

Enzymatisk syntese af *p*-kumarinsyre

In situ produktfjernelse med et vandigt to-fasesystem afhjælper enzyminhibering.

Af Alexander Virklund¹,
Alex Toftgaard Nielsen²
og John M. Woodley¹

¹ Institut for Kemiteknik, Danmarks Tekniske Universitet

² The Novo Nordisk Foundation Center for Biosustainability, Danmarks Tekniske Universitet

Gennem de seneste årtier har der været fokus på at erstatte kemisk syntese eller biomasse-ekstrahering med fermentering eller enzymatisk syntese i håb om at opnå en mere effektiv og bæredygtig produktion. Dette er især relevant, hvor udbyttet er lavt grundet en kemisk syntese med mange trin eller et lavt indhold eller urenheder i biomassen. En god kandidat til enzymatisk syntese er *p*-kumarinsyre, det primære giftstof i kanel, men også en interessant forløber (precursor) blandt andet til produktionen af organiske halvledere til brug i elektronik [1]. Da *p*-kumarinsyre har antimikrobielle egenskaber, har enzy-

matisk syntese frem for fermentering vist sig at være det bedste bud i forbindelse med produktion af *p*-kumarinsyre [2]. Dog har produktinhibering af det relevante enzym vist sig at hæmme reaktionen [3].

Her beskrives vores udvikling af et vandigt to-fasesystem, som kan afhjælpe dette problem.

Produktinhibering af enzymet tyrosin ammoniak lyase

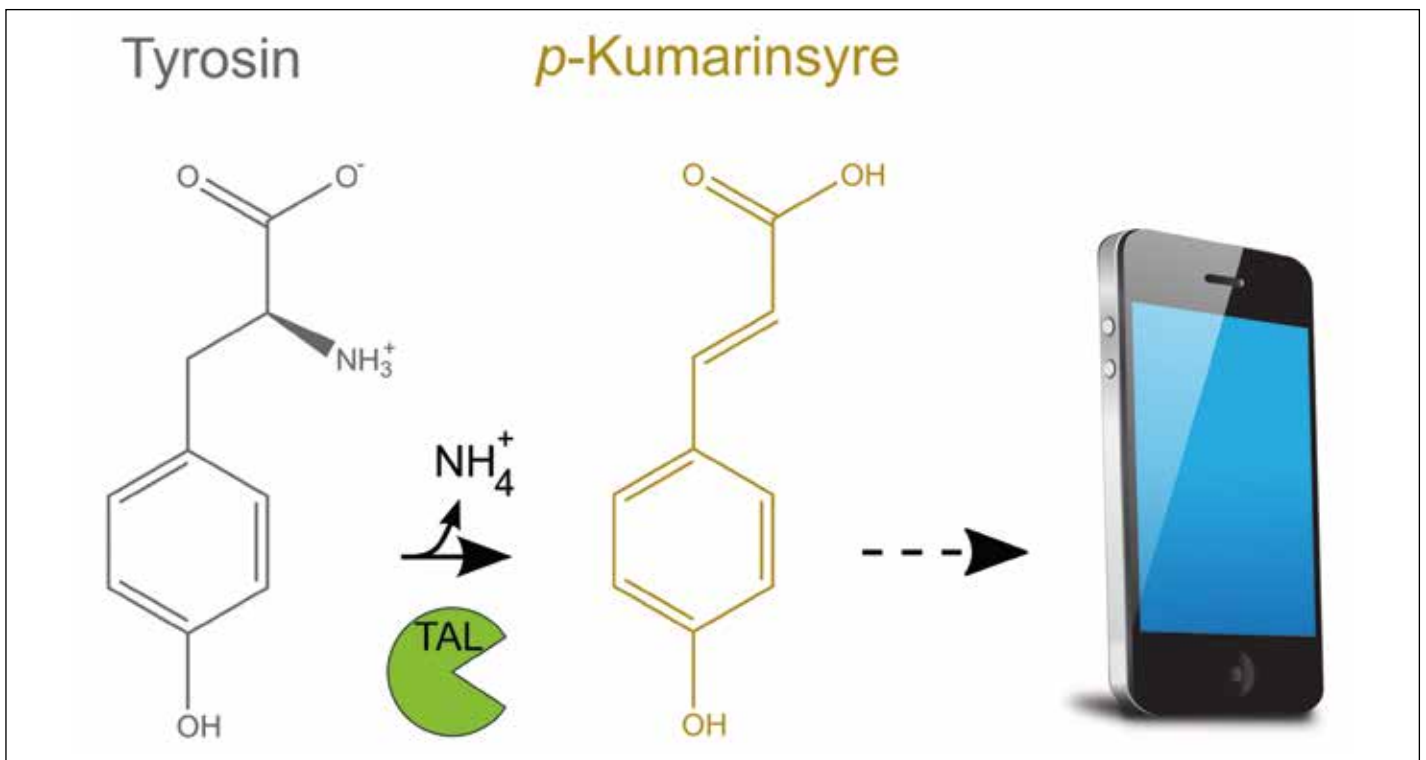
P-kumarinsyre kan dannes fra aminosyren tyrosin ved fraspaltning af ammoniak (figur 1), katalyseret af enzymet tyrosin ammoniak lyase (TAL). TAL-enzymet har begrænsede katalytiske kapaciteter (k_{cat}), og dette forværres ved høje produktkoncentrationer, da *p*-kumarinsyre kan binde til det aktive center og konkurrerer med substratet tyrosin i at få adgang. Dette kan beskrives med en udvidelse af Michaelis-Menten ligningen for enzymkinetik til at

inkludere en inhibitor [4], i dette tilfælde *p*-kumarinsyre,

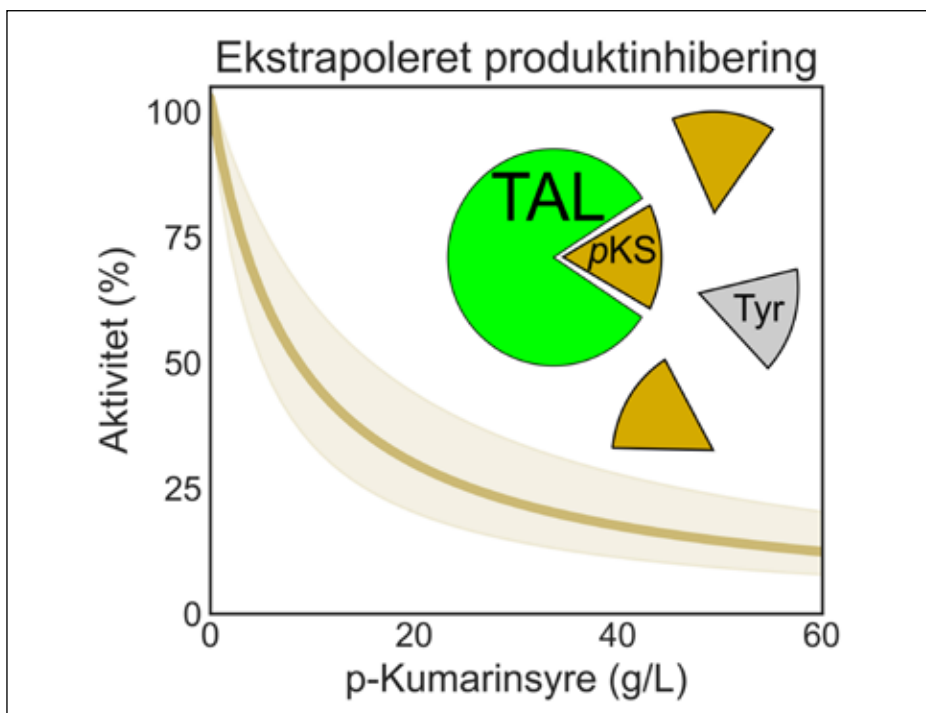
$$v = \frac{k_{cat} * [E] * [S]}{[S] + K_M (1 + \frac{[I]}{K_i})} \quad (1)$$

hvor v er reaktionshastigheden, $[E]$ er enzymkoncentrationen, $[S]$ er substratkoncentrationen, $[I]$ er inhibitor-koncentrationen, K_M er affiniteten til substratet, og K_i er affiniteten til inhibitoren. Selvom vi har identificeret en variant af TAL med relativt høj affinitet til tyrosin i forhold til *p*-kumarinsyre, er produktinhibering stadig et problem på grund af den lave opløselighed af tyrosin. Det er muligt at øge opløseligheden af tyrosin ved at øge temperaturen og pH [5,6] samt ved brug af kosolventer [7].

Der er dog en øvre grænse for, hvad enzymet kan tåle, og det har vist sig ikke at være muligt i tilstrækkelig grad at forhindre produktinhibering alene via ►



Figur 1. Den enzymatiske rute til *p*-kumarinsyre samt eventuel applikation. TAL, tyrosin ammoniak lyase.



Figur 2. Ekstrapoleret produktinhibering baseret på eksperimentielt bestemte kinetiske parametre for TAL, indsat i den udvidede Michaelis Menten ligning (1). pKS, *p*-kumarinsyre; Tyr, tyrosin.

temperatur, pH og brug af kosolventer (figur 2).

Vandigt to-fasesystem til ekstrahering af *p*-kumarinsyre

Vi ønskede en metode til at fjerne *p*-kumarinsyre *in situ*, samtidig med at det blev dannet. En typisk metode til *in situ* produktfjernelse er et to-fasesystem med en organisk fase oven på en vandig fase til ekstrahering af produktet. Dette virker dog ikke for *p*-kumarinsyre i denne enzymproces, da reaktionen foregår i en basisk opløsning, hvor TAL har højere aktivitet og tyrosin har højere opløselighed. I basisk opløsning er *p*-kumarinsyre ladet og foretrækker den vandige fremfor den organiske fase. Derfor undersøgte vi brugen af et vandigt to-fasesystem til ekstraktionen, som dannes, når to ikke-blandbare polymerer eller en polymer og en salt blandes i en vandig opløsning.

Vi afprøvede forskellige salte og polymerer, og fandt, at en opløsning af kaliumfosfat og poly(etylenglykol) dannede et stabilt vandigt to-fasesystem samt ekstraherede *p*-kumarinsyre til den øvre polymerfase med en fordelingskoefficient på op mod 13 afhængig af koncentrationerne. *P*-kumarinsyre absorberer lys i det synlige spektrum, hvilket giver det en gylden farve i tilstrækkelige koncentrationer, som let kan observeres med det blotte øje (figur 3).

In situ produktfjernelse af *p*-kumarinsyre

Selvom vi har identificeret et effektivt vandigt to-fasesystem til ekstrahering af *p*-kumarinsyre, var en proces til *in situ* produktfjernelse endnu ikke på plads, og yderligere udfordringer måtte løses. Det første var at teste TAL-enzymet i saltfasen, da den høje ionstyrke potentielt kunne have en negativ virkning på enzymet. Vi opdagede da også et fald i TAL-aktivitet, selv i en 10 procent vægt fosfatopløsning (figur 4), så vi fortyndede systemet og identificerede den laveste fosfatkoncentration nødvendig til at bevare to-fasesystemet. Det næste var at bevare enzymet i saltfasen og ude af polymerfasen. I stedet for et oprenset enzym benyttede vi en *E. coli*-stamme, som udtrykker TAL, men cellerne flød op til polymerfasen på grund af den høje densitet af saltfasen.

Vi immobiliserede derfor TAL-cellerne i kugler af en hydrogel (figur 5), så vi kunne pakke dem i en roterende kolonnereaktor (rotating bed reactor) placeret i saltfasen. Typisk pakker man immobiliserede enzymer i en kolonnereaktor (packed-bed reactor) og pumper substratet igennem kolonnen kontinuerligt, men dette ville ikke fungere i nærværende enzymproces på grund af den lave opløselighed af tyrosin, som ville give en meget fortyndet produktstrøm. I stedet benyttede vi en batchreaktion, hvor tyrosin er til stede i en opløsning, kolonnen roterer for at øge

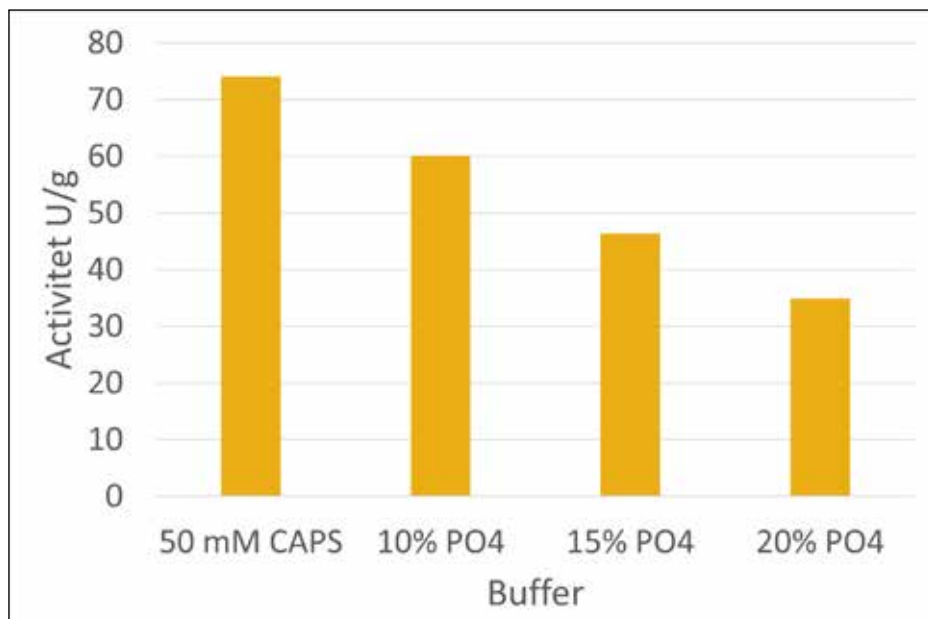
overførslen af substrat igennem enzymet, og tyrosin går gradvist i opløsning, i takt med at den bliver omdannet til den mere opløselige *p*-kumarinsyre. Når reaktionen er til ende, kan de to faser tappes hver for sig, og *p*-kumarinsyren kan udfældes fra polymerfasen ved at sænke pH. De immobiliserede TAL-celler er klar til at blive genbrugt i næste batch, og salt og polymerfasen kan muligvis også genbruges.

Fortsat udvikling af processen

Mens et forsøg med de immobiliserede TAL-celler beskrevet her, nu er gennemført (figur 6), har vi endnu ikke sammenlignet systemet med en kontrol, hvorfor der endnu ikke foreligger resultater på, hvor effektiv metoden er til



Figur 3. Det vandige to-fasesystem ekstraherer gyldent *p*-kumarinsyre til polymerfasen.



Figur 4. Høje fosfatkoncentrationer inhiberer TAL-aktivitet. U, $\mu\text{mol } p\text{-kumarinsyre} / (\text{min} \cdot \text{g TAL})$; CAPS, N-cyclohexyl-3-aminopropansulfonsyre; PO4, kaliumfosfat.



Figur 5. Det er ikke ris, men *E. coli* immobiliseret i hydrogel-kugler.

at øge *p*-kumarinsyre-produktionen. Vi håber dog at kunne vise en forbedring i *p*-kumarinsyre-produktionen, og at metoden kan bidrage til kommercialiseringen af *p*-kumarinsyre produktion via enzymatisk syntese, selvom yderligere optimering kan være nødvendig. Samtidig er dette projekt et af få eksempler på

implementeringen af et vandigt to-fase-system til *in situ* produktfjernelse, hvilket kan inspirere fremtidige processer.

Denne forskning er finansieret af Novo Nordisk Fonden gennem *The Fermentation Based Biomanufacturing Initiative*, fondsnummer: NNF17SA0031362.

E-mail:
Alexander Virklund: alvir@dtu.dk



Figur 6. Før- og efterbilleder af batchreaktionen med det faste uopløselige tyrosin i saltfasen sammen med den roterende kolonne reaktor, samt polymerfasen med *p*-kumarinsyre øverst. Den ringe sigtbarhed skyldes tilstedeværelsen af en kappe til opvarmning samt tilstedeværelsen af tyrosin partikler og *p*-kumarinsyre i opløsning.

Referencer

1. Ben-Bassat, A., Breinig, S., Crum, G.A., Huang, L., La Bonte Altenbaugh, A., Rizzo, N., Trotman, R.J., Vannelli, T., Sariaslani, F.S., & Haynie, S.L. (2007). Preparation of 4-vinylphenol using pHCA decarboxylase in a two-solvent medium. *Organic Process Research and Development*, 11(2), 278-285. <https://doi.org/10.1021/op0602472>.
2. Sariaslani, F.S. (2007). Development of a combined biological and chemical process for production of industrial aromatics from renewable resources. *Annual Review of Microbiology*, 61(1), 51-69. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093248>
3. Virklund, A., Jendresen, C.B., Nielsen, A.T., & Woodley, J.M. (2023). Characterization of tyrosine ammonia lyases from *Flavobacterium johnsonianum* and *Herpetosiphon aurantiacus*. *Biotechnology Journal*, 2300111. <https://doi.org/10.1002/BIOT.202300111>.
4. Segel, I.H. (1975). *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*. John Wiley & Sons.
5. Lee, C.Y., Chen, J.T., Chang, W.T., & Shiah, I.M. (2013). Effect of pH on the solubilities of divalent and trivalent amino acids in water at 298.15 K. *Fluid Phase Equilibria*, 343, 30-35. <https://doi.org/10.1016/J.FLUID.2013.01.010>.
6. Samuel H. Yalkowsky, Yan He, P.J. (2006). *Handbook of Aqueous Solubility Data, Second Edition* (Vol. 1999, Issue December).
7. Li, X., Li, K., Farajtabar, A., He, Y., Chen, G., & Zhao, H. (2019). Solubility of d-Tryptophan and l-Tyrosine in Several Organic Solvents: Determination and Solvent Effect. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 64(7), 3164-3169. <https://doi.org/10.1021/acs.jced.9b00258>.