

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

IPARI ENZIMEK

Történelem, mérföldkövek

- 1969 Enzimek és sejtek immobilizálása
1969 DL-Met részolválása, 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

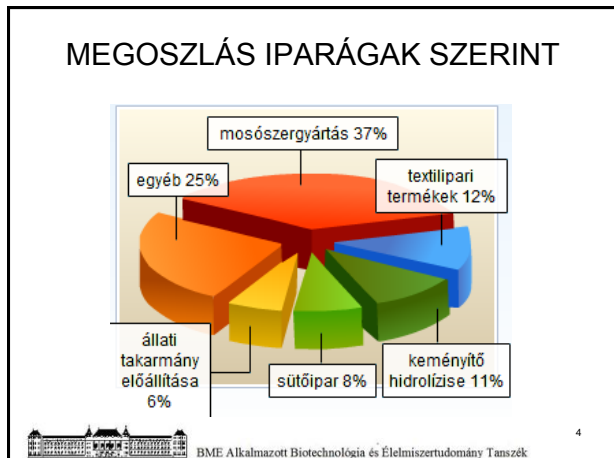
- Ipar: amilázok, proteázok, izomerázok, penicillin aciláz, konverziók. Piac: ~2000 MUSD/év
- Analitika, diagnosztikumok: glükóz-oxidáz, alkohol dehidrogenáz, koleszterin oxidáz, ... stb
- Medicina: proteázok, lipáz, aszparagináz, sztreptokináz, heparináz, ... stb
Piac: ~3000 MUSD/év
- Kutatás/génmanipuláció: restrikciós endonukleázok, reverz transzkriptáz, DNS-ligáz, DNS polimeráz,

Mi itt az ipari enzimekkel foglalkozunk.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

3



IPARI ENZIMEK PIACA

Néhány multi uralja:

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

Novozymes (DK)	
DuPont/Danisco (USA)	
Roche (CH)	
USA	40 %
Európa	35 %
Japán	24 %

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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

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

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 - 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


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).



10

A KEMÉNYÍTŐ SZERKEZETE

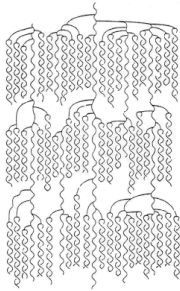
amilóz

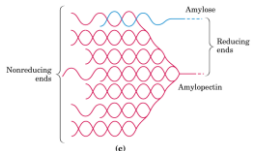


A jókeményítő színe a polimerizáció fokától függően:


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

amilopektin



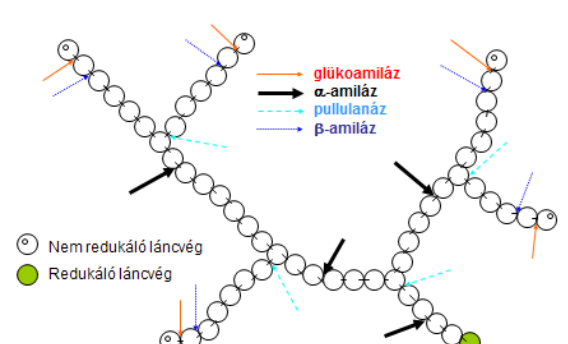


(c)



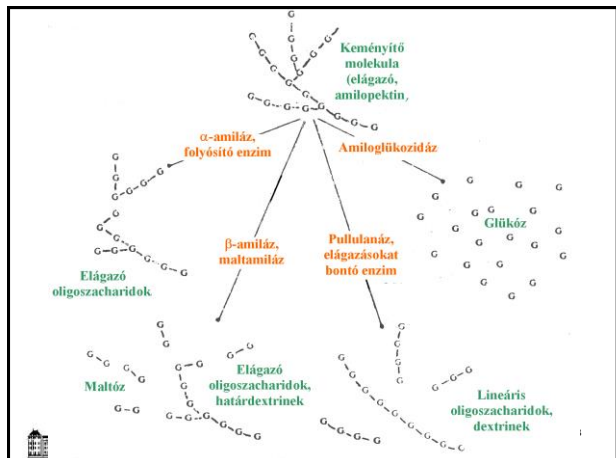
11

AMILÁZOK



→ glukoamiláz
→ α -amiláz
→ pullulanáz
→ β -amiláz

○ Nem redukáló láncvég
 ● Redukáló láncvég



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:

- > sörcefrézés 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*, *Rhizopus 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*) törzssel 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

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: 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: amiloglukozidáz + pullulanáz.

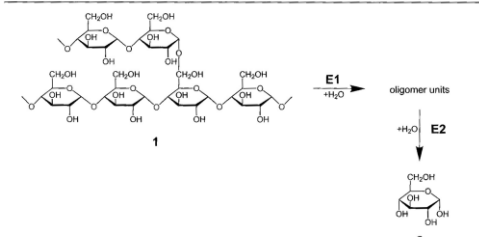


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

22

GLÜKÓZ Gyártás

α-Amylase / Amyloglucosidase
Bacillus licheniformis / Aspergillus niger EC 3.2.1.1/3.2.1.3



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


Several companies

23

GLÜKÓZ Gyártás KUKORICÁBÓL

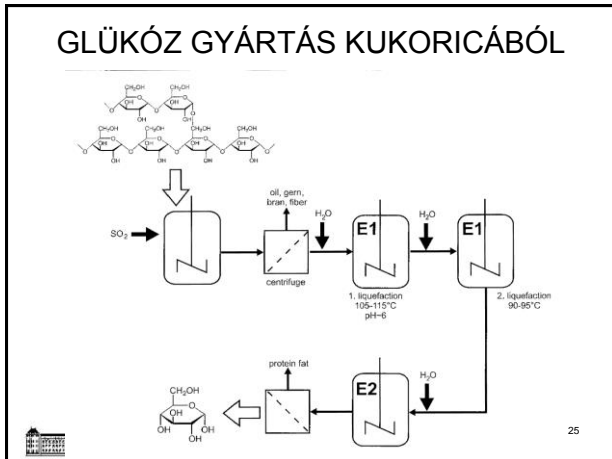
1. A kukorica előkezelése: savas áztatás (SO₂), sok vízzeloldható anyag kioldódik → bepárolva: „kukorica lekvár”, N-tartalmú tápoldat- és takarmány-komponens.
2. Nedves őrlés, keményítőtej kimosása.
3. Folyósítás: +enzim, két lépésben
4. Cukrosítás: +enzim, hosszabb ideig
5. Szűrés
6. (néha koncentráálás,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

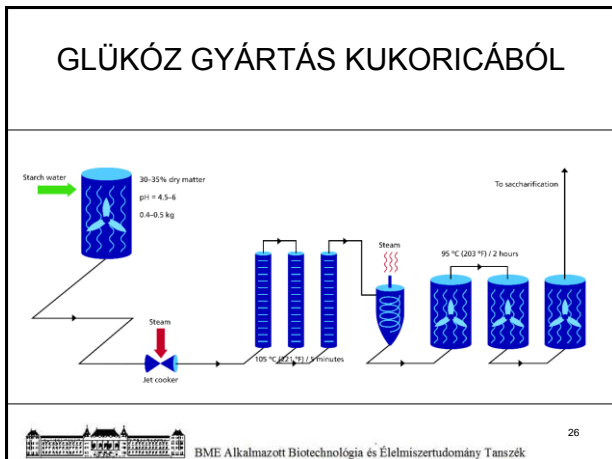
Folytonosításra törekednek minden lépésben
 A kihozatal és a tisztaság a nyersanyagtól függ, 90-99%
 Kapacitás: > 10 Mt/év

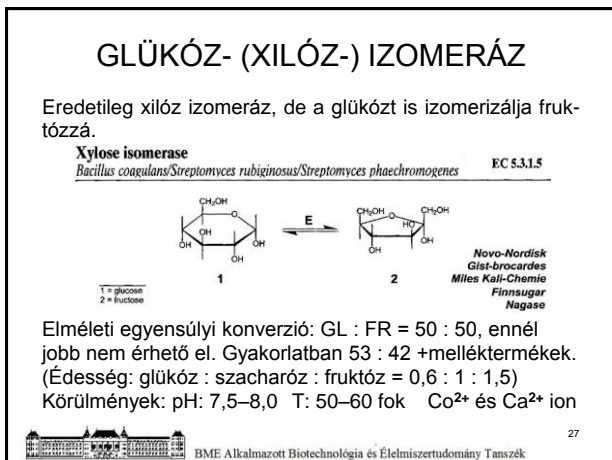


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

24







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

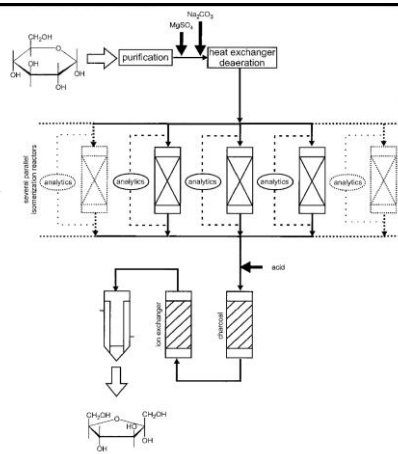
1. A glükóz szirupot előtte alaposan meg kell tisztítani (szűrés, aktív szén, ioncsere).
 2. Immobilizált sejteket alkalmaznak oszlopokban, az oszlopok hatékonyságát folyamatosan mérik.
 3. Élettartam: $t_{1/2} = 100-600$ nap, de $-12,5\%$ után cserélik
 4. Termék: nem egyensúlyi összetételű, G:F = 53:42, 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

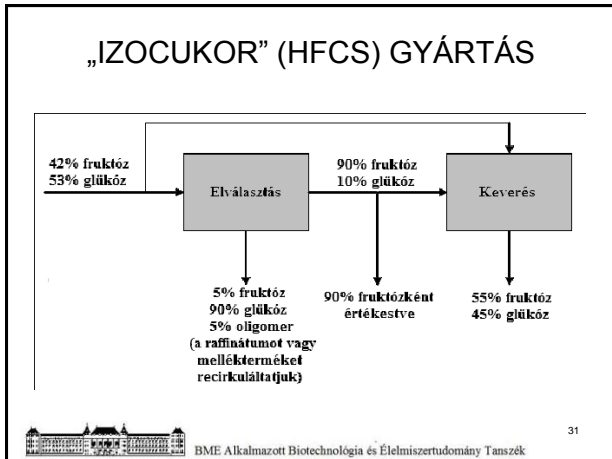


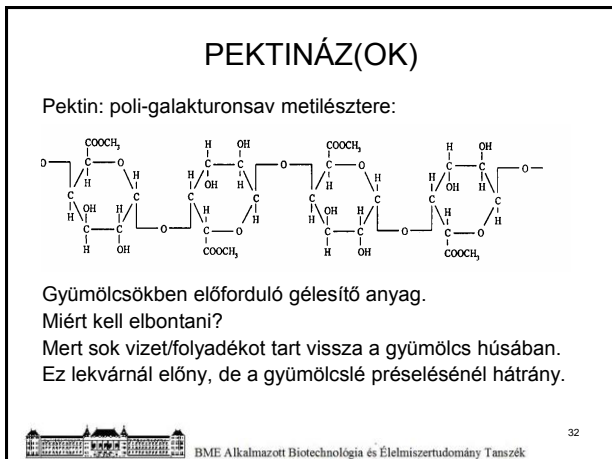
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

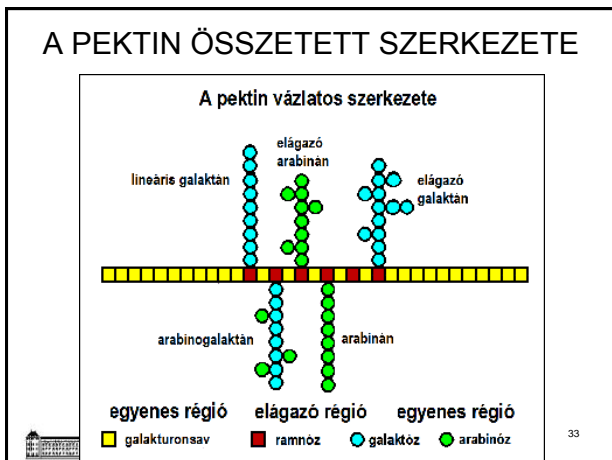
29

„IZOCUKOR” (HFCS) GYÁRTÁS



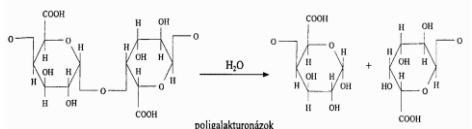







PEKTINÁZ(OK)

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



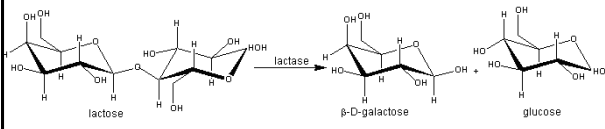
poligalakturonázok

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék
34

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.



lactose → β-D-galactose + glucose


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék
35


β-GALAKTOZIDÁZ

Termelő törzsek:

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

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

Kluyveromyces lactis (élesztő): pH optimum: 6-7, alkalmas,
 de: intracelluláris, $T_{opt} \sim 35$ 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 elemésztja 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 tejtermékeknel 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.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

39
