

IPARI ENZIMEK

Történelem, mérföldkövek

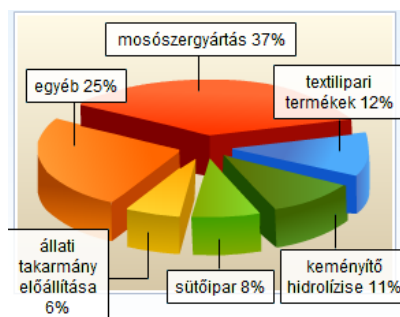
- Ósrégi: borjúgyomor – tejjalvasztó enzim, rennin
maláta – keményítőtöbontó enzimek, amilázok
- 1836 Schwann: pepszin a gyomornedvből (triviális név)
- 1876 Kühne: enzim elnevezés (de még nem tudták pontosan, hogy mi az)
- 1890 TAKAMINE (USA) „takadiasztáz” preparátum *Asp. oryzae*, emésztés-segítő,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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

1

MEGOSZLÁS IPARÁGAK SZERINT



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

4

IPARI ENZIMEK

Történelem, mérföldkövek

- 1969 Enzimek és sejtek immobilizálása
- 1969 DL-Met részolválása, Tanabe, J
- 1973 6-amino-penicillánsav előállítása
- 1974 xilóz izomeráz – High Fructose Corn Syrup
- 1977 laktáz – low lactose milk
- 1975 Kliganov: enzimreakció szerves fázisban – lipáz
- 1999 Enzyme Data Bank: ~4000 enzim, www.expasy.ch
Brenda



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

IPARI ENZIMEK PIACA

Néhány multi urálja:

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

5

ENZIMEK ALKALMAZÁSAI

- Ipár:** amilázok, proteázok, izomerázok, penicillin aciláz, konverziók. 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:** restriktív endonukleázok, reverz transzkriptáz, DNS-ligáz, DNS polimeráz, ...

Mi itt az ipari enzimekkel foglalkozunk.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

3

IPARI ENZIMEK FORRÁSAI

Állati szövetek:

emésztőcsatorna emésztőenzimek: tripszin, rennin
májból: glutamát dehidrogenáz

Növényi eredetű:

Papain, bromelin
 α és β -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

6

IPARI ENZIMEK TERMELESE

Anyagcsere: egyetlen fehérjét kell termelni nagy mennyiségben.

Szabályozások: néhány konstitutív enzimtól eltekintve ezek indukzív enzimek – indukálni kell – általában a szubsztráttal

- Amilázok - keményítő
- Invertáz - szacharóz
- β -galaktozidáz - laktóz
- Glükóz-izomeráz - xilóz (xilán, korpa)

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

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

7

AMILÁZOK

Keményítőbontó enzimek

α -amiláz, folyósító enzim: endo-amiláz, a láncok belsején, véletlenszerűen (1-4) kötéseket hasít, rövidebb láncokat, dextrineket termel

β -amiláz, maltamiláz: a láncok nem-redukáló végéről maltóz egységeket választ le. Határdextrinek maradnak.

Amiloglukozidáz, glükamiláz: a nem-redukáló láncvégekről glükóz egységeket választ le. Határdextrinek maradnak.

Pullulanáz: az elágazásoknál lévő (1-6) kötéseket bontja, ezzel megszünteti az elágazásokat (debranching enzyme).



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

10

IPARI ENZIMEK TERMELESE

Tenyésztés általános jellemzői:

Felületi: még előfordul – tálcá, forgó dob

Szubmerz: általános

Szakaszos: tisztán ritkán fordul elő

Rátáplálás: 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% CO₂ bevezetése előnyös



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

8

A KEMÉNYÍTŐ SZERKEZETE

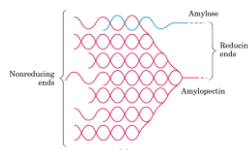
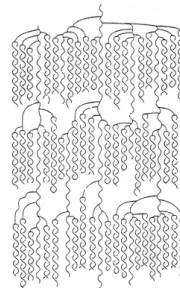
amilóz



A jódkeményítő színe a polimerizáció fokától függően:

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

amilopektin



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

11

IPARI ENZIMEK TERMELESE

Feldolgozás jellemző műveletei:

Extracelluláris – intracelluláris enzimek (sejtfeltárás)

(a cél az extracelluláris, pl. génmanipulációval egy szignálpeptidet kapcsolnak a fehérje elejére)

Kicsapás - kisózás, oldószeres kicsapás (IEP)

Ultraszűrés – koncentráció, diaszűrés

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

Szárítás – fluid ágyas, porlasztva szárító, dobszárító

Granulálás – extruderrel, sima felületű gyöngyök, por nélkül

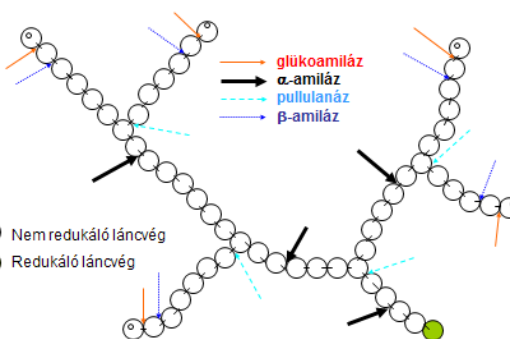
A két utolsó lépés drága, és árthat az enzimnek, ezért gyakran inkább oldatban hozzák forgalomba (stabilizálás)

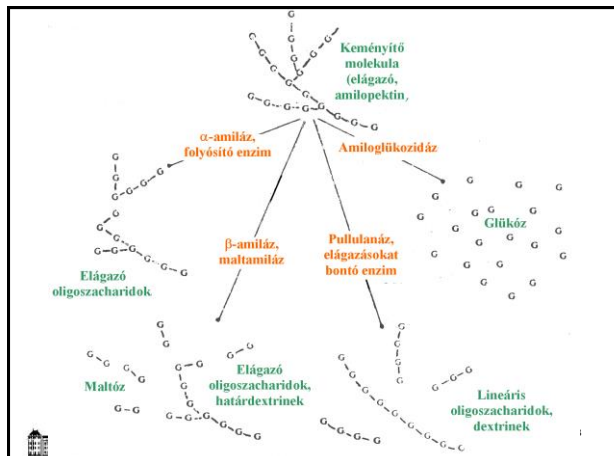


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

9

AMILÁZOK





β-AMILÁZ

α és β nem a szubsztrátra vonatkozik, hanem a termékre!

β-amiláz, maltamiláz: eredetileg maláta enzimet használtak, de ma elsősorban *B. polymyxa*, mellesleg *Streptomyces* és *Pseudomonas* fajok.

Magasabb hőfokon működik ~70 °C

Felhasználás:

- sörcéfrzés és gabonaszesz gyártás
- maltóz szirup előállítása keményítőtől (ez a cukorszirup nem karamellizálódik)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

16

α-AMILÁZ

α-amiláz, folyósító enzim (= mert a bontástól a viszkozitás drámaian csökken)

Sok mikroba termeli, extracelluláris, Ca²⁺ iont igényel.

penészek: *Asp. oryzae*, *Asp. niger*, *Mucor*
hőfok optimum: 30 - 60 °C,
Thermomonospora enzim: 53 °C

baktériumok: *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* (a mRNS nagyon stabil, ~30 perc)
optimális hőfok: 90-105 °C



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

14

AMILOGLÜKOZIDÁZ

Amiloglükozidáz, glükamiláz:

penészek termelik: *Asp. niger*, *Asp. awamori*, *Rhysopus nigricans*

150 m³ térfogatban

Katabolit represszió, glükóz, laktóz és a Glu is fékez - emiatt a glükóz után keményítő és/vagy dextrin adagolás - egyben induktor is.

Felhasználás: glükóz gyártás



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

17

α-AMILÁZ

Rátáplálásos szakaszos fermentáció, 100–150 m³ térfogatban

Katabolit represszió, emiatt a glükóz után a rátáplálásban keményítő a C-forrás – egyben induktor is.

Felhasználás:

- glükóz gyártás
- sörgyártás
- írtelenítés (a textiliparban a szálakat keményítő bevonattal védik, később ezt emésztik le az enzimmel)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

15

PULLULANÁZ

Pullulanáz, „debranching enzyme”

A név eredete: a *Pullularia pullulans* tartalék tápanyaga a pullulán, ami (1-6) kötésekkal polimerizált glükóz. Ezt mobilizálja a pullulanáz.

Ma már *Aerobacter aerogenes* (néha *Pseudomonas*) törzsszel termelik.

Eredetileg induktív volt (pullulán, izomaltóz), de ma már konstitutív mutánsokkal termelik.

Felhasználása: keményítő hidrolízis
határdextrinek bontása



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

18

GLÜKÓZ Gyártás

A hidrolízis mértékét általában a dextróz egyenértékkel (DE) jellemzik.

A keményítő molekula minden hasításánál két láncvég, egy redukáló és egy nem-redukáló vég jön létre.

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

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

Keményítő: DE = 0%

Maltóz: DE = 50%

Glükóz: DE = 100%



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

19

GLÜKÓZ Gyártás

A gyártók több enzimet tartalmazó, közös optimumú elegyet forgalmaznak. Dextrozyme: amiloglukozidáz + pullulanáz.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

22

GLÜKÓZ Gyártás

Két lépéses folyamat.

Előbb *B. licheniformis* α-amilázzal 95-105 fokon elfolyósítják az elcsirizésített keményítőt.

Körülmények: pH=6,0-6,5; kb. 1-3 óra, Ca²⁺ ion szükséges. Dextrinek, oligoszacharidok keletkeznek.

A második lépésben ezeket *Asp. niger* eredetű amiloglukozidázzal kezelik.

Körülmények: pH=4,2, t ~65 fok, kb. 18-72 óra
Szabad glükóz keletkezik.

Ebben a lépésben gyakran adnak pullulanázt is.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

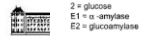
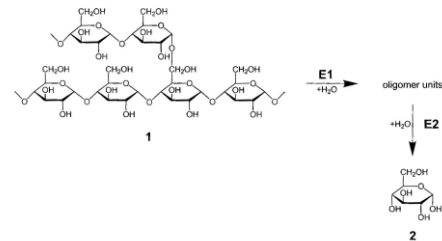
20

GLÜKÓZ Gyártás

α-Amylase / Amyloglucosidase

Bacillus licheniformis / *Aspergillus niger*

EC 3.2.1.1/3.2.1.3



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

23

GLÜKÓZ Gyártás

A gyártók több enzimet tartalmazó, közös optimumú elegyet forgalmaznak. Pl.:

Dextrozyme: amiloglukozidáz + pullulanáz.

Termamyl BrewQ: termofil α-amiláz, sörfőzéshez.

Ceremix Plus: β-glükánázt, xilanázt, α-amilázt és proteázt tartalmazó enzim készítmény

Ultraflo Max: β-glükánázt és arabinoxilanázt tartalmaz



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

21

GLÜKÓZ Gyártás KUKORICÁBÓL

1. A kukorica előkezelése: savas áztatás (SO₂), sok vízzeloldható anyag kioldódik → bepárolva: „kukorica lekvár”, N-tartalmú tápoldat- és takarmány-komponens.
2. Nedves őrlés, keményítőtej kimosása.
3. Folyósítás: +enzim, két lépésben
4. Cukrosítás: +enzim, hosszabb ideig
5. Szűrés
6. (néha koncentráció, ritkán kristályosítás)

Folytonosításra törekednek minden lépésben

A kihazatal és a tisztaság a nyersanyagtól függ, 90-99%
Kapacitás: > 10 Mt/év



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

24

GLÜKÓZ GYÁRTÁS KUKORICÁBÓL

The diagram illustrates the production of glucose from corn starch. It starts with starch, which is treated with SO₂ and then goes through a centrifuge to separate oil, germ, bran, and fiber. The remaining starch is then processed in two stages: 1. liquefaction at 105-115°C and pH=6, and 2. saccharification at 90-95°C. The final product is glucose, with a chemical structure shown below. A second structure shows fructose, which is also produced from the same process.

25

GLÜKÓZ- (XILÓZ-) IZOMERÁZ

Több mikroorganizmussal is termelik:

Trade name	Microorganism	Company	Country
Sweetzyme	<i>Bacillus coagulans</i>	Novo-Nordisk	Denmark
Maxazyme	<i>Actinoplanes missouriensis</i>	Gist-Brocades	The Netherlands
Optisweet	<i>Streptomyces rubiginosus</i>	Miles Kali-Chemie	Germany
Sweetase	<i>Streptomyces phaeochromogenes</i>	Nagase	Japan

Eredetileg induktív enzim, de ma már konstitutív mutánsokat használnak.
Intracelluláris enzim, nehéz kinyerni, ezért immobilizált sejt formában használják.

28

GLÜKÓZ GYÁRTÁS KUKORICÁBÓL

The diagram shows a detailed process for glucose production. It starts with starch water (30-35% dry matter, pH = 4.5-4, 0.4-0.5 kg) which is treated with steam in a jet cooker. The process then moves through several stages of heating and processing, including a steam jacket and a 95°C (203°F) / 2 hours stage, before going to saccharification.

26

„IZOCUKOR” (HFCS) GYÁRTÁS

1. A glükóz szirupot előtte alaposan meg kell tisztítani (szűrés, aktív szén, ioncsere).
2. Immobilizált sejteket alkalmaznak oszlopokban, az oszlopok hatékonyságát folyamatosan mérik.
3. Élettartam: $t_{1/2} = 100-600$ nap, de -12,5% után cserélik
4. Termék: nem egyensúlyi összetételű, G:F = 53:42, mert le kell rövidíteni a kontaktidőt (melléktermékek).
5. Kromatográfiával (ioncsere és kizárás egyszerre) a fruktóz-tartalmat fel lehet emelni.
6. Nem kristályosítják, csak koncentrálják=HFCS, izoszörp

Termelés: ~7 Mt/év Magyarország: Szabadegyháza
Felhasználás: édes-, tej- és sütőipar, italok

29

GLÜKÓZ- (XILÓZ-) IZOMERÁZ

Eredetileg xilóz izomeráz, de a glükózt is izomerizálja fruktózzá.

Xylose isomerase
Bacillus coagulans/*Streptomyces rubiginosus*/*Streptomyces phaeochromogenes* EC 5.3.1.5

C1(C(C(C(C(O1)O)O)O)O)O
1 = glucose

C1(C(C(C(C(O1)O)O)O)O)O
2 = fructose

Novo-Nordisk
Gist-brocades
Miles Kali-Chemie
Finnsugar
Nagase

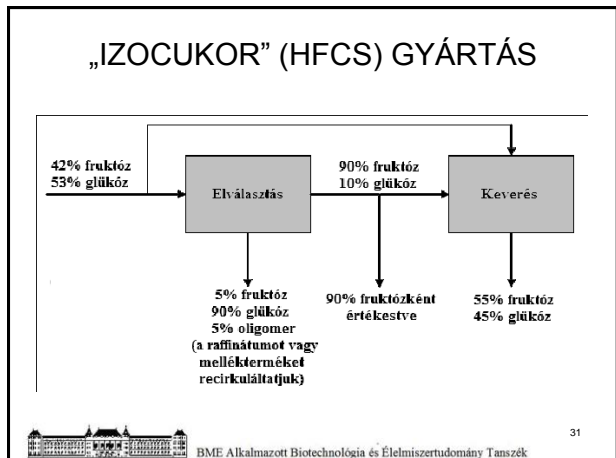
Elméleti egyensúlyi konverzió: GL : FR = 50 : 50, ennél jobb nem érhető el. Gyakorlatban 53 : 42 +melléktermékek.
(Édesség: glükóz : szacharóz : fruktóz = 0,6 : 1 : 1,5)
Körülmények: pH: 7,5–8,0 T: 50–60 fok Co²⁺ és Ca²⁺ ion

27

„IZOCUKOR” (HFCS) GYÁRTÁS

The diagram shows the production of HFCS. It starts with a glucose solution that is purified and then treated with Na₂CO₃. The solution then goes through heat exchange and deaeration. It is then processed through a series of ion exchange columns (anion and cation) and a membrane separator. The final product is HFCS, with a chemical structure shown below.

28



PEKTINÁZ(OK)

Több enzim:
Endo- és exopektinázok, észterázok (metanolt szabadít fel)

The diagram shows the hydrolysis of a pectin chain (poligalakturonázok) with the release of water (H₂O) to form galacturonic acid units.

Törzsek: *Asp. niger*, *Rhizopus*, *Botrytis cinerea*
Alkalmazás: gyümölcsleípar (léhozam növelés, derítés)
olivaolaj kinyerése
borászat: préselésnél a musthozam javítása

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 34

PEKTINÁZ(OK)

Pektin: poli-galakturonsav metilésztere:

The diagram shows the chemical structure of pectin, a polysaccharide composed of galacturonic acid units linked by 1-4 glycosidic bonds, with methyl ester groups attached to the galacturonic acid units.

Gyümölcsökben előforduló gélesítő anyag.
Miért kell elbontani?
Mert sok vizet/folyadékot tart vissza a gyümölcs húsában.
Ez lekvárnál előny, de a gyümölcsle préselésénél hátrány.

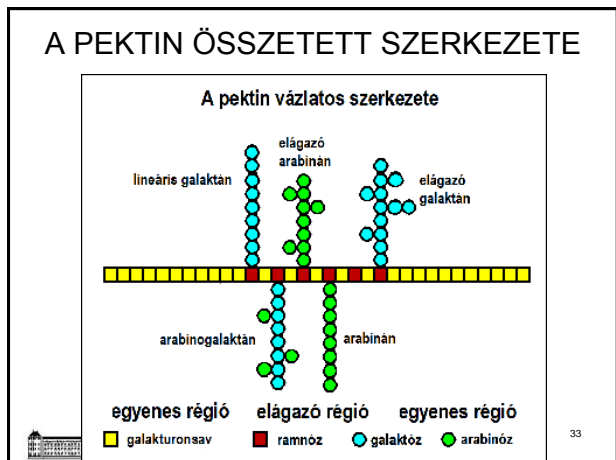
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 32

β-GALAKTOZIDÁZ

enzim a galaktóz β térállású glikozidos kötését hidrolizálja.
Leggyakoribb szubsztrátja a tejcukor (laktóz), amely galaktóz(1→4)glükóz diszacharid, amely a hidrolízis során galaktózra és glükózra bomlik.

The diagram shows the hydrolysis of lactose (a disaccharide of galactose and glucose) by the enzyme lactase, resulting in the release of galactose and glucose.

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 35



β-GALAKTOZIDÁZ

Termelő törzsek:

E. coli: (lac operon, Nobel díj) – iparilag érdektelen

Aspergillus niger: extracelluláris, olcsó, T_{opt} ~55 fok
de: pH optimum: ~4,5 – tejben nem alkalmazható, inkább tejsavónál

Kluyveromyces lactis (élesztő): pH optimum: 6-7, alkalmas,
de: intracelluláris, T_{opt} ~35 fok

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 36

β-GALAKTOZIDÁZ

Az enzimes laktóz hidrolízis alkalmazásai:

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

Oka : laktóz intolerancia. A csecsemők kb. 3 éves korig jól emésztik az anyatej laktóz tartalmát (~ 7,5%). E kor fölött az emberek egy részénél az enzimtermelés megszűnik (genetikai ok). A tejcukor bontatlanul a vastagbélbe jut, és megakadályozza a vízleadást → hasmenés

Ráadásul a bélmikroflóra elemesztí a laktózt → (CO₂ + savak) → gáztermelés együtt: explosív diarrhea

Az intolerancia előfordulása a nagyraszokban eltérő:

Kaukázusi: 5 – 15 %

Negrid, mongolid: 80 – 90 %



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

37

β-GALAKTOZIDÁZ

2. Élelmiszeriparban:

Édesség, stabilitás javítása:

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

Édesítő értékek aránya:

laktóz : galaktóz : glükóz = 20 : 58 : 70

Fermentált tejtermékeknél a folyamat gyorsítása

3. Savó (sajtgyári melléktermék) laktózáinak hidrolízise

- takarmány
- tápszert
- élelmiszer adalék



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

38

β-GALAKTOZIDÁZ

Enzimes technológiák:

1. Tejben:

Szakaszos eljárás (mert a folytonosnál nagyobb a befertőzödés veszélye): élesztő enzimmel, 35 °C-on, 4 órán keresztül → 70-80%-os konverzió. Az enzimet benne hagyják, UHT sterilizációval inaktíválják,

2. Savóban:

Immobilizált enzimes eljárás: inkább penész enzimmel, az alacsonyabb pH valamennyire véd a befertőzödéstől.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

39