

## HIDROLÍZIS

Enzimes hidrolízist a hidrolázok EC. 3.x.x.x végzik.

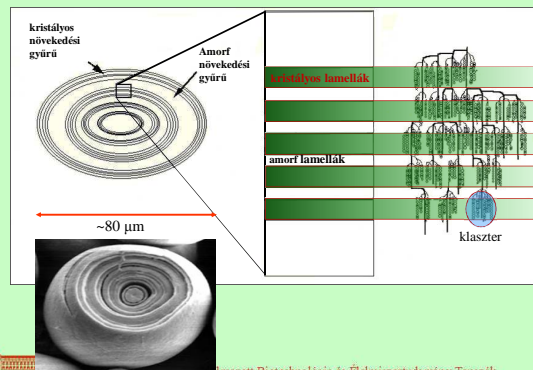
- észterázok: lipázok, foszfatázok
- glikozilázok,
- Peptidhidrolázok: proteázok,
- dezaminázok
- acilázok, stb



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

1

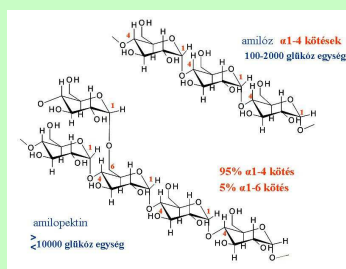
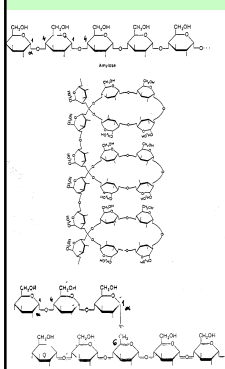
## A keményítő szerkezete



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

4

## Keményítő enzimes hidrolízise



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

## A keményítőt bontó = amilolitikus enzimek

### $\alpha$ -amilázok:

A keményítő  $\alpha$ -1,4-es kötéseit a láncban statisztikusan hasítják (endoenzimek), eltérő polimerizációs fokú,  $\alpha$ -konfigurációjú lineáris és elágazó dextrineket képeznek.

Extracelluláris és általában induktív enzimek

Sok gomba- és baktériumfaj termeli (*Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *Aspergillus oryzae*, *Thermoascus*) Ezek egymástól pH-, és hőmérséklet optimumban, valamint stabilitásban különböznek. A legtöbb  $\alpha$ -amiláz stabilizátorként kalcium iont igényel aktivitásához és stabilitásához.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5

## A keményítő szerkezete

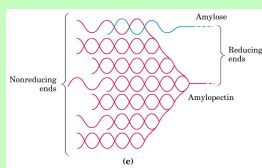
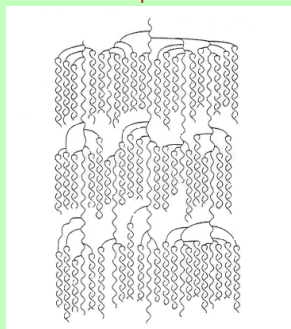
### amilóz



A jódkeményítő színe a polimerizáció fokától függően:

- >40 sötétkék
- 44 kék
- 25 bíbor
- 15 vörösbarna
- 6 sárga

### amilopektin

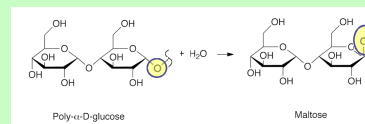


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

3

## Amilázok

A  $\beta$ -amilázok: exoamilázok,  $\beta$ -konfigurációjú maltózokat képeznek  $\alpha$ -1,4-es kötések hasítása révén:



Jórészt növényi (maláta) eredetűek és aktivitásukhoz nem igényelnek kalciumot.

Újabb mikroorganizmusokkal is: ezen  $\beta$ -amilázok hőmérséklet optimuma magas, (→ sokkal nagyobb a maltóz képzési sebesség!)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék


6

### Amilázok

**Glükóamilázok** = amiloglikozidázok =  $\gamma$ -amilázok.  
 Exoenzimek,  $\beta$ D-glükóz egységeket hasítanak le a nem redukáló láncvégekről.  
 keményítő, dextrinek  $\longrightarrow$   
 glükóz, maltóz és határdextrinek keveréke

A maltózt csak nagyon lassan bontják és nem támadják az elágazó láncok 1,6-kötéseit ill. csak nagyon lassan.


Enzim előállítása: *Aspergillus*, *Rhizopus* törzsek  
Pullulanázok ill. izoamilázok az amilopektin elágazásainak  $\alpha$ -1,6-kötéseit képesek hasítani.



7

### Amilázok

Enzyme	EC number	Source	Action
$\alpha$ -Amylase	3.2.1.1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Only $\alpha$ -1,4-oligosaccharide links are cleaved to give $\alpha$ -dextrins and predominantly maltose (G2), G3, G6 and G7 oligosaccharides
		<i>B. licheniformis</i>	Only $\alpha$ -1,4-oligosaccharide links are cleaved to give $\alpha$ -dextrins and predominantly maltose, G3, G4 and G5 oligosaccharides
		<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>A. niger</i>	Only $\alpha$ -1,4 oligosaccharide links are cleaved to give $\alpha$ -dextrins and predominantly maltose and G3 oligosaccharides
Saccharifying $\alpha$ -amylase	3.2.1.1	<i>B. subtilis (amylosacchariticus)</i>	Only $\alpha$ -1,4-oligosaccharide links are cleaved to give $\alpha$ -dextrins with maltose, G3, G4 and up to 50% (w/w) glucose
$\beta$ -Amylase	3.2.1.2	Malted barley	Only $\alpha$ -1,4-links are cleaved, from non-reducing ends, to give limit dextrins and $\beta$ -maltose
Glucoamylase	3.2.1.3	<i>A. niger</i>	$\alpha$ -1,4 and $\alpha$ -1,6-links are cleaved, from the nonreducing ends, to give $\beta$ -glucose
Pullulanase	3.2.1.41	<i>B. acidopullulyticus</i>	Only $\alpha$ -1,6-links are cleaved to give straight-chain maltodextrins




10

8

### Dextróz egyenérték

$$DE = 100 * \left( \frac{\text{elbontott glükózid kötések száma}}{\text{kezdetben jelen volt összes glükózid kötések száma}} \right) =$$

$$= 100 * \left( \frac{\text{redukáló cukor, glükózban kifejezve}}{\text{teljes szénhidrát mennyiség}} \right)$$


11

**KEMÉNYÍTŐ**  
pH=6,5  
35-40% Ca<sup>2+</sup>

**KEMÉNYÍTŐ ZAGY**  
50-60 °C

**ELCSIRIZESÍTETT KEMÉNYÍTŐ**  
105 °C 5 min  $\alpha$ -AMILÁZ 1500 E/kg pH 5,5-5,7

**ELFOLYÓSÍTÁS**


95 °C 2 óra  
szűrés

**ELFOLYÓSÍTOTT KEMÉNYÍTŐ**  
pH=4,5 60 °C GLÜKOAMILÁZ 150 E/kg (pullulanáz 100 E/kg)

**ELCUKROSÍTÁS**

0,3% glükóz  
2,0% maltóz  
97,7% oligoszaharidok  
DE= 1


**GLÜKÓZ SZIRUP**  
97-98% glükóz  
2-3% maltóz,  
izo-maltóz, oligosz-k  
DE=99



9

### Cukrok relatív édessége

Food ingredient	Relative sweetness (by weight, solids)
Sucrose	1.0
Glucose	0.7
Fructose	1.3
Galactose	0.7
Maltose	0.3
Lactose	0.2
Raffinose	0.2
Hydrolysed sucrose	1.1
Hydrolysed lactose	0.7
Glucose syrup 11 DE	<0.1
Glucose syrup 42 DE	0.3
Glucose syrup 97 DE	0.7
Maltose syrup 44 DE	0.3
High-conversion syrup 65 DE	0.5
HFCS (42% fructose) <sup>9</sup>	1.0
HFCS (55% fructose)	1.1
Aspartame	180



12

### Cellulóz hidrolízis

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

### Kitin és kitinázok

**Chitin**

N-acetil-D-glükózamin  
β- (1,4) homopolimer

*Serratia marcescens*  
kitináz

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

### A lignocellulózok szerkezete

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

### PEKTIN HIDROLÍZIS

A pektin láncának fő komponense: poli-galakturonsav, részlegesen metanollal észterezve.

galakturonsav

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

### A *Trichoderma reesei* celluláz komplexe

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

### A pektin tényleges szerkezete

- galakturonsav
- galakturonsav-metilészter
- galakturonsav-amid
- ramnóz
- galaktóz v arabinóz
- xilóz

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

### PEKTIN HIDROLÍZISE

$\alpha$ -1,4-galaktoszidkötések bontása, exo- és endoenzimiek:

endopolygalacturonase,  
EC 3.2.1.15      exopolygalacturonase,  
EC 3.2.1.67  
pectinesterase EC  
3.1.1.11

19

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

### A $\beta$ -galaktózidázok összehasonlítása

Origin	pH <sub>opt</sub>	T <sub>opt</sub>	K <sub>m</sub> (mM) lactose*	M, kDa	Activator	Inhibitor
<b>Fungal</b>						
<i>Aspergillus niger</i>	3.5	58	85	124		
<i>Aspergillus oryzae</i>	5.0	55	50	90		
<b>Yeast</b>						
<i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>K. fragilis</i>	6.5	37	35	115	K <sup>+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup> , Na <sup>2+</sup> , Zn, Cu
<b>Bacterial</b>						
<i>E. coli</i>	7.2	40	2	540	Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup>	
<i>B. subtilis</i>	6.5	50	700			
<i>B. stearrowthermophilus</i>	6.2	55	2	220	Mg <sup>2+</sup>	
<i>L. thermophilus</i>	6.2	55	6	540		

22

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

### PEKTIN HIDROLÍZISE

Léhozam fokozása és derítés gyümölcslevek kinyerésénél - *Aspergillus* és *Penicillium* törzsek extracelluláris enzimei.  
 pH 4-5 között, t<sub>max</sub> ~50 °C

Len és kenderáztatás – *Bacillus macerans*, *B. asterosporus*.

20

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

### Laktóz hidrolízis

Tejipari élesztő *Kluyveromyces fragilis* (*K. marxianus* var. *marxianus*), pH optimum (pH 6.5-7.0)  
 vagy  
*Aspergillus oryzae* vagy *A. niger*,  
 pH optimum (pH 4.5-6.0 and 3.0-4.0)  
 termék inhibíció a galaktóz által

Laktázok felhasználása: fagylalt, ízesített és natúr kondenztejkészítmények  
 (2000 U kg<sup>-1</sup>) enzim egy nap 5°C-on, kb. 50%-a a laktóznak lebomlik ami edesebb és nehezebben kristályosodó lesz!  
 Kisebb mennyiségben a hosszan eltartható sterilizett tejekhez is adnak (20 U kg<sup>-1</sup>, 20°C).  
 Ma még nagyon drága

21

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

### Laktóz hidrolízis

A tejben és a savóban (sajtyártás) ~4.7 s% laktóz van. A hasznosításhoz hidrolizálni kell: laktáz =  $\beta$ -galaktózidáz, emésztő enzim. A csecsemők termelik, a felnőtt populáció zöme már nem = **laktóz intolerancia** (Kína: 90%, fekete amerikaiak: 73% intoleráns, fehér USA: 96%, svédek 84%-a toleráns)  
 Laktóz hidrolízis:  
**(Exo-(1→4)-beta-D-galactanase, lactase EC 3.2.1.23)**

laktóz      galaktóz      glükóz  
β-galaktózidáz

Laktóz bontatlanul vastagbélbe → }  
 Vízzel visszatarthatás hasmenés }  
 Bélbaci gázképződés }  
 } **explozív diareta**

21

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

### Laktóz hidrolízis

Az enzim laktóz hidrolízis alkalmazásai:

- Laktóz-szegény tej (low lactose milk) előállítás**  
 Szakaszos eljárás (mert a folytonosnál nagyobb a befertőzés veszélye): **élesztő enzimmel** (drágább, de a tejet nem lehet lesavanyítani), 35 °C-on, 4 órán keresztül → 70-80%-os konverzió. Az enzimet benne hagyják, UHT sterilizéssel inaktíválják.
- Savóban:**  
 Immobilizált enzim eljárás: inkább **penész enzimmel**, az alacsonyabb pH valamennyire véd a befertőződéstől. Felhasználás: takarmány, tápszer, élelmiszer adalék

24

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

### Laktóz hidrolízis

3. Élelmiszeriparban: édesség, stabilitás javítása:

Laktóz → galaktóz + glükóz  
 kis édesítő érték → édeesebb a keverék  
 könnyen kristályosodik → nem kristályosodik

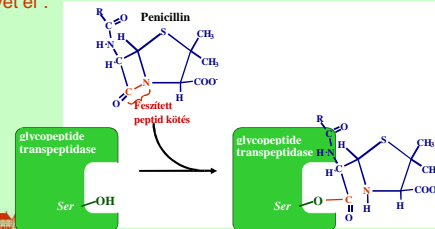
Édesítő értékek aránya:

laktóz : galaktóz : glükóz = 20 : 70 : 70

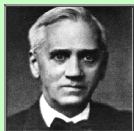
Felhasználása: fagyalt, ízesített és natúr kondenztej-készítmények

### A penicillin

Az enzim befogja a penicillin molekulát és ugyanúgy hidrolizálja a peptid kötést a penicillin β-laktám gyűrűjében, mint az alaninok között. Az aktív centrumban lévő szerinrel létrejön az észterkötés, de ez a penicillin esetében nem tud átrendeződni, irreverzibilisen kovalens kötésben marad az enzimen. A penicillin megkötésével az enzim végérvényesen elveszti az aktivitását, mintegy „öngyilkosságot követ el”.



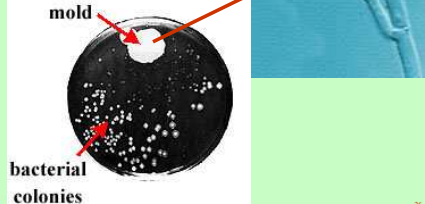
### Penicillin hidrolízis



Sir A. Fleming

Először a penicillinről magáról.

Fleming's original plate:

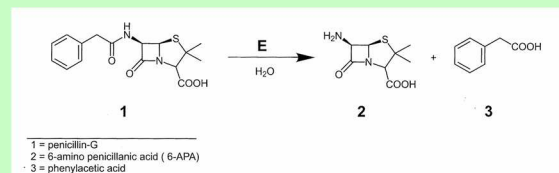


### Penicillin aciláz/amidáz

Miért hidrolizálnak? → a félszintetikus penicillinek előállítása a fermentált G-penicillin oldalláncának lecserélésével történik.

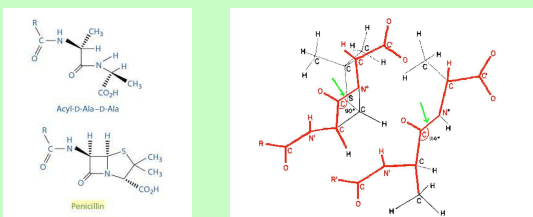
#### 1. Hidrolízis

G penicillin → 6-amino-penicillánsav (6-APA) + fenilacettsav



### A penicillin

... a baktériumok sejtfalában kereszt kötéseket létrehozó glikopeptid transzpeptidáz enzim szerkezetanalóg irreverzibilisen suidic inhibitora. Az enzim a DAla-DAla láncvégeket köti össze pentaglicin láncvégekkel, miközben az egyik DAla kilép. A penicillin a DAla-DAla láncvégek szerkezetanalógja:

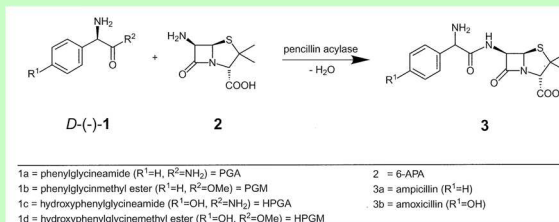


### Penicillin aciláz/amidáz

#### 2. Új oldallánc (karbonsav) rákötése

Karbonsav származék + 6-APA →

félszintetikus penicillin



1a = phenylglycineamide (R<sup>1</sup>=H, R<sup>2</sup>=NH<sub>2</sub>) = PGA  
 1b = phenylglycine methyl ester (R<sup>1</sup>=H, R<sup>2</sup>=OMe) = PGM  
 1c = hydroxyphenylglycineamide (R<sup>1</sup>=OH, R<sup>2</sup>=NH<sub>2</sub>) = HPGA  
 1d = hydroxyphenylglycine methyl ester (R<sup>1</sup>=OH, R<sup>2</sup>=OMe) = HPGM  
 2 = 6-APA  
 3a = ampicillin (R<sup>1</sup>=H)  
 3b = amoxicillin (R<sup>1</sup>=OH)

Ugyanazzal az enzimmel meg lehet csinálni a két ellentétes reakciót, (aciláz/amidáz!) de itt sav-származékot kell adni (pH, ionizálás!)

## Penicillin aciláz/amidáz

Termelő törzsek:

Type I: penész típusú, pH ~10, t ~50 °C, inkább V, mint G

Type II: baktérium típusú, pH ~8, t ~40 °C. Sokféle van, de az iparban főleg *E. coli* mutánsok és manipulált törzsek.

Fermentáció:

Indukció fenil-ecetsav adagolással (5X titer-növekedés)

Glükóz: katabolit represszió miatt kis koncentrációban

O<sub>2</sub> : aerob, de nem túl erős levegőztetés

Feldolgozás: - nyugvósejtes tenyészet, de inkább:

- kinyert, tisztított, immobilizált enzim



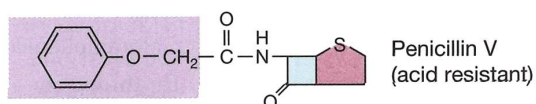
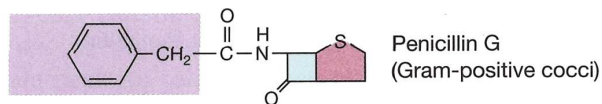
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

31

## Félszintetikus penicillinek

Fermentált alapvegyületek:

Natural penicillins



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

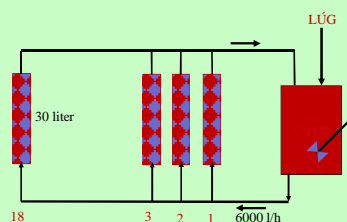
34

## Penicillin hidrolízis

A reakció tulajdonságai: erős S és P inhibíció, a szakaszos nem jó. Kiszámolták: a töltött oszlop a legjobb. De: A felszabaduló fenil-ecetsav miatt a pH csökken, ettől a 6-APA bomlik. pH-szabályozás kellene, de az oszlopreaktorban nem megy.

Megoldások:

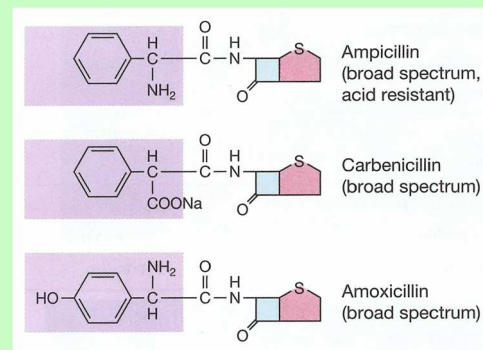
1. Toyo-Ozo eljárás: recirkulációs, pH szabályozás a tartályban, ciklusidő: 30 óra, produktivitás: 33 kg/m<sup>3</sup>h konverzió: 86%



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

32

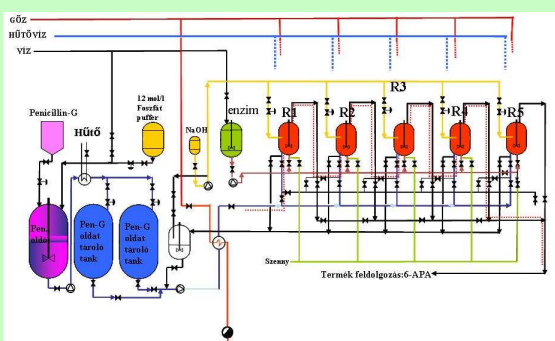
## Félszintetikus penicillinek



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

35

2. Oszlop helyett kaszkád reaktor, optimális számuk 4. 95% konverzió



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

33

## RNS-hidrolízis

Egyes nukleotidokat (5'-GMP, 5'-IMP) ízfokozónak használnak.

Két technológia: - de novo fermentáció

- RNS hidrolízise:

Sok RNS-hez nagy RNS-tartalmú élesztő sejtörmégből juthatunk (*Candida utilis* vagy *Saccharomyces cerevisiae*).

Folytonos technológiával ~35 g/l sejt, 10-15% RNS-tartalommal.

Kinyerése:

- Extrakció (5-20%-os NaOH, 100 °C, 8 óras főzés, az RNS feloldódik)
- A sejtmaradványok lecentrifugálása
- Kicsapás sávvá és alkohollal
- Mosás, szárítás



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

36

## RNS-hidrolízis

RNáz komplex: endo- és exonukleázok együtt (*Penicillium citrinum*). Immobilizált formában is használják.

A hidrolízis: 2%-os RNS-oldatban, pH=5, 4 óra, 65 °C-on.

A folyamat végén nukleotidok keveréke keletkezik, (purin és pirimidin váz egyaránt: 5'-GMP, 5'-AMP, 5'-UMP, 5'-CMP). Ezeket anioncserélővel, vagy metanolos frakcionált kicsapással választjuk el.

Az 5'-IMP előállításához az 5'-AMP frakciót kell dezaminálni (enzimforrás: *Aspergillus oryzae*).



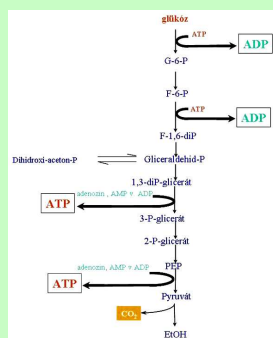
## ATP gyártás - foszforilezés

Korábban lóizomból vonták ki, ma élesztővel állítják elő (Gánti, Reanal).

A glikolízis gyorsabb és egyszerűbb ATP termelő folyamat, mint a terminális oxidációhoz kapcsolt oxidatív foszforilezés.

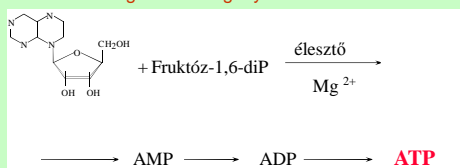
De: fogyasztja is az ATP-t:

-2 ATP → +4 ATP



## ATP gyártás

Az ATP-t fogyasztó lépéseket úgy kerülik el, hogy a terméket előállító élesztősejteknek (*Saccharomyces cerevisiae*, anaerob) a glikolízis már foszforilezett köztitermékét (fruktóz-1,6-biszfoszfát) és az adenozint adagolják, amit kémiai szintézissel állítanak elő. Az enzimek  $Mg^{2+}$  ionokat igényelnek.



Kínában immobilizált élesztővel 300 literes reaktorban évi 5 tonnát termelnek.

