter skulle kunna vara ett ekonomiskt incitament. Eventuella återstoder av barken kan sedan brännas för direkt energi, men efter att dess intressanta molekyler tagits till vara.

Publikationslista

1. 2023, Ristinmaa AS, Tafur Rangel A, Idström A, Valenzuela S, Kerkhoven EJ, Pope PB, Hasani M, Larsbrink J. Resin acids play key roles in shaping microbial communities during degradation of spruce bark. *Nature Communications*, **14**(1):8171. DOI: 10.1038/s41467-023-43867-y.

Sammanfattning: här visar vi hur granbark kan brytas ned av komplexa mikrobiella konsortium och vilka sorters arter som dominerar. Särskilt hartssyror lyfts upp som nyckelmolekyler som styr processen och en ny bakterieart med förmåga att bryta ned hartssyror isolerades, genomsekvenserades och namngavs.

2. 2023, Ravn JL, Ristinmaa AS, Coleman T, Larsbrink J, Geijer C. Yeasts have evolved divergent enzyme strategies to deconstruct and metabolize xylan. *Microbiology Spectrum*, **11**(3):e0024523. DOI: 10.1128/spectrum.00245-23.

Sammanfattning: här studerades olika vildjäster med förmåga att bryta ned polysackariden xylan, där väldigt olika enzymatiska strategier visades dem emellan. Dessa skulle kunna överföras till mer välstuderade jäster så som bagerijäst (*Saccharomyces cerevisiae*).

3. 2022, Ristinmaa AS, Coleman T, Cesar L, Langborg Weinmann A, Mazurkewich S, Brändén G, Hasani M, Larsbrink J. Structural diversity and substrate preferences of three tannase enzymes encoded by the anaerobic bacterium *Clostridium butyricum*. *Journal of Biological Chemistry*, **298**(4):101758. DOI: 10.1016/j.jbc.2022.101758.

Sammanfattning: tre bakteriella tannaser karaktäriserades biokemiskt samt strukturellt och visade sig ha olika egenskaper och förmåga att hydrolysera tanniner. En sammanställning av hela familjen av bakteriella tannaser gjordes även, vilket visar på diversiteten av mikrobiella tannaser hos sekvenserade arter.

4. Manuskript, publicerat pre-print: Ristinmaa AS, Korotkova E, Arntzen MØ, Eijsink VGH, Xu C, Sundberg A, Hasani M, Larsbrink J. Fungi employ different strategies to degrade extractives and polysaccharides in spruce bark. *In review*.

Sammanfattning: vi odlade fem olika svamparter på granbark och såg hur de skiljde sig starkt åt i hur de angrep materialet, med antingen nedbrytning av det mesta eller enbart ett urval av barkens molekyler. Nya potentiella barknedbrytande enzymer identifierades via proteomik och dessa kan bli fokus för framtida barknedbrytningsstudier.

Referenser, källor

1. Kwan, I., Huang, T., Ek, M., Seppänen, R. & Skagerlind, P. Bark from Nordic tree species—a sustainable source for amphiphilic polymers and surfactants. *Nord. Pulp Pap. Res. J.* 37, 566–575 (2022).
2. Krogell, J., Holmbom, B., Pranovich, A., Hemming, J. & Willför, S. Extraction and chemical characterization of Norway spruce inner and outer bark. *Nord. Pulp Pap. Res. J.* 27, 6–17 (2012).
3. Martin, V. J., Yu, Z. & Mohn, W. W. Recent advances in understanding resin acid biodegradation: microbial diversity and metabolism. *Arch. Microbiol.* 172, 131–138 (1999).

Bilagor

1. Administrativ bilaga.
2. Publicerad vetenskaplig artikel: Ristinmaa et al. 2022, Structural diversity and substrate preferences of three tannase enzymes encoded by the anaerobic bacterium *Clostridium butyricum*, *Journal of Biological Chemistry*, <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101758>.
3. Publicerad vetenskaplig artikel: Ravn et al. 2023, Yeasts have evolved divergent enzyme strategies to deconstruct and metabolize xylan, *Microbiology Spectrum*, <https://doi.org/10.1128/spectrum.00245-23>.
4. Publicerad vetenskaplig artikel: Ristinmaa et al. 2023, Resin acids play key roles in shaping microbial communities during degradation of spruce bark, *Nature Communications*, <https://doi.org/10.1038/s41467-023-43867-y>.
5. Vetenskaplig artikel under granskning, pre-print: Ristinmaa et al., Fungi employ different strategies to degrade extractives and polysaccharides in spruce bark, <https://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4645400>.
6. Avhandling, Amanda Sörensen Ristinmaa 2023, Microbial strategies for deconstruction of bark components, <https://research.chalmers.se/publication/537306>.