[www.maturski.org](http://www.maturski.org)

**PRERADA ENZIMA**

**1. Preciscavanje enzima**

Enzimi se u industriji slično kao u laboratoriji prečišćavaju hromatografskim metodama. Za prečišćavanje enzima koriste se uglavnom tri tipa hromatografskog prečišćavanja:

* jonoizmenjivačka hromatografija
* gel-permeabilna hromatografija
* afinitetna hromatografija

**2. Priprema enzima za prodaju**

Nakon prečišćavanja enzima i koncentrovanja često se dobija viša aktivnost enzima od one koja je potrebna u industriji. Osnovni problem je održati aktivnost enzima duže vreme. Da bi se to postiglo neophodno je stabilizovati enzim. Industrijski enzimi sadrže relativno malu količinu aktivnog enzima (manje od 10 %). Ostatak čine neaktivni proteini, stabilizatori, soli i drugo. U cilju stabilizacije enzima primenjuju se tri pristupa:

* dodavanje aditiva
* kovalentna modifikacija proteina i
* imobilizacija enzima

Kao aditivi mogu se primeniti neutralne soli kao što su amonijum-sulfat i kalijum hidrogenfosfat koji povećavaju interakcije između hidrofobnih delova enzima i na taj način ga stabilizuju. Visoka koncentracija NaCl sprečava rast mikro-organizama. Pored toga koriste se nisko molekularni polioli (glicerol, sorbitol i manitol) koji sprečavaju rast mikroorganizama. Glicerol takođe ima ulogu za stabilizaciju enzima na niskim temperaturama jer sprečava formiranje kristala leda. Pored toga ukoliko se isporučuje vodeni rastvor enzima dodaju se antibiotici i estri benzoeve kiseline kao prezervativi.

Enzimi su znatno stabilniji u suvom stanju nego u rastvoru. Stoga se mnogo češće enzimi isporučuju u suvom obliku. Za prevođenje enzima u suvi oblik primenjuju se dva postupka:

* liofilizacija i
* sprej sušenje

Drugi postupak se zbog ekonomičnosti u industriji mnogo češće koristi. U rastvor enzima se dodaju skrob, laktoza, karboksi metilceluloza i polielektroliti koji povećavaju stabilnost enzima prilikom sušenja.

Sprej sušenje je postupak koji podrazumeva atomizaciju rastvora pomoću rasprskivača. Mešanjem sa toplim vazduhom dolazi do isparavanja tečnosti i izdvajanja čvrstog proizvoda.

**3. Tehnike imobilizacije enzima**

Imobilizovani enzimi su nerastvorni enzimi. U reakcijama koje se izvode u vodenoj sredini enzimi se mogu učiniti nerastvornim umrežavanjem ili fiksiranjem enzima za čvrsti nosač. U organskoj sredini mogu se koristiti suspenzije liofilizovanih enzima ili enzimi fiksirani za nosač.

Metode imobilizacije

Enzim se može imobilizovati na nekoliko načina:

* adsorpcijom
* kovalentnim vezivanjem
* zarobljavanjem unutar umreženog polimera
* zarobljavanjem unutar semipermeabilne membrane

Adsorpcija enzima na pogodnom nosaču je jednostavna metoda pogodna za nanošenje velike količine enzima (1 g po gramu matriksa). Izvodi se mešanjem enzima sa adsorbentom pri odgovarajućim uslovima (pH, jonska sila), inkubiranjem i na kraju ispiranjem enzima koji se nije vezao. Adsorpcija je kombinacija hidrofobnih interakcija i jonskih interakcija koje potiću od građenja soli između AK i nosača. Bitno je da u toku reakcije ne dolazi do slabljenja ovih adsorpcionih veza usled promene pH, vezivanja supstrata ili ‘promene jonske sile. Pogodni adsorbenti koji se najčešće koriste su: jonoizmenjivači (DEAE Sephadex i CM Sephadex), porozni ugljenik, gline, staklo, hidratisani metalni oksidi i polimerni aromatični ugljovodonici. Iako su jonoizmenjivači najskuplji njihova primena je opravdana jer se mogu koristiti više puta pošto nakon dezaktivacije enzima mogu da se regenerišu spiranjem enzima koncentrovanim rastvorom soli.

Imobilizacija enzima kovalentnim kuplovanjem za nerastvorni matriks je intenzivno primenjivana u istraživačkim laboratorijama. Nedostatak ove metode je relativno mala količina enzima koji se vezuje (0,02 grama po gramu matriksa). Prednost ove metode je jako vezivanje enzima i malo curenje enzima sa nosača. Najpogodnija grupa u enzimu koja se vezuje je amino ostatak lizina, mada se veza može ostvariti i preko sumpora iz cisteina ili kiseonika iz serina i treonina. Prednost lizina je što se on retko nalazi u aktivnom centru.

Zarobljavanje enzima unutar umreženog polimera moguće je izvesti na dva načina. Prvi način podrazumeva aktiviranje polimera (npr. acilovanjem amina sa hloridom akrilne kiseline) a zatim kopolimerizacijom sa akrilamidom i bis akrilamidom pri čemu nastaje gel. Drugi način podrazumeva zarobljavanje u umreženim polimerima (rastvor natrijum-alginata i enzima se sipa u rastvor kalcijum-hlorida). Na ovaj način se stvaraju zrna kalcijum-alginata u kojima je zarobljen enzim. Ova metoda je podesnija za zarobljavanje delova ćelija ili samih ćelija nego enzima. Nedostatak je što veći supstrati ne mogu da priđu enzimu.

Imobilizacija u semipermeabilnim membranama se može izvesti na dva načina. Jedan je ugrađivanje polimera u membranu (u rastvor sebacoil-hlorida u organskom rastvaraču dodaje se vodeni rastvor heksametilen-diamina i enzima) pri čemu se oko enzima stvara semipermeabilna membrana koja dozvoljava supstratu i proizvodu da prolaze kroz nju dok enzim ne može da izađe. Drugi sistem su tzv. hollow fibre ili šuplja vlakna od semiperme-abilnih membrana kroz koja se u jednom pravcu propušta enzim a u drugom supstrat. Enzim ne može da prođe kroz membranu i da pređe u deo u kome se nalazi supstrat.

**4. Enzimi u industriji detergenata**

Industrija detergenata troši negde oko 25 do 30 % proizvedenih enzima. Nečistoće koje se javljaju mogu biti po svom hemijskom sastavu ugljeni hidrati, proteini i lipidi. Primena enzima za razlaganje ovih jedinjenja omogućava kraće vreme i nižu temperaturu prilikom pranja. Od enzima koriste se amilaze, proteaze i u nekim novijim formulacijama detergenata lipaze. Udeo sirovog enzima kreće se između 0,4 i 0,8 %. Enzimi se isporućuju kao granulat (prečnika 0,5 mm) pri čemu su oni sami zaštićeni slojem soli (NaCl) i šećera. Pored toga dodaje se i karboksimetilceluloza koja gradi koloid.

Proteaze (alkalaza (B. licheniformis) i maksataza (B. licheniformis) na nizem pH i savinaza (B. amyloliquefaciens) i esperaza (B. licheniformis) na visem pH); Amilaze (Termamil (B. licheniformis)).

**5. Enzimi u industriji hrane**

Proteaze u industriji hrane se uglavnom primenjuju u proizvodnji sireva *renin ili himozin* i u postupku osvežavanja mesa *papain.* Renin se izoluje iz predželuca teleta mada je danas ovaj postupak zamenjen proizvodnjom rekombinantnih mikroorganizama koji ga luče. Renin je selektivna proteaza koja hidrolizuje vezu između fenilalanina i metionina.

Hidrolizom kazeina narušava se njegov stabilizujući koloidni efekat što rezultuje zgrušavanjem mleka.

Meso starijih životinja je obično žilavo. Ono se može omekšati ukoliko se životinji pre klanja u vratnu venu ubrizga neaktivni papain. Papain se izoluje iz lateksa papaje. Dezaktiviranje se postiže redukcijom enzima odnosno građenjem disulfida. Prilikom klanja životinje enzim se aktivira zbog oksidacionih uslova. Ovaj enzim hidrolizuje kolagen i na taj način omekšava meso čineći ga pogodnim za prodaju.

Pektini koji se nazivaju i galakuronani ili ramnogalakturonani su heteropolisaharidi koji se sastoje iz delimično esterifikovanih metanolom galakturonskih jedinica. Lanci poligalakturonske kiseline su povezani ramnozom. Pektin je sastavna komponenta ćelijskog zida. Prisustvo pektina predstavlja ozbiljan problem u postupku bistrenja sokova i vina i otežava ceđenje. Pektinaze iz Aspergilus nigera razgrađuju ćelijski zid i omogućavaju taloženje pektina i njihovo uklanjanje. Pektinaze predstavljaju smešu više enzima sa različitim mehanizmom delovanja (pektin metilesteraza hidrolizuje estarsku vezu, pektindeacetilesteraza hidrolizuje acetilostatak i pektin depolimeraza koja hidrolizuje vezu između dve galakturonske jedinice**.**

**6. Enzimi u proizvodnji visoko-fruktoznog sirupa**

Skrob se može hidrolizovati do glukoze kiselom hidrolizom. Ovaj postupak je danas u večini zemalja zamenjen enzimskim postupkom. U prvoj fazi se skrob prevodi u rastvor. 30 % suspenzija skroba se uz mešanje zagreva do 100 do 105 ° C. Nakon toga se dodaje termostabilna bakterijska α-amilaza koja hidrolizuje α-1,4-glikozidne veze (ne hidrolizuje α-1,6-glikozidne veze). Nakon toga se rastvor delimično hidrolizovanog skroba ohladi i smanji se pH vrednost na 4 do 4,5 pri čemu se deaktivira amilaza. Zatim se dodaje glukoamilaza izolovana iz *Aspergillus nigera*.

Glukoamilaza hidrolizuje oligosaharide sa neredukujučeg kraja i ponovo hidrolizuje samo 1,4 glikozidne veze. Na ovaj način se dobija rastvor koji sadrži 97 % glukoze i 3 % oligosaharida. Po završetku reakcije enzim se odvaja na jonoizmenjivaču a glukoza se izdvaja uparavanjem.

U Americi se veliki deo ovako proizvedenog glukoznog sirupa prevodi u visoko fruktozni sirup. Ovaj sirup se koristi kao zaslađivač jer je ekvivalentan po slatkosti saharozi. Pre toga je iz sirupa neophodno udaljiti kalcijum koji se dodaje za poboljšanje rada amilaze. Nakon toga dodaje se glukoizomeraza. Ovaj enzim konvertuje ovakav rastvor u smesu koja sadrži 42 do 46 % fruktoze (ostalo je glukoza). U ovu svrhu se danas koriste imobilizovani enzimi (u kolonama). 1 kg imobilizovanog enzima proizvodi 10 do 11 tona sirupa. Čista fruktoza se može izolovati hromatografijom na zeolitima ili kalcijumovim solima katjonskih jonoizmenjivačkih smola.

U Evropi kao alternativa fruktoznom sirupu ranije opisanom koristi se invertni šećer čija je najvažnija prednost u odnosu na saharozu manja tendencija kristalizacije. Za hidrolizu saharoze do glukoze i fruktoze može se koristiti enzim invertaza izolovan iz kvasca.

**7. Hromatografske metode u preciscavanju enzima**

Enzimi se u industriji slično kao u laboratoriji prečišćavaju hromatografskim metodama. Za prečišćavanje enzima koriste se uglavnom tri tipa hromatografskog prečišćavanja:

* jonoizmenjivačka hromatografija
* gel-permeabilna hromatografija
* afinitetna hromatografija

Jonoizmenjivačka hromatografija zasniva se na činjenici da su proteini u zavisnoti od pH vrednosti različito naelektrisane čestice odnosno iznad izoelektrične tačke su negativno naelektrisani a ispod izoelektrične tačke su pozitivno naelektrisani. Ovakva njihova osobina im omogućava da se vezuju za jonoizmenjivače. U industriji su kao jonoizmenjivaći korišćeni DEAE celuloza (dietilaminoetil-celuloza) kao anjonski jonoizmenjivač i CM celuloza (karboksimetil-celuloza) kao katjonski jonoizmenjivač. Danas su ovi izmenjivači uglavnom zamenjeni sa SP i QAE odnosno sulfopropil i kvaternernim amino etil derivatima. U industriji se često primenjuje takozvani "bač" postupak u kome se jonoizmenjivač meša sa rastvorom enzima a zatim se supernatant u kome se nalaze proteini koji nisu vezani za kolonu odvaja centrifugiranjem. Izmenjivač sa vezanim proteinima se zatim prebacuje u kolonu i proteini se eluiraju promenom jonske sile rastvora ili promenom pH rastvora.



Gel permeabilna hromatografija se zasniva na odvajanju proteina na osnovu njihove molekulske mase. Koriste se matriksi dobiveni umrežavanjem dekstrana (Sephadex G), poliakrilamida (Bio Gel P), agaroze (Sepharose C) i drugi. Svi ovi matriksi izrađuju se sa različitom poroznošću i nose oznake 25, 50 , 100 i 200, na primer, što označava veličinu pora. Što je veća veličina pora manja je rigidnost polimera i sa njim je teže raditi. Razvijeni su noviji znatno skuplji polimeri koji daju bolje rezultate (smesa poliakrilamida i agaroze i kopolimer etilenglikola i metakrilata). Nedostatak metode je razblaživanje uzorka.



Afinitetna hromatografija se zasniva na vezivanju proteina za imobilizovani specifični ligand za taj protein. Ovaj tip hromatografije može dati najbolje rezultate u prečišćavanju proteina. Kao nosač najčešće se koristi agaroza za koju se ligand ili antitelo vezuje kovalentnom modifikacijom. Ovakvi matriksi su skupi i primenjuju se samo ukoliko postoji ekonomska opravdanost (skup enzim, veliki broj drugih proteina sličnih osobina). Eluiranje se izvodi rastvorom liganda koji je vezan za matriks.

**8. Faktori koji uticu na primenu enzima**

Uticaj pH

Enzimi su kao i drugi proteini amfoterni molekuli odnosno na njihovoj površini se nalaze kisele i bazne aminokiseline koje u zavisnosti od pH vrednosti mogu biti naelektrisane.Kada je ukupno naelektrisanje enzima 0 enzim se nalazi na izoelektričnoj tački i tada ima najmanju rastvorljivost. Pored toga naelektrisane AK su odgovorne za vezivanje kofaktora i njihova neutralizacija utiće na vezivanje metalnih jona. Pored toga naelektrisane AK u aktivnom mestu mogu biti odgovorne za izvođenje hemijske reakcije. Stoga svaki enzim ima optimalnu pH vrednost na kojoj se odvijaju reakcije.

Na izuzetno niskoj i visokoj pH vrednosti dolazi do denaturacije proteina odnosno narušavanja strukture proteina.

Uticaj temperature

Slično kao i kod drugih hemijskih reakcija i enzimske reakcije se ubrzavaju sa porastom temperature. Međutim za razliku od klasičnih reakcija sa porastom temperature dolazi do denaturacije proteina. Stoga se za svaki enzim proverava termostabilnost odnosno određuje se optimalna temperatura za izvođenje hemijske reakcije. Prilikom određivanja mora se voditi računa i o vremenu trajanja reakcije jer prilikom produženog izlaganja enzima dolazi do denaturacije iako je enzim stabilan na toj temperaturi.

Inhibicija enzima

Mnoge supstance mogu delimično ili potpuno smanjiti aktivnost enzima. Neke od njih deluju nespecifično i to je slučaj sa reagensima koji izazivaju denaturaciju (urea,

Druge supstance koje se na specifičan način vezuju za enzim nazivaju se inhibitori. Inhibicija može biti reverzibilna (aktivnost enzima se vraća po uklanjanju inhibitora iz sistema) ili ireverzibilna (joni olova i žive se vezuju jakim vezama za aminokiselinski kostur i zazivaju ireverzibilnu inhibiciju).

**9. Enzimi u sintezi aminokiselina**

Postoji nekoliko različitih pristupa za enzimsku sintezu aminokiselina. Prvi pristup za sintezu L-aminokiselina zasniva se na selektivnoj hidrolizi N-acilaminokiselina. Racemska smesa aminokiselina se aciluje i zatim hidrolizuje na pH 8,5 dejstvom aminoacilaze iz *Aspergilus oryzae*. Hidrolizuje samo L-derivat dok D-derivat ostaje nehidrolizovan. Racemizacijom D-derivata i ponovnom hidrolizom može se povećati prinos L-aminokiseline. Koristi se imobilizovani enzim na DEAE-Sephadexu.

Reakcijom aldehida sa HCN i amonijum-karbonatom nastaje racemski hidantoin. Hidantoin se primenom enzima hidantoinaze može selektivno prevesti u L- ili D-amino-kiselinu. Hidantoinaza se izoluje iz *Arthrobacter*-a (L-derivati) ili *Pseudomonas striata* (D-derivati). D-aminokiseline su značajne u sintezi antibiotika i insekticida.

Asparaginska kiselina je važan intermedijer u sintezi aspartama (veštački zaslađivač). Ova kiselina može se sintetisati enzimski iz fumarne kiseline. U sintezi aspartama primenjuje se enzim termolizin koji daje samo α-aspartam odnosno željeni proizvod.

[www.maturski.org](http://www.maturski.org)