

VITAMINOK



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

VITAMINOK

Primer metabolitok, olyan létfontosságú mikrotápanyagok, amelyeket az emberi szervezet nem képes elegendő mennyiségben előállítani, ezért az étkezéssel kell bevenni.

Felhasználásuk:

- Gyógyszerként terápiában
- Élelmiszerek komplettálása
- Élelmiszeraladék (pl. színezék, antioxidáns)
- Takarmányozás



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

VITAMINOK

Gyártási eljárások:

- Extrakció
- Kémiai szintézis
- Fermentáció

Legfontosabb biotechnológiai úton előállított vitaminok:

- B₂ vitamin
- B₁₂ vitamin
- C-vitamin



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

3

B₂-vitamin (riboflavin)

1933-ban izolálták tejsavóból (laktoflavin)

Források: tej, tojás, máj, vese, zöldségek

Hiánya növekedési ill. látászavart valamint dermatitist (bőrgyulladást, pellagrát) okoz.

A B₂ vitamin a FAD és a FMN koenzim része (ld. citrát-kör). A molekula egy alloxazin-származék, amely redox-rendszert alkot. Az oxidált forma színes (vöröses-barna), a redukált forma viszont színtelen.

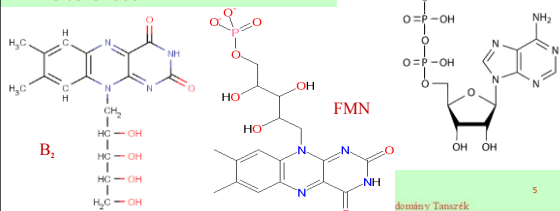


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

4

B₂-vitamin szerkezete

A molekula két részből áll: a 6,7-dimetil-izalloxazinnól és az ehhez N-glükózidos kötással kapcsolódó ribit (cukor-származék) oldalláncból.



5

A B₂-vitamin előállítása

Többféle úton:

- kémiai szintézis
- félszintetikus (ribóz + alloxazin)
- de novo fermentáció (túlnyomórészt)

| Törzsek: | titer (g/l) |
|--|-------------|
| <i>Eremothecium ashbyii</i> | 2,5 |
| <i>Ashbya gossypii</i> (BASF) | 6,5-15 |
| <i>Corynebacterium ammoniagenes</i> | 17,4 |
| <i>Bacillus subtilis</i> Marburg 168 (DSM) | 15 |
| <i>Bacillus subtilis</i> (VNI1304, orosz) | 4,5 |
| <i>Bacillus subtilis</i> Y32 (kínai) | 3 |
| <i>Bacillus subtilis</i> RH33 (kínai) | 12 |



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

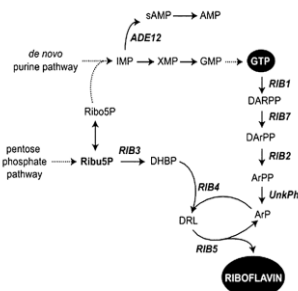
6

A B₂-vitamin bioszintézise

A de novo bioszintézishez két fontos metabolitra van szükség:

- GTP-re és
- Ribulóz-5-foszfátra.

Ezek túlermelését kell előidézni. A GTP-ét úgy, hogy a többi nukleotid ne akkumulálódjon, a pentóz-foszfát ciklust úgy, hogy Ru5P-t termeljen. A feltüntetett enzimeket mind manipulálták.



BME Alkalmazott Bioteknológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Riboflavin fermentáció *B. subtilis* törzsszel

Rátáplálásos fermentációk, glükóz vagy melasz szénforráson.

A riboflavin kiválasztódik a fermentlébe és kikristályosodik (oldhatósága csak 80-100 mg/l).

Kristályfermentáció, 48 óra alatt eléri a 15 g/l-t is.

A hozamok cukorra számolva alacsonyak, 5-10% között.

Feldolgozás: a sejteket hőkezeléssel előlik, majd differenciál centrifugálással elválasztják a sejtömeget és a sárga tús kristályokat. Meleg savas mosással 96%-os tisztaságú termék állítható elő. Átkristályosítással 99%-os, élelmiszer minőségű terméket kaphatunk.

BME Alkalmazott Bioteknológia és Élelmiszertudomány Tanszék

B₁₂-vitamin (kobalamin)

Minot és Murphy máj extraktummal már 1926-ban sikeresen gyógyította a vészes vérszegénységet (B₁₂-hiány). A bélmikroflóra is termeli a vastagbélben, de onnan nem szívódik fel.

Szerepe: THF-hez hasonlóan C₁-átvivő koenzim

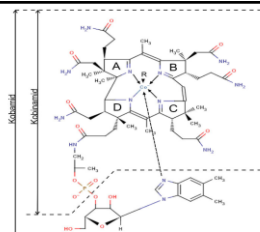
A kobalaminok szerkezetének alapját a porfirinekhez hasonló koringyűrű adja (tetrapirrol váz).

BME Alkalmazott Bioteknológia és Élelmiszertudomány Tanszék

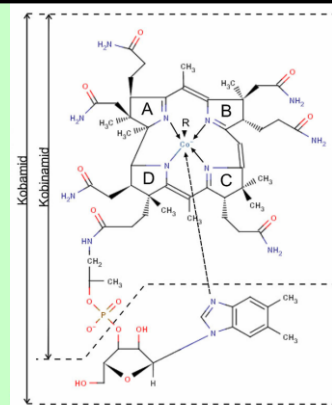
Szerkezete

A szerkezet erős hasonlóságot mutat a hem-csoporttal, de:

- Az A-D gyűrű között nincs metilén híd
- a tetrapirrol váz közepén itt egy kobalt ion helyezkedik el, amelyhez a váz síkja felett az adott kobalaminra jellemző R-csoport, a váz síkja alatt pedig egy benzimidazol gyűrű kötődik.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 10



| R | Molekula neve (szerep) |
|------------------|--|
| -CN | Cianokobalamin (B ₁₂ -vitamin) |
| -OH | Hidroxikobalamin (B ₁₂ -vitamin) |
| -CH ₃ | Metilkobalamin |
| * | 5-Dezoxidadenozil-kobalamin = kobamamid (B ₁₂ -koenzim) |

| | |
|--------------------------|----------|
| Cianokobalamin | 3,5 t/év |
| Hidroxikobalamin | 2 t/év |
| B ₁₂ -koenzim | 1 t/év |
| Metil-kobalamin | 0,5 t/év |

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Előállítás

A tetrapirrol váz bioszintézise az elején azonos a B₁₂ vitaminnál, a hemnél és a klorofillknál. Az ilyen bonyolult (30 lépés) és elágazó anyagcsereutaknál genetikai manipulációval sem lehet számottevő termékkoncentrációt elérni (csak mg/l).

Vad törzseknel:

- sztreptomycin fermentáció levében melléktermékeként (1 mg/l) (*Streptomyces olivaceus*)
- szennyvíztisztító anaerob rothasztójából vett iszap (2-5 mg/kg biomassa)

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 12

Fermentációs technológiák

De novo bioszintézissel:

1. *Propionibacterium freudenreichii* (200 mg/l),
Propionibacterium shermanii (60 mg/l)

Kétlépcsős fermentáció:

1. Anaerob szakasz, 2-4 nap
 2. Aerob szakasz 1-3 nap
- Termékinhibíció, mert sok propionsavat termel (10%)
Intracelluláris termék, feltárás 10-30 p, 80-120 °C,
Hidroxikobalamin → cianokobalamin konverzió



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

13

Fermentációs technológiák

2. *Pseudomonas denitrificans*

2 éves törzsfejlesztés: 0,6 → 60 mg/l, de 2-3 nap alatt
Átvitt gének heterológ expressziója
Növekedéshez kötött termékképzés
5,6-benzimidazol (prekurzor) + betain (permeabilitás)

3. *Rhodopseudomonas protamicus*

Protaminobacter ruber és a *Rhodopseudomonas spheroides* hibridje, mesterséges törzs



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

14

Fermentációs technológiák

4. Metanolhasznosító vegyes tenyészetekkel

Szennyvíziszapból metanollal szelektálják a törzseket
→ mert C1-átvivő

Vegyes metanolhasznosítók: együtt jobb a termelés,
mint izolálva (~35 mg/kg) Richter, Dorogon
Anaerob, félfolytonos
Igen olcsó, mert nem kell levegőztetni, kevertetni, sterilizálni (MeOH), óriási tartályok.

Sejtfeltárás hőkezeléssel
A hidroxikobalaminat cianiddal alakítják át.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

15

B₁₂- felhasználás

- Humán gyógyászat – vészes vérszegénység
- Takarmányozás – növényi takarmányok komplementálása (nem kell izolálni, mehet a sejtömegeggyütt)






BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

16

C-vitamin

Szent-Györgyi Albert
1928 mellékveséből
Redox-rendszer (antioxidáns),
gyökfogó
Az éves világertermelés:
60-70 000 t/év
Többlépcsős a kémiai szintézis,
benn egyetlen biokonverziós lépés a:

(D)-szorbit → (L)-szorbóz átalakítás

Gluconobacter suboxydans






BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

17

C-vitamin gyártás

Hat lépéses szintézis, nagyon vegyeses:



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

18

C-vitamin gyártás

Benne egyetlen biokonverziós lépés a:

$$\begin{array}{ccc}
 \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ | \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ | \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ | \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ | \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ | \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array} & \xrightarrow[\text{Acetobacter}]{-2[\text{H}]} & \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ | \\ \text{C}=\text{O} \\ | \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ | \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ | \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ | \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}
 \end{array}$$

(D)-sorbit → (L)-szorbóz
Gluconobacter suboxydans

Bertrand-szabály!

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

19

C-vitamin gyártás

Alternatív út: a glükózból két konverziós lépésben:

$$\begin{array}{ccccc}
 \begin{array}{c} \text{CHO} \\ | \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ | \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ | \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ | \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ | \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array} & \xrightarrow{E. hercynica} & \begin{array}{c} \text{COOH} \\ | \\ \text{C}=\text{O} \\ | \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ | \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ | \\ \text{C}=\text{O} \\ | \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array} & \xrightarrow{Corynebacterium sp.} & \begin{array}{c} \text{COOH} \\ | \\ \text{C}=\text{O} \\ | \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ | \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ | \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array} \\
 \text{D-Glucose} & & \text{2,5-Diketo-gluzonnic acid} & & \text{2-Keto-L-gulononic acid}
 \end{array}$$

recombinant *Erwinia hercynica*

A második enzimet klónozták az Erwinia-ba – egy lépésben megy.

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

20
