

EC 2. TRANSZFERÁZOK:

EC 2.4. Transzglykizálás v. transzglykizálás

$$R_1-O-R_2 + \boxed{R_3OH} \rightleftharpoons R_1-O-R_3 + R_2-OH$$

↓

Glikozil donor:
Aktivált hexóz:
UDP-,GDP-glükóz,
hexóz-foszfát,
di-, tri-, ... poli-
szacharid
(és aktivált...)

↓

Akceptor:
alkohol,
mono-, di-,
poliszacharid

↓

Termék lehet:
glikozid,
di-, tri-, ... poli-
szacharid

↓

**Mellék-
termék**

Helyettesítettek is! Hexózamin, metilszármazékok.....

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

1

Transzglykizálás

glükóz -1 - P_i + fruktóz $\xrightarrow{\text{Pseudomonas}}$ szacharóz + P_i

nem feltétlenül kell nagy energiájú kötés

2. 4. x.x. Glikoziltranszferázok
 2.4.1.x : hexozil-transzferázok
 2.4.2.x: pentozil-transzferázok

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

Transzglykizálás

maltóz + maltóz $\xrightarrow{\text{Aspergillus niger}}$ glükóz(1→6)glükóz(1→4)glükóz + glükóz

donor akceptor

2 glükóz(1→4)glükóz energia nélkül is megy a folyamat


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

3

Mikrobiális poliszacharidok

Kapszuláris poliszacharidok (CPS):
 szintézis: intracelluláris, sejtfal, tok-, kapszula-nyálka
 Iparilag nem jelentősek

Extracelluláris poliszacharidok (EPS):
 szintézis: intracelluláris, vagy a sejtmembránon történik
 – végül kikerül lébe
 vagy a sejten kívül, biotranszformációval
 Ezeket gyártják: gélesítők, sűrítők, extrém reológiai tulajdonságok.



4

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Mikrobiális poliszacharidok			
poliszacharid	mikroorganizmus	szerkezet	felhasználás
cellulóz	Acetobacter	lineáris β -(1→4)-glükán	Mikrofibrilláris élelmi rostként
kurdlán	Agrobacterium <i>Alcaligenes faecalis</i>	lineáris β -(1→3)-glükán	Gélek, élelmiszeripar
pullulán	<i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Pullularia pullulans</i>	lineáris $2^* \alpha$ -(1→4), α -1*(1→6)-glükán	Erős rost- és filmképző (cellofán helyettesítő)
szkleroglükán	<i>Sclerotium rolfai</i> , <i>Sc. glucanicum</i>	lineáris β -(1→3)-glükán β -(1→6) elágazásokkal	Festékipar
gellán	<i>Pseudomonas elodea</i>	Lineáris heteropoliszacharid β D-Gl-(1→4)- β D-GlcA- (1→4)- β D-Gl-(1→4)- - α D-Rha-(1→3)-	Agar és karragén helyettesítő, Élelmiszadalék.
alginát	<i>Macrocystis pyrifera</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Azotobacter vinelandii</i>	$6^* \beta$ D-MannA-(1→4)- - $6^* \beta$ D-GlcA-(1→4)	Főleg az alga eredetűt használják: enzimmög-zítés, élelmiszerek

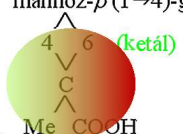
Xantán

Szerkezete: öt cukoregységből és két karbonsavból álló monomerek ismétlődnek.
 Móltömeg: 2-15 millió 2-3 lánc spirált alkothat

→4)-glükóz- β (1→4)-glükóz β (1→

3
↑
1 α

mannóz- β (1→4)-glükuronsav- β (1→2)-mannóz-OAc
(észter)



11

Dextrán

Szerkezete: elágazó láncú glükóz polimer, mint az amilopektin, de: a kötések túlnyomó része (1-6), mellette kevés (1-4), (1-2) és (1-3).



7

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

A dextrán előállítása

Bioszintézise:

Szacharóz $\xrightarrow[\text{Dextrán - szacharáz}]{\text{Leuconostoc mesenteroides}}$ dextrán + (n-1) Fruktóz

Az enzim leveszi a glükózt a szacharózból és rákapcsolja a glükóz lánc végére. (Legelső alkalommal: egy szacharóz glükózára.) Nincs előtte hidrolízis, egy lépéses a reakció.

Irreverzibilis: ~100% a konverzió

Lehetne az enzimet tiszta formában kinyerni (extracelluláris), de a fermentáció végrehajtani gazdaságosabb.

8

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

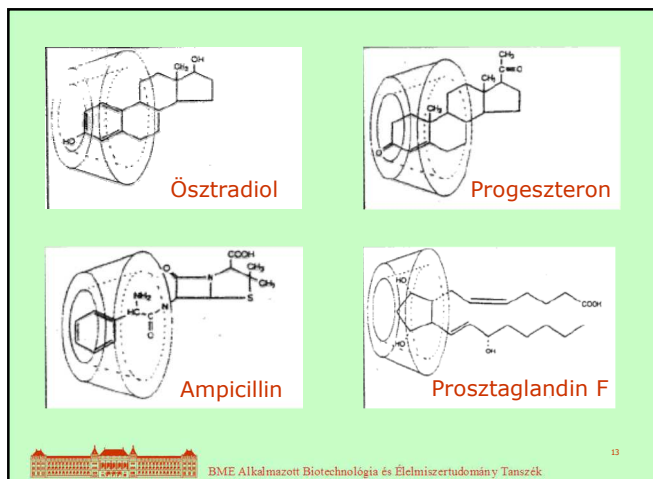
A dextrán előállítása

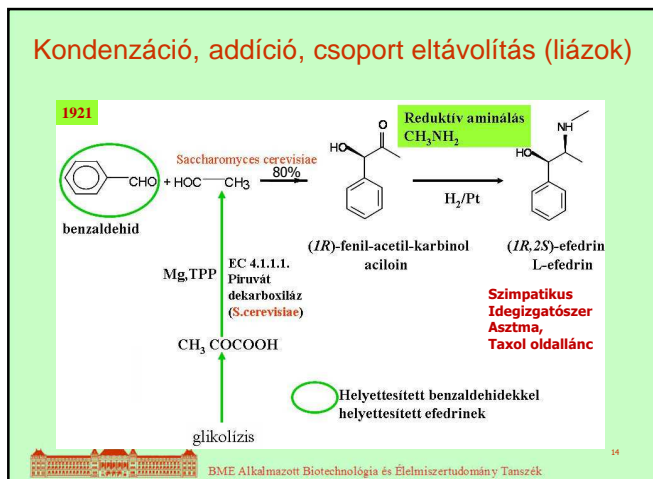
BIOGAL technológia:

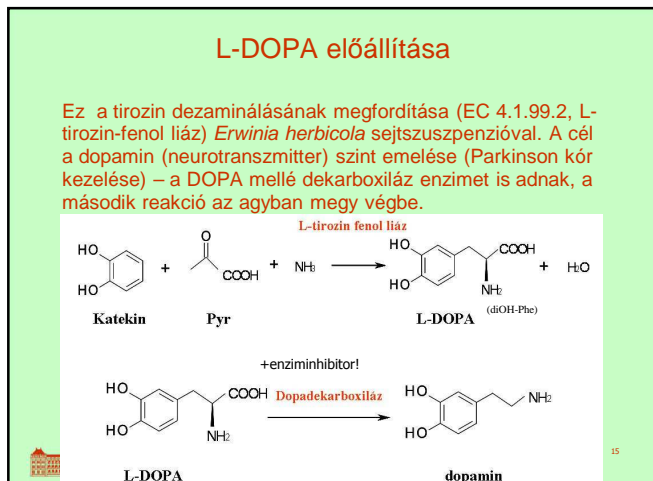
- *L. mesenteroides* – tejsavbaktérium, anaerob
- előbb a sejtszaporítás, aztán a terméképzés
- tápoldat: 10-20% szacharóz + 2% CSL + foszfát
- levegőztetés nem kell, csak keverés
- pH szabályozás: min 5,0–5,2 , a képződő tejsavat közömbösíteni kell
- 0,5 g/l baktérium ~80 g/l dextránt (átlagos móltömeg: ~500.000) termel, + esetleg a fruktóz is hasznosítható
- Kinyerés: kicsapás alkoholokkal, szűrés
- Felhasználás: vérplazmapótló, Sephadex

9

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

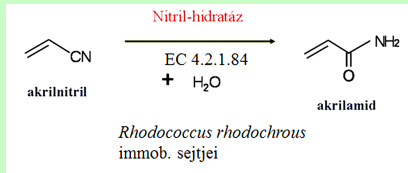






Akrilamid előállítása

...akril-nitrilből. Van kémiai eljárás (Cu katalizátorral), de az enzimes jobb



1984, Mitsubishi Rayon (J) 100.000 t/év
 Óriás enzimek: 4-5 alegység, 130 kD, 18-20 db 520 kD
 Optimális hőmérséklet 35 °C, de 10 °C-on végzik, hogy ne polimerizáljon.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

16

Akrilamid előállítása

Nitto (J) technológia: rátáplálásos eljárás, 2×10^6 U/dm³ enzim-aktivitással

Produktivitás: 80 kg/m³h, konverzió: 99,9%

A biokonverzió előnyei:

	Kémiai eljárás	Enzimes eljárás
Reakció hőmérséklete	70 °C	0-15 °C
konverzió	70-80%	99,9%
Töményítés a feldolgozásnál	szükséges	nem szükséges
Energia igény (gőz,elektomos)	1,9 MJ/kg	0,4 MJ/kg
CO ₂ termelés	1,5 kg CO ₂ /kg	0,3 kg CO ₂ /kg

Az akrilamid → poliakrilamid: koagulátor, talajkondicionáló, papírgyártás

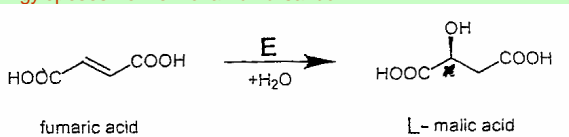


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

17

ADDÍCIÓS REAKCIÓK: almasav előállítása

Egylépéses konverzióval fumársavból.



Törzs: *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum* nyugvósejtes tenyészet

Enzim: EC 4.2.1.2 fumaráz, sztereoszelektív, csak L-malátot termel.

Körülmények: pH = 8, t = 25 °C

Egyensúly: 15 : 85 arányból (oldatban) →



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

18

Glükóz-izomerázok

Több enzim is termel fruktózt:

Glükóz-P-izomeráz (EC 5.3.1.9. *D-Glucose-6-phosphate-ketol-isomerase*)

- *E. intermedia*
- *Aerobacter aerogenes*
- *Aerobacter cloacae*


Ezeknek foszforilált szubsztrát kell, és arzenát a kofaktoruk ☞

Glükóz-izomeráz (EC 5.3.1.18. *D-glucose-ketol-isomerase*)
 Heterofermentatív tejsavbaktériumok - kis hőfokoptimum

D-xilóz-izomeráz (EC 5.3.1.5. *D-xylose-ketol-isomerase*)

Előnyök:

- alacsony pH optimum (nem termel pszikózt)
- nagy fajlagos aktivitás
- hőfokoptimum 60-80°C
- nincs koenzim



22
 BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék


Glükóz-izomerázok

Többféle mikroorganizmussal is termelik (minden cég megtalálta a sajátját) →

Eredetileg induktív enzimek, de ma már konstitutív mutánsokat használnak.

Intracelluláris enzim, nehéz kinyerni, ezért a sejteket vagy a feltárt törmeléket immobilizálják sokféle technikával →

- a sejteket keresztkötés létesítéssel rögzítik,
- porlasztva szárítás → enzim-por,
- fagyasztva szárítás → enzim-pelyhek
 → extrudált enzim-rudacsok




23
 BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Table 2. Commercial immobilized glucose isomerase preparations

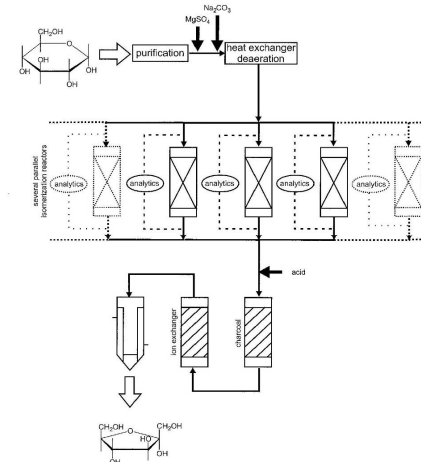
Company	Enzyme source	Immobilization procedure
Clinton Corn Processing	<i>Streptomyces ribiginosus</i> , <i>S. wedmorensis</i>	Enzyme adsorbed on ion-exchanger
Novo Industry	<i>Bacillus coagulans</i>	Enzyme mixed with inorganic diluent and formed into solid spheres or cell lysate cross-linked with glutaraldehyde
Miles Laboratory	<i>Streptomyces olivaceus</i>	Glutaraldehyde cross-linked whole cells
Miles Kali Chemie	<i>Streptomyces</i> sp.	Heat-fixed cells cross-linked with glutaraldehyde
Snamprogetti	<i>Streptomyces</i> sp.	Enzyme entrapped in cellulose triacetate fibres
Gist Brocades	<i>Actinoplanes missouriensis</i>	Cells entrapped in gelatine, and cross-linked by glutaraldehyde
Mi-Car Int.	<i>Streptomyces olivaceus</i>	Glutaraldehyde cross-linked whole cell granules
ICI Americas Inc.	<i>Arthrobacter</i> sp.	Flocculated cells extruded and dried as cylindrical pellets
CPC Int. Inc.	<i>Streptomyces olivochromogenes</i>	Adsorption on alumina/other ceramics/ ion-exchange resin
Corning Glass Works	<i>Streptomyces olivochromogenes</i>	Enzyme adsorbed on controlled pore alumina
Sanmatsu	<i>Streptomyces</i> sp.	Enzyme adsorbed on anion exchange resin
Denki Kagaku-Nagase	<i>Streptomyces phaeochromogenes</i>	Cells entrapped in polymer and granulated


„IZOCUKOR” (HFCS) GYÁRTÁS

1. A glükóz szirupot előtte alaposan meg kell tisztítani (szűrés, aktív szén, ioncsere, ne legyen Ca^{2+} ion).
2. Immobilizált sejteket alkalmaznak oszlopokban, az oszlopok hatékonyságát folyamatosan mérik.
3. Élettartam: $t_{1/2} = 100-600$ nap, de -12,5% után cserélik
4. Termék: nem egyensúlyi összetételű, G:F = 53:42, mert le kell rövidíteni a kontaktidőt (melléktermékek).
5. Kromatográfiával (ioncsere és kizárás egyszerre) a fruktóz tartalmát fel lehet emelni (akár 90%-ig).
6. Nem kristályosítható, csak koncentrálnak = HFCS
= High Fructose Corn Syrup = izoszörp
cukortartalma ~70% ennek 55%-a fruktóz


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék
26

„IZOCUKOR” (HFCS) GYÁRTÁS





„IZOCUKOR” (HFCS) GYÁRTÁS

Magyarországon 1978-82 között Szabadegyházán 4 milliárd (akkori) forintot beruházással egy évi 140.000 tonna kapacitású kukorica-feldolgozó üzem létesült. Azóta ~1 Mt-ra! bővült, ez az össz EU kvóta 27%-a.

Komplex kukorica hasznosítás = BIOREFINERY

Folyékony cukor	49.500 t sz.a./év
Finom szesz	200.000 absz. hl/év
Kukoricacsíra	10.000 t/év
Glutén	6.300 t/év
Takarmány	30.000 t/év

Az első folyékony cukor üzem Európában.
Világtermelés: ~7 Mt/év
Felhasználás: édes-, tej- és sütőipar, italok


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék
27

ENZIMES RESZOLVÁLÁS

Általában: a racém (DL) elegyek komponenseinek szétválasztása. Pl. az aminosavaknál csak a L-forma biológiailag aktív, ezt kell előállítani, használni.

Két fő út:

- aszimmetrikus szintézis,
- aszimmetrikus hidrolízis

Mindkettőnél az enzimek sztereospecifitását használják ki.

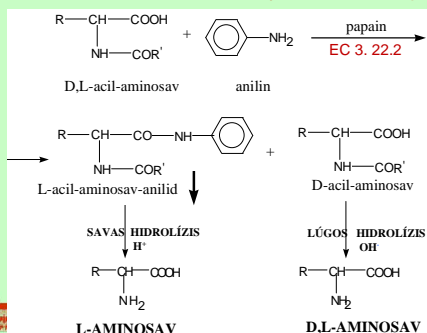


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

28

RESZOLVÁLÁS: Aszimmetrikus szintézis

Aszimmetrikus szintézis : i-Leu, Lys, Met, Phe, Trp, Val



29

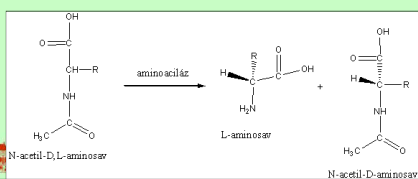
RESZOLVÁLÁS: aszimmetrikus hidrolízis

A racém aminosav keverékre olyan funkciós csoportot kötünk, aminek eltávolítására van sztereoselektív enzim.

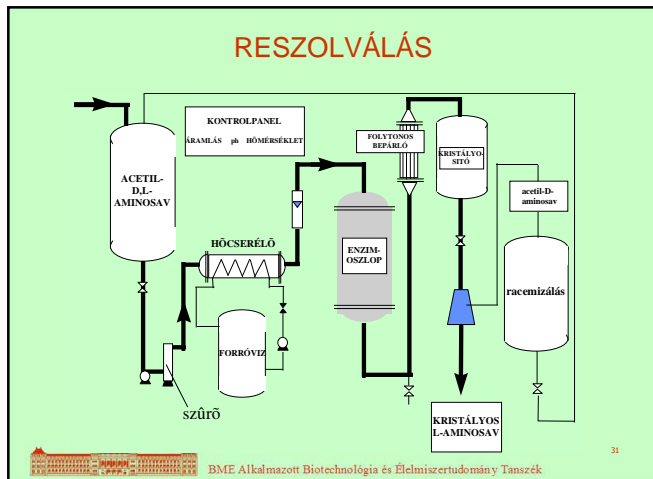
Típusreakció: N-acilezés, majd hidrolízis aminoacilázal.

Az aminoaciláz csak az L-aminosavakat szabadítja fel, a D-származék megmarad. Ez utóbbit lúgos főzéssel racemizálják, újra acilezik, és visszaviszik a folyamat elejére.

Az enzimet a penészgombák, pl. az *Aspergillus oryzae* termeli, sokféleképpen immobilizálják (Sephadex, acetilcellulóz, gélbezárás).



30



Aszimmetrikus hidrolízis

A metionin reszolválása (Degussa = Evonik eljárás).
 Oldott enzim, pH = 7,0 t = 37 °C Co²⁺ effektor

Feldolgozás: az L-Met kristályosítható, az enzimet ultraszűrőssel lehet visszanyerni.
 Ugyanez az eljárás alkalmazható még: Ala, Phe, Val, Leu, Trp, Tyr-ra.

1 = N-acetyl-methionine 3 = methionine
 2 = N-acetyl-methionine 4 = acetic acid

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Az aminosavgyártás megoszlása (2006)

Mennyiség t/év	Aminosav	Alkalmazott eljárás	Felhasználás
1.000.000	L-Glutaminsav	Fermentáció	Ízfokozó
350.000	L-Lizin	Fermentáció	Tak.kiegészítő
350.000	D,L-Metionin	Kémiai szintézis	Tak.kiegészítő
75.000	L-Treonin	Fermentáció	Tak.kiegészítő
10.000	L-Asparaginsav	Enzimes konverzió	Aszpartám
10.000	L-Fenilalanin	Fermentáció	Aszpartám
10.000	Glicin	Kémiai szintézis	Tápl.kiegészítő, édesítőszer
3.000	L-Cisztein	Cisztin-redukció	Tápl.kiegészítő, gyógyszer
1.000	L-Arginin	Fermentáció, extrakció	Gyógyszergyártás
500	L-Leucin	Fermentáció, extrakció	Gyógyszergyártás
500	L-Valin	Fermentáció, extrakció	Gyógyszergyártás
300	L-Triptofán	Nyugvósejtes konverzió	Gyógyszergyártás
300	L-Izoleucin	Fermentáció	Gyógyszergyártás

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

RESZOLVÁLÁS

Speciális módszer glutaminsavra:

D-Glu L-Glu L-pirrolidon-karbonsav

D,L-Glu

34

Aszimmetrikus hidrolízis lipázzal

A savamid kötések mellett az észter kötések aszimmetrikus hidrolízise is alkalmas rezolválásra.

(R,S)-acetil-racém keverék (R)-acetil-50% (S)-alkohol-50%

(Racemáz, vagy lúgos hidrolízis+acilezés)

35

Aszimmetrikus hidrolízis lipázzal

Egy béta-blokkoló molekula szintézise:

R,S-glicidát (R)-glicidát (S)-oxiranyl-metanol
(R)-észter (S)-alkohol

+RCOOH -HCl +H₂O -RCOOH
-HCl

3-Cl-propánoxirán 3-Cl-propánoxirán 2-oxiranyl-etánszulfonsav-
prokirálás fenilészter

Kémiai átalakítások

propranolol ha Ar=

36

Aszimmetrikus hidrolízis lipázzal

A kinetikus racemizálási kulcslépés során visszamaradó (R)-észter racemizálható és visszavezethető a resolválási lépésbe.

Ilyen és hasonló lipáz-katalizálta sztereoselektív észter hidrolízisek tömegét alkalmazzák a gyógyszer-laborok és gyárak optikailag tiszta intermedierek és végtermékek előállítására.

Lipáz források:

- sertés pankreász
- mikrobák (*Pseudomonas fluorescens*, *Candida cylindracea*, stb) enzimeit.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

37
