


BIOKONVERZIÓK, BIOTRANSZFORMÁCIÓK

Oxidációs, redukciós átalakítások



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 funkciók csoportot alakít át
- Enyhe reakciókörülmények – T, p, pH



4

BIOTECHNOLÓGIAI ELJÁRÁSOK

De novo FERMENTÁCIÓK

$$\Sigma S_i + X \longrightarrow \Sigma P_j + (X + \Delta X)$$

mikroorganizmus
 növényi sejtenyészet
 állati szövettenyészet


BIOTRANSZFORMÁCIÓK

$$S + X \longrightarrow P + X$$

sejt(alkotórész)

$$S + E \longrightarrow P + E$$

enzim



2

EC reakciótípusok

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 áthelyezése, 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



5

Enzimes és mikrobiális biokonverziók

MIVEL TÖRTÉNIK?

ENZIMEKKEL ➢ OLDOTT, RÖGZÍTETT

SEJTEKKEL ➢ NÖVEKEDŐ SEJTEKKEL
 (fermentáció: AcOH, szorbóz, glükonsav)

- NYUGVÓ SEJTEKKEL
- RÖGZÍTETT sejtekkel
- TÖBBFÁZISÚ RENDSZEREKBE



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):

$$O_2 + 2e^- \rightleftharpoons O_2^{2-} \rightleftharpoons H_2O_2$$

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

$$AH + DH_2 + O_2 \rightleftharpoons AOH + D + H_2O$$

↑
NADH, NADPH



6

Oxidáció oxigénnel

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

$$A + O_2 \rightleftharpoons AO_2$$

L-triptofán

N-formil-kinurenin

Tryptofán pirroláz (dioxigenáz)

7

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.

10

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Oxidáció dehidrogénezéssel

1.1.1 DEHIDROGENÁZOK

Az oxigén nem közvetlenül a szubsztráttal 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

8

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 hőfejlődés (455 KJ/mol)
 15-19% ecetsav koncentráció

11

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Primer alkoholok oxidációja: ecetsav képződése

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

Acetaldehyde 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.

9

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Az ecetsav felhasználása

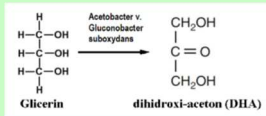
Direkt felhasználás: erős savként
 vízkőoldás
 élelmiszeripar: tartósítás

Vegyipari alapanyagként:

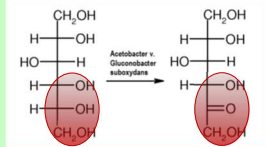
12

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Szekunder alkoholok oxidációja



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

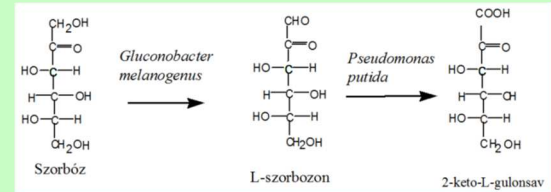


Szorbít – szorbóz átalakítás

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:



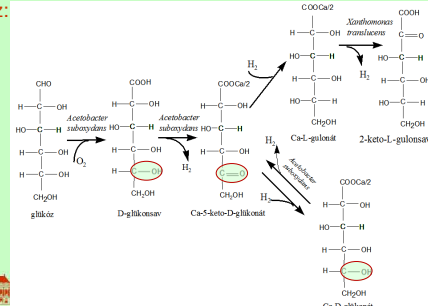
Szorbóz fermentáció

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%
- folytonos technológiák is!**
- nyugvósejtes fermentációk is!**

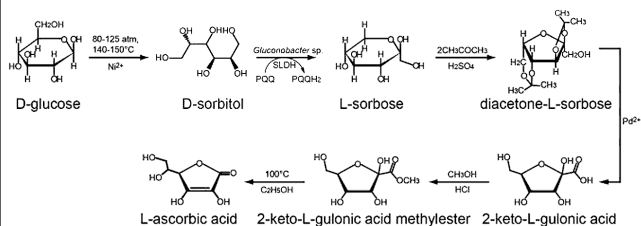
Alternatív aszkorbinsav előállítás

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

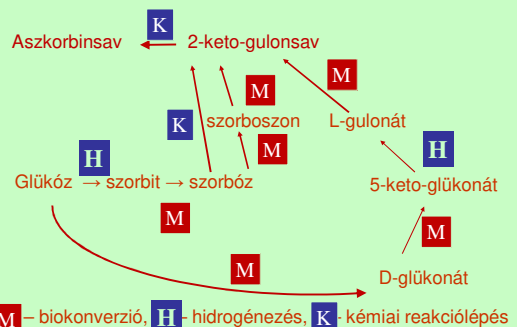


Aszkorbinsav előállítás

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



Aszkorbinsav előállítások összefoglalása




Aszkorbinsav gyártás

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

$$\text{glu vagy gal} \xrightarrow[\text{rec. } S. cerevisiae]{\text{de novo}} \text{C-vitamin}$$

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

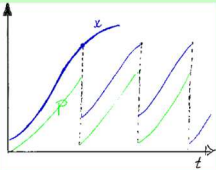
De novo növényi sejtekkel: *Rosa rugosa* 1-2% glükóz, fruktóz, galaktóz alapon.



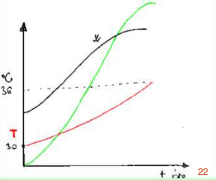

19

Glükonsav gyártási technológiák

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

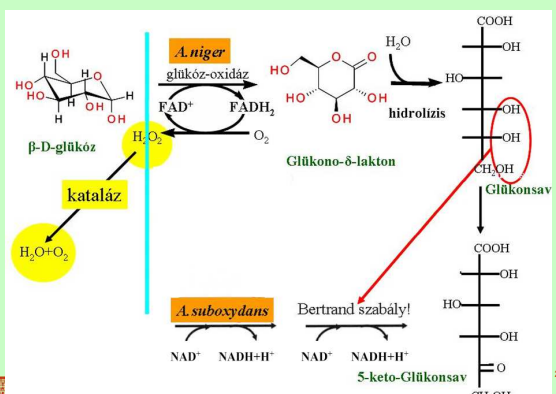


A növekedés és a termékképződés optimális hőfoka nem esik egybe (30 ill. 36 °C). A váltást nem lépcsősen végzik, hanem kiszámlálták az optimális hőfokprofil:

22

Aldózok oxidációja: glükonsav gyártás



A. niger
 glükóz-oxidáz
 $\text{FAD}^+ \rightarrow \text{FADH}_2$
 $\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$

A. suboxydans
 $\text{NAD}^+ \rightarrow \text{NADH} + \text{H}^+$
 $\text{NAD}^+ \rightarrow \text{NADH} + \text{H}^+$

Bertrand szabály!

5-keto-Glükonsav

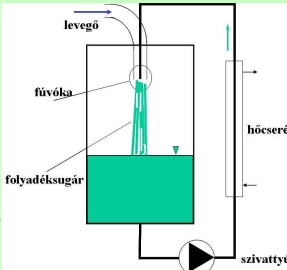

20

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.


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 találkozik a szubsztráttal, hanem a FAD prosztetikus 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).




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.

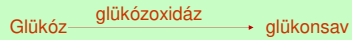
*O₂ eltávolítás a palackozott és dobozolt italok, konzervek fejtérfo-gatából, eliminálandó a nem enzimes barnulást ill. egyéb oxidációs folyamatokat.



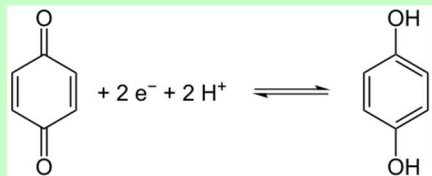
24

A glükózoxidáz mellékreakciója

Kinon redukciója:



Az O₂ helyett a kinon lehet az elektron akceptor, ez veszi fel a hidrogéneket.

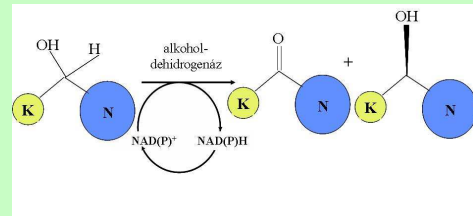


Benzokín

hidrokinón

„Prelog” enzimek

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

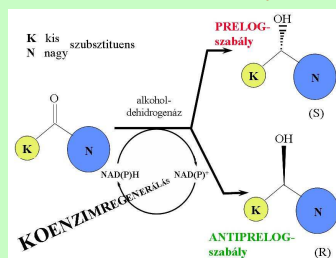


S,R

R

Ketonok redukciója szekunder alkoholokká

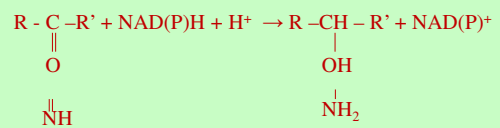
Ezt a redukciót az alkohol dehidrogenázok sztereoselektíven végzik. A legtöbb enzim a Prelog-szabály szerint redukál: a kis és nagy méretű szubsztituensek elhelyezkedése:



Királis redukciók

Prokirális vegyület

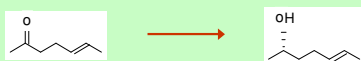
Királis vegyület



Ketonok, ketosavak \rightarrow Alkohol
 Iminek, iminosavak \rightarrow Aminosav

Ketonok redukciója szekunder alkoholokká

Példa a Prelog szabályra:



Szulkaton

Szulkatol

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