

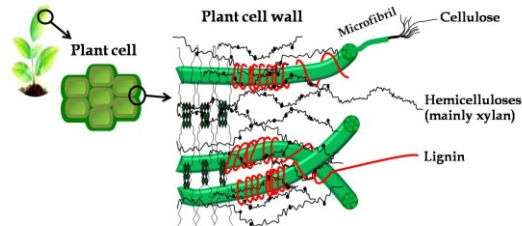


Enzimológia Hemicelluláz enzimek

Fehér Csaba
Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék



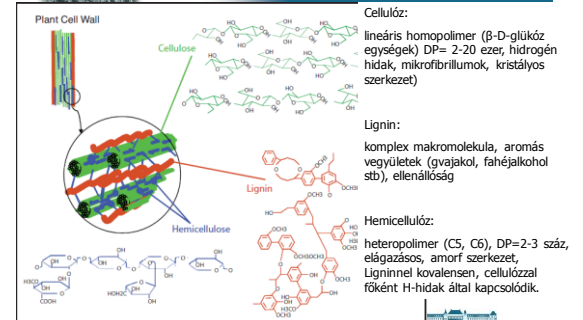
Lignocellulóz felépítése



Enzimológia – Hemicellulázok



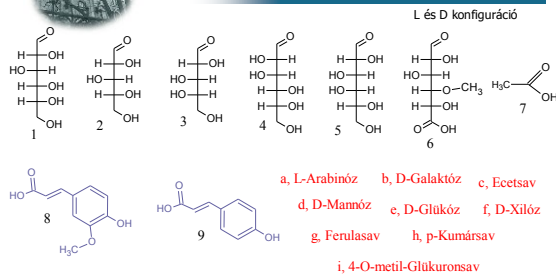
Lignocellulóz felépítése



Enzimológia – Hemicellulázok



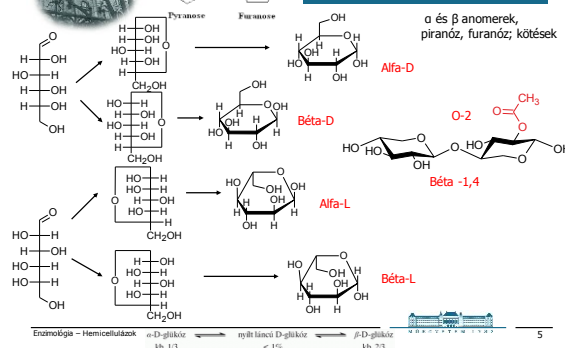
Hemicellulóz felépítése



Enzimológia – Hemicellulázok



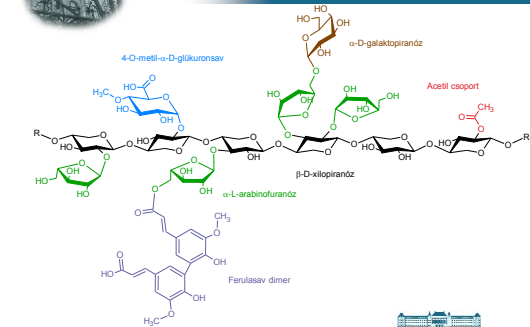
Hemicellulóz felépítése



Enzimológia – Hemicellulázok



Hemicellulóz felépítése



Enzimológia – Hemicellulázok





Hemicellulóz felépítése

A felépítő molekulák és azok aránya alapján nagyon eltérőek lehetnek. Függs a növény fajtájától és a növényi résztől is.

Hemicellulóz kb. 15-35%-át teszi ki a szárazföldi növényeknek (szárazanyagra tekintve)

Homoxilán (dohány szár, eszpartó fű, tengeri fű, tengeri alga)

Glükomannán, glükuronoxilán (keményfa)

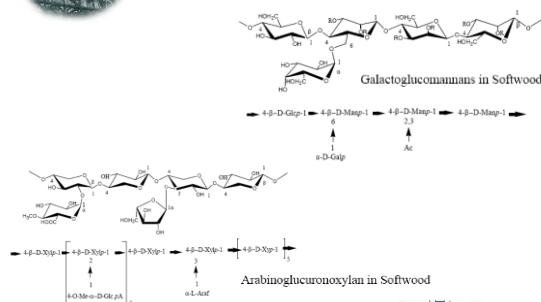
Galaktoglükomannán, arabinoglükuronoxilán (puhafa)

Arabinoxilán, glükuronoarabinoxilán (gabonafélék, fűvek)

Hemicellulóz oldatba vitele savas hidrolízissel, vagy enzimesen.



Hemicellulóz felépítése



Hemicellulóz felépítése

Wood	Hemicellulose type	Amount (% on wood)	Composition			DP
			Units	Molar ratios	Linkage	
SW	Galacto-glucomannan	5-8	β -D-Manp β -D-GlcP α -D-Galp Acetyl	3 1 1 1	1 \rightarrow 4 1 \rightarrow 4 1 \rightarrow 6	100
	(Galacto-)glucomannan	10-15	β -D-Manp β -D-GlcP α -D-Galp Acetyl	4 1 0.1 1	1 \rightarrow 4 1 \rightarrow 4 1 \rightarrow 6	100
	Arabino-gluconoxylan	7-10	β -D-Xylp 4-O-Me- α -D-GlcA α -L-Araf	10 2 1.3	1 \rightarrow 4 1 \rightarrow 2 1 \rightarrow 3	100
HW	Glucuronoxylan	15-30	β -D-Xylp 4-O-Me- α -D-GlcA Acetyl	10 1 7	1 \rightarrow 4 1 \rightarrow 2	200
	Glucomannan	2-5	β -D-Manp β -D-GlcP	1.2 1	1 \rightarrow 4 1 \rightarrow 4	200

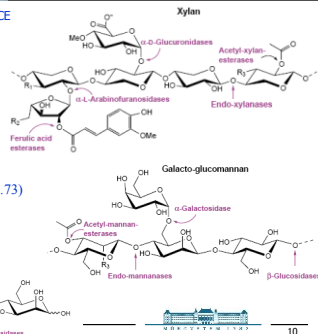
The Major Hemicellulose Components in Softwood and Hardwood



Hemicellulázok

GH és CE

- Endo-1,4- β -xilanáz (EC 3.2.1.8)
- β -D-Xilozidáz (EC 3.2.1.37)
- α -glükuronidáz (EC 3.2.1.139)
- α -L-arabinofuranozidáz (EC 3.2.1.55)
- (galaktózidáz, mannozidáz, glükózidáz)
- Acetilxilán észteráz (EC 3.1.1.72)
- Fenilsav/p-Kumársav észteráz (EC 3.1.1.73)



Hemicellulázok

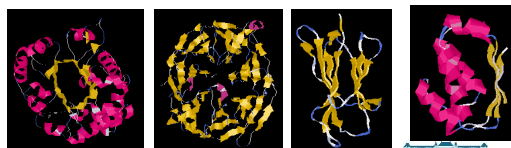
A hemicellulázokat az aminosav szekvenciájuk, a térszerkezetük és a hatásmechanizmusuk alapján különböző Gilkozid Hidroláz családotba sorolják.

www.cazy.org (Carbohydrate-Active enZYmes Database)

(Egyes családokon belül nagyon eltérő szubsztrát/régió **specifitások**, pH hőmérsékleti optimumok)

Felépítésük: Katalitikus domén (CD), szubsztrát kötő domén (CBD), összekötő peptid (linker).

domén struktúrák (3. szerkezet): (α / β)8 hordó (TIM), β -propeller, β -szendvics, α / β szendvics...



Hemicellulázok

A specifikitást az aktív hely topológiája meghatározza:

Endo-enzimek: mindkét végén nyitott rés (cleft)

Exo-enzimek: Egyik végén zárt hasadék/csatorna (groove)

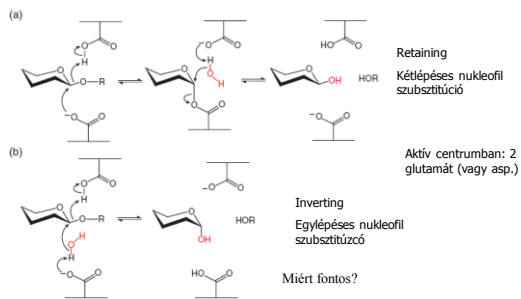
Elágazásokat bontó enzimek (exo): Zseb (pocket)

Szinerdzmus (egymás hatását elősegítik a komplex szerkezet hidrolízise során)

Sokféle enzim együttes jelenléte szükséges.

Polimer hidrolízise: anomer szén konfigurációjának megváltoztatásával (inverting) vagy megtartásával (retaining)

Hemicellulázok működése



Enzimológia – Hemicellulázok

13

Hemicellulázok osztályozása

Summary of classification data related to the principal arabinosylan-degrading enzymes.

Enzyme	Abbreviation	EC activities	Mechanism	CAZy family	GH clan	Fold
endo-1,4-β-xylanase (xylanase)	Xyn	3.2.1.8	Retaining	GH 5 GH 10 GH 11 GH 8 GH 9	A A C M Unk	(β)α (β)α β-jelly roll (β)α (β)α
exo-1,4-β-xylosidase (β-xylosidase)	Xyl	3.2.1.37	Inverting Retaining	GH 2 GH 30 GH 39 GH 52 GH 54 GH 116	Unk A A Unk Unk Unk	(β)α (β)α (β)α Unk β-jelly roll Unk
α-L-arabinofuranosidase (arabinosylan arabinofuranosylhydrolase)	Abf (AxB)	3.2.1.55	Inverting Retaining	GH 43 GH 120 GH 3 GH 51 GH 54 GH 42	Unk Unk Unk A A F	5-fold β-propeller Unk (β)α (β)α β-jelly roll 5-fold β-propeller Unk
Feruloyl esterases	Fae	3.1.1.73	Inverting Unk	GH 62 na	Unk na	(αβ)α-sandwich

Unk: not known; na: not applicable.

Enzimológia – Hemicellulázok

14

Endo-1,4-β-Xilanázok

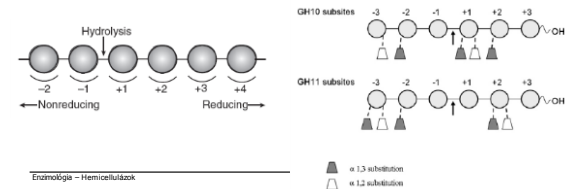
Xilán lánc hasítása: xilo-oligomerek keletkeznek.

GH: 5, 7, 8, 10, 11, 43. GH 10,11 – retaining,

GH 10 – átl 30 kDa-nál nagyobb katalitikus domén, (α/β)8 hordó

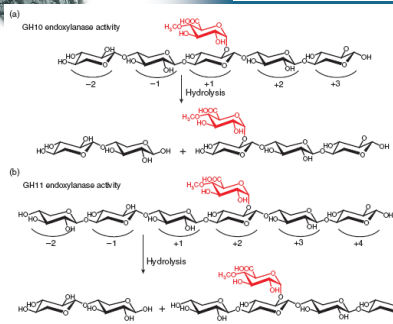
GH11 kisebb katalitikus domén, Béta hordó (β jelly roll)

Elágazásos xilánon nem random módon történik a hasítás. A szubsztituensek, elhelyezkedése, típusa és száma nagyban befolyásolja xilán alaplánc hidrolízisét.



▲ 1.3 szubsztitúció
▲ 1.2 szubsztitúció

Endo-1,4-β-Xilanázok



Enzimológia – Hemicellulázok

16

α-Glükuronozidázok

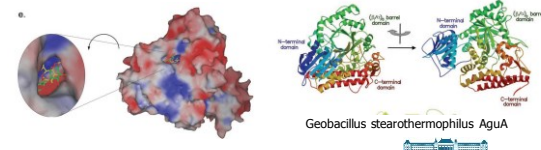
Legtöbb csak terminális (nem redukáló) glükuronsavat képes hidrolizálni xilo-oligomerekről. (GH11 termékeken nem képes hatni)

GH 67

Acetil csoportok (közel) jelenléte nagymértékben gátolja az aktivitás.

Mély, zseb alakú aktív hellyel rendelkezik → csak a terminális helyzetben lévő glükuronsavat képes hidrolizálni.

Az α-glükuronozidázok többsége a sejtfal bontása során az endo-xilanázok után kapcsolódik be, azok termékeit támadja.



17

β-Xilozidáz

Xilán-1,4-β-xilozidáz

GH 3, 39, 43, 52, 54 (GH 43 – inverzió)

Xilóz monomerek felszabadítása: Xilobióz, rövid xilo-oligosaccharidok (XOS) – nem redukáló végről Endo-xilanázok után lépnek akcióba.

Lignocellulóz enzimatiskus bontása során fontos szerepe van, mert a XOS inhibeálja a cellulázokat.

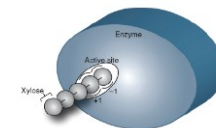


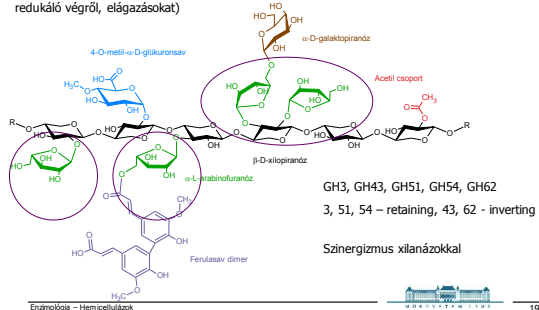
Fig. 8 Schematic representation of the GH family 43 β-xylosidase (XvA) from *Thermotoga maritima* indicating the two xylene binding sites in the active site and the projection of extended xylene chains out into solution. GH β-xylosidase hydrolyses

Enzimológia – Hemicellulázok

18

α-L-arabinofuranozidázok

Arabinanázok (endo/exo 1,5 kötést), arabinofuranozidázok (1,2; 1,3; 1,5 kötés, terminális, nem redukáló végről, elágazásokat)



α-L-arabinofuranozidázok

Nagyon változatosak szubsztát specifikitásuk tekintetében.

Csoportosítás (milyen szubsztátot képes hatni)

ABFA – nem aktív polimeren csak arabinoxilán-oligomereken (AXOS)

ABFB – aktív polimer szubsztátot

AXH – speciális aktivitás arabinoxilánokkal szemben (arabinoxilán arabinofuranozidázok)

AXHA – nincs aktivitás pNPA-val szemben

AXHB – aktív pNPA-n és oligomer szubsztátot is

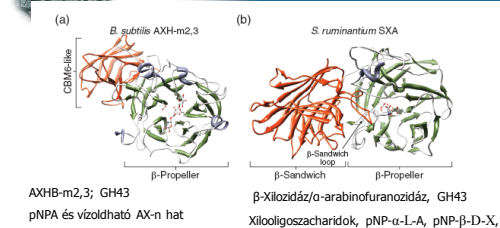
m/d – mono vagy diszubsztituált xilózzal hasít

2/3/2,3 – O2, O3, vagy mindkét helyzetben lévő arabinózt szabadít fel

pl.: AXH-m2,3 – arabinoxilán oligomereken (polimeren) hat, de nem bontja a pNPA-t. A monoszubsztituáltan elhelyezkedő O2 és O3 pozíciójú arabinóz oldallánccokat hidrolizálja.

Befolyásol még: szubsztitúció foka (X/A arány), egyéb oldallánccok jelenléte. (pl.: galaktóz gátol)

α-L-arabinofuranozidázok



Enzim mértékség

Xilán észterázok

Acetil csoportok O2, O3 helyzetben. Ferulasav és p-Kumársav O5 helyzetben az arabinózon.

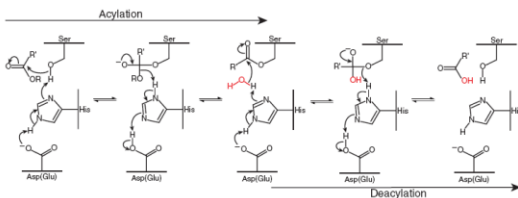
Acetil csoportok nagyban befolyásolják a GH aktivitásokat.

Ferulasav, p-Kumársav – kovalens kereszt-kötések a hemicellulózon belül, ligninhez, fehérjékhez – hemicellulóz bontást akadályozzák

Acetil xilán észteráz CE 1-7, 12, 16. Ferulasav/kumársav észteráz CE1. (szinergizmus)

CE4 kivételével mindenhol Ser-His-Asp(Glu) aktív centrumban (hasonló mint Ser proteázok)

Mechanizmus:



Szénhidrát kötő domén szerepe

Nem csak a kapcsolódásban van szerepük, hatással van a szubsztát szerkezetére.

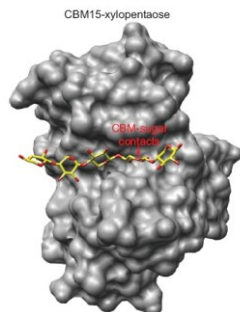


Fig. 11 Structural surface rendering of the *Cellvibrion japonicus* family 15 carbohydrate binding module (CBM) in complex with xylopentaose (PDB accession no. 1CXY) (Srinio et al., 2001). The xylopentaose sugar adopts a helical conformation wherein most of the O-2 and O-3 hydroxyl groups point out into solution suggesting that this CBM could accommodate a highly decorated xylan chain. The only exception is the fourth xylene residue which makes hydrogen bond contacts from both the O-2 and O-3 hydroxyl groups to the protein.

Hemicellulázok termelése

Hemicellulázok termelése: fonalas gombák, baktériumok, élesztők.

Megfelel enzimektől előállítás szükséges.

Különböző „stratégiák”:

Trichodermák, Aspergillusok (aerob fonalas gombák) – sokféle enzimet termelnek extracellulárisan. Ezek szinergikusan hatva monoszacharidokat és diszacharidokat eredményeznek. Ezt veszi fel mikroba. (de mások is)

Bacillus, Cellvibrion nemzetség tagjai – kisebb számú, főként polimer bontó enzimet termelnek, mely viszonylag nagy méretű oligocukrokat eredményeznek. Ezek hidrolízise sejten belül, vagy a sejtfalhoz rögzített enzimekkel történik.

Clostridia (anaerob baci) – cellulosome (xylanosome)

Ipari előállítás: 80-90% szuszpenzióban (submerged culture), de lehet szilárd fázisú fermentációval is.



Hemicellulázok termelése

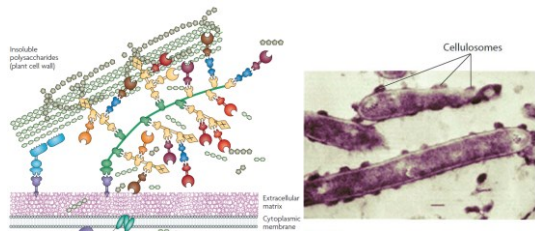
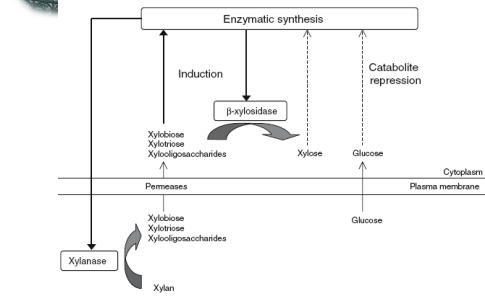


Figure 1 Cellulomes at the surface of *Clostridium thermocellum*.

Endomológia – Hemicellulázok



Hemicellulázok termelése



Endomológia – Hemicellulázok



Hemicellulázok tulajdonságai

Microorganism	Molecular weight (kDa)	Optimum		Stability		pI	K _m (mg/ml)	V _{max} (μM/min per mg)	References
		pH	Temperature (°C)	pH	Temperature (°C)				
<i>Penicillium amabilis</i>	17	6	50	5	50	-	0.731, 0.342	-	Ximenes et al. 1999
<i>Aspergillus niger</i>	13.5-14.0	5.5	45	5-6	60	9	-	-	Tranquero et al. 1985
<i>Aspergillus kawachi</i> IFO 4330	26-35	2-5.5	50-60	1-10	50-60	3.5-4.7	-	-	Ito et al. 1992
<i>Aspergillus nidulans</i>	22-24	5.4	55	5.4	24-40	-	-	-	Pezomandragos et al. 1992
<i>Aspergillus ficiformis</i> Paj	31	6	60	5-9.5	55	-	4.88	5.88	Paj and Clavins 1994
<i>Aspergillus niger</i>	32.7, 35.5	5.5, 5	60, 50	5-8, 5-9	50, 35	3.3, 3.75	-	-	Elizaga et al. 2000
<i>Aspergillus nidulans</i> ICG 48	30	5.5	60	-	-	-	-	-	Obach and Hradak 1994
<i>Coprinopsis sp.</i>	30, 70	8	40	8-10	-	-	0.15	-	Barnes et al. 1993
<i>Fusarium oxysporum</i>	20.8, 23.5	6	60, 55	7-10	30	-	0.5, 0.45, 0.41, 0.37	-	Clavins, Pajman et al. 1994
<i>Geotrichum candidum</i>	60-67	4	50	3-4.5	45	3.4	-	-	Radziszewski et al. 2000
<i>Paecilomyces variotii</i>	20	4	50	-	-	5.2	49.5	-	Selby et al. 1993
<i>Penicillium purpuroscentum</i>	33, 23	7, 3.5	60, 50	6-7.5, 40	4.5-7.5	6.6, 5.9	-	-	Baldwin et al. 1999
<i>Thermoascus aurantiacus</i> DSM 5826	25.5	7	60-70	5-9	60	4.1	7.3	-	Castro and Siqueira 1999
<i>Thermoascus aurantiacus</i> -SIBP	23.6	6.5	70-75	5-12	60	3.8	3.26	6300	Liu et al. 1999
<i>Trichoderma reesei</i>	20	5	50	-	40	-	0.58	0.106	Tee et al. 1985
<i>Trichoderma reesei</i>	20, 19	5-5.5, 4-4.3	45, 40	3-8.5, 2.5-8.5	-	9.5, 5	14.8-21.3	-	Trichopoulos et al. 1992

Endomológia – Hemicellulázok



Hemicellulázok tulajdonságai

Bakteriumokból származó

Microorganism	Molecular weight (kDa)	Optimum		Stability		pI	K _m (mg/ml)	V _{max} (μM/min per mg)	References
		pH	Temperature (°C)	pH	Temperature (°C)				
<i>Bacteria</i>									
<i>Acidobacterium capsulatum</i>	41	5	65	3-8	20-50	7.3	3.5	403	Taggaki et al. 1995
<i>Bacillus sp. W-1</i>	21.5	6	65	4-10	40	8.5	4.5	-	Okamoto et al. 1985
<i>Bacillus cereus</i> W-11	15	5.5-7	-	-	-	9.1	4	-	Tranquero et al. 1985
<i>Bacillus thuringiensis</i> T-6	43	6.5	55	6.5-10	70	7, 9	1.63	288	Tranquero et al. 1985
<i>Bacillus sp. strain BP-23</i>	33	5.5	50	6.5-11	55	9.3	-	-	Tranquero et al. 1985
<i>Bacillus pumilus</i>	41	6	55	6-8	65	7-9	-	-	Logan et al. 1994
<i>Bacillus sp. strain CECT 157</i>	41	6	50	-	-	4.7	171	112	Tranquero et al. 1995
<i>Bacillus sp. strain BC-1</i>	23	5.5	60	5-12	50-60	-	-	-	Tranquero et al. 1995
<i>Bacillus sp. 100-27</i>	-	7, 8.4	70	6-11	40-60	-	-	-	Goggin et al. 1995
<i>Bacillus sp. 195-0</i>	-	6	75	6-9	85	-	-	-	Battilana et al. 1995
<i>Bacillus sp. strain AB-004</i>	23, 48	6-10	60-75	6-8	60-65	-	-	-	Gousses 1995
<i>Bacillus sp. NCDM 59</i>	15.8, 25	6	50-60	7	50	4.8	1.56, 3.50	0.017, 0.162	Tranquero and Oishi 1993
<i>Cellulomonas fiji</i>	14-150	3-6.5	40-45	-	-	8	1.7, 1.5	380, 660	Tranquero et al. 1995
<i>Cellulomonas sp. N.C.134.333</i>	22, 33, 53	6.5	55	-	-	-	-	-	Tranquero et al. 1995
<i>Micromonospora</i> AB-133	56	7.5-9	55	6.5-10	40	-	-	-	Gousses and Miano 1993
<i>Streptococcus sp. SG-13</i>	60	7.5, 9.2	50	7.5-9.5	50	-	4	90	Goggin et al. 2000
<i>Thermomonospora</i> sp. JW 35-15 483	24-180	6.2	80	-	-	4.37	3	-	Shao et al. 1995
<i>Thermoplasma</i> 40, 120	5.4, 6.2	92-105	-	-	-	5.6	11, 0.29	374, 4760	Tranquero and Leibel 1995

Endomológia – Hemicellulázok



Hemicellulázok tulajdonságai

Élesztőkből származó

Microorganism	Molecular weight (kDa)	Optimum		Stability		pI	K _m (mg/ml)	V _{max} (μM/min per mg)	References
		pH	Temperature (°C)	pH	Temperature (°C)				
<i>Yeast</i>									
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25	4.4	54	4.5	55	9.4	7.6	2650	Li et al. 1993
<i>Trichosporon albidum</i>	48	5	25	-	-	5.7, 5.3	-	-	Morozoli et al. 1996
<i>Cryptosporidium parvum</i>	48	5	25	-	-	5.7, 5.3	-	-	Morozoli et al. 1996
<i>Trichosporon cutaneum</i> SL409	-	6.5	50	4.5-8.5	50	-	-	-	Liu et al. 1992
<i>Actinomyces</i>									
<i>Streptomyces sp. BC 10</i>	32	7-8	60	-	-	6.8	3	-	Lumba and Penick 1992
<i>Streptomyces sp. B-1-2-2</i>	23.8-40.5	6-7	55-60	-	-	4.8-8.3	0.8-5.8	162-470	Elger et al. 1994
<i>Streptomyces</i> 27	20	4.5-5.5	60	5	37-50	7.8	10	7610	Kesker 1992
<i>Streptomyces thermophilus</i>	33, 54	7	60-70	-	-	4.2, 6	-	-	Tuppo et al. 1992
<i>Streptomyces</i> OPB-020	48	6	50	5-8	40-60	9	4, 0.3	78.2, 19.1	Logan, Pezomandragos et al. 1992
<i>Streptomyces chathoensis</i> CCEC 3336	59	7-8	65-70	5-9	70	10.2-10.5	-	-	Magnuson and Crawford 1997
<i>Streptomyces</i> varidigazus TTA	-	8.6	60	5.4-9.2	50-75	-	1.2	158.83	Bag et al. 2000
<i>Streptomyces sp. QG-11-3</i>	15-36	6.8-8.7	75	-	-	4.2-8.4	1.4-2.5	-	Strauszberger and Bodine 1992

Endomológia – Hemicellulázok



Alkalmazások

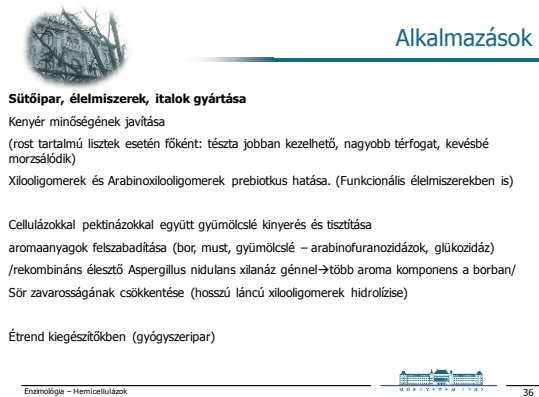
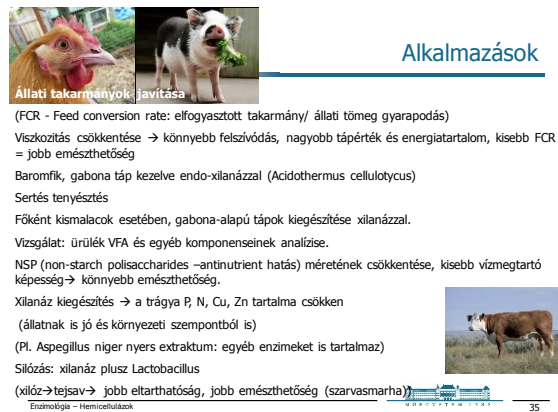
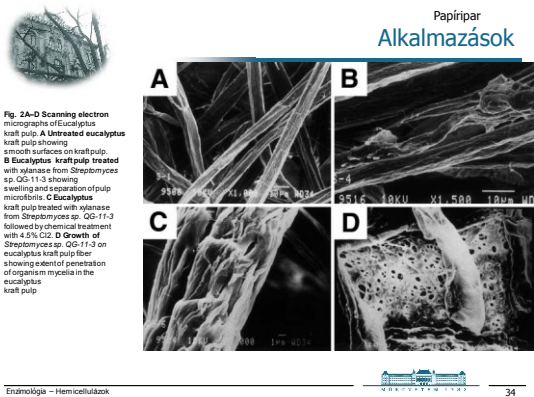
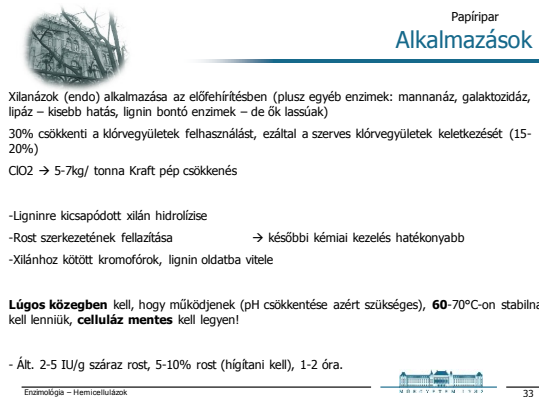
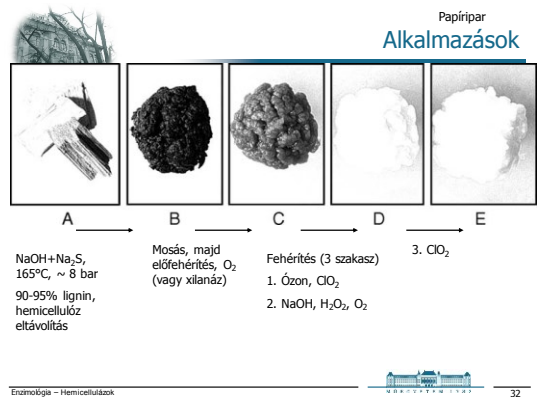
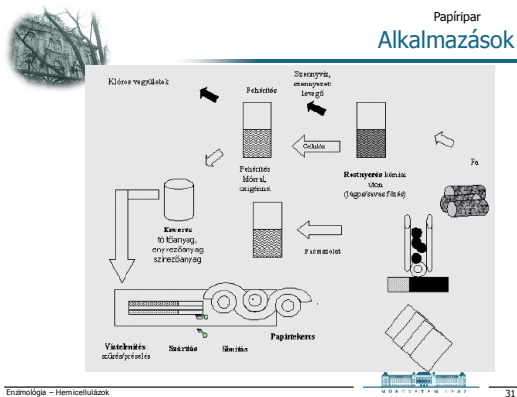
Hemicellulázok (főként xilanázok) 1980-as évek óta alkalmazzák. (Állati takarmányok előállítása, javítása, élelmiszeripar, papír és textilipar)

Ipari hemicelluláz készítmények gyártása: Japán, Németország, Finnország, Írország, Dánia, Kanada, USA.

Leggyakrabban alkalmazott mikroorganizmusok: *Aspergillus niger*, *Trichoderma (reesei) sp.*, *Humicola insolens*. (de azért Bacik is – *Bacillus subtilis*, *Streptomyces lividans*)

- Állati takarmányok
- Élelmiszeripar
- Textilipar
- Gyógyszeripar
- Papírpor
- Bioinonitálás (oldószerke, édesítők, platform-molekulák)

Endomológia – Hemicellulázok





Alkalmazások

Biofinomító technológiákban (lignocellulóz alapú) a hemicellulóz lebontásában:

Másodgenerációs bioetanol előállítás (xilooligomerek gátása a cellulózra, illetve C5 fermentáció)

Xilit, arabinóz előállítás (élelmiszer és gyógyszeripar számára)

Bioplatform vegyületek előállítása (etanol, tejsav, furfural)

Egyéb:

Mosószeres gyártása: xilanáz plusz cellulóz kötő domén

Alkil-glikozidok létrehozása (felületaktív anyagok)

speciális oligoszacharidok, mesterséges szubsztrátok szintézise (transzglykozlálás)

Növényi protoplasztok létrehozása

Olajok elválasztása (növényi rostól)



Köszönöm a figyelmet!



Arabinóz és xilit előállítás kukoricarostból

Cél: arabinóz *szelektív* hidrolízise. Ötlet: enzimés hidrolízis

Tisztított arabinofuranozidáz → aktív modell szubsztráton de nem előkezelt kukoricaroston!

Enzim komplexek: de ezek fő aktivitása xilanáz

