



Ændret stivelse - sundere korn?

Angreb af *Fusarium* i kornplanternes aks reducerer udbyttet og kan i værste fald medføre, at hele høsten må kasseres på grund af et højt indhold af svampetoksiner. Da svampen lever af kernernes stivelse, kan svampeinfektioner muligvis begrænses ved at ændre stivelsens egenskaber.

Af Jan T. Svensson, Inga Christensen Bach og Andreas Blennow, Institut for Plantebiologi og Bioteknologi, Det Biovidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet

Svampe fra slægten *Fusarium* giver store problemer i landbruget, fordi angreb i korn kan medføre ringe høstudbytte af dårlig kvalitet (Boks 1). At finde gener, som gør kornplanter resistente overfor *Fusarium* er en vanskelig opgave for planteforædlerne. De leder efter resistens både i gamle sorter og i vilde beslægtede arter, og målet er at overføre resistens til moderne kornsorter ved hjælp af krydsning. Hidtil er det dog kun lykkedes at udvikle kommercielle sorter af byg og hvede med partiel resistens.

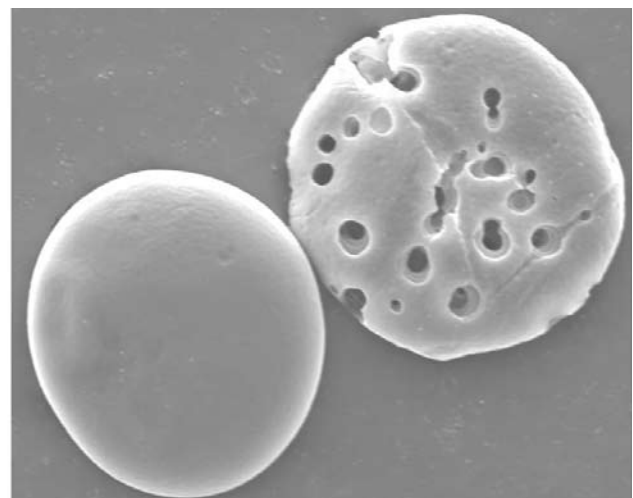
Et forskningsprojekt har haft som formål at undersøge modstandsdygtighed fra en anden synsvinkel, nemlig svampens energikilde, stivelse. Stivelsens rolle i mekanismerne bag infektionsforløbet er blevet undersøgt, og den nye viden kan bidrage til udvikling af nye sorter af byg, hvor kernerne er mere modstandsdygtige mod angreb af *Fusarium* og andre svampe.

I denne artikel beskrives dele af forløbet og nogle af de metoder, som er blevet brugt i forskningsprojektet.

Svampe spiser stivelse

I kernens frøhvide (endosperm) oplagres stivelse og proteiner med henblik på at forsyne den spirende plante med energi og aminosyrer, men endospermen fungerer også som spisekammer for svampe, som angriber kernerne. For at svampe kan udnytte kulhydraterne i de rå

stivelseskorn, der findes i kornkerners frøhvide og i knolde af kartofler mm., skal stivelsen først nedbrydes til glukose ved hjælp af enzymer. *Fusarium graminearum* kan nedbryde stivelseskorn fra byg (Figur 1), men hidtil har det ikke været undersøgt, hvilke stivelsesnedbrydende enzymer denne svamp producerer, eller om den kan nedbryde andre typer af stivelse.



Figur 1. Scanning-elektronmikroskopi (SEM) af stivelseskorn fra bygkerner. Det til højre er angrebet af *Fusarium*. Foto: Renata Skibior.





Boks 1. Fusariose - en alvorlig svampesydom

Svampesydommen aksfusariose forekommer i kornarter som hvede, byg, rug, havre og triticale. Aksfusariose blev først identificeret i 1884 i England. Sygdommen blev betegnet *tombstone disease* (gravstenssygdom), fordi kernerne blev tomme og så helt livløse ud. Økonomiske tab som følge af sygdommen skyldes dels et væsentligt lavere udbytte, dels at kernerne er af dårlig kvalitet. Inficerede kerner kan indeholde så høje koncentrationer af mykotoksiner, så et kornparti afvises af møller og bryggerier. Korn med højt indhold af mykotoksiner er også uegnet som dyrefoder.

Infektion af kornaks

Aksfusariose skyldes svampe fra slægten *Fusarium*. Sygdommen spredes via inficeret plantemateriale, som efterlades fra tidligere høst eller via inficerede kerner i såsæden. *Fusarium* kan vokse på døde planterester, og der produceres store mængde sporer, som kan overvinde og resultere i infektion i den næste vækstsæson. For effektiv spredning af sporerne kræves regn og helst også temperaturer over 25 grader.

Arter af *Fusarium*

Der forekommer flere forskellige arter, deriblandt *F. graminearum*, *F. pseudograminearum*, *F. culmorum* og *F. avenaceum*. Mest problematisk er *F. graminearum*.

Toksiner

F. graminearum producerer mykotoksiner, de mest kendte er deoxynivalenol (DON) og zearalenone. DON (kaldes også vomitoxin) kan give diarré, opkastninger og nedsat foderoptagelse hos svin. Zearalenone kan resultere i infertilitet, spontan abort og andre reproduktionsproblemer hos svin. Zearalenone er et østrogen analog. I EU findes der grænseværdier for mykotoksiner, og hvis værdierne er for høje, kasseres høsten.



Byg med aksfusariose

Infektion af aks sker allerede under blomstringen. Sporerne spirer og svamehyferne vokser ind i gennem blomsterne og inficerer de udviklende kerner. Svampen får energi fra kernerens stivelse. Biosyntesen af stivelse begynder ca. 5 dage efter bestøvning og fortsætter i ca. 20 – 25 dage under kerneudviklingen. En moderne bygsort indholder ca. 60 – 70% stivelse i modne kerner. Foto: David B. Collinge.

Analyser af industrielt fremstillede enzymer har vist, at rå stivelseskorn fra nogle plantearter er ganske resistente overfor enzymatisk nedbrydning, men hidtil har det ikke været undersøgt, om *F. graminearum* kan nedbryde dem.

Det er muligt at ændre planters biosyntese af stivelse, så stivelsen bliver mere resistent mod nedbrydning i fordøjelseskanaalen hos mennesker og dyr. Vi tror, at bygplanters aks vil være mere modstandsdygtige mod angreb af *Fusarium* og andre svampe, hvis kernerne producerer stivelsestyper, som svampenes enzymer ikke kan nedbryde. Udvikling af robuste bygsorter er det langsigtede mål i et projekt, hvor vi kombinerer forskningseksperterise i plante- og svampebioteknologi.

Test af svampens interaktion med stivelse

Før vi går i gang med at ændre biosyntesen af stivelse i byg, er det vigtigt at vide, hvordan stivelseskornene skal

være opbygget for at være resistente mod nedbrydning. Stivelsens nedbrydelighed afhænger især af den fysiske pakning af stivelseskæderne, men også stivelsens kemiske struktur, f.eks. forgreningsgrad har betydning for, hvor let stivelsen nedbrydes (Boks 2).

Dyrkning af *Fusarium* på agarplader med stivelseskorn

En af vores hypoteser er, at svampe vil have vanskeligere ved at nedbryde stivelseskorn fra nogle plantearter end fra andre. For at teste denne hypotese lod vi *F. graminearum* vokse på agarplader, hvor vi havde skiftet sukker (glukose) i det standardiserede dyrkningsmedium, FDM ud med en tilsvarende mængde stivelse fra forskellige plantearter. Vi testede stivelse fra majs (A-type), kartoffel (B-type), cassava (C-type), byg (A-type) eller *Cucumaria zedoaria* (B-type). Til sammenligning blev der podet kontrolplader med og uden glukose (FDM-G) (Figur 2).





Vi lod derefter svampen vokse på agarplader under kontrollerede forhold, så vi kunne sammenligne vækst af svampehyfer (svampeceller, der vokser som tråde) og svampemycelium (en samling svampehyfer) ved forskellige tidspunkter. Pladerne blev analyseret på tre måder: (i) vi observerede pladerne for forskelle i svampens form og farve (ii) vi målte svampens radiale vækst og (iii) vi målte mængden af ergosterol i svampen.

Analyse af svampens vækst

Som forventet voksede svampen dårligt på kontrolplader, som hverken indeholdt glukose eller stivelse (FDM-G). Observation af svampenvæksten på agarplader med forskellige typer stivelse viste, at *F. graminearum* vokser meget dårligere på B-type stivelse fra kartoffelknolde og fra roden af *C. zedoaria* end på A-type stivelse (majs og byg) og C-type stivelse (cassava) (Figur 2a). Evaluering af pladernes udseende er dog kvalitativ, og observationerne er ikke eksakte mål for vækst.

Svampehyferne vokser radiale ud fra podestedet i midten og danner et svampemycelium, og for at få kvantitative data målte vi svampens radiale tilvækst på pladerne. Mærkeligt nok fandt vi, at der ikke var ret stor forskel på den radiale tilvækst (Figur 2B). På kontrolpladerne uden glukose og på plader med stivelsestyper, som svampen ikke kan nedbryde, har svampen kun den meget lille mængde glukose til rådighed, som var i det stykke agar, som pladen blev podet med. Når svampen alligevel vokser ud på pladen, kan det skyldes, at svampen vokser hurtigt, men tyndt under sult. Det er sandsynligvis en mekanisme, som svampen bruger for effektivt at søge efter næring. Tilsyneladende afhænger myceliets tykkelse af, hvor meget glukose, svampen har til rådighed, og svampens biomasse er således et bedre mål for vækst end radial tilvækst.

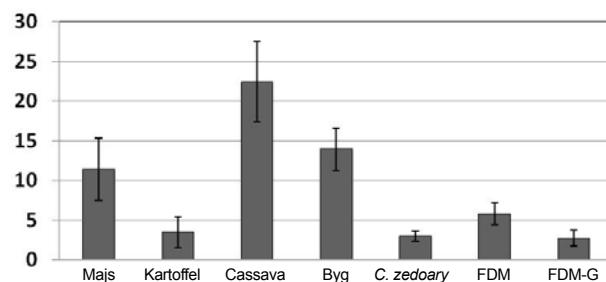
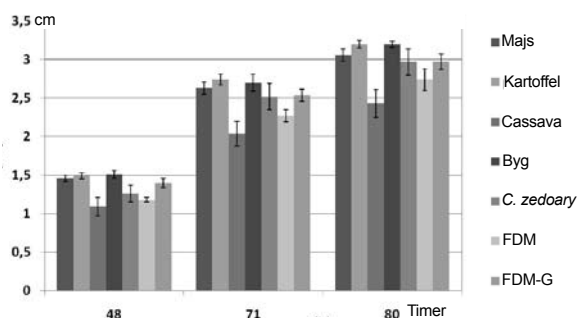
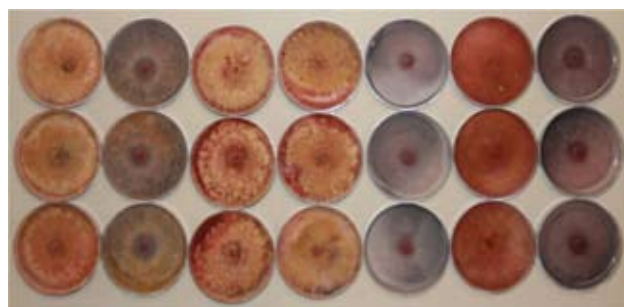
Mængden af ergosterol i en svampekoloni er et godt mål for svampens biomasse. Ergosterol er et fedtstof (el lipid) med en sterolgruppe, som findes i svampens membraner.

For at måle ergosterol høstes al svampemateriale på pladen og lipidene ekstraheres. Derefter analyseres lipidene med HPLC (high pressure liquid chromatography, højtryks væskechromatografi). Lipiderne separeres, og der måles absorbans i den bølglængde, hvor ergosterol absorberer. En standardkurve laves med kendte mængder ergosterol, og ved hjælp af standardkurven beregnes mængden af ergosterol i de ukendte prøver.

Fra vores ergosterol-analyser er det tydeligt, at svampen har meget mindre biomasse, når den har vokset uden glukose og på B-type stivelse fra kartoffel og *C. zedoaria* (Figur 2C). Derimod vokser svampen rigtigt godt på A-type (byg) og C-type (cassava) stivelse.

Tilsyneladende har svampen vokset dårligt på kontrolpladerne med glukose (Figur 2C). Hvad er forklaringen på dette fænomen?

Alle pladerne blev høstet efter fire uger, og det er sandsynligt, at svampen er vokset meget hurtigt med fri



Figur 2. Analyse af svampes vækst på agarplader med seks forskellige kulhydratkilder. Øverst ses svampenvækst på agarpladerplader med rå stivelseskorner fra majs, kartoffel, cassava, byg, *C. zedoaria* samt kontrolplader med og uden glukose (vist fra venstre mod højre i nævnte rækkefølge). I midten ses opgørelser af radial vækst (cm) af svampemycelium. Nederst ses mængde af ergosterol (ng) i svampemyceliet.

glukose til rådighed. Hvis svampen har brugt al glukose i pladen på to uger, vil der være sket en vis nedbrydning af svampens mycelium, når vi analyserer prøverne efter fire uger. Selvom stivelse er sammensat af glukoseenheder, er der ikke sket det samme på de plader, hvor stivelse er kulhydratkilde. Det tager tid for svampen at fordøje stivelsen og frigøre glukose, og derfor vokser svampene meget langsommere på stivelse end på fri glukose.

Stivelsesfordøjende svampeenzymer

Vores resultater fra dyrkning på agarplader viser, at *F. graminearum* kan vokse på stivelseskorner. Denne svamp må dermed udskille enzymer, som kan nedbryde stivelse. Vi benytter bl.a. aktivitetsgelelektroforese og enzymassays til at finde ud af, hvilke typer af enzymer, og hvor meget enzym, svampen udskiller. *F. graminearum* kunne f.eks udskille nogle af de enzymer, som er beskrevet i Boks 3, dvs. alpha-amylaser, beta-amylaser, gluco-amylaser og afgreningsenzymer.



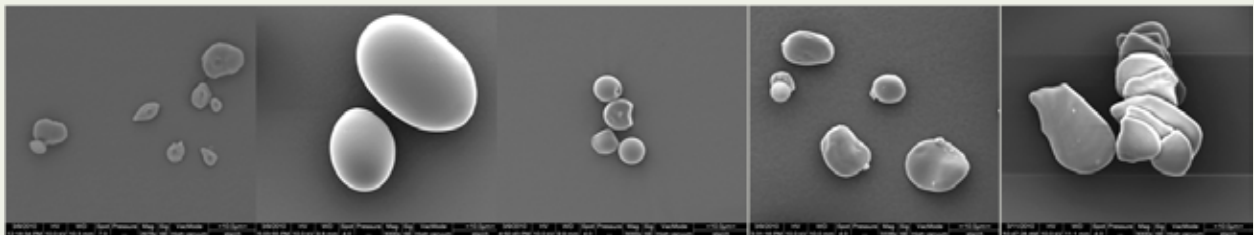


Boks 2. Stivelseskor i planter

Planter oplagrer energi i form af stivelse i lagerorganer som frøhvide (endosperm) i kornafgrøder som byg, hvede, majs og ris, opsvulmede kimblade i frø som hos bælgplanter eller rod- eller stængelknolde som hos cassava, kartofler og *Cucumaria zedoaria*. Cassava (*Manihot esculenta*) er en meget vigtig kulhydratkilde, især i Afrika. *C. zedoaria* minder om ingefær og bruges som krydderi, især i Asien.

Opbygning af stivelseskor

Stivelse består af glukosemolekyler, som er sat sammen i lineære (amylose) eller forgrenede (amylopektin) kæder. Ét enkelt stivelsesmolekyle kan bestå af flere millioner glukoseenheder. Disse meget store molekyler pakkes meget tæt og med en ordnet struktur i stivelseskorne. Amylopektinkæderne kan danne dobbeltspiraler, som ordner sig i koncentriske krystallinske lag i stivelseskorne, og amylose lægger sig ind imellem de krystallinske amylopektinlag. Stivelseskorne størrelse afhænger af plantearten, men kan også variere indenfor en art. Stivelseskor fra kartoffel kan blive op til 100 µm, mens byg indeholder stivelseskor af to forskellige størrelser, 1-3 µm og 10-35 µm. Herunder ses stivelseskor fra hhv. majs, kartoffel, cassava, byg og *C. zedoaria*.



Typen af stivelseskor

Stivelseskor kan inddeles i A-, B- og C-type afhængigt af, hvordan amylopektinkæderne pakkes sammen. Dobbeltspiralerne i A-type-stivelse er kortere og tættere pakket sammen end B-typens dobbeltspiraler. B-typen binder mere strukturelt vand. A-type stivelse findes i kornarter som byg, hvede og majs. B-type stivelse findes i rodknolde som kartoffel og *C. zedoaria*. C-typen er en blanding af A og B-type og findes i bl.a. cassava og bælgplanter.

Aktivitets-gelelektroforese

Enzymer og andre proteiner kan adskilles efter størrelse og ladning ved hjælp af gelelektroforese. Enzymaktivitet kan måles ved hjælp af assays, hvor enzymets nedbrydning af et substrat vurderes. Ved aktivitets-gelelektroforese kombineres nogle af principperne i de to analysemetoder. Metoden er ikke så præcis, men den er relativt hurtig, og man kan detektere mange enzymer samtidigt.

Ved aktivitets-gelelektroforese separeres enzymerne først efter størrelse ved såkaldt nativ gelelektroforese, hvor enzymerne bevarer deres aktivitet. Derefter vurderes enzymaktiviteten i selve gelen. Aktivitetsgeler kaldes også zymogrammer.

Før man støber gelen, tilsættes en lille mængde stivelse til acrylamidopløsningen. Efter elektroforetisk separation af proteinerne inkuberes gelen, og alle aktive stivelsesnedbrydende enzymer, f.eks. amylaser, vil fordøje stivelsen. På de steder i gelen, hvor der ikke er stivelsesnedbrydende enzymer, vil der være stivelse tilbage. For at detektere de områder (bånd) på gelen, som har disse enzymer, farves gelen med jod. Jod binder til stivelseskæderne og danner en mørkeblå farve. Hvor der er enzymaktivitet er stivelsen nedbrudt, og der opstår klare bånd.

Vores gelanalyse viste et meget interessant mønster (Figur 3). Der var næsten ingen enzymaktivitet i proteinfraktionen fra *F. graminearum*, som havde vokset

på kontrolpladen med glukose (bane 6). Vi så meget høj enzymaktivitet i baner med proteinfraktion fra *F. graminearum*, som havde vokset på plader med stivelse fra kartoffel og *C. zedoaria* (bane nr 2 og 5), mens vi kun så en svagt forhøjet enzymaktivitet i de baner, hvor svampen havde vokset på stivelse fra majs (bane 1), cassava (bane 3) eller byg (bane 4). Ligeledes var der kun lidt enzymaktivitet i det bånd, hvor svampen havde sultet dvs. vokset på FDM-G (bane 7).

Resultaterne af dyrkningsforsøg og aktivitets-gelelektroforese viser, at *F. graminearum* ikke har ret



Figur 3. Analyse af stivelsesnedbrydende enzymer ved aktivitets-gelelektroforese. Svampen *F. graminearum* voksede på stivelseskor fra fem forskellige plantearter: majs, kartoffel, cassava, byg og *C. zedoaria* (bane 1-5) samt på kontrolplader med og uden glukose (bane 6 og 7). Efter at proteinerne i de oprensede proteinfraktioner var separeret, blev gelen farvet med jod. Gelen er farvet mørk i de områder, hvor der er stivelse. I de lyse områder er stivelsen nedbrudt.





Boks 3. Stivelsesnedbrydende enzymer i planter og svampe

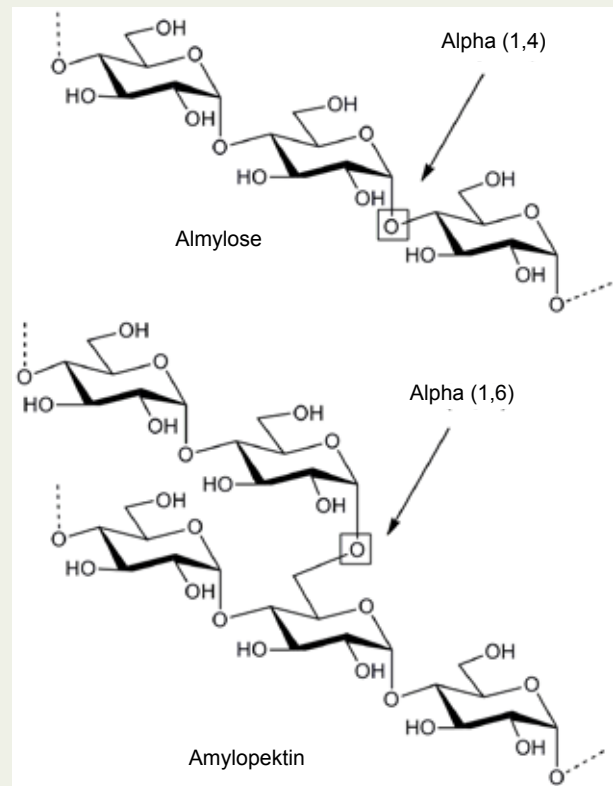
Nedbrydning af stivelse sker naturligt i planter under spiring af frø og rodknolde, hvor der kræves energi til den spirende plante, men stivelse er også en god kulhydratkilde for patogene svampe og bakterier. Fordøjelse af stivelse sker med hjælp af hydrolytiske enzymer med forskellige aktiviteter.

Typen af enzymaktivitet

Generelt er der fire forskellige typer af enzymaktiviteter: alpha-amylase, beta-amylase, gluco-amylase og afgreningsenzym. Disse enzymer kan endvidere deles op i to forskellige grupper baseret på deres katalytiske aktivitet. Glucoamylaser og beta-amylaser er exoenzymer, der arbejder fra enderne af stivelseskæderne. Gluco-amylaser fraspalter glukose, mens beta-amylaser fraspalter maltose (to glukosemolekyler). Enzymer som alpha-amylase og afgreningsenzym er endoenzymer, der klipper midt i kæden. Alpha-amylaser klipper næsten tilfældigt i kæden og genererer kortere oligosaccharider, mens afgreningsenzym hydrolyserer forgreningspunkterne. Flere af de stivelsesfordøjende enzymer har stivelsesbindende domæner, som finder og bindes til stivelseskornene.

Stivelsesnedbrydende enzymer i fødevarerindustrien

Forskellige typer af stivelsesnedbrydende enzymer anvendes ved fremstilling af en række levnedsmidler. De er f.eks. særdeles vigtige ved maltning i bryggeriprocessen, hvor stivelsen bliver fordøjet til sukre, som kan forgæres. De danske virksomheder Novozymes og Danisco er verdensførende inden for industrielle enzymer.



Kemisk struktur af amylose og amylopektin.

Amylose er et lineært molekyle med alpha-1-4-bindinger mellem glukose molekylerne. Amylopektin har en lineær "backbone" ligesom amylose samt forgreninger med alpha-1-6-bindinger.

høj aktivitet af stivelsesnedbrydende enzymer, når der er glukose eller letnedbrydelige stivelseskorn i dyrkningssubstratet. Når svampen vokser på resistent stivelse, sender den store mængder amylolytiske enzymer ud for at fordøje det.

Det tyder på, at biosyntesen af enzymerne skal aktiveres, men hvordan kan det forklares, at der kun detekteres en svagt forhøjet enzymaktivitet under sult, mens der er stærkt øget aktivitet, når *F. graminearum* vokser på stivelse fra kartoffel og *C. zedoaria*? En hypotese er, at den store enzymaktivitet, som ses, når svampen har vokset på de tæt pakkede stivelseskorn af B-typen fra kartoffel og *C. zedoaria*, kunne skyldes aktivering af to forskellige signalveje, en for sult og en for genkendelse af stivelse. Svampen genkender ikke hele stivelseskorn, men den kan genkende små nedbrydningsprodukter (oligosaccharider), og de kan aktivere svampens enzymproduktion. Vi antager, at der selv for B-type stivelse sker en vis nedbrydning, så der frigives oligosaccharider.

En anden observation er, at der kun ses ét bånd på aktivitetsgelerne. Det indikerer, at svampen kun syntetiserer

ét stivelsesnedbrydende enzym, eller at flere forskellige enzymer danner et kompleks. En anden simpel forklaring er, at svampen syntetiserer to eller flere enzymer af samme størrelse, så de ikke separeres på elektroforesegelen.

Aktivitets-gelelektroforese giver et indtryk af enzymaktiviteten, men for at få kvantitative og mere specifikke data, bruges andre analysemetoder.

Specifikke assays for enzymanalyse

Der findes mange forskellige enzymassays, som er meget specifikke og kan bruges til at analysere enzymeres aktiviteter. Til måling af alpha-amylase-aktivitet bruges substratet "nonreducing-end blocked p-nitrophenyl maltoheptaoside" (Figur 4). Den ikke-reducerende ende (non-reducing end) i substratet er blokeret, og dermed kan exo-amylaser ikke nedbryde det. Da der ikke findes forgreninger, er det kun alpha-amylaser, som kan nedbryde substratet.

Substratet nedbrydes til p-nitrophenol (i flere trin med hjælp af andre enzymer), som er gulfarvet. Denne farve kan detekteres med et spektrofotometer. Ændringen i absorbans er et mål for, hvor meget af substratet, som er blevet fordøjet.



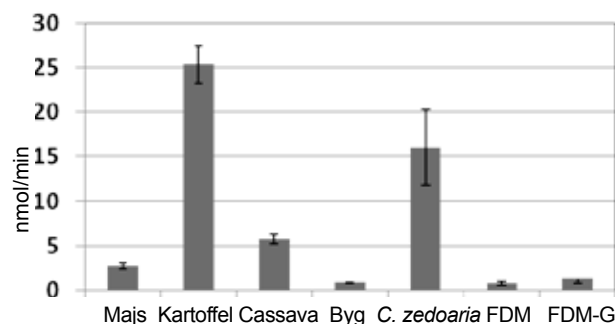
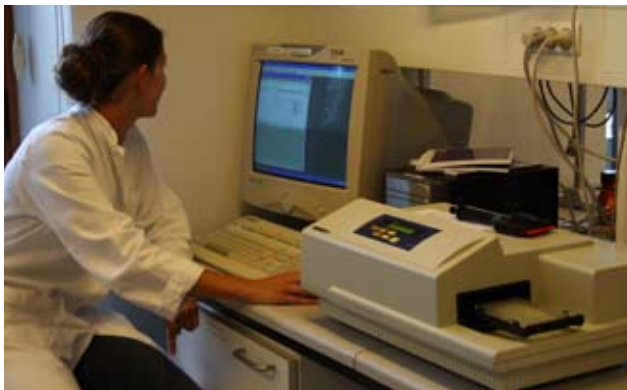
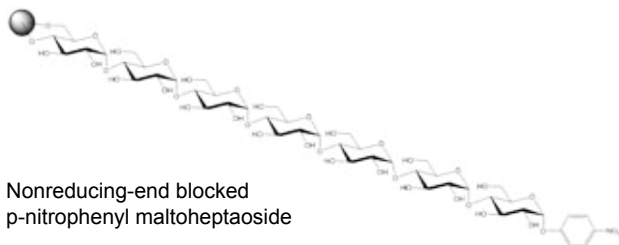


Hvis der er overskud af substrat, kan enzymaktiviteten i forskellige prøver sammenlignes. Enzymaktiviteten kan i de fleste tilfælde bruges som et mål for, hvor meget enzym prøven indeholder i forhold til andre prøver.

Der var signifikant højere alpha-amylase-aktivitet i de prøver, hvor svampen havde vokset på B-type stivelse (Figur 4). For de andre typer af stivelse og i for kontrolplader var der lav enzyminduktion. Umiddelbart stemmer resultaterne fra alpha-amylase-assayet overens med resultater fra aktivitetsgelerne (Figur 3), men da der kunne findes flere enzymer i det samme bånd på gelen, kunne der være andre amylolytiske aktiviteter end alpha-amylase. Det kan ikke afgøres ud fra ovenstående data.

Produktanalyse

En enkel måde at finde ud af, hvilke typer enzymer, der

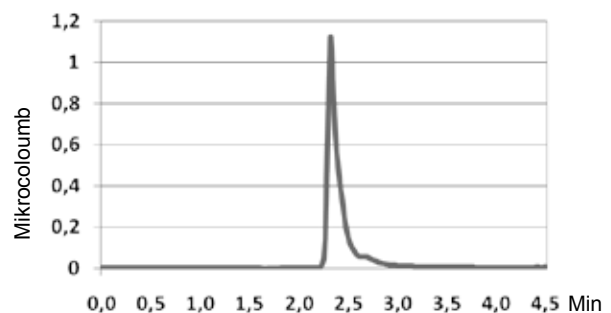


Figur 4. Assay for alpha-amylaseaktivitet. *F. graminearum* blev dyrket på agarplader med stivelseskorn fra fem forskellige plantearter (majs, kartoffel, cassava, byg og *C. zedoaria*) samt på kontrolplader med og uden glukose (FDM og FDM-G). Enzymaktiviteten i proteinfractionerne beregnes ud fra måling af absorbans (nmol/min) af nedbrydningsproduktet af substratet (nonreducing-end blocked p-nitrophenyl maltoheptaoside) på et spektrofotometer. Det var højest aktivitet, når svampen havde vokset på stivelse fra kartoffel eller *C. zedoaria*.

er i prøverne, er at analysere de produkter, der bliver dannet efter enzymaktivitet på ren stivelse. En oprenset proteinfraction fra svampen blandes med stivelse og inkuberes, hvorefter prøvernes indhold af oligosaccharider bestemmes. Hvis produkterne fortrinsvis er maltose og malto-oligosaccharider (for eksempel malto-triose (tre glukose molekyler), malto-tetraose (fire glukose molekyler) osv.) drejer det sig sandsynligvis om alpha-amylase. Hvis der er gluco-amylaseaktivitet, vil der være glukose. En kombination af disse to enzymer bør resultere i en blanding af glukose og maltooligosaccharider. Dog vil al stivelsen blive hydrolyseret til glukose, hvis der er meget gluco-amylase i prøverne.

Nedbrydningsprodukter af stivelse kan analyseres ved at bruge såkaldt BioLC kromatografi (Figur 5). Et BioLC er et HPLC system, hvor sukre separeres ved meget høj pH. Ved pH over cirka 12 bliver hydroxylgrupperne på glukoseenhederne deprotoniseret, og dermed kan de separeres på en anionbytterkolonne.

I vores prøver fandt vi kun glukose. Det tyder på at der er meget gluco-amylase aktivitet i prøverne, men tilstedeværelse af alpha-amylase kan ikke udelukkes. Resultaterne er altså ikke konklusive, og der er brug for yderligere data for at bekræfte, at *F. graminearum* producerer en ekstracellulær glucoamylase.



Figur 5. BioLC analyse af oligosaccharider. Detektion sker med "Pulsed Amperometric Detection" som måles i mikrocoloumb. X-aksen angiver antal minutter fra injektion af prøven.





Bioinformatiske analyser

Sammenligninger af DNA- og aminosyresekvenser mv. er et vigtigt supplement til laboratorieundersøgelser af enzymaktivitet. Bioinformatiske analyser som beskrevet i Boks 4 og Øvelse 1 og 2 har vist at genomet i *F. graminearum* indeholder ét gen, som koder for en alpha-amylase og tre gener, som koder for glucoamylaser.

På vej mod sundere korn

Det langsigtede mål med den beskrevne forskning er at udvikle kornafgrøder, som er mere resistente overfor *F. graminearum* og andre patogene svampe. Vi har fokuseret på svampeenzymer og deres interaktion med forskellige former for plantestivelse, og vi har karakteriseret stivelser, som er resistent mod nedbrydning vha. svampens enzymer. Hvis planterne er resistente overfor svampesygdomme, kan der spares pesticider og risikoen for, at kernerne indeholder svampetoksiner, reduceres.

Ændring af stivelsen i byg og andre kornarter kræver nøje kendskab til de planteenzymer, som er involveret i dannelsen af stivelsekornene. Mange af disse gener er identificeret og detaljeret karakterisering af deres funktion er i gang. Der er vist, at det er muligt at ændre biosyntesen af stivelse i planter, men der skal endnu tages mange skridt, før der er resistente kornafgrøder på markerne.

Videre læsning

Bach IC, Blennow A, Sloth B, Christiansen J, Lærke PE, Ulvskov, P, Knuthsen P, Granby K, Poulsen ME og Kirk HG (2006) Sund delikatesse eller fedende fyld. Planteforskning.dk.

Blennow A og Bach IC (2009). Sund stivelse, vegetabilsk vingummi og spiselig plastik. Planteforskning.dk

Finnie C, Yang F, Jensen JD, Spliid NH, Svensson B, Jacobsen S, Jørgensen LN, Jørgensen HJL og Collinge DB. (2009). Sundt korn i et ændret miljø. Planteforskning.dk

Giese H, Ravnholdt K, Olsson S, Andresson J, Johansen T og Frandsen R. (2008). Svampegens funktion afsløres med genteknologi. Planteforskning.dk.

Jørgensen, LN, Thrane U, Collinge DB, Jørgensen HJL, Jensen JD, Spliid NH, Nielsen GC, Rasmussen PH, Nicolaisen M, Justesen AF, Giese H og Bach IC. (2008) Fusarium på korn skader planter, husdyr og mennesker. Planteforskning.dk.

Nielsen MM, Bozonnet S, Barkholdt, V og Svensson B (2006) α -Amylasers molekylære interaktion med stivelse. Dansk kemi, 87(9):12-16.

Om forfatterne

Jan T. Svensson har en magisterekseamen i biologi og ph.d.-grad i molekylærgenetik fra Sveriges Lantbruksuniversitet, SLU. Han har forsket på universiteter i Sverige, Finland og USA og har siden 2007 været ansat på Institut for Plantebiologi og Bioteknologi, KU-LIFE. Hans forskningsinteresser er indenfor plantegenomer, specielt hvordan man kan bruge genomforskning til at studere fundamentale processer såsom planters stressrespons.

Inga C. Bach er hortonom med en ph.d.-grad i planteafødling og bioteknologi fra KU-LIFE (tidl. Den Kgl. Veterinær og Landbohøjskole). Hun er ansat som kommunikations-

Ordforklaringer

Har du funderet over, hvor de forskellige ord og begreber stammer fra? Ord som amylopektin, amylase osv. og hvad betyder de egentlig? Her er en kort etymologi for en del af de ord og begreber, som vi beskriver i teksten.

Amylase: På græsk betyder amylon stivelse. Ord med suffiks -ase beskriver normalt et enzym (lipase, kinase, transferase). Amyl-ase er et enzym, som nedbryder stivelse. Suffikset -ase stammer sandsynligvis fra diastase, den først beskrevne enzymaktivitet. Diastaseaktivitet kan påvises i maltektstrakt og blev beskrevet i 1833. Ordet diastase kommer fra det græske ord distasis, som betyder separation.

Amylose: Ordet stammer præcis som for amylase fra det græske ord for stivelse, amylon. Bemærk at suffikset -ose også beskriver andre kulhydrater som glukose og maltose.

Amylopektin: Betegnelsen for den forgrenede del af stivelse. Ordet amylo er kombineret med pektin (græsk), som betyder koaguleret.

Endo: Endo kommer fra græsk endon som betyder indre/intern. Stivelsesnedbrydende endo-enzymet klipper midt i en kæde.

Exo: Exo stammer fra det græske exon som betyder ekstern eller fra ydersiden. Stivelsesnedbrydende exo-enzymet klipper fra enderne af en kæde.

Fusarium graminearum: Slægtsnavnet *Fusarium* stammer fra det latinske ord fusus, som betyder at sprede. Artsnavnet *graminearum* betyder fra græs.

Hyfe: Ordet hyfe kommer fra det græske ord hyphe, som betyder næt/væv. Hyfer er de forgrenede tråde, som tilsammen danner svampes mycelium.

Mycelium: Ordet er en variant af det græske ord mukus, som betyder svamp kombineret med ordet helos som på græsk betyder vorte.

Spore: Kommer fra det græske ord for frø, spora. Svampe kan formere sig ved hjælp af kønnede eller ukønnede sporer.

Mykotoksin: Her ser vi igen varianter af myco sammen med toksin. Toksin kommer fra det latinske ord toxicum og det græske ord toxikon, som begge betyder gift. Myko-toksin er derfor selvfølgelig en svampe-gift.

Stivelse: Hvorfor hedder stivelse ikke amyloson da bestanddelene af stivelse kaldes amylose og amylopektin? Det danske ord stivelse, kommer af gammel engelsk stercan/stiercan, som betyder at lave noget rigid (stiver). Hvis man går endnu længere tilbage i tiden, så stammer ordet fra det protogermanske ord starkijanan, som stammer fra det protoindoeuropæiske "ster" som betyder stærk, fast eller rigid. At ordet amyloson ikke bruges, skyldes at stivelse har været kendt i mange forskellige lande, så navnet kom frem længe før videnskaben begyndte at undersøge stivelse.

Patogen: Betyder sygdomsfremkaldende, ordet stammer fra de græske ord pathos, som betyder sygdom, og genes som betyder at producere.

medarbejder ved Institut for Plantebiologi og Bioteknologi, KU-LIFE og er desuden redaktør af Planteforskning.dk.

Andreas Blennow er master i bioteknologi fra Lunds Universitet i Sverige: Han har en ph.d.-grad i biokemi fra samme sted. Han er lektor ved Institut for Plantebiologi og Bioteknologi, KU-LIFE. Andreas Blennow har forsket i stivelse siden sit ph.d.-studium, og er specialist indenfor stivelsesmetabolisme og stivelsens struktur og funktion i fødevarer og materialer.





Boks 4. Baggrund om bioinformatik - genomiske databaser

Direkte målinger af enzymaktiviteten som beskrevet ovenfor kan afsløre hvilke typer enzymer, som en svamp udskiller for at nedbryde stivelse. Disse metoder er dog temmelig arbejdskrævende og dyrt. I dag er genomet for mange organismer sekventeret, og det er derfor oplagt at undersøge, om der er offentliggjort DNA sekvenser, der koder for specifikke stivelsesnedbrydende enzymer.

Genomiske databaser på nettet

DNA databaser kan indeholde utroligt store mængder af information. En DNA database, som hedder GenBank, indeholdt for eksempel DNA sekvenser på tilsammen 124 milliarder nukleotider pr. 15. februar 2011, og datamængden forøges hele tiden. Da hele genomet af *F. graminearum* nu er sekventeret, kan sekvenser for kendte amylolytiske enzymer bruges til at søge efter lignende sekvenser i *F. graminearum* genomiske databaser.

Programmer til søgning i genomiske databaser

Man kan lave sekvenssøgninger ved hjælp af forskellige programmer og på forskellige måder. BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) er et meget brugbart program. BLAST vedligeholdes i USA ved National Center for Biotechnology Information (NCBI) og er gratis at bruge. Den sekvens, der søges med, kaldes for "query" (søgning), og søgeresultaterne omtales som "hits" eller "subjects". Et "BLAST hit" er en sekvens, som overskrider en tærskelværdi (e-værdi/E value), når den sammenlignes med søgesekvensen. E-værdien bestemmes af forskerens krav om, hvor ens sekvenserne skal være.

Princippet i BLAST er enkelt at forstå, hvis man ser på to korte sekvenser, som er sammenlignet. Flere DNA kodons (tre nukleotider) kan kode for den samme aminosyre i proteinet. For at være sikker på at få de rigtige sekvenser i søgeresultaterne, sammenlignes ofte aminosyresekvenser i stedet for DNA-sekvenser. Man bruger bogstavforkortelsen for de forskellige aminosyrer, f.eks. K (lysin), I (isoleucin), E (glutamat), P (prolin), G (glycin), D (aspartat), C (cystein) og H (histidin). Tegnet | indikerer, at to sekvenser har samme aminosyre, mens tegnet . viser en så kaldt "mismatch". Der bruges en font som Courier, hvor alle bogstaver fylder lige meget i bredden, når man sammenligner sekvenser:

Disse sekvenser er meget ens:

```
KIKEKLPG
| | | | | . | |
KIKEKVPG
```

Disse sekvenser er meget forskellige:

```
KIKEKLPG
. . . . . | .
DCHHAGPL
```

Forskellige typer af BLAST

Man vælger BLAST-type afhængigt af, om man har en protein- eller nukleotid sekvens eller en kombination af begge.

blastn - en nukleotidsekvens bruges til at søge i en database med nukleotidsekvenser for at finde sekvenser med stykker, som er homologe med regioner i søgesekvensen.

blastp - i princippet som blastn, men en aminosyresekvens sammenholdes med sekvenser i en database med proteinsekvenser.

tblastn - en aminosyresekvens bruges til at søge i en nukleotiddatabase, hvor alle mulige læserammer af nukleotidsekvenserne er translateret til aminosyresekvenser. Husk at DNA er dobbeltstretet og i princippet kan læses fra begge strenge og i tre forskellige faser på hver streng.

Vurdering af søgeresultater

E-værdien er et mål for risikoen for, at et hit er en tilfældighed, og indgår i vurderingen af om et hit er relevant. Med en e-værdi på 0,01 er der 1% sandsynlighed for, at resultatet er tilfældigt. Normalt bruges kun data med e-værdier på 10^{-20} eller mindre. For at yderligere sikre, at det er de rigtige gener, som er fundet, samles alle de *F. graminearum*-gener, som koder for forskellige typer af amylaser, og sekvenserne for disse gener bruges som søgesekvenser i andre databaser. Denne procedure kaldes for "reciprocal BLAST". Man kan f.eks. bruge sekvensen for en kendt alpha-amylase som query og blaste den mod den database, som indeholder hele genomet fra *F. graminearum*. Hvis det resulterer i et hit til *F. graminearum* genet X med en e-værdi på 10^{-69} , tager man sekvensen af gen X og søger i andre databaser. Hvis det bedste hit bliver en alpha-amylase med en e-værdi på 10^{-73} , kan man være ganske sikker på, at man fundet et gen, der koder for en alpha-amylase. Hvis man derimod i den første søgning kun finder sekvenser med e-værdier på 10^{-12} , så er der risiko for, at man har fundet enzymer, som har noget sekvenslighed, men som ikke er amylaser. Det er meget vigtigt at arbejde meget præcist og omhyggeligt. En fejl i bioinformatikken kan resultere i flere måneders arbejde i laboratoriet med det forkerte protein.





Øvelse 1 - Sekvenssøgning med BLAST

Laboratorieforsøgene har vist, at svampen *F. graminearum* kan danne enzymer, som nedbryder stivelse til glukose. Det indikerer, at svampen har glucoamylase-aktivitet. I denne bioinformatikøvelse bruges BLAST til at søge efter glucoamylase-gener i genomet for *F. graminearum*. Som søgesekvens (query) bruges sekvensen for en kendt glucoamylase, og der søges i en database, som kun indholder sekvenser fra *F. graminearum*.

1.1) Find søgesekvensen i databasen "sequence retrieval system" (SRS) fra European Bioinformatics Institute (EBI).

Gå til hjemmesiden: <http://srs.ebi.ac.uk>

1.2) Vælg fanebladet "library page"

1.3) Vælg protein-databasen "UniProtKB/Swiss-Prot".

Version 57.0 af denne database indeholder 428.650 proteiner (i alt 154.416.236 aminosyrer) fra 11.669 forskellige arter.

1.4) Vælg fanebladet "query form" og skriv derefter kriterier ind.

1.5) Vælg "Species" i dropdown menuen og skriv *Aspergillus*

1.6) Vælg "All text" i dropdown menuen i næste linie og skriv "glucoamylase"

1.7) Klik på "Search"

Søgeresultatet er de *Aspergillus* glucoamylaser, som findes i UniProtKB/Swiss-Prot databasen. En anden database kunne give lidt anderledes resultater.

1.8) Klik på UniProtKB/Swiss-Prot: AMYG_ASPAW under kolonnen UniProtKB/Swiss-Prot.

På denne side er der samlet meget information, f. eks. videnskabelige publikationer, om denne glucoamylase. Nederst ses aminosyresekvensen. Siden for AMYG ASPAW proteinet er blot en af næsten en halv million sider i databasen. Siderne har præcis samme struktur, hvilket gør det muligt at programmere sit eget analyseværktøj, som kan finde og ekstrahere den information, som man skal bruge. Under rubrikken "Database cross-references" ses alle de forskellige databaser, hvor dette protein er beskrevet. Bemærk at der findes mange forskellige databaser, hvilket gør bioinformatik meget kompliceret. Man skal vide, hvad de forskellige databaser indeholder, så man kan vælge den som bedst passer til netop din analyse.

1.9) Gå tilbage med browseren til søgeresultatet, hvorfra sekvenserne kan downloades i et format, så de kan bruges som query i en BLAST-søgning. Normalt bruger man et format, som betegnes fasta. En proteinsekvens i FASTA-format ser sådan ud:

```
>sp|P69327|AMYG_ASPAW Glucoamylase;
```

```
MSFRSLLALSGLVCTGLANVISKRATLDSWLSNEATVARTAILNNIGADGAWVSGADSGI....
```

Større end (>) indikerer, at en ny "data entry" begynder. På den første linje er der information om sekvensen, bl.a. det specifikke ID-nummer (her: P69327) og ofte proteinets enzymaktivitet (her: glucoamylase). Sekvensen begynder på den anden linje. Hvis man laver blast med mange sekvenser (en såkaldt batch blast), kan man lave blast med tusindvis queries, hvis man gemmer alle sekvenser i én fil i FASTA-format.

1.10) Vælg formatet "FastaSeqs" i dropdown menuen under "Display Options" og klik på "Apply Display Options". Ved klik på "Save" gemmes alle sekvenserne i FASTA-format. Vælg én af sekvenserne til videre analyse.

1.11) DNA-sekvensen for *F. graminearum* findes en database, som hedder Fusarium Comparative Database.

1.12) Gå til http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium_graminearum/MultiHome.html

1.13) Klik på "Analysis" og vælg "tblastn"

1.14) Vælg "Fusarium Comparative genomic sequence"

1.15) Indsæt en søgesekvens (ét af søgeresultaterne) i boksen, "Query Sequences".

Søgesekvensen må gerne indeholde den første linje, som begynder med >.

1.16) Man kan ændre forskellige parametre. Sæt E value til 1e-20. Klik på "Submit".

Resultatet af BLAST-søgningen (Blast Output) er beskrevet i forskellige kolonner: Target (navnet på hits), Expect (e-værdien) og Alignment Length (antal aminosyrer, som er matchet mellem søgesekvens og hit). Identities angiver, hvor mange aminosyrer, som er helt ens. Positives angiver antallet af aminosyrer af samme type mht. polaritet, ladningstørrelse etc. Prøv evt. at gå tilbage for at ændre på flere forskellige parametre og se, om det gør en forskel.

For at få information om et hit, skal man klikke på sekvensens navn under kolonnen Target.

1.17) Vælg en "F. graminearum PH-1" under Target.

1.18) Gå videre til "Feature Map", som viser information om genet.

1.19) Klik på "Gene" (den blå line). Ved klik på "Expand" vises aminosyresekvens (protein), kodende sekvens (svarer til mRNA) og genomisk sekvens.

1.20) Kopier proteinsekvensen og gem den som tekstfil til brug i Øvelse 2.





Øvelse 2 - Reciprok BLAST-søgning, analyse af proteiner, domæner og proteinstruktur

For at bekræfte, at en BLAST-søgning har givet et relevant hit (i dette tilfælde en glucoamylase), kan man lave en såkaldt reciprok BLAST. Man kan teste, om de(t) fundne protein(er) fra Øvelse 1 virkelig er en glucoamylase ved at lave en BLAST søgning mod en af de største DNA databaser som findes - NCBI non-redundant protein sequences.

Når det er bekræftet, at man har fundet det rigtige protein, kan man finde mere information om de domæner, som proteinet indeholder, og om de proteinfamilier, som proteinet tilhører. Der findes en række forskellige databaser, f.eks. pfam, CAZy, HOMSTRAD, PANDIT, pseudofam, SCOP og SYSTERS. I denne øvelse bruges pfam.

Efterfølgende kan man se nærmere på proteinstrukturen. Til det formål kan programmet "Cn3D 3-D Structure Viewer" installeres. Cn3D 3-D findes her: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D/cn3dinstall.shtml>
Se her for manual: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D/cn3dtut.shtml>

2.0) Gå til: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> for at lave en reciprok BLAST-søgningen med resultatet af øvelse 1.

2.1) Vælg "protein blast" og indsæt en aminosyresekvens fra Øvelse 2 i sekvens-boksen.

2.2) Vælger databasen "non-redundant protein sequences".

2.3) Tryk på knappen BLAST.

Der åbnes en ny side, som opdateres kontinuerligt. Når søgningen er færdig, åbnes en ny side med alle resultater.

2.4) Se først på den grafiske opsummering (Graphic Summary). Rød farve indikerer en god match. Er der mange mange sekvenser som ligner søgesekvensen?

2.5) Under "Descriptions" findes flere detaljer om de enkelte hits, heriblandt navne og e-værdier.

Er der mange glucoamylaser?

Er der også andre typer af enzymer?

Bemærk at enzymer kan have flere forskellige navne. En glucoamylase kan også betegnes amyloglucosidase, γ -amylase, lysosomal α -glucosidase, acid maltase, exo-1,4- α -glucosidase, glucose amylase, γ -1,4-glucan glucohydrolase eller 1,4- α -D-glucan glucohydrolase.

Viser den reciproke BLAST sekvensen fra Øvelse 1 er en Fusarium glucoamylase?

2.6) Øverst under "Grafic Summary" kan man komme videre til "Show Conserved Domains". Længst oppe på den nye side ses søgesekvensen (grå farve). Under den findes "specific hits" og "superfamilies". Ved at klikke på navnene kan man få mere information om superfamilier og domæner.

Hvad er en gluco-hydro-15-superfamily?

Hvad gør et CBM20 domæne?

2.7) Det kan være lidt kompliceret at finde frem til den korrekte informationen så prøv:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?uid=144356>

2.8) Åbn "Links" og vælg "pfam". Pfam er en database, hvor protein klassificeres mht. proteinfamilier og domæner.

Hvad er en Glycosyl hydrolases family 15?

2.9) Åbn "Structure" og følg instruktionerne for at se proteinstrukturen af Glycosyl hydrolases family 15. Med Cn3D kan man f.eks. dreje proteinstrukturen kan om x, y eller z akser, så man kan se proteinstrukturen fra forskellige vinkler.

Der findes forskellige måder at vise proteinstrukturen på. Gå til style\rendering shortcuts og prøv de forskellige måder til at vise strukturen. Nogle giver overblik, mens andre viser alle atomer, og så er det svært at få overblik. Kig i manualen for mere information og funktioner: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D/cn3dtut.shtml>.

