

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 enzimtartalmú 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, kicseri 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.: restriktív 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

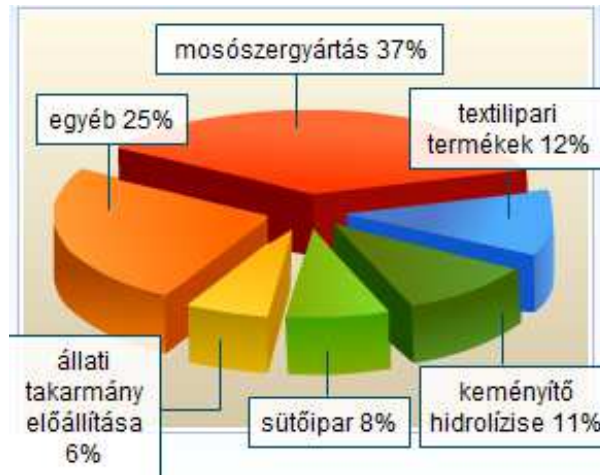
Pl.: restriktív endonukleázok, reverz transzkriptáz, DNS-ligáz, DNS-polimerázok, Klenow enzim.

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, írtelenítés	
		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	
Gyümölcsipar		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	kesperűség 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, glutation oxidázok	haj hullámosítás
	papain, bromelin, szubtilizin	bőr felület tisztítás
	amiloglükozidáz, glükóz oxidáz	fogpaszták és szájjvizek



1. ábra Az enzimek használatának megoszlása iparágak szerint

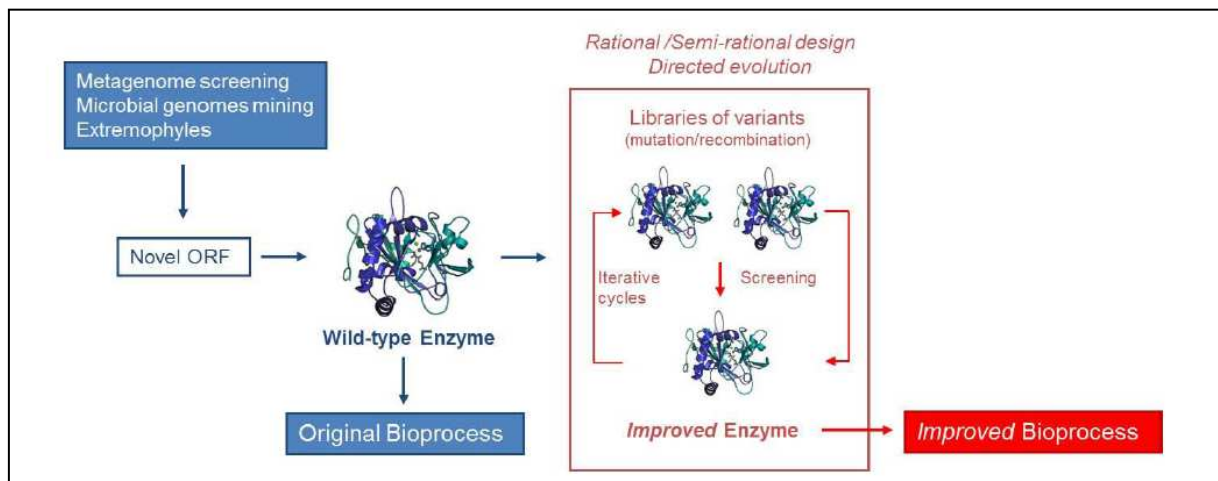
4. Genetikai módszerek az ipari enzimek gyártásában

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 specifitását 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 számításigényes 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 enzimmtulajdonságokra, 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 foszfatázból (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 rendszerre, 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 sejtfehérje 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 hiperglikoziláció 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 előállításának 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.

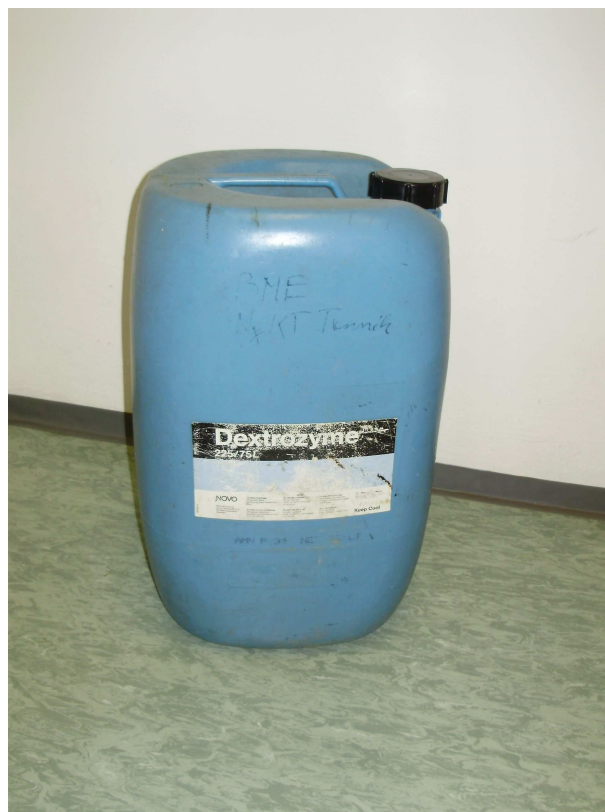
Az alapkérdés, hogy a termelt enzim a sejten belül marad (intracelluláris) vagy a mikroba kiválasztja a fermentlébe (extracelluláris). Az előbbi esetben a sejt tömeget fel kell tárnai, ez plusz egy bonyolult művelet a feldolgozási technológiában. Ennek elkerülésére célszerű a fehérjét úgy manipulálni, 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, adszorpciós, 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



3. ábra Folyékony enzim preparátum gyári kiszerelésben

enzimaktivitás megőrzése a szavatossági időn belül, másrészt a technológiában való felhasználás egyszerűen, beméréssel 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 enzim hidrolízisre. Összehasonlításképpen, az enzim 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.

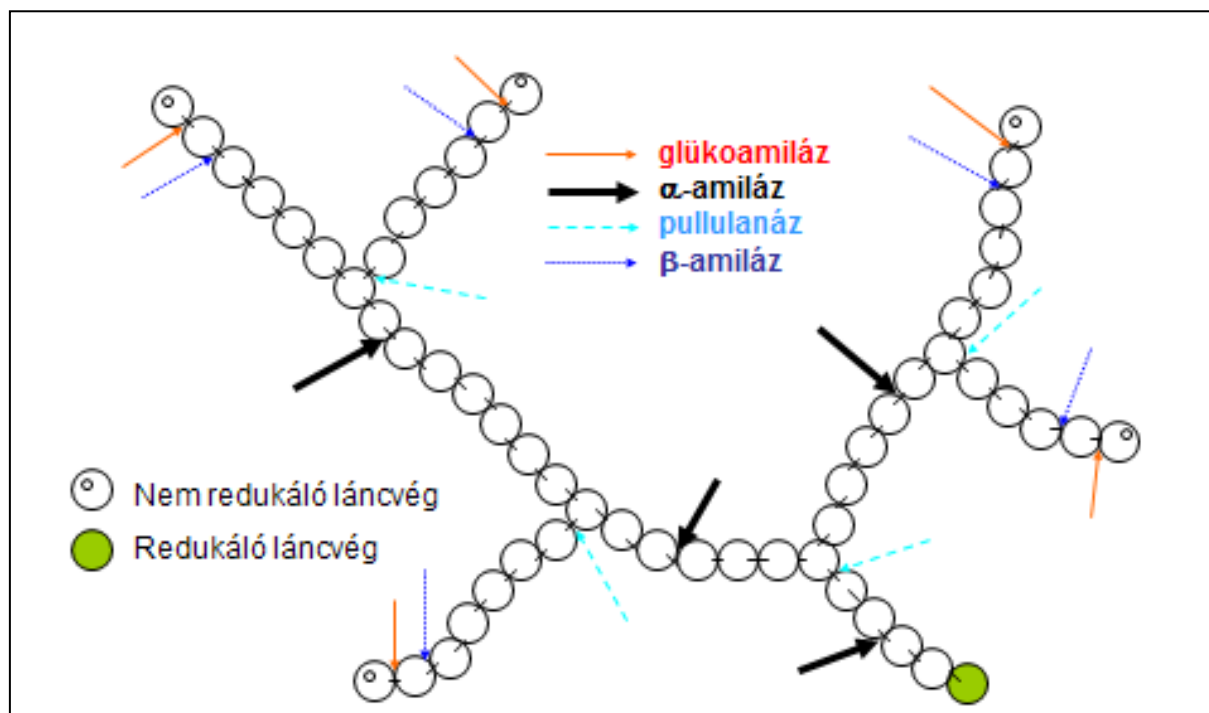
A fontosabb amilázok:

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 maltózzra és glükózra. A képződött termékek mind α -konfigurációban válnak szabaddá. Az α -D(1-6)-os elágazásokat is tartalmazó amilopektin enzim 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 enzimforrások 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 enzimforrás. 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, írtelenítés - a szálakat a technológia egyik fázisában keményítő bevonattal védik, később ezt emésztik le az enzimmel. Az írtelenítő 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 keményítőtől állnak. Ezért a megfelelő tisztításhoz fehérje- és szénhidrát bontó enzimeket is adagolnak a termékekbe.

6.1.2. Maltamilázok

6.1.2.1. β -amiláz

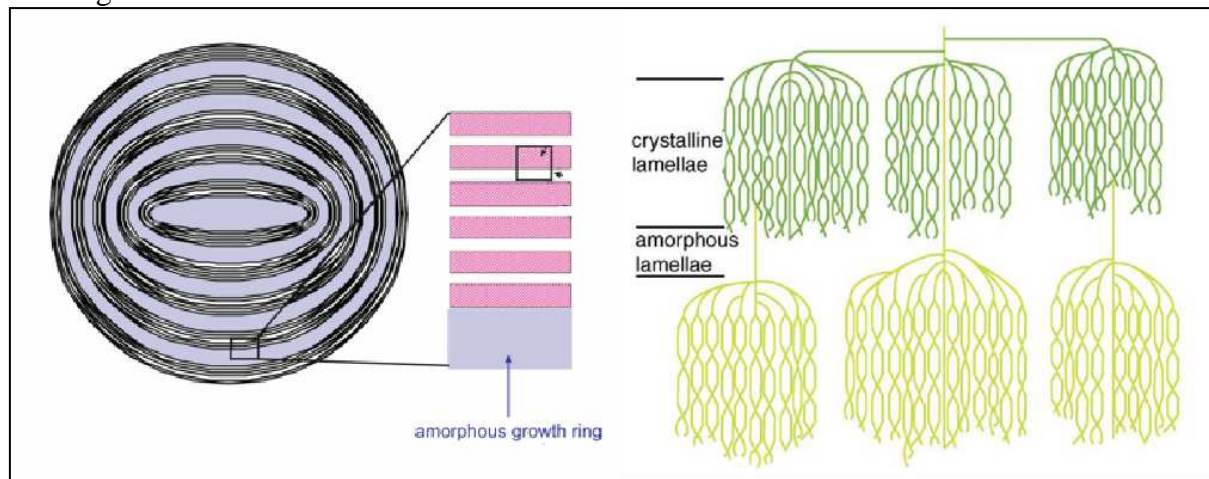
Ez az enzimescsoport a keményítő láncok nem redukáló végéről maltóz egységeket (glükóz(1-4)glükóz diszacharidokat) vág le. Legrövidebb szubsztrátja a maltotetraóz (4 glükóz egység), a maltotriózt csak nagyon kis sebességgel bontja.

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 gabonaszesz 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 móltömeget, 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 kizorította 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 pullulánban, 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 törzsben 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) konstitutívúvá 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, specifikitásuk 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 kromatográfiai 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

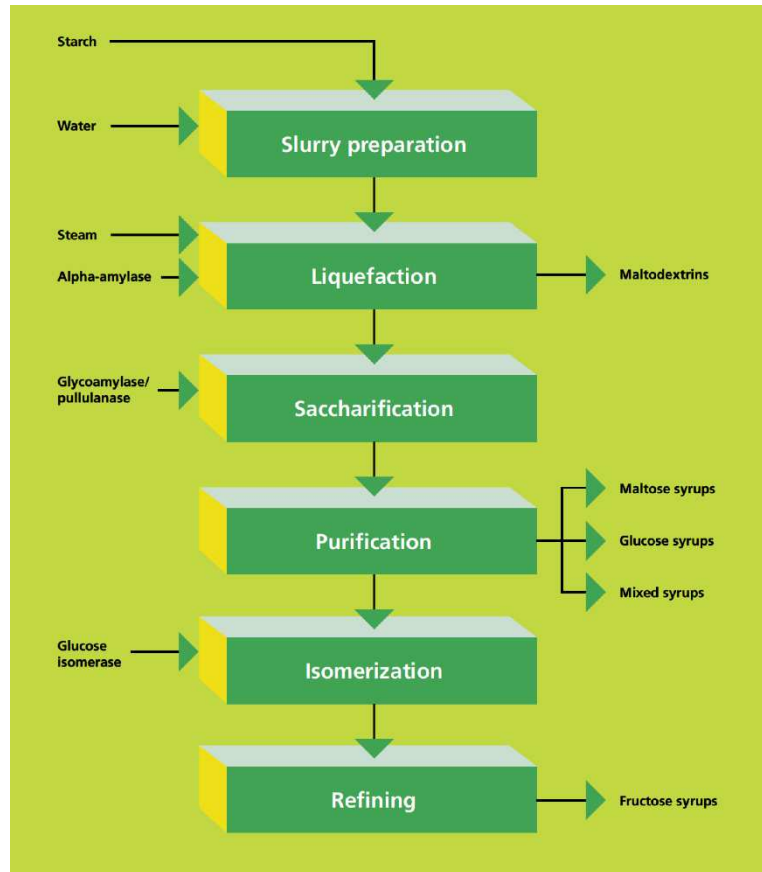
A modern enzimes műveletek a kukorica nedves őrléses feldolgozási technológiájába épülnek be. Bár ez már kiforrott technológia, még mindig folynak kutatások az enzimes átalakítás kizozatalának és hatékonyságának javítása érdekében.

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

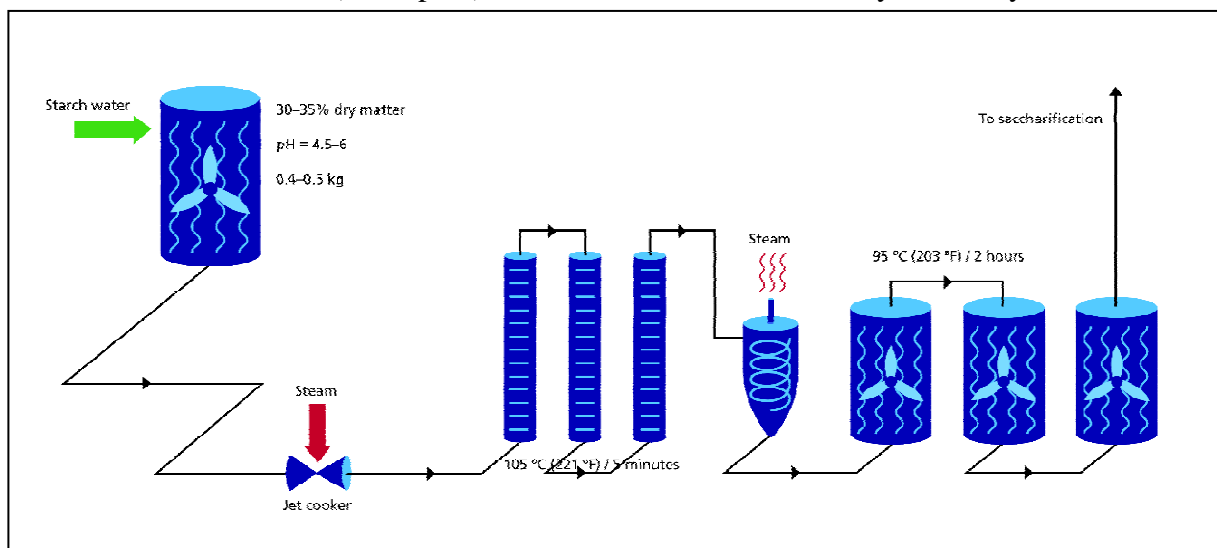
Folyósítás

A legelterjedtebben 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 megkezdje 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 csőkiágón 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 enzimes 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 említettekénél, 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 törzset 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)

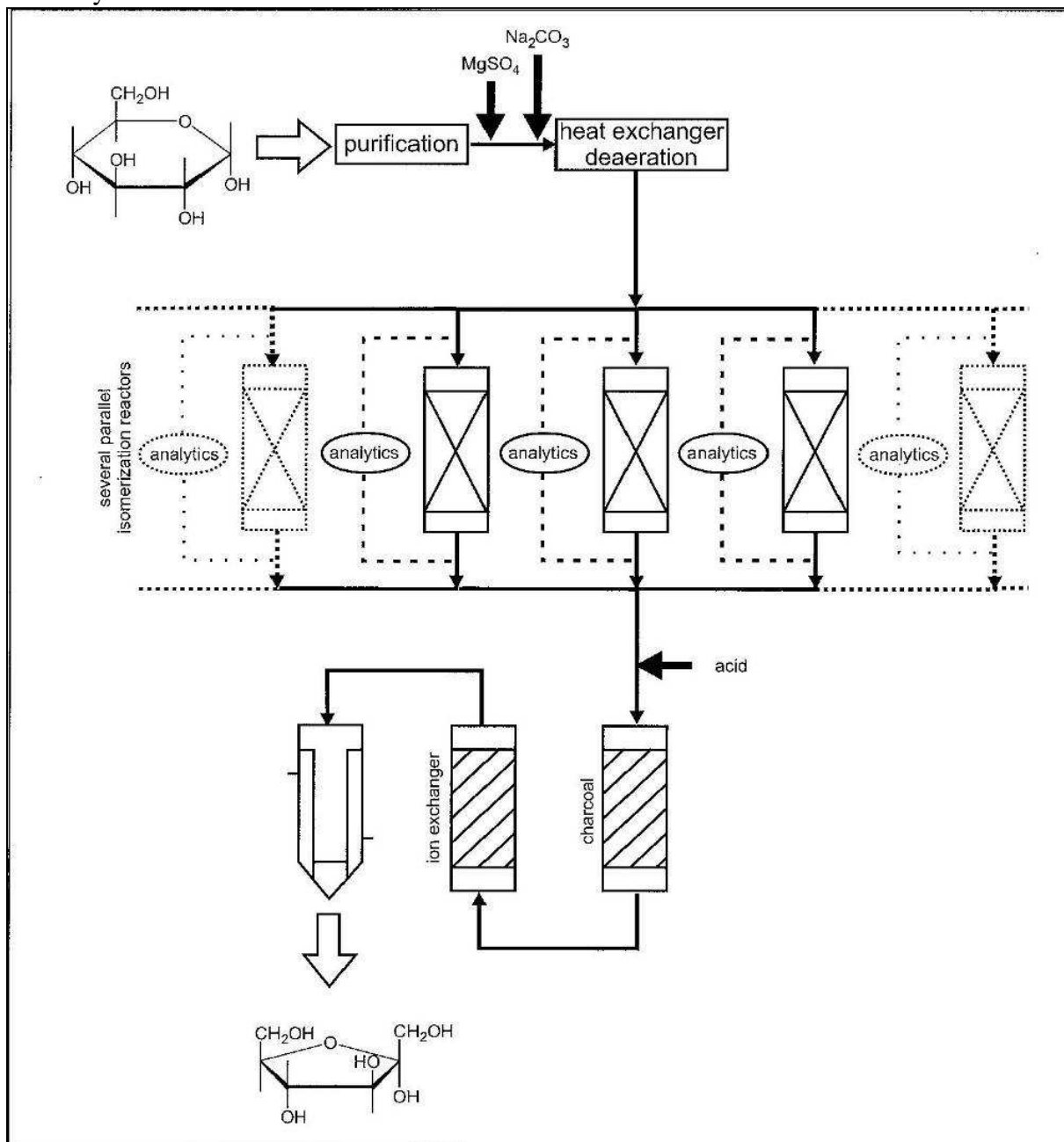
Az izomerázok intracellulárisan termelődnek. A hasznosítandó xilán poliszacharid nem lép be a sejtbe, de hidrolízis terméke, a xilóz igen, és ezt a sejten belül izomerizálja az enzim. A sejtfeltárás, enzimizálás nehézkes művelet, még nagyobb probléma az izolált enzimek bomlékonysága. Emiatt különböző immobilizációs módszerekkel rögzítik az enzimeket. Használják 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 szén 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

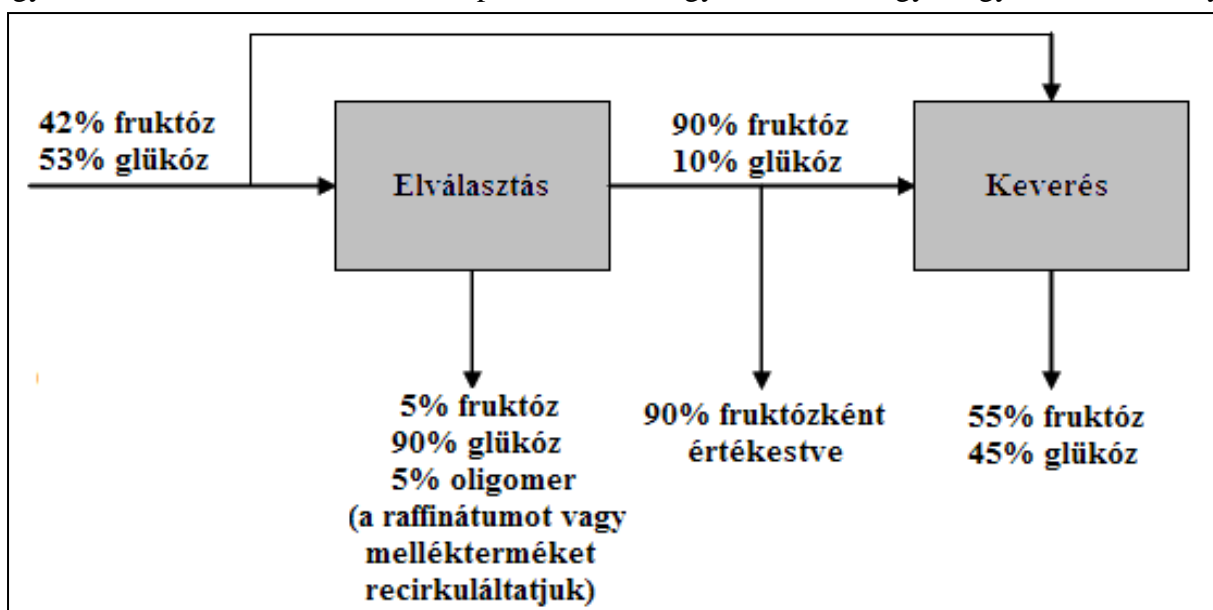
A rögzített enzim idővel veszít aktivitásából. Manapság a kereskedelmi glükóz izomerek aktivitásának felezési ideje ipari körülmények között 200 nap körül van. Az enzimet hatékonytalanít minden reaktornál az elfolyónál optikai szenzorokkal folyamatosan mérik.

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 kromatográfiás 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 kromatográfiának 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 tejparban használják fel.

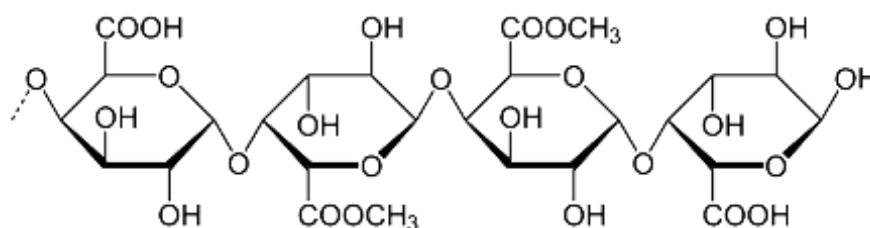
Adalékok: ez a technológia, mint annyi más műszaki fejlesztés, a háborús politikának köszönhető. Amikor Fidel Castro rendszere átvette az irányítást Kubában, az USA gazdasági blokádot hirdetett ellene. Kuba fő exportcikke a nádcukor volt, ez nem kerülhetett az amerikai piacra. Ettől viszont cukorhiány 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), azután 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.

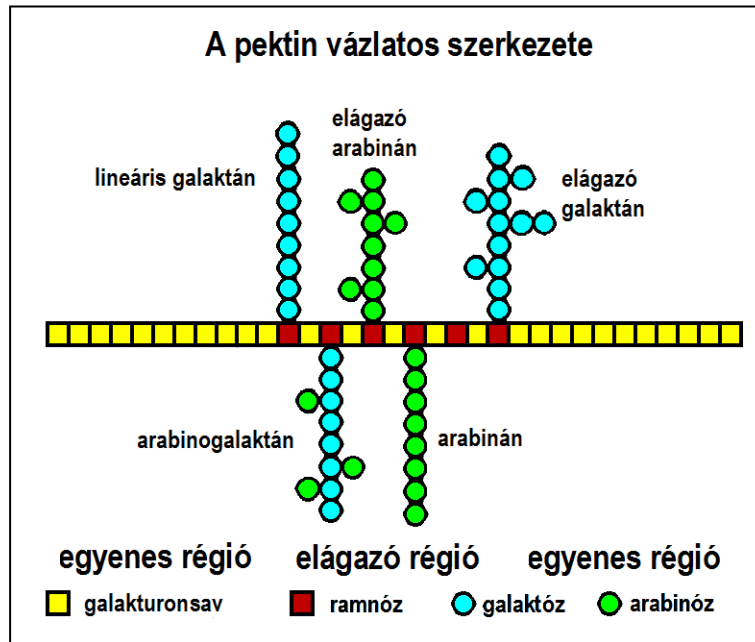
6.3. Pektinázok

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.



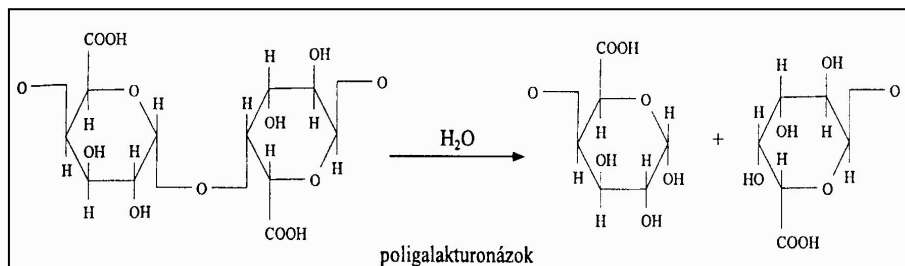
11. ábra A pektin oldalláncai

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 húsában, 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.

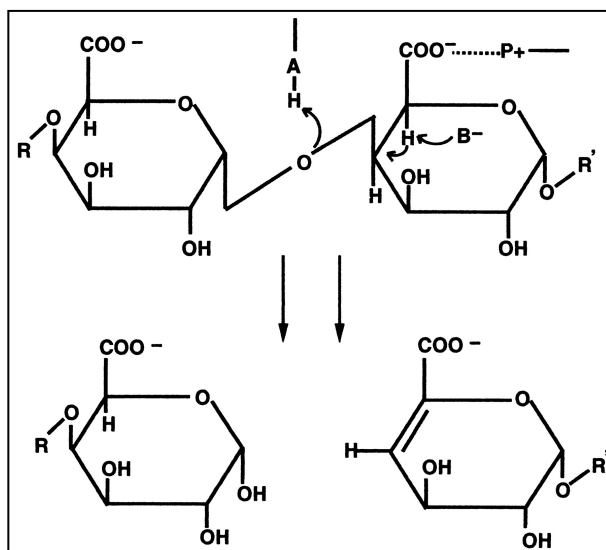
A növényi pektinbontás mellett sok mikroorganizmus, elsősorban a fonalas gombák termelnek bontó enzimeket. Ezek biológiai szerepe egyértelmű. A penészek számára kiváló táptalaj a növények termése a benne található tartalék tápanyagokkal, ehhez pedig a sejtfal lebontásával tudnak hozzájutni. A prokarióták 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 gyümölcsleípar 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.

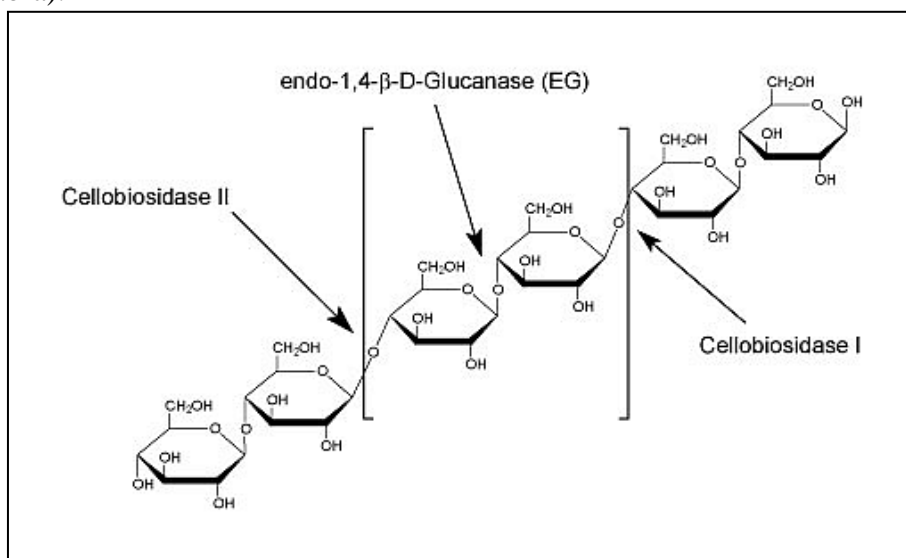
A pektin-hidrolízisnek a felsoroltakon kívül a textiliparban is van jelentősége, a len és a kender áztatásánál. A len és kenderkórók feltárása egy spontán mikrobiológiai folyamatban, az áztatás során történik. Az áztatás célja a külső háncrestok maradéktalan elválasztása a belső fás részekről. A háncrestben 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 szabaddá válnak, szárítás után a tilolással és gerebenezéssel elválaszthatók. A kender és len növényen mindig vannak a talajból származó, pektinázot 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 biomassza 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 lehet (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 megrágítják 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 moszergyártás 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 kötések és ezzel oligo- β -glükánokat hoz létre. A cellulóz bontás exoenzimeit a β -amilázokhoz hasonlóan a lánc végéről kettesével 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 hatáskukat (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 termelő 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.

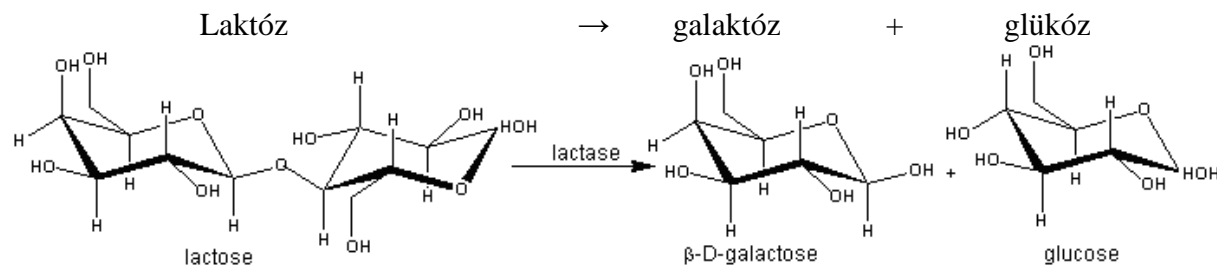
A megfelelő tulajdonságú alkalikus cellulázt a *Bacillus* BCE103 fajban találták meg. Ez a törzs viszont nehezen szaporítható és kevés enzimet termel, emiatt az endocelluláz gént *B. subtilis*-be klónozták. Ez jól ismert, biztonságos gazdaszervezet, extracellulárisan termeli az enzimet, így a feldolgozás 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 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, ez okozza a laktóz intoleranciát.

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 glükózhoz 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 enzimes 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 tablettá, drázsé, 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 enzimes 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 enzimek fehérje a tejben marad, a folyamatos sterilizálás (UHT = ultra high temperature, ~140 °C) során inaktiválódik. 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) laktózájának hidrolízisére használják. A savas közegben jól alkalmazható 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.

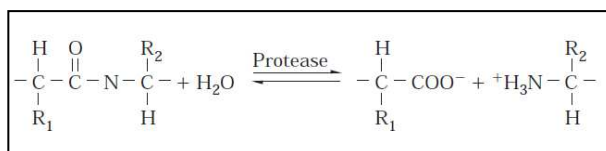
Az emberi faj fejlődése során egyes csoportokban, a pásztornépeknél viszont a táplálkozás úgy alakult, hogy a felnőttek is rendszeresen fogyasztottak tejet és tejtermékeket. Ezekben a populációkban szelekciós hát-

ránnyá vált a felnőttkori enzimhiány. Azok, akik érett korukban is fogyasztottak 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 pásztorok mongolok toleránsak. Fekete-Afrikában a lakosság nagyrészt intoleráns, viszont a marhatartó maszájok toleránsak.

6.6. Proteázok

A proteázok a peptid lánc az 16. ábrán látható hidrolitikus bomlását katalizálják. A reakció valójában három egymást követő részfolyamatból tevődik össze:

1. létrejön a Michaelis komplex az eredeti peptid lánc (S) és az enzim között (ES),
2. a peptidkötés hasítása, az új N-terminális peptid leválása,
3. nukleofil támadás a még kötött másik peptidre és a szabad enzim rekonstruálása.



16. ábra A proteázok alapreakciója

A szubsztrát koncentráció jelentősen különbözik az élelmiszeripari és a mosószer alkalmazásoknál. Az élelmiszereknél a fehérje koncentráció nagy, százalékokban is kifejezhető, míg a mosásnál a tisztítandó felületen kevés fehérje természetű szennyezés van jelen. Ezzel együtt a rendszer messze van a kémiai egyensúlytól, a folyamat a bomlás irányába megy végbe, a nagyobb molekulák szintézise elhanyagolható. A folyamat csak úgy fordítható meg, ha nagy aminosav koncentrációt állítunk be, ez esetben a proteázok képesek peptidkötések létrehozására, de csak di- és tripeptidek keletkeznek (pl.: aszpartám gyártás). Sok proteáz enzim szubsztrát specifikitása nem korlátozódik a peptid (savamid) kötésre, képesek a karbonsav észtereket is hidrolizálni. Ezt a melléreakciót az enzimaktivitás mérésére lehet kihasználni.

A fehérje hidrolízis kvantitatív leírására a hidrolízis ekvivalenst (h) használják. A (h) mértékegysége (mól elbontott peptidkötés)/(kg fehérje (szubsztrát)). A hidrolízis ekvivalens jól használható a fehérje hidrolízis kinetikai vizsgálatánál, de más célokra inkább a hidrolízis fokot (DH = degree of hydrolysis) számítják ki. Definíciója:

$$DH = \frac{h}{h_{\text{tot}}} \cdot 100\%$$

h_{tot} az egy kilogramm fehérjében található összes peptid kötések mennyisége, mólban kifejezve. Jó becslésként ezt 8 mól/kg-nak vehetjük, mert ha az aminosavak átlagos molekula-tömegét 125 g/mol-nak vesszük, akkor egy kg fehérjére nyolc aminosav, azaz 8 peptid kötés jut. Pontos értékét a fehérje aminosav-összetétele alapján számíthatjuk ki. Néhány extrém összetételű fehérjétől eltekintve (pl.: zselatin – 11,1) ez az érték jól használható.

Az élelmiszeriparban a hidrolízisfok nagymértékben meghatározza a termék tulajdonságait, így az enzimek alkalmazhatóságát is. Ehhez kapcsolódóan fontos, hogy a hidrolízis előrehaladtát a folyamat közben követni lehessen és a reakciókat egy jól meghatározott szakaszban, a termék optimális állapotában le lehessen állítani. A mosó- és tisztítószeres esetében a

hidrolízisfok meghatározása felesleges, mert mind a szubsztrát koncentráció, mind annak változása nagyon kicsi és nehezen mérhető.

A proteázokat többféle szempont szerint csoportosíthatjuk, így a termelő organizmus szerint lehetnek állati, növényi vagy mikrobiális eredetűek, támadáspontjuk szerint endopeptidázok vagy exopeptidázok. Az exopeptidázok a peptid kötések a polipeptid lánc az aminosav vagy karboxil végén bontják, egy, két, vagy három aminosavat választanak le, míg az endopeptidázok a lánc belső peptidkötéseit hasítják. A pH optimum alapján meg szoktak különböztetni alkálikus, neutrális és savas proteázokat, ami viszont kapcsolatban van katalízis mechanizmusával, az aktív centrumban működő kémiai funkciók csoportokkal (szerin, tiol-, aszparaginsav és metalloproteázok). A szerin-proteázok családjába két további alcsoportra osztható: kimotripszin-szerű és szubtilizin-szerű proteázokra, (ezek a legfontosabb ipari termékek). Az osztályok neve onnan ered, hogy más-más katalitikus csoport vesz részt a reakcióban. A szerin és cisztein proteázoknál az aktív centrumban lévő szerin hidroxil, illetve a cisztein tiol csoportja indít nukleofil támadást a katalízis során.

Szerin-proteázok

A név arra utal, hogy az enzim aktív centrumában a szerin oldallánca a nukleofil csoport. A katalitikus hely három aminosavból áll, a szerin mellett egy-egy aszpartát és hisztidin oldallánca együttesen alkotja az úgynevezett katalitikus triádot. Ezek az aminosav láncban egymástól távol helyezkednek el (pl.: a kimotripszin esetében: His57, Asp102, Ser195), de a fehérje háromdimenziós szerkezetében egymás közelébe pozícionálódnak. A szerin proteázok gyakoriak mind a prokarióta, mind az eukarióta szervezetekben.

Cisztein proteázok

A cisztein-proteázok is széles körben elterjedtek, megtalálhatók az állatok, növények, baktériumok és vírusok körében egyaránt. Hatásmechanizmusuk közel áll a szerin proteázokhoz, de itt a támadó nukleofil ágens a szerin hidroxil csoportja helyett a tiol-csoport. A katalitikus triád is hasonló (papain esetében: Cys25, His159, Asp175), de kiegészül egy negyedik aminosavval (Gln19), amelynek savamid nitrogénje a peptidkötés oxigénjével képez hidrogén hidat.

Aszparaginsav proteázok

Az aszparaginsav proteázok nevüket az aktív centrumban lévő két katalitikus fontosságú aszparaginsavról kapták. A különböző eredetű, emlős, gomba, vírus enzimek háromdimenziós szerkezete nagyon hasonló egymáshoz. Az enzimek két szerkezetileg hasonló doménből állnak, és az aktív centrum a két domén közötti résben alakul ki. A legtöbb aszparaginsav proteáz a pH 2-4 tartományban aktív (pl.: pepszin), emiatt régebben ezt az enzim osztályt a savas proteázokkal azonosították. Ez alól kivétel a rennin, amelynek optimális pH tartománya 5,5-7,5 közé esik.

Metalloproteázok

Katalitikus aktivitásukat az aktív centrumban lévő egy vagy két fém ion, leggyakrabban cink ion biztosítja (pl.: termolizin). Érdekessége a mechanizmusnak, hogy a nukleofil támadást itt egy erősen polarizált vízmolekula hajtja végre.

Számos kereskedelmi enzimpreparátum többféle proteáz keveréke. Ezeket a termelő organizmus párhuzamosan szintetizálja, és nem érdemes az egyes enzimeket tisztán kikezteni, mert együttesen általában hatékonyabban működnek, mint izolált formában. A

gyógyszeriparban szigorúbbak a tisztasági követelmények, de az élelmiszeriparban és a mosószereknél elterjedtek a vegyes enzimek készítmények.

Néhány kereskedelmi forgalomban lévő proteáz jellemzőit foglalja össze az 3. táblázat. Az Alcalase, Esperase, Savinase és a tripszin szerin proteázok, míg a Neutrased metalloproteáz, amelynek aktív centrumában egy Zn ion helyezkedik el. A Durazym és az Everlase a Savinase fehérje mérnökileg továbbfejlesztett variánsai. A sajtgyártásban használatos Rennilase vagy Fromase aszparaginsav proteázok. Tiol- vagy cisztein proteázokkal növényi enzimek között találkozhatunk, ilyen a papain (papaja), a bromelin (ananász növény) és a ficin (füge).

3. táblázat Kereskedelmi forgalomban lévő enzimek tulajdonságai

Kereskedelmi név	Eredet	Formulázás	pH tartomány	Hőfok tartomány
Alcalase	<i>Bacillus spp.</i>	folyadék/granulátum	6–10	10–80
Esperase	<i>Bacillus spp.</i>	folyadék/granulátum	7–12	10–80
Everlase	<i>Bacillus GMO</i>	folyadék/granulátum	8–11	15–30
Savinase	<i>Bacillus GMO</i>	folyadék/granulátum	8–11	15–75
Durazym	<i>Bacillus spp. GMO</i>	folyadék/granulátum	8–11	15–70
Neutrased	<i>Bacillus spp.</i>	folyadék/granulátum	6–8	10–65
Protamex	<i>Bacillus spp.</i>	mikrogranulátum	6–8	10–65
Flavourzyme	<i>Aspergillus spp.</i>	folyadék/granulátum	4–8	10–55
Rennilase vagy Fromase	<i>Rhizomucor meihe</i>	folyadék/granulátum	3–6	10–50
Trypsin	hasnyálmirigy	granulátum	7–9	10–55

A proteázok bioszintézisének gyakori jelenség, hogy az enzim egy inaktív fehérje (zimo-
gén) formájában jön létre és választódik ki, és csak a sejten kívül aktiválódik. Ez általában irányított proteolízis, egy rövidebb-hosszabb peptidet le kell hasítani a fehérjeláncról (pl.: pepszinogén – pepszin átalakulás). A mikroorganizmusok saját enzimeit esetében kihasználhatjuk az aktiválódás természetes mechanizmusait. A rekombináns fehérjeként termelt enzimeknél viszont többlet feladatként meg kell oldani az aktiválást is.

A proteázokat ipari léptékben mikrobákkal állítják elő, mert az állati és növényi enzimek források korlátozottak. Ha másként nem megy, az állati enzim génjét klónozzák mikroorganizmusba, és így termeltetik nagy mennyiségben (pl.: rennin). A mikrobák proteáz termelése szervesen kapcsolódik az anyagcseréjükhöz, enzimeikkel lebontják a fehérjéket és a kapott egyszerűbb molekulákat anabolikus vagy katabolikus anyagcseréjükben hasznosítják. A reakció végbemehet extra- vagy intracelluláris enzimekkel. A bontás első lépése általában oligopeptidek létrehozása endopeptidázokkal, majd az exopeptidázok ezeket tovább hidrolizálják aminosavakká. Az első lépést az extracelluláris proteázok végzik, a sejt csak a kis molekulákat képes felvenni és hasznosítani. Az intracelluláris proteázok is létfontosságúak a sejt különféle celluláris és anyagcsere-folyamatainak fenntartásához, mint a fehérjék folyamatos megújulása, a sejtek differenciálódása, a fehérjék aktiválása.

A proteázok a teszik ki az ipari méretben termelt enzimek nagy részét, ezen belül az alkálikus proteázok a vannak túlsúlyban. A termelő törzsek között találunk baktériumokat, fonalas gombákat, élesztőket és sugárgombákat, de a legnagyobb súllyal a *Bacillus*-ok által termelt enzimek szerepelnek.

6.6.1. Alkálikus proteázok

Az alkálikus proteázok általános tulajdonságai

Az mosószerekben használatos alkálikus proteázok pH = 8-12 közötti tartományban aktívak, ezen belül az optimális pH általában 9-11 közé esik. Egy-két extrém bakteriális enzimet is izoláltak, amelyek jól működnek pH = 12-13-nél is.

A proteázok optimális hőmérséklete rendszerint 50 – 70 °C közé esik. Mint minden enzimnél, itt is keresik a magasabb hőmérsékleten dolgozó változatokat. Ilyenek a prokarióták

körében fordulnak elő, például a *Bacillus sp.* B189 optimális hőmérséklete kivételesen magas, 85 °C-os. Más fajok, mint pl.: a *Bacillus*-ok a *Streptomyces*-ek és a *Thermus* fajok enzimeinek hőstabilitása Ca^{2+} ionok hozzáadásával növelhető meg hasonló értékre. Általánosságban elmondható, hogy a lúgos proteázok – bár nem fémproteázok – fémionokat (leggyakrabban Ca^{2+} , Mg^{2+} vagy Mn^{2+} ion) igényelnek az aktivitásukhoz vagy stabilitásukhoz.

A fonalas gombák (*Aspergillus*, *Mucor*) által termelt alkálikus proteázok ipari jelentősége változatos tulajdonságaik ellenére kicsi, ipari méretekben a szélsőséges körülmények között is jól működő bakteriális enzimeket termelnek. Ezek jellemző típusa a szubtilizin csoport. Nevét a *Bacillus subtilis*-ről kapta, de sok más organizmus termel hasonló szerin proteázokat. Ipari méretekben a genetikailag manipulált *Bacillus amyloliquefaciens* és *Bacillus licheniformis* törzsekkel állítják elő. Magas pH és hőmérséklet optimuma révén különösen jól alkalmazható mosószerekben.

Adalék: ezeket az extrémofil baktérium törzseket a természetből speciális táptalajon szelektálják. A fő szénforrás nem-hidrolizált fehérje (ha aminosavak vannak jelen, a sejtek nem termelnek proteázt, mert nincs rá szükségük). A pH-t 10-re állítják és a lemezeket melegen inkubálják. Ami ilyen körülmények között kinő, az nagy valószínűséggel termeli az alkálikus proteázokat.

A génmanipulációnál az enzimfehérje kópiaszámát meg lehet növelni, ha – a gén elé egy erős promotert építünk be, – a gént multikópiás plazmiddal fejeztetjük ki. Az enzim szerkezetét a fehérjeméternökség módszerével lehet javítani, aminosavak cseréjével lehet az aktivitást illetve a hőstabilitást növelni.

6.6.1.1. Mosószer proteázok

A mosólé, mint működési környezet több szempontból is kedvezőtlen az enzimek számára. A mosás magasabb hőmérsékleten, 40-90 fokon történik. Bár az iparban törekednek az alacsonyabb hőmérsékletekre, de a háztartási mosógépek mindegyikében van 90 fokos program. A közeg erősen lúgos (pH = 9-12), és inaktiváló/inhibitor jellegű anyagok is jelen vannak. A teljesség igénye nélkül: detergensok: n-alkil-benzol szulfonátok, alkohol-szulfátok, alkohol-éter-szulfátok, etoxilált alkohokok, kationos tenzidek. Vízlágyítók: zeolitok, nátrium-karbonát, nátrium-szilikát, nátrium-citrát, nátrium-tripolifoszfát (STTP), nátrium-nitrilotriacetát (NTA), polikarboxilátok. Fehérítők: nátrium-perborát, nátrium-perkarbonát, tetraacetyl-etiéndiamin (TAED), nonánoil-fenol-szulfonát (NOBS) és más adalékanyagok: habzás-zabályozók, stabilizátorok, feldolgozási segédanyagok, optikai fehérítők, lerakódás elleni szerek, korrozó-inhibitorok, illatanyagok, színezékek. Töltőanyagként a poroknál nátrium-szulfátot, a folyékony mosószereknél vizet használnak. Ez a komplex közeg nagyon leszűkíti az alkalmazható enzimek körét.

Adalék:

A mosószer enzimek története egészen 1914-ig nyúlik vissza, amikor a két német tudós, a Röhm and Haas hasnyálmirigy proteázt és nátrium-karbonátot tartalmazó mosószert hozott forgalomba Burnus néven. Ez újítás volt, megelőzte a korát, de egyúttal több kezdeti problémába ütközött. Egyrészt a nyers fehérjebontó enzim preparátum sok szennyeződést tartalmazott, így gyakran beszennyezte a tisztítandó ruhákat. Másrészt, mivel csak egy tablettát kellett 10 liter vízbe adni, a háziasszonyok többszörösen túladagolták, mivel nem hitték el, hogy ennyi is elegendő a mosáshoz. Ehhez járult, hogy az enzim kinyerési technológia nem volt elég gazdaságos.

Az első bakteriális enzimet, alkálikus proteázt tartalmazó mosószert 1956-ban Alcalase kereskedelmi néven vezették be a piacra. Por formában a Novo hozott forgalomba enzimes mosóport BioTex márkaneven 1963-ban. Az iparág 1971-ben krízisen ment át. Az enzimes mosószer finom pora a levegőben szállva súlyos allergiás reakciókat váltott ki a nyálkahártyákon és a bőrfelületen. Át kellett alakítani a szer formulázását. Finom por helyett mikrokapszulázással, granulálással olyan szemcséket kellett kialakítani, nem szállnak a levegőben és a nem is aprózódnak a manipuláció során, ugyanakkor változatlanul könnyen és gyorsan oldódnak a mosólében.

Ma a mosószerekben sokféle enzim kombinációját használják (lipázok, cellulázok, amilázok), de a főkomponensek változatlanul a *Bacillus* törzsek által termelt szubtilizin típusú alkálikus proteázok.

6.6.1.2. Proteázok a bőrparban

A bőr kikészítése történhet kémiai úton, vegyszerekkel, de ezek az anyagok veszélyesek a dolgozókra és a környezetre nézve (nátrium-szulfid, nátrium hidroxid, krómvegyületek, stb.) Az enzimek alkalmazásával ezek az ártalmas vegyszerek nagyrészt kiválthatók, a technológia

„megszelídíthető”. A bőrfeldolgozás több lépésből áll, az egyes fázisokban más és más enzimek alkalmazhatók (4. táblázat). A sok részfolyamatban alkalmazott proteázok használatában az a kihívás, hogy maga a bőr is fehérje rostokból áll, amit meg kell őrizni, míg az egyéb fehérje anyagokat szelektíven el kell bontani.

4. táblázat Enzimek alkalmazása a bőrfeldolgozás egyes fázisaiban

A bőrfeldolgozás fázisai	résztevő enzim	funkció
tartósítás	nem enzimátikus	bőr és irha tartósítása
áztatás	lúgos/hasnyálmirigy proteáz	nem-fibrilláris fehérjék eltávolítása
szórtelenítés	lúgos/semleges proteáz	szórtelenítés
zsírtalanítás	lipázok és proteázok	zsírok eltávolítása
pácolás	tripszin és alkalikus proteáz	puha, rugalmas, hajlékony bőr
cserzés	nem enzimátikus, az előző kezelések hatnak	a cserzés minőségének javítása

Adalék: a középkorban is alkalmaztak proteolitikus enzimeket a bőrfeldolgozásban. Enzimforrásul emberi és kutya fekáliát használtak, mivel ezek az élőlények termelnek emésztőrendszerükben fehérjebontó enzimeket. Az ezzel foglalkozó műhelyeket (tímár, cserzővarga) a szag és a járványveszély miatt a település periferiájára „száműzték”. Mivel működésükhöz vízre is szükség volt, ez a helyszín rendszerint a település vízfolyásának legalsó pontja volt, ott, ahol a folyóvíz elhagyta a lakott területet. Így a középkori Budán a céh műhelyei az Ördögárok torkolati szakaszára, a mai Döbrentei tér környékére települtek.

A nyersbőrt nem használják fel azonnal a vágás helyszínén, a szállítás/tárolás során viszont sajátenzimes és mikrobiológiai romlás indul meg. Ezért az irhákat konzerválni szükséges. Ez történhet: ~sós vízbe merítéssel, ~hús-oldali sózással vagy ~száritással. Mindezek dehidratálják a bőrt, ezzel akadályozzák a biokémiai folyamatokat. Ebben a fázisban nincs szükség enzimekre, éppen a működésük meggátlása a cél.

A beérkező bőrt először egy áztató fürdőben újra hidratálják. Az áztatásnak több funkciója is van. A víz kioldja a sókat és a globulinokat. Eltávolítja a szennyezéseket, a mosóhatás fokozására lipázokat és/vagy detergenset is lehet adagolni. A víz hatására a kollagén rostok megduzzadnak, a szerkezet szivacsossá, azaz könnyebben hozzáférhetővé válik. A vízfelvétel proteázokkal fokozható, mivel ezek kioldják a köztes nem-rost fehérjéket, húsmaradékot, hámfehérjéket. E célra kettős enzimpreparátumot adagolnak: egyrészt alkálikus proteázokat (Alcalase, Promod 206P), másrészt tripszint, vagy hasonló proteázot, azonos mennyiségben. Az áztatást melegítés nélkül, 10-20°C-on végzik, alkálikus közegben, amit mésztej hozzáadásával állítanak be.

A klasszikus, vegyszeres szórtelenítésnél a bőrt erősen lúgos, 10-12% mésztejet, szerves szulfidokat vagy tioglikolsavat és aminosavat tartalmazó fürdőben áztatják. Ezek veszélyes anyagok és a keletkező szennyvíz ártalmatlanítása is komoly problémát jelent. Emiatt terjedtek el az enzimes kezelések. Az enzimekkel nem a szőr anyagát, a keratint bontják le, mert az a legtöbb proteáz számára nem bontható, a kompakt, spirális, rengeteg diszulfid híddal rögzített szerkezet miatt.

Adalék: A keratináz enzimek külön csoportot képeznek a proteázok között. A keratinázt termelő törzsek izolálásánál a szilárdított táptalajba apróra vágott madártollat főznek, így biztosítják ezt a speciális szénforrást a mikroorganizmusok számára.

Adalék: a hajsütés azon alapszik, hogy a haj keratinjában ezek a diszulfid hidak magas hőmérsékleten felnyílnak, majd lehűlve újra összekapcsolódnak

Az enzimek a keratin helyett a szórtüszőt támadják meg, a szőrszál gyökerének emésztésével a szőr meglazul és enyhe mechanikai hatásra lemosódik. Ebben a lépésben különböző eredetű alkálikus proteázokat használnak (Promod 206P, NUE = Novo Unhearing Enzyme). Durva szűrő állatok (pl. birka) esetén a kezelés hosszabb időt vesz igénybe. Ekkor a húsoldalt egy festékréteggel védik meg. A reakciót szobahőfokon, éjszakán át folytatják. Magasabb hőmérséklet vagy az enzim túladagolása a bőr szerkezetének roncsolódásával jár. Szerencsére a

bőr fibrilláris fehérjéi, a kollagén és az elasztin nehezebben bonthatók, mint az őket körülvevő egyéb proteinek. A kollagén láncok hármas spirálokat alkotnak, ami sztérikusan nehezíti az enzimek hozzáférését. Emellett az aminosav összetétel is különleges, sok prolint és hidroxiprolint tartalmaz, amihez kicsi a proteázok affinitása.

A bakteriális proteázok mellett itt szerepet kapnak a *Streptomyces* és *Aspergillus* fajok által termelt enzimek is, mivel ennél a technológiánál nincs szükség magas hőmérsékletre, sőt éppen hidegen is nagy aktivitású enzimekre van szükség. Elterjedt az *Aspergillus flavus* proteáza Clarizyme márkanéven.

A zsírtalanítás fázisa nem mindig különül el a technológiában. A zsíros anyagok eltávolítása szükséges a vegyi anyagok behatolásának elősegítéséhez, illetve a folyamat legvégén az egyenletes festéshez. A zsiradék eltávolításába besegít az áztatásnál alkalmazott detergens, de a trigliceridektől enzimes bontással is megszabadulhatunk. Ha a proteázokkal együtt alkalmazzuk, akkor azonos pH optimumú enzimeket kell keresni. Hiába jó hatású pl. a birkabőr zsírtalanítására a *Rhizopus* lipáz, ez savas közegben működik jól, ehhez be kell iktatni a technológiába egy külön savas enzimes áztatást. Az *Aspergillus niger* enzime, illetve a bakteriális lipázok viszont lúgos közegben hatékonyak, ezeket lehet a proteázokkal együtt, egy áztató fürdőben alkalmazni. A mésztejes oldatban az alkalikus proteázok és lipázok együttes alkalmazásának (NovoLime® = proteáz/lipáz keverék) több előnye is lehet. A proteázok felnyitják a zsírsejteket, így a zsírok hozzáférhetővé válnak a lipázok számára. Továbbá a zsírok hidrolízisével (= elszappanosításával) létrejövő szappanok emulgeálják a zsíros anyagokat, így helyettesítik a detergenset.

A cserzés már nem enzimes folyamat, de a megelőző enzimes kezelések határozzák meg, hogy a cserzőanyagok mennyire tudnak behatolni a rostokba, milyen minőségű lesz a kikészített bőr. A cserzőanyagok keresztkötéseket hoznak létre a kollagén láncok között, ezáltal stabilizálják a bőr szerkezetét, ellenállóvá teszik a bakteriális, enzimes, illetve savas bomlással szemben.

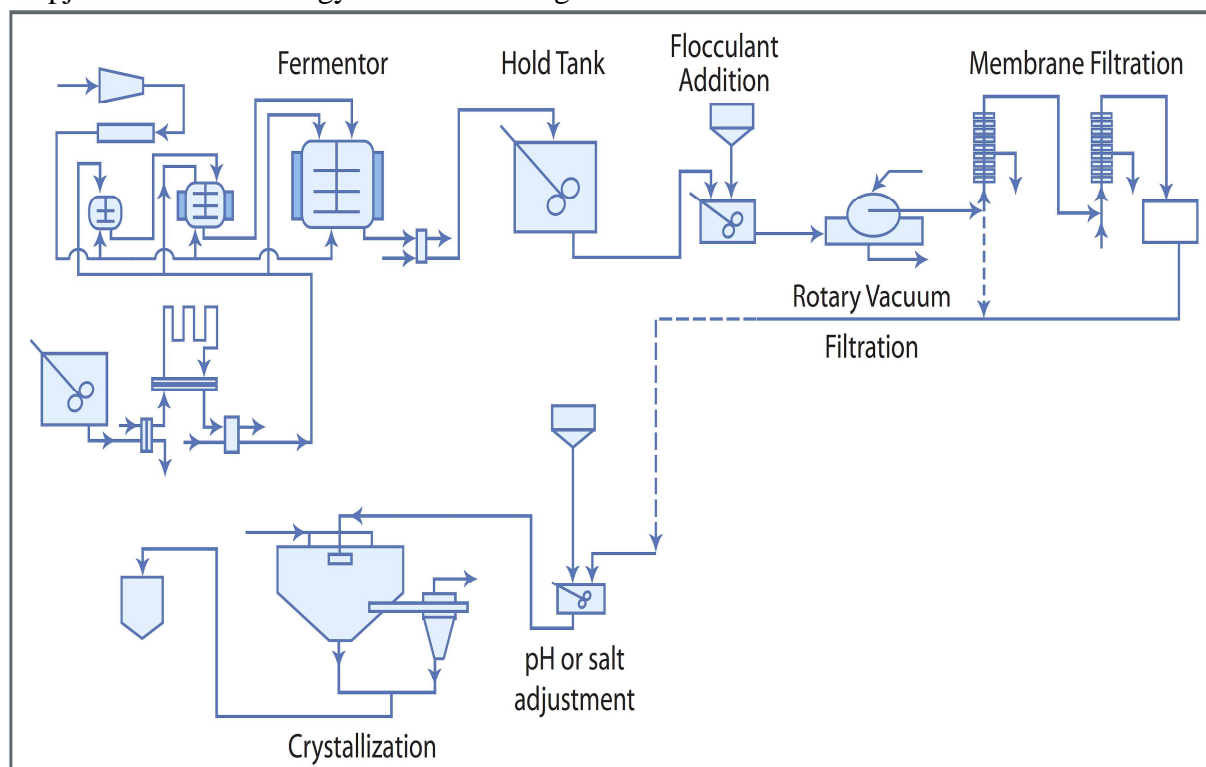
6.6.1.3. Alkalikus proteázok előállítása: fermentáció

Az alkalikus proteázokat nagyrészt *Bacillus* törzsekkel állítják elő, jellemzően fed batch (rátáplálásos) fermentációval. (Spórázó törzseknél a folytonos fermentációt nehéz jól termelő munkaponton a poszt-exponenciális fázisban stabilizálni.) Szénforrásként könnyen metabolizálható cukrokat alkalmaznak, a többszöri rátáplálást indokolja a katabolit represszió veszélye. Nitrogénforrásként szerves anyagokat (szójadara, kukoricalekvár, részlegesen hidrolizált fehérje tartalmú melléktermékek) adagolnak. A szubsztrát ez esetben is indukálja a hasznosító enzim, a proteázok termelését. Az ammónium- és a szabad aminosav tartalmat célszerű alacsony tartani, mivel ezek jelenléte feleslegessé teszi a fehérje szubsztrátok hidrolízisét, ezért a proteáz termelés csökken. Az olcsóbb szerves nitrogén források közül ammónium nitrátot adhatunk, de azt is inkább csak kiegészítésként. A tenyészet oxigénigénye nagy, a folyamat érzékeny az oxigén limitációra. A fermentáció során végig intenzív levegőztetésre van szükség.

6.6.1.4. Alkalikus proteázok előállítása: Feldolgozás

A termék izolálásának első lépése a sejtek elválasztása. Mivel a termelő baktérium sejtek kicsik, a fermentlé előkezelés nélkül nem szűrhető. A lé savanyításával és/vagy flokkuláló anyagok hozzáadásával könnyíthető meg a szűrés, illetve a szűrés helyett centrifugálást lehet alkalmazni. A nagy térfogatú, viszonylag híg sejtmentesített enzimmoldatot ultraszűréssel lehet betöményíteni. Az enzimefehérjét az oldatból kicsapják. Ez egyaránt történhet kisózással és oldószeres kicsapással. A kisózásnál az szokásos ammónium szulfát helyett általában nátrium szulfátot használnak, mert ez esetben lúgos közegben kell dolgozni, és ekkor az ammónium

sókból ammónia szabadul fel. Az oldószeres kicsapásnál két-háromszoros térfogatú acetonnal csapják ki az enzimet. Egy általános feldolgozási sémát mutat be a 17. ábra.



17. ábra Proteázok általános gyártási sémája

6.6.2. Neutrális proteázok

A sejtek nagy többsége számára a „fiziológiás”, semleges közeli pH az optimális, enzimeik is ehhez adaptálódtak az evolúció során. Így sok faj rengeteg neutrális proteázát izolálták már, de gyakorlati jelentőségük mégis kisebb, mert kevésbé tűrik a szélsőséges körülményeket (hőmérséklet, pH), így alkalmazási területük is szűkebb. Jól termelő törzsek minden nagy rendszertani egységben előfordulnak, általánosan használatosak a

- *Bacillus subtilis*
- *Streptomyces. griseus*
- *Aspergillus oryzae*

enzimei. Működésükhöz gyakran igényelnek kationokat, pl. a CaCl_2 , NaCl növelheti a stabilitásukat.

6.6.2.1. Proteázok a sütőiparban

A búzaliszt egyedülálló tulajdonsága, hogy sikértartalma vízzel összedolgozva egy viszkózus szerkezetet hoz létre. Ez a glutén mátrix visszatartja a kelesztés során keletkező gázt a tésztában, és egy buborékokkal lazított szerkezet jön létre. A laza, rugalmas szerkezet hőkezelés (sütés) után is megmarad. A búzaliszt előnyös sütőipari tulajdonságai a fehérjéknek köszönhetők, így a fehérjék minősége és a mennyisége meghatározza a búzaliszt minőségét. Fehérjebontó enzimek adagolása megváltoztatja a tészta szerkezetét és ezzel a sütési tulajdonságokat is.

A kelesztett péksüteményeknél előfordulhat, hogy a túl sűrű fehérjeszerkezet nem engedi kellően kitágulni a pékárut, az túlságosan tömött és kicsi marad. Kis mennyiségű specifikus proteáz (jellemzően fonalas gomba eredetű - pl. *Aspergillus oryzae* - proteáz) képes úgy lazítani a sikért, hogy jobb lesz a tészta nyújthatósága, gyorsabban kel és ezáltal a végtermék

állaga és mérete is jobb lesz. Hasonló hatás érhető el kémiai szerekkel, például L-ciszteinnel vagy nátrium-metabiszulfittal is. Ezek a redukáló szerek a fehérjeláncok közti diszulfid hidak felbontásával csökkentik a térhálósítás mértékét. Ezek az idegen anyagok viszont benne maradnak termékben és fel kell tüntetni az áru csomagolásán, ezért szívesebben választják az enzimes kezelést.

A kelesztés nélkül készült termékeknél, mint a kekszek, ostyák, ropi, stb. a viszkoelasztikus tulajdonság nem előnyös, sőt szükségtelen. Ezeknél más a kívánalom, a puha, rugalmas, laza textúra helyett a kemény, törékeny, ropogós terméket keresik. A glutén térháló a rugalmasságot segíti elő, ennek hiányában kapunk merev, törékeny terméket. A szerkezetalkotó fehérjéket specifikus proteázok, jellemzően *Bacillus* proteázok alkalmazásával megbontani. Az enzimek alkalmazásával lehetőség nyílik arra, hogy a különböző fehérjetartalmú lisztek sütőipari tulajdonságait egységesítsék. Ez a cél ebben az esetben is elérhető enzimek helyett az előbb említett kémiai redukáló szerek adagolásával, de ezeket ritkán alkalmazzák. A peptidázok alkalmazása befolyásolhatja a kenyér ízét és a kéreg színét is. A peptidázok aminosavakat és oligopeptideket termelnek. Ezek, és az ezekből a hő hatására keletkező molekulák befolyásolják az ízelet. Aromás, édes és keserű anyagok, ízfokozók és potenciális oxidánsok jelenhetnek meg. A szabaddá váló amino-csoportok hő hatására reakcióba lépnek a cukrok aldehid csoportjával (Maillard-reakció), ami szintén szín- és ízanyagok kialakulását eredményezi. Ezek adják például a kenyérhéj jellegzetes ízét és barna színét.

6.6.2.2. Proteázok a húsfeldolgozásban

A főtt vagy sült húst akkor tekintjük megfelelő állagúnak, ha könnyen rágható, ugyanakkor megtartja rugalmas, rostos textúráját. Ezek az érzékszervi tulajdonságok nehezen kvantifikálhatók és nagyon sok tényezőtől függenek. A nyers hús állaga a vágás után több lépésben változik. Az izmokban előbb beáll a hullamerevség, majd ez fokozatosan felenged, ahogy a bomlási folyamatok előre haladnak. A szerkezet fellazulásában endogén proteázok, elsősorban a katepszinek játszanak szerepet. A hús természetes érése lassú folyamat, hűtőházi körülmények között (+1-4 °C) legalább 10 napot igényel, de akár 3-4 hétig is tarthat. Ez az érlelési folyamat igen jó állagú húst eredményez, de közben a vízvesztés elérheti a 7%-ot is, és a hús ettől összezsugorodik. A folyamat felgyorsítására az élelmiszeriparban már fél évszázada alkalmaznak exogén proteázokat. Túlnyomórészt növényi enzimeket használnak (bromelint, papaint, ficint), de szeletelt húsoknál bakteriális eredetű proteázokat is alkalmaznak. A fő probléma az enzim bejuttatása a hús belsejébe. Ha csak ráfröcskölük az enzimoldatot vagy beáztatjuk a húst, a puhító hatás nem lesz egyenletes, a belső részek keményebbek maradnak. Hatékonyabb megoldás az oldat beinjekciózása. A kémiai reakciók termodinamikájának megfelelően az enzimes folyamat sebessége a hőmérséklet emelésével exponenciálisan növekszik. Ebből az következik, hogy a puhítás túlnyomó részben a hőkezelés (főzés, sütés) során megy végbe, nem a hűtve tárolás közben.

6.6.3. Savas proteázok

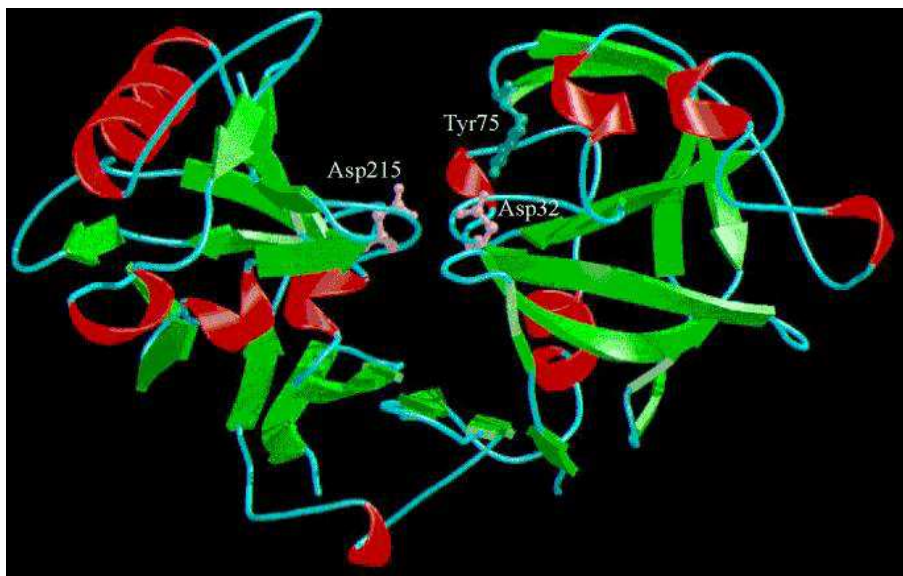
A savas proteázokat régebben egyértelműen az aszparaginsav proteázokkal azonosították, de manapság már ide sorolják a később besorolt glutaminsav proteázokat is. Az Asp proteázokon belül két alaptípus különíthető el:

- Pepszin típusú enzimek ($\text{pH}_{\text{opt}} = 2-4$), elsősorban *Aspergillus*ok termelik
- Rennin típusú enzimek: ($\text{pH}_{\text{opt}} = 5-7$), főleg *Mucor* törzsek termelik

A savas proteázokat több területen is felhasználják:

- Emésztést elősegítő preparátumokban (a gyomorban a pepszin hatás kiegészítésére, pótlására)
- Szója szósz előállítására, a szójafehérjék irányított hidrolízisére

- Tej alvasztására. Ez a sajtgyártás kritikus lépése, a tej kolloid szerkezetének megbonthatása, aminek hatására a tej két fázisra, túróra és savóra válik szét.



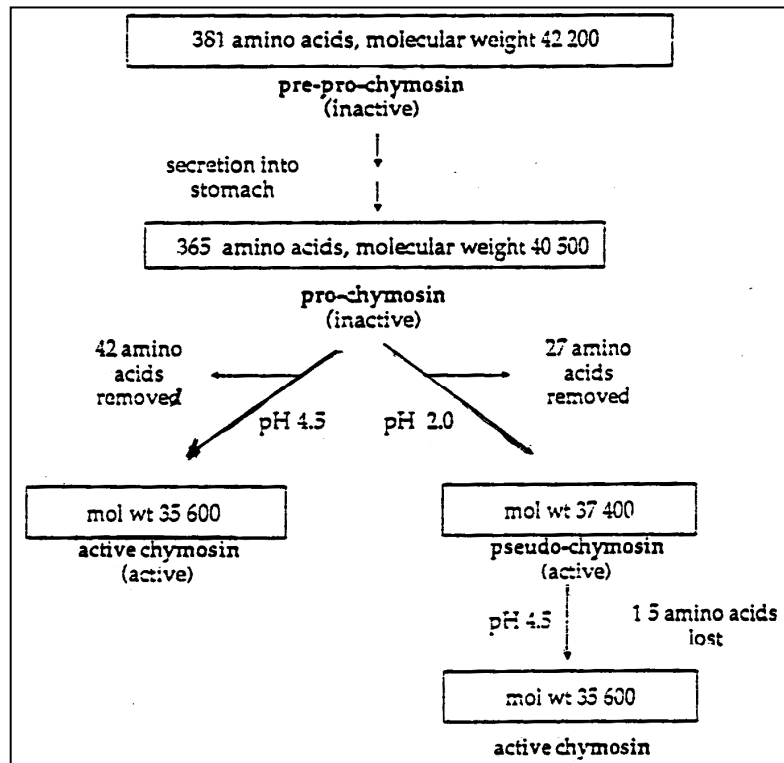
18. ábra Kimozin A, két Asp az aktív centrumban

Ez utóbbi enzimet állítják elő nagyipari méretekben, ezzel foglalkozunk részletesebben. Az enzimnek több neve is van, magyarosan oltóenzimnek, latinosan chymosinnak nevezik, ennek magyaros átírása a kimozin. A szakirodalomban elterjedt a rennin és a rennet név is.

Adalék: az oltóenzim név onnan ered, hogy ezzel „oltják be” a tejet, hogy megalvadjon a sajt készítésénél. Az enzim klasszikus forrása a 3-4 hetes borjú negyedik gyomra, amelynek az a funkciója, hogy a tejet a könnyebb emésztés érdekében megalvasztja. A pásztornépeknél, így Mongóliában ma is használják a félretett, zacskószerű gyomrot oly módon, hogy beletöltik a tejet, ami egy idő után a gyomorfal enzimentartalmának hatására megalvad és kiönthető a „reaktorból”. Hasonló enzim minden emlős újszülöttjének gyomrában megjelenik, így a csecsemőknél is.

Az enzimfehérje inaktív zimogén formában termelődik, ez a preprokimozin. A fehérjelánc 381 aminosavból áll, a molekulatömege 42200. Az első 16 aminosav a szignál peptid, a bioszintézisnél azonnal leválik, az így kapott prokimozin 365 aminosavból áll, móltömege 40500. A további aktiválás egy további peptid lehasadásával savas közegben autokatalitikusan megy végbe. Érdekes, hogy az átalakulás a közeg savasságától függően kétféle módon is bekövetkezhet. pH=2-nél egy kisebb, 27 aminosavból álló peptid válik le, így jön létre a pszeudokimozin, aminek már van katalitikus aktivitása. Ha viszont a közeg pH-ja csak ~4,5 körülire csökken, akkor egy nagyobb, 42 tagú fehérjerész hasad le, és létrejön a kész, aktív kimozin. A pszeudo-kimozin a savas közegben meglehetősen stabil, csak akkor alakul át a végső formába, ha a pH értéket megemeljük a 4,5 körüli szintre (19. ábra).

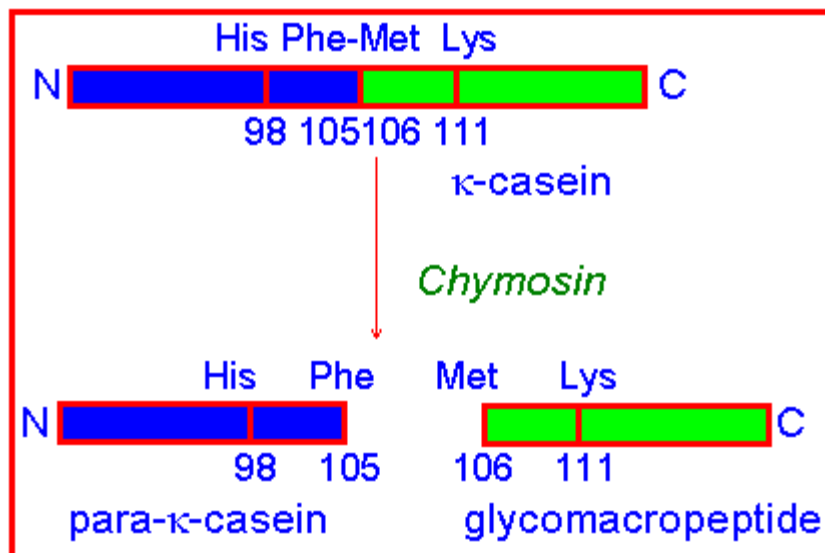
A szarvasmarha kimozinnak két izoformája van, ezek között csak egyetlen aminosavban van különbség: az A formában a 244 helyen aszparaginsav található, a B enzimnél glicin. Az egyes egyedekben a szerkezetet az allélek határozzák meg, az állatok ~40%-a A, ~60% pedig a B formát termeli.



19. ábra A kimozin aktiválódása különböző közegekben

A kimozin aktivitása:

A kimozin egy nagyon specifikus endopeptidáz. Hasítási helye kizárólag a fenilalanin-metionin közti peptidkötés. Szelektivitására jellemző, hogy a tejben található tucatszintű fehérje közül egyedül a κ -kazein a szubsztrátja, azon is csak egyetlen hasítási helyet talál. A hidrolízissel kettévágja a κ -kazeint és ezzel destabilizálja a tej micelláris szerkezetét. A hidrolízis-termékek a para- κ -kazein és a glikomakropeptid (20. ábra).

20. ábra A κ -kazein hidrolízise

Mintegy százötven évvel ezelőtt dolgozták ki a legelső ipari enzimgyártási technológiát. A vágóhídon összegyűjtött borjúgyomorból sóoldattal vonták ki a kimozint (Christian Hansen, 1874).

Állati oltóenzim kimozin és pepszin keveréke. A két enzim aránya elsősorban az állat életkorától függ, a kimozin tartalom a szopós borjúnál legmagasabb (mintegy 95%). A borjú gyomrának alacsony pepszin tartalma azzal magyarázható, hogy a pepszin képes a koloszt-rumban (föcstej) jelen lévő immunglobulinokat is elbontani, amelyek szükségesek az újszülött állat immunitásának kialakulásához.

A sajtgyárak egyre növekvő igényét ez a termék nem tudta fedezni, így sorozatos próbálkozások történtek az állati kimozin pótlására más enzimmel.

Előbb egy másik állati eredetű készítménnyel, a „csirke pepszinnek” nevezett emésztő enzimmel próbálkoztak. Ezt szintén vágóhídi melléktermékből vonták ki. A termék nem teljesen váltotta be a hozzá fűzött reményeket, hatása nem volt teljesen azonos az eredetivel, ráadásul az alapanyag mennyisége ebből is korlátozott volt, Izraelen és Csehországon kívül nem terjedt el.

Mások abból a megalapozott feltevésből indultak ki, hogy a legtöbb állati enzimmel azonos hatásút lehet találni a lényegesen változatosabb mikrobiális enzimek körében. Széleskörű screening programot indítottak analóg hatású enzimek felkutatására.

A hasonló tulajdonságú enzimeket a fonalas gombák körében találták meg. Ipari méretben is alkalmazott enzimtermelők a *Rhizomucor miehei* (régebben *Mucor miehei*), *Rhizomucor pusillus* (régebben *Mucor pusillus*), és a *Cryphonectria parasitica* (régebben *Endothia parasitica*), a magyar neve gesztenyepenesz. Ez utóbbit 1967-ben az USA-ban hozták forgalomba SUPRAREN néven.

Ezek az alvasztó enzim preparátumok is tartalmazznak a kimozinon kívül más fehérjebontó enzimeket. Ennek jellemzésére az MC/PA (vagy röviden C/P) arányt használják. Jelentése: milk clotting activity (tejalvasztó aktivitás)/proteinase activity (összes proteáz aktivitás). A sajtgyártás szempontjából a magas értékek a kedvezők, mert ha sok az egyéb proteáz, akkor azok a tejfehérjéket sok kis oldható peptiddé aprítják, amelyek a savóban oldódva elvesznek a sajt készítés számára, ráadásul keserű ízt okoznak. Az aktivitások aránya állandó enzimarány mellett is változik a pH-val. Alacsony pH értéknél a pepszin típusú savas proteázok aktivitása nagyobb, enyhén savas közegben pedig a kimoziné. A tej normális 6,5-es pH-ján mérve a rekombináns kimozinok C/P értéke a legnagyobb, a borjúgyomorból kivont preparátumé alacsonyabb, majd a mikroba eredetű (*R. miehei*, *R. pusillus* és a *C. parasitica*) enzimek tisztasága sorrendben egyre kisebb. A különböző eredetű enzimek tulajdonságait az 5. táblázat mutatja be.

5. táblázat A különböző eredetű enzimek tulajdonságainak összehasonlítása

enzim	forrás	MS, kDa	IEP	t _{opt} °C
Kimozin	borjú	35,7	4,98	40–44
Mucorpepszin	<i>R. miehei</i>	38	4,58	58–62
Mucorpepszin	<i>R. pusillus</i>	30–39	4,41	42–45
Endothiapepszin	<i>C. parasitica</i>	33,8	4,89	42

6.6.3.1. A kimozin heterológ termelése

A rekombináns fehérjék előállítására ma már számos genetikai transzformációs rendszert áll rendelkezésre, de kezdetben csak néhány gazdaszervezetből lehetett választani. A sokféle lehetséges gazda közül az élelmiszeripari enzimek termelésében még mindig két törzs dominál, az *Aspergillus niger* és a *Kluyveromyces lactis*. Mindkét törzset több évtizeden keresztül biztonságosan használták az élelmiszeriparban, és mind a sejtek, mind az ezekből származó enzimek elnyerték a GRAS (Generally Recognised As Safe = általánosan biztonságosnak elismert) FDA státuszt.

A kimozin előállítását elsőként a Pfizer Inc engedélyeztette *E. coli* gazdaszervezettel 1988-ban. Később mindkét említett eukariótával is megoldották a gyártást.

Az enzimek fermentációs gyártásánál leggyakrabban a fonalas gombákat használják, mert ezek vad törzsként is nagy mennyiségű fehérjét választanak ki a fermentálébe. Így a feldolgozási lépéssor viszonylag egyszerű, nagyok a hozamok és alacsonyak a költségek. Ugyanakkor a penész alapú gyártásnak megvannak a maga hátrányai a bakteriális fermentációkkal összehasonlítva. A fermentációs idő hosszabb, 4-6 nap, ez növeli az energiaköltségeket, rontja a fermentorok kapacitásának kihasználtságát. Emellett nagyobb a fertőzés kockázata, a fonalas tenyészetnél morfológiai és reológiai problémák léphetnek fel, ami megnehezíti a méretezést, a léptéknövelést és a reprodukálhatóságot.

Baktériumok fő előnye a gombákhoz képest a viszonylag egyszerű tápoldat és a gyors növekedés. Sokszor elegendő egy kémiai meghatározott (chemically defined), ásványi sókból álló tápoldat, amelyen jobb a tenyésztés reprodukálhatósága, mert az eredmény nem függ a fonalas gombáknál használatos komplex tápanyagok (szója- vagy élesztő kivonat) változékonyságától. Egy bakteriális fermentáció ideje alig fele a penészgomba alapú technológiák szokásos időtartamának, ami jelentős költség megtakarítást jelent. Másrészt a legtöbb baktérium nem képes a célfehérjék kiválasztására, azok a sejten belül, intracellulárisan halmozódnak fel, ami megnehezíti a termék kinyerését és tisztítását, ezzel rontja a kizozatalt és az egész technológia gazdaságosságát. Ezen kívül az intracelluláris fehérjék izolálása során nagy mennyiségű vegyi anyagot használnak fel, ami hulladékként jelentősen terheli környezetet.

A mikroorganizmusok között akadnak olyan gazdaszervezetek, amelyek egyesítik magukban a bemutatott két csoport előnyös tulajdonságait. A *Kluyveromyces lactis* és egyes *Bacillus* expressziós rendszerek egyrészt gyorsan szaporodnak, másrészt nagy mennyiségű terméket hoznak létre extracellulárisan.

A megfelelő host kiválasztását legtöbbször nem lehet előre, elméleti alapon elvégezni. Sokszor több különböző törzsből is kifejeztetik a célfehérjét és ezek tesztelése alapján hozzák meg a végső döntést. A biológiai és technikai szempontokon túl szerepet játszik még a gazdaszervezet ismertsége, a korábbi genetikai manipulációk során szerzett tapasztalat és a technológiai ismeretek. Ezek birtokában jelentősen lerövidíthető a fejlesztés ideje, hamarabb lehet a piacon megjelenni a termékkel, ami jelentősen befolyásolja az új technológia profitabilitását

Kimozin termelés penészgombákkal

Több gyártó is van a piacon: Christian Hansen (DK) CHY-MAX néven, Genencor (USA) CHYMOGEN néven forgalmaz kimozint. A génmanipulált *A. niger* var. *awamori*-ra épülő technológia az általános, soklépcsős oltótenyésztés nevelés helyett egyetlen inokulum fermentációs lépést alkalmaz, ezt a fermentort vegetatív tenyésztés helyett spórákkal oltják be.

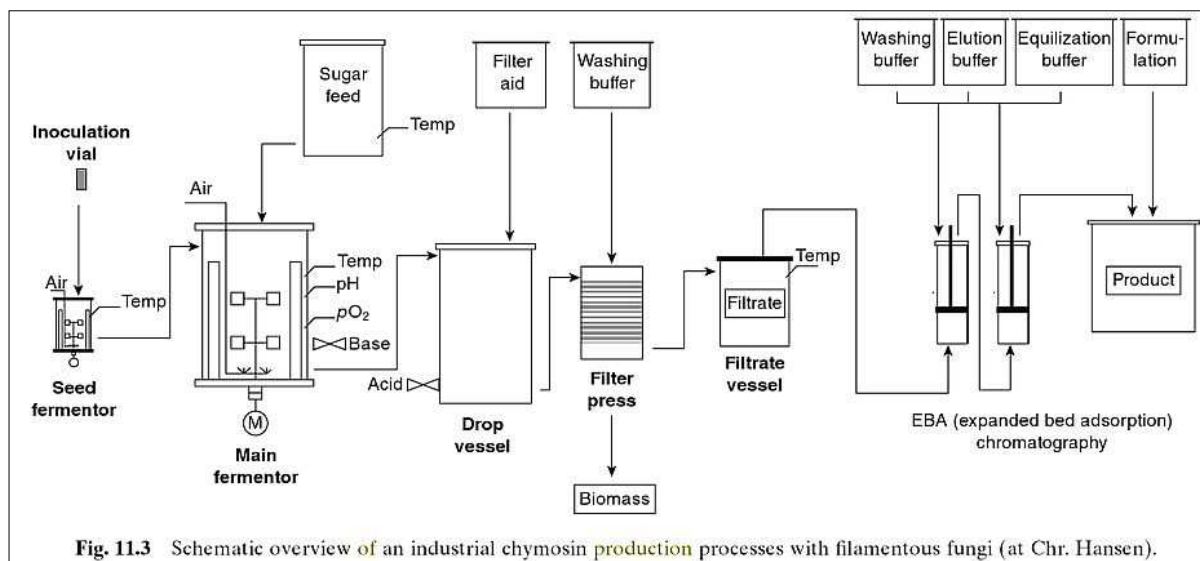


Fig. 11.3 Schematic overview of an industrial chymosin production processes with filamentous fungi (at Chr. Hansen).

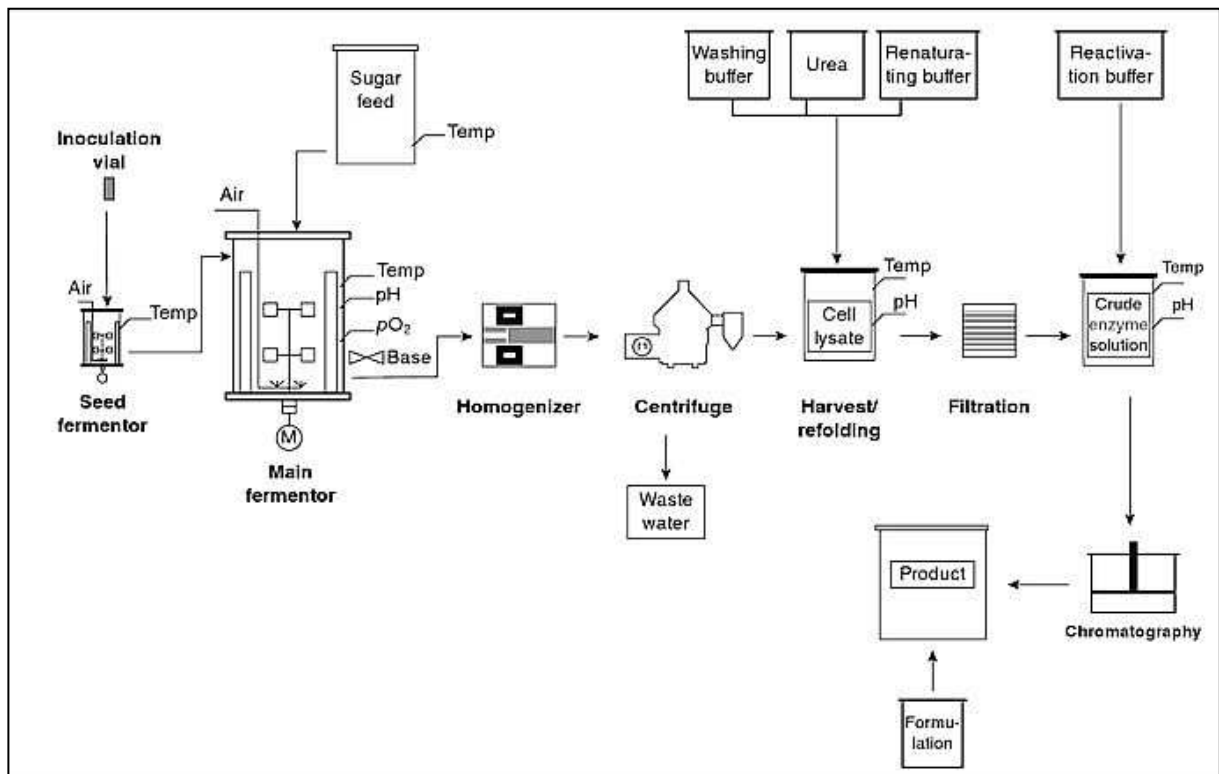
21. ábra Kimozin gyártás technológiája fonalas gombával

Az oltótenyészet a főfermentációnak kb. tíz százaléka, azaz több tíz köbméteres. Feladata nem a termékképzés, hanem nagy mennyiségű gyorsan szaporodó sejtömeg előállítása. A termelő fermentációt tízszeres térfogatú, azaz akár több száz köbméteres, keverős, levegőztetett készülékben végzik. A folyamatot komplex tápoldatban, rátáplálással hajtják végre. Szénforrásként könnyen metabolizálható cukrokat (melasz, maltóz, maltodextrin vagy glükóz) adagolnak. A maltóznak vagy a maltodextrinnek akkor van jelentősége, ha a kimozin gén elé a glükóamiláz maltózzal indukálható promóterét építik be. Az enzim extracellulárisan termelődik. Általában egy hetes fermentáció után az enzimkoncentráció már nem növekszik tovább, sor kerül a fermentáció vágására és elkezdődik a feldolgozás (termékizolálás) lépésora. Az első lépés a sejtömeg elválasztása. Fonalas gombák esetében ez szűrővásznon, például vákuum dobszűrőn történhet. A további lépések az enzim végtermék kívánt tisztaságától függenek. Ha nem zavaróak az egyéb fehérjék, akkor további elválasztás helyett egyszerűen porlasztva szárítással eltávolítják a vizet a rendszerből. Más technológiában az enzimoldatot ultraszűrővel töményítik, és egyúttal eltávolítják a kis molekulájú szennyezéseket is. Ha tisztább preparátumra van szükség, akkor kromatográfiával (Christian Hansen, DK) vagy adszorpcióval választják el az enzimet a szennyezésektől. A tisztított fehérjét adalékanyagokkal formulázzák, ezzel tartósítják (prolonged shelf life), szilárd preparátum esetében oldódását gyorsítják, stb (21. ábra).

Kimozin termelés baktériummal (*E. coli*-val)

Az *E. coli* a legjobban tanulmányozott gazdaszervezet, már számtalan genetikai manipulációt hajtottak végre rajta. Nem véletlen, hogy ez volt az első kimozin termelő gazdaszervezet, a Pfizer Inc engedélyeztette 1988-ban, és ez volt a legelső genetikai manipulációval előállított élelmiszeripari enzim a piacon. Hátránya viszont, hogy a kimozint intracellulárisan termeli. A manipulációs eljárás azóta klasszikussá vált: az *E. coli* K-12 törzsbe transzfektálták a prokimozin gént a pBR322 plazmid vektorral, a kifejeződést a *trp* promóterrel szabályozták. A Pfizer később az egész üzletágot továbbadta a Christian Hansen, (DK) cégnek.

A folyamat jelentősen különbözik az *A. niger*-rel kidolgozottól. Speciális rátáplálási



22. ábra Kimozin gyártás technológiája *E. coli*-val

stratégiával állandó szénforrás limitben tartják a tenyészetet, ugyanakkor nagy sejt- és enzim-koncentrációt tartanak fenn, miközben lefékezik az anyagcserét és megakadályozzák az ecetsav felhalmozódását. Az *E. coli* ugyanis korlátozatlan növekedésben ecetsavat termel, ami nagyobb koncentrációban toxikussá válik és akadályozza a növekedést valamint a termékképződést. A *coli* sejtekben a kimozin oldhatatlan zárványtestek (inclusion bodies, IB) formájában halmozódik fel. Ezek feloldására, foldingjára, az aktív szerkezet kialakítására speciális műveletsort kellett kidolgozni. Előbb az elkülönített sejteket nagynyomású homogenizátorral feltárlják, és az IB szemcséket centrifugálással leválasztják, majd pH=2 pufferrel mossák. Az oldást kaotróp oldószerekben (7-9 M karbamid) lúgos közegben lehet megoldani. Az így kapott oldatban a fehérje még nem aktív, a megfelelő harmadlagos szerkezet erős hígításban lassan, spontán alakul ki az ún. folding pufferben, amely ásványi sókat és kis molekulájú anyagokat, pl. arginint tartalmaz. Ezután az aktív enzimet a szokásos fehérjetisztítási módszerekkel, például anioncsere-kromatográfiával tisztítják (22. ábra).

Kimozin termelés élesztővel (*Kluyveromyces lactis*-szal)

A *K. lactis*-t a Dutch States Mines (DSM, NL) alkalmazta gazdaszervezetként a kimozin gyártására (MAXIREN néven, 1990). Ezt a jól ismert élesztőtörzset már az ötvenes évek óta használták a laktáz fermentációs előállítására, amit az élelmiszeriparban a tejcukor bontására alkalmaztak (Gist-Brocades, NL).

Az expresszióhoz a bovin kimozin gén elé az erős *lac4*-promotert építették be és az enzim sejtől való kilépését a jól ismert élesztő α -faktor leader szekvencia hozzácsatolásával segítették elő. Az első fejlesztéseknél az expressziós kazettát plazmiddal fejeztették ki (pUC19 élesztő plazmid), de később a gént a kromoszomális DNS-be építették be.

A fermentáció során az *E. coli*-hoz hasonlóan a tápanyag speciális összetételével és adagolási stratégiájával nagy sejtsűrűséget állítottak be, miközben a keletkező etanol koncentrációját alacsonyan tartották. A technológiák sikeresen léptéknövelték 100 m³ fölé is. Az extracelluláris enzim tisztítása a penész eredetű enzimhez hasonló lépéssorral történik. Mivel a törzs kevés egyéb extracelluláris fehérjét termel, a kimozint könnyű izolálni. Az előírások szerint a termék nem tartalmazhat élő sejteket ezért a levet benzooesavval kezelik, és alacsony pH-n szűrik. Eközben a sav hatására a prokimozin \rightarrow kimozin átalakulás is végbemegy. A termék (MAXIREN^R) tartósítását benzooesavval vagy NaCl-dal oldják meg.

A rekombináns terméknek több előnye is van az eredeti, borjúgyomor kimozinnal szemben:

- tisztább, mint a borjú rennin, mert nem tartalmaz kísérő enzimeket (pepsint és egyebeket)
- kémiaileg és biológiailag teljesen azonos a borjú enzimmal
- termelése olcsóbb
- állandó tisztaságú, mentes állati szervmaradványoktól (pl. nincs BSE veszély)
- korlátlanul termelhető

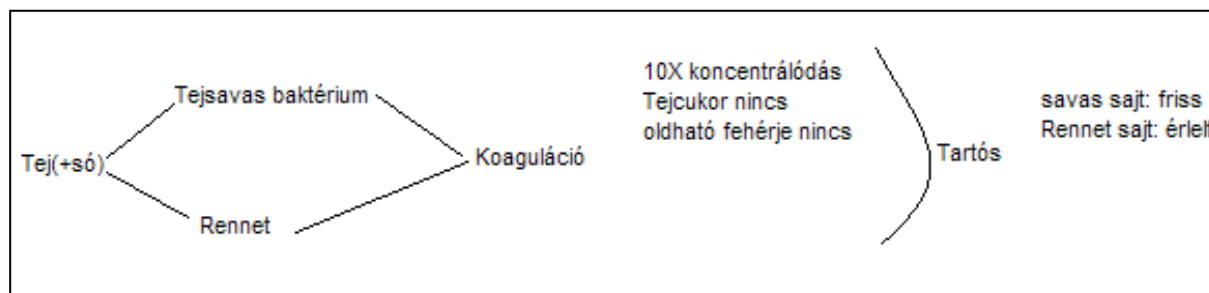
Az ipari termelés Franciaországban, Seclinben indult meg, hosszú és bonyolult engedélyeztetési eljárás után. Az üzem engedélyt kapott rekombináns mikroba tenyésztésére és megszerezte az ISO 9002 bizonyítványt is. Magát a terméket pedig – mivel már nem állati eredetű – elfogadták a vegetariánusok is, és a kóser és halál vallási szabályok szerint is megfelelőnek minősítették. Az engedélyeztetés során meg kellett vizsgálni a

- rekombináns törzs DNS stabilitását,
- esetleges patogenitását,
- a termék mutagenitását,
- toxicitását,
- allergenitását.

Ezután sajtgyártási tesztek és organoleptikus vizsgálatokat is végeztek, és akkor fogadták el, amikor a francia sajtínyencek sem tudták megkülönböztetni a termékeket.

6.6.3.2. A kimozin szerepe a sajtgyártásban

A sajtgyártás kulcslépése a tej megalvasztása. A tej kolloidális szerkezete átalakul, a micellák elveszítik stabilitásukat és a tej szétválik egy fehérje alapú géltre és a homogén savó folyadékra. A kivált gél szerkezetét mechanikai hatásokkal (keverés, aprítás, préselés) megbontják, így kivonják a benne visszatartott savó nagy részét. A folyadék eltávolítását melegítéssel és sózással is elősegítik.



23. ábra A tej alvasztásának lehetőségei

A tejfehérjék kicsapása más módon is megvalósítható. A kazeinok izoelektromos pontja 4,5 körül van. Ha a pH-t erre az értékre csökkentjük, a fehérjék kicsapódnak. A mechanizmus eltérő, ez esetben nem történik kémiai bontás a fehérjeláncban, csak a disszociáció mértéke változik. A savas tejalvasztást is nagyon régóta használják a háziiparban és a nagyiparban egyaránt. A savat a tejben elszaporított tejsavbaktériumokkal állítják elő, amelyek egyrészt kellemes ízanyagokat termelnek, másrészt a pH biztosan nem csökken 4,5 alá, mert ekkor a baktériumok működése is leáll. A savas és enzim alvasztást párhuzamosan, sőt sokszor kombinálva alkalmazzák a különböző termékek készítésénél. Nem szigorú szabály, de általában a friss sajtoknál a savas, érlelt sajtoknál az enzim technológiát használják (23. ábra).

Adalék: Magyarországon is elterjedt növény a tejoltó galaj. Nevét onnan kapta, hogy főzete a tejfehérjéket ugyanúgy kicsapja, mint a tejsav vagy a kimozin. A középkorban is használták sajt készítésre, sárga színanyaga a sajtokat is megfestette.

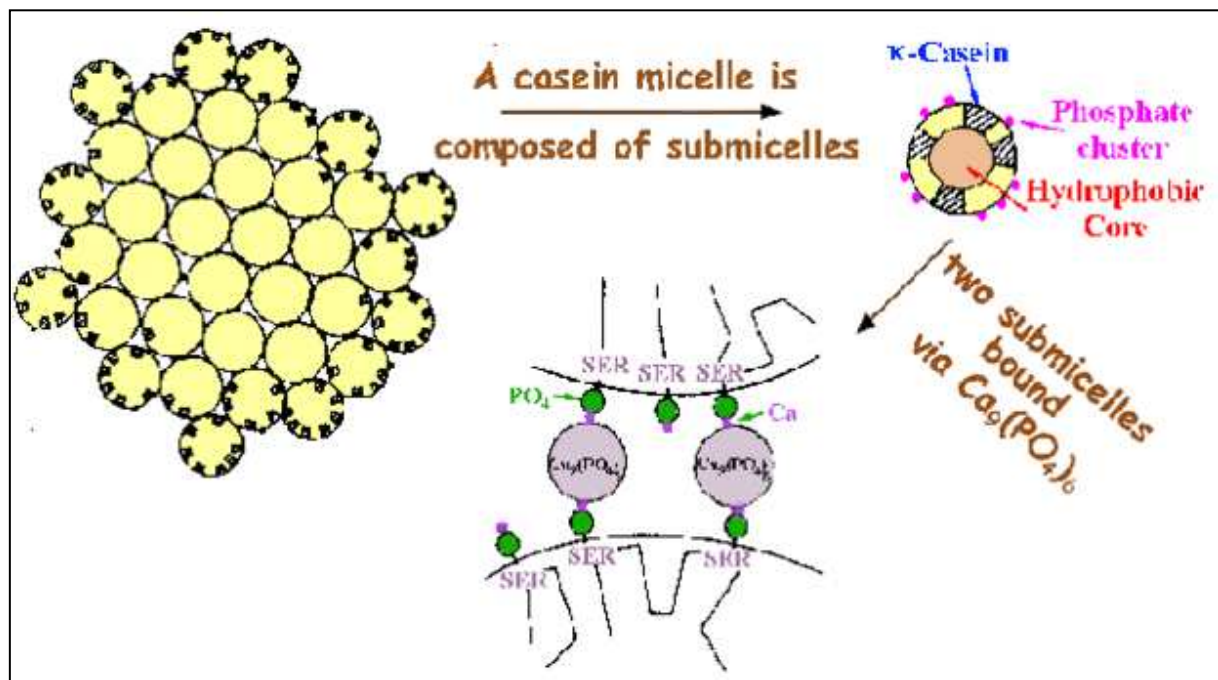
A fehérje csapadék a túró, illetve ebből préseléssel, sózással, érleléssel, esetleg további mikroba elszaporításával készítenek nagyon sokféle sajtot.

6. táblázat A tehéntej fő fehérje frakciói

Fehérje	%	Foszfát csoportok molekulánként
Kazein		
alfa s1-kazein	32	8
alfa s2-kazein	8	10-13
béta-kazein	32	5
kappa-kazein	8	1-2
	80	
Savó fehérjék		
béta-laktoglobulin	12	0
béta laktalbumin	4	0
immunglobulin	3	0
szérum albumin	1	0
	20	

A tehéntej fehérjetartalma összesen kb. 8%. Ennek mintegy 80 %-a kazein, ami négy fő frakcióból áll: α 1-, α 2-, β - és κ -kazein. A kazeinek hidrofób jellegű fehérjék, mindegyik tartalmaz foszforsav csoportokat. A fehérjék további 20%-a vízoldható savófehérje 6. táblázat.

A kazeinek apoláris jellegük miatt a vizes közegben csak kolloid formában oldódnak, micellákat alkotnak. A micellák további szubmicellákból állnak. Ezek felületén található az amfifil jellegű κ -kazein molekula, amely poláris aminosav oldalláncaival fordul a vizes fázis felé. A felületen lévő szerin aminosavak OH csoportjai kölcsönhatásba lépnek a $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$ komplexekkel, amelyek hídként összekapcsolják a szubmicellákat (24. ábra).



24. ábra A tej micelláris szerkezete

Ez a szerkezet meglehetősen stabil, hiszen a tej felforralása sem bontja meg a kolloidot.

Amikor a kimozin elhidrolizálja a κ -kazein 105-106 helyén található fenilalanin-metionin közti peptidkötést, destabilizálja az egész micella rendszert. A micellában található fehérjék kicsapódnak. A hidrolízis és a csapadékképzés két külön folyamat, a környezeti tényezők eltérő módon hatnak rájuk. A kalcium ionok elősegítik a kazeinek aggregálódását, de magát az enzimes reakciót nem befolyásolják. Ugyanez a helyzet a hőmérséklettel is. A 25-35 fokban a reakciósebesség csak kis mértékben gyorsul, ugyanakkor a fehérjék kiválása sokkal intenzívebbé válik. Az enzimaktivitás érzékeny a pH-ra, a tej normális, 6,5-es pH-ján nagy, savas irányba mozdítva jelentősen csökken, a 4,5-es érték már az enzim izoelektromos pontja, ahol az aktivitás minimális.

A kapott két fázis összetétele a következőképpen alakul: a túró tartalmazza az eredetileg 8%-nyi fehérje túlnyomó részét, kb. 7 százalékot, a zsírokat, és a Ca-foszfátot. A savóba kerül a tejcukor teljes egészében (5,5-7,5%), a maradék ~1% fehérje, valamint az ásványi sók.

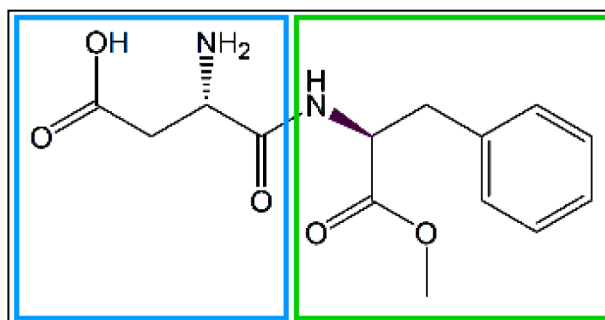
Adalék: a savóból a maradék egy százaléknál több fehérjét forralással ki lehet csapni. Egyes országokban ebből is készítenek sajtot. Az olasz ricotta sajt neve is erre utal: re+cotta = újra + főzés. A friss sajtok gyakorlatilag azonnal fogyaszthatók, az érlelt sajtok csak hosszabb (4 hét-2 év) érlelés után. Ennek során csökken a víztartalom és kémiai, biokémiai, mikrobiológiai változások mennek végbe. A fehérje bomlás folyamatos, szabad aminosavak, biogén aminok, ammónia is keletkezik. Számos sajtajtást starter tenyészetekkel oltanak be az érlelés elősegítése érdekében (camembert, rokfort, brie, kéksajt, stb.).

6.6.4. Fémproteázok

A termolizín egy hőstabil fémproteáz, amit eredetileg a *Bacillus thermoproteolyticus* törzs termelt. Az enzim kofaktora Zn^{2+} ion, a stabilitását 4 Ca^{2+} biztosítja. Az ipari felhasználásra gyártott proteázok között ennek a legnagyobb hőstabilitása. A termolizín és hasonló mikrobiális enzimek azért kapták a fémproteáz besorolást, mert katalitikus aktivitásukhoz egy fémionra, általában Zn^{2+} ionra van szükség. Korábban ezeket a semleges proteázok közé sorolták, mert a pH optimumuk 7 körül van. További közös tulajdonságuk a hasonló szubsztrát specifitás, a legnagyobb sebességgel a hidrofób és terjedelmes oldalláncú aminosavak (Leu, Phe) amino csoportjánál elhelyezkedő peptidkötéseket hidrolizálják.

Bár a metalloproteázokat nem csak a laboratóriumi felhasználásra, hanem ipari léptékben is gyártják, a piac kicsi, mert a hidrolízis specifitása szűkebb a többi proteázhoz (szerin proteázok, cisztein proteázok) viszonyítva. Használatuk akkor indokolt, ha más enzimek nem képesek a hidrolízisre. Ilyen nehezen bontható anyag például az árpa fehérje, amely egy specifikus szerin proteáz inhibitorot tartalmaz.

A termolizín legnagyobb felhasználója az aszpartám gyártás. Az aszpartám (L- α -aszpartil-L-fenil-alanin-metilészter, APM) egy mesterséges édesítőszer, amely mintegy kétszázszor édesebb, mint a szacharóz. Kémiaileg egy dipeptid származék (25. ábra).



25. ábra Az aszpartám szerkezete

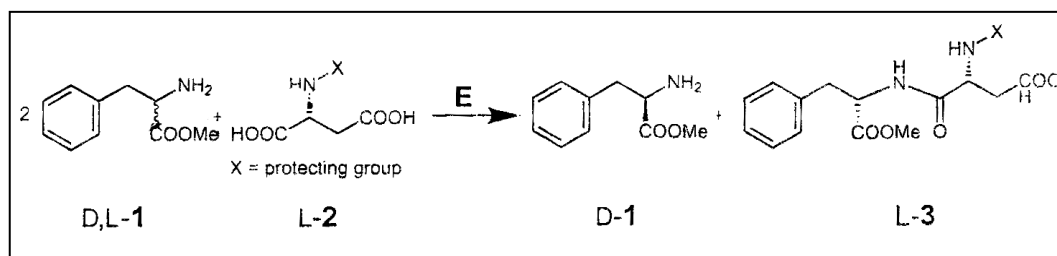
Adalék: Az aszpartámot a Searle cég vegyésze, G.D. Schlatter véletlenül fedezte fel 1965-ben, miközben egy tetrapeptid szintézisén dolgozott. A Searle cég sok nehézség árán engedélyeztette és piacra vitte az aszpartámot. 1985-ben a Monsanto felvásárolta az egész céget és NutraSweet Company néven működtette tovább. Közben megjelentek a versenytársak, az alapanyag aminosavakat termelő Ajinomoto, és a holland-japán közös vállalat a Holland Sweetener Company (HSC). 2000-ben az Ajinomoto átvette a terméket a Monsanto-tól, és ezzel a világpiac 40%-t látja el. A HSC 2006-ban beszüntette a gyártást, mert nem bírta a piaci versenyt. Ennek oka elsősorban a kínai gyártók megjelenése volt.

A gyártás egy lépéses enzim biokonverzió, így az enzim és használatának költsége kulcsfontosságú gazdaságossági kérdés. Az egyik technológiai előrelépés ezen a téren az enzim immobilizálása volt. Többszöri felhasználással az adott enzim mennyiség jobban kihasználható. Az immobilizáció eredményeként az oldatban kifejezetten labilis enzim évekig stabil marad. Egy másik módszer szerint a teljes sejteket rögzítik. A rögzítés előtt a sejtömeget hőkezelik. Ez a hőstabil termolizinnak nem árt, de a hőérzékeny enzimek, így a fumaráz is elbomlik. Ezáltal a fumársav–almasav átalakulás miatt bekövetkező fumársav veszteség kiküszöbölhető.

Az enzim aktivitása jelentős mértékben növelhető a körülmények beállításával. Sók (2-4 M NaCl), n-pentanol hozzáadása, illetve nagy nyomás (50-100 bar) a többszörösére növeli az enzim aktivitását. Emellett jelentős eredményt hozhat magának az enzimnek a fehérjeméternöki módosítása. Site directed mutagenézissel *Bacillus subtilis*-ben kifejezve mind az enzim aktivitását, mind stabilitását a többszörösére növelték. Más lehetőség az enzim fermentáció hatékonyságának javítása, olcsóbb enzim előállítási technológia keresése.

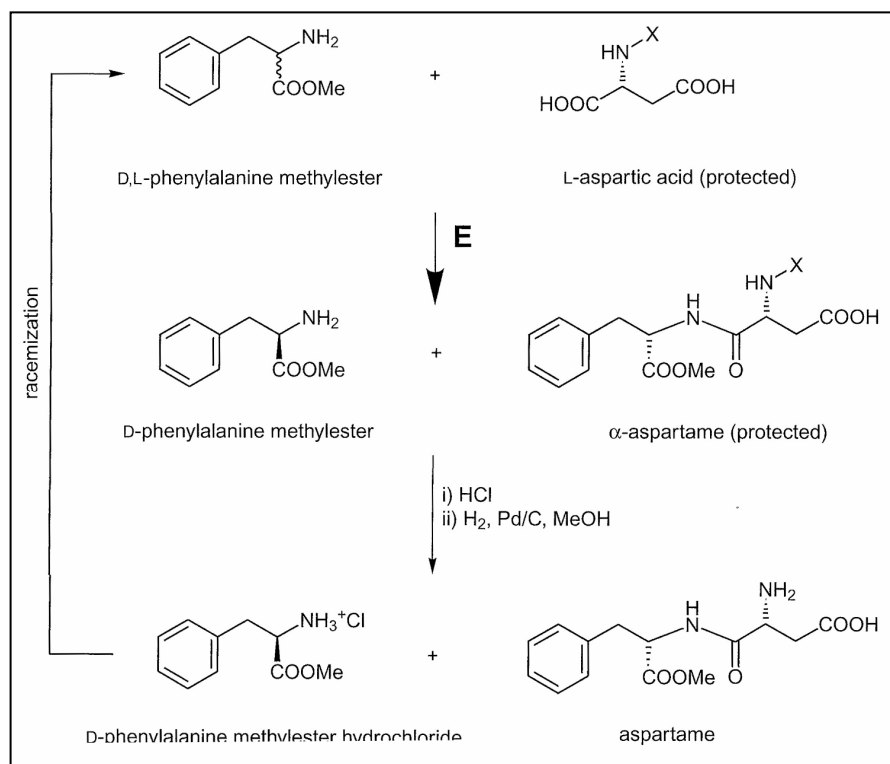
A reakciót vizes közegben, pH = 7-7,5 között hajtják végre, az optimális hőmérséklet $t=50\text{ }^{\circ}\text{C}$, ez a kompromisszum a kielégítő reakciósebesség és az enzim hosszú élettartama között.

Az enzim tulajdonságai után nézzük magát a reakciót. A termolizin proteáz, tehát fehérjebontó enzim, de itt fordított irányú reakcióban, peptidkötés létrehozására használjuk. A két aminosavból (Phe + Asp) irányítottan dipeptidet hozunk létre. A katalizált reakció (26. ábra):



26. ábra Az aszpartám előállítása

A szelektivitás itt is érvényesül, a nagy, apoláris aminosav (Phe) amino csoportján alakul ki a peptidkötés. Ahhoz, hogy csak a fenilalanin amino csoportja reagáljon az aszparaginsav 1-karboxil csoportjával, a rajtuk lévő egyéb funkciós csoportokat blokkolni kell, egyébként random di- és oligopeptidek képződnek. A Phe karbonsav csoportját metilészter formájában blokkolják, az aszparaginsav amino csoportját pedig egy benzil-oxi-karbonil (BOC) csoporttal védik. Ez utóbbit a termékről katalitikus hidrogénezéssel lehet eltávolítani, a metilcsoport viszont a termék része, nem kell leválasztani.

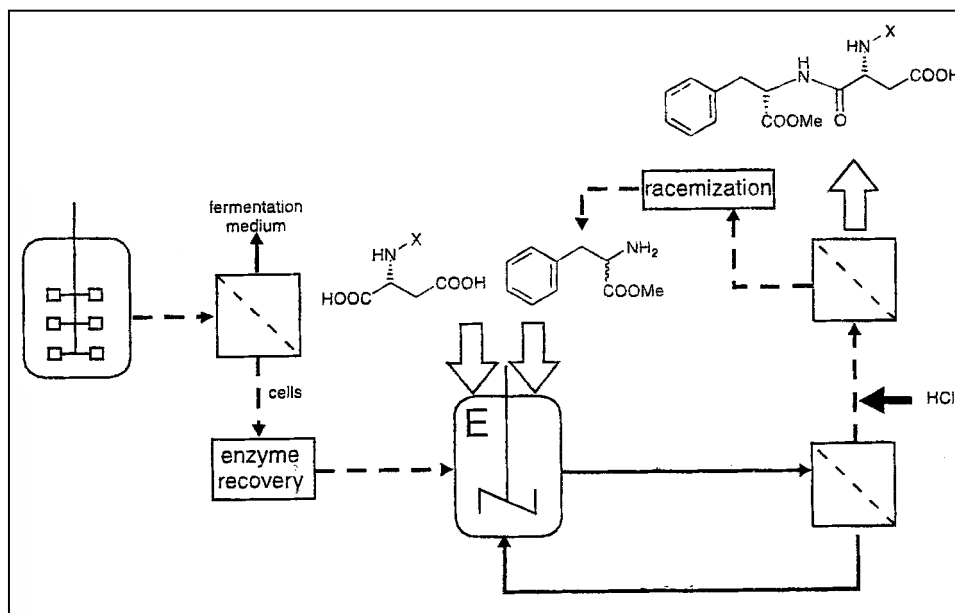


27. ábra Az aszpartám gyártás reakciói

Az enzim specifikusait többszörösen kihasználják. Az átalakítás szelektivitása abban áll, hogy az Asp két karbonsav csoportja közül csak 1 pozíciójú lép reakcióba, a 4 helyzetű viszont nem. Ez onnan vezethető le, hogy a fehérjéket α -aminosavak alkotják, a proteázok ezek peptidkötéseit hidrolizálják, így visszafelé is ezt a szerkezetet hozzák létre. Másrészt az enzim sztereoszelektív, csak az L-aminosavak lépnek reakcióba. Ez azt jelenti, hogy alapanyagként

az olcsóbb, szintetikus, racém DL-fenilalanint is fel lehet használni mégis csak L-aszpartám keletkezik (enantiomer tisztaság: 99,99 %), a D-Phe változatlan formában marad.

A termék tisztasága azért lényeges szempont, mert az izomer melléktermékek nem édes, hanem keserű ízűek. Az aszpartám gyártása kémiai szintézissel is megoldható, de ott jelentős



28. ábra Aszpartám gyártás technológiai lépései

mennyiségű keserű izomer keletkezik, aminek elválasztása jelentősen megrálgítja a folyamatot. A racém fenilalanin alkalmazásának van még egy előnye. A keletkező BOC-aszpartám és a megmaradó D-Phe oldhatatlan komplexet képeznek, ami kicsapódik a reakcióelegyből, kiszűrhető. A csapadékot sósavval kezelik, ebben a D-fenilalanin feloldódik, a BOC-aszpartám továbbra is oldhatatlan marad, elválasztható. Az előbbit racemizálják és visszaviszik a folyamatba, az utóbbiról hidrogénezéssel leválasztják a védőcsoportot (26. ábra). A reakció hőt termel, a készüléket hűteni kell. A technológia lépéseit az enzim fermentációs előállításával együtt mutatja be a (28. ábra).

Az aszpartám piaca jelenleg kb. 30 000 t/év, lassan, de folyamatosan bővül. Ennek legalább háromnegyed részét különféle italok édesítésére használják fel, a további mennyiség is az élelmiszerekbe kerül, dzsemek, cukorkák, édességek, tejtermékek, diabetikus készítmények édesítésére. Elterjedésének korlátja, hogy magasabb hőmérsékleten, főzés, sütés hatására elbomlik, így sütőipari termékekben nem alkalmazható.

6.7. Lipázok

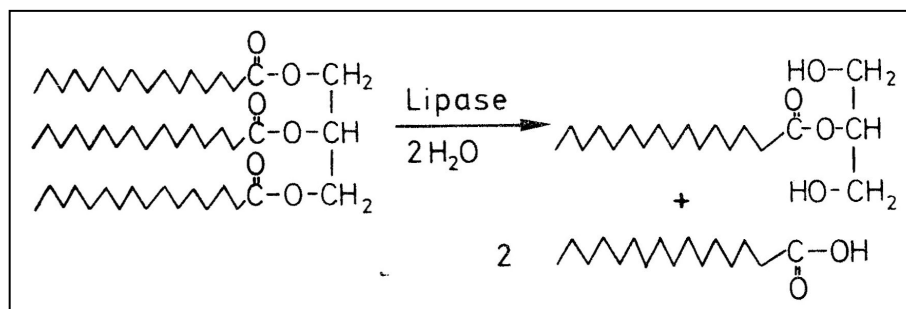
A lipázok (triacil glicerol hidrolázok) a hidrolázok közé tartoznak, a karbonsavak észter kötéseit bontják. Élettani szerepük a trigliceridek hidrolízise digliceridekké, monogliceridekké, zsírsavakká és glicerinné.

Az iparban a zsírok hidrolízise megoldható kémiai úton is, magas hőmérsékleten és nagy nyomás alatt (250 °C és 30-60 bar). Azonban ez az eljárás nem alkalmas a telítetlen zsírsavakat tartalmazó olajok, különösen a több kettős kötést tartalmazó olajok feldolgozására. Emiatt terjedt el az enzim hidrolízis.

Mivel a szubsztrát rosszul oldódik vízben, külön fázist is képez, a reakció, ezzel a katalízis is részben heterogén fázisú, a víz-olaj határfelületen megy végbe. A többi hidroláz

enzimhez hasonlóan a lipázok sem igényelnek kosubsztrátot. Általában sokféle hasonló szubsztrát átalakítására képesek, de régióspecifitást és sztereospecifitást mutatnak.

A reakció sebessége általában függ a zsírsavak szénláncának hosszától. Rendszerint a rövid szénláncú zsírsavak észtereit lassabban bontják, mint a közepes és hosszú szénláncú-



29. ábra Régiószelektív lipázok reakciója

két. A hossz mellett befolyásol az esetleges kettős kötések száma és helyzete. A *Geotrichium candidum* lipáz például szelektíven bontja a 9 pozícióban cisz helyzetű kettős kötést tartalmazó zsírsavak észtereit. Sok lipáz régióspecifikus abból a szempontból, hogy a glicerinen a primer alkohol csoportok (1 és 3 pozíció) észtereit nagyságrendekkel gyorsabban hidrolizálja, mint a középső (szekunder) csoportt (pl. *Rhizopus* lipázok) (29. ábra). Egyes enzimek specifikusak a glicerinenre, mások egyéb alkoholos vegyületek észtereit is bontják.

Hőfok optimumuk változatos, alacsony és magas hőmérsékleten működő enzimeket is találhatunk. A hőstabil lipázok, mint a *Thermus aquaticus*, *T. flavus* és *T. thermophilus* fajok enzimeivel magasabb hőmérsékleten (50-70 °C között) lehet dolgozni, ami több előnnyel is jár. Csökken a befertőződés kockázata, javul a diffúziós anyagátadás sebessége és a lipidek oldhatósága.

Mindez sokféle, változatos ipari alkalmazást tesz lehetővé, a lipázokat mosószerekben, a bőr-, textil-, élelmiszer-, papír- és gyógyszeriparban használják.

A lipázok széles körben elterjedtek, az állatok, növények és mikroorganizmusok körében egyaránt, gyakorlatilag minden sejt termel több-kevesebb lipázt.

A legtöbb kereskedelmi forgalomba kerülő lipáz mikrobiális eredetű, mivel csak ezeket lehet ipari léptékben előállítani. Mind a gombák, élesztők és a baktériumok körében található lipáz termelő törzsek. A baktériumok körében az említett *Pseudomonas*-ok és *Thermus*-ok, az élesztők között a *Candida* törzsek (*C. cylindracea*, *C. antarctica*, *C. rugosa*), a fonalas gombáknál pedig a *Rhizomucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus* és *Penicillium* fajok alkalmasak ipari léptékű lipáz termelésre. A bakteriális enzimek között külön figyelmet érdemelnek a *Pseudomonas* lipázok, amelyek kitűnően működnek vizes közeg helyett szerves oldószerekben is.

Kisebb léptékben gyártanak még hasnyálmirigy lipázt is, ezt sok más enzimhez hasonlóan a sertés vágóhidakon összegyűjtött szervekből nyerik ki

A törzsek változatosságának megfelelően a fehérje molekula is sokféle. A molekulatömegek 22-69 kDa között változnak. Az enzimek működésére jelentős hatással vannak a jelen lévő fémionok. A kétértékű ionok általában növelik az aktivitást, illetve elősegítik a fehérje leválását a sejtek felületéről. A nehézfémekre viszont érzékenyek, gátolják működésüket.

A lipázok szubsztrátjai, a zsírok és olajok rosszul oldódnak vízben, az oldott szubsztrát koncentráció alacsony, emiatt a reakciósebesség is kicsi. Szerves oldószerek jelenléte megnöveli a szubsztrát oldhatóságát, ezzel a reakciósebességet. Ugyanakkor az oldószeres közeg a legtöbb fehérjét denaturálja, tönkreteszi. Szerencsére a lipázok között sok oldószer-tűrő fehérje van, amelyek apoláris közegben is megtartják szerkezetüket és aktivitásukat. A szerves oldószerben végrehajtott enzimes reakciók új lehetőségeket nyitottak meg a kémiai szintézisekben. Sok lipázzal kimutatták, hogy aktívan működik vízzel elegyedő (metanol, etanol, acetone, gli-

cerin) és nem elegyedő (hexán, ciklohexán, heptán, izo-oktán, xilol és MTBE) oldószerekben. A reakciót gyakorlatilag vízmentes közegben is végre lehet hajtani, arra azonban ügyelni kell, hogy a hidrolízishez szükséges sztöchiometrikus mennyiségű víz (általában néhány ezrelék) jelen legyen.

Az oldószer nem csak az enzimaktivitást növeli, hanem a lipázok stabilitását, élettartamát is. Oldószeres közegben (víztartalom <3%) a lipázokat 20-30 fokkal magasabb hőmérsékleten lehet alkalmazni, mint vizes pufferben.

6.7.1. Fermentáció

A lipáz enzimet leggyakrabban szubmerz szakaszos, illetve rátáplálásos fermentációval állítják elő. Indukálható enzimek, termelésüket a szubsztrát, azaz növényi olajok adagolásával lehet kiváltani. Gátolhatja az enzim képződését a katabolit represszió (a glükóz jelenléte), illetve a termékkihíbió (glicerín szénforrás). A termékképzés növekedéshez kapcsolódó folyamat, főként az exponenciális fázisban történik. A *Rhizopus chinensis* fermentációnál a maximális intracelluláris lipáz aktivitást az exponenciális fázis végén kapták, amikor az alapvető szubsztrátok koncentrációja limitálóvá vált. Jelentősen növelni lehet az enzim termelést rátáplálásos fermentációban, a beadagolt szubsztrát lehet húskivonat illetve növényi olaj.

A nitrogén-források között a törzsek igényétől függően szerves és szervetlen anyagok egyaránt alkalmazhatók. Elegendő lehet egy minimál táptalaj, ásványi sókkal, nátrium-nitráttal, ammónium-szulfáttal és ammónium-nitráttal esetleg karbamiddal kiegészítve. Más törzsek olyan komplex szerves nitrogénforráson termelnek jól, mint a kukorica lekvár, pepton, tripton vagy az élesztő kivonat. Szerves nitrogénforrás egyrészt számottevően megnöveli a költséget, másrészt megnehezíti az enzim izolálását, tisztítását.

A levegőztetés intenzitása nagyon eltérő hatással van a lipázok fermentációjára. Egyes mikroorganizmusok minimális levegőztetés mellett termelik a lipázt, másoknál bőséges oxigénellátásra van szükség. Az oxigén hatása feltehetőleg közvetett, nem az enzimtermeléshez van rá szükség, hanem az enzim termékeinek, a szabad zsírsavaknak az oxidációjához. *Rhizopus* törzseknél egyértelműen kimutatták, hogy az oldott oxigén szint emelése (keveréssel, levegőztetéssel, stb.) fokozza a lipáz termelést.

A lipáz fermentációknál speciális lehetőség a szerves oldószerek használata. A *Ps. aeruginosa* ugyanúgy nőtt és termelte a lipázt n-tetradekán és n-dodekán jelenlétében, mint oldószer nélkül. A *Bacillus sphaericus* 205y vízzel elegyedő oldószerek (akár 75%) jelenlétében is növekedett és lipázt termelt. A *Pseudomonas sp.* G6 törzset egyedüli szénforrásként n-hexadekánon minimál tápoldaton szaporítva a tenyészet jól szaporodott, és sok lipázt termelt.

Az így termelt enzimek oldószeres vagy vizes-oldószeres közegben is működnek, sőt sokszor nagyobb az aktivitásuk, mint egy vizes pufferben.

6.7.2. Izolálás, tisztítás

A lipázok sokféle ipari alkalmazása ismert, de ezek nagy többségében nincs szükség nagy tisztaságú enzimre. Bizonyos esetekben, amikor valóban tisztított biokatalizátorra van szükség, egyszerű és olcsó feldolgozási művelettel kell ipari mennyiségű, stabil és nagy aktivitású enzim készítményt előállítani.

Az enzim tisztítását a szokásos fehérje elválasztási műveletekkel (csapadékképzés, ultraszűrés, kromatográfia, adszorpció) oldják meg.

Az ioncserélő kromatográfiánál általában anioncserélő töltetekkel (gyenge – DEAE, erős – Q) kötik meg a lipázokat. A hidrofób kölcsönhatás kromatográfiát (HIC) szívesen alkalmazzák, mert a lipázokról ismert, hogy a fehérje felületén hidrofób foltok találhatóak, ame-

lyek jól kötődnek a hidrofób töltetkez. A feldolgozás végén gyakran tisztítják az enzimet gélkromatográfiával.

6.7.3. *Enzim rögzítés*

A lipázok immobilizálásában speciális lehetőségeket biztosít a fehérjék hidrofób jellege, aminek révén spontán adszorpcióval is kötődnek apoláris hordozók felületére. Ezeket jól nedvesítik a szerves oldószerek, a reakció akadálytalanul végbemehet. A hordozó lehet poliuretán hab, polipropilén szemcse vagy akár ásványi anyag is.

Az kötött enzimek mellett alkalmaznak immobilizált sejteket is. A lipázt tartalmazó sejteket agar, alginát vagy poliakrilamid gélbe zárják. Ennél a megoldásnál a rögzítés általános előnyei mellett számolni kell az anyagátadás limitáló hatásával.

6.7.4. *Alkalmazások*

A lipázokat közvetlenül is lehet alkalmazni emésztést elősegítő készítményekben. Erre a célra a legalkalmasabb a hasnyálmirigy lipáz. Sok iparág használ lipáz készítményeket:

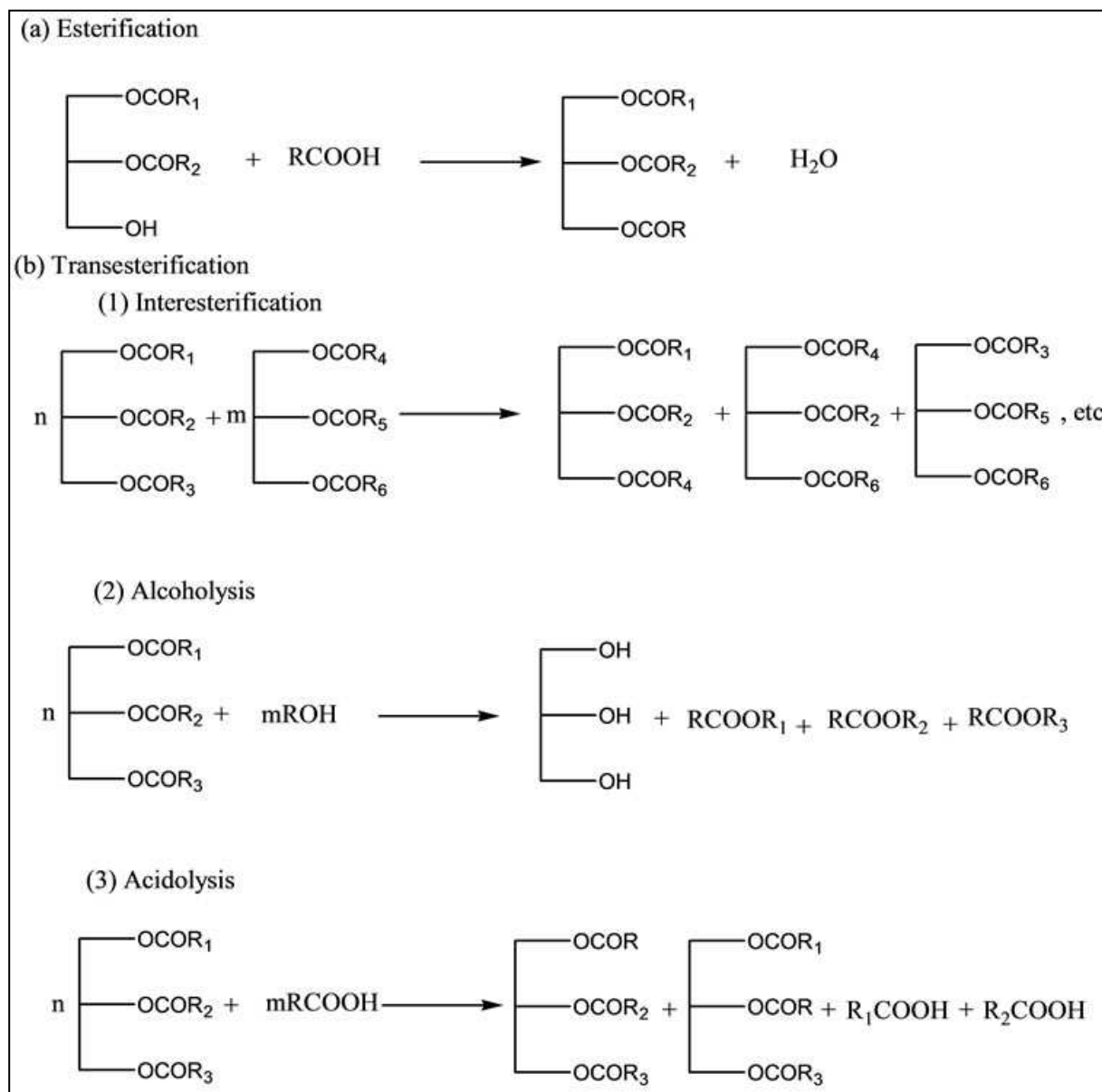
- Élelmiszeripar (a sajtok érlelésénél és a sütőiparban a tézta javítására)
- Bőripar (zsírtalanítás)
- Kozmetikai ipar (kíméletes, lúgmentes elszappanosítás)
- Cellulóz és papíripar (szennyezések eltávolítása)
- Átészterezési reakciók

Ez utóbbiakkal foglalkozunk részletesebben.

Az átészterezéseknél is azt használják ki, hogy minden enzimes reakció megfordítható, az „előre” és „vissza” menő folyamatok egyidejűleg játszódhatnak le és beáll közöttük egy dinamikus egyensúly. A hidrolízis és az észterezés párhuzamosan folyik, egy adott hidroxil csoportról ismételtelen leválnak, majd rákötődnek a zsírsavak. A természetes zsíradékok zsírsav összetétele sohasem homogén, így az adott pillanatban szabadon lévő zsírsavak is sokfélék. Az észterezésnél a nagy valószínűséggel nem ugyanaz a zsírsav kerül vissza az –OH csoportra, hanem statisztikusan valamelyik a jelen lévő szabad karbonsavak közül. Ettől a bevitt trigliceridek zsírsav összetétele megváltozik. Ezt a változást céljainknak megfelelően kihasználhatjuk, sőt irányíthatjuk, ha megfelelő specifitású enzimeket választunk, illetve megfelelő reakciópartnereket viszünk a rendszerbe. A két fő lehetőség, hogy nem-specifikus, vagy 1,3-specifikus lipázokat alkalmazunk. Előbbire akkor van szükség, ha mind a három észter kötést át kívánjuk alakítani. A reagáló partner lehet karbonsav vagy alkohol, aszerint, hogy a molekula melyik részét szükséges megváltoztatni. De lehet egy másik triglicerid is, amellyel a zsírsavak statisztikusan kicserélődnek (30. ábra).

6.7.4.1. *Esettanulmány: kakaóvaj pótló anyag előállítása*

A csokoládégyártás és a kapcsolódó iparok szűk keresztmetszete az, hogy a kakaó korlátozott mennyiségben áll rendelkezésre. A kakaócserjét ültetvényeken termesztik, de a terelés nem intenzifikálható, mint más ipari növényeknél, és a kultúra érzékeny az időjárás szélsőségeire. Az alapanyag drágasága létrehozta az igényt valamilyen póanyag kifejlesztésére. A kakaómag feldolgozása során két hasznos frakciót állítanak elő: a kakaómasszát (amely barna színű, keserű, íz és aromaanyagokat tartalmaz), és a kakaóvaját – ez fehéres színű, íztelen és gyakorlatilag tisztán trigliceridekből áll, szobahőmérsékleten szilárd és csak 37 fokon olvad meg. Az előbbi pótlása szinte lehetetlen, de a kakaóvaj kémiai összetételét meg lehet közelíteni. Az alapgondolat az, hogy valamilyen olcsó, hozzáférhető növényi olaj telítetlen zsírsavait ki kell cserélni hosszú szénláncú, telített savakra. Erre a feladatra kézenfekvő megoldás az átészterezés lipáz enzimmel. Eljárásokat dolgoztak ki pálmamag olaj, illetve napraforgó olaj átalakítására is. A 7. táblázatban szerepel a pálmaolaj és a kakaóvaj triglicerid összetétele. A ka-



30. ábra Lipázok átészterezési reakciói

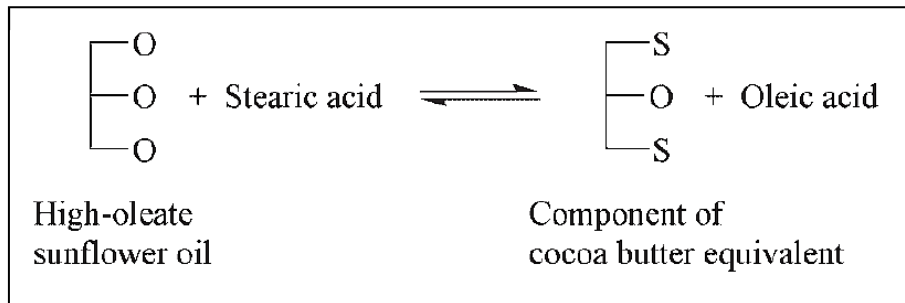
kaóvaj magas olvadáspontját a hosszú szénláncú telített zsírsavaknak (sztearinsav, palmitinsav) köszönheti.

7. táblázat Zsiradékok triglicerid összetétele

Triglicerid	Pálmaolajban %	Enzimes termékben %	Kakaóvajban %
StStSt	5	3	1
POP	58	16	16
POSt	13	39	41
StOSt	2	28,5	27
StLnSt	9	8	8
StOO	4	4	6

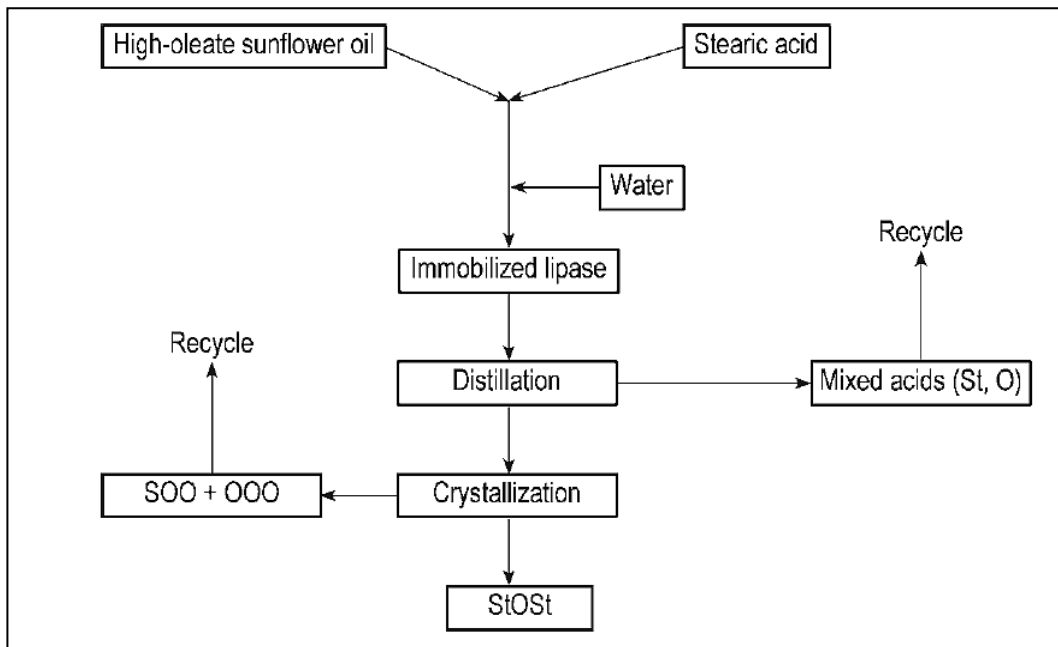
St = sztearát (C18,0); P = Palmitát (C16,0); O = Oleát (C18,1); Ln = Linolát (C18,2)

A pálmaolajban (ami szobahőfokon szintén szilárd, emiatt pálmazsírnak is szokták nevezni) ezek részaránya lényegesen kisebb, a folyékony napraforgó olajban pedig elenyésző. Az is megfigyelhető, hogy a középső pozícióban még a kakaóvajban is olajsav található. Így az átalakítás arra irányul, hogy a két szélső zsírsavat cseréljük le sztearinsavra. Erre a célra az 1,3-szelektív lipázok is megfelelnek. A napraforgó olaj átalakításánál is hasonló a helyzet, a trioleát főkomponens két szélső pozícióján cserélik le az olajsavat sztearinsavra (31. ábra)



31. ábra Napraforgó olaj átészterezése

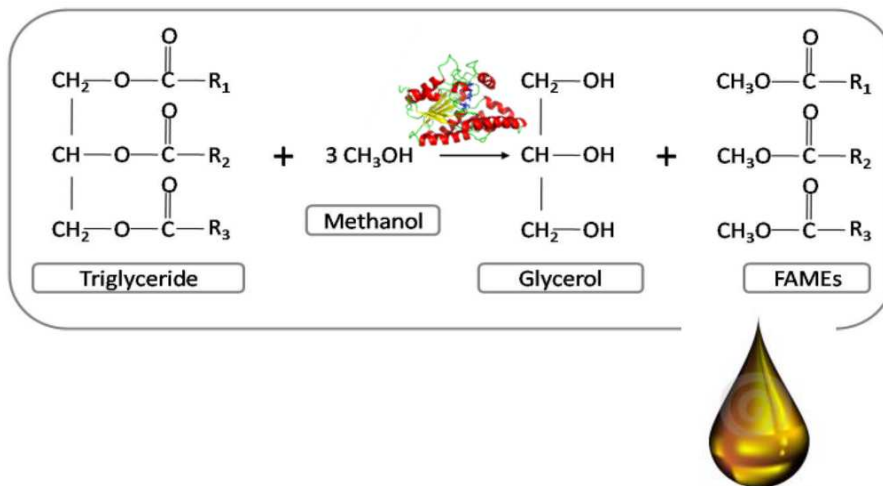
Az ipari technológiákban oldószeres közegben (például petroléterben) hajtják végre a reakciót. Kis mennyiségű vizet (1-2 ezrelék) adnak az elegyhez, ez szükséges az enzim hidratálásához és a hidrolízishez. A folyadékot immobilizált enzim tölteten engedik át (pl. *Rhizomucor miehei* lipáz, diatómaföldön kötve). A jellemző hőmérséklet 70 °C, a konverzió javítása érdekében az anyagot recirkuláltatják. A termékek közül előbb molekuláris desztillációval eltávolítják a szabad zsírsavakat (olajsav, maradék sztearinsav), ez utóbbit izolálva vissza lehet vinni a gyártási folyamatba. A maradékot lehűtve a sztearinsav észterek kikristályosodnak, az olajsavasok olvadékban maradnak. A szilárd fázist lecentrifugálva kapjuk a kakaóvaj pótló anyagot, a felülúszóban maradó gliceridek visszakerülnek a reakcióba.



32. ábra Kakaóvaj pótló anyag előállítása napraforgó olajból

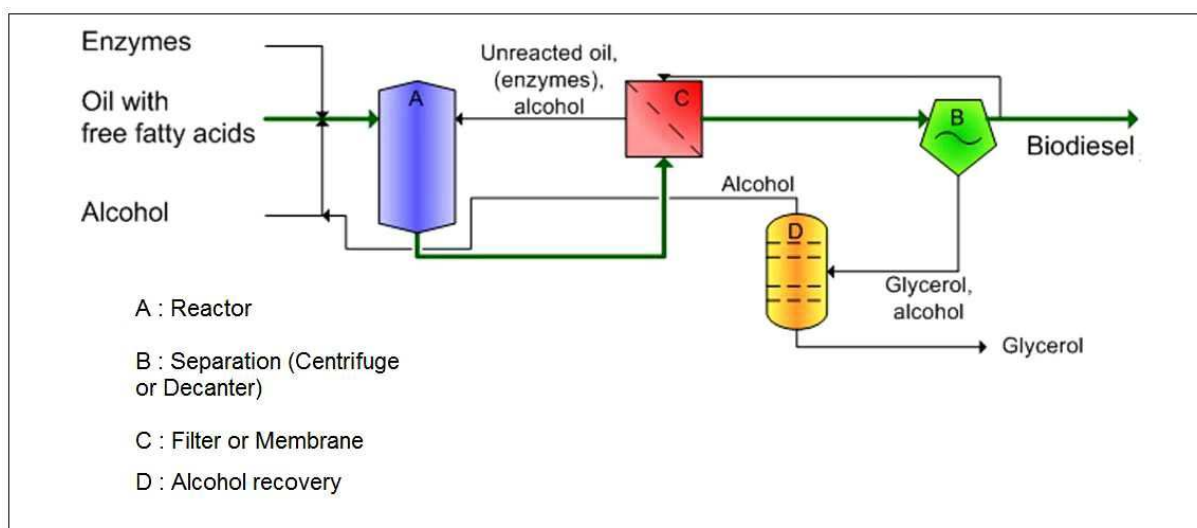
6.7.4.2. Esettanulmány: átészterezés alkoholokkal – biodízel üzemanyag enzimes előállítása

A fosszilis eredetű üzemanyagok kiváltásának egyik lehetősége, hogy növényi olajokat használunk fel belső égésű motorok hajtóanyagaként. Ipari mennyiségben a repce illetve napraforgó olaj jöhet számításba. Ezek egyes dízel erőgépekben (pl. traktorokban) közvetlenül is felhasználhatók, de az égés nem tökéletes és sok kellemetlen melléktermék keletkezik. A trigliceridek túl nagy molekulák, illékonyaságuk, gőznyomásuk kicsi. Célszerűen ezeket a kisebb



33. ábra Biodízel üzemanyag gyártása napraforgó olajból

és illékonyabb zsírsav metilészterekké alakítják át, és ezt használják üzemanyagként. A folyamat egy lépésben átészterezéssel hajtható végre. Ez megvalósítható a klasszikus kémiai úton, kálium hidroxidos főzéssel is. Ez az eljárás olcsóbb, de a melléktermékként keletkező lúgos gyanta/iszap veszélyes hulladék, ártalmatlanítása külön költségekkel jár. Lipáz enzimmal viszont enyhe körülmények között, ártalmatlan melléktermékek nélkül megoldható a gyártás. Ehhez olyan nem-specifikus lipázra van szükség, amely mindhárom észterkötést egyforma sebességgel bontja (33. ábra).



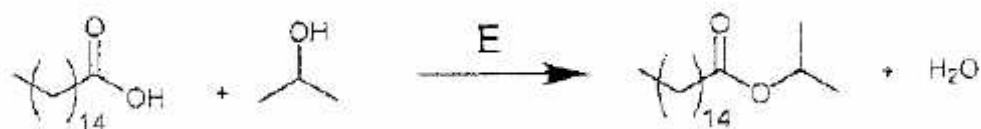
34. ábra A biodízel gyártás technológiai folyamata

Az enzimeket membránnal vagy más módon visszatartják a reaktorban. A keletkező glicerin külön fázist képez, elválik az olajoktól és így centrifugális szeparátorral elválasztható. A maradék metanol is megoszlik a két fázis között, túlnyomó része a glicerines fázisba oldódik. Ezt a két anyagot desztillációval szétválasztják, a metanolt vissza lehet vezetni a reakcióba, a glicerin mint hasznos termék értékesíthető. Az olajos fázis megfelelő konverzió esetén egyből használható üzemanyagként, ha viszont sok a maradék glicerid, akkor azokat kifagyasztással el lehet távolítani (34. ábra).

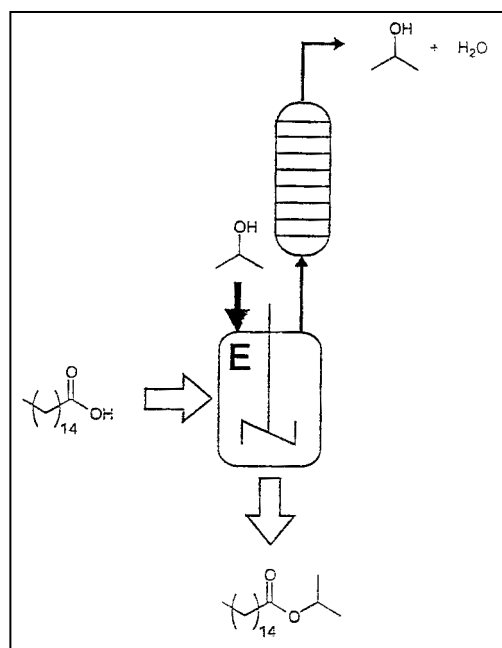
6.7.4.3. Esettanulmány: észterképzés lipázzal – izopropil palmitát/mirisztát

Az észterképződés egyszerű egyensúlyi kémiai reakció, amely sav illetve bázis katalízissel megy végbe. Katalizátorként lipáz enzimet is alkalmazhatunk. A konverzió növelése érdekében a képződő vizet el kell távolítani a rendszerből. Erre több megoldást is találtak: - azeotróp desztillációt, - pervaporációt.

Az izopropil palmitát és mirisztát a kozmetikai iparban nagy mennyiségben használatos krémek, szappanok, testápolók alapkomponenseként. Az észter előállítását immobilizált enzimmel (*Candida antarctica* lipáz) oldják meg.



Az oldószer a kis víztartalmú izopropanol, ebben oldják fel a palmitinsavat (pH=7-nél nem-disszociált, apoláris formában van). A reakció optimális hőmérséklete 60 °C. A keletkező víz eltávolítását folyamatos azeotróp desztillációval oldják meg. Az izopropanol-víz rendszer minimális forrponitú azeotrópot alkot, amelynek forrponitja 80,4 °C. Ez túl magas az enzim optimális hőmérsékletéhez képest, ezért vákuumdesztillációt alkalmaznak 60 °C-on. A távozó izopropanolt folyamatos adagolással pótolják. A szakaszos reakcióban 14 óra alatt 99% fölötti kitermelést lehet elérni (35. ábra).



35. ábra Észter előállítása lipáz enzimmel