

Enzimológia

Amiláz enzimek

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék



Bevezetés

- Fontos szénhidrát forrás az emberi táplálkozásban
 - Magok, gyökerek, gumók
- Keményítő tartalmú gabonák termesztése korai időktől (későbbi keményítőipar legfontosabb nyersanyag forrásai)
 - Búza, Kukorica, Rozs, Árpa, Rizs(Ázsia)
- Megjelenik a keményítő maga: Ókor
 - Egyiptom: papír, hajpúder, ruhakeményítés
 - Kína: papír
- Keményítőgyárak megjelenése: Középkor
 - Hollandia, Németország: ruhakeményítés
- Keményítőipar berobbanása: 19. sz.
 - Módosított keményítők felfedezése, dextrinek, édesítők
- Ma
 - Sűrítő, ragasztó, keményítő, textilipar írezés, biodegradálható műanyagok, keményítő lebontási termékek (pl.:izocukor), keményítő átalakítási termékek (pl.:flokkulálószer), üzemanyag alkohol



Termelődése

- zöld növényekben
- legfontosabb emberi szénhidrát-tartalmú táplálékokban:
 - rizs
 - búza
 - kukorica
 - burgonya
 - manióka (trópusok)
- Tároló szövetekben az érés során

Funkciója

- energia-tárolás: elhanyagolható az ozmotikus nyomása ezért, jobb ebben a formában raktározni a növényeknek
- A csírázás során szén és energia forrásként szolgál

Tárolása

- magokban, gyümölcsökben, gumókban, gyökértörzsekben
- félkristályos keményítő granulákként (kukorica: kb. 2-30 μm , burgonya: 5-100 μm)
- a kloroplasztban (levél) és az amiloplasztban (gumó, mag, gyökér)



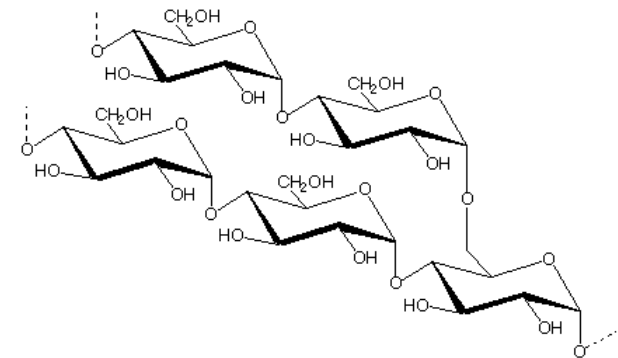
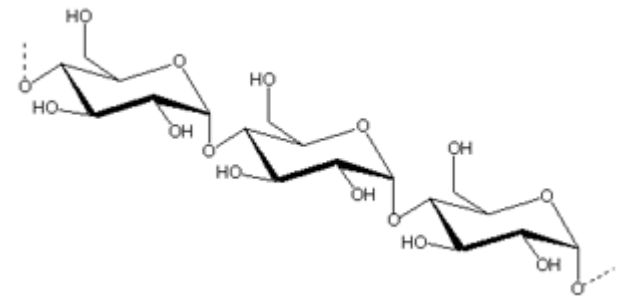
Keményítő

Jellemzői

- fehér
- íztelen
- szagtalan
- por

Felépítése

- szénhidrát
- poliszacharid, monomere: glükóz
- 2 féle glükózpolimer: **amilóz, amilopektin**
 - a növényekre jellemző az **amilóz/amilopektin arány**
 - ♦ rozs: 26% amilóz
 - ♦ kukorica: 22-28%
 - ♦ **viaszos tengeri: 1%**
 - ♦ **„high amylose corn”: 80%**
 - ♦ búza: 17-27%
 - ♦ burgonya: 23%
 - ♦ banán: 17%





Amilóz / α -amylose

- lineáris
- α -1,4
- 10-30%
- burgonya **DP 1000-6000**
kukorica **DP 200-1200**
- redukáló és nem-redukáló vég
- gyengén vízoldható, micellákat képez
→ helikális elrendeződés
- főleg az amilózra jellemző (retrogradáció)
(öreg kenyér morzsásodása)
- jóddal → kék szín

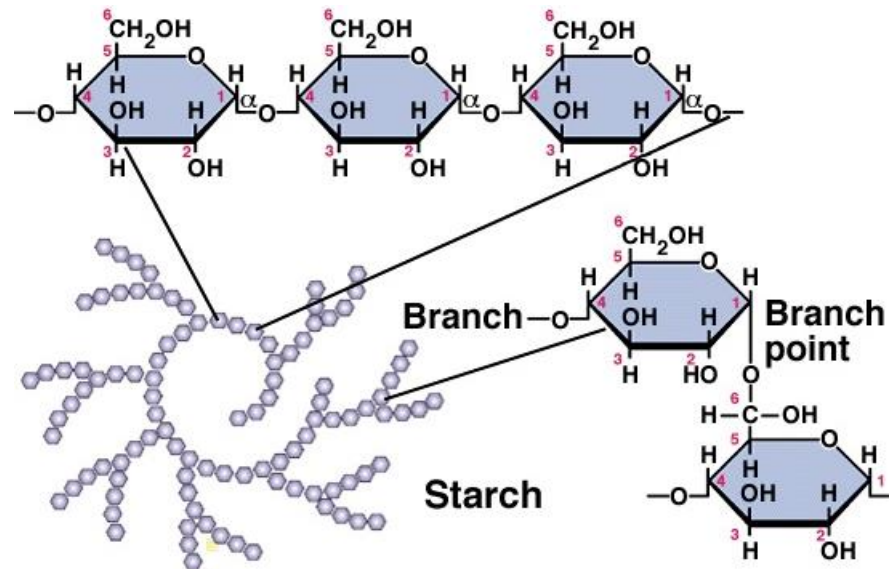


Amylose



Amilopektin / amylopectin

- elágazó
- láncban α -1,4
- elágazás csatlakozás α -1,6
- 70-90%
- elágazás minden 12-30. cukormolekulán
- oldallánc: 15-45 monomer
- DP: akár **>10.000 monomer egység**
- vízben oldódik, micellákat képez
- jóddal \rightarrow vöröses lila szín





Fajtái

- Nativ keményítő
 - Sokféle módosított keményítő termék nyersanyaga
- Waxy corn starch= „viaszos” tengeri keményítő
 - Csak amilopektin
 - Ázsiai kukorica fajta
 - Jóddal piros szín
- High amylose corn starch
 - amilóz > 70%
 - Cukorka gyárak, sűrítés: szószok, gélek
 - Biodegradálható fólia



Fajtái

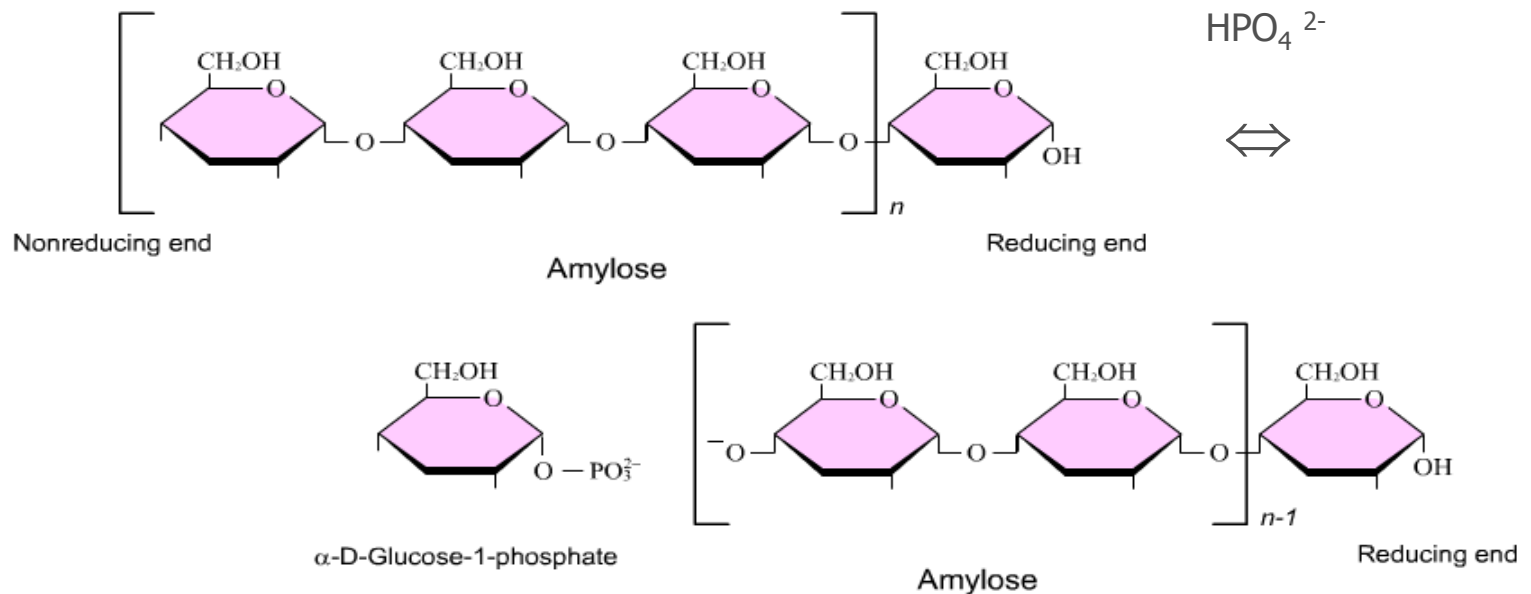
- Kémiaailag módosított keményítők
 - Az ipar (papír, élelmiszer, kozmetikai) számára még inkább megfelelőbb keményítő változatok
 - Fagyasztott, instant ételek állagjavítás, eltarthatóság
- „Természetesen” módosított keményítők
 - Nem utólag kémia módon
 - A növényben történő bioszintézis módosítása
 - Pl. amilóz-amilopektin arány befolyásolása
 - GMO növények



Keményítő

Lebontása a növény által

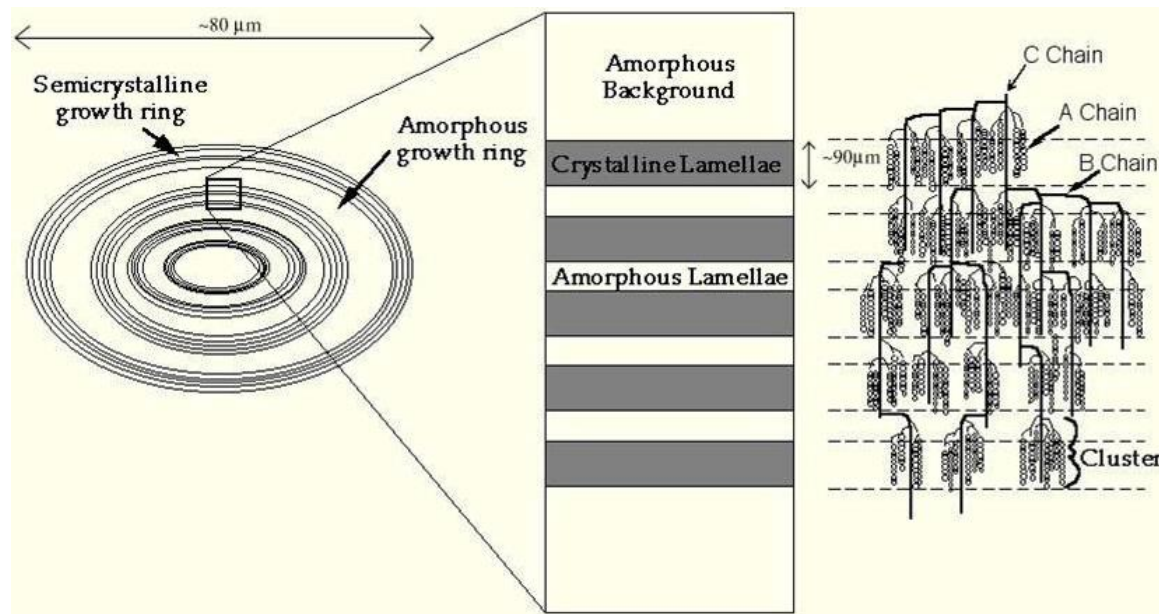
- lépcsőről-lépésre monomerré
- α -1,4 kötések a **keményítő-foszforiláz** által
- α -1,6 kötések az **α -1,6-glükozidáz** által





Lebontása az ember által

- Nyálban és hasnyálmirigyben található amiláz enzimekkel
- főzés → emészthetőség ↑
- rezisztens keményítő: bontás nélkül megy át az emésztőrendszeren





Rezisztens keményítő

- **Bontás nélkül megy át az emésztőrendszeren**, csak a vastagbélben kezdődik el a lebontása, ezáltal jó táptalajt biztosítva az ott élő hasznos mikroorganizmusoknak
 - **RS1:** Olyan keményítő, mely működő sejtekbe van bezárva, így az emésztőenzimek nem, vagy nehezen férnek hozzá pl: egész, vagy durván őrölt gabona magvak, hüvelyesek
 - **RS2:** Olyan keményítő mely nem bomlik le a vékonybélben pl: nyers krumpli, zöld banán
 - **RS3:** Olyan keményítő, mely a retrogradációs folyamatok során keletkezik (irreverzibilis átmenet az oldott formából az oldhatatlanba) pl: megfőzött, majd kihűtött rizs, krumpli
 - **RS4:** Kémiaailag módosított keményítő



Keményítőbontás

- **Keményítő lebontása az iparban**
 - Korábban savas-savas hidrolízis
 - Később savas-enzimes hidrolízis
 - Ma: enzimes-enzimes hidrolízis



Amilázok

- Alfa-amilázok
- Béta-amilázok
- Izoamilázok

- Termelik
 - Baktériumok: *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. coagulans*, *Pseudomonas saccharophila*, *Aspergillus oryzae*
 - Gombák, növények, állatok
 - Ember: nyál, hasnyál
- Endo enzim
 - Nem meghatározott terméket adnak, hanem eltérő hosszúságú malto-oligoszacharidokat
 - Keményítő viszkozitása drasztikusan csökken hatására: folyósító enzim
 - Jóddal adott kék szín eltűnik
- Ca^{2+}
- Előállítás
 - Fermentációval
 - Rátáplálásos
 - Katabolit represszió
 - Keményítő adagolás: C forrás és induktor
 - Extracelluláris termék
 - Kicsapás, Ultraszűrés, Kromatográfia, (Szárítás, Granulálás)

- Termelik
 - Baktériumok
 - Gombák
 - Növények: édesburgonya, szójabab, árpa, rozs
 - Ember, állatok: nem termelik, csak a bélcsatorna mikroflórája
- Exo enzim
 - Nem redukáló láncvégen hasít
- Két nagy csoport
 - Klasszikus béta-amilázok
 - glükóamilázok



klasszikus

- Termelik
 - Baktriumok: *B.polymyxa*, *B.cereus*
- Terméke:
 - ◆ Béta-maltóz + határdextrinek
 - 1,4 kötést bont
- Előállítás: régen malátából ma fermentációval

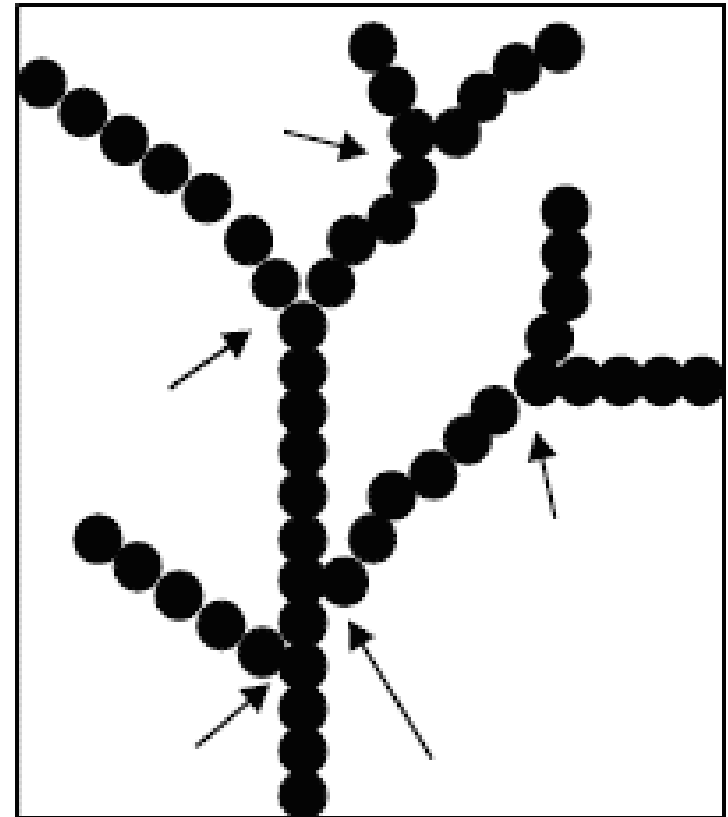
glükoamiláz

- Termelik:
 - Baktériumok: *A. niger*, *A. awamorii*
- Terméke: D-glükóz
 - Cukrosító enzim
 - 1,4 és 1,6 kötést is bont
- Előállítás: fermentációval



Isoamilázok

- Elágazás bontó enzimek
- Endo mechanizmussal bontanak
- 1,6 kötést bont
- Lineáris maltodextrineket eredményez
- Pullulanáz
 - *Aerobacter aerogenes*
 - C forrás: pullulán





Ősbaktériumok által termelt amilázok

- Ősbaktériumok
 - Szokatlan környezetben is képesek megélni
 - Nagy hő
 - Nagy sókoncentráció
 - Termelnek amilázokat
 - Enzimek hőm. optima: ~90°C!
 - Nagy ipari érdeklődés
 - Enzimek génjeinek más mikrobákba történő klónozása

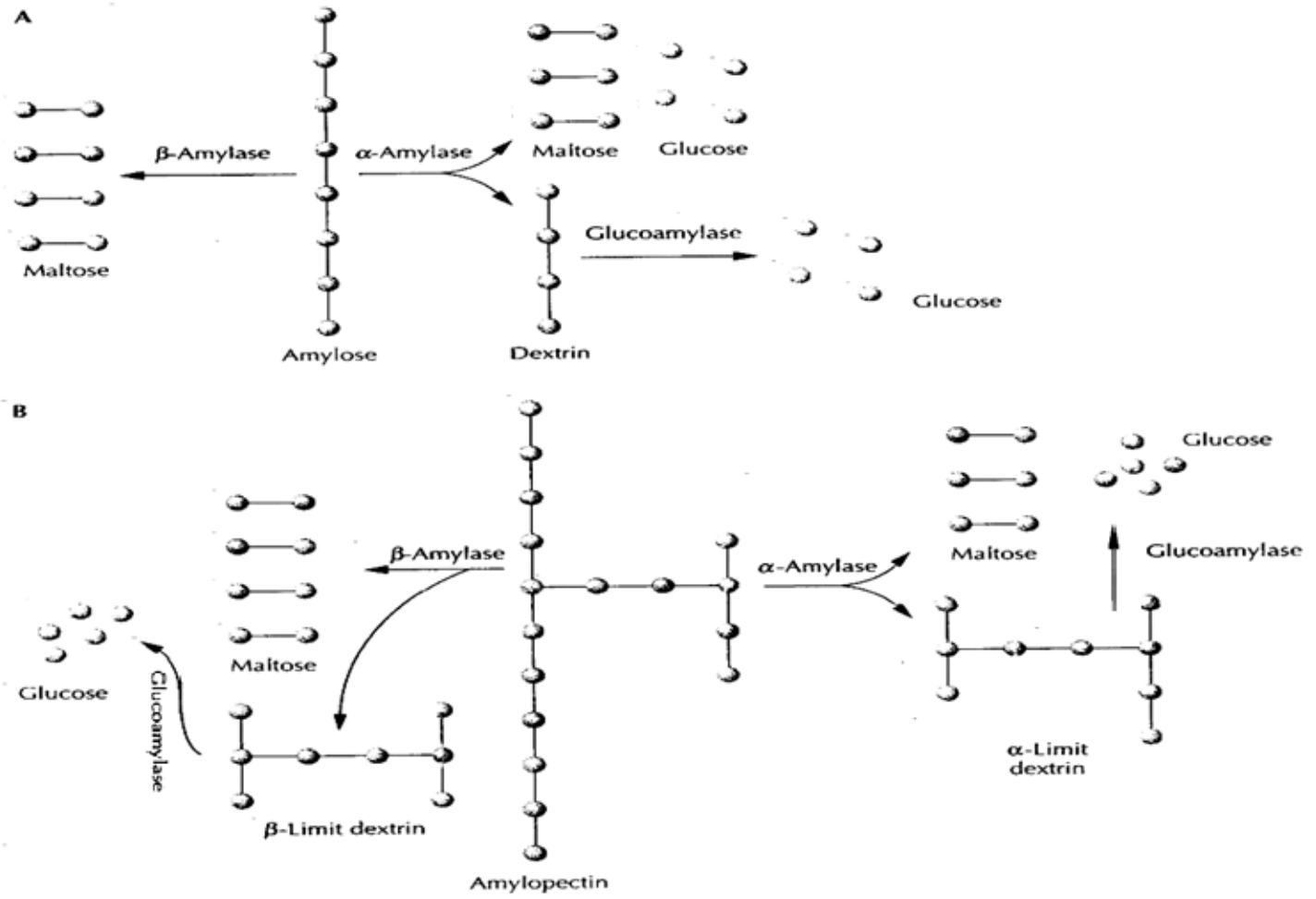
Table 7.1 Thermophilic archaeobacterial amylolytic enzymes⁷⁸

Bacterium	Enzymes	Optimum temperature of activity, °C	Optimal pH of activity	Main products	Location of enzyme ^a
<i>Desulfurococcus mucosus</i>	α-amylase	100	5.5	-	-
	pullulanase	100	5.0	-	-
<i>Pyrococcus furiosus</i>	α-amylase	100	5.0	G4, G5, G6	I
	α-glucosidase	105–115	5.0–6.0	G1	E
<i>Pyrococcus woesei</i>	α-amylase	98	5.5	G2, G5	E
	α-glucosidase	100	5.0–5.5	G1	E
<i>Pyrococcus</i> sp. KOD1	α-amylase	100	5.5	G2, G3	E
<i>Thermococcus hydrothermalis</i>	α-amylase	75–85	5.0–5.5	G3, G4	E
	α-glucosidase	110	6.0	G1	I
	pullulanase	100		α-(1→6) debranching	I
<i>Thermococcus litoralis</i>	isoamylase	125	5.0–5.5	α-(1→6) debranching	E
<i>Thermococcus profundus</i>	α-amylase	80	5.5–6.0	G2, G3	E
<i>Thermococcus zilligii</i>	α-glucosidase	75	7.0	G1	E
	pullulanase	80–95	5.0–5.5	α-1→6 debranching	E

^aE = extracellular; I = intracellular



Amilázok





Aktivitásuk mérése (Nagyon jól definiált körülmények között: Szubsztrát, Termék, pH, T, Reakcióidő)

Az α -amiláz aktivitás meghatározásának alapjai

- a **redukáló cukrok mennyiségének** növekedése
 - keményítő hasítása \rightarrow dextrinek \rightarrow kisebb egységek (maltotetraóz, maltotrióz, maltóz és glükóz)
 - **új cukor redukáló végek megjelenése**
 - pl. dinitro-szalicilsavas eljárás: 3,5-dinitro-szalicilsav oxidálja a glükóz aldehid csoportját \rightarrow 3-amino-5-nitro-szalicilsav keletkezik \rightarrow barnás-sárgás szín, fotometriásan mérhető, **megfelelő cukorkalibráció szükséges**
- a **keményítő-jód komplex kék színének** intenzitáscsökkenése
 - amiláz \rightarrow kezdetben hosszabb molekulájú dextrinek \rightarrow jóddal barnásvörös szín (**kalibráció kell**)
 - keményítő teljes lebomlása \rightarrow az elegy jóddal nem ad színreakciót
- keményítő szuszpenzió **viszkozitásának** változása (**kalibráció kell**)
- **mesterséges szubsztrát** hidrolízise
 - kromofór csoport felszabadulása (**Phadebas tableta, kék szín 620 nm**) gyári kalibráció
 - fotometriásan mérhető



Dextróz egyenérték

- a keményítő **hidrolízis mértéke**
 - **elbontott glikozidkötések száma / kezdeti összes [%]**
 - **redukáló cukor** glükózban kifejezve / teljes szénhidrát mennyiség [%]
 - a **száranyag %-ában** számított redukálóképesség
 - a **keményítő hány %-a** van dextróz (glükóz) formában
-
- **$DE = 180 / (162 \times n + 18) \times 100$**
ahol n az átlagos DP

glükóz DE 100

maltóz DE 53

maltotrióz DE 36

keményítő DE közel 0

fordítva arányos a polimerizációs fokkal, a maltodextrinek móltömegével



Élelmiszeripari-felhasználás

- élelmiszer adalékanyag
 - sűrítő, stabilizáló (pudingok, szószok, salátaöntetek, tészták stb.)
 - rezisztens keményítő
- keményítő bontásából származó egyéb termékek
 - maltodextrinek (dextróz egyenérték, DE 10-20%) – **töltőanyag**, sűrítő
 - keményítő szörp/szirup (DE 30-70) – **édesítő**, sűrítő
 - dextróz (DE 100) – kereskedelmi glükóz
 - Izocukor, HFS (high fructose syrup) (glükózból glükóz-izomerázzal, ioncserés fruktóz elválasztás, majd visszakeverés)
 - cukoralkoholok (cukrok redukálásával v. fermentációval előállított édesítők)
általában nem, vagy kevésbé emelik a vércukrot, alacsony kalória-tartalmúak, nem okoznak fogszuvasodást
 - Etanol



Amilázok felhasználása

Ipari felhasználás

kukorica keményítő bontása

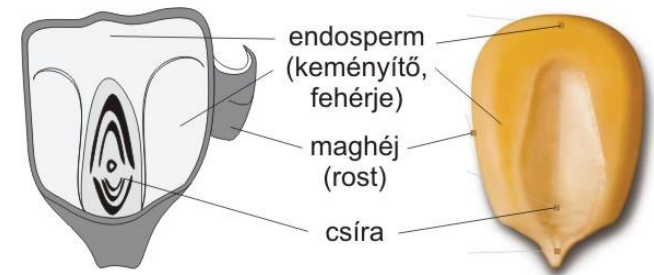
- **glükóz** eá. α -amilázzal, pullulanázzal, amiloglikozidázzal
- **izocukor** eá. (fruktóz 42%) glükózból, immobilizált glükóz-izomerázzal
- **HFS** eá. (fruktóz 55% izocukorból, ioncserével elválasztott fruktóz visszakeverésével)
- **keményítőszörp** eá. Keményítőből (α -amilázzal, amiloglikozidázzal), glükóz + dextrinek, DE kb. 40%; édesipar: cukorkák eá.)
- **maltóz szirup** eá. β -amilázzal



Amilázok felhasználása

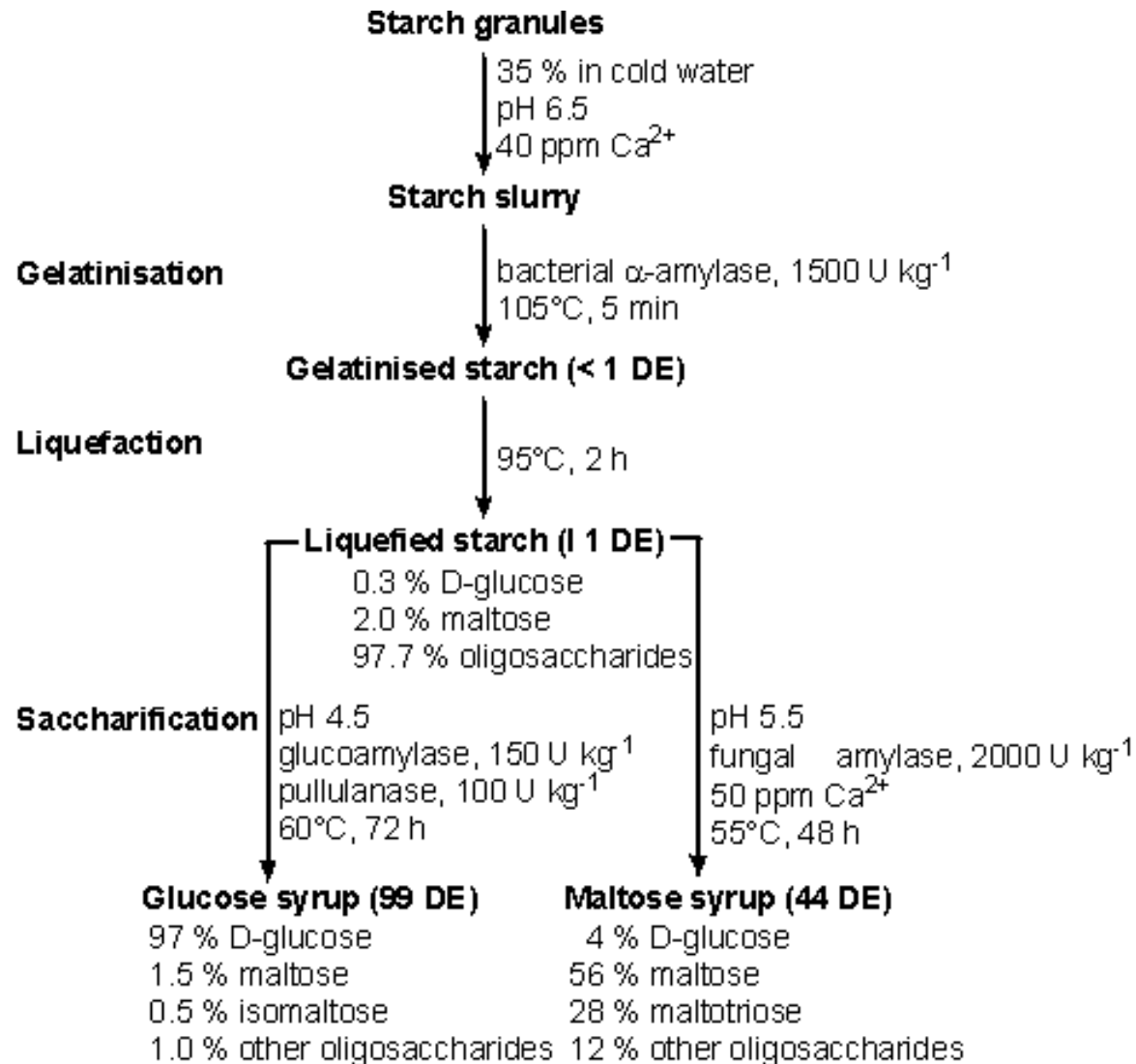
Glükóz előállítása (Isd. Mezőgazd.Iparok)

- kukorica keményítő kinyerése
 - a kukoricaszemekből eltávolítják a fehérjetartalmú csírat
→ állati takarmány/csíraolaj kinyerése
 - a csíratlanított szemeket megőrlik
 - a keményítőt elkülönítik, tisztítják
- előhidrolízis, **elfolyósítás**
 - 105-110°C, 5 perc (gélesítés) → <1 DE
 - 30-40% sz.a. szuszpenzióhoz **α -amiláz** (*B. licheniformis*) (+ 20 ppm Ca^{2+})
 - **85-95°C , pH 6,0**, 1-2 óra → **8-18 DE**
- **elcukrosítás**
 - **amiloglükozidáz** (*A. niger*) + **pullulanáz** (*Bacillus*) → további hidrolízis → glükóz
 - **60°C, pH 4,5**, 48-96 óra → **95 DE**
 - szűrés
- termék: 95-98% glükóz





Amilázok felhasználása





Amilázok felhasználása

Izocukor élőállítása

- kukorica keményítőből eá. glükózoldat tisztítása, ioncseréje (Ca^{++} eltávolítás), sterilizálása
- a glükóz-oldatot (+ MgSO_4 + Na-hidrogénszulfid) **immobilizált glükóz-izomeráz** (xilóz izomeráz) enzimmel feltöltött oszlopokon engedik át (pH 7-8, T:42-45 °C)
intracelluláris E → nehéz kinyerni ⇒ immobilizálják
 - az enzimet *Bacillus coagulans* baktérium tenyésztésével állítják elő (Novozymes)
 - xilóz alapú fermentáció (xilán és xilóz tartalmú búzakorpán)
→ glükóz-izomeráz (xilóz izomeráz) indukciója
 - egyensúlyi reakció → a glükóz egy része fruktózzá izomerizálódik
elméletileg max. 50% fruktóz
rövidebb reakcióidő → kevesebb melléktermék, de így csak **42% fruktóz**
- oldatot tisztítása
töményítése bepárlással **71,5%-ra, hogy az 1 l izocukor édessége az 1 kg kristálycukorral legyen azonos**
- glükóz és fruktóz **kromatográfiás elválasztása**
- **fruktóz bekeverése a 42%-osba**
→ HFCS (high fructose corn syrup) ált **55% fruktóz**



Amilázok felhasználása

Izocukor

- **glükóz-fruktóz elegy tömény vizes oldata**
- élelmiszeriparban édesítőszerként
- nehezen kristályosodik,
- **fűtött tartálykocsikban szállítják (min. 30°C, alacsony hőmérsékleten a fruktóz kikristályosodik)**
- **maltózsörp + izocukor → csökkenti az izocukor kristályosodási hajlamát**
- erős nedvszívó képességű
⇒ megakadályozza a készítmény vízvesztését
- Mo.: Szabadegyháza, Hungrana Kft.

Európa legnagyobb kukoricafeldolgozója

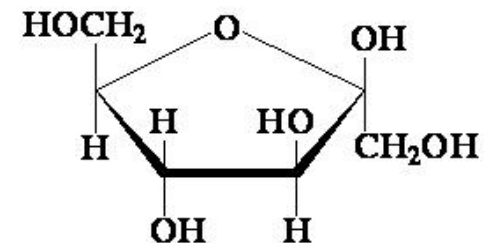
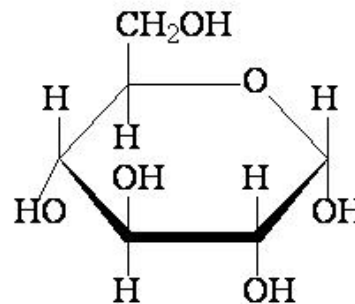
>1 M t/év

(3.500 t/nap feldolgozási kapacitás)

Európa legnagyobb izocukor-kvótája

(220.000 t/év)

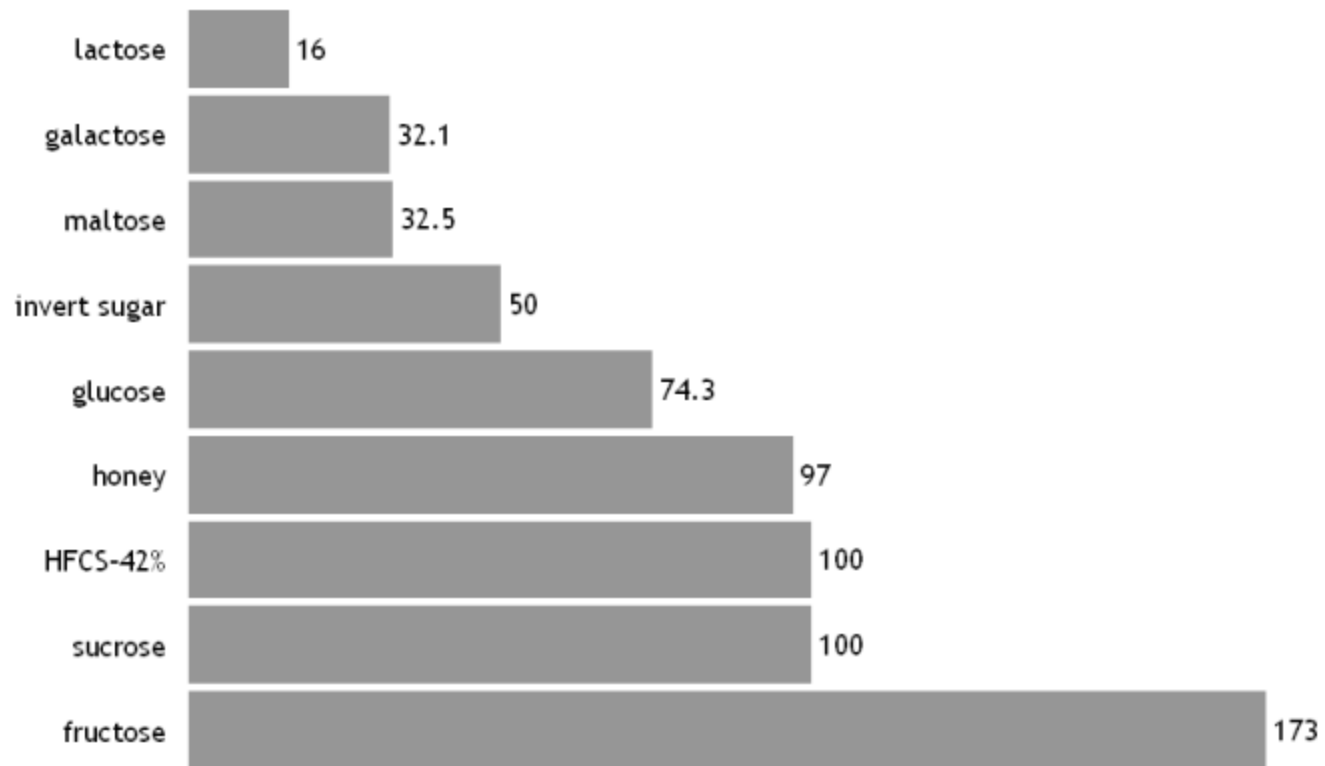
EU termelés 27%-a





Amilázok felhasználása

Relative sweetness of sugars and sweeteners

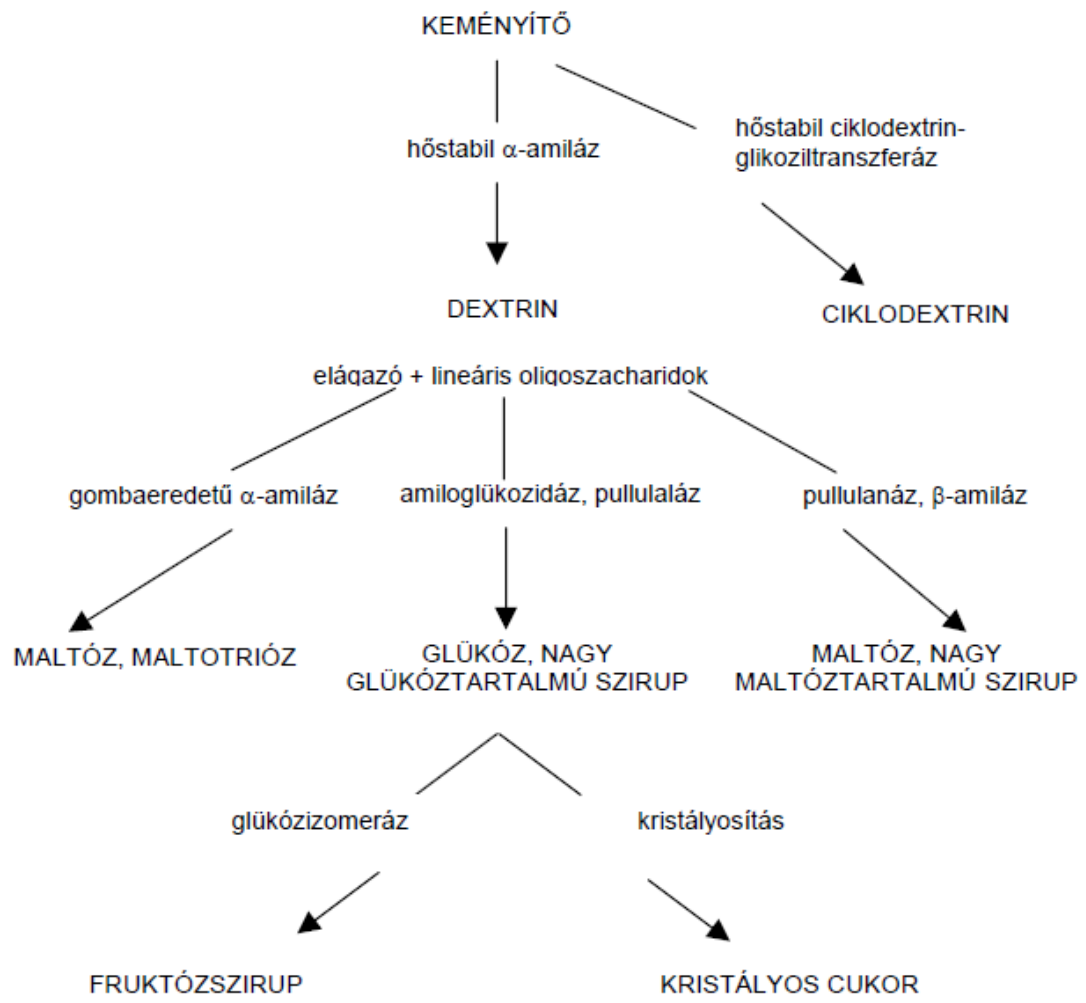




Amilázok felhasználása

cseppfolyósítás

elcukrosítás





Amilázok felhasználása

Keményítőszörpök

- Keményítő savas / enzimes bontása
- savas katalízissel (régebben) → 28-55 DE
- elfolyósítás savval, elcukrosítás amiloglükózidázzal → további lebontás
- hőstabil amiláz felfedezése → még több lehetőség a termék összetételére
- enzimes, enzimes technológia (ma a fejlett világban kizárólag ezt alkalmazzák (folyósítás α -amilázzal, cukrosítás amiloglükózidázzal):
 - porlasztva szárítható termékek (pl. kávékrémporba)
- lekvárokból magas cukor-tartalom → mikrobák növekedését gátolja
- glükóz szirup kedvezőbb mint a szacharóz, mert kevésbé édes
- hagyományos felhasználásuk: keménycukorkákban
- később: italokban (sör) magas maltóz-tartalmú szirupok felhasználása





Ipari felhasználás

▪ papíripar

- felületi enyvezés → szilárdság, felület simasága, fehérség, nyomtathatóság
- hullámpapír ragasztó enyv
- könyvkötés, tapéta, papírzsák, boríték, üveg-cimke ragasztás

▪ textilipar

- pamutszálak bevonása szövés előtt (írezés)
- ruha keményítés
- sima, ropogó élek, szennyeződések könnyebb eltávolítása

▪ Kozmetikai ipar

- hintőpor (talkum helyett)

▪ Bioműanyagok

▪ Bioetanol



Amilázok felhasználása

Ipari felhasználás

- **sütőipar**

cukrok → élesztő C-forrása → CO_2

amiláz → a pékáruk térfogata ↑, állaga javul

- **sörgyártás:** cukor- és alkohol-tartalom beállítása

- **gyümölcslevek:** keményítő-tartalmú gyümölcsök (pl. éretlenül szedett alma)

- **takarmányok** emészthetőségének javítására



Amilázok felhasználása

Sütőipar

- az élesztő erjeszti a cukrokat
→ alkohol és CO₂ keletkezik
→ a tészta megkel
- az **élesztő termel amilázokat**, de hosszadalmas (hosszú idejű kelt tészták, savanyú kenyerek)
- amiláz hozzáadás → a keményítőszemcséinek lebontása kismolekulájú dextrinekre
→ az élesztő tovább tudja bontani ⇒ gyors
- **csíráztatott árpa (maláta) vagy gombaeredetű α-amiláz**
→ megnő a tészta térfogata, és javul a bélzet textúrája, rugalmassága
+ öregedés késleltetése
- már **csékély túladagolásuk ragadós, gumiszerű tésztát eredményez**
 - α-amiláz hatására keletkező elágazó DP 20-100 maltodextrin miatt
 - elágazásbontó enzim, pl. pullulanáz adagolása



Amilázok felhasználása

Textilipar

- a **fonalat szövés előtt** dextrinnel vagy **keményítővel vonják be: írezés**
 - a felületet simává teszik
 - növelik a szilárdságot
- a kész textíliákból amilázzal eltávolítják: **írtelenítés**
 - szelektív eltávolítás, a rostok nem sérülnek
 - előmosás
 - ♦ nedvesítés és a nem keményítő anyagok eltávolítása
 - impregnálás az enzimoldattal
 - ♦ 65-70 / 75-80°C
 - keményítőhidrolízis (már az impregnálásnál is)
 - ♦ 2-16 óra reakcióidő, pH 6-7 (az enzim optimumán), 70-75 / 90-110°C
 - utómosás: az enzim és a hidrolízis termékek eltávolítása
 - ♦ szintetikus detergens + NaOH, 95-100°C, sav hozzáadás a lúg semlegesítésére
- hőtűrő bakteriális amiláz



Amilázok felhasználása

Papíripar

- **primer rostok feldolgozásokor** (fából kinyert cellulóz)
 - **felületi kezelésére** vagy **ragasztóanyagként** alacsony viszkozitású, nagy molekula tömegű keményítő-származékokok, dextrin
 - ennek előállítása: α -amilázzal
- **szekunder rostok felhasználásokor** (hulladékpapír)
 - amilázos kezeléssel a **rostok felülete megtisztítható** az előző feldolgozás során alkalmazott keményítő alapú segédanyagoktól
 - a rost-rost kapcsolat fokozódik
 - **erősebb papírokat lehet előállítani**
 - javulnak a nedvesedési tulajdonságok
 - **a rostosítás gyorsul**