


---



# Enzimológia

## Lipáz enzimek

---

Bedő Soma

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

2021.11.04



# Lipidek

## Lipids

### Mi a lipid?

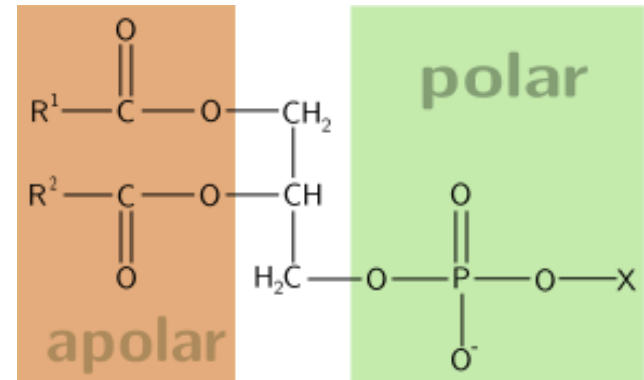
- zsírsavak és származékaik (gliceridek és foszfolipidek)
- zsírok (trigliceridek), viaszok
- szteránvázas metabolitok (koleszterin)

### Jellemzőjük

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

### Funkciójuk

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



a foszfolipidek amfipatikus jellege

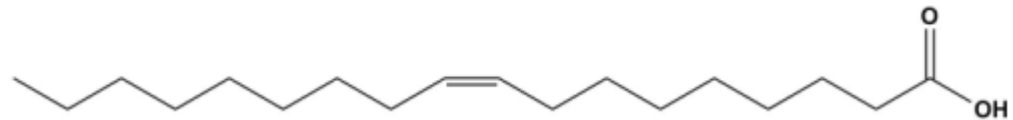


# Zsírsavak

Fatty acids

## Felépítésük

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



szabad zsírsav

## Néhány telített karbonsav / Saturated fatty acids

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

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



### Telítetlen zsírsavak / Unsaturated fatty acids

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

### Néhány telítetlen karbonsav

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

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

# Növényolajok zsírsavösszetétele

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



# Zsír-sav-észterek - viaszok

Fatty esters – wax esters

## Mi a viasz?

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

## Előfordulás

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

## Felhasználás

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



finomított rizskorpa-  
és napraforgó-viasz

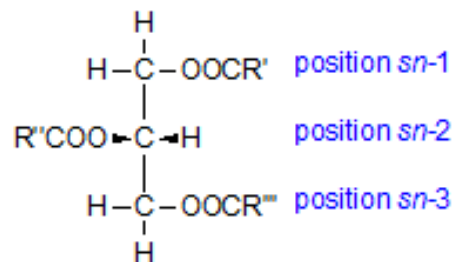


# Glicerolipidek

## Glycerolipids

### Felépítésük

- mono-
- di-
- triszubsztituált glicerin
- Fischer képletben:

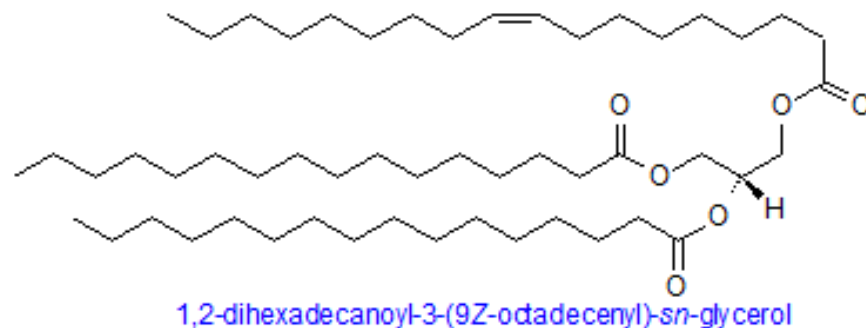


Fischer projection of a triacyl-*sn*-glycerol

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

### Trigliceridek / Triglycerides

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



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

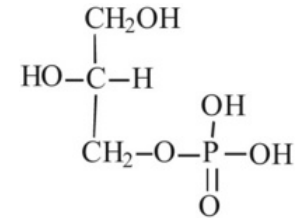


# Foszfolipidek / foszfamidok

Glycerophospholipids / phospholipids

## Felépítésük

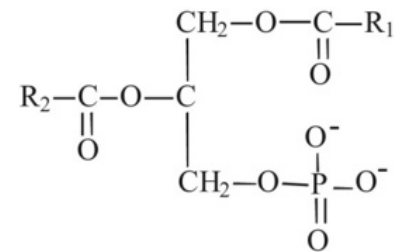
- glicerín +
- 2 zsírsav +
- foszforsav +
- 1 N-t tartalmazó molekula (alkohol észteresíti a foszfamidtsavat)



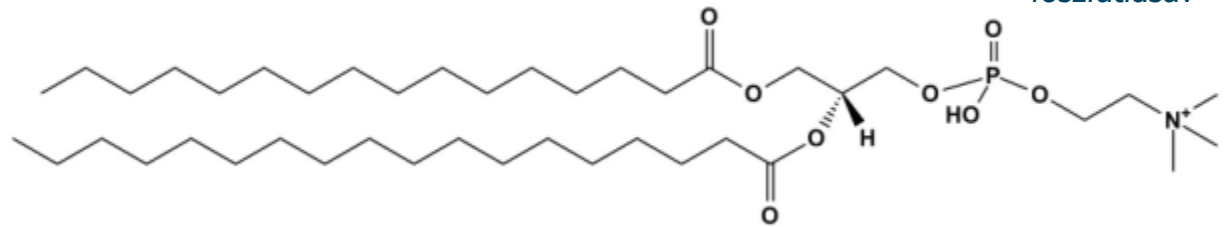
glicerín-3-foszfát

## Jellemzőik

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



foszfamidtsav



foszfamid

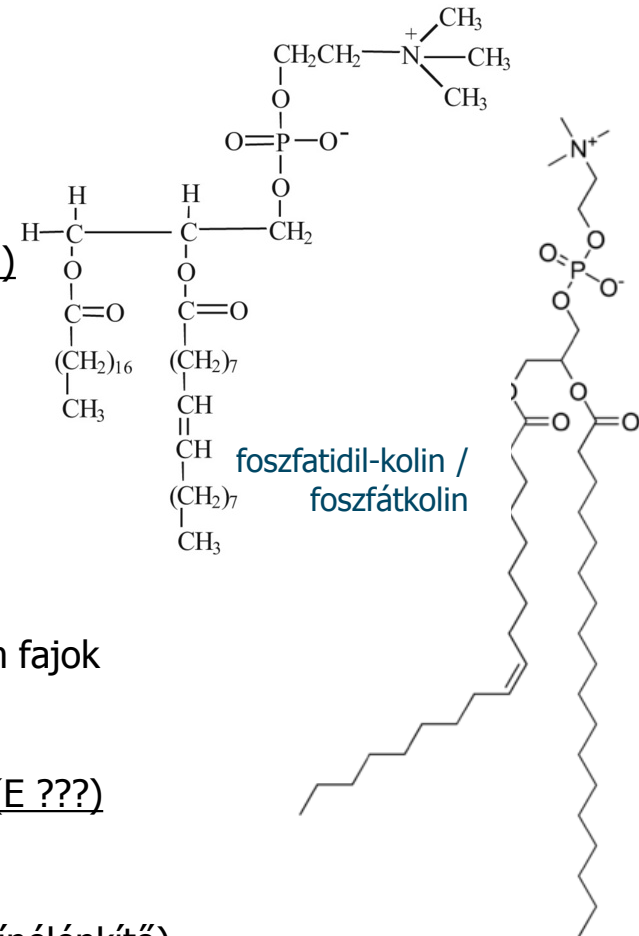


# Foszfolipidek / foszfátidok

Glycerophospholipids / phospholipids

## Technikai lecitin

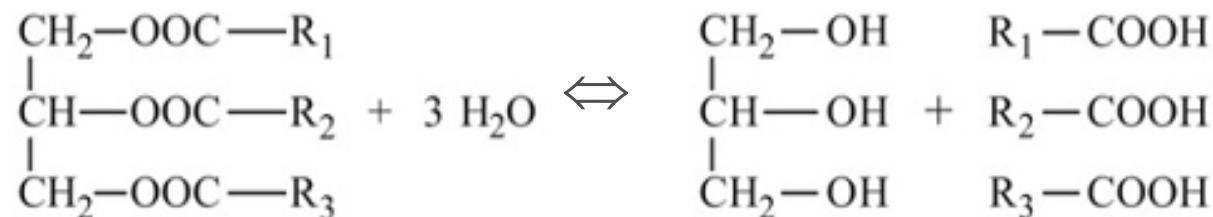
- sárgás-barnás zsíros anyag  
glikolipidek, trigliceridek, foszfolipidek keveréke
- előfordulása  
állati és növényi szövetekben, tojássárgájában (lekithos ógörögül)
- kinyerése  
napraforgó olaj nyálkátlanítása  
→ nyálka üledék (olaj, víz, lecitin) bepárlása
- élettani hatása
  - koleszterin-csökkentő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





## Jellemzőik

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





## Szerkezetük

- $\alpha/\beta$  hidroláz
- többféle mechanizmus, határfelületen való megkötődés  
katalitikus triád: szerin (mint nukleofil) + savas aminosav (ált. aszparaginsav) + hisztidin

## Hol termelődnek az emberi szervezetben?

- száj
- gyomor
- hasnyálmirigy

## Hol működnek?

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



### Reakcióik

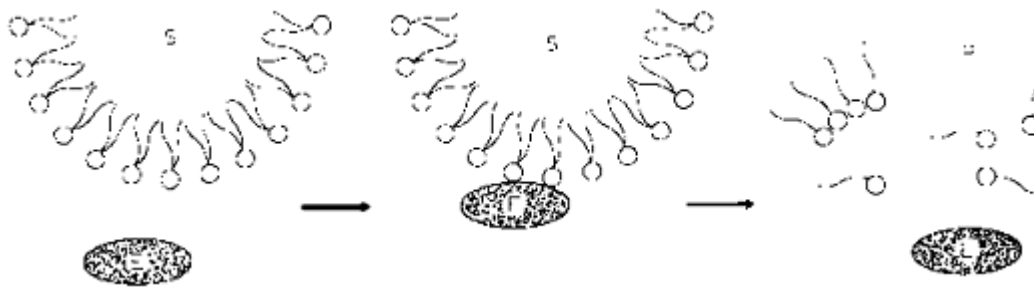
- észter hidrolízis
- észter szintézis
- átészterezés
  - alkohollal
  - észterrel
  - savval

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

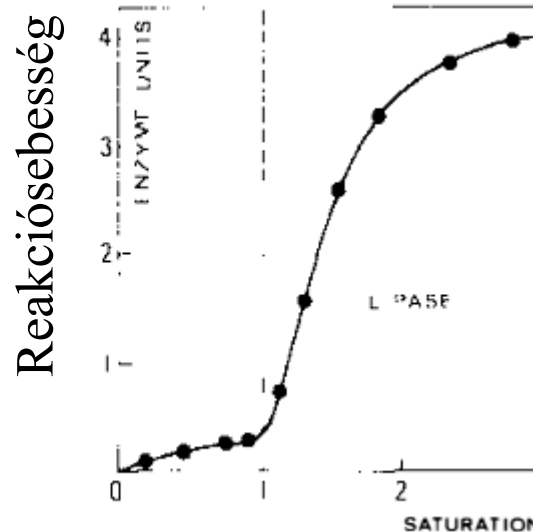
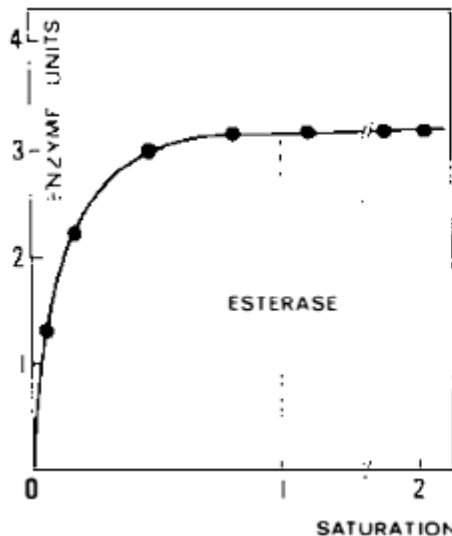


# Lipázok vs. észterázok

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



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



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

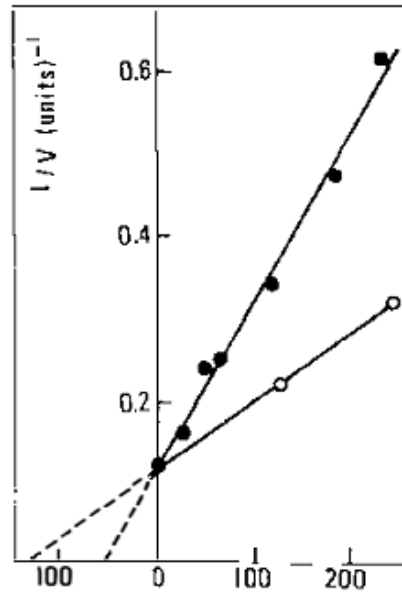
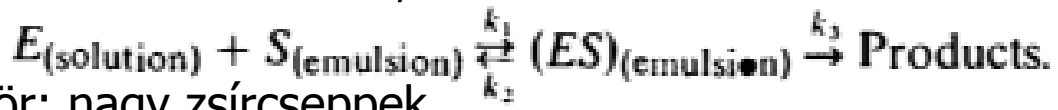
A lipáz aktivitás ugrásszerűen nő, ha a triacetin oldhatóságát meghaladja a szubsztrátkonc. (a telítettség > 1) → két fázis van jelen, és a lipáz a közöttük lévő határfelületen aktív



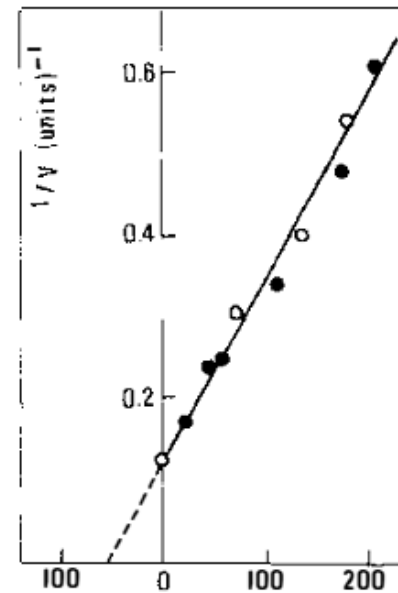


# Lipáz kinetika

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



1/S  
S: anyagmennyiség/térfogat



1/S<sub>A</sub>  
S<sub>A</sub>: felület/térfogat





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



# Lipid-víz kétfázisú rendszerek

- I. Lipid emulzió

A hidrofób tulajdonságok dominálnak

- II. a) Lipid kettősréteg és b) Liposzóma

Megjelenik töltés a molekulában

Pl. foszfolipidek

- III. Micella

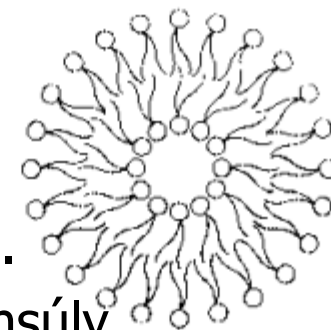
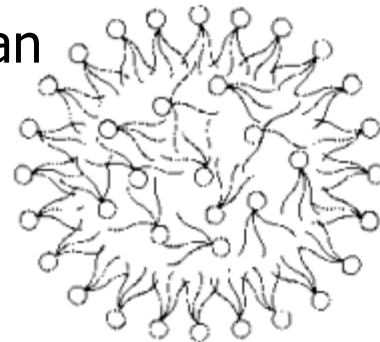
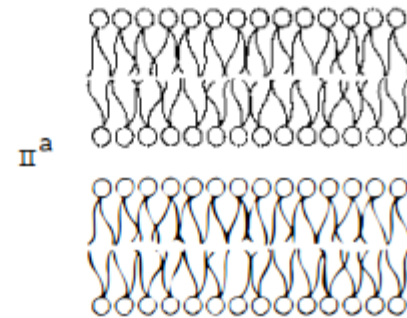
Egyre polárosabb a molekula

Rövidebbek a zsírsavláncok

Kis koncentrációban teljesen oldatban vannak

CMC (kritikus micella koncentráció) felett gömb v. pálca, de optikailag tiszta a folyadék, gyors egyensúly

Pl. detergens







# Lipáz források, termékek

Sources of lipases, products

## Enzimforrások / Sources

### ▪ állati szövet

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

### ▪ mikrobiális

előgyomor enzimek helyettesítésére  
egyedi lipázok vagy enzimkeverékek

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

## Kereskedelmi termékek

- folyadék extraktum
- vákuum- vagy fagyasztva szárított
- immobilizált



# Lipázok ipari felhasználása

Industrial uses of lipases

## Ipari felhasználás területei

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



# Kereskedelmi lipázok

Commercial lipases

## Novozymes

- olaj- és zsír feldolgozás
- tésztagyártás, sütőipar
- tejipar
- kontakt lencse tisztítószer
- bőripar
- detergens ipar
- textilipar
- állateledel
- papíripar
- egyéb biokatalízis

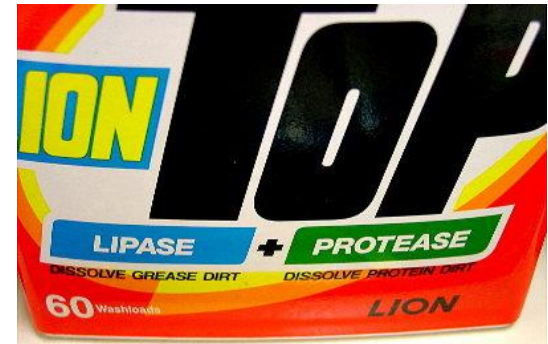
- ▶ Finizym® W
- ▶ Lecitase® Novo
- ▶ Lecitase® Ultra
- ▶ Lipopan®
- ▶ Lipozyme®
- ▶ Noopazyme®
- ▶ Novozym® 27080
- ▶ Novozym® 46016
- ▶ Palatase®
- ▶ Clear-Lens® LIPO
- ▶ Greasex®
- ▶ Lipex®
- ▶ Lipolase®
- ▶ NovoCor® ADL
- ▶ NovoCor Soaking O
- ▶ NovoCor Zyminc O
- ▶ NovoLime®
- ▶ Novozym® 388
- ▶ Novozym® 435
- ▶ Novozym® 525 F
- ▶ Novozym® 735
- ▶ Novozym® 871
- ▶ Novozym® 51032
- ▶ Resinase®





### Detergensek / Detergents

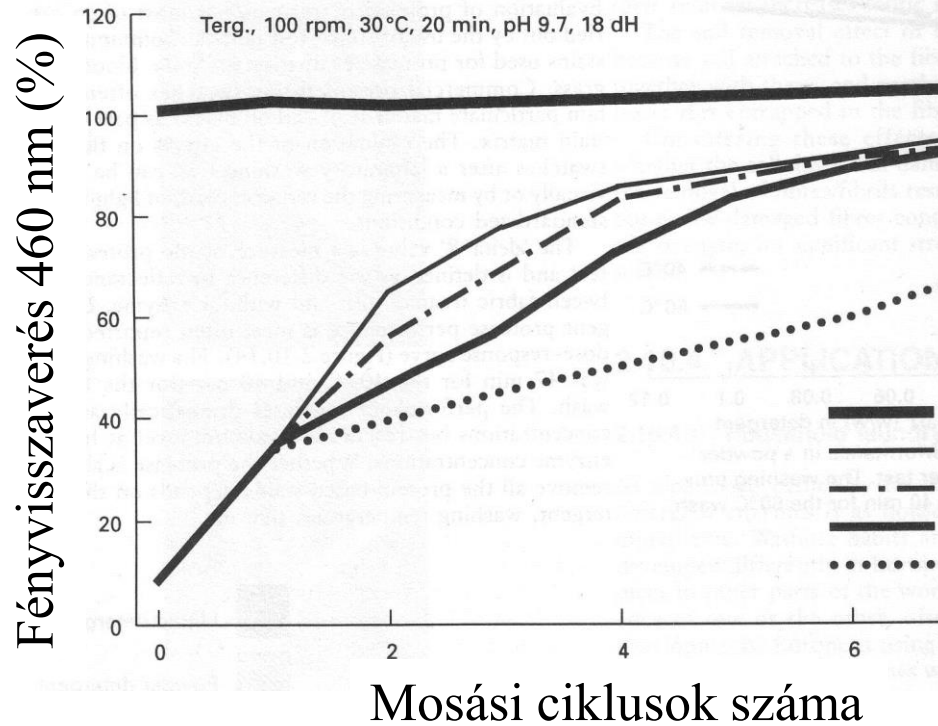
- követelmények
  - lúgos környezetben aktív
  - kis szubsztrát specificitás
  - kompatibilitás a detergensekkel
- teljes lipáz termelés kb. 1/3-a
- kereskedelemben 1988- (Lipolase - Novo Nordisk)
- ipari és háztartási
  - mosó-
  - mosogató-
  - egyéb tisztítószer
- Mosás után a szárítás során a lipáz aktivitás jelentősen nő (következő dia, jobb ábra).  
Oka: 20-30% nedvességtartalmú szövet az optimális az enzim működéshez.  
A feltöltévolítás a következő mosás során hatékonyabb (21 dia, jobb ábra).



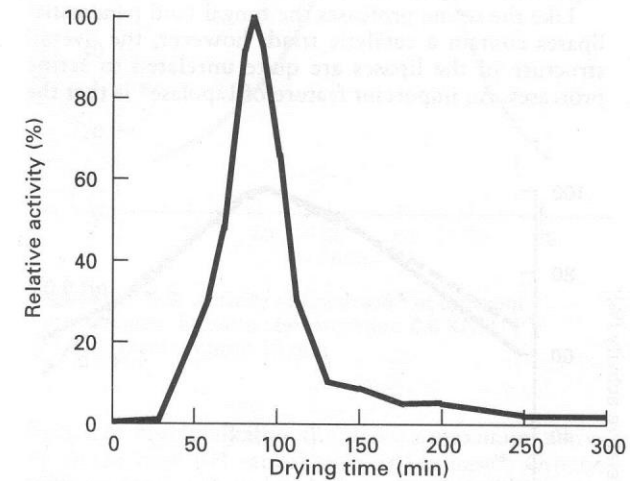


# Tisztítószeresek

## Detergents



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



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



# Tejipar - sajtgyártás

Dairy industry – cheese making

## Tejipar / Dairy industry

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



## Olajkémia ipar / Oleochemical industry

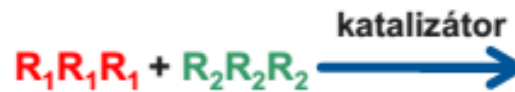
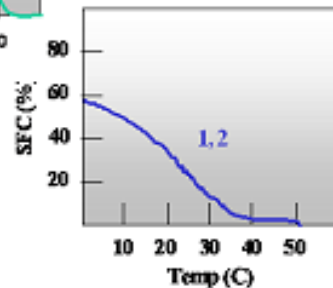
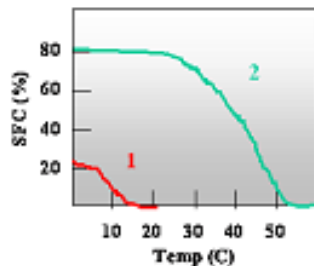
- szerteágazó felhasználási lehetőség, de viszonylag kevés iparosított technológia
  - konzervatív iparág (nagy beruházási költségek)
  - nagy enzimárak  $\Rightarrow$  olcsó (és termostabil) enzimekkel lehet áttörni
- 60 M t zsír és olaj éves termelés a világon
  - nagy energiaigényű kémiai átalakítások
  - magas hőmérséklet, nyomás
  - instabil termék  $\rightarrow$  pl. többszöri desztillációs tisztítás
  - többszörösen telítetlen, hőérzékeny olajok hidrogénezés nélkül nem dolgozhatók fel
- kémiai technológiák  $\rightarrow$  enzimes
  - $\rightarrow$  energia megtakarítás
  - $\rightarrow$  hőbomlás csökkentése
- értéktelen/olcsó zsírok értékesebbé alakítása
  - kémiai keverékekkel  $\rightarrow$  random termékösszetétel
  - lipáz enzimekkel specifikusan, pl. átészterezéssel kakaóvaját pálmaolajból  
(CBE - cocoa butter equivalents)



## Margarin

### ▶ Átészterezés:

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



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



## Gyógyszeripar / Pharmaceutical Industry

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

## Kozmetikai ipar / Cosmetic Industry

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