

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

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

Transzglykozilálás

glükóz - **1 - P** + 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

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 (cellofan 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 -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 aeru-</i> <i>liosa Acetobacter</i>	6*βD-MannA-(1→4)- -6*βD-GlcA-(1→4)	Főleg az alga eredetűt használják: enzimmög-zítés, élelmiszerek

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Transzglykozilálás

$2 \text{ maltóz} \xrightarrow{\text{Aspergillus niger}} \text{glükóz(1→6)glükóz(1→4)glükóz} + \text{glükóz}$

donor akceptor

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

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

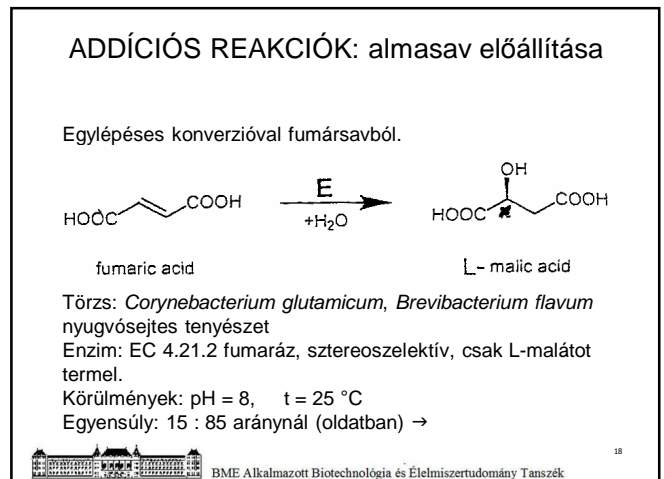
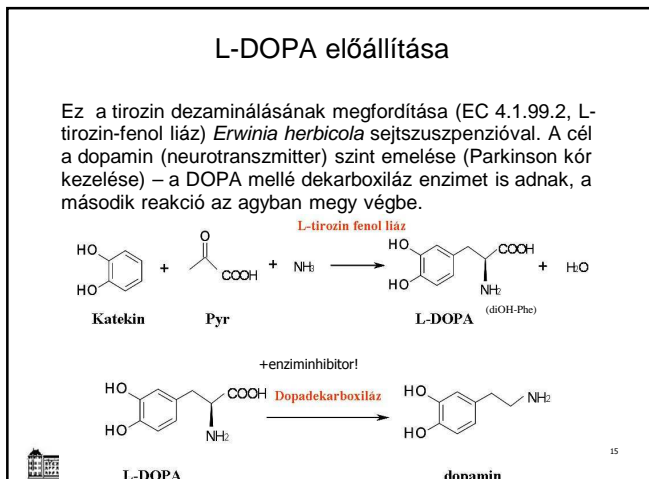
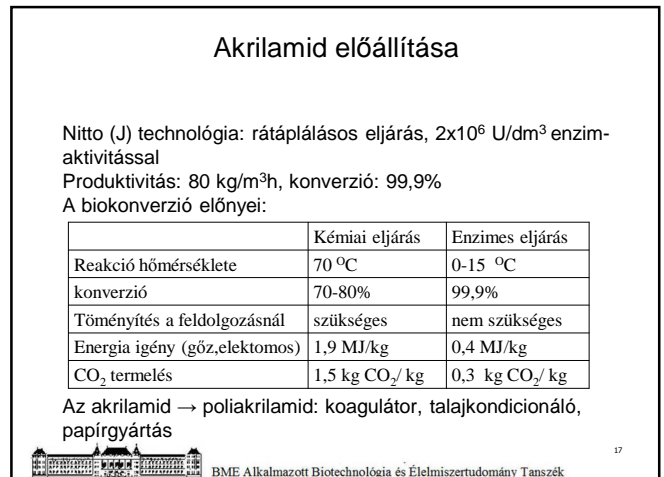
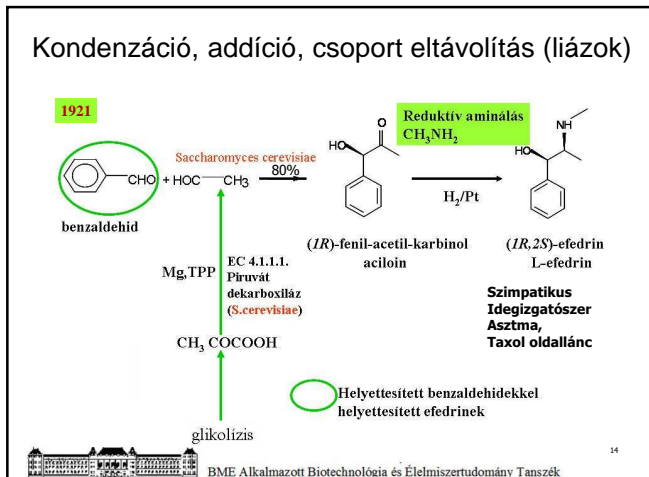
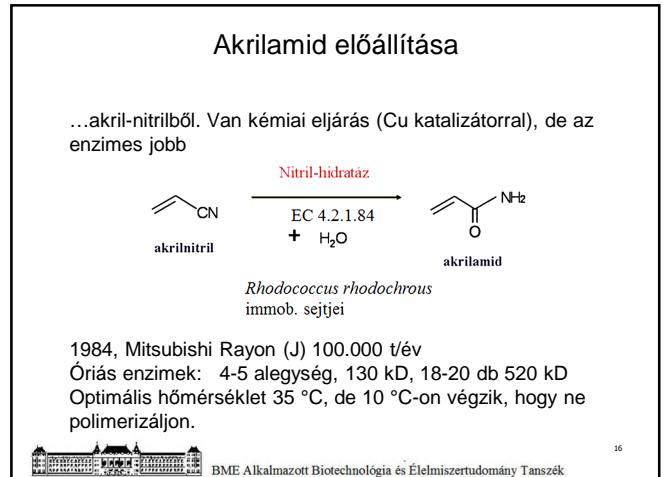
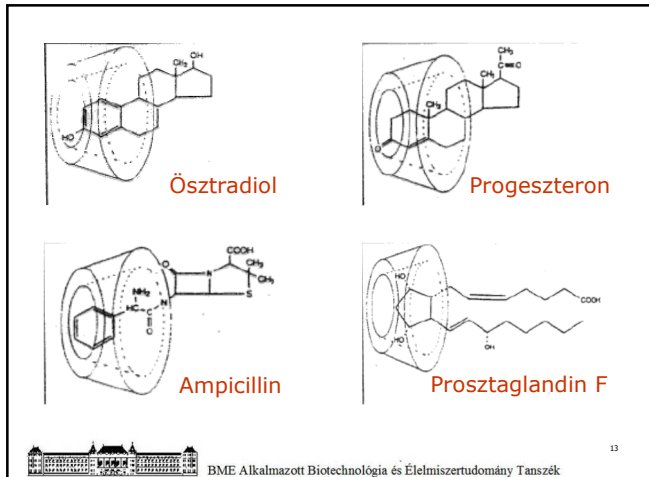
Xantán

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

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

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

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék



Almasav előállítása

A termék kicsapásával az egyensúlyinál jobb konverzió érhető el:

Kristályfermentáció

19

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 arzénát 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

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

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-rudacsokká

23

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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
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

Table 2. Commercial immobilized glucose isomerase preparations

Company	Enzyme source	Immobilization procedure
Chinton 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 = izoszórp 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.

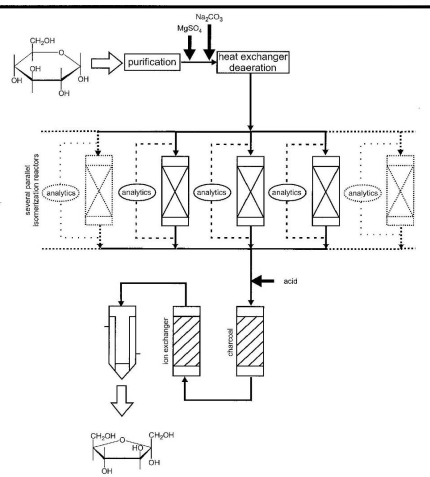
Két fő út:

- aszimmetrikus szintézis,
- aszimmetrikus hidrolízis

Mindkettőnél az enzimek sztereospecifikitását használják ki.

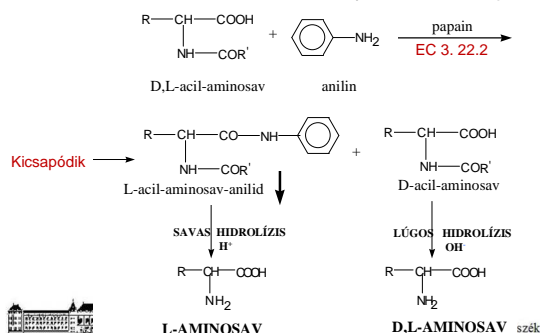


„IZOCUKOR” (HFCS) GYÁRTÁS



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



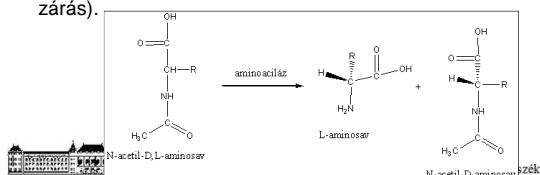
RESZOLVÁLÁS: aszimmetrikus hidrolízis

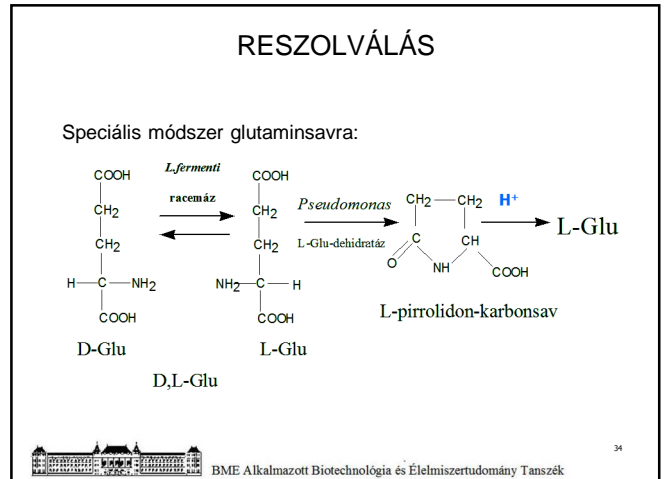
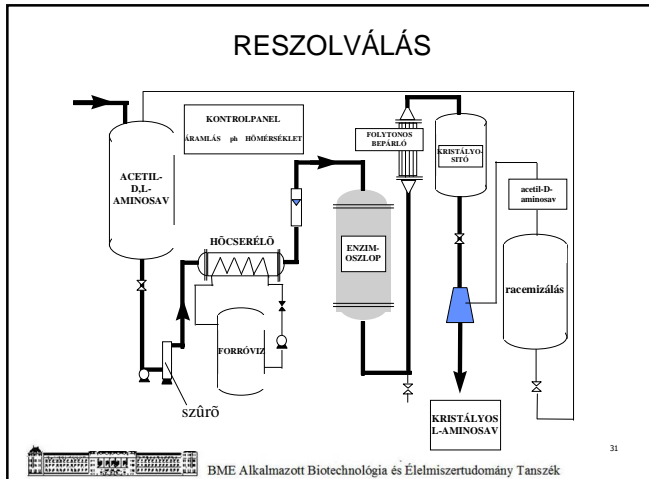
A racém aminosav keverékre olyan funkciós csoportot kötünk, aminek eltávolítására van sztereoselektív enzim.

Típusreakció: N-acilezés, majd hidrolízis aminoacilázsal.

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).





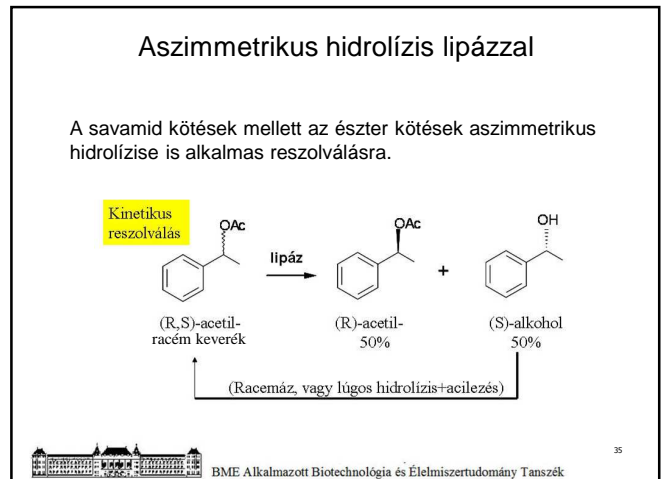
Aszimmetrikus hidrolízis

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.

$$\begin{array}{c}
 \text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH} \\
 | \\
 \text{NH}-\text{C}-\text{CH}_3 \\
 | \\
 \text{O} \\
 \text{D,L-1}
 \end{array}
 \xrightarrow[\text{Co}^{2+}]{\text{E}}
 \begin{array}{c}
 \text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH} \\
 | \\
 \text{NH}-\text{C}-\text{CH}_3 \\
 | \\
 \text{O} \\
 \text{D-2}
 \end{array}
 +
 \begin{array}{c}
 \text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH} \\
 | \\
 \text{NH}-\text{C}-\text{CH}_3 \\
 | \\
 \text{O} \\
 \text{L-3}
 \end{array}
 +
 \begin{array}{c}
 \text{HO}-\text{C}-\text{CH}_3 \\
 | \\
 \text{O} \\
 \text{4}
 \end{array}$$

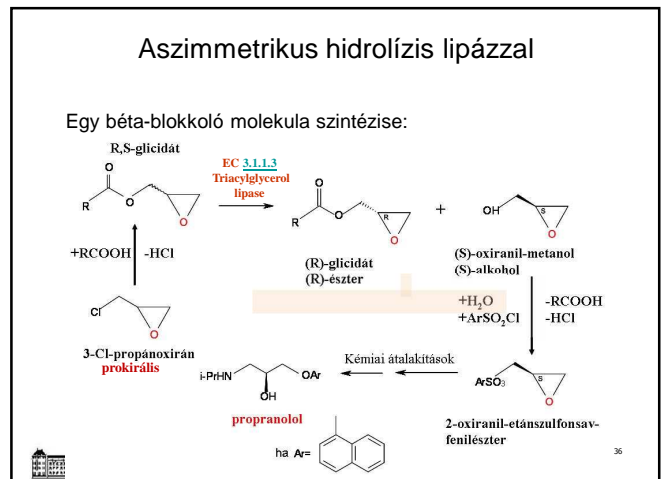
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék



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	Táp.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.

