

# Aplikovaná enzymologie

1. Úvod
2. Přehled nejdůležitějších enzymů
3. Technologické využití
4. Biochemické změny v potravinářských surovinách
5. Enzymy v analytice
6. Enzymy v klinické biochemii
7. Biotransformace

## Materiály ke studiu

1. přednášky

2. E-knihy, CIS VŠCHT

Enzymes in industry

<http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/9783527617098>

Industrial enzymes

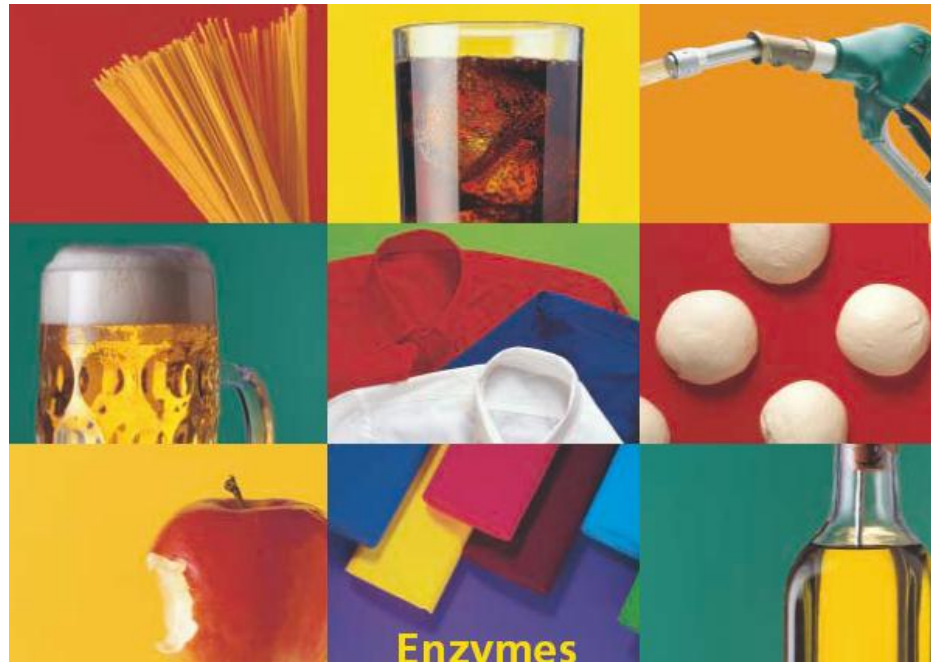
Enzymes in food technology

Předpoklad: enzymologie

# Aplikovaná enzymologie = Enzymové technologie

**OECD 2001** – ET označuje jako významnou součást udržitelného rozvoje průmyslu

**Mezioborová disciplína** – od přímých průmyslových aplikací přes produkci nových farmaceutik až po nástroje pro výzkum



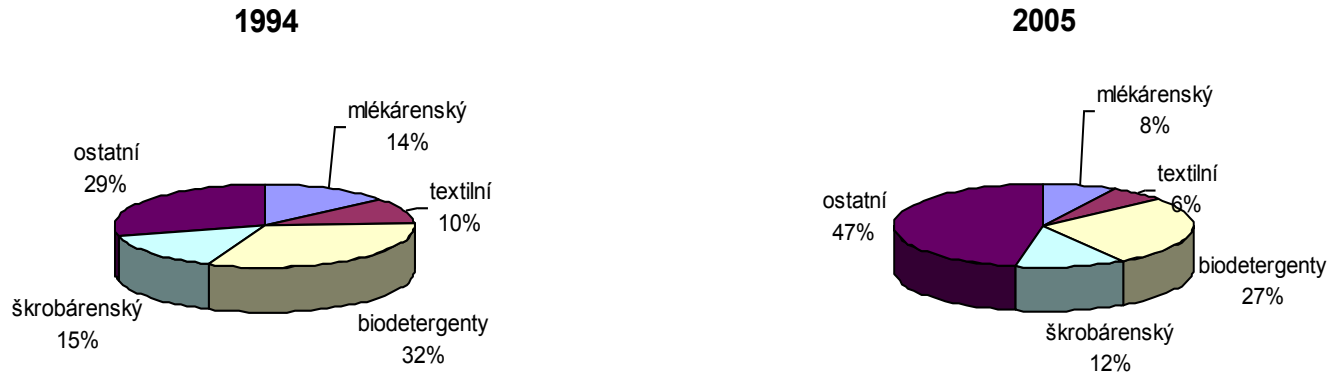
# 1. úvod

- Historie
- Kde všude se enzymy uplatňují?
- Proč používat enzymy?
- .... a které se vlastně uplatňují?
- Složení a forma
- Stanovení aktivity
- Výběr vhodných preparátů
- Zdroje
- Hledání nových enzymů
- Legislativní a bezpečnostní aspekty

# „Trocha historie nikoho nezabije“

- 1833 - diastasa z klíčícího ječmene
- 1834 - enzymová hydrolysa škrobu (Berzelius)
- 1839 – 1897 - 60 let diskusí o úloze kvasinek při fermentaci
- 1894 - takadiastasa (*A.oryzae*)
- 1908 - Otto Röhm – Oropon – koželužství
- 1914 - Burnus – první biodetergent
- 1963 - Alcalasa – bakteriální proteasa Novo
- 1964 - enzymy zaváděny do potravinářství
- 1984 - první enzymy z GMO

# Rozdělení objemu prodeje technických enzymů



## Ostatní

## Potravinářské

Výroba alkoholu

Tukový průmysl

Výroba aditiv

Konzervárenství

Nápojový průmysl

Hydrolýza bílkovin

pekárenství

## Nepotravinářské

Krmivářství

Biotransformace

Diagnostika

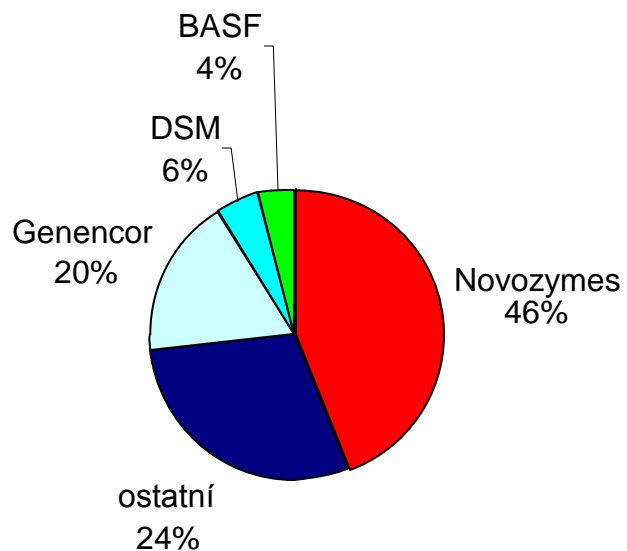
Kožedělný průmysl

Papírenský průmysl

Zpracování odpadů

Výzkum

### Světoví producenti technických enzymů



Rok	Objem prodeje (bil. USD)
1983	0,4
1995	1,0
2000	1,5
2005	1,7 – 2,0
Skutečnost 2010 (odhad Novozymes)	<b>3,3</b>
Odhad 2015	<b>4,4</b>

# Proč používat enzymy v technologii (a jinde)?

- Zvýšení konverze, kontrolovatelnost procesu
- Omezení vzniku vedlejších produktů – specifita,
- Snížení nákladů (jednodušší provozní zařízení)
- Positivní vliv na životního prostředí:
  - ✓ „přátelštější“ odpadní produkty
  - ✓ nižší spotřeba energie
  - ✓ využití obnovitelných zdrojů



# Faktory ovlivňující využívání enzymů

## 1. Dostupnost substrátu, nehomogenita prostředí

## 2. Reakční podmínky:

laboratorní

x

technologické



optimální

↑↓ teplota

↑ konc. substrátu

(inhibice produktem)

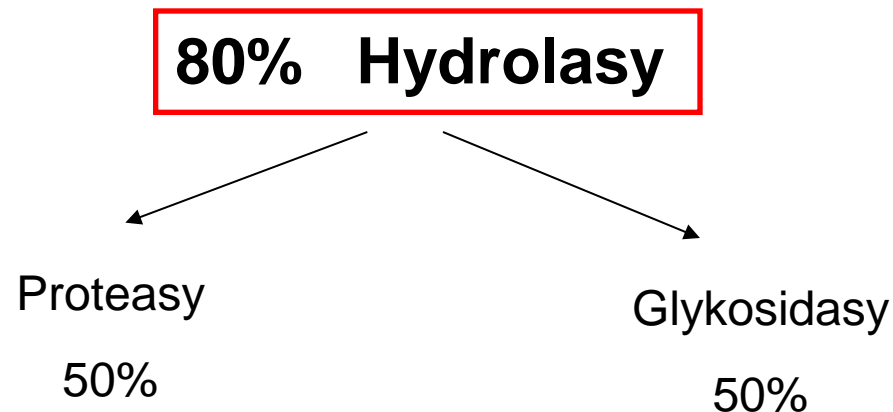
↑ viskozita

↑↓ pH

polarita prostředí

# Které enzymy se nejčastěji využívají?

<b>Enzym</b>	<b>Podíl (%)</b>	<b>Hlavní použití</b>
<b>Bakteriální proteasy</b>	<b>35</b>	<b>detergenty</b>
<b>Glukoamylasa</b>	<b>13</b>	<b>škrobové sirupy</b>
<b>Glukosaisomerasa</b>	<b>12</b>	<b>škrobové sirupy</b>
<b>Bakteriální amylasy</b>	<b>10</b>	<b>škrobové sirupy</b>
<b>Pektolytické enzymy</b>	<b>9</b>	<b>konzervárenství</b>
<b>Syřidla</b>	<b>9</b>	<b>sýrařství</b>
<b>Plísňové amylasy</b>	<b>3</b>	<b>pekárenství</b>
<b>Plísňové proteasy</b>	<b>2</b>	<b>pekárenství</b>
<b>ostatní</b>	<b>7</b>	<b>různé</b>



Class	Industrial enzymes
1: Oxidoreductases	Peroxiidasas Catalasas Glucosa oxidasas Lacasas
2: Transferases	Fructosyl-transferasas Glucosyl-transferasas
3: Hydrolases	Amylasas Cellulasas Lipasas Pectinasas Protasasas Puffulasasas
4: Lyases	Pectata lyasas Alpha-a-cetolactata de-carboxylasas
5: Isomerasas	Glucosa isomerasas
6: Ligasas	Not used at present

Table 1. Typical enzymes used in industrial processes

# Stanovení aktivity technických preparátů

Katal, unit

Potíže s technickými enzymy:

- nejedná se o čisté proteiny
- substrát není chemické individuum (pšeničný protein, škrob)
- podmínky reakce vzdáleny od ideálních, resp. standardních

Řešení?

- použití syntetických substrátů jako modelových systémů a stand. podmínek a definovat aktivitu podle doporučení EC ... (může vést k falešným výsledkům)
- použít standardní substráty a podmínky, které se realisticky přibližují podmínkám technologického procesu (podmínky technol.procesu se u uživatelů liší)
- úplně ignorovat doporučení EC a používat vyhovující "speciální" jednotky (v podstatě jediný reálný postup).

Možné důsledky:

"Jednotka aktivity je množství enzymu, které za stand.podm. (37 °C, pH 5,7) rozštěpí 5,26 mg škrobu za 1 hod."

"1 jednotka aktivity je množství enzymu které, za stand. podmínek (40 °C, pH 4,7 a 30 min) vytvoří za minutu ekvivalent absorbance hydrolyzátu při 275 nm rovný absorbanci roztoku tyrosinu o koncentraci 1,1 µg/ml 0,006N HCl. Tato absorbance je 0,084"

# Složení technických enzymových preparátů

Forma: tekuté, práškovité, enkapsulované

Formulace technického preparátu – „šité na míru“ procesu

komponenta	Zastoupení (%)
Bílkoviny a aminokyseliny	10 - 15
Aktivní protein	1 - 5
polysacharidy	5 - 12
sacharidy	2 - 40
Anorganické soli	3 - 40
Konzervační prostředky	0 - 0,3

## Enzymové technologie:

- Volné, „rozpustné“ enzymy
- Imobilizované enzymy
- CLECs CLEAs, nanočástice
- reversní mycely

## Zdroje

Živočišné – produkční doba,

- legislativní omezení

Rostlinné – produkční doba

- klimatické podmínky

Mikrobiální – 95% všech enzymů

- krátká produkční doba, obnovitelné zdroje,
- legislativní omezení – malý počet povolených MO, GRAS
- rekombinantní technologie

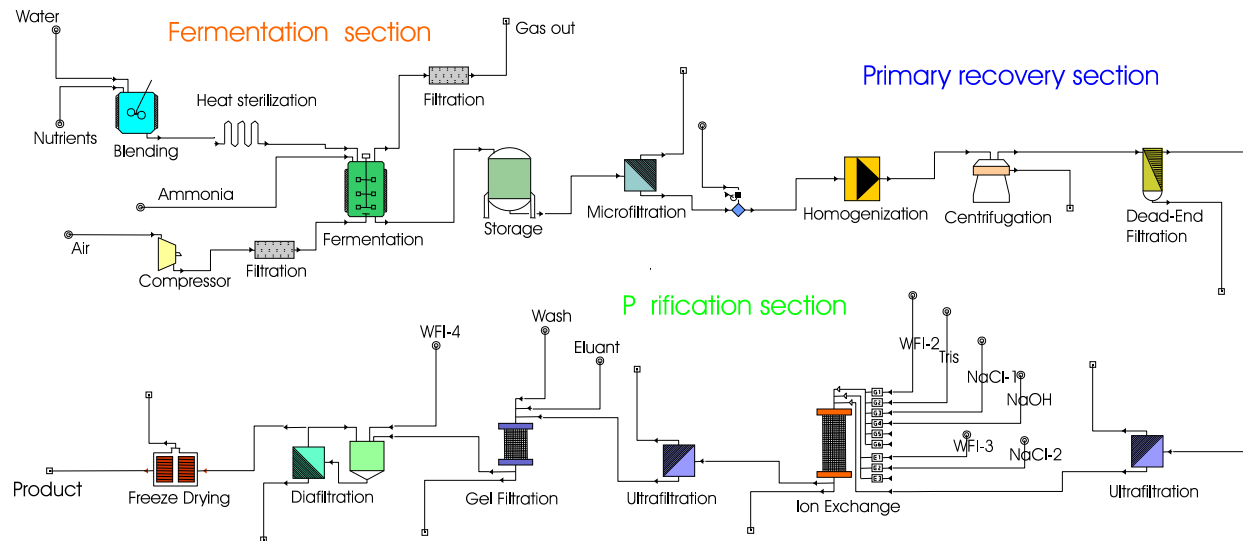
# Extremofilní mikroorganismy a jejich aplikace

MO	Podmínky	Zdroj	Enzymy, využití
Termofilní	50 – 110 °C	geotermální oblasti	amylasy xylanasy proteasy DNA polymerasy
Psychofilní	5 – 20 °C	ledovcové sedimenty	Proteasy, glykosidasy lipasy
Acidofilní	pH < 2	solfatary	oxidace síry
Alkalofilní	pH > 9	kaly	lipasy proteasy
Halofilní	3 – 20% solí	sedimenty solných jezer	biotransformace aditiva, léky
Barofilní	Zvýšený tlak	podmořské sedimenty	

# Produkce enzymů

1. Výběr enzymu
2. Výběr produkčního kmene (zdroje)
3. Konstrukce nadexprimujícího kmene MO (typicky 50g/l)
4. Optimalizace kultivačních podmínek
5. Optimalisace isolačního a purifikačního postupu
6. Formulace stabilního preparátu

ENZYME PRODUCTION FLOW SHEET





## Možná rizika:

- katalytická aktivita enzymu
- alergické reakce
- toxické metabolity (mykotoxiny, antibiotika)

## Joint FAO/WHO Expert committee on Food Additives (JECFA) rozlišuje:

- enzymy získané z jedlých tkání živočichů používaných jako potraviny, z jedlých částí rostlin a z mikroorganismů, které byly tradičně akceptovány jako složky potravy
- enzymy získané z nepathogenních MO
- enzymy z méně běžných MO

## Zdroje toxinů v enzymových preparátech:

- Produkční kmen
- Mutantní kmen produkčního kmene
- Kontaminující MO
- Toxiny ze suroviny použité jako substrát

# „Statut“ enzymů

- aditiva
- součást technologického procesu

## Příklady

Belgie	součást technologického procesu
Dánsko	ověřeny a registrovány Dánským nár. institutem pro potraviny
Francie	aditiva
Irsko	žádná specifická kontrola
Kanada	aditiva
Německo	aditiva
Velká Britanie	žádná specifická kontrola, doporučen seznam
USA	GRAS (generally recognized as safe) nebo aditiva

Pozn.: krmivářství obdobná pravidla, ostatní průmysl - chemikálie

# Hledání a produkce nových enzymů

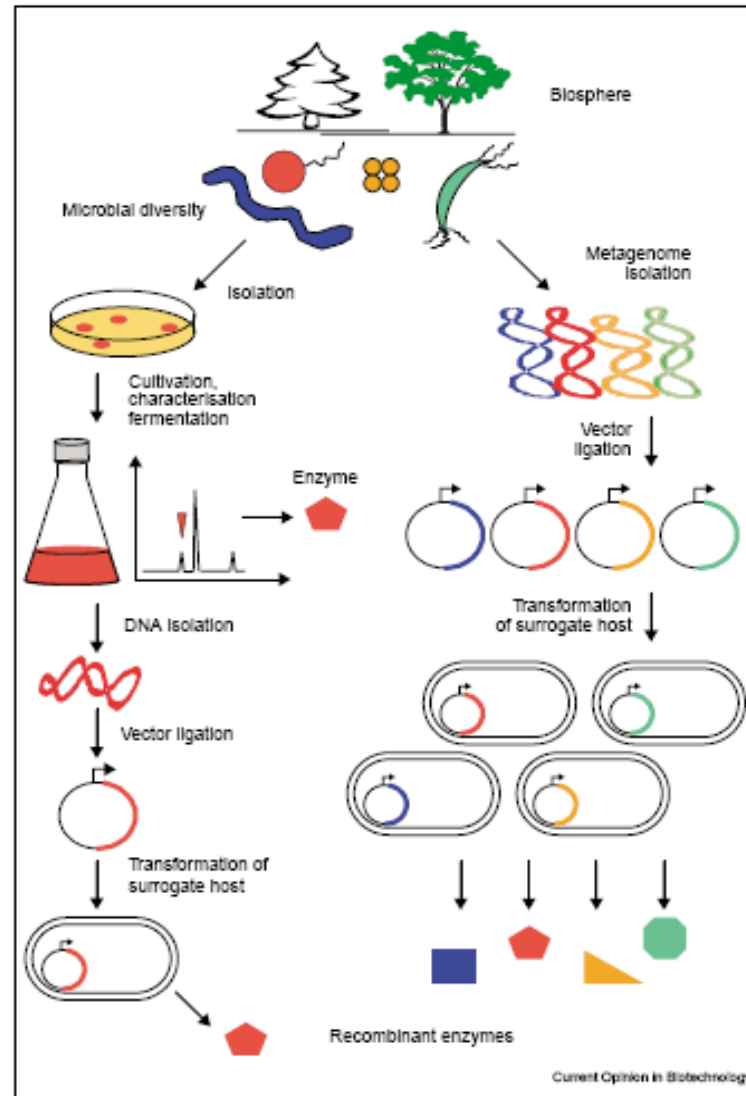
Jen asi 1% MO lze kultivovat *in vitro*

Výběr producentů:

**Selekcí** – např. substrát jako jediný zdroj C

**Detekcí** enzymové aktivity

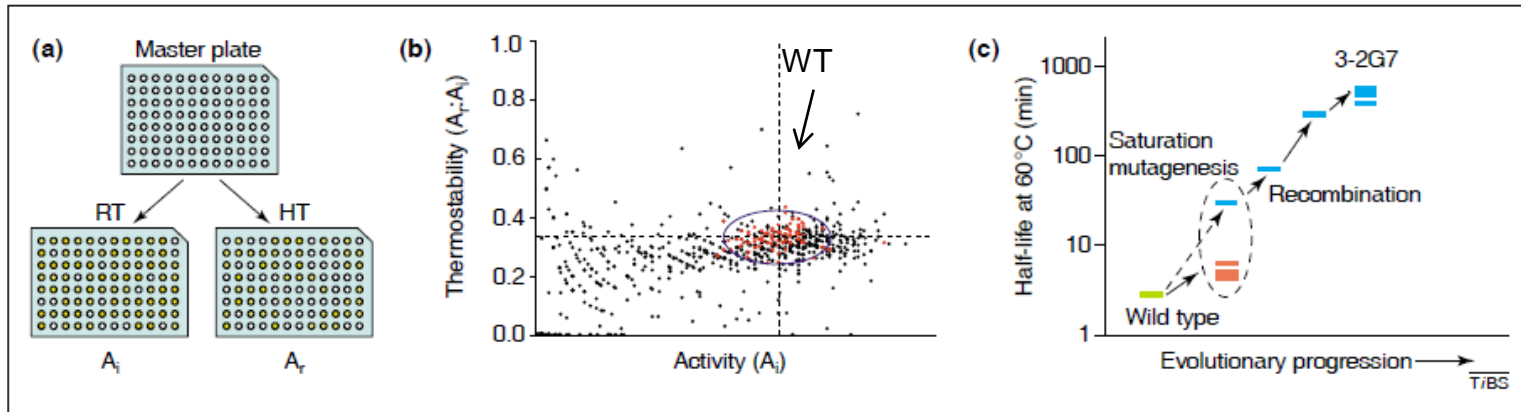
**Metagenomický přístup**



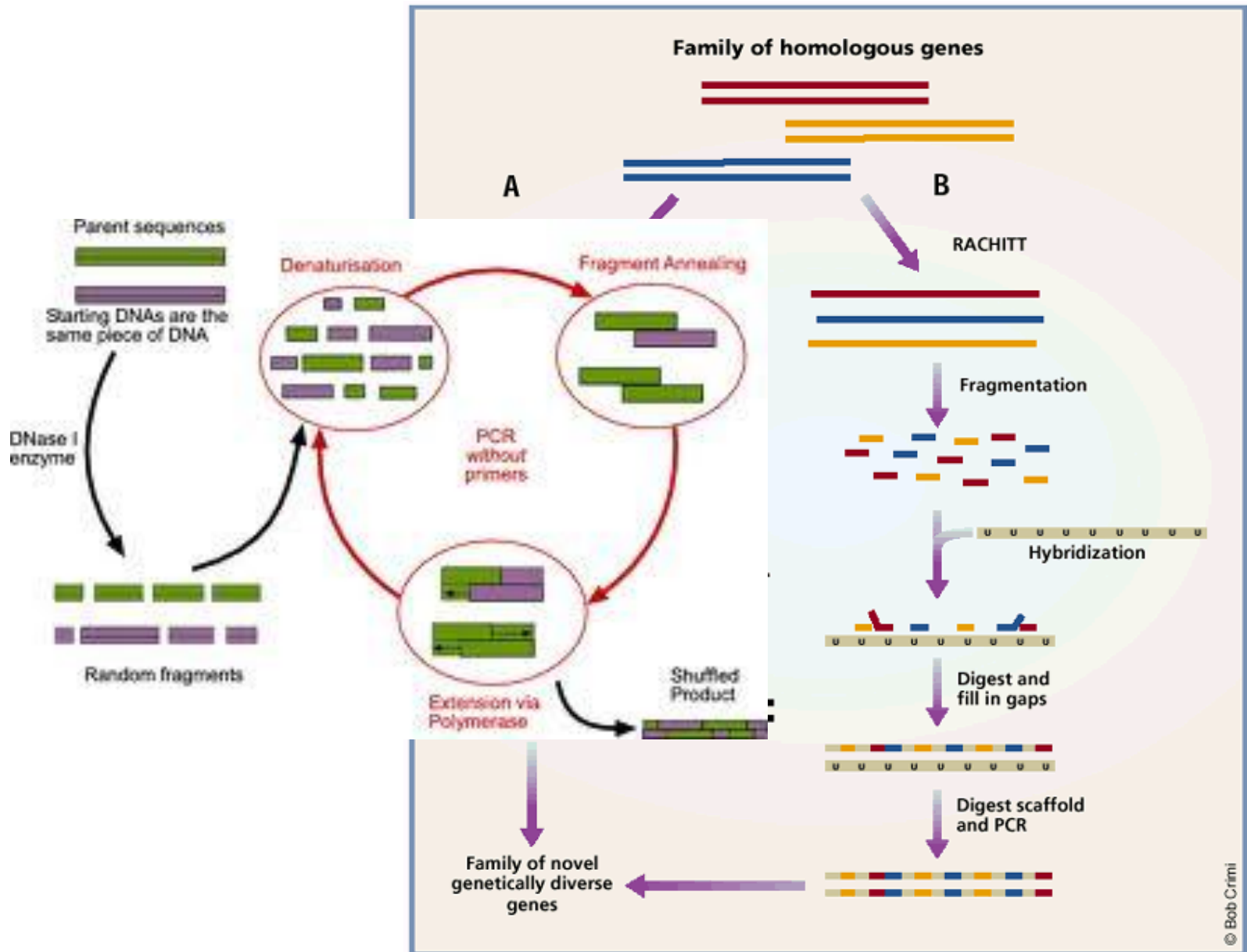
## „Vývoj“ nových enzymů

Řízená (orientovaná) evoluce:

napodobuje proces přirozené evoluce - mutagenese, rekombinace, výběr  
- gene shuffling



Zvýšení termostability subtilisinu z psychofilního MO



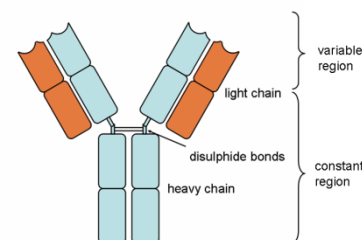
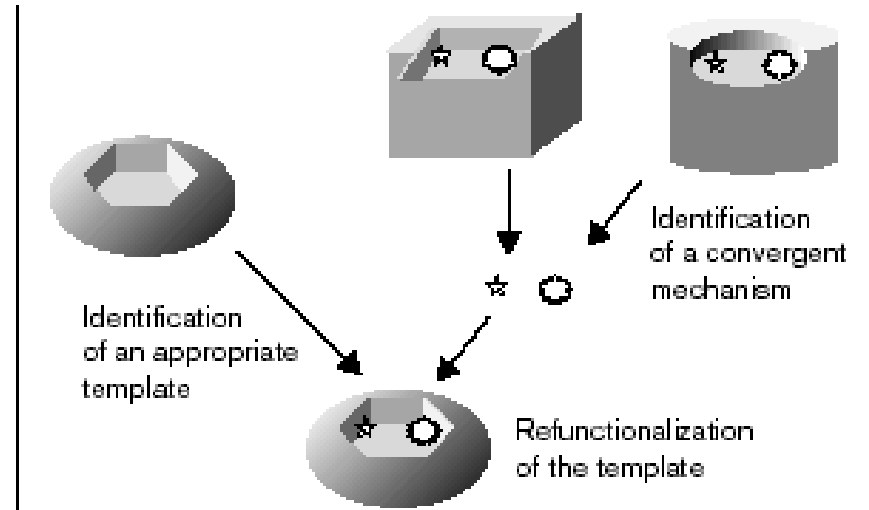
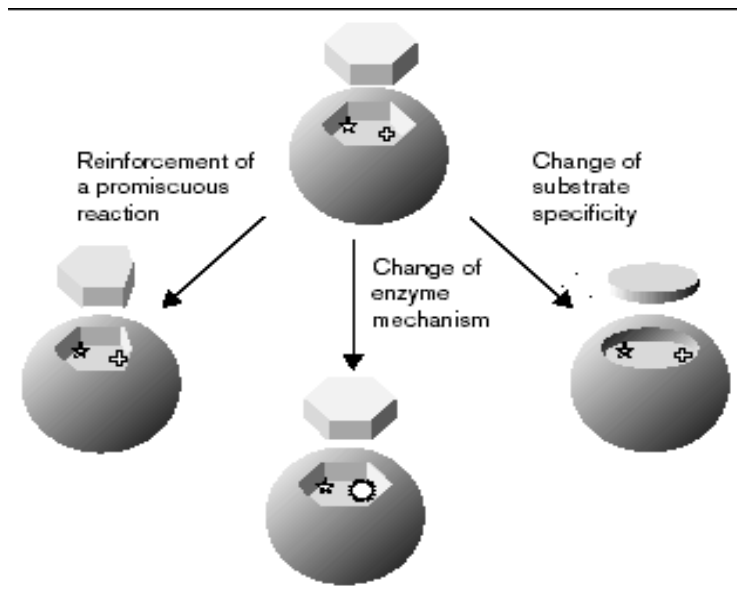
RACHITT - random chimeragenesis on transient templates

## 2. Proteinové inženýrství - "Přešívání enzymů"

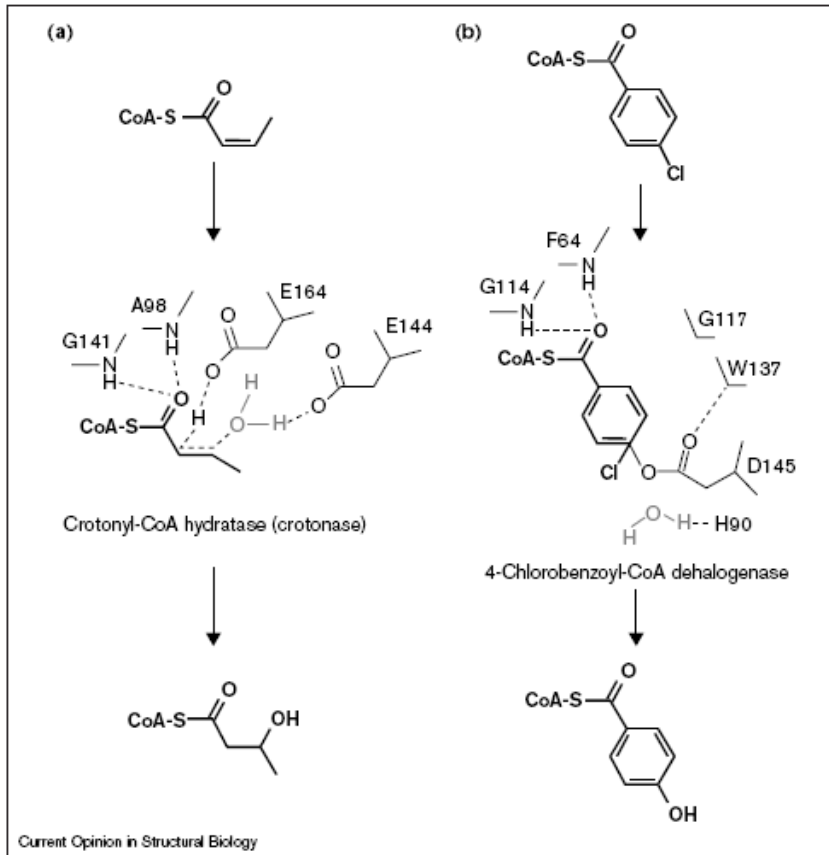
1. změna katalytické aktivity již existujícího proteinu

2. vytvoření nového biokatalyzátoru:

**templát + funkční části**



# Příklad:



8 bodových mutací:

2 katalytické zbytky

1 vazací substrát

5 remodelace katalytické smyčky

