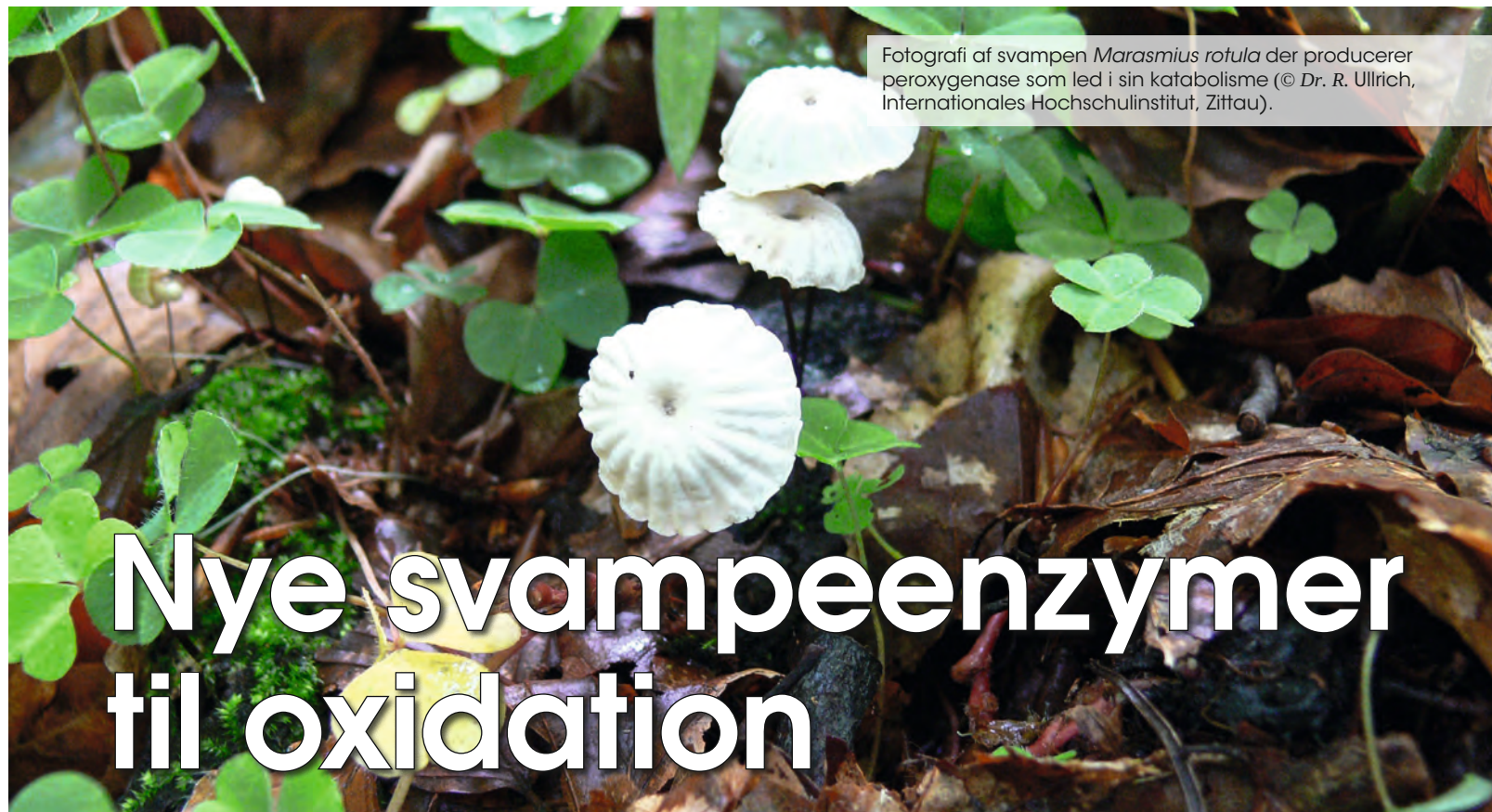




Fotografi af svampen *Marasmius rotula* der producerer peroxygenase som led i sin katabolisme (© Dr. R. Ullrich, Internationales Hochschulinstitut, Zittau).

Nye svampeenzymer til oxidation

Helt unikke enzymer fundet i svampe åbner nye muligheder for den kemiske og farmaceutiske industri.

Af Lars H. Østergaard og Lisbeth Kalum, Novozymes A/S

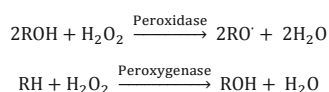
En helt ny klasse af enzymer kan indsætte hydroxylgrupper på en række forskellige aromatiske, alifatiske og heterocykliske forbindelser ved tilsætning af enzym og hydrogenperoxid. Denne klasse af oxiderende enzymer giver en række nye anvendelsesmuligheder og kan eksempelvis anvendes indenfor biokatalyse eller ved produktion og udvikling af lægemidler.

Oxiderende enzymer

En del kommercielt tilgængelige industrielle enzymer falder i klassen af oxiderende enzymer, altså enzymer der er i stand til at katalysere en oxidation af et substrat.

Oxiderende enzymer kan inddeles efter, hvorvidt de anvender dioxygen eller hydrogenperoxid som oxidationsmiddel og yderligere efter, om oxygen indsættes i substratet (figur 1, side 18).

Oxidaser reagerer med dioxygen, som reduceres til hydrogenperoxid eller helt til vand. Oxygenaser anvender også dioxygen, men indsætter oxygen i substratet. Tilsvarende kan oxiderende enzymer, der benytter hydrogenperoxid som oxidationsmiddel, inddeles i peroxidaser og peroxygenaser:

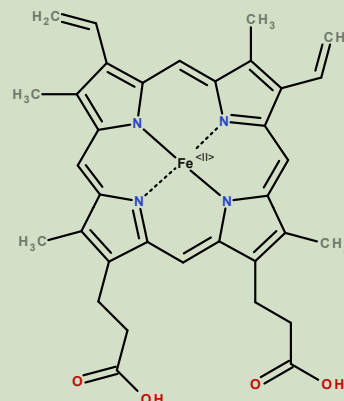


Tidligere har peroxygenaseaktivitet kun været rapporteret som en del af helt specifikke enzymsystemer i f.eks. planter, men for nylig blev en helt ny gruppe af enzymer med peroxygenaseaktivitet isoleret fra svampe [1]). Disse peroxygenaser

Faktaboks. Hæm - en enzymatisk cofaktor

Den kemiske struktur af hæm

- Består af et jern atom bundet i centrum af et organisk molekyle kaldet porphorin.
- Hæm har både hydrofobe og hydrofile egenskaber, der gør det i stand til at binde til proteiner.
- Jern-ionen er koordineret af fire N-atomer, men kan binde yderligere to ligander (f.eks. O_2 som i hæmoglobin).
- Cofaktoren kan også veksle mellem flere oxidationstrin (+2, +3 and +4), hvilket muliggør overførsel af elektroner og katalyse af redox-reaktioner.



Besøg VandTek

Her mødes en samlet branche for
rent vand og spildevand

Odense Congress Center · 20. - 23. november 2012

Mød os på VandTek

A

ABB A/S
ABC rørteknik
ACO Nordic
Agrometer
Alectia
AL-Laser
AMTech Aqua Miljø
AO
Aquacon
Aquasense
Arm-Tec Division
Assentoft Silo
Avidenz
AVK International

B

B.V. Electronic
Bergstrøm Plastteknik
Berotech
Bihl + Wiedemann Nordic
Birepo
Brd. Klee
Brenntag Nordic
Bürkert-Contromatic

C

Cady Aqua Control
Care Construction
Contech Automatic
Cowi

D

DanFlow
Danfoss Industriautomatik
Dankalk A/S
Danmarks Miljøportal
Dannozle
Danova
Dansk Automation
& Analyse

Dansk Kloak
RenoveringsTeknik
Dansk Standard
Danwatec
DENIOS
DESMI Danmark
DHI
DONG Energy - Sales
& Distribution

E

E. Eberhardt
Efsen Engineering
Egeplast Werner
Strumann GmbH & Co.
Elma Instruments
Endress + Hauser
Entrepreneurfirmaet
Østergaard
EnviDan
ETC TEKNIK
Expo-Net Danmark

F

Festo
FH Automation
Fibox
FKS Slamson
Flonidan DC

G

Gavatec
Genvand.dk
Geo
Georg Fischer
Glynwed
Grontmij
Grundfos DK
Grønbech & Sønner
Gunnar Guldbrand

H

Hans Buch
HedeDanmark
Hidrostal
HJORTKÆR maskinfabrik
Honeywell
HydroSystems
Højvang Miljølaboratorium

I

I.S.T. Skandinavien
IBF Betonvarer
Indiana Water Management
Systems pvt.ltd
Induflow
Informi GIS
ISS Kloak- & Industriservice

J

J.C. Hansens Metalvarefabrik
JA Watertechnik
Jens Dalsgaard
JH Dyk
JKL Teknik

K

Kamco
Kamstrup
Kemic Vandrens
Kemira Water Danmark
Kromann Connect
Krüger
KWH Pipe (Danmark)

L

Landia
Lauridsen Handel-Import
Lauridsen Rørteknik
Leif Koch
Liqflow
LMJ-TV

L

Marsø Plast
MJK Automation
Mosbaek
MT Miljøteknik
Munck Forsyningsledninger

N

N.C. Johansen
NCC Danmark
Nordisk Aluminat
Novotek

O

Orbicon
Otto P Vandteknik

P

PCS/SCHEMATIC
PEO-TECH
Per Aarsleff
Perstrup Beton Industri
Picca Automation
Polyflex
Proagria RIA Watech
Proline Danmark
Pumptechnik

R

Raingates
Rambøll
RC Betonvarer
Robotek El & Teknik
RoTek

S

Scanvand
Schneider Electric Danmark
Seepex Nordic
Siemens A
Silhorko-Eurowater

Socla SAS
Sondex Px Pumper
Stjernholm
Svatek
Søren Knudsen

T

Tech
Textile Tube
Thvilum

U

Ulefos NV
Uponor

V

Vand og Teknik
VandCenter Syd
Vandmand
Vandtech
Vatech 2000
Villy Poulsen
V. Løwener

W

Wavin
Wicotec
Wintec Aqua
Wisecor

X

Xylem Water Solutions
Denmark

Y

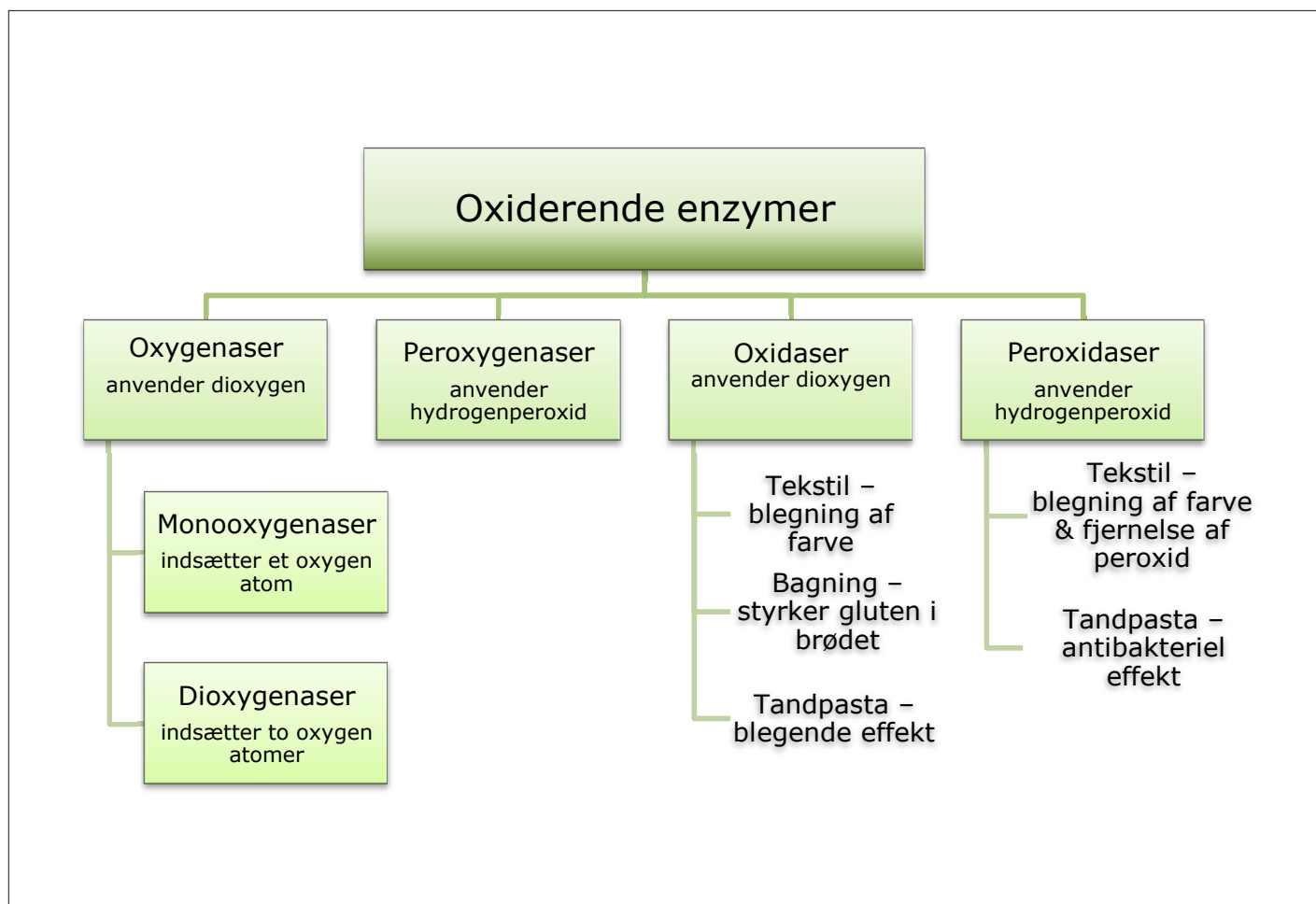
Yara Chemicals

Se udstillernes nyheder og tilmeld dig konferencer på vandtek.dk

VandTek

Print dit gratis adgangskort på vandtek.dk





Figur 1. Oversigt over oxiderende enzymer og deres industrielle anvendelser.

katalyserer hydroxylering og epoxidering af en meget bred vifte af substrater: Aromatisk hydroxylering af eksempelvis benzen eller naphthalen, hydroxylering af alifatiske forbindelser såsom heptan, epoxidering af eksempelvis styren og oxidation af heterocykliske forbindelser som dibenzothiophen og pyridin (figur 2). Denne nye gruppe af peroxygenaser har derfor fået navnet "uspecifik peroxygenase".

Tilsvarende bred substratspecificitet er ellers kun kendt fra cytochrom P450-systemer, som findes bundet i membraner i levende celler. De fungale peroxygenaser er derimod extracellulære enzymer, hvilket muliggør industriel produktion. Inkorporering af oxygen i substraterne betyder, at de får ændret egenskaber, som f.eks. vandopløselighed, reaktivitet og bionedbrydelighed, og åbner samtidig for en række anvendelsesmuligheder bl.a. indenfor biokatalyse.

Cofaktorer er hemmeligheden

De oxiderende enzyms aktivitet er afhængig af cofaktorer, en forbindelse som er i stand til at modtage og afgive elektroner. En cofaktor sidder bundet til enzymet og er enten en organisk forbindelse, såsom hæg, eller en uorganisk forbindelse, såsom

metal-ioner. Jern er den mest udbredte metal-ion hos oxide-rende enzymer, mens kobber, mangan og molybdæn er mindre anvendt [2].

Et af de vigtigste molekyler for liv er hæg. De fleste kender til molekylet i kraft af proteinet hægoglobin, der transporterer dioxygen fra lungerne til andre organer og væv i kroppen. Det er hæg-molekylet, der giver hægoglobin dets unikke oxygen-bindende egenskaber. Men hæg er altså også en vigtig cofaktor i en række andre nøgle-proteiner og enzymer: Hægoglobin og myoglobin transporterer og opbevarer dioxygen, cytochromer og oxidoreduktaser understøtter den cellulære energiproduktion og biosyntese, cytochrom P450'ere er vigtige for metabolisme af lægemidler og syntese af endogene forbindelser såsom steroider. Endelig findes hæg som cofaktor i en række industrielle enzymer, herunder peroxidaser (figur 3, side 20), katalaser og den nye peroxygenase.

Kommercielle anvendelser

De i dag kommercielt tilgængelige oxiderende enzymer anvendes indenfor en række forskellige industrier [3]. Oxidaser anvendes således indenfor bageindustrien, hvor glukose oxidaser

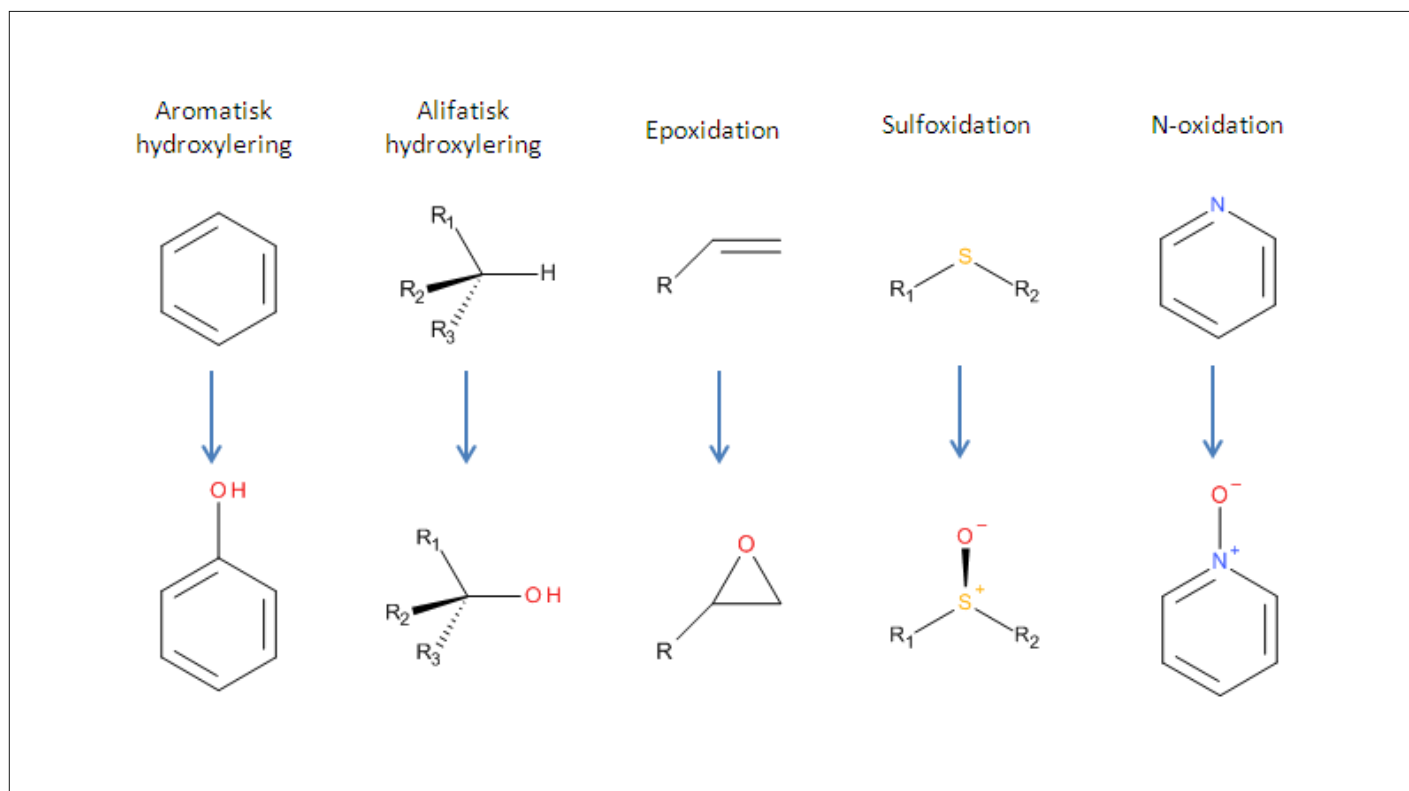


GEMÜ 800 serie

**Den holdbare flowmåler
med 500 standardskalaer**

GEMÜ®

www.gemue.dk



Figur 2. Oversigt over peroxygenase reaktioner.

THESE SHOES ARE MADE FOR WORKING...



Mød os på

FOODTECH '12 - STAND M9694

og se OptimaX - vores nye serie af let, komfortabelt og skridsikkert fodtøj.

Få en snak med vores salgskonsulenter, og lad os sammen finde det fodtøj, der lever op til dine medarbejders krav til kvalitetsfodtøj.

SIKA er **totalleverandør** af **arbejds- og sikkerhedsfodtøj** til den hvide sektor (herunder levnedsmiddel- og medicinalindustrien). Produktsortimentet er bredt og indeholder både sko, sandaler, hyttesko, støvletter, støvler, træsko og tilbehør.

SIKA
Created to work
www.sika-footwear.dk

SIKA OPTIMAX - Created to work for your business

FOODTECH
Processing & Packaging





Figur 3. Repræsentation af krystalstrukturen af kloroperoxidasen (svampe peroxygenasens nærmeste kendte slægtning) med hæg bundet som cofaktor.

oxiderer glukose under frigivelse af hydrogenperoxid, som øger krydsbindingerne i gluten. Kombinationen af en oxidase og en peroxidase findes i visse tandpasta, hvor den af oxidasen dannede peroxid dels virker blegende og dels indgår i et naturligt antibakterielt system sammen med peroxidasen [4]. Peroxidaser og katalaser anvendes ligeledes indenfor tekstilindustrien, hvor de benyttes til fjernelse af overskudsfarve og peroxid. Endelig benytter tekstilindustrien også oxidaser til blegning af farven indigo i produktionen af denim.

Potentiel industriel anvendelse af peroxygenaser

Peroxygenaser kan selektivt hydroxylere komplekse substrater, hvilket ellers er en stor udfordring i organisk syntese. Derfor er anvendelse indenfor biokatalyse en spændende mulighed. I dag anvendes biokatalyse i farmaindustrien i forbindelse med produktion og udvikling af nye lægemidler, men kun i mindre omfang i produktion af fin- og bulkkemikalier. Under udvikling af nye lægemidler skal man undersøge, hvordan disse omsættes i kroppen. Her kan en peroxygenase anvendes til at simulere den omdannelse af lægemidler som cytochrom P450 normalt katalyserer i leveren. To eksempler på hydroxylering af lægemidler er alkyl hydroxylering [5] af ibuprofen og aromatisk hydroxylering af dichlofenac (figur 4).

Phenol er blandt de 25 vigtigste kemiske produkter i verden med en årlig produktion på omkring 9 mio. tons. Phenol fremstilles industrielt primært ved "cumen processen". Benzen reage-

rer med propylen (alkylering ved 30 atm og 180-250°C), herefter oxideres det dannede cumen til cumen hydroperoxid som efter sur hydrolyse frigives som phenol og acetone.

Peroxygenaser kan overføre oxygen fra peroxid direkte til benzen, hvorved phenol kan fremstilles under milde betingelser med vand som biprodukt.

Anvendelse af peroxygenaser til biokatalyse giver en række fordele: Idet enzymerne er selektive kan man ofte reducere syntesevejen og undgå besværlig beskyttelsesgruppekemi. Der dannes færre biprodukter, og man kan opnå højere udbytter [6]. Endvidere foregår reaktionerne under milde betingelser, således at man opnår en miljømæssig fordel og kan reducere energiforbruget. At anvende peroxygenaser uden for deres naturlige vandige miljø byder dog også på en række procesmæssige udfordringer. Der stilles store krav til stabilitet overfor solvent, som ofte tilsættes for at øge substrattilgængeligheden. Desuden forbruges hydrogenperoxid i støkiometriske mængder i forhold til substratet. Da høje koncentrationer af hydrogenperoxid deaktiverer enzymet bør peroxid i de tilfælde tilsættes løbende under reaktionen.

Tillige vil anvendelser indenfor bioremediering være af interesse da peroxygenaser kan oxidere en række miljøfremmede stoffer som f.eks. polyaromatiske hydrocarboner, og herved øge bionedbrydeligheden.

Tak til EU-projekt Peroxicats (KBBE-2010-4-265397) for økonomisk støtte.

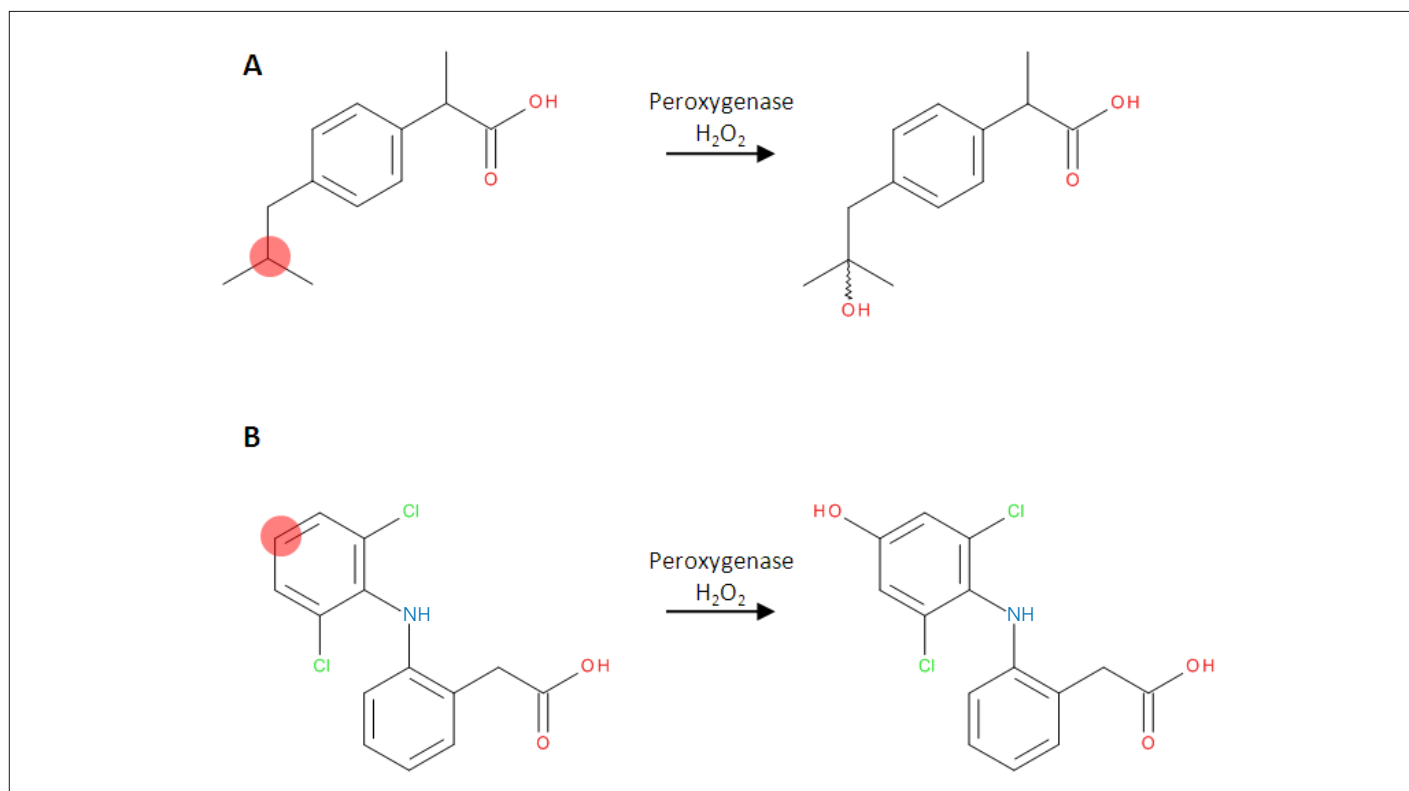


GEMÜ P600

**Kundespecifikke løsninger
for økonomisk optimal
anlægsdesign**

GEMÜ®

www.gemue.dk



Figur 4. Eksempler på peroxylase katalyseret hydroxylering af lægemidler: Alkyl hydroxylering af ibuprofen (A) og aromatisk hydroxylering af dichlofenac (B).

E-mail

Lars H. Østergaard: laq@novozymes.com

Lisbeth Kalum: lkal@novozymes.com

Referencer

1. Hofrichter, M. and Ullrich, R. (2010). New trends in fungal biooxidation. In: The Mycota (Hofrichter, M., ed.). 423-449. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
2. Andreini, C.; Bertini, I.; Cavallaro, G.; Holliday, G.L. and Thornton, J.M. (2008). Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles. J. Biol. Inorg. Chem. 13, 1205-1218.
3. Xu, F (2005). Applications of oxidoreductases: Recent progress. Industrial Biotechnology 1, 38-50.
4. Kussendrager, K. D. & van Hooijdonk, A. C (2000). Lactoperoxidase: physico-chemical properties, occurrence, mechanism of action and applications. Br. J. Nutr. 84 Suppl 1, S19-25.
5. Poraj-Kobielska, M.; Kinne, M.; Ullrich, R.; Scheibner, K.; Kayser, G.; Hammel, K.E. and Hofrichter, M. (2011). Preparation of human drug metabolites using fungal peroxylases. Biochemical Pharmacology. 82, 789-796
6. Hollman, F.; Arends, I.W.C.E; Buehler, K., Schallmeyer, A. and Bühler, B. (2011). Enzyme-mediated oxidations for the chemist. Green Chem., 13, 226-265.

Intelligent Chemistry

Gilson Trilution LC-MS Purification

Gilson PLC2020 Personal LC

Genevac Rocket Evaporator

Radley ReactorReady



GILSON®

radleys
preparing to separate



SP SCIENTIFIC
solvent evaporation technology



Biolab A/S
Sindalsvej 29
DK-8240 Risskov
Telefon 8621 2866
Telefax 8621 2301
E-mail: sales@biolab.dk