

Bioökonomie

Nutzbarmachung pflanzlicher Biomasse durch Abbau von Geruchsstoffen

JOHANNES F. BUYEL

INSTITUT FÜR BIOVERFAHRENSTECHNIK, UNIVERSITÄT FÜR BODENKULTUR WIEN (BOKU), ÖSTERREICH

Using residual plant biomass in sophisticated applications such as building materials and additives is often hindered by the presence of odorous, volatile organic compounds (VOC) that gas-out and create an unacceptable user experience. Likewise, plant-derived proteins may create off-flavors in vegan food products. The *in planta* production of enzymes that degrade VOCs, can facilitate the removal of the latter, for example during processing, and ensure compatibility with high-value applications

DOI: 10.1007/s12268-024-2173-2
© Der Autor 2024

■ In vielen Großprozessen wie der landwirtschaftlichen Lebensmittelherstellung fallen große Mengen pflanzlicher Restbiomasse an. Diese Biomasse wird oft direkt thermisch verwertet oder zunächst fermentiert (z. B. zur Biogasproduktion) und dient damit letztlich der Energiegewinnung. Einer höherwertigen, stofflichen Nutzung stehen häufig flüchtige Geruchsstoffe (*volatile organic compounds*, VOC) entgegen, welche zu Ausdünstungen führen, die für Endnutzer olfaktorisch inakzeptabel sein können. Ein ähnliches Problem ergibt sich bei der Verwendung pflanzlicher Proteine in veganen oder vegetarischen Produkten sowie pflanzlichen Lebensmitteln allgemein, wobei Fehlge-

schmäcke entstehen können [1, 2]. Zwar ist es möglich, VOCs durch prozesstechnische Maßnahmen (z. B. Filtration, Extraktion, biologische Umsetzung) zu entfernen [3], allerdings kann der Aufwand und letztlich die Kosten nicht im Verhältnis zum Nutzen stehen, weshalb eine Verwendung der pflanzlichen Restbiomasse unrentabel werden kann. Dies ist ein relevantes Problem für eine kreislauforientierte, auf nachwachsenden Rohstoffen basierte Bioökonomie (Abb. 1).

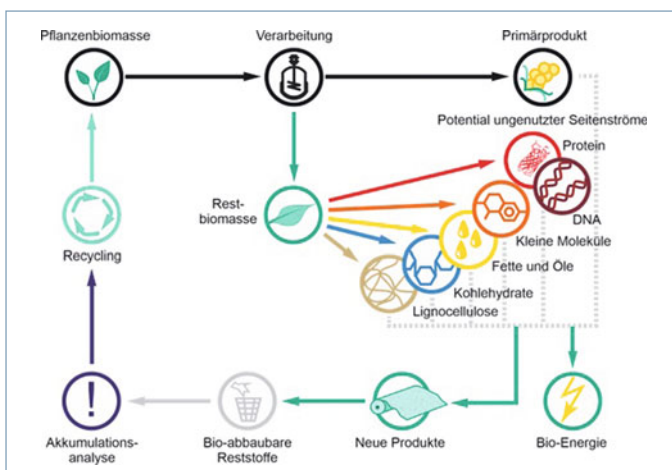
Enzymauswahl und Expressionstests

Eine Expression von Enzymen, welche die VOCs unmittelbar in der pflanzlichen Biomasse ab- bzw. umbauen kann helfen, dieses

Problem zu lösen. So ist es möglich, die relevanten Enzyme in ein Zellkompartiment zu dirigieren, in dem sie während der Anbauphase keinen negativen Einfluss

auf das Pflanzenwachstum haben und z. B. erst nach einer Zerkleinerung der Biomasse freigesetzt und aktiv werden. Die Herausforderung ist es, die relevanten VOCs und Enzyme zu identifizieren und letztere in ausreichender Menge in Pflanzen herzustellen (Abb. 2A und B). Die Identifizierung ist schwierig, weil es verschiedene Geruchskomponenten gibt und sich deren Menge und Zusammensetzung sowohl in Abhängigkeit von der zu prozessierenden Biomasse als auch den Prozessierungs- und Lagerbedingungen ändern kann [4]. Daher ist eine Charakterisierung der flüchtigen Substanzen ein erster Schritt, wobei auf massenspektrometrische Verfahren oder Literaturdaten zurückgegriffen werden kann. Sobald passende Enzyme identifiziert sind, sollten die anschließenden Expressionstests in einer authentischen Umgebung, d. h. Pflanzenzellen, erfolgen. Hierzu bieten sich Hochdurchsatz-kompatible Verfahren wie die „Plant Cell Packs“ (PCPs) an [5, 6], bei denen Zellen aus Suspensionskultur in ein Mikrotiterplattenformat „gegossen“ werden und anschließen für eine transiente Proteinexpression durch Infiltration mit geeigneten *Rhizobium radiobacter* (früher *Agrobacterium tumefaciens*) bereitstehen.

In unserer Forschung haben wir zunächst basierend auf Literaturdaten relevante Geruchsstoffe für Tabakpflanzen identifiziert, da diese Pflanze im Bereich des „Plant Molecular Farming“ oft für die Herstellung von pharmazeutischen Wirkstoffen verwendet wird. Darauf aufbauend erfolgte dann die Auswahl von Enzymen zum Abbau dieser Stoffe (Tab. 1). Für die Expressionstests haben wir uns auf monomere Enzyme beschränkt, um die Untersuchung möglichst simpel zu halten und etwaige Unterschiede zwischen Pflanzenzellen und den Ursprungs-



◀ **Abb. 1:** Schematische Darstellung einer möglichen integrierten, stofflichen Nutzung von pflanzlicher Restbiomasse, wie sie bei der Herstellung von Lebensmitteln, technischen Produktion oder Pharmazeutika anfällt. Die kleinen Moleküle können dabei *volatile organic compounds* (VOCs) sein, welche als Verunreinigungen auch in den anderen Stoffgruppen enthalten sein können und deren Nutzung aufgrund von Geruchsentwicklung erschweren oder sogar verhindern.

► **Abb. 2:** Schematischer Ablauf für die Auswahl und Expressionstests von Enzymen zum Abbau flüchtiger Geruchsstoffe in pflanzlicher Biomasse. **A**, allgemeiner Ablaufplan. **B**, Bild eines für das Testen im Hochdurchsatz ausgelegtes pflanzlichen Expressionssystem, sogenannte „Plant Cell Packs“ (PCPs). Bei PCPs handelt es sich um Zellen aus Suspensionskultur, welche Medium befreit und in 96-Kavitäten-Filterplatten „gegossen“ wurden. Diese PCPs ermöglichen die transiente Expression der relevanten Enzyme innerhalb von 2–3 Tagen. **C**, Detektion der in PCPs produzierten Enzyme (Tab. 1). S: nur Saccharose (negative Kontrolle); G: nur Glukose (Negativkontrolle); D: Konstrukt zur Expression des Fluoreszenzproteins DsRed (Positivkontrolle); Cy: Zytosol; A: Apoplast (sekretiert); E: endoplasmatisches Retikulum; Ch: Chloroplast.

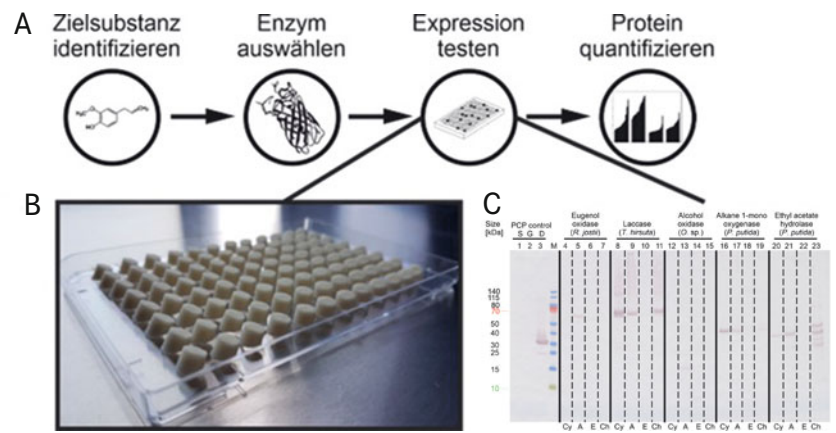


Tabelle 1: Liste von Geruchssubstanzen und möglichen, für deren Umsetzung geeigneten Enzymen.

Geruchssubstanz	Umsetzendes Enzym	UniProt ID	Masse [kDa]	Ursprungsorganismus	Substrat-selektivität	Reaktionsprodukt
1-Butanol	Alkoholoxidase	n.a.	n.a.	<i>Ochrobactrum sp.</i> AIU 033	Diverse	Diverse
n-Pentanal	Alkan-1-Monooxygenase	Q9WWW6	46.1	<i>Pseudomonas putida</i>	Diverse	Diverse
Ethylbenzen	Ethylbenzen-Dehydrogenase	Q5P5I0; Q5P5I1; Q5NZV0; Q5P5I3	110.3; 39.7; 23.4; 25.4	<i>Aromatoleum aromaticum</i> (strain EbN1)	Ethylbenzene	(S)-1-Phenylethanol
Eugenol	Eugenoloxidase	Q0SBK1	58.7	<i>Rhodococcus jostii</i> (Stamm RHA1)	Eugenol	Coniferylalkohol
Quinolin	Quinolin-2-Oxidoreduktase	P72222; P72223; P72224	30.7; 18.0; 84.2	<i>Pseudomonas putida</i>	Quinoline	Quinolin-1(2H)-on
Geosmin	Laccase	Q02497	55.7	<i>Trametes hirsuta</i>	Diverse	Diverse
Ethylacetat	Ethylacetat-Hydrolase	Q8KQK1	34.3	<i>Pseudomonas putida</i>	Diverse	Diverse

organismen der Enzyme auf deren Oligomerisierungszustand auszuschließen. Bei den Versuchen haben wir die Expression in verschiedenen Kompartimenten untersucht, um optimale Akkumulation der Proteine zu erreichen und gleichzeitig mögliche negative Effekte auf das Pflanzenwachstum umgehen zu können (**Abb. 2C**). Wir konnten alle Enzyme in Pflanzen herstellen [7].

Nächste Schritte und Anwendung

Die nächsten Schritte werden nun ein Transfer in intakte Pflanzen sowie Aktivitätstests mit Referenzsubstanzen sein. Anschließend soll der Effekt der Enzymexpression auf die Menge an Geruchssubstanzen in pflanzlicher Restbiomasse bestimmt werden. Dazu planen wir neben einzelnen Enzymen auch verschiedenen Kombinationen dieser einzusetzen, um eine Wirkung auf verschiedene Gruppen von VOCs gleichzeitig zu erzielen. Sollten diese Tests erfolgreich sein wird die vermutlich größte Herausforderung auf dem Weg zur Translation in die Anwendung bevorstehen: eine mögliche regulatorische Zulassung. Hier bietet es sich an, zunächst größere Stu-

dien mit ohnehin genetisch veränderten Pflanzen durchzuführen, z. B. solchen, die für die Herstellung von Pharmazeutika verwendet werden.

Danksagung

Unsere Arbeiten wurden durch die Max-Buchner-Forschungsstiftung (Fördernummer 3792) unterstützt. Ich danke Dr. Benjamin Gengenbach für das Foto der Plant-Cell-Pack-Mikrotiterplatte. ■

Literatur

- [1] Schroeder M, Pöllinger-Zierler B, Aichernig N et al. (2008) Enzymatic removal of off-flavors from apple juice. *J Agr Food Chem* 56: 2485–2489
- [2] Faruqi A, Henderson M, Henderson RK et al. (2018) Removal of algal taste and odour compounds by granular and biological activated carbon in full-scale water treatment plants. *Water Supply* 18: 1531–1544
- [3] Ho L, Hoefel D, Bock F et al. (2007) Biodegradation rates of 2-methylisoborneol (MIB) and geosmin through sand filters and in bioreactors. *Chemosphere* 66: 2210–2218
- [4] Kuo PC, Lai YY, Chen YJ et al. (2011) Changes in volatile compounds upon aging and drying in oolong tea production. *J Sci Food Agr* 91 293–301
- [5] Gengenbach BB, Opdensteinen P, Buyel JF (2020) Robot Cookies – Plant Cell Packs as an Automated High-Throughput Screening Platform Based on Transient Expression. *Front Bioeng Biotechnol* 8: 393
- [6] Rademacher T, Sack M, Blessing D et al. (2019) Plant cell packs: a scalable platform for recombinant protein production and metabolic engineering. *Plant Biotechnol J* 17: 1560–1566

[7] Opdensteinen P, Knödler M, Buyel JF (2023) Production of enzymes for the removal of odorous substances in plant biomass. *Protein Express Purif* 106379

Funding note: Open access funding provided by University of Natural Resources and Life Sciences Vienna (BOKU).

Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.



Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Johannes Felix Buyel
Universität für Bodenkultur Wien (BOKU)
Institut für Bioverfahrenstechnik
Muthgasse 18
A-1190 Wien
johannes.buyel@boku.ac.at
ORCID: 0000-0003-2361-143X