

IPARI ENZIMEK

1. Az enzimek használatának története

Az enzimek a biológiai anyagok, biológiai makromolekulák, amelyeket élő szervezetek állítanak elő, és amelyek egy meghatározott biokémiai reakció katalizátoraként működnek. Ezek a kémiai reakciók kémiai katalizátoraihoz hasonlóan egy biológiai/biokémiai reakciót gyorsítanak fel akár a sejt belsejében, akár azon kívül is. Így működésüket jobban leírja a biokatalizátor elnevezés. Wilhelm Friedrich Kühne, a Heidelbergi Egyetem a fiziológia professzora 1877-ben használta először az enzim kifejezést, amely a görög ενζυμη (enzümé) = „élesztőben” szóból származik. Az enzimeket már évezredek óta használta az emberiség, de Kühne volt az első, aki tudományos terminológiát alkotott erre a biomolekulára. Már a sumérok, az egyiptomiak és görögök is ismerték az enzimentartalmú anyagok empirikus használatát.

Az enzimaktivitásuk miatt használt preparátumoknak is megvan a maga története. Enzimhatásuk miatt használták a malátát (keményítóbontó enzimek), a borjúgyomrot (rennin), a kovászt (tejsavbaktériumok), sőt még a fekáliát is (proteáz aktivitása a bőrkikészítésnél volt hasznos). Időrendbe szedve:

1894-ben Jokichi Takamine felfedezte a takadiasztázt, amely az *Aspergillus oryzae* törzssel termeltetett diasztáz preparátum, a penész extracelluláris enzimeit, elsősorban amilázokat és proteázokat tartalmazta. Emésztést segítő szerként is alkalmazták, pótolta a hasnyálmirigy által termelt enzimek hiányát.

A következő preparátum éppen ellenkezőleg, állati hasnyálmirigy kivonatot tartalmazott, proteáz (tripszin, kimotripszin) aktivitása révén az első enzimes mosópor (Burnus, 1913, Otto Röhm) alkotórésze volt.

A mai értelemben vett fermentációs enzim gyártást 1960-ban kezdte meg a NOVO cég, ipari léptékben kezdte termelni a *Bacillus licheniformis* proteáz enzimét.

1980 után sok tudós a génmanipulációs technikák alkalmazásával az enzimtermelés fokozásán, illetve az enzimek a tulajdonságainak fehérjemérnöki javításán kezdett dolgozni.

Az ipari enzimfermentációs technológiák fejlesztése a célzottan kiválasztott/manipulált törzsek felhasználásával termelt, tisztított, jól jellemzett enzimpreparátumok nagy léptékű előállítására irányul. Ez tette lehetővé az enzimek bevezetését olyan nagyipari termékekbe és folyamatokba, mint például a mosó- és tisztítószer, a textil- és a keményítő iparok.

Az 1940-es évektől kezdve az intenzív biokémiai kutatás kialakította az enzimek alkalmazását a diagnosztikában, és a klinikai kémiában is megjelentek. Az elmúlt néhány évtizedben az érdeklődés a diagnosztikai enzimológia területén megsokszorozódott. Viszont számos, a szakirodalomban leírt módszer még nem terjedt el széles körben, és az orvosi kutatás nagy területein még nem sikerült felhasználni az enzimes diagnosztika minden lehetőségét.

Jelenleg a legtöbb ipari enzimet hidrolitikus reakcióban használják, különböző természetes anyagok lebontására. A domináns enzimtípus a proteázok csoportja, ezeket széles körben használják a mosószer és tejiparban. A második legnagyobb csoport a különböző szénhidrátbontó enzimeké, fő képviselői az amilázok, cellulázok, amelyeket a keményítő-, textil-, tisztítószer- és sütőiparban használnak.

Az ipari enzimek forgalmát a világpiacon 2010-ben 3 milliárd dollárra becsülték. Ez a piac 2015-re várhatóan eléri a 4 milliárd dollárt. Az enzimek kulcsfontosságú szerepet játszanak számos biotechnológiai termékben és folyamatban. Iparágak szerint az élelmiszer, ital, tisztítószer, ruha, papír, üzemanyag és gyógyszergyártás a legnagyobb felhasználók.

Az enzimek egy része sztereospecifikus, kiválóan alkalmasak aszimmetrikus szintézisekre illetve a racém elegyek resolválására. Ezt a szelektivitást enantiomer tisztaságú gyógyszerek, mezőgazdasági és vegyi anyagok, takarmány és élelmiszer-adalékanyagok gyártásánál használják ki.

2. Lehetséges enzim források

A szükséges enzimeket sokféle élőlényből vonhatjuk ki. Kiindulhatunk állati szervekből, vágóhídi melléktermékekből (gyomor, bél, hasnyálmirigy), ezekből emésztő enzimeket (pepszin, tripszin, rennin, stb.) nyerhetünk ki. A máj is sokféle aktivitású enzimet tartalmaz, ebből nyerhető ki pl. a glutamát dehidrogenáz. Az állati nyersanyag mindenképpen korlátozott mennyiségben áll rendelkezésre, nagyipari felhasználásnál mindenképpen keresni kell valamilyen más forrást.

Valamivel tágabb keresztmetszet a növényi alapanyag. Történetileg és mennyiségben is a legnagyobb jelentőségű növényi enzim preparátum a maláta. A csírázó növényi magvak sokféle enzimaktivitást hordoznak, ezek közül elsősorban az amilázok (α - és β -amiláz) és a proteázok aktivitását használjuk ki. Emellett számottevő a papain (papaja gyümölcs) és a bromelin (ananász növény) termelése is.

Ipari léptékben egyértelműen a legjobb megoldás a mikrobiális enzimek termelése. A mikroorganizmusok rengeteg enzimes reakcióra képesek, és ezen belül is az egyes funkciókra a különböző törzsekben sokszor nagyon eltérő tulajdonságú enzimet hozott létre az evolúció. Ha állati vagy növényi enzim helyettesítésére keresünk mikroba eredetűt, szinte mindig találunk egyenértékű vagy jobb enzimet megfelelő screeneléssel. A génmanipuláció segítségével az sem probléma, hogy az emlős enzimet mikroorganizmussal termeltessük, erre kiváló példa az eredetileg borjúgyomorban található rennin, a sajtgyártásban használatos tejjalvasztó enzim, amit a *Kluyveromyces lactis* élesztővel gyártanak. Ma már a fermentált enzimek kb. 90%-a nem természetes, vad típusú, mert

- vagy átvitték a génjét génmanipulációval egy másik mikroorganizmusba,
- vagy fehérjemérnökséggel (protein engineering) megváltoztatták a szerkezetét.

3. Az enzimek piaca és alkalmazásai

Az enzimeket legkülönbözőbb területeken alkalmazzák, beleértve a kémiai szintéziseket, az élelmiszergyártást, az állati takarmánygyártást, kozmetikumok és gyógyszerek előállítását, valamint a kutatás-fejlesztést is. Jelenleg közel 4000 enzim ismert, ezek közül körülbelül 200 mikrobiális enzimtípus van nagykereskedelmi forgalomban. Ebből valóban csak körülbelül 20 enzimet termelnek valóban ipari méretekben. Megjósolható, hogy a biokémiai ismeretek, a fermentációs technológiák és az izolálási módszerek fejlődésével egyre több enzimet fognak ipari léptékben előállítani. A világ teljes enzim igényét mintegy 12 a nagyobb gyártó és 400 kisebb szállító elégíti ki. A teljes enzim piac közel 75%-át három nagy cég, a dániai központú Novozymes, az amerikai gyökerű DuPont (beleértve a 2011. májusában megszerzett dán Danisco-t), és a svájci bázisú Roche dominálja. A piacon igen erős a verseny, kicserélve a haszonkulcs és a technológiai fejlesztés dominál (a gyártásfejlesztés a gyártmányfejlesztés előtt).

Az enzimek alkalmazása a termelés volumenét is meghatározza. A skála egyik végén a nagy tömegben gyártott, viszonylag olcsó ipari enzimek állnak, a másik végén a kis tételben termelt és felhasznált, finomvegyszer jellegű innovatív anyagok (pl.: restriktions enzimek, *Taq* polimeráz). Az alkalmazás szerint az alábbi csoportok különíthetők el:

Ipari enzimek

Az ipari enzimek csaknem 75%-a hidrolitikus aktivitású. Szénhidrátbontók, proteázok, lipázok uralják az ipari enzimek piacát, az értékesítés több mint 70%-át ezek adják. Az 1. táblázat bemutatja, hogy a különböző ipari ágazatokban milyen enzimeket alkalmaznak.

Analitika

Pl.: glükóz-oxidáz, alkohol dehidrogenáz, koleszterin oxidáz, foszfatázok

Orvosi alkalmazás

Pl.: aszparagináz, sztreptokináz, urikáz, urokináz

Kutatás, nukleinsav manipuláció

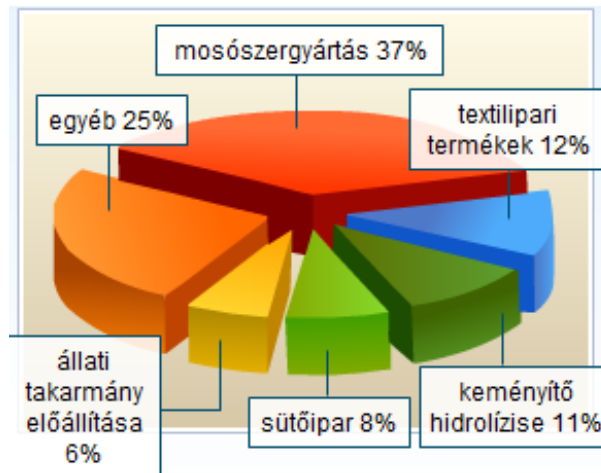
Pl.: restrikciós endonukleázok, reverz transzkriptáz, DNS-ligáz, DNS-polimerázok, Klenow enzim.

E tantárgy keretében csak az ipari enzimekkel foglalkozunk

1. táblázat

Alkalmazási terület	Enzim	Felhasználás	
Ipari alkalmazások	Papír- és cellulózipar	amilázok	keményítő elbontása a felületkezeléshez
		lipázok	festék és gyantamentesítés a pépesítésnél
		cellulázok	a cellulóz rostok elbontásával lágyítja a szálakat
		mannanázok	fényesíti a papírt a glükomannánok elbontásával
		lakkázok	fehérít, fényesít
		β -xilanázok	elősegíti a fehérítést
	Textilipar	amilázok	keményítő bevonat eltávolítása, irtelenítés
		cellulázok	fehérít, fényesít
		pektinázok	kiszabadítja a cellulózt a növényi rostok közül
		Lakkázok, glükózoxidázok	fehérít, fényesít
	mosószerek	proteázok	hidrolizálja a fehérje szennyezéseket
		lipázok	elbontja a zsíradékokat, amelyek ételből vagy bőrről kerültek a ruhára
		amilázok	eltávolítja a keményítő szennyezéseket
		cellulázok	módosítja a cellulóz szálak szerkezetét, lágyít, élénkebb színek
Élelmiszeripar	Tejipar	rennin, lipázok	sajtgyártás
		β -galaktozidáz	tejcukor elbontása a laktóz intoleránsok számára
	Sütőipar	α -amiláz	részben bontja a liszt keményítőjét, térfogatot növel, javítja a bélzet minőségét
		β -xilanáz	javítja a tészta minőségét
		oxidoreduktázok	fokozzák a glutén erősségét
		lipázok	fokozzák a gázbuborékok stabilitását
		proteázok	csökkentik a fehérjetartalmat
	Gyümöleslé ipar	amiláz, amilogükozidáz	lebontja a keményítőt, ezzel édesít, tükrösít
		pektinázok	lebontja a pektint, ezzel javul a léhozam és tükrösít
		cellulázok, hemicellulázok	elősegíti a pektin hatását, csökkenti a viszkozitást
	lakkázok	barnulásgátlók	

	naringináz, limonináz	keserűség szabályozás citrusleveknél
Keményítő ipar	α -amiláz	keményítő bontása, elfolyósítása
	pullulanáz, izoamiláz	keményítőláncok elágazásainak hasítása
	β -amiláz	maltóz molekulákat hasít le a keményítő nem-redukáló végéről, maltóz szirup előállítása
	amiloglükozidáz	glükóz molekulákat hasít le a keményítő nem-redukáló végéről, glükóz szirup előállítása
	glükóz izomeráz	
Söripar	α -amiláz	keményítő bontása, elfolyósítása, növeli a maltóz és glükóz tartalmat
	pullulanáz, izoamiláz	keményítőláncok elágazásainak hasítása, több erjeszhető cukor
	β -glükánáz	β -glükánok bontása, jobb szűrhetőség
	amiloglükozidáz	glükóz molekulákat hasít le a keményítő nem-redukáló végéről, több erjeszhető cukor
	proteázok	fehérje bontás, jobban növekszik az élesztő
	pentozánázok, xilanázok	hidrolizálja a pentozánokat, javítja a szűrhetőséget
	α -acetolaktát dekarboxiláz	megakadályozza a diacetil képződést, javítja a sör ízét
Állati takarmány gyártás	xilanázok	lebontja a rostokat
	fitázok	lebontja a fitinsavat, felszabadítja a Ca és Mg ionokat
	proteázok	lebontja a fehérjéket, az emésztésgátló faktorokat, javítja az emészthetőséget
	α -amiláz	lebontja a keményítőt, gyorsabban felszívódik a cukor
Szerves szintézisek	sokféle különböző aktivitás	például enantioszelektív szintézisek
Kozmetikai ipar	oxidázok, peroxidázok, polifenol oxidázok	hajfestés
	protein diszulfid izomerázok, glutathion oxidázok	haj hullámosítás
	papain, bromelin, szubtilizin	bőr felület tisztítás
	amiloglükozidáz, glükóz oxidáz	fogpaszták és szájjavítók



1. ábra Az enzimek használatának megoszlása iparágak szerint

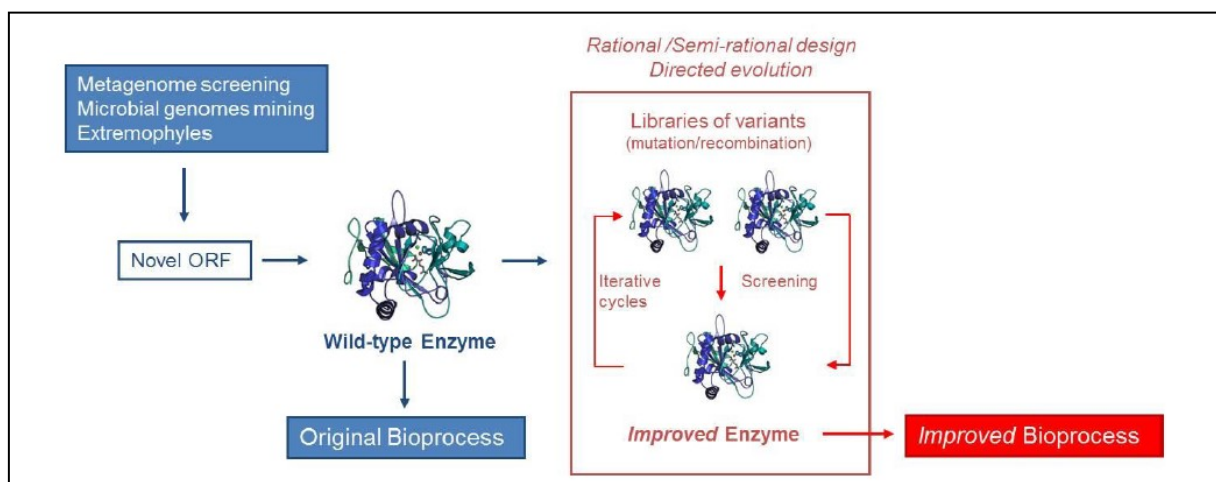
4. Genetikai módszerek az ipari enzimek gyártásában

A rekombináns DNS-technológiával egyrészt tovább fokozható az enzimek termelése, másrészt olyan tulajdonságú enzimek gyártása is lehetővé vált, amelyek korábban nem léteztek. A biotechnológiai fejlesztések, mint például a fehérje mérnökség és az irányított evolúció további lökést adtak a fontos ipari enzimek gyártásának. A biotechnológia fejlődése lehetővé tette a legkülönbözőbb új aktivitású enzimek megjelenését, illetve az eddigtől eltérő körülmények közötti alkalmazását.

4.1. Stratégiák a mikrobiális enzimek tulajdonságainak javítására

Az enzimek folyamatosan bővülő alkalmazásával együtt egyre nagyobb az igény az eddigieknél jobb vagy új tulajdonságokkal rendelkező biokatalizátorokra. Az enzimek hatékonyak a reakciók felgyorsításában, ugyanakkor nem illeszkednek mindenben a technológiai folyamatokba, ezért tulajdonságaik „finomhangolására” van szükség. Ilyen probléma lehet a szubsztrát vagy termék inhibíció, a fehérje molekula gyenge stabilitása, a szubsztrátspecifitás vagy enantioszelektivitás gyengesége vagy éppen túlságos pontossága. A genetikai módosítások igen eredményesek ezen a téren, rekombináns DNS-technikával az enzimes technológia hatékonysága akár százszorosára is növelhető.

Új, illetve jobb biokatalizátorok fejlesztése nehéz és összetett feladat (2. ábra). Az en-



2. ábra Az enzimek fejlesztése fehérjemérnöki úton

zimek módosításának két fő módszere, amellyel tulajdonságaikat a technológiák igényeihez alakíthatjuk: (1) a meglévő biokatalizátorok racionális átalakítása és (2) fehérjekönyvtárakban kombinatorikus módszerekkel keressük meg a kívánt funkciót.

Racionális tervezés

Ez a megközelítés a helyspecifikus mutagenézist alkalmazza, célzott aminosav-szubsztitúciókat, ehhez viszont a fehérje háromdimenziós szerkezetének és az enzimes reakció mechanizmusának részletes ismerete szükséges, amely sokszor még nem tisztázott. Azonban mind az aminosav sorrendet, mind a térszerkezeteket gyűjtő adatbázisok intenzív bővülése segít leküzdeni ezt az információ hiányt. Egy szűrőprogramban azonosított új enzim aminosav sorrendjének összehasonlítása az adatbázisokban tárolt több ezer már ismert adatsorral lehetővé teszi a hasonló szerkezetű vagy funkciójú fehérjék kiválasztását, a szerkezet-hatás összefüggések vizsgálatát. A természetben is az evolúció során az új enzimek az eredeti aktív centrum szerkezetének viszonylag kisebb módosulásaival (spontán mutáció – aminosav csere) jöttek létre. A homológián alapuló célzott változtatások érinthetik egyrészt az aktív centrumot, alkalmassá teszik az eddigetől eltérő szubsztrátok beilleszkedésére, azaz a szubsztrát specifitás megváltoztatására, másrészt a kicserélt aminosavak segítségével másfajta átmeneti komplex jöhet létre, más reakcióutak aktiválási energiája csökken, megváltozhat az enzim funkciója. E fehérje mérnöki beavatkozásoknál több változatot is létrehozhatnak, és ezeket tesztelik. Gyakran bebizonyosodik, hogy a természet, az evolúció „okosabb”, az általunk tervezett és létrehozott változatok kevésbé jók, mint az eredeti, de vannak nagyon jó eredmények is.

A fehérjeláncok komputeres tervezésénél elsődleges a főlánc térbeli helyzetének célszerű kialakítása, és az ezt stabilizáló erőkterekhez rendelik hozzá az aminosavak sorrendjét és elrendezését. Ezek nagyon bonyolult és számításgépes feladatok, ezeket az algoritmusokat most kezdik alkalmazni a funkcionális fehérje tervezésben.

A mosószer proteázokat például úgy fejlesztették, hogy az aktív centrumtól távol eső 8 aminosavat módosítottak, így megnövekedett a mosóerő valamint 100°C-on a hőstabilitás 34-szeresre növekedett.

Irányított evolúció

A kombinatorikus módszerek, mint például az irányított evolúció számos változatot hoznak létre, amelyeket azután tesztelni kell enantiomer szelektivitásra, katalitikus hatékonyságra, reakciósebességre, oldhatóságra, stabilitásra és más enzimetulajdonságokra, de nem igénylik az enzim és a reakció mélyebb ismeretét. Az irányított evolúcióval gyorsan és olcsón létre lehet hozni a meglévő enzimek nagyszámú változatát. Számos ezek közül meghatározott feltételek mellett jobban működik, mint a természetben előforduló enzimek. Az irányított evolúció alkalmazásához molekuláris biológiai technikák széles körére van szükség, amelyek lehetővé teszik a természetben előforduló genetikai sokféleség utánzását. Ez lehet a fehérje-kódoló gén random mutagenézise különböző technikákkal, mint például a hibázó polimeráz láncreakció, mutagenézis ismétlődő oligonukleotidokkal, vagy mutagén kémiai szerek. A hibázó PCR véletlenszerű pontmutációkat visz be az enzimmolekulák populációjába. A DNS manipulációs módszerek (DNA shuffling, Molecular Breeding) lehetővé teszik a változatos DNS molekulák in vitro random homológ rekombinációját, ha a gének között a homológia magasabb, mint 70%. Klónozás és expresszió után nagyszámú (10^4 - 10^6) enzim változat jelenik meg, ezek vizsgálatával lehet kiszűrni a legalkalmasabbakat.

A fent említett megközelítések a nem zárják kölcsönösen ki egymást, a racionális, az irányított és a random enzimfejlesztés területe átfed egymással. Így például irányított evolúciós technikák, ahol lehetséges, racionális vagy félig racionális módszerekkel tervezett kisebb enzim variáns könyvtárakat vesznek igénybe, hogy csökkentsék a tesztelés munkaigényét, de anélkül, hogy a jobb variánsok megtalálásának valószínűségét veszélyeztetnék. Az egyik le-

hetőség, hogy a mutációk célterülete csak az aktív centrumra (körülbelül 10-15 aminosav) és a hozzá legközelebb eső további 20-30 aminosavra terjed ki, hatásuk ezekben a régiókban számottevőbb. Egy másik stratégia, az úgynevezett CASTing, az aktív hely kombinatorikus vizsgálatán alapul, amelyben az aktív centrum két vagy három aminosavból álló csoportjaival operálnak.

Az irányított evolúciós fejlesztés csúcsteljesítménye pillanatnyilag a glyphosate-N-acetiltranszferáz, amelynek aktivitása a 10.000-szeresére, ugyanakkor, a hőstabilitása ötszörösére növekedett. Az ipari enzimek között elsőként (2000-ben) a Novo Nordisk LipoPrime lipáza jelent meg a piacon.

4.2. Rekombináns fehérjék gyártása mikroba gazdaszervezetekkel

A rekombináns DNS technológia nagyban hozzájárult ahhoz, hogy iparilag ismeretlen mikroorganizmusok, illetve magasabb rendű szervezetek enzimeit olyan, a fermentációs iparban jól ismert és jól kezelhető mikroorganizmusok segítségével állíthassunk elő, mint például *E. coli*, *Bacillus subtilis* és további *Bacillus* fajok, *Ralstonia eutropha*, *Pseudomonas fluorescens*, *Saccharomyce cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, valamint az *Aspergillus* és *Trichoderma* fajok. Az összes ipari enzim mintegy 90%-át rekombináns fehérjeként termelik.

Az *E. coli*-t több okból is széles körben használják, rekombináns gazdaszervezetként:

- genomja könnyen, gyorsan, és pontosan módosítható
- gyors növekedés és nagy sejtkoncentráció
- könnyen tenyészthető olcsó tápoldaton
- könnyen kiiktatható a proteáz aktivitása

Az *E. coli* képes heterológ fehérjéből akár az összes fehérje 50%-át is felhalmozni. Mindemellett több hátránya is van, például nem képes poszt-transzlációs módosításokra, hajlamos pirogén toxinokat képezni, illetve egyes esetekben zárványtest (inclusion body) formájában termeli a heterológ fehérjét.

Ennek ellenére nagy fehérje koncentrációkat értek el, például alkalikus foszfátából (PhoA) 5,2 g/l a periplazmában, leván-fruktotranszferázból (LFT) 4 g/l a közegben, más törzssel 20 g/l fehérjekoncentrációt is elértek.

Az élesztő gazdaszervezeteknek több előnye is van a prokarióta host-okhoz képest. A *S. cerevisiae* gyorsan szaporodik egyszerű tápoldaton, nagy sejtsűrűséget lehet elérni, hajlamos a heterológ fehérjéket az extracelluláris térbe kiválasztani, valamint a genetikája könnyebben kezelhető, mint bármely más eukariótáé.

Mindennek ellenére a *S. cerevisiae* nem mindig legjobb gazda az emlős fehérjék nagyüzemi termeléséhez, alkalmazásának megvannak a nehézségei is. Kevés az erős és jól szabályozható promotere, emellett hajlamos a hiperglikozilálásra, akár ötven-száztagú mannóz lánccot is ráépíthet a termékre, és ebben α -1,3 kötések is előfordulnak, ami pedig antigénként immunválaszt válthat ki a szervezetben.

A *Pichia pastoris* vált az egyik legszélesebb körben használt expressziós rendszerré, eddig több mint 700 fehérje előállítását írták le ezzel az élesztővel. Szabadalmakban *P. pastoris*-szal már 30 g/l-es rekombináns fehérje termelést is leírtak. E metilotróf élesztő nagy előnye a *S. cerevisiae*-hez képest, hogy

- erős és jól szabályozott metanol promotere van (AOX1), amely az alkohol-oxidáz enzim mennyiségét az összes oldható fehérje 30%-ig is képes növelni,
- kevésbé intenzív a glikoziláció, a hordozó N atomokhoz rövidebb, maximum 20 egységből álló oligoszacharidok kapcsolódnak, és ezekben nem fordul elő az α -1,3-mannóz kötés,

- a bevitt idegen DNS integrálható a kromoszomális DNS-be, így a transzformánsok stabilizálhatók,
- sok rekombináns fehérjét képes extracellulárisan kiválasztani
- gyors növekedés, nagy sejtsűrűség, és problémamentes léptéknövelés.

A *Hansenula polymorpha* metilotróf élesztő hasonló módon alkalmazható heterológ génextpresszióra, mint a *P. pastoris*. Itt a metanol-oxidáz gén promóterét használják az idegen gének kifejezésére. A *P. pastoris* AOX1 génjéhez hasonlóan a *H. polymorpha* MOX génje is erősen és szabályozottan expresszálódik, az enzim mennyisége elérheti a összes sejtféherje akár 37%-át is. Alapvető különbség, hogy a MOX gén expressziója szignifikánsan derepresszálódik glükóz hiányában vagy glükóz limitben, és fordítva, nagy glükóz koncentráció mellett (pl. a sejtszaporítási fázisban) a MOX promoter szabályozása megszűnik.

A harmadik nagy rendszertani egység, a fonalas gombák esetében a rekombináns heterológ fehérjék termeltetésére irányuló molekuláris genetikai technikák már sokkal bonyolultabbak és fáradtságosak, mint az élesztők esetében. A gének bevitele, vagy eltávolítása még mindig nehézkes, bár néhány területen születtek eredmények, pl.: a restriktív enzim mediált integráció, és az *Agrobacterium tumefaciens* TI plazmidja által közvetített átalakítások. Az elért fehérjekoncentrációk rendszerint alacsonyabbak, mint más gazdaszervezetekkel.

A fonalas gombák manipulációjára különböző stratégiákat dolgoztak ki, pl.: proteáz-deficiens törzsek létrehozását, multikópiás génbevitt, az erős penész promóterek, hatékony szekréciós szignálok azonosítását. Kevesebb figyelmet fordítottak a glikozilációra. Bár hiper-glikoziláció nem lép fel, de rövid mannóz láncok kialakulnak a fehérjén.

Néhány ipari enzim forrás- és gazdaszervezetei:

AQUAZYM ULTRA ^R (amiláz)	<i>Bacillus stearothermophilus</i> → <i>B. licheniformis</i>
PENICILLIN ACILASE ^R	<i>E. coli</i> multikópiás plazmid,
RENNIN (proteáz, sajtgyártásban)	borjúgyomor → <i>E. coli</i> (Pfizer, USA)
	borjúgyomor → <i>B. subtilis</i> (Genencor, USA)
	borjúgyomor → <i>Kluyveromyces lactis</i> (DSM, NL)
NATURPHOS ^R (fitáz)	<i>Asp. niger</i> → <i>Asp. niger</i> (genomba)
PURADAX ^R (mosószer celluláz)	<i>Bacillus</i> BCE103 → <i>B. subtilis</i>
CD-glikozil-transzferáz (ciklodextrin)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> → <i>B. subtilis</i>

5. Enzim fermentációk

Tenyésztés

A mikrobiális enzimek elállításának általános technikája a levegőztetett szubmerz fermentáció, emellett régi technológiaként, vagy más folyamatokkal összekapcsolva előfordulnak felületi, illetve SSF (solid state fermentation = szilárd fázisú fermentáció) eljárások is (pl.: pektinázok, hemicellulázok gyártása mezőgazdasági hulladékokon, korpán, répaszeleten, stb.).

A szubmerz fermentáción belül a szakaszos, rátáplálásos, folytonos technika egyaránt előfordul. Ennek megválasztását a műszaki paramétereken kívül az anyagcsere is befolyásolja: induktív enzimek gyártásánál az induktor bevitele rátáplálást igényel. Sok fontos enzim nem konstitutív, csak akkor termelődik, ha a mikroorganizmusnak szüksége van rá. Alapesetben az induktor maga a szubsztrát, ennek adagolásával lehet kiváltani az enzim termelődését.

Így az amilázokat → keményítővel, az invertázt → szacharózzal, a β -galaktozidázt → laktózzal a glükóz-izomerázt → xilózzal (xilán, korpa formájában) lehet indukálni.

A másik anyagcsere jelenség, amely a fermentációs technikát is befolyásolja a katabolit represszió. A sejtek a legkönnyebben hasznosítható szénforrást, a glükózt preferálják, ennek jelenlétében az egyéb anyagcsereutakat leállítják. Sok esetben a mikroba szaporodásához adott glükóz lefékezi az enzim termelést. Ekkor a folyamatot több szakaszban hajtjuk végre, a sejt szaporítás után olyan körülményeket teremtünk, hogy glükóz hiányában ne növekedjen, hanem enzimet termeljen a tenyészet. Ezt többféleképpen is megoldhatjuk. Lehet például a glükózt olyan kis adagokban beadni, hogy a koncentráció folyamatosan a limitáló tartományban maradjon. Lehet ezen kívül a mikroba számára nehezen hozzáférhető szubsztrátot adni, amit csak egy lassú enzimes bontás után tud hasznosítani (laktóz, keményítő, mannóz, glicerin, stb.), vagy adenil-cikláz regulációs mutánsokat izolálni.

Az ipari enzimek olcsó tömegtermékek, így a tervezők igyekeznek a készülékek kapacitását a műszakilag elérhető maximumra növelni. Ez a kevert, levegőztetett fermentoroknál több száz köbméteres térfogatot jelent.

A levegőztetésre, oxigén ellátásra nincs általános szabály, egyes enzimeket oxigén limitben állítanak elő (pl. glükóz izomeráz, penicillin aciláz), másoknál intenzív levegőztetés szükséges (pl. proteázok).

Feldolgozás

A tisztítás folyamatát az enzim forrása, a fehérje tulajdonságai, és az alkalmazás körülményei határozzák meg. Célszerű minden tisztítási művelet után vizsgálni a kapott összes enzimaktivitást (U) és a fajlagos aktivitást (U/mg). Az első változásából a kihozatalt, a másodikból a tisztítási tényezőt határozhatjuk meg.

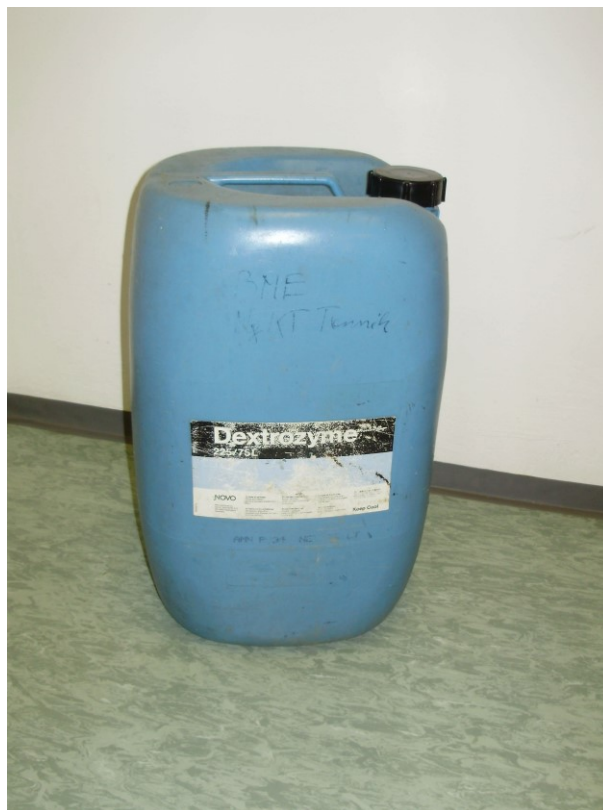
Az alapkérdés, hogy a termelt enzim a sejten belül marad (intracelluláris) vagy a mikroba kiválasztja a fermentlébe (extracelluláris). Az előbbi esetben a sejtömeget fel kell tární, ez plusz egy bonyolult művelet a feldolgozási technológiában. Ennek elkerülésére célszerű a fehérjét úgy manipulálni, hogy egy megfelelő indító szakaszt (szignál peptid, leader sequence) építenek az elejére, aminek segítségével az enzim a sejt saját fehérjeihez hasonlóan ki tud lépni a sejtmembránon. A homogén oldatból a célterméket, az enzimfehérjét kell izolálni a kívánt formában és tisztaságban. A fehérjék tisztításának jellemző műveletei:

Kicsapás - kisézés, oldószeres kicsapás (IEP)

Kromatográfia – ioncsere, adszorpció, néha affin- és gélkromatográfia

Ultraszűrés – koncentráció, diaszűrés

A teljes tisztaság a nagy tömegben gyártott olcsó ipari enzimeknél nem követelmény, csak a zavaró idegen aktivitásokról és gátló anyagokról kell megszabadulni. Inert, aktivitással nem rendelkező fehérjék és más anyagok jelenléte általában nem zavaró. A végső formulázásnál olyan enzim preparátumot kell létrehozni, amelyben biztosított az enzimak-



3. ábra Folyékony enzim preparátum gyári kiszerezésben

tivitás megőrzése a szavatossági időn belül, másrészt a technológiában való felhasználás egyszerűen, bemeréssel vagy oldással megvalósítható. A szilárd preparátumok gyártásánál az oldószer maradékát szárítással (fluid ágyas, porlasztva szárító, dobszárító) távolítják el. A kapott porszerű anyag tulajdonságait is be kell állítani granulálással vagy mikrokapszulázással (a szálló finom por allergiát, vagy más megbetegedést okozhat).

A szilárd termék előállítása költséges, és csökkentheti az aktivitást, emiatt inkább stabilizált oldat formájában hozzák forgalomba az enzimet (3. ábra).

6. Ipari enzimek

Az ipari léptékben termelt enzimek szinte mind hidrolázok. Ezen belül a szubsztrátok szerint célszerű csoportosítani az egyes készítményeket.

- Szénhidrátbontó enzimek (ez a keményítőipar kapcsán is tananyag volt)
- Proteázok (pH optimumuk szerint lúgos, semleges és savas proteázok)
- Lipázok

6.1. Amilázok

Az amilázok a keményítő hidrolízisét katalizálják egyszerűbb cukrokká. Az emberi szervezetben amilázt találunk az emberi nyálban, ezzel kezdődik az emésztés folyamata. A hasnyálmirigy szintén alfa-amilázt termel, amely a táplálék keményítőjét di- és triszacharidokká bontja. A növények és mikroorganizmusok is termelnek amilázokat. Éppen a diasztáz amiláz volt az első enzim, amit Anselme Payen felfedezett és preparált 1833-ban. Valamennyi amiláz az α -1,4-glikozidos kötések hidrolizálja.

A mikrobiális enzimek az első nagy áttörése az élelmiszeriparban a korai 1960-as években történt, a glükóamiláz piacra vitelével, amely lehetővé tette a keményítő lebontását glükózzá. Azóta a glükóz termelés teljes egészében átváltott a hagyományos savas hidrolízisről az enzimes hidrolízisre. Összehasonlításképpen, az enzimes hidrolízis a gőz költségeket 30, a hamutartalmat 50 és a melléktermékek mennyiségét 90 százalékkal csökkentette a régi savas eljáráshoz képest.

1973 óta a keményítő-feldolgozó ipar az enzimek egyik legnagyobb felvevő piacává nőtte ki magát. Az édesítő szirupok gyártásának minden fázisában (folyósítás, cukrosítás és izomerizáció) enzimeket használnak.

Az amilázok forgalma az enzim piac közel 25 %-át teszi ki. Az iparban a mikrobiális amilázokat használják szélesebb körben, mivel sokkal stabilabbak, mint a növényi és állati eredetű amilázok. A mikroorganizmusok használatának nagy előnye a gazdaságos tömegtermelés, és a mikrobákat egyszerűbb genetikailag manipulálni.

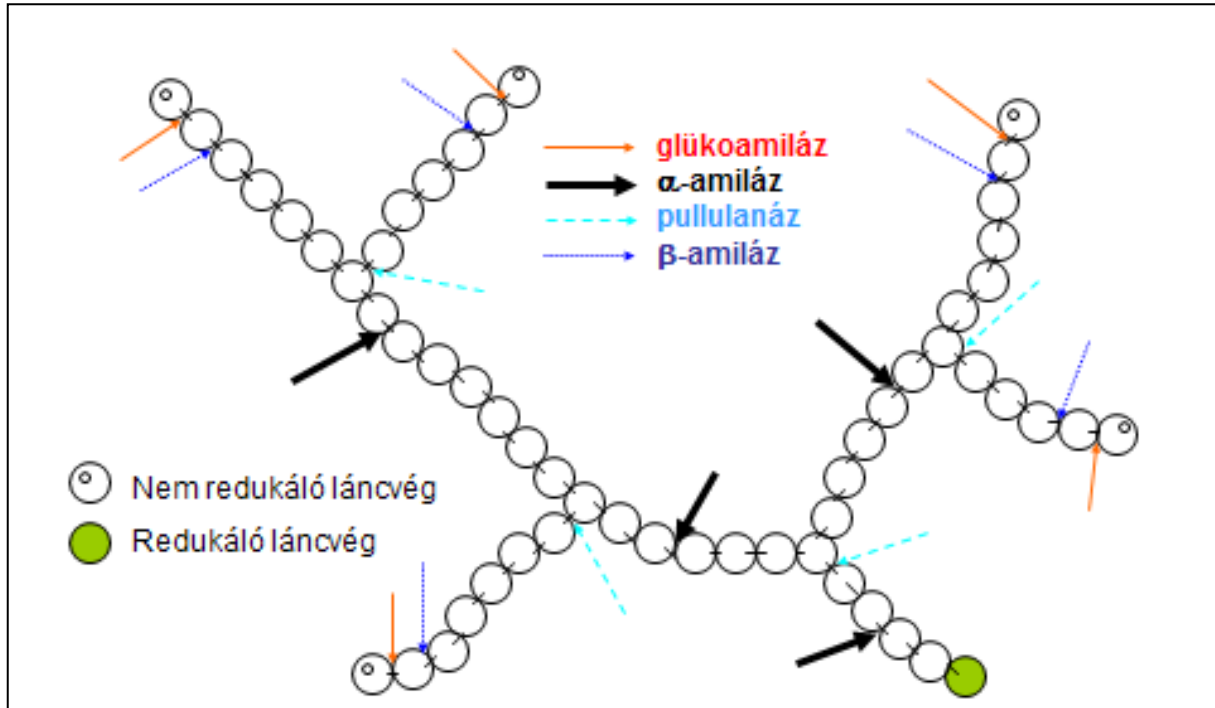
A fontosabb amilázok:

6.1.1. α -amilázok

α -amiláz, folyósító enzim: endo-amiláz, a keményítő láncok belsejében, véletlenszerűen az α (1-4)-glikozidkötéseket hasítja, a terméke amilóz szubsztrát esetén maltotrióz és maltóz, amilopektin esetén dextrin, maltóz és glükóz. A folyósító nevet azért kapta, mert hatására a nagyon viszkózus elcsirizesített keményítő elfolyósodik, a bontástól a viszkozitás drámaian lecsökken. A keményítőlánc tetszőleges pontját képes megtámadni, ezért gyorsabban bont a csak láncvégen dolgozó enzimeknél.

A hidrolízishez legalább három egymás mellett álló α (1-4)-kötésű D-glükóz egységre van szükség. A hidrolízis sebességét vizsgálva az enzim a lineáris amilóz láncokat hasítja a

leggyorsabban. A bontás nagymértékben lelassul a szubsztrát polimerizációfokának csökkenésével. Az amilóz lánc hidrolízise két szakaszból áll. Előbb a kevésbé rendezett spirális szakaszból 6-8 glükózból álló oligomerek képződnek, majd ezek kisebb sebességgel maltózzá és maltotriózzá hasadnak. Végül a maltotrióz még lassabban tovább hidrolizálódhat maltózra és glükózra. A képződött termékek mind α -konfigurációban válnak szabaddá. Az α -D(1-6)-os elágazásokat is tartalmazó amilopektin enzimes hidrolízise hasonló, de két elágazás között csak akkor hasadnak fel az α (1-4)-es glükozidos kötések, ha legalább hat glükóz egységből álló lineáris szakasz áll rendelkezésre. A teljes mértékű lebontáskor a maltóz és glükóz mellett 5-15 glükóz egységből álló és 1-2 elágazást tartalmazó oligomerek, ún. α -határdextrinek is keletkeznek.



4. ábra A keményítőbontó enzimek támadáspontjai

Az α -amiláz az állatvilág alapvető emésztőenzime, de előfordul mikroorganizmusokban, növényekben, gombákban is. Ipari szempontból azok a mikrobák érdekesek, amelyek extracelluláris enzimet termelnek:

- *Aspergillus oryzae*
- *Aspergillus niger*
- *Mucor nemzetség*
- *Bacillus licheniformis*
- *Bacillus amyloliquefaciens*
- *Bacillus subtilis*

A termelő organizmusnak megfelelően sokféle enzimtípus létezik.

Bakteriális α -amilázok: pl. *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* termeli. Igen magas hőfokon (90-105 °C) is használhatók, több óráig megőrzik aktivitásukat. Aktivitásukhoz, stabilitásukhoz Ca^{2+} ionok jelenlétét igénylik. Működésük optimális pH tartománya 6.7-7.0 közé esik. Móltömegük ~50 kDa, de hajlamosak a dimerizálódásra.

Penészgomba α -amilázok: a legjelentősebb enzimműködés az *Aspergillus* törzsek (*A. oryzae*, *A. niger*). Ipari célra általában az *Asp. oryzae* törzs által termelt készítményeket használják. Móltömegük 50-60 kDa körüli, pH optimumuk 5-6 közé esik. Aktivitásuk 55-60 fokig növekszik, efelett bomlanak. Ca^{2+} és Na^{+} ionokkal aktiválhatók.

Növényi α -amilázok: Ipari szempontból a malátázott árpa a legfontosabb enzimműködés. A nem csíráztatott gabonaféléknek nincs α -amiláz aktivitásuk. A maláta amiláz optimális re-

akciókörülményei a penész enzimekre hasonlítanak, annyi eltéréssel, hogy a pH optimum 4,7-5,5 közé esik.

Az amiláz termelő *Bacillus* törzsek enzim termelő képességének javításában a klasszikus indukált mutációs-szelekciós módszerek is jelentős eredményeket hoztak, a kinyert aktivitás 50-100-szorosára növekedett.

Az amilázok fermentációs előállításánál két alapvető anyagcsere szabályozási mechanizmust kell szem előtt tartani. Az amiláz induktív enzim, termelődését a szubsztráttal, azaz keményítővel lehet indukálni. A másik a katabolit represszió, azaz glükóz jelenlétében nem indul meg a keményítő hasznosítás. A fermentáció során tehát a kezdeti glükóz szénforrás elfogyása után keményítő adagolásával indíthatjuk el az enzim termelést.

A technológia tehát rátáplálásos szakaszos fermentáció, nagy térfogatú (100–150 m³), levegőztetett fermentorokban.

Felhasználás

Az α -amilázokat sok iparágban alkalmazzák, csak felsorolásszerűen:

Keményítőipar, a keményítő lebontása maltodextrinekké, glükózzá, izocukorrá (Termamyl, ld. később).

Söripar, gabonaszesz gyártása, a maláta aktivitásának kiegészítésére

Textilipar, irtelenítés - a szálakat a technológia egyik fázisában keményítő bevonattal védik, később ezt emésztik le az enzimmel. Az irtelenítő enzim először a maláta volt, majd 1917-ben próbálták ki az első baktérium amilázt. Majd 1950-ben a NOVO-NORDISK hozott forgalomba egy olcsó, stabil, kemikáliákra nem érzékeny, nagy aktivitású *B. subtilis* enzimet AQUAZYM néven. A továbbfejlesztés során a *B. stearothermophilus* enzimét választották, mert nagy a hőstabilitása és széles a pH optimuma, de a törzs kis mennyiségű enzimet termelt. Ezért az enzim génjét *B. licheniformis*ba klónozták (nem patogén, maga is amiláz és proteáz termelő), ez az újabb termék az AQUAZYM ULTRA^R.

Mosó- és tisztítószer: a mosószeres detergens tartalma a csak zsíros jellegű szennyezések eltávolítására alkalmas. Más anyagú szennyezések, fehérjék és szénhidrátok esetében nem hatékonyak. A ruhanemű és az edények viszont rendszeresen szennyeződnek étellel és a testfelület anyagaival – ezek főként fehérjéből és keményítőből állnak. Ezért a megfelelő tisztításhoz fehérje- és szénhidrát bontó enzimeket is adagolnak a termékekbe.

6.1.2. Maltamilázok

6.1.2.1. β -amiláz

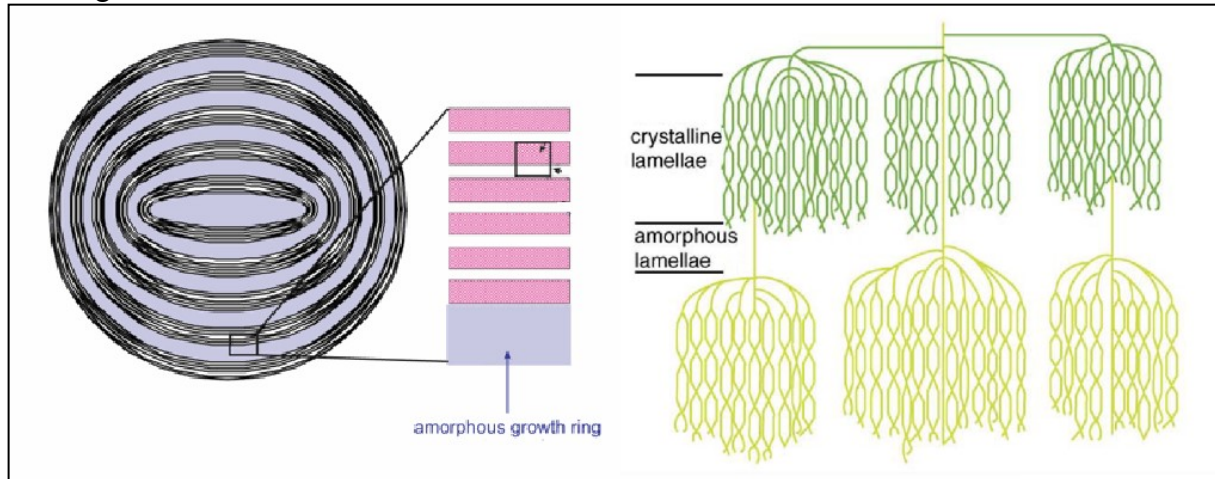
Ez az enzimescsoport a keményítő láncok nem redukáló végéről maltóz egységeket (glükóz(1-4)glükóz diszacharidokat) vág le. Legrövidebb szubsztrátja a maltotetraóz (4 glükóz egység), a maltotriózt csak nagyon kis sebességgel bontja.

Az α - és β -amilázok nevében a görög betűk nem a szubsztrát molekulára utalnak, hiszen mindkét enzim a keményítő α (1-4)-es glükozidos kötéseit hidrolizálja, hanem a termékek térállására. Az α -amilázoknál a lánchasítás után a redukáló láncvégén álló piranóz gyűrűs glükóz -OH csoportja marad α (axiális) térállású, a β -amilázoknál viszont a keletkező maltózé β (ekvatoriális) helyzetű. Ez természetesen csak a keletkezés pillanatában igaz, oldatban azonnal megindul a mutarotáció és lassan kialakul a két forma egyensúlyi összetételű keveréke.

Az α - és β -dextrinek elnevezése a létrehozó enzimek specifitásából vezethető le. Az α -amilázok termékei az α -dextrinek, olyan kis oligoszacharidok, amelyeknél a redukáló láncvég α térállású, és csak egy-két elágazás van a molekula belsejében. Mivel az α -amiláz vágásához legalább hat egységnyi lineáris szakasz szükséges, az elágazási pontoknál még legalább

három glükóznyi láncvég marad. Az α -amiláz egyaránt megrövidíti az elágazó cukorláncok redukáló és nem-redukáló szarait, így az α -dextrinek Y vagy K alakúak.

A β -dextrinek, másnéven határdextrinek a maltamilázok vagy amiloglikozidázok hatására jönnek létre. Ezek az enzimek csak a nem-redukáló végek felől közelítik meg az elágazási pontokat, de a redukáló oldalra nem tudnak átlépni, az a szerkezeti rész érintetlen marad. Ezek az enzimek önmagukban csak az amilózt tudják teljesen lebontani, az amilopektin bontása az első elágazásnál leáll. A keményítő szemcse réteges szerkezetét tekintve látható, hogy így csak egy-egy zónát lehet lebontani, az amorf rétegek elágazó fűrtös szerkezete változatlan marad. Nagy dextrin molekula keletkezik, amely láncai végén változatlanul tartalmazza az összes (1-6) kötést. Ezért a teljes hidrolízishez az amilázok kombinált alkalmazására van szükség.



5. ábra A keményítőszemcse szerkezete

A β -amilázok elsősorban a magasabb rendű növényekben fordulnak elő, de számos mikroorganizmus is termeli. Kristályos formában is előállították gabonafélékből (búza, árpa, malátázott árpa, rizs) valamint szójából és batátából (édesburgonya). A mikrobák között jelentős mennyiségű extracelluláris amilázt termel a *Bacillus polymyxa*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. circulans*, valamint néhány *Streptomyces* és *Pseudomonas* faj. A különböző eredetű enzimek tulajdonságai jelentősen eltérnek. A növényi enzimek molekulatömege nagy, 80-250 kDa, míg a baktériumoknál csak 35-60 kDa. A pH optimum is eltérő, 4,8-5,2 illetve 6,0-7,0 közé esik. A hőmérséklet optimum viszont hasonló, 45-55 °C. Aktivitásuk tovább nő 60-65 fokra, de ezen a hőfokon már gyorsan inaktiválódnak.

Felhasználás

Igen nagy mennyiséget használnak fel maláta formájában a sörcefrézésnél és a gabona-szesz gyártásánál. Régebben a tisztított enzim preparátumot is ebből az olcsó alapanyagból nyerték ki. Manapság elsősorban *B. polymyxa* fermentációjával állítják elő. Az élelmiszeripar számára nagy tételben állítanak elő maltóz szirupot (HMS = high maltose syrup) keményítőtől. Ennek megvan az az előnye a többi cukor oldathoz képest, hogy hő hatására nem barnul, nem karamellizálódik.

6.1.2.2. Maltogén α -amilázok

Ezek az enzimek az előbbiekhöz hasonlóan maltóz egységeket vágak le a keményítő nem-redukáló láncvégéről, de a termék térállása α marad. A két maltóz izomer közötti különbség oldatban fokozatosan eltűnik a mutarotáció jelensége miatt, a két forma egymásba át-

izomerizálódik, és egyensúlyi összetételű elegyük alakul ki. A mechanizmusnak megfelelően az α -maltóz mellett β -határdextrinek keletkeznek.

Az iparban általában penész eredetű enzimeket használnak.

6.1.3. *Amiloglikozidáz, glükoamiláz*

Az amiloglikozidáz (szinonim nevei glükoamiláz, γ -amiláz) exoenzim, a keményítő nem redukáló végeiről β konfigurációjú glükóz molekulákat választ le. Specifitása nem tökéletes, az $\alpha(1-4)$ kötések mellett hidrolizálja az $\alpha(1-6)$ és $\alpha(1-3)$ kötések is, de nagyságrendekkel lassabban. Így, ha lassan is, de önmagában is képes a keményítő teljes elbontására glükózzá. A gyakorlatban a hidrolízisidő lerövidítése érdekében mégis az α -amilázzal előbontott keményítő további bontására alkalmazzák. A reakciósebességek összehasonlításából kitűnik, hogy minél rövidebb a cukorlánc, annál lassabban megy hidrolízis (2. táblázat).

2. táblázat Amiloglikozidáz hidrolízis sebességének összehasonlítása különböző szubsztrátokkal

Szubsztrát (kötés)	Reakciósebesség, %
maltopentóz (1-4)	100
maltotetraóz (1-4)	77
maltotrióz (1-4)	36
maltóz (1-4)	10
izomaltopentóz (1-6)	2,3
izomaltotetraóz (1-6)	1,5
izomaltotrióz (1-6)	0,8
izomaltóz (1-6)	0,13
panóz (1-6)	7,3
nigeróz (1-3)	0,11

Amiloglikozidázok az állati szövetekben (máj, vékonybél), élesztő és penészgombákban, valamint baktériumokban egyaránt előfordulnak. Ipari szempontból is a legjelentősebb enzimeforrás az *Aspergillus niger*, emellett gyártják *Asp. awamori*, és *Rhizopus nigricans* törzsekkel is.

A glükoamilázok glükoproteinek. Az *Aspergillus niger* enzime jelentős mennyiségű mannózt tartalmaz. A törzs két izoenzimet termel, nagyobb mennyiségben a 97 kDa móltömegűt, kisebb mennyiségben a 112 kDa-osat. Stabilis működési tartományuk 40-60 °C közé esik, e fölött ez az enzim is gyorsan inaktiválódik. A pH optimum 4,5-5,0, a két izoenzim izoelektromos pontja 3,4 és 4,0.

A penésztörzsek szubmerz tenyésztése kiszorította a régebben (1970 előtt) még alkalmazott felületi technológiákat. Az enzim indukció és a katabolit represszió ennél a technológiánál is működik. Glükóz, laktóz, de még a glutaminsav jelenléte is fékezi az enzimettermelést. Ezért célszerű a folyamat során szénforrást cserélni, a glükóz után keményítőt és/vagy dextrint adagolni. A fermentációs idő a fonalas gombáknál megszokott 4-5 nap, de rátáplálásos technikával 10-12 napig is elnyújtható.

Felhasználás

Iparban az elfolyósított keményítő cukrosítására használják. Fő alkalmazási területe a bakteriális α -amilázzal együtt a keményítőtől kiinduló enzimes glükóz gyártás. A glükóz az élelmiszer és fermentációs ipar fontos alapanyaga és közbenső terméke (izocukor gyártás, szorbit gyártás, fermentációs technológiák szénforrása, szeszgyártás). A glükóz gyártáson kí-

vül felhasználják különleges összetételű keményítőszirupok és diabetikus készítmények előállítására, a sörlét zavarossá tevő dextrinek eltávolítására.

6.1.4. Pullulanáz, izoamiláz

A pullulanáz (EC 3.2.1.41) egy amilolitikus glükánáz enzim, amely az (1-6)- α -D-glükózid kötések hidrolízisét katalizálja a pullulanban, amilopektinben és glikogénben, és ezek α - és β -határdextrinjeiben (debranching enzyme = elágazást megszüntető enzim).

A név onnan származik, hogy eredetileg a *Pullularia pullulans* nevű mikrobában fedezték fel. A törzs tartalék tápanyaga a pullulán, ami α (1-6) kötésekkel polimerizált glükóz. Ennek visszabontására, mobilizálására termeli a pullulanázt.

A későbbiekben a *Klebsiella aerogenes* (mai nevén: *Aerobacter aerogenes*) által termelt enzimet vizsgálták, termelték, és engedélyezték élelmiszeripari célokra.

Emellett számos olyan törzsen is kimutatták, amelyek egyéb amilázokat is termelnek. Így megtalálták élesztőkben, a prokarióták között pedig *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Clostridium* és *Bacillus* fajokban. Ez utóbbiak közül sokat foglalkoztak a *B. cereus*, *B. acidopullulyticus*, *B. stearotherophilus*, *B. circulans*, *B. polymyxa*, *B. sectorramus*, *B. cereus* enzimeivel. Mivel az izoamilázokat rendszerint más enzimekkel, általában amiloglükózidázokkal együtt alkalmazzák, az ipari technológiákhoz célszerű olyan enzimeket választani, amelyek pH és hőmérséklet optimuma azonos vagy nagyon közel áll egymáshoz. A glükóamiláz működési paraméterei 50-60 °C és pH=4,5-5,0. Tehát a semleges vagy gyengén lúgos közegben működő izoamilázok nem jönnek számításba. A savas tartományban működik viszont a *Pseudomonas amyloclavata*, a *Bacillus acidopullulyticus* és a *Bacillus sectorramus* enzime. Ezek közül is a magasabb hőmérsékleten aktív enzim alkalmazása előnyös. Mivel a termelő organizmusok produktivitása vagy más tulajdonságai nem mindig megfelelők, ilyenkor célszerű a jónak bizonyult enzim génjét inkább más fajba klónozni és így megoldani a gyártást. A *B. subtilis* emberekre nem patogén és nem toxikus, és használata a múltban élelmiszeripari enzimek termelésében biztonságosnak bizonyult. Ezért gazda szervezetül egy genetikailag módosított *B. subtilis* törzset választottak, amely nem spóráképző, proteáz-hiányos, amiláz negatív és surfactin negatív. Ebben expresszálták a *B. acidopullulyticus*-ból származó pullulanáz (pulC) gént. Ez a génmanipulált *B. subtilis* által termelt pullulanáz megkapta a GRAS (generally recognised as safe) minősítést. A génmanipulációval azt is elérték, hogy az eredetileg induktív enzimek (induktor: pullulán, izomaltóz) konstitutívva váltak, az enzimtermelés állandóan folyik.

Felhasználás

Az eddig tárgyalt amilázok egyike sem volt képes az amilopektin elágazásainál található az α (1-6) kötések elfogadható sebességű bontására. A pullulanázt és a hasonló enzimeket éppen erre használják. Hatására az elágazások eltűnnek, minden dextrin lineárisává válik és ezzel az exoamilázok teljesen le tudják bontani a keményítőt. Az elágazás-bontó enzimeket a hidrolízis második szakaszában, az amiloglükózidázzal együtt alkalmazzák.

6.1.5. Glükóz és izocukor előállítás

A keményítőből sok értékes termék állítható elő. Ezen a téren komoly munkát fektettek egyrészt az enzimek kutatásába, másrészt a technológiai folyamatok fejlesztésébe. Az enzimek ideális katalizátorok a keményítőiparban hatékonyságuk, specifitásuk és az enyhe reakciókörülmények (hőmérséklet, pH) miatt. Ilyen körülmények között kevesebb melléktermék, kellemetlen íz és színanyag képződik. Emellett az enzimes reakciók könnyen szabályozhatók és a kívánt konverzió elérésénél leállíthatók.

Időrendben az első enzim készítmény a glükóamiláz volt, ami teljesen lebontja keményítőt glükózzá. Megjelenése után a teljes keményítő ipar teljes egészében átváltott a hagyományos savas hidrolízisről az enzimes hidrolízisre. Az új technológia tisztább terméket, nagyobb hozamot és könnyebb kristályosítást eredményezett.

A második lépés 1973-ban a rögzített glükóz izomeráz megjelenése volt, amely lehetővé tette a nagy fruktóz tartalmú szirup (HFCS = high fructose corn syrup, magyar neve: izocukor, izoszörp) ipari gyártását. Ez volt az a nagy áttörés, ami egy több milliárd dolláros iparág, a HFCS termelés születéséhez vezetett az USA-ban.

6.1.5.1. *Enzimekkel módosított keményítők*

Megfelelő enzimek és a megfelelő reakciókörülmények kiválasztásával a keményítőből sokféle értékes termék állítható elő, amelyek az élelmiszeripar szinte bármely konkrét igényét ki tudják elégíteni. A különböző összetételű, illetve fizikai tulajdonságú szirupokat és módosított keményítőket sokféle élelmiszer, üdítők, cukrászdai, húsipari, sütőipari termékek, fagyalaltok, mártások, bébiételek, befőttek, lekvárok gyártásánál használják fel.

A hidrolizált keményítőt sok fermentációs tápoldatban használják, mint könnyen metabolizálható cukrot. Viszonylag olcsó szénforrásként alkalmazható ipari alkohol, primer metabolitok, enzimek előállításához.

6.1.5.2. *Glükóz szirupok igény szerint*

Glükóz szirupokat különböző növényekből (búza, kukorica, tapióka, manióka és burgonya) kinyert keményítő hidrolízisével kapunk. A hidrolízis módja és mértéke alakítja ki a végső szénhidrát összetételt, ezáltal az anyag funkcionális tulajdonságait. A hidrolízis mértékét általánosan a dextróz egyenértékkel jellemzik.

A dextróz (glükóz) egyenérték a cukrok redukáló képességén alapul. A glükóz aldehid csoportja miatt önmagában egy redukáló cukor. Viszont a keményítő láncába épülve az (1-4) kötések miatt elveszti redukáló képességét, csak a lánc egyik végén (=redukáló láncvég) lévő egyetlen glükóz képes redukálni. A hidrolízisnél fordított folyamat megy végbe: a keményítő molekula minden hasításánál két láncvég, egy redukáló és egy nem-redukáló vég jön létre. Így a redukáló csoportok számának növekedésével jellemezhetjük a folyamat előre haladását. Definíció:

$$DE = 100 \cdot \left(\frac{\text{elbontott glikozid kötések száma}}{\text{kezdetben jelen volt összes glikozid kötések száma}} \right)$$

$$DE = 100 \cdot \left(\frac{\text{redukáló cukor, glükózban kifejezve}}{\text{teljes szénhidrát mennyiség}} \right)$$

Értéke tehát a kiindulási keményítőnél gyakorlatilag nulla, a teljes bontásnál, amikor már csak szabad glükóz van jelen, 100. Egy maltóz oldat DE értéke értelemszerűen 50. A DE fordított arányosságban áll az oligoszacharidok polimerizációs fokával: átlagos tagszám = 100/DE.

Az irányított enzimes hidrolízissel jól meghatározott cukor spektrumú hidrolizátumok állíthatók elő. Az elcukrosított levek összetételét kromatográfias technikákkal analizálják. A HPLC és GPC (gélpermeációs kromatográfia) elemzések megadják az oldat molekulatömegeloszlását és a teljes szénhidrát-összetételt. Így pontosan jellemezhető és szabványosítható egy termék, például a maltóz szirup (HMS=high maltose syrup) összetétele és tulajdonságai.

Ezek a módszerek pontos összetételt adnak, de a gyakorlat szempontjából a minősítéshez sokszor elegendő közvetett paraméterek, mint például a viszkozitás mérése.

6.1.5.3 Technológia

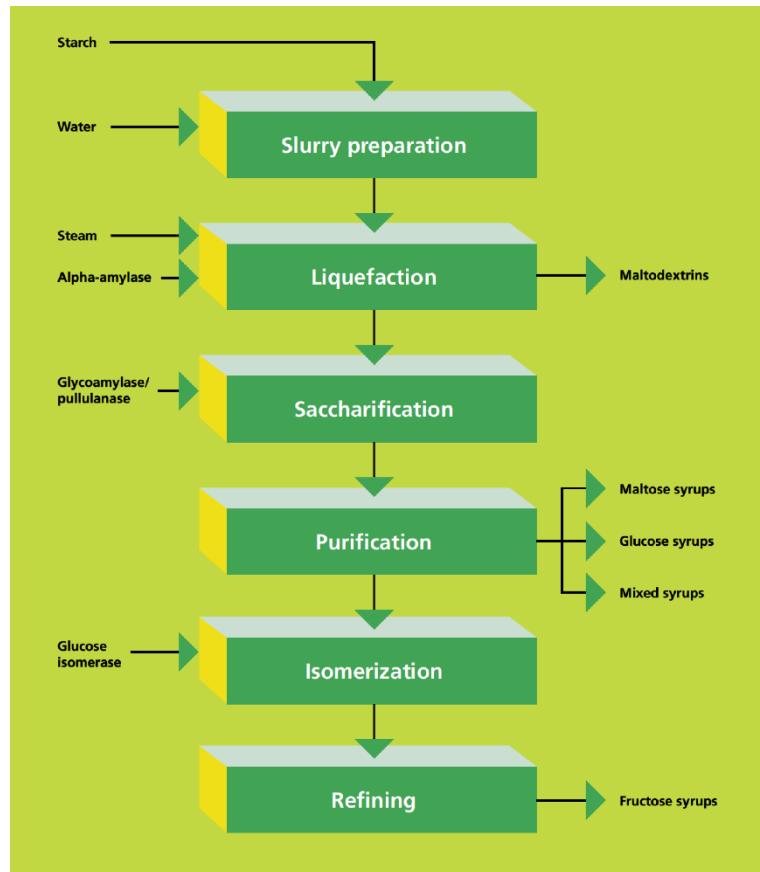
A modern enzimes műveletek a kukorica nedves őrléses feldolgozási technológiájába épülnek be. Bár ez már kiforrott technológia, még mindig folynak kutatások az enzimes átalakítás kizozatalának és hatékonyságának javítása érdekében.

A keményítő feldolgozásának a fő lépéseit a 6. ábra mutatja be. Az enzimes lépések az alábbiakban kerülnek bemutatásra.

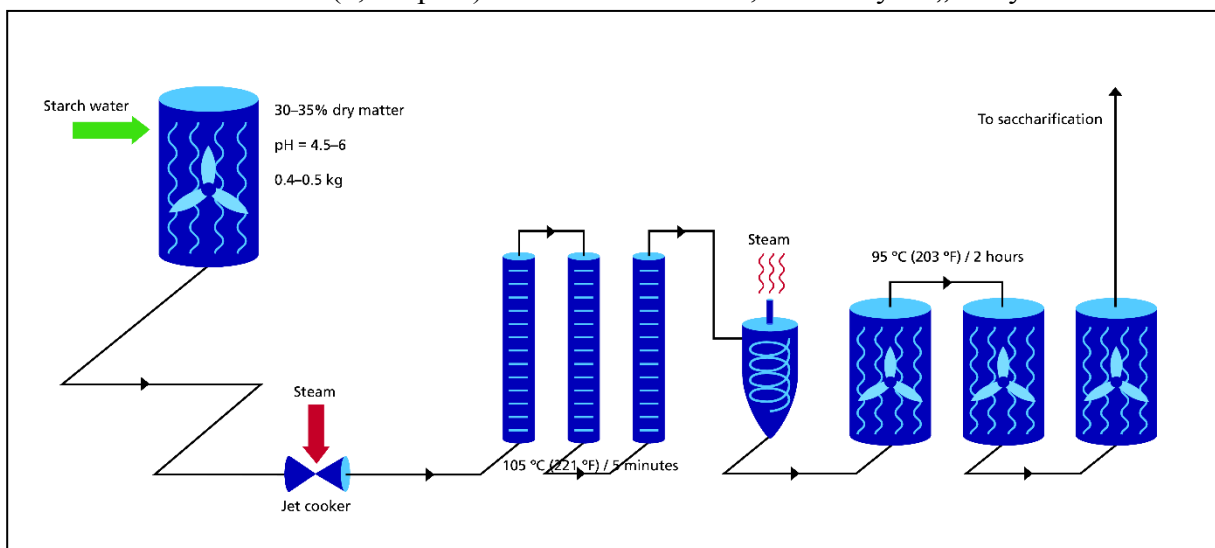
Folyósítás

A legerterjedtebben felhasznált nyersanyag a kukorica keményítő, ezt követi a búza, a tápióka és a burgonya. Mivel a natív keményítő az alfa-amiláz hatására csak lassan bomlik le, a 30-40% szárazanyag tartalmú szuszpenziót előbb a hőmérséklet emelésével elcsirizesítik. A hozzáadott hőstabil bakteriális alfa-amiláz megkezdja a keményítő láncok darabolását (folyósítás), ezzel a további enzimes bontást is lehetővé teszi.

A művelet kivitelezését mechanikailag is ki kell dolgozni, mert a csirizes keményítő szuszpenzió rendkívül viszkózus, a szokásos keverők a szokásos teljesítményfelvétellel nem képesek átkeverni a reaktort. A keverő rendszert inkább dagasztásra kell méretezni, mint keverésre. A folyósítás művelete onnan kapta nevét, hogy ez az óriási viszkozitás az enzim hozzáadására rövid idő alatt (0,5-1 perc) drámaian lecsökken, a keményítő „elfolyósodik”. A ke-



6. ábra A keményítő feldolgozásának a fő lépései



7. ábra A folyósítás berendezései

verős (szakaszos vagy folyamatos üzemű) reaktorok alkalmazását meg lehet kerülni, ha folytonos üzemben gőzinjektoros fűtést (jet cooker) alkalmaznak.

A legtöbb üzemben a keményítő elfolyósítása egyszeri enzimadagolással, gőzinjektoros fűtéssel zajlik (7. ábra). A hőstabil alfa-amilázt hozzáadják a keményítő szuszpenzióhoz, azután ezt szivattyúval átnyomatják a gőzinjektoron. Itt éles gőzt nyomatnak a folyadékba, ami lekondenzálva felemeli a hőmérsékletet kb. 105 fokra. Az elegy ezután egy hőszigetelt csőkiágyn halad keresztül – ez a hőntartási szakasz – ahol az 5 perces tartózkodási idő elégséges az elcsirizesítéshez és elfolyósításhoz. A részben elfolyósított keményítő szuszpenziót egy expanziós szelepen keresztül atmoszférikus nyomásra engedik ki. Ennek során a folyadék egy része elpárolog, főtömege pedig 90-100 °C-ra hűl. Ezen a hőmérsékleten kevertetik tovább egy-két órán át, amíg az enzim hidrolízis el nem éri a tervezett DE értéket.

Az enzim hidrolizálja az elcsirizesített keményítő $\alpha(1,4)$ -glikozidos kötéseit, ezáltal gyorsan csökkenti a viszkozitást, és α -dextrinek keletkeznek. A folyamatot ezen a ponton meg lehet állítani, és az oldatot tisztítás után bepárolni. A maltodextrineket (DE 15-25) reológiai tulajdonságaik miatt az élelmiszeriparban használják. Édeskés ízű funkcionális összetevők, töltő és sűrítő anyagok pasztákban, bébiételekben, szószokban, mártásokban, ragasztók a levesporokban és instant élelmiszerekben, stb.

Cukrosítás

A maltodextrineket további enzimes (glükóamilázos, pullullanázos) hidrolízissel a különböző édes szirupokká lehet alakítani. Ezeket a dextróz ekvivalensük szerint különböző csoportokba lehet sorolni: DE= 40-45: maltóz, 50-55: nagy maltóz tartalmú (high maltose), és 55-70: nagy konverziójú (high conversion) szirup. Több enzim kombinációjával (béta-amiláz, glükóamiláz, és pullulanáz, mint elágazást bontó enzim) közepes konverziójú szirupot is elő lehet állítani, amelynek maltóz tartalma közel 80%.

A maltodextrin fázistól glükóamiláz és elágazást bontó enzimek segítségével a legtöbb keményítő-nyersanyag (kukorica, búza, burgonya, tápióka, árpa, és a rizs) gyakorlatilag teljesen elhidrolizálható 95-97%-os glükóz tartalomig.

Az enzimgyártók eleve többféle enzimet tartalmazó, közös optimumú preparátumot forgalmaznak, pl. a DEXTROZYME amiloglikozidázt és elágazásbontó enzimet tartalmaz, amelyeknél a komponensek pH és hőmérséklet optimuma nagyon közel áll egymáshoz. Ennél a termékénél a működési paraméterek: 55-65 °C és pH=4,0-5,0. Az enzim mennyisége és a szükséges reakcióidő fordítottan arányos egymással, sok enzimmel 18 óra alatt el lehet érni a kb. 98%-os hidrolízist, kisebb beméréssel viszont 48 óra is szükséges lehet.

A cukrosításnál célszerű meghígítani a 30-40%-os dextrin oldatot, mert ilyen nagy koncentrációknál mellékreakciók léphetnek fel. Ha az amilázok „nem találnak elég vizet” a hidrolízishez, akkor a levett cukrot víz helyett egy másik oligoszacharidhoz kapcsolják, ezáltal szokatlan szerkezetű oligoszacharid melléktermékek jelennek meg.

A kapott glükóz oldatot a felhasználási cél szerint tisztítják, elsősorban adszorpciós műveletekkel. A tiszta glükóz monohidrát formájában kristályosítható. A bepárlás és a kristályosítás energiaigényes művelet, ezért gazdaságosabb a glükózt tömény oldat, szirup formájában értékesíteni.

A glükóz gyártás olyan nagy üzemméretben folyik, hogy minden technológiai lépésben a gazdaságosabb folytonos működtetésre törekednek.

A gyártás kihozatala és a termék tisztasága a növényi nyersanyagtól függ, a keményítőre nézve 90-99% közé esik.

6.2. Glükóz-izomeráz (xilóz-izomeráz)

A glükóz gyártása mind agrotechnikailag, mind technológiailag gazdaságosabb, mint a szacharózé. Van azonban egy nagy hátránya, mégpedig az, hogy az édesítő hatása jóval kisebb. Emiatt ugyanolyan édességhez jóval többet kell az élelmiszerekbe adalékolni, mint a répacukorból. Ez egyrészt gazdasági kérdés, mert a több glükóz nagyobb költséget is jelent, másrészt egészségügyi kérdés, mert megnövelt cukorbevitel hosszú távol komoly egészségi károsodásokat okoz. Ezért keresték a megoldást, hogy hogyan lehetne az édesítő értéket megnövelni. Megállapították, hogy a szacharóz másik komponense, a fruktóz édesebb az előbb említetteknél, az édesítő értékek aránya: glükóz : szacharóz : fruktóz = 0,6 : 1 : 1,5.

6.2.1.1. Izomerizáció

Kézenfekvőnek látszott, hogy a glükózt egy izomerizációs reakcióban át kellene alakítani fruktózzá. Erre több enzim reakcióutat is találtak, de a technikai-gazdasági problémák (arzenát kofaktor, alacsony hőfok) miatt végül egy viszonylag rossz konverziójú enzimet, a xilóz izomerázt alkalmazzák világszerte. Az enzim eredetileg xilóz izomeráz, de az egy szén atommal hosszabb hexózokkal is végrehajtja ugyanazt a konverziót. Az enzim eredeti funkciója abban is megmutatkozik, hogy termelődését a xilánok (xilóz polimerek, korpában, fűrészporban, fás anyagokban található) indukálják.

A szokásos 60 °C körüli hőmérsékleten az elméleti egyensúly közel 50-50%-os koncentráció aránynál van. Az egyensúly viszont csak hosszú reakcióidő után áll be, ezalatt pedig melléktermékek (pl.: pszikóz) keletkezésével kell számolni. Ennek elkerülésére és a kihozatal javítására a reakcióidőt lerövidítik, a konverziót csak kb. 43%-os fruktóz tartalomig vezetik.

6.2.1.2. Mikroorganizmusok

Az enzimet sokféle mikroorganizmusban azonosították, szinte minden gyártó a saját izolálású nemesített törzsét használja. Közös vonása a fejlesztésnek, hogy az eredetileg induktív enzimek génjeit áthelyezték a konstitutív génállományba.

- *Bacillus coagulans* (Sweetzyme, NOVO, DK)
- *Actinoplanes missouriensis* (Maxazyme, DSM, NL)
- *Streptomyces rubiginosus* (Optisweet22, Miles-Kali Chemie)
- *Streptomyces phaeochromogenes* (Sweetase, Nagase, J)
- *Arthrobacter* (ICI)

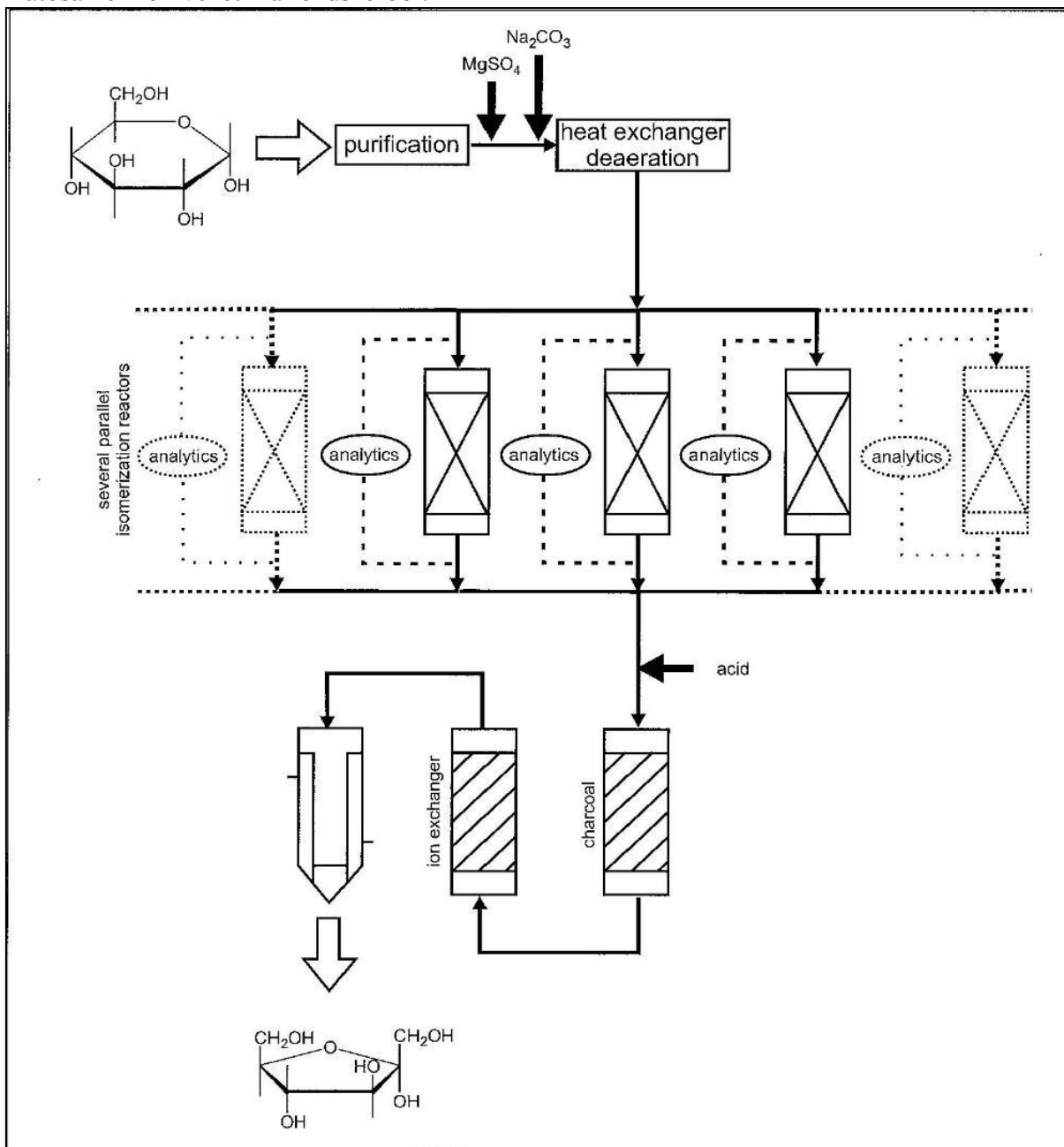
Az izomerázok intracellulárisan termelődnek. A hasznosítandó xilán poliszacharid nem lép be a sejtbe, de hidrolízis terméke, a xilóz igen, és ezt a sejten belül izomerizálja az enzim. A sejtfeltárás, enzimizálás nehézkes művelet, még nagyobb probléma az izolált enzimek bomlékonysága. Emiatt különböző immobilizációs módszerekkel rögzítik az enzimeket. Használhatnak rögzített sejteket, sejtfeltárás után a törmelékkel keresztkötött enzimeket formulázott tölteteket is.

A NOVO *Bacillus coagulans* folytonos fermentációjában a megfelelő enzimtermelés érdekében Co és Mg ionokat adagolnak a tápoldatba. A katabolit represszióval itt is számolni kell, a termelési szakaszban glükóz és oxigén limitet kell fenntartani. A közeg pH-ja a *Bacillus* fermentációknál szokásos 7,5-8.

6.2.1.3. Konverzió

Az izomerizálásra kerülő glükóz szirupnak tisztának kell lennie: szűrés és aktív szenes kezelés vagy ioncserés tisztítás szükséges. Ha az amilázok kalcium igénye miatt az oldat Ca ionokat tartalmaz, azt el kell távolítani, mert ezek az ionok mérgezik az enzimet. A Mg ionok viszont éppen ellenkezőleg, stabilizálják és aktiválják az enzimet. Az oldott oxigén jelenléte inaktíválja az enzimet és fokozza a melléktermékek képződését. Emiatt a meleg cukoroldatban amúgy is rosszul oldódó oxigén nyomait nátrium-metabiszulfittal távolítják el.

Az izomerizációs reakciót oszlopba töltött immobilizált enzimekkel hajtják végre. A reakció optimális pH-ja 7,5 vagy felett, a hőmérséklet 55-60 °C. E körülmények között nagy az enzimaktivitás, a mikrobiális befertőződés esélye kicsi és az enzim stabilitása is még megfelelő. Ugyanakkor a glükóz és fruktóz meglehetősen instabil, és könnyen átalakul, szerves savak és színes melléktermékek keletkezhetnek. Ezt úgy csökkentik, hogy minimalizálják a reakcióidőt, a cukrok csak annyi időt töltenek e reakciókörülmények között, amíg az oldat átfolyik az immobilizált izomerázt tartalmazó oszlopon. Az enzimet szemcsékben rögzítik, így töltik az oszlopba. A szemcsék elég merevek ahhoz, hogy ne roppanjanak össze a nyomáskülönbségtől, és ne zárják el a folyadék útját. A folyamat kis mennyiségű hőt termel, amit folyamatosan el kell vezetni a rendszerből.



8. ábra Izoszörp előállítása

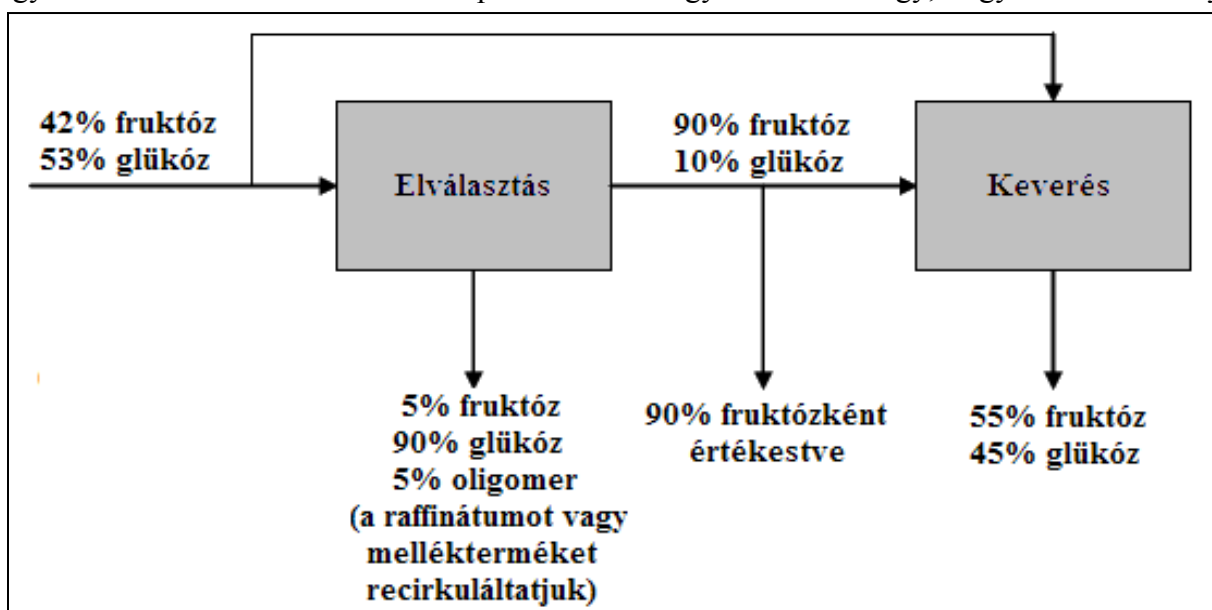
A rögzített enzim idővel veszít aktivitásából. Manapság a kereskedelmi glükóz izomerek aktivitásának felezési ideje ipari körülmények között 200 nap körül van. Az enzimet hatékonyságát minden reaktornál az elfolyónál optikai szenzorokkal folyamatosan mérik.

Az aktivitás csökkenése miatt az oszlopreaktor konverziója időben változik, így nehéz lenne fenntartani az állandó fruktóz koncentrációt a termékben. Le kellene lassítani az áramlási sebességet, ami viszont a melléktermékek keletkezésének kedvez. Ennek elkerülése érdekében sok oszlopot működtetnek együtt összekapcsolva. Egy gyengébb és egy aktívabb töltetet sorba kötve közel állandósult működést lehet elérni. Az USA-ban használatos oszlop jellemző átmérője általában 0,6-1,5 m, és tipikus ágymagassága 2-5 m. Egy naponta több mint 1000 tonna izocukrot előállító üzem legalább 20 egyedi reaktort használ.

A kilépő cukorelegy százalékos összetétele jellemzően 53 : 42 a glükóz javára, a többi melléktermék. Ez még mindig nem pótolja tökéletesen a megszokott szacharózt. A lé további feldolgozása során adszorpciós lépésekkel megtisztítják, majd egy speciális kromatográfias művelettel részlegesen elválasztják a glükózt és a fruktózt.

Az elválasztásra kalcium ionokkal telített erős kationcserélő gyantát, pl.: DOWEX MONOSPHERE 99-et használnak. Az elválasztás mechanizmusa összetett. Egyrészt az oldott állapotban levő cukrok -OH csoportjai kölcsönhatásba lépnek a gyantán levő kalcium ionokkal (kelátképzés). A fruktóz és glükóz elválasztása azon alapul, hogy a fruktóz/kalcium ion komplexben erősebb kölcsönhatás jön létre, mint a glükóz/kalcium ion komplexben. Az elválasztás mechanizmusát ligandcserés kromatográfának is nevezik. Másrészt méretkizárásos kromatográfia is megvalósul, mivel a nagyobb molekulák, mint a tri-, tetra- és nagyobb méretű oligoszacharidok, fizikailag nem férnek be a gyantában található polisztirol láncok közötti legkisebb nyílásokba. Fruktóz tisztítás esetén a méretkizárásos kromatográfia a ligandcserés kromatográfiával együtt, párhuzamosan játszódik le. A szirupban levő oligoszacharidok a gyanta gyöngyökön kívül maradnak, így elsőként érnek az oszlop aljára.

Az elválasztáshoz igen nagy oszlophosszra van szükség (~10 m), ezért nem egy kolonával, hanem több, rövidebb oszlop összekapcsolásával, az ún. szimulált mozgó ágyas (simulated moving bed = SMB) technikával hajtják végre. A kapott frakciók így sem tiszták, mindkettő tartalmaz mintegy 10%-ot a másik cukorból is. A glükóz áramot visszavezetik az izomerizációra, a fruktóz áramot pedig többféleképpen is fel lehet használni. Lehet tovább tisztítani a fruktózt, tetszőleges tisztaságig, lehet ebben a 90%-os formában értékesíteni, de a legnagyobb részét az izomerizációból kapott 43%-os elegyhez keverik úgy, hogy a fruktóz arány



9. ábra A fruktóz tartalom beállítása

55%-ra növekedjen. Ez az összetétel felel meg legjobban a szacharóz tulajdonságainak, ezt használja föl az óriási mennyiségben az élelmiszeripar izocukor/izoszörp néven. Ezt az elegyet nem kristályosítják ki, hanem 70% szárazanyag tartalomig bepárolva oldatban forgalmazzák.

Az izocukor szinte minden téren képes helyettesíteni a szacharózt, de a legtöbbet mégis az üdítő italokban, fagyaltokban, édes- és tejiparban használják fel.

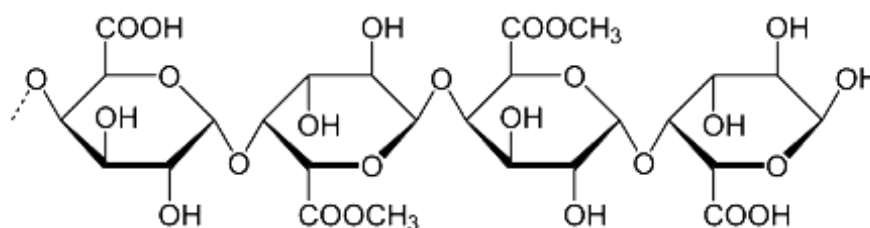
Adalékok: ez a technológia, mint amnyi más műszaki fejlesztés, a háborús politikának köszönhető. Amikor Fidel Castro rendszere átvette az irányítást Kubában, az USA gazdasági blokádot hirdetett ellene. Kuba fő exportcikke a nádcukor volt, ez nem kerülhetett az amerikai piacra. Ettől viszont cukorhiány lépett fel. Az Egyesült Államok nem tudta megtermelni a megfelelő mennyiségű cukrot. Cukornád termesztésére csak Floridában volt mód, ott is csak kis területen. A répacukor pedig eleve drágább, mint a nádcukor, csapadékigényes, és az agrotechnikája költséges, nehezebb gépesíteni. Ráadásul jól termő gabonatermelő területeket kellett volna átállítani cukorrépára. (A répacukor is valójában háborús kényszermegoldás, a napóleoni háborúk idején az angolok kontinentális zárlata miatt a trópusi területekről megszűnt a nádcukor importja, és ezért kezdtek Európában az édes répa nemesítésével és a cukor kinyerésével foglalkozni.) Emiatt született meg az igény, hogy a bőséges kukorica feleslegéből kellene valahogy cukorpótlót előállítani. A gyártás így amerikából indult (Clinton Corn Proc. Co, 1967, nincs kapcsolat a későbbi elnökkel), aztán elterjedt az egész fejlett világon. A következő technológiai fejlesztés az izomeráz enzim rögzítése volt (1974).

Magyarországon még a rendszerváltás előtt (1982-ben) állami vállalatként hozták létre Szabadegyházán a kukoricafeldolgozó vertikumot, mai szóval biofinomítót, ami melléktermék nélkül dolgozta fel a kukoricát kb 15 féle terméké (izocukor, glükóz, ipari alkohol, glutén, kukorica csíra, csíraolaj, élesztő, takarmányok, stb.). Teljes egészében megvásárolták a fejlett technológiát. Ami akkor azért volt nagy szó, mert a forint még nem volt konvertibilis, és ezt dollárban kellett kifizetni. Ez kivételesen jó beruházásnak bizonyult, három év alatt dollárban is megtérült a befektetés.

Az üzem jelenleg is működik HUNGRANA néven osztrák többségi tulajdonban, de az eredetileg évi 140 000 tonnás kukorica feldolgozó kapacitását azóta több mint egy millió tonnára növelték.

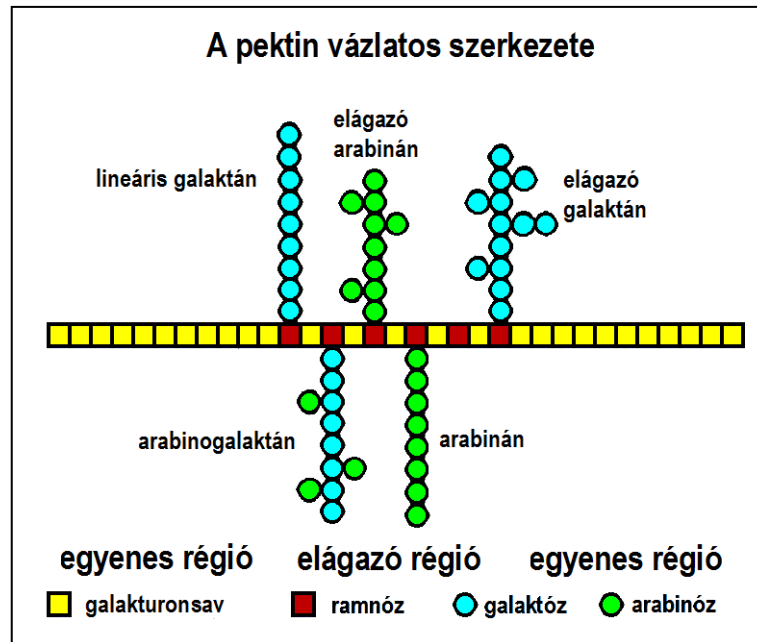
6.3. Pektinázok

A pektin a keményítőhöz hasonlóan a természetben gyakran előforduló poliszacharid, összetétele azonban messze nem olyan egységes. Első közelítésben poli-galakturonsavnak tekinthető, melynek karbonsav csoportjai részlegesen (40-70%-ban) metilalkohollal észterezettek. A monomerek béta 1,4-es kötéssel kapcsolódnak össze.



10. ábra A pektin alaplánca

Valójában heteropoliszacharid, csak a lineáris alapláncot alkotja tisztán galakturonsav, az elágazó zónákban más cukor molekulák is megjelennek. Itt a lineáris alapláncba ramnóz molekulák is beépülnek, és ezekhez rövidebb, 10-20 egységből álló oligoszacharidok kapcsolódnak, amelyek galaktózból, arabinózból és xilózból állnak.



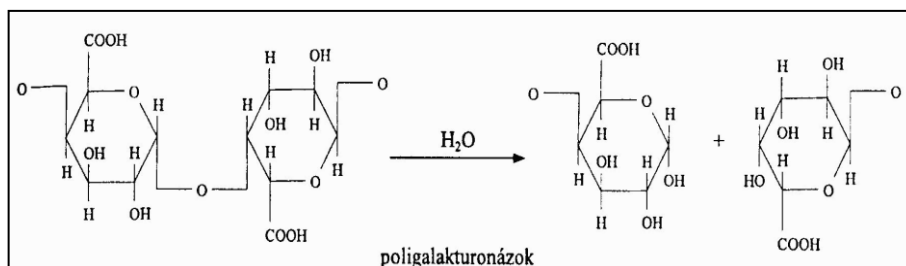
11. ábra A pektin oldalláncai

A pektin szinte minden növényi sejt falának középrétegében előfordul, a cellulózzal, hemicellulózzal együtt. A kultúrnövények között a zöldségek és gyümölcsök (alma, körte, bogyós gyümölcsök, citrusfélék, paradicsom, répa, uborka) termésének érésénél játszik szerepet. Az éretlen termés kemény, a sejtfalak szilárd tartást adnak a szöveteknek. Az érés folyamán a növény saját enzimei részlegesen elbontják a pektint, az a sejtfalból a citoplazmába kerül, ettől a termés megpuhul, élvezhetővé válik. Ez a pektin a felelős a feldolgozás során a dzsemek gélesedéséért (ez itt előnyös, sokszor adagolnak is a gél keményítése érdekében „befőzőpektint” a gyümölcshöz), ugyanakkor sok vizet/folyadékot tart vissza a gyümölcs húzában, ezáltal a gyümölcslégyártásnál kevesebb levet lehet kipréselni, csökkenti a léhozamot. Mint kiváló védőkolloid „oldatban” tartja a gyümölcslé kolloidális anyagait (fehérjéket, rostanyagokat stb.), ettől a lé zavaros, nem szűrhető és tárolási problémák is fellépnek.

A pektint a gyümölcsfeldolgozás melléktermékeiből extrahálják, mérsékelt égövön alma maradékból, melegebb klímán pedig citrusfélék héjából.

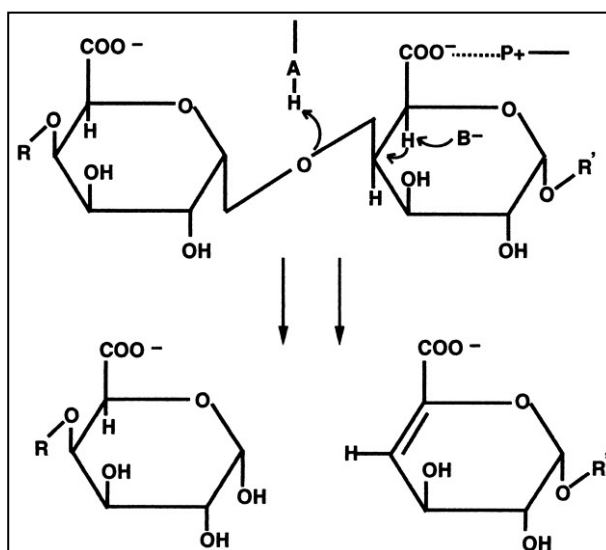
A növényi pektinbontás mellett sok mikroorganizmus, elsősorban a fonalas gombák termelnek bontó enzimeket. Ezek biológiai szerepe egyértelmű. A penészek számára kiváló táptalaj a növények termése a benne található tartalék tápanyagokkal, ehhez pedig a sejtfal lebontásával tudnak hozzájutni. A prokarióták között a lágyrothadást előidéző növénypatogén *Erwinia* fajokra jellemző az enzimtermelés.

A pektin bontásában még több fajta enzim vesz részt, mint a keményítőében. Itt is megtaláljuk az exo- és endoenzimeket. Az exo-poligalakturonázok a lánc végéről hasítanak le egy-egy galakturonsav-egységet. Az endoenzimek között az endo-poligalakturonázok statisztik



12. ábra Endopektinázok hatása

tikusan hidrolizálják a láncot, rövidebb pektin darabokat hoznak létre. Emellett az enzimkomplexben gyakran előfordul a pektin liáz enzim is, amely nem hidrolízissel vágja el a pektin láncot, hanem a hidrogének átrendezésével egy kettős kötést hoz létre a nem-redukáló láncvégen álló cukorban.



13. ábra Pektin liáz

A poligalakturonázok (pektinázok) mellett rendszerint jelen van a pektinészteráz is, amely a pektin metilészter kötéseit hidrolizálva metanolt szabadít fel.

Ipari termékként a pektinbontó enzimkomplexeket elsősorban penészekkel (*Aspergillus*- és *Penicillium*-fajokkal) állítanak elő. Az enzimek extracellulárisan (sejten kívül) termelődnek, tehát tenyésztés után a fermentléből egyszerűbben preparálhatók. A fermentáció során több enzim termelődik párhuzamosan, a felsoroltakon kívül rendszerint hemicelluláz-keverék is megjelenik, amelyben xilanázok, arabinázok is jelen vannak. Ezek szétválasztására, kitisztítására az iparban nincs szükség, ezek a mellékaktivitások nem zavarják, hanem segítik a fő funkciót, a poliszacharidok lebontását.

Felhasználás

A pektinhidrolízisnek több ipari folyamatnál van jelentősége. Ha pektináz-preparátumot adunk gyümölcszúvalékhhoz, akkor a léhozam 2–8%-kal növelhető. Ugyanez az eljárás használható a szőlő feldolgozásánál a must préselés hozamának javítására, illetve az olívaolaj kipréselésénél is.

A gyümölcsleárpár az enzimet ezen kívül gyümölcsle derítésére is felhasználja. Az enzimmel nem kezelt gyümölcsle zavaros és szűrhetetlen, de ha a pektint enzimes úton lebontjuk, a védőkolloid hatása megszűnik, és a lé könnyen „tükrösre” szűrhető.

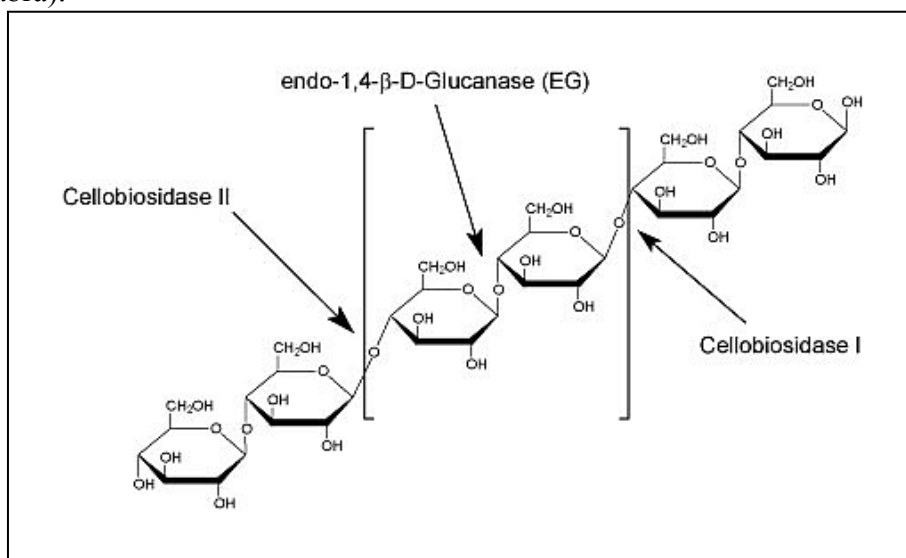
A pektin-hidrolízisnek a felsoroltakon kívül a textiliparban is van jelentősége, a len és a kender áztatásánál. A len és kenderkórók feltárása egy spontán mikrobiológiai folyamatban, az áztatás során történik. Az áztatás célja a külső háncrestok maradéktalan elválasztása a belső fás részekről. A háncrestben cellulózban dús, rugalmas kötegeket, rostnyalábokat találunk, amelyeket egymással és a farésszel pektin (mint ragasztóanyag) köt össze. A kenderáztatásnál ez a pektinanyag elbomlik, és ezáltal a szálak szabadabbá válnak, szárítás után a tilolással és gerebenezéssel elválaszthatók. A kender és len növényen mindig vannak a talajból származó, pektinázt termelő *Bacillus macerans* és *Bacillus asterosporus* sejtek, amelyek a szá-

mukra kedvező életfeltételeket jelentő áztatóvízben gyorsan elszaporodnak, enzimet termelnek és ezzel fellazítják a rostokat.

6.4. Celluláz

A cellulóz a keményítőhöz hasonlóan egy glükóz homopolimer, de az egyes glükóz egységek közötti glikozidos kötések térállása nem α , hanem β (ekvatoriális), ettől a lánc nem spirális alakú, hanem egyenes. A cellulóz molekulának nincsenek elágazásai, így a lineáris β -(1 \rightarrow 4)-glükán láncok képesek párhuzamosan egymás mellé rendeződni, kvázikristályos szerkezetet alkotni. A cellulóz a növényi sejtek sejtfalának fő komponense. Lineáris molekulaláncai a növények rostjaiban bonyolult szerkezetű kompozitot alkotnak a hemicellulózokkal (5- és 6-szénatomos heteropoliszacharidok) és a ligninnel (polifenol alapú polimerek). A cellulóznak az ad jelentőséget, hogy a bioszférában termelődő biomaszából túlnyomó része cellulóz, a keményítő és egyéb poliszacharidok termelése jóval kisebb. Ha sikerülne ennek az anyagnak a gazdaságos, ipari léptékű feldolgozását megoldani, az az élelmiszeriparnak, a bioenergia termelésnek, de még a vegyiparnak is hatalmas lökést adhatna. Ehhez viszont le kellene bontani a felépítő glükóz egységekre, amelyek azután a további átalakítások kiinduló anyagai lehetnek (pl. bioetanol, egyéb fermentációk). A feltételes mód annak szól, hogy ezek a folyamatok még nem érték el a gazdaságosság határát. Nagyon sok kutatás és fejlesztés folyik a cellulóz kémiai és enzimes bontása területén, de ipari szinten működő eljárás még nem született. Ennek oka nem elsősorban a cellulóz molekula nehéz bonthatósága, hanem a növényi rostok említett komplex szerkezete, amelybe a cellulóz beágyazódik. A cellulóz kiszabadításához olyan fizikai vagy kémiai előkezelések (gőzrobbantás, ammóniás áztatás) szükségesek, amelyek megdrágítják az eljárást. Emellett a cellulóz (tartalmú anyagok) nem oldódnak vízben, a reakció heterogén fázisú, ami további problémákat okoz. E technológiák nagy elvi lehetőségei dacára jelenleg a cellulázokat nagy mennyiségben más célokra termelik, így pl. a textilipar és a mosásgépgyártás számára.

A cellulóz enzimes bontásában – hasonlóan a keményítőéhez – egy több enzimből álló komplex vesz részt. Ennek egyik eleme a β -endoglukanáz (EG), amely a poliszacharid lánc belsejében hidrolizálja a glükózok közötti kötéseket és ezzel oligo- β -glükánokat hoz létre. A cellulóz bontás exoenzimeit a β -amilázokhoz hasonlóan a lánc végéről kettésével választják le a glükóz monomereket cellobióz formájában. Ezek a cellobiozidázok, két alaptípusukat különíthetjük el aszerint, hogy a lánc redukáló (CB1) vagy nem-redukáló (CB2) végén fejtik ki hatásvégüket (14. ábra).



14. ábra A celluláz enzimek támadáspontjai

A bontás utolsó lépése a cellobióz hidrolízise glükózzá, ezt az eléggé elterjedt cellobiáz (béta-glükozidáz) enzim katalizálja.

6.4.1. *Trichoderma* enzimek

Egy sor mikroorganizmus képes ilyen enzimek előállítására, ezek között legelterjedtebben alkalmazott a *Trichoderma reesei* és a *T. viride*. Ezek celluláz komplexei mind a három aktivitást tartalmazzák, de ezeken belül elkülöníthető 7-8 izoenzim is. Az enzimek párhuzamosan termelődnek és együttesen, ugyanabban a közegben hatnak, így az evolúció során a működési optimumuk is összehangolódott. A *Trichoderma* enzimek pH = 4,2-5,2 között működnek hatékonyan.

Az enzimtermelés ebben az esetben is induktív és a katabolit represszió hatása alatt áll. Glükóz jelenlétében nem termelődik az enzim, hiányában viszont cellulózzal (cellulóz tartalmú melléktermékekkel, hulladék anyagokkal), cellobiózzal, és, bármilyen különös, de laktózzal is indukálható. A fermentációnál a szilárd szubsztrátok, a reakció heterogén volta miatt sokat foglalkoztak a szilárd fázisú fermentációval (SSF), de a szubmerz technológia jóval gyorsabbnak bizonyult, bár más enzimekkel összehasonlítva a celluláz fermentáció ebben a formában is lassú és viszonylag kis mennyiségű enzimfehérjét termel. Próbálkoztak folytonos fermentációval is, abból a megfontolásból, hogy a termelődő és felhalmozódó redukáló cukrokat eltávolítsák a rendszerből, mielőtt lefékeznek az az enzimtermelést.

6.4.2. Felhasználás

A pamut az egyik legelterjedtebb textilanyag, szálai gyakorlatilag tiszta cellulózból állnak. A cellulázok egyik textilipari alkalmazása az enzimes kőmosás. Az enzimes kezelés úgy változtatja meg a pamutszálak felületét, hogy azok részben elengedik az indigó festéket, és ezzel ugyanolyan hatást érnek el, mint a durva mechanikus kőmosással.

Az anyag tapintása és fénye egyaránt függ a felület simaságától. Mindkettőt rontja, ha az alkotó fonalak felületén kiálló parányi rostvégek meredeznek, ettől a felület matt hatású lesz. Ezt cellulázos kezeléssel csökkenteni lehet, mind a gyártásnál a kikészítésnél, mind a ruhák mosása során. A cellulázt emiatt széleskörűen alkalmazzák a mosóporokban, az enzim a pelyheket (bolyhokat) eltávolítja, de nem támadja meg a cellulóz rostokat, a textil színes, fényes marad hosszú hordás és gyakori mosás után is.

A problémát az okozza, hogy a *Trichoderma* enzimek enyhén savas közegben működnek hatékonyan. Ez a gyárban, a kikészítésnél beállítható, de a ruha mosása lúgos közegben és magasabb hőfokon történik. Erre a célra más enzimeket kellett keresni. Ilyen esetekben a természetben extremofil fajokat keresnek, feltételezve, hogy ezek enzimeit is képesek szélsőséges körülmények között működni.

Adalékok: A magas pH-jú és hőmérsékletű élőhelyeket Kelet-Afrika szikes tavaiban keresték (Kenya, Rift Valley, Bogoria tó, ott is egy flamingó fészkelő telep, ahol a madárürülék még lúgosabbá tette a közeget), innen izoláltak alkáli toleráns vagy obligát alkalofil és hőtoleráns fajokat.

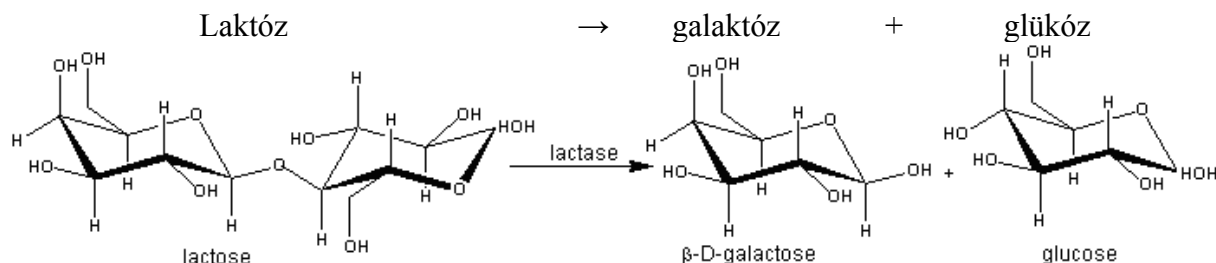
A megfelelő tulajdonságú alkalikus cellulázt a *Bacillus* BCE103 fajban találták meg. Ez a törzs viszont nehezen szaporítható és kevés enzimet termel, emiatt az endocelluláz gént *B. subtilis*-be klónozták. Ez jól ismert, biztonságos gazdaszervezet, extracellulárisan termeli az enzimet, így a feldolgozás is egyszerűbb. Az így termelt hő-, alkáli- és fehérítőtűrő enzimet a Genencor hozta forgalomba 1998-ban PURADAX^R néven.

6.5. β-galaktozidáz (laktáz)

Ez az enzim di- és oligoszacharidokban az egyes szénatom béta térállású glükozidos kötésével kapcsolódó galaktóz egységet ismeri fel, és ezt a kötést hidrolizálva galaktózt szabadít

fel. Leggyakoribb szubsztrátja a tejcukor (laktóz, galaktóz(1→4)glükóz diszacharid), amely a hidrolízis során galaktózra és glükózra bomlik.

Az ábrán az is jól megfigyelhető, hogy a két aldohexóz szerkezete nagyon hasonlít egymáshoz, a mindössze a 4 szénatomon lévő -OH csoport térállása különbözik, a glükóznál ekvatoriális, a galaktóznál axiális.



15. ábra A tejcukor hidrolízise

A laktáz aktív centrumában egy cisztein és egy hisztidin aminosav vesz részt közvetlenül a katalízisben. A β -kötésben lévő galaktóz kapcsolódik az enzimhez, az SH-csoport protonot ad át a galaktóz oxigén atomjának, és a hisztidin imidazol csoportja nukleofil támadást intéz a galaktóz C-1 szénatomjára. A glükóz vagy más aglikon molekularész leválik. A következő fázisban egy ROH típusú akceptor, például víz protonálja a szulfhidril aniont és felszabadítja galaktózt. Az akceptor egy másik cukor is lehet, ekkor di-, tri- vagy akár poliszacharidok is képződhetnek. Ezt a transzferáz aktivitást nem-emészthető oligoszacharidok, prebiotikumok előállítására használhatjuk fel.

Egyes kationok, mint például a Ca^{2+} és Na^{+} gátolhatják a reakciót, ugyanakkor a K^{+} , a Mg^{2+} és a Mn^{2+} aktiválják az enzimet. Termékinhibíció is fellép, különösen a galaktóz gátolja erősen az enzimreakciót.

6.5.1. Termelő organizmusok

β -galaktozidázt nagyon sok törzs termel. A baktériumok között részletesen foglalkoztak az *E. coli* enzimével, amelynek génje a *lac* operonban található (operon szabályozás, Jacob és Monod, Nobel díj 1965), de ez az intracelluláris enzim ipari szempontból érdektelen.

Aspergillus oryzae, *A. niger*: penész eredetű laktázok, vagy savas laktázok. pH optimumuk 4-5 közé esik, optimális működési hőmérsékletük ~ 55 °C. A fonalas gombák extracellulárisan termelik az enzimet, viszonylag olcsó termékek, de alkalmazási korlátjuk, hogy az alacsony pH optimum miatt tejben nem alkalmazhatók.

Kluyveromyces lactis (élesztő laktáz, semleges laktáz): pH optimuma majdnem semleges, 6-7 közötti, hőfok optimuma ~ 35 °C. Az élesztő intracellulárisan termeli, emiatt költségesebb előállítani, viszont alkalmazható tejben is a laktóz hidrolízisére.

Az emlősök kicsinyeiket tejjel táplálják, ez változó töménységben, de minden esetben tartalmaz tejcukrot. Az újszülöttek vékonybele termeli a laktázt, amely emészthető monomerekké bontja a tejcukrot. Az életkor előrehaladtával (az embernél kb. három éves kor után) ez az enzimtermelés gyakran megszűnik, ekkor jön létre a laktóz intolerancia. Az emésztetlen tejcukor okozza a kellemetlen tüneteket. Ezek megelőzésére a célszerű fogyasztás előtt a tejben a laktózt enzimesen hidrolizálni.

Az enzim előállítása szubmerz, aerob fermentációval történik (bár az *Aspergillus*-oknál leírtak szilárd fázisú fermentációt is). Szénforrásként célszerű tejcukrot alkalmazni, ez indukálja a növekedéshez kötött laktáz termelést. A fermentáció időtartama a törzstől függ, az élesztő fermentáció egy-másfél nap alatt lefut, a penészeknél 4-5 napig is eltart. A feldolgozás

az élesztőknél bonyolultabb a sejtfeltárás művelete miatt. Az enzim kinyerésénél segíthet a sejttömeg kezelése hidegen toluollal.

6.5.2. *Felhasználás*

A különböző laktázok konkrét alkalmazásait elsősorban a pH optimum, és más pH-függő jellemzők határozzák meg. A semleges optimumú élesztő laktázt túlnyomórészt a laktózszegény sterilizált tej termelésére használják. Ugyanez alkalmazható az édes savó (pH = 6,1) laktóztartalmának bontására is. A penész laktázt viszont a sajtgyártás másik melléktermékének, a savanyú savónak a kezelésére használják.

Fermentált tejtermékeknél (joghurt, sajt stb.) a hidrolízissel létrehozott cukrok a sejtkultúrák szaporodását felgyorsítják.

Az élelmiszeriparban a tej, tejalapú italok és tejpor gyártásánál a laktóz hidrolízise, növeli az édességet. Az egyes cukrok relatív édessége a szacharózhhoz viszonyítva: laktóz 20% < galaktóz 58% < glükóz 70%. Ebből látható, hogy a hidrolízis több mint háromszorosára növeli az édességet, ettől a termékek vonzóbbak lesznek, különösen a gyermekek számára. A fagyaltoknál az íz mellett még egy szempont szól az enzimés kezelés mellett. A laktóz oldhatósága rossz, különösen fagyponthoz közeli hőmérsékleten, így előfordulhat, hogy a fagyaltban ki-kristályosodik, ami rontja a termék élvezeti értékét. Hidrolízis után a monoszacharidok jól oldódnak, kiválás nem fordul elő.

Laktóz intolerancia esetén az is megoldás lehet, hogy a tejcukrot tartalmazó élelmiszerekkel együtt tablettát, draszt, vagy kapszula formájában laktáz enzimet vesz be a fogyasztó, és ezzel pótolja az emésztőcsatornából hiányzó enzimet.

A laktáz felnőttkori hiánya a háziállatoknál is természetes. Ha tehát a laktózt felnőtt állatok takarmányozásában alkalmazzák, ezt a tejcukrot is célszerű előzőleg hidrolizálni. Borjú és szopósmalac-tápokban gyakran alkalmaznak sajtgyári savót, ezeknél a tejcukor bontása előnyös, de nem feltétlenül szükséges.

6.5.3. *Technológiák*

1. Szakaszos enzimés technológia laktózszegény tej előállítására:

Azért választják a szakaszos eljárást, mert a folytonoshoz képest kisebb a befertőződés veszélye. Oldott élesztő enzimet adnak a tejhez, a tej saját közel semleges pH-ját nem változtatják meg. A tejet 35 °C-on tartják 4 órán keresztül. Ennyi idő alatt a laktóz 70-80%-a átalakul, a mikrobák szaporodása viszont még nem számottevő. Az enzimfehérje a tejben marad, a folyamatos sterilizálás (UHT = ultra high temperature, ~140 °C) során inaktívulódik. A termék tehát nem laktózmentes, csak csökkentett laktóz tartalmú, más szóval laktózszegény, low lactose milk.

2. Folytonos technológia immobilizált enzimekkel:

Ezt savanyú savó (sajtgyári melléktermék) laktózáinak hidrolízisére használják. A savas közegben jól alkalmazhatók az olcsó penész enzimek. Az alacsonyabb pH részleges védelmet nyújt a befertőződés ellen is. Az enzimet oldhatatlan hordozóra rögzítik, ezzel oszlopokat töltenek meg, amin megfelelő tartózkodási idővel átengedik a savót.

Adalék: Laktóz intolerancia, laktóz érzékenység

A csecsemők bélrendszere kb. 3 éves korukig elegendő laktáz enzimet termel, ezáltal tökéletesen megemésztik az anyatej laktóz tartalmát (~7,5%). E kor fölött a táplálkozás változásával ez az enzim feleslegessé válik, alapesetben termelődése fokozatosan leáll, felnőtt korra eltűnik. Ha ezek a személyek tejet (tejcukrot) fogyasztanak, az emésztetlenül halad végig a vékonybélben és a vastagbélbe jut. Ott ozmotikus hatásánál fogva jelentős mennyiségű vizet tart vissza, ezáltal hasmenést okoz. Ráadásul a jelen lévő anaerob bélmikroflóra szénforrásként hasznosítja a laktózt, amiből széndioxid és szerves savak keletkeznek. Az erős gázfejlődéssel kísért hasmenést nevezik explosive diarrhea-nak. Maga a jelenség a laktóz intolerancia, ezek a személyek nem tolerálják a laktózt, a kellemetlen tünetek elkerüléséhez kerülniük kell tejet és a belőle készült ételeket.

Az emberi faj fejlődése során egyes csoportokban, a pásztornépeknél viszont a táplálkozás úgy alakult, hogy a felnőttek is rendszeresen fogyasztottak tejet és tejtermékeket. Ezekben a populációkban szelekciós hátránnyá vált a felnőttkori enzimhiány. Azok, akik érett korukban is fogyaszthattak laktóz tartalmú élelmiszert, mennyiségileg (kalória) és minőségileg (teljes értékű fehérje) jobban táplálkoztak, így javultak a túlélési és szaporodási esélyeik. A nemzedékek során a szelekció átfordította az arányokat, a felnőttkori enzimtermelés lett a jellemző, és az intolerancia kisebbségbe szorult. Az eltérő táplálkozás miatt a laktóz intolerancia térkép nagyon tarkává alakult. A thai, kínai, és afroamerikai populációkban az intolerancia aránya 97, 90, és 73 százalék. A fehér (kaukázusi) és a svéd populációkban viszont a toleránsak előfordulása 84 illetve 96%. Területileg is erős átmenetek figyelhetők meg. Az intoleráns kínaiak mellett élő pásztorkodó mongolok toleránsak. Fekete-Afrikában a lakosság nagyrészt intoleráns, viszont a marhatartó maszájok toleránsak.