

EC 2. TRANSZFERÁZOK:

EC 2.4. Transzglykozilálás v. transzglykozilezés

$$R_1-O-R_2 + R_3OH \rightleftharpoons R_1-O-R_3 + R_2-OH$$

↓

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

Transzglykozilálás

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

Transzglykozilálás

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

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	Mikrofibilláris 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* α -(1→4), α -1*(1→6)-glükán	Erős rost- és filmképző (cellofán helyettesítő)
szkleroglükán	<i>Sclerotium rolfai</i> , <i>Sc. glaucanicum</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>Agrobacter</i>	6* β D-MannA-(1→4)- -6* β D-GlcA-(1→4)	Főleg az alga eredetűt használják: enzimmögzítés, élelmiszerek

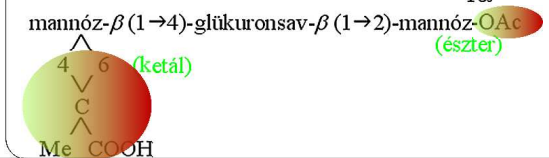


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Xantán

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

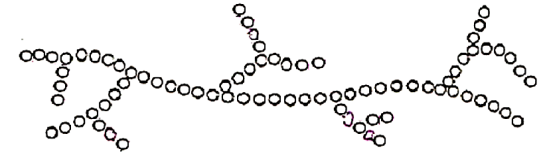
$$\rightarrow 4)\text{-glükóz-}\beta(1\rightarrow 4)\text{-glükóz}\beta(1\rightarrow 3)\uparrow 1\alpha$$




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).



 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 szacharórról 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.

 BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

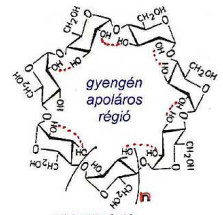
A dextrán előállítása

BIOGAL technológia:

- *L. mesenteroides* – tejsavbaktérium, anaerob
- előbb a sejtszaporítás, aztán a termékképzés
- 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

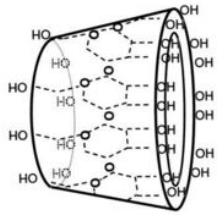
 BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Ciklodextrinek (CD, Schardinger dextrinek)




Hidrofil régió

A ciklodextrinek szerkezete
 n = glikopiranoz egységek száma.
 n = 0: α-CD, 1: β-CD, 2: γ-CD



A gyűrű belső felülete apoláris, ezért a hidrofób molekulák beleilleszkednek és zárványvegyületet alkotnak.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Ciklodextrinek előállítása


α - amidázzal hidrolizált (burgonya) keményítő $\xrightarrow{\text{ciklodextrin-glikozil-transzferáz (CGT-áz)}}$ (lineáris és) gyűrűs dextrinek \rightarrow CD izolálás

Egylépéses biokonverzió: (CGTáz, EC 2.4.1.19 = cyclodextrin glucanotransferase).

Több törzs is termeli:


- 1. *Bacillus macerans*
- 2. Alkalofil bakt. № 38-2
- 3. *Klebsiella pneumoniae* (patogén) klónozták *B. subtilis*be
- 4. *Bacillus circulans*

Izolált, oldott enzimet használnak
 Az α-, β- és γ-CD keveréke keletkezik.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Ciklodextrinek előállítása

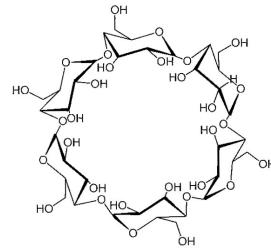


Előhidrolízis: 5-8 % keményítő, α-amilázzal, n~10-ig


Konverzió CGT-ázzal: többféle enzim, többféle optimum: 34-55 °C, pH=5,8-6,0

Konverzió: függ az enzim mennyiségétől:

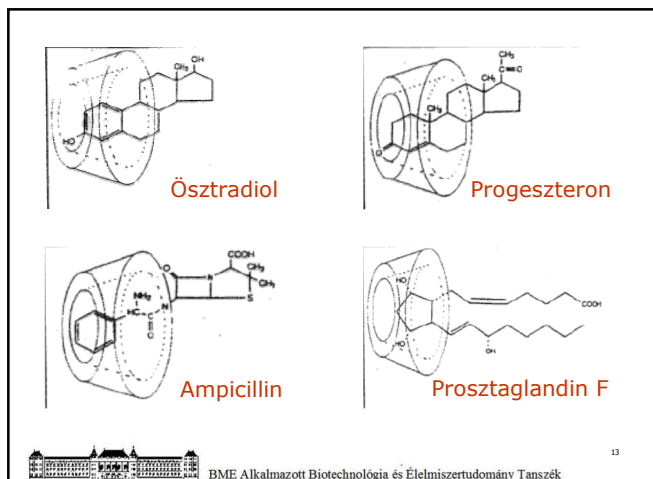
15E CGT-áz/g keményítő: 24% CD
 90E CGT-áz/g keményítő: 56% CD

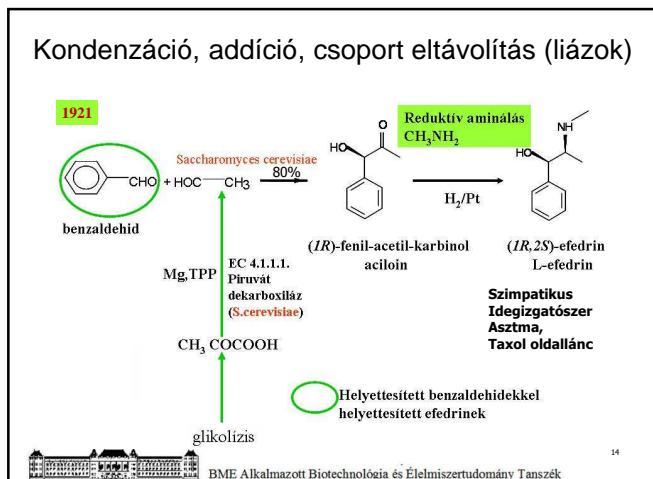


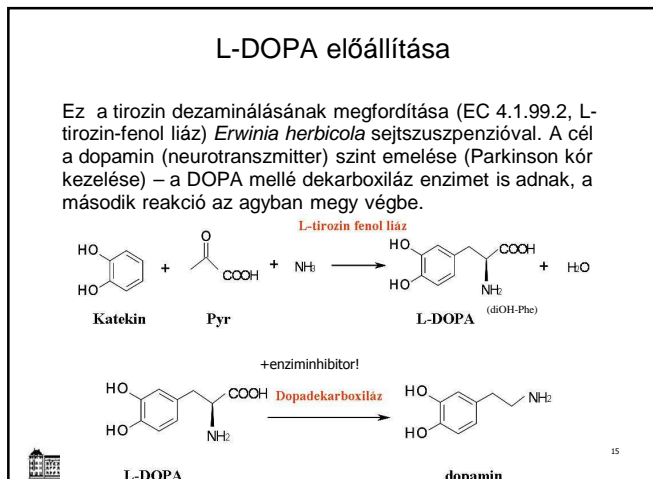
α-ciklodextrin



○ = glükóz

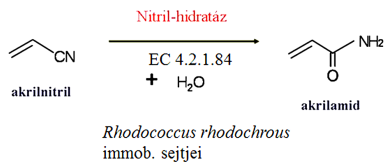






Akrilamid előállítása

...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

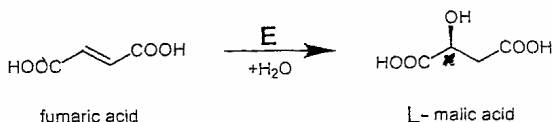


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

17

ADDÍCIÓS REAKCIÓK: almasav előállítása

Egylépéses konverzióval fumársavból.



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

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

Körülmények: pH = 8, t = 25 °C

Egyensúly: 15 : 85 aránynál (oldatban) →



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

18

Almasav előállítása

A termék kicsapásával az egyensúlyinál jobb konverzió érhető el:

E

$\text{calcium fumarate (in solution)} \rightleftharpoons \text{calcium malate (in solution)}$
 equilibrium ratio: ~ 15:85

$\uparrow \text{solubility: } \sim 1\% \quad \downarrow \text{solubility: } \sim 1\%$

$\text{calcium fumarate (crystalline)} \rightleftharpoons \text{calcium malate (crystalline)}$

Kristályfermentáció

19
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

ADDÍCIÓS REAKCIÓK: aszparaginsav előállítása

Régen fermentációval, ma egy lépéses biotranszformációval (sejtes vagy enzim) állítják elő.

OC(=O)/C=C/C(=O)O

 $\xrightarrow[\text{+ NH}_3]{\text{L-aszpartát-ammónia liáz (4.3.1.1) aszpartáz}}$
NC(C)C(=O)O

fumársav
L-aszparaginsav

E. coli enzim rögzítve, vagy *Brevibacterium flavum* rögzített teljes sejt, konverzió ~99%
 Felhasználás: aszpartám (édesítőszer) alapanyaga

20
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

IZOMERÁZOK (EC 5.x.x.x): glükóz-(xilóz-)izomeráz

Eredetileg xilóz izomeráz, de a glükózt is izomerizálja fruktózázá.

Xylose isomerase
Bacillus coagulans/*Streptomyces rubiginosus*/*Streptomyces phaeochromogenes* EC 5.3.1.5

O[C@H]1[C@@H](O)[C@H](O)[C@@H](O)[C@@H]1O
 \rightleftharpoons
O[C@H]1[C@@H](O)[C@@H](O)[C@H](O)[C@@H]1O

1
2

1 = glucose
 2 = fructose

Novo-Nordisk
 Gist-brocardes
 Miles Kali-Chemie
 Finnsugar
 Nagase

Elméleti egyensúlyi konverzió: GL : FR = 50 : 50, ennél jobb nem érhető el. Gyakorlatban 53 : 42 + melléktermékek.
 (Édesség: glükóz : szacharóz : fruktóz = 0,6 : 1 : 1,5)
 Körülmények: pH: 7,5–8,0 T: 50–60 fok +Co²⁺ és Mg²⁺ ion

21
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

22

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 törmelékét immobilizálják sokféle technikával →

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

23

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

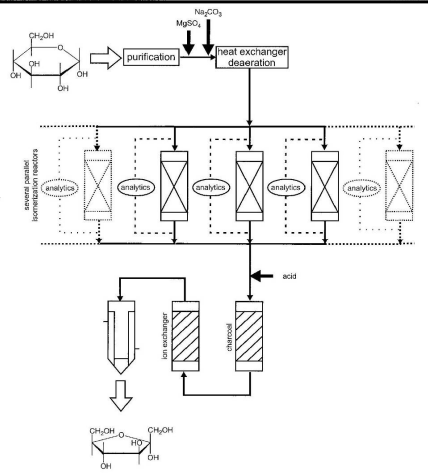
1. A glükóz szirupot előtte alaposan meg kell tisztítani (szűrés, aktív szén, ioncsere, ne legyen Ca^{2+} ion).
2. Immobilizált sejteket alkalmaznak oszlopokban, az oszlopok hatékonyságát folyamatosan mérik.
3. Élettartam: $t_{1/2} = 100\text{-}600$ nap, de $-12,5\%$ után cserélik
4. Termék: nem egyensúlyi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

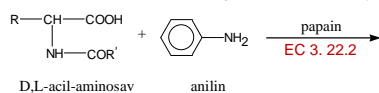


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

28

RESZOLVÁLÁS: Aszimmetrikus szintézis

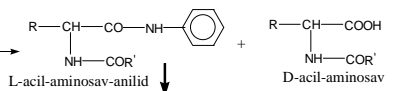
Aszimmetrikus szintézis : i-Leu, Lys, Met, Phe, Trp, Val



D,L-acil-aminosav

anilin

Kicsapódik



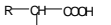
L-acil-aminosav-anilid

D-acil-aminosav

SAVAS

HIDROLÍZIS

H⁺

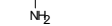


L-AMINOSAV

LÚGOS

HIDROLÍZIS

OH⁻



D,L-AMINOSAV szék



29

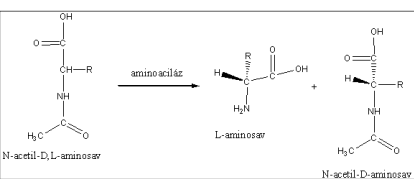
RESZOLVÁLÁS: aszimmetrikus hidrolízis

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).

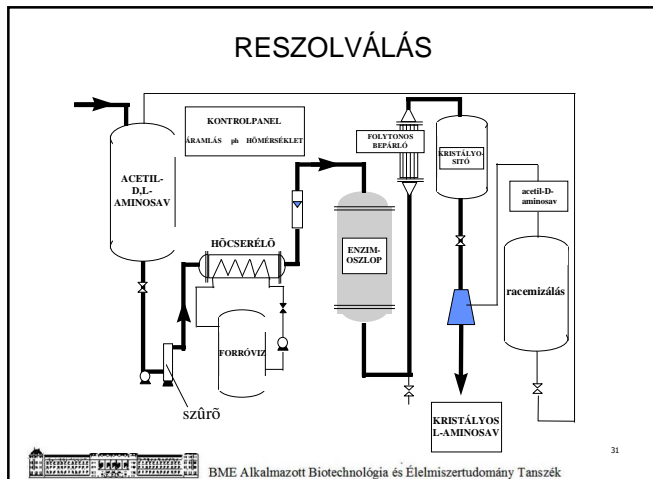


N-acetil-D,L-aminosav

L-aminosav

N-acetil-D-aminosav szék

30



Aszimmetrikus hidrolízis

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

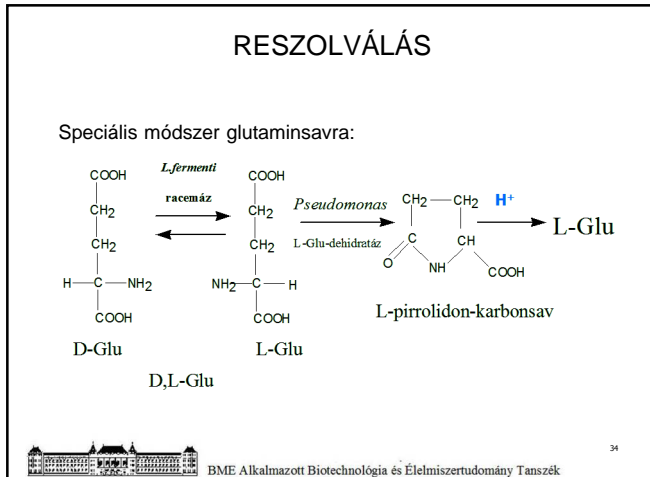
Feldolgozás: az L-Met kristályosítható, az enzimet ultraszűrőssel lehet visszanyerni.
 Ugyanez az eljárás alkalmazható még: Ala, Phe, Val, Leu, Trp, Tyr-ra.

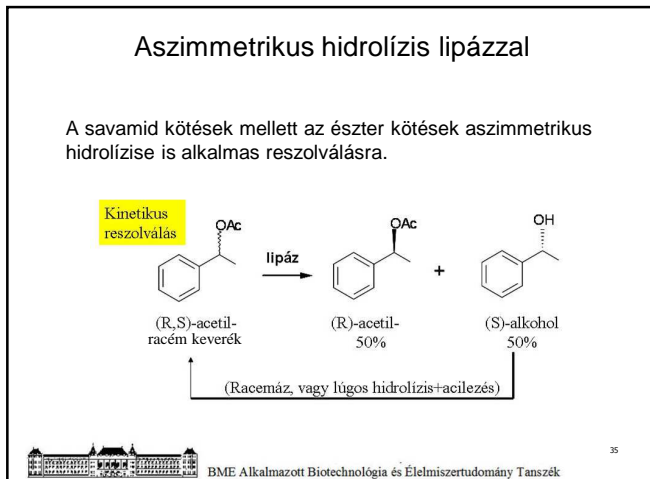
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

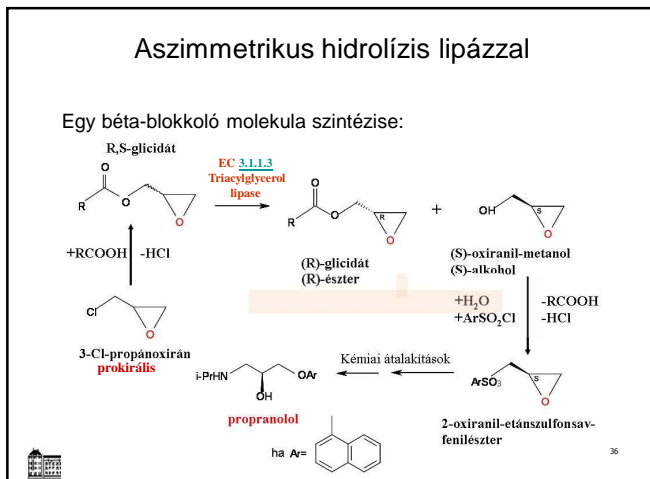
Az aminosavgyártás megoszlása (2006)

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	Táp.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







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
