

HIDROLÍZIS

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

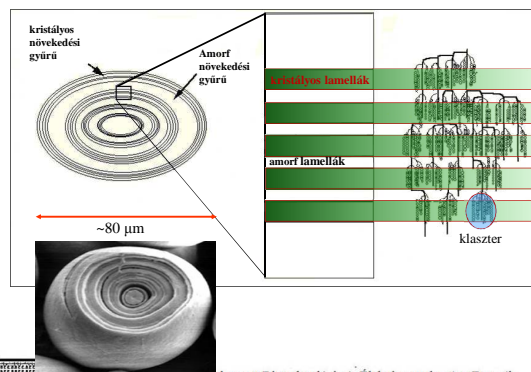
- észterázok: lipázok, foszfatázok
- glikozilázok,
- Peptidhidrolázok: proteázok,
- dezaminázok
- acilázok, stb



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

1

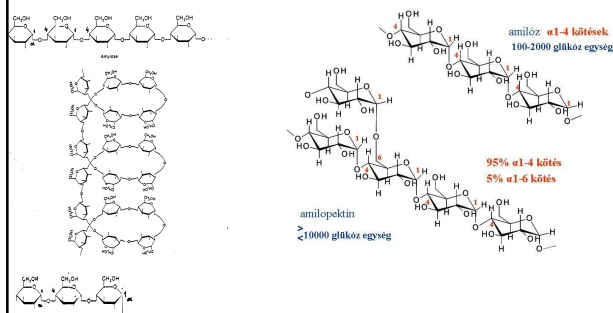
A keményítő szerkezete



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

4

Keményítő enzimes hidrolízise



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

A keményítőt bontó = amilolitikus enzimek

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*, *Thermo-monospora*) Ezek egymástól pH-, és hőmérséklet optimumban, valamint stabilitásban különböznek. A legtöbb α-amiláz stabilizátorként **kalcium ion**t igényel aktivitásához és stabilitásához.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5

A keményítő szerkezete

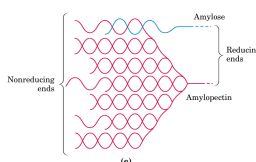
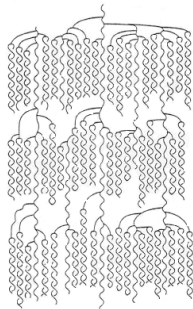
amilóz



A jódkeményítő színe a polimerizáció fokától függően:

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

amilopektin

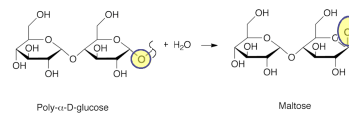


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

3

Amilázok

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



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

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

6

Amilázok

Glükóamilázok = amiloglikozidázok = γ -amilázok.
Exoenzimek, β D-glükóz egységeket hasítanak le a nem redukáló láncvégekről.
keményítő, dextrinek \rightarrow
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

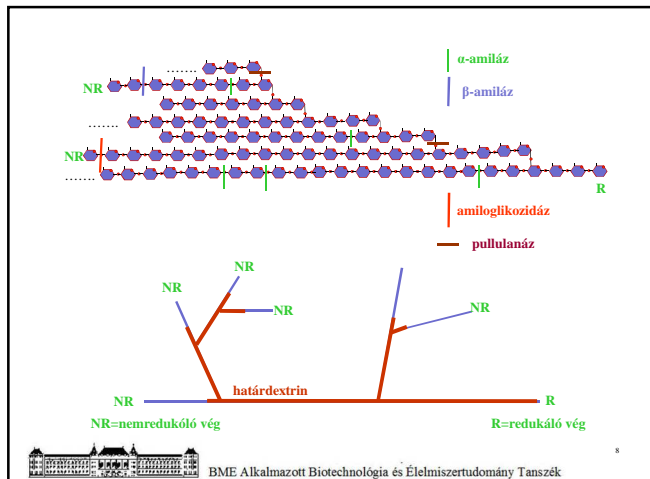
7

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</i> (<i>amylosacchariticus</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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

8

Dextróz egyenérték

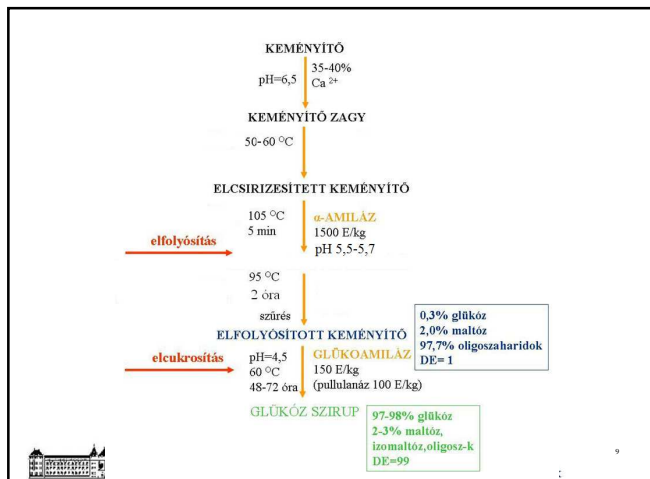
$$DE = 100 * \left(\frac{\text{elbontott glikozid kötések száma}}{\text{kezdetben jelen volt összes glikozid kötések száma}} \right) =$$

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

11



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) ^a	1.0
HFCS (55% fructose)	1.1
Aspartame	180



12

Cellulóz hidrolízis

cellobióz

Nemredukáló vég Redukáló vég

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Kitin és kitinázok

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

α -1,4-galaktozidkötések bontása, exo- és endoenzimiek:

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. stearrowthermophilus</i>	6.2	55	2	220	Mg ²⁺	
<i>L. thermophilus</i>	6.2	55	6	540		

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} ~50 °C

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

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 kondenztej-készítmények
(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

Laktóz hidrolízis

A tejben és a savóban (sajtyártás) ~4.7 % laktóz van. A hasznosításhoz hidrolizálni kell: laktáz = β -galaktozidáz, 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 bontatlanul vastagbélbe → }
Víz visszatartás hasmenés }
Bélbaci gázképződés }
explozív diarrhea

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Laktóz hidrolízis

Az enzimes laktóz hidrolízis alkalmazásai:

- 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.
- 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

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

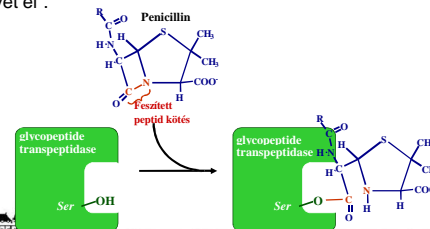


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

25

A penicillin

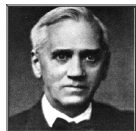
Az enzim befogja a penicillin molekulát és ugyanúgy hidrolizálja a peptid kötést a penicillin β-laktám gyűrűjében, mint az alaninok között. Az aktív centrumban lévő szerinrel létrejön az észterkötés, de ez a penicillin esetében nem tud átrendeződni, irreverzibilisen kovalens kötésben marad az enzimen.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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

28

Penicillin hidrolízis



Sir A. Fleming

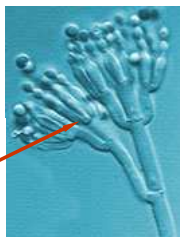
Először a penicillinről magáról.

Fleming's original plate:

mold



bacterial colonies



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

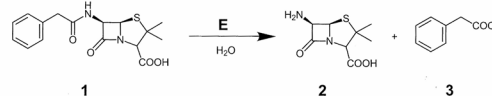
26

Penicillin aciláz/amidáz

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

1. Hidrolízis

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



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

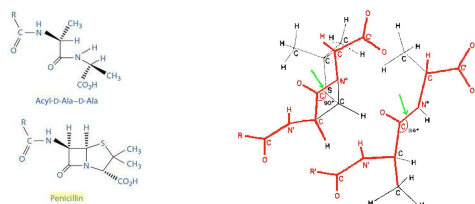


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

29

A penicillin

... a baktériumok sejt falában kereszt kötések 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 szerkezetanalógja:



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

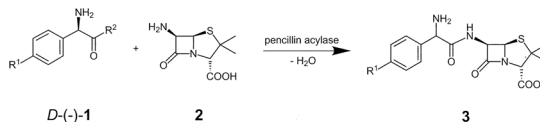
27

Penicillin aciláz/amidáz

2. Új oldallánc (karbonsav) rákötése

Karbonsav származék + 6-APA →

félszintetikus penicillin



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

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

30

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



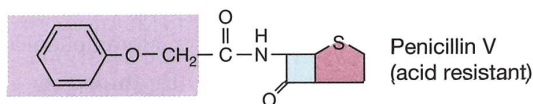
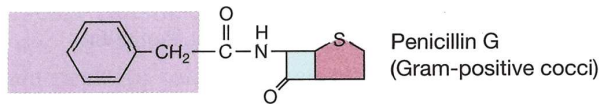
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

31

Félszintetikus penicillinek

Fermentált alapvegyületek:

Natural penicillins



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

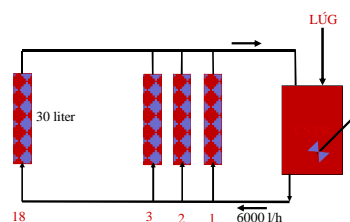
34

Penicillin hidrolízis

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

Megoldások:

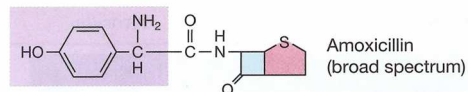
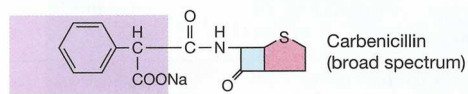
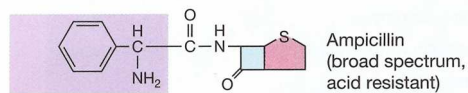
1. Toyo-Ozo eljárás: recirkulációs, pH szabályozás a tartályban, ciklusidő: 30 óra, produktivitás: 33 kg/m³h konverzió: 86%



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

32

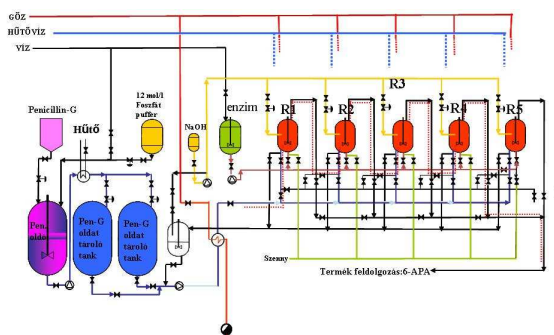
Félszintetikus penicillinek



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 órás 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*).



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

37

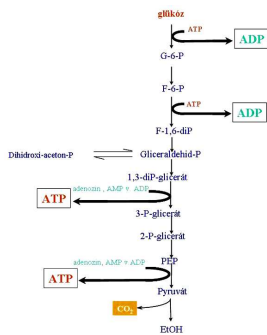
ATP gyártás - foszforilezés

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

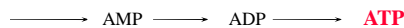
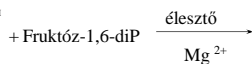
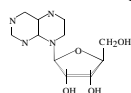


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

38

ATP gyártás

Az ATP-t fogyasztó lépéseket úgy kerüljük el, hogy a terméket előállító élesztősejteknek (*Saccharomyces cerevisiae*, anaerob) a glikolízis már foszforilezett köztitermékét (fruktóz-1,6-biszzfózfát) 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