

EC 2. TRANSZFERÁZOK:

EC 2.4. Transzglykizálás v. transzglykizilezés

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

↓

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

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 tulaj-
 donságok.

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Transzglykizálás

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

Mikrobiális poliszacharidok

poliszacharid	mikroorganizmus	szerkezet	felhasználás
cellulóz	<i>Acetobacter</i>	lineáris β-(1→4)-glükán	Mikrofibrilláris élelmi rostként
kurdlán	<i>Agrobacterium</i> <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 rolfsii</i> , <i>Sc. glucanicum</i>	lineáris β-(1→3)-glükán β-(1→6) elágazásokkal	Festékipar
gellán	<i>Pseudomonas elodea</i>	Lineáris heteropoliszacharid -βD-Gl-(1→4)-βD-GlcA- (1→4)-βD-Gl-(1→4)- -αD-Rha-(1→3)-	Agar és karragén helyettesítő, Élelmiszadalék.
alginát	<i>Macrocystis pyrifera</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Azotobacter vinelandii</i>	6*βD-MannA-(1→4)- -6*βD-GlcA-(1→4)	Főleg az alga eredetűt használják: enzimrög-zítés, élelmiszerek

Transzglykizálás

maltóz + maltóz $\xrightarrow{Aspergillus niger}$ **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

Xantán

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

→4)-glükóz-β(1→4)-glükózβ(1→

3
↑
1α

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

Me COOH

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Dextrán

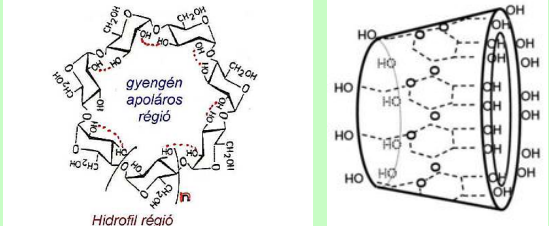
Szerkezete: elágazó láncú glükóz polimer, mint az amilopektin, de: a kötések túlnyomó része (1-6), mellette kevés (1-4), (1-2) és (1-3).



7

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Ciklodextrinek (CD, Schardinger dextrinek)



A ciklodextrinek szerkezete
 n = glükopiranoz 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.

10

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

A dextrán előállítása

Bioszintézise:

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

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.

8

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Ciklodextrinek előállítása

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

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.

11

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

A dextrán előállítása

BIOGAL technológia:

- *L. mesenteroides* – tejsavbaktérium, anaerob
- előbb a sejt szaporítás, aztán a termék képzés
- 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

Ciklodextrinek előállítása

$$\text{dextrin} \xrightarrow{\text{CGTáz}} \text{α-ciklodextrin}$$

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

○ = glükóz

α-ciklodextrin

12

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Ösztradiol **Progészteron**

Ampicillin **Prostaglandin F**

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Akrilamid előállítása

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

$$\text{akrilnitril} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow[\text{EC 4.2.1.84}]{\text{Nitril-hidratáz}} \text{akrilamid}$$

Rhodococcus rhodochrous
immob. sejtei

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

Kondenzáció, addíció, csoport eltávolítás (liázok)

1921

benzaldehyd + HOC-CH₃ $\xrightarrow[\text{80\%}]{\text{Saccharomyces cerevisiae}}$ (IR)-fenil-acetil-karbinol aciloin

Reduktív aminálás
CH₃NH₂

$\xrightarrow[\text{H}_2/\text{Pt}]{} (IR,2S)\text{-efedrin L-efedrin}$

Szimpatikus Idegizgatószer, Asztma, Taxol oldallánc

glikolízis: CH₃COCOOH $\xrightarrow[\text{Mg, TPP}]{\text{EC 4.1.1.1. Piruvát dekarboxiláz (S.cerevisiae)}}$ HOC-CH₃

Helyettesített benzaldehidekkel helyettesített efedrinek

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Akrilamid előállítása

Nitto (J) technológia: rátáplálásos eljárás, 2x10⁶ 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 feldolgozáshoz	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

L-DOPA előállítása

Ez a tirozin dezaminálásának megfordítása (EC 4.1.99.2, L-tirozin-fenol liáz) *Erwinia herbicola* sejtuszpenzióval. A cél a dopamin (neurotranszmitter) szint emelése (Parkinson kór kezelése) – a DOPA mellé dekarboxiláz enzim is adnak, a második reakció az agyban megy végbe.

L-tirozin fenol liáz

Katekin + Pyr + NH₂ \rightarrow L-DOPA (diOH-Phe) + H₂O

+enziminhibitor!

L-DOPA $\xrightarrow{\text{Dopadekarboxiláz}}$ dopamin

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

ADDÍCIÓS REAKCIÓK: almasav előállítása

Egylépéses konverzióval fumaric acidból.

$$\text{fumaric acid} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{E}} \text{L-malic acid}$$

Törzs: *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum* nyugvósejtes tenyészet
 Enzim: EC 4.2.1.2 fumaráz, sztereoselektív, csak L-malátot termel.
 Körülmények: pH = 8, t = 25 °C
 Egyensúly: 15 : 85 arányban (oldatban) →

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Almasav előállítása

A termék kicsapásával az egyensúlyinál jobb konverzió érhető el:

Kristályfermentáció

19

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

ADDÍCIÓS REAKCIÓK: aszparaginsav előállítása

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

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

20

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 feltart törmeléket immobilizálják sokféle technikával →

- a sejteket keresztlinkelés létesítéssel rögzítik,
- porlasztva szárítás → enzim-por,
- fagyasztva szárítás → enzim-pelyhek → extrudált enzim-rudacsokká

23

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

Eredetileg xilóz izomeráz, de a glükózt is izomerizálja fruktózzá.

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

Novo-Nordisk
 Gist-brocades
 Miles Kali-Chemie
 Flinsugar
 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

Table 2. Commercial immobilized glucose isomerase preparations

Company	Enzyme source	Immobilization procedure
Clinton Corn Processing	<i>Streptomyces rubiginosus</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 fruktóztartalmat fel lehet emelni (akár 90% -ig).
6. Nem kristályosítják, csak koncentrálják = HFCS = High Fructose Corn Syrup = izoszörp cukortartalma $\sim 70\%$ ennek 55% -a fruktóz



ENZIMES RESZOLVÁLÁS

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

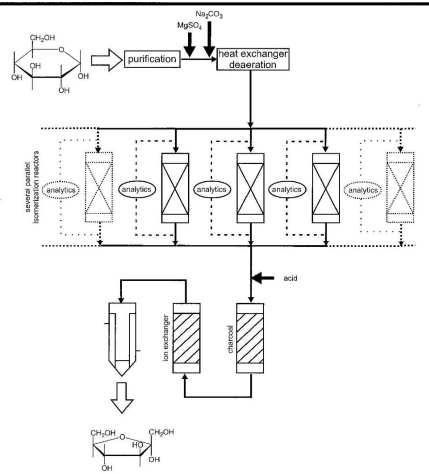
Két fő út:

- aszimmetrikus szintézis,
- aszimmetrikus hidrolízis

Mindkettőnél az enzimek sztereospecifikusát használják ki.

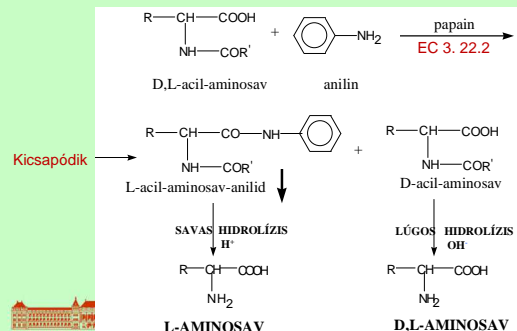


„IZOCUKOR” (HFCS) GYÁRTÁS



RESZOLVÁLÁS: Aszimmetrikus szintézis

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



„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



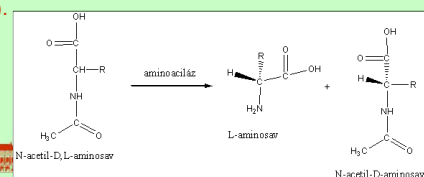
RESZOLVÁLÁS: aszimmetrikus hidrolízis

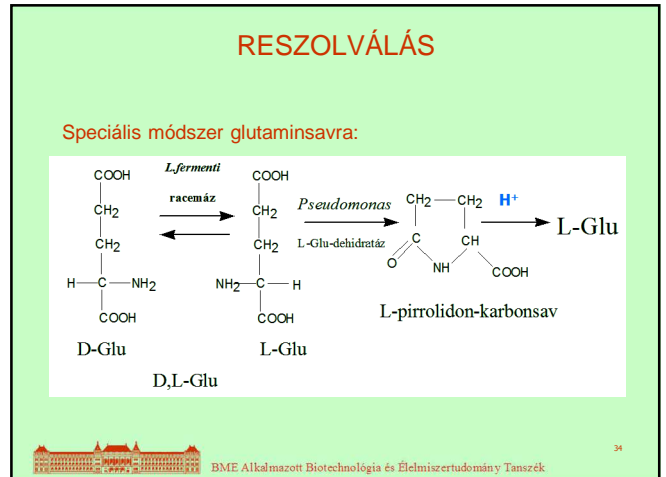
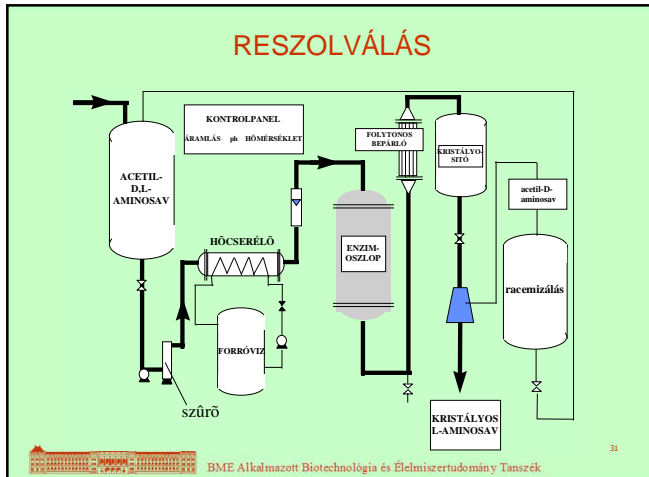
A racém aminosav keverékre olyan funkciós csoportot kötünk, aminek eltávolítására van sztereoselektív enzim.

Típusreakció: N-acilezés, majd hidrolízis aminosavakkal.

Az aminosavakat 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).



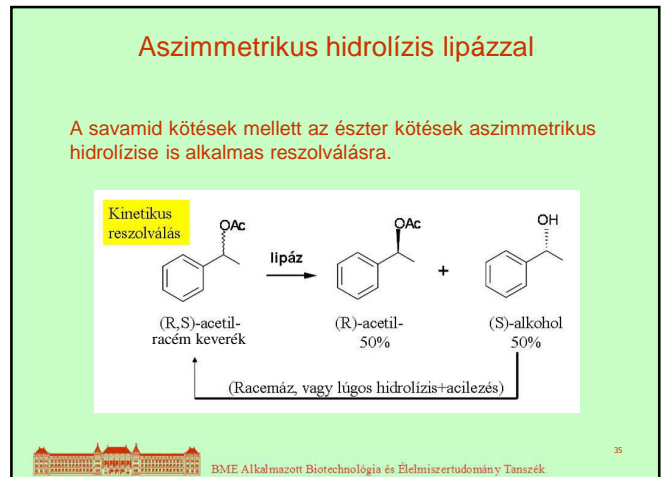


Aszimmetrikus hidrolízis

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

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

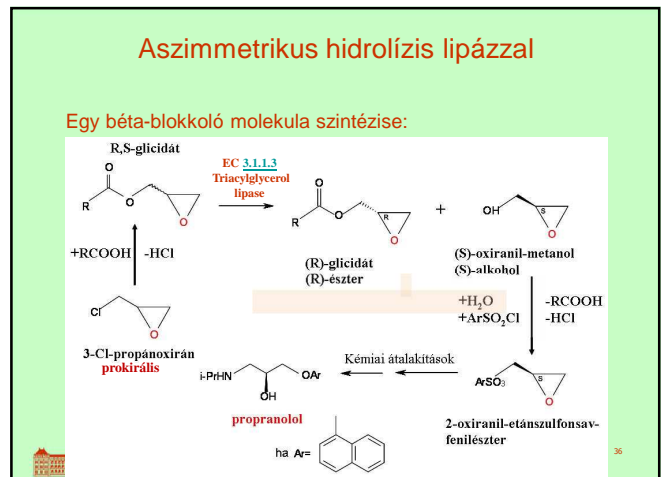
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék



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	Enzimis 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	Nyugvojeszt 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.

