



Enzimológia

Lipáz enzimek

Fehér Anikó

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

2019.11.12.



Lipidek

Lipids

Mi a lipid?

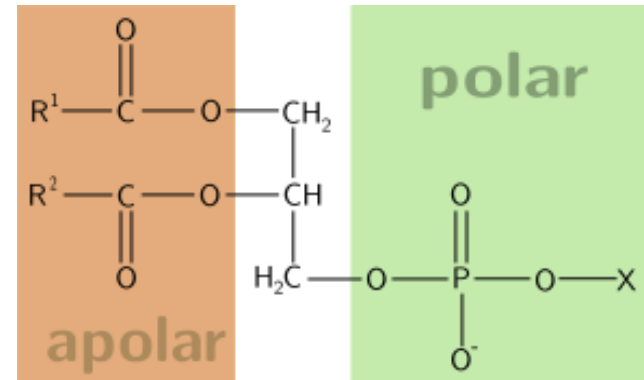
- zsírsavak és származékaik (gliceridek és foszfolipidek)
- zsírok (trigliceridek), viaszok
- szteránvázas metabolitok (koleszterin)

Funkciójuk

- energia tárolás
teljes oxidációjukkor kb. 9000 kcal/kg energia szabadul fel
(szénhidrátból/proteinből kb. 4000 kcal/kg)
- szignál molekulák
- zsíroldható vitaminok (A, D, E, K) tárolása

Jellemzőjük

- hidrofób vagy
- amfipatikus:
hidrofil (víz-kedvelő) és lipofil (zsír-kedvelő)
→ vezikulumok, liposzómák, membránok



a foszfolipidek amfipatikus jellege

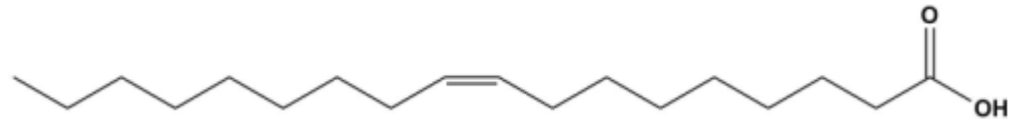


Zsírsavak

Fatty acids

Felépítésük

- szénhidrogén lánc → hidrofób
- karboxil csoport → hidrofil
- 4-24 C-atom
- telített vagy telítetlen
- a természetes zsírok/olajok → legalább 8 C-atomos zsírsavak
- C-lánc alfa(α)-végén karboxilcsoport (-COOH): vegyületképzés, másik végén: omega(ω)



szabad zsírsav

Néhány telített karbonsav / Saturated fatty acids

jelölés: C-atomszám + kettős kötések száma (ezen esetben 0)

- Ecetsav (etánsav; C2:0): CH_3COOH
- Vajsav (butánsav; C4:0): $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$
- Laurinsav (dodekánsav; C12:0): $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$
- Mirisztinsav (tetradekánsav; C14:0): $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$
- Palmitinsav (hexadekánsav; C16:0): $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
- Sztearinsav (oktadekánsav; C18:0): $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$
- Arachidinsav (eikozánsav; C20:0): $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$



Telítetlen zsírsavak / Unsaturated fatty acids

- legalább egy kettős kötés (-CH=CH-) a láncban
- két H atom állása szerint: cisz- / transz-zsírsav
- természetes, többszörösen telítetlen:
 - kettős kötések között 2 egyszeres kötés
 - cisz-konfiguráció (elhajlás lehetősége)
- transz: többnyire mesterséges eredetű
- kettős kötések helye:
 - a) szénlánc "elejétől" (a karboxilcsoporttól, az *alfa*-szénatomtól) számítva
 - b) végétől (a metilcsoporttól, az ún. ω -C-atomtól) \rightarrow ω -3, ω -6, ω -9 zsírsavak

Néhány telítetlen karbonsav

jelölés: C-atomszám + kettős kötések száma + kötések láncvégtől számított helye

- α -linolénsav, ALA (oktadekatriénsav, C18:3 ω -3): $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
- Linolsav (oktadekadiénsav, C18:2 ω -6): $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
- Olajsav (oktadecénsav, C18:1 ω -9): $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
- Erukasav (dokozénsav, C22:1 ω -9): $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{11}\text{COOH}$

Növényolajok zsírsavösszetétele

%			napraforgó	olíva	repce	mogyoró	kukorica	szója	pálmamag
C6			nd	nd	nd	nd	nd	nd	<0,8
C8			nd	nd	nd	nd	nd	nd	2-5
C10			nd	nd	nd	nd	nd	nd	3-5
C12	laurinsav		nd -0,1	nd	nd	nd -0,1	nd -0,3	nd -0,1	<u>44-51</u>
C14	mirisztinsav		nd -0,2	<0,1	nd -0,2	nd -0,1	nd -0,3	nd -0,2	<u>15-17</u>
C16	palmitinsav		5,6-7,6	8-14	3,3-6,0	8-14	7-17	8-13	7-10
C16:1			nd -0,3	<1	0,1-0,6	nd -0,2	nd -0,4	nd -0,2	<0,1
C18	sztearinsav		2,7-6,5	3-6	1,1-2,5	1,9-4,4	nd -3,3	2,4-5,4	2-3
C18:1	olajsav	ω -9	14-39	<u>61-80</u>	52-67	36-67	<u>20-42</u>	17-26	12-18
C18:2	linolsav	ω -6	<u>48-74</u>	3-14	16-25	14-43	<u>39-66</u>	50-57	1-4
C18:3	α -linolénsav	ω -3	nd -0,2	<1	<u>6-14</u>	nd -0,1	0,5-1,5	<u>5,5-9,5</u>	<0,7
C20	arachidinsav		0,2-0,4	<0,5	0,2-0,8	<u>1,1-1,7</u>	0,3-0,7	0,1-0,6	<0,3
C20:1			nd -0,2	<0,4	0,1-3,4	0,7-1,7	0,2-0,4	nd -0,3	<0,5
C22			0,5-1,3	<0,9	nd -0,5	<u>2,1-4,4</u>	nd -0,5	0,3-0,7	
C22:1	erukasav	ω -9	nd -0,2		<u>nd -2,0</u>	nd -0,3	nd -0,1	nd -0,3	
C24			0,2-0,3		nd -0,2	<u>1,1-2,2</u>	nd -0,4	nd -0,4	
C24:1			nd		nd -0,4	nd -0,3	nd	nd	



Zsír-sav-észterek - viaszok

Fatty esters – wax esters

Mi a viasz?

hosszú szénláncú alifás alkoholok + zsírsavak észterei
(+ alkánok, egyéb észterek, poliészterek)

Előfordulás

- méhviasz
- termés (pl. napraforgó) külső héján → véd a nedvességtől
- magban (pl. nyers napraforgó olajban)

Felhasználás

- gyertya
- kozmetikai ipar (viasz+zsír+pigment → rúzsok, szemfestékek)
- édességipar
- sajtok bevonása
- textil, papír vízhatlanítása
- cipő- és autoápoló, fa kezelő szerek
- zsírkréta, színes ceruza, indigó papír



finomított rizskorpa-
és napraforgó-viasz

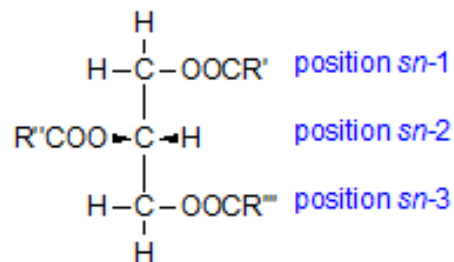


Glicerolipidek

Glycerolipids

Felépítésük

- mono-
- di-
- triszubsztituált glicerín
- Fischer képletben:

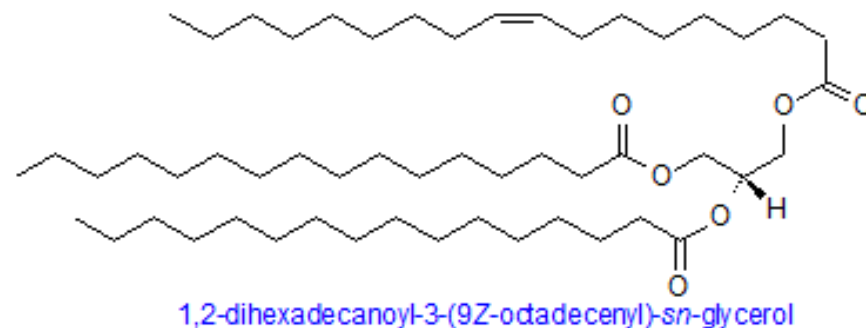


Fischer projection of a triacyl-*sn*-glycerol

a középső C atomon lévő zsírsav balra áll
felül lévő C atom sn-1, alul lévő C atom sn-3

Trigliceridek / Triglycerides

- glicerín észtere 3 zsírsavval
- 3 azonos / különböző alkilánc
- alkilánc hossza változó,
leggyakoribb: 16, 18, 20 C-atom
- természetes növényi és állati zsírsavak:
jellemzően páros számúak, mert
szintézisük során az acetil-CoA 2 C-atomos acetát-csoportokat képes szállítani
- baktériumok képesek páratlan C-atomszámú és elágazó láncú zsírsavak előállítására
kérődzők zsírja is tartalmaz ilyet
- zsírok / olajok: trigliceridek keveréke



<http://lipidlibrary.aocs.org/Lipids/tag1/index.htm>

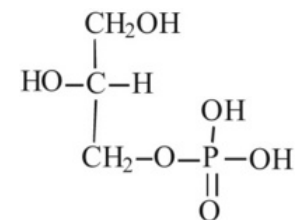


Foszfolipidek / foszfamidok

Glycerophospholipids / phospholipids

Felépítésük

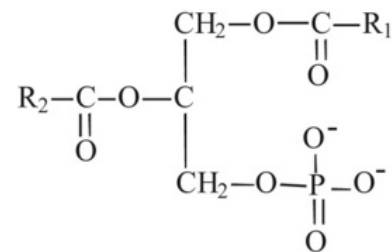
- glicerín +
- 2 zsírsav +
- foszforsav +
- 1 N-t tartalmazó molekula (alkohol észteresíti a foszfamidtsavat)



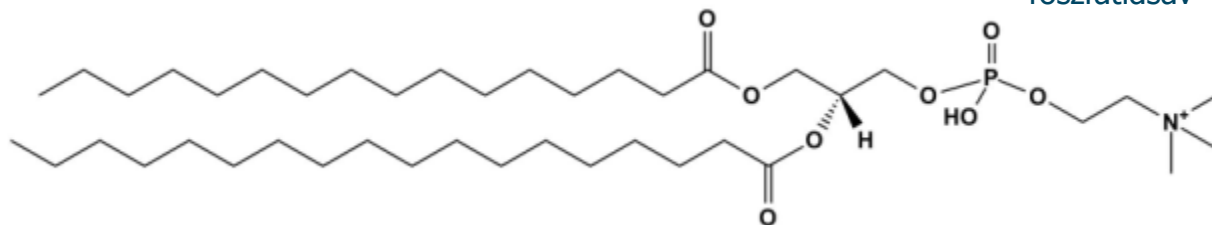
glicerín-3-foszfát

Jellemzőik

- amfipatikus vegyületek (víz & apoláris kh.)
- vizes közegben cseppek/vékony hártályk sejtmembrán építőkövek
- foszfamidtsav: más foszfamidok alapvegyülete
- ammónium-foszfamidok: élelmiszerekben (csokoládé- és kakaótart.)
E442 néven emulgeálószer



foszfamidtsav



foszfamid

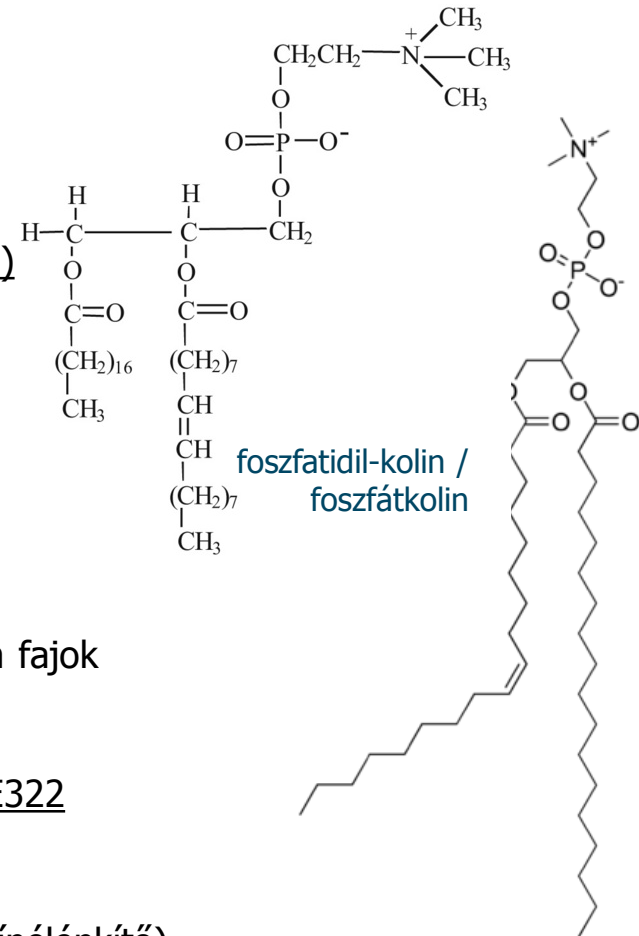


Foszfolipidek / foszfátidok

Glycerophospholipids / phospholipids

Technikai lecitin

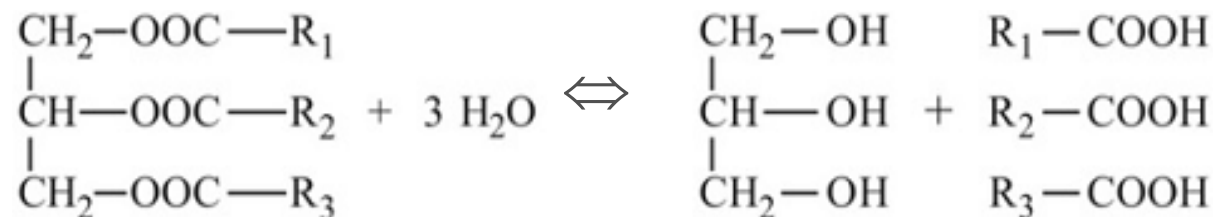
- sárgás-barnás zsíros anyag
glikolipidek, trigliceridek, foszfolipidek keveréke
- előfordulása
állati és növényi szövetekben, tojássárgájában (lekithos ógörögül)
- kinyerése
napraforgó olaj nyálkátlanítása
→ nyálka üledék (olaj, víz, lecitin) bepárlása
- élettani hatása
 - koleszterin-csökkentő (jó koleszterinszint növelő)
 - kötött P- és B vitamin (B8 és B11)-tartalom
jó hatás az idegrendszerre, agyműködésre, memóriára
 - a vastagbélben támogatja a Lactobacillus és Bifidobacterium fajok elszaporodását
- felhasználása
 - tartósító- (antioxidáns hatás), emulgeáló-, stabilizálószer - E322
 - margarin-, csokoládégyártás, sütőipar
 - takarmányipar (zsíradék, pelletképzés-javító)
 - festékipar (stabilizáló, emulgeáló, rozsdaképződést gátló, színélnékítő)





Jellemzőik

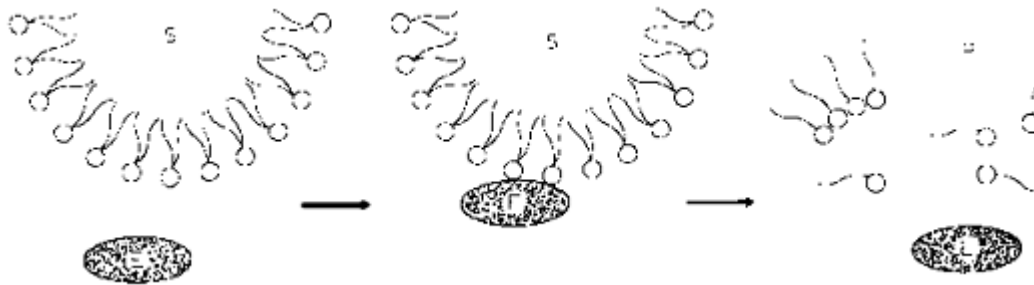
- lipidek észter-kötésének hidrolízisét katalizálják
- egyensúlyi reakció \Rightarrow kis vízkoncentráció: katalizálják az alkoholok és savak észterképzését (lipid szintézis)
- legtöbb mikrobiális lipáz mezofil, optimális körülményeik: pH 7-9, 30-40°C
termofilek: potenciális ipari jelentőség
- Nem igényelnek kofaktorokat (ez jellemző a hidrolázokra is)
- Affinitás csökken a di- és monogliceridek esetén



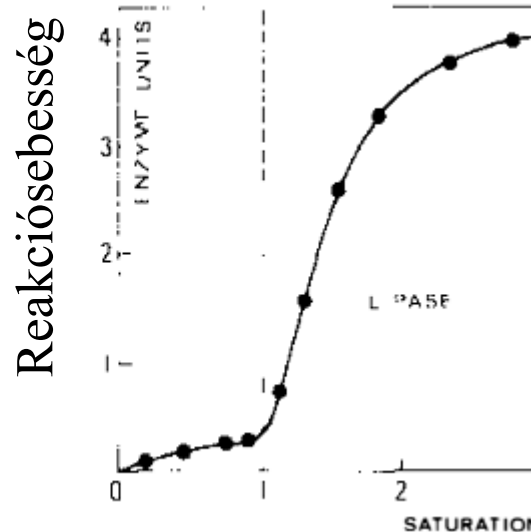
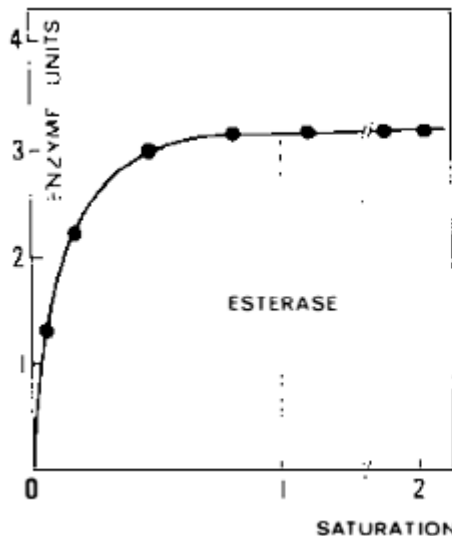


Lipázok vs. észterázok

- Határfelületi enzimek: az aktív centrumot borító „fedél” határfelület hatására felnyílik → határfelületi aktiváció (azonban nem mindenhol teljesül ez, így más megközelítésben 10 C atom szám feletti zsírsavakat tartalmazó lipidek hidrolízisét és szintézisét katalizáló észterázok)



Reakciósebesség a szubsztrátkoncentráció függvényében
máj észteráz és hasnyálmirigy lipáz esetén triacetin szubsztráton



Az észterázok Michaelis-Menten kinetikát követnek, és oldatban lévő szubsztráton hatnak

A lipáz aktivitás ugrásszerűen nő, ha a triacetin oldhatóságát meghaladja a szubsztrátkonc. (a telítettség >1) → két fázis van jelen, és a lipáz a közöttük lévő határfelületen aktív





Reakcióik

- észter hidrolízis
- észter szintézis
- átészterezés
 - alkohollal
 - észterrel
 - savval

<p>HYDROLYSIS</p> $\text{R}_1-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{R}_2 + \text{H}_2\text{O}$	$\text{R}_1-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OH} + \text{R}_2-\text{OH}$
<p>ESTER SYNTHESIS</p> $\text{R}_1-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OH} + \text{R}_2-\text{OH}$	$\text{R}_1-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{R}_2 + \text{H}_2\text{O}$
<p>TRANSESTERIFICATION</p> <p>Alcoholysis</p> $\text{R}_1-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{R}_2 + \text{R}_3-\text{CH}_2-\text{OH}$	$\text{R}_1-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{R}_3 + \text{R}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$
<p>Interesterification</p> $\text{R}_1-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{R}_2 + \text{R}_3-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{R}_4$	$\text{R}_1-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{R}_4 + \text{R}_3-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{R}_2$
<p>Acidolysis</p> $\text{R}_1-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{R}_2 + \text{R}_3-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OH}$	$\text{R}_3-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{R}_2 + \text{R}_1-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OH}$



Szerkezetük

- α/β hidroláz
- többféle mechanizmus, többségük kimotripszin-szerű
katalitikus triád: szerin (mint nukleofil) + savas aminosav (ált. aszparaginsav) + hisztidin

Hol termelődnek az emberi szervezetben?

- száj
- gyomor
- hasnyálmirigy

Hol működnek?

- a sejt bizonyos részében (lizoszómában)
- extracellulárisan, a sejten kívül
 - pl. hasnyálmirigyben termelt lipáz
 - gomba vagy baktérium által termelt
 - egyes méhek, darazsak mérgében foszfolipid-bontó enzimek
csípés → fokozottabb sérülés, gyulladás



- Az észterek hidrolízisének követésére → hidrolízis kinetika vizsgálatára
- Enzimaktivitás méréshez szintén használható
- A pH-t mérhetjük pl. üvegelektóddal, vagy indikátorok alkalmazásával
- A **lipázok aktivitásmérését** is leggyakrabban pH-stat segítségével valósítják meg
- Állandó pH-t tartanak lúgoldat hozzáadásával
- Ebben az esetben legtöbbször tributírint (a glicerín vajsav-észterét) használnak szubsztrátként, de jellemző az olívaolaj emulzió is
- A pH ilyen méréseknél jól követhető üvegelektóddal, mivel a felszabaduló vajsav vízoldható és az NaOH oldattal jól mérhetően titrálható.



Lipid-víz kétfázisú rendszerek

- I. Lipid emulzió

A hidrofób tulajdonságok dom

- II. a) Lipid kettősréteg és b) Li

Megjelenik töltés a molekuláb

Pl. foszfolipidek

- III. Micella

Egyre polárosabb a molekula

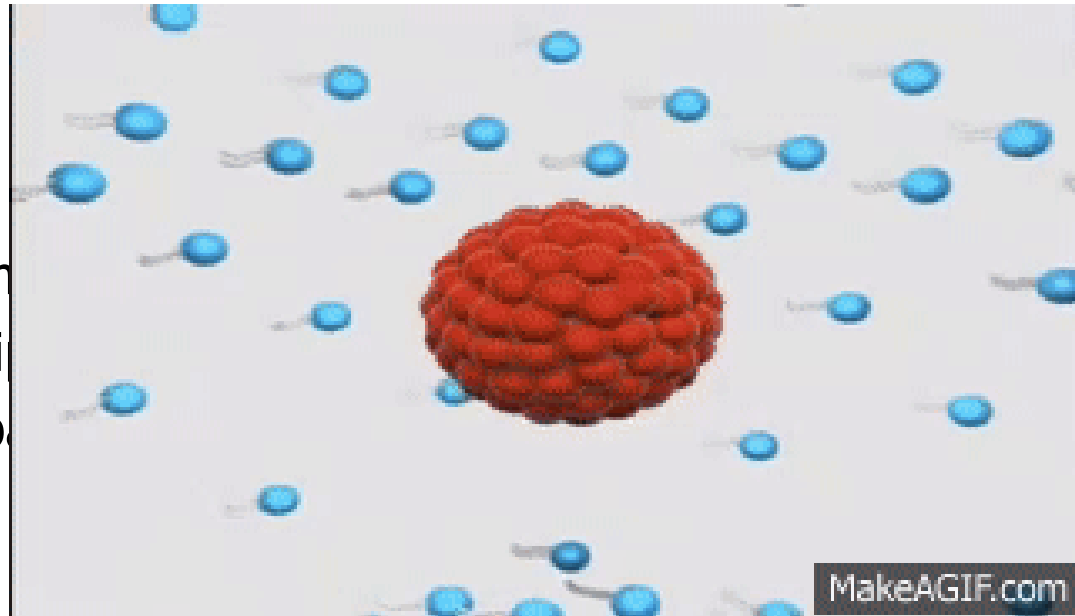
Rövidebbek a zsírsavláncok

Kis koncentrációban teljesen oldatban vannak II^b

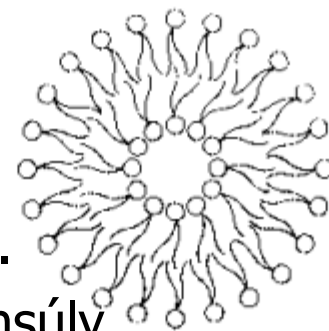
CMC (kritikus micella koncentráció) felett gömb v.

pálca, de optikailag tiszta a folyadék, gyors egyensúly

Pl. detergens



I



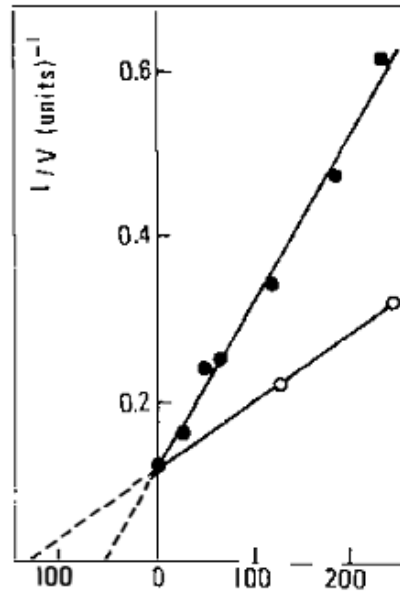
III





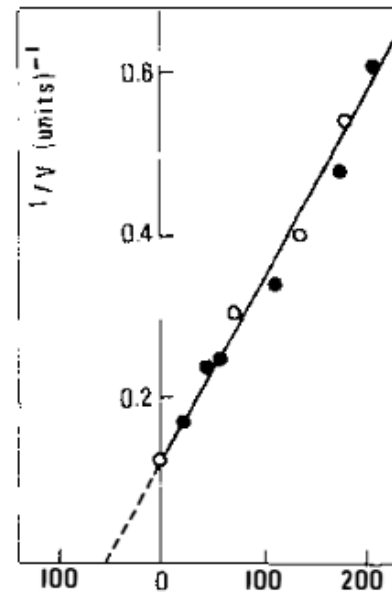
Lipáz kinetika

- Lipid emulzió a szubsztrát
- Formailag a Michaelis-Menten kinetikához hasonló, de fontos eltérés a felületen történő adszorpció
- Üres kör: kis zsírcseppek, teli kör: nagy zsírcseppek
- „Felületi szubsztrátkoncentráció” esetén illeszkednek egy egyenesre



1/S

S: anyagmennyiség/térfogat



1/S_A

S_A: felület/térfogat





Lipázok ipari felhasználása

Industrial uses of lipases

Ipari felhasználás területei

- régió- és sztereospecifikusak lehetnek, vagy szelektívek lánchosszra, kettős kötés helyzetére
- mosószeresek
- tejipar
- olajkémia (pl. biokenőanyag, szappanok eá.)
- gyógyászat
- kozmetikai ipar
- sütőipar (javítja a tészta állagát, szerkezetét)
- bőripar
- bioremediáció
- biodízelgyártás
- Szennyvízkezelés, biogáz előállítás



Lipáz források, termékek

Sources of lipases, products

Enzimforrások / Sources

▪ állati szövet

- hasnyálmirigy
 - ♦ marha, sertés
- fiatal kérődző előgyomra
 - ♦ kecskegida (pikáns sajt íz), borjú (vajás, kicsit borsos), bárány (pecorino, „koszos zokni”)

▪ mikrobiális

előgyomor enzimek helyettesítésére
egyedi lipázok vagy enzimkeverékek

- bakteriális eredetű
- gomba eredetű
 - ♦ Aspergillus, Mucor, Rhyzopus, Candida nemzetségek

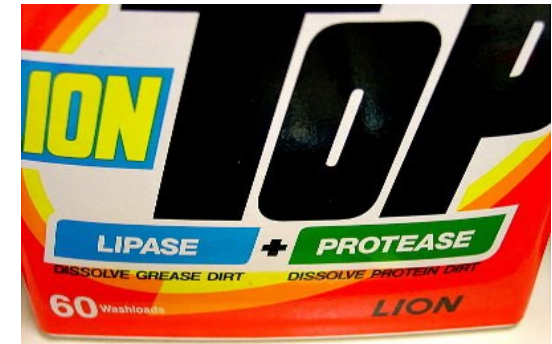
Kereskedelmi termékek

- folyadék extraktum
- vákuum- vagy fagyasztva szárított
- immobilizált



Detergensek / Detergents

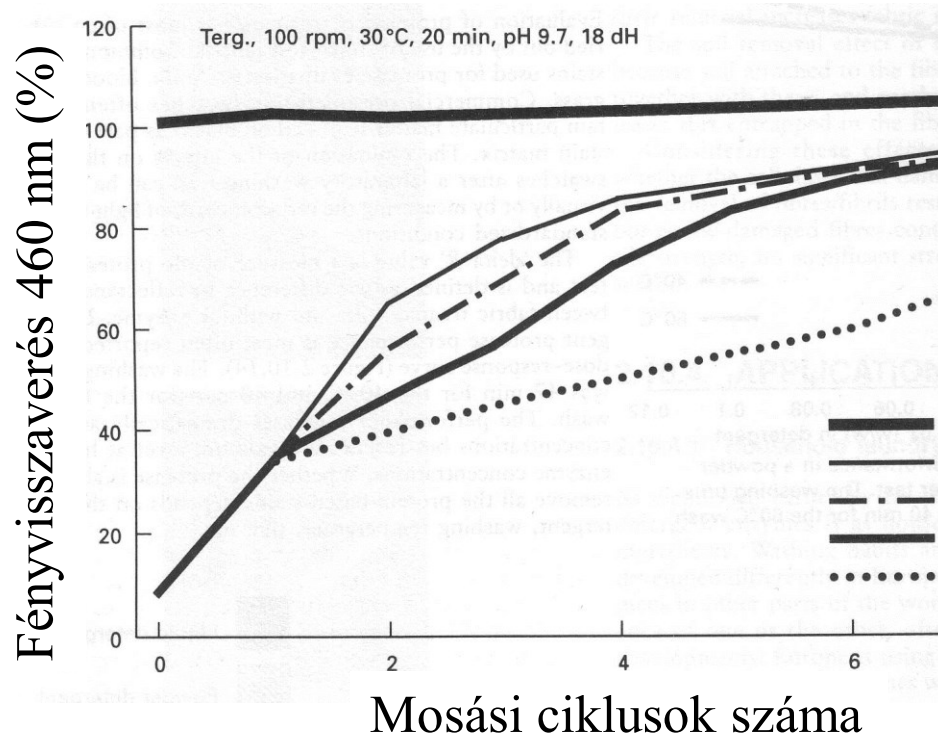
- követelmények
 - lúgos környezetben aktív
 - kis szubsztrát specificitás
 - kompatibilitás a detergensekkel
- teljes lipáz termelés kb. 1/3-a
- kereskedelemben 1988- (Lipolase - Novo Nordisk)
- ipari és háztartási
 - mosó-
 - mosogató-
 - egyéb tisztítószer
- Mosás után a szárítás során a lipáz aktivitás jelentősen nő (következő dia, jobb ábra).
Oka: 20-30% nedvességtartalmú szövet az optimális az enzim működéshez.
A feltöltévolítás a következő mosás során hatékonyabb (következő dia, bal ábra).



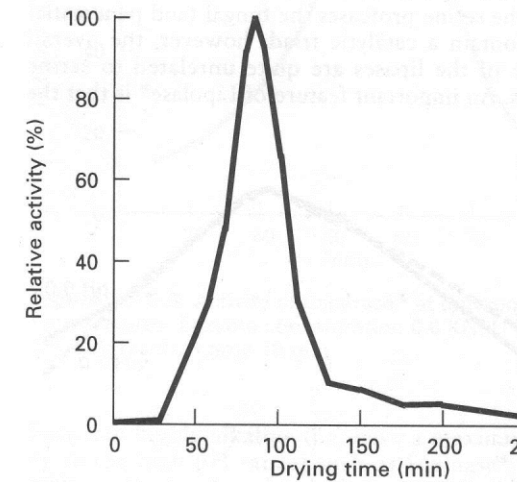


Tisztítószer

Detergents



Tiszta szövet
 3000 U/l, szennyezett szövet
 1000 U/l, szennyezett szövet
 300 U/l, szennyezett szövet
 0 U/l, szennyezett szövet



Wolfgang Ahle (ed.) Enzymes in industry: production and applications, 2004



Tejipar - sajtgyártás

Dairy industry – cheese making

Tejipar / Dairy industry

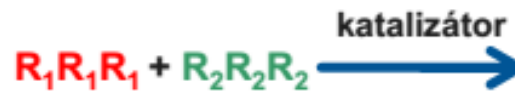
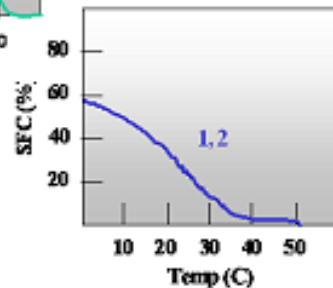
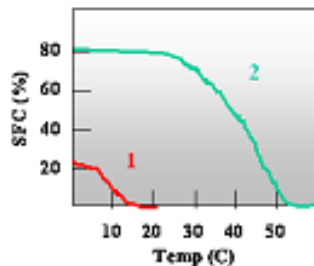
- joghurtgyártás
- **sajtgyártás / cheese making, ripening**
 - vajzsír és tejszín bontása
 - érés gyorsítása
 - ízfokozás (főleg lágy sajtok jellegzetes ízének kialakítása)
 - lipáz → rövid láncú zsírsav (ált. C4, C6) felszabadítása → erős, csípős íz
 - lipáz → közepes lánchossz (C12, C14) → zsírosabb íz
 - lipázok részt vesznek egyszerű kémiai reakciókban → egyéb ízanyagok
 - íz imitálás
 - utánozza a juh / kecske sajtok ízét → feta és egyéb sajtok tehéntejből
 - pasztőrözött tejből való sajtgyártásnál a nyers tejből előállítottéhoz hasonló ízt ad
 - EMC: enzim-módosított sajtok (USA)
 - a sajtot enzimmel termosztálják magas hőfokon
→ 10x nagyobb zsírsavkonc.
→ szószokhoz, saláta-öntetekhez, levesekhez, rágcsálnivalókhoz



Margarin

▶ Átészterezés:

- A zsírsavak újra-rendeződnek a triglicerid molekulában.
- Kémiai:
 - 50-120°C, 30-60 perc
 - nátrium-metilát (NaOCH₃) katalizátor (véletlenszerű)
- Enzimes:
 - enzim katalizátor (1,3 specifikus)



$R_1R_2R_1$	12,5%
$R_1R_1R_2$ $R_2R_1R_1$	25,0%
$R_1R_1R_1$	12,5%
$R_2R_2R_2$	12,5%
$R_2R_2R_1$ $R_1R_2R_2$	25,0%
$R_2R_1R_2$	12,5%



Gyógyszer-, Kozmetikai ipar

Pharmaceutical, Cosmetic Industry

Gyógyszeripar / Pharmaceutical Industry

- szintetikus enantiomerek ált. racém keveréke van forgalomban, pedig csak az egyik izomer kellene
lipáz: szelektív észterezést végez, pl. intermedierek eá.
 - tiszta enantiomer gyomirtók
 - nem-szteroid gyulladásgátlók (pl. ibuprofén)
 - béta-blokkolók és egyéb szívgyógyszerek
 - prosztaglandinok
 - szteroidok
- emésztést segítő gyógyszerkészítményekben

Kozmetikai ipar / Cosmetic Industry

- drága az enzim, de jobb minőségű a termék és kevesebb „downstream” művelet kell
- speciális észterek eá.
 - bőrápoló és napozókrémek, fürdőolajok
 - viasz észterek