
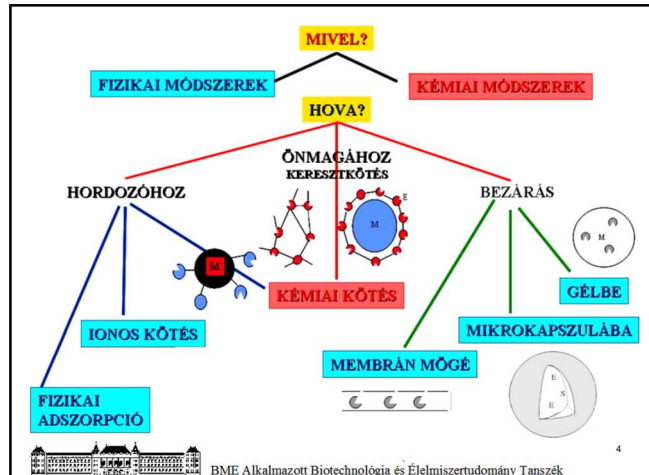


HETEROGÉN FÁZISÚ ENZIMES REAKCIÓK

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 :

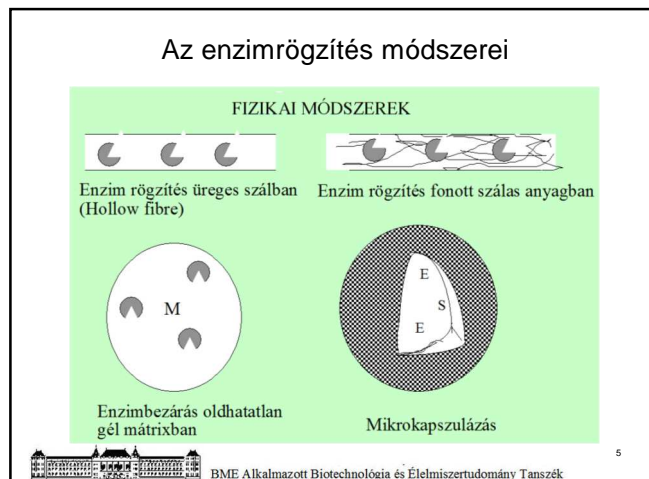
- Az enzimek drágák, 1-10 \$/mg
- Csak egyszer használhatók fel, a reakció után elvesznek, illetve kinyerésük a reakcióelegyből bonyolult és drága.

Technológiai hátrány:

- szennyezik a terméket, tisztítását nehezítik.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék




Az enzim immobilizáció története

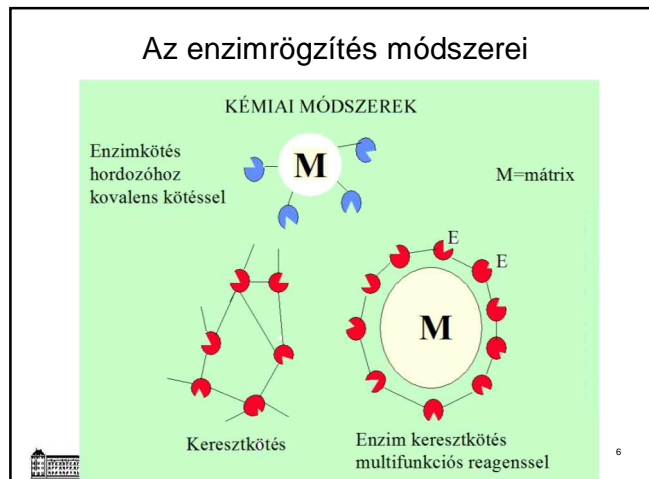
Nelson és Griffin 1916-ban véletlenül fedezte fel, hogy az élesztő invertáza aktív szénen adszorbeálódott, de megőrizte az aktivitását a szaharóz hidrolízisében.

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




Kémiai módszerek

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

$$\text{H}_2\text{N}-\text{R}-\text{X} + \text{E} \longrightarrow \text{H}_2\text{N}-\text{R}-\text{E} + \text{X}$$

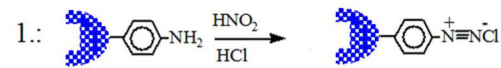
Hordozó lehet:

- természetes polimer:** agar, agaróz, kitin, cellulóz, kollagén,...
- szintetikus polimer:** poliuretán, polisztirol, nylon, ...,
- szervetlen hordozók:** üveg, alumínium, szilikagél, magnetit,...

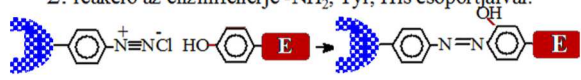



7

Kémiai módszerek: diazotálás

1.: 

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

10


Kémiai módszerek

Kovalens kötés kialakítása:
 szabad α-, β- vagy γ-COOH, α-, β-NH₂ csoportok
 fenil-, OH-, SH- vagy imidazol-csoportok

LÉPÉSEK:

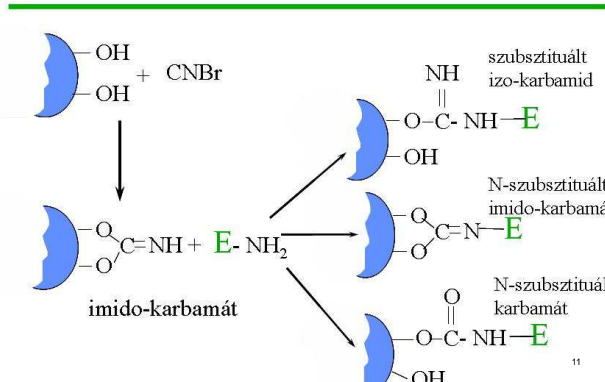
- A hordozó aktiválása (kar és -X, reaktív csoport felvitele),
- a kovalens kötés létrehozása az enzim és az aktivált hordozó között.

Az aktív centrum védelme: S v. analogon jelenléte



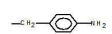
8


MÁTRIX: vicinális -OH : cellulóz, sephadex sepharose



11

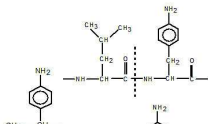
Kémiai módszerek: diazotálás


p-NH₂-benzil-cellulóz 


p-NH₂-benzoi-cellulóz 


SEPHADEX: amino-benzoi származék

Amino kopolimerek:
 poli(-L-Leu+pNH₂-D,L-Phe)



Polisztirol származék 

Poliakrilamid származék
 (BIOGEL, ENZACRYL) 



9

A szénhidrát mátrixok eredete

Glükóz → dextrán → Sephadex®

Tengeri alga → agar(óz) → Sepharose®



12

KÉMIAI MÓDSZEREK 4

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

MÁTRIX: METAKRILÁT és CELLULÓZ származékok homo- és kopolimerjei

$\text{-OH} \xrightarrow[\text{BrCH}_2\text{COOH (dioxán)}]{\text{BrCH}_2\text{COBr}}$ $\text{-O-C(=O)-CH}_2\text{-Br}$

$\text{-O-C(=O)-CH}_2\text{-Br} + \text{-NH}_2 \rightarrow \text{-O-C(=O)-CH}_2\text{-NH-E}$

13

KÉMIAI MÓDSZEREK: bifunkciós molekulákkal

O=C\CCCC=O

GLUTÁRALDEHID

N#Nc1ccc(cc1)-c2ccc(cc2)N#N

DIAZOBENZIDIN

OCNCC(C)CC(C)CC(C)CC(C)NCO

HEXAMETILÉN-DIIZOCIANÁT

OS(=O)c1ccc(cc1)-c2ccc(cc2)S(=O)(=O)N=C=S

4,4'-DIIZOCIANÁTO-BIFENIL-2,2'-DISZULFONSÁV

KÉMIAI MÓDSZEREK: rögzítés üvegfelületre

$\text{-Si-OH} \xrightarrow{(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_2\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2}$ $\text{-Si-O-Si}(\text{CH}_2)_3\text{-NH}_2$

$\text{-Si-O-Si}(\text{CH}_2)_3\text{-NH}_2 \xrightarrow{\text{SCCl}_2}$ $\text{-Si-O-Si}(\text{CH}_2)_3\text{-NCS}$

$\text{-Si-O-Si}(\text{CH}_2)_3\text{-NCS} + \text{-NH}_2 \rightarrow \text{-Si-O-Si}(\text{CH}_2)_3\text{-NH-C(=S)-NH-ENZIM}$

14

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

KÉMIAI MÓDSZEREK: keresztkötések glutáraldehiddel

O=C\CCCC=O

GLUTÁRALDEHID

O=C\CCCC=O

OLIGO-GLUTÁRALDEHID

$\text{O=C-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C=O} + \text{-NH}_2 \rightarrow \text{O=C-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C=N-ENZIM}$

17

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

KÉMIAI MÓDSZEREK: bifunkciós molekulákkal

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

$\text{-NH}_2 + \text{OHC}(\text{CH}_2)_3\text{-CHO} \rightarrow \text{-N=C}(\text{H})(\text{CH}_2)_3\text{-CHO}$

GLUTÁRALDEHID

$\text{-N=C}(\text{H})(\text{CH}_2)_3\text{-CHO} + \text{-NH}_2 \rightarrow \text{-N=C}(\text{H})(\text{CH}_2)_3\text{-CH=N-E}$

E-NH₂

15

KÉMIAI MÓDSZEREK: keresztkötések glutáraldehiddel

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

18

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

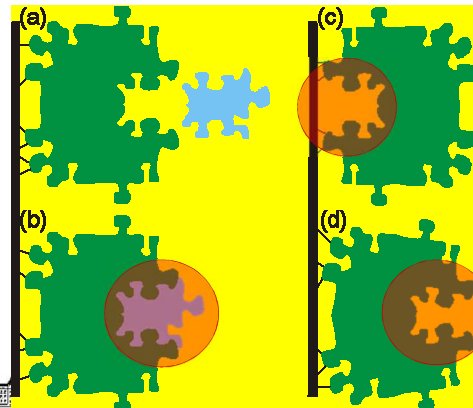
KÉMIAI MÓDSZEREK: keresztkötések glutáraldehiddel

Példa: kataláz keresztkötéses immobilizálása

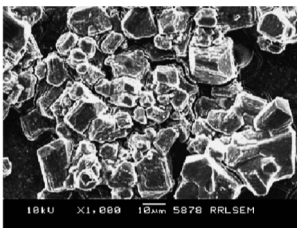
1. Kristályos katalázt oldunk 10%-os NaCl-ben és 0,05 M foszfát pufferrel hígítjuk, míg a kataláz cc. 2 mg/ml lesz.
2. 4 ml 4 %os glutáraldehidet ua pufferben 4 ml-hez adunk és kb egy órát szobahőmérsékleten kevertetjük, amíg zöld rögös csapadék nem válik le. (Egy éjszakán át hidegszobában kezelve hasonló 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.



A kémiai kötés esetleges hatásai: aktivitáscsökkenés



CLEC = Cross-Linked Enzyme Crystals

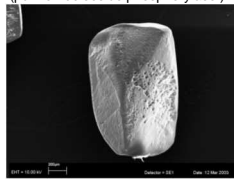


Scanning electron microscopic view of CLEC laccase
 Surface area (m²/g) 2.456

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)



FIZIKAI MÓDSZEREK

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



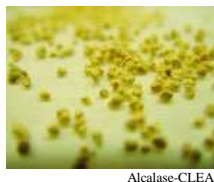
CLEA = Cross-Linked Enzyme Aggregates

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

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



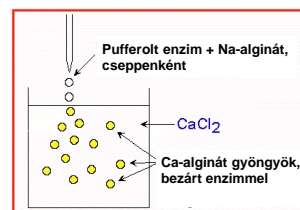
Alcalase-CLEA



Fizikai módszerek

Gélbe zárás: pl. alginát képzés

ALGINÁT: poli-β D-mannuronsav (1→4),-guluronsav
 Hidrofil, kolloid, egyenes láncú polimer



forrása:
Macrocystis pyrifera



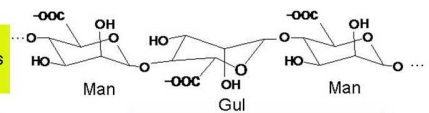
Példa: élesztő alginát gélbe zárása

Példa: *S. cerevisiae* rögzítése kalcium alginátban

- 25 g nedves tömegű *S. cerevisiae* sejtömeget szuszpendáljunk fel steril vízben és jól keverjük össze 50 ml 4%-os nátrium-alginát oldattal.
- A keletkező szuszpenziót nyomjuk keresztül egy szűk csövön (pipettahegy, kb 1 mm átmérő) és csepegtessük bele 50 mM-os pH=6-8 CaCl₂ oldatba.
- A keletkező 2,8-3 mm átmérőjű golyókat inkubáljuk 20-22 °C-on CaCl₂ oldatban, hogy megkeményedjenek a gél szemcsék.



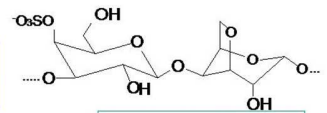
Alginát: mannuronsav, guluronsav 1,4 glikozidos heteropolimerje



polianionos

Oldat: víz gél: Ca²⁺, Zn²⁺, Al³⁺

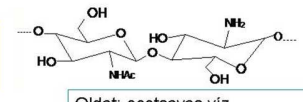
κ-karragén: galaktóz és 3,6 anhidro-galaktóz helikális biopolimerje



polianionos

Oldat: víz gél: Ca²⁺, K⁺

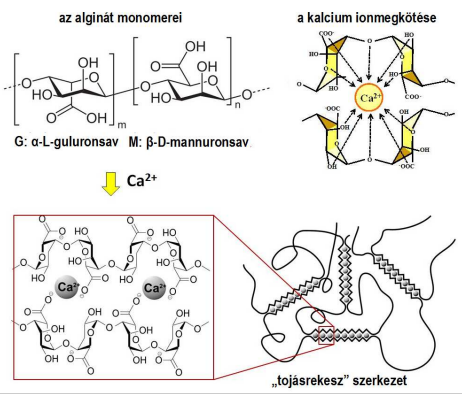
Kitozán: részlegesen dezacetilezett N-acetilglükózamin polimer



polikationos

Oldat: ecetsavas víz gél: polifoszfátok, pH változás

A Ca-alginát gél szerkezete



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.

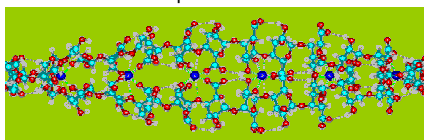
Sűrűre kell venni – 100-400 nm pórusméret – hogy az enzim (300-2000 nm) „beszoruljon”. Két-három mm-es gyöngyök.



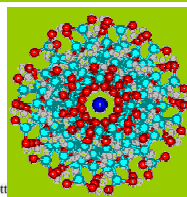
A Ca-alginát gél szerkezete

A Ca-ionokat közrezáró két lánc spirált alkot:

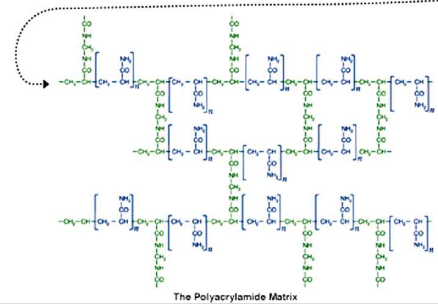
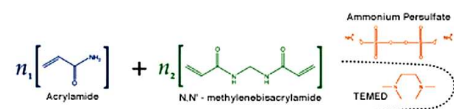
Oldalnézet:



Keresztmetszeti nézet:



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 bepolimerizálódik.
6. A megfelelő alakú szemcsék kialakulása után fizsóval mossuk

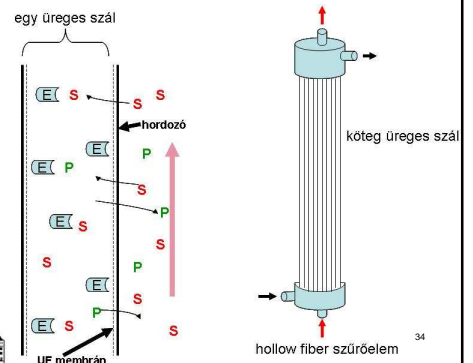


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

31

Fizikai módszerek: bezárás ultraszűrő membránal

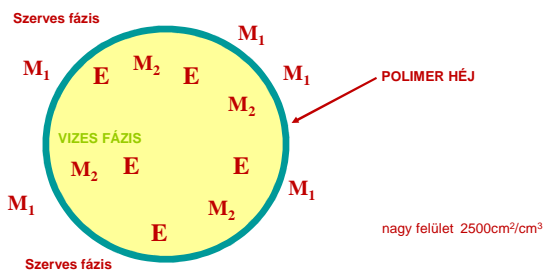
A membrán a szubsztrátot és a terméket átengedi, de az enzimet visszatartja.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

34

Fizikai módszerek: mikrokapszulázás állandó polimer membrános mikrokapszulák



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

32

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

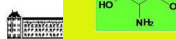
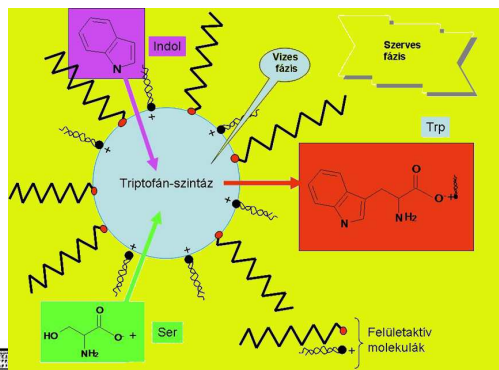


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

35

Fizikai módszerek: mikrokapszulázás

Nem állandó membrános koacervátumok: pl. reverz micellák



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

33

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



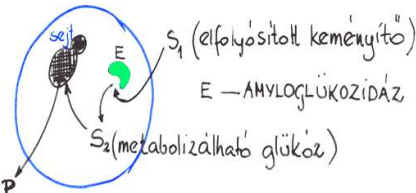
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

36

Sejtek immobilizálása

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

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



37

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 cm²cm³

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

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

40

ENZIM RÖGZÍTÉS MÓDSZEREI

MIVEL?

FIZIKAI MÓDSZEREK

KÉMIAI MÓDSZEREK

HOVA?

hordozóhoz

keresztikötés

bezárás

fizikai adszorpció

ionos

kémiai kötés

gél

membrán

mikrokapszula

38

RÖGZÍTETT ENZIMEK KINETIKÁJA Külső anyagátadás

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

Túl sok a paraméter! ($k_s, v_{max}, S_o, K_m, a$)

Transzformáljuk DIMENZÓMENTESSÉ!!!

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

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

$$\frac{1-x}{Da} = \frac{x}{\kappa + x} = \frac{\frac{1}{\kappa} x}{1 + \frac{1}{\kappa} x}$$

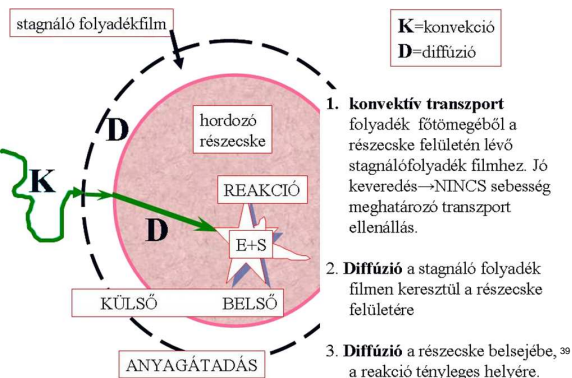
$$Da = \frac{V_{max}}{k_s a S_o} = \frac{\text{maximális reakciósebesség}}{\text{maximális anyagátadási sebesség}}$$



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

41

RÖGZÍTETT ENZIMEK KINETIKÁJA



1. **konvektív transzport** folyadék főtömegéből a részecske felületén lévő stagnálófolyadék filmhez. Jó keveredés \rightarrow NINCS sebesség meghatározó transzport ellenállás.

2. **Diffúzió** a stagnáló folyadék filmen keresztül a részecske felületére

3. **Diffúzió** a részecske belsejébe, ³⁹ a reakció tényleges helyére.

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


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 KINETIKÁJA Belső anyagátadás

ϑ = kacskaringósság = átlagos (h/l)

H = (hindrance) a molekuláris diffúziógátolás mértéke

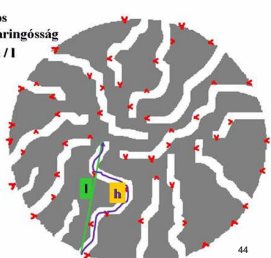

Kiszámítása:

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

r_s, r_p ekvivalens sugár

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

Átlagos kacskaringósság $\tau = h/l$

BME Alkalmazott E 44

RÖGZÍTETT ENZIMEK

RÖGZÍTETT ENZIMEK

előnyök

- nem szennyezik a terméket
- könnyen elválaszthatók
- újra felhasználási lehetőség
- folytonos technológia is
- ...ennek általános előnye
- könnyű terminálás
- stabilisabb lehet

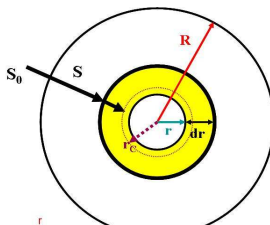
hátrányok

- rögzítés költséges (előkészítés)
- csökken az enzim aktivitása
- diffúziós gát (transzport-rezsim is)




BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 47

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

Enzimtechnikai alapfogalmak


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

Folytonos reaktorok: a betáplálás és az elvétel egyidejűleg folyik.

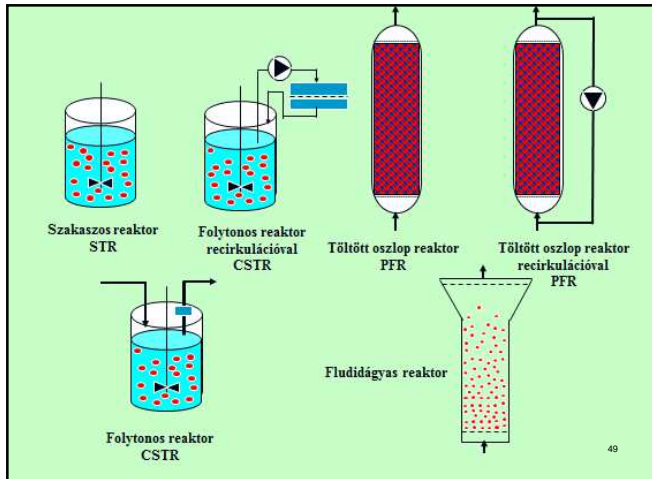
Ezek kombinálhatók valamelyik komponens recirkulációjával illetve visszatartásával.

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)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 48



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-galaktózidáz	Tejcuruk hidrolízise glükóz+galaktózzá
Lipáz	Zsírok hidrolízise és átészterezése
Termolizin	Aszpartám gyártás

Enzimtechnikai alapfogalmak

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

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).

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:

Ag anode: $4Ag + 4Cl \rightarrow 4AgCl + 4e^-$
 Pt cathode: $O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2H_2O$

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:

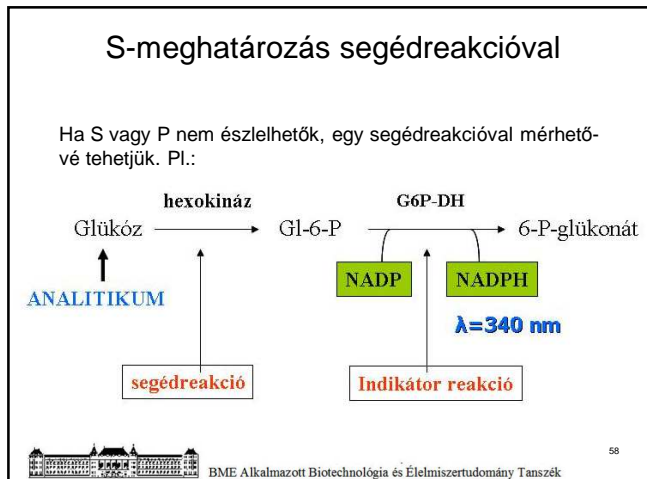
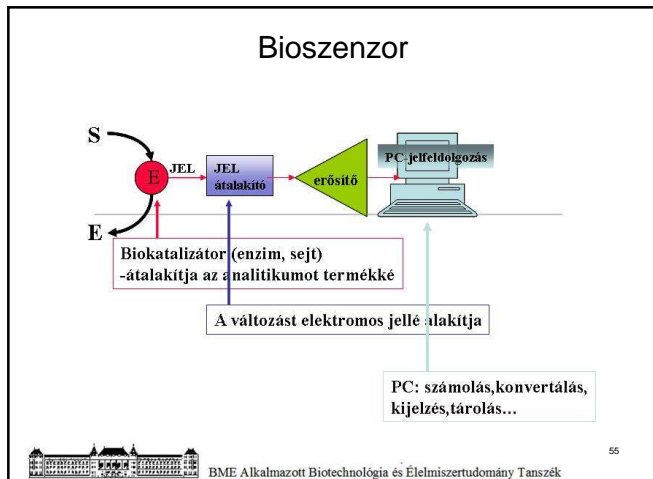
$\eta_p = \sigma_p \cdot X_s$

Enzimelektrod-2

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

Chemical reactions shown:

- penicillinG $\xrightarrow{\text{penicillináz}}$ penicilloinsav + H⁺
- Lipáz \rightarrow
- Lipid + víz $\xrightarrow{\text{lipáz}}$ L-Asav + O₂ + H₂O \rightarrow ketosav + zsírsav + H⁺
- L-Asn + víz $\xrightarrow{\text{L-aszparagináz}}$ L-Asp + NH₄⁺



Enzimek felhasználása **analitikai** céllal

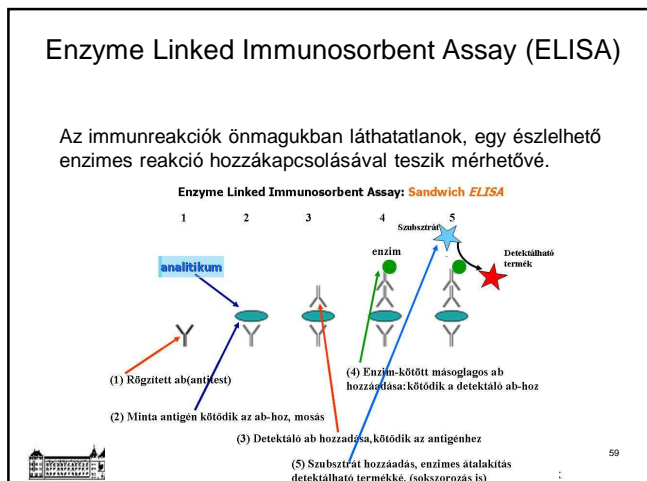
Ez esetben nem az enzim aktivitását mérjük meg, hanem egy vegyület koncentrációját igyekszünk meghatározni.

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

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Cél lehet: diagnosztika, biokémia

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék



S-meghatározás, reakció végpontig

$$S + E \rightarrow P + E$$

ANALITIKUM → húgysav → allantoin + CO₂ + H₂O

A reakció követése: abszorbancia, pH mérés

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

S mérés kinetikai vizsgálattal

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

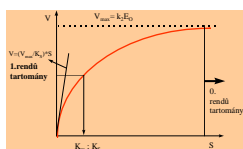
Ha $S \ll K_m \rightarrow V = V_{max}/K_m \cdot S$

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

S mérés kinetikai vizsgálattal

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

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



S így nem mérhető, de inhibitorok vagy aktivátorok meghatározhatók:

- Heparin → trombin
- Inszekticidek → acetilkolinészteráz



MEGOSZLÁS IPARÁGAK SZERINT

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



Követelmények az analitikai enzimekkel szemben

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



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 %)
Bacillus proteázok	45
Glikamilázok	13
Bacillus amilázok	5
Glikóz izomerázok	6
Remin (mikrobiális)	10
Amilázok (penész)	4
Pektinázok	3
Proteázok (penész)	2
Egyéb	12



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: restriktációs endonukleázok, reverz transzkriptáz, DNS-ligáz, DNS polimeráz,

