

IPARI ENZIMEK



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

IPARI ENZIMEK

Történelem, mérföldkövek

- Ősrégi: borjúgyomor – tejalvasztó 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 Sumner: kristályos enzim, ureáz kardbabból
- 1966 teljes térszerkezet, lizozim



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

IPARI ENZIMEK

Történelem, mérföldkövek

- 1969 Enzimek és sejtek immobilizálása
- 1969 DL-Met reszolválása, 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.expasy.ch



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

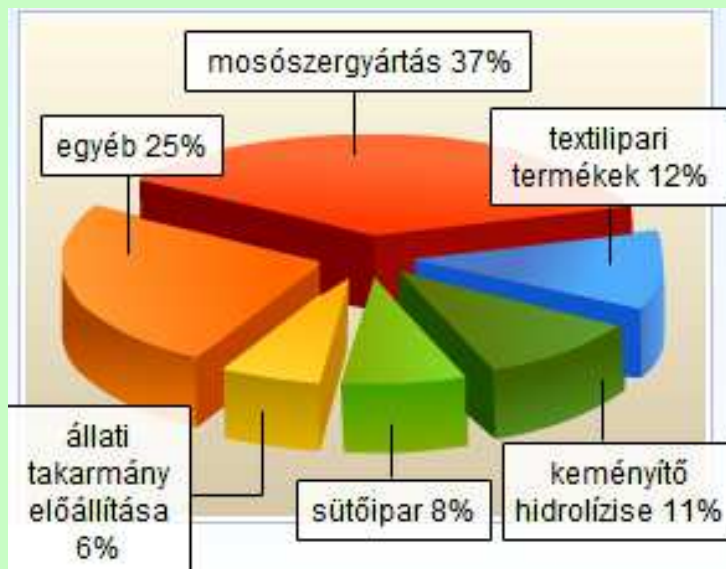
Medicina: proteázok, lipáz, aszparagináz, sztreptokináz, heparináz, ... stb
Piac: ~3000 MUSD/év

Kutatás/génmanipuláció: restrikciós endonukleázok, reverz transzkriptáz, DNS-ligáz, DNS polimeráz,

Mi itt az ipari enzimekkel foglalkozunk.



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 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.



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
β -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, glicerin, ..)
- glükóz adagolással limitben tartani
- szabályozási mutánsok keresése



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



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 sokszor inkább oldatban hozzák forgalomba (stabilizálás)



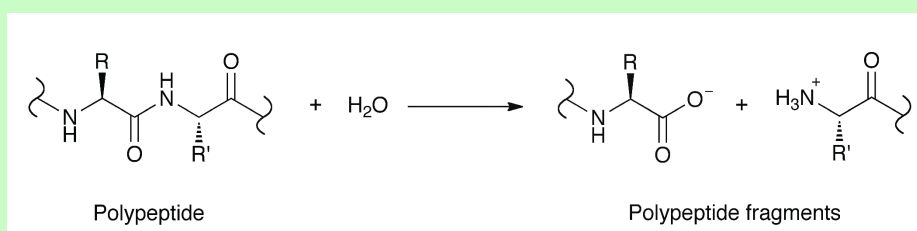
IPARI ENZIMEK

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



Proteázok



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

Peptid kötések bont (létrehoz) (hidrolízis, szintézis)

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

Peptid szintézis: aszpartám előállítása



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.



Proteázok

Csoportosítás:

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



Alkalikus proteázok

Termelő mikroorganizmusok:

Streptomyces nemzetség, *Aspergillus* nemzetség, *B. amyloliquefaciens* (szubtilizint termel – szerin-proteáz, reverzibilis a hidrolízis)

A **mosószer** proteázoknál feltétel a kompatibilitás:

- detergenssekkel
- lúgokkal
- kelátképzőkkel
- Perborátokkal
- Hőstabilitás



Alkalikus proteázok a bőriparban

Bőrkikészítés:

- Tartósítás
- **Áztatás** – proteázokkal leemésztik a nem-rost fehérjéket
- **Szórtelenítés** – az enzimek nem a szórt (keratint) bontják, hanem a szórtüszőt
- 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.



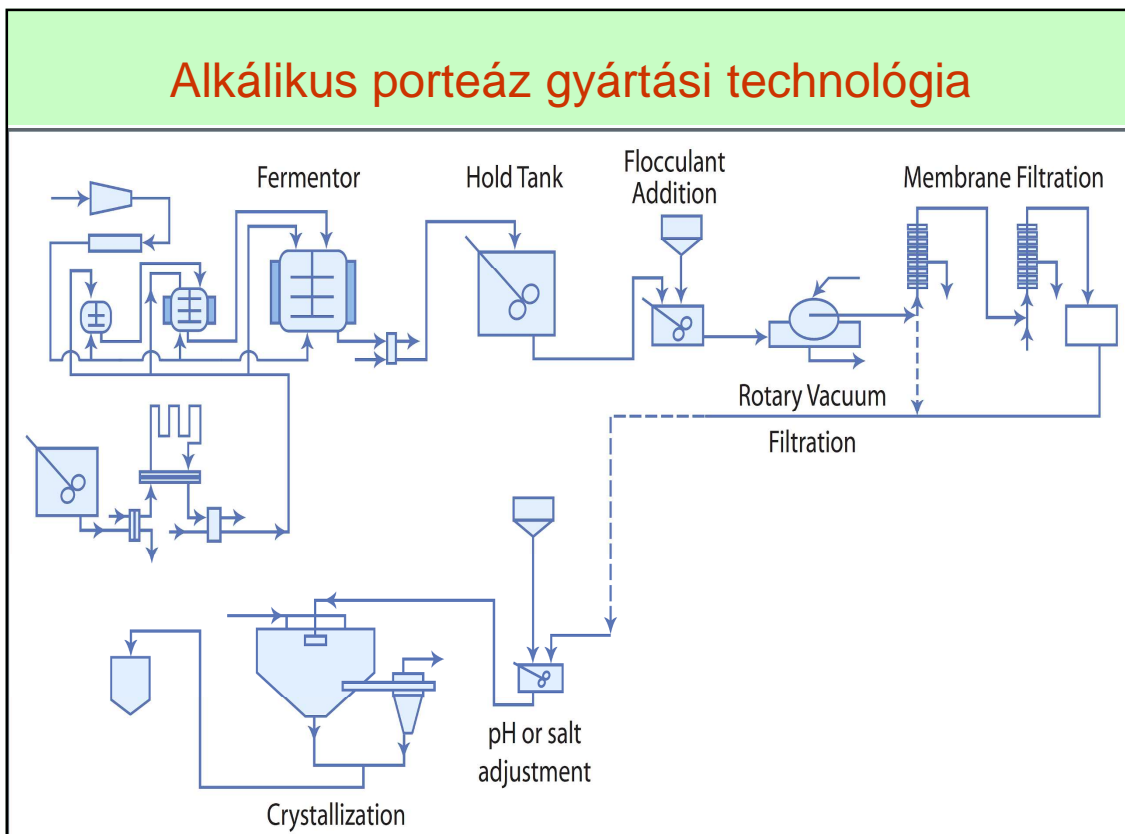
Fermentációs technológia

- Fed batch fermentáció
- Az NH_4 és aminosav koncentrációt alacsonyan kell tartani
- intenzív O_2 bevitel kell
- 48-72 h

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

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





Neutrális proteázok

Termelő mikroorganizmusok:

Bacillus subtilis, S. griseus, Aspergillus oryzae

Érzékeny:

- hőre
- stabilizátorokra (CaCl_2 , NaCl)
- alkalikus proteáz gyorsan lebontja

Felhasználás:

- Élelmiszeriparban
- Bőriparban



Neutrális proteázok a sütőiparban

A sütőiparban: elbontják a siker fehérjét, ezzel

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



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



Savas proteázok

Asp és Glu proteázok

Pepszin típusú: $\text{pH}_{\text{opt}} = 2-4$, Aspergillus-ok termelik

Rennin típusúak: $\text{pH}_{\text{opt}} = 5-7$, Mucor-ok termelik

Felhasználás:

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



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:

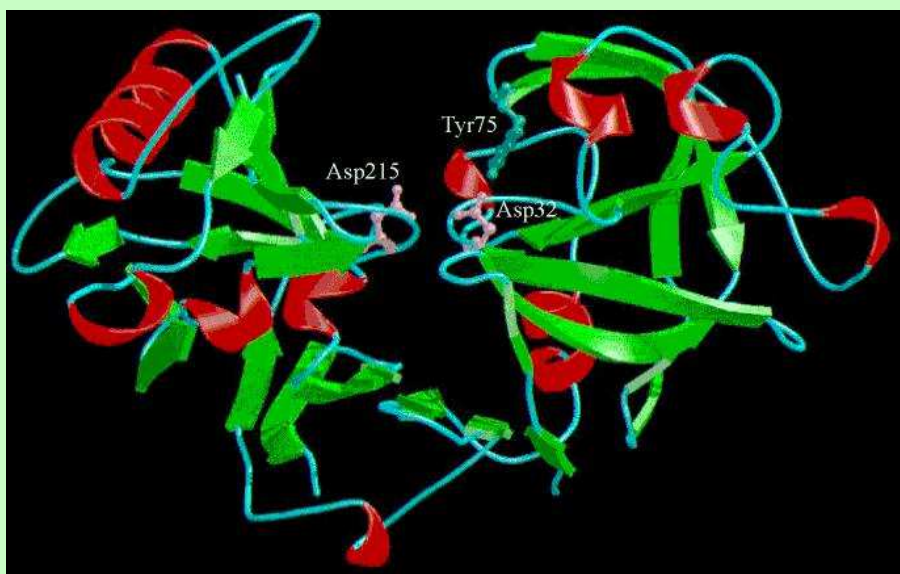
- *chymozin A*: Asp (~40%, nagyobb az aktivitás)

- *chymozin B*: Gly (~60%)

Genetikailag meghatározott, vagy A vagy B van termelődik.



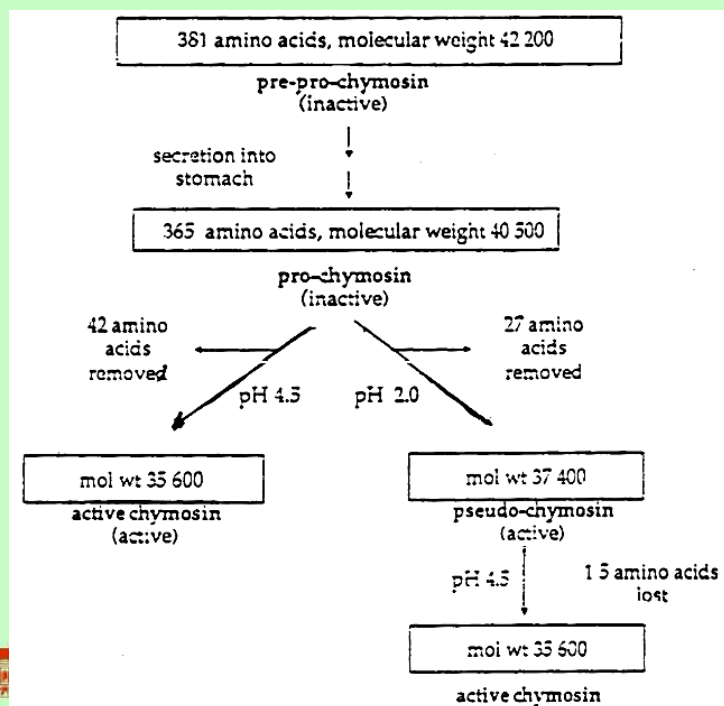
Chymosin-B



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.



Rekombináns rennin

3. Rekombináns DNS technikával

E. coli

- 1980 elején az állati chymozin gént klónozták, RENNET^R 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 β -galaktozidázt ezzel termeli a Gist-Brocades.

Extracelluláris enzimtermelés: az élesztő α -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[®])

Jól ismert törzs, egyszerű a scale up.



MAXIREN^R

A termék nem tartalmazhat élő sejtet, ezeket benzooesavval alacsony pH-án előlik, és szűrik (ultraszűrés után sterilszűrés → 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^R

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



MAXIREN^R

- 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, patogénitász, mutagenitász, toxikusság, etetési teszt, allergia, sajtgyártási teszt, organoleptikus vizsgálatok után fogadták el.
- EC, EU előírásait be kell tartani (termelésre és termékre egyaránt)

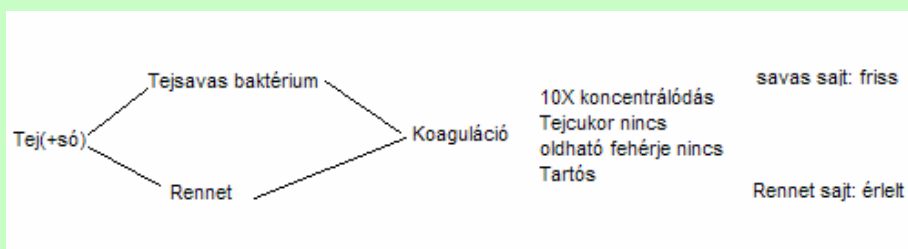


A RENNIN hatása

A sajtgyártás kulcslépése a tejfehérje megalvasztása.

A sajt az első termék, melynél enzimet és mikrobát (tejsavbaktériumot) is használnak évezredek óta.

Évente $25 \cdot 10^6$ liter rennetet forgalmaznak, 140 M USD értékben, olcsó enzim.



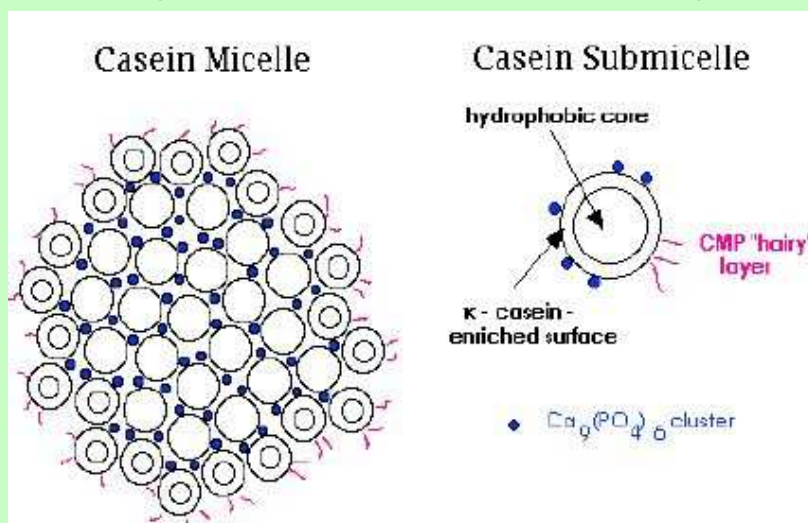
A tej fehérjéi

Fehérjék	%	Foszfát csoportok molekulánként	
Kazein			
α s1-kazein	32	8	Hőstabil P miatt, Ca kötő micella képz.
α s2-kazein	8	10-13	
β -kazein	32	5	
κ -kazein	8	1-2	
	80		
Savó fehérjék			
β -laktoglobulin	12	0	Ezek ultraszűréssel eltávolíthatók
β -laktalbumin	4	0	
Immunglobulin	3	0	
Szérum albumin	1	0	
	20		

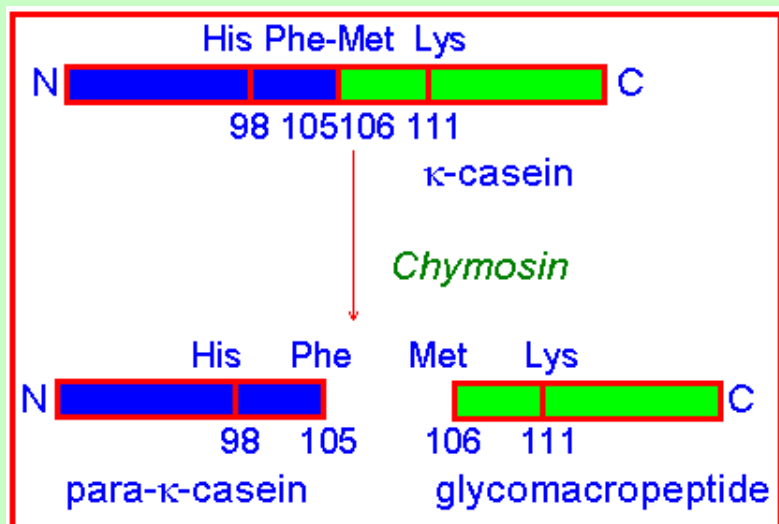


Kazein micellák

0,1% Ca jelenlétében a kazeinok micellát képeznek.



A rennin hatása



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 Ca^{2+} ionok hatására fokozódik

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



Sajtérelés

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



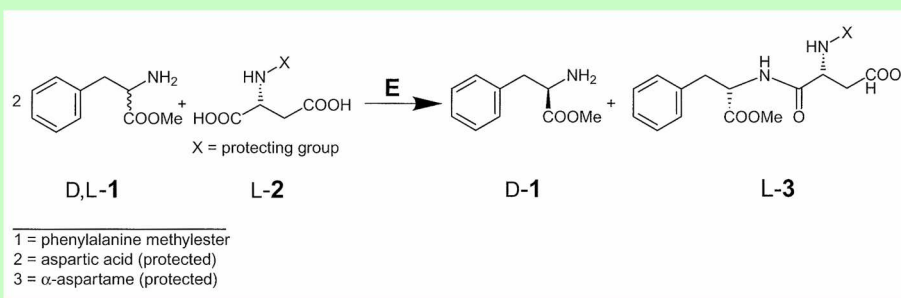
Fémproteázok

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:



Termolizin

Forrása: *Bacillus proteoliticus*

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 enzimként, oldott vagy immobilizált formában alkalmazzák.

Szakaszos eljárás, keverős reaktorban

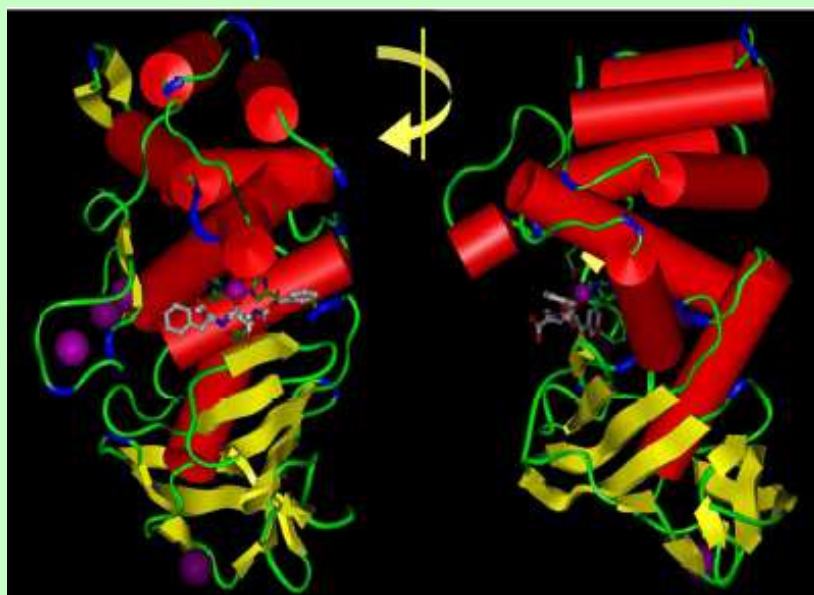
Enantiomer tisztaság: 99,99 %



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

41

Termolizin

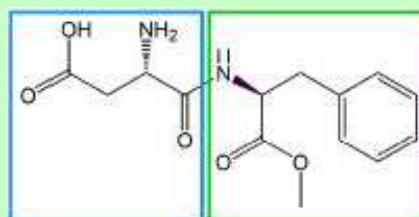


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

42

Aszpartám gyártás

Ahhoz, hogy csak a fenilalanin aminocsoportja reagáljon az aszparaginsav α -karboxil csoportjával, a rajtuk lévő egyéb funkciókat blokkolni kell, egyébként random di- és oligopeptidek képződnek.

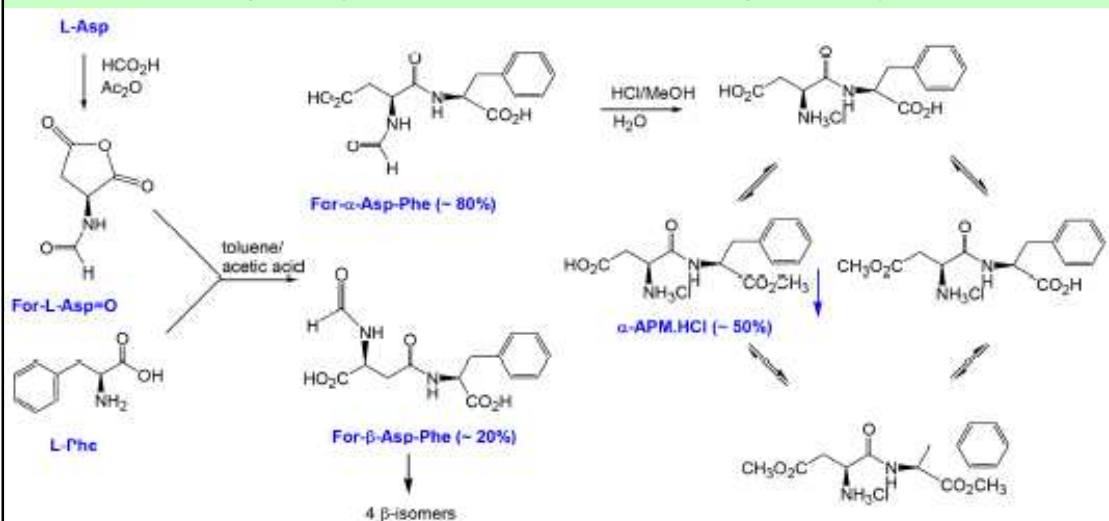


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

43

Aszpartám gyártások

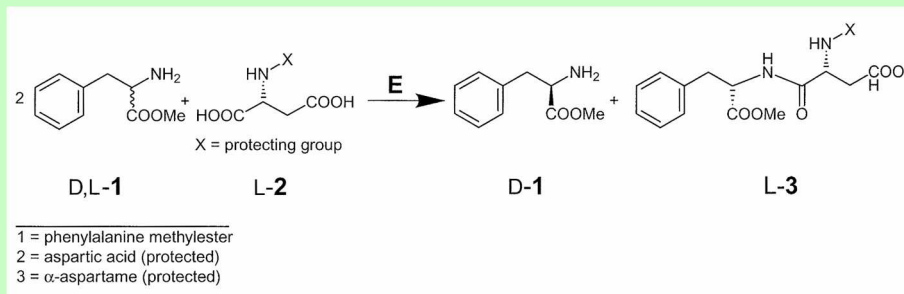
Kémiai eljárás (formilezés, NutraSweet, Ajinomoto):



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

44

Enzimes eljárás (HSM = Holland Sweeteners Company)



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



Enzimes eljárás (HSM)

Az enzimes eljárás előnyei:

- Nem keletkezik β -aszpartám (ami keserű)
- Sztereoszelektív 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%).



Az enzimes aszpartám gyártás lépései

Szubsztrátok:

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

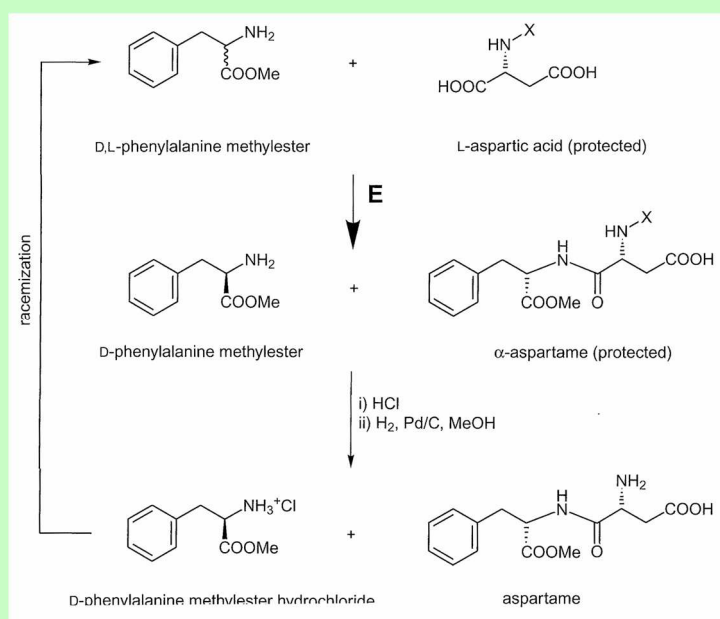
- A keletkező védett aszpartám adduktot képez a feleslegben lévő D-PheOMe-rel, ami kicsapódik.
- Szűrés
- Sósavval visszaoldják.
- A BOC csoportot lehidrogénezik, a D-PheOMe-t racemizálják és visszaviszik a folyamat elejére.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

47

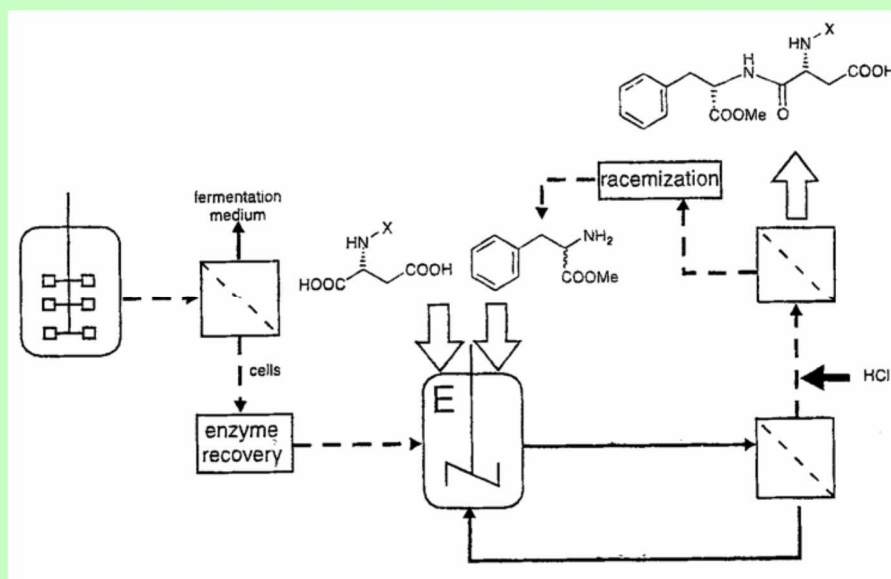
Aszpartám gyártás



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

48

Az aszpartám gyártás folyamatábrája

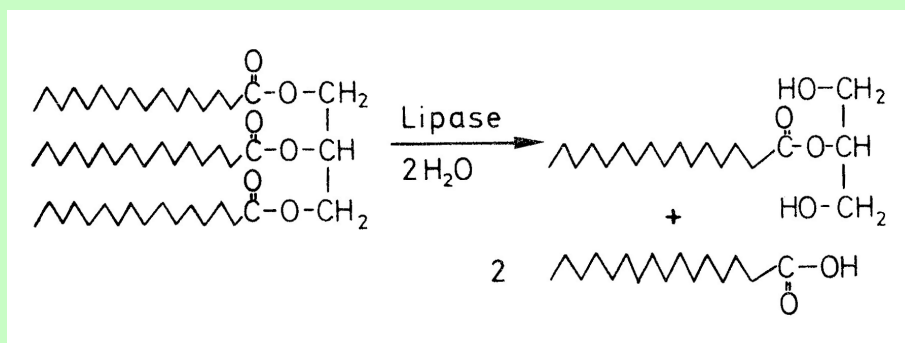


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

49

Lipázok

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

50

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), glicerin (termék inhibíció)



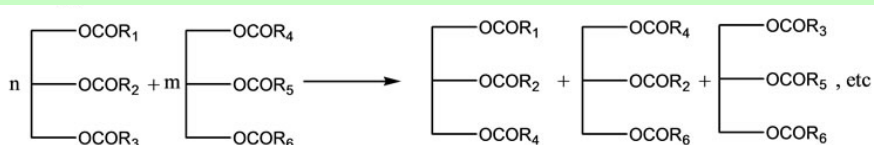
Lipázok felhasználása

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

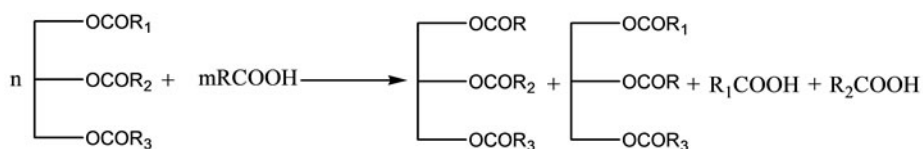


Zsírok átészterezése

1. Trigliceridek között



2. Triglicerid és zsírsav között



Kakaóvaj-pótló anyag előállítása

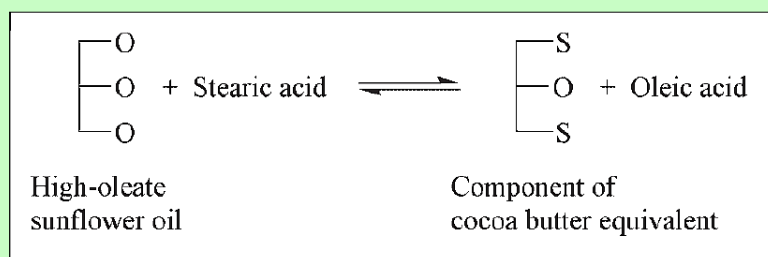
Pálmamag-olaj átészterezése kakaóvajszerű zsiradékká (csokoládé gyártás)

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



Kakaóvaj-pótló anyag előállítása

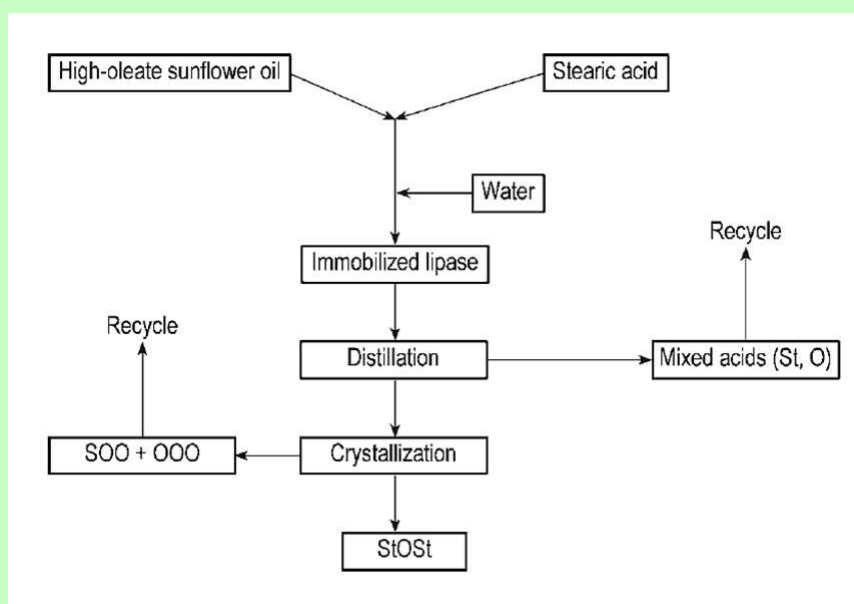
Napraforgóolaj átészterezése kakaóvajszerű zsiradékká (csokoládé gyártás) régió-szelektív lipázokkal.



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



Kakaóvaj-pótló anyag előállítása

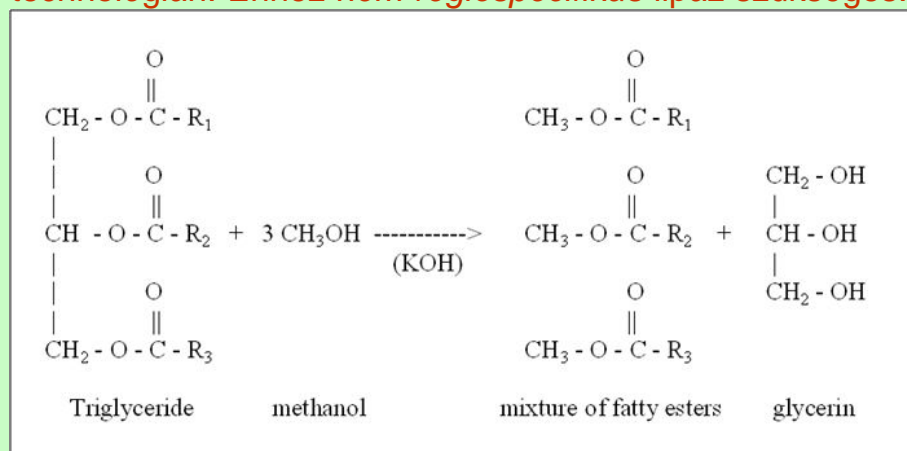


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

57

Növényolaj átészterezése biodízellé

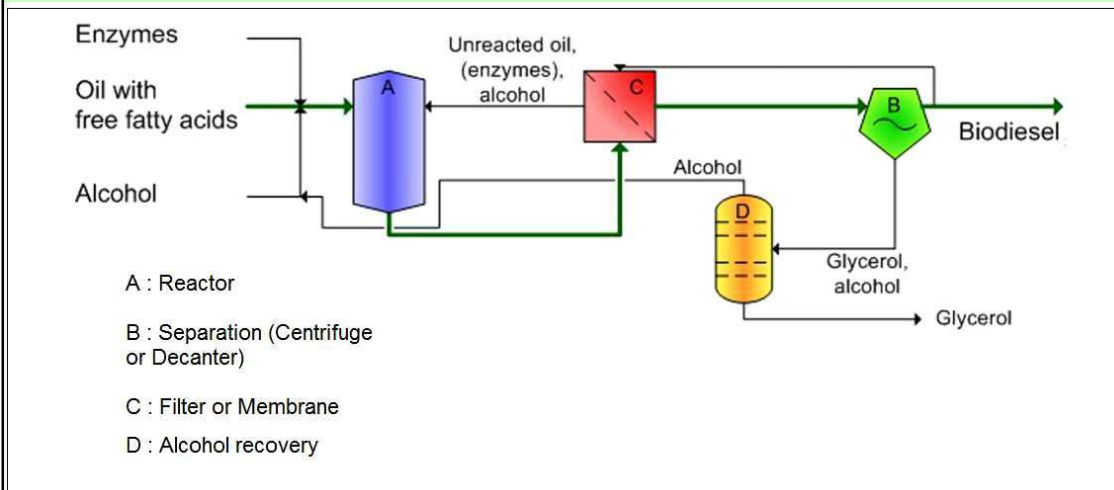
A biodízel gyártása során a növényi olajat átészterezik metilészterré. Ezt KOH-val végzik, de dolgoznak az enzimikus technológián. Ehhez *nem-régióspecifikus* lipáz szükséges.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

58

Növényolaj átészterezése



Sok (~12%) glicerint keletkezik



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

59