


BIOKONVERZIÓK, BIOTRANSZFORMÁCIÓK
Oxidációs, redukciós átalakítások



1

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

BIOTECHNOLÓGIAI ELJÁRÁSOK

De novo FERMENTÁCIÓK

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

mikroorganizmus
növényi sejtenyészet
állati szövetenyészet


BIOTRANSZFORMÁCIÓK

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

sejt(alkotórész)

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

enzim




2

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Enzimes és mikrobiális biokonverziók

MIVEL TÖRTÉNIK?

- ENZIMEKKEL > OLDOTT, RÖGZÍTETT
- SEJTEKKEL > NŐVEKEDŐ SEJTEKKEL
(fermentáció: AcOH, szorbóz, glükonsav)
- > NYUGVÓ SEJTEKKEL
- > RÖGZÍTETT sejtekkel
- > TÖBBFÁZISÚ RENDSZEREKBE



3

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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
 - kirootechnológia: a szerves kémikusok új eszköztára
- Csoportspecifitás – egy funkció csoportot alakít át
- Enyhe reakciókörülmények – T, p, pH



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

4

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 gyűrűfelnyitás, 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

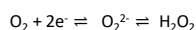
Oxidációs, redukciós átalakítások Oxidáció oxigénnel

1. Oxidáció oxigénnel

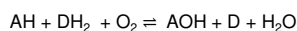
Biológiai oxidációkban az O₂ vagy mint **végző elektronakceptor** működhet, vagy közvetlenül **beépül** a szerves molekulába.

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



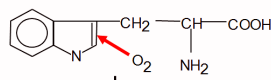
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

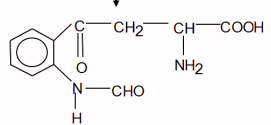
6

Oxidáció oxigénnel

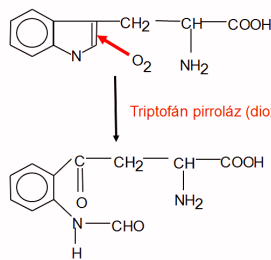
EC 1.13 *dioxigenázok* vagy *oxigéntranszferázok* (mindkét oxigén atom beépül a szubsztrátba, például [triptofán-pirroláz](#) (EC 1.13.11.11 tryptophan 2,3-dioxygenase):

$A + O_2 \rightleftharpoons AO_2$

L-triptofán 

N-formil-kinurenin 

Tryptofán pirroláz (dioxigenáz)



13 BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 7

Oxidáció dehidrogénezéssel


1.1.1 DEHIDROGENÁZOK

Az oxigén nem közvetlenül a szubsztráttal reagál, hanem a hidrogéneket redukált koenzimek viszik át $\rightarrow H_2O$

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 8


Primer alkoholok oxidációja: ecetsav képződése

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

Acetaldehyde Acetate

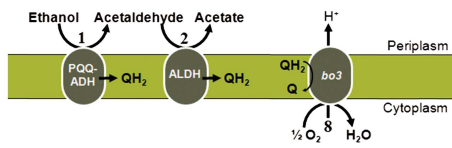
A folyamat két lépésben megy végbe, az etanol előbb acetaldehiddé oxidálódik (alkohol-dehidrogenáz), majd az aldehid oxidálódik ecetsavvá (aldehid dehidrogenáz).

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 9

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

10

Ipari ecetsavgyártás

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

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

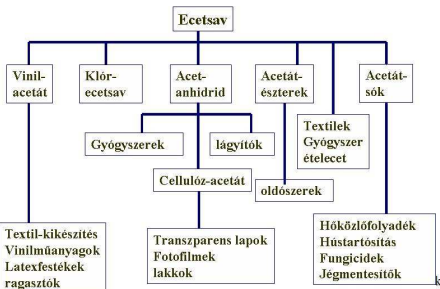


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

11

Az ecetsav felhasználása

- Direkt felhasználás: erős savként
 vízkőoldás
 élelmiszeripar: tartósítás
- Vegyipari alapanyagként:



12

Szekunder alkoholok oxidációja

Glicerin → **dihidroxi-aceton (DHA)**

Sorbitol → **szorbóz**

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

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

13

Szorbóz fermentáció

Technológia:

- alapanyag: lebontott keményítő (glükóz) szörp
- hidrogénezés: Raney-Ni-lel → szorbit
- mikrobák: *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter (Gluconobacter) suboxydans* → Ni-hez szoktatás!!!
- rátáplálásos eljárás: 10-20% szorbit → 33-35% szorbit
- konverzió: >95%
- folytonos technológiák is !
- nyugvősejtes fermentációk is!

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

14

Aszkorbinsav előállítás

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

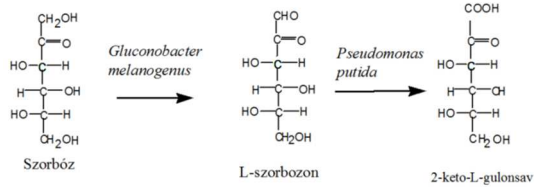
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

15

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:

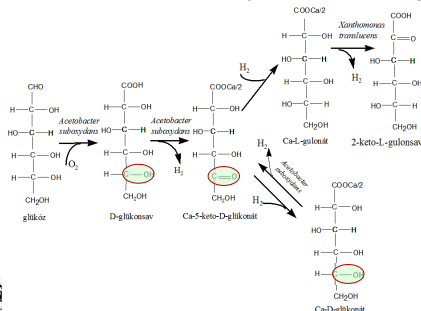


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

16

Alternatív aszkorbinsav előállítás

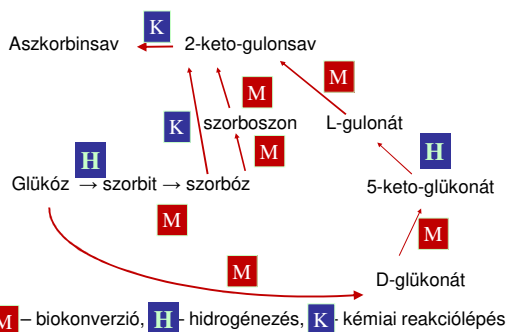
Az *Acetobacter suboxydans* és a *Xanthomonas translucens* szelektív oxidációival más úton is eljuthatunk a 2-keto-gulonsavhoz:



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

17

Aszkorbinsav előállítások összefoglalása



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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

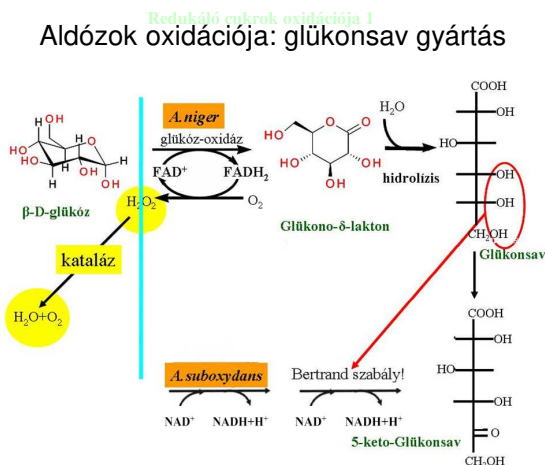
De novo növényi sejtekkel: *Rosa rugosa* 1-2% glükóz, fruktóz, galaktóz alapon.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

19

Aldózok oxidációja: glükonsav gyártás



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 O_2 nem találkozik a szubsztráttal, hanem a FAD proszтетikus csoportok H_2O_2 -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 visszaszorítható (pH=7, t=37 °C).



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

21

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:

22

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

A glükonsav és a glükóz-oxidáz felhasználása

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

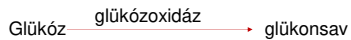
*O₂ eltávolítás a palackozott és dobozolt italok, konzervek fejtérfogatából, eliminálandó a nem enzimes barnulást ill. egyéb oxidációs folyamatokat.

24

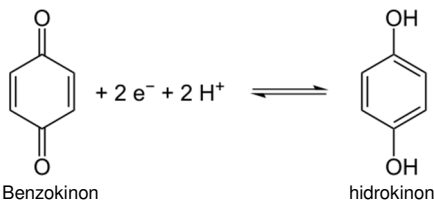
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

A glükózoxidáz mellékreakciója

Kinon redukciója:



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



Benzokín

hidrokinon

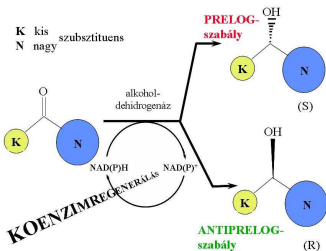


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

25

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

26

Ketonok redukciója szekunder alkoholokká

Példa a Prelog szabályra:



Szulkaton

Szulkatol

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

27

„Prelog” enzimek

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

S,R R

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Királis redukciók

BIM 5B
2001

| Prokirális vegyület | Királis vegyület |
|---|------------------|
| $R - \overset{\overset{O}{\parallel}}{C} - R' + NAD(P)H + H^+ \rightarrow R - \underset{\underset{OH}{ }}{CH} - R' + NAD(P)^+$ | |
| $R - \overset{\overset{NH}{\parallel}}{C} - R' + NAD(P)H + H^+ \rightarrow R - \underset{\underset{NH_2}{ }}{CH} - R' + NAD(P)^+$ | |
| Ketonok, ketosavak → Alkohol | |
| Iminek, iminosavak → Aminosav | |

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék
