

IPARI ENZIMEK

Történelem, mérföldkövek

- Ősrégi: borjűgyomor – tejjalvasztó enzim, rennin
- maláta – keményítőkészítő 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



IPARI ENZIMEK

Történelem, mérföldkövek

- 1969 Enzimek és sejtek immobilizálása
- 1969 DL-Met rezolválása, 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.expaty.ch
- Brenda



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: restriktív endonukleázok, reverz transzkriptáz, DNS-ligáz, DNS polimeráz,

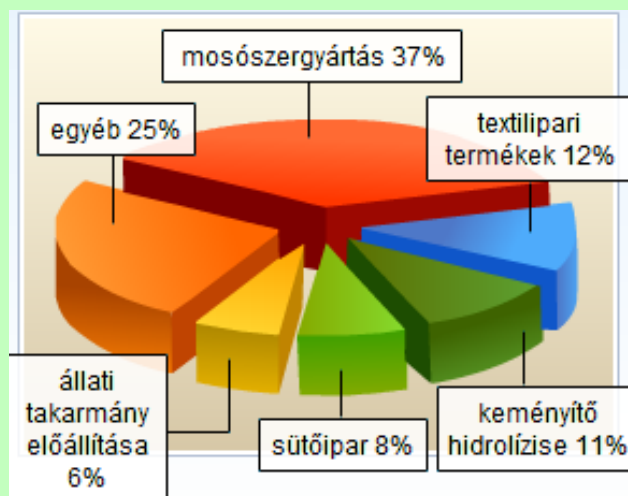
Mi itt az ipari enzimekkel foglalkozunk.



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 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

IPARI ENZIMEK FORRÁSAI

Állati szövetek:

emésztőcsatorna emésztőenzimeit: 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) lefékez 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

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% 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 kapcsolnak a fehérje elejére)

Kicsapás - kicsapás, oldószeres kicsapás (IEP)

Ultraszűrés – koncentráció, diaszűrés

Kromatográfia – ioncsere, adszorpció, 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

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.

Amiloglikozidáz, 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

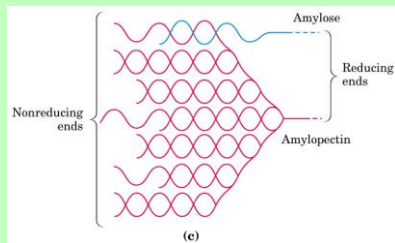
A KEMÉNYÍTŐ SZERKEZETE

amilóz

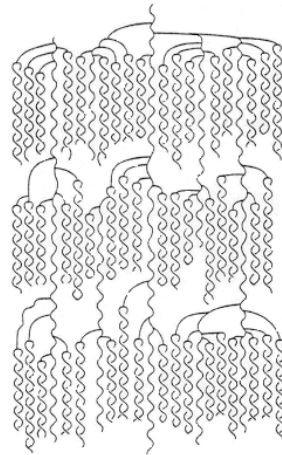


A jódkeményítő színe a polimerizáció fokától függően:

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



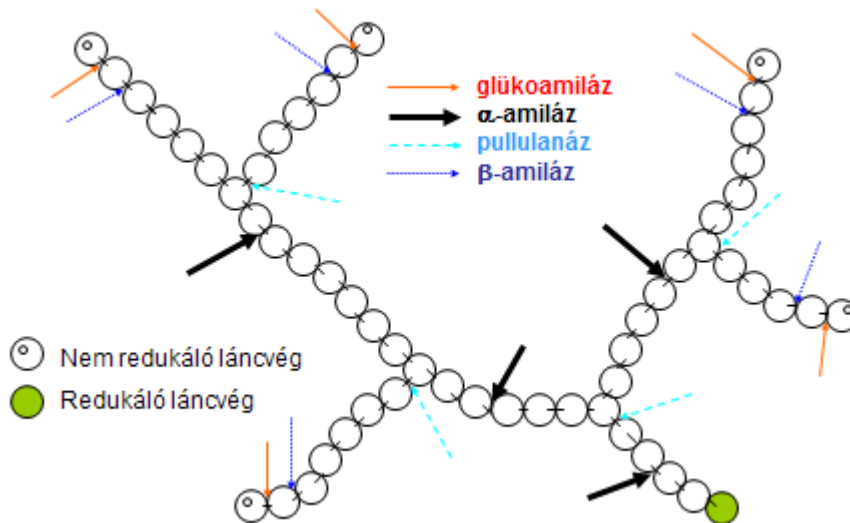
amilopektin

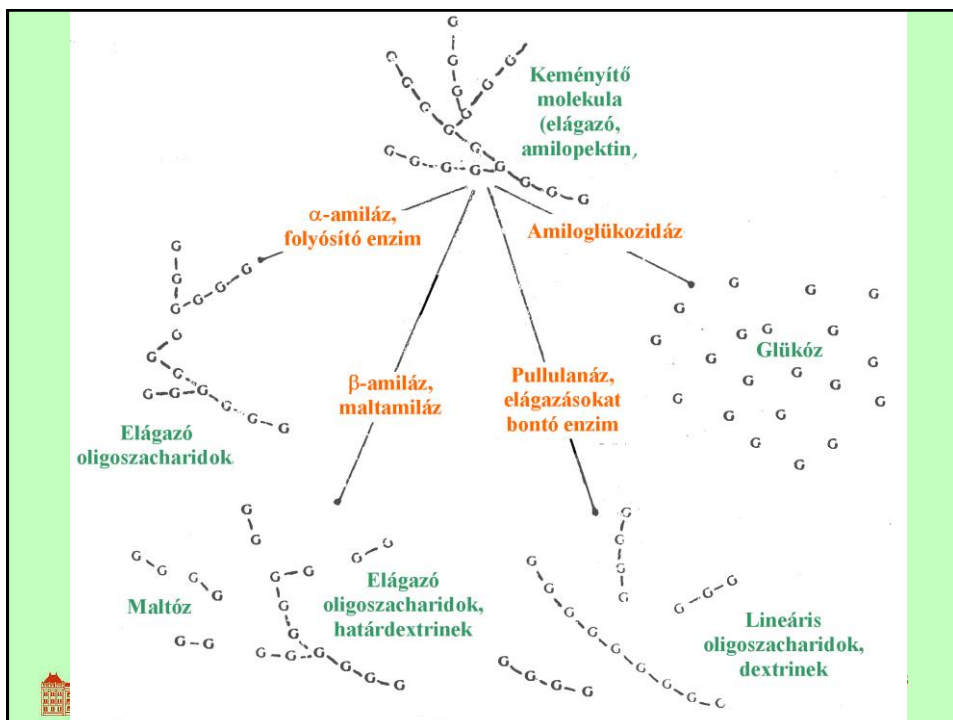


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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



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:

- sörcefrézés és gabonaszesz gyártás
- maltóz szirup előállítása keményítőtől (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) kötésekkel 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 elcsirizesített 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 elegyeket 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

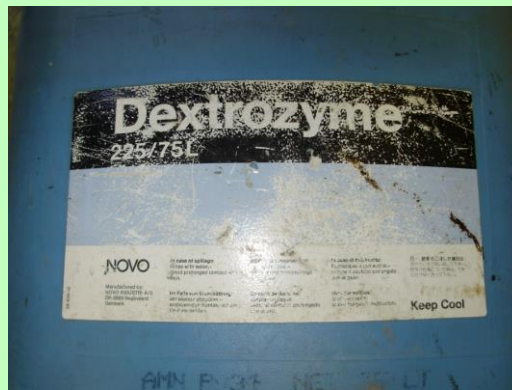


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

21

GLÜKÓZ Gyártás

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

The diagram illustrates the enzymatic breakdown of starch. Starch (1), represented as a long chain of glucose units linked by α -1,4-glycosidic bonds, is first hydrolyzed by α -amylase (E1) in the presence of water ($+H_2O$) to produce oligomer units. These oligomers are then further hydrolyzed by glucoamylase (E2) with additional water ($+H_2O$) to yield free glucose (2).

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

Several companies

23

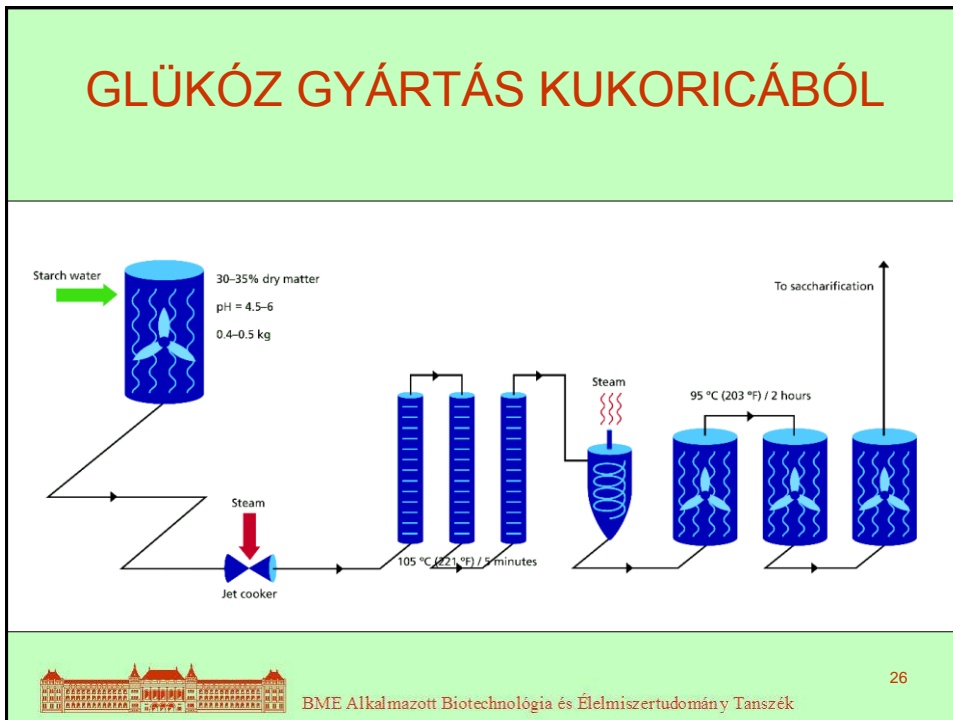
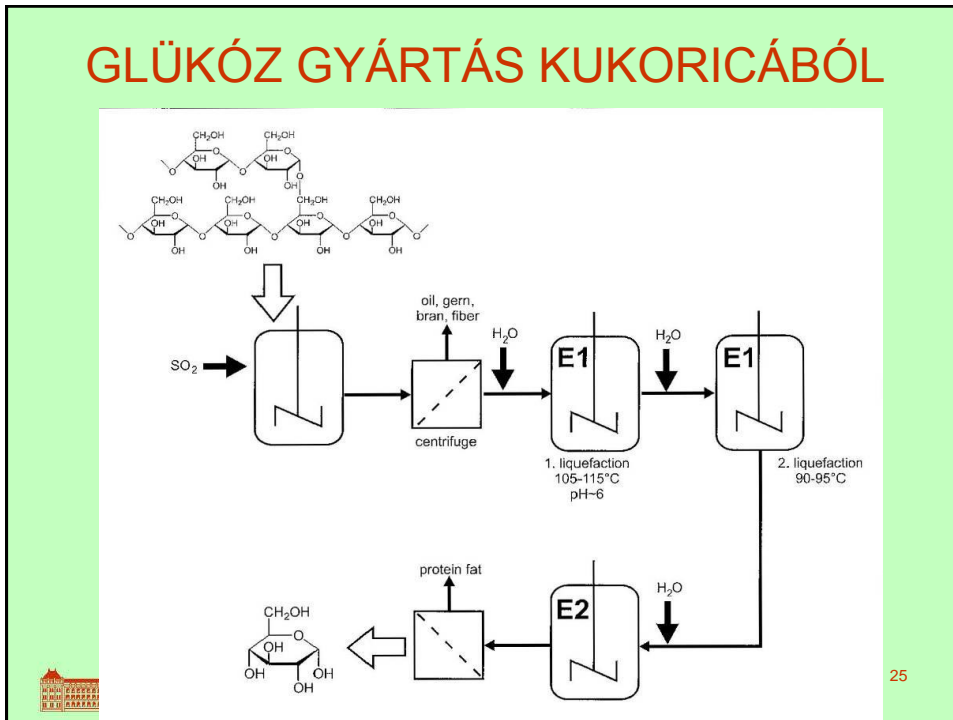
GLÜKÓZ Gyártás KUKORICÁBÓL

1. A kukorica előkezelése: savas áztatás (SO_2), sok vízoldható anyag kioldódik \rightarrow 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 hozóanyag és a tisztaság a nyersanyagtól függ, 90-99%
 Kapacitás: > 10 Mt/év

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

24



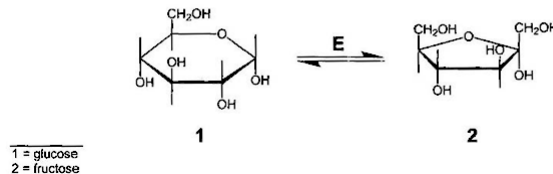
GLÜKÓZ- (XILÓZ-) IZOMERÁZ

Eredetileg xilóz izomeráz, de a glükózt is izomerizálja fruktózzá.

Xylose isomerase

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

EC 5.3.1.5



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 Co^{2+} és Ca^{2+} ion



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

27

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.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

28

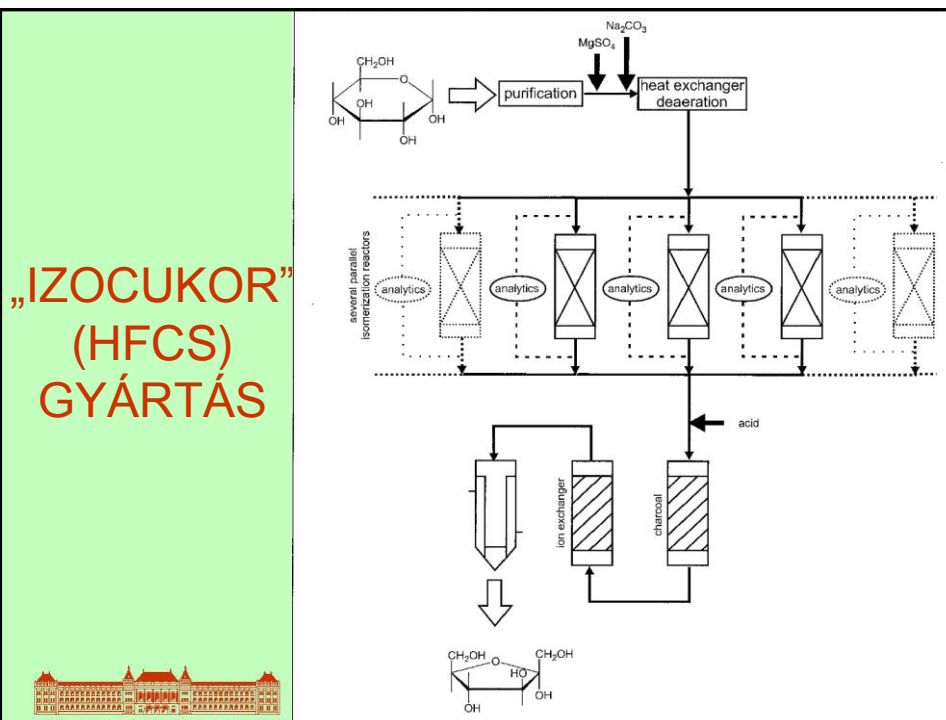
„IZOCUKOR” (HFCS) GYÁRTÁS

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

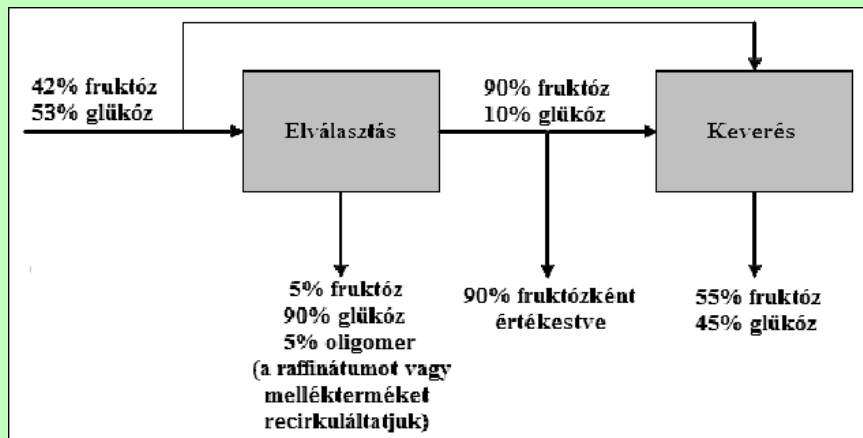


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

29



„IZOCUKOR” (HFCS) GYÁRTÁS

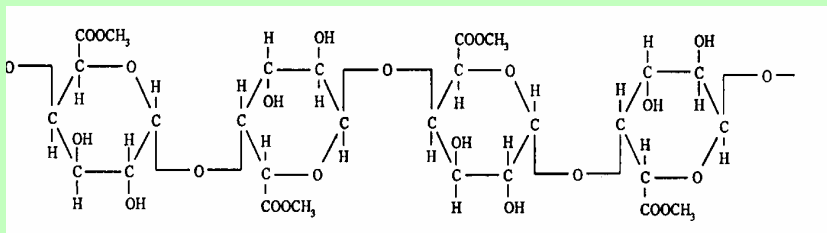


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

31

PEKTINÁZ(OK)

Pektin: poli-galakturonsav metilésztere:



Gyümölcsökben előforduló gélesítő anyag.

Miért kell elbontani?

Mert sok vizet/folyadékot tart vissza a gyümölcs húsában.

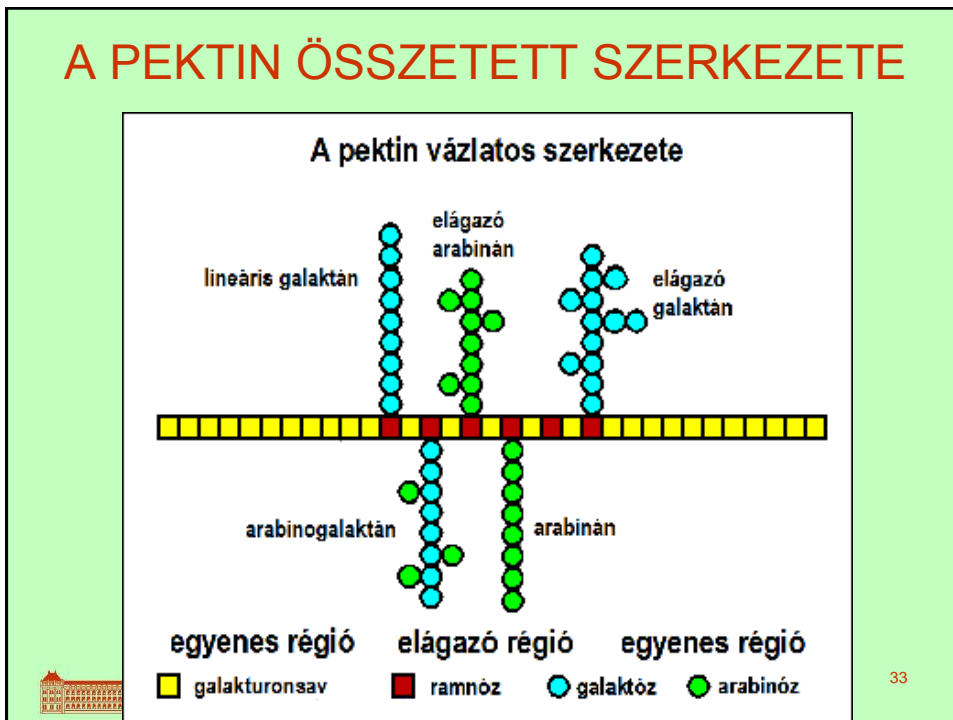
Ez lekvárnál előny, de a gyümölcsle préselésénél hátrány.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

32

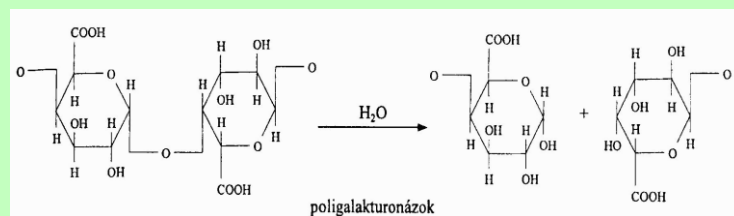
A PEKTIN ÖSSZETETT SZERKEZETE



PEKTINÁZ(OK)

Több enzim:

Endo- és exopektinázok, észterázok (metanolt szabadít fel)



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

Alkalmazás: gyümölcsleípar (léhozam növelés, derítés)

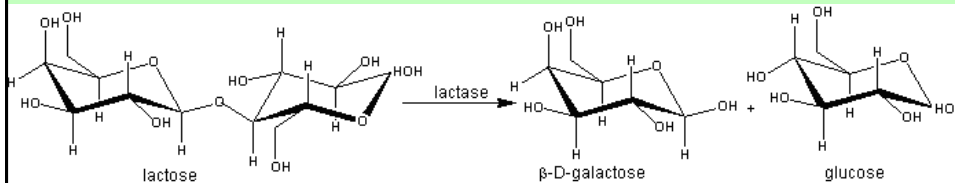
olivaolaj kinyerése

borászat: préselésnél a musthozam javítása



β -GALAKTOZIDÁZ

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



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 enzim 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 elemészteti 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
- tápszer
- 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 inaktiválják,

2. Savóban:

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

