

HETEROGÉN FÁZISÚ ENZIMES REAKCIÓK

Immobilizált/rögzített enzimek



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

HETEROGÉN FÁZISÚ ENZIMES REAKCIÓK

ELŐNYÖK/HÁTRÁNYOK

Előny: ➤ a rendszer homogenitása,
➤ az enzim – izolálásán kívül – előkészítést nem igényel.

Gazdasági hátrányok :

- Az enzimek drágák, 1-10 \$/mg
- Csak egyszer használhatók fel, a reakció után elvesznek, illetve kinyerésük a reakcióelegyből bonyolult és drága.

Technológiai hátrány:

- szennyezik a terméket, tisztítását nehezítik.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

Az enzim immobilizáció története

Nelson és Griffin 1916-ban véletlenül fedezte fel, hogy az élesztő invertáza aktív szénen adszorbeálódott, de megőrizte az aktivitását a szacharóz hidrolízisében.

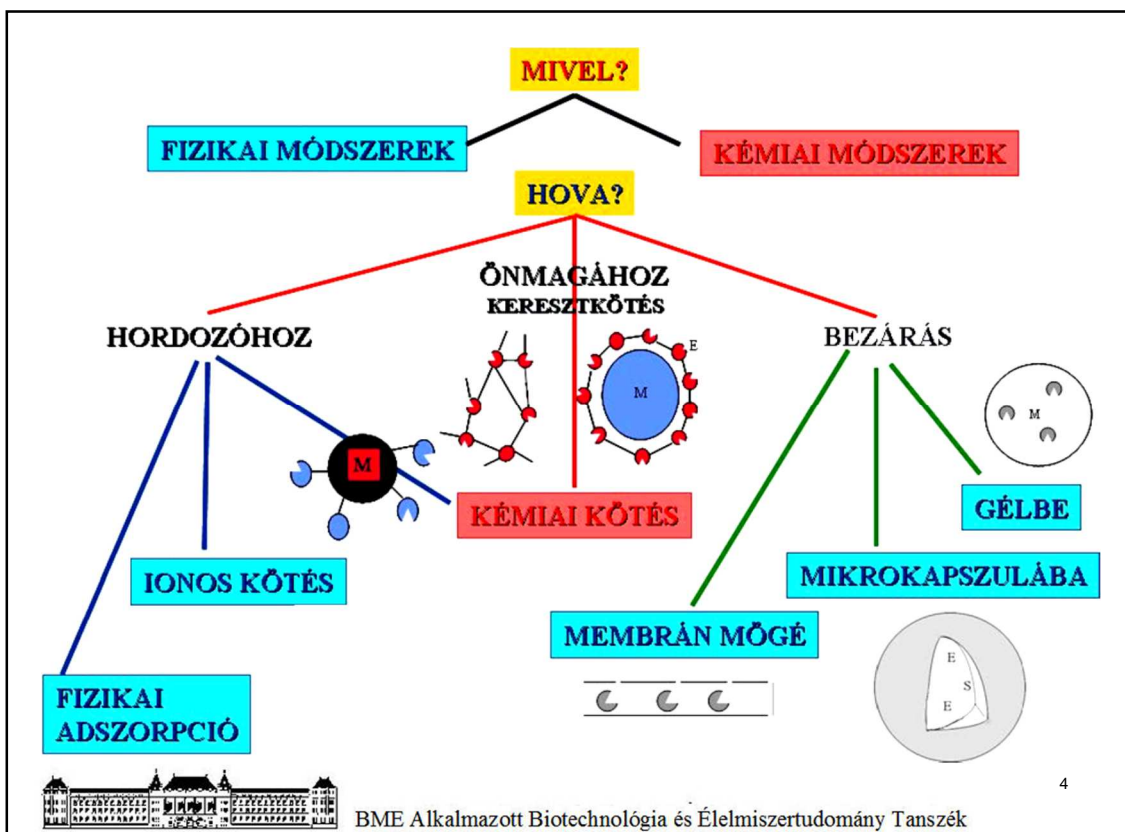
Ipari gyakorlattá illetve kereskedelmivé akkor vált, amikor Grubhofer és Schleith egy sor enzimet rögzítettek: karboxipeptidázt, diasztázt, pepszint és ribonukleázt. Ezeket diazotálással kovalens kötéssel poli-aminosztírol gyantára rögzítették.

Az első ipari alkalmazás Chibata nevéhez fűződik, aki 1969-ben aminoacilázt rögzített DEAE Sephadex-re ionosan és ezt N-acyl-D, L-aminosav rezolválására használták.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

3



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

4

Az enzimrögzítés módszerei

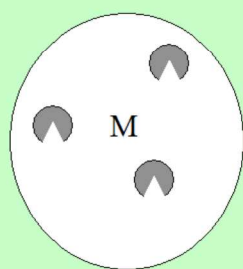
FIZIKAI MÓDSZEREK



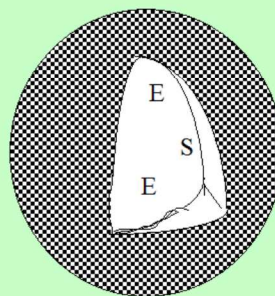
Enzim rögzítés üreges szálban
(Hollow fibre)



Enzim rögzítés fonott szálak anyagban



Enzimbezáras oldhatatlan
gél mátrixban



Mikrokapszulázás



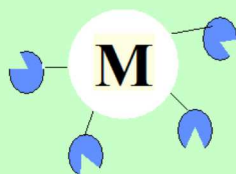
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5

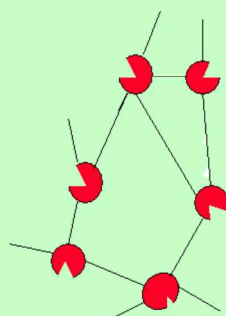
Az enzimrögzítés módszerei

KÉMIAI MÓDSZEREK

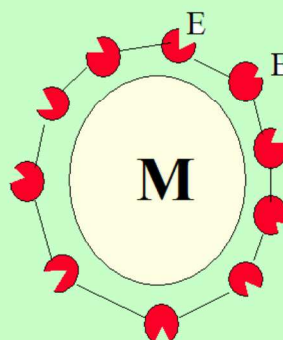
Enzimkötés
hordozóhoz
kovalens kötéssel



M=mátrix



Keresztkötés



Enzim keresztkötés
multifunkciós reagenssel



6

Kémiai módszerek

Kovalens kötés az enzim nem esszenciális aminosav-oldallánca és egy vízben nem oldódó, funkciós csoporttal ellátott hordozó mátrix között.



Hordozó lehet:

természetes polimer: *agar, agaróz, kitin, cellulóz, kollagén,...*

szintetikus polimer: *poliuretán, polisztirol, nylon, ...*

szervetlen hordozók: *üveg, alumínium, szilikagél, magnetit,...*



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

7

Kémiai módszerek

Kovalens kötés kialakítása:

szabad α -, β - vagy γ -COOH, α -, β -NH₂ csoportok
fenil-, OH-, SH- vagy imidazol-csoportok

LÉPÉSEK:

1. A hordozó aktiválása (kar és -X, reaktív csoport felvitele),
2. a kovalens kötés létrehozása az enzim és az aktivált hordozó között.

Az aktív centrum védelme: S v. analogon jelenléte

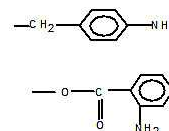


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

8

Kémiai módszerek: diazotálás

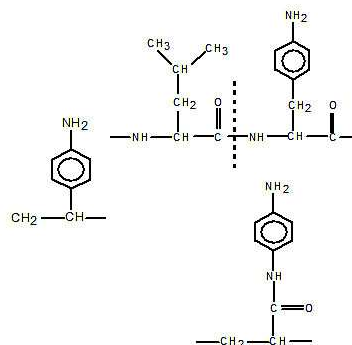
p-NH₂-benzil-cellulóz
 p-NH₂-benzoil-cellulóz



SEPHADEX: amino-benzoil származék

Amino kopolimerek:

poli(-L-Leu+pNH₂-D,L-Phe)



Polisztirol származék

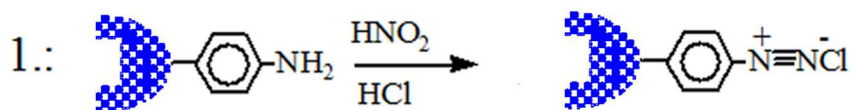
Poliakrilamid származék
 (BIOGEL, ENZACRYL)



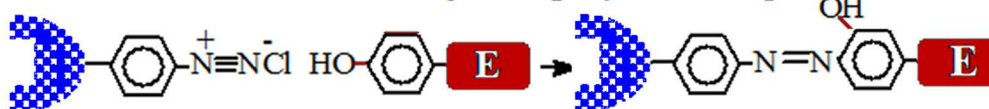
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

9

Kémiai módszerek: diazotálás

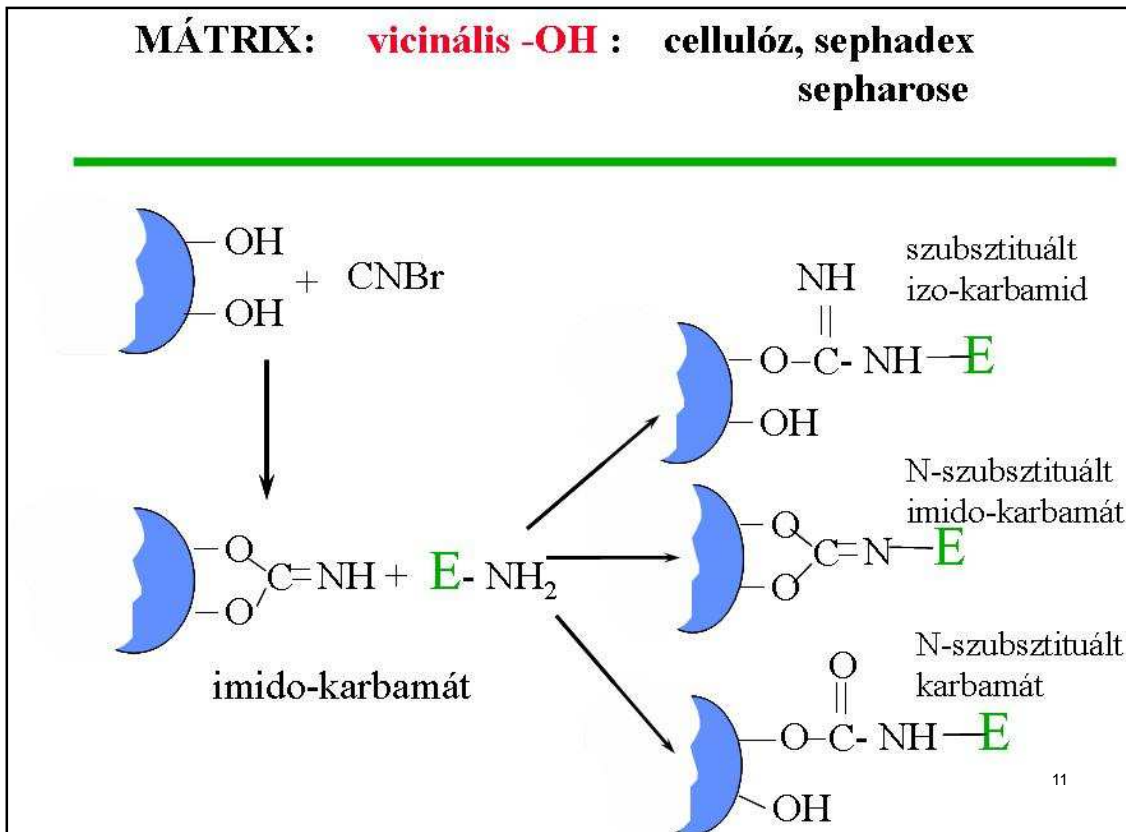


2. reakció az enzimefehérje -NH₂, Tyr, His csoportjaival:



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

10



A szénhidrát mátrixok eredete

Glükóz → dextrán → Sephadex®

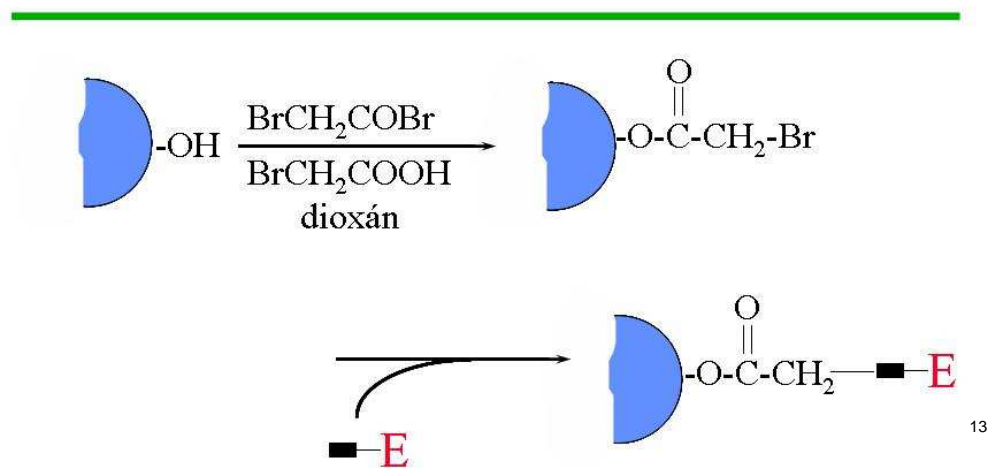
Tengeri alga → agar(óz) → Sepharose®



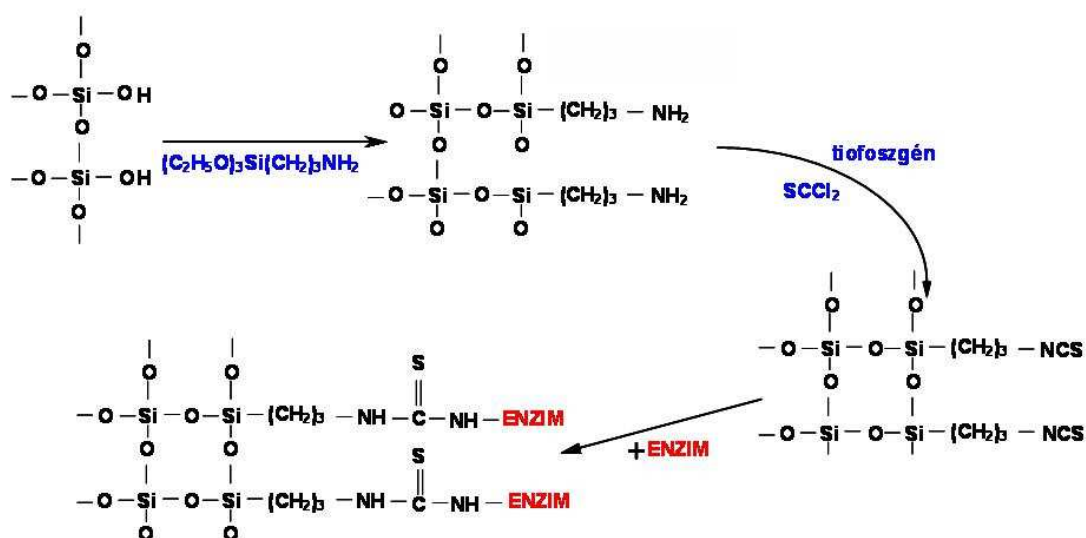
KÉMIAI MÓDSZEREK 4

Az enzim fenil-, amin-, SH-csoportjainak (■) ALKILEZÉSE

MÁTRIX: METAKRILÁT és CELLULÓZ származékok homo- és kopolimerjei

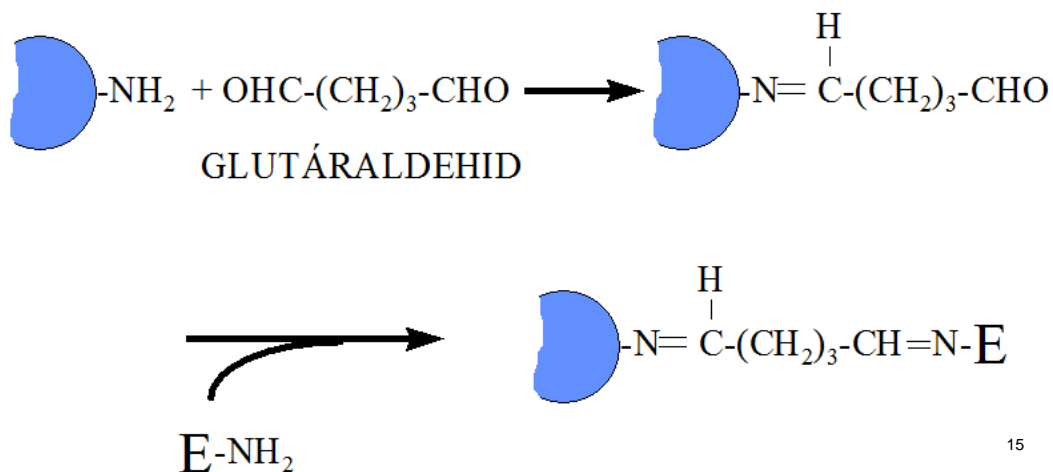


KÉMIAI MÓDSZEREK: rögzítés üvegfelületre



KÉMIAI MÓDSZEREK: bifunkciós molekulákkal

Mátrix: -NH₂ csoport: AE-cellulóz, DEAE-cellulóz, kollagén, kitin, Nylon,.....

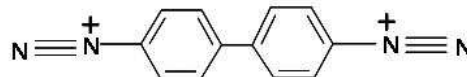


15

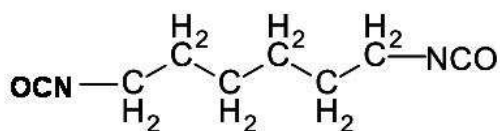
KÉMIAI MÓDSZEREK: bifunkciós molekulákkal



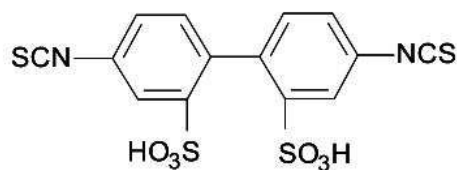
GLUTÁRALDEHID



DIAZOBENZIDIN

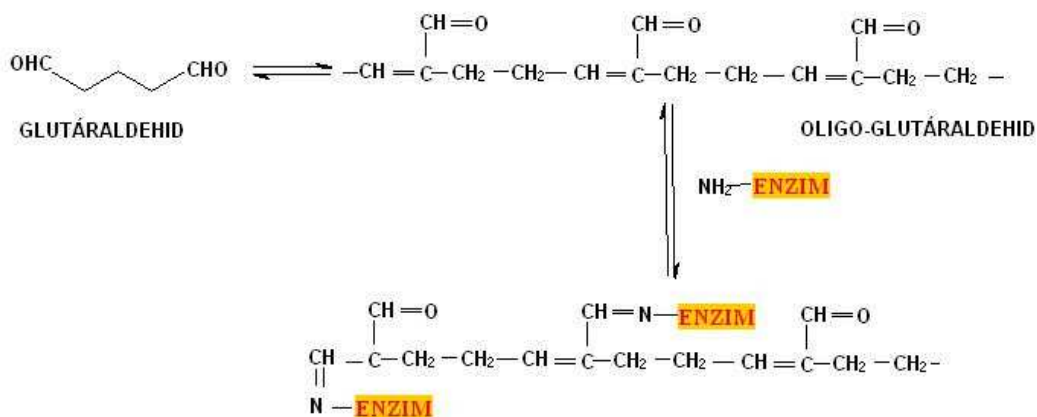


HEXAMETILÉN-DIIZOCIÁNÁT



4,4'-DIIZOCIÁNÁTO-BIFENIL-
-2,2'-DISZULFONSAV

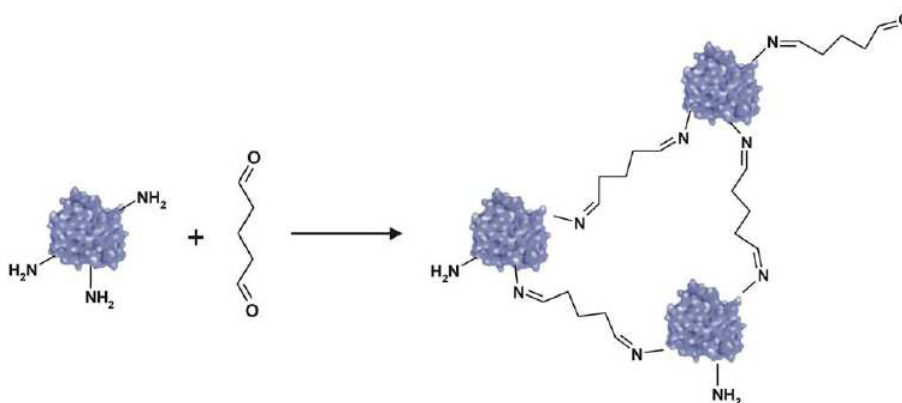
KÉMIAI MÓDSZEREK: keresztkötések glutáraldehiddel



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

17

KÉMIAI MÓDSZEREK: keresztkötések glutáraldehiddel



Rendszerint inert fehérjével együtt immobilizálják (~hordozó) (zselatin, albumin, kollagén, tojásfehérje). Nem élő sejtek vagy feltárt sejtek homogenizátumára is lehet immobilizálni.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

18

KÉMIAI MÓDSZEREK: keresztkötések glutáraldehiddel

Példa: kataláz keresztkötéses immobilizálása

1. Kristályos katalázt oldunk 10%-os NaCl-ben és 0,05 M foszfát pufferrel hígítjuk, míg a kataláz cc. 2 mg/ml lesz.
2. 4 ml 4 %os glutáraldehidet ua pufferben 4 ml-hez adunk és kb egy órát szobahőmérsékleten kevertetjük, amíg zöld rögös csapadék nem válik le. (Egy éjszakán át hidegszobában kezelve hasonló eredményekre jutunk).
3. Centrifugálás (5 min 4000 rpm) és ismételt mosás 10% NaCl-dal (6-8x), amíg a szupernatánsban már nincs kataláz aktivitás.
4. Homogenizálás.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

19

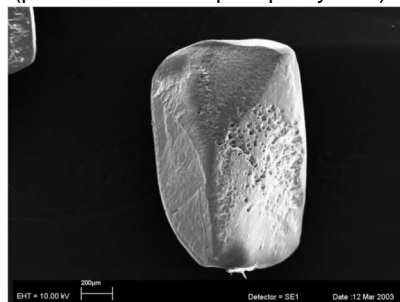
CLEC = Cross-Linked Enzyme Crystals



Scanning electron microscopic view of CLEC laccase
Surface area (m^2/g) 2.456

Preparation and characterization of cross-linked enzyme crystals of laccase, J. J. Roy, T. E. Abraham *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 38 (2006) 31–36

Cross-linked Enzyme crystal of PNP
(purine nucleoside phosphorylase)



BME Alkalmazott Biotechnológia és

CLEA = Cross-Linked Enzyme Aggregates

CLEA: precipitáció + keresztkötés
Kombinálja a tisztítást és a rögzítést
Glutáraldehid, de.... Pl. dextránpolialkohol
Előnyei:

- Egyszerű és sokféle enzimhez megfelelő
- Tiszta és nem tisztított enzim preparátumokkal is végrehajtható
- Nagy stabilitás hővel, szerves oldószerekkel és proteolízissel szemben
- Nem oldódik vizes környezetben (nem vész el kioldással az aktivitása)
- Combi CLEA: két vagy több enzim együttes immobilizálása



Alcalse-CLEA

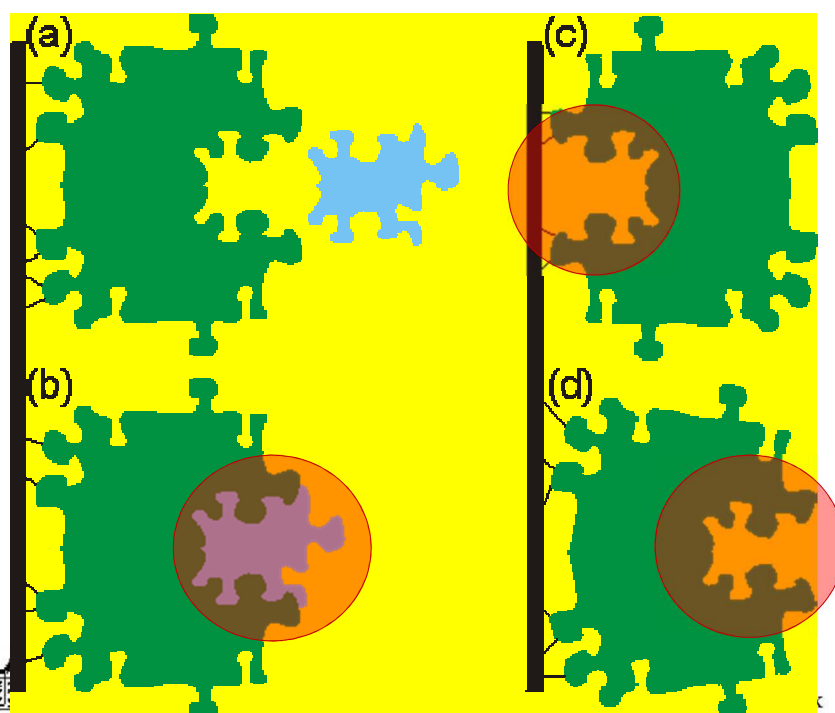
Mindkettő (CLEC, CLEA) jó vizes és szerves fázisokban megvalósuló biotranszformációkra



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

21

A kémiai kötés esetleges hatásai: aktivitáscsökkenés



22

FIZIKAI MÓDSZEREK

1. Adszorpció, pl *ioncserélőn* – nem specifikus, könnyen leválik (pH)
2. Gélbe zárás
3. Mikrokapszulázás
4. Membrán „mögé” zárás



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

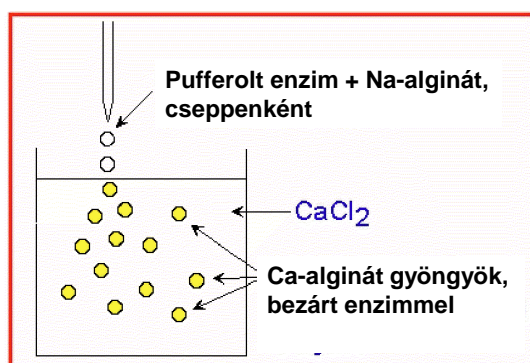
23

Fizikai módszerek

Gélbe zárás: pl. alginát képzés

ALGINÁT: poli- β D-mannuronsav (1 \rightarrow 4),-guluronsav

Hidrofil, kolloid, egyenes láncú polimer



forrása:
Macrocystis pyrifera



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

24

Példa: élesztő alginát gélbe zárása

Példa: *S. cerevisiae* rögzítése kalcium alginátban

1. 25 g nedves tömegű *S. cerevisiae* sejtömeget szuszpendáljunk fel steril vízben és jól keverjük össze 50 ml 4%-os nátrium-alginát oldattal.
2. A keletkező szuszpenziót nyomjuk keresztül egy szűk csövön (pipettahegy, kb 1 mm átmérő) és csepegtessük bele 50 mM-os pH=6-8 CaCl_2 oldatba.
3. A keletkező 2,8-3 mm átmérőjű golyókat inkubáljuk 20-22 °C-on CaCl_2 oldatban, hogy megkeményedjenek a gélszemcsék.

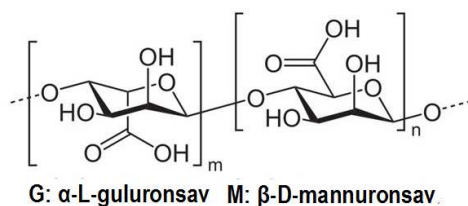


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

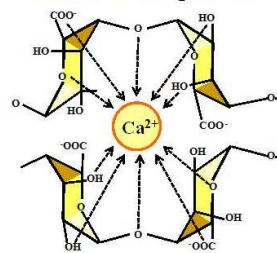
25

A Ca-alginát gél szerkezete

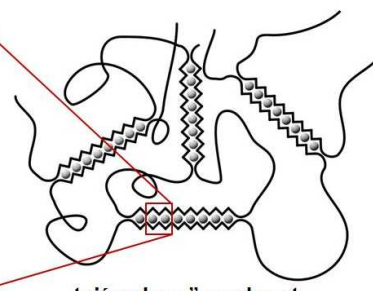
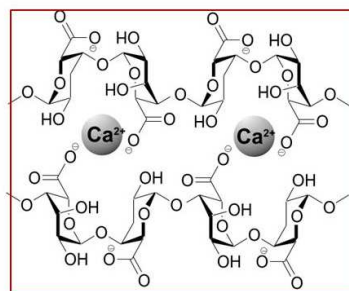
az alginát monomerei



a kalcium ionmegkötése



↓ Ca^{2+}



„tojásrekesz” szerkezet

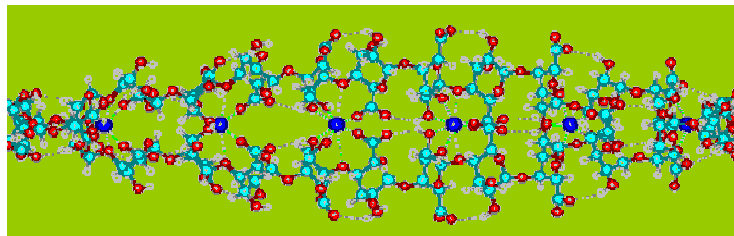


26

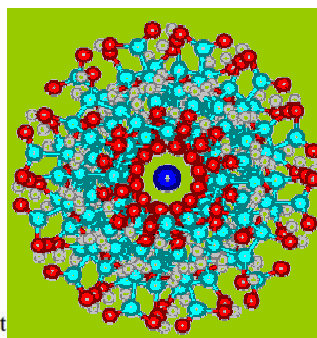
A Ca-alginát gél szerkezete

A Ca-ionokat közrezáró két lánc spirált alkot:

Oldalnézet:



Keresztmetszeti nézet:



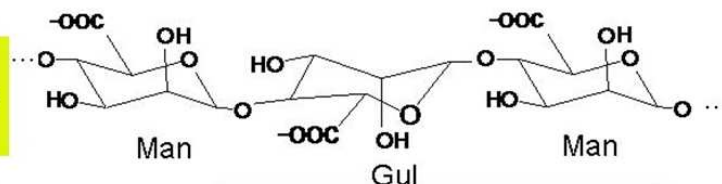
BME Alkalmazott

Élelmiszertudomány Tanszék

27

Alginát: mannuronsav, guluronsav 1,4 glikozidos heteropolimerje

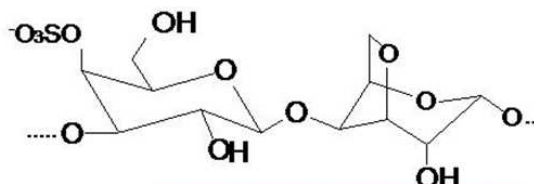
polianionos



Oldat: víz gél: $\text{Ca}^{2+}, \text{Zn}^{2+}, \text{Al}^{3+}$

κ -karragén: galaktóz és 3,6 anhidro-galaktóz helikális biopolimerje

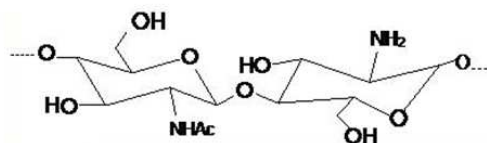
polianionos



Oldat: víz gél: $\text{Ca}^{++}, \text{K}^{+}$

Kitozán: részlegesen dezacetilezett N-acetilglükózamin polimer

polikationos



Oldat: ecetsavas víz gél: polifoszfátok, pH változás

28

Fizikai módszerek: poli-akrilamid gélbe zárás

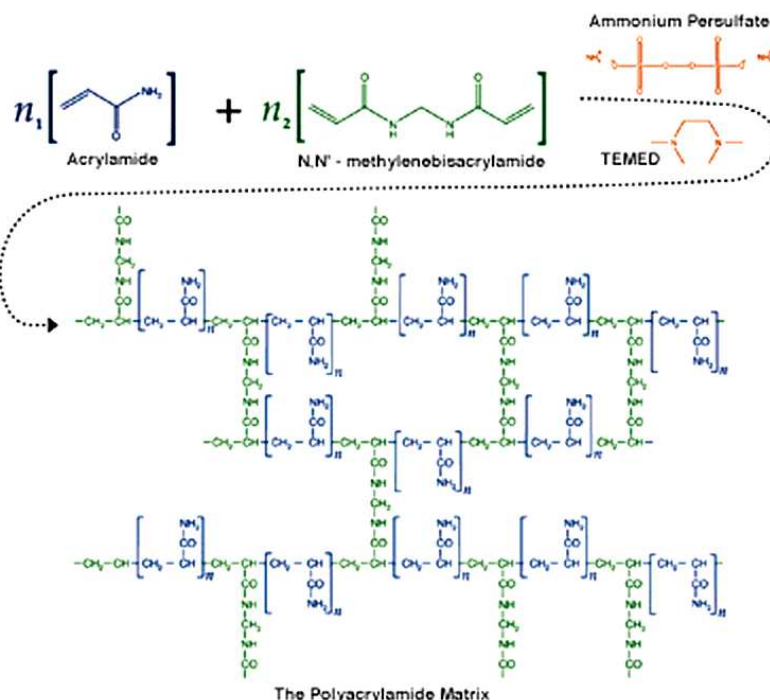
A poli-akrilamid láncokat bis-akrilamid keresztkötésekkel kopolimerizálva térhálósítjuk → gél.

Ha laza a gél → a fehérje vándorol benne → elektroforézis.

Sűrűre kell venni – 100-400 nm pórusméret – hogy az enzim (300-2000 nm) „beszoruljon”. Két-három mm-es gyöngök.



Fizikai módszerek: poli-akrilamid gélbe zárás

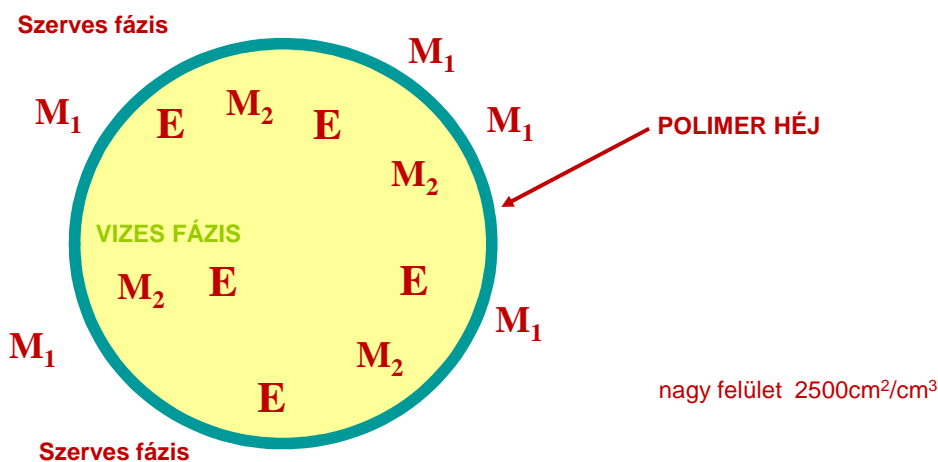


Példa: *E. coli* gélbezárása poliakrilamiddal

1. 4 ml fizsóban 1 g centrifugált baktériumsejtet szuszpendálunk
2. A szuszpenzióhoz 0,75 g akrilamid monomert, 40 mg bis-akrilamidot, 5% DMAPN-t adunk.
3. Inert gáz buborékolatásával kiűzzük az oxigén nyomait is, mert az oxigén megakadályozza a polimerizációt.
4. 0,5 ml 2,5%-os K-perszulfát hozzáadásával indítjuk a reakciót.
5. 37 °C-on keverés mellett inkubáljuk 30 percig, amíg bepolicimerizálódik.
6. A megfelelő alakú szemcsék kialakulása után fizsóval mossuk

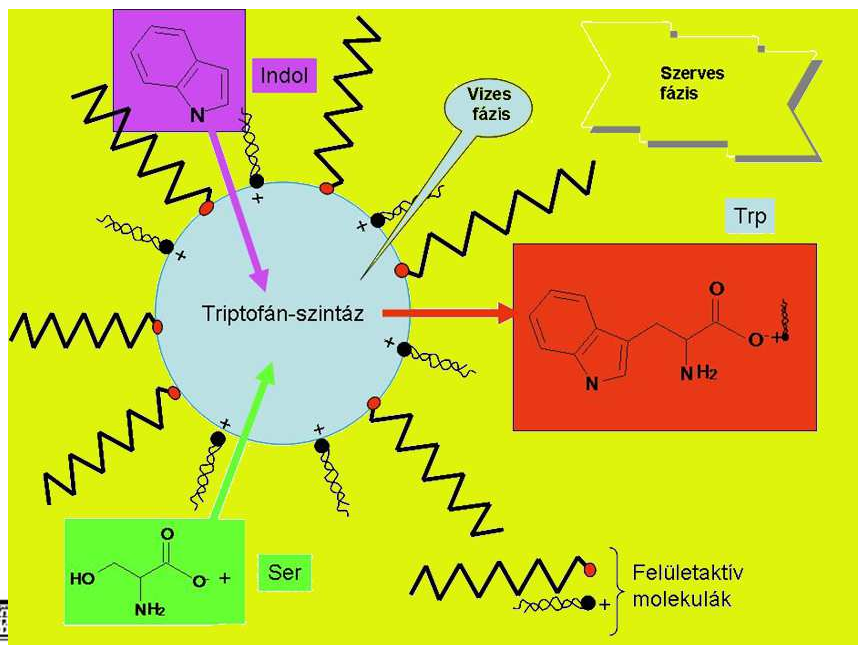


Fizikai módszerek: mikrokapszulázás állandó polimer membrános mikrokapszulák



Fizikai módszerek: mikrokapszulázás

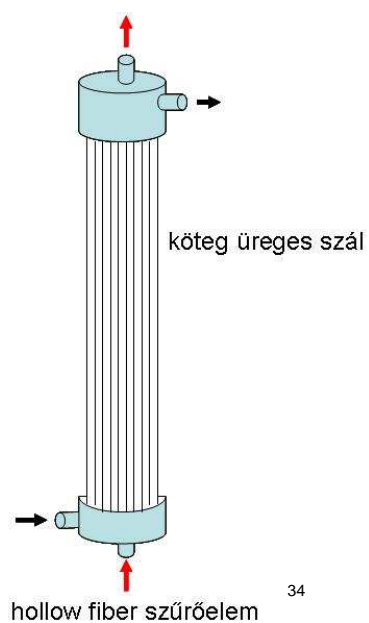
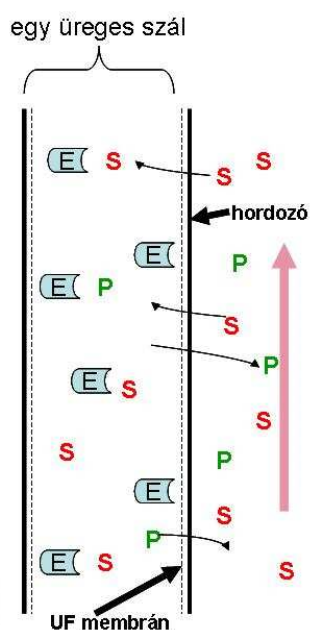
Nem állandó membrános koacervátumok: pl. reverz micellák



33

Fizikai módszerek: bezárás ultraszűrő membránal

A membrán a szubsztrátot és a terméket átengedi, de az enzimet visszatartja.



34

Rögzítési módszerek összehasonlítása

Tulajdonság	fizikai adszorpció	ionos kötés	kovalens kötés	keresztkötés	(gél)bezárás
megvalósítás	könnyű	könnyű	nehéz	nehéz	nehéz
enzimaktivitás nagysága	kicsi	nagy	nagy	közepes	nagy
S-specificitás	nem változik	nem változik	változhat	változhat	
kötő erő	gyenge	közepes	erős	erős	erős
regenerálás	lehetséges	lehetséges	lehetetlen	lehetetlen	lehetetlen
alkalmazhatóság	gyenge	közepes	közepes	gyenge	jó
költség	alacsony	alacsony	magas	közepes	alacsony
mikrobás fertőzés elleni védelem	nincs	nincs	nincs	lehetséges	megvalósul



Sejtek immobilizálása

Az enzim preparálása nem mindig szükséges.

A teljes sejt immobilizálása:

- költségkímélő (izolálás költségei)
- az enzim természetes környezetében működik
- a fehérje molekula védettebb, mint oldatban
- természetes koenzimregenerálás lehetséges

Élő sejt rögzítése:

Nem élő sejt preparátum:
(permeabilizálás)

koenzimes átalakítások

egyszerű átalakítások
(pl. laktóz hidrolízis)

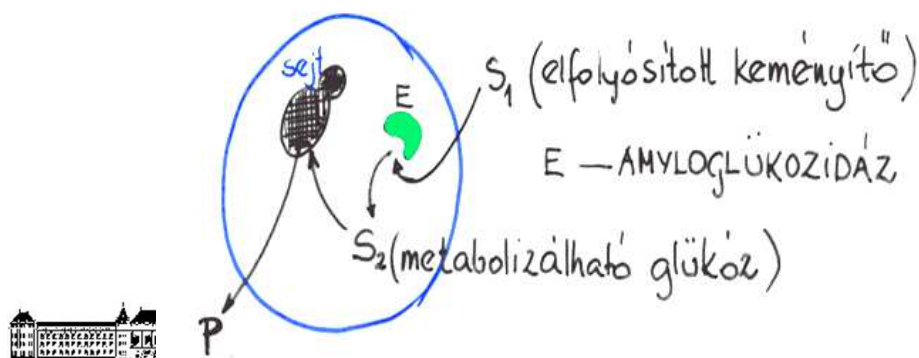
A RÖGZÍTÉSI MÓDSZEREK UGYANAZOK



Sejtek immobilizálása

Számos kombinált eljárást is kidolgoztak, amelyekben többféle enzimet és/vagy sejtet rögzítettek egy preparátumban.

Példa: MAXAFERM eljárás – amiloglükozidáz enzimet és élesztő sejtet kapcsoltak egy hordozóba. A szubsztrát dextrin α -amilázzal elfolyósított keményítő – ebből az amiloglükozidáz glükózt hidrolizál, amit aztán az élesztő alkohollá erjeszt.



37

ENZIM RÖGZÍTÉS MÓDSZEREI

MIVEL?

FIZIKAI MÓDSZEREK

KÉMIAI MÓDSZEREK

HOVA?

hordozóhoz

keresztkötés

bezárás

fizikai
adszorpció

ionos

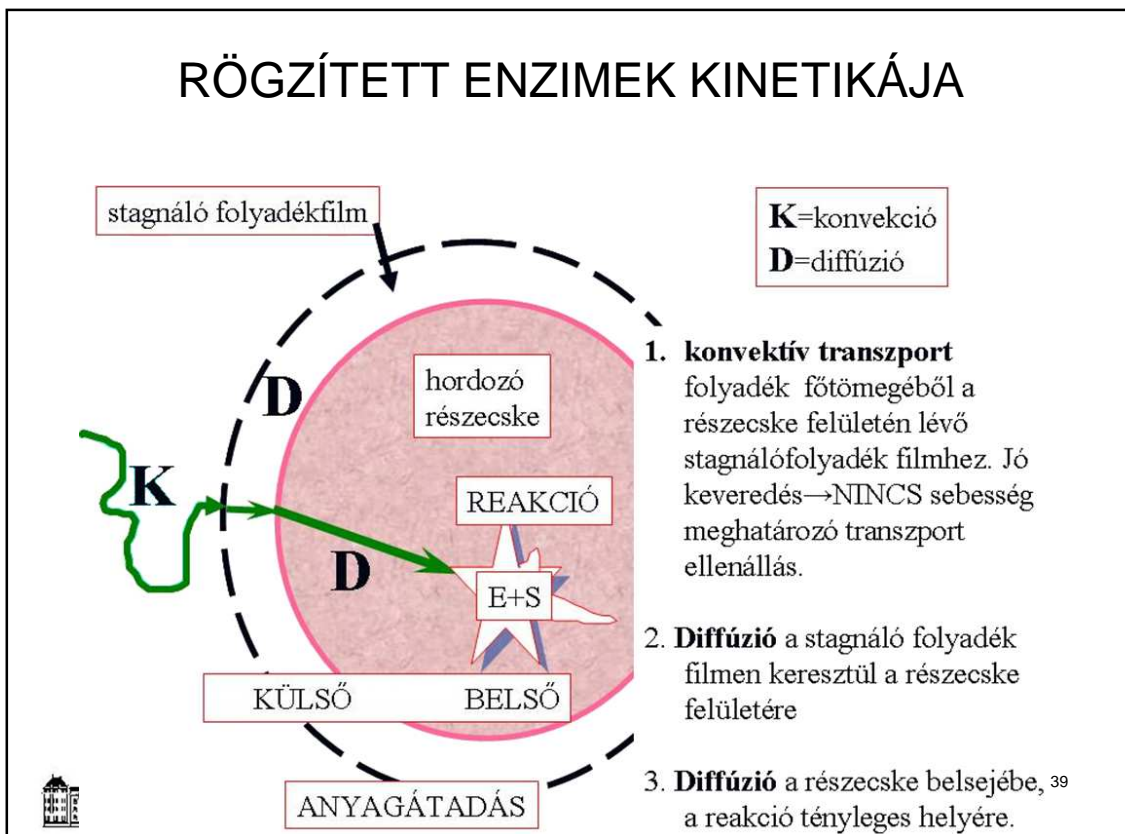
kémiai
kötés

gél

membrán

mikrokapszula

38



RÖGZÍTETT ENZIMEK KINETIKÁJA

Külső anyagátadás

Először csak a külső transzportfolyamatokat tekintjük át (az enzim a hordozó *felületén* van kötve). Ekkor az 1 és 2 folyamat közül a diffúzió a sebesség-meghatározó lépés. A stagnáló folyadék filmben:

$$N_s = \frac{dS}{dt} = k_s a (S_o - S)$$

\swarrow \searrow
 cm/s cm²/cm³

ha a M-M kinetika érvényes, és nincs S akkumuláció, akkor az anyagtranszport sebessége azonos lesz az enzim reakció sebességével:

$$V = k_s a (S_o - S) = \frac{V_{max} S}{K_m + S}$$

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

40

RÖGZÍTETT ENZIMEK KINETIKÁJA Külső anyagátadás

$$V = k_s a (S_o - S) = \frac{V_{\max} S}{K_m + S} \quad \text{Túl sok a paraméter! } (k_s, v_{\max}, S_o, K_m, a)$$

Transzformáljuk DIMENZÓMENTESSÉ!!!

Legyen $x = S/S_o$ és $\kappa = K_s / S_o$

$$\frac{k_s a S_o \left(1 - \frac{S}{S_o}\right)}{V_{\max}} = \frac{\frac{S}{S_o}}{\frac{K_s}{S_o} + \frac{S}{S_o}} \quad \frac{1-x}{Da} = \frac{x}{\kappa+x} = \frac{\frac{1}{\kappa}x}{1+\frac{1}{\kappa}x}$$

$$Da = \frac{V_{\max}}{k_s a S_o} = \frac{\text{maximális reakciósebesség}}{\text{maximális anyagátadási sebesség}}$$



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

41

RÖGZÍTETT ENZIMEK KINETIKÁJA Külső anyagátadás

$$Da = V_{\max} / k_s S_o a$$

$Da \ll 1,$
 anyagátadás \gg reakciósebesség

reakció-limitált rezsim

$$V = V_{\max} \frac{S}{K_m + S} \approx V_{\max} \frac{S_o}{K_m + S_o}$$

$Da \gg 1,$
 anyagátadás \ll reakciósebesség

diffúzió-limitált v. transzport rezsim

$$V = k_s a S_o$$

($S=0$ a felületen)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

42

RÖGZÍTETT ENZIMEK KINETIKÁJA Belső anyagátadás

Feltételek a kinetikai leíráshoz:

1. a külső határréteg transzportja elhanyagolható
2. gömbszimmetrikus részecske
3. homogén eloszlás a részecskén belül
4. gátolt diffúzió a pórusokban

Az effektív diffúziós állandó $D_s = D_{so} \frac{\epsilon_p}{\tau} H$

D_{so} - diffúziós állandó a szabad folyadék fázisban

ϵ_p - porozitás= szabad térfogat / teljes térfogat



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

43

RÖGZÍTETT ENZIMEK KINETIKÁJA Belső anyagátadás

ϑ = kacskaringósság = átlagos (h / l)

H = (hindrance) a molekuláris diffúziógátlás mértéke

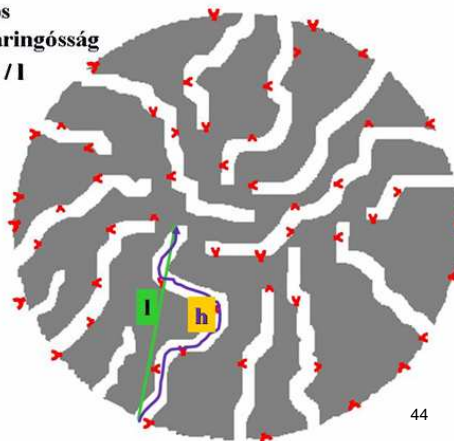
Kiszámítása:

$$H \cong \left(1 - \frac{r_s}{r_p} \right)^4$$

r_s, r_p ekvivalens sugár

Ha a $r_{\text{pórus}} \gg r_s \rightarrow H=1$

Átlagos
 kacskaringósság
 $\tau = h / l$

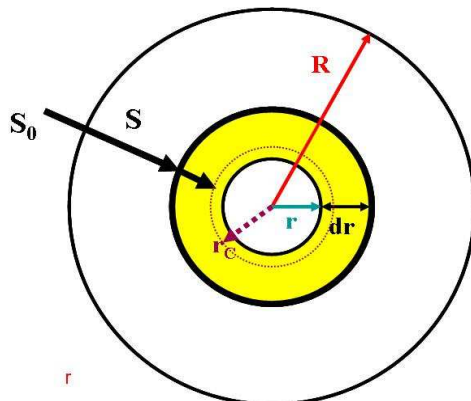


BME Alkalmazott B

44

RÖGZÍTETT ENZIMEK KINETIKÁJA

Belső anyagátadás



anyagmérleg az r és $r+dr$ sugarú gömbhéjra:

$$\left(D_s \frac{dS}{dr} 4\pi r^2 \right)_{r+dr} - \left(D_s \frac{dS}{dr} 4\pi r^2 \right)_r + \text{reakció} = \text{változás a gömbhéjban}$$



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

45

RÖGZÍTETT ENZIMEK

OLDOTT ENZIMEK

Előnyök

- homogén rendszer
- előkészítés nem szükséges
- csak reakció-rezsim van

Hátrányok

- drágák (1-10-50 \$/mg)
- elvesznek
- a terméket szennyezik
- csak szakaszos technológia



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

46

RÖGZÍTETT ENZIMEK

RÖGZÍTETT ENZIMEK

- előnyök
- nem szennyezik a terméket
 - könnyen elválaszthatók
 - újra felhasználási lehetőség
 - folytonos technológia is
- ...ennek általános előnyei
- könnyű terminálás
 - stabilisabb lehet
- hátrányok
- rögzítés költséges (előkészítés)
 - csökken az enzim aktivitása
 - diffúziós gát (transzport-rezsim is)



Enzimtechnikai alapfogalmak

Szakaszos reaktorok: a betáplálás és az elvétel időben elkülönül egymástól.

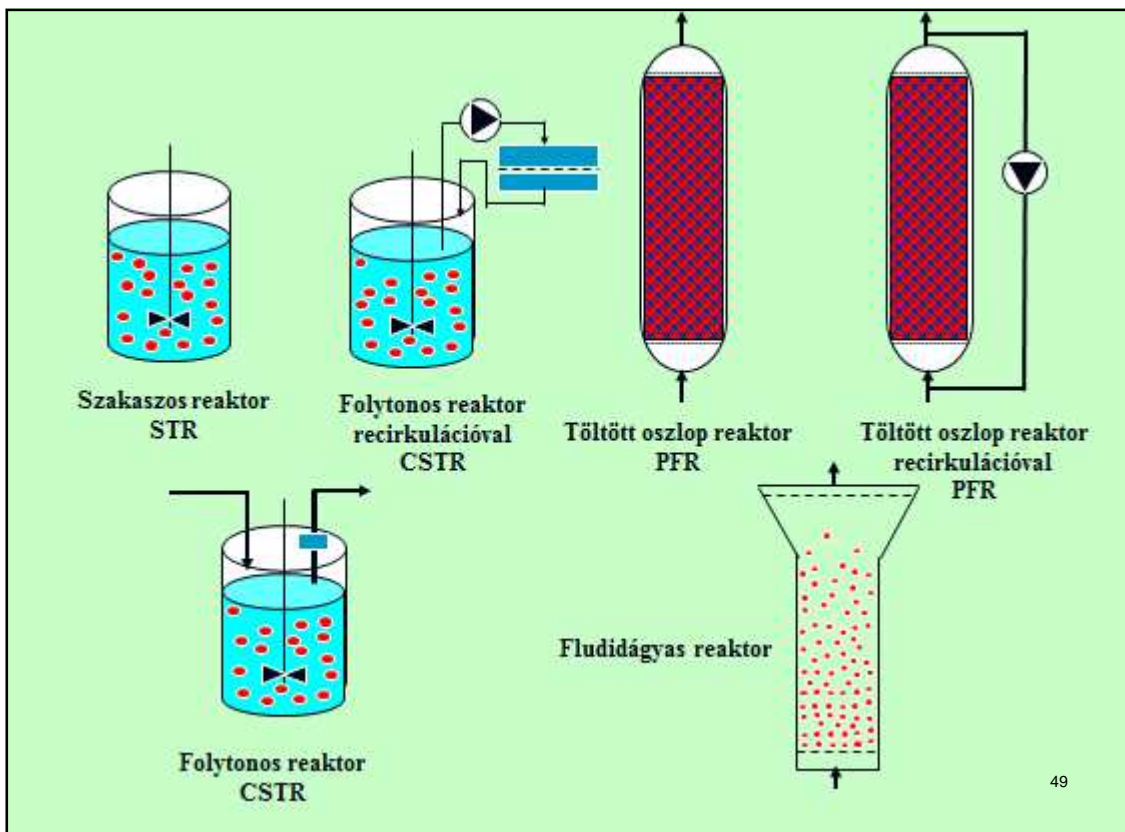
Folytonos reaktorok: a betáplálás és az elvétel egyidejűleg folyik.

Ezek kombinálhatók valamelyik komponens recirkulációjával illetve visszatartásával.

Konverzió:
$$X_s = \frac{\text{átalakult mólok száma}}{\text{kiindulási mólok száma}} = \frac{n_{s0} - n_s}{n_{s0}}$$

Szakaszos reaktorban a konverzió a reakció előre haladásával növekszik, míg el nem éri az egyensúlyt (=egyensúlyi konverzió)





49

Enzimtechnikai alapfogalmak

Hozam: $\frac{\text{szintetizált mólok száma}}{\text{kiindulási mólok száma}} \quad \eta_p = \frac{n_p - n_{p0}}{n_{s0}} \left(\frac{v_s}{v_p} \right)$

Ahol: n_p – a termék mólszáma a reakció végén

n_{p0} – a termék mólszáma a reakció elején

n_{s0} – a szubsztrát mólszáma a reakció elején

v_s – a szubsztrát sztöchiometriai együtthatója (hány mól vesz részt a reakcióban)

v_p – a termék sztöchiometriai együtthatója (hány mól képződik a reakcióban).



Enzimtechnikai alapfogalmak

Szelektivitás: $\frac{\text{szintetizált (céltermék) mólok száma}}{\text{konvertált mólok száma}}$

$$\sigma_p = \frac{n_p - n_{p0}}{n_{s0} - n_s} \left(\frac{v_s}{v_p} \right)$$

Ennek értéke akkor közelít az egyhez, ha nem keletkeznek melléktermékek.

A definiált jellemzők közötti összefüggés:

$$\eta_p = \sigma_p \cdot X_s$$



Rögzített enzimek/sejtek alkalmazása

Aminoaciláz	D,L-aminosavak reszolválása
Glükóz-izomeráz	Glükóz konverziója glükóz+fruktóz 1:1 eleggyé
Penicillin-amidáz	6-amino-penicillánsav előállítása
β -galaktozidáz	Tejcukor hidrolízise glükóz+galaktózzá
Lipáz	Zsírok hidrolízise és átészterezése
Termolizin	Aszpartám gyártás

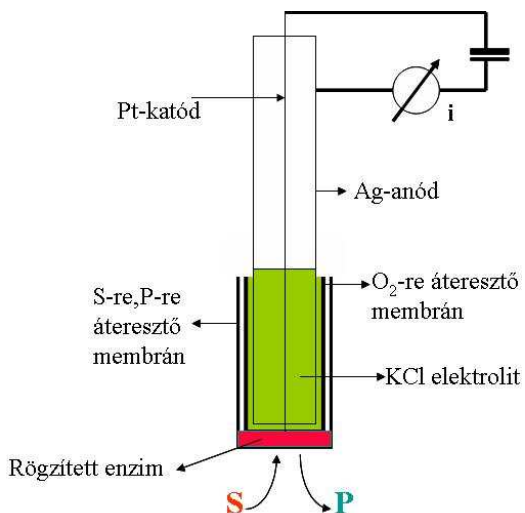
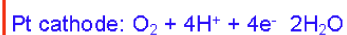
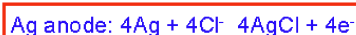


Rögzített enzimek/sejtek alkalmazása

Alapja egy *amperometriás* oldott oxigén mérő elektród, amelyre olyan enzimet rögzítenek, ami oxigént fejleszt vagy nyel el.

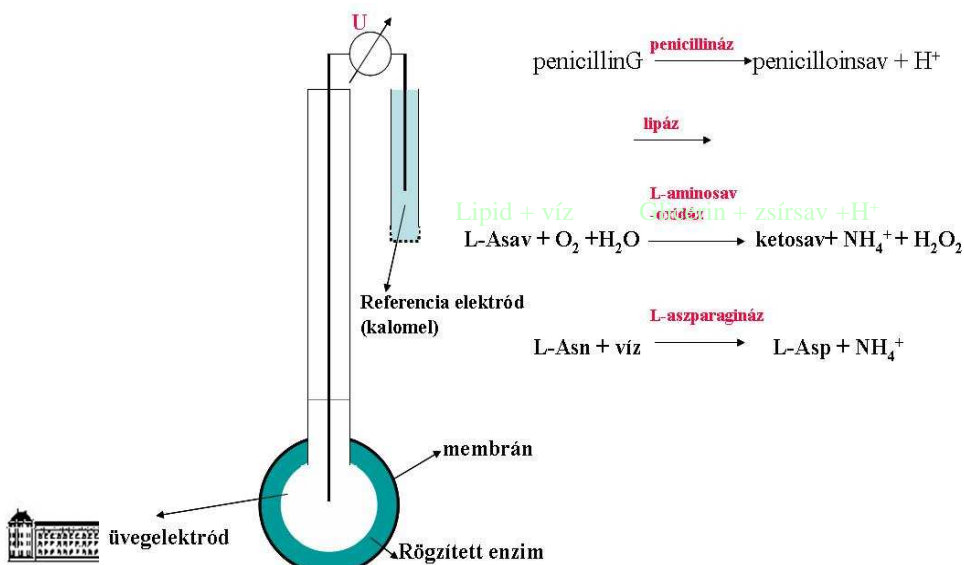
Pl.: glükóz oxidáz + kataláz.

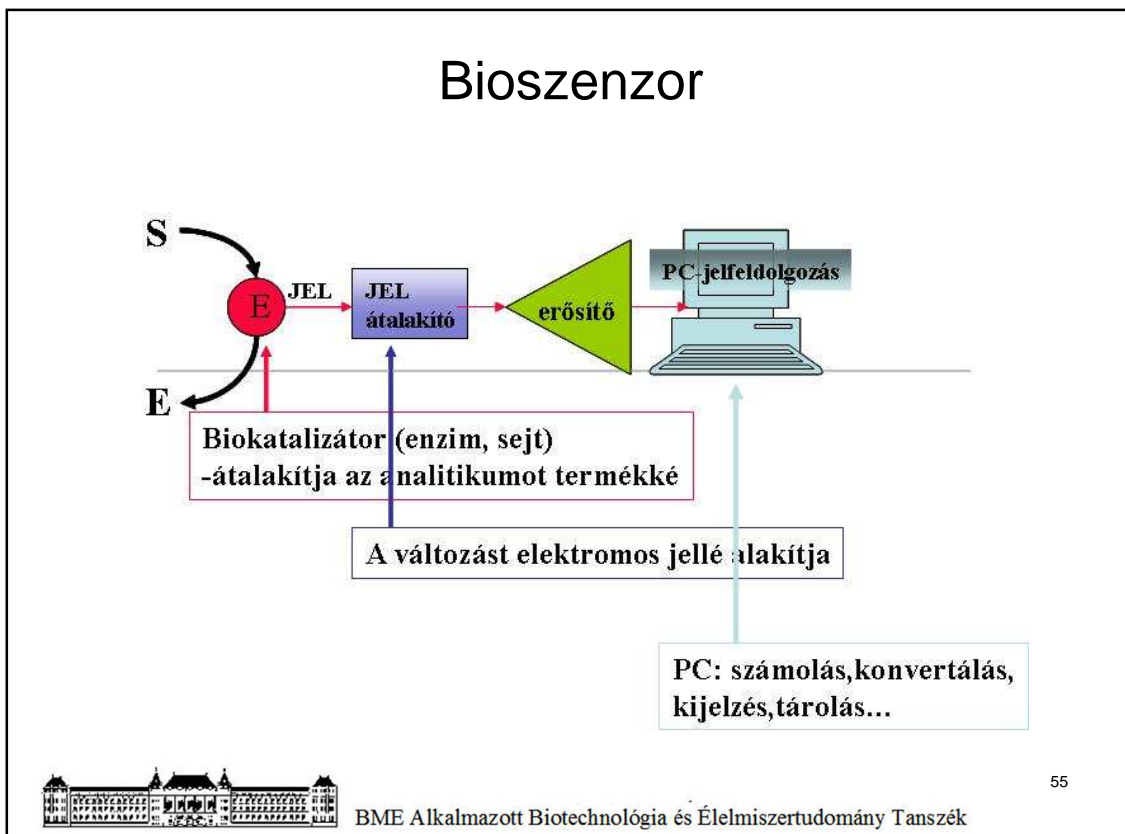
Az elektródfolyamat:



Enzimelektrod-2

Alapja egy *potenciometriás* elvű pH-mérő (üveg)elektrod, amelyre olyan enzimet rögzítenek, ami H^+ ionokat termel vagy fogyaszt.





Enzimek felhasználása **analitikai** céllal

Ez esetben nem az enzim aktivitását mérjük meg, hanem egy vegyület koncentrációját igyekszünk meghatározni.

1. S meghatározása
2. I meghatározása
3. Marker (pl. immun assay-kben)

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Cél lehet: diagnosztika, biokémia

S-meghatározás, reakció végpontig

S + E → P + E

ANALITIKUM → O=C1NC(=O)NC(=O)NC1=O + O₂ + 2H₂O \rightleftharpoons O=C1NC(=O)NC(=O)NC1=O + CO₂ + H₂O

húgysav **allantoin**

Enzim: Urát oxidáz

A

ΔA

$\lambda = 293 \text{ nm}$

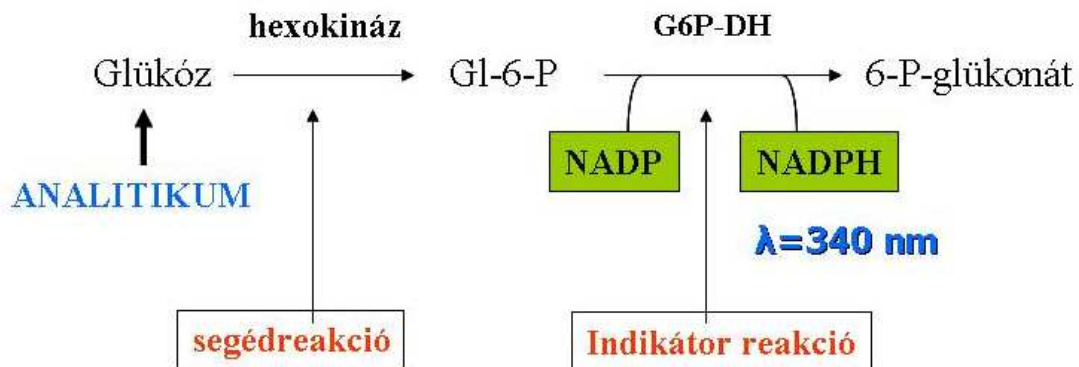
start

idő

A reakció követése:
abszorbancia, pH méréssel

S-meghatározás segédreakcióval

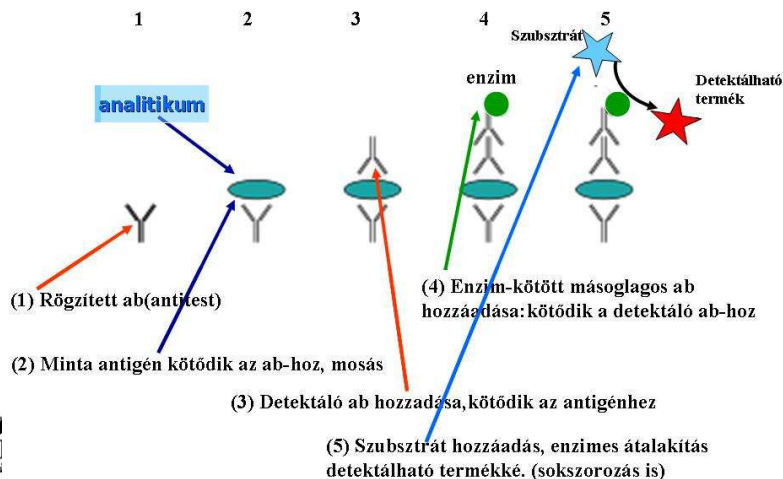
Ha S vagy P nem észlelhetők, egy segédreakcióval mérhetővé tehetjük. Pl.:



Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Az immunreakciók önmagukban láthatatlanok, egy észlelhető enzim reakció hozzákapcsolásával teszik mérhetővé.

Enzyme Linked Immunosorbent Assay: **Sandwich ELISA**



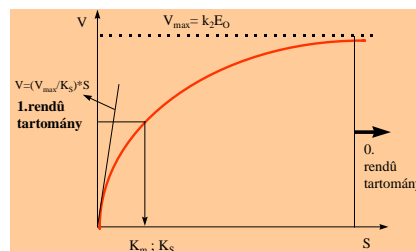
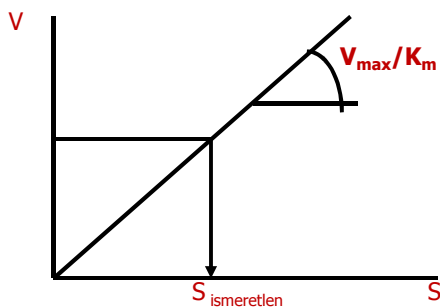
59

S mérés kinetikai vizsgálattal

A M-M görbe kezdeti, lineáris szakaszán a reakciósebesség egyenesen arányos S koncentrációjával.

$$\text{Ha } S \ll K_m \rightarrow V \sim V_{\max}/K_m \cdot S$$

$\nearrow -dS/dt$
 $\searrow dP/dt$



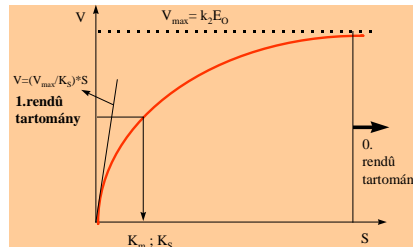
60



S mérés kinetikai vizsgálattal

A M-M görbe telítési, vízszintes szakaszán a reakciósebesség egyenlő V_{\max} -al.

Ha $S \gg K_m \rightarrow V \sim V_{\max} = k_2 E_0$



S így nem mérhető, de inhibitorok vagy aktivátorok meghatározhatók:

Heparin	→	trombin
Inszekticidok	→	acetilkolinészteráz



Követelmények az analitikai enzimekkel szemben

- Specifitás (ne legyen mellékreakció más S-sel)
- Tisztaság
- Stabilitás
- Kinetikai tulajdonságok
- pH optimum
- Oldhatóság (ne csapódjon ki)
- Ár



ENZIMEK ALKALMAZÁSAI

Ipar: amilázok, proteázok, izomerázok, penicillin aciláz, konverziók (pl. az eddigi előadásokban felsoroltak)
Piac: ~2000 MUSD/év

Analitika, diagnosztikumok: glükóz-oxidáz, alkohol dehidrogenáz, koleszterin oxidáz, ... stb

Medicina: proteázok, lipáz, aszparagináz, sztreptokináz, heparináz, ... stb
Piac: ~3000 MUSD/év

Kutatás/génmanipuláció: restriktív endonukleázok, reverz transzkriptáz, DNS-ligáz, DNS polimeráz,



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

63

MEGOSZLÁS IPARÁGAK SZERINT

Élelmiszeripar (ebből keményítőipar)	45% 11%)
Detergens ipar	34%
Textilipar	11%
Bőripar	9%
Papír	1,2%



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

64

IPARI ENZIMEK PIACA

Néhány multi uralja:

NOVO Nordisk (DK)

DSM-Gist (NL)

IBIS

Genencor (USA)

Rhone Poulenc (F)

Solvay Enzym

Miles Chemicals (USA)

USA 40 %

Európa 35 %

Japán 24 %

Enzim	Érték (piac %)
<i>Bacillus proteázok</i>	45
<i>Gliükamilázok</i>	13
<i>Bacillus amilázok</i>	5
<i>Gliükóz izomerázok</i>	6
<i>Rennin (mikrobiális)</i>	10
<i>Amilázok (penész)</i>	4
<i>Pektinázok</i>	3
<i>Proteázok (penész)</i>	2
<i>Egyéb</i>	12



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

65