

BIOTRANASFORMACE

Biochemická modifikace látek (...i v organismu)

Celé buňky

(Fermentace – využití obnovitelných zdrojů C pro synthesu *de novo*)

Biotransformace:

Přeměna prekursorů na jiné látky – vedlejší produkty metabolismu

Enzymy

Specifita



úzké rozmezí reakčních podmínek

Regioselektivita

vodné prostředí

Enantioselektivita

Enzymy versus celé buňky

	FORMA	PRO	PROTI
enzymy	všechny	Jednoduchá aparatura, vyšší produktivita, tolerance ↑ konc. substrátu	Recyklace kofaktorů Nižší stabilita
	Vodné prostředí	↑ aktivita	Postranní reakce Lipofilní substráty nerozpustné, Nutná extrakce
	Organická rozp.	Snadné provedení, lipof.substráty rozp., enzyme recovery	↓ aktivity
	imobilizované	Snadné "recovery" enzymu	Ztráta aktivity při imobilizaci
buňky	všechny	Není nutná recyklace kof.	Drahé zařízení, velké objemy, nízká produktivita, intolerance vůči org. rozp. a vyšším konc substrátů, další produkty metabolismu
	Rostoucí kultura	↑ aktivity	↑ objem biomasy, vedlejší produkty, obtížnější kontrola procesu
	Stagnující kultury	Méně vedlejších prod.	↓ aktivity
	imobilizované	Opakované použití	↓ aktivity

Vliv organických rozpouštědel na biokatalysu



- Vyšší rozpustnost hydrofobních látek
- Změna specifity
- Nižší aktivita vody → potlačení hydrolysy
- Snažší separace produktů, vyšší výtěžek
- Menší riziko mikrobiální kontaminace
- Vyšší termostabilita enzymů v nepolárním prostředí

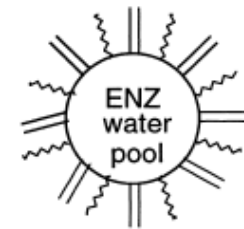
Imobilizované enzymy

Mikroemulze

Reversní micely (voda v apolárním prostředí) - lipasy



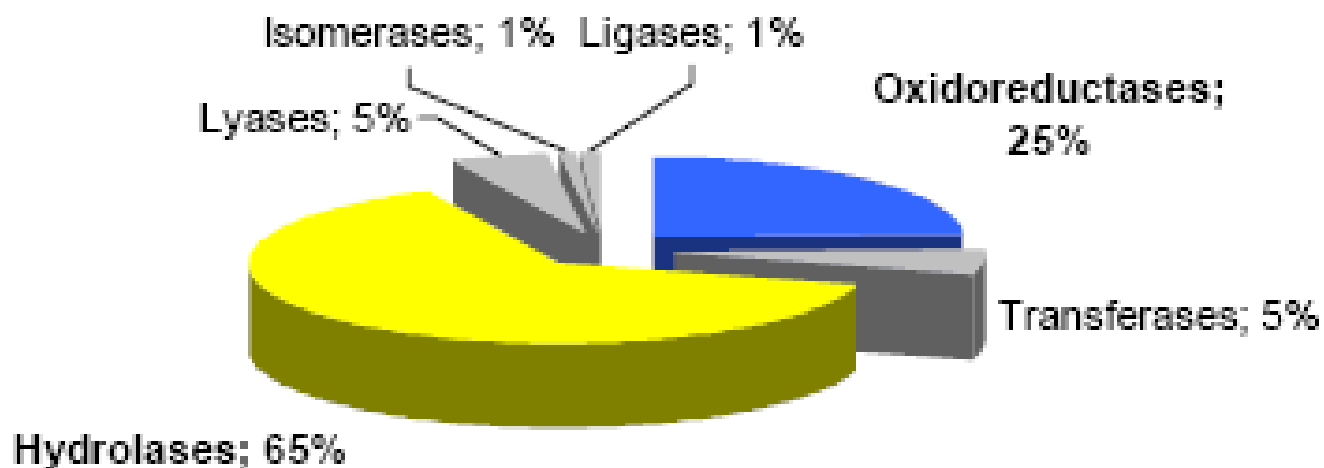
- Nižší aktivita enzymů → vyšší spotřeba
- Denaturace proteinů



n-hexane

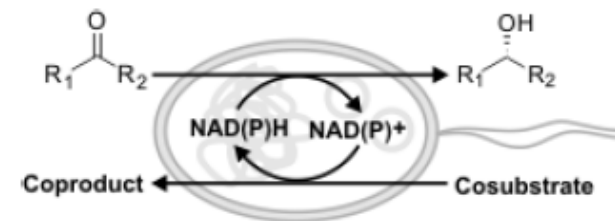
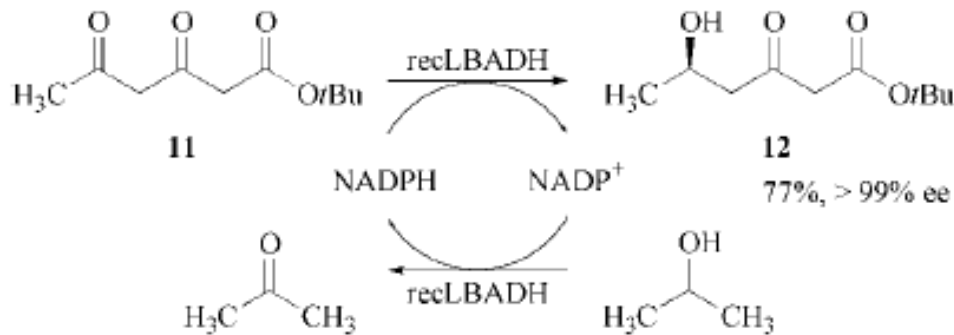
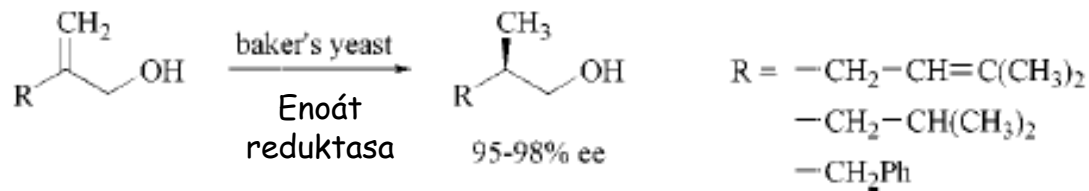
~~~~~ AOT: bis(2-ethylhexyl)sodium sulfosuccinate  
==== Brij30: polyoxyethylene(4) lauryl ether

# Enzymy v organické synthese



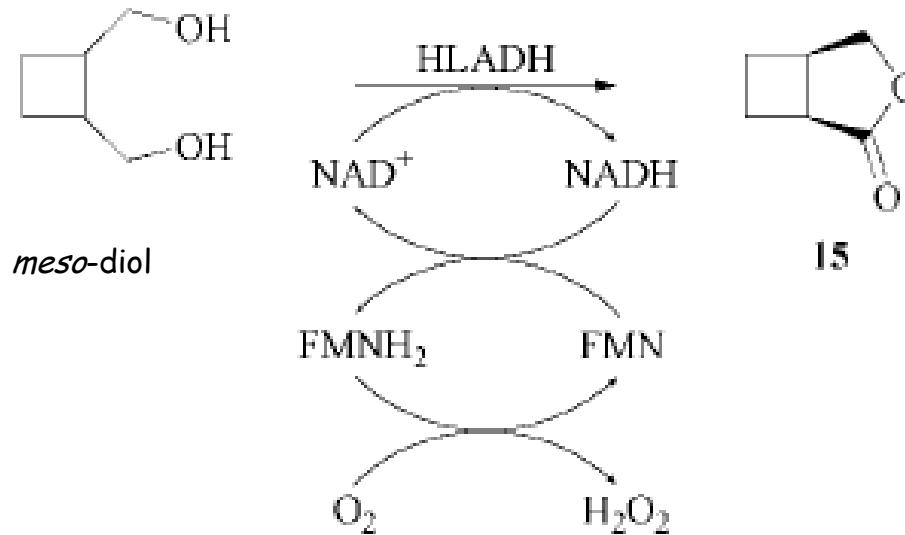
# Oxidoreduktasy

**Redukce:** karbonylu, C=C



LDH z *L.brevis* - enetiospecifická red. α-oxo kyselin

# Oxygenace: alkyly, hydroxyly, alkenyly, aryly, peroxidace karboxylových kyselin



## Regenerace NAD<sup>+</sup> glutamát dehydrogenasou

Jiné metody regenerace kofaktoru:

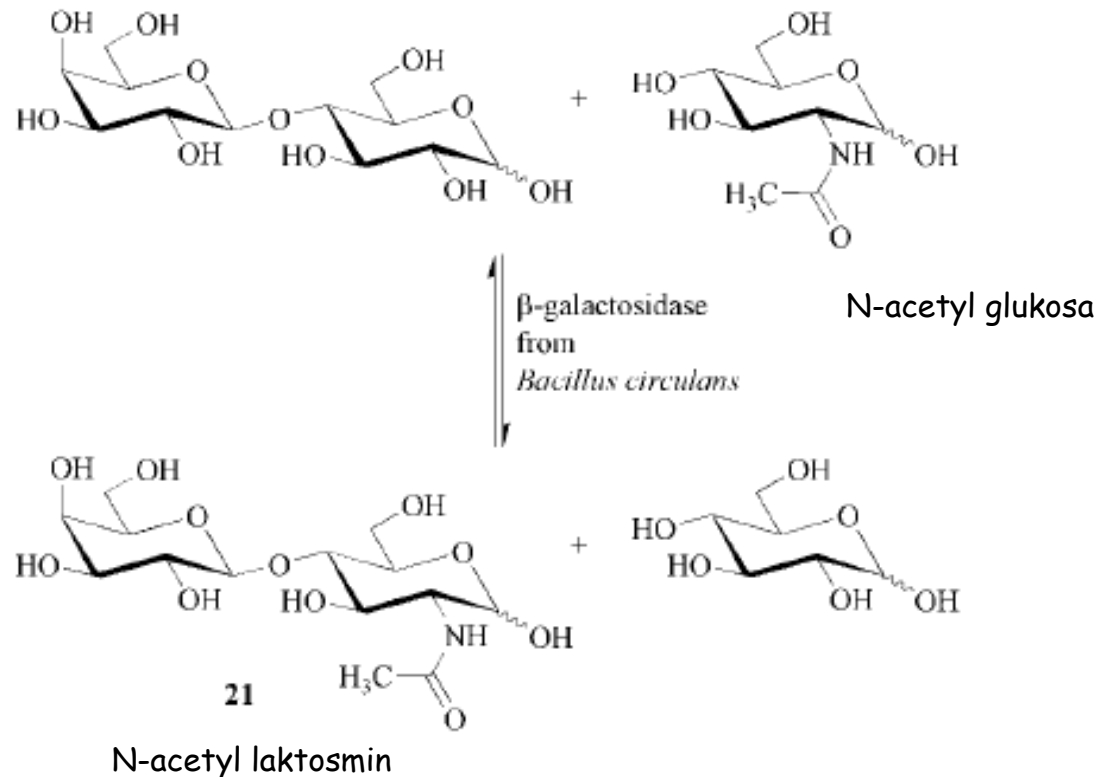


glukosa 6-fosfát dehydrogenasa (NADPH)

# Transferasy

Glykosyltransferasy - vyžadují nukleotidy monosacharidů

Glykosidasy -



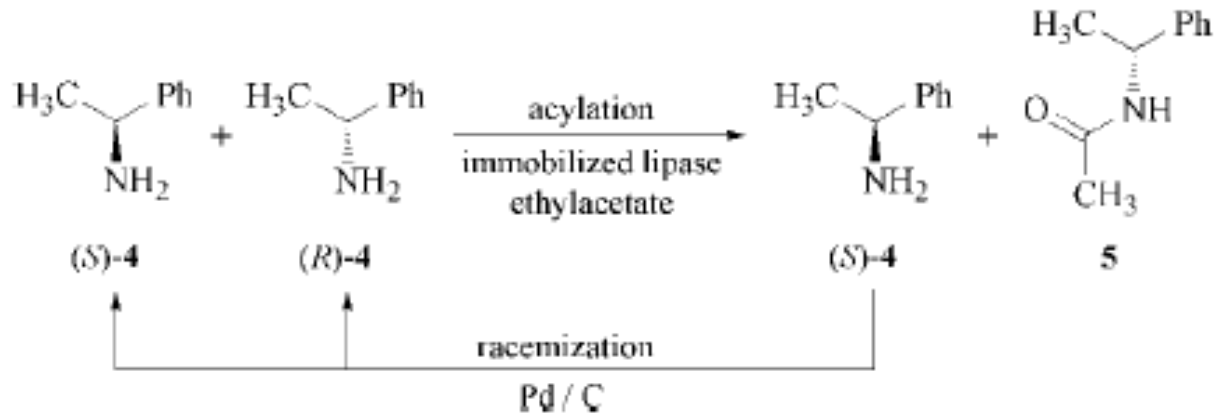
Bojarová, Křen: *Glycosidases: a key to tailored carbohydrates.*  
Trends in biotechnology 2008

# Hydrolasy

Levné, dostupné, nevyžadují kofaktory, stabilní, tolerují organická rozpouštědla, stereoselektivní,

**Synthesis** - acylace polyhydroxylů (sacharidy, glyceroly, steroidy, alkaloidy)

lipasy, esterasy, proteasy

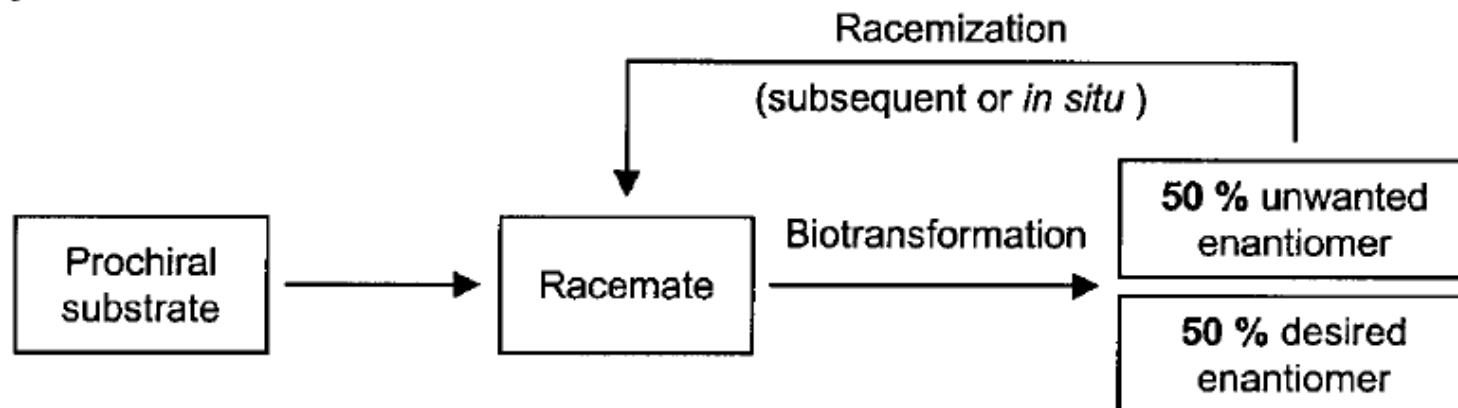


Enantioselektivní acylace racemických směsí aminů, in situ racemizace nezreagovaného produktu



# Příprava opticky čistých chirálních látek

## Enzymatic resolution of racemates



## Asymmetric (bio-)catalysis

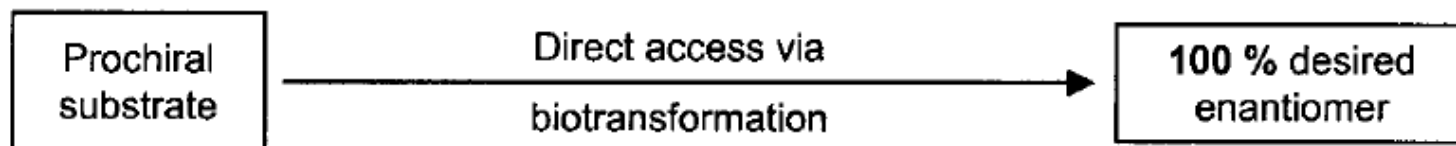


Fig. 1 Biocatalytic concepts for the production of L-amino acids.

# Příprava L-aminokyselin

## Racemické směsi

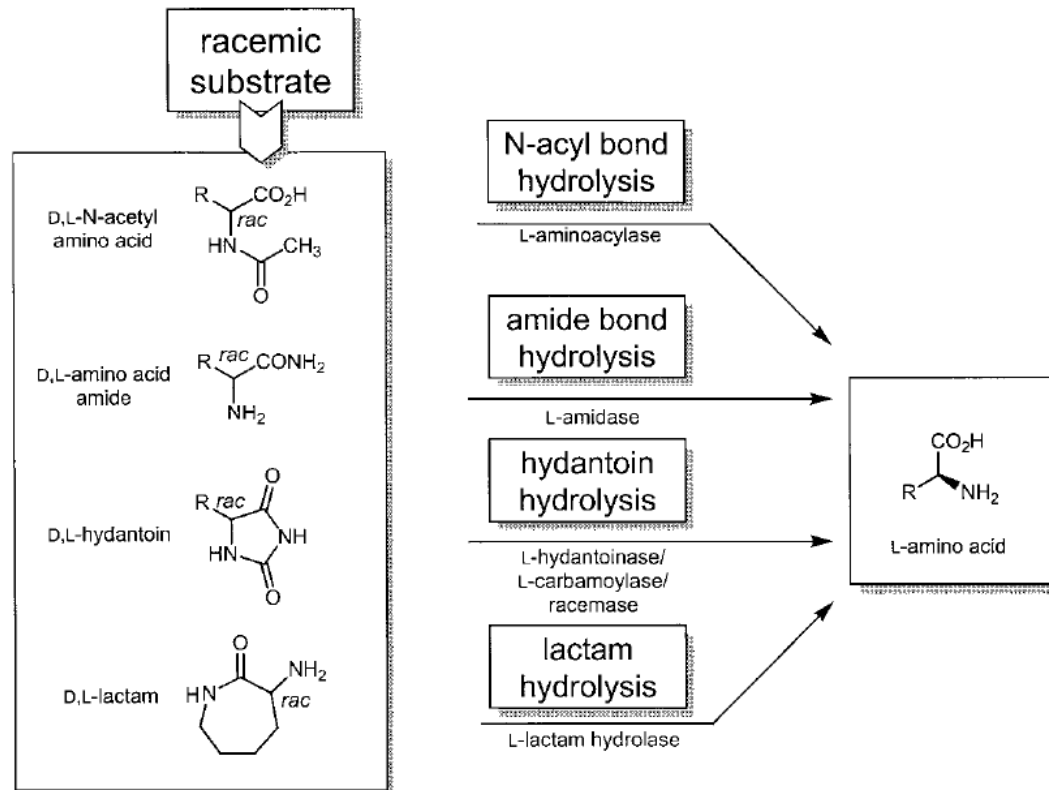
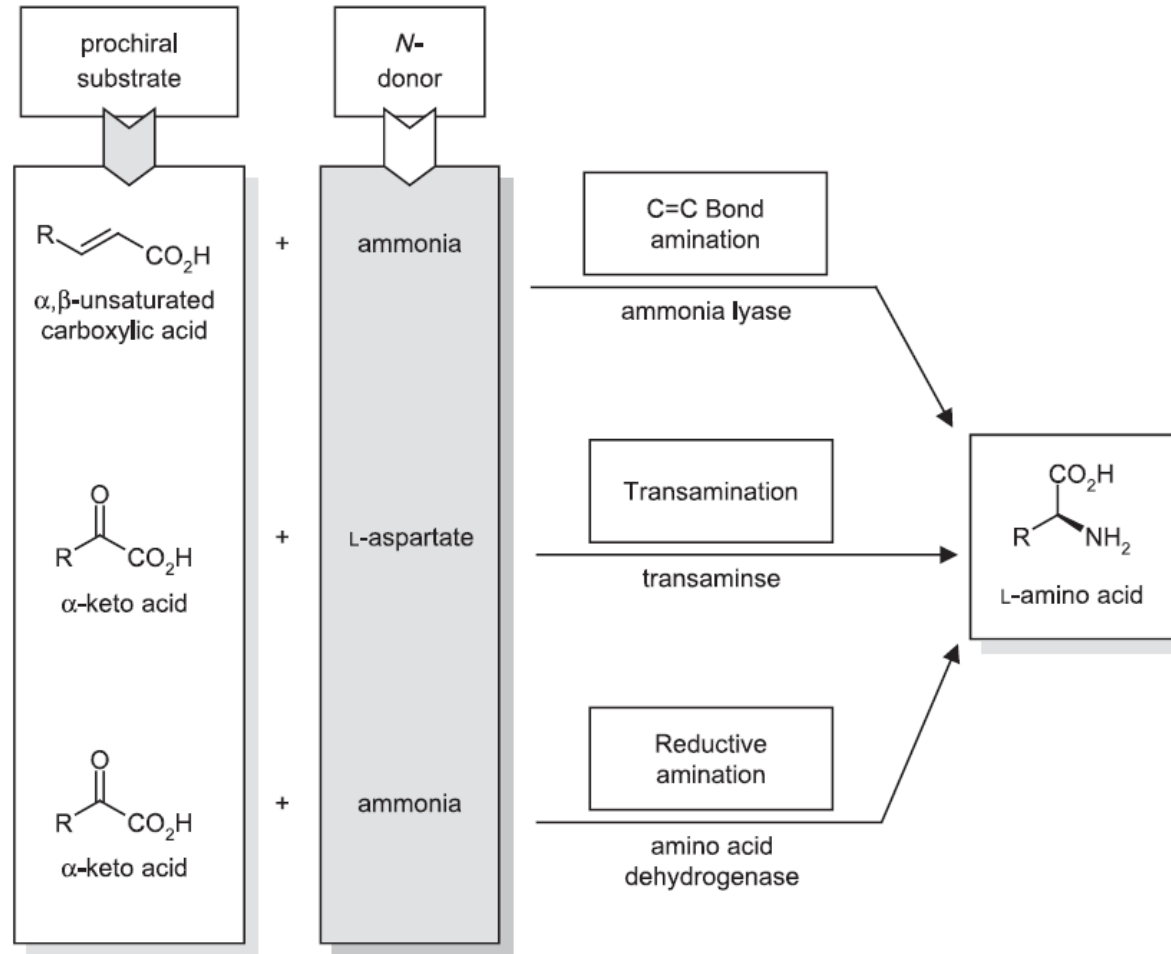


Fig. 2 Overview of enzymatic resolution methods for the production of L-amino acids.

# Příprava L-aminokyselin

## Asymetrická katalýza



# Výroba AK v průmyslovém měřítku - hydrolasy

1. Acylasa ( N-acetyl AK amidohydrolasa, EC 3.5.1.14), *A. oryzae*

Imobilisovaná formy - Tanabe 1966

Membránové reaktory - Degussa 1981

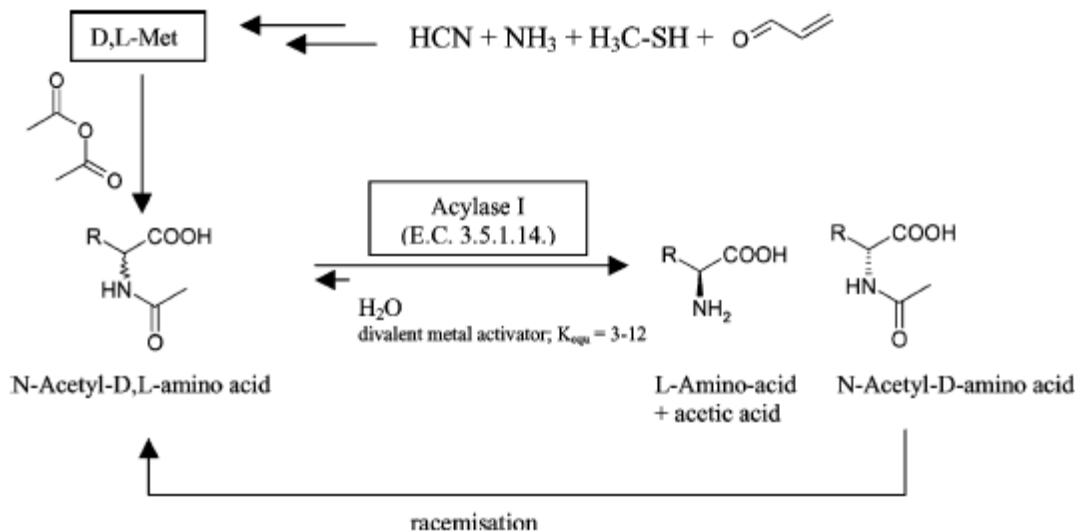


Fig. 3. Scheme of the acylase process (Degussa-Hüls process).

Specifita široká:

Ala, phe, norval, val,  
norleu, leu, trp, tyr a  
jejich deriváty

# Enzymový membránový reaktor - EMR

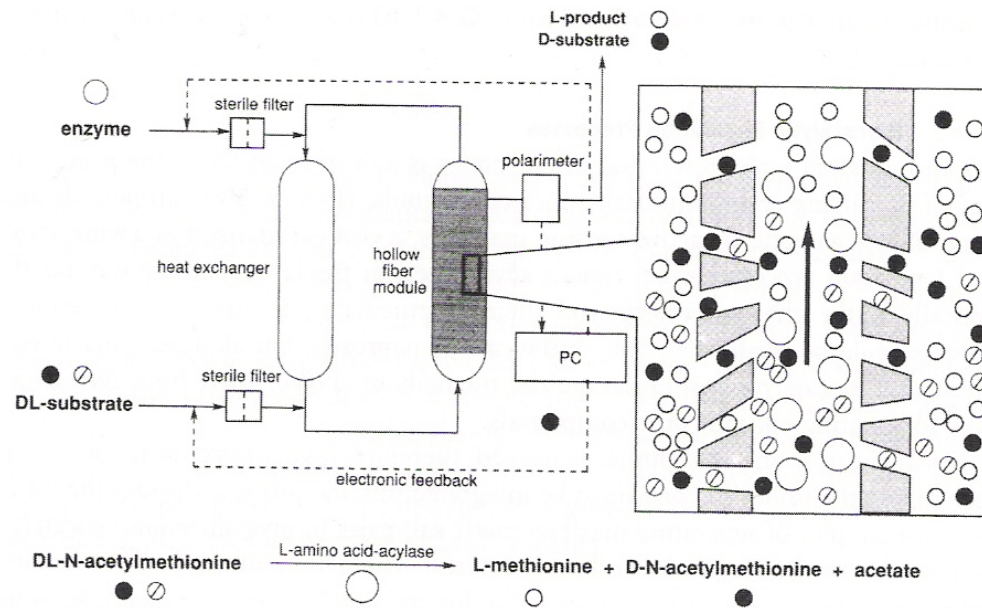
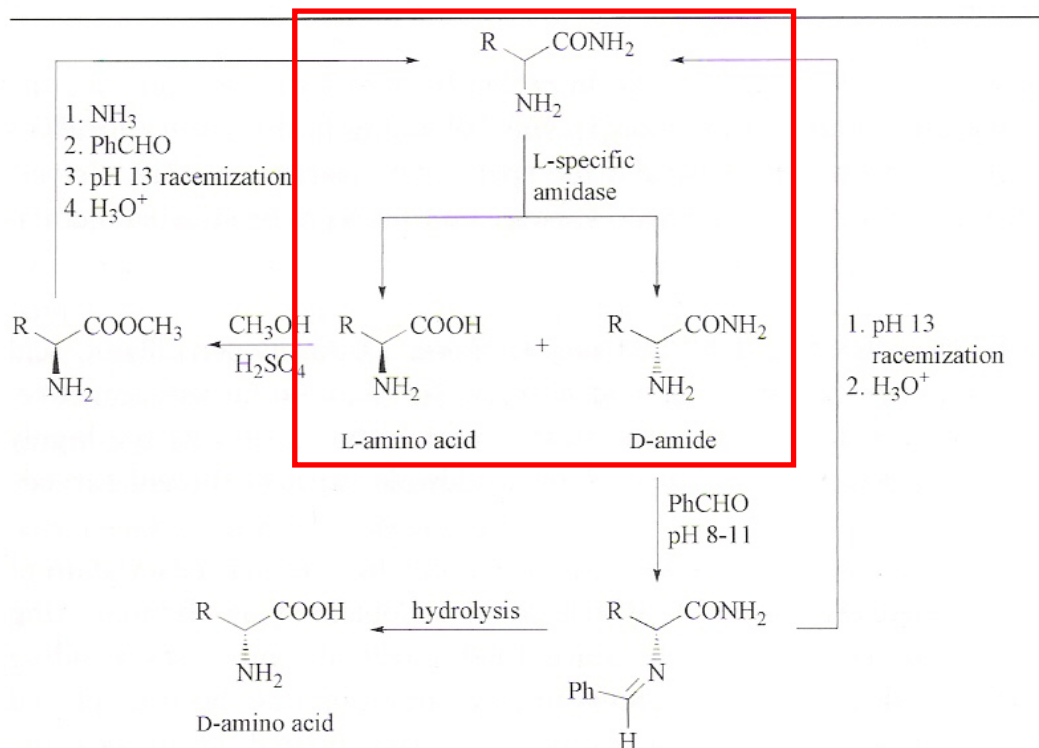


Figure 96. Recycle reactor used for amino acylase resolution of *N*-acetyl-D,L-amino acids

# Acylamid amidohydrolasa (EC 3.5.1.4), *Pseudomonas putida*

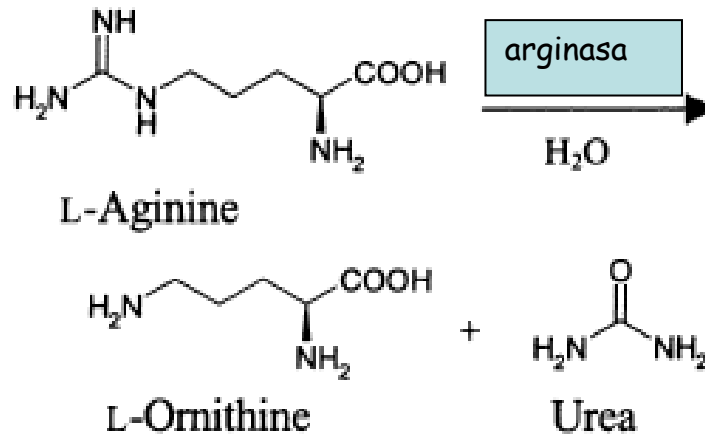
Amid karboxylové kyseliny +  $\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons$  karboxylová kyselina +  $\text{NH}_3$



Scheme 17. DSM amidase process for enantiomerically pure  $\alpha$ -amino acids

# Produkce ornithinu

L-argininamidinohydrolasa, EC 3.5.3.1)



Separace ionexovou chromatografií

**Table 2.1.** World production of amino acids using enzymatic processes (1980-1992)

| Amino acid                   | Amount [t/a] |
|------------------------------|--------------|
| L-alanine                    | 250          |
| L-aspartic acid              | 5000*        |
| L-2,4-dihydroxyphenylalanine | 200          |
| L-methionine                 | 240          |
| L-phenylalanine              | 5000*        |
| L-tryptophane                | 200          |
| L-valine                     | 150          |
| D-phenylglycine              | 1000         |
| D-p-hydroxyphenylglycine     | 1000         |

\* Including the demand for the manufacture of the low-calorie sweetener aspartame.



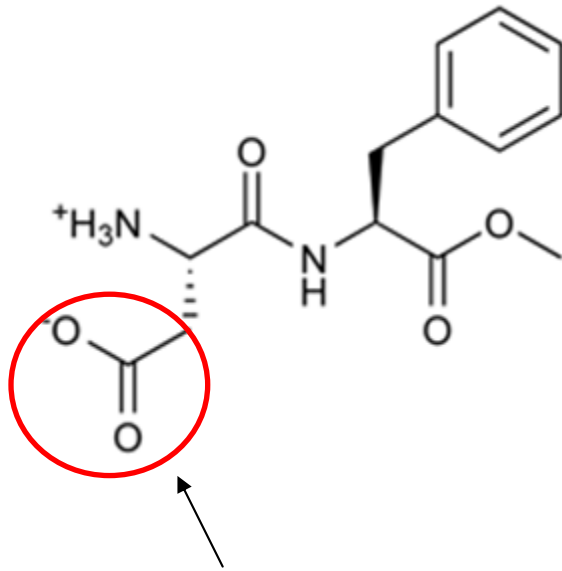
# Výroba aspartamu

200x vyšší sladivost než sacharosa

Thermolysin (EC 3.4.24.27), metalopeptidasa (Zn,Ca)

*B. thermoproteolyticus*,

Specifita Xaa-Leu, Xaa-Phe



Aspartam:  $\alpha$ -L-aspartyl-L-fenylalanyl-O-methylester

BOC-L aspartát + L-fenylalanyl methylester

↓ Thermolysin

BOC-L-aspartam

↓ D-fenylalanyl methylester

BOC-L-aspartam + precipitát

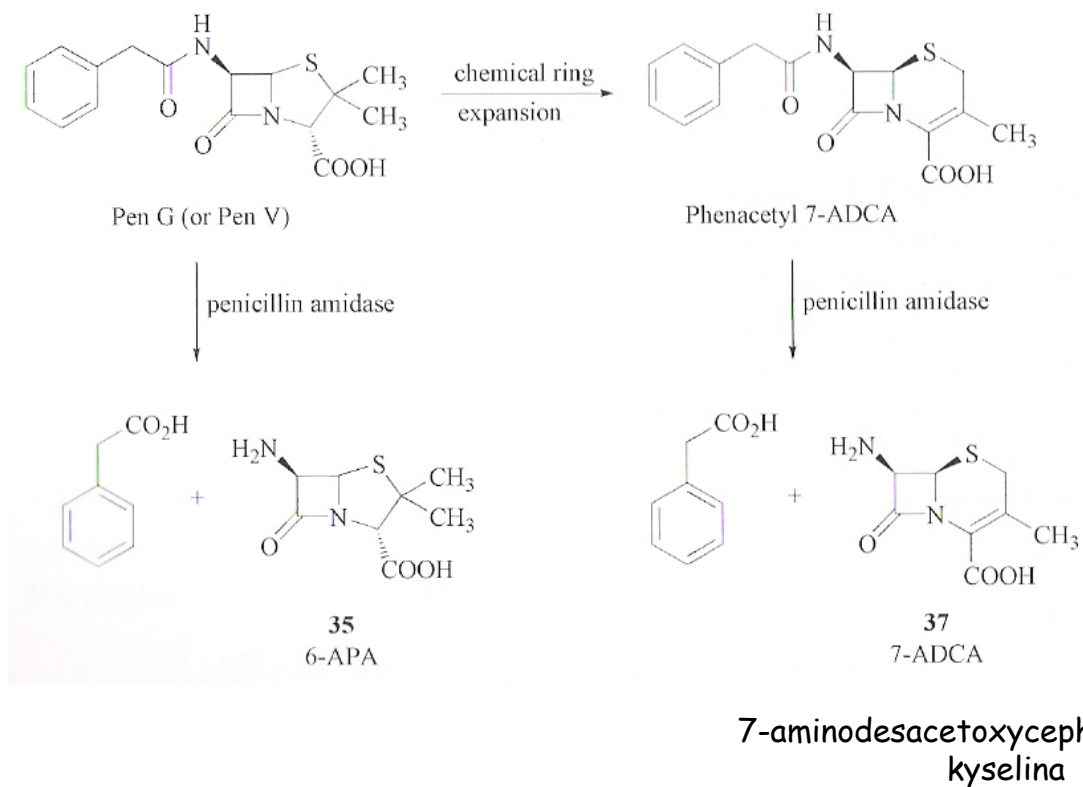
BOC - benzyloxykarbonyl

# Výroba laktamových antibiotik (peniciliny, ampiciliny a cefalosporiny)

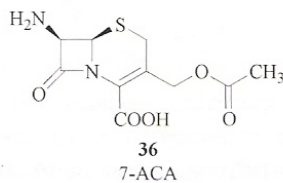
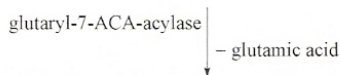
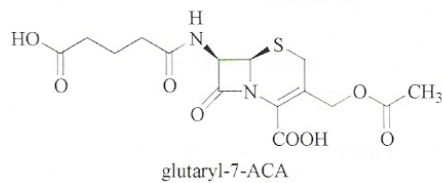
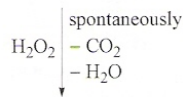
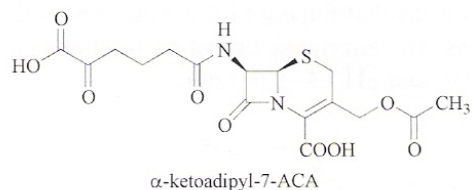
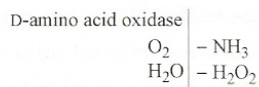
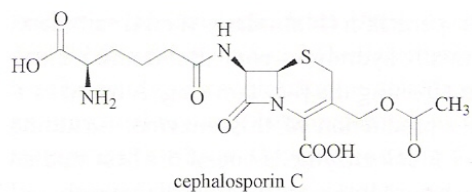
Semisyntetický postup nahradil fermentaci

Penicilinamidasa (EC 3.5.1.11), *Pseudomonas chrysogenum*, rekombinantní v *E.coli*, *B.megaterium* atd, imobilisovaná, entrapped

Produkce prekursorů , 20 000 t/rok



## Cephalosporium acremonium

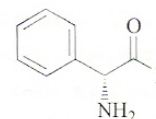


7-aminocelphalosporanová  
kyselina

## Výroba ampicillinu a cephalexinu

Penicilin amidasy katalysují i  
transferasovou reakci:

D-phenylglycine  
ester/amid

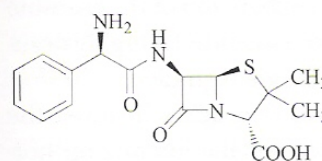


R =  $OCH_3$ ,  $NH_2$

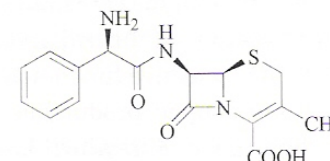
penicillin  
amidases

6-APA

7-ADCA



38  
ampicillin



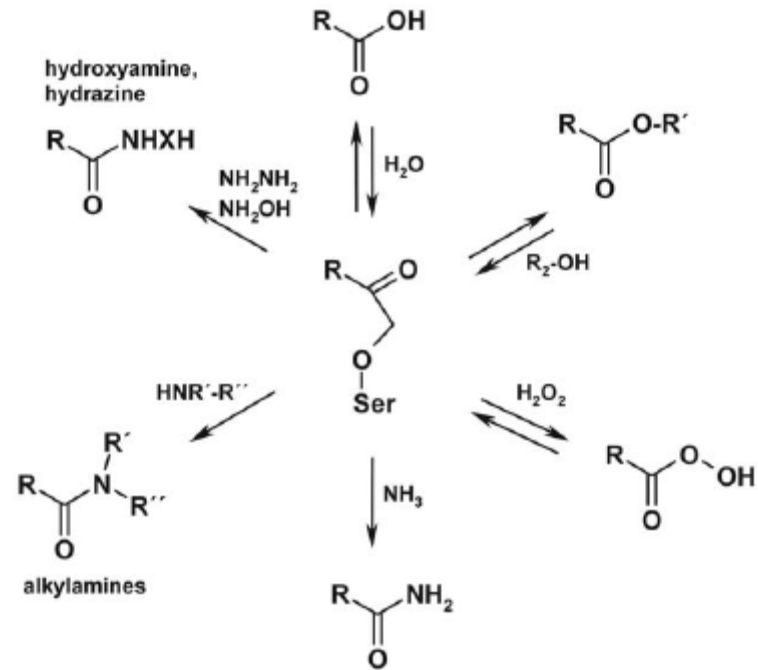
39  
cephalexin

Scheme 21. Enzymatic synthesis of ampicillin and cephalexin

# Lipasy - nejvyžívanější

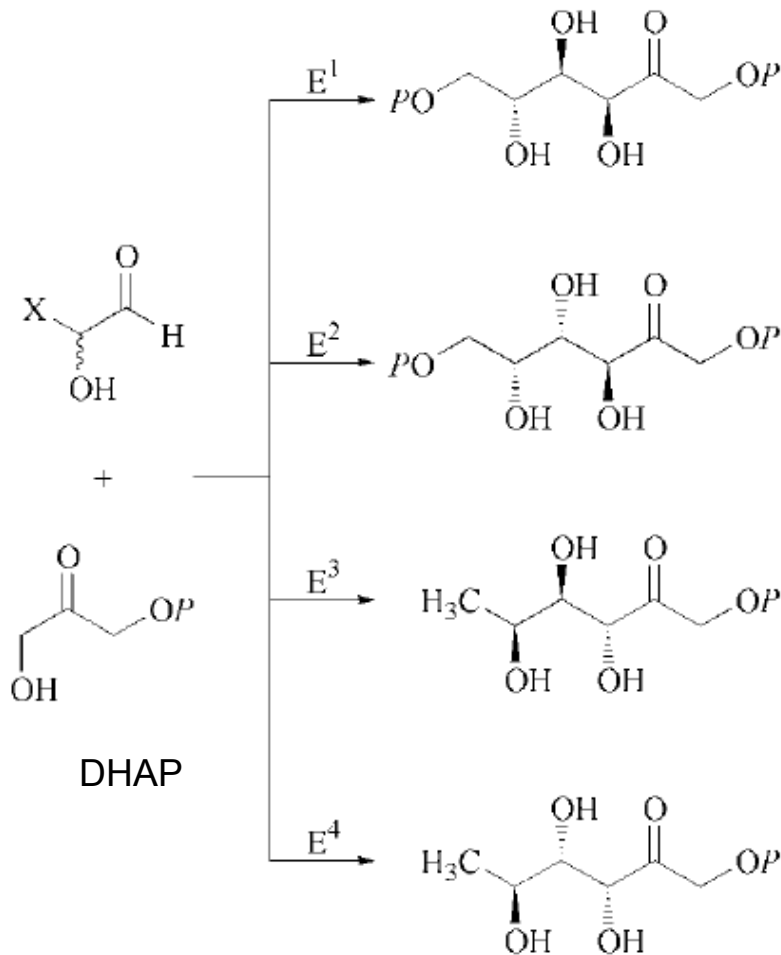
Vysoce stereospecifické, fungují na fázovém rozhraní

Lipase-acyl accepting compounds



# Lyasy

adice HX na C=C, C=N, C=O, eliminace



E<sup>1</sup> = D-fructose-1,6-bisphosphate-aldolase (EC 4.1.2.13)

E<sup>2</sup> = D-tagatose-1,6-bisphosphate-aldolase (EC 4.1.2.40)

E<sup>3</sup> = L-fuculose-1-phosphate-aldolase (EC 4.1.2.17)

E<sup>4</sup> = L-rhamnulose-1-phosphate-aldolase (EC 4.1.2.19)

P = PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>

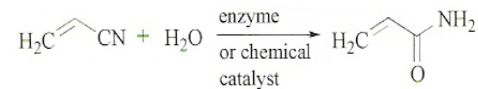
X = -CH<sub>2</sub>-OP (for E<sup>1</sup>, E<sup>2</sup>)

X = -CH<sub>3</sub> (for E<sup>3</sup>, E<sup>4</sup>)

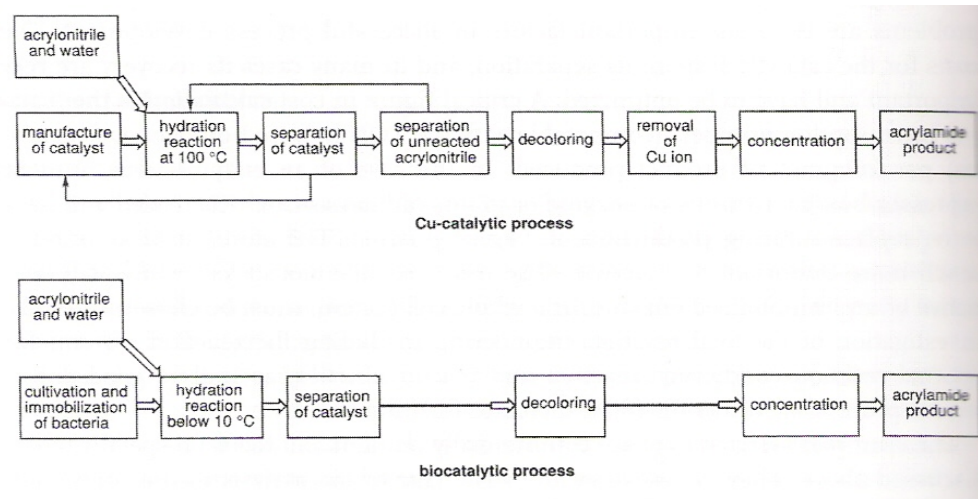
# Výroba akrylamidu

Nitril hydratasa (EC 4.2.1.84), *Rhodococcus* sp.,  
imobilizované buňky

700 g/l , roční produkce 30 000 t



32



# Úprava syntetických polymerů

Zvýšení hydrofilnosti povrchu synt. polymerů

- Biokompatibilita - použití v medicíně
- tkaniny - neprodyšnost, statická elektřina

PET - polyethylentereftalát, PA - polyamidy, PAN - polyakrylonitril

