

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: restriktív endonukleázok, reverz transzkriptáz, DNS-ligáz, DNS polimeráz,



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

1

Enzimtechnikai alapfogalmak

Szakaszos reaktorok: a betáplálás és az elvétel időben elkülönül egymástól.

Folytonos reaktorok: a betáplálás és az elvétel egyidejűleg folyik.

Ezek kombinálhatók valamelyik komponens recirkulációjával illetve visszatartásával.

Konverzió:
$$X_s = \frac{n_{s0} - n_s}{n_{s0}}$$

Szakaszos reaktorban a konverzió a reakció előre haladásával növekszik, míg el nem éri az egyensúlyt (=egyensúlyi konverzió)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

Enzimtechnikai alapfogalmak

Hozam:
$$\eta_p = \frac{n_p - n_{p0}}{n_{s0}} \left(\frac{v_s}{v_p} \right)$$

Ahol: n_p – a termék mólszáma a reakció végén
 n_{p0} – a termék mólszáma a reakció elején
 n_{s0} – a szubsztrát mólszáma a reakció elején
 v_s – a szubsztrát sztöchiometriai együtthatója (hány molekula vesz részt a reakcióban)
 v_p – a termék sztöchiometriai együtthatója (hány molekula képződik a reakcióban).



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

3

Enzimtechnikai alapfogalmak

Szelektivitás: $\frac{\text{szintetizált (céltermék) mólok száma}}{\text{konvertált mólok száma}}$

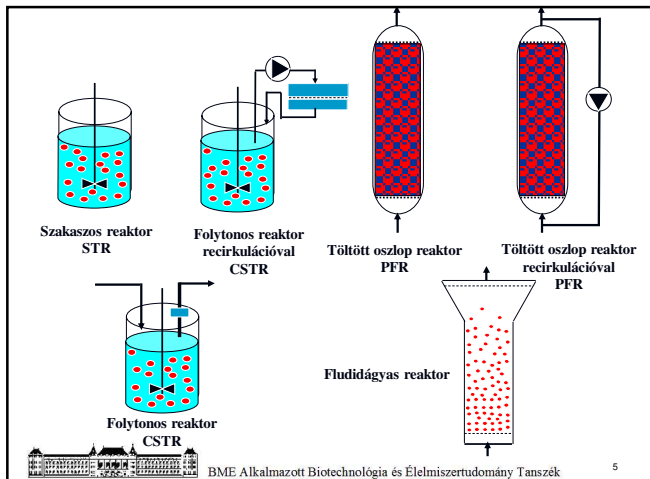
$$\sigma_p = \frac{n_p - n_{p0}}{n_{s0} - n_s} \left(\frac{v_s}{v_p} \right)$$

Ennek értéke akkor közelít az egyhez, ha nem keletkeznek melléktermékek.

A definiált jellemzők közötti összefüggés:

$$\eta_p = \sigma_p \cdot X_s$$





Ipari technológiák rögzített enzimekkel

Aminoaciláz	D,L-aminosavak reszolválása
Glükóz izomeráz	Glükóz → fruktóz konverzió
Penicillin amidáz	Penicillin oldallánc csere
β-galaktozidáz	Tejucukor hidrolízise
Lipáz	Trigliceridek hidrolízise és átészterezése
Termolizin	Aszpartám gyártás



MEGOSZLÁS IPARÁGAK SZERINT

Élelmiszeripar (ebből keményítőipar)	45% 11%)
Detergens ipar	34%
Textilipar	11%
Bőripar	9%
Papír	1,2%



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

7

IPARI ENZIMEK PIACA

Néhány multi urálja:

- NOVO Nordisk (DK)
- DSM-Gist (NL)
- IBIS
- Genencor (USA)
- Rhone Poulenc (F)
- Solvay Enzym
- Miles Chemicals (USA)

- USA 40 %
- Európa 35 %
- Japán 24 %

Enzim	Érték (piac %)
Bacillus proteázok	45
Glükamilázok	13
Bacillus amilázok	5
Glükóz izomerázok	6
Rennin (mikrobiális)	10
Amilázok (penész)	4
Pektinázok	3
Proteázok (penész)	2
Egyéb	12

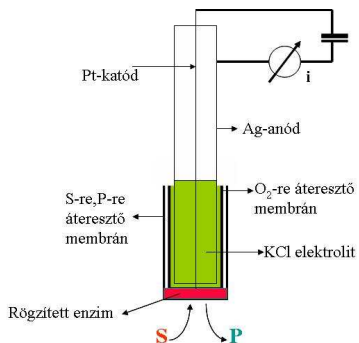


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

8

Enzimelektrodok: amperometria

Ez voltaképpen egy oldott oxigén mérő elektród, amelyre a membránok közé glükóz-oxidázt és katalázt rögzítettek. A két enzim által termelt oxigént méri amperometriásan az elektróda.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

9

Enzimelektrodok: potenciometria

penicillinG $\xrightarrow{\text{penicillináz}}$ penicilloinsav + H⁺

Lipid + víz $\xrightarrow{\text{lipáz}}$ Glicerín + zsírsav + H⁺

L-Asav + O₂ + H₂O $\xrightarrow{\text{L-aminosav-oxidáz}}$ ketosav + NH₄⁺ + H₂O₂

L-Asn + víz $\xrightarrow{\text{L-aszparagináz}}$ L-Asp + NH₄⁺

Referencia elektrod (kalomel)

membrán

üvegelektrod

Rögzített enzim

Enzimelektrodok: elektronátadás

Ha az enzim reakció során elektronátmenet történik (NAD-, FAD-mediált reakciók), az elektronátadás közvetlenül mérhető jelle alakítható:

mediátor

β -D-glucose $\xrightarrow{\text{glucose oxidase}}$ D-glucono-1,5-lactone + FAD \rightarrow FADH₂

FADH₂ + Ferrocene + 2H⁺ \rightarrow 2Fe⁺ + 2H₂O

2Fe⁺ $\xrightarrow{\text{Electrode}}$ 2e⁻ + Ferrocene

Ferricinium ion

Electrode

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 11

BIOSZENZOR

S $\xrightarrow{\text{E}}$ P

JEL \rightarrow JEL átalakító \rightarrow erősítő \rightarrow PC: számolás, konvertálás, kijelzés, tárolás...

Biokatalizátor (enzim, sejt) -átalakítja az analitikumot terméké

A változást elektromos jelle alakítja

PC: számolás, konvertálás, kijelzés, tárolás...

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 12

Enzimek felhasználása **analitikai** céllal

Ez esetben nem az enzim aktivitását mérjük meg, hanem egy vegyület koncentrációját igyekszünk meghatározni.

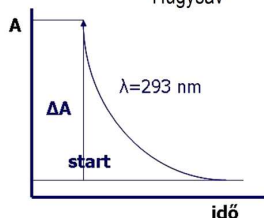
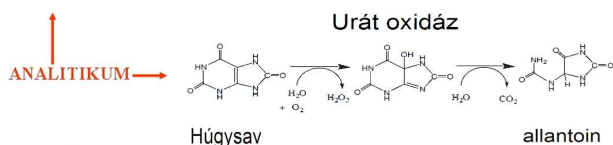
1. S meghatározása
2. I meghatározása
3. Marker (pl. immun assay-kben)

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Cél lehet: diagnosztika, biokémia



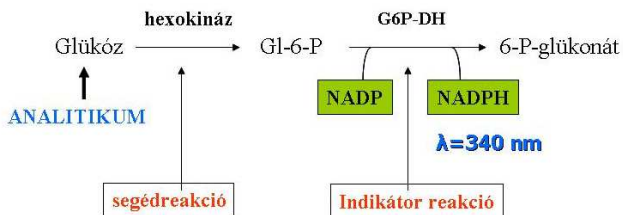
S-meghatározás, reakció végpontig



A reakció követése:
abszorbancia, vagy pH méréssel

S-meghatározás segédreakcióval

Ha S vagy P nem észlelhetők, egy segédreakcióval mérhetővé tehetjük. Pl.:

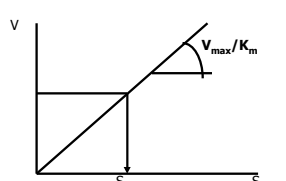
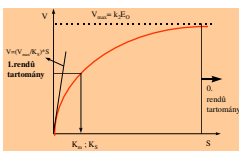


S mérés kinetikai vizsgálattal

A M-M görbe kezdeti, lineáris szakaszán a reakciósebesség egyenesen arányos S koncentrációjával.

Ha $S \ll K_m \rightarrow V \sim V_{max}/K_m \cdot S$

$-dS/dt$
 dP/dt

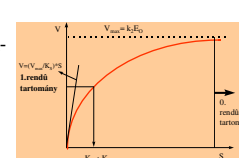



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 16

S mérés kinetikai vizsgálattal

A M-M görbe telítési, vízszintes szakaszán a reakciósebesség egyenlő v_{max} -al.

Ha $S \gg K_m \rightarrow V \sim V_{max} = k_2 E_0$



S így nem mérhető, de inhibitorok vagy aktivátorok meghatározhatók:

Heparin	→	trombin
Inszekticidek	→	acetilkolinészteráz

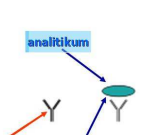
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 17

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Az immunreakciók önmagukban láthatatlanok, egy észlelhető enzim reakció hozzákapcsolásával teszik mérhetővé.

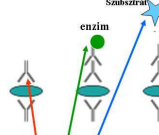
Enzyme Linked Immunosorbent Assay: Sandwich ELISA

1




(1) Rögzített ab(antitest)

2



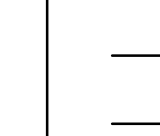
(2) Minta antigén kötődik az ab-hoz, mosás

3



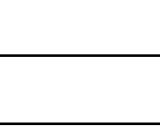
(3) Detektáló ab hozzáadása, kötődik az antigénhez

4



(4) Enzim-kötött másodlagos ab hozzáadása: kötődik a detektáló ab-hoz

5



(5) Szubstrát hozzáadás, enzim átalakítás detektálható terméké. (sokszorozás is)

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 18

Követelmények az analitikai enzimekkel szemben

- Specifitás (ne legyen mellékreakció más S-sel)
- Tisztaság
- Stabilitás
- Kinetikai tulajdonságok
- pH optimum
- Oldhatóság (ne csapódjon ki)
- Ár