

IPARI ENZIMEK

Történelem, mérföldkövek

- Ósrégi: borjűgyomor – 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 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: restriktív 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:

- Novozymes (DK)
- DuPont/Danisco (USA)
- Roche (CH)

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

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, 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.

Amiloglükozidáz, 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

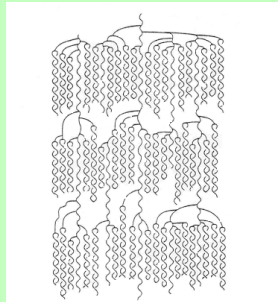
amilóz

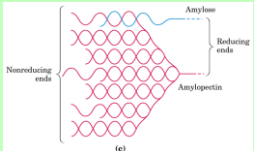


A jódkeményítő színe a polimerizáció fokától függően:


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

amilopektin



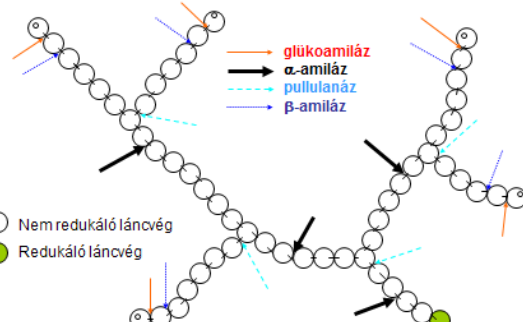


(e)



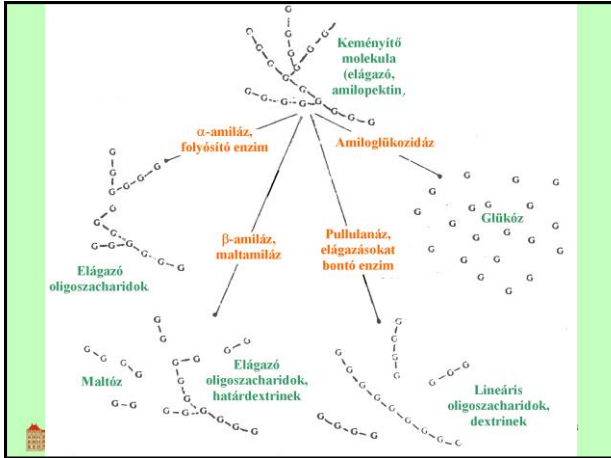
11

AMILÁZOK



→ **glükóamiláz**
→ **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 keményítőtől (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 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: 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

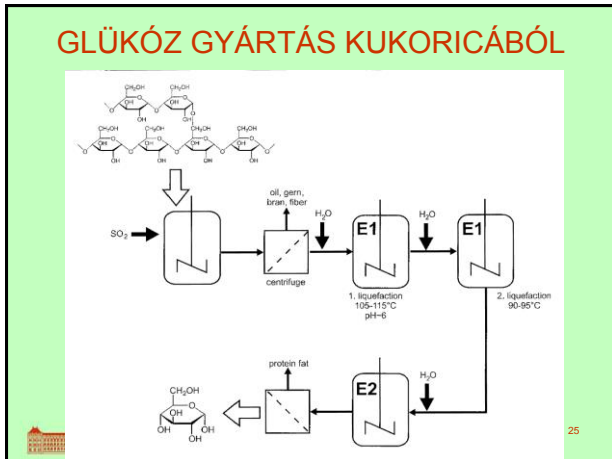
Several companies 23

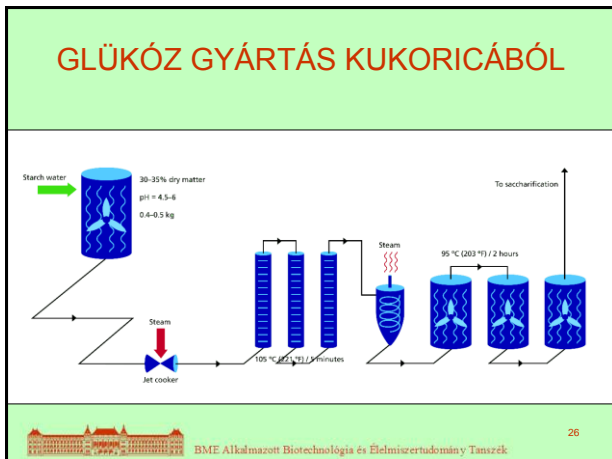
GLÜKÓZ Gyártás KUKORICÁBÓL

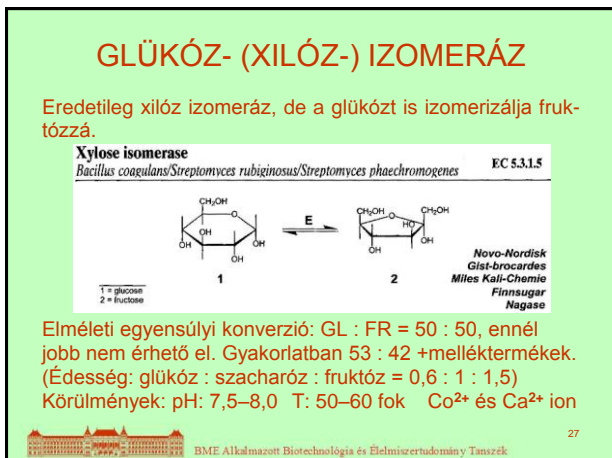
1. A kukorica előkezelése: savas áztatás (SO₂), sok vízzeloldható anyag kioldódik → bepárolva: „kukorica lekvár”, N-tartalmú tápoldat- és takarmány-komponens.
2. Nedves őrlés, keményítőtej kimosása.
3. Folyósítás: +enzim, két lépésben
4. Cukrosítás: +enzim, hosszabb ideig
5. Szűrés
6. (néha koncentráció,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

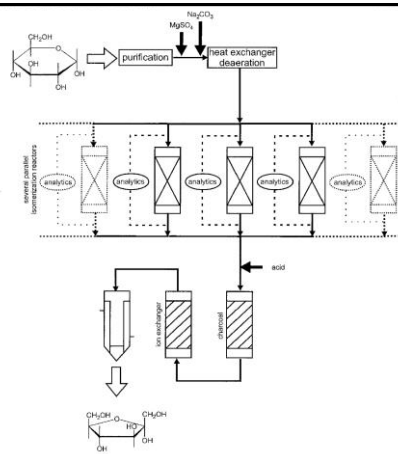


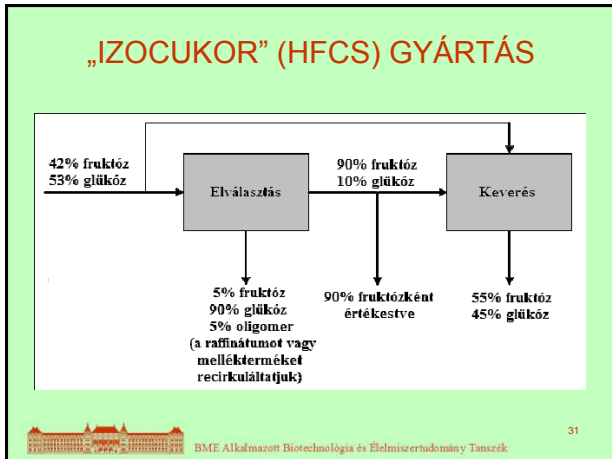
„IZOCUKOR” (HFCS) GYÁRTÁS

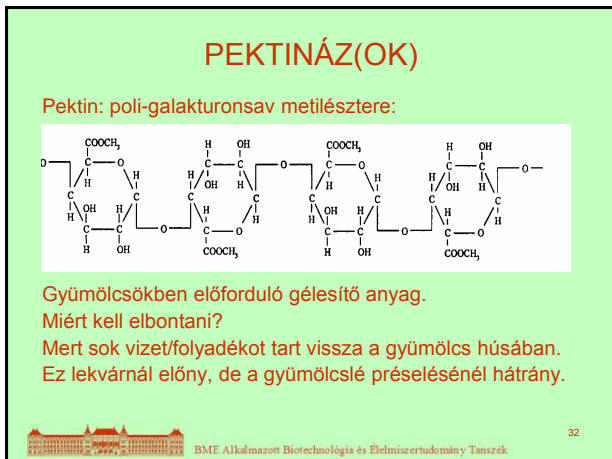
1. A glükóz szirupot előtte alaposan meg kell tisztítani (szűrés, aktív szén, ioncsere).
2. Immobilizált sejteket alkalmaznak oszlopokban, az oszlopok hatékonyságát folyamatosan mérik.
3. Élettartam: $t_{1/2} = 100-600$ nap, de $-12,5\%$ után cserélik
4. Termék: nem egyensúlyi összetételű, G:F = 53:42,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

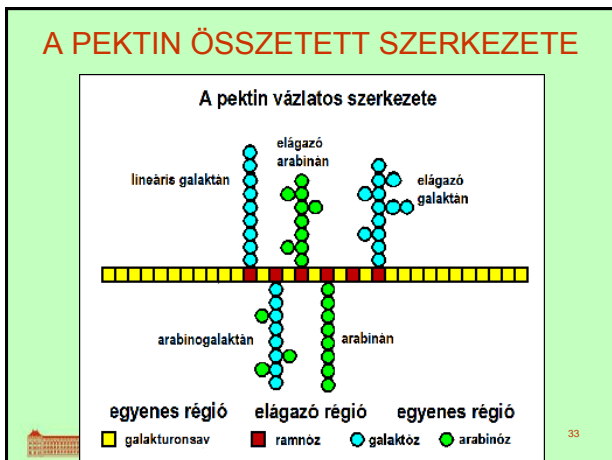


„IZOCUKOR” (HFCS) GYÁRTÁS





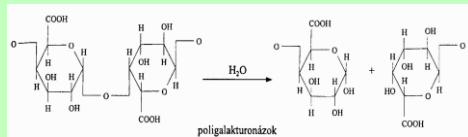




PEKTINÁZ(OK)

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

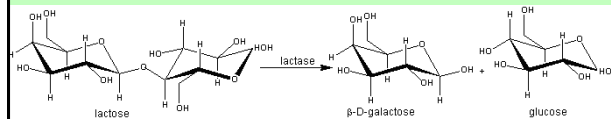


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

34

β -GALAKTOZIDÁZ

enzim a galaktóz β térállású glikozidos kötését hidrolizálja. Leggyakoribb szubsztrátja a tejcukor (laktóz), amely galaktóz(1 \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 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 elemesztí 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 sterilizéssel inaktíválják,

2. Savóban:

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

39
