



Enzimológia Lipáz enzimek

Fehér Anikó
Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

2019.11.12.



Lipidek

Lipids

Mi a lipid?

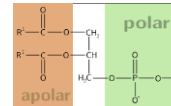
- zsírsavak és származékaik (gliceridek és foszfolipidek)
- zsírok (trigliceridek), viaszok
- szteránvázas metabolitok (koleszterin)

Funkciójuk

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

Jellemzőik

- hidrofób vagy
- amfipatikus:
hidrofili (víz-kezelő) és lipofili (zsír-kezelő)
→ vezikulumok, liposzómák, membránok



2

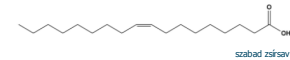


Zsírsavak

Fatty acids

Felépítésük

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



Néhány telített karbonsav / Saturated fatty acids

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

- Ecetsav (etánsav; C2:0); CH₃COOH
- Vajsav (butánsav; C4:0); CH₃(CH₂)₂COOH
- Laurinsav (dodekánsv; C12:0); CH₃(CH₂)₁₀COOH
- Mirisztinsav (tetradekánsv; C14:0); CH₃(CH₂)₁₂COOH
- Palmitsav (hexadekánsv; C16:0); CH₃(CH₂)₁₄COOH
- Stearinsav (oktadekánsv; C18:0); CH₃(CH₂)₁₆COOH
- Arachidinsav (eikozánsv; C20:0); CH₃(CH₂)₁₈COOH



3



Zsírsavak

Fatty acids

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 α/β-szénatomtól) számítva
 - b) végétől (a metilcsoporttól, az ún. ω-C-atomtól) → 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); CH₃CH₂CH=CHCH₂CH=CHCH₂CH=CH(CH₂)₇COOH
 - Linolsav (oktadekadiénsav, C18:2 ω-6); CH₃(CH₂)₄CH=CHCH₂CH=CH(CH₂)₇COOH
 - Olajsav (oktadekadiénsav, C18:1 ω-9); CH₃(CH₂)₇CH=CH(CH₂)₇COOH
 - Erukasav (dokozensav, C22:1 ω-9); CH₃(CH₂)₇CH=CH(CH₂)₁₁COOH



4



Növényolajok zsírsavösszetétele

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



5



Zsírsav-észterek - viaszok

Fatty esters – wax esters

Mi a viasz?

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



fronított reszkepa- és napraforgó-viasz

Előfordulás

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

Felhasználás

- gyertya
- kozmetikai ipar (viasz+zsír+pigment → rúzsok, szemfestékek)
- édességipar
- szilok bevonása
- textil, papír vízhatlantítása
- cipő- és autópótló, fa kezelő szerek
- zsírkreta, színes ceruza, indigó papír



6

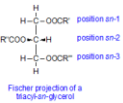


Glycerolipidek

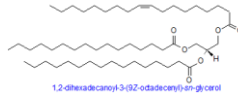
Glycerolipids

Felépítésük

- mono-
- di-
- triszubsztituált glicerín



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



Triglyceridek / 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 acetyl-CoA 2 C-atomos acetát-csoportokat képes szállítani
- baktériumok képesek páratlan C-atomszámú és elágazó láncú zsírsavak előállítására
- kérődzők zsírja is tartalmaz ilyen zsírokat
- zsírok / olajok: triglyceridek keveréke



Foszfolipidek / foszfatidok

Glycerophospholipids / phospholipids

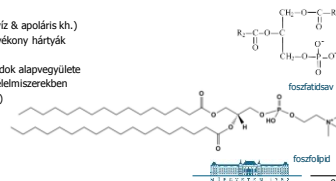
Felépítésük

- glicerín +
- 2 zsírsav +
- foszforsav +
- 1 N-t tartalmazó molekula (alkohol észterestí a foszfátsavat)



Jellemzőik

- amphipátikus vegyületek (víz & apoláris kh.)
- vizes közegben cseppek/vékony hátyák sejtmembrán építőkövek
- foszfátsav: más foszfátidok alapvegyülete
- ammónium-foszfatidok: élelmiszerekben (csokoládé- és kakaoart.) E442 néven emulgálószer

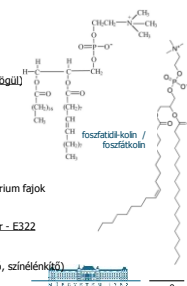


Foszfolipidek / foszfatidok

Glycerophospholipids / phospholipids

Technikai lecitin

- sárgás-barnás zsíros anyag
- glikolipidek, triglyceridek, foszfolipidek keveréke
- előfordulása
- állati és növényi szövetekben, tojássárgájában (lekithos ógürögül)
- kinyerése
- természetes olaj nyálkátartás
- nyálka üledék (olaj, víz, lecitin) beparázása
- ételtani 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
 - tartósítók (antioxidáns hatás), emulgáló-, stabilizálószer - E322
 - margarin-, csokoládégyártás, sütőipar
 - takarmányipar (zsíradék, pelletképzés-javító)
 - festékipar (stabilizáló, emulgáló, rozsdiákeződést gátló, színelédkód)

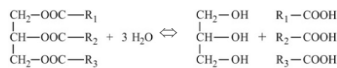


Lipázok

Lipases

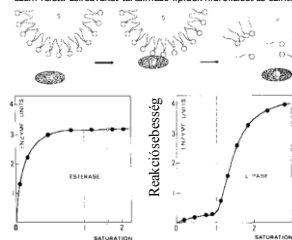
Jellemzőik

- 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 monoglyceridek esetén



Lipázok vs. észterázok

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



VERGER, R. DEHAAS, GH. ANNUAL REVIEW OF BIOPHYSICS AND BIENGINEERING. Volume 5. Page: 77-117. Published: 1976



Lipázok

Lipases

Reakcióik

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

HYDROLYSIS		
$\text{R}_1-\text{C}-\text{O}-\text{R}_2 + \text{H}_2\text{O}$	$\text{R}_1-\text{C}-\text{OH}$	R_2-OH
ESTER SYNTHESIS	$\text{R}_1-\text{C}-\text{OH}$	R_2-OH
$\text{R}_1-\text{C}-\text{OH} + \text{R}_2-\text{OH}$	$\text{R}_1-\text{C}-\text{O}-\text{R}_2$	H_2O
TRANS-ESTERIFICATION		
Alcoholysis	$\text{R}_1-\text{C}-\text{O}-\text{R}_2 + \text{R}_3-\text{CH}_2-\text{OH}$	$\text{R}_1-\text{C}-\text{O}-\text{R}_3 + \text{R}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$
Interesterification	$\text{R}_1-\text{C}-\text{O}-\text{R}_2 + \text{R}_3-\text{C}-\text{O}-\text{R}_4$	$\text{R}_1-\text{C}-\text{O}-\text{R}_4 + \text{R}_3-\text{C}-\text{O}-\text{R}_2$
Acidolysis	$\text{R}_1-\text{C}-\text{O}-\text{R}_2 + \text{R}_3-\text{C}-\text{OH}$	$\text{R}_1-\text{C}-\text{O}-\text{R}_3 + \text{R}_2-\text{C}-\text{OH}$



Salek et al. (Eds), New lipases and proteases, 2006



Lipázok

Lipases

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 mérgeiben foszfolipid-bontó enzimek
- csipés → fokozottabb sérülés, gyulladás



13



pH-stat módszer

- 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 lúgoldattal hozzáadásával
- Ebben az esetben legtöbbször tributírint (a glicerinné 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.

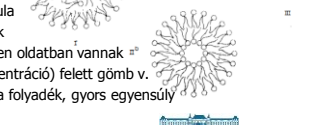
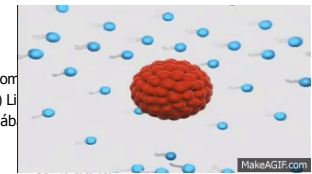


14



Lipid-víz kétfázisú rendszerek

- I. Lipid emulzió
 - A hidrofób tulajdonságok dominálnak
- II. a) Lipid kettősréteg és b) Lipid micella
 - Megjelenik töltés a molekulák PI. foszfolipidek
- III. Micella
 - Egyre polárosabb a molekula
 - Rövidebbek a zsírsavláncok
 - Kis koncentrációban teljesen oldatban vannak ⇒ CMC (kritikus micella koncentráció) felett gömb v. pálcák, de optikailag tiszta a folyadék, gyors egyensúly
 - PI. detergens



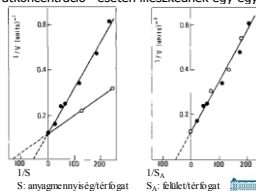
VERGER, R. DEHAAS, GH. ANNUAL REVIEW OF BIOPHYSICS AND BIENGINEERING. Volume: 5. Pages: 77-117. Published: 1976

15



Lipáz kinetika

- Lipid emulzió a szubsztrát
- Formailag a Michaelis-Menten kinetikához hasonló, de fontos eltérés a felületen történő adszorpció $E_{(solution)} + S_{(emulsion)} \xrightleftharpoons[k_2]{k_1} (ES)_{(emulsion)} \xrightarrow{k_3} Products$.
- Üres kör: kis zsírcseppek, teli kör: nagy zsírcseppek
- „Felületi szubsztrátkoncentráció” esetén illeszkednek egy egyenesre



16

VERGER, R. DEHAAS, GH. ANNUAL REVIEW OF BIOPHYSICS AND BIENGINEERING. Volume: 5. Pages: 77-117. Published: 1976



Lipázok ipari felhasználása

Industrial uses of lipases

Ipari felhasználás területei

- régió- és sztereospecifikusak lehetnek, vagy szelektívek láncosszra, kettős kötés helyzetére
- mosószerek
- tejipar
- olajkémia (pl. biokénőanyag, szappanok é.)
- gyógyszerészet
- kozmetikai ipar
- sütőipar (javítja a tészta állagát, szerkezetét)
- bőrőipar
- bioremediáció
- biodizelgyártás
- Szennyvízkezelés, biogáz előállítás



17



Lipáz források, termékek

Sources of lipases, products

Enzimforrások / Sources

- állati szövet
 - hasnyálmirigy
 - marha, sertés
 - fiatal kérődző elögyomra
 - kecskegida (pikáns sajt íz), borjú (vajas, kicsit borsos), bányai (pecorino, „koszos zokni”)
- mikrobiális
 - elögyomor enzimek helyettesítésére
 - egyedi lipázok vagy enzimeverek
 - bakteriális eredetű
 - gomba eredetű
 - Aspergillus, Mucor, Rhizopus, Candida nemzetségek

Kereskedelmi termékek

- folyadék extraktum
- vákuum- vagy fagyaszta szárított
- immobilizált



19

VERGER, R. DEHAAS, GH. ANNUAL REVIEW OF BIOPHYSICS AND BIENGINEERING. Volume: 5. Pages: 77-117. Published: 1976



Tisztítószer

Detergents

Detergensek / Detergents

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

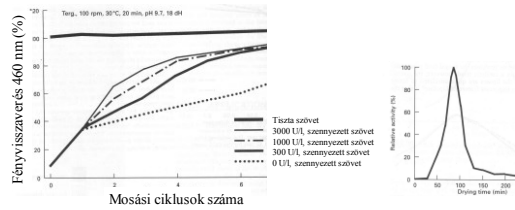


20



Tisztítószer

Detergents



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



21



Tejipar - sajtygyártás

Dairy industry – cheese making

Tejipar / Dairy industry

- joghurtgyártás
- sajtygyártás / cheese making, ripening
 - vajzsír és tejszín bontása
 - érés gyorsítása
 - ízfokozás (főleg lágy sajtok jellegzetes ízének kialakítása)
 - lipáz → rövid lánцу zsírsav (ált. C4, C6) felszabadítása → erős, csipős íz
 - lipáz → közepes lánchoossz (C12, C14) → zsírosabb íz
 - lipázok részt vesznek egyszerű kémiai reakciókban → egyéb ízanyagok
 - ízimitálás
 - utánózza a juh / kecske sajtok ízét → feta és egyéb sajtok tehéntejből
 - pasztörözött tejből való sajtygyártásnál a nyers tejből előállítottéhoz hasonló ízt ad
 - EMC: enzim-módosított sajtok (USA)
 - a sajtot enzimmel termosztálják magas hőfokon → 10x nagyobb zsírsavkonc. → szószókhöz, saláta-öntetkekhez, levesekhez, ráncsalínálalókhöz



22



Margarinyártás

Margarin

Absztrahálás:

- A zsírsavakat triglicerid-oxidokat a triglicerid molekulákban.
- Kémiai:
 - 60-120°C, 30-60 perc
 - nátrium-oxid (NaOH) katalizátor (kalkinálás)
- Izomerizáció:
 - enzim katalizátor (1,3 specificitás)

Chemical structures:

$R_1R_2R_3$ 12,1%
 $R_2R_1R_3$ 12,1%
 $R_1R_3R_2$ 12,1%
 $R_2R_3R_1$ 12,1%
 $R_3R_1R_2$ 12,1%
 $R_3R_2R_1$ 12,1%

Graphs: 1. Triglyceride content vs time, 2. Triglyceride content vs temperature.

25



Gyógyszer-, Kosmetikai ipar

Pharmaceutical, Cosmetic Industry

Gyógyszeripar / Pharmaceutical Industry

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

Kosmetikai ipar / Cosmetic Industry

- drága az enzim, de jobb minőségű a termék és kevesebb „downstream” művelet kell
- speciális észterek éá.
 - bőrápoló és napozókrémekek, fűrdőolajok
 - viasz észterek



27