

BIOKONVERZIÓK, BIOTRANSZFORMÁCIÓK

Oxidációs, redukciós átalakítások

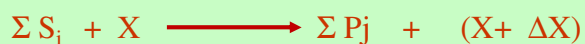


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

1

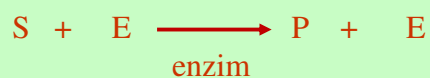
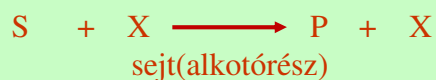
BIOTECHNOLÓGIAI ELJÁRÁSOK

De novo FERMENTÁCIÓK



mikroorganizmus
növényi sejttenyészet
állati szövettenyészet

BIOTRANSZFORMÁCIÓK



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

Enzimes és mikrobiális biokonverziók

MIVEL TÖRTÉNIK?

ENZIMEKKEL ➤ OLDOTT, RÖGZÍTETT

SEJTEKKEL ➤ NÖVEKEDŐ SEJTEKKEL

(fermentáció: AcOH, szorbóz, glükonsav)

➤ NYUGVÓ SEJTEKKEL

➤ RÖGZÍTETT sejtekkel

➤ TÖBBFÁZISÚ RENDSZEREKBE



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



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 gyűrűfelyítés, 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

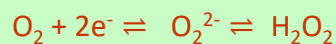
Oxidációs, redukciós átalakítások Oxidáció oxigénnel

1. Oxidáció oxigénnel

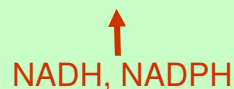
Biológiai oxidációkban az O₂ vagy mint **végső elektronakceptor** működhet, vagy közvetlenül **beépül** a szerves molekulába.

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):

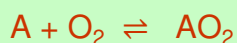


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

6

Oxidáció oxigénnel

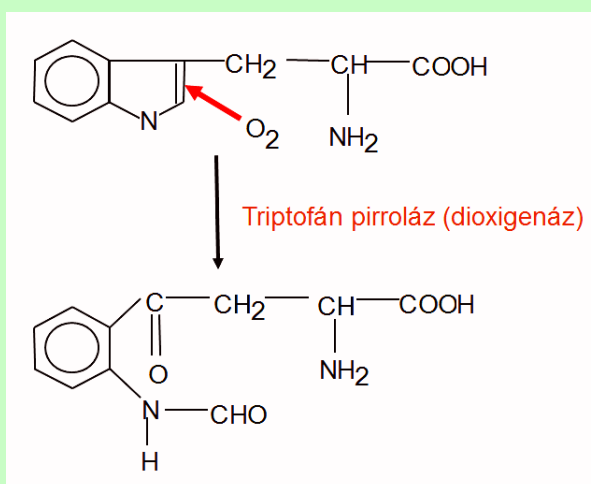
EC 1.13 *dioxigenázok vagy oxigéntranszferázok* (mindkét oxigén atom beépül a szubsztrátba, például triptofán-pirroláz (EC 1.13.11.11 tryptophan 2,3-dioxygenase):



L-triptofán



N-formil-kinurenin



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)

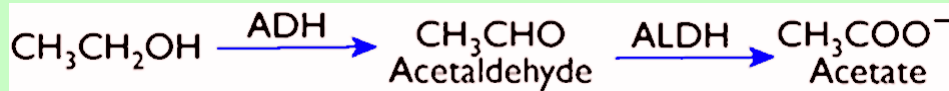
1. Primer alkoholok oxidációja
2. Szekunder alkoholok (cukrok) oxidációja
3. Aldehidek (cukrok) oxidációja



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

8

Primer alkoholok oxidációja: ecetsav képződése

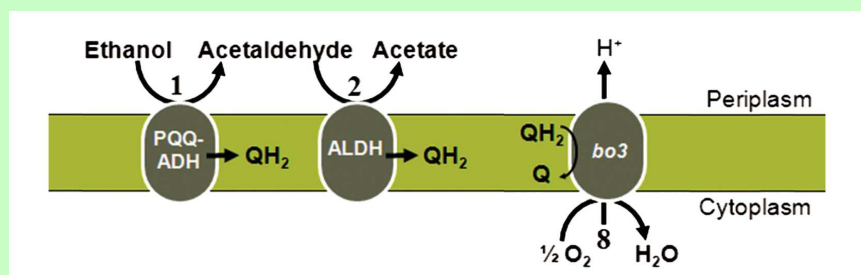


A folyamat két lépésben megy végbe, az etanol előbb acetaldehiddé oxidálódik (alkohol-dehidrogenáz), majd az aldehid oxidálódik ecetsavvá (aldehid dehidrogenáz).

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



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.



Ipari ecetsavgyártás

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

Technológiák: Orleans-i eljárás (borecet, XIV. század)
generátor eljárás (bükkforgács 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



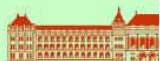
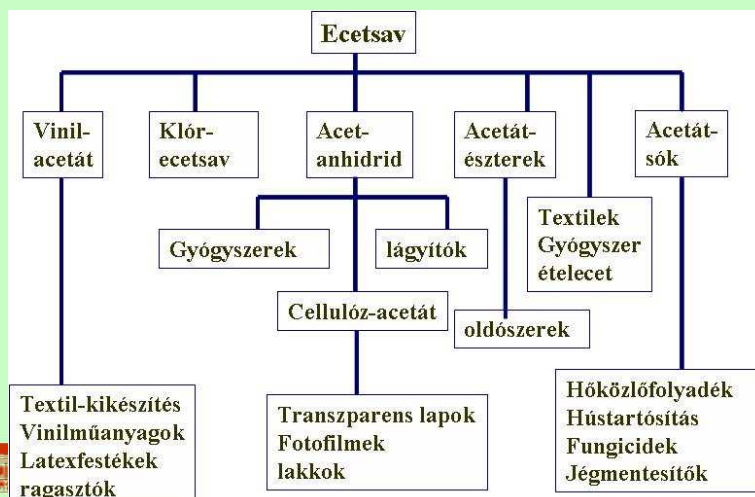
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

11

Az ecetsav felhasználása

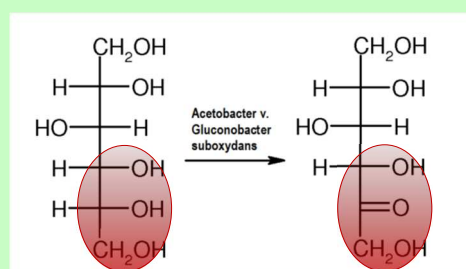
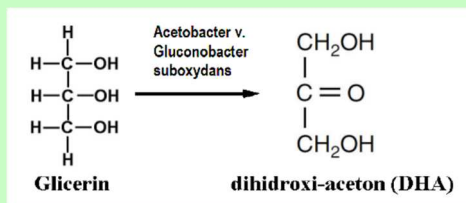
Direkt felhasználás: erős savként
vízkőoldás
élelmiszeripar: tartósítás

Vegyipari alapanyagként:



12

Szekunder alkoholok oxidációja



Szorbit – szorbóz átalakítás

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

Bertrand szabály (1904)



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%

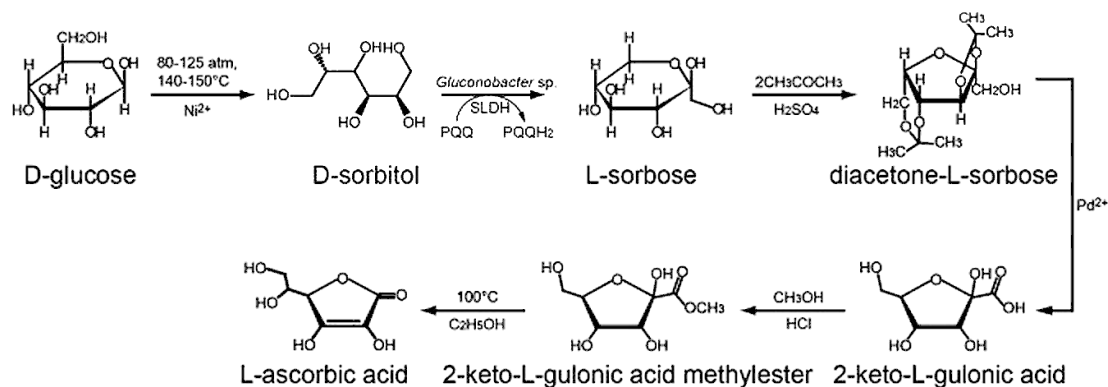
folytonos technológiák is !

nyugvósejtes fermentációk is!



Aszkorbinsav előállítás

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



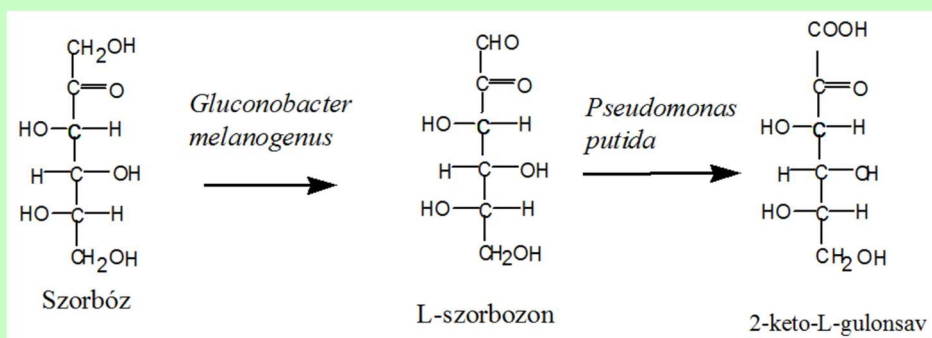
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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:

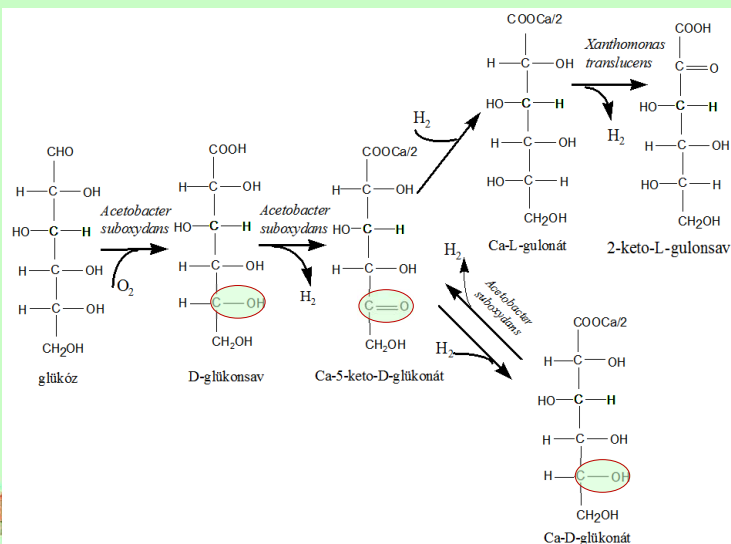


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

16

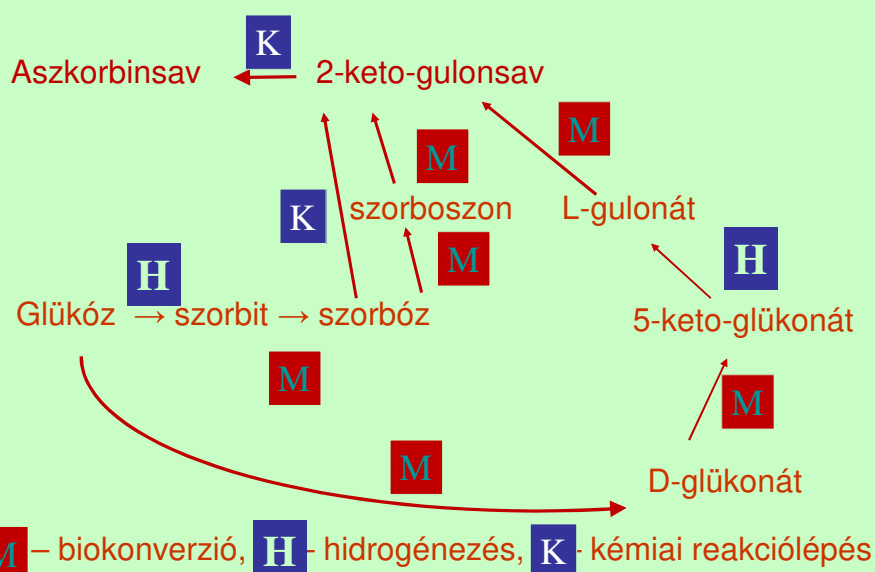
Alternatív aszkorbinsav előállítás

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



17

Aszkorbinsav előállítások összefoglalása

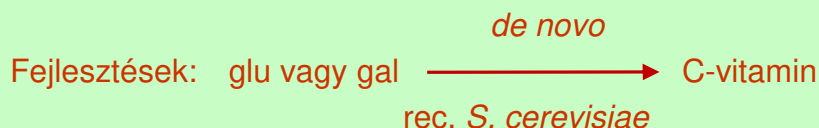


18



Aszkorbinsav gyártás

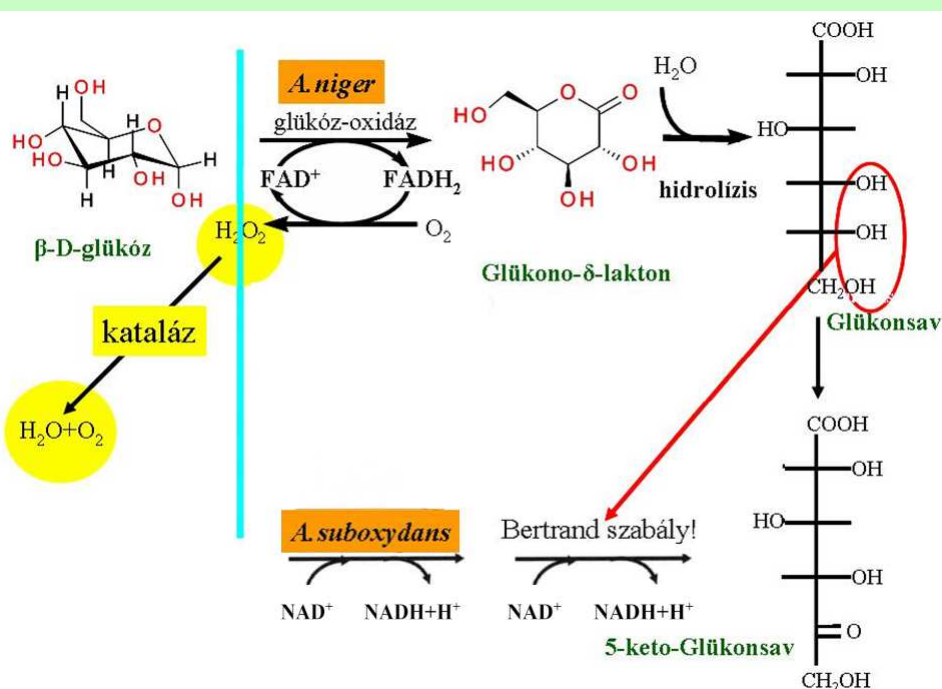
Éves piac: 100-120.000 t/év, ennek 80%-át Kína termeli (+ BASF, Takeda, DSM, Merck) a klasszikus eljárással.



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



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 prosztetikus 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).

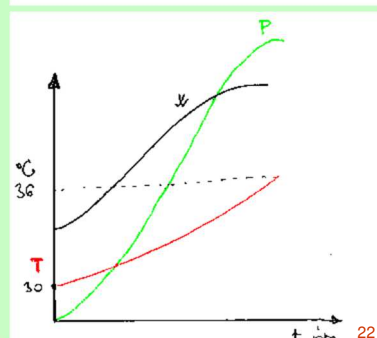
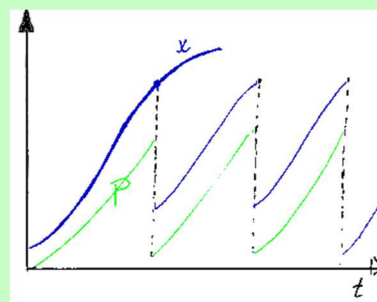


Glükonsav gyártási technológiák

A keletkező savat közömbösíteni kell - pH szabályozás (~7), $CaCO_3$ -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:

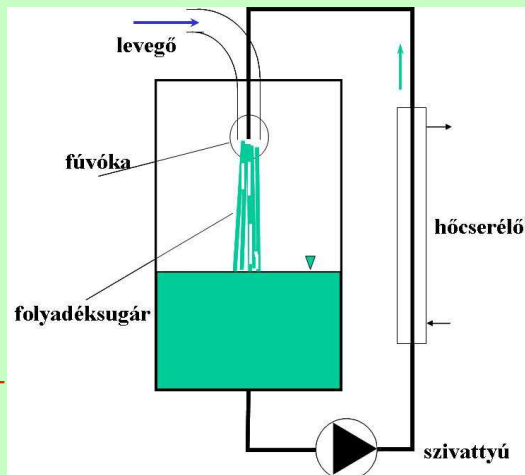


Más glükonsav gyártási technológiák

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



A glükonsav és a glükóz-oxidáz felhasználása

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

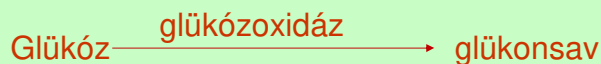
*A glükóz-oxidáz/kataláz rendszer: glükóz eltávolítása tojásfehérjéből (sütőipar, szárítás előtt). Enzimkeveréket használnak (165 U/kg) hozzáadott H_2O_2 -dal (kb 0.1 % w/w) biztosítják a szükséges molekuláris oxigént.

* O_2 eltávolítás a palackozott és dobozolt italok, konzervek fejtérfo-gatából, eliminálandó a nem enzimes barnulást ill. egyéb oxidációs folyamatokat.

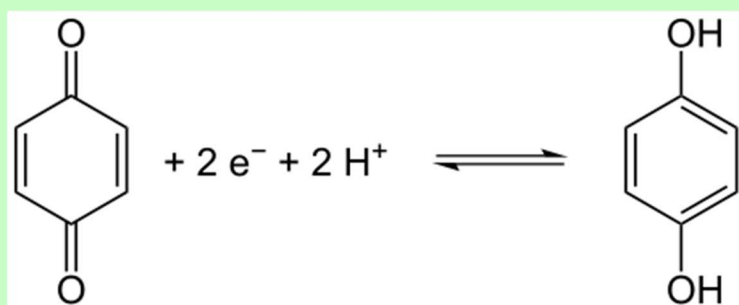


A glükózoxidáz mellékreakciója

Kinon redukciója:



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



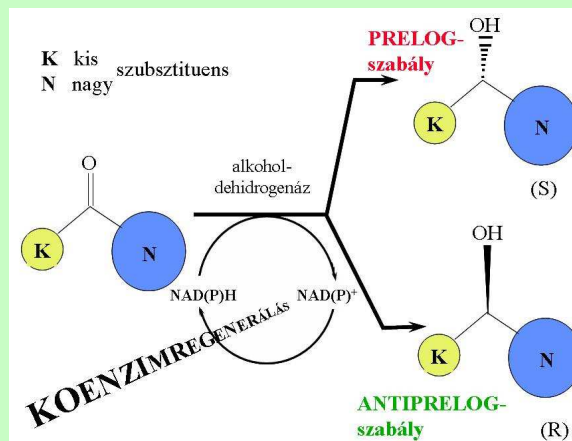
Benzokín

hidrokinon



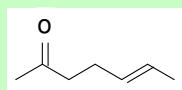
Ketonok redukciója szekunder alkoholokká

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

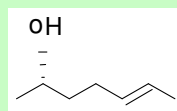


Ketonok redukciója szekunder alkoholokká

Példa a Prelog szabályra:



Szulkaton



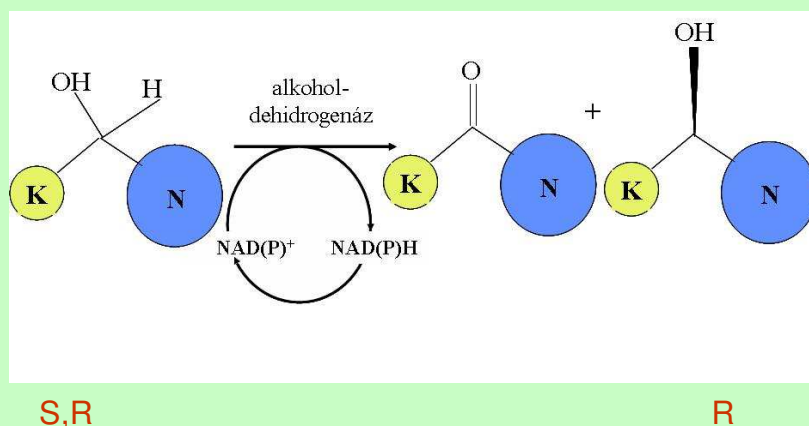
Szulkatol

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



„Prelog” enzimek

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



S,R

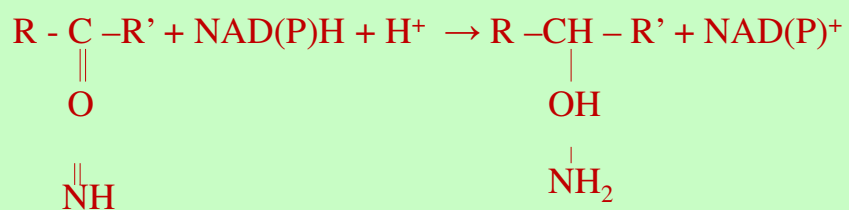
R



Királis redukciók

Prokirális vegyület

Királis vegyület



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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

29