

Enzymatisk hydrolyse af hemicellulose

Reaktionsoptimering og afdækning af synergimekanismer ved brug af statistisk forsøgsdesign. Resultaterne kan være med til at optimere den industrielle produktion af bioethanol

Af Hanne R. Sørensen^{1,2}, Anne S. Meyer², Sven Pedersen¹
¹Novozymes A/S, ²BioCentrum-DTU

Industriel produktion af bioethanol er i dag enten baseret på direkte gæring af sukkerholdige afgrøder, især sukkerrør, eller på brug af stivelsesholdige substrater som majs og hvede [1]. Den sidstnævnte metode bygger på en enzymkatalyseret nedbrydning af frøhvidens stivelse til glucose og efterfølgende gæring af glucosen til ethanol vha. bagegær *Saccharomyces cerevisiae* [2]. I Europa bruges der primært hvede til produktion af ethanol til drikkesprit, brændselsethanol og teknisk brug. Udnyttelsen af frøhvidens stivelse og herunder stivelsens enzymatiske nedbrydning til forgærbart glucose er tilnærmelsesvis optimal. En mere fuldstændig udnyttelse af hvedens resterende frøhvide kan imidlertid finde sted, hvis også frøhvidens cellevægges indhold af hemicellulose og cellulose udnyttes. *S. cerevisiae* kan ikke naturligt omdanne monosaccharider såsom xylose og arabinose, der frigives fra hemicellulose, men der arbejdes intenst på at udvikle mikroorganismer, der kan [1]. En vigtig forudsætning for gæringen er imidlertid, at cellevægsmaterialet først omdannes til et forgærbart hydrolysat. En vigtig forudsætning for gæringen er, at cellevægsmaterialet først omdannes til et forgærbart hydrolysat.

Enzympræparater

På Novozymes A/S arbejder vi sammen med BioCentrum-DTU på enzymkatalyseret hydrolyse af især hvedekorns cellevægge mhp. substratets senere forgæring til ethanol eller andre slutprodukter. En lang række mikroorganismer, primært skimmel-svampe, producerer en vifte af enzymaktiviteter, der helt eller delvist kan katalysere nedbrydning af cellevægspolysaccharider. Novozymes A/S producerer en række enzympræparater, der kan anvendes til hydrolyse af korns cellevægge (tabel 1). De i tabel 1 nævnte enzympræparater er multikomponente enzymer, der både har en hovedaktivitet og sideaktiviteter. Ved udvikling af enzymer er de primære opgaver derfor at indkredse de rette enzymaktiviteter, karakterisere deres hydrolytiske effektivitet samt kortlægge og optimere reaktionsforholdene (f.eks. pH og temperatur).

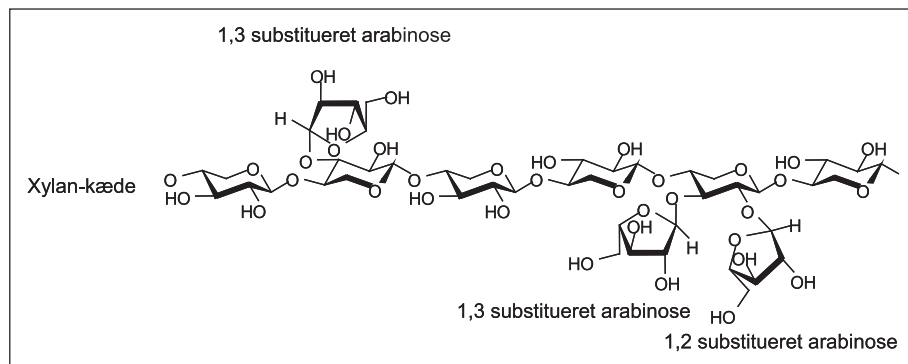
Frøhvidens cellevægspolysaccharider: Hemicellulose

Cellevæggene i korns frøhvide (endosperm) indeholder både 1→3, 1→4-β-D-glucan, glucomannan, cellulose, arabinoxylan, og arabinogalaktan foruden lidt protein. »Hemicellulose«-fraktionen omfatter normalt arabinoxylan, arabinogalaktan og glucomannan, men ofte inkluderes også β-D-glucan. Substitutionsgraden af arabinoxylan og arabinogalaktan varierer markant i forskellige typer korn og

formentlig også i deres forskellige typer cellevægge. I endospermcellevæggene i hvede er hemicellulosefraktionen domineret af arabinoxylan, der udgør ca. 70% af cellevægspolysacchariderne [3].

Enzymatisk nedbrydning af arabinoxylan

Som vist i figur 1 består arabinoxylan af en hovedkæde af (1→4)-bundne β-D-xylopyranosylenheder med α-arabinofuranosylsubstituenten bundet enkeltvis til C(O)-3 i xylose eller dobbeltsubstitueret til både C(O)-2,3 i en xylopyranosylenhed (figur 1). Arabinoxylans basale skelet er opbygget af 5-leddede monosaccharider, dvs. pentoser. Derfor omtales arabinoxylan - især i lidt ældre litteratur - ofte som pentosan. Analogt hertil betegnes de enzympræparater, der kan katalysere nedbrydningen af arabinoxylan, ofte som »pentosanaser«. Xyloseenhederne i arabinoxylan kan være substitueret med acetylgrupper, glucuronsyre, eller med 4-O-methyleret glucuronsyre; arabinoseenhederne kan være esterificeret med ferulinsyre eller p-coumarinsyre ved C-5 (ikke vist i figur 1). Arabinoxylan kan således betegnes som et komplekst, substitueret heteropolysaccharid. Ligesom andre polysaccharider kan arabinoxylan nedbrydes til monosaccharider vha. syre eller enzymatisk katalyse. Ved en efterfølgende gæring af hydrolysatet har enzymkatalyseret hydrolyse den fordel, at produktion af forbindelser, der kan hæmme gæringen, minimeres [4]. Pga. arabinoxylans sammensætning kræver den enzymkatalyserede nedbrydning til monosaccharider forskellige aktiviteter, dvs. enzymaktiviteter, der kan katalysere fra-



Figur 1. Udsnit af den basale struktur af arabinoxylan fra hvede.

Enzym navn	Hovedaktivitet	Side-aktiviteter	Oprindelse	Optimal pH*	Optimal temperatur *
Celluclast 1.5 L	Cellulase	-	<i>Trichoderma reesei</i>	4.5-6.0	50-60
Finizym 200 L	β-glucanase	-	<i>Aspergillus niger</i>	4-5.5	60
Ultraflo L	β-glucanase	Cellulase Xylanase Arabanase Pentosanase	<i>Humicola insolens</i>	6	40
Viscozyme L	β-glucanase	Cellulase Xylanase Arabanase	<i>Aspergillus aculeatus</i>	3.5-5.5	25-55

*For hovedaktiviteten

Tabel 1. Oversigt over kommercielle enzympræparater, der kan anvendes til nedbrydning af cellevægge i korn. Data og informationer er taget fra Novozymes A/S' produktdatablade.

spaltningen af sidegrupperne og enzymaktiviteter, der kan katalysere hydrolysen af xylanhovedkæden.

De enkelte typer enzymaktivitet

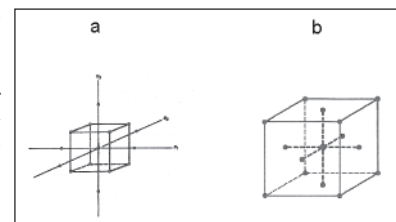
Det er en grundlæggende antagelse, at den enzymatiske nedbrydning af xylanhovedkæden først finder sted, når en del af arabinosylsidegrupperne er fjernet. Den enzymkatalyserede fraspaltning af sidegrupperne i arabinoxylan kræver, at flere forskellige enzymer kommer i spil. Disse inkluderer: α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), muligvis også ferulylesterase (EC 3.1.1.73), α -glucuronidase (EC 3.2.1.139) og acetylerase (EC 3.1.1.6). Betydningen af hver aktivitet afhænger af substratets molekulære sammensætning. Relevante enzymaktiviteter, der kan katalysere depolymeriseringen af xylankæden, inkluderer endo-1,4- β -xylanase (EC 3.2.1.8) og β -xylosidase (EC 3.2.1.37), hvor β -xylosidase frigør xylose fra korte xylankæder (xylo-oligosaccharider). Da arabinoxylan kan være sammenflettet med øvrige plantecellevægspolysaccharider, herunder β -glucan og cellulose, kan andre aktiviteter være påkrævede for at give de arabinoxylannedbrydende aktiviteter adgang til deres substrat. De ekstra enzymer, der er brug for til at løse denne opgave, inkluderer bl.a. cellulase (EC 3.2.1.4), endo-1,3(4)- β -glucanase (EC 3.2.1.6), exo- β -glucosidase (EC 3.2.1.74). Adskillige af de multikomponente enzympræparater, der er kommercielt tilgængelige til brug i forskellige plante- eller cerealieprocesser, forventes at indeholde relevante sideaktiviteter, der helt eller delvist kan katalysere hydrolysen af arabinoxylan (tabel 1). Da produktionen af de kommercielle præparater samtidig er optimeret og fødevarer-godkendt, er en evaluering af eksisterende enzympræparaters effektivitet, alene eller i blanding, et naturligt udgangspunkt for identifikation af relevante arabinoxylannedbrydende enzymaktiviteter. For at identificere effektiviteten af de tilstedeværende sideaktiviteter er det dog nødvendigt at anvende relativt høje enzymdoseringer ift. de niveauer enzymer normalt tilsættes i.

Statistisk forsøgsdesign i vurdering af enzymreaktioner

Enzymers aktivitet og stabilitet påvirkes på forskellige måder af reaktionsforholdene, især af temperatur og pH. Forskellige andre faktorer, f.eks. tilstedeværelsen af inhibitorer, kan indvirke på enzymaktiviteten. For at vurdere effektiviteten af en række forskellige enzympræparater og samtidig kortlægge reaktionsparametrene betydning for enzymernes hydrolytiske effektivitet er en rationel tilgang til forsøgsplanlægning nødvendig.

Netop her har statistisk designede forsøg, bl.a. i forskellige responsfladedesign, været effektive redskaber til hurtigt at evaluere enzympræparaters ydeevne og samtidig kortlægge betydningen af reaktionsparametrene for enzymaktiviteten. Frem for at vurdere indflydelsen af f.eks. enzymdoseringen, reaktionstiden, pH og temperatur ved at variere én parameter ad gangen, designs en række forsøg, hvor forskellige kombinationer af enzymdosering og reaktionsparametre testes på én gang i flere niveauer. Resultatet af hver reaktionskombination sammenlignes derefter med multivariat regression (valget af regressionsmetode afhænger af design). Når mere end to reaktionsparametre skal undersøges i samme forsøgsrække, ansues forsøgsop-

Figur 2. Central Composite Design (a) samt et fladecentreret central composite design (b). Punktet i midten er centerpunktet. X1, X2 og X3 er akserne i det centrale composite design.



sætningen i en tredimensional kvadratisk struktur (figur 2a-b).

Simple faktorforsøg kan designs på to måder:

i) som et centralt composite design (CCD), hvor midterniveauerne er aksiale punkter, der når uden for selve kvadraten (figur 2a) eller

ii) som en variant af det centrale composite design, såkaldte fladecentrerede CCD, hvor de testede faktorerers midterniveauer er rykket ind på kvadratens flader (figur 2b). En deltaljeret gennemgang af forskellige varianter af CCD-designet kan findes i Montgomery [5].

Fordele og begrænsninger

De fladecentrerede design er bedst til at evaluere enzymatisk hydrolyse. Det skyldes bl.a., at det ikke er muligt at tilsætte »negativ« enzymdosering (vil CCD kræve, hvis centerpunkt-doseringen ønskes ret lav). Resultaterne, kaldet responserne, analyseres med multivariat regressionsanalyse, og analysen re-

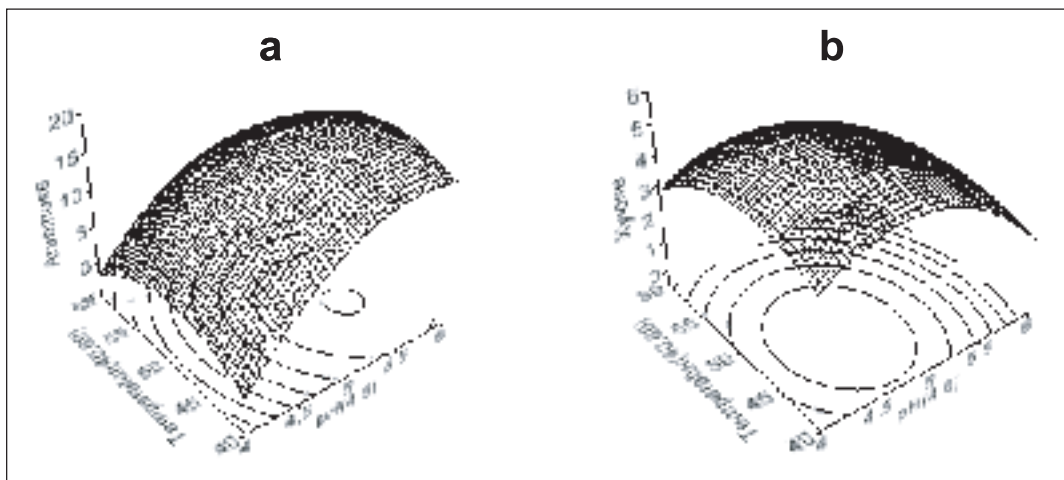
Prøve	Dosis index	Tid (timer)	pH	Temperatur (°C)
1	1	2	4	40
2	10	6	6	40
3	10	2	4	60
4	10	6	4	40
5	5,5	4	5	50
6	1	6	4	60
7	5,5	6	5	50
8	5,5	4	5	50
9	10	2	6	60
10	1	2	6	60
11	10	2	6	40
12	5,5	4	6	50
13	5,5	4	5	40
14	5,5	4	4	50
15	5,5	4	5	60
16	1	6	4	40
17	5,5	4	5	50
18	1	2	6	40
19	1	6	6	40
20	1	6	6	60
21	5,5	2	5	50
22	1	2	4	60
23	10	6	4	60
24	10	6	6	60
25	10	2	4	40
26	10	4	5	50
27	1	4	5	50

Tabel 2. Fladecentreret Centralt Composite Design (CCD) med faktorerne dosis, tid, pH og temperatur, i alt 27 kombinationer.

AAS · ICP/MS
UV-VIS · LC/MS
GC/MS · FT-IR/NIR

Ny FT-IR?
- Så er det også os!

Thermo
ELECTRON CORPORATION
48 16 62 00 · Gydevang 17-19 · 3450 Allerød



Figur 3. Responseflademodeller for frigivelsen af arabinose (a) og xylose (b) ved enzymatisk hydrolyse af hvedearabinoxylan med hhv. Ultraflo L og Celluclast 1.5 L.

sulterer i den model, der bedst beskriver data. Forsøgsdesignet og målingernes kvalitet påvirker de resulterende modellers validitet. De resulterende modeller kan afbildes på forskellige måder. Den flade, modellen beskriver, kaldes en responsflade. Det er klart, at faktorforsøg ikke kan bruges til at udlede kinetiske konstanter eller til direkte at sammenligne forskellige reaktioners forløb. Men erfaringen viser, at resultaterne af designede responsfladeforsøg hurtigt kan give grundlag for valg af optimale reaktionsparametre til videregående enzymforsøg ved enzymatisk hydrolyse af hvide frøhvide eller andre bioressourcer.

Enzymatisk frigivelse af arabinose og xylose

For at vurdere effektiviteten af sideaktiviteter i forskellige enzympræparater til nedbrydning af arabinoxylan blev der udført et fladecentreret CCD med faktorerne tid, dosis, pH og temperatur (tabel 2). Som indikatorer for nedbrydnings-effektiviteten blev arabinose- og xylosefrigivelsen målt. Celluclast 1.5 L og Ultraflo L indeholdt de mest relevante (og bedste) sideaktiviteter: En analyse af de udførte responsfladeforsøg viste, at de to enzympræparater responderede forskelligt på pH: Arabinosefrigivelsen blev bedst katalyseret af Ultraflo L og var højest ved stigende pH med maksimum frigivelse mellem pH 5.5 og pH 6.0 (figur 3a). En detaljeret dataanalyse afslørede, at maksimum var ved pH 5.8. Der var ikke en statistisk signifikant effekt af temperaturen inden for det testede temperaturinterval. Ultraflo L-tilsætning gav kun minimal xylosefrigivelse (data ikke vist). Omvendt gav Celluclast 1.5 L-tilsætning tilnærmelsesvis ingen arabinosefrigivelse (data ikke vist), men katalyserede frigivelsen af noget xylose fra substratet. Frigivelsen af xylose, katalyseret af Celluclast 1.5 L, var gradvist bedre med faldende pH, ned til pH 4.5 (figur 3b). En detaljeret evaluering af data viste, at det optimale pH for xylosefrigivelsen i forsøgsrammen var 4.5. Temperaturen havde ikke nogen signifikant effekt på xylosefrigivelsen inden for det testede temperaturinterval. Faktorforsøgene afslørede derfor to problemer:

- 1) At frigivelsen af hhv. arabinose og xylose fra arabinoxylan blev katalyseret bedst af to forskellige enzympræparater.
- 2) At katalysen af hhv. arabinose og xylosefrigivelse var maksimal ved forskelligt pH.

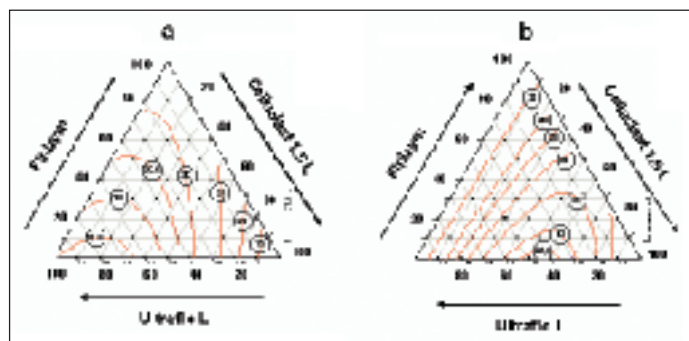
En detaljeret dataanalyse samt en redegørelse for hvilke enzymaktiviteter i de to præparater, der er ansvarlige for at katalysere frigivelsen af hhv. arabinose og xylose, er præsenteret andetsteds [6].

Mixture-design

For at arabinose- og xylosefrigivelsen kan katalyseres i samme reaktion, er det nødvendigt, at flere forskellige enzymreaktioner foregår samtidig. Vi har derfor fundet et kompromis

- 2) hvilket indbyrdes blandingsforhold, der giver optimalt udbytte.

Ternære mixture-design er velegnede til at besvare begge spørgsmål. Vha. et tertiært diagram kan udbytter ved blanding af tre enzymer/enzympræparater i forskellige forhold sammenlignes. Siden enzympræparatet Finizym 200 L også effektivt kan katalysere frigivelsen af arabinose fra arabinoxylan (data ikke vist) blev Finizym 200 L, Celluclast 1.5 L, og Ultraflo L kombineret i forskellige forhold. Udbyttet af hhv. arabinose og xylose blev bestemt for hvert af disse delforsøg. De opnåede udbytter modelleres som responsflademodeller, de forskellige mixturemodeller, der kan anvendes er beskrevet i Montgomery [6]. Data kan afbildes grafisk som konturplots og kan bruges direkte til at bestemme optimum. I tilfældet arabinose- og xylosefrigivelse fra systematiserede kombinationer af de tre valgte enzympræparater viste de opnåede data, at den optimale arabinosefrigivelse blev katalyseret ved et blandingsforhold på ca. 90:10 Ultraflo L:Celluclast 1.5 L (figur 4a), mens den optimale xylosefrigivelse var ved en ca. 50:50 blanding af Ultraflo L:Celluclast 1.5 L og helt uafhængig af tilstedeværelse af Finizym 200 L (figur 4b).



Figur 4. Responseflademodeller af tertiære mixture-design for frigivelsen af arabinose (a) og xylose (b) ved enzymatisk hydrolyse af hvedearabinoxylan med 66 forskellige kombinationer af Ultraflo L, Celluclast 1.5 L og Finizym 200 L i 24 timer. Tallene i cirklerne angiver den enzymatiske hydrolyse i procent. Total hydrolyse = 100%. Enzymdoseringerne er angivet i relativ % af den samlede enzymdosering.

I dette arbejde, der er en del af et ph.d.-studium, har forskellige statistiske forsøgsdesign vist sig at være effektive til at undersøge og sammenligne individuelle »multikomponente« enzympræparater og systematiske kombinationer af sådanne enzympræparater. Det har også vist sig, at brug af responsfladeforsøg er velegnede til at vurdere nye enzyms effektivitet og robusthed, herunder monokomponente enzymer, dvs. enzympræparater med en enzymaktivitet. Disse data har givet inspiration til en ny enzymdoseringsmetode med sekventiel tilsætning af kommercielle enzympræparater og monokomponente enzymer.

Når de mest effektive enzymaktiviteter og reaktionsbetingelser er identificeret, kan det betale sig detaljeret at undersøge og modellere kinetikken.

E-mail-adresser

Hanne R. Sørensen: hasq@novozymes.com

Anne S. Meyer: am@biocentrum.dtu.dk

Sven Pedersen: svp@novozymes.dk

Referencer:

1. Zaldivar J, Nielsen J, and Olsson L. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Appl Microbiol Biotechnol* 56:17-34, 2001
2. Lewis SM. Fermentation alcohol. In: Godfrey T, West S, editors. *Industrial enzymology*, 2nd ed. London: MacMillan Press Ltd; 1996. p. 11-48.
3. Izydorczyk M, Biliaderis CG, and Bushuk W. Comparison of the structure and composition of water-soluble pentosans from different wheat varieties. *Cereal Chem* 68:139-144, 1991
4. Saha BC. α -L-arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. *Biotechnol Adv.* 18:403-423, 2000.
5. Montgomery DC. Response surface methods and other approaches to process optimization. In: Montgomery DC, editor. *Design and analysis of experiments*, 5th ed. John Wiley & Sons, Inc; 2001. p. 427-510.
6. Sørensen HR, Meyer AS, and Pedersen S: Enzymatic hydrolysis of water-soluble wheat arabinoxylan. I. Synergy between α -L arabinofuranosidases, endoxylanases, and β -xylosidase activities. *Biotech Bioeng*, 81:726-731, 2003.

Ph.d.-projekt

Ruthenium-carben-metatese – struktur, applikationer og syntese

Projektet har omhandlet en særlig reaktion inden for metalorganisk kemi, der anvendes til at bytte bindinger (metatese) i molekyler med to kulstof-kulstof-dobbeltbindinger. Herved kan et acyklisk molekyle med to dobbeltbindinger omdannes til et cyklisk molekyle med en dobbeltbinding under fraspaltning af ethylen. Til reaktionen bruges specielle homogene ruthenium-katalysatorer, der bl.a. indeholder en 5-ledet heterocyklisk ligand (substituent).

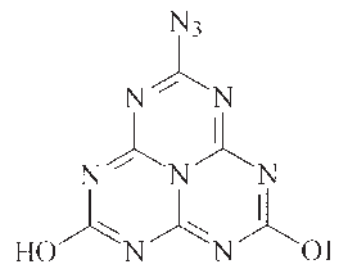
Det har været formålet med projektet at studere strukturen af disse katalysatorer, designe nye katalysatorer og anvende dem i organisk syntese. Krystalstrukturen af to metatesekatalysatorer er blevet bestemt ved røntgenkrystallografi. På basis af strukturerne blev der designet en ny og mere reaktiv katalysator, hvor den 5-lede heterocykliske ligand blev erstattet med en tilsvarende 6-lede ligand. Først blev den nye heterocykliske forbindelse fremstillet ved en cykliseringsreaktion. Noget overraskende blev der også dannet en 16-lede forbindelse i denne reaktion. Betingelserne blev optimeret til at give enten 6-ringen eller 16-ringen, og strukturen af begge forbindelser blev bekræftet ved røntgenkrystallografi. Det lykkedes desværre ikke at fremstille den ønskede katalysator, da det ikke var muligt at påsætte den nye heterocykliske ligand. I det eksterne ophold blev det forsøgt at fastgøre metatesekatalysatoren til en polymer, der ville gøre det nemmere at oprense reaktionen, da katalysatoren i så fald blot skal frafiltreres. Det lykkedes at fremstille den centrale byggeblok, der blev forsøgt polymeriseret. Desværre var det ikke muligt at oprense og isolere den fremstillede polymer. Metatesereaktionen er også blevet anvendt i syntesekemi. Vinsyre er blevet forlænget med fire kulstofatomer i form af to dobbeltbindinger. Disse derivater af vinsyre er derefter blevet ringsluttet til 6-lede carbocykliske forbindelser, kaldet conduritoler, vha. metatesereaktionen.

Andreas Lundtang Paulsen, Kemisk Institut, DTU

Nyt om...

...heptaziner

Linus Pauling døde i 1994. Han var den toneangivende kemiker i 1900-tallet. På hans kontor var der ved hans død en skrivevæg. På væggen var opbygningen af et heptazinmolekyle tegnet. I molekylet var indført 2-hydroxyl og 1-azid. Se figur.



Opdagelsen af heptaziner kan føres tilbage til omkring 1830, hvor Jöns J. Berzelius udførte forsøg med opvarmning af kviksølvthiocyanat. De fremstillede stoffer var inerte, og det var umuligt for Berzelius at komme ret langt med projektet.

I de seneste år er der vha. moderne forskningsteknik kommet megen ny viden om heptaziner og andre stoffer med grafit- og diamantlignende strukturer.

Bos

Litteratur: Elizabeth K. Wilson: Old molecules, new chemistry. Long-mysterious heptazines are beginning to find use in making carbon nitride materials *Chemical & Engineering News*. 31. maj 2004.

TÆNK....

TÆNK FINTI

Når finhed virkelig betyder noget: Retsch nye Planetkuglemøller PM 100 og PM 200. Bl.a. til fin og ultrafin formaling, homogenisering og mekanisk legering.



SKANLAB

Tlf. 4738 1014
www.skanlab.com



TÆNK STORT!

Når størrelsen betyder noget: Retsch nye Sigteapparater AS 300 for sigter op til 305 mm, AS 400 for sigter op til 400 mm.

TÆNK HURTIGT!

Når tiden betyder noget: Retsch nye Ultra-Centrifugalmølle ZM 200. Gennemført nytænkning.



Retsch

Reproducerbar formaling og komstørrelsesanalyse