

BIOKONVERZIÓK, BIOTRANSZFORMÁCIÓK

Oxidációs, redukciós átalakítások



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

1

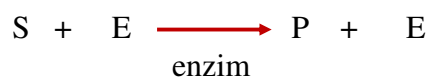
BIOTECHNOLÓGIAI ELJÁRÁSOK

De novo FERMENTÁCIÓK



mikroorganizmus
növényi sejttenyészet
állati szövettenyészet

BIOTRANSZFORMÁCIÓK



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

Enzimes és mikrobiális biokonverziók

MIVEL TÖRTÉNIK?

ENZIMEKKEL ➤ OLDOTT, RÖGZÍTETT

- SEJTEKKEL ➤ NÖVEKEDŐ SEJTEKKEL
(fermentáció: AcOH, szorbóz, glükonsav)
- NYUGVÓ SEJTEKKEL
 - RÖGZÍTETT sejtekkel
 - TÖBBFÁZISÚ RENDSZEREKBE



Enzimes és mikrobiális biokonverziók

Tulajdonságok, jellemzők: mint az enzimtulajdonságok

- Szubsztrátspecifitás – csak egy adott szubsztrát
- Régióspecifitás – a S egy adott helyén, részterületén
- Sztereospecifitás - enantiomerek felismerése
S és P oldalon
- kirotechnológia: a szerves kémikusok új eszköztára
- Csoportspecifitás – egy funkció csoportot alakít át
- Enyhe reakciókörülmények – T, p, pH



EC reakciótípusok

REAKCIÓTÍPUS	ENZIMCSOPORT	REAKCIÓK
Oxidációk és redukciók	EC 1.	Hidroxilálás, dehidroxilezés, epoxidálás, C-C kötés hidrogénezése,- dehidrogénezése, alkoholok, aldehidek oxidációja, alkil-, karboxialkil-, ketoalkil láncok oxidatív lebontása, szubsztituensek oxidatív eltávolítása, oxidatív dezaminálás, oxidatív gyűrűfelyítés, szerves savak, aldehidek, ketonok redukciója, heterofunkciós csoportok redukálása, szubsztituensek redukatív eliminálása
Hidrolízis	EC 3.	észterek, aminok, amidok, laktonok, éterek, laktámok hidrolízise
Izomerizáció	EC 5.	kettős kötés és oxigén tartalmú csoport áthelyezés, racemizálás, intramolekuláris átrendeződés
Kondenzáció (transzferázok, liázok)	EC 2. EC 4.	dehidratálás, O-és N-acilezés, glikozilezés, észterezés, laktonizáció, aminálás
Új kötés létrehozása	EC 6.	C-C , C-O, C-P, C-N kötések kialakítása



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5

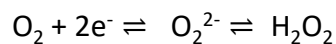
Oxidációs, redukciós átalakítások Oxidáció oxigénnel

1. Oxidáció oxigénnel

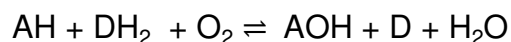
Biológiai oxidációkban az O₂ vagy mint **végső elektronakceptor** működhet, vagy közvetlenül **beépül** a szerves molekulába.

Az EC1. enzimcsoporton (oxidoreduktázok) belül 3 alcsoport

EC 1.1.3 *oxidázok vagy elektrontranszferázok* (egyik oxigén atom sem épül be a szubsztrátba, például EC 1.1.3.4 glükózoxidáz):



EC 1.13.12 monooxygenázok vagy hidroxilázok (az egyik oxigén atom épül be a szubsztrátba, például szteroid hidroxilázok):

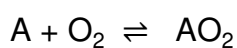


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

6

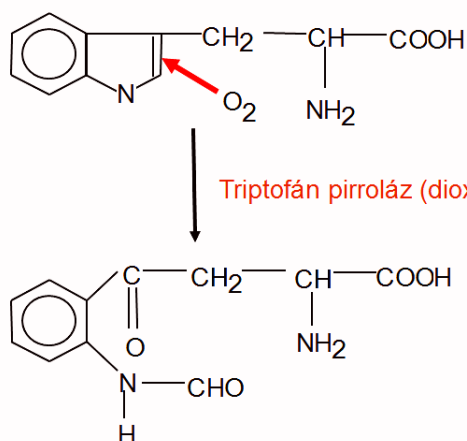
Oxidáció oxigénnel

EC 1.13 *dioxigenázok vagy oxigéntranszferázok* (mindkét oxigén atom beépül a szubsztrátba, például triptofán-pirroláz (EC 1.13.11.11 tryptophan 2,3-dioxygenase):



L-triptofán

N-formil-kinurenin



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

7

Oxidáció dehidrogénezéssel

1.1.1 DEHIDROGENÁZOK

Az oxigén nem közvetlenül a szubsztráttal reagál, hanem a hidrogéneket redukált koenzimek viszik át $\rightarrow H_2O$

- koenzim szükséglet :
- NADH , NADPH
 - FADH₂
 - Ubikinon
 - PQQ (pirrolo-kinolin-kinon)

1. Primer alkoholok oxidációja
2. Szekunder alkoholok (cukrok) oxidációja
3. Aldehidek (cukrok) oxidációja



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

8

Primer alkoholok oxidációja: ecetsav képződése

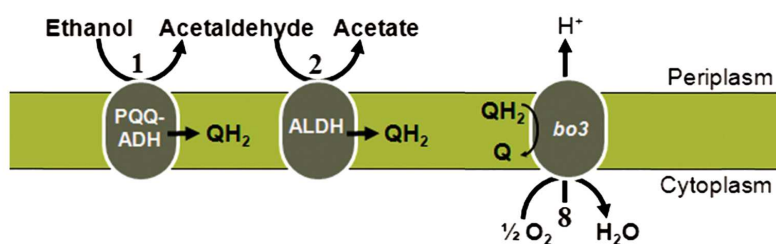


A folyamat két lépésben megy végbe, az etanol előbb acetaldehiddé oxidálódik (alkohol-dehidrogenáz), majd az aldehid oxidálódik ecetsavvá (aldehid dehidrogenáz).

Az ADH prosztetikus csoportja PQQ (pirrolo-kinolin-kinon), ez veszi át a hidrogéneket, majd ubikinonnak adja át.



Az ecetsav képződés biokémiája



Az enzimek a citoplazmamembránba épülnek be. A hidrogéneket ubikinonnak adják át. Az ubikinol visszaoxidálása során a terminális oxidációhoz hasonlóan molekuláris oxigénnel víz képződik és proton exportálódik a periplazmikus térbe. A protonok visszaáramlásával a sejt ATP-t termel, így nyer energiát a folyamatból.



Ipari ecetsavgyártás

Törzs: *Acetobacter aceti* → sok rokon és hibrid törzs

Technológiák: Orleans-i eljárás (borecet, XIV. század)
generátor eljárás (bükkforgács töltet felületén biofilm)

szubmerz eljárás (Frings acetátor)

O₂ ellátás kritikus

S és P szint is kritikus

etanol RÁTÁPLÁLÁS

erős hőfejlődés (455 KJ/mol)

15-19% ecetsav koncentráció



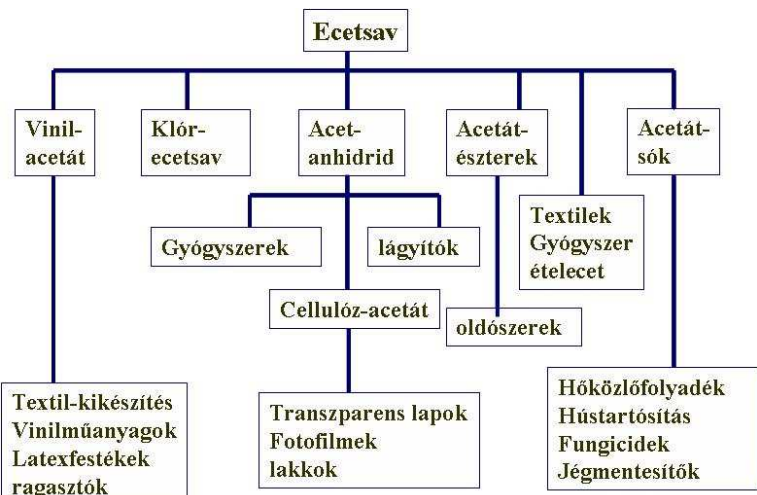
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

11

Az ecetsav felhasználása

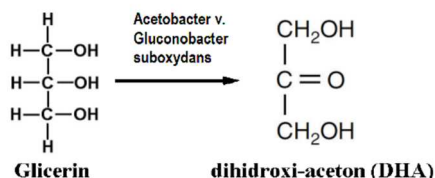
Direkt felhasználás: erős savként
vízkőoldás
élelmiszeripar: tartósítás

Vegyipari alapanyagként:



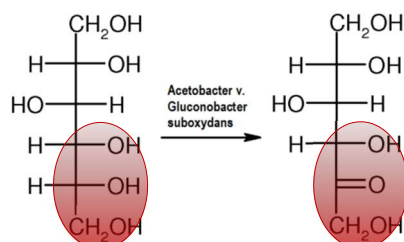
12

Szekunder alkoholok oxidációja



Az *Acetobacter/Gluconobacter suboxydans* enzime csak olyan szekunder hidroxil-csoportot képes oxidálni, amelynek szomszédságában két cisz helyzetű alkoholos OH található.

Bertrand szabály (1904)



Szorbit – szorbóz átalakítás



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

13

Szorbóz fermentáció

Technológia:

alapanyag: lebontott keményítő (glükóz) szörp

hidrogénezés: Raney-Ni-lel → szorbit

mikrobák: *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter (Gluconobacter) suboxydans* → Ni-hez szoktatás!!!

rátáplálásos eljárás: 10-20% szorbit → 33-35% szorbit

konverzió: >95%

folytonos technológiák is !

nyugvósejtes fermentációk is!

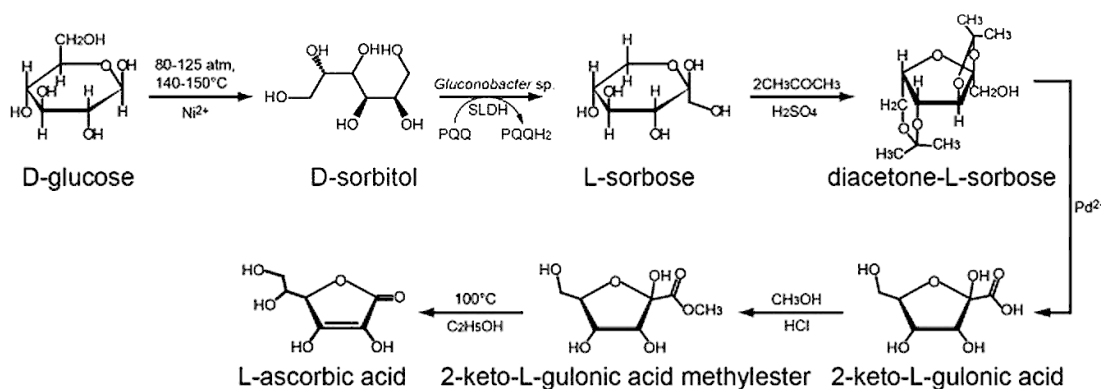


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

14

Aszkorbinsav előállítás

Szorbit–szorbóz átalakítás a klasszikus aszkorbinsav gyártás egyetlen biokonverziós lépése. (Reichstein 1934)



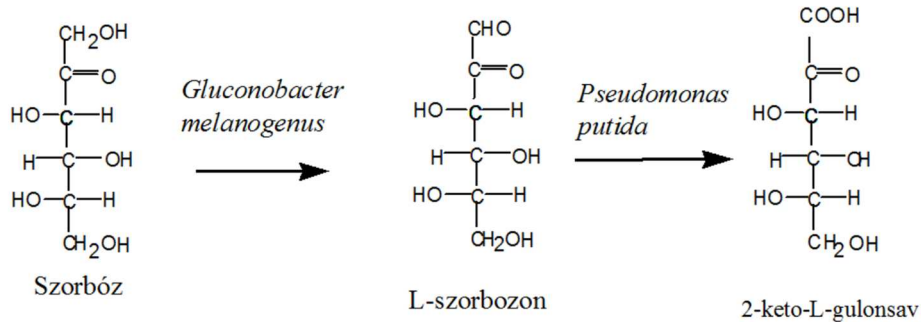
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

15

Aszkorbinsav előállítás

Az aszkorbinsav gyártásnak több változatát is kidolgozták, ezekben több biokonverziós lépés is szerepel.

Pl. a 2-keto-gulonsav kialakítása kémiai út helyett megoldható két biotranszformációval is:

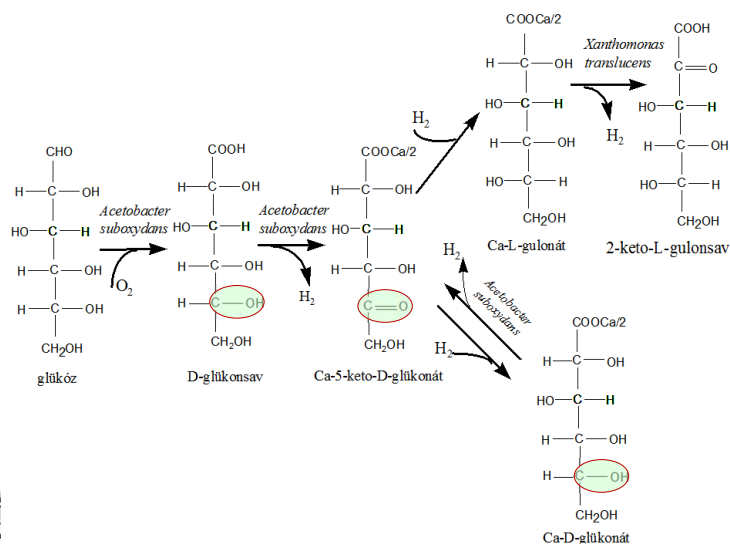


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

16

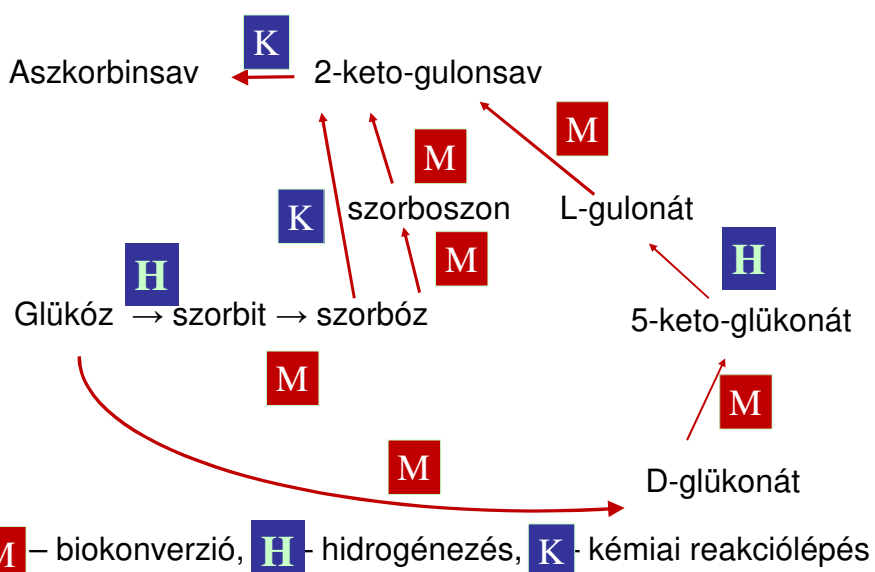
Alternatív aszkorbinsav előállítás

Az *Acetobacter suboxydans* és a *Xanthomonas translucens* szelektív oxidációival más úton is eljuthatunk a 2-keto-gulonsavhoz:



17

Aszkorbinsav előállítások összefoglalása



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

18

Aszkorbinsav gyártás

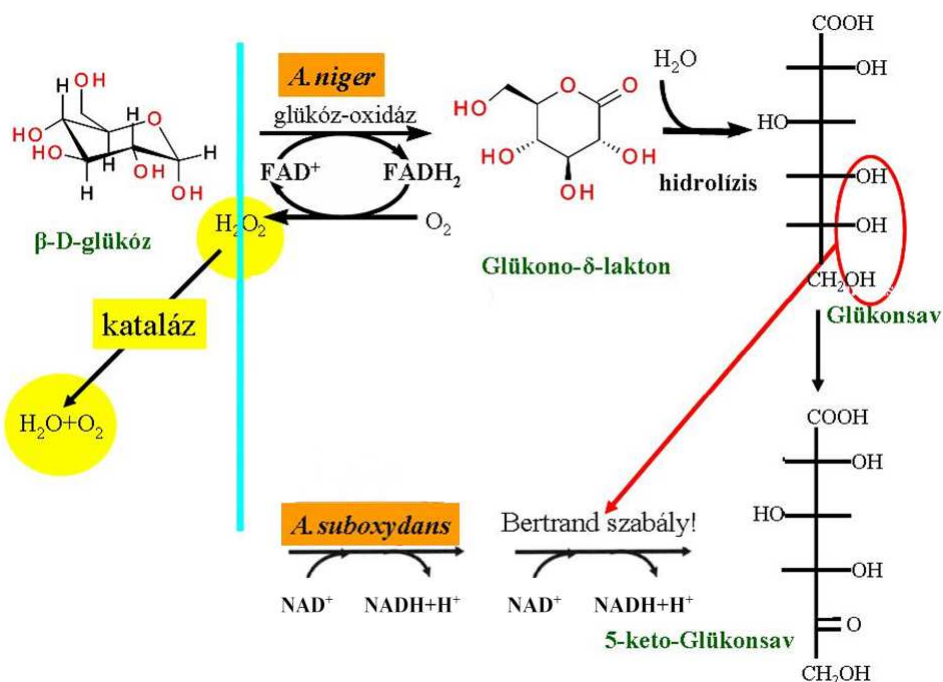
Éves piac: 100-120.000 t/év, ennek 80%-át Kína termeli (+ BASF, Takeda, DSM, Merck) a klasszikus eljárással.

Fejlesztések: glu vagy gal $\xrightarrow{\text{de novo}}$ C-vitamin
 rec. *S. cerevisiae*

De novo növényi sejtekkel: *Rosa rugosa* 1-2% glükóz, fruktóz, galaktóz alapon.



Aldózok oxidációja: glükonsav gyártás



Redukáló cukrok oxidációja 1 Aldózok oxidációja: glükonsav gyártás

Glükóz oxidációja: lehet elektrokémiai, vagy HOCl-os oxidációval is, de inkább biokonverzióval glükózból.

Aspergillus niger: az első lépésben glükono-laktont állít elő, ez spontán hidrolizál glükonsavvá. Az O_2 nem találkozik a szubsztráttal, hanem a FAD prosztetikus csoportok H_2O_2 -dá alakítják. Ezt a kataláz elbontja.

Az *A/G. suboxydans* egy lépésben hajtja végre a reakciót (NAD koenzimmal), de tovább is oxidál 5-keto-glükonsavvá (Bertrand szabály). Ez a reakció a körülmények beállításával visszaszorítható (pH=7, t=37 °C).



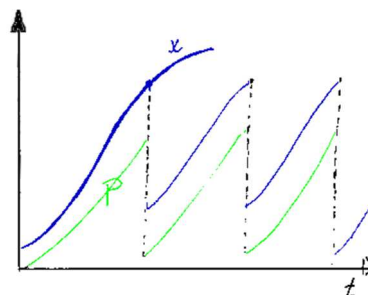
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

21

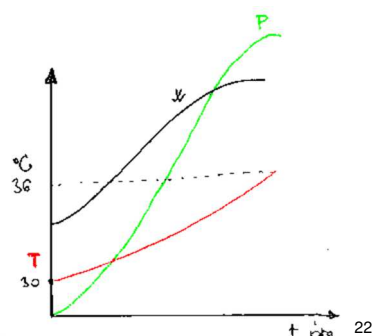
Glükonsav gyártási technológiák

A keletkező savat közömbösíteni kell - pH szabályozás (~7), $CaCO_3$ -tal.

Félfolytonos fermentáció: részleges lefejtés és feltöltés.



A növekedés és a termékképződés optimális hőfoka nem esik egybe (30 ill. 36 °C). A váltást nem lépcsősen végzik, hanem kiszámolták az optimális hőfokprofil:



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

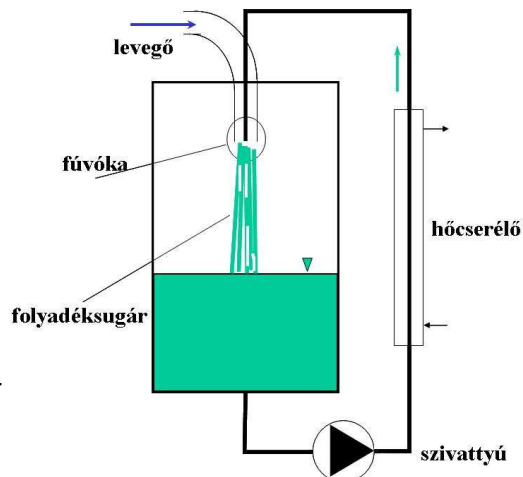
22

Más glükonsav gyártási technológiák

Kétlépcsős Vogelbusch technológia:

1. MeOH-on kemosztát folytonos technológiával *Acetobacter metanolicus* sejtömeg előállítás
2. Biokonverzió nagy glükóz koncentráció mellett Vb-IZ reaktorban (becsapódó sugaras levegőztetés)

Létezik **tisztított glükózoxidáz** technológia is (ARGONNE, USA) különleges integrált rendszer: elektrodeionizálással semlegesítik a keletkező savat.



A glükonsav és a glükóz-oxidáz felhasználása

Ipar: páclé, sütőpor,
fémfelület tisztítás
kation-bevitel (Cu, Fe, Ca) E574-579
kristályok helyett ~50% oldat, sav \Rightarrow lakton (E575)

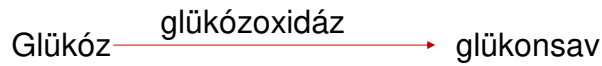
*A glükóz-oxidáz/kataláz rendszer: glükóz eltávolítása tojásfehérjéből (sütőipar, szárítás előtt). Enzimkeveréket használnak (165 U/kg) hozzáadott H_2O_2 -dal (kb 0.1 % w/w) biztosítják a szükséges molekuláris oxigént.

* O_2 eltávolítás a palackozott és dobozott italok, konzervek fejtérforatából, eliminálandó a nem enzimes barnulást ill. egyéb oxidációs folyamatokat.

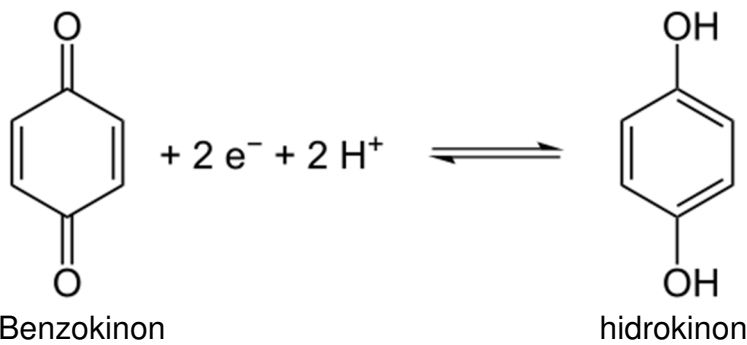


A glükóoxidáz mellékreakciója

Kinon redukciója:



Az O₂ helyett a kinon lehet az elektron akceptor, ez veszi fel a hidrogéneket.

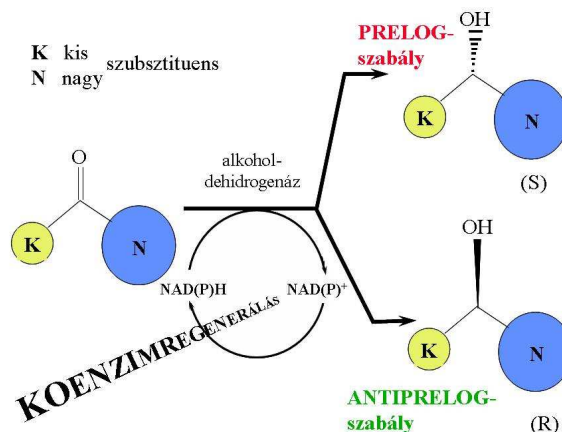


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

25

Ketonok redukciója szekunder alkoholokká

Ezt a redukciót az alkohol dehidrogenázok sztereoszелеktivén végzik. A legtöbb enzim a Prelog-szabály szerint redukál: a kis és nagy méretű szubsztituensek elhelyezkedése:



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

26

Ketonok redukciója szekunder alkoholokká

Példa a Prelog szabályra:

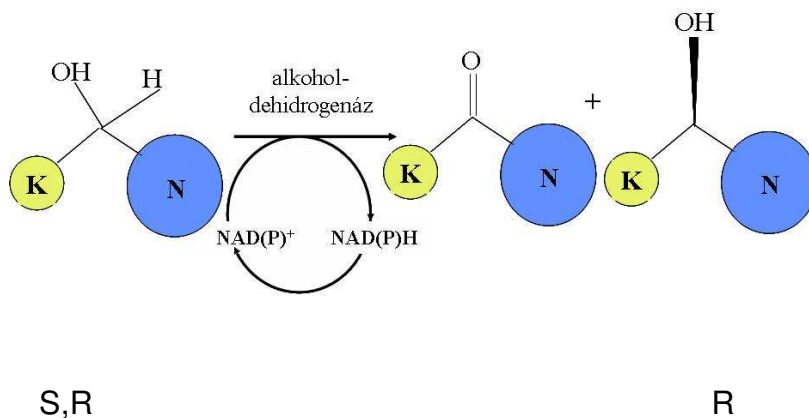


Találtak olyan enzimeket is, amelyek az anti-Prelog szabály szerint redukálnak \rightarrow tetszés szerint irányíthatjuk a reakciót.



„Prelog” enzimek

Az enzimek sztereoszelektivitása oxidációs irányban lehetővé teszi racém keverékek reszolválását is:

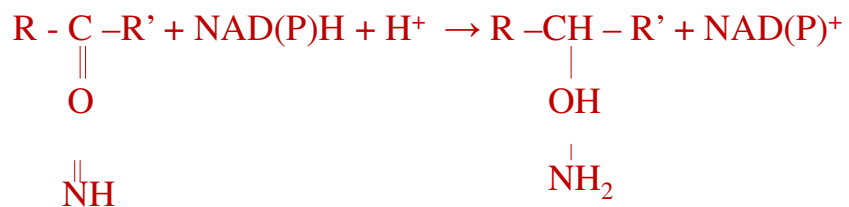


BIM SB
2001

Királis redukciók

Prokirális vegyület

Királis vegyület



Ketonok, ketosavak \longrightarrow Alkohol
Iminek, iminosavak \longrightarrow Aminosav



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

29