



(19) Országkód

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: P 93 03093
(22) A bejelentés napja: 1992. 05. 13.
(30) Elsőbbségi adatok:
702,068 1991. 05. 17. US
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/US 92/04048
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 92/20329

(40) A közzététel napja: 1995. 02. 28.
(45) A megadás meghirdetésének a dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1998. 08. 28.

(11) Lajstromszám:

214 736 B

(51) Int. Cl.⁶

C 12 N 11/00

A 61 K 38/43

C 11 D 3/386

C 11 D 7/42

(72) Feltaláló:

Fuisz, Richard C., Great Falls, Virginia (US)

(73) Szabadalmas:

Fuisz Technologies Ltd., Chantilly, Virginia (US)

(74) Képviseelő:

Gödölle, Kékes, Mészáros & Szabó Szabadalmi
és Védjegy Iroda, Budapest

(54) **Eljárás enzimhordozó mátrixot tartalmazó enzimtermékek előállítására**

KIVONAT

A találmány új enzimtermékek, így kelesztő anyagok, fermentálószerke-
tek, detergensek, diagnosztikai szerek, biológiailag lebontható termékek, immunvizsgálathoz
használható szerek, terápiás anyagok előállítására vo-
natkozik, amelyek egy nem-szálal enzimhordozó mátri-
xot tartalmaznak. Ezeket egy, az említett enzim és egy
szilárd, pillanatfolyással enzimhordozó mátrixszá fel-

dolgozható hordozóanyagot tartalmazó nyersanyag-
nak az említett hordozóanyag fizikai és/vagy kémiai szerke-
zetét megváltoztató körülmények között végzett, pillan-
atfolyással történő feldolgozásával állítottak elő. A ta-
lálmány tárgyát képezi az új enzimtermékeknek az elő-
állítási eljárása is.

A találmány új enzimtermékekre vonatkozik. Közlelebbről a találmány javított enzimtermékekre vonatkozik, így erjesztő anyagokra, alkohol fermentumokra, detergens-alapanyagokra, lebontószerekre, diagnosztikai szerekre, biógyógyszerekre, katalázokra és oxidázokra. A találmány tárgyát képezi az enzimtermékek előállítása is.

Az enzimek olyan proteinek, amelyek számos biológiai reakciót katalizálnak. Rendkívüli katalitikus erejüknek és fajlagos hatásuknak köszönhetően az enzimeket olyan folyamatok gyorsítására használják, amelyek egyébként nem mennének végbe. Sok izolált enzim viszonylag instabil, gyakran a felhasználást megelőzően fokozatosan elveszti az aktivitását, és működése sok tényezővel könnyen gátolható.

Évek során át különböző célokra számos enzimterméket fejlesztettek ki. Így például élelmiszerek, detergens, kozmetikai és gyógyszerek hatását növelték enzimekkel. Számos kereskedelemben kapható, enzim alapú terméknek azonban bizonyos hátrányai vannak.

Szemléltetésként szolgálhat az, hogy a detergens enzimeket általában por vagy folyadék formájában állítják elő. Ezek nehezen kezelhetők, poruk irritációt okozhat, előfordulhat, hogy más detergens termékekkel nem kompatibilisek és nedvesség jelenlétében megromolhatnak. A nagy víz- és felületaktívanyag-tartalmú folyékony detergensekben levő enzim aktivitása idővel csökkenő tendenciát mutat. A felületaktív anyagok gyakran inaktíválják az enzimet. Következésképpen olyan – detergensekben használható enzimtermékek előállítására van szükség, amelyek könnyen kezelhetők, a felhasználót nem irritálják, és a detergensben aktivitáscsökkenés nélkül egyenletesen eloszthatók.

Hasonlóan fontos, hogy a bió masszába az élesztő anyagokat és az alkohol erjesztőket megadott időpontban és helyen tudják adagolni és aktiválni. Így például az élesztő hajlamos olyan csomókká összeállni, amelyek a keverés során nem diszpergálódnak. Ez az „összetapadás” mind a száraz, mind a paszta állapotú élesztőkészítmény esetén előfordul, amikor a készítményt tésztához vagy bió masszához adják. Ezért az olyan anyagokat, mint például az élesztő, előnyösebb lenne a szállításhoz valamilyen közegben szuszpendálni és amikor kívánatos, felszabadítani. Ez főként akkor igaz, ha a befogadó anyag olyan nyúlós anyag, mint a sütési folyamatban használt tészta és a fermentációs folyamatban használt bió massa.

Más enzimhordozó anyagok szempontjából előnyös a megnövekedett tárolási idő. Szobahőmérsékleten az immunvizsgálatokban indikátorként használt enzimek tárolási ideje gyakran rövid. A torna peroxidázt, lipoprotein lipázt, glicerín-3-foszfát oxidázt általában fagyasztva szárított porként, -20°C -on tárolják. Az immunvizsgálatokat általában $20-30^{\circ}\text{C}$ hőmérséklet tartományban végzik. Ezért olyan mátrix kifejlesztésére van szükség, amely javítja az immunvizsgálatokhoz használt enzim tárolási idejét, anélkül, hogy aktivitását gyengítené.

Régóta kísérleteznek az enzimek alkalmazásával összefüggő problémák megoldásával. Az US 3 095 358 szá-

mú szabadalmi leírás szerint szorbitot használnak a papaint, proteázokat és amilázokat tartalmazó vizes oldatok stabilizálására. Ehhez a módszerhez nagymennyiségű stabilizálószerre van szükség és ezért drága.

5 Az US 3 296 094 számú szabadalmi leírás szerint részlegesen hidrolizált és oldhatóvá tett kollagént és glicerint használnak a proteolitikus enzimek vizes oldatainak a stabilizálására. Ehhez a módszerhez nagymennyiségű glicerinnre van szükség és ez az enzimoldat 10 költségét szignifikánsan megnöveli.

Az US 3 749 671 számú szabadalmi leírás eljárást ismertet mosodai detergensekben használt, enzimtartalmú minták előállítására. Az eljárás lépései az alábbiak: (a) a normál körülmények között szilárd, átlátszó anyagot az anyag megolvadásához elegendő olyan hőmérsékletre melegítik, amelyen az enzim aktivitása még nem romlik; (b) az olvadt anyagból és az enzimből sűrű szuszpenziót képeznek; (c) a sűrű szuszpenzióba inert gázt vezetnek, hogy a gázzal egyenletes diszperzió alakuljon ki és (d) a képződött sűrű szuszpenzióból mintát készítenek. Ennek az eljárásnak sok olyan lépése van, amely energia-, berendezés- és kézimunka-igényes.

Bár a fentiekben ismertetett eljárások bemutatják az enzimtartalmú detergens-termékek javítására tett kísérleteket, még nem sikerült megoldani az enzim-aktivitás 25 idővel bekövetkező csökkenésével és a megfelelő diszpergálással kapcsolatban felmerülő problémákat.

Ezért a találmány feladata egyrészt olyan enzimtermék kidolgozása, amely egyenletesen diszpergálódik vagy oszlik el a kiválasztott folyadékban, miközben az enzim aktivitása a felhasználás előtt hosszabb ideig megmarad.

A találmány feladata másrészt olyan enzimtermék kidolgozása, amelynek hosszabb a tárolási ideje.

35 A találmány feladata továbbá olyan nem-szálas mátrix kidolgozása, amely megkönnyíti az enzim és a massa összekeveredését, és így az enzim a masszában egyenletesen diszpergálható.

Mátrixból (hordozóanyagból) és abba bedolgozott gyógyszerészeti anyagból álló készítmények már ismertek. Ilyen készítményt ismertetnek például a HU 207 941 számú szabadalmi leírásban, ahol a mátrix alapanyaga cukor vagy valamilyen cukorszerű anyag. A megoldás lényege, hogy a készítmény mátrixa oldékóbból végzett szálhúzással előállított szálas anyag. Ez a szálas szerkezet teszi lehetővé, hogy a készítmény a 45 szájban gyorsan fel tud oldódni.

A találmány nem-szálas mátrixot tartalmazó enzimtermékre vonatkozik, amelyet úgy állítunk elő, hogy az enzimet és egy hordozóanyagot tartalmazó nyersanyagot olyan hőmérsékleti és nyíró körülményeknek vetjük alá, amely elegendő ahhoz, hogy olyan mátrix keletkezzék, amely a tárolási és felhasználásra szolgáló enzimet szuszpendálja. A hordozóanyag a folyamat során olyan 55 változáson megy keresztül, amelyben fizikai és/vagy kémiai szerkezete átalakul.

A leírásban az „enzimtermék” egy vagy több enzimet tartalmazó terméket jelent. A mátrixban szuszpendálható enzimek példaként megemlítjük az alábbiakat: 60 amilázok, proteázok, invertázok, glükóz-oxidázok,

pektinázok, lipázok, laktázok és cellulázok. Az enzim mennyisége a mátrix tömegére számítva körülbelül 1 – körülbelül 30%, előnyösen körülbelül 5 – körülbelül 25%, a legelőnyösebb esetben körülbelül 10 – körülbelül 20 %.

A mátrixhoz felhasználható hordozóanyagokra példaként a szacharidok, a hőre lágyuló polimerek, biológiailag lebontható polimerek és vízzoldható cellulóz anyagok említhetők. A szacharidok közül például a szacharóz, laktóz, fruktóz, dextróz, szorbit, mannit, maltóz és ezek keverékei használhatók. Ezen túlmenően a szacharidok közül alkalmazhatjuk még a polidextrineket, maltodextrineket és ezek keverékeit. A hőre lágyuló polimerek közé tartozik a polipropilén, polisztirol, polietilén, polivinilacetát, polivinilalkohol, poli(metil-metakrilát), poli-akrilgyanták, laktid/glikolid kopolimerek és ezek keverékei. A biológiailag lebontható polimerek közé tartoznak a poli(cisz-izoprén) alifás poliészterek, poliuretánok és karbamid-formaldehid polimerek. A cellulóz anyagok vízzoldhatóak, és közéjük tartozik a metil-cellulóz, etil-cellulóz, hidroximetil-cellulóz, hidroxietil-cellulóz, a karboximetil-cellulóz alkálifémsói és ezek keverékei.

A találmány eredményeként az enzimeket szuszpendálhatók, stabilizálhatók, diszpergálhatók és általában megválasztott körülmények között a kívánt helyen igény szerint előállíthatók. Különböző enzimtermékeket állíthatunk elő, amelyek a kiválasztott folyadékban, bió masszában, stb. egyenletesen diszpergálhatók vagy feloldhatók. A találmány szerinti eljárással olyan enzimtermékeket is előállíthatunk, amelyek a felhasználás előtt hosszú időn át megőrzik aktivitásukat. A találmány szerinti mátrix korántsem teljes felhasználási területei: erjesztő anyagok, alkohol fermentáló szerek, detergenszek, emésztést elősegítő termékek, klinikai diagnosztikai szerek, bió gyógyszerek, húspuhító termékek, sebtisztító anyagok és egyéb terápiás alkalmazású anyagok.

A találmányt az alábbiakban részletesen ismertetjük.

A találmány szerinti eljárással egy nem-szálas enzimhordozó mátrix állítható elő oly módon, hogy egy hordozó alapanyagot és egy enzimet olyan hőmérsékleti és nyíró körülményeknek teszünk ki, amelyeknek a hatására mátrix képződik. Ezt az enzim és a hordozóanyagok olvadáspontja útján előállíthatjuk meg. A mátrix számos enzim alapú termékben előfordulhat, így például élesztő anyagokban, alkohol fermentáló anyagokban, detergenszekben, diagnosztikai szerekben, lebontóanyagokban, ásványolaj szénhidrogénbontó anyagokban, emésztést elősegítő anyagokban, terápiás enzimekben, stb.

A fonási eljárás „vattacukor”-gyártó berendezéshez hasonló készülékben végezhető. A találmány szerinti eljárásban alkalmazott vattacukorgyártó berendezés például a Gold Medal Products Company of Cincinnati, Ohio által gyártott 3017 sz. Econo Floss berendezés lehet. Szakember számára teljesen érthető, hogy bármely olyan készülék vagy fizikai eljárás alkalmazható, amellyel hasonló erőhatás és hőmérsékleti viszonyok hozhatók létre. Egyszerűség kedvéért az „olvadáspont” kifejezés olyan eljárást jelent, amely magában fog-

lalja a vattacukorgyártó berendezés által létrehozott hőmérséklet, nyíróerő, folyás, folyási sebesség, mechanikai erők és hőmérsékleti gradiens kombinációját.

A berendezést olyan hőmérsékleten és sebességgel üzemeltetjük, amely az adott hordozóanyagban – a kezelt hordozóanyag és enzimek) degradálódása nélkül – pillanatfolyást hoz létre. A képződött mátrix pehely, szemcse, pikkely, túcske vagy egyéb, meghatározhatatlan alakú aggregátum, amely képes arra, hogy védett állapotban szolgáltatssa az enzimet.

A mátrix előállítására szolgáló eljárás értelmében úgy járunk el, hogy egy enzimet és egy hordozóanyagot tartalmazó keveréket egyidejűleg megnövelt hőmérsékleti és nyíró hatásnak vetünk alá oly módon, hogy az alkotórészeket a centrifugális erő segítségével nyíláson visszük át. Az alkotórészeket érő, nagyon rövid időtartamú megnövelt hő- és nyíróhatás lehetővé teszi, hogy a mátrixképződés károsodás nélkül menjen végbe.

A pillanatfolyási jelenség akkor jön létre, amikor a szilárd hordozóanyaggal összekevert enzimet annyi ideig vetjük alá az olvadáspont körülményeinek, hogy belső folyás jöjjön létre. Ez az állapot az anyag fizikai és/vagy kémiai szerkezetének – degradáció nélkül végbemenő átalakulását eredményezi. Belső folyás akkor jön létre, ha az anyag infrastruktúrája oly mértékben meggyengül, hogy az anyag szubpartikuláris vagy esetleg molekuláris részecskéinek mozgása lehetővé válik. Molekuláris szintű belső folyásnál a molekulák egymáshoz képest történő relatív elmozdulására számíthatunk.

Az anyag belső folyása általában az olvadásponthoz vagy üvegesedési ponthoz kapcsolható. Azonban hő és külső erő megfelelő kombinációja révén a legtöbb keverék esetén az olvadáspont, illetve az üvegesedési hőmérséklet alatti hőmérsékleten is létrejöhet a belső folyás.

A mátrixban diszpergált enzimeket állati-, növényi- és mikrobiális-eredetű készítményekből választjuk. Ezeket az enzimeket élesztőtermékek, alkoholerjesztő anyagok, detergenszek, klinikai diagnosztikai szerek vagy bió gyógyszerek és ezek keverékeinek részeként használhatjuk. Példaképpen megnevezzük az alábbiakat: amilázok, proteázok, invertázok, oxidázok, katalázok, pektinázok, lipázok, laktázok, cellulázok és ezek keverékei.

A találmány egyik kiviteli módja szerint a mátrixot előállíthatjuk úgy, hogy a hordozóanyagot bontóenzimekkel, így cellulózokkal, kutinázokkal, lipázokkal és pektinázokkal és ezek keverékeivel keverjük össze. Cellulóz források közé tartoznak a Trichoderma, Penicillium, Aspergillus, Clostridium, stb. nemzetségből származó anyagok. További cellulázok a kereskedelmi forgalomban beszerezhető cellulázok. Az ilyen cellulázok képesek arra, hogy a gyümölcsök és zöldségek felszíni membránjának részét képező, vízben oldhatatlan cellulóz polimert lebontsák.

Kutináz források közé tartoznak a Pseudomonas, Fusarium, Botrytis, Ulocladium, stb. nemzetségből származó anyagok. További kutinázok a kereskedelmi forgalomban beszerezhetőek. A kutinázok képesek arra,

hogy a gyümölcsök és zöltségek felszíni membránjának a részét képező, vízben oldhatatlan kutin polimert lebontsák.

Lipáz források közé tartoznak a *Staphylococcus*, *Candida*, *Rhizopus*, stb. nemzetségből származó anyagok. További lipázok a kereskedelmi forgalomban beszerezhetők. Az ilyen lipázok képesek arra, hogy a gyümölcsök és zöltségek felszíni membránjának részét képező, vízben oldhatatlan glicerinnel komponenseket lebontsák.

Pektináz források közé tartoznak a *Rhizopus*, *Penicillium*, *Aspergillus* stb. nemzetségből származó anyagok. További pektinázok a kereskedelmi forgalomban beszerezhetők. Az ilyen pektinázok képesek arra, hogy a gyümölcsök és zöltségek felszíni membránjának a részét képező, vízben oldhatatlan pektin komponenseket lebontsák.

A találmány szerinti, enzimet hordozó mátrix sokféleképpen felhasználható. Így például egy cellulóz mátrix felhasználható arra, hogy növelje a zöltségek és gyümölcsök felszíni membránjának az áteresztőképességét. A felszíni membrán vízáteresztőképességének a növekedése könnyebbé teszi az anyagok, így ízanyagok, édesítőszer, stabilizátorok és tartósítószer bejuttatását a gyümölcs és zöltség belsejébe. Ezenkívül a megnövekedett vízáteresztőképesség a gyümölcs és zöltség sokkal hatékonyabb vízmentesítésére is módot nyújt. Sokkal fontosabb az, hogy a természetes úton előállított lebontó enzimek áteresztőképességet növelő anyagként történő alkalmazása lehetővé teszi vegyszerek, így a metanol, kloroform vagy alkálifém-hidroxidok helyettesítését, amelyek, ha a szervezetbe kerülnek, káros mellékhatásokat gyakorolhatnak a gyümölcsöt és zöltséget fogyasztókra.

A találmány szerinti, enzimet hordozó mátrix másik fontos alkalmazási területe a klinikai diagnosztikai termékek előállítása. A klinikai diagnosztikai termékekben található hatóanyagok például az alábbiak: aszkorbinsav oxidáz, α -glicerinfoszfát oxidáz, laktát oxidáz, uriáz, koleszterin észteráz, koleszterin-észter hidroláz, kreatinin aminoszteráz, lipáz, glicerinnel kináz és ezek keverékei.

A klinikai enzimtermékek különösen jól használhatók a találmány szerinti mátrixszal, ha száraz enzimport kívánunk vizes oldatban diszpergálni. Szakember számára nyilvánvaló, az összes hatóanyagot száraz vagy liofilizált formában is előállíthatjuk és a felhasználás előtt vízben feloldjuk. Az ilyen típusú kompozíciók is a találmány oltalmi körébe tartoznak. A találmány szerinti mátrix által hordozott klinikai diagnosztikai enzimek is elkészíthetők az irodalomból ismert egyrétegű vagy többretegű analitikai elemek alakjában.

A találmány értelmében a mátrixot arra is használhatjuk, hogy növelje az immunkísérletekben használt enzimek tárolási idejét és aktivitását. Így például, ha a torna-peroxidáz a találmány szerinti mátrixszal együtt olvadékfonásnak vetjük alá, az enzim tárolási ideje hosszabb lesz és sokkal könnyebben aktiválható.

A találmány szerinti enzimtermékek másik csoportját a javított detergens enzimek képezik. A detergens enzimek az irodalomból olyan enzimekként ismertek,

amelyek megtámadják a textiliák foltjait és szennyeződéseit. A javított detergensekben található aktív detergens enzimek közé tartoznak a proteázok, lipázok, amilázok és ezek keverékei. Az előnyös detergens enzimek a proteázok, így a subtilizin és az amilázok, így a bacillus-fajokból származó amilázok.

Az új mátrixot önmagában vagy egyéb alkotókkal kombinálva használhatjuk abból a célból, hogy a beadagolt alkotórészeket az anyagban diszpergáljuk. Így például részecskéket, forgácsot, pelyheket, tücskéket vagy kombinációit használhatunk olyan enzimek diszpergálására, amelyek egyébként az ilyen anyagok fizikai tulajdonságai következtében viszonylag nemdiszpergálhatók. Így a találmány szerinti mátrixot arra használhatjuk, hogy a detergens készítményekben jelenlevő egyéb anyagokban, így felületaktív anyagokban, mosószerépítőben, fehérítőszerben, színtelenítőszerben és hasonlóknál könnyebben és egyenletesen diszpergálható detergens enzimeket hordozza.

Az enzimek bizonyos kiviteli alakjai a gazda mikroorganizmusokban, így például gombákban, baktériumokban, algákban vannak jelen. A gazda mikroorganizmusok példái közé tartoznak az élesztők, bió gyógyászati anyagok és hasonlóak.

A találmány értelmében az élesztőket jól megválasztott hordozóanyagokkal együtt olvadékfonásnak vethetjük alá, hogy megnövelt élesztőképességű termékeket állítsunk elő. Az élesztők számos fermentációs folyamatban alkalmazott, enzimentartalmú, egysejtű mikroorganizmusok. A nagyban előállított fermentált italok, élelmiszerek, vitamin-termékek, fermentált alkoholos italok, fermentációval előállított antibiotikumok gyártásához élesztőkre vagy azok enzimeire van szükség, hogy a termékeket a kiindulási anyagnál egyszerűbben állíthassuk elő. Az alkalmazott szubsztrátumtól vagy a kiválasztott mikroorganizmustól függetlenül az ipari fermentációs folyamatokban különféle, szénhidrátokat, nitrogéntartalmú vegyületeket, növekedési faktorokat, vitaminokat és ásványi anyagokat tartalmazó táptalajra van szükség. A legtöbb fermentációban ezeket a tápanyag követelményeket – többek között – az élesztőtermékek kielégítik.

Az alkoholos italok gyártásának legfontosabb alapanyagai a gabonamagnak. Másik fontos alkotóelem az amiláztermelésre használt maláta. Az amilázok olyan szerves enzimek, amelyek a gabonamag keményítőtartalmát maltózzá alakítják. A fermentáció során az élesztő által termelt zimáz az amiláz által előállított maltózt etilalkohollá és szén-dioxiddá alakítja. Az alkoholos fermentációban zimáz előállítására leggyakrabban használt élesztő a *Saccharomyces cerevisiae*.

A fermentációs folyamatokban kívánatos metabolikus változások gyakran szűk hőmérsékleti és pH-tartományban mennek végbe. Következésképpen, a termék kitermelésének a növelése érdekében fontos, hogy szűk hőmérséklet- és pH-tartományban működő enzimaktivitású élesztőt használjunk. Ezenfelül a termék kitermelésének az optimalizálása érdekében arra van szükség, hogy az élesztő a célfolyadékban gyorsan és jól diszpergálható legyen. Így a találmány szerinti mátrix

rixban szuszpendált élesztők könnyen diszpergálhatók a tápoldatban, és néhány esetben azt tapasztaltuk, hogy aktivitásuk sokkal jobb.

A találmány szerint a mátrixot felhasználhatjuk arra is, hogy növelje az élesztőkben használt enzimek tárolási idejét és aktivitását. Így például, amikor Fleischman-féle szárított élesztőt vetünk alá olvadékfonásnak a találmány szerinti mátrixszal, az élesztő tárolási ideje hosszabb és aktivitása nagyobb lesz.

A találmány szerinti enzimhordozó mátrix másik ki-tűnő alkalmazási lehetősége az ásványolaj szénhidrogé-nek biológiai lebontása. Számos baktérium, gomba és alga képes az ásványolaj szénhidrogénjeit enzimatikusan táplálékként hasznosítani. A szénhidrogénbontóként leg-nyakrabban elkülönített baktériumok a *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter*-nemzetségek. A gomba-nemzetségek közé tartoznak a *Candida*, *Cladosporium*, *Trichosporium* és *Rhodotorula* nemzetségek. Ezek a baktériumok és gombák a környezetünkben megtalálha-tók. Az olyan, genetikai úton előállított baktériumokat, amelyek számos szénhidrogén enzimátikus bontására képesek, szintén felhasználhatjuk az ásványolaj bioló-giai bontására.

A találmány szerinti mátrix alkalmazásával lehető-ség nyílik arra, hogy ezeket a biológiai lebontószereket táptalajukkal együtt gyorsan és egyenletesen diszper-gáljuk az egyébként hidrofób vagy elegyíthetetlen kör-nyezetben. Ily módon a kiömlött olaj feltisztítása sokkal gyorsabban végezhető el.

A találmány szerint az enzimhordozó mátrixot fel-használhatjuk a fokozott olajkitermelés területén is. A mátrixban szuszpendált mikrobatermékek, valamint az életképes mikroorganizmusok stimulálózszereként használhatók az ásványolajkitermelés növelésére. Így például az *Acinetobacter calcoaceticus* törzs emulzánt – egy lipopoliszacharidot – termel, amelyet olaj-a-vízben emulziók stabilizálására használnak. A *Xanthomonas campestris* mikrobatermék xantánt – egy poliszacharidot – állít elő, amelyet az olajkitermelésben a beáramlott víz besűrítésére használnak. Mindkét említett mikrobater-mék könnyebben elegyíthető az ásványolaj tárolókban, ha a találmány szerinti mátrixszal együtt alkalmazzák. Az eredmény a megnövekedett olajkitermelés.

A mikroorganizmusok azon képessége, hogy az ásványolajat táplálékként hasznosítják, káros követke-zményekkel is járhat. Így például az ásványolaj-üzem-anyag a tárolás során nem szennyeződhet vízzel vagy mikroorganizmusokkal. Az ilyen szennyeződés számos problémát okozhat a kerozinüzemű repülőgép-üzem-anyagoknál. Ezen probléma csökkentése céljából az olaj/víz határfelületen koncentráldó mikrobaellenes szereket fel lehet használni arra, hogy csökkentsék a szénhidrogének mikrobaszennyeződési sebességét. A találmány szerinti mátrixszal mikrobaellenes szerve-zetek juttathatók az olaj/víz határfelületekre.

A találmány értelmében hordozóanyagként bármi-lyen anyag alkalmas, amely olyan mátrixszá alakítható, amely védően szuszpendálja az enzimet tárolása és/vagy helyszínrre szállítása alatt, és/vagy megvédi a

környezettől a felszabadítás és aktiválás során. A fel-használásra alkalmas hordozó anyag szacharidalapú, hőre lágyuló polimer, biológiailag lebontható polimer és/vagy vízdoldható cellulóz anyag és ezek keveréke lehet.

A felhasználásra alkalmas szacharid hordozóanya-gok példái az alábbiak: szacharóz, laktóz, fruktóz, dext-róz, szorbit, mannit, maltóz, szintetikus szacharid szár-mazékok, így poli-dextróz és hasonlók, valamint ezek keverékei. A szacharidok közül a maltodextrinek és/vagy keményítősörp sűrítmény is használhatók. Meg kell jegyezni, hogy a leírásban a maltodextrineket és a keményítősörp sűrítményt (az FDA meghatározá-sának megfelelően) együttesen maltodextrineknek ne-vezzük.

A megfelelő, hőre lágyuló polimerek közé tartoznak a polipropilén, polisztirol, polivinil-acetát, polivinil-alkohol, poli(metakrilátok), poliakril-gyanták, lak-tid/glikolid kopolimerek és ezek keverékei. Alkalmas vízdoldható cellulóz anyag a metil-cellulóz, etil-cellulóz, hidroximetil-cellulóz vagy hidroxietil-cellulóz, karb-oxi-metilcellulóz alkálifém-sói és hasonlók, valamint ezek keverékei.

A találmány egyik előnyös kiviteli alakjában egye-dülálló tulajdonságai alapján a maltodextrint választot-tuk a találmány szerinti mátrix hordozóanyagaként. A maltodextrinek vízdoldható glükóزالapú polimerekből állnak, amelyeket víz jelenlétében állítanak elő kemé-nyítőből enzimmel vagy savval végzett reagáltatással. A hirolízises reakció során szacharidok szénhidrát-ele-gye jön létre, amelynek dextróz-egyenértéke (D. E.) <40. A találmány egyik kiviteli alakja szerint a dextróz-egyenérték (D. E.) 20–40. (Ezeket a maltodextrin ter-mékeket az FDA a keményítősirup sűrítmények közé sorolja). A találmány másik kiviteli alakjában a dext-róz-egyenérték (D. E.) 10 és 20 közötti. A találmány ér-telmében előnyösen használható maltodextrinek a MALTRIN néven forgalmazott termékek, amelyeket a Grain Processing Corporation állít elő (Muscatine, Iowa, US) vagy a „Dri-Sweet” néven forgalmazott maltodextrinek, amelynek a gyártója a Hubinger Company (Keokuk, Iowa, US). Ezek a termékek por, granula vagy hasonló formában kaphatók.

Az enzimet és a maltodextrint a két alkotóelem fizi-kai összekeverésével egyesíthetjük. Az alkotóelemek keverőgéppel vagy bármilyen egyéb ismert keverési módszerrel egyesíthetők. A maltodextrin és enzim disz-perzióként is összekeverhető. A diszperzió készítéshez az alkotóelemek keverékét vizes közeggel hozzuk érint-kezésbe. A diszperzió lehetővé teszi egyéb anyagok be-keverését is, így a végső enzimtermékben az összes alkotóelem lényegében homogén keverékét kapjuk.

A találmányt az alábbi példák mutatjuk be anél-kül, hogy a találmányt a példákban szereplő megoldá-sokra korlátoznánk.

1. példa

Vízelenített joghurt előállítás

Egy adag Columbo néven forgalmazott, laktáz enzi-met tartalmazó zsírszegény joghurtot (No Fat Yogurt) –

a víz nagy részének a kicsepegtetése céljából – túlszerű anyagban 48 órára hűtőszekrénybe helyeztünk. A víztelenített joghurtot 1:9 arányban összekevertük 35R keményítőszirup sűrítménnyel. Ezután a keveréket Econo Floss berendezésben 135–145 °C hőmérsékleten, 3600 ford./perc sebességgel olvadátfonásnak vetettük alá, így lemezes terméket kaptunk, amelyet hét napon át hűtés nélkül pihentettünk. A hét-napos periódus végén a lemezes terméket leföldrőzt tejhez adtuk, 4 teáskanál lemezke: 1 csésze leföldrőzt tej arányban. Majd ezt a keveréket 24 órán keresztül 43,5 °C-on tartottuk.

Jó ízű, sima szerkezetű joghurtot kaptunk, ebből azt a következtetést lehet levonni, hogy a találmány szerinti eljárással olyan víztelenített joghurt állítható elő, amely így szárított formában tárolható, majd a későbbiekben ismét joghurtta alakítható.

2. példa

Módosított élesztőtermék előállítása

Ezt a példát „Fleischman” gyártmányú, kereskedelemben kapható, szárított, csomagolt élesztővel valósítottuk meg. Két csomag élesztőt 20 g polipropilén porral (gyártja az Aldrich Chemical Co., Inc.) kevertünk össze. Az összekeverés után a keveréket pillanatfolyást előidéző Econo Floss berendezésben dolgoztuk fel 135–145 °C-on 3600 ford./perc sebességgel, így szálaspelyhet kaptunk.

Előkészítettünk három darab, 0,473 literes műanyag palackot. Az első palackba (#1 palack) 10 g – előzőleg csapvízzel leöblített – fenti pelyhet helyeztünk. A második palackba (#2 palack) öblítés nélkül azonos mennyiségű pelyhet helyeztünk. A harmadik palackba (#3 palack) egy csomag élesztőt szórtunk. Mindegyik palackhoz 3 g szacharózt és 0,236 liter csapvizet adtunk. Mindegyik palack nyakára gumiballont erősítettünk és a három gumiballont 24 órán keresztül megfigyelés alatt tartottuk.

Azt figyeltük meg, hogy a fejlődő gáz kisebb vagy nagyobb mértékben megduzzasztotta a ballonokat. A kiértékelést egy 1-től 5-ig terjedő skála alapján végezve, ahol a minimum érték 1, a maximum érték pedig 5, az alábbi relatív növekedést tapasztaltuk. Az #1 palacknál a duzzadás 2 és 24 óra elteltével körülbelül 3, illetve 4 volt. A #2 palacknál ugyanezen időközökben 2 és 4, míg a #3 palacknál a duzzadás 2 és 24 óra elteltével 1 és 5 volt.

A fentiekből megállapítható, hogy a pehellyel módosított élesztő gyorsabban aktiválódott, mint az eredeti, módosítatlan élesztő, a pehely átöblítése gyorsítja a pehelyből felszabaduló élesztő aktivitását, és 24 óra elteltével – akár átöblítettük a pelyhet, akár nem – a pehely lényegében ugyanazt a teljes aktivitást mutatja. A pehelyből származó élesztő aktivitása következtében képződött teljes gázmennyiség azonban valamivel kisebb, mint a módosítatlan élesztő esetében.

A pelyhes anyagban alkalmazott élesztő könnyebben kezelhető és masszákba történő bekeveréshez ideális, ilyen például a sütési folyamatban használt tészta-massza vagy a fejlesztő folyamatokban alkalmazott bió-massza.

3. példa

Lemezes tejsavtenyészet előállítása

A Chris Hansen Laboratories által előállított, Streptococcus thermophilus-t és Lactobacillus bulgaricus-t tartalmazó Dri-Vac Lactic tenyészet 10 g-ját 5 g kukoricacsíra-olajjal kevertük össze. A keverékhez lassan hozzáadtunk 85 g Maltrin 365-öt (gyártó: Grain Processing Corporation [GPC]) és a keverést addig folytattuk, amíg az összes alkotórész alaposan el nem keveredett. A végső keverék egyharmadát kontroll mintaként kivéve, a maradék kétharmad részt Econo Floss berendezésben 135–145 °C-on 3600 ford./perc sebességgel pillanatfolyási folyamatban vékony lemezes termékke alakítottuk.

Az alábbi tenyészet mintákat készítettük elő:

A) 180 g sterilizált teljes tej 2,5 g fenti lemezes termékkel elegyítve,

B) 180 g sterilizált teljes tej 2,5 g – pillanatfolyásnak alá nem vetett, kontroll keverékkel elegyítve,

C) 180 g sterilizált teljes tej 0,25 g Dri Vac Lactic tenyészettel elegyítve.

A mintákat 40 °C-on vízfürdőn egy éjszakán keresztül tenyésztettük. Az A) mintából sima, tömör és egészséges joghurt keletkezett, amely kanállal feldarabolva bárnyosan sima szerkezetű. A B) és C) mintából képződő joghurt durva, porózus szerkezetű volt. A B) és C) minta állaga nem volt olyan tömör, mint az A) mintáé. Az A) minta szerkezete kellemesebb íz-érzetet keltett, mint a B) és C) mintáké.

A lemezes termékkel sokkal könnyebb adott mennyiségű tenyészetet adagolni a sterilizált tejhez, mint az eredeti tejsavas tenyészetből. Így a találmány a gyártók számára előre meghatározott eredményű és sokkal hatékonyabb joghurt gyártást tesz lehetővé.

4. példa

Élesztőtermék előállítása

Ennek a példának a megvalósításához „Fleischman” gyártmányú, kereskedelemben kapható szárított, csomagolt élesztőt használtunk. Az élesztőt kerámia mozsárban mozsártörővel elporítottuk és 0,18–0,25 mm (60–80 mesh) méretű szitán átszittattuk. 5 g szitált élesztőt 2,5 g kukoricacsíra-olajjal kevertünk össze. A keveréket 42,5 g Maltrin 365 néven forgalomba hozott, GPC gyártmányú maltodextrinhez adtuk és homogén élesztőkeverék kialakulásáig kevertük.

Az élesztő-keverékből Econo Floss berendezésben 135–145 °C-on 3600 ford./perc sebességgel élesztőtartalmú lemezes terméket állítottunk elő.

Előkészítettünk két darab 0,473 literes műanyag palackot. Az első palackba (#1 palack) 10 g élesztőtartalmú lemezes terméket tettünk. A második palackba (#2 palack) 1 g szitált élesztőt tettünk. Mindkét palackhoz 15 g szacharózt és 0,236 liter csapvizet adtunk. Mindkét palack nyakára gumiballont erősítettünk, a ballonokat 24 órán át megfigyelés alatt tartottuk.

A ballonok növekedésére vonatkozóan azt tapasztaltuk, hogy a lemezes terméket tartalmazó palack balonja körülbelül azonos mértékben nőtt, mint az élesztőt tartalmazó palacké. Az #1 palack esetében azonban a

növekedés sebessége kisebb volt, mint a #2 palack ballonjéé.

A találmány szerinti módon előállított lemezes termék olyan nagy tömegű masszák esetében, mint a sütéshez használt tészta vagy a fermentációnál alkalmazott bió massa, jobban kezelhető és keverhető élesztő anyagot biztosít.

5. példa

Peroxidáz tartalmú termék előállítása

95 g Maltrin 365-öt (gyártó: GPC) és 0,1 g torna peroxidázt (gyártó: Genzyme Diagnostics) mértani hígítással alaposan összekevertünk. Keverés közben lassan 5 g ásványolajat adtunk hozzá és a keverést addig folytattuk, amíg egyenletes keveréket kaptunk.

Az enzimkeverékből Econo Floss berendezésben pillanatfolyással, 135–145 °C-on, 3600 ford./perc sebességgel világos rózsaszín, lemezes terméket állítottunk elő.

Az átalakított és átalakítatlan enzim enzimaktivitását a peroxidázos módszerrel végeztük el. Ezt a módszert a Genzyme Diagnostics cég fejlesztette ki. A módszer elve a pirogallol oxidációja peroxidáz segítségével purpurogallinná. A reakcióképességet meghatározott időközönként ultraibolya (UV) spektrofotometriás módszerrel mérik. A reakciósebességet a görbe 20 és 30 s közötti meredekségéből határozzák meg.

Az enzim a pillanatfolyással végbemenő folyamat után a lemezes termékben aktív maradt. Az átalakított és átalakítatlan enzimmintákat egy órán át 135 °C-on tartottuk, majd meghatároztuk az aktivitást. A lemezes termékben az enzim aktivitása az inkubálás előtti értéken maradt, míg az átalakítatlan enzim aktivitásának körülbelül 20%-át elvesztette. Így a találmány szerinti eljárás az enzim stabilitását szignifikánsan növeli.

6. példa

Amiláz tartalmú termék előállítása

100 g, Maltrin 365-öt (gyártó: GPC) és 10 tömeg Termamyl néven forgalmazott amiláz enzimet (gyártó: Novo Nordisk, DK) tartalmazó keveréket mozsárban mozsártörővel alaposan összekevertünk. A keveréket Econo Floss berendezésben 3600 ford./perc sebességgel, 135–140 °C hőmérsékleten pillanatfolyással dolgoztuk fel. A kapott anyagot az enzimaktivitás vizsgálatáig 5 °C hőmérsékleten tároltuk.

Ezután a kapott lemezes anyag és az átdolgozatlan enzim mintákat a stabilitás meghatározása céljából kemencében 100 °C-on egyensúlyi állapotba hoztuk. Négy óra múlva a lemezes termékben levő enzim eredeti aktivitását lényegében megtartotta, míg az átdolgozatlan minta eredeti aktivitásának több, mint felét elvesztette.

Az enzimaktivitást a „Manual Procedure for Determination of Alpha-Amylase Activity in Enzyme Preparations and Detergents” című szakkönyvben leírt módszer alapján határoztuk meg. Ezt a módszert a Novo Nordisk Bioindustrials, Inc. cég dolgozta ki. A módszer lényege a keményítő polimer szubsztátum lebontása al-

fa-amiláz segítségével. Phadebas tablettákat (Phadebas Amylase Test, gyártó: Pharmacia Diagnostics) használnak. Ez az anyag térhálós, vízben oldhatatlan, kék színű keményítő polimer. A tablettá ezenkívül szarvasmarha szérum-albumint és pufferanyagot is tartalmaz. Miután a tablettát vízben szuszpendálják, majd a keményítőt az alfa-amiláz hidrolizálja, oldható, kék színű fragmentumok keletkeznek. Az így keletkező kék színű oldat abszorbanciáját 620 nm-en (W spektrofotométerrel) meghatározva kapják az alfa-amiláz aktivitását.

Így a találmány segítségével olyan enzimetartalmú lemezes terméket állítottunk elő, amely a fenti egyensúlyi feltételek között hosszabb ideig marad aktív, mint a kezeletlen enzim.

7. példa

Proteáz tartalmú termék előállítása

200 g, Maltrin 365-öt (gyártó: GPC) és 10 tömeg% Alcalase néven forgalmazott proteáz enzimet (gyártó: Novo Nordisk, DK) tartalmazó keveréket mozsárban mozsártörővel alaposan elkevertük. A keveréket Econo Floss berendezésben 3600 ford./perc sebességgel, 135–140 °C hőmérsékleten pillanatfolyással dolgoztuk fel. A képződött anyagot az enzimaktivitás vizsgálatáig 5 °C hőmérsékleten tároltuk.

Ezután az átdolgozatlan és az átdolgozott enzim mintáját 57 °C-on 21 órán át kemencében tartottuk, hogy a stabilitás meghatározása céljából egyensúlyi állapotba hozzuk. 21 óra elteltével mindkét minta lényegében ugyanolyan aktivitást mutatott, mint az eredeti átdolgozott és átdolgozatlan minta.

A proteolites aktivitást a „Determination of Proteolytic Activity Using Azocasein as a Substrate” módszerrel határoztuk meg. Ezt a módszert a Novo Nordisk Bioindustrials, Inc. cég dolgozta ki. A módszer alapelve az, hogy hagyjuk, hogy a proteolites enzim 30 percen át 40 °C-on hidrolizálja az azokazeint. A feltáratlan proteint triklórecetsavval kicsapjuk és a feltárt termék mennyiségét ultraibolya (UV) spektrofotométerrel meghatározzuk.

A pillanatfolyási folyamat után a proteáz enzim ugyanolyan hosszú ideig megtartotta aktivitását, mint a kezeletlen enzim.

A találmány szerinti termékek és eljárás jelentős javulást eredményeznek az enzimkezelésben és felhasználásban.

A fentiekben a találmány előnyös kiviteli módjait mutattuk be, szakember azonban számos módosítást végezhet anélkül, hogy a találmány szellemétől eltérne, ezek szintén a találmány oltalmi körébe tartoznak.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás enzimettermék előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy, az enzimet és egy hordozóanyagot tartalmazó nyersanyagot pillanatfolyásnak alávetve enzimhordozó mátrixot állítunk elő, ahol a hordozóanyag fizikai és/vagy kémiai szerkezetét megváltoztattuk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a nyersanyagot egyidejűleg pillanatszerűen fellelegítjük és fizikai erőhatásnak tesszük ki.

3. A 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a mátrixot a nyersanyag olvadátkonaszával hozzuk létre.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a hordozóanyagot a szacharidok, hőre lágyuló polimerek, biológiaiilag lebontható polimerek és vízóldható cellulózanyagok közül választjuk.

5. A 4. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a szacharidokat a polidextrókok, maltodextrinek, szacharóz, laktóz, dextróz, mannit, szorbit, glükóz, maltóz és ezek keverékei közül választjuk.

6. A 4. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a hőre lágyuló polimereket a polipropilén, polisztirol, polietilén, polivinilacetát, polivinilalkohol, poli-metakrilát, poliakril-gyanták, laktid/glikolid kopolimer-ek és ezek keverékei közül választjuk.

7. A 4. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a biológiaiilag lebontható polimereket a poli(cisz-izoprén), alifás poliészterek, poliuretánok és karbamid-formaldehid polimerek közül választjuk.

8. A 4. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a cellulóz anyagokat a metil-cellulóz, etil-cellu-lóz, hidroximetil-cellulóz, hidroxietil-cellulóz, karb-

oxi-metil-cellulóz alkálifém-sói és ezek keverékei kö-zül választjuk.

9. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az enzimet az amilázok, proteázok, invertázok, oxidázok, katalázok, pektinázok, lipázok, laktázok, cellulázok és ezek keverékei közül választjuk.

10. A 9. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az enzim a mátrix tömegére számítva 1–30% mennyiségben van jelen.

11. A 10. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az enzim 5–25% mennyiségben van jelen.

12. A 11. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az enzim 10–20% mennyiségben van jelen.

13. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az enzimet az élesztőanyagok, fermentációs anyagok, biológiaiilag lebontható termékek, detergen-sek, immunvizsgálathoz használható szerek, klinikai di-agnosztikai szerek, élelmiszer emésztést elősegítő sze-rek és terápiás anyagok közül választjuk.

14. Eljárás detergens előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy, az enzimet és egy hordozóanyagot tartalma-zó nyersanyagot pillanatfolyásnak alávetve enzimhor-dozó mátrixot állítunk elő, ahol a hordozóanyag fizikai és/vagy kémiai szerkezetét megváltoztattuk, az enzim-hordozó mátrixot detergens alkotórészekkel kombi-náljuk.