

»Ekstremozym«: Nye enzymer til opgradering af industriens biprodukter

Som eksempel på hvordan man kan udvikle nye enzymer til opgradering af affalds- og biprodukter beskrives her enzymatisk opgradering af laktose

Af Peter Stougaard, afdelingsleder, lic.scient., Afd. for Enzymteknologi, Biotechnologisk Institut, pst@biotechnologisk.dk

Levnedsmiddelindustrien producerer en stadigt stigende mængde affalds- og biprodukter. I bedste fald kan disse stoffer opgraderes og anvendes på en udgiftsneutral måde, i værste fald kan det koste dyrt at komme af med dem. Mange typer af affald og biprodukter indeholder imidlertid værdifulde komponenter, som kan opgraderes til højværdi-ingredienser og -produkter. Eksempler på dette er affald fra rejeindustrien og biprodukter fra mejeribranchen. Rejeaffald består hovedsageligt af kitin, proteiner og mineraler samt farvestoffet astaxanthin. Astaxanthin kan udvindes og anvendes som naturligt farvestof, og kitin kan oprensnes og omdannes til stoffet kitosan, som har et stort anvendelsespotentiale inden for farmaceutika, biomedicin og som levnedsmiddelingsingrediens. På samme måde kan biproduktet valle fra mejeribranchen opgraderes: Proteinerne og laktosen i valle kan udvindes og anvendes som højværdi-ingredienser i levnedsmidler og farmaceutiske produkter. De processer, som er udviklet til at omdanne og opgradere affald og biprodukter, har hidtil mest været fysiske og kemiske behandlinger, men på det seneste har også enzymer i stigende omfang fundet anvendelse i disse industrielle processer.

På Biotechnologisk Instituts Afdeling for Enzymteknologi i Hørsholm har vi i de seneste år i samarbejde med danske virksomheder udviklet flere nye enzymer til opgradering af affalds- og biprodukter. Som eksempel vil enzymatisk opgradering af laktose blive præsenteret i det følgende.

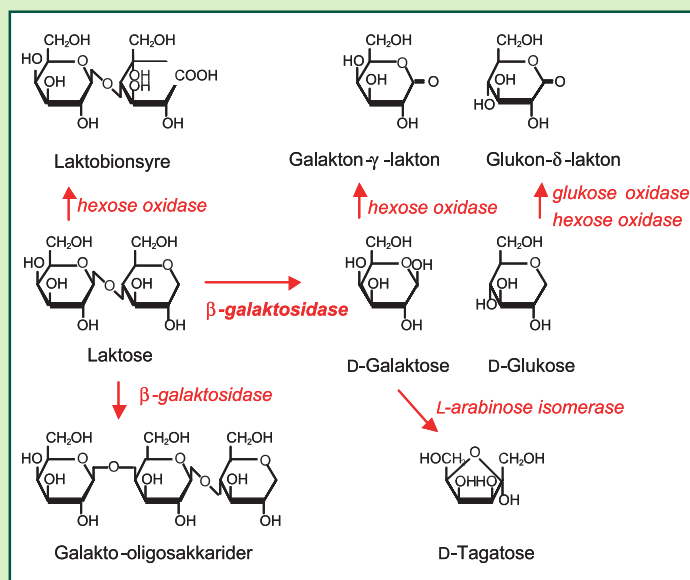
Laktose

Laktose, som er et biprodukt fra osteproduktion, produceres i EU i mængder, der overstiger 300.000 tons pr. år. Hovedparten af laktose anvendes som ingrediens i levnedsmidler og foder og kun en lille del oparbejdes kemisk til farmaceutisk brug. I figur 1 er vist hvordan laktose vha. enzymer kan omdannes til en lang række monosaccharider, disaccharider og oligosaccharider.

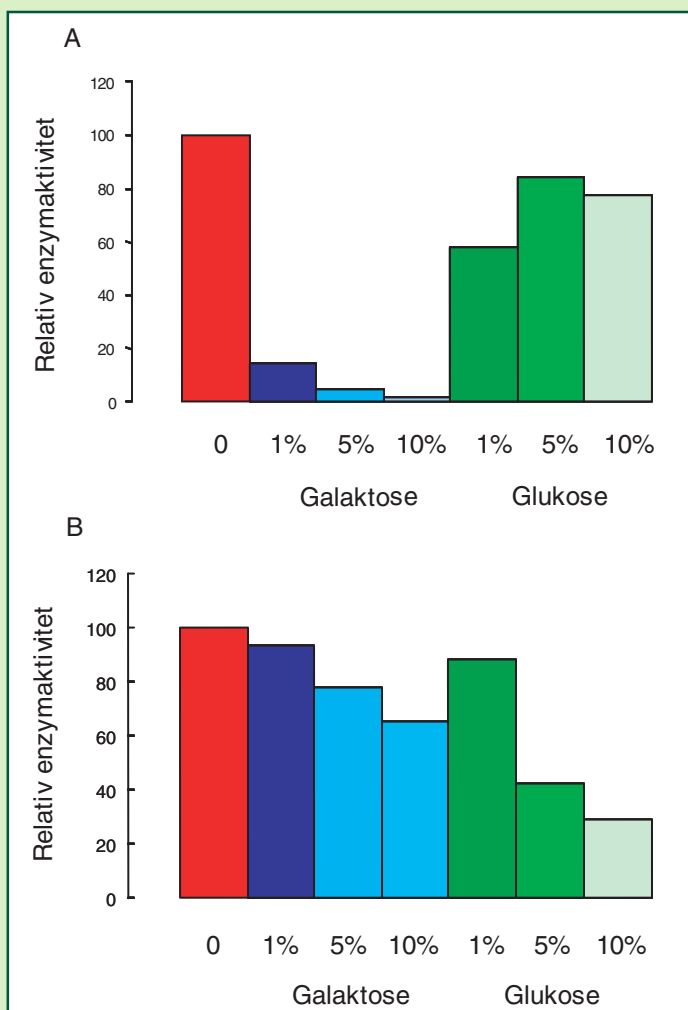
Omdannelse af laktose til D-glukose og D-galaktose

Laktose er et disaccharid, som består af monosacchariderne D-glukose og D-galaktose. Enzymatisk hydrolyse af laktose med enzymet β -GALAKTOSIDASE (eller LAKTASE) resulterer derfor i dannelse af monosacchariderne D-glukose og D-galaktose. En af fordelene ved hydrolyseret laktose er, at det ikke giver fordøjelsesproblemer for personer med laktoseintolerans. Samtidig er laktosehydrolysatet mere sødt end den oprindelige laktose, så hydrolysatet er meget velegnet som ingrediens i brød, kager, is og soft drinks samt ved produktion af yderligere opgraderede monosaccharider (se nedenfor).

Enzymatisk hydrolyse af laktose bør af hensyn til produktionshygiejnen helst finde sted ved temperaturer over 65°C eller under 10°C. De hidtil udviklede β -galaktosidaser anvendes godt nok til at hydrolysere laktose, men de er ikke specielt optimerede til processen: de fungerer ikke ved temperaturer over 65°C og kun meget dårligt under 10°C, og



Figur 1. Enzymatiske veje til opgradering af laktose.



Figur 2. Relativ enzymaktivitet af kommercielt tilgængelig β -galaktosidase (A) og af termostabil β -galaktosidase (B) i tilstedeværelse af galaktose og glukose.

de hæmmes desuden af den producerede galaktose. Figur 2A viser, at allerede ved 1% galaktose er enzymaktiviteten for en af de kommercielle laktaser reduceret til under 20%.

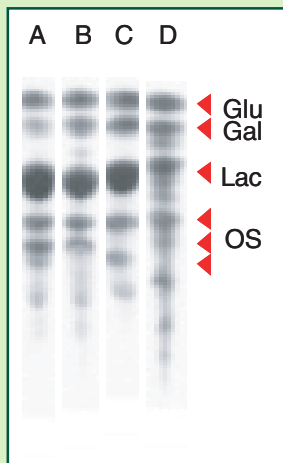
Defor har vi isoleret et nyt β -galaktosidase enzym, som er aktivt ved temperaturer over 65°C, som ikke hæmmes af den producerede galaktose, og som kun hæmmes moderat af glukose (figur 2B). Enzymet, der kommer fra den termofile mikroorganisme, *Sulfolobus solfataricus*, kan produceres i store mængder i laboratorie-produktionsorganismen *Escherichia coli*. Den nye proces til enzymatisk hydrolyse af laktose ved høj temperatur er både mere hygiejnisk og mere effektiv. Den høje temperatur hæmmer mikrobiel vækst og gør samtidig laktosen mere opløselig, så processen kan udføres ved høj laktosekoncentration. I nogle anvendelser, hvor det er vigtigt at bevare temperaturfølsomme smagsstoffer, kan det imidlertid være fordelagtigt at kunne foretage hydrolysen ved lav temperatur. Vi har derfor - fra en grønlandsk kulde-aktiv bakterie - isoleret et andet nyt β -galaktosidase enzym, som har størst aktivitet ved lave temperaturer, og vi er i øjeblikket ved at udvikle en proces til fremstilling et sådant kulde-aktivt β -galaktosidase enzym i større skala.

Omdannelse af laktose til oligosaccharider

Oligosaccharider opbygget af 3-5 galaktoseenheder er en naturlig bestanddel af mælk, omend de kun findes i meget små mængder. I løbet af de seneste årtier er det vist, at sådanne galakto-oligosaccharider selektivt stimulerer væksten af gavnlige tarmbakterier, og der er derfor stigende interesse for at kunne fremstille sådanne præbiotiske oligosaccharider. Visse β -GALAKTOSIDASER er, ud over den hydrolytiske aktivitet, desuden i stand til at koble galaktose på andre monosaccharider, disaccharider eller oligosaccharider, og denne reaktion kaldes transgalaktosylering. Nogle enzymer danner overvejende $\beta 1 \rightarrow 3$ bindinger, andre danner $\beta 1 \rightarrow 4$ og/eller $\beta 1 \rightarrow 6$ bindinger (figur 3), men fælles for de fleste β -galaktosidaser er det, at de kræver høj koncentration af laktose for at kunne producere galakto-oligosaccharider. Vi har gennem flere år arbejdet med oligosaccharid-producerende β -galaktosidaser fra en lang række mikroorganismer, og vi har i et forsøg på at optimere syntesen af oligosaccharider udviklet et nyt enzym fra bakterien *Bifidobacterium bifidum*. Enzymets aminosyresekvens, som er dobbelt så lang som i andre β -galaktosidaser, består af en β -galaktosidase-del og en galaktose-bindende del. Vi fjernede dele af det galaktose-bindende domæne og undersøgte enzymvarianternes evne til at hydrolysere laktose og til at opbygge oligosaccharider. Én af β -galaktosidase varianterne udviste en hydrolyseaktivitet på kun 6% sammenlignet med det naturlige enzym, men havde til gengæld en stærkt forbedret evne til at syntetisere oligosaccharider. Mens det naturlige enzym, som alle andre β -galaktosidaser, kun kan transgalaktosylere ved høje laktose-koncentrationer (over 40% laktose), så har den nye enzymvariant fået forbedret produktionsevnen betydeligt, idet syntese af oligosaccharider tillige kan finde sted ved lave laktose-koncentrationer (figur 4).

Omdannelse af laktose til glukon-delta-lakton og glukonsyre

Glukose-delen i laktose-hydrolysatet kan oxideres til glukon-delta-lakton vha. enzymet GLUKOSE OXIDASE fra *Aspergillus niger*. Glukon-delta-lakton, som spontant omdannes til glukonsyre, anvendes i flere levnedsmiddelprocesser og har tillige præbiotiske egenskaber, da det selektivt stimulerer væksten af gavnlige tarmbakterier. Glukose oxidase har været kendt i mange år, og det er vist, at rekombinant glukose oxidase fremstillet i gær (*Saccharomyces cerevisiae*) er mere temperaturstabil, sandsynligvis pga. en kraftigere

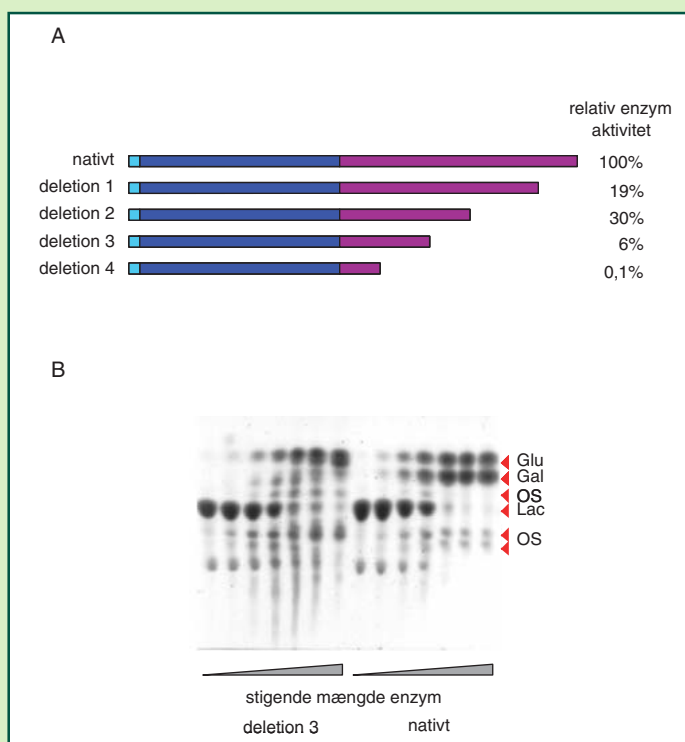


Figur 3. Tyndtlagschromatografi (TLC) af oligosaccharider fremstillet vha. termotabile β -galaktosidaser (A, B og C) samt et kommercielt produkt, Elix'or fra Borden. Oligosaccharider i A, B og C er fremstillet af tre forskellige enzymer: Glu, Gal, Lac og OS viser positionen af henholdsvis glukose, galaktose, laktose og tre forskellige trisaccharider.

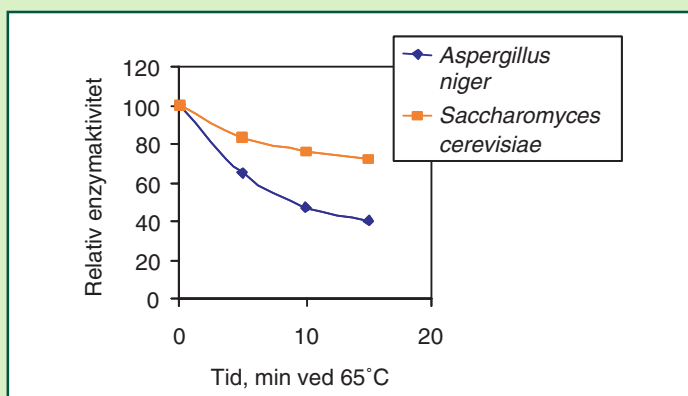
glykosylering af enzymet i gær end i *A. niger* (figur 5, side 32). Glukose oxidase har imidlertid en meget snæver substratspecifitet, da det udelukkende oxiderer C-1 positionen i D-glukose. Vi har derfor udviklet en bredspektret kulhydrat oxidase, HEXOSE OXIDASE fra rødalgen *Chondrus crispus*, som ud over at kunne oxidere D-glukose også kan oxidere en lang række andre mono- og disaccharider, inkl. D-galaktose og laktose (figur 6, side 32). Det er således muligt vha. hexose oxidase at fremstille glukon-delta-lakton fra D-glukose, galakton-gamma-lakton fra D-galaktose og laktobionsyre fra laktose. Glukon-delta-lakton og galakton-gamma-lakton har syrnende egenskaber i f.eks. levnedsmidler, og laktobionsyre anvendes som stabilisator ved opbevaring og transport af organer i forbindelse med transplantationskirurgi.

Omdannelse af laktose til D-tagatose

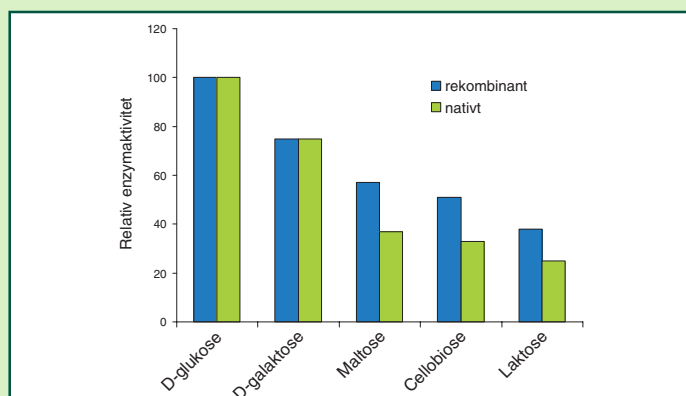
D-galaktosen i laktose-hydrolysatet kan opgraderes til monosaccharidet D-tagatose, som af fagfolk er blevet kaldt »fremtidens sødemiddel«. D-tagatose er et naturligt forekommende lav-kalorie sukker med en sødeevne svarende til almindeligt sukker. D-tagatose er non-cariogent, dvs. det giver ikke huller i tænderne, det kan indtages af diabetikere, og det er desuden præbiotisk. D-tagatose kan fremstilles kemisk ved isomerisering af D-galaktose, men der vil være en række procestekniske fordele, hvis den kemiske proces kan erstattes af en mere specifik, enzymatisk isomerisering. F.eks. vil dannelsen af miljøskadelige stoffer blive reduceret væsentligt. I løbet af de seneste år har det vist sig, at enzymet L-ARABINOSE ISOMERASE, der normalt isomeriserer L-arabinose til L-ribulose, tillige kan isomerisere aldosen D-galaktose til den



Figur 4. Hydrolytisk aktivitet (A) og transgalaktosyleringsevne (B) af nativt *Bifidobacterium bifidum* β -galaktosidase og deletionsmutanter. Lyseblå boks i (A) indikerer transportsignal, blå viser » β -galaktosidase-del« og lilla det »galaktose-bindende domæne«. I (B) viser Glu, Gal, Lac og OS positionen af henholdsvis glukose, galaktose, laktose og oligosaccharider i TLC.



Figur 5. Relativ enzymaktivitet af nativ glukose oxidase fra *Aspergillus niger* og rekombinant glukose oxidase produceret i gær, *Saccharomyces cerevisiae*.



Figur 6. Substratspecificitet af nativ hexose oxidase fra carrageentang, *Chondrus crispus*, og rekombinant hexose oxidase produceret i *Pichia pastoris*.

korresponderende ketose D-tagatose (figur 7). Ikke alle L-arabinose isomeraser har dog denne egenskab, men det er kendt, at isomeraser fra f.eks. *Aerobacter aerogenes*, *E. coli* og *Lactobacillus plantarum* kan isomerisere både L-arabinose og D-galaktose. Strukturkemisk er D-galaktose og L-arabinose nært beslægtede (figur 7), og isomeraseaktiviteten over for D-galaktose er generelt 15-40% af L-arabinoseaktiviteten. Imidlertid er ingen af de hidtil kendte isomeraser temperaturstabile, og da det af proceshygiejniske og effektivitetsmæssige årsager er attraktivt at kunne udføre processen ved høj temperatur, har vi isoleret genet for L-arabinose isomerase fra en termofil mikroorganisme og udviklet en enzymatisk proces til omdannelse af D-galaktose til D-tagatose ved 65°C. Sammenlignet med den »normale« isomerisering af L-arabinose til L-ribulose kan enzymet omdanne D-galaktose til D-tagatose med en effektivitet på over 40%.

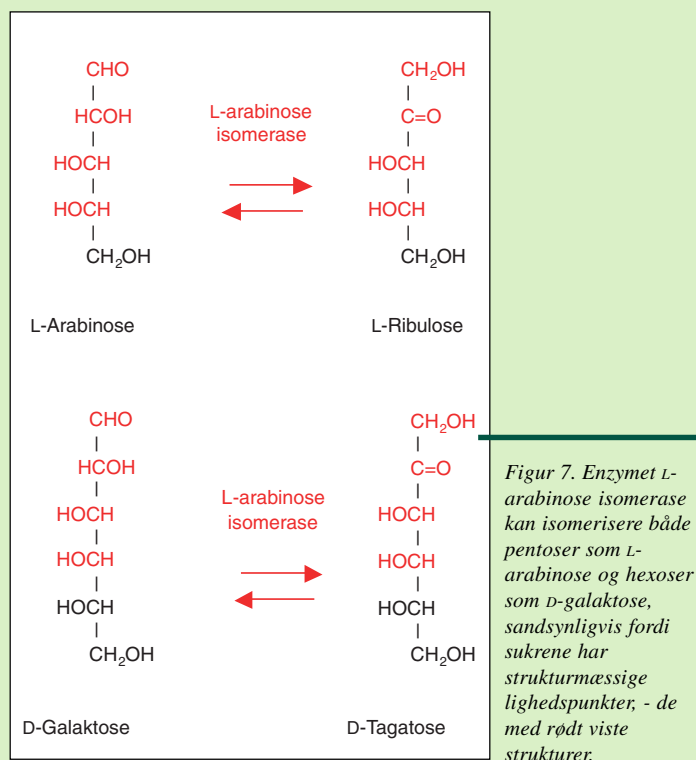
Konklusion

Biproduktet laktose, som på verdensmarkedet handles til priser på ca. 5 kr. pr. kg, kan ved nye, relativt simple enzymatiske modifikationer omdannes til en række høj-værdi kulhydrater,

der kan anvendes som levnedsmiddelingredienser og som bestanddele i farmaceutiske præparater.

I udviklingen af laktosebaserede enzymatiske processer har vi i stigende omfang fået øjnene op for det potentiale, som mikrobiel biodiversitet udgør for nye enzymer med særlige temperatur- og pH-krav. I stedet for at tilpasse processerne til f.eks. de relativt snævre temperatur- og pH-krav, som almindelige enzymer har, har det været muligt at isolere nye enzymer med særlige egenskaber, som passer bedre til de specifikke processer. Enzymer med bedre stabilitet ved høje temperaturer er således isoleret fra *termofile* organismer, og kulde-aktive enzymer er identificeret i bakterier fra kolde habitater, såkaldte *psychrofile* bakterier. Sådanne mikroorganismer fra ekstreme økologiske nicher, *ekstremofile organismer*, har vist sig at være vigtige kilder til nye enzymer, og i erkendelse heraf har Biotechnologisk Institut etableret en stor stammesamling bestående af mikroorganismer fra ekstreme økologiske nicher, som f.eks. varme kilder, kolde habitater og saltsøer. Ekstremofile organismer og deres enzymer kan selvfølgelig anvendes i mange andre processer end opgradering af laktose. Faktisk er der efterhånden flere eksempler på, at nye enzymer fra ekstremofile organismer har kunnet anvendes til opgradering af en lang række andre affalds- og biprodukter, fra brugte bildæk og slagteriaffald til biprodukter fra reje-industrien og affald fra sukkerproduktion. Kun de industrielle processer og fantasien sætter begrænsningen.

Dele af dette arbejde er udført i samarbejde med og støttet af Arla Foods amba. Vi takker Arla Foods amba for tilladelse til at præsentere resultater, som endnu ikke er offentliggjort. Erhvervsfremme Styrelsen og Danisco A/S takkes for hhv. økonomisk støtte og stimulerende samarbejde.



Litteratur

- Hatzinikolaou, D.G., Hansen, O.C., Macris, B.J., Tingey, A., Kekos, D., Goodenough, P., og Stougaard, P. (1996). A new glucose oxidase from *Aspergillus niger*: Characterization and regulation studies of enzyme and gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46, 371-381.
- Hansen, O. og Stougaard, P. (1997) Hexose oxidase from the red alga *Chondrus crispus*: Purification, molecular cloning, and expression in *Pichia pastoris*. *J. Biol. Chem.* 272, 11581-11587.
- Wolff, A.-M., Hansen, O.C., Poulsen, U., Madrid, S., og Stougaard, P. (2001) Optimization of the Production of *Chondrus crispus* Hexose Oxidase in *Pichia pastoris* Prot. *Expres. Purific.* 22, 189-199.
- Møller, P.L., Jørgensen, F., Hansen, O.C., Madsen, S.M., og Stougaard, P. (2001) Intra- and Extracellular β -Galactosidases from *Bifidobacterium bifidum* and *B. infantis*: Molecular Cloning, Heterologous Expression, and Comparative Characterization, *Appl. Environ. Microbiol.* 2001. 67:2276-2283.
- Jørgensen, F., Hansen, O.C., og Stougaard, P. High-efficiency synthesis of oligosaccharides with a truncated β -galactosidase from *Bifidobacterium bifidum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (in press).