



## Általános alkalmazott enzimológiai ismeretek

Dr. Fehér Csaba  
BME ABÉT  
Biofinomító Kutatócsoport



## Mezőgazdasági iparok technológiája

- Keményítőipar
  - Mikrobiális enzimek
  - Amilázok
  - Oldott és rögzített enzimek
- Söripar
  - Növényi enzimek, maláta
- Szeszípar
  - Nyersanyag előkészítés (hidrolízis), amilázok, cellulázok, hemicellulázok
- Cukoripar
  - Dextranázok (Leuconostoc mesenteroides dextránt szintetizál a szacharózból)



2



## Történeti áttekintés - ipari enzimek

- **1915-ben:** Mosószerrekebe **tripszin** hatású enzimet tesznek.
- **1969-ben:** Az NSZK-ban az összes **mosószer**ek 80%-a tartalmazott enzimet, főleg **proteázokat**, de kísérletképpen: *lipázokat, amilázokat, pektinázokat, oxidoreduktázokat.*
- **1971-ben:** Rengeteg **allergiás panasz**, csökkentik a proteázok mennyiségét a mosóporokban, granulálják (porzás elkerülése)
- **Manapság** a mosószerreke 80-85 %-a tartalmaz enzimeket.



3



## Történeti áttekintés - ipari enzimek

- **1970 óta:** **Glükóz izomeráz** nagyipari felhasználás  **$\alpha$ -amilázzal** és **amiloglükozidázzal** együtt (Keményítőből izocukor előállítás)
- **1965 óta** mikrobiális úton előállított **rennin** (*Mucor miehei*)
- **Pektinázok** a gyümölcsleógyártó iparban egyre nagyobb jelentőségre tesznek szert (*Aspergillus niger, Aspergillus wentii*)
- **Lipázok**, mind gomba eredetűeket (*Aspergillus, Mucor, Geotrichum* családokból), mind bakteriális eredetűeket az emésztés segítésére (gyógyszerekben)
- **Penicillin acilázok:** a mikrobiális úton előállított penicillin G-ből penicillin előállítás
- **Laktázok** tejcukor lebontására



4



## Az enzimek felhasználás megoszlása

Az összes használt enzim minimum **75%-a hidrolitikus enzim**

**Proteázok:** legnagyobb mennyiségben alkalmazott enzimek (kb.40%) a **tejiparban** (koaguláló szerek), valamint a **mosószeriparban**

**Szénhidrátbontó enzimek:** a második legnagyobb %-ban alkalmazott enzimekcsoport: **sütőipar, szeszípar, keményítőipar, textilipar**



5



## Enzimek - alapok

Az enzimek biológiai rendszerekben (élő szervezetekben) szintetizálódnak és kémiai reakciókat katalizálnak.

- Egyrészt az **élő szervezetekben** a sejtek működéséhez szükséges anyagátalakításokat és energiatermelő folyamatokat gyorsítják
- Másrészt az **ipari technológiákban** különböző technológiai lépések reakcióját gyorsítják.

- Csak a **termodinamikailag lehetséges** folyamatokat katalizálják, a kémiai reakció **egyensúlyát nem változtatják** meg, az egyensúlyt tehát nem változik meg, csak az idő, ami alatt az egyensúlyt elérjük.
- Az enzimek csökkentik a katalizált reakció aktiválási energiáját.
- Az enzimek **mindkét irányú reakciót** katalizálják, (reverziós termékek keletkeznek).



6



## Enzimek - alapok

Az enzimek katalitikus hatása óriási:



Enzim: karboanhidráz

Egyetlen enzimmolekula hatására  $10^5$  mol  $\text{CO}_2$  hidratálódik másodpercenként. A sebesség  $10^7$ -szer nagyobb, mint a katalizálatlan reakció sebessége.

Glükózid kötés hidrolízise  $25^\circ\text{C}$ -on 1 mol katalizátor koncentráció hatására  $10^8$ -szor gyorsabban játszódik le az enzim (glükózidáz) jelenlétében, mint HCl katalízissel.



7



## Hogyan mérjük az enzimek mennyiségét?

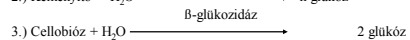
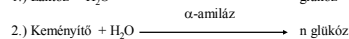
Enzimaktivitás, az enzimek legfontosabb tulajdonsága

IUPAC 1 enzimegység/ml (Ee/ml):

1 ml enzimoldat

1  $\mu\text{mol}$  termék képződését katalizálja

1 perc alatt



Enzim aktivitás meghatározásához definiálni kell a **körülményeket**:

Reakció, szubsztrát/termék alapú-e az aktivitás, hőmérséklet, pH, (idő)



8



## Az enzimek specifikitása nagyon különböző

- **SZUBTILIZIN**: bakteriális proteáz, általános, nem specifikus enzim, a peptidkötés melletti oldallanckóktól függetlenül működik
- **TRIPSZIN**: a hasnyálmirigyben termelődő tripszinogénből keletkezik, az emésztő enzimrendszer második tagja, csak akkor hasít, ha  $R_1$ : lizin, vagy arginin
- **TROMBIN**: a vér alvasztó enzime, mely a vérplazmában oldott fibrinogént kocsonyás állapotú fibrinné alakítja és ezáltal a vér alvadását idézi elő. A protrombinból keletkezik, s csak akkor hasít, ha:  $R_1$ : arginin és  $R_2$ : glücín



9



## Fogalmak az enzimszintézissel kapcsolatban

- **Indukálható enzimek**, pl.  $\beta$ -galaktozidáz *E. coli*ban glükózon 3 mol/sejt, laktózon 3000 mol/sejt. A laktóz induktor (inducer), olyan anyag, mely a táptalajba adagolva specifikusan megnöveli az illető enzim mennyiségét.
- **Represszáható enzimek**, pl. *E. coli* aminosavmentes táptalajon szaporítva megtermeli az összes aminosav szintéziséhez szükséges enzimet. Ha a táptalajba pl. hisztidint adagolunk a hisztidin szintetáz termelés megszűnik.
- **Konstitutív enzimszintézis**, amikor a regulátor gén működésképtelen represszort kódol, vagy nem is képződik represszor fehérje, vagy nem tud kapcsolódni az operátorhoz és így nem tudja megakadályozni az átírást, s az enzim szintézis korlátozás nélkül folyik.



10



## Az induktorral szembeni követelmények

- Jól indukáljon
- Ne fogyjon el a fermentáció alatt
- Ne képződjön belőle olyan anyag, ami katabolizt repressziót okozhat

### Lehetőségek:

- A szubsztrát ill. szénforrás maga (a gond, hogy elfogy)
- Szubsztrát analóg pl.  $\text{O} \rightarrow \text{S}$  csere laktóz  $\rightarrow$  tiolaktóz, vagy kötésváltoztatás: cellobióz  $\rightarrow$  szoforóz ( $\beta$ -1-4  $\rightarrow$   $\beta$ -1-2 csere)
- Kemosztát fermentáció
- Az inducer folyamatosan képződik a fermentáció alatt, pl. cellulózon történő szaporításakor a cellobióz



11



## Az ipari enzimek eredete

- Növényi (mg-i iparok: sörgyártásnál maláta)
- Állati (oltóenzim)
- **Mikrobiológiai** - egyre növekvő jelentőség (mg-i iparok: szeszipar, keményítőipar)

Az enzimek ipari alkalmazásával egyidejűen szükséges volt az ipari léptékű enzimmelállítás megoldására is.



12



## Enzimfermentáció fajtái

Lényeges jellemzők a hozam (Ee/g szénforrás) és a produktivitás (Ee/l/óra)

- Aerob
- Anaerob
- Szilárd fázisú
- Félszilárd fázisú
- Folyadék fázisú (sülyesztett)
- Szakasos (batch)
- Rátáplálásos (fed-batch)
- Folytonos



13



## Az enzimtermelés lehet:

- Intracelluláris
- Extracelluláris

Az **intracelluláris** enzimkészítményeket felhasználhatják:

- Sejthez kötve
- Sejtből kivonva és elválasztva sejtmentes extraktként

Az **extracelluláris** enzimeket felhasználhatják:

- A mikrobátömeg elválasztása után **fermentlé felüliszóként**
- **Sűrítményként** (fermentlé felüliszó besűrítésével nyerik)
- Kicsapással, vagy szárítással nyert **szilárd enzim készítményként**
- **Frakcionálás, tisztítás után** nyert enzimkészítmény formájában
- **Immobilizálva** (tisztítás után)



14



## Enzimmtisztítás, enzimfrakcionálás

Folyadékfázis tisztítása:

(extracelluláris enzimtermelésnél, vagy sejtfeltárás után a sejtek /sejttörmelék eltávolításakor nyert felüliszó):

- oldhatóság
- tömeg/méret
- töltés
- specifikus tulajdonságok alapján



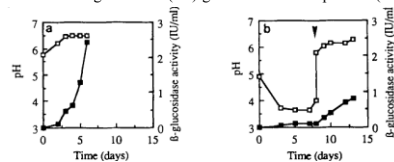
15



## Aspergillus phoenicis béta-glükozidáz termelése

- Táptalaj pH-ja határozza meg, hogy a szintetizálódott béta-glükozidáz megjelenik-e a fermentlében

extracelluláris béta-glükozidáz (teli) görbék különböző pH-kon (üres)



- „in situ” immobilizált enzimkészítmény



16



## Szekerációs mechanizmus

Prokariotáknál: (Baktériumok)

- 30 aminosavból álló hidrofób oldalláncokból álló lánc szintetizálódik és kötődik az enzimfehérjéhez (alanin, valin, leucin, prolin, fenilalanin, triptofán, metionin)
- ez a lánc viszi át a szintetizált enzimfehérjét a sejtmembránra
- amikor az enzimfehérje kijutott a fermentlébe, s a lánc még a membránban van, leszakad róla, és újabb enzimfehérjét visz át a sejtmembránra

Eukariotáknál (élesztők, gombák)

eddig **nem figyeltek meg a baktériumokéhoz hasonló szekerációs mechanizmust**, a mikrobák autolízisével hozható összefüggésbe az enzimek megjelenése a fermentlében. Adott mikroorganizmuson belül is nagyon különböző lehet ld. *Aspergillus phoenicis*  $\beta$ -glükozidáz kiválasztása: f (pH)



17



## Enzimfermentáció

➢ táptalajösszetétel:

- szénforrás (glükóz, hidrol, melasz, maláta kivonat, tejsavó, metanol, cellulóz, szulfitszennylég)
- nitrogénforrás ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ , karbamid, műtrágyák, kukoricaalekvár, élesztőextrakt, pepton)
- **csapvíz+sók**
- habzásgátló

➢ sterilizálás

➢ hőfokszabályozás

➢ pH szabályozás

➢ habszintszabályozás

habzás: keverős, levegőztetett - merülő sugaras (HTPJ)

- on line mérések (pH, T, ...)
- off line mérések



18



## Mérendő faktorok a fermentáció során

- Cukortartalom
- enzimaktivitás
- pH
- oldott oxigén (ökölszabály szerint aerob fermentáció esetén 30%-ot célszerű tartani)

Hozam (yield): Ee/g szénforrás  
 Produktivitás: Ee/l/h



19



## A fermentációhoz szükséges mikroba beszerzése

- különböző törzsgyűjteményekből (gond lehet, ha nem találunk megfelelőt, vagy, ha a kiválasztott mikroba szabadalmi oltalom alatt áll)
- izolálással:

- ❖ talajból  $10^6$ - $10^7$  mikroba/g
- ❖ irányított szelekcióval:

- korhadó fáról-cellulózfontók, ligninhasznosítók (celluláztermelők, difenoloxidáztermelők)
- penészes kenyérről - amiloglukozidáz termelők
- keményítőüzem szennyvizéből:  $\alpha$ -amiláz termelőket
- hőforrásokból termotoleráns, vagy termofil mikroorganizmusokat lehetőleg nagy hőfok optimumú enzimekkel
- sós mocsarakból: nagy só koncentrációt tűró mikrobákat



20



## Leoltás - Dúsítás

- Komplet taptalajra
- Kiválasztott cél taptalajra (olyan körülményeket biztosítunk, amit szeretnénk majd használni)
- Ha csak kis koncentrációban van a keresett mikroorganizmus: DÚSÍTÁS

*példa:* Balatonfüzűi Nitrokémia szennyvizéből olyan mikrobát kellett izolálni, mely **akrilitrilhidrát** és **amidáz** aktivitással is rendelkezik

Dúsítás rázatott lombikokban: **0.008 g/l akrilitril** koncentráció mellett 0.5 g/l glükóz, pepton, foszfát,  $MgSO_4$  tartalmú taptalajjal helyettesítettük a dekantált felülzót, naponta friss taptalajt adagoltunk.

akrilitril koncentráció:

1. héten: 0.008 g/l

2. héten: 0.016 g/l

3. héten: 0.04 g/l, 1 hónap után a glükózt elhagytuk **akrilitril volt a kizárólagos szén és nitrogén forrás**, további 2 hét szoktatás, majd azonos taptalaj szilárdított változatára szélesítettük a tenyészetet

**IK4 izolátum** rendelkezett a kívánt tulajdonságokkal



21



## Enzim tisztítási és elválasztási lehetőségek

*Példa:* Balatonfüzűn a szennyviziszapból nyert **IK4** izolátum termelt:

**Akrilitril hidrát** és **amidáz** is, s olyan enzimekiztményre volt szükség, mely amidázt nem tartalmaz.

Akrilitril  $\longrightarrow$  **akrilamid**  $\longrightarrow$  akrilsav

Mutációs kezelés (UV besugárzás) után szelekción olyan taptalajon, melyben az agarlemez **fluoracetamidot** is tartalmaz. Az amidáz+ telepek mellett képződő fluorecetsav azonnal megöli az amidáz+ telepek mikrobáit, a túlélő telepek **amidáz negatív mutánsok lesznek**.

**Nagyipari enzimfelhasználás:** amiloglukozidáz, amennyiben az enzimkészítmény glükózoxidázzal, vagy transzglükózidázzal szennyezett, nem a fermentlé frakcionálásával foglalkozunk, hanem az **Aspergillus niger törzsjavításával**, annak érdekében, hogy ne termeljen ilyen enzimeket.



23



## Enzimek alkalmazása

Ahhoz, hogy az **enzimek az iparban hasznosíthatóak legyenek**, olyan termékek előállításában kell, hogy közreműködjenek, melyek a következő tulajdonságok valamelyikével rendelkeznek:

- Jobb minőségű, mint a tradicionális termék
- Jobban felhasználható
- Olcsóbb
- Enzimek nélkül nem is lehetne előállítani

**Versenyképesség lényeges!** Kristálycukor - izocukor 1970-es évek közepétől az izocukor versenyképes (amílázok árobbanása)



24



## Enzimek alkalmazásának környezeti hatásai

Bár az enzimek enyhe reakciókörülményeket tesznek lehetővé, alkalmazásuknak vannak egyeb **környezeti vonatkozásai:**

- Előállításuk **ipari fermentációban** történik:
  - Gyakran intenzív **levegőztetésre** van szüksége, és a kompresszorok **sok villamosenergiát** igényelnek
  - C, N stb. **forrás** igény, melynek **előállítása is energiát igényel** Pl. a N-t nitrát só formájában adva gyakorlatilag műtrágya felhasználást jelent, és a műtrágyagyártás is energiaigényes folyamat
- **Rendszerszemlélet** szükséges annak eldöntésére, hogy tényleg kisebb környezetterhelést jelent-e az enzimes technológia
- **Életciklus elemzéssel** vizsgálható



25



## Enzimek alkalmazásának környezeti hatásai

Journal of Cleaner Production 42 (2013) 228–240

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Cleaner Production

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jclepro



Review

### Environmental assessment of enzyme use in industrial production – a literature review

Kenthorai Raman Jegannathan<sup>a</sup>, Per Henning Nielsen<sup>b,\*</sup>

Konklúzió: az enzimes technológiák – összehasonlítva a konvencionális megfelelőjükkel – kisebb mértékben járulnak hozzá az üvegházhatáshoz, az ökoszisztémák savasodásához, az eutrofizációhoz és a fotokémiai ózontképződéshez



26



## Az enzimek felhasználása

- **Oldott állapotban**
- **Rögzített (immobilizált) készítményként**

### Oldott enzimmel végzett katalízis:

amikor a termék koncentráció eléri a kívánt értéket, a reakciót leállítjuk, s a reakcióelegyet az igényeink szerint feldolgozzuk

- kinyerjük a terméket
- inaktíváljuk az enzimet
- bekonzentrálnak a terméket
- ha szükséges, továbbalakítjuk a terméket

Ebben az esetben **többnyire nem használjuk fel újra az enzimet**, habár vízoldható termék és szubsztrát esetén, amennyiben a termék molekula és az enzimmolekula mérete eléggé különböző, elvileg visszanyerhető az enzim pl. ultraszűréssel



27



## Rögzített enzimmel végzett katalízis

**Definíció:** rögzített enzimmről beszélünk, ha az enzimmolekula **fizikai módon elválasztható** fázisban lesz a reakcióelegy többi részétől.

Lényeges különbség az oldott enzimmel végzett reakcióhoz képest, hogy a **reakció végén** az enzimet szűréssel, centrifugálással (**egyszerű mechanikai művelettel**) el lehet választani a terméktől. A **TERMÉK** tisztán (enzimmentesen) kinyerhető, az **ENZIM** pedig újrafelhasználható.



28



## Immobilizált enzimek története

- **1960-as évek: csúcs az immobilizálásban**, a laboratóriumi immobilizálásokkal foglalkozó tudományos cikkek száma több száz évente.
- **1969-ben** megjelennek az első **félüzemi** berendezések, **penicillin aciláz**, **glükóz izomeráz**
- **1970-es évek:** további méretnövelési kísérletek,
  - ◊ ipari megvalósítás:
    - ◊ glükóz izomeráz,
    - ◊  $\beta$ -galaktozidáz,
  - ◊ további félüzemek:
    - ◊ 6-féle glükóz izomeráz,
    - ◊ 2-féle penicilli naciláz,
    - ◊ aszpartáz,
    - ◊ aminoaciláz,
    - ◊ laktáz
- **1981:** további félüzemek az előző enzimmekkel, más-más eredet, más-más rögzítési mód
- **IPARI MEGVALÓSÍTÁS:** továbbra is csak a **glükóz izomeráz** és a  **$\beta$ -galaktozidáz**

Kezdetben nagyon lelkes hangulatban mindenféle enzimek rögzítéséről beszámoltak, később már a gazdaságossági szempontokat is figyelembe vették.



29



## Rögzített enzimek: előnyök és hátrányok

### A rögzített enzimek előnyei:

- Egyszerű fizikai elválasztás után **többször felhasználhatók**
- általában **stabilabbak**, mint az oldott enzimek
- **folytos rendszerekben** jól alkalmazhatók (immobilizált enzimmekkel töltött reaktorok)
- **az enzim nem szennyezi a terméket**, illetve nem kell külön gondoskodni az enzim elválasztásáról, vagy inaktíválásáról

### Az immobilizált enzimek elterjedését limitáló faktorok:

- az oldott enzimek kis ára (pl. *A.niger* eredetű amiloglükozidáz annyira olcsó, hogy nem lehet gazdaságosan immobilizálni)
- a hordozó nagy ára
- az immobilizált enzimeket felhasználó technológia bevezetéséhez szükséges beruházási költségek ára



30



## Az immobilizált enzimek gyakorlati bevezetése előtt vizsgálandó:

- **A REAKCIÓ:** a gazdaságos megvalósítás valóban csak immobilizált enzimmel lehetséges-e? (pl. a kis szubsztrát koncentráció – 5%-os tejsavó – nagy oldott enzimveszteséget jelentene)
- **A SZUBSZTRÁT:** vízoldható-e, eléggé kicsi-e a móltömege, nem várható-e erőteljes diffúziógátlás?
- **A TERMÉK:** tisztább lesz-e ezáltal a termék, vagy olcsóbban tisztítható-e, nagyobb lesz-e a hozam?
- **AZ ENZIM:** nő-e az enzim stabilitása a rögzítéssel? Gazdaságosabb lesz-e az enzimfelhasználás?
- **KONTROLL:** jobbak-e így a szabályozási lehetőségek, automatizálható-e az eljárás?
- **GYÁR:** kivitelezhető-e a technológia a meglévő létesítményben?
- **GAZDASÁGOSÁG:** az immobilizált enzim alkalmazása-e a legjobb megoldás?



31



## Mikor használjunk rögzített enzimet?

- ENZIMELEKTRÓDOK-BIOSZENZOROK
  - glükózoxidáz: glükózmérés
  - alkoholehidrogenáz: etanolmérés
  - ureáz: karbamid
- HA AZ ELJÁRÁS GAZDASÁGOSSÁGA LEHETŐVÉ TESZI AZ OLDOTT--RÖGZÍTETT CSERÉT
  - azonos tömegáram esetén kisebb gyárméret
  - kisebb terméktisztítási költségek
  - kisebb energiaköltségek
  - nagyobb produktivitás



32



## Immobilizált enzimekkel kapcsolatos fogalmak

### Enzimaktivitás meghatározása:

Az aktivitásmérést az oldott enzimeknél elmondottak szerint kell elvégezni, azzal a módosítással, hogy a reakcióeleget intenzíven keverni kell a diffúziógátlás csökkentésére

Az aktivitás kifejezhető: Ee/g sza, Ee/g nedves tömeg, Ee/cm<sup>3</sup> ágytérfogat

### A rögzítés hatásfoka:

100 Ee-ből a rögzítés után mennyit tudunk meghatározni. 20-30%-os rögzítési hatásfok már jónak minősül.

### Mi okozza az aktivitáscsökkenést?

1. A rögzítés során az enzim funkciócsoportjai reagálnak a hordozóval, vagy a keresztelőkötő ágenssel, s ezután ezek a csoportok már nem tudnak részt venni a katalízisben.
2. A rögzítés hatására szterikus gátlások keletkeznek, s a szubsztrátmolekula nem fér eléggé hozzá az enzimkomplexum megfelelő csoportjaihoz.
3. A rögzítés következtében megváltozik az enzimkomplexum mozgása



33



## Immobilizált enzimekkel kapcsolatos fogalmak

### Stabilitás

Miután az immobilizált enzimeket hosszú időn keresztül kívánjuk felhasználni, nagyon lényeges ismernünk a stabilitásukat.

A működési stabilitás (operational stability) két faktorból tevődik össze:

- Az enzim kiáramlása következtében jelentkező aktivitáscsökkenés (enzyme leakage)
- Hőinaktiválódás (fehérjék denaturálódásából fakadó aktivitásvesztés)

Az enzim kiáramlása azt jelenti, hogy a nem tökéletes rögzítés következtében a szubsztrátherelés, vagy egyszerű elújló következtében szabad (oldott) enzimkomplexumok kerülnek a reakcióelegetbe.



34



## Immobilizált enzimekkel kapcsolatos fogalmak

### Felezési idő

Az az időtartam (óra), ami alatt a kezdeti aktivitás a felére csökken le. Óriási pazarlás lenne, ha az enzimeket csak a felezési időig használnánk. Két, három felezési időig szokták használni, de tudatában kell lennünk, hogy a térfogati produktivitás állandóan csökken.

Az állandó termékösszetétel és állandó kihozatal elérése érdekében ezt figyelembe kell venni.

Általában több (különböző fázisban levő) reaktort kapcsolnak össze.



35



## Immobilizált enzimekkel kapcsolatos fogalmak

### Produktivitás:

Az adott enzim 1 grammjával mennyi termék képződését lehet katalizálni g termék/g enzim

### Térfogati produktivitás:

Adott ágytérfogat mennyi termék képződését katalizálja g termék/cm<sup>3</sup> ágytérfogat

### Diffúziógátlás:

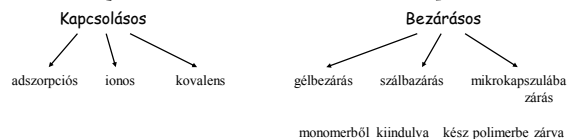
Különösen akkor válhat jelentőssé, ha az enzimkomplexumok nem a hordozó felületén, hanem a hordozó belsejében vannak rögzítve. Ekkor a szubsztrátmolekulának az ENZIMHEZ, ill. a termék-molekulának az ENZIMTŐL való transzportjéért a rögzített készítményen belüli diffúzió a felelős.



36



## Az enzimek rögzítése



- nő a rögzítés erőssége → nő a rögzítés költsége



37



---

**Köszönöm a figyelmet!**

