



(12) Patentskrift

(10) SE 537 440 C2

(21) Patentansökningsnummer:	1150989-0	(51) Int.Cl.:	
(45) Patent meddelat:	2015-04-28	C12N 9/24	(2006.01)
(41) Ansökan allmänt tillgänglig:	2011-12-21	C07K 14/39	(2006.01)
(22) Ingivningsdag:	2010-03-31	C12N 9/74	(2006.01)
(24) Löpdag:	2010-03-31	C12N 15/56	(2006.01)
(30) Prioritetsuppgifter:	2009-03-31	C12P 19/16	(2006.01)
ZA 2009/08321			
(86) Fullföljd internationell patentansökan:			
PCT/IB2010/000724	2011-10-25		
(86) Internationell ingivningsdag:	2010-03-31		

- (73) Patenthavare: STELLENBOSCH UNIVERSITY, 4th Floor, Admin B Victoria Street, 7600 STELLENBOSCH, Western Cape ZA
- (72) Uppfinnare: Willem Heber VAN ZYL, STELLENBOSCH ZA
Peter BIELY, BRATISLAVA SK
Olena RYABOVA, OKRES SENEC SK
Annie Fabian Abel CHIMPHANGO, PINELANDS ZA
Johann Ferdinand GÖRGENS, STELLENBOSCH ZA
- (74) Ombud: Noréns Patentbyrå AB, Box 10198, 100 55, STOCKHOLM SE
- (54) Benämning: Förfarande för enzymatisk hydrolys av glukuronoxylan
- (56) Anförda publikationer: JEFFRIES, T.W. ET AL.: 'Genome Sequence of the Lignocellulose-Bioconverting and Xylose-Fermenting Yeast *Pichia stipitis*', 2007, vol. 25, sida 319 - 326 NATURE BIOTECHNOLOGY, no. 3, & DATABASE DATABASE GENBANK 23 February 2007 'Pichia stipitis CBS 6054 Predicted Protein (PICST 61283) mRNA, Complete cds' Database accession no. XM_001385893 · TENKANEN, M. ET AL.: 'An α -glucuronidase of *Schizophyllum commune* Acting on Polymeric Xylan', 2000, vol. 78, sida 149 - 161 JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY
- (57) Sammandrag:

Föreliggande uppfinning avser en isolerad polypeptid med α -glukuronidasaktivitet och vilken kan degradera glukuronxylanmolekyler genom hydrolys av en glykosidlänk mellan en MeGlcA-rest (glukuronsidokedja) och en icke-terminal xylopyranosylrest. Den isolerade polypeptiden har förmågan att klyva glykosidlänkar inuti glukuronxylaner från växtbiomassa och därigenom avlägsna inre glukuronsidokedjor. Uppfinningen avser också aminosyra-sekvenser för den isolerade polypeptiden, och homologer därav, liksom även isolerade polynukleotider som har nukleinsyrasekvenser kodande polypeptiderna. Uppfinningen avser vidare förfaranden för isolering av polypeptiderna från mikrobiella odlingar, såsom den för *Pichia stipitis*, med användning av kromatografiska tekniker, och förfaranden för att bereda väsentligen berikade beredningar av polypeptiderna.

SAMMANDRAG

Föreliggande uppfinning avser en isolerad polypeptid med α -glukuronidasaktivitet och vilken kan degradera glukuronxylan-
5 molekyler genom hydrolys av en glykosidlänk mellan en MeGlcA-rest (glukuronsidokedja) och en icke-terminal xylopyranosyl-rest. Den isolerade polypeptiden har förmågan att klyva glykosidlänkar inuti glukuronxylaner från växtbiomassa och därigenom avlägsna inre glukuronsidokedjor. Uppfinningen avser
10 också aminosyrasekvenser för den isolerade polypeptiden, och homologer därav, liksom även isolerade polynukleotider som har nukleinsyrasekvenser kodande polypeptiderna. Uppfinningen avser vidare förfaranden för isolering av polypeptiderna från mikrobiella odlingar, såsom den för *Pichia stipitis*, med
15 användning av kromatografiska tekniker, och förfaranden för att bereda väsentligen berikade beredningar av polypeptiderna.

ENZYM MED α -GLUKURONIDASAKTIVITET

Uppfinningens område

Denna uppfinning avser som helhet enzymatisk degradering av
5 växtbiomassa. Mer specifikt avser uppfinningen en isolerad
polypeptid med α -glukuronidasaktivitet, ett förfarande för att
isolera polypeptiden och en väsentligen berikad beredning därav.

Uppfinningens bakgrund

10 Massa- och pappersindustrin behandlar stora kvantiteter växtbio-
massa eller trä. Denna biomassa innefattar komplexa kolhydrater,
såsom cellulosa, hemicellulosa och lignin, vilka måste vara
delvis nedbrutna och behandlade för att ge en pappersprodukt.
Trä innehåller omkring 20% hemicellulosor, av vilka xylan bildar
15 en väsentlig del i både lövträ och barrträ. Den huvudsakliga
gruppen av hemicellulosor som finns i hårt trä är glukuron-
xylaner. Dessa innefattar en β -1,4-länkad D-xylopyranos-
grundstomme med 4-O-metyl-D-glukuronsyra-substituenten länkade
 α -1,2. Dessutom kan 2,3-positionerna på xylosgrundstommen vara
20 delvis acetylerade. Glukuronxylaninnehållet i lövträ är typiskt
mellan 15 och 30 viktprocent baserat på träet.

Under massatillverkning genomgår hemicellulosor olika änd-
ringar. Hemicellulosor såsom xylan bildar inte tätt packade
25 kristallina strukturer såsom de för cellulosa, på grund av
närvaron av sidokedjor i xylanstrukturen. Detta kännetecken
hos hemicellulosor betyder att dessa polysackarider bryts ned
lättare än cellulosa. Medan några hemicellulosor och nedbrut-
na produkter av hemicellulosa löses i kokande vätskor, såsom
30 lätt alkalilösliga hemicellulosor, bryts andra ned till pro-
dukter med lägre molekyylvikt som kan bibehållas i en olöslig
form inuti fibermatrisen eller lösas i de kokande vätskorna.
Fraktionen av hemicellulosor och nedbrutna produkter av hemi-

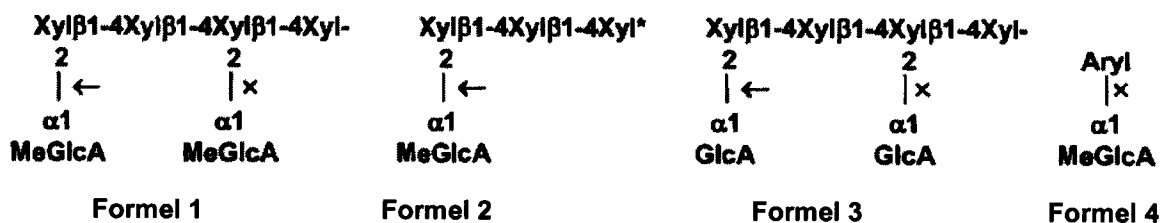
cellulosa som löses i de kokande vätskorna förloras sedan till processen, vilket resulterar i utbytesförlust av träet. Hemicellulosor tros bidra till svällningen av massan och därmed formbarheten för de våta fibrerna under arkbildning som ett resultat av deras icke-kristallina hydrofila natur. Under nedbrytningen av xylan är det därför önskvärt att minimera förlusten av hemicellulosa och nedbrutna produkter av hemicellulosa i de kokande vätskorna, och att maximera bevarandet av hemicellulosan i fibermatrisen.

10

För att framställa önskvärda nedbrutna produkter av hemicellulosa utförs selektiv nedbrytning av hemicellulosa genom användning av enzymer. Enzymatisk nedbrytning av hemicellulosaxylanet är en komplex process som kräver verkan av olika enzymer som allmänt faller inom två kategorier: i) enzymer som bryter ned polysackaridens huvudkedja, såsom endo- β -1,4-xylanas (EC 3.2.1.8) och β -xylosidas (EC 3.2.1.37); och ii) enzym som frigör sidokedjor, de huvudsakliga kedjesubstituenterna, så kallade accessoriska xylanolytiska enzym, som inkluderar α -glukuronidas (EC 3.2.1.139), α -L-arabinofuranosidas (EC 3.2.1.55), acetylxylanesteras (EC 3.1.1.72) och feruloylesteras (3.1.1.73). Medan endoxylanaset attackerar huvudkedjan av xylaner och β -xylosidas hydrolyserar xylooligosackarider till xylos, α -arabinofuranosidaset och α -glukuronidaset avlägsnar arabinoset respektive 4-O-metylglukuronsyrasubstituenterna från xylanstommen. Esteraset hydrolyserar esterlänkar mellan xylosenheter på xylanet och ättiksyra (acetylxylanesteras) eller mellan arabinossidokedjerester och fenolsyror, såsom ferulsyra (ferulsyraesteras) och p-kumarsyra (p-kumarsyraesteras).

Avlägsnandet av MeGlcA- eller GlcA-sidokedjor från xylan föreslås för att öka kvarhållandet av xylanet i fibermatri-

sen. För närvarande innehåller endast en GH-familj, GH67, exklusivt α -glukuronidaser. Aktiviteten hos dessa enzym är emellertid begränsad eftersom de frigör MeGlcA eller GlcA enbart från de fragment av glukuronxylan (alduronsyror), i vilken uronsyran är länkad till icke-reducerande terminala xylopyranosylrester. Dessa α -glukuronidaser klyver inte glykosidlänkar inuti polymera substrat, såsom inuti glukuronxylaner. Den enda α -glukuronidas som hittills beskrivits ha förmågan att frisätta MeGlcA-sidokedjor från glukuronxylan från lövträd är enzymet som finns närvarande i det cellulolytiska systemet i trärötsvampen *Schizophyllum commune*. Formel 1 till 4 visar glykosidlänkarna i fragment av glukuronxylan som attackeras ($\leftarrow$) eller inte attackeras (x) av GH67- α -glukuronidaser.



Dessa enzym hydrolyserar inte heller aryl- α -glukuronider, vilka fungerar som substrat för icke-hemicellulolytisk familj 4- α -glukuronidaser. Även om ett α -glukuronidas som hydrolyserar aryl- α -D-glukuronosider är känt i GH4, känner inte detta enzym igen glukuronxylan eller dess fragment som substrat. Typerna av glykosidlänkar som klyvs av α -glukuronidaser fram till idag är därför begränsade.

Det finns ett behov av ett förbättrat förfarande för enzymatisk hydrolysering av glukuronxylan för att öka kvarhållandet av glukuronxylan i fibermatrisen under nedbrytning av växtbiomassa, och av enzymer för användning däri.

Uppfinningens ändamål

Det är ett ändamål med denna uppfinning att tillhandahålla ett alternativt förfarande för enzymatisk hydrolys av glukuronxyylan som, åtminstone till viss utsträckning, kan mildra problemen beskrivna ovan.

5

Sammanfattning av uppfinningen

I enlighet med uppfinningen tillhandahålls en isolerad polypeptid som har α -glukuronidasaktivitet och som kan bryta ned en glukuronxyylanmolekyl genom hydrolys av en glykosidlänk mellan en MeGlcA-rest och en icke-terminal xylopyranosylrest.

Uppfinningen tillhandahåller också en isolerad polypeptid med en aminosyrasekvens vald från följande grupp:

- i. aminosyrasekvensen för SEQ ID NO:1;
- ii. en aminosyrasekvens som är åtminstone 95% homolog med SEQ ID NO:1 eller en del därav;
- iii. en aminosyrasekvens som är åtminstone 85% homolog med SEQ ID NO:1 eller en del därav;
- iv. en aminosyrasekvens som är åtminstone 75% homolog med SEQ ID NO:1 eller en del därav;
- v. en aminosyrasekvens som är åtminstone 65% homolog med SEQ ID NO:1 eller en del därav;
- vi. en aminosyrasekvens som är åtminstone 50% homolog med SEQ ID NO:1 eller en del därav;
- vii. en funktionell variant av någon av aminosyrorna listade i i-vi.

Ytterligare kännetecken för uppfinningen medför att polypeptiden har en molekylvikt av omkring 120 kDa och att polypeptiden är ett biologiskt aktivt fragment av polypeptiden.

Uppfinningen sträcker sig till en isolerad polynukleotid som kodar en polypeptid enligt uppfinningen, varvid polynukleotiden har en nukleotidsekvens vald från följande grupp:

- i. nukleotidsekvensen enligt SEQ ID NO:2;
- 5 ii. en nukleotidsekvens som är åtminstone 95% homolog med SEQ ID NO:2 eller en del därav;
- iii. en nukleotidsekvens som är åtminstone 85% homolog med SEQ ID NO:2 eller en del därav; och
- iv. en nukleotidsekvens som är åtminstone 75% homolog med SEQ
- 10 ID NO:2 eller en del därav.

Uppfinningen tillhandahåller också ett förfarande för att isolera en polypeptid enligt uppfinningen, varvid förfarandet innefattar stegen att:

- 15 i. odla en mikrob med förmågan att uttrycka polypeptiden i induktionsmedium och skapa mikrobiell biomassa;
- ii. separera den mikrobiella biomassan från induktionsmediet;
- iii. fraktionera induktionsmediet genom anjonutbyteskromatografi för att erhålla ett första elueringsmedel;
- 20 iv. fraktionera det första elueringsmedlet genom hydrofob interaktionskromatografi för att erhålla ett andra elueringsmedel;
- v. fraktionera ett andra elueringsmedel genom anjonutbyteskromatografi för att erhålla ett tredje elueringsmedel; och
- 25 vi. fraktionera det tredje elueringsmedlet genom anjonutbyteskromatografi för att erhålla en fraktion innehållande den isolerade polypeptiden.

Ytterligare kännetecken hos uppfinningen tillhandahåller

30 mikroben att väljas från gruppen inkluderande
Pichia stipitis, *Schizophyllum commune*, *Aspergillus clavatus*,
Neosartorya fischeri, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus oryzae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Bo-*

tryotinia fuckeliana, *Pyrenophora tritici-repentis*, *Neurospora crassa*, *Gibberella zeae*, *Podospora anserina*, *Coprinopsis cinerea* okayama, *Magnaporthe grisea*, *Fusarium sporotrichioides*, *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*, *Cellvibrio japonicus*, *Saccharophagus degradans*, *Opitutus terrae*, *Phaeosphaeria nodorum*, *Bacteroides ovatus* och *Streptomyces pristinaespiralis*; och för mikroben att företrädesvis vara *Pichia stipitis* CBS 6054.

- 10 Ännu fler kännetecken enligt föreliggande uppfinning visar ett förfarande för att isolera polypeptiden för att ytterligare inkludera steget att koncentrera ett eller flera av induktionsmediet; det första elueringsmedlet, det andra elueringsmedlet, det tredje elueringsmedlet och fraktionen innefattande den isolerade peptiden.

Uppfinningen tillhandahåller vidare en väsentligt berikad beredning av en polypeptid enligt uppfinningen.

- 20 Ytterligare kännetecken för uppfinningen möjliggör rening av polypeptiden från en odling av en mikrob som valts från gruppen inkluderande *Schizophyllum commune*, *Aspergillus clavatus*, *Neosartorya fischeri*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus oryzae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botryotinia fuckeliana*, *Pyrenophora tritici-repentis*, *Neurospora crassa*, *Gibberella zeae*, *Podospora anserina*, *Coprinopsis cinerea* okayama, *Magnaporthe grisea*, *Fusarium sporotrichioides*, *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*, *Cellvibrio japonicus*, *Saccharophagus degradans*, *Opitutus terrae*, *Phaeosphaeria nodorum*, *Bacteroides ovatus* och *Streptomyces pristinaespiralis*; och att mikroben företrädesvis är *Pichia stipitis* CBS 6054.

Ännu fler kännetecken för uppfinningen möjliggör för induktionsmediet att vara glukos-YNB-medium kompletterat med xylooligosackarider och metyl- β -xylopyranosid; för xylooligosackarider att vara i en koncentration av 0,5 mg/ml; för metyl- β -xylopyranosiden att vara i en koncentration av 0,33 mg/ml; för fraktioneringen av induktionsmediet genom anjonutbyteskromatografi för att erhålla ett första elueringsmedel utförs genom användning av en HiTrap-DEAE-FF-kolonn; för det första elueringsmedlet att erhållas genom tillförseln av en första elueringsbuffert till HiTrap-DEAE-FF-kolonnen, varvid den första elueringsbufferten innefattar en NaCl-gradient av 0 till 1,0 M i ungefär 50 mM natriumfosfatbuffert vid ungefär pH 7,0; för fraktionering av det första elueringsmedlet genom hydrofob interaktionskromatografi för att erhålla ett andra elueringsmedel utförs med användning av en butyl-FF-kolonn; för det andra elueringsmedlet som ska erhållas genom tillsats av en andra elueringsbuffert till butyl-FF-kolonnen, varvid den andra elueringsbufferten innefattar att minska $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -gradienten av 1,1M till 0,61M i ungefär 50 mM acetatbuffert vid ett ungefärligt pH av 4,0; för fraktioneringen av det andra elueringsmedlet genom anjon-utbyteskromatografi för att erhålla ett tredje elueringsmedel att utföras med användning av en "Tricorn MonoQ 5/50GL"-kolonn; för det tredje elueringsmedlet som ska erhållas genom tillförandet av en tredje elueringsbuffert till Tricorn MonoQ 5/50GL-kolonnen, varvid den tredje elueringsbufferten innefattar en ökande NaCl-gradient från 0 till 1,0 M i ungefär 50 mM natriumacetatbuffert vid ungefär pH 4,0; fraktionering av det tredje elueringsmedlet genom anjon-utbyteskromatografi för att erhålla en väsentligen ren enzymfraktion att utföras med användning av en Tricron MonoQ 5/50GL-kolonn; för den väsentligen rena enzymfraktionen att erhållas genom tillförseln av en fjärde elueringsbuffert till Tricron MonoQ 5/50GL-kolonnen, varvid

den fjärde bufferten innefattar en ökande NaCl-gradient från 0 till 1,0 M i ungefär 50 mM natriumfosfatbuffert vid ungefär pH 7,0.

- 5 Ytterligare kännetecken för uppfinningen gör det möjligt att erhålla polypeptiden från en odling av en mikrob vald från gruppen inkluderande *Schizophyllum commune*, *Aspergillus clavatus*, *Neosartorya fischeri*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus oryzae*, *Sclerotinia sclerotiorum*,
 10 *Botryotinia fuckeliana*, *Pyrenophora tritici-repentis*, *Neurospora crassa*, *Gibberella zeae*, *Podospora anserina*, *Coprinopsis cinerea* okayama, *Magnaporthe grisea*, *Fusarium sporotrichioides*, *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*, *Cellvibrio japonicus*, *Saccharophagus degradans*, *Opitutus terrae*, *Phaeosphaeria nodorum*, *Bacteroides ovatus* och *Streptomyces pristinaespirali*; och för mikroben att företrädesvis vara *Pichia stipitis* CBS 6054.

Kort beskrivning av ritningarna

- 20 Ytterligare egenskaper för uppfinningen kommer nu att bli uppenbara från den följande beskrivningen, som endast ska ses som exempel, med hänvisning till de medföljande ritningarna och SEQ ID NO:s.

- 25 I ritningarna:

Figur 1 är en sammanfattning av α -glukosinidasrening från induktionsmediet av *P.stipitis* CBS 6054;

- Figur 2 är en SDS-PAGE-gel av renad *P.stipitis* α -
 30 glukosinidas, rad 1 - proteinmarkörer (Fermantas #SM 0431), rad 2 - α -glukuronidas, 10 μ g protein, rad 3 - α -glukuronidas, 20 μ g; rad 4 - proteinmarkör (SERVA #39216);

Figur 3 är ett kromatogram över TLC-analysen av produkter bildade från aldopentauronsyra (Xyl-Xyl(MeGlcA)-Xyl-Xyl) (A) och glukuronxyylan (B) "under inverkan" av renad *P. stipitis* α -glukuronidas, A: prov: rad 1 och rad 8 - xylos och xylooligosackaridstandar-
 5 gosackaridstandar, 2 - aldopentauronsyra (Xyl-Xyl-(MeGlcA)-Xyl-Xyl), rad 3 - enzym blank, rad 4-7 - produkter av enzymreaktion efter 1, 10, 60 min respektive 18 h, B: prov: rad 1 och rad 5 - xylos och xylooligosackaridstandar-
 der, rad 2 - glukuronxyylan kontroll, rad 3 och rad 4 - pro-
 10 dukter av enzymreaktion efter 4 h respektive 18 h.

Figur 4 är en sammanfattning av en BLAST-sökning utförd med användning av en sekvens av *P.stipitis*. Sekvensen av mikroor-
 ganismer som används för inriktningen och konstruktionen av
 15 fylogenetiskt trä visas i fetstil;

Figur 5 är en schematisk representation av den homologa in-
 riktningen av aminosyrasekvensen enligt *P.stipitis* CBS 6054 α -glukuronidas med de nio proteinsekvenserna från *Aspergillus*
 20 *fumigatus* Af293, *Pyrenophora tritici-repentis* Pt-1C-BFP, *Neurospora crassa* OR74A, *Gibberella zeae* PH-1, *Cellvibrio japonicus* Ueda107, *Coprinopsis cinerea* okayama 7#130, *Aspergillus oryzae* RIB40, *Bacteroides ovatus* ATCC 8483, *Streptomyces Pistinaespiralis* ATCC 25486 som visade mer än 50% identi-
 25 tet;

Figur 6 visar en sammanfattning av xylanssubstrat använda för att utvärdera enzymatisk substratspecificitet och avlägs-
 ningsgrad av xylansidokedjor;

30

Figur 7 visar den experimentella uppsättningen av Box-Behnken för avlägsnande av 4-O-metyl-D-glukuronsyra från björkxyylan genom α -glu;

Figur 8 visar en centrala kompositutformningen för effekt på koncentration av xylan från havrespält och enzymdoser på arabinosavlägsnande;

5

Figur 9 visar ett stapeldiagram av innehållet (% OD-biomassa) av extraktämnen och aska av bagasse, tall (*Pinus patula*) och bambu (*Bambusidae balcooa*);

10

Figur 10 visar ett stapeldiagram av Klasonlignin (% OD-biomassa) av bagasse, tall (*Pinus patula*) och bambu (*Bambusidae balcooa*);

15

Figur 11 visar ett stapeldiagram av innehållet (%OD-biomassa) av cellulosa och pentosan av bagasse, tall (*Pinus patula*) och bambu (*Bambusidae balcooa*);

20

Figur 12 visar ett stapeldiagram av xylanutbytet (% pentosan) extraherat med användning av ultrarening och etanolutfällningsprotokoll från bagasse, tall (*Pinus patula*) och bambu (*Bambusidae balcooa*);

25

Figur 13 visar ett ^{13}C -CPMAS NMR fastfässpektrum uppvisande effekten av mild alkalixylanextraktion på integriteten av cellulosa-fibrer i (A) *Pinus patula*, (B) bagasse, (C) *Eucalyptus grandis* och (D) jätdebambu. Spektret 1, 2 och 3 anger: råmaterial, fritt extraktämnesmaterial och material efter xylanextraktion och ** betecknar toppar för kolresonanser i glukosenheter av lägre ordnad cellulosa;

30

Figur 14 visar en jämförelse av neutral sockerkomposition av lignocellulosamaterial före (EF) och efter xylanextraktion (Pxyl) för (A) *Pinus patula* (tall), (B) bagasse (bag), (C) *Eucalyptus grandis* (EU) och (D) bambu (BM).

Figur 15 visar en sammanfattning av profilen för neutrala sockerarter och uronsyra av för-extraherad xylan.

- 5 Figur 16 visar elueringsprofiler för xylan på HPAEC-PAD (Dionex) CarboPac P10-kolonn från (A) monomera sockerarter, (B) xylitol, (C) björkxylan (Roth) och (D) xylan från havrespält;

- Figur 17 visar elueringsprofilerna för xylan på HPAEC-PAD
 10 (Dionex) CarboPac-kolonn P10 från (A) milt alkaliextraherad H₂O₂-blekt bagasse (Bag B), (B) milt alkaliextraherad ultrarenad bagasse (Bag H) och (C) milt alkaliextraherad etanolutfälld bagasse (Bag L);

- 15 Figur 18 visar elueringsprofilerna för xylan på HPAEC-PAD (Dionex) CarboPac-kolonn P10 från (A) *Eucalyptus grandis* H [EU H] och (B) *Eucalyptus grandis* L [EU L] (C) bambu och (D) *Pinus patula*;

- 20 Figur 19 visar ett stapeldiagram av den olösliga fraktionen erhållen efter 72% syrahydrolys av milt alkaliextraherad xylan H₂O₂-blekt bagasse (Bag B), ultrarenad bagasse (Bag H), etanolutfälld bagasse (Bag L), bambu, ultrarenad *E. grandis* (EU H), etanolutfälld *E. grandis* (EU L) och *P. patula* (Pine)
 25 med referens till björkxylan (Roth);

- Figur 20 visar karakteriseringen av xylan genom (A) ¹H-NMR och (B) ¹³C-NMR-analys av björkxylan, (C) ¹H-NMR och (D) ¹³C-NMR-analys av H₂O₂-blekt bagasse (Bag B) och (E) ¹H-NMR och
 30 (F) ¹³C-NMR-analys av xylan från havrespält, Me betecknar metylgrupp från glukuronsyra och Ac = Acetylgrupp, Ar = arabinosgrupp;

Figur 21 visar karakteriseringen av xylan genom (A) ^1H -NMR och (B) ^{13}C -NMR-analys av bagasse, (C) ^1H -NMR och (D) ^{13}C -NMR-analys av *E.grandis*-xylan: I spektra (1) = Lopez-extraherad xylan (Bag L eller EU L), och (2) Hoije ultrarenad xylan (Bag H eller Eu H);

Figur 22 visar karakteriseringen av xylan genom (A) ^1H -NMR och (B) ^{13}C -NMR-analyser av bambu, (C) ^1H -NMR och (D) ^{13}C -NMR-analyser av *P.patula*-xylan;

Figur 23 visar FTIR-spektrum av xylan extraherad från olika typer av lignocellulosamaterial från botten (iv) björk**, (F) etanolutfälld bagasse [Bag L] (2), (E) ultrarenad bagasse [Bag H] (1), (D) xylan från havrespält *, (C) bambu, (B) etanolutfälld *E.grandis* [EU L] (2), (B) ultrarenad *E. grandis* [EU H] (1) och (A) *P.patula*;

Figur 24 visar avlägsnandet av 4-O-MeGlcA genom AbfB och α -glu från havrespält/björk, milt alkali för-extraherad bagasse Hoije (BH), H_2O_2 -blekt bagasse (BB), bambu (BM) och *Pinus patula* (PP) xylan och genom α -glu från milt alkal-för-extraherad *Eucalyptus grandis* (EH), *Eucalyptus grandis*-gel (ES) extraherad från massa;

Figur 25 visar responsyttdiagram för avlägsning av glukuronsyra som en funktion av (A) tid (h) och temperatur ($^{\circ}\text{C}$) vid 16500 nKat g^{-1} substrat, (B) temperatur ($^{\circ}\text{C}$) och enzymdos (nKat g^{-1} substrat) vid 9 h och (C) tid (h) och enzymdos (nKat g^{-1} substrat) vid 33,5 $^{\circ}\text{C}$;

Figur 26 visar interaktionseffekter mellan tid, temperatur och enzymdos på avlägsnande av glukuronsyra. De första kolonnerna uppfifrån visar interaktionen mellan temperatur (Temp) och tid, enzymdos (ABfB/ α -glu) och tid, och enzymdos (α -glu)

och temperatur. I den andra kolonnens högra del visar cellen storleken och signifikansen av behandlingen och interaktions-effekter uppmätt genom storleken på stapeldiagrammet. $t_{(1,14)}$ -värdena visas i slutet av varje stapeldiagram i respektive
 5 Pareto-diagram. Den vertikala prickade linjen i Pareto-diagrammet är ett mått på statistisk signifikans vid $p=0,05$;

Figur 27 visar en sammanfattning av regressionskoefficienter för glukuronsyrafrisläppning som en funktion av hydrolysparame-
 10 trarna (kodad variabel);

SEQ ID NO 1 är den härledda aminosyrasekvensen av α -glukuronidasgenen av *P.stipitis*, tillgänglig i Genbank som accessionsnummer XP 001385893; och

15 SEQ ID NO 2 är DNA-sekvensen av α -glukuronidasgenen av *P.stipitis*, såsom den är tillgänglig i Genbank som accessionsnummer XM 001385893 och publicerad *P.stipitis*-genomsekvensen (Vršanska et al 2007).

20 **Detaljerad beskrivning med hänvisning till ritningarna**

Uppfinningen avser en isolerad polypeptid som har α -glukuronidasaktivitet och har förmågan att degradera glukuronxylanmolekyler som återfinns i växtbiomassa. Öväntat upp-
 25 visar denna polypeptid fördelar för enzymatisk aktivitet i degradering av glukuronxylanmolekyler som inte kan ses i andra enzym som tidigare rapporterats uppvisa α -glukuronidasaktivitet. Sådana andra α -glukuronidaser är begränsade i sin hydrolys av glykosidlänkar av glukuronxylanmolekyler eftersom
 30 de endast har förmågan att hydrolysera en glykosidlänkning mellan en MeGlcA-rest och en terminal xylopyranosylrest. Däremot har den isolerade polypeptiden enligt uppfinningen befunnits vara öväntat kapabel att hydrolysera en glykosid-

länkning mellan en MeGlcA-rest och en icke-terminal xylopyranosylrest. Dessutom är α -glukuronidasaktiviteten för den isolerade polypeptiden enligt uppfinningen brett applicerbar till ett antal glukuronxylanmolekyler som erhållits från
 5 olika växtbiomassakällor.

Föreliggande uppfinning ger en isolerad polypeptid som har en aminosyrasekvens som är aminosyrasekvensen enligt SEQ ID NO 1; eller en som är väsentligen lik den, så att en sekvens som
 10 är åtminstone 95% homolog med SEQ ID NO 1 eller del därav, åtminstone 85% homolog med SEQ ID NO 1 eller del därav; åtminstone 75% homolog med SEQ ID NO 1 eller del därav; åtminstone 65% homolog med SEQ ID NO 1 eller del därav; åtminstone 50% homolog med SEQ ID NO 1 eller del därav; en funktionell
 15 variant av någon av dessa aminosyrasekvenser. Identiteten för den isolerade polypeptiden av fullängd kan bekräftas med referens till dess molekyylvikt av omkring 120 kDa, med användning av tekniker såsom SDS-PAGE eller α -glukuronidasaktivitetsanalys för identifieringen av biologiskt aktiva fragment av polypeptiden.
 20

Polypeptiden är typiskt isolerad från induktionsmediet av en odling av *Pichia stipitis* CBS 6054, även om det kommer att inses att andra mikrober uttryckande väsentligen liknande polypeptider som även kan användas. Sådana mikrober inkluderar
 25 *Schizophyllum commune*, *Aspergillus clavatus*, *Neosartorya fischeri*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus oryzae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botryotinia fuckeliana*, *Pyrenophora tritici-repentis*, *Neurospora crassa*, *Gibberella zeae*, *Podospora anserina*, *Coprinopsis cinerea okayama*, *Magnaporthe grisea*, *Fusarium sporotrichioides*, *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*, *Cellvibrio japonicus*, *Saccharophagus*

degradans, *Opitutus terrae*, *Phaeosphaeria nodorum*, *Bacteroides ovatus* och *Streptomyces pristinaespiralis*.

Eftersom polypeptiden utsöndras i induktionsmediet av den
5 mikrobiella odlingen, kan olika kromatografiska tekniker
användas för att isolera polypeptiden från induktionsmediet
såsom anjon-utbyteskromatografi, hydrofob kromatografi och
anjon-utbyteskromatografi. Polypeptiden är typiskt isolerad
från induktionsmediet genom att först separera mikrobiell
10 biomassa från induktionsmediet, fraktionera induktionsmediet
genom anjon-utbyteskromatografi för att erhålla ett första
elueringsmedel; fraktionera det första elueringsmedlet genom
hydrofob interaktionskromatografi för att erhålla ett andra
elueringsmedel; fraktionera det andra elueringsmedlet genom
15 anjon-utbyteskromatografi för att erhålla ett tredje elue-
ringsmedel; och fraktionera det tredje elueringsmedlet genom
anjon-utbyteskromatografi för att erhålla en fraktion inne-
fattande den isolerade polypeptiden. Ytterligare steg för
koncentrering av en eller flera av induktionsmediet; det
20 första elueringsmedlet; det andra elueringsmedlet; det tredje
elueringsmedlet; och fraktionen innefattande den isolerade
polypeptiden utförs också.

Den isolerade polypeptiden enligt uppfinningen kan tillhanda-
25 hållas i formen av en väsentligen berikad beredning av poly-
peptiden. En väsentligen berikad beredning som framställt
enligt uppfinningen betyder i allmänhet att de övervägande
proteinarterna eller -komponenterna enligt beredningen är
polypeptiden enligt SEQ ID NO 1, eller en väsentligen liknan-
30 de. Det kommer emellertid att inses att mer renade former av
den väsentligen berikade beredningen innefattas inom ramen
för uppfinning, såsom beredningar innefattande åtminstone 75%
av polypeptiden; beredningar innefattande åtminstone 80% av

polypeptiden; beredningar innefattande åtminstone 90% av polypeptiden. En väsentligen berikad beredning framställd enligt uppfinningen hänvisar också i allmänhet till den väsentliga frånvaron av biologiskt aktiva enzym med förmågan
 5 att hydrolysera huvudkedjan i en glukuronxylanmolekyl.

Exempel 1

Material och metoder

10

***P.stipitis*-stammar och dess kultivering**

P.stipitis CBS 6054 odlades i flaskor i medium innehållande YNB (Difco, 6,7 g/l), L-asparagin (2 g/l), KH_2PO_4 (5 g/l) och kolkälla (glukuronxylan från glukos eller björkträ, 10 g/l)
 15 vid en temperatur av 30°C och en omrörning av 180 rpm. Exponentiellt tillväxta celler skördades vid en celldensitet av 0,15-0,20 mg/ml (torr vikt).

***α*-glukuronidasubstrat och produkter**

20 Deacetylerad glukuronxylan extraherades från sågdamms [Ebring-erová et al, 1967, *Holzforschung* 21:74-77], aldotetrauronsyra $\text{Xyl}(\text{MeGlcA})\text{Xyl-Xyl}$, den kortaste syraprodukten av glukuronxylanhydrolys genom familj 10-endoxylanaser, och aldopentauronsyra $\text{Xyl-Xyl}(\text{MeGlcA})\text{Xyl-Xyl}$, den kortaste pro-
 25 dukten av glukuronxylanhydrolys genom familj 11-endoxylanaser framställdes såsom beskrivits tidigare [Biely et al., 1997, *J. Biotechnol.* 57:151-166]. 4-O-metyl-F-glukuronsyra (MeGlcA) framställdes genom omestring av dess metylester genom *S.commune* glukuronoylesteraser [Špáníková och Biely, 2006,
 30 FEBS Lett. 580:4597-4601].

***P.stipitis α*-glukuronidasframställning i frånvaron av xylan**

Enzymet, vilket blev ett föremål för rening, framställdes i induktionsexperiment vilka utfördes enligt följande: celler från exponentiell fas odlade i ett YNB-medium med 1% glukos samlades in genom centrifugering, tvättades två gånger med
 5 basalt YNB-medium (utan kolkälla) och suspenderades i samma medium försett med 0,5 mg/ml xylooligosackaridblandning (XYLO-OLIGO 70, Suntory Limited, Japan) och 0,33 mg/ml av metyl- β -xylopyranosid. Cellkoncentrationen var 0,6-0,8 mg/ml torr vikt (105°C). Efter 24 h inkubation på en skakmaskin
 10 (180 rpm) vid 30°C under 24 h centrifugerades blandningen och den klara supernatanten använd för rening av extracellulär α -glukuronidas vilken saminducerades med endo- β -1,4-xylanas.

Rening av *P.stipitis*- α -glukuronidas

15 Det klara induktionsmediet (600 ml) koncentrerades 300-faldigt på Amicon 10 kDa gränsmembran. De utsöndrade protei-
 nerna fraktionerades först genom anjon-utbyteskromatografi på en HiTrap DEAE-FF-kolonn (GE Healthcare, Sverige) med använd-
 ning av eluering med NaCl-gradient (0-1,0 M) i 50 mM natrium-
 20 fosfatbuffert (pH 7,0). Fraktioner innehållande α -
 glukuronidas, eluerade som en topp mellan 0,2-0,26 M NaCl, förenades, koncentrerades och avsaltades, ekvilibrerades sedan i 50 mM acetatbuffert (pH 4,0) innehållande 2M
 (NH₄)₂SO₄. Det erhållna elueringsmedlet återupplöstes genom
 25 hydrofob interaktionskromatografi på en butyl-FF-kolonn (5 ml) (GE Healthcare) eluerad med en minskande gradient av
 (NH₄)₂SO₄ i samma buffert. α -glukuronidas eluerades vid en koncentration av mellan 1,1 och 0,61 M (NH₄)₂SO₄. Fraktionerna
 som har α -glukuronidasaktivitet förenades, avsaltades, kon-
 30 centrerades och återupplöstes genom två ytterligare jonutby-
 teskromatografisteg med användning av en Tricorn MonoQ 5/50GL kolonn (Amersham, UK) (polystyren/divinylbensen). I det för-
 sta steget ekvilibrerades kolonnen med 50 mM natriumacetat-

buffert (pH 4,0) och eluerades med en ökande gradient av NaCl (0-1,0 M). I det andra elueringssteget ersattes acetatbufferten med 50 mM natriumfosfatbuffert (pH 7,0). Fraktioner som har α -glukuronidasaktivitet avsaltades och koncentrerades genom membranfiltrering på Microcon (10 kDa gräns, Millipore Co., USA).

Sekvensanalys av renat protein

Renad α -glukuronidas återupplöstes genom SDS PAGE på 10% akrylamidgeler och elektro-blottades på ett polyvinylidendifluoridmembran (Millipore Corp., USA). Sekvensen för de 15 N-terminala aminosyrorna bestämdes med användning av en HP G105A-proteinsekvenserare (Hewlett Packard, Palo Alto, Ca, USA).

α -glukuronidasanalys

Reningsfraktioner som har α -glukuronidasaktivitet identifierades kvalitativt genom TLC-analys med användning av en kiselgel (Merck kiselgel 60 på aluminiumplattor) i etylacetat:ättiksyra:1-propanol:myrsyra:vatten (26:10:5:1:15, baserat på volym). Närvaron av fri MeGlcA härledd från alduronsyra (10 mg/ml) eller glukuronxylan (2%) upplöst i 0,05 M natriumacetatbuffert (pH 4,4) indikerade α -glukuronidasaktivitet. Enzymet användes vanligtvis vid koncentration 50 μ g protein/ml.

En kvantitativ analys baserad på bestämning av fri MeGlcA frigjord från aldopentauronsyra (Xyl-Xyl(MeGlcA)-Xyl-Xyl, 10 mg/ml) eller glukuronxylan från björkträ (2%) enligt förfarandet beskrivet av Milner och Avigad [Milner och Avigad, 1967, Carbohyd. Res. 4:359-361] användes för att detektera substrat och produkter med α -glukuronidasaktivitet. Substratet och produkterna detekterades med användning av N-(naftyletylendiamin)dihydrokloridreagens [Buonias, 1980,

Anal. Biochem. 106:291-295]. Reagenset är brunt till färgen i närvaron av MeGlcA och lila till färgen i närvaron av xylo-sinnehållande föreningar. Proteinprov (1-10 µg, beroende på renhet) inkuberades under 10-60 min i 0,1 ml reaktionsblandning innehållande substratet i 50 mM acetatbuffert (pH 4,4). Reaktionen stoppades genom tillsats av 0,3 ml kopparreagens och kokning under 10 min vid 100°C, följt av tillsats av 0,2 ml Nelsonreagens och 0,4 ml vatten. Absorbansen mättes vid 600 nm med användning av kalibrering med GlcA. En enhet α-glukuronidas definierades som mängden enzym producerande 1 µmol uronsyra på 1 min från aldopentauronsyra (Xyl-Xyl(MeGlcA)-Xyl-Xyl).

Proteinbestämning

Proteinkoncentration bestämdes enligt förfarandet från Bradford [Bradford, 1976, Anal. Biochem. 72, 248-254] med användning av bovint serumalbumin som standard. Proteinmolekylvikt uppskattades med användning av SDS-PAGE (Laemmli, 1970, Nature 227:680-685] och jämförelse med liknande återupplösta ofläckade proteinmolekylviktsmarkörer (FERMENTAS, Kanada) och färgade proteinmarkörer (SERVA, GmnH). IEF utfördes på Multiphor-II-system (GE Healthcare, Sverige) med användning av SERVALYT PRECOTES 3-6 förgjuten gel och IEF-markörer 3-10 (SERVA, GmbH).

Resultat

Isolering av α-glukuronidas

En ny α-glukuronidas observerades under tillväxt av flera *P.stipitis*-stammar på olika typer av xylan. Den högsta tillväxten av jästen observerades på glukuronxylan. Även om glukuronxylan utnyttjades som den huvudsakliga kolkällan till begränsad grad då den jämförs med utnyttjandet av D-xylos, D-glukos eller

β -1,4-xylooligosackarider, fanns det inte någon ackumulering av sura oligosackarider i mediet. Alla fragment som släppts fria från glukuronxylan var helt utnyttjade, vilket antydde att jästen utsöndrade en α -glukuronidas till mediet. Analys av tillväxtmediet av jästen efter tillväxt på glukuronxylan avslöjade stark α -glukuronidasaktivitet. Det delvis renade enzymet befanns ha förmågan att ta bort förgreningar på glukuronxylan och frisätta MeGlcA från alduronsyra i vilka MeGlcA var länkad till interna xylopyranosylrester. Enzymet kunde inte renas från ett delvis använt glukuronxylanmedium, eftersom närvaron av xylanrester ökade viskositeten hos det koncentrerade mediet och störde enzymreningen.

Den extracellulära α -glukuronidasen var emellertid framgångsrikt renad från mediet då den tvättades, glukostillväxta celler från exponentiell fas inkuberades i ett syntetiskt medium försett med en blandning av xylobios, xylotrios och metyl- β -D-xylopyranosid, vilka är inducerare av xylanolytiska enzym i *P.stipitis*. Nivån av extracellulär α -glukuronidas inducerad under dessa betingelser var 0,015 U/ml, vilket representerade ungefär 20% av aktiviteten som observerades under inkubering av celler med 1% glukuronxylan. Denna nivå av α -glukuronidas var tillräcklig för dess rening från induktionsmediumet innehållande enbart dialyserbara näringskomponenter. Enzymet renades framgångsrikt från ett koncentrerat induktionsmedium med användning av en kombination av jonutbyte och hydrofob interaktionskromatografi (figur 1). Enzymet sönderdelades till ett enda band genom analys med SDS PAGE, motsvarande ett protein med ungefär 120 kDa (figur 2) och en tillräcklig renhet för att användas för N-terminal aminosyra-sekvensanalys.

Katalytiska egenskaper hos *P.stipitis*- α -glukuronidas

Det renade α -glukuronidaset befanns vara väsentligen fritt från endoxylaner eller β -xylosidasaktivitet. Den enda reaktion som uppvisades genom enzymet med aldopentauronsyra med strukturen Xyl-Xyl(MeGlcA)-Xyl-Xyl* eller med björk-glukuronxylan var frigörandet av MeGlcA-rester (figur 3).

Enzymet frisatte också MeGlcA från aldotetrauronsyra Xyl(MeGlcA)-Xyl-Xyl* (inte visad) vilken på liknande sätt fungerar som ett substrat för familj 67 av α -glukuronidaser (Biely, 2003, Xylanolytic enzymes, In:Handbook of Food Enzymology, sid. 879-916, Marcel Dekker, Inc. NY). Den initialt klara glukuronxylanlösningen uppvisade ökad opalescens och ökad viskositet beroende på tillräckligt avlägsnande av förgreningar. Mängden uronsyra som frisläppts från björkved-glukuronxylan genom enzymet efter en långtidsbehandling var 0,35 μ mol per 1 mg glukuronxylan, vilket representerar 75% av det totala MeGlcA-innehållet i polysackariden.

Optimala betingelser för enzymaktivitet

Det optimala pH-värdet för enzymaktivitet befanns vara 4,4. Vid pH 4,0 och pH 5,5 representerade aktiviteten 26,5% respektive 51,6% av aktiviteten vid det optimala pH-värdet. Den optimala temperaturen för enzymaktiviteten var 60°C (18,43 U/mg vid polymerformig glukuronxylan), men proteinet befanns vara ostabilt vid denna temperatur, med 50% aktivitetsförlust i 30 min. Proteinets befanns vara stabilt under åtminstone 3h vid 40°C, med specifik aktivitet på glukuronxylan 3,01 U/mg. pI-värdet för α -glukuronidas beräknat från sekvens (ExPASy online ProtParam-verktyg) var 4,64, men isoelektrisk fokuseringsdata indikerade att proteinets pI-värde var närmare 4,0.

N-terminal aminosyrasekvens och homologianalys

Edman-analys av renad α -glukuronidas avslöjade en aminosyrasekvens inkluderande den N-terminala LGGLQNIVFKNSKDD-

sekvensen vilken exakt motsvarade *P.stipitis*-genen XP 0013855930 som härletts från den tillgängliga genomsekvensen för *P.stipitis*, med början vid aminosyra nummer 19, kodande ett protein med okänd funktion men som har liknande molekyl-

5 massa som den isolerade α -glukuronidasen (SEQ ID NO 1). Den del av genen som kodar de första 19 aminosyrorna motsvarar uppenbart enzymets utsöndrade signalsekvens, vilken inte är skyddad i det fullt utvecklade extracellulära proteinet innefattande 957 aminosyror.

10

En BLAST-sökning genomfördes med användning av sekvensen för *P.stipitis* α -glukuronidas vilken avslöjade liknande gener i genomen för många andra mikroorganismer, mestadels svampar. Listan på mikroorganismer med ortologer av *P.stipitis* α -

15 glukuronidas-genen som har identitet som är högre än 34% och likhet som är högre än 51% visas i figur 4. Alla ortologer motsvarar proteiner med omkring 1000 aminosyror, vilket motsvarar en molekylmassa av omkring 120 kDa, i alla avseenden är det proteiner med okänd funktion. Den högsta identiteten

20 (54%) och den högsta likheten (69%) uppvisades av gensekvensen för *Aspergillus clavatus*.

Inriktningen av åtta valda homologa sekvenser (visade i fetstil i figur 4) med *P-stipitis* α -glukuronidas-sekvensen visas i figur 5. Inriktningen visar 6 bevarade glutaminsyrarester

25 och 12 bevarade aspartamsyrarester, av vilka två kan vara aminosyran som är inblandad i katalys av reaktionen. Dessutom bevaras 3 tyrosiner och 6 tryptofaner. Om den aromatiska aminosyran är ytexponerad kan de spela en viktig roll i igenkännandet av xylanhuvudkedjan som en av betingelserna för

30 enzymet att verka på polymersubstratet.

P.stipitis-enzymet frisätter MeGlcA-rester som är länkade till terminal- eller inre xylopyranosylrester av glukuronxy-

lan och aldouronsyror genererade från polysackariden under inverkan av endoxylanaser. Sekvensen för *P.stipitis* CBS 6054 är fylogenetiskt avlägsnad från både GH-familj 67 och 4.

- 5 Den xylosfermenterande jästen *Pichia stipitis* är unik på det sättet att den också har en begränsad förmåga att utnyttja xylan som en kolkälla. Jästen befanns företrädesvis hydrolysera glukuronxylan från lövträ, möjligen beroende på att uppsättningen i dess xylanolytiska enzym är begränsat till
- 10 framställningen av endast tre enzymer, endo- β -1,4-xylanas, α -glukuronidas och β -xylosidas. Denna egenskap hos det xylanolytiska systemet för jäst motsvarar dess naturliga miljö, dvs den för matsmältningskanalen hos Passalide-skalbaggar som äter på biomassa från lövträd rika på acetylglukuronxylan.
- 15 Under tillväxt på denna deacetylerade glukuronxylan utsöndrades de två första enzymer genom jästen till tillväxtmediet och ingen ackumulering av sura oligosackarider (alduronsyror) kunde därför ske under tillväxt på denna kolkälla. Nivån av utsöndrat endoxylanas genom denna jäst har tidigare befunnits
- 20 vara så låg att den inte uppmuntrat vidare studier av det xylanolytiska systemet hos denna jästart. Det är därför överraskande att denna dåliga xylanas utsöndrar en ny och användbar α -glukuronidas.
- 25 Den nya beskrivna typen av α -glukuronidas har förmågan att frigöra MeGlcA-rester från polymersubstrat. Dess verkan på aldotetrauronsyra Xyl(MeGlcA)Xyl-Xyl, den kortaste syraprodukten från glukuronxylanhydrolys genom familj 10 endoxylanaser bekräftar att den nya familjen α -glukuronidase uppvisar katalytisk
- 30 aktivitet för GH67-enzym. Den N-terminala aminosyrasekvensen för α -glukuronidas av *S.commune* passade inte ihop med någon sekvens för enzymerna grupperade i den nya familjen.

Förmågan hos detta nya α -glukuronidasenzym att avgrena glukuronxylan tros inverka på de fysiokemiska egenskaperna hos polysackariden. Deacetylering av acetylglukuronxylan eller avlägsnandet av sidokedjor hos α -L-arabinofuranosyl i arabinoxylan föreslås minska lösligheten hos polysackariderna och eventuellt resultera i utfällningen av avgrenade polymerer. Behandling av växtbiomassa med användning av det nya α -glukuronidasenzymet som beskrivits häri, förelås minska förlusten av glukuronxylan i kokningen av vätskor som skapas under pappersframställning och maximera bevarandet av glukuronxylan i fibermatrisen.

Avlägsnandet av metylglukuronsyra och glukuronsyra från glukuronxylan förväntas skapa kompositioner som har användbara appliceringar i pappers- och massaindustrin och det farmaceutiska området. Ökade mängder glukuronxylan i pappersframställningen bidrar inte enbart till bevarande av växtbiomassa i papperstillverkningsprocesser, utan kan även ge unika egenskaper i pappersstyrka, pappersbeläggning och bevarande av tryckfärg. Återutfällningen av glukuroxylan kan användas i det farmaceutiska området för beläggning av mediciner för att öka deras lagringsförmåga och underlätta vid långsam frisättning av medicinska föreningar. Hydrolysen av glukuronxylan genom synergistiska aktiviteter hos α -glukuronidas tillsammans med β -xylanaser och β -xylosidaser kan frisätta fermenterbara sockerarter från glukuronxylan för ombildning till handelsvaror, såsom etanol, laktat och andra finkemikalier.

EXEMPEL 2

30

Material och metoder

Statistisk analys

Om inte annat anges utfördes prov trefaldigt. Analys av varians (ANOVA) inkluderande provmedel och standardavvikelser utfördes med användning av Microsoft Excel och Statistica 2007.

5

Optimering av xylanextraktion för analys av α -glukuronidasaktivitet

Selektiviteten och effektiviteten hos de två milda alkalixylanextraktionsmetoderna som lånades från Höije et al. [2005, Carbohydr. Polym. 61:266-275] och De Lopez et al. [1996, Biomass and Bioenergy, 10:(4):201-211] utvärderades för potentiell användning i integrerad produktion av väsentligen rena xylanbiopolymerer och massaframställning från råvaran som i allmänhet finns i Sydafrika. Utvärderingen baserades på fem faktorer enligt följande: (1) xylanextraktionseffektivitet, (2) polymerisationsgrad och substituering, (3) kemisk komposition för det extraherade xylanet, (4) renhet för det extraherade xylanet, och (5) den strukturella integriteten och kemiska kompositionen för råmaterialet efter xylanextraktion. En sammanfattning av xylansubstraten som används för utvärdering av enzymatisk substratspecificitet och grad av avlägsnande av xylansidokedjor visas i figur 6.

Råmaterialbestämning

Råvaran som användes inkluderar Eucalyptus (*Eucalyptus grandis*), tall (*Pinus patula*), jättebambo (*Bambusa balcooa*) och sockerrör (*Saccharum officinarum* L) bagasse. Flis av *E. grandis* tillhandahölls av "The Transvaal Wattle Cooperatives" från Piet Retif, Mpumalangaprovinsen, medan *P. patula*-träden skördades från Stellenbosch universitets skogsodlingar i Western Cape-provinsen i Sydafrika. Jättebambastammar (plantor som var 1,5 år) tillhandahölls från färdigvuxna odlingar placerade i Paarl i Western Cape-provinsen i Sydaf-

rika. Bagasse var en biprodukt från sockertillverkningsindustrin som donerades av TBS Company placerat i Nkomaziregionen i sydöstra Lewveld i Mpumalangaprovinsen i Sydafrika. Xylan från havrespält (Sigma), björkxylan (Roth) och mild alkaliextraherad H₂O₂-blekt bagassexylan (donerat av Prof. A.M.F. Milagres, University of São Paulo, Brasilien) användes som referensxylaner.

Material från råvaran bereddes för analys enligt TAPPI-testmetoderna (TAPPI, T264 cm-97 (2002-2003)) och NREL Laboratory Analytical Procedures (NREL LAP) [Hammes et al., 2005, Laboratory Analytical Procedure (LAP), version 2005, NREL Biomass Program, National Bioenergy Center]. Flis härledda från de olika råvarorna torkades till ett fuktinnehåll (mc) av $\approx 10\%$ och konditionerades därefter till en relativ fuktighet av 55% vid 20°C under minst 24 h innan ytterligare storleksreducering. Flisen storleksreducerades successivt genom Condux hammarkvarn, en Retch och en Wiley laboratoriekvarn och fraktionerades genom siktningsmed användning av staplingsbara siktar (ASTM) av 850 μm /20 maskstorlek, 425 μm /40 maskstorlek och 250 μm /60 maskstorlek med lock och vågskål. Partiklarna som passerade genom 425 μm /40 maskstorlek men som kvarhölls på en 250 μm /60 maskstorlek samlades in för kemisk kompositionsanalys och de som kvarhölls på 425 μm /40 maskstorlek användes för xylanextraktion. Fuktinnehållet i råvaran bestämdes med användning av National Renewable energy Laboratory Analytical Procedure (NREL LAP) för bestämning av totalt mängd fast massa i biomassan [Hammes et al., 2005, Laboratory Analytical Procedure (LAP), NREL Biomass Program, National Bioenergy Center]. Det procentuella fuktinnehållet beräknades som en procentandel av ugnstorr (o.d.) vikt för biomassa.

Extraktämnen bestämdes i två sekventiella steg, startande med cyklohexan/etanol (2:1) följt av varmvattenextraktion, med användning av soxhlet-anordning. Båda extraktionerna utfördes enligt TAPPI testmetod T264 om-88 och NREL LAP-metoder [Suiter et al., 2005, Analytical Procedure (LAP), version 2006, National Biomass Program, National Bioenergy Center]. Extraktämnena kvantifierades på en fuktfri bas.

Innehåll av Klasonlignin (syraolöslig) i råvaran bestämdes följande en NREL LAP-metod för bestämning av strukturella kolhydrater och lignin i biomassa [Suiter et al., 2005, Analytical Procedure (LAP), version 2006, National Biomass Program, National Bioenergy Center] och TAPPI testprocedurer (T249 cm-85). Klasonligninet beräknades på ugnstorr massa.

15

Innehållet av Seifertcellulosa bestämdes enligt de analytiska metoder som sammanfattats av Browning [1967, Methods of wood chemistry, Vol. II Interscience publishers] och Fengel och Wegner [1989, Wood Chemistry, Ultrastructure, Reactions, Walter de Gruyter, Berlin, Tyskland]. Material fritt från extraktämnen med en vikt av 1,1 g ugnstorr behandlades med en blandning av acetylacetone (6 ml), dioxin (2 ml) och 32% HCl (2 ml) i en rundkolv följt av inkubation i ett kokande vattenbad under 30 min. Behandlade prov överfördes kvantitativt till förvägda sinterglasdeglar för vakuumfiltrering och tvättning. Återstoden tvättades succesivt med 100 ml vardera av metanol cyklodioxan, varmvatten (80°C), metanol och di-etyleter och torkades därefter vid 105°C under 2h. Innehållet av Seifertcellulosa definierades som den torra vikten av den torkade återstoden presenterad som procentandel av material fritt från extraktämnen.

30

Monomer sockerkomposition av syrahydrolysatet analyserades efter lagring vid -20°C under minst 24 h. Analysen utfördes i anjonutbyteskromatografi med hög prestanda kopplat till pulserande amperometrisk detektering (HPAEC-PAD, Dionex) utrustad med en gradientpump GP50, en Carbopac PA 10-kolonn (4 mm x 250 mm) och elektrokemisk detektor (ED40). Datauppföljning och analys utfördes med användning av PEAKNET mjukvarupaket. Elueringsmedlen var 250 mM NaOH och Milli-Q-vatten i förhållandet 1,5:98,5 vid en flödeshastighet av 1 ml min⁻¹. Natriumacetat (1M NaOAc) elueringsmedel användes då sura sockerarter (glukuron/metylglukuronsyra) analyserades. Proven filtrerades på filter med 0,22 µm porstorlek innan analys på HPAEC-PAD. Kvantiteten av sockerarterna bestämdes från standardkurva av respektive analytisk grad av socker (arabinos, rhaminos, galaktos, glukos, mannos, xylos och glukuronsyra). Mängden socker presenterades som en procentandel relativt den ugnstorra (o.d.) vikten för substratet. Pentosaninnehållet i råvaran bestämdes enligt TAPPI standardmetoder för mätning av pentosan i trä och massa (T223 cm-84). Xylaninnehållet beräknades från en standardkurva av ugnstorr biomassa [$Xyl = xyl \times cf$, där: Xyl = xylaninnehåll (mg), xyl = xylosinnehåll (mg), cf = korrigeringsfaktor (0,88)].

Askinnehållet bestämdes genom en termogravimetrisk metod. Lignocellulosaproov (0,5 g) förbrändes till aska i en Muffleugn vid 575 ± 25°C under 4 h eller till dess att en konstant vikt erhöles. Askinnehåll beräknades som en procentandel av initial ugnstorr biomassa.

30 ***Xylanextraktion och karakterisering***

Extraktion av xylan från råvaran utfördes med användning av två milda alkaliextraktionsmetoder beskrivna i sektion 2.9 ovan. Hoije-metoden involverade xylanextraktion efter ultra-

rening med användning av membrandialys (MWCO 12-14 kDa) medan Lopezmetoden involverade fraktionering av hydrolysaten genom etanolutfällning. I båda metoderna utfördes xylanextraktion utan tidigare avlägsnande av lösningsmedel och varmvattenextraktämnen. Extrakt koncentrerades innan ultrafiltrering eller fraktionering till en tredjedel av den initiala volymen med användning av en roterande förångare (Rotavapor Büchi R-124, Schweiz) under vakuum vid 40°C. Extraktionseffektiviteten definierades som utbytet av xylan per teoretiskt innehåll av pentosaner i materialet. Lopezmetoden begränsades till extraktion av xylan endast från *E.grandis* och bagasse.

Strukturen och den kemiska sammansättningen av råvaran före xylanextraktion analyserades för och efter xylanextraktion genom fasttillstånd ^{13}C -kärnmagnetisk resonans tvärpolarisering/MaGlcAl vinkelrotation (^{13}C -NMR CP/MAS) på en Varian VNMRs 500 vid diameter fastfast-NMR-spektrometer med en driftfrekvens av 125 MHz för ^{13}C , med användning av en 6 mm T3-sondtemperatur av 25°C. Torra prov laddades i 6 mm zirkoniumoxidrotorer för analys. Spektrum samlades in med användning av tvärpolarisering och rotation i magisk vinkel (magic angle spinning) (CP/MAS). Rotationshastigheten var 5 kHz, proton 90°-pulsen var 5 μs , kontaktpulsen 1500 μs och fördröjningen mellan repetitioner 5 s. Kemiska skift bestämdes relativt TMS genom att sätta nedströmstoppen för en extern diamantreferens till 38,3 ppm. Kolresonanserna i fastfas-NMR-spektrum tilldelades enligt Larsson et al. [1999, Solid State Nuclear Magnetic Resonance 15:31-40], Renard och Jarvis [1999, Plant Physiology 119:1315-1322], Lahaye et al. [2003, Carbohydrate Research 338:1559-1569]; Atalla och Isogai [2005, Recent developments in spectroscopic and chemical characterisation of cellulose, In Dumitriu, S (red) Marcel Dekker, New York, sid. 123-157], Virkki et al [2005, Carbohydrate Polymers

59:357-366], Geng et al. [2006, *International Journal of Polymer Characterization* 11: 209-226] och Oliviera et al. [2008, Chemical composition and lignin structural features of banana plant leaf sheath and rachis, In Hu, T.QQ. (red) kapitel 10:171-188].

De extraherade xylanproven analyserades med fastfas ^{13}C -kärnmagnetisk resonans tvärpolarisering/MaGlcAl vinkelrotation (^{13}C -NMR CP/MAS) och vätske- ^{13}C och ^1H -NMR och Fourier Transform Infrared (FTIR) spektroskopi. Xylanproven utsattes för en ^{13}C - och en ^1H -NMR-körning antingen på en Varian Inova 400 eller 600 NMR-spektrometer. ^{13}C -NMR-spektrum samlades in med användning av en 1,3s följningstid och 1s pulsfördröjning vid 25°C. ^{13}C -spektrat samlades in över natt (minimum 19000
15 scannningar). ^1H -NMR-spektra samlades in efter filtrering av provet med en 4,8 s följningstid vid 50°C. ^1H -spektrum samlades in med 64 scannningar och för-mättnad av HDO-toppar. ^{13}C - och ^1H -NMR-spektrum tolkades enligt inriktning av karakteristiska signaler för relaterad råvara presenterat av Ebringerová et al. [1988, *Carbohydrate Polymers* 37:231-230], Vignon och Gey [1998, *Carbohydrate Research* 307: 107-111], Renard och Jarvis [1999, *Plant Physiology* 119: 1315-1322], Teleman et al. [2002, *Carbohydrate Research* 337: 373-377], Gröndahl et al. [2003, *Carbohydr. Polym.* 53: 359-366], Lahaye et al.
25 [2003, *Carbohydrate Research* 338: 1559-1569], Sun et al. [2004, *Carbohydrate Research* 339: 291-300; *Polym. Degrad. and Stability* 84: 331-337; *Carbohydrate Polymers* 56: 195-204], Sims och Newman [2006, *Carbohydrate Polymers* 63: 379-384]; Habibi och Vignon [2005, *Carbohydrate Research* 340: 1431-
30 1436], Pinto et al. [2005, *Carbohydrate Polymers* 60: 489-497], Geng et al. [2006, *International Journal of Polymer Characterization* 11: 209-226], Maunu [2008. ^{13}C CPMAS NMR Studies of wood, cellulose fibers, and derivatives. In Hu,

T.O. (red)], Shao et al. [2008, Wood Science Technology 42: 439-451].

FTIR-spektroskopi, torra fasta prov av xylanet registrerades
 5 på en Nexus 670-spektrometer från Thermo Nicolet med Smart
 Golden Gate ATR mättillbehör installerat. Detta enkelreflek-
 terande mättillbehör uppvisar en diamant-ATR-kristall bunden
 till en volframkarbidsupport utrustad med ZnSe-
 fokuseringslinser. Spektret samlades in över spektralområdet
 10 4000 till 650 cm^{-1} med användning av 16 scanningar vid 6 cm^{-1}
 upplösning och kalibrerades mot en tidigare registrerad bak-
 grund. Thermo Nicolets OMNIC® mjukvara användes för att samla
 in och bearbeta det infraröda spektret. Spektrumsignaler för
 FTIR tolkades enligt kännetecknande band presenterade i Feng-
 15 el och Wegener (1989); Sun et al (2004); Xu et al (2000),
 Sims och Newman (2006).

Polymerisationsgraden för de extraherade xylanfraktionerna
 utvärderades på HPAEC (Dionex) med användning även CarboPac™
 20 PA100 kolonn (4 x 25 mm) och en vaktkolonn, och elektrokemisk
 detektor (ED40) för pulserad amfoterisk detektering (PAD). PA
 100-kolonnen separerar monomerer och oligomerer upp till en
 polymerisationsgrad (DP) 10 vilket vanligtvis elueras inom en
 retentionstid av 25 min. HPAEC PA100-kolonner baserar sin
 25 separation på substitueringsgraden, d.v.s. ju längre reten-
 tionstid desto högre DP eller substitueringsgrad (Combined
 CarboPac manual, sid 52-56). Prov (10 μl) injicerades till
 kolonnen och eluerades med heliumavgasad 0,25M NaOH, Milli-Q
 H₂O och 1M NaOAc vid en flödes hastighet av 1 mlmin^{-1} . Elue-
 30 ringsprofiler för proven refererade till elueringsprofiler
 för monomera sockerarter (arabinos, raminos, galaktos, glu-
 kos, xylos och mannos) och polymert xylan (xylan från björk
 och havrespält) och H₂O₂-blekt bagasse. Prov med lägre toppin-

tesitet < 20 nC eller inga toppar eluerade inom retentionstiden om 25 min ansågs polymera med DP>10 sockerenheter.

Kompositionen av neutrala sockerarter i extraherade xylanprov
 5 bestämdes på HPAEC-PAD (Dionex) på Carbopac PA 10-kolonn
 efter mild syrahydrolyys beskriven av Yang et al. [2005, LWT
 38:677-682]. Prov (0,1 g) placerades i Schott-flaskor (50 ml)
 till vilka 1 ml 72% H₂O₂ tillsattes. Blandningen inkuberades
 vid 30°C i ett vattenbad under 1 h. Avjoniserat vatten (30
 10 ml) tillsattes efter autoklivering vid 121°C under 1 h. Pro-
 ven kylades till rumstemperatur innan filtrering. Filterkakan
 torkades vid 105°C för bestämning av återstående Klasonlig-
 nin. Den vätskeformiga fraktionen filtrerades genom ett fil-
 ter med porstorleken 0,22 µm innan den utsattes för HPAEC-PAD
 15 (Dionex) på Carbopac PA 10-kolonn. Monomera sockerarter kvan-
 tifierades från standardgrafer av analytisk grad (arabinos,
 raminos, galaktos, glukos, xylos och mannos). Det totala
 innehållet av neutrala sockerarter i proven presenterades
 jämfört med den initiala ugnstorra xylanmassan.

20

Bestämning av uronsyrakomposition

Innehåll av uronsyrakomposition i xylanproven och råvaran
 kvantifierades med användning av kromatografiska och kolori-
 metrisk metod. I den kromatografiska metoden användes en
 25 tvåstegs syrahydrolyysmetod från Prof. A.M.F. Milagres vid
 University of São Paulo i Brasilien. Xylanprov (150 mg ugnst-
 torr mass) hydrolyserades i 0,75 ml av 72% (vikt/vikt) H₂SO₄ i
 McCartney-flaskor. Blandningen inkuberades vid 45°C under 7
 min i ett vattenbad efter vilket 22,5 ml destillerat vatten
 30 tillsattes. Flaskorna täcktes löst och autoklaverades vid
 121°C under 30 min. Efter kylning till rumstemperatur separe-
 rades den vätskeformiga fraktionen genom vakuumfiltrering
 genom glasmikrofiberfilter (GF/A-Whatman). Den vätskeformiga

fraktionen filtrerades ytterligare genom ett 0,22 µm filter och hölls fruset över natt vid -20°C innan analys avseende glukuronsyrainnehåll med användning av HPAEC-PAD (Dionex) på Carbopac PA 10-kolonn. Kvantifiering av uronsyra baserades på standardgrafer för glukuronsyra (Sigma). Uronsyräförluster under autoklivering togs det hänsyn till genom autoklaverad glukuronsyra vid 121°C under 1 h i 4% H₂SO₄. I den kalorimetriska metoden användes karbazol-svavelsyraanalys från Li et al. [2007, Carbohydr. Res. 342 (11):1442-1449]. Total uronsyrakoncentration bestämdes från standardkurvgrafer för D-galakturonsyra (Merck) och i båda metoderna presenterades uronsyrainnehåll som procentandel av den initiala xylanmängden.

15 **Avlägsning av xylansidokedjor**

Graden av selektivt avlägsnande av sidogrupper på 4-O-metylglukuronsyra (4-O-MeGlcA) genom α-D-glukuronidas hos *Schizophyllum commune* (α-glu) bestämdes med användning av xylan som härletts från *Eucalyptus grandis*, *Pinus patula*, *Bambusa balcooa* och bagassee från Sydafrika.

α-glu från *S. Commune* utvärderades för selektivt avlägsnande av 4-O-MeGlcA-sidokedjor från xylan härlett från källor för lövträ, barrträ och gräs (inkluderande spannmål) med målet att utveckla en kontrollerad enzymatisk teknologi för diversifiering av funktionella xylanegenskaper. Effekterna på hydrolystid, temperatur och specifik dosering av enzymxylan på avlägsnandet av 4-O-MeGlcA-sidokedjor, och efterföljande modifiering av viskositet, löslighet, utfällning och aggregering av xylan undersöktes därför. Xylanprov ersatta med sidokedjor för arabinos och/eller 4-O-metylglukuronsyra (4-O-MeGlcA) (Figur 7), xylan från havrespält (Sigma) och björkxylan (Roth) utnyttjades som modellxylan. Xylanlösning (1%

vikt/volym) för varje material bereddes i avjoniserat vatten (dH₂O). Xylanet som uppvisade begränsad löslighet i vatten bereddes först genom upplösning i etanol och efterföljande värmning enligt de Wet et al. [2008, Appl. Microbiol. Biotechnol. 77:975-983]. Xylanlösningar tillverkades i bulk och lagrades i ampuller vid -20°C. Xylan från havrespält (Sigma) med en socker komposition av 10:15:75 (arabinos:glukos:xylos) och björkxylan (Roth) med sockerkomposition av 8,3:1,4:89,3 (4-O-MeGlcA:glukos och xylos) [Kormelik och Voragen, 1993, Carbohydr. Res. 249:345-353] tillverkad på liknande sätt användes som modellxylan. Enzymet som användes var α -D-glukuronidas (α -glu) med specifik aktivitet = 300 nKat mg⁻¹ renad rån *Schizophyllum commune* av vildtyp (VTT-D-88361-ATCC 38548 (donerad av Prof. Matti Siika-aho vid VTT Biotechnology Institute i Finland)) för selektivt avlägsnande av 4-O-metyl-D-glukuronsyra/D-glukuronsyrasidogrupper. Enzymalikkvoterna lagrades vid 4°C.

En xylanlösning (1% vikt/volym) beredd från 4-O-MeGlcA-substituerade substrat behandlades med α -glu (9000 nKat g⁻¹) i 5 ml reaktionsvolymen bestående av 2,5 ml av substratet och ökades upp till 5 ml med 0,05M acetatbuffert, pH 4,8. Reaktionen fortskred under 16 h vid 40°C.

Sockerfrisättning från 4-O-MeGlcA-sidokedjor analyserades med användning av (HPAEC-PAD) på Carbopac PA 10-kolonn eluerad med helium avgasad Mill-Q H₂O, 250 mM NaOH och 1M NaOAc (endast för sura sockerarter). G-glukuronsyra användes som standardsocker. Olöslighet, utfällning och aggregering av xylanhydrogeler bekräftades genom visuell inspektion (tagna fotografier) och kvantifierades genom att mäta viskositeten med användning av Rheometer (MCR501). Graden av xylanutfällning kvantifierades genom att bestämma restxylos i lösning med

användning av fenol-svavelanalys för totalt socker [Dubois et al., 1956, *Annal. Chem.* 28 (3):350-356].

Ett Box-Behnken statistiskt designat trefaktorexperiment med 3 centrala punkter som utgör totalt 15 körningar kördes två gånger: Statistica 7.0 mjukvaruprogram (StatSoft, Inc., 1984-2005) användes för design och analys med användning av responsytmetod (response surface method, RSM) såsom visas i figur 8. Regressions- och ANOVA-analyser utfördes för att bestämma storleken och signifikansen för individuella och interagerande effekter av hydrolysp parametrarna på viskositeten. Optimala förhållanden bestämdes med användning av önskvärdhetsfunktionen. Responsyttdiagram anpassades med ett andra gradens polynom enligt följande:

$$Z = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_2 x_2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_3 x_3 + \beta_{33} x_3^2 + \varepsilon$$

varvid: Z=viskositet (mPa.s), $\beta_0 + \beta_1 \dots \beta_n$ = linjär regressionskoefficient, $\beta_{11} \dots \beta_{nn}$ = kvadratisk regressionskoefficient, ε = fel, och x_1, x_2, x_3 = hydrolystid, temperatur och enzymxylanspecifik dos.

Optimala tillstånd för avlägsnande av sidokedja

De optimala kombinationsnivåerna för hydrolysp parametrar bestämdes: tid, temperatur och dosering av α -D-glukuronidas för avlägsnande av sidokedja från 4-O-metylglukuronsyra.

Effekten av xylansats, enzymsats, hydrolystid och temperatur, och deras interaktion på α -glu-avlägsnande av sidokedjor från 4-O-MeGlcA från havrespält- och björkxylan, bestämdes med användning av responsytmetod (RSM). Tid, temperatur och enzymxylan specifik dosering utgjorde den oberoende variabeln medan raden av sidokedjeavlägsnande och viskositetsändring bildade de beroende variablerna. Mjukvaruprogrammet Statistica 7.0 (StatSoft, Inc., 1984-2005) användes för design och

analys av experimenten. Statistisk analys inkluderade regres-
sion och ANOVA-analys. Pareto-diagramkurvor användes för att
visa storleks- och signifikanseffekter medan önskvärdheten
och profilerande funktioner användes för att bestämma optimal
5 sättpunkt för hydrolysp parametrarna. Xylan från havrespält (1%
vikt/volym) bereddes enligt de Wet et al. [2008, *Appl. Micro-
biol. Biotechnol.* 77: 975-983]. Lösningen tillverkades i bulk
och lagrades i ampuller vid -20°C. α -D-glukuronidas (α -glu)
renades från *Schizophyllum commune* av vildtyp (VTT-D-88362-
10 ATCC 38548) med specifik aktivitet av 300 nKat mg⁻¹ (donerad
av Prof. Matti Siika-aho på VTT Biotechnology Institute i
Finland), användes för selektivt avlägsnande av 4-O-metyl-D-
glukuronsyra/sidokedjegrupper av D-glukuronsyra. Enzymalikvo-
terna lagrades vid 4°C. D-glukuronsyra (Sigma) användes som
15 standardsockerarter.

Optimering av hydrolysp parametrar

Optimala sättpunkter för tid, temperatur och enzymdosering av
 α -glu-avlägsnande från 4-O-MegICA från xylan från björk be-
20 stämdes i en Box-behnken statistisk trefaktordesign med 3
centrala punkter utgörande totalt 15 körningar i duplikat.
Hydrolysp parametrar testades var och en vid två nivåer och
medelpunkten med de högsta, mellersta och lägsta nivåerna
noterades som 1, 0 respektive -1. Temperaturen testades vid
25 30°C och 50°C, tid vid 1 h och 16 h, enzymdosering av α -glu
var 2000 nKat g⁻¹ och 18000 nKat g⁻¹. De centrala punkterna för
temperatur och tid var 40°C och 8,5 h, medan den specifika
doseringen av α -glu-xylan var 360000 nKat g⁻¹ respektive 11000
nKat g⁻¹. Variablerna var kodade enligt ekvationen:

30
$$[x_i = \left(\frac{X_i - \bar{X}_i}{\Delta X_i} \right)], \text{där: } [x_i = \text{kodat värde för variabel,}$$

X_i = naturligt värde, ΔX_i =skalningsfaktor (halva området för de oberoende variablerna som utgjorde tid, temperatur och specifik dosering av enzymxylan)] .

- 5 4-O-MegIcA-sidokedjor analyserades med användning av (HPAEC-PAD) på Carbowac PA 10-kolonn eluerad med heliumavgasad Mill-Q H₂O, 250 mM NaOH och 1M NaOAc (endast för sura sockerarter). D-glukuronsyra användes som en standardsockerart.

- 10 Responstytdiagrammet anpassades med ett andra gradens polynom som inkluderade både linjära och kvadratiske interaktioner enligt följande:

$$Z = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_2 x_2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_3 x_3 + \beta_{33} x_3^2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 + \beta_{112} x_1^2 x_2 + \beta_{113} x_1^2 x_3 + \beta_{223} x_2^2 x_3 + \beta_{123} x_1 x_2 x_3 + \varepsilon$$

- 15 där: Z=respons (grad av sidokedjeavlägsnande), $\beta_0 + \beta_1 \dots \beta_n$ = linjär regressionskoefficient, $\beta_{11} \dots \beta_{nn}$ = kvadratisk regressionskoefficient, x_1, x_2, x_3 = hydrolystid, temperatur och enzymxylanspecifik dos eller xylan och enzymlast, ε = fel.

RESULTAT

20

Extraktion och karakterisering av xylan från lignocellulosa-material

- Den kemiska kompositionen för bagasse, tall (*Pinus ptula*) och bambu (*Bambusidae balcoa*) visas i figurerna 9-11. Bagasse hade det högsta innehållet av aska (8,6%) och extraktämnen i lösningsmedel (6,2%) (figur 9), lignin (30,0%) (figur 10), cellulosa (53,80%) och pentosaner (22,00%) (figur 11). Både *E.grandis* och *P.patula* hade innehåll av aska och extraktämnen som var lägre än 3% (figur 9). *P. patula* uppvisade emellertid den lägsta pentosannivån (8,49%). Cellulosannivån i *E.grandis* och bambu var i området av 40.43% (figur 11) medan lignininnehållet var omkring 23% (figur 10). Extraktion av xylan från *P.patula*, bagasse, *E.grandis* och bambu genom Hoiye-metoden
- 30

gav extraktionseffektivitetsvärden av 71,20, 65,50, 35,20 respektive 20,20% (figur 12) medan extraktion av xylan från bagasse och *E.grandis* med användning av Lopez-metoden gav extraktionseffektivitetsvärden av 28,00 respektive 12,00% (figur 12).

¹³C-CP/MAS NMR-fastfasspektrum för obearbetad, extraktämnesfri och xylanextraherad rest av *P. patula*-, bagasse-, *E.grandis*-och bambumaterial uppvisade karakteristiska signaler härstammande från de sex kolresonanserna för vattenfri glukosring i cellulosa vilket överfördes enligt Atalla och Isogai [2005, Recent developments in spectroscopic and chemical characterisation of cellulose. In Dumitriu, S. (red.) Marcel Dekker, New York, sid 123-157] (figurer 13A-D, spektrum 1). Med början vid övre delen av spektret C6 för den primära alkoholgruppen vid kemiskt skift (δ) 60-70 ppm och resonanser för ett kluster av C2, C3 och C5 från ringkolen, andra än de som ankrar glykosidlänken, uppvisades vid δ 70-81 ppm, C4-resonansen vid δ 81-93 ppm och C1 vid δ 102-108 ppm. Dessutom visades typiska dubbletter i C4- och C6-resonanser (över området) som representerade cellulosa i mindre ordnad form (amorf) och cellulosa i ordnad form (kristallin) (nedre området) (atalla och Isogai, 2005) i spektret över alla lignocellulosaråvarumaterial (figurer 13A-D). Dubbletter för C6 i spektrat för *P. patula* (figur 13A, spektrum 1) var emellertid mer upplösta än i bagasse (figur 13B), *E.grandis* (figur 13C) och bambu (figur 13D). Karakteristiska signaler för acetylgrupper vid δ 20-22 ppm, alifatiska grupper vid 30-40 ppm, metyl (CH₃) uppkommande från ligninrester vid 50-60 ppm, C1 från arabinosrester vid δ 110-120 ppm, aromatiska föreningar från ligninrester vid δ 140-160 ppm och C6 från uronsyrarester eller karbonylgrupper vid δ 170-190 ppm var dessutom i enlighet med Liitia et al. [2001, Holzforschung 55: 503-510]; Maunu [2002, Progress in Nuclear Magnetic Response Spectroscopy 40: 151-

174]; Lahaye et al. [2003, *Carbohydrate Research* 338: 1559-1569]; Oliveira et al. [2008, Chemical composition and lignin structural features of banana plant leaf sheath and rachis. In Hu, T.Q. (red). kapitel 10: 171-188] identifierade i spektret
5 för obearbetat råmaterial (figurer 13A-D, spektrum 1). ^{13}C -CP/MAS NMR-spektrum för råvaran i vilka extraktämnen avlägsnats uppvisade ändringar i linje- och kluvet mönster för signaler i det övre området av C4 och C6 och resonanserna mellan δ 81-93; 60-70 respektive 20-22 ppm (figurer 13A-D, spektrum 2). Medan
10 ^{13}C -CP/MAS NMR-spektrum för råvara från vilken xylan har avlägsnats uppvisade försvinnande eller reduktion i intensiteten av signaler härrörande från acetylgrupper, alifatiska grupper, metylgrupper, aromatiska grupper, C6 från uron/karbonylgrupper vid δ 20-22, 30-40, 50-60, 140-160 respektive 170-190 ppm (fi-
15 gurer 13A-D, spektrum 3). ^{13}C -CP/MAS NMR-spektrum för bagasse från vilken xylan har avlägsnats uppvisade skarpare signaler speciellt i resonans mellan δ 30 och 40 ppm, vilka härstammade från alifatiska grupper (Oliveira, 2008) och komplett försvinnande av resonanser uppstående från metylgrupper vid δ 40-50
20 ppm (figur 13B, spektrum 3). Medan det i ^{13}C -CP/MAS NMR-spektrum för *P.patula*, *E.grandis* och bambu noterades en reducerad intensitet för signalen från metylgrupper (figur 13A, C, D, spektrum 3).

25 Den initiala glukosnivån i extraktämnesfri bagasse, bambu, *P.patula* och *E.grandis* var 68,0, 66,0, 61,0 respektive 59,0. Vid xylanextraktion med användning av Hoije-metoden ökade glukosandelen i råvarorna till 75,0, 76,0, 65,0 respektive 79,0% medan xyloskoncentrationen minskade från 14,0 till
30 10,0%, 27,0 till 25%, 35 till 19%, 30,0 till 22,0% i *P.patula*, bagasse, *E.grandis* respektive bambu (figur 14A-D). Dessutom motsvarar xylanextraktionen en minskning i arabinos- och galaktosinnehåll i all råvara (figur 14A-d). Konventra-

tionen av mannos (16,0%) som endast var detekterbar i *P.patula*-råvaran ökade till 18% i xylanextraherad rest (figur 14A). Närvaron av uronsyror var detekterbar i all fyra råvarumaterialen i lignocellulosan (figur 15). Det högsta och
 5 lägsta uronsyrainnehållet hittades i *E.grandis*- respektive bagasse-råvaror (figur 15).

Elueringsprofilerna för extraherade xylanfraktioner hänvisades till elueringsprofilen för de monomera sockerarterna
 10 (arabinos, raminos, galaktos, glukos, xylos och mannos), xylitolsocker, xylan från björk, xylan från havrespält och H₂O₂-blekt bagasse (Bag B). HPAEC-PAD-kromatogrammet (Dinoex) visade att de monomera sockerarterna inkluderande xylitol eluerades på CarboPac PA 100-kolonn med en retentionstid av 5
 15 min (figur 16A och B). Mellan 0 och 3 min visade elueringsprofilen för xylan från havrespält en högintensitetstopp med detektionssvar > 300 nC vilket motsvarar retentionstiden för xylitol (figur 16D). I annat fall uppvisades endast lågintensitetstoppar (detektionssvar av < 20 nC) mellan 3 och 6 min
 20 på kromatogrammet för både xylan från björk och xylan från havrespält. Däremot uppvisade kromatogrammet för H₂O₂-blekt bagassexylan (Bag B) multipla toppar av hög intensitet med detektionssvar av över 100 nC, uppträdande vid retentionstider mellan 2 och 30 min (figur 17A). Kromatogrammen för både
 25 Hoije- och Lopezextraherad xylan uppvisade lågintensitetstoppar (<20 nC) inom 25 min retentionstid (figur 17B och C). Bland den extraherade xylanproven var toppar motsvarande xylitol närvarande i kromatogrammen för xylan från *E.grandis* (figur 18A), bambu (figur 18C) och *P.patula* (figur 18D),
 30 vilka extraherats genom Hoije-metoden.

Xylosinnehåll av xylan från *E.grandis* extraherad genom Hoije-metoden (EU H), bambu, bagasse extraherad genom Hoije-metoden

(Bag H) och *P. patula* var 92,00, 79,50, 71,00 respektive 61,30% (figur 15). Däremot var xylosinnehållet i xylan från björk och havrespält 80,00 respektive 87,20% (figur 15). Andelen arabinos i xylanfraktioner från Bag H, *P.patula* och bambu var 17,45, 15,50 respektive 10,50% (figur 15). Även om kommersiell xylan från havrespält har rapporterats ha 10% arabinos (Sigma) visade denna studie arabinosinnehåll av 7,4% (figur 15). Omkring 2,30% glukos var närvarande i xylanfraktion från EU H, medan 13,20% glukos var närvarande i xylanfraktioner från *P.patula* (figur 15). Dessutom innehöll EU-H 4,45% galaktos och spår av raminos och arabinos (figur 15). Totalt uronsyrainnehåll av uronsyrainnehåll i xylan från EU H, bambu och *P.patula* var 12,83, 11,20 och 11,54% medan xylan från bagasse innehöll 8,5% (figur 15).

Xylanfraktioner extraherade genom Hoijsen-metoden, då de utsattes för mild syrahydrolys (72% H_2O_2), gav mellan 16 och 55% olösliga rester (figur 19). Den högsta andelen syraolösliga rester, 55%, erhöles från xylan extraherad från *P.patula* med användning av Hoijsen-metoden. De syraolösliga resterna från xylan från bagasse extraherad genom Lopezmetoden (Bag L) var 16% medan referensmaterialet, xylan från björk, hade 3,5% (figur 19).

Strukturella kännetecken hos extraherad xylan

Spektrum för 1H -NMR och ^{13}C -NMR för referensxylan från björk, H_2O_2 -blekt bagasse och xylan från havrespält uppvisade karakteristiska signaler för proton- och kolresonans (figur 20A-D). Spektret för 1H -NMR för den extraherade xylanen uppvisade karakteristiska protonsignaler från xylos, 4-O-metylglukuronsyra och arabinosenheter vid kemiska skift (δ) mellan 3,3 och 5,7 ppm (figur 20-22). I protonsignalerna i 1H -NMR för xylos i xylanfraktionerna från bagasse extraherade

genom Hoije- (Bag H) och Lopezmetoderna (Bag L) uppvisades vid δ 4,44/4,45, 3,50, 3,67 och 4,01 ppm (figur 21A). Enligt Vignon och Gey [1998, *Carbohydrate Research* 307: 107-111] motsvarar sådana signaler H1, H3, H4 respektive H5 på xylo-

5 senheter substituerad med 4-O-metylglukuronsyra länkad vid O-2. Dessutom uppvisade protonspektret för Lopezextraherad bagasse (Bag L) och Hoije-extraherad bagasse (Bag H) protonresonanser från D-xylopyranosylenhetsrester substituerade med 4-O-metylglukuronsyra vid O-2 och acetylgrupp vid O-3 vid δ

10 4,72, 3,76/3,75, 3,97/3,96 ppm som motsvarar H1, H2 respektive H4 av β -D-xylopyranosylenheterna (figur 21A).

Protonspektra för xylan extraherad från *E.grandis* genom Lopezmetoden (EU L) och Hoijemetoden (EU H) uppvisade signaler

15 vid δ 4,48, 3,96/3,99, 3,63/3,68 och 3,50/3,52 ppm uppstående från xylosenheter substituerade med 4-O-metylglukuronsyra (figur 21C). Enligt Sims och Newman (2006) kan sådana kemiska skift härstamma från D-xylopyranosylenhetsrester substituerade med 4-O-metylglukuronsyra vid O-2 och acetylgrupp vid O-3.

20 I samma spektra var protonsignaler härstammande från H1 och H3 för 4-O-metylglukuronsyrarester synliga vid δ 5,48/5,49/5,46 ppm och mellan 1,06 och 1,54 ppm δ 5,16 och 3,63 ppm (figur 21C). I protonspektret för bambu och *P.patula* uppvisades signaler för 4-O-metylglukuronsyrarester vid

25 5,47/5,48 ppm (figur 21A och C). Sådana signaler kan uppträda vid δ 5,16 och 3,63 ppm [Sun et al., 2004, *Carbohydrate Research* 339: 291-300, *Polym. Degrad. and Stability* 84: 331-337, *Carbohydrate Polymers* 56: 195-204; Ebringerová et al., 1998, *Carbohydrate Polymers* 37: 231-239]. Protonspektret för extra-

30 herad xylan uppvisade ytterligare karakteristiska signaler härstammande från C-2-länkad arabinos till xylosenheter [Höije et al., 2005, *Carbohydr. Polym.* 61: 266-275; Ebringerová et al., 1998, *Carbohydrate Polymers* 37: 231-239]. I protonspekt-

ret för Bag H och Bag L identifierades C2-länkad arabions vid δ 5,58, 5,60, 4,29/4,30 ppm (figur 21A och C). Närvaron av arabinos i protonspektret för xylan från bambu och *P.patula* var i enlighet med Ebringerová et al. (1998) och Vignon och Gey (1998) identifierade inter alia, vid δ 5,58/5,59 ppm respektive 5,47/5,48 ppm (figur 22A och C). Arabinosignaler var närvarande i protonspektret för EU L och EU H vid δ mellan 3,83 och 3,85 ppm (figur 21C) medan närvaron av O-2-länkade acetylgrupper vilka, baserat på Shao et al. [2008, Wood Science Technology 42:439-451]; Höije et al. (2005) Sun et al. (2004); Ebringerová et al. (1998); Vignon och Gey (1998) *supra* identifierades vid δ 4-2,4 ppm (figur 20-22). Dessutom uppvisades breda signaler associerade med aromatiska och fenolföreningar härstammande från ligninrester [Höije et al., 2005 *supra*; Xu et al., 2006, Carbohydrate Research and Oliveira et al., 2008, Chemical composition and lignin structural features of banana plant leaf sheath and rachis. In Hu, T.O. (red), kapitel 10: 171-188] mellan δ 6,5 och 7,9 ppm i protonspektret för den extraherade xylanen (figur 21 och 22).

Karakteristiska kolresonanser från de fem kolen i (1 $\rightarrow$ 4)länkade β -D-xylopyranosylrester mellan δ 103 och 62 ppm var reflekterade i ^{13}C -NMR-spektrum för extraherade xylanfraktioner (figur 21 och 22). I kolspektret för xylanfraktioner från *E.grandis* uppträder resonanser härstammande från C1 från xylosoheter med C2-länkade arabinosgrupper vid $\delta \approx 102,33$ ppm medan de från C1, C2, C3, C4 och C5 för arabinofuranosylrester uppvisade vid $\delta \approx 108, 81,7, 78, 85,5$ och 62 ppm (figur 21D). I spektret sågs arabinosassocierade kolsignaler i EU H och EU L vid δ 61,81/61,59 ppm (figur 21D). I Bag L och Bag H uppvisades de identifierade arabinosignalerna baserat på Vignon och Gey (1998) *supra* vid δ 112,50/111,56 och 89,31 ppm vilket motsvarar C1 respektive C2 av C-2-länkade arabi-

nosrester (figur 21B). C1-, C2- och C4-resonanser hörande till arabinofuranosylrester monosubstituerade xylosenheter vid O-3 (Ebringerová et al., 1998, *supra*) var närvarande i ^{13}C -NMR-spektrat för både bambu och *P.patula* vid δ

5 108,60/108,33 ppm, 81,71/81,42 ppm respektive 85,72/85,43 ppm (figur 22B och D). Närvaron av 4-O-metylglukuronsyrarester i de extraherade xylanfraktionerna var uppenbart från karakteristiska kolsignaler som härstammar från C1, C4, C6 och C5 vid δ mellan 97 och 100 ppm, 83 och 84 ppm, 179-172 ppm re-

10 spektive 59 och 61 ppm (Haibibi och Vignon, 2005, Carbohydrate Research 340:1431-1436; Xu et al., 2000, *supra*; Ebringerová et al., 1998, *supra*) (figur 21 och 22). Närvaron av acetyl-, fenol- och aromatiska grupper uppstående från ligninföreningar, och hexossocker var identifierade i ^{13}C NMR-

15 spektrat från de extraherade xylanfraktionerna. Dessutom identifierades acetylgrupper i alla xylanfraktioner mellan δ 21-24 ppm (figur 21 och 22). Frånvaron av acetylgrupper var emellertid uppenbart i ^{13}C NMR-spektrat för xylan från björk (figur 20B) och H_2O_2 -blekt bagasse (Bag B) (figur 20D). Metoxylgrupperna som antyder närvaron av ligninföreningar [Ebringerová et al., 1998, *supra*, Sun et al., 2004, *supra*, Xu et

20 al., 2006 *supra*; Maunu, 2008, ^{13}C CPMAS NMR Studies of wood, cellulose fibers and derivatives. In Hu, T.Q. (red)] identifierades i ^{13}C NMR-spektrat vid δ 56,62/56,58 ppm (figur 21

25 och 22). Ligninföreningarna, speciellt de länkade till arabinosylsidokedjor genom ferulsyrabryggor, reflekterades av kolsignaler vid δ 140-160 ppm och 116,6-117,08 ppm (figur 21 och 22). Andra ligninföreningar associerade med ferul- eller p-kumarsyragrupper och av $-\text{CH}_3-$ i ArCOCH_3 (Maunu, 2002, *Progress in Nuclear Magnetic Response Spectroscopy* 40: 151-174; Sun et al., 2004, *supra*) sågs vid δ 26-49 ppm, vid δ 115,38 och δ 17,55/17,69 ppm i Bag L (figur 21B, spektrum 1) xylanfraktioner från bambu och *P.patula* (figur 22B och D). Närva-

30

ron av hexossocker såsom galaktos eller glukos [Sun et al., 2004 *supra*] var uppenbart i ^{13}C NMR-spektrum, speciellt för EU H och EU L vid δ mellan 69 och 71 ppm (figur 21B).

5 FTIR-spektrum av extraherade xylanfraktioner visade karaktäristiska band för xylanrester, vilka inkluderade β -glykosidlänkar reflekterade vid $\approx 897\text{ cm}^{-1}$ (figur 23). Sådan signal var emellertid frånvarande i FTIR-spektrat för extraherad xylan från *P.patula*. Dessutom uppvisade spektret av
 10 extraherad xylan signaler i bandregionen mellan 1600 och 1200 cm^{-1} (figur 23), vilket enligt Fengel och Wegener [1989, Wood Chemistry, Ultrastructure, Reactions, Walter de Gruyter, Berlin, Tyskland] är en region associerad med aromatiska föreningar som härstammar från ligningfraktioner. Band upp-
 15 stående från syringylring levande med $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-OCH}_3$ och metoxylgrupper i lignin reflekterades vid 1329 cm^{-1} och 1591-1595, och 1460-1461 cm^{-1} i spektret för *E.grandis* och bambu (figur 23). Xylanfraktioner från bagasse, Bag H och Bag L innehöll signaler av varierande intensiteter i våglängdsregionen 1600-
 20 1200 cm^{-1} och spektra för Bag L reflekterade ett relativt starkt intensitetsband för C-H-sträckande vibrationer vid 2919 cm^{-1} (figur 23). FTIR-spektret för EU L uppvisade två starka signaler relaterade till ligninföreningar vid 1591 och 1379 cm^{-1} medan det i EU H-spektret sågs multipla band av
 25 lägre styrka i området 1600-1200 cm^{-1} , speciellt vid 1595, 1461 och 1329 cm^{-1} (figur 23).

Kontrollerat enzymatiskt avlägsnande av sidokedjor från lignocellulosaråvaror

30 Det renade α -glukuronidaset (α -glu) från *Schizophyllum commune* avlägsnade 1,2 mg g^{-1} 4-O-MegIcA (1,3% tillgänglig uronsyra) från xylan från björk, medan omkring 1,6 mg g^{-1} 4-O-MegIcA (2% tillgängliga uronsyror) frisläpptes från BH-

xylanfraktioner (figur 24). Proportionen 4-O-MegIcA avlägsnad från *Eucalyptus grandis*-xylan, extraherad genom Hoije-metoden (EH), och från *Eucalyptus grandis*-xylangel (ES) var omkring 1,3 mg g substrat⁻¹ (figur 24). Det lägsta av α -glu-
 5 avlägsnandet från 4-O-MegIcA var <0,6 mg g substrat⁻¹ från H₂O₂-blekt bagasse (BB) (figur 24).

Bestämning av optimala betingelser för avlägsnande av sidokedjor

- 10 Ytresponsdiagram för avlägsnande av glukuronsyra (4-O-MegIcA) från xylan från björk genom α -glu reflekterade på liknande sätt både linjära och kvadratiska förhållanden med hydrolystid, temperatur och specifik dosering α -glu-xylan. Maximalt 350 μ g g⁻¹ substrat av 4-O-MegIcA avlägsnades från björk genom
 15 α -glu vid xylanspecifik dosering mellan 16500 och 18000 nkat g substrat⁻¹ då hydrolys utfördes för varaktighet av mellan 9 och 10,2 h vid temperaturer mellan 33,5 och 42°C (figur 25A-C).
- 20 Hydrolysparmetrarna uppvisade signifikanta effekter på avlägsnande av 4-O-MegIcA från xylan från björk genom α -glu och var i fallande magnitud, från linjära effekter från α -glu - xylanspecifik dosering [α -glu, nKat/g (L)], temperatur [Temp (L)] och kvadratisk effekt på temperatur [Temp (Q)] (figur 26,
 25 Paretdiagram]. Den enda signifikanta interaktionseffekten på avlägsnandet av 4-O-MegIcA från xylan från björk genom α -glu var från den linjära effekten av hydrolystid och den kvadratiskeffekten av temperatur [tid (L) genom temperatur (Q)] (figur 26, Paretdiagram). De optimala inställningspunkterna för α -glu-avlägsning av 4-O-MegIcA var mellan 9h och
 30 10,2 h, 33,5 och 42°C och 16500 och 18000 nKat g substrat⁻¹. Regressionskoefficienterna för variabeln i andra gradens polynommodell anpassad till responsyttdiagram för 4-O-MegIcA-

avlägsning som en funktion av tid, temperatur och enzymdos gav en regressionskoefficient R^2 av 0,90 (R^2 justerat = 0,81) (figur 27).

PATENTKRAV

- ① s.2, r.5-6
s.24, r.31-33
- ② urspr.
krav 2
- ③ s.24, r.31-33
- ④ s.22, r.11-12
- Urspr. krav 2
- Urspr. krav 5
- Urspr. krav 8
1. Förfarande för att degradera xylan, varvid förfarandet innefattar stegen att bringa xylanet i kontakt med en isole-
rad polypeptid, vilken har aminosyrasekvensen som är åt-
minstone 75% identisk med SEQ ID NO:1 eller vilken är en
funktionell variant av polypeptiden enligt SEQ ID NO:1, var-
vid polypeptiden eller varianten därav har α -
glukoronidasaktivitet och kan degradera en xylanmolekyl genom
hydrolys av en glykosidlänk mellan en MeGlcA-rest och en
terminal xylopyranosylrest och mellan en MeGlcA-rest och en
icke-terminal xylopyranosylrest.
2. Förfarande enligt krav 2, varvid polypeptiden har aminosy-
rasekvensen som är åtminstone 85%, åtminstone 95% eller 100%
identisk med SEQ ID NO:1.
3. Förfarande enligt något av kraven 1 till 2, varvid poly-
peptiden kodas av en polynukleotid som har en nuk-
leotidsekvens som är åtminstone 75%, åtminstone 85%, åt-
minstone 95% eller 100% identisk med nukleotidsekvensen en-
ligt SEQ ID NO:2.
4. Förfarande enligt något av kraven 1 till 3, varvid poly-
peptiden eller polynukleotiden isolerats från en mikrob vald
från gruppen inkluderande *Pichia stipitis*, *Schizophyllum*
commune, *Aspergillus clavatus*, *Neosartorya fischeri*, *Asper-*
gillus fumigatus, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus oryzae*,
Sclerotinia sclerotiorum, *Botryotinia fuckeliana*, *Pyrenophora*
tritici-repentis, *Neurospora crassa*, *Gibberella zeae*, *Podo-*
spora anserina, *Coprinopsis cinerea okayama*, *Magnaporthe*
grisea, *Fusarium sporotrichioides*, *Cryptococcus neoformans*
var. neoformans, *Cellvibrio japonicus*, *Saccharophagus degra-*

dans, Opitutus terrae, Phaeosphaeria nodorum, Bacteroides ovatus och *Streptomyces pristinaespiralis*.

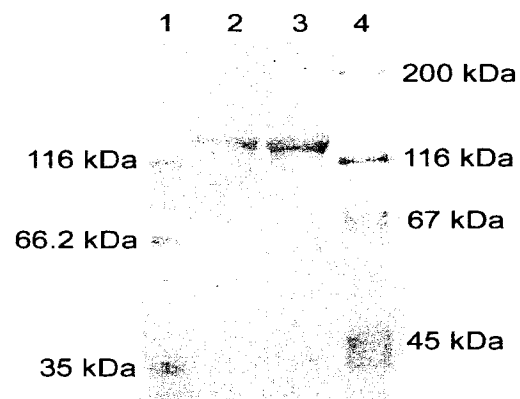
- Urspr. krav 9 5. Förfarande enligt något av kraven 1 till 4, varvid poly-
5 peptiden eller polynukleotiden är isolerad från *Pichia stipitis* CBS 6054.
- Sid. 22, r. 6-9
Sid. 31, r. 3 6. Förfarande enligt något av kraven 1 till 5, varvid xylanet
är polymert xylan.
- 10
Sid 34, r. 23-25 7. Förfarande enligt något av kraven 1 till 6, varvid xylanet
innehåller sidokedjor av 4-O-metylglukuronsyra (MeGlcA).
- Sid 19, r. 21-24 8. Förfarande enligt krav 7, varvid xylanet innefattar glu-
15 kuronoxylan.

1/24

Steg	Totalt protein, mg	Specifik aktivitet*, $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$	Total aktivitet, U	Reningsgrad
Koncentrerat inductions- medium (600 ml to 2 ml)	12,8	0,67	8,6	1,00
DEAE Sepharose pH 7,0	7,2	0,93	6,7	1,38
Butyl Sepharose pH 4,0	6,6	0,94	6,2	1,4
MonoQ pH 4,0	4,2	1,4	5,9	2,1
MonoQ pH 7,0	0,1	6,2	0,6	9,2

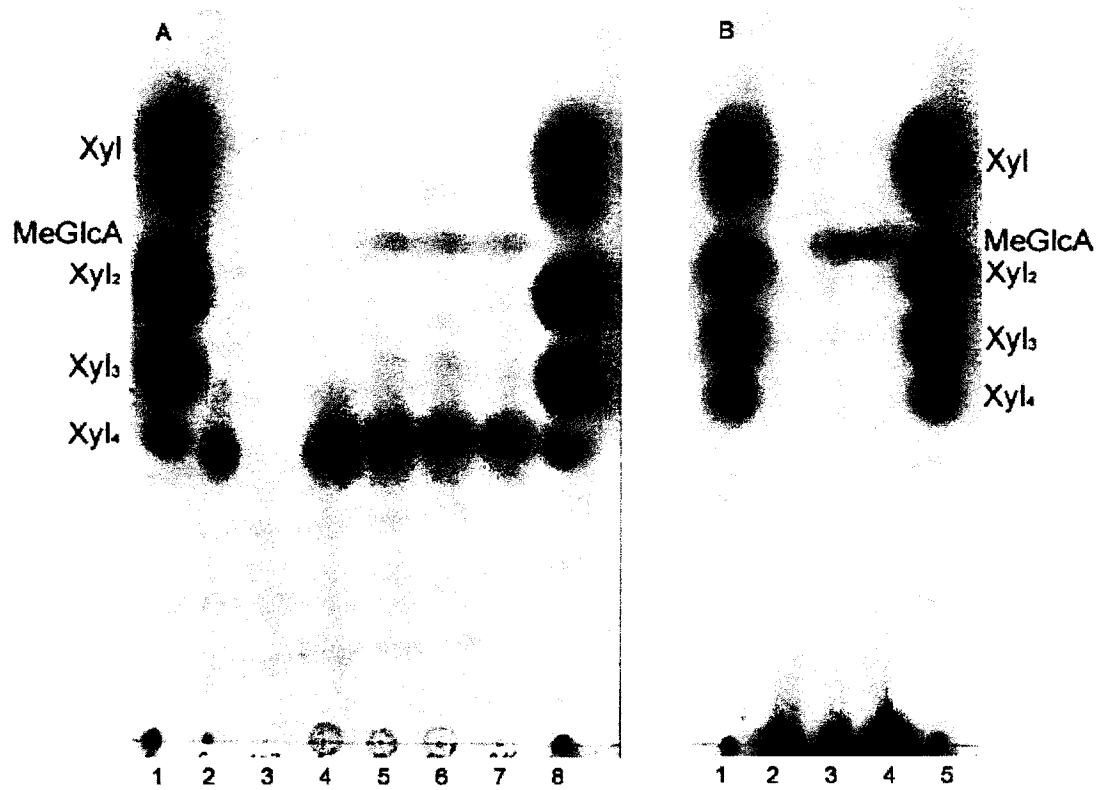
* Aktivitet bestämd på aldopentauronsyra Xyl-Xyl(MeGlcA)-Xyl-Xyl.

Figur 1



Figur 2

2/24



Figur 3

Organism	Accessions nummer	Identitet (%)	Likhet (%)
<i>Pichia stipitis</i> CBS 6054	ABN67901	100	
<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1	EAU11879	54	69
<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181	EAU19490	51	69
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	EAL87004	51	68
<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624	EAU34802	48	63
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> 1980	EDN95878	47	62
<i>Botryotinia fuckeliana</i> B05.10	EDN18998	46	63
<i>Pyrenophora tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP	EDU43793	44	63
<i>Neurospora crassa</i> OR74A	EAA30769	44	60
<i>Gibberella zeae</i> PH-1	XP_384059	44	61
<i>Podospora anserina</i>	CAP65960	42	59
<i>Cellvibrio japonicus</i> Ueda107	ACE84961	41	60
<i>Saccharophagus degradans</i> 2-40	ABD81015	41	60
<i>Opitutus terrae</i> PB90-1	ACB77616	42	58
<i>Coprinopsis cinerea</i> okayama 7#130	EAU87823	43	58
<i>Magnaporthe grisea</i> 70-15	EDK03476	43	60
<i>Phaeosphaeria nodorum</i> SN15	EAT92065	41	58
<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40	BAE56806	42	59
<i>Magnaporthe grisea</i> 70-15	EDK06705	41	58
<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40	BAE56340	40	56
<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624	EAU29423	40	58
<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40	BAE65957	36	56
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	AA027748	37	56
<i>Gibberella zeae</i> PH-1	XP_383704	37	56
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> B-3501A	EAL18800	36	54
<i>Bacteroides ovatus</i> ATCC 8483	EDO13867	36	53
<i>Streptomyces pristinaespiralis</i> ATCC 25486	EDY63299	34	51

Figur 4



Figur 5

*P. stipitis*_glucuronidase/1-997
*A. fumigatus*_A/293/1-989
*N. crassa*_OR74A/1-1065
*G. zeae*_PH_V1-1070
*A. oryzae*_RB40/1-997
*C. cinerea*_okayama_78 130/1-1005
*S. pratense spiralis*_ATCC_25486/1-1069
*C. japonicus*_Ueda 107/1-982
*B. ovarius*_ATCC_8483/1-1028

532 N NTT T ETSS AD DRWA K KKN 968
 A DSS R ROE RA ND HQ KDS 969
 N EQ A A Q AE RAH A D DE A 970
 G EEW V E EA E AT RD A D DSE 971
 A SQL F Y D E AN A ES A Q S SS DQA T 972
 C N NT R N T DN SA TR N SNA 973
 S N RR ITLD AKOLATDD SAVVHDD EAT D R ER ED RD QD RE R AA D 974
 C QDA H OT R RA KA EA C A D TN D 975
 B T QN L R QA A HR RR V EY EE D 976

*P. stipitis*_glucuronidase/1-997
*A. fumigatus*_A/293/1-989
*N. crassa*_OR74A/1-1065
*G. zeae*_PH_V1-1070
*A. oryzae*_RB40/1-997
*C. cinerea*_okayama_78 130/1-1005
*S. pratense spiralis*_ATCC_25486/1-1069
*C. japonicus*_Ueda 107/1-982
*B. ovarius*_ATCC_8483/1-1028

580 VT YD SA N ER NQ A TH DK QY NT K D K F R 977
 QI TN TV N RT T DQ K ND HA K H D N D R 978
 EV HR QY L K KN EQ A NQ A DE WQ Q N A R D 979
 EI NK QY Q K N D W DK YK SN N E D A R D 980
 KT VD K T F A R QN D TE SA E H K K N V S 981
 SA NT HT NV LN R S AQ T A ER LD RW E T H K D 982
 E T AN Y R EA ET A L A L E AR AR AD FA D N NE R 983
 Q SA VT R Q A Q A R E K ER EA EA D N Q 984
 K AA AE TAA N K Q LQ Y ER V EQ RK DY NHC D K SDN 985

*P. stipitis*_glucuronidase/1-997
*A. fumigatus*_A/293/1-989
*N. crassa*_OR74A/1-1065
*G. zeae*_PH_V1-1070
*A. oryzae*_RB40/1-997
*C. cinerea*_okayama_78 130/1-1005
*S. pratense spiralis*_ATCC_25486/1-1069
*C. japonicus*_Ueda 107/1-982
*B. ovarius*_ATCC_8483/1-1028

906 V L EENS B T Q R DAYNAVAYS NN V T L TD T N 986
 V EES S S A N DVVHSLS SS S THE T 987
 A R TR V H N A DKYHANS NN SA S TKD T 988
 D R F R S K W HSLS SNVE E E A Q H K 989
 V A AA Q V AA E K R S E S E 990
 K A TR KQ A V R T N CA N NN CR D Y NC D N 991
 W Q E N AL DE I AV KR E E E E E E 992
 S V T D Y H A D T Q A E R E R 993
 E V K AR SS A EQ AA N V A L O A 994

*P. stipitis*_glucuronidase/1-997
*A. fumigatus*_A/293/1-989
*N. crassa*_OR74A/1-1065
*G. zeae*_PH_V1-1070
*A. oryzae*_RB40/1-997
*C. cinerea*_okayama_78 130/1-1005
*S. pratense spiralis*_ATCC_25486/1-1069
*C. japonicus*_Ueda 107/1-982
*B. ovarius*_ATCC_8483/1-1028

738 E S YAD H SS SATNNS VSD V D E YN I F SN T TY E 995
 T S Y D SS K SVS N N TD AR H E K S E 996
 Q A W Q Y N K S D TR D SQ K A S T 997
 F A W E H Y N N

Figur 5 (forts.)

Xylan	Extraktionsmetod	Typ av sidokedja	Källa
Sockerrör (<i>Saccharum officinarum</i> L) Bagasse (BH)	Mild alkali (Höije et al., 2005)	Arabinos och 4-O-MeglcA	Denna studie
Sockerrör (<i>Saccharum officinarum</i> L) Bagasse (BL)	Mild alkali (de Lopéz et al., 1996)	Arabinos och 4-O-MeglcA	Denna studie
Sockerrör (<i>Saccharum officinarum</i> L) bagasse (BB or BagBraz)	Mild alkali extraherad och H ₂ O ₂ -blekt	Arabinos och 4-O-MeglcA	Generöst donerad av Prof. A.M.F. Milagres, University of São Paulo, Brazil
Jättebambu (<i>Bambusidae balcoa</i>) (BM or Bam)	Mild alkali (Höije et al., 2005)	Arabinos och 4-O-MeglcA	Denna studie
Eucalyptus (<i>Eucalyptus grandis</i>) (EH)	Mild alkali (Höije et al., 2005)	4-O- MeglcA	Denna studie
Eucalyptus (<i>Eucalyptus grandis</i>) (EL)	Mild alkali (de Lopéz et al., 1996)	4-O- MeglcA	Denna studie
Eucalyptus (<i>Eucalyptus grandis</i>) gel från massa (ES)	nd	4-O- MeglcA	Generöst donerad av Arlene Bayley, SAPPI Technology Centre, Pretoria, South Africa
Tall (<i>Pinus patula</i>) (PP)	Höije et al. (2005		
Xylan från havrespält	nd	10% Arabinos,	Sigma
Xylan från björk	nd	8-10% MeglcA	Roth
Xylan	Extraktionsmetod	Typ av sidokedja	Källa
Sockerrör (<i>Saccharum officinarum</i> L) Bagasse (BH)	Mild alkali (Höije et al., 2005)	Arabinos och 4-O-MeglcA	Denna studie
Sockerrör (<i>Saccharum officinarum</i> L) Bagasse (BL)	Mild alkali (de Lopéz et al., 1996)	Arabinos och 4-O-MeglcA	Denna studie
Sockerrör (<i>Saccharum officinarum</i> L) bagasse (BB or BagBraz)	Mild alkali extraherad och H ₂ O ₂ -blekt	Arabinos och 4-O-MeglcA	Generöst donerad av Prof. A.M.F. Milagres, University of São Paulo, Brazil
Jättebambu (<i>Bambusidae balcoa</i>) (BM or Bam)	Mild alkali (Höije et al., 2005)	Arabinos och 4-O-MeglcA	Denna studie
Eucalyptus (<i>Eucalyptus grandis</i>) (EH)	Mild alkali (Höije et al., 2005)	4-O- MeglcA	Denna studie
Eucalyptus (<i>Eucalyptus grandis</i>) (EL)	Mild alkali (de Lopéz et al., 1996)	4-O- MeglcA	Denna studie
Eucalyptus (<i>Eucalyptus grandis</i>) gel från massa (ES)	nd	4-O- MeglcA	Generöst donerad av Arlene Bayley, SAPPI Technology Centre, Pretoria, South Africa
Tall (<i>Pinus patula</i>) (PP)	Höije et al. (2005		
Xylan från havrespält	nd	10% Arabinos,	Sigma
Xylan från björk	nd	8-10% MeglcA	Roth

Figur 6

7/24

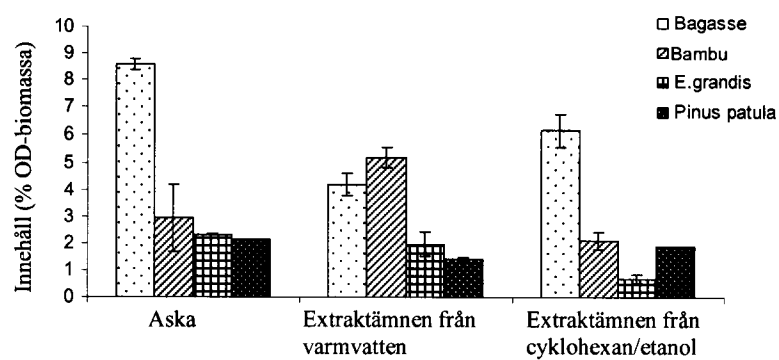
Körning (Slumpmässig ordning)	Kodade variabler			Naturliga variabler		
	X1	X2	X3	Enzymdos (nKat g ⁻¹)	Tid (h)	Temperatur (°C)
6	1	0	-1	18000	8,5	30
15	0	0	0	10000	8,5	40
1	-1	-1	0	2000	1,0	40
14	0	0	0	10000	8,5	40
8	1	0	1	18000	8,5	50
5	-1	0	-1	2000	8,5	30
2	1	-1	0	18000	1,0	40
13	0	0	0	10000	8,5	40
11	0	-1	1	10000	1,0	50
9	0	-1	-1	10000	1,0	30
3	-1	1	0	2000	16,0	40
10	0	1	-1	10000	16,0	30
12	0	1	1	10000	16,0	50
4	1	1	0	18000	16,0	40
7	-1	0	1	2000	8,5	50

Figur 7

8/24

Körning	Kodade variabler		Naturliga variabler		
Slumpmässig ordning	A	B	xylaninnehåll (g)	xylankonc. ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Enzymdos (nKat mL^{-1})
1	-1,00000	-1,00000	0,0125	1562,50	8942,50
6	1,41421	0,00000	0,058	7220,30	22356,30
10 (C)	0,00000	0,00000	0,0313	3906,30	22356,30
4	1,00000	1,00000	0,050	6250,00	35770,00
3	1,00000	-1,00000	0,05	6250,00	8942,50
8	0,00000	1,41421	0,030	3906,30	41323,30
5	-1,41421	0,00000	0,0047	592,20	22356,30
7	0,00000	-1,41421	0,0313	3906,30	3389,20
9 (C)	0,00000	0,00000	0,0313	3906,30	22356,30
2	-1,00000	1,00000	0,0125	1562,50	35770,00

Figur 8



Figur 9

9/24

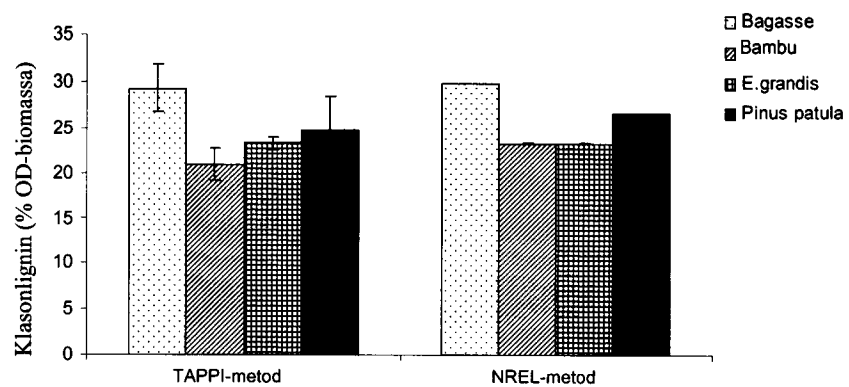


Figure 10

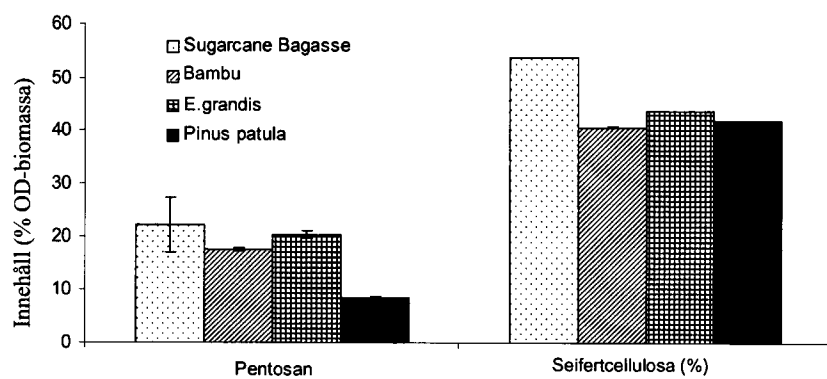
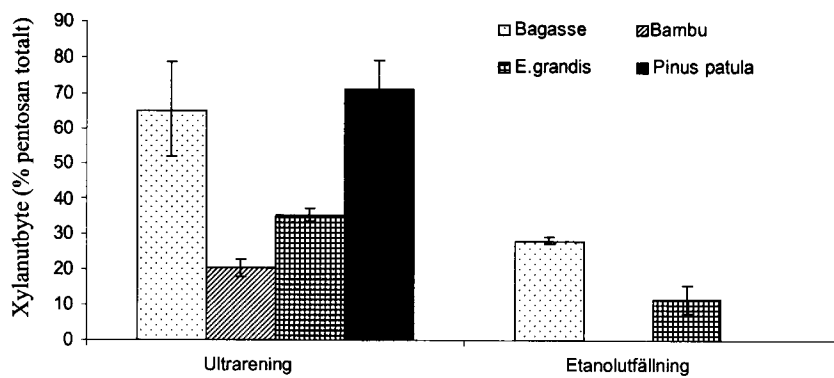
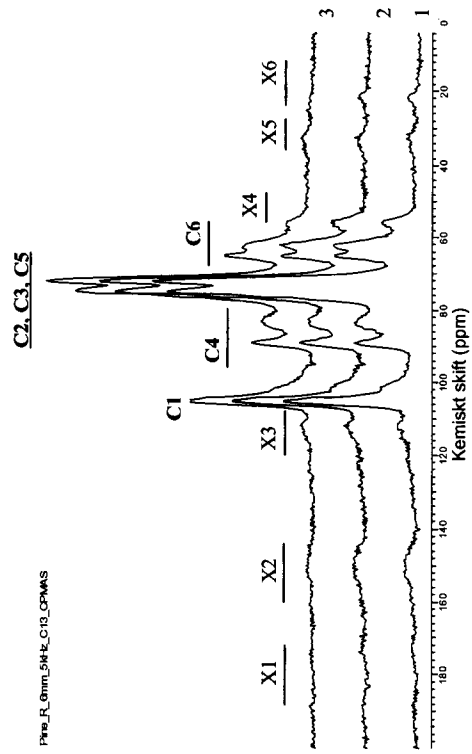


Figure 11

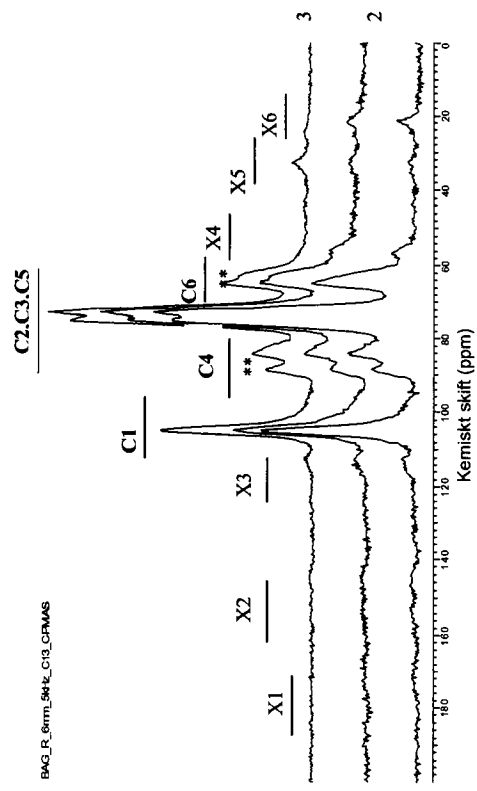


Figur 12

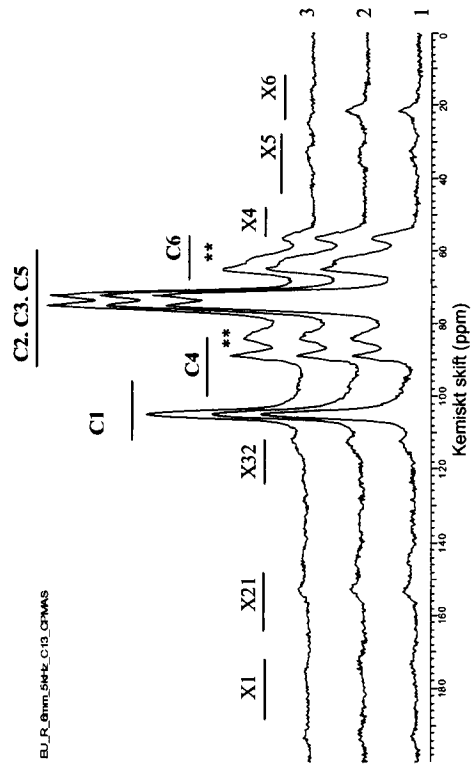
A



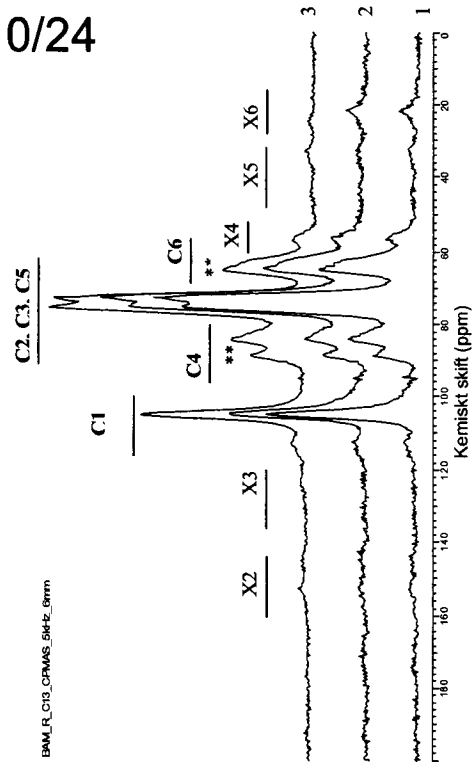
B



C

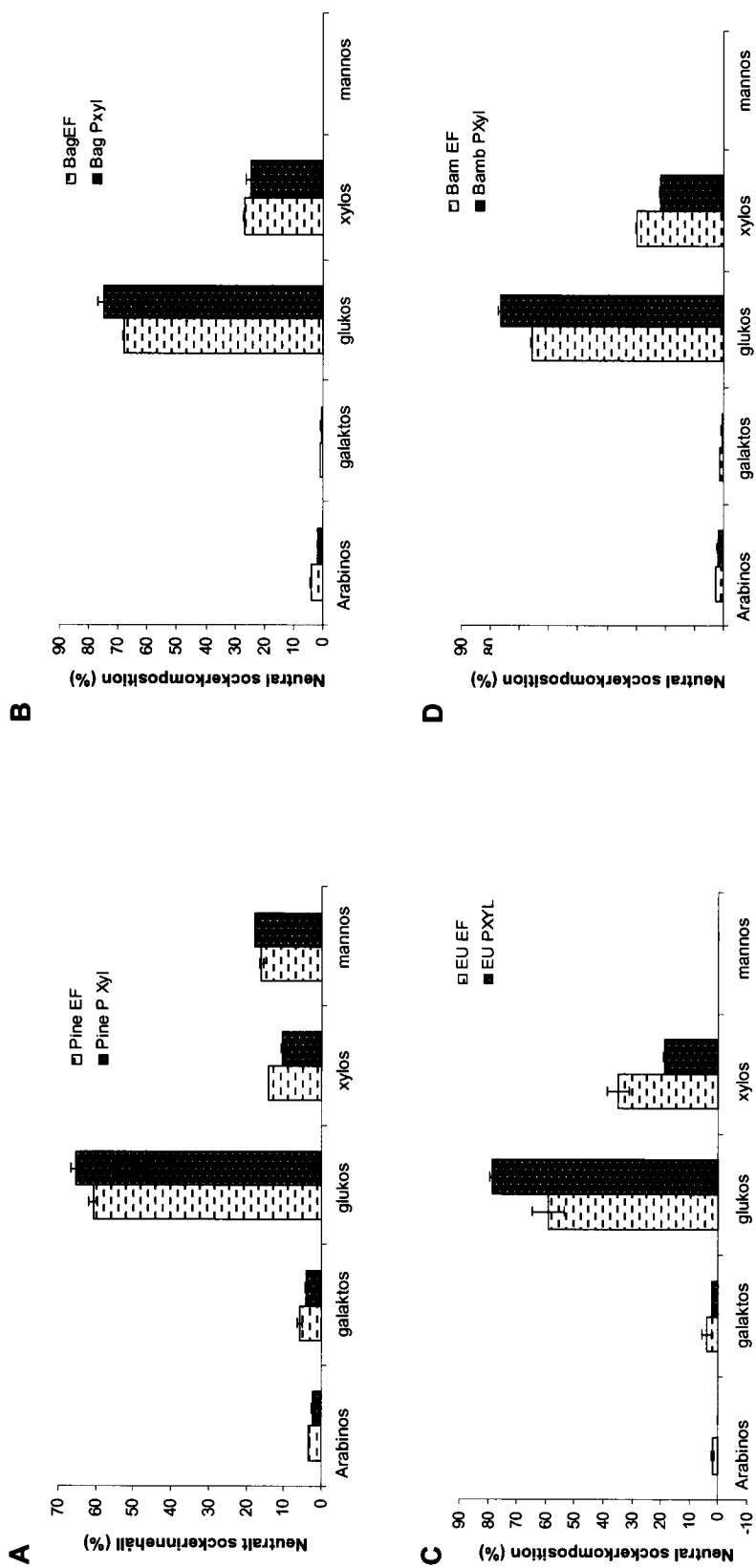


D



10/24

Figure 13



Figur 14

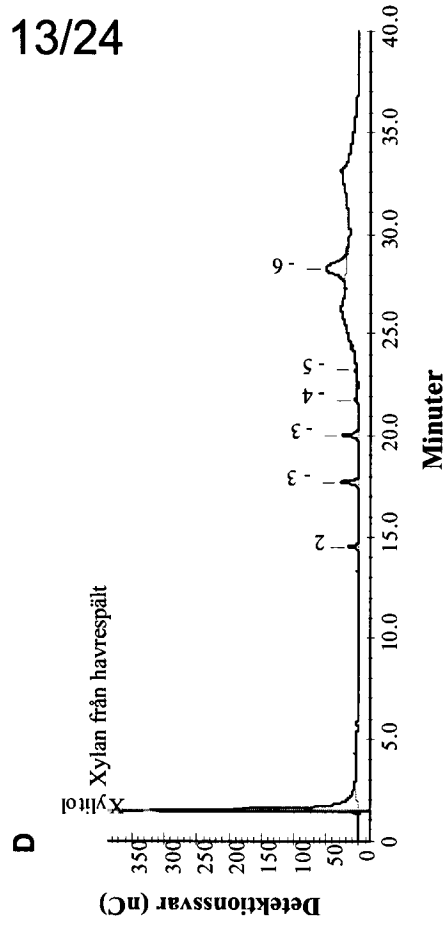
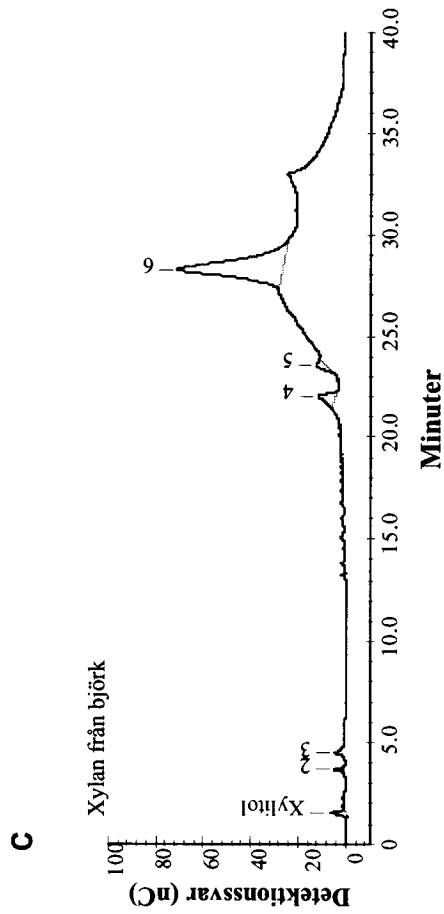
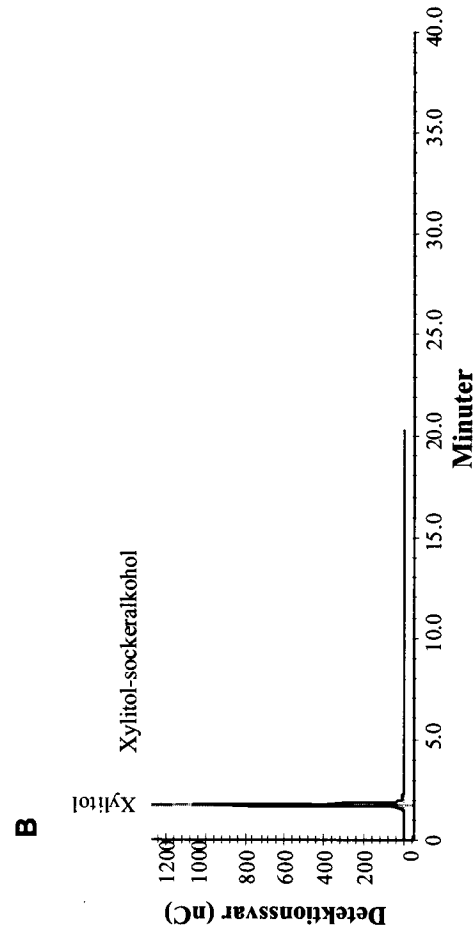
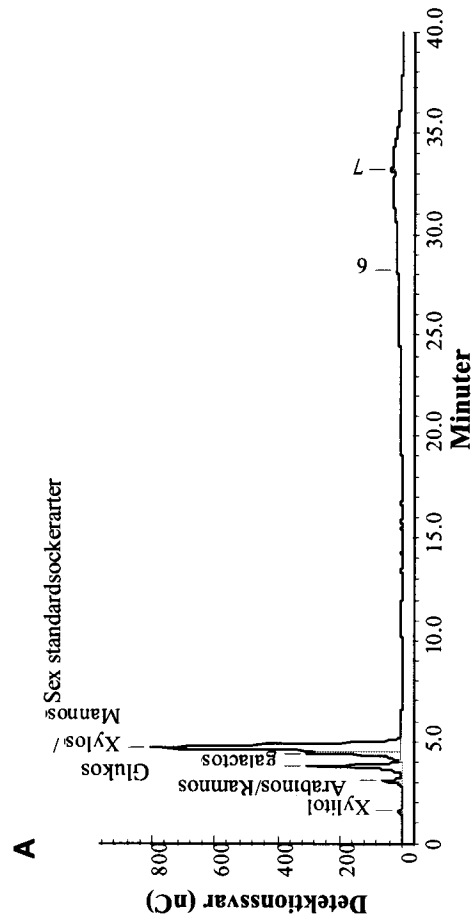
12/24

Notering: ^a betecknar medelvärde för åtminstone tre prov med standardavvikelse < 0.1, * procentandel extraktfritt råmaterial

Xylantyp	Total neutral sockerkomposition av xylan (%) ^a					Total uronsyra (%) ^a	
	Arabinos	Galactos	Glukos	Raminos	Xylos	Rå-material*	Xylan
Bagasse Hojie (BH)	17,44	3,4	8,2	-	70,97	6,02	8,5
Bambu (BM)	10,50	2,86	7,09	-	79,54	6,72	11,20
<i>Eucalyptus grandis</i> Hojie (EH)	0,26	4,45	2,28	0,92	92,09	10,34	12,83
<i>Pinus patula</i>	15,53	9,98	13,23	-	61,26	8,68	11,54
Björk	-	0,43	19,53	-	80,03	-	10
Havrespält** xylan	7,4	1,35	4	-	87,24	-	-

**Normal komposition av xylan från havrespält (Sigma) är 10:75:15 för arabinos: xylos: glukos

Figur 15

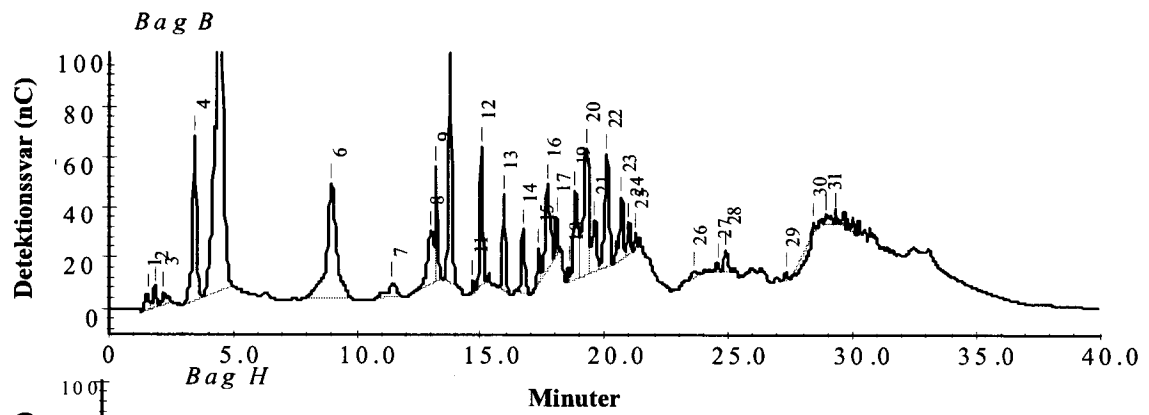


13/24

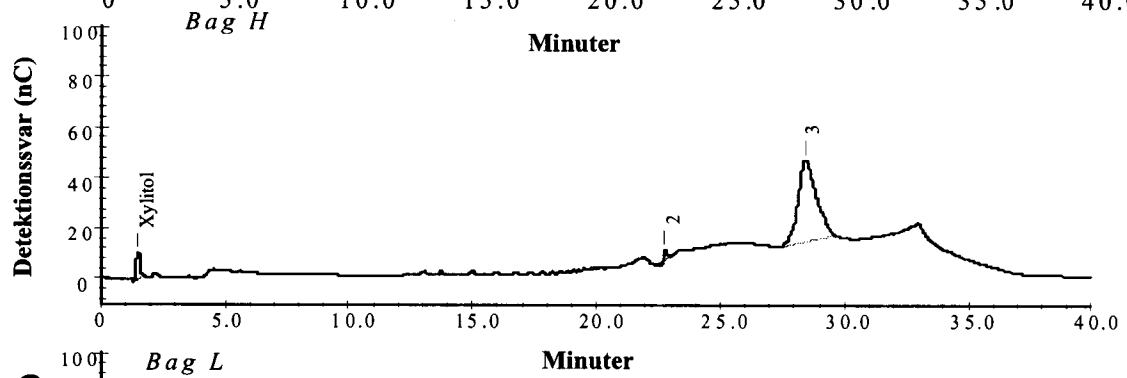
Figur 16

14/24

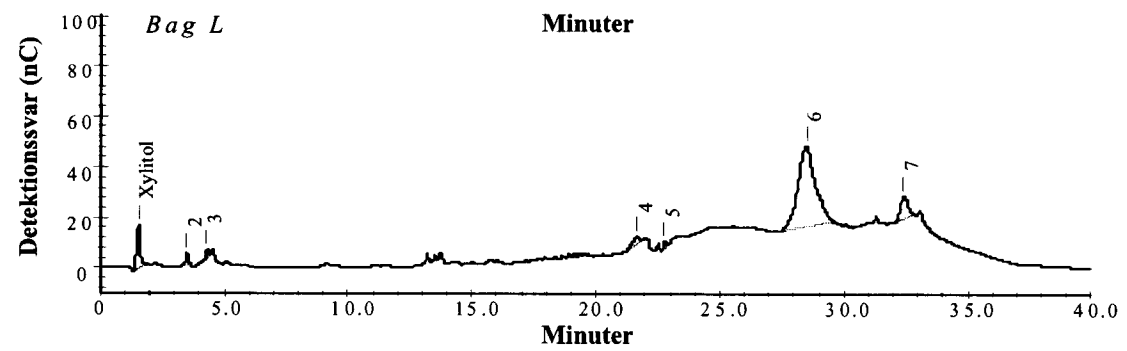
A



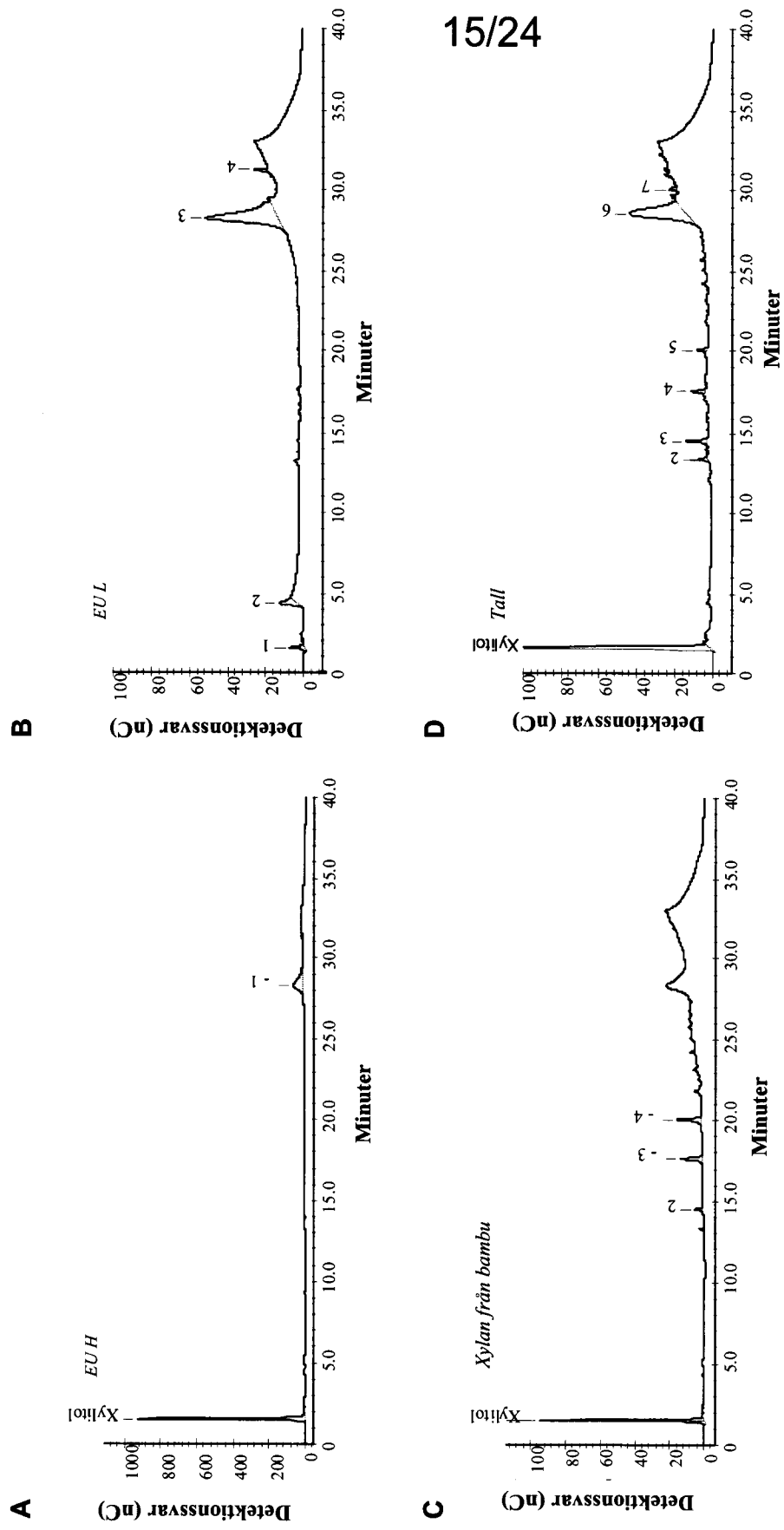
B



C

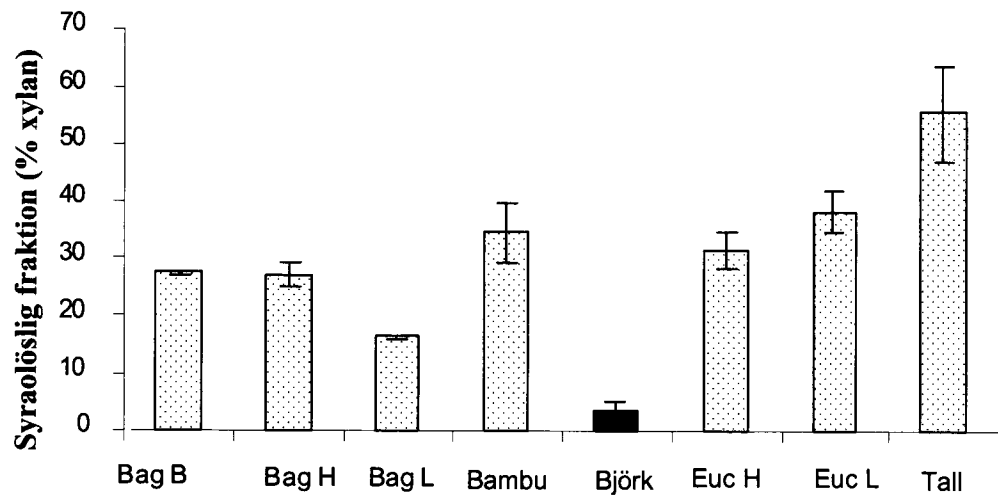


Figur 17

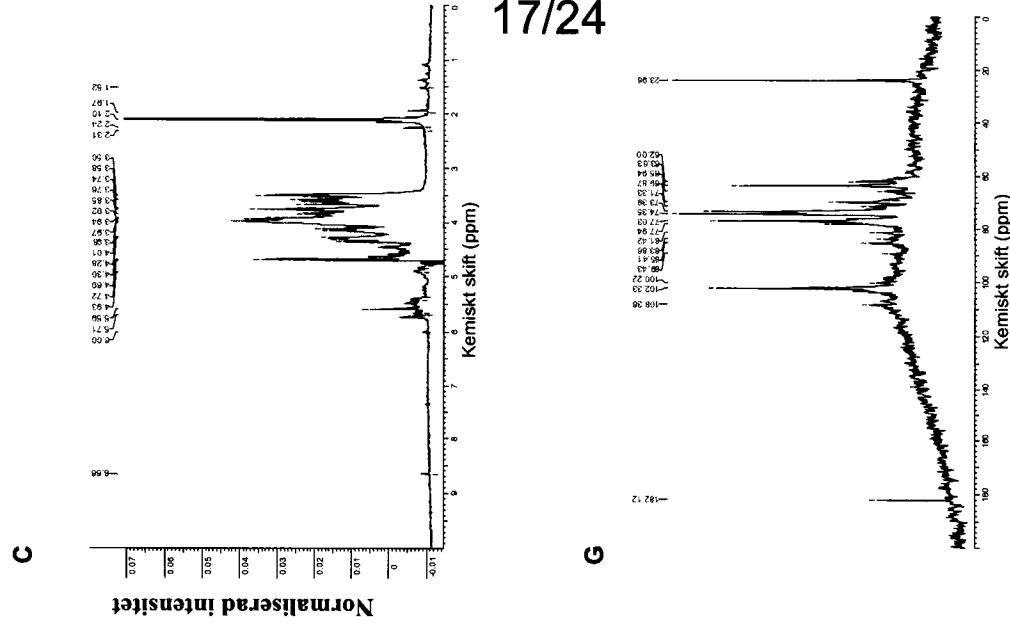
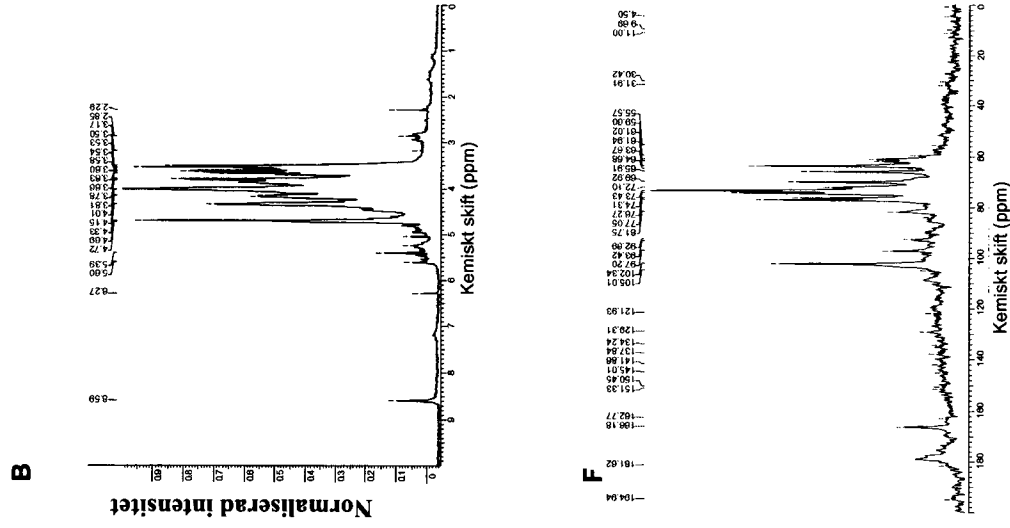
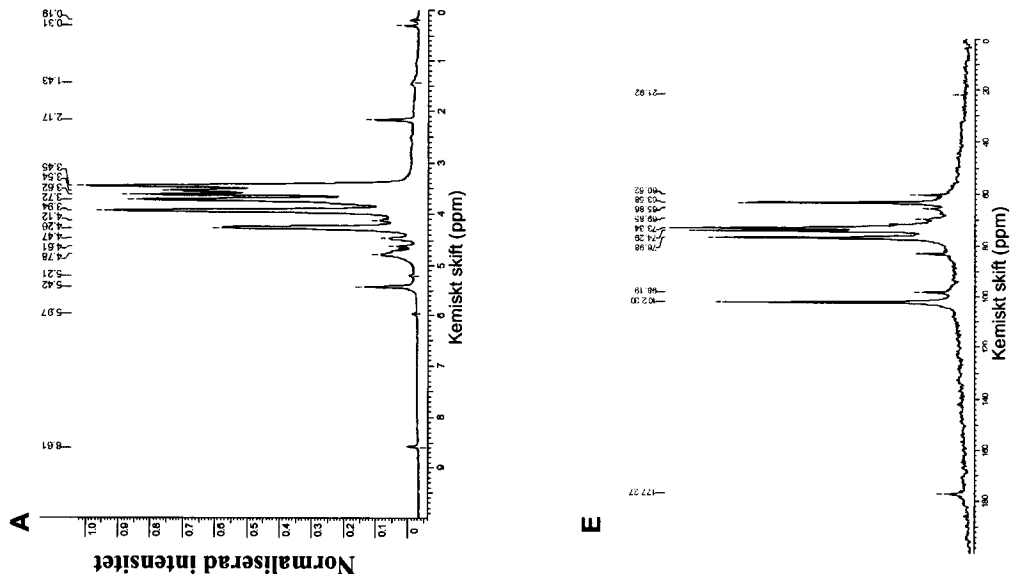


Figur 18

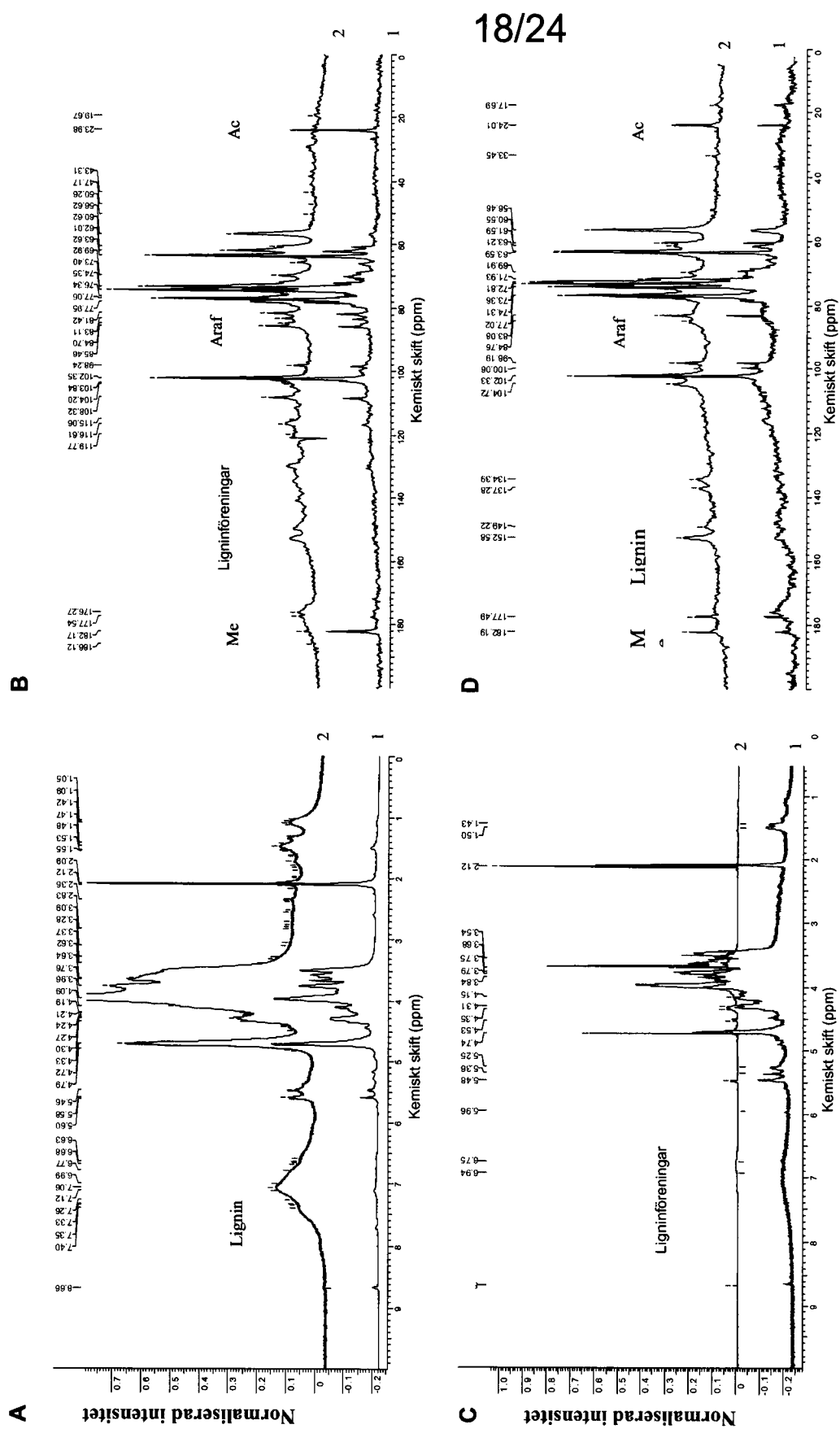
16/24



Figur 19

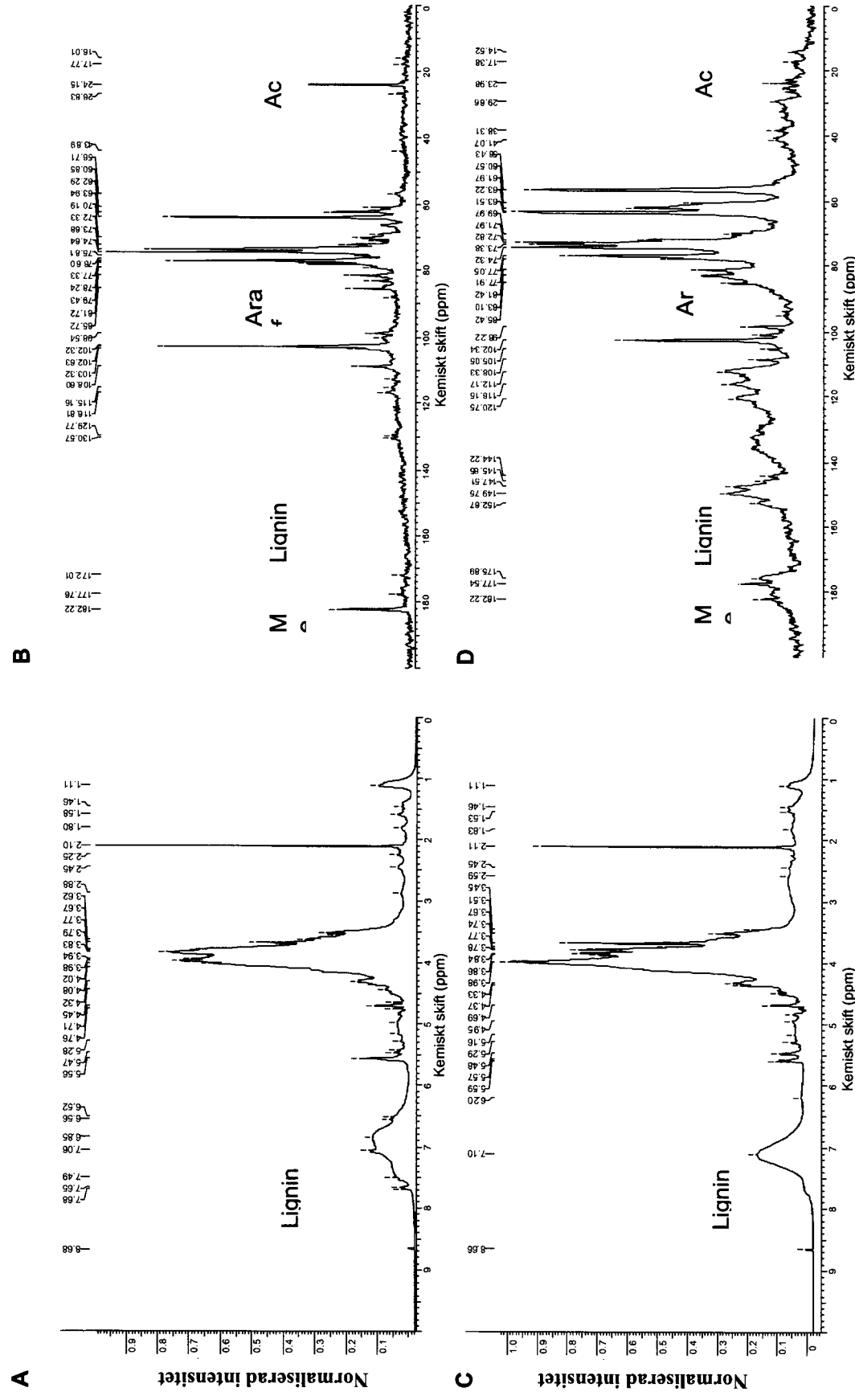


Figur 20



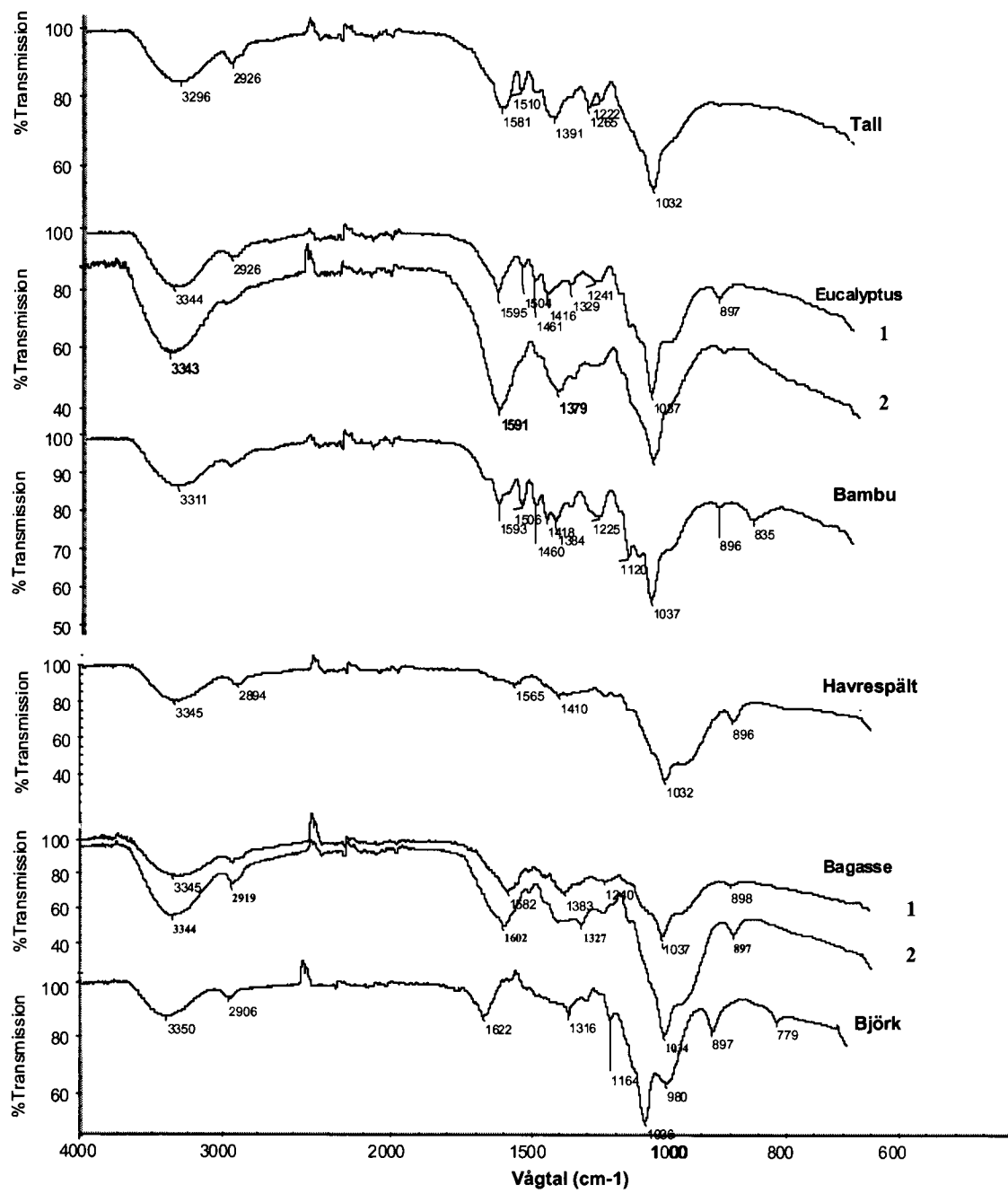
18/24

Figur 21

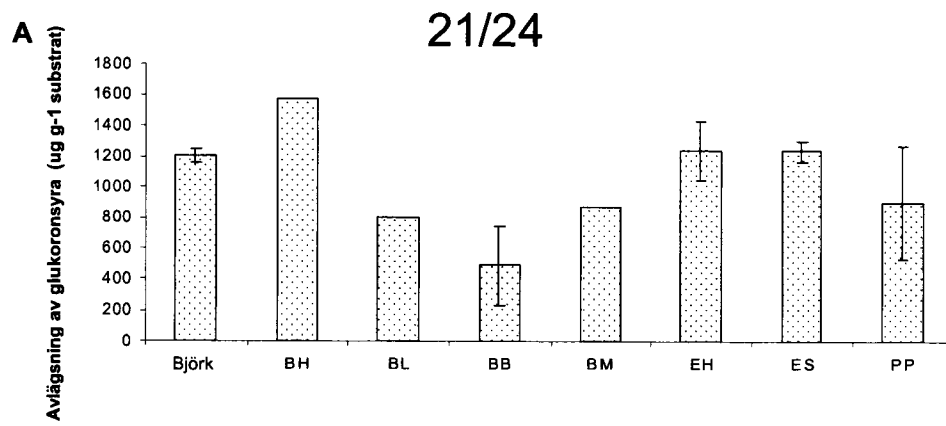


Figur 22

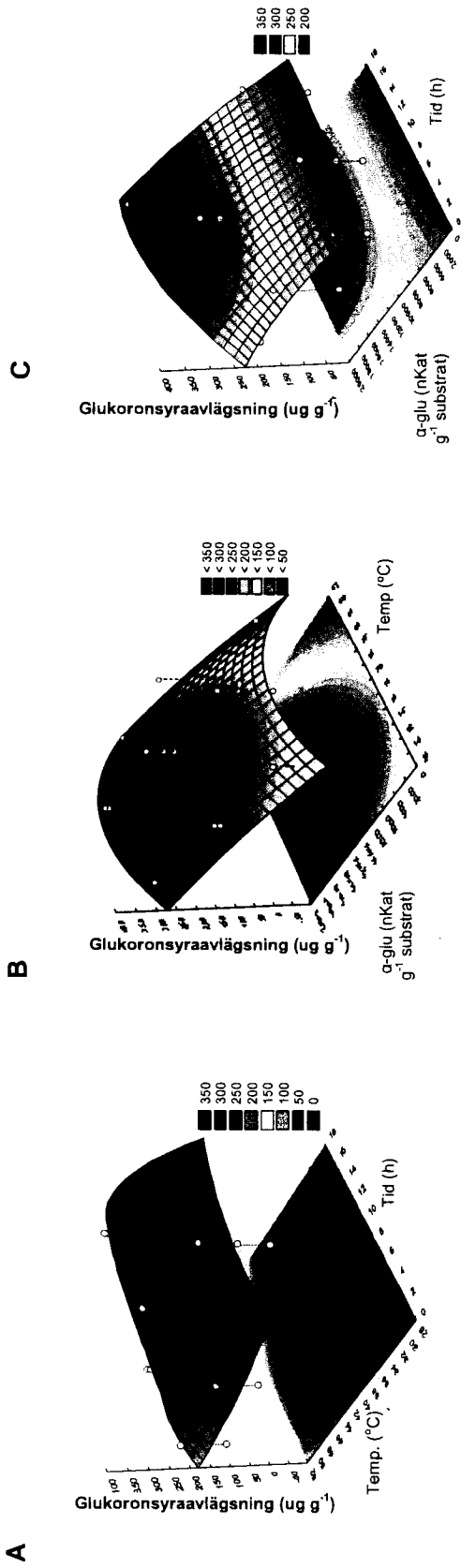
20/24



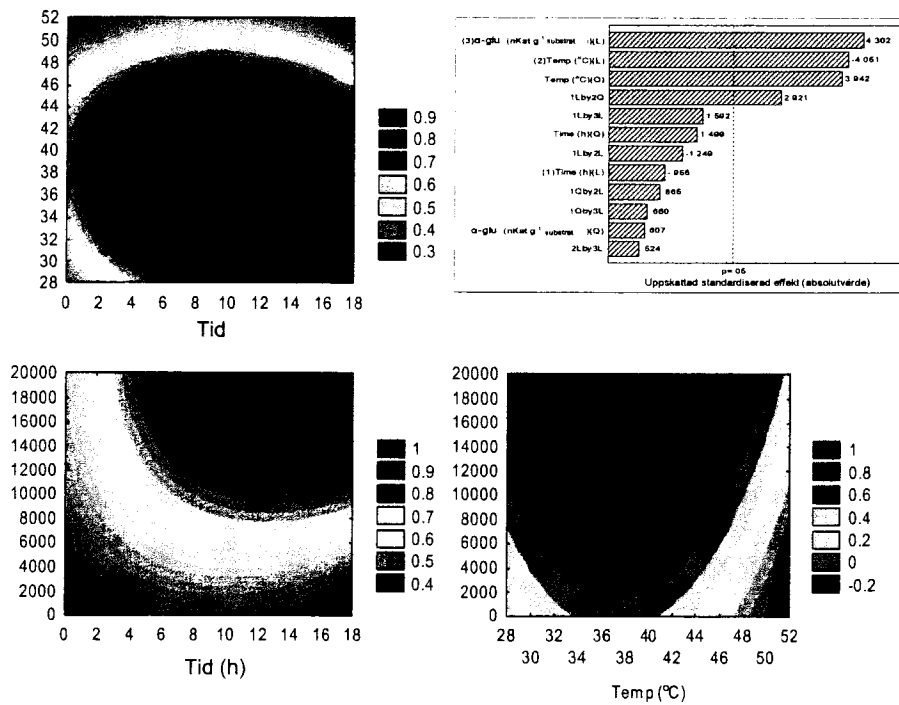
Figur 23



Figur 24



Figur 25



Figur 26

Hydrolysparameter och förhållande	Regressions-koefficient	Koefficienter i ekvationer för frisättning av glukuronsyra $f(x,y)$		t(17)	p
Glukuronsyrafrisläppning = $f(\text{tid, temperatur, specifik AbfB-nivå})$ $R^2 = 0,90$ (R^2 justerad =0,81)					
Medel /interaktion	278,0162	b_0	b_0	13,9314	<0,01
Huvudeffekter					
Temp °C (Q)	-70,9028	b_{22}	b_2	-3,9416	<0,01
(3) α -glu (nKat/g substrat) (L)	66,164		b_3	3,8280	<0,01
(2)Temp°C (L)	-38,087	b_2	b_2	-2,2040	<0,01
(1)Tid (h)(L)	35,295	b_1		2,0420	<0,05
α -glu (nKat/g substrat) (Q)	-10,911	b_3	b_3	-0,6070	0,057
Tid (h) (Q)	-26,958	b_{22}	b_{22}	-1,4990	0,552
Interaktioner					
1L genom 2Q	-71,385	b_{122}	b_{122}	-2,9210	<0,01
1L genom 2L	-21,584	b_{12}	b_{12}	-1,2490	0,229
1Q genom 2L	-21,151	b_{112}	b_{112}	-0,8650	0,399
1Q genom 3L	-16,121	b_{113}	b_{113}	-0,6600	0,518
1L genom 3L	27,506	b_{13}	b_{13}	1,5920	0,139
2L genom 3L	9,056	b_{23}	b_{23}	0,5240	0,607

Notering: 1 =tid eller xylanlast, 2 = temperatur, 3 = enzymxylanspecifik dosering, L = linjär, Q = kvadratisk, R^2 = linjär regressionskoefficient, $b_1, \dots, b_n$ = modellregressionskoefficient, bokstäver och siffror i fetstil = signifikans.

Figur 27