

Peptidszintézis

SZINTÉZIS ← PROTE(IN)ÁZ → BONTÁS
 -CO-NH- -CO-NH-

$$\text{H}_2\text{N}-\overset{\text{R}_1}{\text{CH}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-\overset{\text{R}_2}{\text{CH}}-\text{COOH} + \text{H}_2\text{O} \xrightleftharpoons{\text{Protease}} \text{H}_2\text{N}-\overset{\text{R}_1}{\text{CH}}-\text{COOH} + \text{H}_2\text{N}-\overset{\text{R}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$$

Minden enzimés reakció megfordítható, még a makromolekulákat hidrolizálók is, de csak egy-két kötést hoznak létre, hosszú láncot nem.

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Bontási hely specifikus prote(in)ázok

Tripszin* (EC 3.4.21.4)	Arg/Lys ↓ Y _{as}
Szubtilizin* (EC 3.4.21.62)	Trp/Tyr/Phe/Leu ↓ Y _{as}
Elasztáz* (EC 3.4.21.36)	Ala/Ser ↓ Y _{as}
Termolizin (EC 3.4.24.27)	X _{as} ↓ Leu/Phe
Pepszin (EC 3.4.23.15)	Phe/Tyr/Leu ↓ Trp/Phe/Tyr

Y_{as}=bármelyik aminosav, -észter vagy -amid
 X_{as}=bármelyik aminosav

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Védőcsoportok

Melléktermékek elkerülésére a nem-reagáló csoportokat védeni kell

-NH₂ védelme

$\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-\text{NH}-\overset{\text{R}}{\text{CH}}-\text{COOH}$
 Benziloxikarbonil- (Z)

$\text{CH}_3-\text{CO}-\text{NH}-\overset{\text{R}}{\text{CH}}-\text{COOH}$
 Acetil- (Ac)

-COOH védelme

$\text{H}_2\text{N}-\overset{\text{R}}{\text{CH}}-\text{CO}-\text{NH}_2$
 Amid-

$\text{H}_2\text{N}-\overset{\text{R}}{\text{CH}}-\text{CO}-\text{O}-\text{CH}_3$
 Észter

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Egyensúlyi kontroll

Egyensúlyi állandó:
$$K_{eq} = \frac{\text{peptid}}{[\text{R}-\text{COOH}][\text{H}_2\text{N}-\text{R}']}$$


1. aminosav 2. amin(osav)

Az egyensúly eltolásának lehetőségei:

1. Kicsapás: oldhatalan peptidek, védő csoportok hatása is.

$$\text{P.L. Z-Phe-COOH} + \text{Leu-NH}_2 \xrightarrow{\text{peptidáz}} \text{Z-Phe-Leu-NH}_2$$


Aminocsoport védve + karboxilcsoport védve dipeptid-származék
a sav-amid kicsapódik



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Az egyensúly eltolása


2. Kétfázisú rendszerben
2-5% H₂O szerves oldószerben: a disszociáció visszaszorul
3. Vizes-oldószeres rendszerben: + dimetil-formamid, dimetil-szulfid, trietilén-glikol
4. pH eltolás: 9,5 → 6,5 20xK_{eq} Z-Trp + Gly → Z-Trp-Gly
5. Aminosavak koncentráció növelése



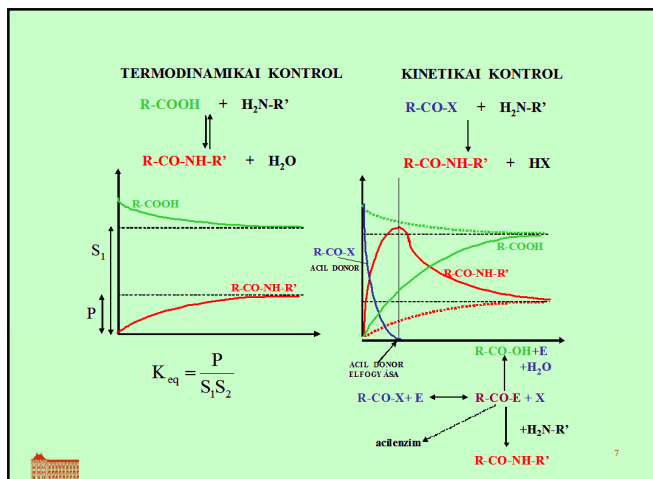
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Kinetikai kontroll

Ez esetben nem várják meg az egyensúly beállását, hanem egy kedvező összetételű korábbi fázisban leállítják a reakciót. Erre azok az enzimes reakciók alkalmasak, amelyeknél stabil átmeneti komplex alakul ki (vö.: ping-pong mechanizmus, például szerin proteázok). Ezeknél az acilező szubsztrát elfogyásáig nő a termék koncentráció, ezután viszont a hidrolízis miatt csökken. A maximális kihozatalhoz a maximum pontot kell elcsípni.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék



Aszpartám gyártás

Aszpartám: mesterséges édesítőszer.
 Felhasználása élelmiszereknél: italok, cukorkák, tej, jam,...
 de: hőre bomlik, sütésre nem jó
 A fenilalanin metil észterének és aszparaginsavnak az összekapcsolásával keletkezik, enzim: termolizin

COC(=O)C(N)Cc1ccccc1.COC(=O)C(N)C(=O)O>>COC(=O)C(N)Cc1ccccc1.COC(=O)C(N)C(=O)N[C@@H](C)C(=O)O

D,L-1 + L-2 → D-1 + L-3

1 = phenylalanine methyléster
 2 = aspartic acid (protected)
 3 = α-aspartame (protected)

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Aszpartám gyártás

Ahhoz, hogy csak a fenilalanin aminocsoportja reagáljon az aszparaginsav α-karboxil csoportjával, a rajtuk lévő egyéb funkciós csoportokat blokkolni kell, egyébként random dipeptidok és oligopeptidok képződnek.
 A Phe metilésztere a karbonsavat blokkolja, az Asp aminocsoportját pedig egy benzoi-oxi-karbonil (BOC) csoporttal védik (ez hidrogénezéssel eltávolítható).

$$BOC-N-Asp-COOH + H_2N-Phe-COOCH_3 \rightarrow BOC-L-aszpartám \xrightarrow{H_2} L-aszpartám$$

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Az enzimes eljárás

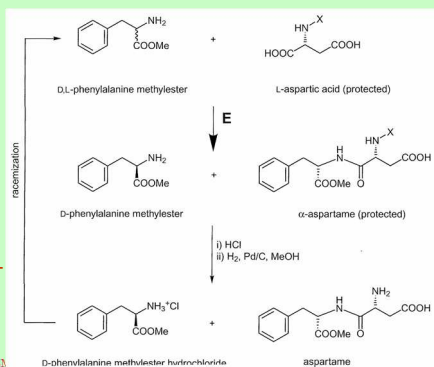
Az enzim forrása: *Bacillus proteoliticus*
Izolált enzimként, oldott formában vagy rögzítve alkalmazzák.
Szakasos eljárás, keverős reaktorban

Előnyei:
Nem keletkezik β -aspartám (keserű)
Sztereoselektív a reakció, csak L-aspartám keletkezik, enantiomer tisztaság: 99,99 %
Emiatt alapanyagként DL-Phe (racém) is használható.
Nincs racemizáció a szintézis alatt



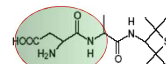
A gyártás lépései

1. A keletkező védett aspartám adduktot képez a feleslegben lévő D-PheOMe-rel, és kicsapódik.
2. Szűrés
3. Sósavval visszaoldják.
4. A BOC csoportot lehidrogénezik, a D-PheOMe-t racemizálják és visszavisszák a folyamat elejére.



További édesítőszer

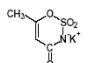
Main intense sweeteners



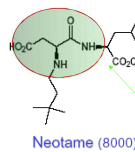
Alitame (2000)



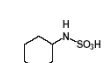
Saccharin (300)



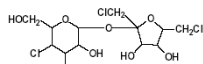
Acesulfame-K (200)



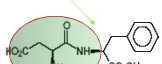
Neotame (8000)



Cyclamate (30)



Sucralose (500)



Aspartame (200)