

## IPARI ENZIMEK



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

---

---

---

---

---

---

---

---

## IPARI ENZIMEK

### Történelem, mérföldkövek

- Ősrégi: borjűgyomor – tejjalvasztó enzim, rennin
- maláta – keményítőtöbontó enzimek, amilázok
- 1836 Schwann: pepszin a gyomornedvből (triviális név)
- 1876 Kühne: enzim elnevezés (de még nem tudták pontosan, hogy mi az)
- 1890 TAKAMINE (USA) „takadiasztáz” preparátum *Asp. oryzae*, emésztés-segítő, proteáz + amiláz
- 1894 E. Fischer: sztereo-specifitás,  $\alpha$  és  $\beta$  glükózidázok
- 1913 Michaelis-Menten: enzimkinetika  $v_{max}$ ,  $K_M$
- 1926 Sumner: kristályos enzim, ureáz kadbabból
- 1966 teljes térszerkezet, lizozim



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

---

---

---

---

---

---

---

---

## IPARI ENZIMEK

### Történelem, mérföldkövek

- 1969 Enzimek és sejtek immobilizálása
- 1969 DL-Met részolválása, Tanabe, J
- 1973 6-amino-penicillánsav előállítás
- 1974 xilóz izomeráz – High Fructose Corn Syrup
- 1977 laktáz – low lactose milk
- 1975 Kliganov: enzimreakció szerves fázisban – lipáz
- 1999 Enzyme Data Bank: ~4000 emzim, [www.expsy.ch](http://www.expsy.ch)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

3

---

---

---

---

---

---

---

---

## ENZIMEK ALKALMAZÁSAI

**Ipar:** amilázok, proteázok, izomerázok, penicillin aciláz, konverziók (pl. az eddigi előadásokban felsoroltak)  
Piac: ~2000 MUSD/év

**Analitika, diagnosztikumok:** glükóz-oxidáz, alkohol dehidrogenáz, koleszterin oxidáz, ... stb

**Medicina:** proteázok, lipáz, aszparagináz, sztreptokináz, heparináz, ... stb  
Piac: ~3000 MUSD/év

**Kutatás/génmanipuláció:** restriktációs endonukleázok, reverz transzkriptáz, DNS-ligáz, DNS polimeráz, ....

Mi itt az ipari enzimekkel foglalkozunk.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

4

---

---

---

---

---

---

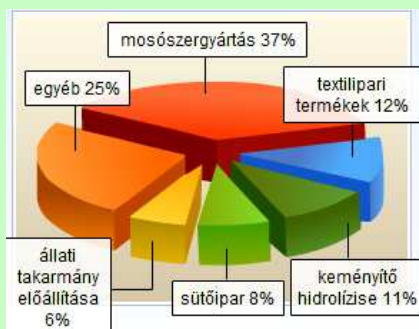
---

---

---

---

## MEGOSZLÁS IPARÁGAK SZERINT



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## IPARI ENZIMEK PIACA

Néhány multi uralja:

Novozymes (DK)  
DuPont/Danisco (USA)  
Roche (CH)

USA 40 %  
Európa 35 %  
Japán 24 %

| Enzyme                      | Sales (% of total) |
|-----------------------------|--------------------|
| <i>Bacillus proteázok</i>   | 45                 |
| <i>Glükamilázok</i>         | 13                 |
| <i>Bacillus amilázok</i>    | 5                  |
| <i>Glükóz izomerázok</i>    | 6                  |
| <i>Rennin (mikrobiális)</i> | 10                 |
| <i>Amilázok (penész)</i>    | 4                  |
| <i>Pektinázok</i>           | 3                  |
| <i>Proteázok (penész)</i>   | 2                  |
| <i>Egyéb</i>                | 12                 |



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

6

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## IPARI ENZIMEK FORRÁSAI

### Állati szövetek:

emésztőcsatorna emésztőenzimeit: tripszin, rennin  
májból: glutamát dehidrogenáz

### Növényi eredetű:

Papain, bromelin  
 $\alpha$  és  $\beta$ -amilázok: malátában

### Mikroorganizmusok:

Sok extracelluláris hidroláz  
Egyenértékű vagy jobb enzimet termelnek.

Ma a termelt enzimek 60%-a nem természetes, vagy  
- génmanipulációval átvitték egy másik mikroorganizmusba  
- protein engineering-gel megváltoztatták a szerkezetét.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

7

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## IPARI ENZIMEK TERMELÉSE

Anyagcsere: egyetlen fehérjét kell termelni nagy mennyiségben.

Szabályozások: néhány konstitutív enzimtől eltekintve ezek induktív enzimek → indukálni kell → általában a szubsztráttal

Amilázok - keményítővel

Invertáz - szacharózzal

$\beta$ -galaktozidáz - laktózzal

Glükóz-izomeráz - xilózzal (xilán, korpa)

Katabolit represszió: a bőséges cukor (glükóz, fruktóz, stb) lefékezi a primer anyagcserét. Kivédése:

- más, nehezen hozzáférhető szénforrás (laktóz, glicerín, ...)
- glükóz adagolással limitben tartani
- szabályozási mutánsok keresése



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

8

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## IPARI ENZIMEK TERMELÉSE

Tenyésztés általános jellemzői:

Felületi: még előfordul – tálca, forgó dob

Submerz: általános

Szakaszos: tisztán ritkán fordul elő

Rátáplálásos: a leggyakoribb

Folytonos: ahol csak lehet

Oxigén ellátás: nincs általános szabály

van, ahol az oxigén limit a jó (pl. glükóz izomeráz, ...)

van, ahol nagy OUR szükséges (pl. proteáz, ...)

van ahol +8% CO<sub>2</sub> bevezetése előnyös



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

9

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## IPARI ENZIMEK TERMELÉSE

Feldolgozás jellemző műveletei:

Extracelluláris – intracelluláris enzimek (sejtfeltárás)  
(a cél az extracelluláris, pl. génmanipulációval egy szignálpeptidet kapcsolnak a fehérje elejére)

Kicsapás - kicszés, oldószeres kicsapás (IEP)

Ultraszűrés – koncentráció, diaszűrés

Kromatográfia – ioncsere, adszorpció, néha affin- és gél-

Szárítás – fluid ágyas, porlasztva szárító, dobszáritó

Granulálás – extruderrel, sima felületű gyöngyök, por nélkül

A két utolsó lépés drága, és árthat az enzimeknek, ezért sokszor inkább oldatban hozzák forgalomba (stabilizálás)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

10

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## IPARI ENZIMEK

Az ipari léptékben termelt enzimek szinte mind hidrolázok. Ezen belül a szubsztrátok szerint célszerű csoportosítani az egyes készítményeket.

- Szénhidrátbontó enzimek (ezeket itt nem tárgyaljuk, mert párhuzamosan a keményítőipar kapcsán tananyag)
- Proteázok (pH optimumuk szerint lúgos, semleges és savas proteázok)
- Lipázok



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

11

---

---

---

---

---

---

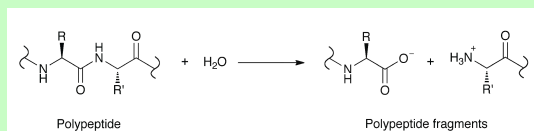
---

---

---

---

## Proteázok



A proteázok az ipari enzimek egyik legfontosabb csoportja (6200 t tiszta enzimfehérje/év)

Peptid kötések bont (létrehoz) (hidrolízis, szintézis)

Fehérje lebontás: élelmiszer, tejelválasztás, mosóenzimek, infúzió, vérrögoldás (fibrin oldás)

Peptid szintézis: aszpartám előállítás



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

12

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Proteázok

Hidrolízis-ekvivalens (h):

(mól elbontott peptidkötés)/(kg fehérje (szubsztrát))

Hidrolízis fok (DH = degree of hydrolysis), bontási százalék:

$$DH = \frac{h}{h_{tot}} \cdot 100\%$$

(mól elbontott peptidkötés)/(mól összes peptidkötés)

$h_{tot} = 1$  kg fehérjében található összes peptidkötés (mól).  
Ez ~8 mól/kg, mert ha az aminosavak átlagos molekula-  
tömege 125 g/mol, akkor 1 kg fehérjében 8 peptid kötés  
van.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

13

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Proteázok

Csoportosítás:

- Exo- és endoproteázok
- termelő szervezetek alapján (baktérium, gomba)
- pH optimum alapján (alkalikus, neutrális, savas)
- kulcs-aminosav szerint (Ser, Cys, Asp proteázok)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

14

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Alkalikus proteázok

Termelő mikroorganizmusok:

*Streptomyces* nemzetség, *Aspergillus* nemzetség, *B. amy-  
loliuefaciens* (szubtilizint termel – szerin-proteáz, reverzi-  
bilis a hidrolízis)

A **mosószer** proteázoknál feltétel a kompatibilitás:

- detergensekkel
- lúgokkal
- kelátképzőkkel
- Perborátokkal
- Hőstabilitás



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

15

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Alkalikus proteázok a bőriparban

### Bőrkikészítés:

- Tartósítás
- **Áztatás** – proteázokkal leemésztik a nem-rost fehérjéket
- **Szörtelenítés** – az enzimek nem a szőrt (keratint) bontják, hanem a szörtüszőt
- Zsírtalanítás
- Pácolás
- Cserzés




---

---

---

---

---

---

---

---

## Törzsek

### Screening

pH = 10-es fehérje agaron szélesztéssel

### Törzsjavítás (génmanipuláció, protein engineering)

Célja: az adott törzs több enzimet termeljen

- 1.) erős promotert teszünk az adott gén elé
- 2.) multikópiás plazmid: az adott gén több példányban legyen jelen.
- 3.) protein engineering: pl.:a stabilitás érdekében a 222 Met-t (amitől egy fehérje általában instabil) Ser-re cserélték - jobb aktivitást tapasztaltak, de a stabilitás nem lett jobb.




---

---

---

---

---

---

---

---

## Fermentációs technológia

- Fed batch fermentáció
- Az  $\text{NH}_4$  és aminosav koncentrációt alacsonyan kell tartani
- intenzív  $\text{O}_2$  bevétel kell
- 48-72 h

1971-ben termék-krisz: a por állagú enzim a gyár levegőjében szállva a dolgozóknál erős allergiát okozott.

Megoldás: mikrokapszulázás, extruder granulálás – sima felületű szemcsék, nem porzik.




---

---

---

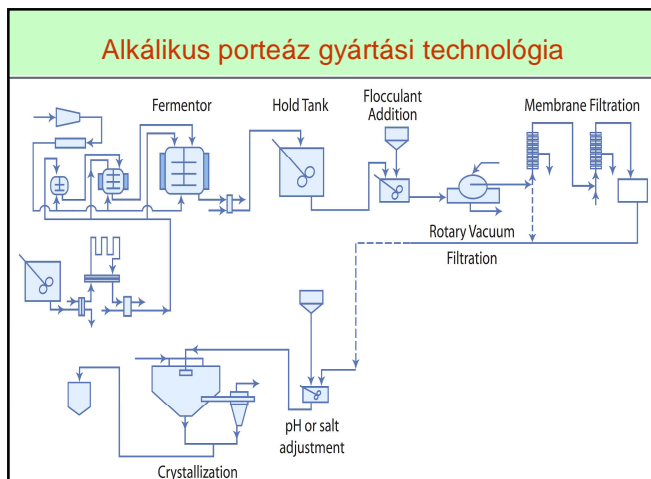
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---

### Neutrális proteázok

Termelő mikroorganizmusok:  
*Bacillus subtilis*, *S. griseus*, *Aspergillus oryzae*

Érzékeny: - hőre  
- stabilizátorokra ( $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NaCl}$ )  
- alkalikus proteáz gyorsan lebontja

Felhasználás:

- Élelmiszeriparban
- Bőrparban

20

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

---

---

---

---

---

---

---

---

### Neutrális proteázok a sütőiparban

A sütőiparban: elbontják a sikké fehérjéket, ezzel

- Enyhe bontásnál a tészta lazább lesz, nagyobbak a buborékok
- Erősebb bontásnál a tészta nem rugalmas lesz, hanem kemény, roppanós (keksz, ropi)
- Több szabad aminos csoport keletkezik – Maillard reakció – barna szín,
- gluténmentesítés, eltűnik az allergén

21

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

---

---

---

---

---

---

---

---

## Neutrális proteázok húsiparban

A húsiparban: érlelés, fehérje rostok fokozatos lebontása (rágós → puha)

- Spontán, saját enzimekkel +4 fokon 2-3 hét
- Felgyorsításához proteázt injektálnak
- Hidegen ez is lassan megy, de a sütés/főzés során felgyorsul a folyamat



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

22

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Savas proteázok

Asp és Glu proteázok

Pepszin típusú:  $pH_{opt} = 2-4$ , Aspergillus-ok termelik  
Rennin típusúak:  $pH_{opt} = 5-7$ , Mucor-ok termelik

Felhasználás:

- emésztést elősegítő enzimek (pepszin pótlása)
- szója hidrolízis, szója szósz előállítás
- tej alvasztása



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

23

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Oltóenzim, rennin, rennet, chymosin, gasztriktin

Savas proteáz

A sajtgyártás kulcsenzime, alvasztó enzim, Asp van az aktív centrumban (= aszparaginsav proteáz)

A 3-4 hetes borjú gyomrában található pre-pro-chymozin formában.

Két izoenzime van, egy aminosav (244) különbség:

- *chymozin A*: Asp (~40%, nagyobb az aktivitás)
- *chymozin B*: Gly (~60%)

Genetikailag meghatározott, vagy A vagy B van termelődik.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

24

---

---

---

---

---

---

---

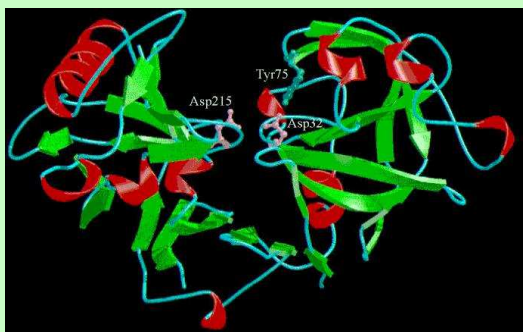
---

---

---



## Chymosin-B



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

25

---

---

---

---

---

---

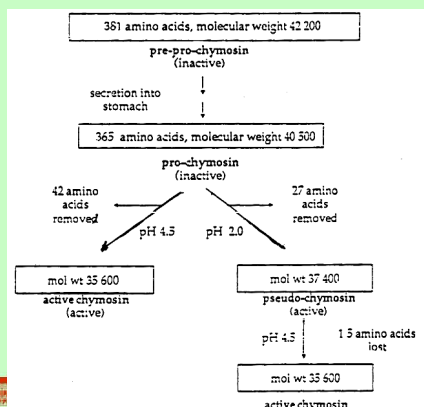
---

---

---

---

## Az aktív RENNIN kialakulása



26

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Rennin

Megnövekedett igény, nincs elég borjú gyomor.

A hiányzó mennyiség pótlására:

1. állati (pl. csirke) pepszinek (Izrael, Csehország)
2. savas penész proteázok - *Rhizomucor mihei*, *R. pusillus*, *Cryphonectria (Endothia) parasitica*  
*E. parasitica* enzim: kereskedelmi készítmény, 1967, Supraren (USA, Franciaország)  
- pH = 4 - 5,5  
- hőstabilitása (viszonylag) nagy (itt hátrány)  
- extracelluláris enzim, kicsapódhat

Protein engineering-gel próbálták javítani.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

27

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Rekombináns rennin

### 3. Rekombináns DNS technikával

#### E. coli

- 1980 elején az állati chymozin gént klónozták, RENNET<sup>®</sup> néven szabadalmaztatták és engedélyeztették
- az enzim oldhatatlan, zárványtest (inclusion body) formában van
- az összfehérje 15-20%-a rennin

B. subtilis: ártalmatlan mikroba, de ez is intracelluláris

Saccharomyces cerevisiae: gyenge termékképzés




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Rekombináns rennin

#### Aspergillus niger var. awamori törzssel

Egyszerű inokulálás, spórákkal, hosszabb, egy hetes fermentáció.

Extracelluláris, könnyű feldolgozni, de: a komplex tápoldat miatt marad szennyezettebb.

Elég porlasztva szárítani, ha tiszta enzim kell, akkor oszlopokon tisztítják.

Christian Hansen, (CHY-MAX); Genencor (CHYMOGEN)




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Rekombináns rennin

Kluyveromyces lactis-sal: élelmiszeripari mikroba, tejsavóból izolált élesztő, a tejcukrot bontja (vö.: SCP gyártás),

A tejiparban használatos  $\beta$ -galaktozidázt ezzel termeli a Gist-Brocades.

Extracelluláris enzimtermelés: az élesztő  $\alpha$ -faktor leadert, mint szignál szekvenciát beépítették az N-terminálisra ezáltal a prochymosint extracellulárisan termeli. (1988 F, NL)

A törzs kevés más extracelluláris fehérjét termel, ezért könnyű a rennint izolálni.

Prochymosin  $\rightarrow$  chymosin (MAXIREN<sup>®</sup>)

Jól ismert törzs, egyszerű a scale up.




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## MAXIREN<sup>R</sup>

A termék nem tartalmazhat élő sejtet, ezeket benzooesavval alacsony pH-án előlik, és szűrik (ultraszűrés után steriliszűrés → élelmiszeripari enzim)  
Közben a prochymosin → chymosin átalakulás végbemegy  
A terméket benzooesavval tartósítják.

Régebben plazmidon elhelyezkedő génről termeltették a prochymosint, azután a prochymosin gént beépítették a kromoszómába.




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## MAXIREN<sup>R</sup>

- tisztább, mint a borjú rennin, nincs kísérő enzim (pepszin + egyéb)
- a renninnel kémiaiilag és biológiailag teljesen azonos
- ez a kereskedelmi termék az egész világon.
- termelése olcsó
- állandó tisztaságú, mentes állati szervesmaradványoktól (pl. nincs BSE veszély)
- korlátlanul termelhető




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## MAXIREN<sup>R</sup>

- 1988-tól ipari termelés Seclinben (F), az üzem ISO 9002 minősítéssel rendelkezik rekombináns élesztő tenyésztésére, kóser minősítés, vegetáriánus minősítés.
- engedélyeztetése nehéz volt, csak
- DNS stabilitás, patogenitás, mutagenitás, toxikusság, etetési teszt, allergia, sajtgyártási teszt, organoleptikus vizsgálatok után fogadták el.
- EC, EU előírásait be kell tartani (termelésre és termékre egyaránt)




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### A RENNIN hatása

A sajtgyártás kulcslépése a tejfehérje megalvasztása.  
 A sajt az első termék, melynél enzimet és mikrobat (tejsavbaktériumot) is használnak évezredek óta.  
 Évente  $25 \cdot 10^6$  liter rennetet forgalmaznak, 140 M USD értékben, olcsó enzim.

Tej(+só)

Tejsavas baktérium

Rennet

}

Koaguláció

10X koncentráció

Tej cukor nincs

oldható fehérje nincs

Tartós

savas sajt: friss

Rennet sajt: érelt

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

34

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### A tej fehérjéi

| Fehérjék               | %  | Foszfát csoportok molekulánként |   |
|------------------------|----|---------------------------------|---|
| <b>Kazein</b>          |    |                                 |   |
| $\alpha$ s1-kazein     | 32 | 8                               | Hőstabil P miatt, Ca kötő micella képz. |
| $\alpha$ s2-kazein     | 8  | 10-13                           |   |
| $\beta$ -kazein        | 32 | 5                               |   |
| $\kappa$ -kazein       | 8  | 1-2                             |   |
|                        | 80 |                                 |   |
| <b>Savó fehérjék</b>   |    |                                 |   |
| $\beta$ -laktoglobulin | 12 | 0                               | Ezek ultraszűréssel eltávolíthatók      |
| $\beta$ -laktalbumin   | 4  | 0                               |   |
| Immunglobulin          | 3  | 0                               |   |
| Szérum albumin         | 1  | 0                               |   |
|                        | 20 |                                 |   |

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

35

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Kazein micellák

0,1% Ca jelenlétében a kazeinok micellát képeznek.

Casein Micelle

Casein Submicelle

hydrophobic core

$\kappa$ -casein-enriched surface

CMP "hairy" layer

$\text{Ca}_v(\text{PO}_4)_w$  cluster

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

36

---

---

---

---

---

---

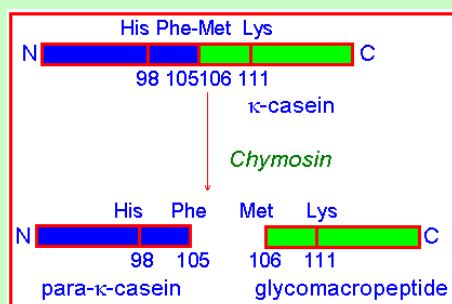
---

---

---

---

### A rennin hatása



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

37

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### A rennin hatása

1. fázis: A rennin fenilalanin-metionin között végez hasítást, kettévágja a κ-kazeint és ezzel destabilizálja a micella szerkezetét.
2. fázis: koaguláció, mely a magasabb hőmérsékleten és  $\text{Ca}^{2+}$  ionok hatására fokozódik

Szétválasztás: túró (fehérje: a 8%-ból 7, zsír, Ca, foszfát) + savó (tejcukor ~7,5% és ~1% fehérje, ásványi sók)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

38

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Sajtérlelés

Bizonyos sajtokat érlelnek (4 hét-2 év), az idővel a víztartalom csökken. Közben kémiai, biokémiai, mikrobiológiai változások zajlanak le.

- ha tejcukor maradt a sajtban és ezen a mikrobák elszaporodnak → kellemetlen íz
- sok szabad zsírsav keserű (szappanszerű) ízt ad
- a fehérje bomlás folyamatos, aminosavak, biogén aminok, ammónia



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

39

---

---

---

---

---

---

---

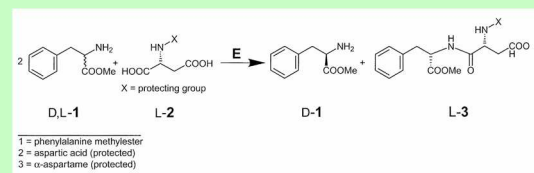
---

---

---

## Fémproteázok

termolizin Zn proteáz, az aszpartám gyártás enzime  
 Aszpartám: mesterséges édesítőszer.  
 Felhasználása élelmiszereknél: italok, tej, jam, cukorkák...  
 A fenilalanin metil észterének és aszparaginsavnak az  
 összekapcsolásával keletkezik:



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

40

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Termolizin

Forrása: *Bacillus proteolyticus*

Mérete: 316 aminosav, 34.333 Da

Japán hőforrásból izolálták → jó a hőstabilitása

A kofaktora  $Zn^{2+}$  ion, a stabilitását 4  $Ca^{2+}$  biztosítja.

Optimális körülmények: pH = 7-8    T = 70 °C

Izolált enzimeként, oldott vagy immobilizált formában alkalmazták.

Szakaszos eljárás, keverős reaktorban

Enantiomer tisztaság: 99,99 %



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

41

---

---

---

---

---

---

---

---

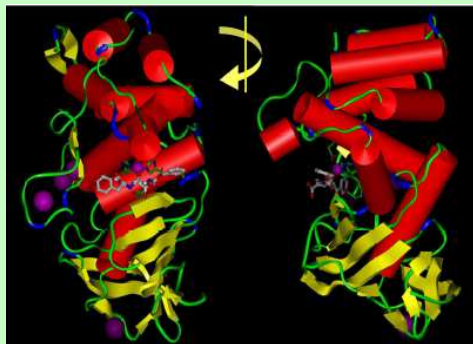
---

---

---

---

## Termolizin



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

42

---

---

---

---

---

---

---

---

---

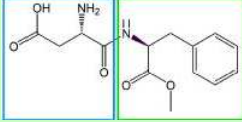
---


---

---

### Aszpartám gyártás

Ahhoz, hogy csak a fenilalanin aminocsoportja reagáljon az aszparaginsav  $\alpha$ -karboxil csoportjával, a rajtuk lévő egyéb funkciós csoportokat blokkolni kell, egyébként random di- és oligopeptidek képződnek.




BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék
43

---

---

---

---

---

---

---


---

---

---

### Aszpartám gyártások

Kémiai eljárás (formilezés, NutraSweet, Ajinomoto):


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék
44

---

---

---

---

---

---

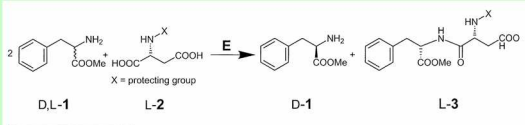
---

---

---


---

### Enzimes eljárás (HSM = Holland Sweeteners Company)



1 = phenylalanine methyl ester  
 2 = aspartic acid (protected)  
 3 =  $\alpha$ -aspartame (protected)

A Phe metilésztere a karbonsavat blokkolja, az Asp aminos csoportját pedig egy benzoi-oxi-karbonil (BOC) csoporttal védik (ez végül hidrogénezéssel eltávolítható).


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék
45

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Enzimes eljárás (HSM)

Az enzimes eljárás előnyei:

- Nem keletkezik  $\beta$ -aszpartám (ami keserű)
- Sztereoselektív a reakció, csak L-aszpartám keletkezik, így alapanyagként DL-Phe (racém, olcsóbb) is használható.
- Nincs racemizáció a szintézis alatt
- A reakció vizes közegben, enyhe körülmények között végrehajtható.
- A keletkező védett aszpartám adduktot képez a feleslegben lévő D-PheOMe-rel, ami kicsapódik.
- A termék kicsapódása miatt az egyensúlyinál jobb konverziót lehet elérni (5%  $\rightarrow$  90%).



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

46

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Az enzimes aszpartám gyártás lépései

Szubsztrátok:

L-aszparaginsav + DL-fenilalanin-OMe (racém, olcsóbb)

- A keletkező védett aszpartám adduktot képez a feleslegben lévő D-PheOMe-rel, ami kicsapódik.
- Szűrés
- Sósavval visszaoldják.
- A BOC csoportot lehidrogénezik, a D-PheOMe-t racemizálják és visszaviszik a folyamat elejére.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

47

---

---

---

---

---

---

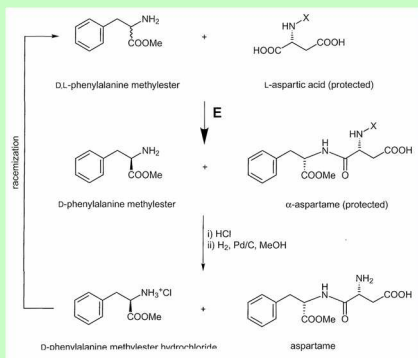
---

---

---

---

## Aszpartám gyártás



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

48

---

---

---

---

---

---

---

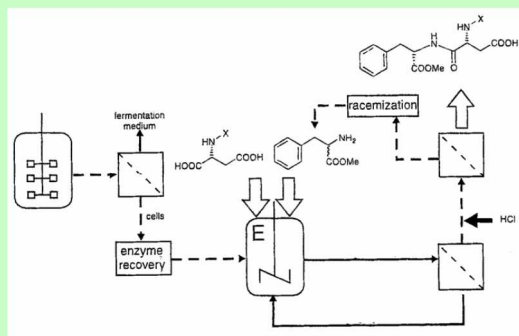
---

---

---



### Az aszpartám gyártás folyamatábrája




---

---

---

---

---

---

---

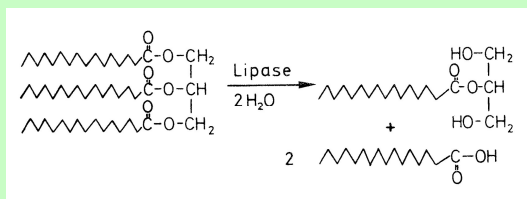
---

---

---

### Lipázok

Alapreakció: a zsírok észterkötéseit hidrolizálják, termékek: szabad zsírsavak, mono- és digliceridek, glicerín.  
Egyensúlyi reakció, visszafelé is megy.




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Lipázok

Vannak régióspecifikusak, amelyek csak a szélső zsírsavakat hidrolizálják, a középsőt nem, de vannak erre érzéketlenek is. A szénlánc hossza csak a sebességet befolyásolja.  
Szerves oldószerekben is jól működnek, igen kis víztartalom mellett.  
Sőt a hőállóságuk is jobb ebben a közegben →70 °C.  
Adszorpcióval könnyen immobilizálhatóak szerves és szervetlen hordozók felületén (hidrofil-hidrofób jelleg a használt oldószer szerint).




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Lipázok

Termelő mikroorganizmusok:

- *Aspergillus* nemzetség,
- *Mucor* nemzetség,
- *Rhizopus* nemzetség,
- *Candida* nemzetség

Általában sejthez kötött enzimek, de  $Mg^{2+}$  ionok hatására leválnak

Induktor: olaj, zsírok (szubsztrát),  
Represszor: glükóz (katabolit represszió), glicerín (termék inhibíció)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

52

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Lipázok felhasználása

1. Emésztést elősegíti (pankreász lipáz pótlása)
2. Sajtérlelésben ízjavító (tejsír irányított bontása)
3. Szappan ipar, kéméletes elszappanosítás (*Candida* lipáz)
4. Átészterezés, észterképzés → dinamikus egyensúly → a karbonsav csoportok folyamatosan cserélődnek →



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

53

---

---

---

---

---

---

---

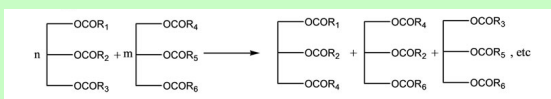
---

---

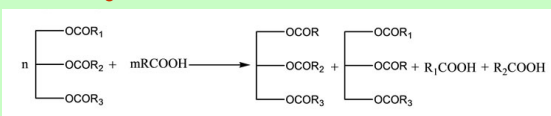
---

## Zsírok átészterezése

### 1. Trigliceridek között



### 2. Triglicerid és zsírsav között



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

54

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Kakaóvaj-pótló anyag előállítása

Pálmagaj-olaj átészterezése kakaóvajszerű zsíradékká (csokoládé gyártás)

| Triglyceride | Palm oil mid-fraction (% dry weight) | Enzymically produced fat (% dry weight) | Cocoa butter (% dry weight) |
|--------------|--------------------------------------|---|-----------------------------|
| SiSiSt       | 5                                    | 3                                       | 1                           |
| POP          | 58                                   | 16                                      | 16                          |
| POSt         | 13                                   | 39                                      | 41                          |
| SiOSt        | 2                                    | 28.5                                    | 27                          |
| StLnSt       | 9                                    | 8                                       | 8                           |
| SiCO         | 4                                    | 4                                       | 6                           |
| Others       | 2                                    | 1.5                                     | 1                           |

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék
55

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Kakaóvaj-pótló anyag előállítása

Napraforgóolaj átészterezése kakaóvajszerű zsíradékká (csokoládé gyártás) régió-szelektív lipázokkal.

$$\begin{array}{c} \text{O} \\ | \\ \text{O} \\ | \\ \text{O} \end{array} + \text{Stearic acid} \rightleftharpoons \begin{array}{c} \text{S} \\ | \\ \text{O} \\ | \\ \text{S} \end{array} + \text{Oleic acid}$$

High-oleate sunflower oil
Component of cocoa butter equivalent

A termékéből a szabad savakat eltávolítják molekuláris desztillációval, azután hűtéssel frakcionált kristályosítás: a sztearinsav észterek válnak ki először, az olajsavasok folyékonyak maradnak.

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék
56

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Kakaóvaj-pótló anyag előállítása

```

    graph TD
      A[High-oleate sunflower oil] --> C[Immobilized lipase]
      B[Stearic acid] --> C
      D[Water] --> C
      C --> E[Distillation]
      E --> F[Mixed acids (St, O)]
      F --> G[Recycle]
      E --> H[Crystallization]
      H --> I[SOO + OOO]
      I --> J[Recycle]
      H --> K[SiOSt]
    
```

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék
57

---

---

---

---

---

---

---

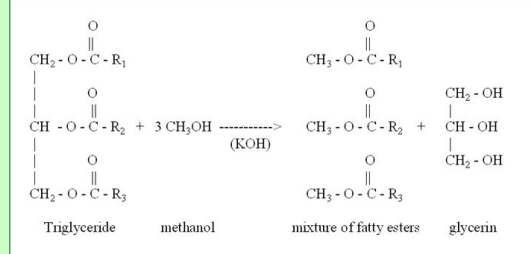
---

---

---

## Növényolaj átészterezése biodízellé

A biodízel gyártása során a növényi olajat átészterezik metilészterré. Ezt KOH-val végzik, de dolgoznak az enzimikus technológián. Ehhez *nem-régióspecifikus* lipáz szükséges.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

58

---

---

---

---

---

---

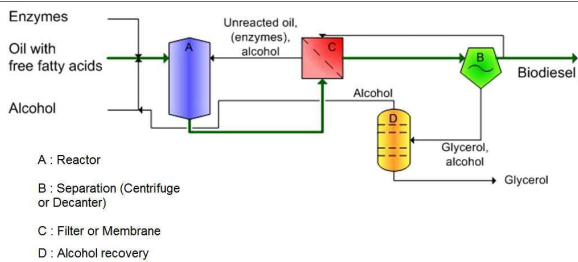
---

---

---

---

## Növényolaj átészterezése biodízellé



Sok (~12%) glicerín keletkezik



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

59

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---