

Az α -amiláz keményítőbontó enzimek jellemzése és alkalmazása

Tárgyszavak: keményítő; α -amiláz; keményítőátalakító enzim; glikozilhidrolázok.

A keményítőtartalmú növények fontos szerepet játszanak az emberi táplálkozásban. Számtalan élelmiszer készül keményítőből, de a közvetlen felhasználás mellett nagy jelentősége van a módosított keményítőből előállított termékeknek, így pl. keményítőhidrolizátumoknak, glükózsirupnak, fruktóz-nak, stb. A keményítőt tartalmazó számtalan növényfajta között csekély az ipari felhasználásra alkalmas növények száma. Első helyen érdemel említést a kukorica, burgonya, búza és tapióka. Európában 1998-ban 3,6 M tonna kukoricakeményítőt, 2 M tonna búzakeményítőt és 1,8 M tonna burgonyakeményítőt állítottak elő.

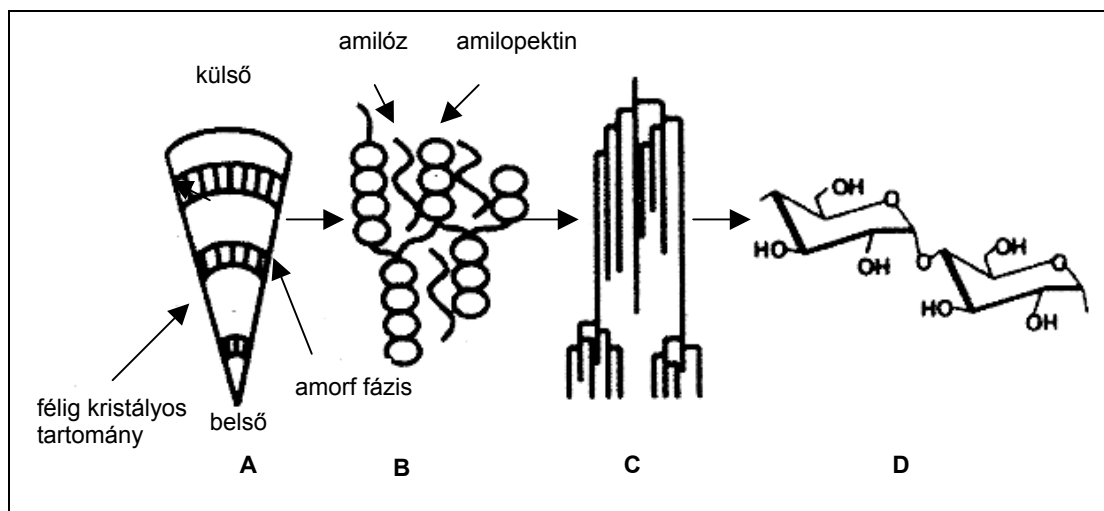
A keményítő jellemzése

A növények a napenergiát fotoszintézis útján kémiai energiává alakítják át. A keményítőt a növény levelében található plasztidok szintetizálják, de hasonló folyamat játszódik le az amiloplasztokban, amelyet a gumók, magvak és a gyökérszövet tartalmaznak. A keményítő vízoldhatatlan szemcse formájában keletkezik, és alakja, átmérője a növényfajtától függ. A gyakorlati szempontból jelentős keményítőszemcsék átmérője a következő: kukoricakeményítő 2–30 μm , burgonyakeményítő 5–100 μm .

A keményítőben a glükózmolekulák a C1 szénatom oxigénjén keresztül glikozidkötéssel kapcsolódnak egymáshoz. A glikozidkötés magas (lúgos) pH-tartományban stabil, de alacsony (savas) pH-tartományban könnyen elbomlik. A polimer molekulának azt a végét, ahol a latens aldehidcsoport található, redukáló láncvégnak nevezik. A keményítőben kétféle glükózipolimer fordul elő: az amilóz és az amilopektin. A lineáris szerkezetű amilózban a max. 6 ezer glükózegység $\alpha,1-4$ glikozidkötéssel kapcsolódik egymáshoz. A glükózegységek száma növényfajtánként változó. Jellemzésük a polimerizációs fokkal, DP (= degree of polymerization) történik. A burgonyában, ill. tapiókában előforduló amilóz DP értéke 1000–6000 között mozog, a kukorica, ill. búza DP-je 200–1200 között. A keményítő átlagos amilóztartalma 0–75%

között ingadozhat, jellemzően 20–25%. Az amilopektin elágazó szénláncú glükózpolimer, amelyben a rövid egyenes láncszakasz 10–60 α ,1-4 kötéssel kapcsolódó glükózegységből, az oldallánc pedig 15–45 α ,1-6 glikozidkötéssel kapcsolódó glükózegységből áll. Az amilopektin elágazásainak száma kb. 5%. A teljes amilopektin-molekula átlagosan 2 M glükózegységből áll, vagyis az egyik legnagyobb természetben előforduló molekula. Az amilopektin szerkezetét az egyenes lánc körül fűrtökbe rendeződő oldalláncok jellemzik.

A keményítőszemcsében kristályos és amorf fázisok találhatók (1. ábra). A gumókban és gyökérzetben található keményítőben az amilopektin kizárólag kristályos, az amilóz amorf alakban fordul elő. A gabonakeményítő kristályos fázisának fő komponense az amilopektin. Az amilóz a lipidekkel laza kristályokat képez, ami növeli a szemcse szilárdságát.



A – keményítőszemcse metszete, B – félis kristályos tartomány részlete,
C – amilopektin-molekula faszzerű szerkezetének kialakulása,
D – két α ,1-4 glikozidkötéssel kapcsolódó glükóz molekula

1. ábra A burgonyakeményítő kialakulása

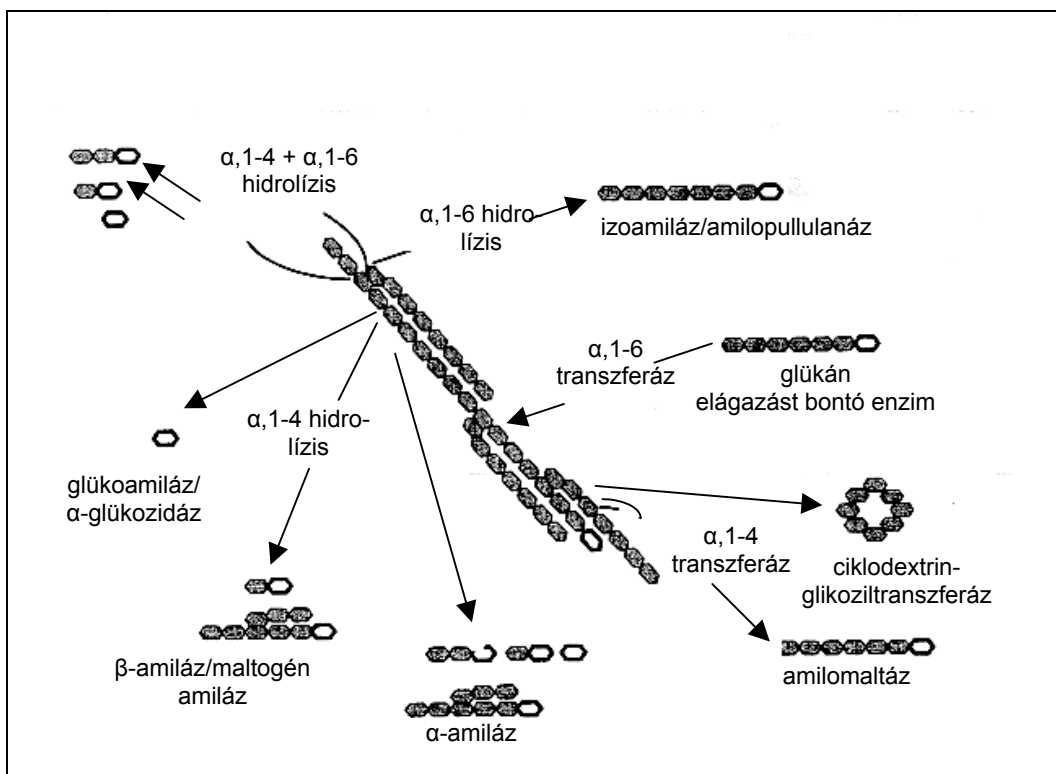
Az amilopektin vízben oldódik, az amilóz és a keményítőszemcse ellenben nem. A keményítő kinyerésénél ezt a tulajdonságát használják fel. A vizes keményítőszuszpenzióban melegítés hatására a szemcsék duzzadni kezdenek. Egy bizonyos ponton túl a duzzadás irreverzibilissé válik, ezt nevezik zselatinizálódásnak. A melegítés során a szemcsékből felszabaduló amilóz megnöveli a szuszpenzió viszkozitását. A hőmérséklet további emelésekor a szemcsék duzzadása és a szuszpenzió viszkozitása maximumot ér el, ezután a szemcsék összetöredeznek, és viszkózus kolloid diszperzió képződik. A tömény kolloid diszperzió hűtés hatására elasztikus géllé alakul. Retrogradáció során a keményítőkomponensekben lejátszódó változások következtében az oldott és disszociált állapot megszűnik. A retrogradációért elsősorban az amilóz felelős, az amilopektin kevésbé hajlamos a retrogradációra.

Keményítőbontó enzimek

A keményítő szintézisében különböző enzimek vesznek részt. A növényekhez hasonlóan a baktériumok is tartalmaznak amilopektint, főleg glikogén formájában. A glikogén szerkezete megegyezik az amilopektinével, különbség az oldalláncok hosszúságában és számában van. A glikogén oldalláncai rövidebbek és számuk kétszerese az amilopektin oldalláncainak. A baktériumok különböző extra- és intracelluláris enzimek segítségével hasznosítják az energia- és szénraktárként szolgáló keményítőt vagy glikogént (2. ábra).

A keményítőbontó enzimek négy csoportba sorolhatók:

- endoamilázok,
- exoamilázok,
- szénláncelágazásnál bontó enzimek,
- transzferázok.



2. ábra Keményítőbontó enzimek. Az üres gyűrű a polimermolekula redukáló láncvégét jelöli

Endo- és exoamilázok

Az endoamilázok az amilóz vagy amilózláncon belül elhelyezkedő α -1,4 glikozidkötést bontják. Az α -amiláz az egyik legismertebb endoamiláz (EC

3.2.1.1), és számtalan mikroorganizmusban előfordul. Az α -amiláz hatására különböző lánchosszúságú α -konfigurációjú oligoszacharidok és az elágazó oligoszacharidokat alkotó α -dextrinek keletkeznek.

A második csoportba sorolt exoamilázok vagy kizárólag az α ,1-4 glikozidkötést, mint pl. a β -amiláz (EC 3.2.1.2) vagy mindkét kötéstípust – az α ,1-4 és α ,1-6 glikozidkötést – bontják, pl. az amiloglükózidáz vagy glükóamiláz (EC 3.2.1.3) és az α -glükózidáz (EC 3.2.1.20). Az exoamilázok, az amilóz vagy amilopektin kizárólag láncvégi glükózát bontják, ennek következtében a keletkező végtermék vagy glükóz (glükóamiláz és α -glükózidáz), vagy maltóz és β -dextrin (β -amiláz). A β -amiláz és a glükóamiláz ezen kívül a bontáskor keletkező α -konfigurációjú maltózt β -konfigurációjává konvertálja. A glükóamiláz és α -glükózidáz szubsztrátspecifikusságban különböznek egymástól: az α -glükózidáz a rövid malto-oligoszacharidokat hasítja α -konfigurációjú glükóz keletkezése közben. A glükóamiláz elsősorban a hosszú szénláncú poliszacharidokat bontja.

Az exoamilázok közé tartozik a transzglykoziláló aktivitással is rendelkező ciklodextrin-glikoziltranszferáz (EC 2.4.1.19), a *Bacillus stearothermophilus* által termelt maltogén α -amiláz (glükán 1,4- α -glükánhidroláz, EC 3.2.1.133), amelynek maltóz a bomlásterméke. A *Pseudomonas stutzeri*-ből izolált amiláz (EC 3.2.1.60) hatására malto-oligoszacharidok, pl. maltotetraóz keletkezik. A *Klebsiella pneumoniae* által termelt amiláz (EC 3.2.1.98) hatására maltohexaóz szabadul fel.

A szénláncelágazásnál bontó enzimek

A keményítőbontó enzimek harmadik csoportjába az α ,1-6 glikozidkötést bontó enzimek tartoznak. Az ide tartozó két enzim, az izoamiláz (EC 3.2.1.68) és az I.típusú pullulanáz (EC 3.2.1.41) között az a különbség, hogy ez utóbbi az α ,1-6 glikozidkötéssel kapcsolódó maltotrióz egységekből álló poliszacharidot, a pullulanázt is bontja. Az izoamiláz csak az amilopektin α ,1-6 kötését hasítja, az egyenes szénláncú poliszacharidokat nem hidrolizálja.

A II. típusú pullulanáz enzim egyaránt bontja az α ,1-4 és α ,1-6 kötést, ezért α -amiláz-pullulanáznak vagy amilopullulanáznak is nevezik. A bontáskor elsősorban maltóz és maltotrióz keletkezik. Ugyanebbe a csoportba tartozik egy különleges keményítőbontó enzim, a neopullulanáz. Az enzim az α ,1-4 és α ,1-6 kötések bontása után transzglykozilációval új α ,1-4 és α ,1-6 kötést hoz létre.

Transzferázok

A keményítőbontó enzimek negyedik csoportját a transzferázok alkotják. Ezekre az enzimekre az jellemző, hogy az α ,1-4 glikozidkötés bontása után új glikozidkötést hoznak létre. Ebbe a csoportba két enzim, az amilomaltáz (EC

2.4.1.25) és a ciklodextrin-glikoziltranszferáz (EC 2.4.1.19) tartozik. Az új α ,1-6 glikozidkötést az elágazást bontó enzim (EC 2.4.1.18) hozza létre.

A ciklodextrin-glikoziltranszferáz hidrolitikus aktivitása igen csekély. A bontás során 6, 7 vagy 8 glükózegységből álló poliszacharid és nagy molekulatömegű, nagymértékben elágazó dextrin keletkeznek. A ciklodextrin molekulán belüli transzglykozilációval jön létre, melynek során az enzim először az α ,1-4 glikozidkötést hasítja, majd a redukáló és nemredukáló végcsoportokat kapcsolja össze.

Az amilomaltáz és a ciklodextrin-glikoziltranszferáz bontási mechanizmusa azonos. A különbség annyi, hogy az amilomaltáz transzglykolizisekor lineáris molekulalánc, míg a másik enzim bontásakor ciklikus vegyület keletkezik. A mikroorganizmusokban található amilomaltáz a maltóz, ill. a glikogén bontásában játszik szerepet. A mikroorganizmusok glikogénszintézisében nagy jelentősége van a glükán elágazást kialakító enzimeknek, elsősorban a glikogén oldallánc α ,1-6 kötését létrehozó enzimeknek. Jelenleg azonban kevés adat van ezekről az enzimekről.

Az α -amiláz keményítőbontó enzimek jellemzése és reakciómechanizmusa

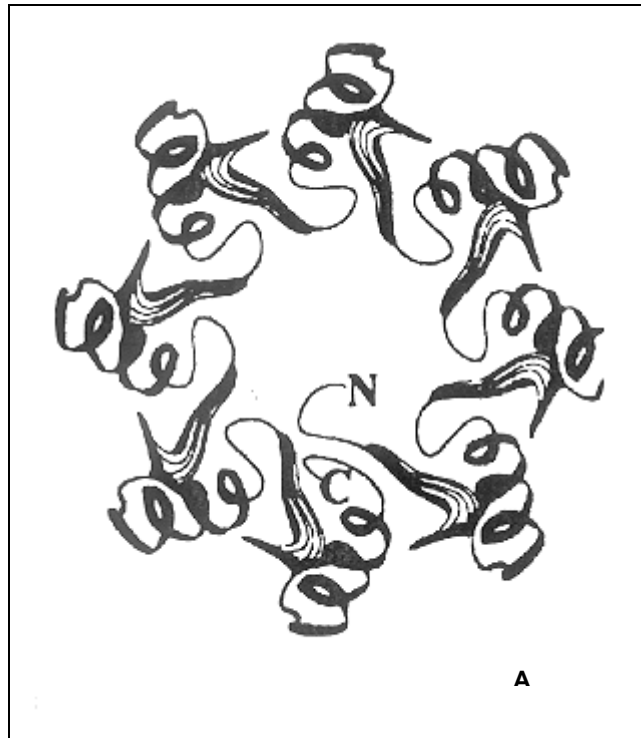
Aminosav-szekvenciájuk alapján a legtöbb keményítőbontó enzim homológ sort alkot és egy családba, az α -amilázok vagy a 13 glikozilhidroláz családjába tartozik. Ezeknek az enzimeknek közös jellemzője, hogy

- az α -glikozidkötést bontják. Hidroliziskor mono- vagy oligoszacharid α -anomer keletkezik, majd α ,1-4 vagy α ,1-6 glikozidkötést hoznak létre (transzglykoziláció). Gyakori a kétféle enzimtevékenység kombinációja is;
- szerkezetükre a $(\beta/\alpha)_8$ vagy TIM (= triózfoszfát-izomeráz) hurok jellemző, ebben található az aktív centrum (3. ábra);
- elsődleges szerkezetükben négy jellemző aminosav-tartomány mutatható ki, amelyek az aktív centrum aminosavai mellett a hurok szerkezeti stabilitását biztosító aminosavakat tartalmazzák.

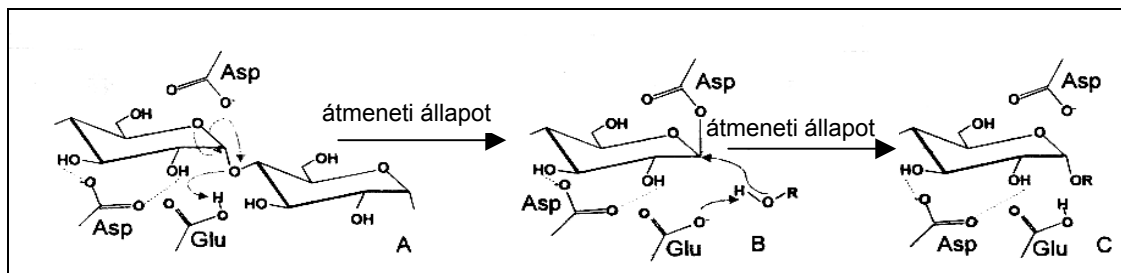
A felsorolt kritériumoknak megfelelő enzimek közé tartozik, pl. az amilomaltáz, ciklodextrin-glikoziltranszferáz, izoamiláz, maltogén α -amiláz, pullulánáz, α -amiláz.

Az enzimatis bontás mechanizmusa

Az α -glikozidkötés igen stabil, a spontán hidrolízis sebessége szobahőmérsékleten 2×10^{-15} /s. Az egyes enzimek bontási sebessége ennek többszöröse lehet, így a leghatékonyabb enzimek közé tartoznak. A ciklodextrin-glikoziltranszferáz hidrolízissebessége 3/s, ami a spontán hidrolízis sebességének 10^{15} -szerese.



3. ábra A $(\beta/\alpha)_8$ hurok vázlatos szerkezete és az *Aspergillus oryzae*-ből izolált α -amiláz fehérje adatbázis alapján készült háromdimenziós szerkezete



4. ábra A glikozilhidrolázok bontási mechanizmusa kétlépcsős átrendeződéssel, majd kovalens kötésű intermedier képződésével

Az általánosan elfogadott elmélet szerint a bontás kétlépcsős átrendeződéssel történik (4. ábra). Az enzim aktív centrumában két katalitikus egység helyezkedik el: a sav/bázis katalizátor szerepét betöltő glutaminsav és a nukleofil ágensként működő aszpartát. A bontás a következő öt lépésből áll:

1. A szubsztrátot az enzim aktív centruma megköti. A glutaminsav a glikozidkötésben levő oxigénnek, vagyis a két glükóz molekulát összekötő oxigénnek egy protont ad át. Ezt követi az aszpartát nukleofil támadása a glükózoldallánc C1 szénatomján.

2. Az oxo-karbonium-ionszerű átmeneti állapotban egy kovalens kötésű intermedier vegyület keletkezik.
3. A protonált glükózmolekula elhagyja az aktív centrumot, helyére egy víz vagy egy új glükózmolekula lép be. Az aktív centrumot elhagyó protonált glükóz megtámadja a glükózoldallánc és az aszpartát közötti kovalens kötést.
4. Ismét létrejön az oxo-karbonium-ionszerű átmeneti állapot.
5. A bázisos glutamát katalizátor az aktív centrumba belépett víz- vagy új glükózmolekulától egy hidrogént vesz át, a víz- vagy glükózmolekula oxigénje belép a glükózmolekula és aszpartát közötti oxo-karbonium-kötésbe. Ezután vagy egy új hidroxilcsoport jön létre a glükózoldallánc C1 szénatomján (hidrolízis) vagy új glikozidkötés létesül (transzglykózálás).

A legújabb vizsgálatokkal sikerült igazolni az intermedier vegyület és az enzim közötti kovalens kötést.

A kétlépcsős mechanizmusban a négy jellemző aminosav-tartománynak fontos szerepe van a szubsztrát szerkezetének módosításában, a szubsztrát aktív centrumon belüli pozicionálásában, a nukleofil megfelelő helyzetének biztosításában, az átmeneti állapot stabilizálásban és a szubsztrát elektromos töltésének módosításában.

Az ismert négy jellemző aminosav-tartomány mellett több α -amilázban egy további ötödik tartományt is kimutattak, amelyben igazolható az aszpartát jelenléte. Az aszpartátnak fontos szerepe van a Ca-ionnal képzett ligandumban.

Az egyes aminosav-tartományok szerkezete és funkciója

Az α -amilázok közös jellemzője, hogy mindegyik azonos mechanizmus szerint működik. Ugyanakkor szubsztrátspecificitásuk eltérő, és a bontás során más-más végtermék keletkezik. A jelenség az aktív centrum körül elhelyezkedő különböző csoportok vagy a különleges cukormegkötő helyek hatásával áll kapcsolatban (1. táblázat).

Az A-tartomány minden α -amilázban megtalálható, és nyolc párhuzamos, teljesen szimmetrikus fehérjefonalból áll, amelyek a nyolc α -hélixből képzett hurok körül helyezkednek el. A bontásban és a szubsztrátmegkötésben meghatározó szerepet játszó jellegzetes aminosavcsoportok a β -fonal C-végcsoportjain hurkot képeznek. Mivel a $(\beta/\alpha)_8$ hurkot először a csirkeizom triózfoszfát-izomerázban (TIM) mutatták ki, ezért TIM huroknak is szokták nevezni. Ugyancsak minden α -amilázban megtalálható a B-tartomány, amely 44–133 aminosavat tartalmaz és a Ca^{2+} , ill. szubsztrátmegkötésben játszik szerepet.

1. táblázat

A glükóztartalmú szubsztrátot bontó α -amilázok, EC számuk, felderített jellemző tartományaik és szubsztrátjuk

Enzim neve	EC száma	Jellemző tartomány	Szubsztrát
Amiloszacharáz	2.4.1.4		szacharóz
Szacharáz-foszforiláz	2.4.1.7		szacharóz
Glükánbontó enzim	2.4.1.18	A,B,F	keményítő, glikogén
Ciklodextrin-glikoziltranszferáz	2.4.1.19	A, B, C, D E	keményítő
Amilomaltáz	2.4.1.25	A,B1,B2	keményítő, glikogén
Maltopentaózt képző amiláz	3.2.1.-	A, B, I	keményítő
α -Amiláz	3.2.1.1	A,B,C	keményítő
Oligo-1,6-glükozidáz	3.2.1.10	A,B	amilopektin
α -Glükozidáz	3.2.1.20		keményítő
Amilopullulanáz	3.2.1.41 vagy 3.2.1.1	A,B,H,G,I	pullulán
Ciklomaltodextrináz	3.2.1.54	A,B	ciklodextrin
Izopullulanáz	3.2.1.57		pullulán
Izoamiláz	3.2.1.68	A,B,F,7	amilopektin
Maltotetraóz-képző amiláz	3.2.1.60	A,B,C,E	keményítő
Glükodextrináz	3.2.1.70		keményítő
Trehalóz-6-foszfát-hidroláz	3.2.1.93		trehalóz
Maltohexaóz-képző amiláz	3.2.1.98		keményítő
Maltogén amiláz	3.2.1.133	A,B,C,D,E	keményítő
Neopullulanáz	3.2.1.135	A,B,G	pullulán
Malto-oligozil-trehaláz-hidroláz	3.2.1.141		trehalóz
Malto-oligozil-trehaláz-szintetáz	5.4.99.15		maltóz

A különböző α -amilázokban az A- és B-tartományok mellett további aminosavegységeket azonosítottak. Egyébként az A-tartomány számtalan, belső α ,1-6 glikozidkötést bontó enzimen is előfordul. A C–I-tartomány szerepe még tisztázatlan, valószínűleg az enzimaktivitás kialakulásában játszik szerepet. A ciklodextrin-glikoziltranszferáz vizsgálatok a C-tartományban

megtalálták azt a maltózkötő helyet, ahol a bontatlan keményítő az enzimmel kapcsolódik össze. A maltogén α -amiláz és a ciklodextrin-glikoziltranszferázban a C-tartományt egy D-tartomány követi, amelynek szerepe még ugyancsak tisztázatlan. A bontatlan keményítőkötő helyet, az E-tartományt ugyancsak több α -amilázban megtalálták. Az említett jellemző tartományok mellett a N-terminálison további olyan F-, H- vagy G-vel jelölt egységek is előfordulnak, amelyek részben a keményítőmolekulán belül bontanak, részben az α ,1-6 glikozidkötést hasítják.

Az α -amilázok ipari alkalmazása

Glükóz és fruktóz előállítása keményítőből

A keményítőiparban a nagyüzemi módszerek az 1900-as évek közepén indultak meg. A keményítőfeldolgozás első lépése a keményítő kinyerése. A növényi részek a keményítő mellett cukrokat, pentózokat, rostokat, fehérjét, aminosavakat és lipideket tartalmaznak. A burgonyakeményítő átlagos összetétele a következő: 78% víz, 3% fehérje és aminosav, 0,1% lipid, 1% rost és 17% keményítő. 1811-ben a német Kirchhoff tudós fedezte fel, hogy ha a vizes keményítősuszpenziót híg savval kezelik, édes szirupot lehet előállítani. A glükózszirupgyártás nagyüzemi technológiáját néhány évtized alatt dolgozták ki.

Az 1921-ben bevezetett szakaszos technológia első lépése a vizes keményítősuszpenzió készítése volt. Ezután az amilózt és amilopektint melegítéssel kioldották a granulátumból. A keményítőtartalmú oldatot a hidrolízis mértékétől függően különböző ideig kezelték savval. Később a melegítés helyett közvetlen gőzbevezetést alkalmaztak, és nyomás alatt, folytonos keverés közben melegítették fel a szuszpenziót 100–175 °C-ra. Ezzel a módszerrel a szuszpenzió néhány másodperc alatt elérte a kívánt hőmérsékletet, az enzimes bontásra a hidrolizáló reaktorban került sor. A közvetlen gőzbevezetés elősegítette a keményítőszemcsék jobb feltárását, és ezáltal könnyebbé vált a diszpergálás. A nem hőérzékeny enzimet már felmelegítés előtt bekeverték a szuszpenzióba. A nagyüzemi módszert az 1950-es évek óta alkalmazzák.

A keményítőszirup édessége a hidrolízisfokkal szabályozható. A teljes hidrolízis alkalmával csak glükóz vagy dextróz keletkezik. A szirup dextróztartalmát dextróz egyenértékben, DE-ben adják meg. A DE a szirup redukálóképessége szárazanyagra vonatkoztatott glükózban kifejezve. Kiszámítása a következő képlettel történik:

$$DE = 180 / (162 \times n + 18) \times 100$$

ahol n az átlagos DP. A glükóz DE-értéke 100, a maltózé 53, a maltotriózé 36 és a keményítőé 0. Vagyis minél nagyobb a polimerizációs fok, a DP, annál alacsonyabb a DE-érték.

Időközben a savas hidrolízist felváltotta az enzimes bontás, amelynél három vagy négy különböző enzimet alkalmaznak. Az első lépés a vízdoldható rövid szénláncú dextrinek elfolyósítása. A 30–35% szárazanyag-tartalmú szuszpenzió pH-ját 6-ra állítják be, ezután hozzáadják az α -amilázt. A közvetlen gőzbevezetésű reaktorban 90 percig 95–105 °C-on tartják a szuszpenziót, 100 °C feletti hőmérsékleten jó hatásokkal távolítható el a keményítő-lipid komplex. Először a *Bacillus amiloliquefaciens* baktérium törzsből izolált α -amilázzal végezték a bontást, majd a *Bacillus stearothermophilus* vagy *Bacillus licheniformis* baktériumtörzsekből izolált α -amilázt alkalmazták. A DE-érték az inkubálási idővel és az alkalmazott enzim mennyiségével szabályozható. Ha a hidrolizátumból glükózt akarnak előállítani, akkor a hidrolizátum DE-értékét 8–10-re állítják be.

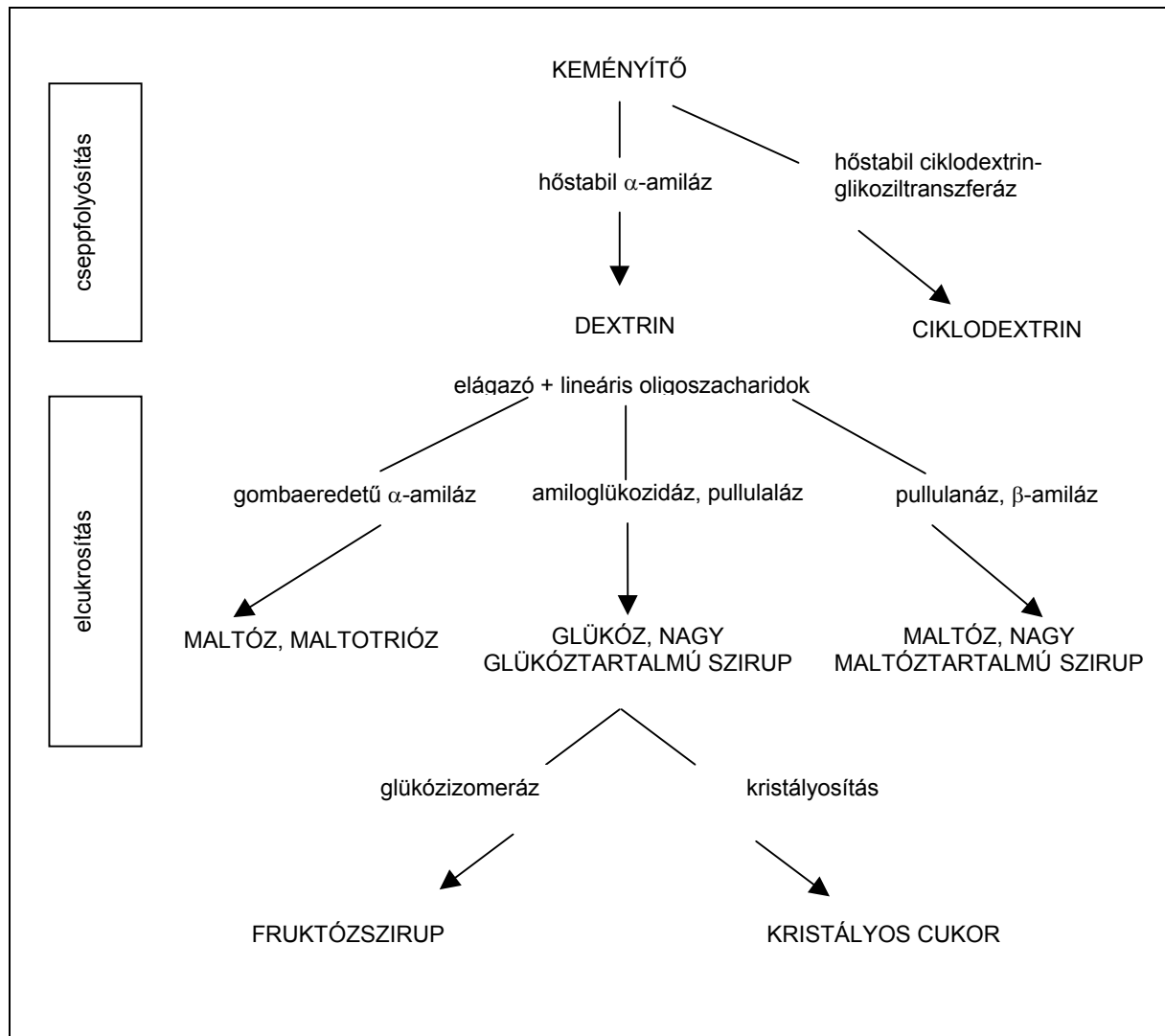
Az enzimes hidrolízisnél alkalmazott α -amilázok nem mutatnak aktivitást pH 5,9 érték alatt és magas hőmérsékleten. A szuszpenzió pH-ját nátronlúggal 6-ra állítják be, ezenkívül még Ca^{2+} -ionok is szükségesek az enzim működéséhez. Az utóbbi időben vizsgált *Pyrococcus furiosus* baktériumból izolált extracelluláris enzim fémionok távollétében magas, 130 °C feletti hőmérsékleten is megőrizte aktivitását. Szubsztrátspecificitása és a bontáskor keletkező termék tekintetében a keményítőiparban jól hasznosítható.

A keményítőhidrolizátumból cukrosítással állítják elő a nagy, 95% glükóztartalmú glükózszirupot. A nem-redukáló láncvégi α ,1-4 kötések hasítását az *Aspergillus niger* törzsből izolált exo-glükoamilázzal végzik. Az enzim pH-optimuma 4,2 és 60 °C-on stabil. A keményítőhidrolizátum pH-ját sósavval 4,5-re állítják be. A bontást a végterméktől függően 60–62 °C-on 12–96 órán keresztül végzik. A glükoamiláz elsősorban az α ,1-4 glikozidkötést hasítja, emellett a maltodextrin α ,1-6 glikozidkötését is lassan hidrolizálja, ennek következtében folyamatosan nő az izomaltóz koncentrációja. A megoldást az α ,1-6 kötést hasító pullulanáz alkalmazása jelenti. A pullulanáz és a glükoamiláz hőmérséklet- és pH-optimuma azonos. A nagy glükóztartalmú (>95% glükóz) glükózszirup gazdaságos előállításának egyik előfeltétele a nagy szárazanyag-tartalom, különben a glükoamiláz nagy glükóztartalom esetén a reakciót az ellenkező irányába tolja el, ekkor maltóz és izomaltóz keletkezik. Az enzimek mennyiségének és arányának megválasztásával, az inkubálás idejének és hőmérsékletének helyes kombinációjával jól kézben tartható a technológia.

A fruktózszirupot a glükózszirup konverziójával állítják elő. A fruktóz a glükóz izomerje, és édesítő hatása közel kétszerese a glükózénak. A konverziót D-xilóz-ketol-izomerázzal (EC 5.3.1.5), ismertebb néven glükózigomerázzal végzik. A tömény glükózszirupot először finomítják, aktív szénen szűrik, több mint 40% szárazanyag-tartalomra sűrítik, a pH-ját 7–8-ra

állítják be. A folyamatos eljárásnál a glükózszirupot glükózizomerázzal töltött oszlopon engedik át. A fruktózszirup maximális fruktóztartalma kb. 55%.

A glükóz- és fruktózszirup, valamint a kristályos cukor előállításának vázlatos folyamatábráját az 5. ábra mutatja be.



5. ábra A keményítő ciklodextrinné, maltodextrinné, glükóz- vagy fruktózszirupá való ipari feldolgozásának áttekintése

Sütőipari alkalmazás

A keményítő és módosított keményítő egyik legnagyobb felhasználója a sütőipar. A kenyértészta alapanyagait, a lisztet, vizet, élesztőt, só és az adalékanyagot először alaposan összekeverik. A liszt főleg glutént, keményítőt, nem keményítőtől származó poliszacharidokat és lipideket tartalmaz. A tész

takészítés következő fázisában az élesztő elkezd dolgozni, ezalatt az élesztő megerjeszti a cukrokat alkohol- és szén-dioxid-keletkezés közben, amitől a tészta megkel. A liszt sérült keményítőszemcséinek lebontását kismolekulájú dextrinekre, amelyeket az élesztő tovább tud bontani, amiláz hozzáadással segítik elő. A maláta vagy gombaeredetű α -amiláz hatására megnő a tészta térfogata, és javul a bélzet textúrája, rugalmassága.

Miután a tészta megkelt, megsütik. Amint a megsült kenyeret kivesszük a kemencéből, számtalan, a kenyér minőségromlását előidéző változás indul meg. Ezek közé tartozik a bélzet jól ismert megkeményedése, a héj ropogóságának csökkenése, a nedvességtartalom csökkenése és az illat fokozatos elvesztése. Mindezeket a változásokat, amelyek a tárolás során tovább folytatódnak, összefoglalóan öregedésnek nevezik. A kenyéröregedés egyik fő előidézője a keményítő, elsősorban az amilopektin retrogradációja. A kenyér és péksütemények öregedése komoly gazdasági kárt jelent nemcsak a sütőiparnak, hanem az egész nemzetgazdaságnak. Amerikában évente 1 Mrd USD-re becsülik az okozott kár nagyságát.

Az öregedés késleltetésére, a bélzetállomány javítására, a sütőipari termékek térfogatának és aromájának javítására különböző sütőipari adalékokat használnak. Ezek közé különböző vegyszerek, kis molekulatömegű cukrok, enzimek és ezek kombinációi tartoznak. A legismertebbek a tejpor, glutén, emulgeálószer (mono- és digliceridek, cukorészterek, lecitin stb.), granulált zsír, oxidálószer (aszorbinsav vagy kálium-bromát), cisztein, cukrok és sók.

A biotechnológia rohamos fejlődése lehetővé tette speciális, sütőipari célú enzimek kifejlesztését. Az enzimek alkalmazása azzal az előnnyel jár, hogy mivel természetes anyagok, a fogyasztók nem idegenkednek tőle, és inkább elfogadják, mint a különböző vegyi adalékokat. A sütőiparban használatos enzimek két csoportba sorolhatók: az egyikbe a keményítőtörő enzimek, a másikba az egyéb enzimkészítmények tartoznak. A keményítőtörő enzimek közül az α -amilázokat, az elágazást létrehozó, ill. törő enzimeket, maltogén amilázokat, β -amilázokat és az amiloglikozidázokat érdemes megemlíteni. A másik csoportba, pl. a glükóxidáz, hemicelluláz, lipáz, proteáz és xilanáz tartozik.

A kenyértészta készítésekor eredetileg azért használtak α -amilázt, mert segítségével tudtak fermentálható bomlástermékeket előállítani. Alkalmazásukkal egyúttal sikerült az öregedést késleltetni, és a bélzet rugalmasságát megőrizni. Felhasználásuknál azonban különös gondot kell fordítani a pontos adagolásra, mivel már csekély túladagolásuk ragadás, gumiszerű tésztát eredményez, ugyanakkor az öregedés késleltetése csak 3–4 nap múlva jelentkezik. A ragadóságot az α -amiláz hatására keletkező elágazó szénláncú DP 20-100 maltodextrin idézi elő. Valószínűleg erre vezethető vissza, hogy az α -amiláz alkalmazása nem terjedt el széles körben. A probléma elágazástörő enzim, pl. pullulanáz adagolásával csökkenthető, sőt teljesen ki is kü

szöbölhető. Jó eredményt értek el a két enzim – az α -amiláz és a hőstabil pullulanáz – kombinációjával. A pullulanáz viszonylag rövid idő alatt hidrolizálja az elágazó szerkezetű maltodextrint, de az amilopektint nem bontja.

A sütőipari termékek öregedésgátlásával folyó kísérletekben különböző elágazást bontó enzimeket vizsgálnak. A vizsgálatok azt mutatták, hogy ezek az enzimek elsősorban sütés alatt fejtik ki hatásukat, pl. megnövelik a termék térfogatát. Rendszerint más keményítőbontó és az előbb felsorolt nem keményítőbontó enzimekkel kombinálva alkalmazzák őket.

A ciklodextrin-glikoziltranszferáz kedvező hatása feltételezések szerint a ciklodextrin-képződésre vezethető vissza. Az exoamilázok közül a β -amiláz és az amiloglikozidáz hasítja az amilopektin oldalláncában található maltózt vagy glükózmolekulát. A kenyéröregedés késleltetése azon alapul, hogy a két exoamiláz szinergens hatására csökken az amilopektin retrogradációja, ezáltal megnő a sütőipari termékek minőségmegőrzési ideje.

A ragadós, gumyszerű bélzet az α -amiláz-túladozás hatására következik be, amit a bontás során keletkező elágazó szénláncú maltooligoszacharidok idéznek elő. A jelenség különböző exoamilázok adagolásával kiküszöbölhető. A jól bevált exoamiláz, a maltogén amiláz hatására a maltooligoszaharidból 2–6 glükózegységből álló különféle lineáris oligoszacharidok, pl. maltóz, maltotrióz és maltotetraóz keletkezik. A sütőipari gyakorlatban a *Bacillus stearothermophilus*-ból izolált hőstabil maltogén amiláz használata vált be. Bár az enzimre az exo-aktivitás jellemző, némi endo-aktivitással is rendelkezik, de a sütés alatt kizárólag exo-aktivitást mutat.

Ciklodextrin/cikloamilóz előállítása

A ciklodextrinek 6,7 vagy 8 glükózegységből álló, egymáshoz α ,1-4 kötéssel kapcsolódó ciklikus oligoszacharidok (α -, β - vagy γ -ciklodextrin). A glükózegységek elhelyezkedése olyan, hogy a gyűrű belseje felé hidrofób (apoláros), kifelé pedig hidrofil jelleget mutat. Ez lehetővé teszi, hogy különböző hidrofób vegyületekkel komplexet képezzen. A komplexképző vegyület befogadására alkalmas, különböző méretű üreggel rendelkező ciklodextrinek állíthatók elő. A komplexek tulajdonságai eltérnek a komplexképző molekula eredeti fizikai és kémiai tulajdonságaitól, így pl. fényálló, oxidációval szemben ellenálló, jobban oldódó komplex vegyületek állíthatók elő. A *mikrokapszulázás* számtalan lehetőséget kínál a ciklodextrinek analitikai, mezőgazdasági, biotechnológiai, gyógyszeripari, élelmiszeripari és kozmetikai alkalmazására.

A ciklodextrinek ipari méretű előállításának első lépése a keményítő hőstabil α -amilázzal végzett elfolyósítása, majd a hidrolizátumot a *Bacillus macerans* baktériumból izolált ciklodextrin-glikoziltranszferázzal ciklizálják. Mivel a ciklodextrin-glikoziltranszferáz hőérzékeny, a ciklizálás az elfolyósításnál

alacsonyabb hőmérsékleten végezhető. Már folynak a kísérletek hőstabil ciklodextrin-glikoziltranszferáz előállításával, amelyre a *Thermoanaerobacter* törzs tűnik alkalmasnak, pl. a *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* és az *Anaerobranca bogoriae*.

A jelenleg alkalmazott technológiával különböző ciklodextrinek keveréke állítható elő, amelyeket ezután tisztítani és finomítani kell. Az egyik tisztítási módszer a frakcionált kristályosítás. A viszonylag rosszul oldódó β -ciklodextrint kikristályosítják, majd szerves oldószerrel szeletíven komplexbe viszik. A módszernek több hátránya van, többek között az, hogy a toxikus, tűzveszélyes, szerves oldószert regenerálni kell. A drága előállítás miatt több alkalmazási terület nem jön szóba, a szerves oldószert alkalmazása miatt pedig emberi fogyasztásra alkalmatlan.

A ciklodextrin-glikoziltranszferáz lehetőséget nyújt új glikozilált vegyületek előállítására. Az egyik kereskedelmi forgalomban levő kiváló édesítő hatású édesítőszer előállításánál már sikerrel alkalmazzák. Az édesítőszer alapanyagát a steviozidot a *Stevia rebaudania* növény leveléből nyerik ki, glikozilálással eredményesen csökkenthető a keserű íz és javítható az oldhatósága.

A keményítőből még egy ciklikus termék állítható elő, a cikloamilóz. A nagymolekulájú ciklikus glükán (DP >20) antiparalell hélixekből áll. A gyűrűben levő üreg átmérője nagyjából megegyezik az α -ciklodextrinével. A ciklodextrinek előállításával összehasonlítva a cikloamilóz valamennyi α -amilázhoz tartozó transzglykoziláló enzimmel előállítható. A két ciklikus vegyület képződése abban különbözik, hogy míg a ciklodextrinek intramolekuláris transzglykoziláció révén, addig a nagy cikloamilóz molekula intermolekuláris transzglykoziláció révén keletkezik. Cikloamilózt a nagy molekulatömegű amilóz igen kis, mikromólos koncentrációjú oldatából viszonylag nagy mennyiségű enzimmel lehet előállítani. Vagyis a bontás a korlátozott mennyiségben jelen levő szubsztrát által irányított mechanizmus szerint megy végbe. Ipari méretű előállítására még nem került sor.

Vegyes alkalmazások

Az α -amilázokat a keményítő cukrosítása vagy cseppfolyósítása mellett a textiliparban, az élelmiszeriparban és a takarmány-előállításban is alkalmazzák (2. táblázat). A textiliparban a textilszálak méretre vágásánál a szálak megfelelő merevségét a keményítőből enzimes bontással nyert viszkózus oldattal érik el. Az élelmiszeriparban sörök és gyümölcslevek derítésénél alkalmazzák. Az állati takarmányok emészthetősége α -amilázzal javítható. Újabban nagy mennyiségben használják mosó- és mosogatószerke adalékanyagaként. A fogyasztók egyre szívesebben alkalmaznak alacsonyabb mosási és mosogatási hőmérsékletet. A keményítő eltávolítása alacsony hőmérsékleten kevésbé eredményes, összehasonlítva a magas hőmérséklet tisztító hatásával. Ez a probléma enzim alkalmazásával megoldható, mivel az α -amiláz-

tartalmú mosó- és mosogatószeres alacsony hőmérsékleten és lúgos közegben is jó hatásfokkal tisztítanak.

Gyakorlati szempontból két enzimről nem esett szó: az amilomaltázzal és az elágazást bontó enzimekről. Bár több szabadalom tárgyát képezik ezek az enzimek, gyakorlati bevezetésükre elsősorban hőérzékenységük miatt nem került sor. Újdonságnak számítanak a nagy hőállóságú *Thermus thermophilus* baktériumból izolált amilomaltázzal folyó kísérletek, amikor hőreverzibilis keményítő gélt állítottak elő. Mint ismeretes a kezeletlen keményítő retrogradáció után nem vihető ismét oldatba. Amennyiben a keményítőt előzetesen amilomaltázzal kezelik, hőreverzibilis gélt lehet előállítani, amely többszöri felmelegítés és lehűtés után is oldatba vihető. Viselkedése nagymértékben hasonlít a zselatinéhoz.

2. táblázat

Az α -amilázok főbb alkalmazási területei

Felhasználási terület	Enzimek
Keményítő elfolyósítása	α -amiláz
Keményítő elcukrosítása	amiloglükózidáz, pullulanáz, maltogén α -amiláz, α -amiláz, izoamiláz
Mosó- és mosogatószeres, sör- és üdítőitaliparban derítéshez, sütőipar, takarmány-emészthetőség javítása, textilipar, szennyvíz-kezelés	α -amiláz
Ciklodextrin-gyártás	ciklodextrin-glikoziltranszferáz
Hőstabil keményítő gél	amilomaltáz
Cikloamilóz	amilomaltáz, elágazást bontó enzimek, ciklodextrin-glikoziltranszferáz

Enzimtervezés

Az ipari alkalmazásoknál szokásos gyártási körülmények, különösen a hőmérséklet és pH vonatkozásában, az enzimek szempontjából szélsőséges igénybevételt jelentenek. A fejlesztések arra irányulnak, hogy lehetőleg egyes, speciális igényeknek megfelelő enzimeket állítsanak elő. A kísérletek több irányban folynak. Egyik út a szélsőséges körülmények között, mint pl. hőforrásokban, különböző sós tavakban élő baktériumok felkutatása. A kutatások eredményesek voltak, amit a szép számban benyújtott szabadalmak bizonyítanak. Ezek közé tartozik a *Fervidobacterium pennavorans*-ból izolált hőstabil pullulanáz, vagy a *Pyrococcus woesei*-ből izolált α -amiláz. Annak ellenére, hogy hőstabilitásuk sokkal kedvezőbb a jelenleg alkalmazott enzimekéénél, gyakorlati bevezetésükre máig nem került sor. Ennek több, részben gazdasági oka van. Rendszerint csak nagy szárazanyag-tartalmú (>30%) keményítőol

datban mutatnak optimális aktivitást, vagy a fermentáció másik végtermékére, pl. a fehérjére gyenge a kihozatal. Ezeknek a követelményeknek az újonnan vizsgált α -amilázok nem tesznek eleget.

Másik lehetőség degenerált PCR (polimeráz láncreakció) primerek előállítására az enzimekre jellemző nukleotid- vagy aminosav-szekvencia segítségével. A primerekkel átvizsgálják a mikrobák genomját, és megállapítják, hogy rendelkezik-e a szóban forgó mikroorganizmus az enzim előállításához szükséges génekkel. Ezzel a módszerrel választottak ki két hőstabil izoamilázt termelő *Sulfolobus* törzset és a *Rhodothermus marinust*.

A harmadik, egyben legígéretesebb megoldásnak az enzimek tervezése tűnik, ami egyben gazdaságos is. Egy meghatározott funkcióért felelős tartomány kiválasztása két homológ enzimből nyert hibrid segítségével történik vagy az aminosav-szekvenciák összehasonlításával. A vizsgálatot a *B. licheniformis* és *B. amyloliquefaciens* törzsekből izolált α -amiláz hibriddel végezték el, és meghatározták a hőstabilitásért felelős aminosav-tartományokat. Egy másik vizsgálattal igazolták, hogy a *B. licheniformis*-ból izolált α -amiláz hőstabilitásában a 34–76, a 112–142, a 174–179 és a 263–276 aminosav-tartományok játszanak szerepet. Egy másik kísérletben a különböző α -amilázok aktív centrumait és a körülötte elhelyezkedő csoportokat vizsgálták két, közepes és magas hőmérsékleten. Így beazonosították a *B. licheniformis* α -amiláz közepes hőmérsékleten mutatott aktivitásáért felelős tartományokat. A korábbi vizsgálatokban meghatározott aminosav-tartományok mellett további tartományok szerepét tisztázták. Ezek a 181–195, 141–149, 456–463. Igazolták a 311, 346, 385 helyzetű aminosavak szerepét. A felsorolt helyeken bekövetkező mutációk/változások következtében Ca^{2+} -ionok jelenlétében is nő az enzim stabilitása 8–10,5 pH-tartományban, ill. 30–40 °C-on nagyobb a fajlagos aktivitásuk.

Az aminosavak kicserélésével végzett vizsgálatok azt mutatták, hogy a hurokban található tartományokba bevitt prolin általában javítja a fehérjék stabilitását. Ezt igazolta az a tapasztalat, amikor az egyik lúgos közeget kedvelő *Bacillus* törzsből izolált α -amilázban prolinnal helyettesítették a 124-es helyzetű arginint. Ezzel jelentősen nőtt az enzim stabilitása. A diszulfidkötések ugyancsak stabilizálják az enzimeket.

A mosó- és tisztítószer oxidáló komponenseivel szemben egyes aminosavak, pl. metionin, triptofán, cisztein és hisztidin érzékenyek. Ha az enzimen sikerül ezeket az aminosavakat oxidációra nem érzékeny tirozinra kicserélni, akkor az enzim a fehérítő adalékok, persavak vagy klóraminok jelenlétében is megőrzi aktivitását. Az α -amiláz-tervezés egyik fő célkitűzése a szélsőséges pH-tartományban is megfelelő aktivitással rendelkező enzimek kifejlesztése.

A PCR technika alkalmazásának elsődleges célja az α -amiláz keményítőbontó enzimek nemrégén megismert szerkezet–funkció összefüggéseinek felhasználása. A PCR technikát eddig a ciklodextrin-glikoziltranszferáz és a

maltogén α -amiláz fehérjeoldallánc mutagenézisében alkalmazták. A maltogén α -amiláz háromdimenziós szerkezetét fehérjekristályosítással és röntgenkrisztallográfiai vizsgálatokkal sikerült felderíteni. Ezek az adatok nagy segítséget jelentenek az aktív centrumban és az a körül elhelyezkedő különböző aminosavak, valamint a szubsztrát, ill. végtermék közötti kötések vizsgálatában.

Összefoglalás

Az α -amiláz enzimek közös jellemzője, hogy az egymáshoz $\alpha,1-1$, $\alpha,1-4$ vagy $\alpha,1-6$ glikozidkötéssel kapcsolódó glükózegységeket hasítja. A sok azonos tulajdonság ellenére a csoportban mintegy 21 különböző enzimfajta tartozik. A fő különbség az aktív centrum szerkezetében és az enzimmolekula általános szerkezetében mutatható ki. Az enzimeken belül két alcsoport különböztethető meg: a keményítőhidrolizáló és a keményítőmódosító, ill. transzglykoziláló enzimek. A keményítőmódosító enzimek közül egyedül a ciklodextrin-glikoziltranszferáz terjedt el széles körben. Első helyen a keményítőhidrolizátum elcukrosítását és a nem élelmiszeripari alkalmazást kell megemlíteni.

(Haidekker Borbála)

Maarel, M. J. E. C., Veen, B. stb.: Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. = Journal of Biotechnology, 94. k. 2. sz. 2002. márc. 28. p. 137–155.

Chen, R.: Enzyme engineering: rational design versus directed evolution. = Trends in Biotechnology, 19. k. 1. sz. 2001. p. 13–14.

Veen, B. A.; Alebeek, G.-J. W. M. stb.: The three transglycosylation reactions catalyzed by cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* (strain 251) proceed via different kinetic mechanisms. = European Journal of Biochemistry, 267. k. 6. sz. 2000. p. 568–665.

EGYÉB IRODALOM

Csomos E.; Simonné Sarkadi K.: Különböző borok biogén amin tartalmának összehasonlító vizsgálata. = Élelmezési Ipar, 56. k. 10. sz. 2002. p. 297–302.

Vajda B.; Bátki Zs.; Szabó, M.: A genetikailag módosított élelmiszerek laboratóriumi vizsgálatának jelenlegi helyzete, nehézségei, ill. fejlesztések irányai. = Élelmezési Ipar, 56. k. 10. sz. 2002. p. 303–308.

Szigeti E.: Baktériumok szaporodásának prediktív modellezése. = Élelmezési Ipar, 56. k. 10. sz. 2002. p. 313–315.

Londesborough, J.: Fermentation of maltotriose by brewer's and baker's yeasts. (Maltotrióz fermentálása sör- és sütőélesztővel.) = *Biotechnology Letters*, 23. k. 24. sz. 2001. dec. II. p. 1995–2000.