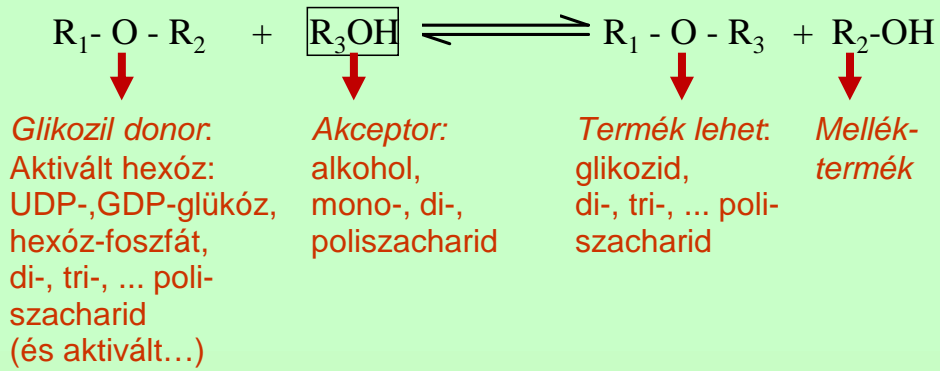


EC 2. TRANSZFERÁZOK:

EC 2.4. Transzglykozilálás v. transzglykozilezés



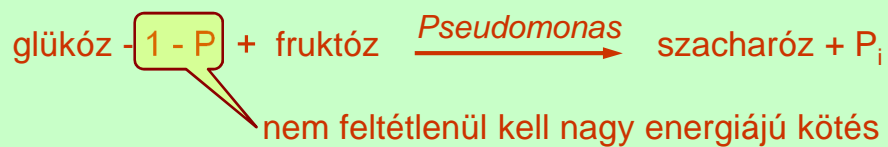
Helyettesítettek is! Hexózamin, metilszármazékok.....



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

1

Transzglykozilálás



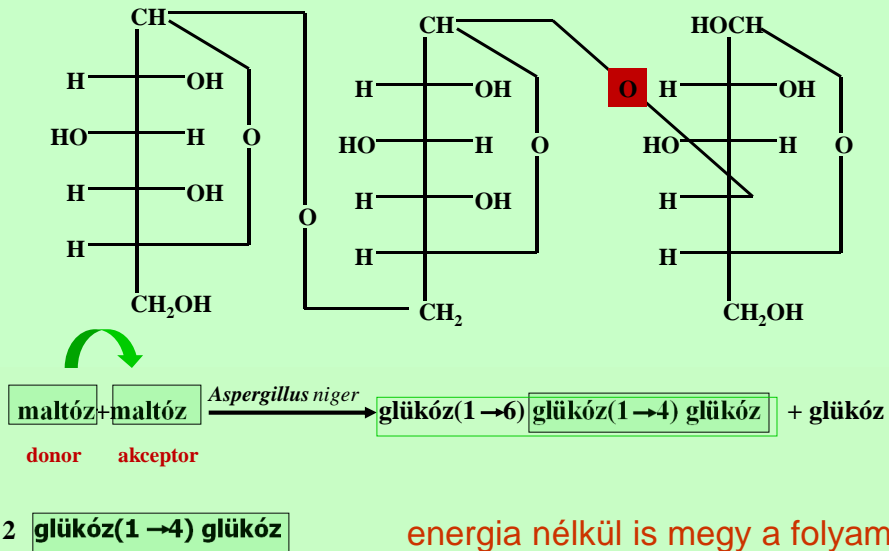
- 2. 4. x.x. Glikoziltranszferázok
- 2.4.1.x : hexozil-transzferázok
- 2.4.2.x: pentozil-transzferázok



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

Transzglykozilálás



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

3

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: gélesztők, sűrítők, extrém reológiai tulajdonságok.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

4

Mikrobiális poliszacharidok			
poliszacharid	mikroorganizmus	szerkezet	felhasználás
cellulóz	<i>Acetobacter</i>	lineáris β -(1 \rightarrow 4)-glükán	Mikrofibrilláris élelmi rostként
kurdlán	<i>Agrobacterium</i> <i>Alcaligenes faecalis</i>	lineáris β -(1 \rightarrow 3)-glükán	Gélek, élelmiszeripar
pullulán	<i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Pullularia pullulans</i>	lineáris 2* α -(1 \rightarrow 4), α -1*(1 \rightarrow 6)-glükán	Erős rost- és filmképző (cellofán helyettesítő)
szkleroglükán	<i>Sclerotium rolfai</i> , <i>Sc. glucanicum</i>	lineáris β -(1 \rightarrow 3)-glükán β -(1 \rightarrow 6) elágazásokkal	Festékipar
gellán	<i>Pseudomonas elodea</i>	Lineáris heteropoliszacharid - β D-Gl-(1 \rightarrow 4)- β D-GlcA-(1 \rightarrow 4)- - β D-Gl-(1 \rightarrow 4)- - α D-Rha-(1 \rightarrow 3)-	Agar és karragén helyettesítő, Élelmiszadalék.
alginát	<i>Macrocystis pyrifera</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Azotobacter vinelandii</i>	6* β D-MannA-(1 \rightarrow 4)- -6* β D-GlcA-(1 \rightarrow 4)	Főleg az alga eredetűt használják: enzimrög-zítés, élelmiszerek

Xantán

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

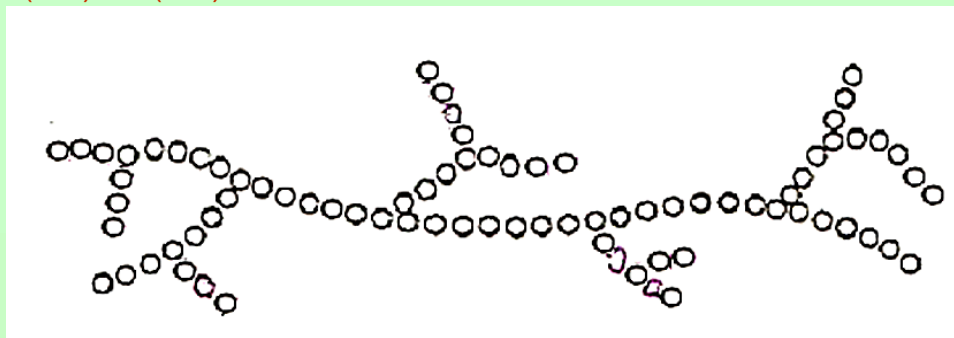
\rightarrow 4)-glükóz- β (1 \rightarrow 4)-glükóz β (1 \rightarrow

3
 \uparrow
 1 α

mannóz- β (1 \rightarrow 4)-glükuronsav- β (1 \rightarrow 2)-mannóz-OAc
(észter)

Dextrán

Szerkezete: elágazó láncú glükóz polimer, mint az amilopektin, de: a kötések túlnyomó része (1-6), mellette kevés (1-4), (1-2) és (1-3).

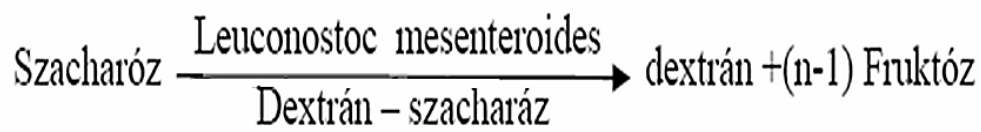


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

7

A dextrán előállítása

Bioszintézise:



Az enzim leveszi a glükózt a szacharózzal és rákapcsolja a glükóz lánc végére. (Legelső alkalommal: egy szacharóz glükózára.) Nincs előtte hidrolízis, egy lépéses a reakció.

Irreverzibilis: ~100% a konverzió

Lehetne az enzimet tiszta formában kinyerni (extracelluláris), de a fermentáció végrehajtani gazdaságosabb.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

8

A dextrán előállítása

BIOGAL technológia:

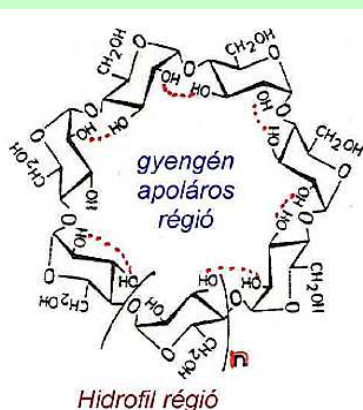
- *L. mesenteroides* – tejsavbaktérium, anaerob
- előbb a sejtszaporítás, aztán a termékképzés
- tápoldat: 10-20% szacharóz + 2% CSL + foszfát
- levegőztetés nem kell, csak keverés
- pH szabályozás: min 5,0–5,2 , a képződő tejsavat közömbösíteni kell
- 0,5 g/l baktérium ~80 g/l dextránt (átlagos móltömeg: ~500.000) termel, + esetleg a fruktóz is hasznosítható
- Kinyerés: kicsapás alkoholokkal, szűrés
- Felhasználás: vérplazmapótló, Sephadex



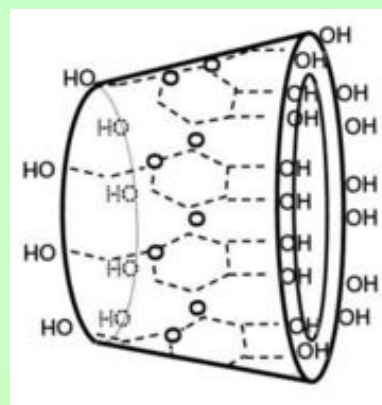
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

9

Ciklodextrinek (CD, Schardinger dextrinek)



A ciklodextrinek szerkezete
 n = glükopiranoz egységek száma.
 $n = 0$: α -CD, 1: β -CD, 2: γ -CD



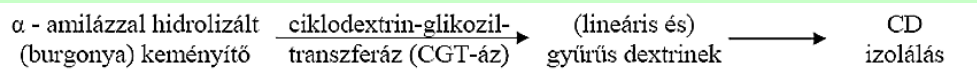
A gyűrű belső felülete apoláris, ezért a hidrofób molekulák beleilleszkednek és zárványvegyületet alkotnak.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

10

Ciklodextrinek előállítása



Egylépéses biokonverzió: (CGTáz, EC 2.4.1.19 = cyclodextrin glucanotransferase).

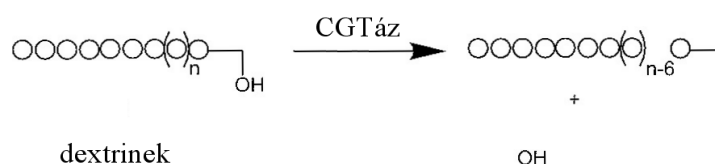
Több törzs is termeli:

- 1. *Bacillus macerans*
- 2. Alkalofil bakt. № 38-2
- 3. *Klebsiella pneumoniae* (patogén) klónozták *B. subtilis*-be
- 4. *Bacillus circulans*

Izolált, oldott enzimet használnak
 Az α -, β - és γ -CD keveréke keletkezik.

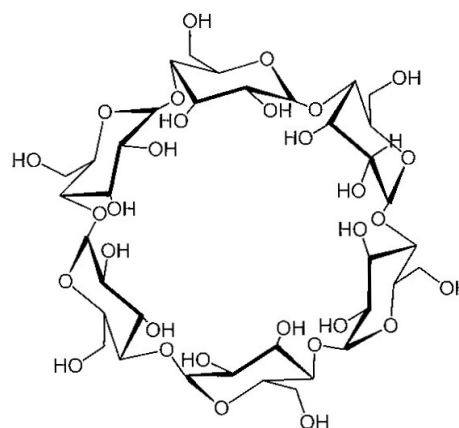


Ciklodextrinek előállítása



Előhidrolízis: 5-8 % keményítő, α -amilázzal, $n \sim 10$ -ig
 Konverzió CGT-ázzal: többféle enzim, többféle optimum: 34-55 °C, pH=5,8-6,0
 Konverzió: függ az enzim mennyiségétől:

15E CGT-áz/g keményítő: 24% CD
 90E CGT-áz/g keményítő: 56% CD



α -ciklodextrin

○ = glükóz




Ösztradiol

Progészteron

Ampicillin

Prostaglandin F



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

13

Kondenzáció, addíció, csoport eltávolítás (liázok)

1921


benzaldehyd + HOC-CH₃ $\xrightarrow[80\%]{\text{Saccharomyces cerevisiae}}$ (1*R*)-fenil-acetil-karbinol aciloin

$\xrightarrow[\text{H}_2/\text{Pt}]{\text{Reduktív aminálás CH}_3\text{NH}_2}$ (1*R*,2*S*)-efedrin L-efedrin

glikolízis \uparrow CH₃COCOOH $\xrightarrow[\text{Mg, TPP}]{\text{EC 4.1.1.1. Piruvát dekarboxiláz (S.cerevisiae)}}$ HOC-CH₃

○ Helyettesített benzaldehydekkel helyettesített efedrinek

Szimpatikus Idegizgatószer
Asztma, Taxol oldallánc

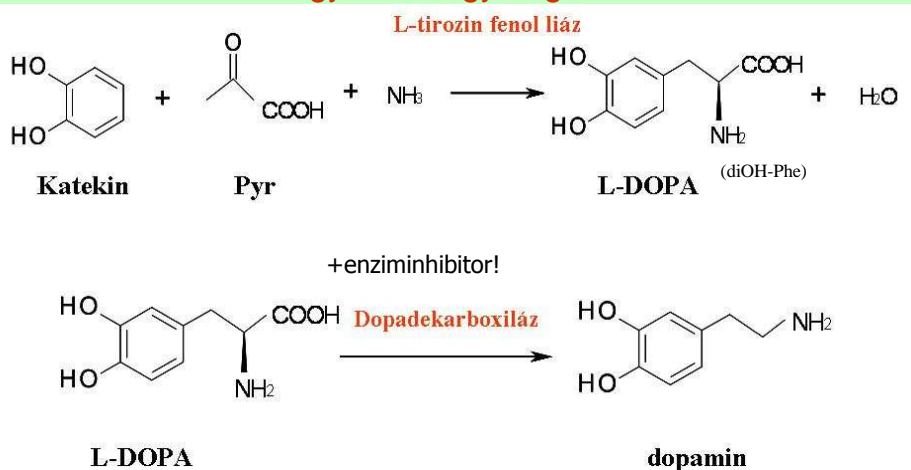


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

14

L-DOPA előállítása

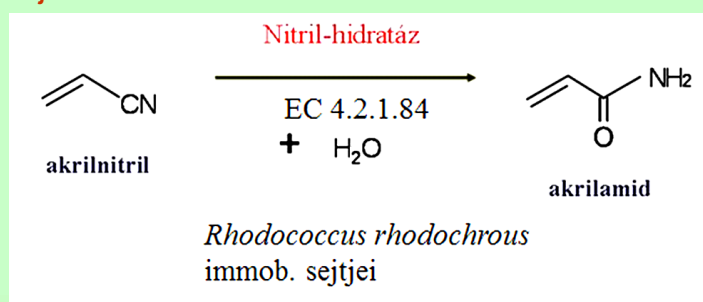
Ez a tirozin dezaminálásának megfordítása (EC 4.1.99.2, L-tirozin-fenol liáz) *Erwinia herbicola* sejtuszpenzióval. A cél a dopamin (neurotranszmitter) szint emelése (Parkinson kór kezelése) – a DOPA mellé dekarboxiláz enzimet is adnak, a második reakció az agyban megy végbe.



15

Akrilamid előállítása

...akril-nitrilből. Van kémiai eljárás (Cu katalizátorral), de az enzimes jobb



1984, Mitsubishi Rayon (J) 100.000 t/év
 Óriás enzimek: 4-5 alegység, 130 kD, 18-20 db 520 kD
 Optimális hőmérséklet 35 °C, de 10 °C-on végzik, hogy ne polimerizáljon.

16



Akrilamid előállítása

Nitto (J) technológia: rátáplálásos eljárás, 2×10^6 U/dm³ enzim-aktivitással

Produktivitás: 80 kg/m³h, konverzió: 99,9%

A biokonverzió előnyei:

	Kémiai eljárás	Enzimes eljárás
Reakció hőmérséklete	70 °C	0-15 °C
konverzió	70-80%	99,9%
Töményítés a feldolgozásnál	szükséges	nem szükséges
Energia igény (gőz, elektromos)	1,9 MJ/kg	0,4 MJ/kg
CO ₂ termelés	1,5 kg CO ₂ / kg	0,3 kg CO ₂ / kg

Az akrilamid → poliakrilamid: koagulátor, talajkondicionáló, papírgyártás

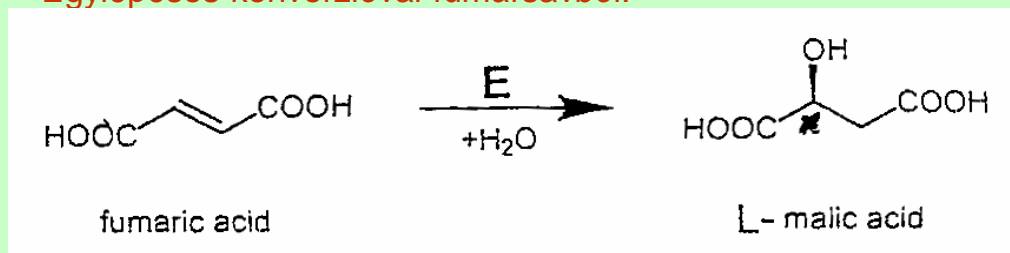


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

17

ADDÍCIÓS REAKCIÓK: almasav előállítása

Egylépéses konverzióval fumársavból.



Törzs: *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum* nyugósejtes tenyészet

Enzim: EC 4.21.2 fumaráz, sztereoszelektív, csak L-malátot termel.

Körülmények: pH = 8, t = 25 °C

Egyensúly: 15 : 85 aránynál (oldatban) →

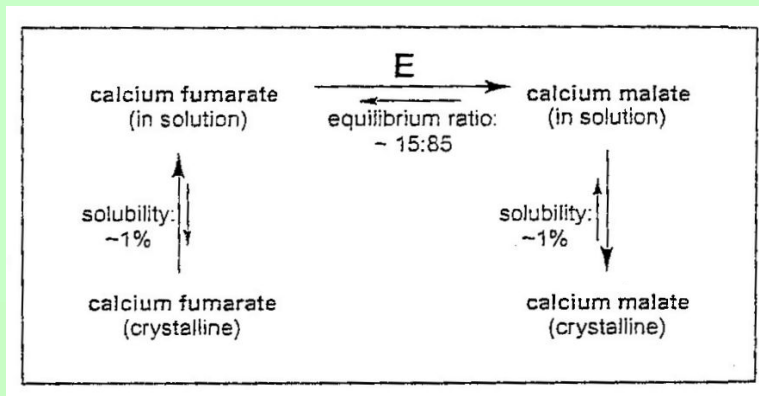


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

18

ALMASAV ELŐÁLLÍTÁSA

A termék kicsapásával az egyensúlynál jobb konverzió érhető el:



Kristályfermentáció

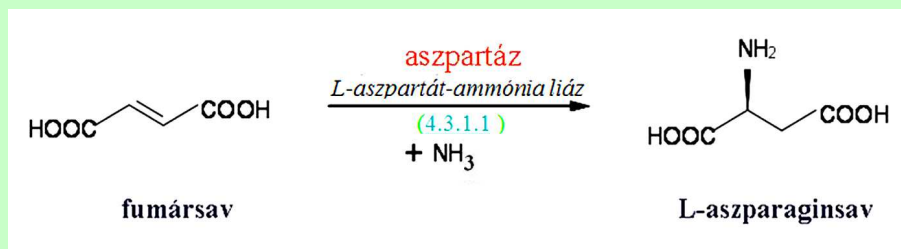


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

19

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 $\sim 99\%$

Felhasználás: aszpartám (édesítőszer) alapanyaga

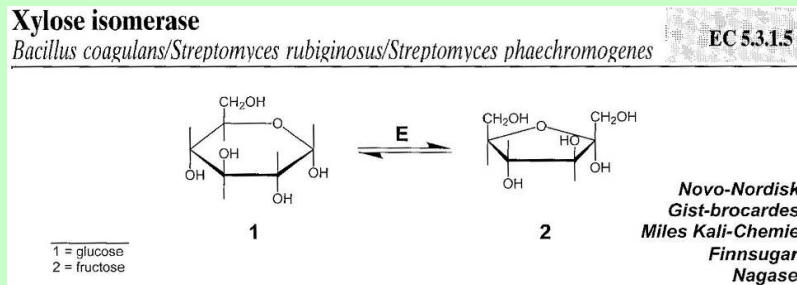


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

20

IZOMERÁZOK (EC 5.x.x.x): glükóz-(xilóz-)izomeráz

Eredetileg xilóz izomeráz, de a glükózt is izomerizálja fruktózá.



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



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 cloaceae*

Ezeknek foszforilált szubsztrát kell, és arzenát 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



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-rudacskák



Table 2. Commercial immobilized glucose isomerase preparations

Company	Enzyme source	Immobilization procedure
Clinton Corn Processing	<i>Streptomyces ribigenosus</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 Chemic	<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

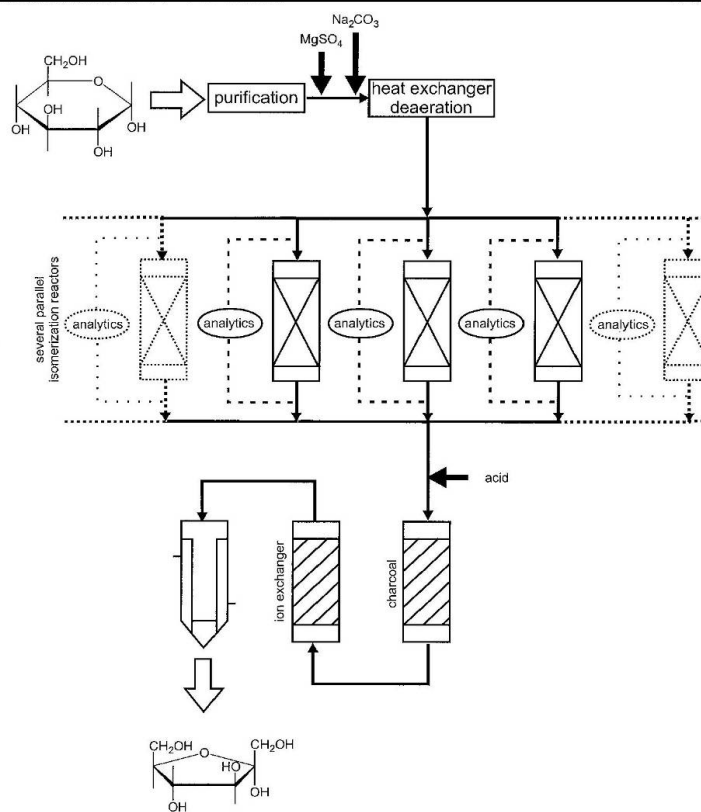
1. A glükóz szirupot előtte alaposan meg kell tisztítani (szűrés, aktív szén, ioncsere, ne legyen Ca^{2+} ion).
2. Immobilizált sejteket alkalmaznak oszlopokban, az oszlopok hatékonyságát folyamatosan mérik.
3. Élettartam: $t_{1/2} = 100\text{-}600$ nap, de $-12,5\%$ után cserélik
4. Termék: nem egyensúlyi 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 = izoszörp
 cukortartalma $\sim 70\%$ ennek 55%-a fruktóz



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

25

„IZOCUKOR” (HFCS) GYÁRTÁS



IZOCUKOR” (HFCS) GYÁRTÁS

Magyarországon 1978-82 között Szabadegyházán 4 milliárd (akkori) forintos 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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

27

ENZIMES RESZOLVÁLÁS

Általánosan: 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 sztereospecifitását használják ki.

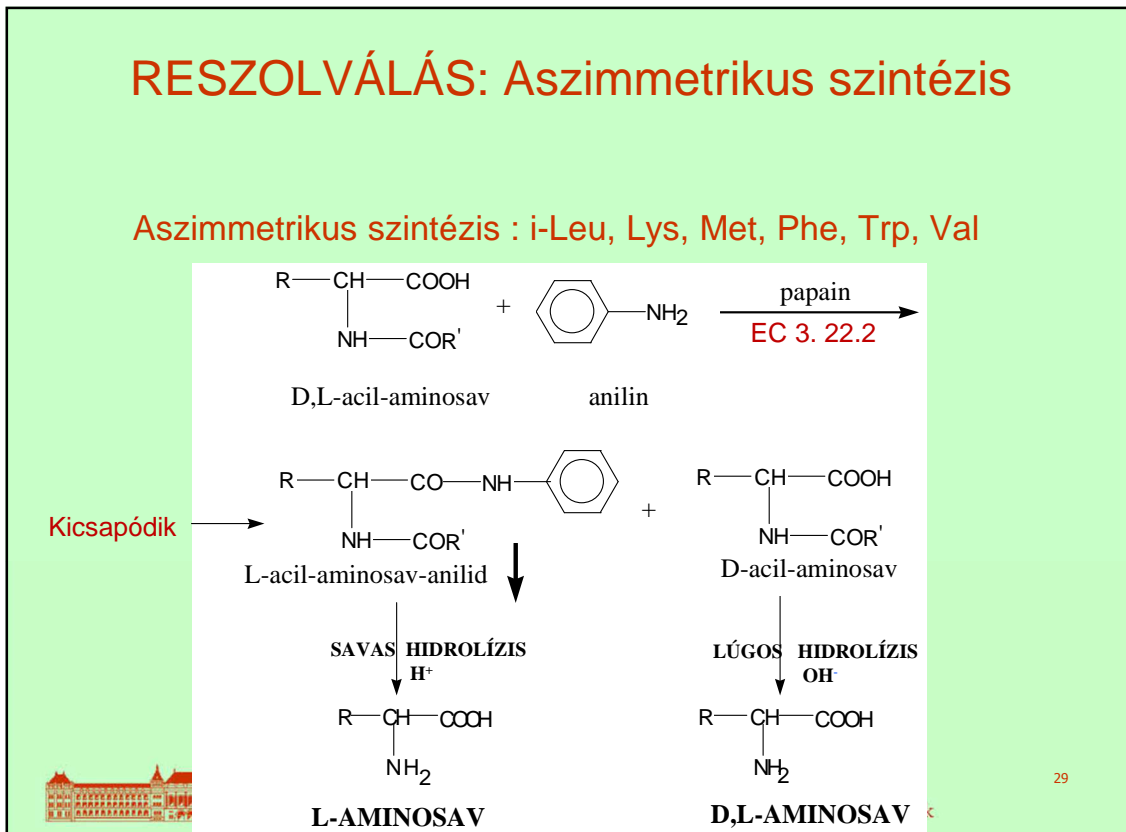


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

28

RESZOLVÁLÁS: Aszimmetrikus szintézis

Aszimmetrikus szintézis : i-Leu, Lys, Met, Phe, Trp, Val



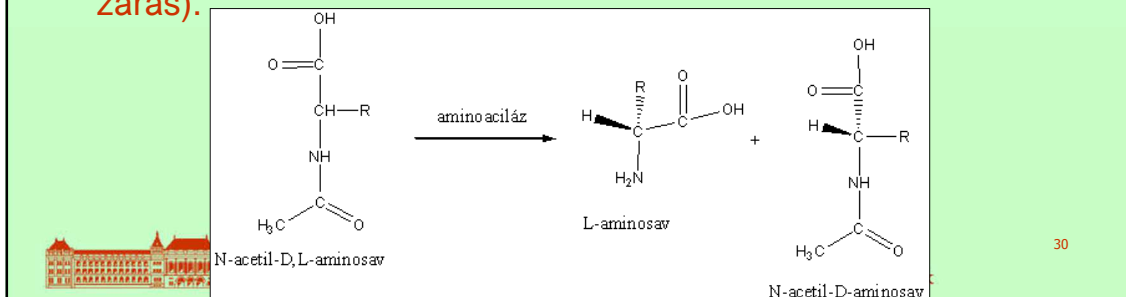
RESZOLVÁLÁS: aszimmetrikus hidrolízis

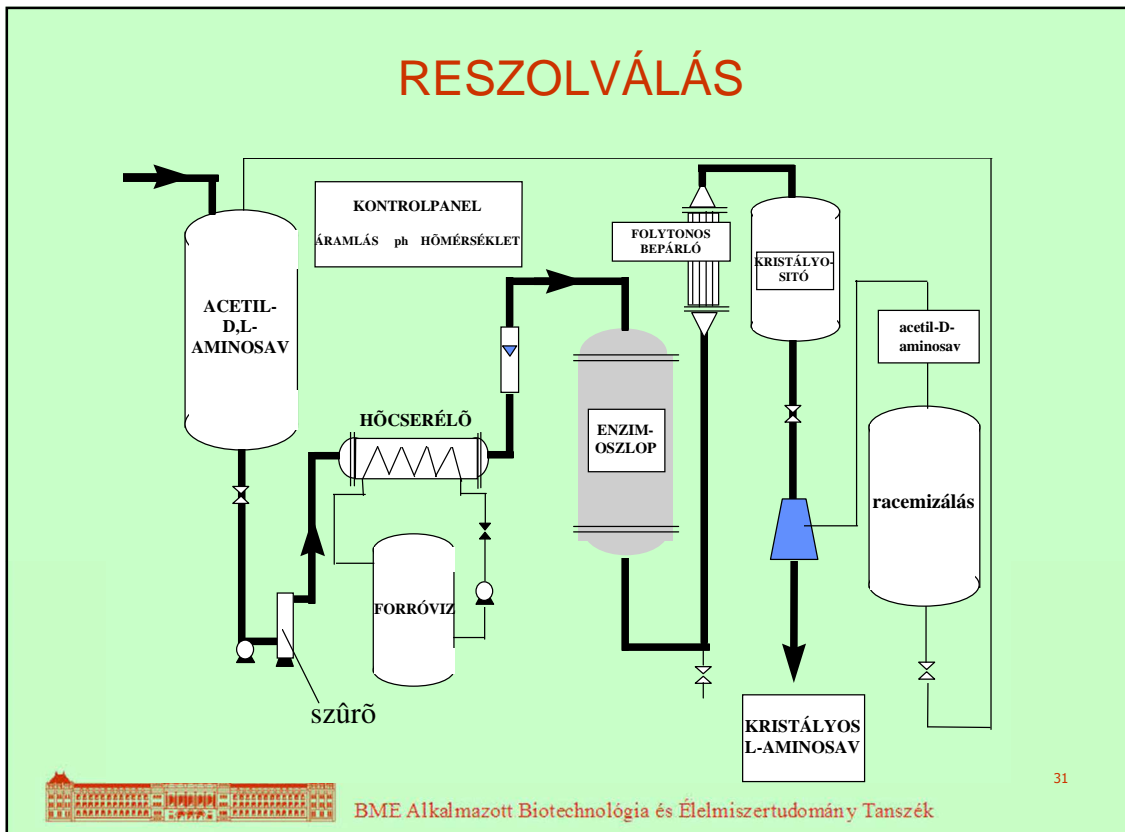
A racém aminosav keverékre olyan funkciós csoportot kötünk, aminek eltávolítására van sztereoselektív enzim.

Típusreakció: N-acilezés, majd hidrolízis aminoacilázzal.

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.

CC(=O)N[C@@H](CS)C(=O)O $\xrightarrow[\text{Co}^{2+}]{E}$ CC(=O)N[C@@H](CS)C(=O)O + CC(=O)N[C@H](CS)C(=O)O + CC(=O)O

D,L-1 D-2 L-3 4

1 = N-acetyl-methionine 3 = methionine
 2 = N-acetyl-methionine 4 = acetic acid

32

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	Tápl.kiegészítő, gyógyszer
1.000	L-Arginin	Fermentáció, extrakció	Gyógyszergyártás
500	L-Leucin	Fermentáció, extrakció	Gyógyszergyártás
500	L-Valin	Fermentáció, extrakció	Gyógyszergyártás
300	L-Triptofán	Nyugvósejtes konverzió	Gyógyszergyártás
300	L-Izoleucin	Fermentáció	Gyógyszergyártás

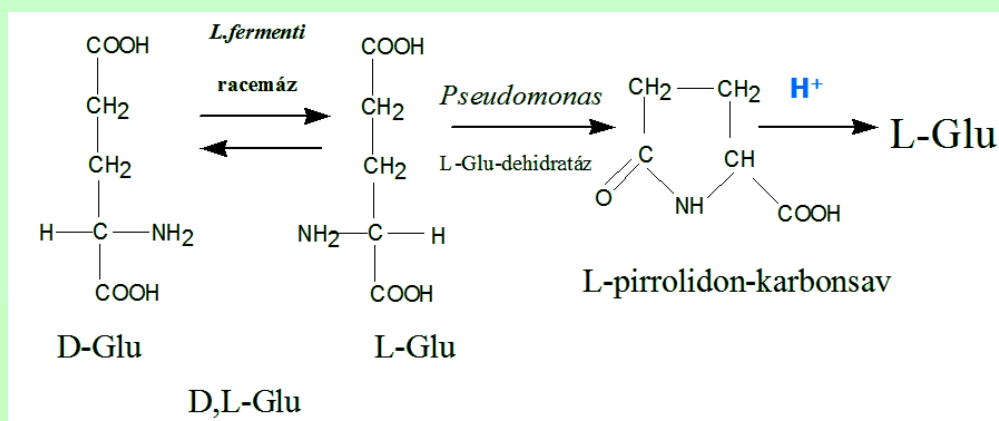


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

33

RESZOLVÁLÁS

Speciális módszer glutaminsavra:

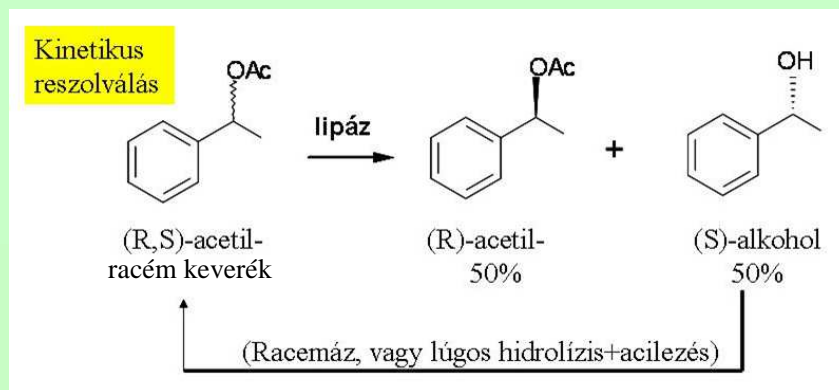


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

34

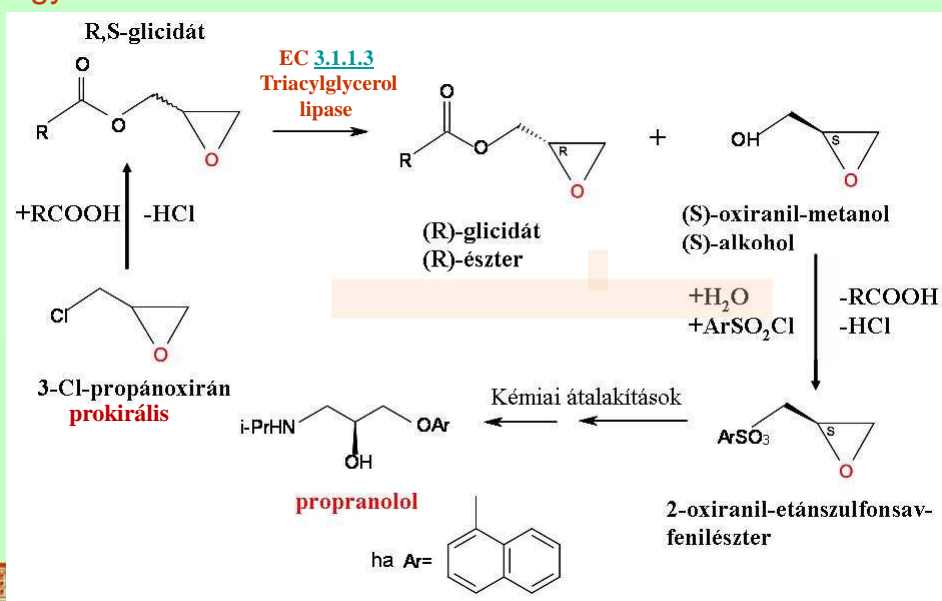
Aszimmetrikus hidrolízis lipázzal

A savamid kötések mellett az észter kötések aszimmetrikus hidrolízise is alkalmas rezolválásra.



Aszimmetrikus hidrolízis lipázzal

Egy béta-blokkoló molekula szintézise:



Aszimmetrikus hidrolízis lipázzal

A kinetikus racemizálási kulcslépés során visszamaradó (R)-észter racemizálható és visszavezethető a rezolválási 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.

