



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
- Szeszipar
 - Nyersanyag előkészítés (hidrolízis), amilázok, cellulázok, hemicellulázok
- Cukoripar
 - Dextranázok (*Leuconostoc mesenteroides* dextránt szintetizál a szacharózból)





Történeti áttekintés - ipari enzimek

- **1915-ben:** Mosószerbe **tripszin** hatású enzimet tesznek.
- **1969-ben:** Az NSZK-ban az összes **mosószer** **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 mosószer **80-85 %-a** tartalmaz enzimeket.



Történeti áttekintés - ipari enzimek

- **1970 óta:** **Glükóz izomeráz** nagyipari felhasználás **α -amilázzal** és **amiloglükozidázzal** együtt (Keményítőből izocukor előállítás)
- **1965 óta** mikrobiális úton előállított **rennin** (*Mucor miehei*)
- **Pektinázok** a gyümölcslegyártó iparban egyre nagyobb jelentőségre tesznek szert (*Aspergillus niger, Aspergillus wentii*)
- **Lipázokat**, 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





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 enzimescsoport: **sütőipar, szeszipar, keményítőipar, textilipar**



Enzimek - alapok

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

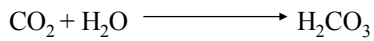
- Egyrészt az **élő szervezetekben** a sejtek működéséhez szükséges anyagátalakításokat és energiatermelő folyamatokat gyorsítják
 - Másrészt az **ipari technológiákban** különböző technológiai lépések reakcióját gyorsítják.
- Csak a **termodinamikailag lehetséges** folyamatokat katalizálják, a kémiai reakció **egyensúlyát nem változtatják** meg, az egyensúly 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).





Enzimek - alapok

Az enzimek katalitikus hatása óriási:



Enzim: karboanhidráz

Egyetlen enzim molekula hatására **10^5 mol CO_2** hidratálódik **másodpercenként**. A sebesség **10^7 -szer** nagyobb, mint a katalízátlan reakció sebessége.

Glükózid kötés hidrolízise 25°C -on 1 mol katalizátor koncentráció hatására **10^8 -szor gyorsabban** játszódik le enzim (glükózidáz) jelenlétében, mint HCl katalízissel.



7



Hogyan mérjük az enzimek mennyiségét?

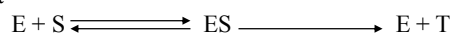
Enzimaktivitás, az enzimek legfontosabb tulajdonsága

IUPAC 1 enzimegység/ml (Ee/ml):

1 ml enzimoldat

1 μmol termék képződését katalizálja

1 perc alatt



- 1.) Laktóz + H_2O $\xrightarrow{\beta\text{-galaktozidáz}}$ glükóz + galaktóz
- 2.) Keményítő + H_2O $\xrightarrow{\alpha\text{-amiláz}}$ n glükóz
- 3.) Cellobióz + H_2O $\xrightarrow{\beta\text{-glükózidáz}}$ 2 glükóz

Enzim aktivitás meghatározásához definiálni kell a **körülményeket**:
Reakció, szubsztrát/termék alapú-e az aktivitás, hőmérséklet, pH,
(idő)



8



Az enzimek specificitása nagyon különböző

- **SZUBTILIZIN:** bakteriális proteáz, általános, nem specifikus enzim, a peptidkötés melletti oldalláncoktól 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 : glicin



Fogalmak az enzimszintézissel kapcsolatban

- **Indukálható enzimek**, pl. β -galaktozidáz *E. coliban* glükózon 3 mol/sejt, laktózon 3000 mol/sejt. A laktóz induktor (inducer), olyan anyag, mely a táptalajba adagolva specifikusan megnöveli az illető enzim mennyiségét.
- **Represszálható 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.





Az induktorral szembeni követelmények

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

Lehetőségek:

- A szubsztrát ill. szénforrás maga (a gond, hogy elfogy)
- Szubsztrát analóg pl. O→S csere laktóz→tiolaktóz, vagy kötésváltoztatás: cellobióz→szoforóz (β -1-4 → β -1-2 csere)
- Kemosztát fermentáció
- Az inducer folyamatosan képződik a fermentáció alatt, pl. cellulózon történő szaporításkor a cellobióz



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 enzimmelőállítás megoldására is.





Enzimfermentáció fajtái

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

- Aerob
- Anaerob

- Szilárd fázisú
- Félszilárd fázisú
- Folyadék fázisú (süllyesztett)

- Szakaszos (batch)
- Rátáplálásos (fed-batch)
- Folytonos



13



Az enzimtermelés lehet:

- Intracelluláris
- Extracelluláris

Az intracelluláris enzimkészítményeket felhasználhatják:

- Sejthez kötve
- Sejtől kivonva és elválasztva sejtmentes extraktként

Az extracelluláris enzimeket felhasználhatják:

- A mikrotömeg elválasztása után **fermentlé felülúszóként**
- **Sűrítményként** (fermentlé felülúszó besűrítésével nyerik)
- Kicsapással, vagy szárítással nyert **szilárd enzim készítményként**

- **Frakcionálás, tisztítás után** nyert enzimkészítmény formájában
- **Immobilizálva** (tisztítás után)



14



Enzimtisztítás, enzimfrakcionálás

Folyadékfázis tisztítása:

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

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



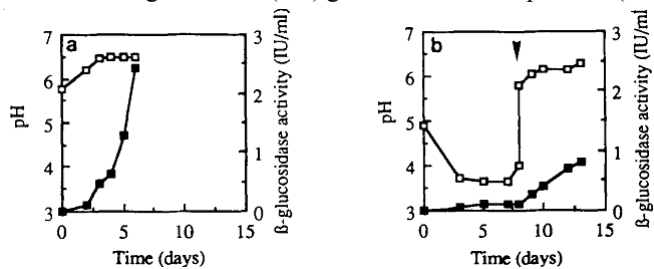
15



Aspergillus phoenicis béta-glükozidáz termelése

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

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



- „in situ” immobilizált enzimmészítmény



16



Szekréción 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 sejtmembránon
- amikor az enzimfehérje kijutott a fermentlébe, s a lánc még a membránban van, leszakad róla, és újabb enzimfehérjét visz át a sejtmembránon

Eukariotáknál (élesztők, gombák)

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



17



Enzimfermentáció

➤ táptalajösszetétel:

- szénforrás (glükóz, hidrol, melasz, malátakivonat, tejsavó, metanol, cellulóz, szulfid-szennylég)
- nitrogénforrás (NH_4^+ , NO_3^- , karbamid, műtrágyák, kukoricalékvar, 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



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-cellulóz-bontók, ligninhasznosítók (celluláztermelők, difenoloxidáztermelők)
- penészes kenyérről - amiloglükózidáz termelők
- keményítőüzem szennyvizéből: α -amiláz termelőket
- hőforrásokból termotoleráns, vagy termofil mikroorganizmusokat lehetőleg nagy hőfok optimumú enzimekkel
- sós mocsarokból: nagy só koncentrációt tűrő mikrobákat





Leoltás - Dúsítás

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

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

Dúsítás rázatott lombikokban: **0.008 g/l akrilnitril** koncentráció mellett 0.5 g/l glükóz, pepton, foszfát, MgSO₄ tartalmú táptalajjal helyettesítettük a dekantált felülúszót, naponta friss táptalajt adagoltunk.

akrilnitril 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 **akrilnitril volt a kizárólagos szén és nitrogén forrás**, további 2 hét szoktatás, majd azonos táptalaj agarral szilárdított változatára szélesztettük a tenyészetet

IK4 izolátum rendelkezett a kívánt tulajdonságokkal



21



Enzim tisztítási és elválasztási lehetőségek

Példa: Balatonfüzfőn a szennyvíziszapból nyert **IK4** izolátum termelt: **Akrilnitril hidratázt** és **amidázt** is, s olyan enzimmészítményre volt szükség, mely amidázt nem tartalmaz.

Akrilnitril \longrightarrow **akrilamid** \longrightarrow akrilsav

Mutációs kezelés (UV besugárzás) után szelekció olyan táptalajon, 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 enzimek felhasználása: amiloglükozidáz, amennyiben az enzimmészítmény glükózoxidázzal, vagy transzglükozidázzal szennyezett, nem a fermentálé 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 (amilázok árrobbanása)



Enzimek alkalmazásának környezeti hatásai

Bár az enzimek enyhe reakciókörülményeket tesznek lehetővé, alkalmazásuknak vannak egyéb **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





Enzimek alkalmazásának környezeti hatásai

Journal of Cleaner Production 42 (2013) 228–240



Contents lists available at SciVerse 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 ^a, Per Henning Nielsen ^{b,*}

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



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
- bekonzentráljuk a terméket
- ha szükséges, továbbalakítjuk a terméket

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



27



Rögzített enzimvel végzett katalízis

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

Lényeges különbség az oldott enzimvel 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.



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,
 - ◊ β -galaktozidáz,
 - ◊ további félüzemek:
 - ◊ 6-féle glükóz izomeráz,
 - ◊ 2-féle penicilli naciláz,
 - ◊ aszpartáz,
 - ◊ aminoaciláz,
 - ◊ laktáz
- 1981: további félüzemek az előző enzimekkel, más-más eredet, más-más rögzítési mód
- **IPARI MEGVALÓSÍTÁS**: továbbra is csak a **glükóz izomeráz** és a **β -galaktozidáz**

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





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 enzimekkel töltött reaktorok)
- **az enzim nem szennyezi a terméket**, illetve nem kell külön gondoskodni az enzim elválasztásáról, vagy inaktiválásáról

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 enzimvesztéséget jelentene)
- **A SZUBSZTRÁT:** vízdoldható-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:** jobb-e így a szabályozási lehetőségek, automatizálható-e az eljárás?
- **GYÁR:** kivitelezhető-e a technológia a meglévő létesítményben?
- **GAZDASÁGOSSÁG:** az immobilizált enzim alkalmazása-e a legjobb megoldás?



31



Mikor használjunk rögzített enzimet?

• ENZIMELEKTRÓDOK-BIOSZENZOROK

- glükózosidáz: glükózmérés
- alkoholdehidrogenáz: 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



Immobilizált enzimekkel kapcsolatos fogalmak

Enzimaktivitás meghatározása:

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

Az aktivitás kifejezhető: Ee/g szá, Ee/g nedves tömeg, Ee/cm^3 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 keresztköti ágenssel, s ezután ezek a csoportok már nem tudnak részt venni a katalízisben.
2. A rögzítés hatására sztérikus gátlások keletkeznek, s a szubsztrátmolekula nem fér eléggé hozzá az enzim molekuláinak megfelelő csoportjaihoz.
3. A rögzítés következtében megváltozik az enzim molekulák mozgása.





Immobilizált enzimekkel kapcsolatos fogalmak

Stabilitás

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

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 szubsztrátterhelés, vagy egyszerű elúció következtében szabad (oldott) enzim molekulák kerülnek a reakcióelegybe.



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 használnák. Két, három felezési időig szokták használni, de tudatában kell lennünk, hogy a térfogati produktivitás állandóan csökken.

Az állandó termékösszetétel és állandó kihazatal elérése érdekében ezt figyelembe kell vennünk.

Általában több (különböző fázisban levő) reaktort kapcsolnak össze.





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/cm³ ágytérfogat

Diffúziógátlás:

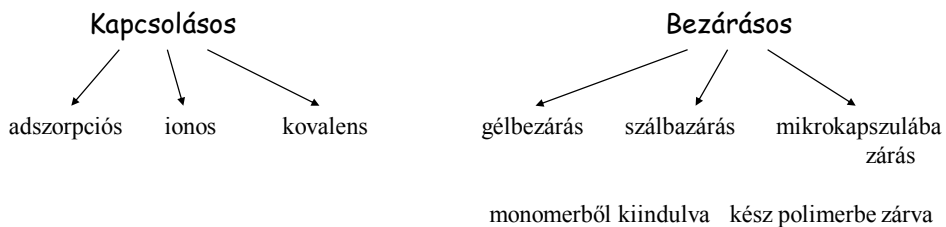
Különösen akkor válhat jelentőssé, ha az enzim molekulák nem a hordozó felületén, hanem a hordozó belsejében vannak rögzítve. Ekkor a szubsztrát molekulának az ENZIMHEZ, ill. a termék molekulának az ENZIMTŐL való transzportjéért a rögzített készítményen belüli diffúzió a felelős.



36



Az enzimek rögzítése



• nő a rögzítés erőssége → nő a rögzítés költsége



37



Köszönöm a figyelmet!

