

IPARI ENZIMEK

Történelem, mérföldkövek

- Ősrégi: borjúgyomor – tejalvasztó 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

IPARI ENZIMEK

Történelem, mérföldkövek

- 1969 Enzimek és sejtek immobilizálása
1969 DL-Met resolválása, 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 enzim, www.expasy.ch
Brenda



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

ENZIMEK ALKALMAZÁSAI

Ipar: 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: restrikciós endonukleázok, reverz transzkriptáz, DNS-ligáz, DNS polimeráz,

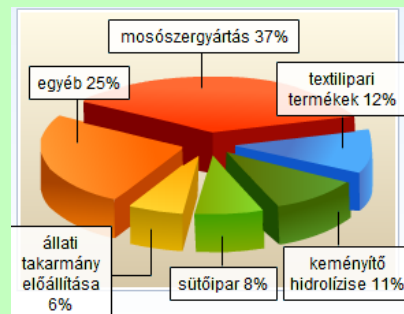
Mi itt az ipari enzimekkel foglalkozunk.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

3

MEGOSZLÁS IPARÁGAK SZERINT



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

4

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5

IPARI ENZIMEK FORRÁSAI

Állati szövetek:

emésztőcsatorna emésztőenzimei: 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 TERMELÉSE

Anyagcsere: egyetlen fehérjét kell termelni nagy mennyiségben.

Szabályozások: néhány konstitutív enzimtől eltekintve ezek induktív 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, glicerin, ..)
- glükóz adagolással limitben tartani
- szabályozási mutánsok keresése



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

7

IPARI ENZIMEK TERMELÉSE

Tenyésztés általános jellemzői:

Felületi: még előfordul – tálca, 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

IPARI ENZIMEK TERMELÉSE

Feldolgozás jellemző műveletei:

Extracelluláris – intracelluláris enzimek (**sejtfeltárás**)

(a cél az extracelluláris, pl. génmanipulációval egy szignálpeptidet kapcsolni 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 enzimeknek, ezért gyakran inkább oldatban hozzák forgalomba (stabilizálás)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

9

AMILÁZOK

Keményítóbontó 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

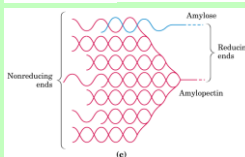
A KEMÉNYÍTŐ SZERKEZETE

amilóz

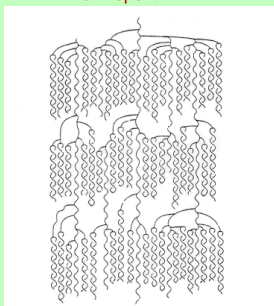


A jód-keményítő színe a polimerizáció fokától függően:

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



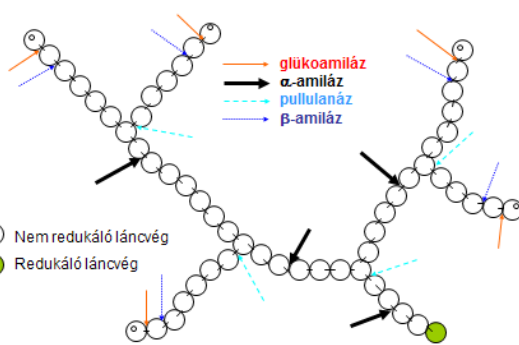
amilopektin

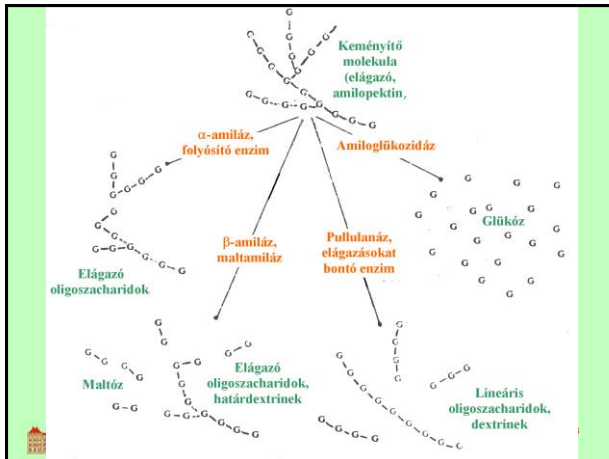


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

11

AMILÁZOK





α-AMILÁZ

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

Sok mikroba termeli, extracelluláris, Ca^{2+} 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

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

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:

- sörcéfrézés és gabonaszesz gyártás
- maltóz szirup előállítása keményítőből (ez a cukorszirup nem karamellizálódik)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

16

AMILOGLÜKOZIDÁZ

Amiloglükózidáz, 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

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 általánosan 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

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 amiloglikozidázzal 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

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

Dextrozyme: amiloglikozidáz + 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

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

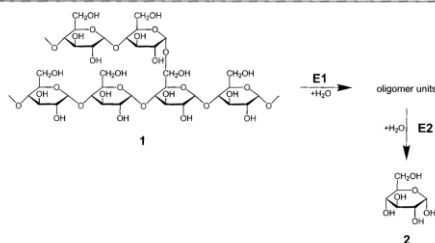
22

GLÜKÓZ Gyártás

α -Amylase / Amyloglucosidase

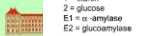
Bacillus licheniformis / *Aspergillus niger*

EC 3.2.1.1/3.2.1.3



1 = starch
2 = glucose
E1 = α -amylase
E2 = glucoamylase

Several companies



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

23

GLÜKÓZ Gyártás KUKORICÁBÓL

1. A kukorica előkezelése: savas áztatás (SO₂), sok vízoldható 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%

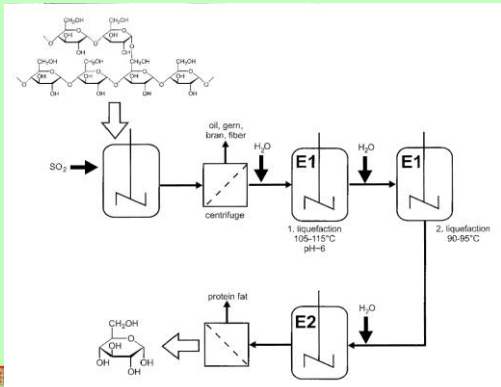
Kapacitás: > 10 Mt/év



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

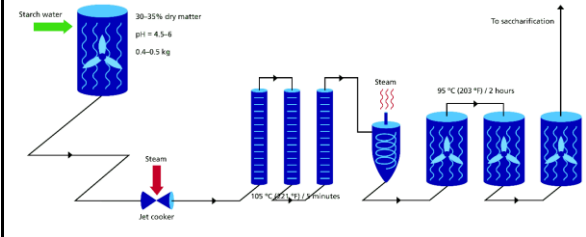
24

GLÜKÓZ Gyártás kukoricából



25

GLÜKÓZ Gyártás kukoricából



26

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

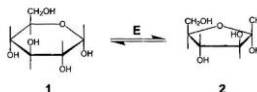
GLÜKÓZ- (XILÓZ-) IZOMERÁZ

Eredetileg xilóz izomeráz, de a glükózt is izomerizálja fruktózá.

Xylose isomerase

Bacillus coagulans/*Streptomyces rubiginosus*/*Streptomyces phaeochromogenes*

EC 5.3.1.5

1 = glucose
2 = fructose

Novo-Nordisk
Gist-brocades
Miles Kall-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 Co^{2+} és Ca^{2+} ion

27

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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 Kall-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

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

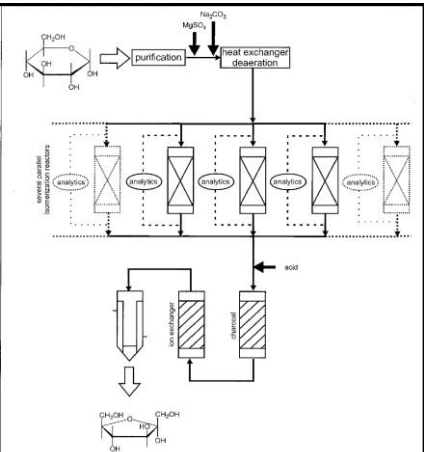
„IZOCUKOR” (HFCS) Gyártás

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 kristályosítható, csak koncentrálnak=HFCS, izoszörp
- Termelés: ~7 Mt/év Magyarország: Szabadegyháza
Felhasználás: édes-, tej- és sütőipar, italok

29

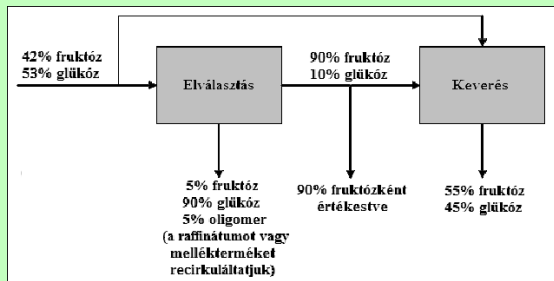
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

„IZOCUKOR” (HFCS) Gyártás



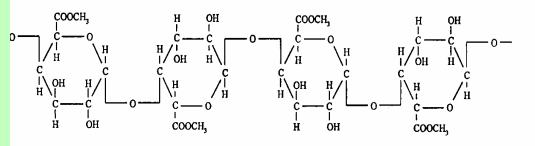
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

„IZOCUKOR” (HFCS) Gyártás



PEKTINÁZ(OK)

Pektin: poli-galakturonsav metilésztere:



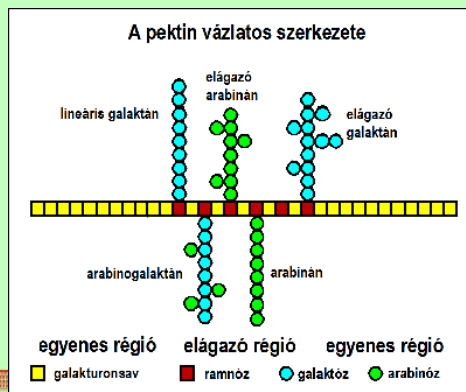
Gyümölcsökben előforduló gélesítő anyag.

Miért kell elbontani?

Mert sok vizet/folyadékot tart vissza a gyümölcs húsában. Ez lekvárnál előny, de a gyümölcslé préselésénél hátrány.



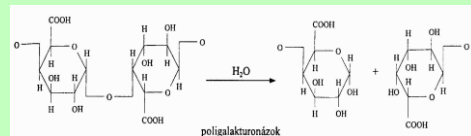
A PEKTIN ÖSSZETETT SZERKEZETE



PEKTINÁZ(OK)

Több enzim:

Endo- és exopektinázok, észterázok (metanolt szabadít fel)



Törzsek: *Asp. niger*, *Rhizopus*, *Botrytis cinerea*

Alkalmazás: gyümölcsléipar (léhozam növelés, derítés)

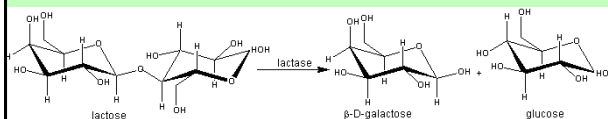
olivaolaj kinyerése

borászat: préselésnél a musthozam javítása



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.



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 – tejből nem alkalmazható, inkább tejsavonál

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



β -GALAKTOZIDÁZ

Az enzim laktóz hidrolízis alkalmazásai:

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

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 elemésztí a laktózt → (CO₂ + savak) → gáztermelés együtt: explosív diarrhea

Az intolerancia előfordulása a nagyrasszokban 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 tejtermékeknel a folyamat gyorsítása

3. Savó (sajtgyári melléktermék) laktózának hidrolízise

- takarmány
- tápszer
- élelmiszer adalék



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

38

β -GALAKTOZIDÁZ

Enzim technológiák:

1. Tejben:

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

2. Savóban:

Immobilizált enzim eljárás: inkább penész enzimmel, az alacsonyabb pH valamennyire véd a befertőződéstől.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

39