

# HIDROLÍZIS

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

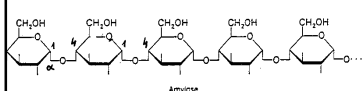
- észterázok: lipázok, foszfatázok
- glikozilázok,
- Peptidhidrolázok: proteázok,
- dezaminázok
- acilázok, stb



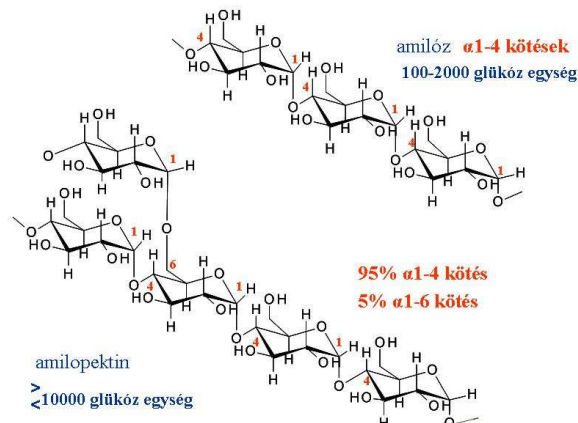
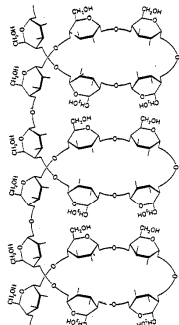
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

1

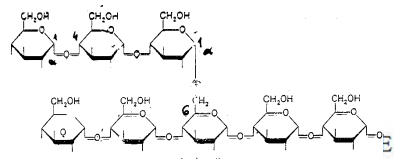
## Keményítő enzimes hidrolízise



Amylose



amilopektin  
> 10000 glükóz egység



Amylopectin

Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

## A keményítő szerkezete

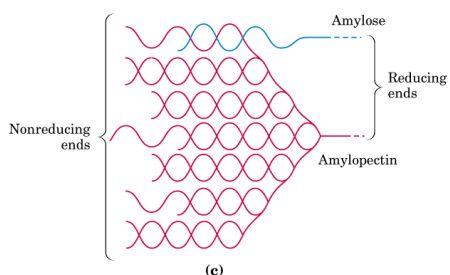
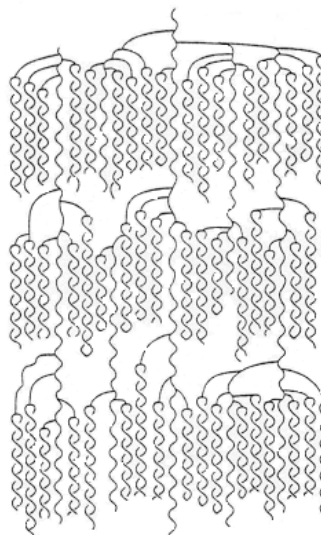
amilóz



A jódkeményítő színe a polimerizáció fokától függően:

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

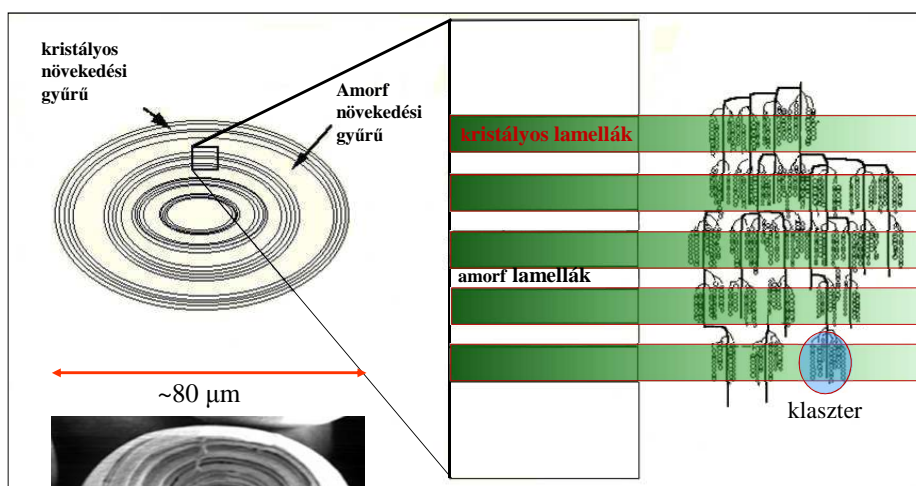
amilopektin



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

3

## A keményítő szerkezete



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

4

## 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 **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  $\alpha$ -amiláz stabilizátorként **kalcium iont** igényel aktivitásához és stabilitásához.

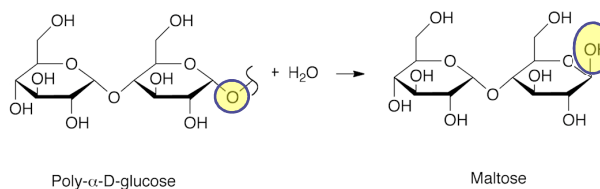


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5

## 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.

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

6

## Amilázok

Glükoamilázok = 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.

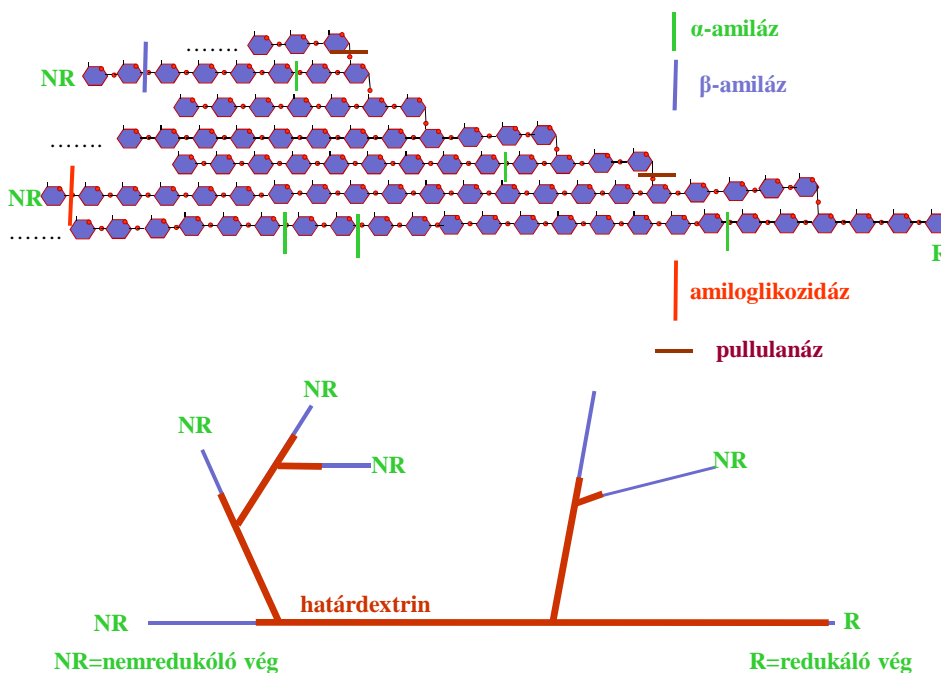
Enzim előállítás: *Aspergillus*, *Rhizopus* törzsek

Pullulanázok ill. izoamilázok az amilopektin elágazásainak  $\alpha$ -1,6-kötéseit képesek hasítani.



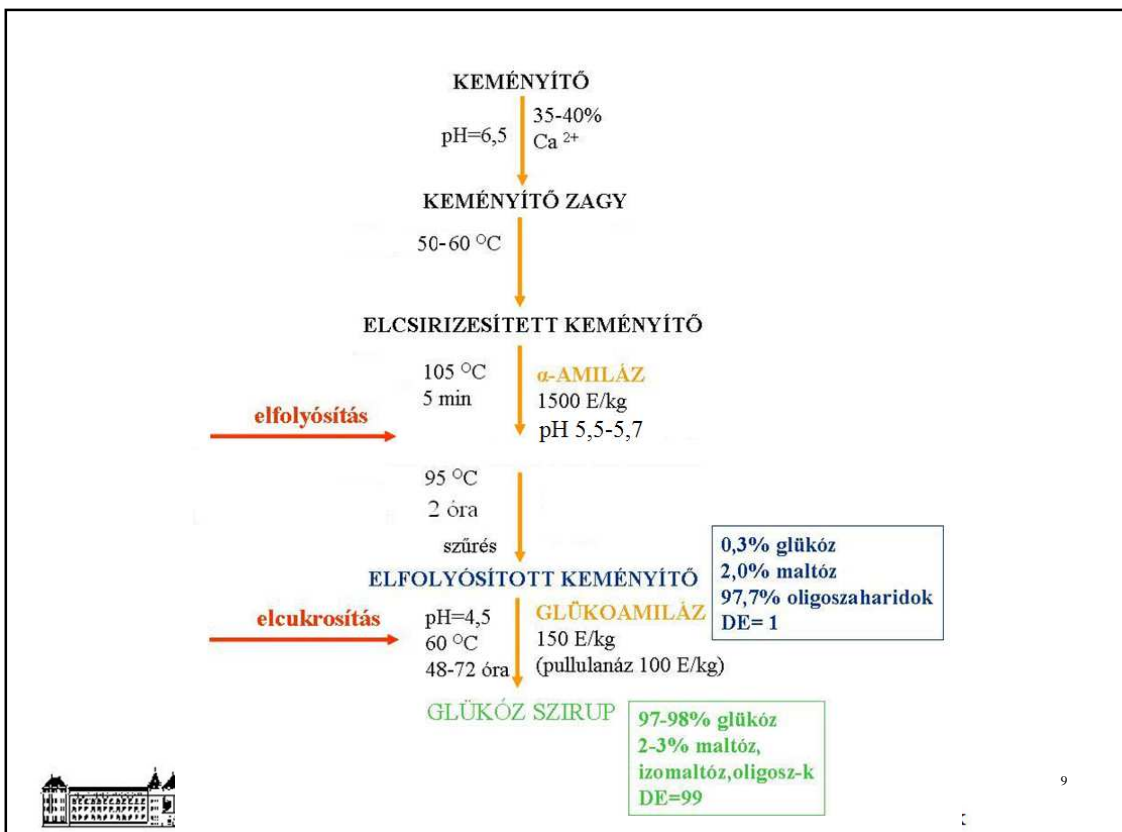
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

7



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

8



## 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 (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
Glucosylase	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

## Dextróz egyenérték

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

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

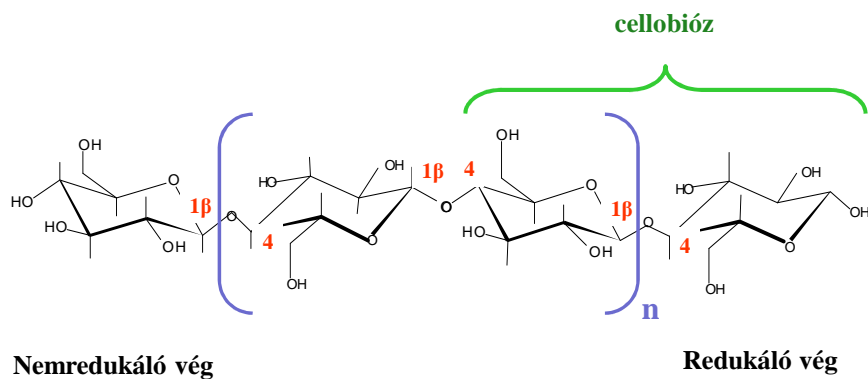


## Cukrok relatív édessége

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>a</sup>	1.0
HFCS (55% fructose)	1.1
Aspartame	180



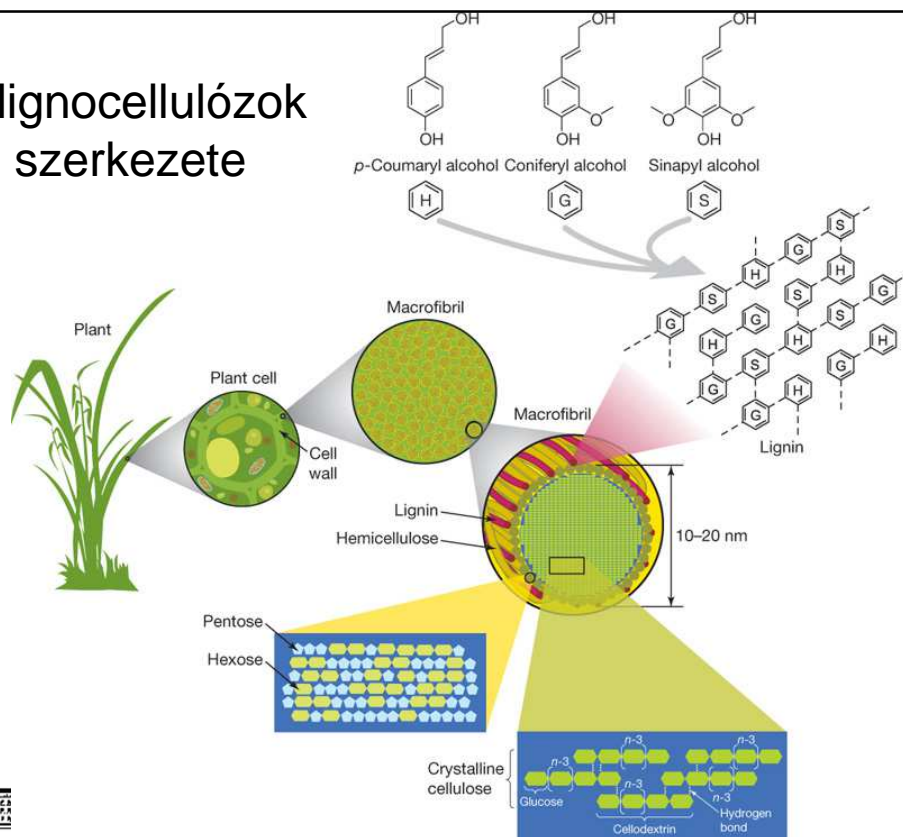
## Cellulóz hidrolízis



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

13

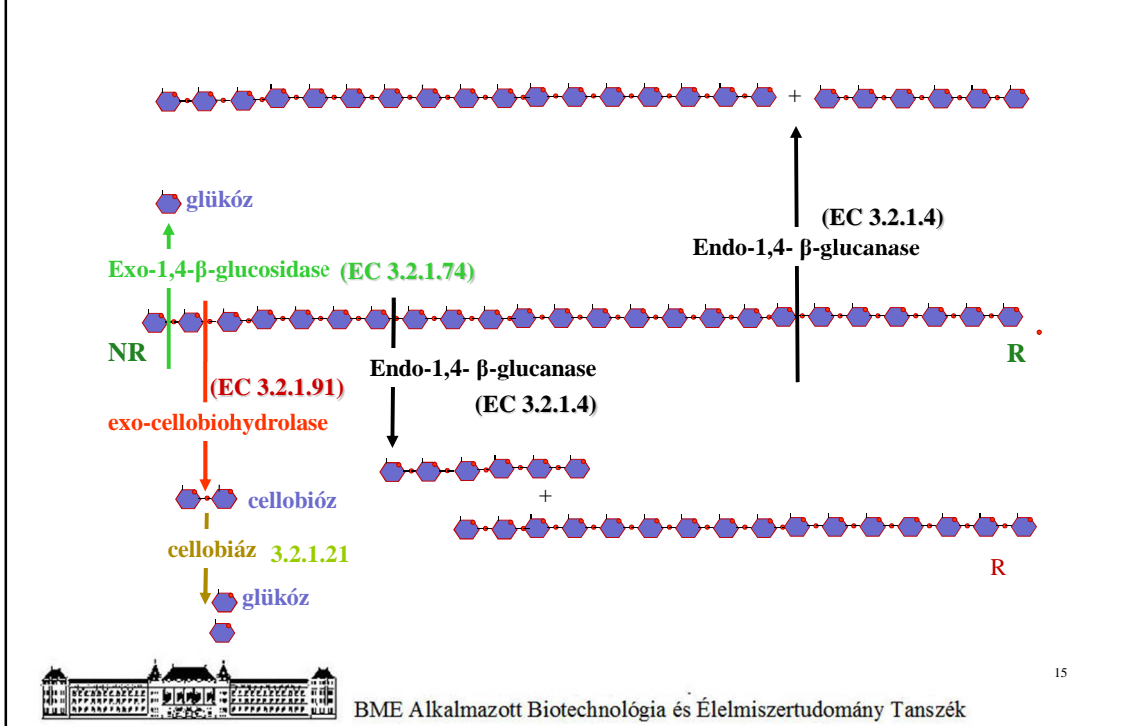
## A lignocellulózok szerkezete



14

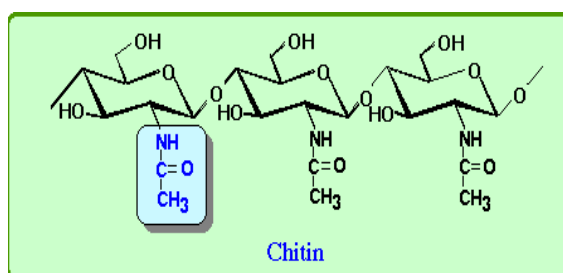


## A *Trichoderma reesei* celluláz komplexe



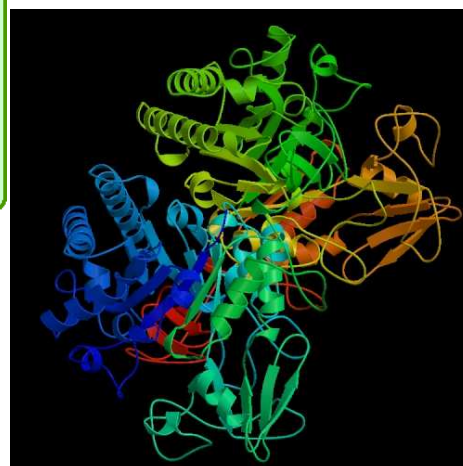
15

## Kitin és kitinázok



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

*Serratia marcescens*  
 kitináz

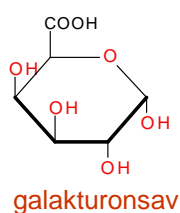
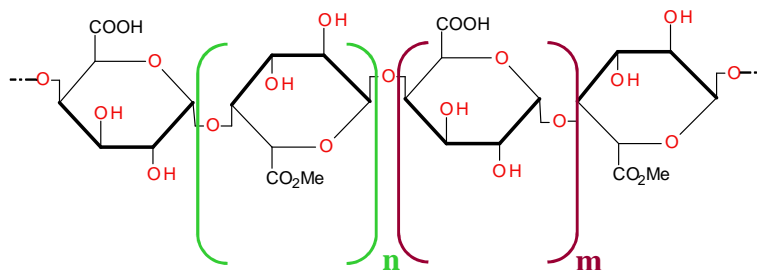


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

16



## PEKTIN HIDROLÍZIS



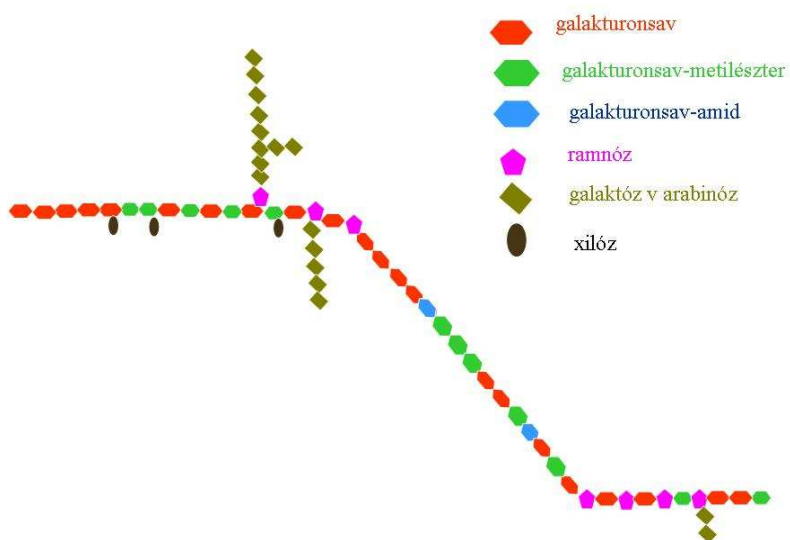
A pektin láncának fő komponense:  
 poli-galakturonsav, részlegesen  
 metanollal észterezve.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

17

## A pektin tényleges szerkezete

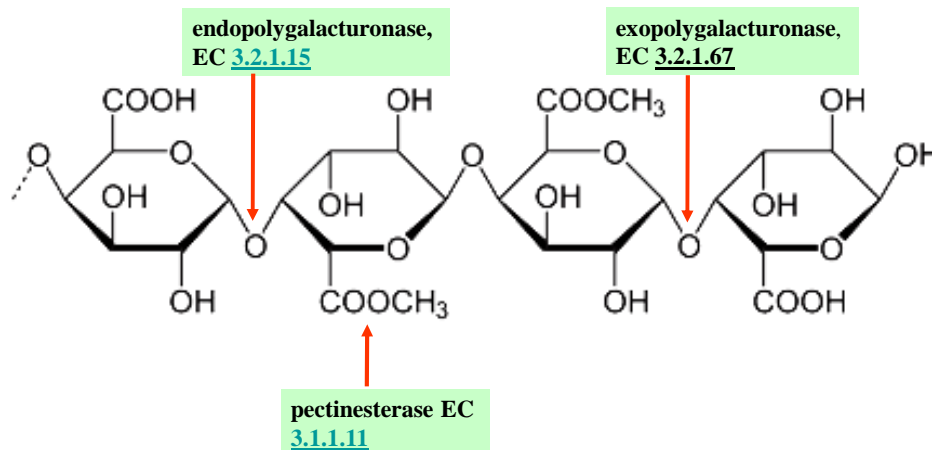


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

18

## PEKTIN HIDROLÍZISE

$\alpha$ -1,4-galaktozidkötések bontása, exo- és endoenzimek:



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

19

## PEKTIN HIDROLÍZISE

Léhozam fokozása és derítés gyümölcslevek kinyerésénél -  
*Aspergillus* és *Penicillium* törzsek extracelluláris enzimei.

pH 4-5 között,  $t_{\max} \sim 50$  °C

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

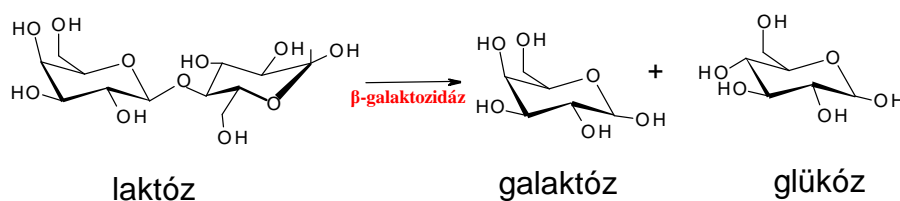
20

## Laktóz hidrolízis

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

Laktóz hidrolízis:

(**Exo-(1 → 4)-beta-D-galactanase, lactase EC 3.2.1.23**)



Laktóz bontatlanul vastagbélbe →  $\left. \begin{array}{l} \text{Víz visszatartás} \quad \text{hasmenés} \\ \text{Bélbacik} \quad \text{gázképződés} \end{array} \right\} \text{explozív diarrea}$



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

21

## A $\beta$ -galaktozidázok összehasonlítása

Origin	pH <sub>opt.</sub>	T <sub>opt.</sub>	K <sub>m</sub> (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 <sup>+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup> , Na <sup>2+</sup> , Zn, Cu
Bacterial						
<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. stearothermophilus</i>	6.2	55	2	220	Mg <sup>2+</sup>	
<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 kondenztej-készítmények

(2000 U kg<sup>-1</sup>) 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<sup>-1</sup>, 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) előállítása

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

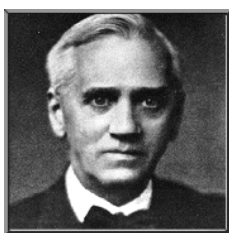
Felhasználása: fagylalt, ízesített és natúr kondenztejkészítmények



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

25

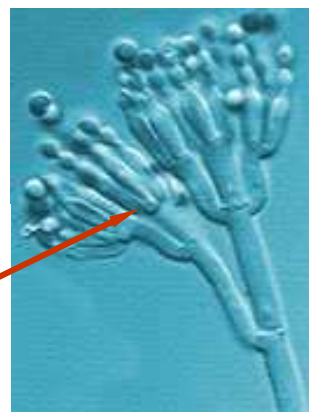
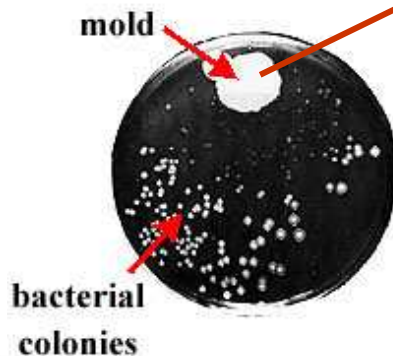
## Penicillin hidrolízis



Sir A. Fleming

Először a penicillinről  
magáról.

*Fleming's original plate:*

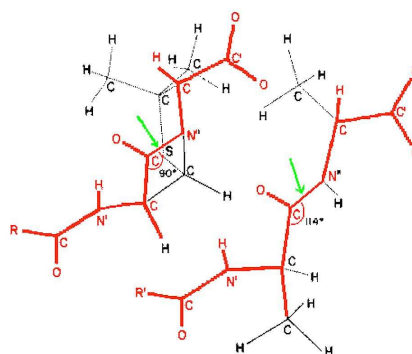
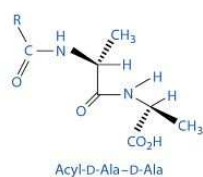


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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:

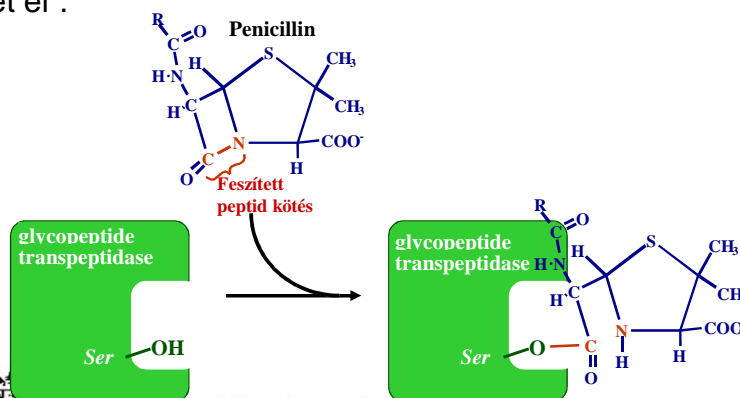


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

27

## A penicillin

Az enzim befogja a penicillin molekulát és ugyanúgy hidrolizálja a peptid kötést a penicillin  $\beta$ -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

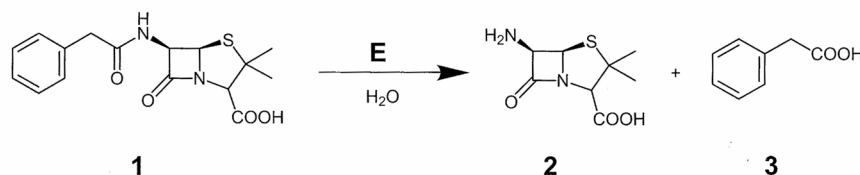
28

## 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

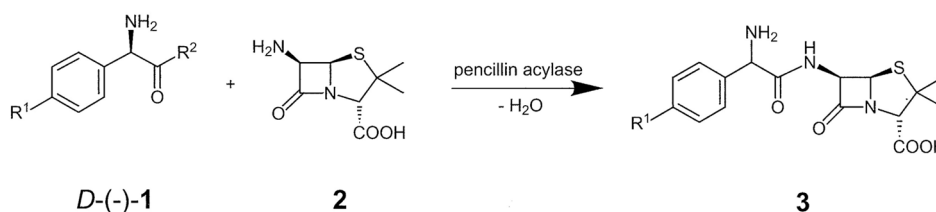
29

## 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          | 2 = 6-APA                             |
| 1b = phenylglycinmethyl ester (R <sup>1</sup> =H, R <sup>2</sup> =OMe) = PGM                 | 3a = ampicillin (R <sup>1</sup> =H)   |
| 1c = hydroxyphenylglycineamide (R <sup>1</sup> =OH, R <sup>2</sup> =NH <sub>2</sub> ) = HPGA | 3b = amoxicillin (R <sup>1</sup> =OH) |
| 1d = hydroxyphenylglycinmethyl ester (R <sup>1</sup> =OH, R <sup>2</sup> =OMe) = HPGM        |                                       |

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

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

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

## Penicillin hidrolízis

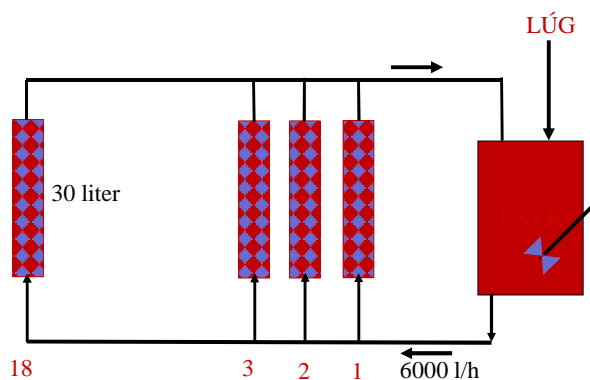
A reakció tulajdonságai: erős S és P inhibíció, a szakaszos nem jó.

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:

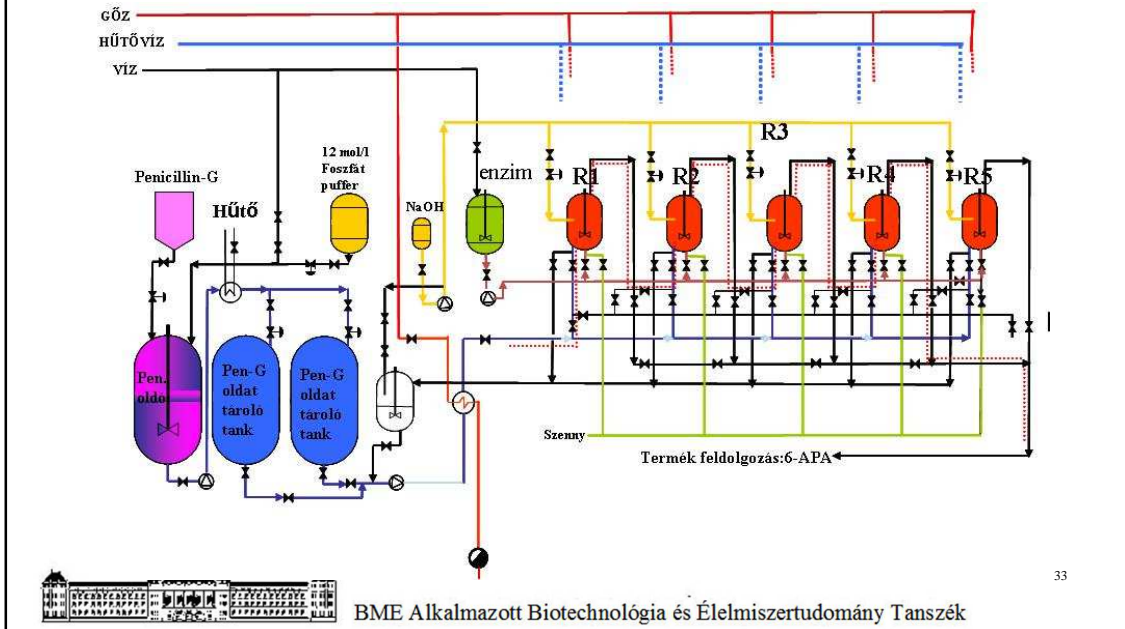
1. Toyo-Ozo eljárás:  
recirkulációs, pH szabályozás a tartályban,  
ciklusidő: 30 óra,  
produktivitás: 33 kg/m<sup>3</sup>h  
konverzió: 86%



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

32

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



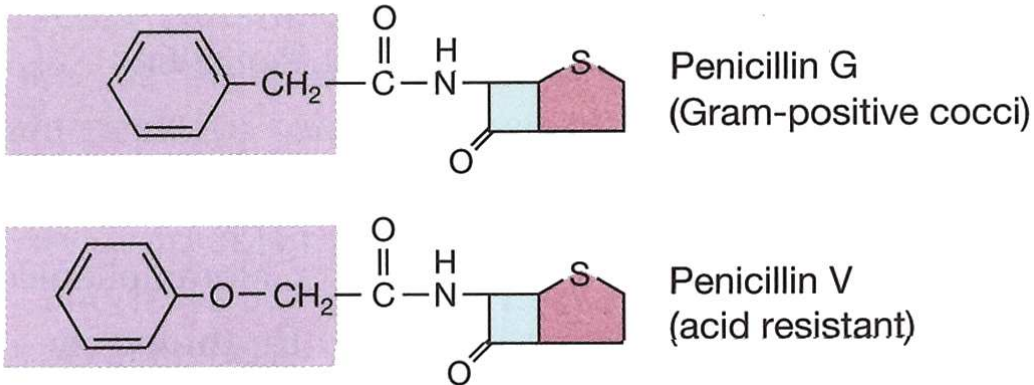
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

33

## Félszintetikus penicillinek

Fermentált alapvegyületek:

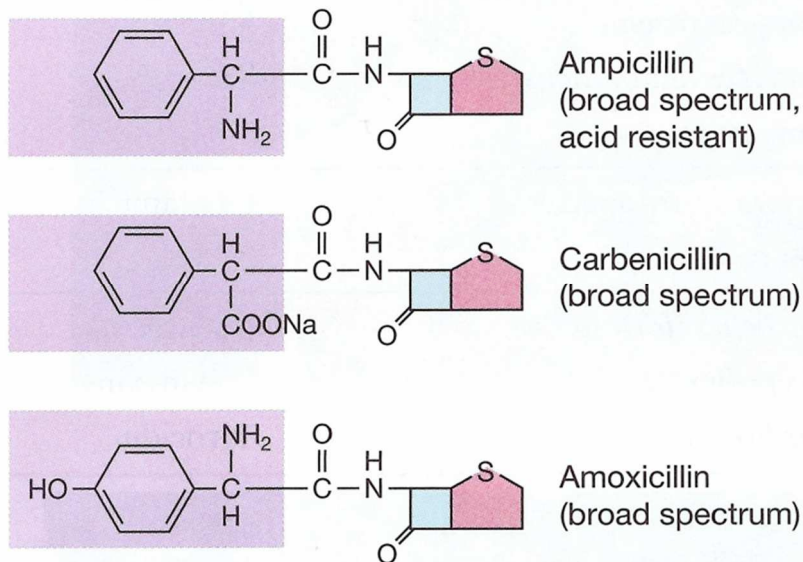
### Natural penicillins



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

34

## Félszintetikus penicillinek



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

35

## RNS-hidrolízis

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

Két technológia: - de novo fermentáció  
- RNS hidrolízise:

Sok RNS-hez nagy RNS-tartalmú élesztő sejtöregből 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 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*).

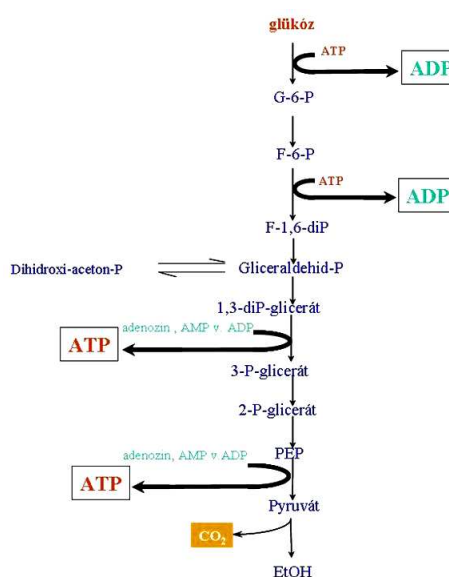
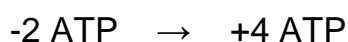


## ATP gyártás - foszforilezés

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

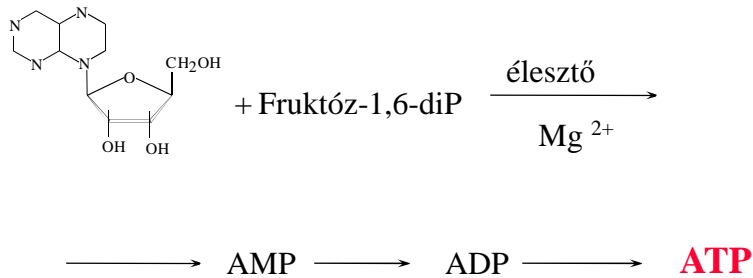
A glikolízis gyorsabb és egyszerűbb ATP termelő folyamat, mint a terminális oxidációhoz kapcsolt oxidatív foszforilezés.

De: fogyasztja is az ATP-t:



## ATP gyártás

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



Kínában immobilizált élesztővel 300 literes reaktorban évi 5 tonnáig termelnek.

