

BIOKONVERZIÓK, BIOTRANSZFORMÁCIÓK

Oxidációs, redukciós átalakítások



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

1

Enzimes és mikrobiális biokonverziók

Tulajdonságok, jellemzők: mint az enzimtulajdonságok

- Szubsztrátspecifitás – csak egy adott szubsztrát
- Régióspecifitás – a S egy adott helyén, részterületén
- Sztereospecifitás - enantiomerek felismerése
S és P oldalon
- kirotechnológia: a szerves kémikusok új eszköztára
- Csoportspecifitás – egy funkció csoportot alakít át
- Enyhe reakciókörülmények – T, p, pH



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

4

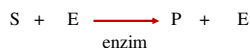
BIOTECHNOLÓGIAI ELJÁRÁSOK

De novo FERMENTÁCIÓK



mikroorganizmus
növényi sejtenyészet
állati szövetenyészet

BIOTRANSZFORMÁCIÓK



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

EC reakciótypusok

REAKCIÓTÍPUS	ENZIMCSOPORT	REAKCIÓK
Oxidációk és redukciók	EC 1.	Hidroxilálás, dehidroxilezés, epoxidálás, C-C kötés hidrogénezése-, dehidrogénezése, alkoholok, aldehidek oxidációja, alkil-, karboxialkil-, ketoalkil láncok oxidatív lebontása, szubsztituensek oxidatív eltávolítása, oxidatív dezaminálás, oxidatív gyűrűfelynyítés, szerves savak, aldehidek, ketonok redukciója, heterofunkciós csoportok redukálása, szubsztituensek redukatív eliminálása
Hidrolízis	EC 3.	észterek, aminok, amidok, laktonok, éterek, laktámok hidrolízise
Izomerizáció	EC 5.	kettős kötés és oxigén tartalmú csoport áthelyezés, racemizálás, intramolekuláris átrendeződés
Kondenzáció (transzferázok, liázok)	EC 2. EC 4.	dehidratálás, O-és N-acilezés, glikozilezés, észterezés, laktonizáció, aminálás
Új kötés létrehozása	EC 6.	C-C, C-O, C-P, C-N kötések kialakítása



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5

Enzimes és mikrobiális biokonverziók

MIVEL TÖRTÉNIK?

ENZIMEKKEL ➢ OLDOTT, RÖGZÍTETT

SEJTEKKEL ➢ NÖVEKEDŐ SEJTEKKEL
(fermentáció: AcOH, szorbóz, glükonsav)
➢ NYUGVÓ SEJTEKKEL
➢ RÖGZÍTETT sejtekkel
➢ TÖBBFÁZISÚ RENDSZEREKBE



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

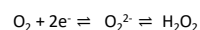
3

Oxidációs, redukciós átalakítások Oxidáció oxigénnel

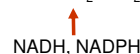
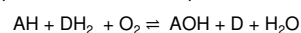
1. Oxidáció oxigénnel

Biológiai oxidációkban az O₂ vagy mint **végző elektronakceptor** működhet, vagy közvetlenül **beépül** a szerves molekulába.

Az **EC1. enzimcsoporton (oxidoreduktázok)** belül 3 alcsoport
EC 1.1.3 **oxidázok vagy elektrontranszferázok** (egyik oxigén atom sem épül be a szubsztrátba, például EC 1.1.3.4 glükózoxidáz):



EC 1.13.12 **monooxigenázok vagy hidroxilázok** (az egyik oxigén atom épül be a szubsztrátba, például szteroid hidroxilázok):



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

6

Oxidáció oxigénnel

EC 1.13 *dioxigenázok* vagy *oxigéntranszferázok* (mindkét oxigén atom beépül a szubsztátba, például [triptofán-pirroláz](#) (EC 1.13.11.11 tryptophan 2,3-dioxygenase):

$$A + O_2 \rightleftharpoons AO_2$$

L-triptofán

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Az ecetsav képződés biokémiája

Az enzimek a citoplazmamembránba épülnek be. A hidrogéneket ubikinonnak adják át. Az ubikinol visszaoxidálása során a terminális oxidációhoz hasonlóan molekuláris oxigénnel víz képződik és proton exportálódik a periplazmikus térbe. A protonok visszaáramlásával a sejt ATP-t termel, így nyer energiát a folyamatból.

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Oxidáció dehidrogénezéssel

1.1.1 DEHIDROGENÁZOK

Az oxigén nem közvetlenül a szubsztáttal reagál, hanem a hidrogéneket redukált koenzimek viszik át → H₂O

koenzim szükséglet :

- NADH , NADPH
- FADH₂
- Ubikinon
- PQQ (pirrolo-kinolin-kinon)

1. Primer alkoholok oxidációja
2. Szekunder alkoholok (cukrok) oxidációja
3. Aldehidek (cukrok) oxidációja

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Ipari ecetsavgyártás

Törzs: *Acetobacter aceti* → sok rokon és hibrid törzs

Technológiák: Orleans-i eljárás (borecet, XIV. század)
 generátor eljárás (bűkkfaforgács töltet felületén biofilm)
 szubmerz eljárás (Frings acetátor)
 O₂ ellátás kritikus
 S és P szint is kritikus
 etanol RÁTÁPLÁLÁS
 erős hőfejlesztés (455 KJ/mol)
 15-19% ecetsav koncentráció

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Primer alkoholok oxidációja: ecetsav képződése

$$CH_3CH_2OH \xrightarrow{ADH} CH_3CHO \xrightarrow{ALDH} CH_3COO^-$$

Acetaldehide Acetate

A folyamat két lépésben megy végbe, az etanol előbb acetaldehiddé oxidálódik (alkohol-dehidrogenáz), majd az aldehid oxidálódik ecetsavvá (aldehid dehidrogenáz).

Az ADH proszтетikus csoportja PQQ (pirrolo-kinolin-kinon), ez veszi át a hidrogéneket, majd ubikinonnak adja át.

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Az ecetsav felhasználása

Direkt felhasználás: erős savként
 vízkőoldás
 élelmiszeripar: tartósítás

Vegyipari alapanyagként:

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Szekunder alkoholok oxidációja

OCC(O)CO
Glicerín

$\xrightarrow{\text{Acetobacter v. Gluconobacter suboxydans}}$

OCC(=O)CO
dihidroxi-aceton (DHA)

Az *Acetobacter/Gluconobacter suboxydans* enzime csak olyan szekunder hidroxil-csoportot képes oxidálni, amelynek szomszédságában két cisz helyzetű alkoholos OH található. Bertrand szabály (1904)

OCC(O)C(O)CO
Szorbít – szorbóz átalakítás

$\xrightarrow{\text{Acetobacter v. Gluconobacter suboxydans}}$

OCC(O)C(=O)CO

13

Aszkorbinsav előállítás

Az aszkorbinsav gyártásnak több változatát is kidolgozták, ezekben több biokonverziós lépés is szerepel. Pl. a 2-keto-gulonsav kialakítása kémiai út helyett megoldható két biotranszformációval is:

OCC(O)C(O)CO
Szorbóz

$\xrightarrow{\text{Gluconobacter melanogenus}}$

OCC(O)C(=O)CO
L-szorbazon

$\xrightarrow{\text{Pseudomonas putida}}$

OCC(O)C(=O)C(=O)O
2-keto-L-gulonsav

16

Szorbóz fermentáció

Technológia:

- alapanyag:** lebontott keményítő (glükóz) szörp
- hidrogénezés:** Raney-Ni-vel → szorbít
- mikrobák:** *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter (Gluconobacter) suboxydans* → Ni-hez szoktatás!!!
- rátáplálási eljárás:** 10-20% szorbít → 33-35% szorbít
- konverzió:** >95%
- folytos technológiák is!**
- nyugvósejtes fermentációk is!**

14

Alternatív aszkorbinsav előállítás

Az *Acetobacter suboxydans* és a *Xanthomonas translucens* szelektív oxidációival más úton is eljuthatunk a 2-keto-gulonsavhoz:

OCC(O)C(O)CO
glükóz

$\xrightarrow{\text{Acetobacter suboxydans}}$

OCC(O)C(O)C(=O)O
D-glikonsav

$\xrightarrow{\text{Acetobacter suboxydans}}$

OCC(O)C(O)C(=O)C(=O)O
Ca-5-keto-D-glikonát

$\xrightarrow{\text{Xanthomonas translucens}}$

OCC(O)C(=O)C(=O)O
2-keto-L-gulonsav

17

Aszkorbinsav előállítás

Szorbít-szorbóz átalakítás a klasszikus aszkorbinsav gyártás egyetlen biokonverziós lépése. (Reichstein 1934)

OCC(O)C(O)CO
D-glucose

$\xrightarrow[140-150^\circ\text{C}]{80-125\text{ atm. Ni}^2+}$

OCC(O)C(O)C(O)CO
D-szorbítol

$\xrightarrow[\text{PQQ}]{\text{Gluconobacter sp. (SLDH)}}$

OCC(O)C(O)C(O)C(=O)O
L-sorbóse

$\xrightarrow{\text{H}_2\text{SO}_4}$

OCC(O)C(O)C(=O)C(=O)O
diaceton-L-sorbóse

$\xrightarrow[\text{HCl}]{\text{CH}_3\text{OH}}$

OCC(O)C(O)C(=O)C(=O)O
2-keto-L-gulonic acid methylester

$\xrightarrow{100^\circ\text{C. C}_2\text{H}_5\text{OH}}$

OCC(O)C(O)C(=O)C(=O)O
2-keto-L-gulonic acid

$\xrightarrow{100^\circ\text{C. C}_2\text{H}_5\text{OH}}$

OCC(O)C(O)C(=O)C(=O)O
L-ascorbic acid

15

Aszkorbinsav előállítások összefoglalása

OCC(O)C(O)CO
Glükóz

$\xrightarrow{\text{H}}$

OCC(O)C(O)CO
szorbít

$\xrightarrow{\text{H}}$

OCC(O)C(O)CO
szorbóz

$\xrightarrow{\text{K}}$

OCC(O)C(=O)CO
2-keto-gulonsav

$\xrightarrow{\text{K}}$

OCC(O)C(=O)C(=O)O
2-keto-L-gulonsav

$\xrightarrow{\text{H}}$

OCC(O)C(O)C(=O)C(=O)O
L-gulonát

$\xrightarrow{\text{H}}$

OCC(O)C(O)C(=O)C(=O)O
5-keto-glükonát

$\xrightarrow{\text{H}}$

OCC(O)C(O)C(=O)C(=O)O
D-glükonát

M – biokonverzió, **H** – hidrogénezés, **K** – kémiai reakciólépés

18

Aszkorbinsav gyártás

Éves piac: 100-120.000 t/év, ennek 80%-át Kína termeli (+ BASF, Takeda, DSM, Merck) a klasszikus eljárással.

Fejlesztések: glu vagy gal $\xrightarrow{\text{de novo}}$ C-vitamin
rec. *S. cerevisiae*

De novo növényi sejtekkel: *Rosa rugosa* 1-2% glükóz, fruktóz, galaktóz alapon.

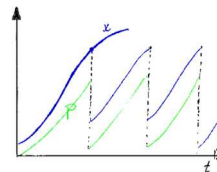


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

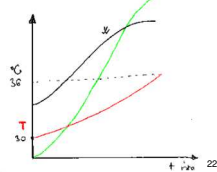
19

Glükonsav gyártási technológiák

A keletkező savat közömbösíteni kell - pH szabályozás (~7), CaCO₃-tal.
Félfolytonos fermentáció: részleges lefejtés és feltöltés.



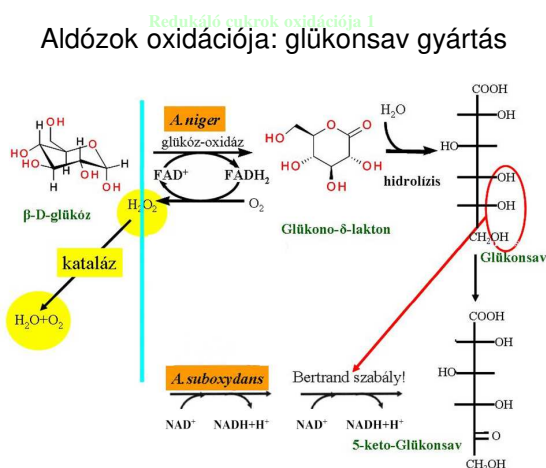
A növekedés és a termékképződés optimális hőfoka nem esik egybe (30 ill. 36 °C). A váltást nem lépcsősen végzik, hanem kiszámolták az optimális hőfokprofil:



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

22

Aldózok oxidációja: glükonsav gyártás



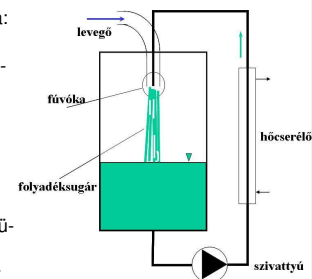
20

Más glükonsav gyártási technológiák

Kétlépcsős Vogelbusch technológia:

1. MeOH-on kemosztát folytonos technológiával *Acetobacter metanolicus* sejtömeg előállítás
2. Biokonverzió nagy glükóz koncentráció mellett Vb-IZ reaktorban (becsapódó sugaras levegőztetés)

Létezik tisztított glükózoxidázos technológia is (ARGONNE, USA) különleges integrált rendszer: elektrodeionizálással semlegesítik a keletkező savat.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

23

Aldózok oxidációja: glükonsav gyártás

Glükóz oxidációja: lehet elektrokémiai, vagy HOCl-os oxidációval is, de inkább biokonverzióval glükózból.

Aspergillus niger: az első lépésben glükono-laktont állít elő, ez spontán hidrolizál glükonsavvá. Az O₂ nem található a szubsztrát-tal, hanem a FAD proszitetikus csoportok H₂O₂-dá alakítják. Ezt a kataláz elbontja.

Az *A/G. suboxydans* egy lépésben hajtja végre a reakciót (NAD koenzimmel), de tovább is oxidál 5-keto-glükonsavvá (Bertrand szabály). Ez a reakció a körülmények beállításával visszazorítható (pH=7, t=37 °C).



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

21

A glükonsav és a glükóz-oxidáz felhasználása

Ipar: páclé, sütőpor, fémfelület tisztítás
kation-bevitel (Cu, Fe, Ca) E574-579
kristályok helyett ~50% oldat, sav = laktón (E575)

*A glükóz-oxidáz/kataláz rendszer: glükóz eltávolítása tojásfehérjéből (sütőipar, szárítás előtt). Enzimkeveréket használnak (165 U/kg) hozzáadott H₂O₂-dal (kb 0.1 % w/w) biztosítják a szükséges molekuláris oxigént.

*O₂ eltávolítás a palackozott és dobozolt italok, konzervek fejtér-fogatóból, eliminálandó a nem enzim barnulást ill. egyéb oxidációs folyamatokat.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

24

A glükóoxidáz mellékreakciója

Kinon redukciója:
 Glükóz $\xrightarrow{\text{glükóoxidáz}}$ glükonsav

Az O_2 helyett a kinon lehet az elektron akceptor, ez veszi fel a hidrogéneket.

Benzokín + $2 e^- + 2 H^+$ \rightleftharpoons Hidrokinon

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

„Prelog” enzimek

Az enzimek sztereoselektivitása oxidációs irányban lehetővé teszi racém keverékek reszolválását is:

S,R + R

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Ketonok redukciója szekunder alkoholokká

Ezt a redukciót az alkohol dehidrogenázok sztereoselektíven végzik. A legtöbb enzim a Prelog-szabály szerint redukál: a kis és nagy méretű szubsztituensek elhelyezkedése:

KOENZIMREGENERÁCIÓ

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Királis redukciók

BIM 5B 2001

Prokirális vegyület	Királis vegyület
$R - C(=O) - R'$	$R - CH(OH) - R'$
$R - C(=NH) - R'$	$R - CH(NH_2) - R'$
Ketonok, ketosavak	Alkohol
Iminek, iminosavak	Aminosav

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Ketonok redukciója szekunder alkoholokká

Példa a Prelog szabályra:

Szulkaton \rightarrow Szulkatol

Találtak olyan enzimeket is, amelyek az anti-Prelog szabály szerint redukálnak \rightarrow tetszés szerint irányíthatjuk a reakciót.

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék