

## 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

---

---

---

---

---

---

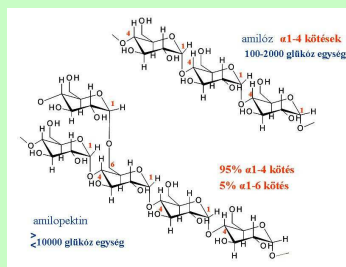
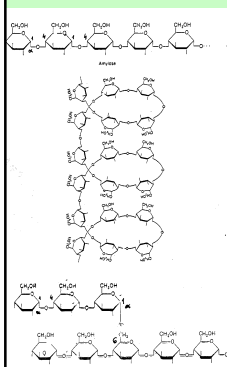
---

---

---

---

## Keményítő enzimes hidrolízise



Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## A keményítő szerkezete

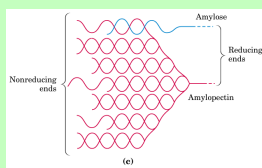
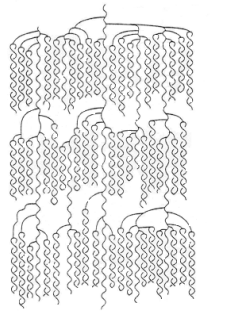
amilóz



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

~80 µm

4

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 dextrineket 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.

5

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Amilázok

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

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

Póly-D-glucose                      Maltose

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

6

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## 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.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

7

---

---

---

---

---

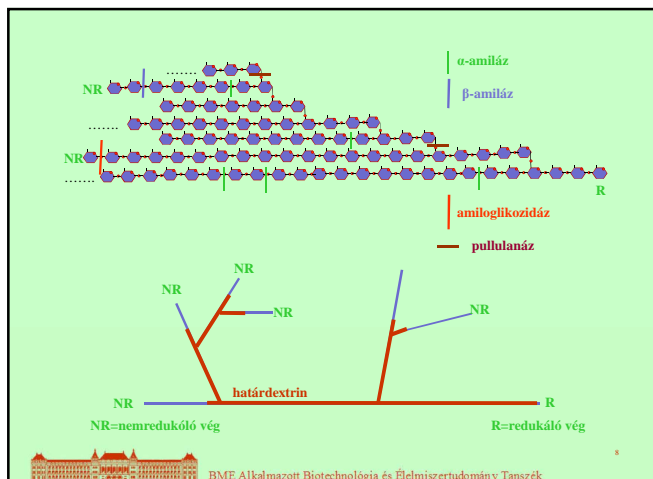
---

---

---

---

---



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

8

---

---

---

---

---

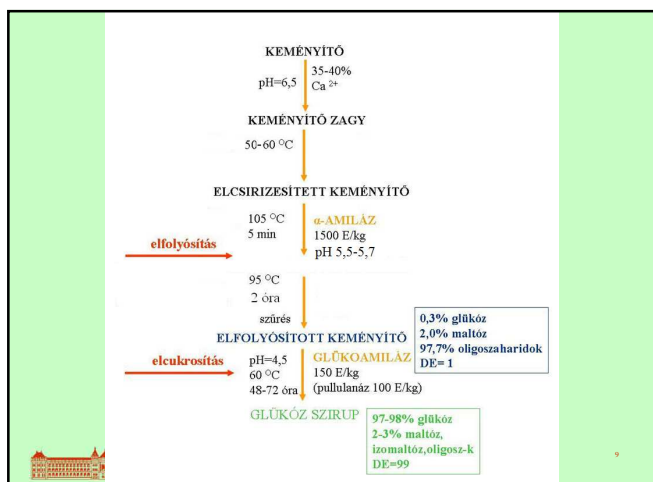
---

---

---

---

---



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 (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

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

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



12

---

---

---

---

---

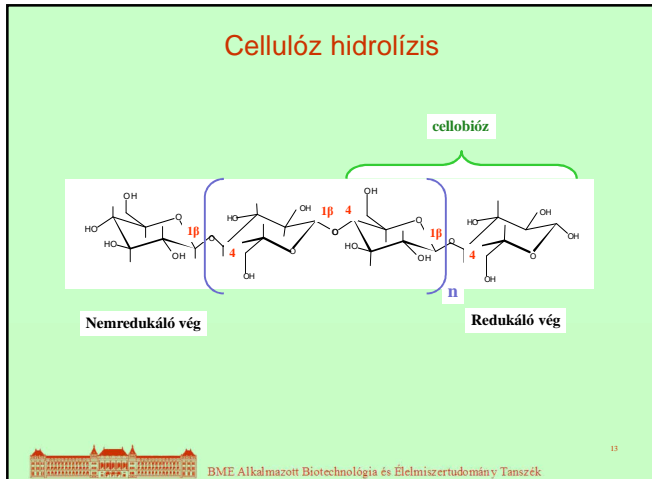
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

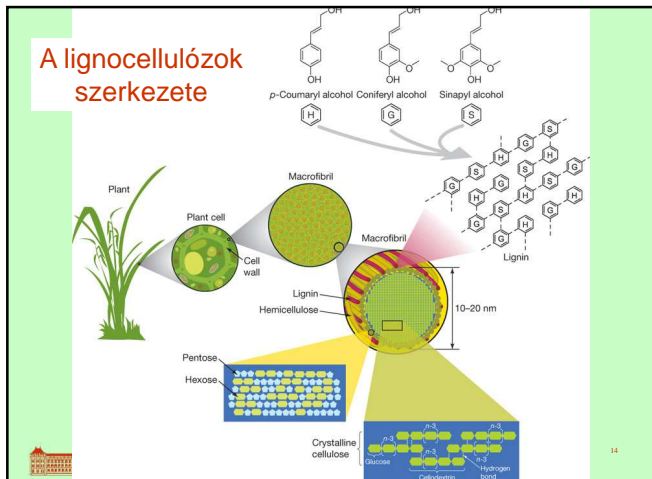
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

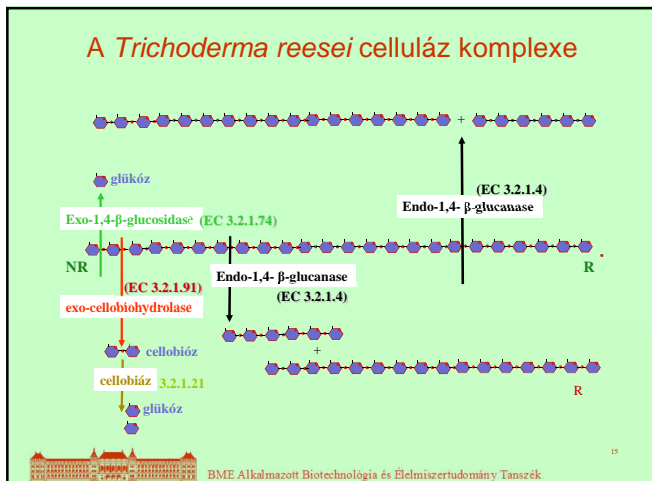
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### 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-galaktozidkötések bontása, exo- és endoenzimiek:

endopolygalacturonase, EC 3.2.1.15

exopolygalacturonase, EC 3.2.1.67

pectinesterase EC 3.1.1.11

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### PEKTIN HIDROLÍZISE

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

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

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Laktóz hidrolízis

A tejben és a savóban (sajtyártás) ~4.7 s% 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%, svédok 84%-a toleráns)

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

laktóz                      galaktóz                      glükóz

Laktóz bontatlanul vastagbélbe →  $\left. \begin{matrix} \text{Víz visszatartás} \\ \text{hásmenés} \\ \text{Bélbacik gázképződés} \end{matrix} \right\} \text{explozív diarrea}$

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## A β-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. 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: fagyalt, ízesített és natúr kondenztejkészítmények

(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) 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 inaktiválják.

### 2. Savóban:

Immobilizált enzimes eljárás: inkább penész enzimmel, az alacsonyabb pH valamennyire véd a befertőződéstől. Felhasználás: takarmány, tápszert, 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 kondenztej-készítmények



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

25

---

---

---

---

---

---

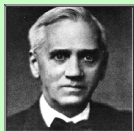
---

---

---

---

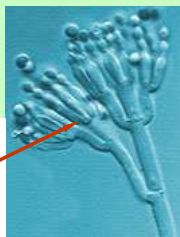
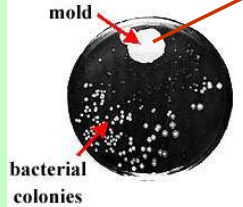
### Penicillin hidrolízis



Sir A. Fleming

Először a penicillinről  
 magáról.

*Fleming's original plate:*



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

26

---

---

---

---

---

---

---

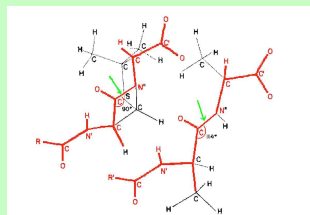
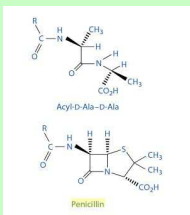
---

---

---

### 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 szerkezetanalógja:



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

27

---

---

---

---

---

---

---

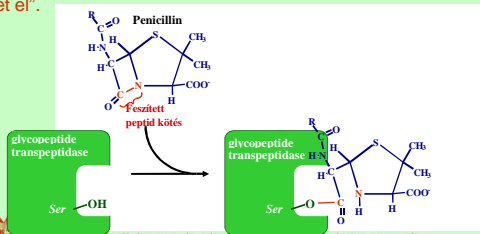
---

---

---

### 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”.




---

---

---

---

---

---

---

---

---

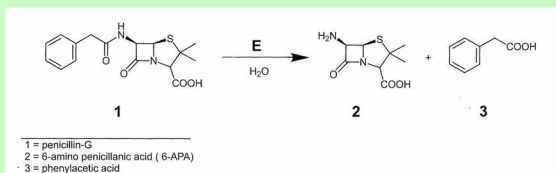
---

### 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




---

---

---

---

---

---

---

---

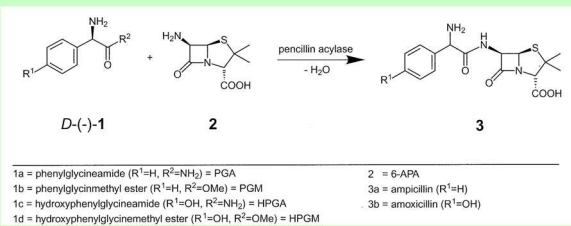
---

---

### Penicillin aciláz/amidáz

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

Karbonsav származék + 6-APA → félszintetikus penicillin



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

---

---

---

---

---

---

---

---

---

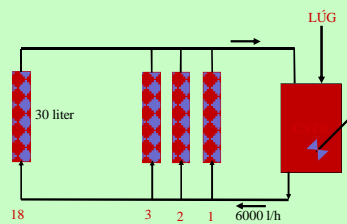
---

### 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

---

---

---

---

---

---

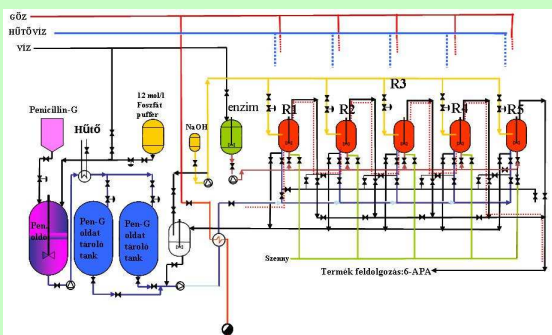
---

---

---

---

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

33

---

---

---

---

---

---

---

---

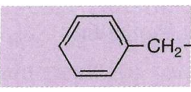
---

---

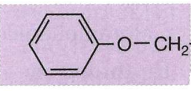
### Félszintetikus penicillinek

**Fermentált alapvegyületek:**

**Natural penicillins**



Penicillin G  
(Gram-positive cocci)



Penicillin V  
(acid resistant)

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 34

---

---

---

---

---

---

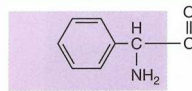
---

---

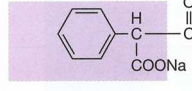
---

---

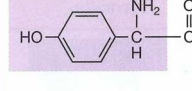
### Félszintetikus penicillinek



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 sejtöregéből 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 piri-midin váz egyaránt: 5'-GMP, 5'-AMP, 5'-UMP, 5'-CMP). Ezeket anioncserélővel, vagy metanolos frakcionált kicsapással választ-hatjuk el.

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




---

---

---

---

---

---

---

---

---

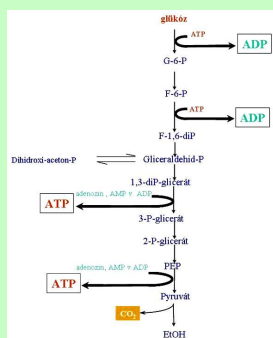
---

### ATP gyártás - foszforilezés

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

A glikolízis gyorsabb és egy-szerűbb ATP termelő folya-mat, mint a terminális oxidá-cióhoz kapcsolt oxidatív foszforilezés.

De: fogyasztja is az ATP-t:  
 -2 ATP → +4 ATP




---

---

---

---

---

---

---

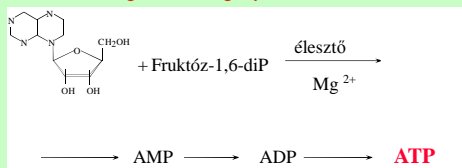
---

---

---

### ATP gyártás

Az ATP-t fogyasztó lépéseket úgy kerülük el, hogy a terméket előállító élesztősejteknek (*Saccharomyces cerevisiae*, anaerob) a glikolízis már foszforilezett köztitermékét (fruktóz-1,6-biszfosz-fát) és az adenozint adagolják, amit kémiai szintézissel állítanak elő. Az enzimek Mg<sup>2+</sup> ionokat igényelnek.



Kínában immobilizált élesztővel 300 literes reaktorban évi 5 ton-nát termelnek.




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---