

HIDROLÍZIS

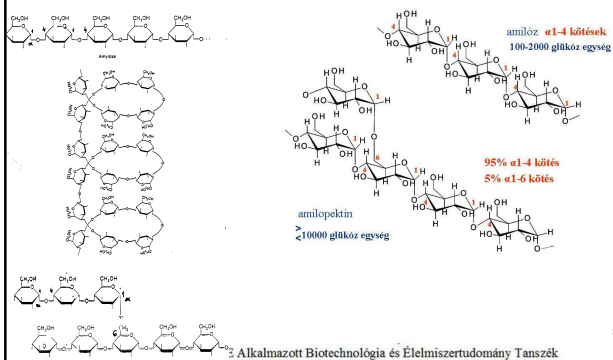
Enzimés hidrolízist a hidrolázok EC. 3.x.x.x végzik.

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Keményítő enzimes hidrolízise



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

A keményítő szerkezete

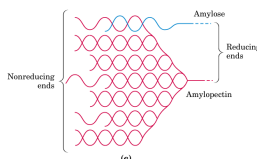
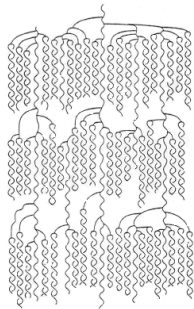
amilóz



A jódkeményítő színe a polimerizáció fokától függően:

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

amilopektin



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

A keményítő szerkezete

The diagram illustrates the hierarchical structure of starch. On the left, a cross-section shows concentric rings representing growth rings, with an outer 'kristályos növekedési gyűrű' (crystalline growth ring) and an inner 'Amorf növekedési gyűrű' (amorphous growth ring). A scale bar indicates a diameter of approximately 80 μm. On the right, a detailed view shows alternating layers of 'kristályos lamellák' (crystalline lamellae) and 'amorf lamellák' (amorphous lamellae). A 'klaszter' (cluster) is shown as a collection of these lamellae.

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

A keményítőt bontó = amilolitikus enzimek

α-amilázok:
 A keményítő α-1,4-es kötéseit a láncban statisztikusan hasítják (**endoenzimek**), eltérő polimerizációs fokú, α-konfigurációjú lineáris és elágazó **dextrin**eket képeznek.

Extracelluláris és általában induktív enzimek
 Sok gomba- és baktériumfaj termeli (*Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *Aspergillus oryzae*, *Thermomonospora*) Ezek egymástól pH-, és hőmérséklet optimumban, valamint stabilitásban különböznek. A legtöbb α-amiláz stabilizátorként **kalcium iont** igényel aktivitásához és stabilitásához.

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Amilázok

A β-amilázok: exoamilázok, β-konfigurációjú maltózokat képeznek α-1,4-es kötések hasítása révén:

OC[C@H]1O[C@@H](OC[C@H]2O[C@@H](O)[C@H](O)[C@@H]2O)[C@H](O)[C@@H](O)[C@@H]1O.O>>OC[C@H]1O[C@@H](OC[C@H]2O[C@@H](O)[C@H](O)[C@@H]2O)[C@H](O)[C@@H](O)[C@@H]1O.O

Poly-1,4-D-glucose Maltose

Jórészt növényi (maláta) eredetűek és aktivitásukhoz nem igényelnek kalciumot.
 Újabban mikroorganizmusokkal is: ezen β-amilázok hőmérséklet optimuma magas, (→ sokkal nagyobb a maltóz képzési sebesség!)

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Amilázok

Glükóamilázok = amiloglikozidázok = γ -amilázok.
 Exoenzimek, β 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.

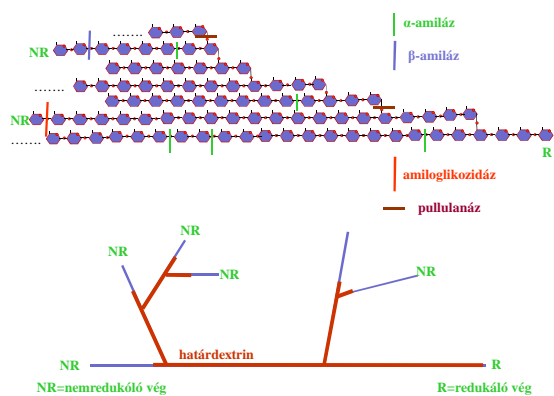
Enzim előállítása: *Aspergillus*, *Rhizopus* törzsek

Pullulanázok ill. izoamilázok az amilopektin elágazásainak α -1,6-kötéseit képesek hasítani.



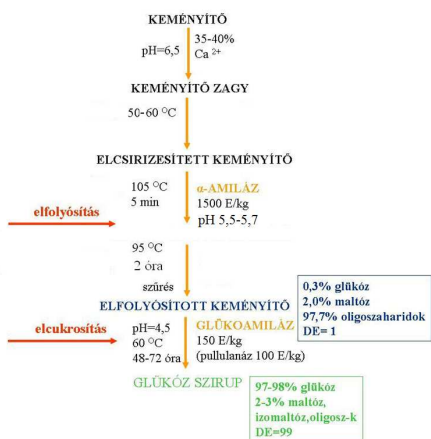
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

7



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

8



9

Amilázok

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



10

Dextróz egyenérték

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

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

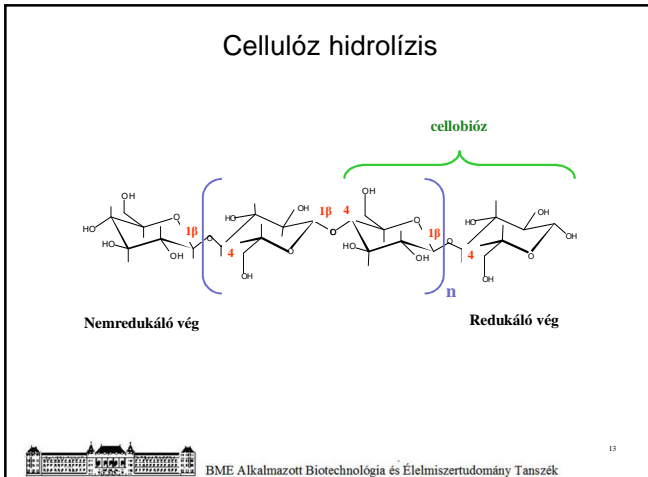
11

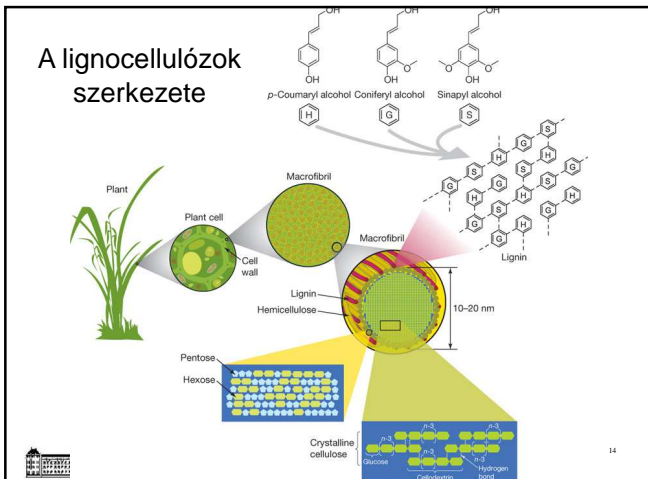
Cukrok relatív édessége

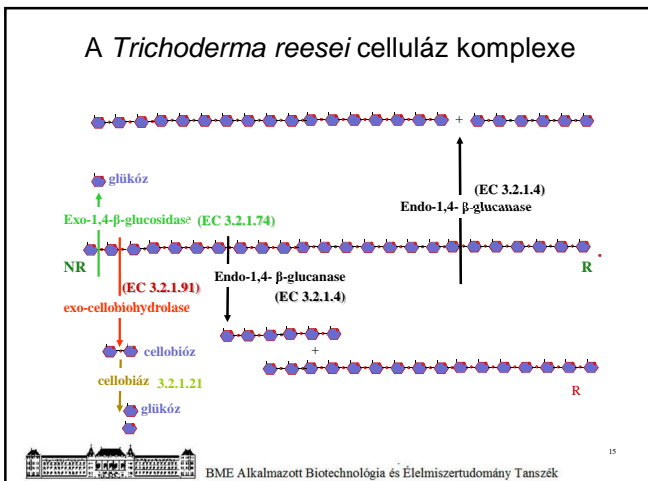
Food ingredient	Relative sweetness (by weight, solids)
Sucrose	1.0
Glucose	0.7
Fructose	1.3
Galactose	0.7
Maltose	0.3
Lactose	0.2
Raffinose	0.2
Hydrolysed sucrose	1.1
Hydrolysed lactose	0.7
Glucose syrup 11 DE	<0.1
Glucose syrup 42 DE	0.3
Glucose syrup 97 DE	0.7
Maltose syrup 44 DE	0.3
High-conversion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



12







Kitin és kitinázok

Chitin

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

Serratia marcescens
 kitináz

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

16

PEKTIN HIDROLÍZIS

galakturonsav

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

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

17

A pektin tényleges szerkezete

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

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

18

PEKTIN HIDROLÍZISE

α-1,4-galaktoszidkötések bontása, exo- és endoenzimek:

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

PEKTIN HIDROLÍZISE

Léhozam fokozása és derítés gyümölcslevek kinyerésénél -
Aspergillus és *Penicillium* törzsek extracelluláris enzimei.
 pH 4-5 között, $t_{max} \sim 50\text{ }^{\circ}\text{C}$

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

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Laktóz hidrolízis

A tejben és a savóban (sajtgártás) ~4.7 s% laktóz van.
 A hasznosításhoz hidrolizálni kell: laktáz = β-galaktoszidáz, emésztő enzim. A csecsemők termelik, a felnőtt populáció zöme már nem = **laktóz intolerancia** (Kína: 90%, fekete amerikaiak: 73% intoleráns, fehér USA: 96%, svéddek 84%-a toleráns)

Laktóz hidrolízis:
(Exo-(1 → 4)-beta-D-galactanase, lactase EC 3.2.1.23)

laktóz galaktóz glükóz

Laktóz bontatlanul vastagbélbe → }
 } Víz visszatartás hasmenés }
 } Bélbaci gázképződés } } **explozív diarrhea**

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

A β -galaktozidázok összehasonlítása

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

22

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⁻¹) enzim egy nap 5°C-on, kb. 50%-a a laktóznak lebomlik ami édesebb és nehezebben kristályosodó lesz!

Kisebb mennyiségben a hosszan eltartható sterilizett tejekhez is adnak (20 U kg⁻¹, 20°C).

Ma még nagyon drága



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

23

Laktóz hidrolízis

Az enzimes laktóz hidrolízis alkalmazásai:

1. Laktóz-szegény tej (low lactose milk) előállítás

Szakaszos eljárás (mert a folytonosnál nagyobb a befertőződés 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.

2. Savóban:

Immobilizált enzimes eljárás: inkább penész enzimmel, az alacsonyabb pH valamennyire véd a befertőződéstől. Felhasználás: takarmány, tápszer, élelmiszer adalék



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

24

Laktóz hidrolízis

3. Élelmiszeriparban: édesség, stabilitás javítása:

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

Édesítő értékek aránya:

laktóz : galaktóz : glükóz = 20 : 70 : 70

Felhasználása: fagyalt, ízesített és natúr kondenztej-készítmények



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

25

Penicillin hidrolízis

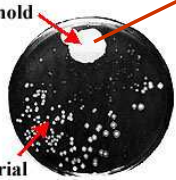


Sir A. Fleming

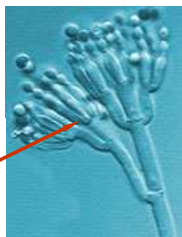
Először a penicillinről
 magáról.

Fleming's original plate:

mold



bacterial
 colonies

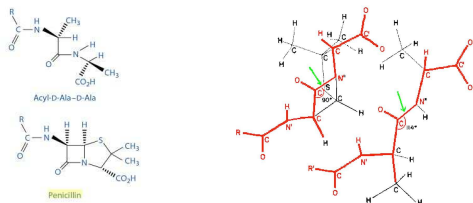


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

26

A penicillin

... a baktériumok sejtfalában keresztköteket létrehozó **glikopeptid transzpeptidáz** enzim szerkezetanalóg irreverzibilis suicid inhibitora. Az enzim a DAla-DAla láncvégeket köti össze pentaglicin láncvégekkel, miközben az egyik DAla kilép. A penicillin a DAla-DAla láncvégek szerkezetanalóga:

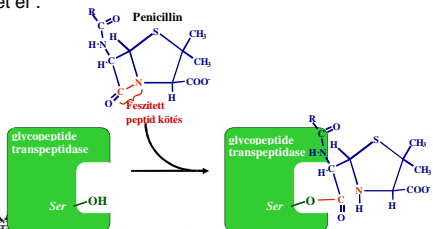


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

27

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 szerinnel 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”.



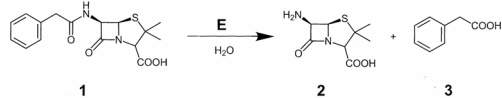
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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) + fenilecetsav



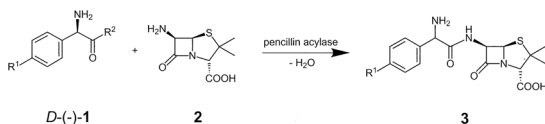
- 1 = penicillin-G
- 2 = 6-amino-penicillanic acid (6-APA)
- 3 = phenylacetic acid

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Penicillin aciláz/amidáz

2. Új oldallánc (karbonsav) rákötése

Karbonsav származék + 6-APA → félszintetikus penicillin



- 1a = phenylglycineamide (R¹=H, R²=NH₂) = PGA
- 1b = phenylglycinemethyl ester (R¹=H, R²=OMe) = PGM
- 1c = hydroxyphenylglycineamide (R¹=OH, R²=NH₂) = HPGA
- 1d = hydroxyphenylglycinemethyl ester (R¹=OH, R²=OMe) = HPGM
- 2 = 6-APA
- 3a = ampicillin (R¹=H)
- 3b = amoxicillin (R¹=OH)

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

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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

O₂ : aerob, de nem túl erős levegőztetés

Feldolgozás: - nyugvósejtes tenyészet, de inkább:

- kinyert, tisztított, immobilizált enzim



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

31

Penicillin hidrolízis

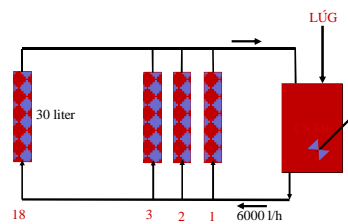
A reakció tulajdonságai: erős S és P inhibíció, a szakaszos nem jó.

Kiszámolták: a töltött oszlop a legjobb. De:

A felszabaduló fenilecetsav miatt a pH csökken, ettől a 6-APA bomlik. pH-szabályozás kellene, de az oszlopreaktorban nem megy.

Megoldások:

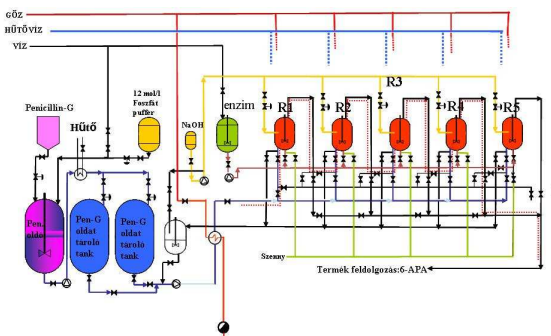
1. Toyo-Ozo eljárás:
 recirkulációs, pH szabályozás a tartályban,
 ciklusidő: 30 óra,
 produktivitás: 33 kg/m³h
 konverzió: 86%



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

32

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



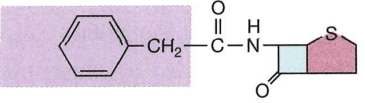
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

33

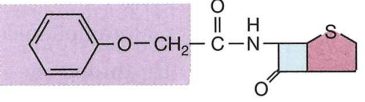
Félszintetikus penicillinek

Fermentált alapvegyületek:

Natural penicillins



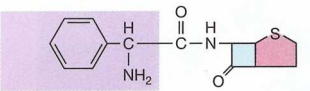
Penicillin G
(Gram-positive cocci)



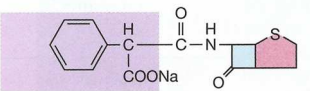
Penicillin V
(acid resistant)

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 34

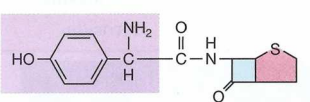
Félszintetikus penicillinek



Ampicillin
(broad spectrum, acid resistant)



Carbenicillin
(broad spectrum)



Amoxicillin
(broad spectrum)

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 35

RNS-hidrolízis

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

Két technológia: - de novo fermentáció
 - RNS hidrolízise:

Sok RNS-hez nagy RNS-tartalmú élesztő sejtömegeből 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 savval 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*).



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

37

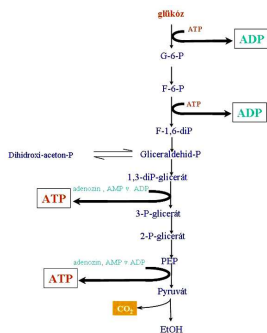
ATP gyártás - foszforilezés

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

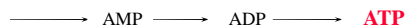
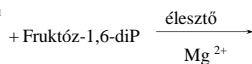
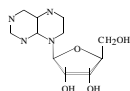


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

38

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 Mg²⁺ ionokat igényelnek.



Kínában immobilizált élesztővel 300 literes reaktorban évi 5 tonnát termelnek.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

39
