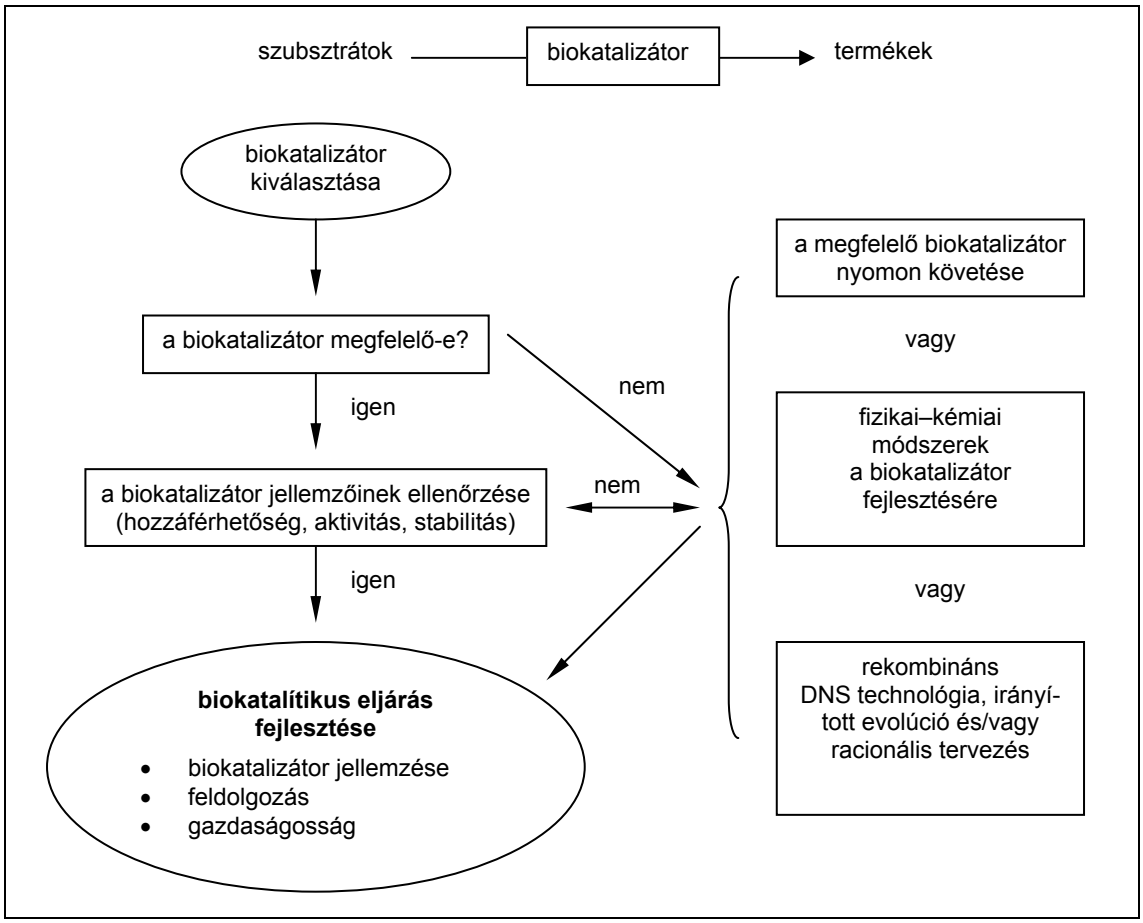
Lipázok és hasonló enzimek hatékonyságának optimálása

Tárgyszavak: lipáz; észteráz; foszfatáz; optimálás; enzimaktivitás; molekuláris biológia.

A rendelkezésre álló lipázok (triacil-glicerin-hidrolázok) számában az 1980-as évek óta jelentős növekedés tapasztalható. Ez elsősorban a klónozás és az enzimek mikroorganimusokban való kifejezése terén elért hatalmas fejlődés eredménye. Az 1980-as évek előtt a lipázokat többnyire mosószerek összetevőiként, ill. a trigliceridek módosításában alkalmazták. A későbbiekben széles körű kutatási eredmények bizonyították, hogy nagyon hatékony biokatalizátorok az optikailag tiszta vegyületek szintézisében; az általuk katalizált folyamatokban nincs szükség kofaktorra, számos szerves oldószerben aktívak, és rendszerint stabilitásuk is megfelelő. Ez ideig több mint 1000 különböző szubsztrátról kimutatták, hogy a lipázokkal reakcióba lépnek. Számos ipari eljárást kifejlesztettek, amelyekben ezeket az enzimeket hatékony biokatalizátorokként alkalmazhatják. Ennek egyik legsikeresebb ipari példáját a BASF (Ludwigshafen, Németország) különféle aminok kinetikai bontásának nagyipari eljárása (>2000 t/a) képviseli.

Az enzimek, jelen esetben a lipázok ipari méretű biokatalitikus eljárásai fejlesztési módszereinek különféle stratégiái vannak *(1. ábra):*

1. Fizikai–kémiai módszerek:
   – immobilizálás (stabilitás javítása),
   – szolubilizálás (oldékonyság növelése szerves oldószerekben),
   – kémiai derivatizálás (pl. nitrálás).
2. Reakciótechnológiai módszerek:
   – hidrolízis észterezési reakció helyett,
   – vízaktivitás ellenőrzése,
   – megfelelő acil donor választása (vinil-acetát ecetsav helyett),
   – oldószer (ionos folyadékok).
3. Molekuláris biológiai módszerek:
   – racionális fehérjetervezés (enantioszelektivitás módosítása),
   – irányított evolúció (szubsztrátspecificitás módosítása, stabilitás növelése).



1. ábra Biokatalitikus eljárások fejlesztési módszerei

A lipázok rövid áttekintése

A lipázok mint biológiai katalizátorok természetes funkciója a trigliceridek hidrolízise részleges gliceridekre és zsírsavakra az emésztés folyamán. A karboxilészterázoktól eltérően, a lipázkatalízis a lipid–víz határfelületen játszódik le; a legtöbb lipáz esetében megfigyelhető az ún. határfelületi aktiválás jelensége – a katalitikus hatás csak hidrofób fázis jelenlétében alakul ki, ennek segítségével a lipidcseppecskék diszpergálódnak a vízben vagy a szerves oldószerben. A folyamathoz szükség van egy hidrofób oligopeptidre (pórusfedél), amely befedi az aktív helyhez vezető bejáratot. Hidrofób környezetben ez a záró fedél elmozdul, és a szubsztrát beléphet a kötődésre alkalmas nyílásba. A határfelületi aktiválás jelensége nem tapasztalható a *Pseudomonas glumae, Pseudomonas aeruginosa* és *Candida antarctica* B szervezetekből származó lipázok esetében, bár ezek is tartalmaznak egy kisebb pórusfedelet. A lipázok többségében megtalálható a szerin, hisztidin és aszpartát (néhány, pl. a *Geotrichum candidum* vagy *Candida rugosa* mikroorganizmusból származó lipázban esetleg glutamát) katalitikus hármas csoportja. Az átmeneti ál-

lapotban képződő tetraéderes köztitermék egy oxianion üreg segítségével stabilizálódik. Az összes lipáz esetében megfigyelhető a jellegzetes α/β-hidroláz áthajlás, amely az észterázokban, proteázokban és haloperoxidázokban szintén megtalálható. Jellemző rájuk, hogy széles pH- és hőmérsékleti tartományban aktívak; a maximális hatást a legtöbb mikrobiális lipáz 7–9 pH-értéken és 30–40 °C hőmérsékleten mutatja.

Az észterázok abban különböznek a lipázoktól, hogy nem tapasztalható náluk határfelületi aktiválás, nem hidrolizálnak hosszú láncú zsírsavésztereket és előnyben részesítik a vízoldékony szubsztrátokat.

Egyes lipázok, különösen a *Rhizopus* alfajból származók, foszfolipáz A_1 aktivitást is mutatnak, ezáltal foszfolipidek hidrolízisével 1-lizo-foszfolipidek szintetizálására alkalmasak. Az acilvándorlás következtében az *sn2* helynél elhelyezkedő zsírsavak migrációjával 2-lizo-foszfolipidek is képződhetnek. Ezt az alapelvet az olaj gyantamentesítésénél alkalmazhatják.

A Lipázok Adatbázisa gyors és naprakész elérést biztosít 92 mikrobiális lipáz és homológ szerinhidroláz szekvencia–szerkezet–funkció összefüggésével, a lipázok szerkezeti és más releváns biokémiai adataival összefüggő információkról, különös tekintettel a fehérjetervezés példáira.

A szakemberek körében rendkívüli érdeklődést kelt a lipázok kiemelkedő aktivitása, stabilitása nemvizes rendszerekben (szerves oldószerek, szuperkritikus folyadékok), rendkívül széles szubsztráttartománya és nagy sztereoszelektivitása. Kis mennyiségű víz jelenlétében megfigyelhető hatásuk következtében észterhidrolízis (észterezés vagy transzészterezés) fordított reakciói is lehetségesek, ezáltal a katalizált reakciók köre jelentősen növekedhet.

Biokatalitikus eljárások fejlesztése

Fizikai–kémiai módszerek

Az immobilizáció stabilizálja a biokatalizátort és megkönnyíti a további feldolgozást. A lipázok és más enzimek immobilizálására már számos hordozót és módszert kifejlesztettek, de ez ideig még nincsenek általános vezérelvek a megfelelő anyagok és reakciókörülmények kiválasztására. Az 1980-as években és az 1990-es évek elején több stabil immobilizált lipázkészítményt kifejlesztettek, de azóta korszerűbb technológiákról nem számoltak be.

Az immobilizációs kísérletekkel párhuzamosan számos kutatócsoport tanulmányozta a lipázok szolubilizációját szerves oldószerekben. A vizsgálatok során ezek a módosított biokatalizátorok jelentősen aktívabbak voltak, mint a diszpergált vagy immobilizált lipázok, viszont izolálásuk nehéznek bizonyult, és napjainkig még nem sikerült hatékony szolubilizációs módszert kifejleszteni.

Reakciótechnológiai módszerek

A reakciótechnológiai módszerek segítségével növelhető a lipázok teljesítménye. A kísérletek többségében azonban az optimális reakciókörülmények

kialakítása még mindig nehézségekbe ütközik; a folyamatban levő vizsgálatok során a fokozatos megközelítés (kísérlet és tévedés) módszerével dolgoznak. Széles körű tapasztalatokkal rendelkeznek különböző acil donorok alkalmazásáról lipázok által katalizált (transz-)észterezési reakciókban; enolészter, pl. vinil-acetát segítségével irreverzibilis és gyors reakciót lehet végrehajtani.

A legújabb kutatási eredmények alapján az enzimes reakciók végrehajthatók ionos folyadékokban is. A leggyakrabban használt ionos oldat az 1-butil-3-metil-imidazol-tetrafluoroborát ([BMIM]BF_4) és a -hexafluorofoszfát ([BMIM]PF_6). Az ionos oldat szolvatációs tulajdonságait különböző kationok vagy anionok segítségével módosítani lehet, amely vízzel elegyedő vagy nem elegyedő rendszereket eredményez.

A különböző oldószerek vizsgálati eredményei alapján a *Candida antarctica* lipáz B (CAL–B) hatékonysága alkoholízisben, ammoniolízisben, ill. perhidrolízisben hasonló a hagyományos szerves oldószerekéhez. Kimutatták, hogy CAL-B és *Pseudomonas cepacia* lipáz (PCL) enantioszelektivitásának mértéke fenntartható vagy jelentősen növelhető ionos oldat jelenlétében. Egy kutatócsoport a glükóz acetilezését ionos oldatban sokkal szelektívebbnek találta, mivel az azt követő, hagyományos oldószerben végbemenő 6-O-acetil-glükóz acetilezése nagymértékben csökkent. A vizsgálati eredmények értékelésekor azonban figyelembe kell venni, hogy ezek a megfigyelések nem az ionos oldatok biokatalizátorokon előidézett változtatásainak következményei, hanem az oldószerrendszerek polaritásváltozásának és az ionos hatásoknak az eredményei.

A szerves közegben végbemenő, lipázokkal katalizált reakciók gyakran tanulmányozott paramétere a vízaktivitás (a_w). Ennek a jellemzőnek fontos szerepe van az enzimek katalitikus aktivitásának fenntartásában egy adott oldószerben, ill. erős hatást gyakorol az acilvándorlásra is. A strukturált trigliceridek és foszfolipidek szintézisében például kielégítő termékhozam csak a vízaktivitás gondos ellenőrzésével érhető el. E paraméter nyomon követésének segítségével az *sn1*-pozíciónál végrehajtott zsírsavcserével a foszfolipidek szintézisének hozama jelentősen növelhető.

Molekuláris biológiai módszerek

Az 1990-es évek közepétől számos hatékony módszert fejlesztettek ki a hatékony lipázok (és más biokatalizátorok) körének kiterjesztésére. Ezek az eljárások három fő kategóriába sorolhatók:

1. biológiai változatok felfedezése az újabb biokatalizátorok forrásának és számának növelésére;
2. racionális fehérjetervezés alkalmazása olyan enzimek fejlesztésére, amelyekre a háromdimenziós szerkezet már tisztázott vagy homológia-modellezett;
3. irányított evolúció.

Racionális fehérjetervezés

A kristálytan kutatói már sok lipáz szerkezetét megismerték, ill. folyamatban van a számítógépes modellezés alkalmazásának fejlesztése az enzimek szubsztrátspecificitásának és enantioszelektivitásának racionalizálása céljából. Egy kísérletben az 1-klór-2-oktanol *C. antarctica* B lipáz által katalizált feloldásának enantioszelektivitása jelentősen javult egyetlen aminosav kicserélésével (Ser47Ala), amint azt a molekuláris modellezés segítségével előre megjósolták. Egy másik eljárásban helyirányított mutagenezis alkalmazásával az átmeneti állapotot stabilizáló treonint az aktív hely mellett valinnal helyettesítették, amely a lipázaktivitás elvesztését eredményezte. Érdekes megfigyelés, hogy a lipázaktivitást 2-hidroxi-propanoát szubsztrát segítségével sikerült visszaállítani, mivel az pótolta a „hiányzó" hidroxilcsoportot. Ez az eljárás szintén növelte az enantioszelektivitás mértékét.

Egyes kutatók szerint a lipázok eltérnek egymástól egy, az aktív helyen elhelyezkedő motívumban, amely felelős a tetraéderes köztitermék stabilizációjáért a katalízis során. Ez az ismétlődő rész az oxianion kötődési nyílásban (zsebben) helyezkedik el, és néhány frissebb kutatási eredmény alapján ez szintén szabályozza a lipázok aktivitását.

Irányított evolúció

Ez az eljárás előnyösebb a hagyományos módszerek, például UI-fény vagy kémiai mutagének alkalmazásánál, mivel a véletlenszerű mutagenezis hatásának kitett nukleotidszekvenciák korlátozhatók az adott fehérjét vagy annak egy részét kódoló génre a teljes szervezet célbavétele helyett. Az irányított evolúció fő feladata a megfelelő rendszerek kiválasztása szelekcióval vagy nyomon követéssel a kívánt mutánsok azonosítására a 10^3–10^8 számú variáns könyvtárából. Az eddigiekben kifejlesztett követő rendszerek lehetővé teszik az aktív és sztereoszelektív lipáz és észteráz biokatalizátorok gyors meghatározását.

Egy kísérletben az irányított evolúció segítségével sikerült módosítani a *Pseudomonas fluorescens* észterázának (PFE) szubsztrátspecificitását. Jelentős növekedést értek el egy lipáz enantioszelektivitásában *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 szervezetből optikailag tiszta (R)- vagy (S)-p-nitro-fenil-észter alkalmazásával.

Néhány 1,3-helyspecifikus lipáz foszfolipáz A_1 aktivitást mutat, ezáltal alkalmas a foszfolipidek elsődleges észterkötésének hasítására. Az irányított evolúció hatékony módszernek bizonyult a *Bacillus thermocatenulatus* és *Staphylococcus hyicus* szervezetből származó lipáz foszfolipáz A_1 aktivitásának fejlesztésére.

A fentiekben ismertetett vizsgálati eredmények ellenére a lipázok tulajdonságait meghatározó tényezők még nem teljes mértékben tisztázottak, az irányított evolúciós eljárásokból származó információk azonban hozzájárulnak a szerkezet–funkció összefüggések megismeréséhez.

A kutatási eredményekből levonható következtetések

A lipázok által katalizált reakciók optimálására irányuló kutatások célja egy tökéletes biokatalitikus technológia megvalósítása, ehhez pedig nem elégséges a módszerek egyikének egyedüli alkalmazása, hanem a rendelkezésre álló eljárások megfelelő kombinációjára van szükség. A hatékony aktivitás és/vagy sztereoszelektivitás kifejlesztése céljából a molekuláris biológiai módszerekkel optimált enzimet adaptálni kell az eljárási körülményekhez, és ebből következik, hogy a fizikai–kémiai és reakciótechnológiai eljárások a további vizsgálatokban is fontosak maradnak.

(Molnár Kinga)

Bornscheuer, U. T.; Bessler, C. stb.: Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. = Trends in Biotechnology, 20. k. 10. sz. 2002. p. 433–437.

Carrió, M. M.; Villaverde, A.: Construction and deconstruction of bacterial inclusion body. = Journal of Biotechnology, 96. k. 1. sz. 2002. p. 3–12.

Röviden…

Géntechnikai kísérletekben használt sertések az USA vágóállat-kereskedelmében

A közelmúltban közel 400 genetikailag módosított sertés került be az USA élelmiszer-ellátásába, ami alapos rést üthet a genetikai tanulmányok hatósági szabályozásán. A kísérleti állatokat az University of Illinois adta el egy vágóállat-kereskedőnek, és ezt engedély nélkül nem tehette volna meg.

Az illetékes hatóság, az Élelmiszer- és Gyógyszer Hivatal (FDA) által lefolytatott vizsgálatnak nem sikerült megállapítania a kibocsátott állatokba „zárt” genetikai anyag biztonságát, ill. hatékonyságát. Az FDA azt sem tudja meghatározni, hogy ezt a genetikai anyagot egyik generáció átadhatja-e a következőnek. Mindezen bizonytalanságok ellenére az FDA fenntartja azt a meggyőződését, hogy a sertések nem veszélyeztetik a lakosság egészségét.

Az említett vizsgálat azt viszont felderítette, hogy 2001. április és 2003 januárja között 386, géntechnikai kísérletben használt sertést értékesítettek az élelmezésben. Ezek egyike sem volt maga transzgénikus állat, de ilyen állattól származott. A kutatók szerint ezek nem örökölték a beültetett genetikai anyagot, az FDA viszont azt vallja, hogy ennek biztos kijelentését nem támasztja alá kellő számú és megalapozottságú kísérlet.

A géntechnikai kísérletek célja a sertésekkel egy speciális fehérje termeltetése volt, amely a tehéntejben, (de nem kizárólag abban) található. Egyébként az eladott állatok még nem érték el a laktáció életkorát.

Az FDA, további vizsgálódásainak eredményétől függően, újabb akciókat kezdeményez az egyetemi és egyéni kutatókkal szemben.

(Chemistry and Industry, 4. sz. febr. 17. p. 5.)

AGRÁR MÉDIAKLUB – BUDAPEST

rendezvényt tartottak 2003. április 29-én a Városházán
a régióban tevékenykedő újságírók számára.

Az előadók – **Baintner Ferenc** ovh. az FVM-ből és **Halmai Péter** egyetemi tanár a Szent István Egyetem GTK Vezető- és Továbbképző Intézetből – ismertették az EU-csatlakozási tárgyalások eredményeit:

A csatlakozási tárgyalások eredményei

- ***A mezőgazdasági termőföld tulajdonának külföldi állampolgárok által történő megszerzését*** a hatályos 1994. évi LV. törvény tiltja. Magyarország eredetileg tíz éves ideiglenes mentességet kért e szabályozás fenntartására. 2001 júniusában a tárgyaló felek hét éves átmeneti mentességben állapodtak meg. A fenti hét éves átmeneti időszak további három évvel meghosszabbítható, ha lejártakor még mindig jelentős különbség áll fenn a magyarországi és a külföldi földárak között.
- ***Mennyiségi keretek (kvóták).*** A Magyarország által elért mennyiségi keretszámok az utóbbi 4–5 év statisztikai adatokkal igazolható termelési szintjét tükrözik, sőt a legtöbb esetben még bizonyos növekedést is megengednek (pl. húsmarha prémium esetén).

Kvóta:	**Elfogadott kvóta:**	**Megjegyzés:**
Szántóföldi bázisterület (ha):	3 487 792	1999-2000-2001-es adatok átlaga.
Regionális hozam (t):	4,73	1997-2001. évi adatok, kivéve a legrosszabb és a legjobb évet.
Tejkvóta (t):	1 990 060	Dán javaslat alapján, kimerítve a tagjelöltek számára elkülönített mennyiséget.
Szarvasmarha kiegészítő támogatás (€):	2 936 076 (100 %) 734 019 (25 %)	Kvótától függő számított érték.
Vágási prémium (felnőtt+borjú) (db):	235 998	-
Húsmarha prémium (db):	94 620	2002. dec. 3-i helyettesi szintű fordulón az EU végső ajánlata.
Anyatehén támogatás (db):	117 000	2000. év adata-10 %.
Anyajuh támogatás (db):	1 146 000	2002. dec. 11-i dán csomagban javított EU álláspont.
Juh kiegészítő támogatás (€):	1 211 510 (100 %) 302 878 (25 %)	Kvótától függő számított érték.
Kecske (db):	Juhval együtt	A hazai állomány nem felel meg az EU követelményeknek.
Tradicionális durumbúza terület (ha):	2500	2002. dec. 3-i helyettesi szintű fordulón az EU végső ajánlata.
Nem tradicionális durumbúza terület (ha):	4 305	-
Izoglükóz A kvóta (t):	127 627	A dán csomagban szereplő javaslat alapján.
Izoglükóz B kvóta (t):	10 000	A dán csomagban szereplő javaslat alapján.
Rizs termőterület (ha): Támogatási szint (€):	3 222 163,215 (3,10 t/ha átlaghozam)	2000. évi adatok alapján.
Egyéb fehérjenövények termőterülete (ha):	1 954	Nem ország specifikus kvóta
Szárított takarmány (t):	49 593	1998-1999. évek átlaga
Cukor A kvóta (t):	400 454	1995-1999. évek adatai alapján (hazai fogyasztás)
Cukor B kvóta (t):	1 230	WTO által engedélyezett export (A kvóta 0,31%-a)
Kender (t):	2 061	1997-1999. évek alapján
Paradicsom (t):	130 790	1998-2000. évek adatai alapján
Őszibarack (t):	1 616	1998-2000. évek adatai alapján
Körte (t):	1 031	1998-2000. évek adatai alapján
Dohány (t):	12 355	1997-1999. évek adatai alapján

E mennyiségi keretszámok – a tejkvóta kivételével – nem a termelés maximális szintjét korlátozzák. Azok a Magyarország számára elérhető közösségi támogatás keretösszegét határozzák meg, de a termelők számára semmiféle termelési korlátot nem jelentenek. Túllépésük nem jár büntetéssel, viszont a kvóta feletti termelésre nem jár közösségi támogatás.

Az agrár- és vidékfejlesztés uniós forrásai
Magyarország az Európai Unióhoz történő csatlakozás után jogosulttá válik az EU Strukturális Alapjainak támogatására, melyek elsődleges célja, hogy segítsék a tagállamok, valamint a régiók közötti fejlettségi különbségek csökkentését. A Strukturális Alapok igénybevételéhez a tagállamok, illetve a jelöltek Nemzeti Fejlesztési Tervet készítenek. A NFT-ben összefoglalt célokat ágazati és regionális Operatív Programok tartalmazzák.

Az új tagországok átmeneti támogatási lehetőségei
A csatlakozási tárgyalások eredményeként az új tagországok a mezőgazdasági termelők meghatározott körének adhatnak olyan támogatásokat, melyeket a régi tagországok gazdálkodói nem kaphatnak. Ezek a támogatások is a vidékfejlesztési támogatások kísérő intézkedéseinek sorába tartoznak.

1. Félig önellátó gazdaságok támogatása (árutermelő gazdaságok kialakítása).
2. Termelői csoportok (szövetkezetek) létrehozásának támogatása.
   - EU előírásoknak való megfelelés támogatása.
   - Technikai segítségnyújtás.

Nemzeti támogatások
A vonatkozó EU-irányelvekkel összhangban a tagállamoknak lehetőségük van bizonyos nemzeti támogatási intézkedések átmeneti alkalmazására is. Az EU-szabályozás pontosan körülhatárolja azokat a támogatási lehetőségeket, amelyek nemzeti támogatás formájában nyújthatók lesznek.

Közvetlen kifizetések
Az új tagországok gazdái közvetlen kifizetésből 2004-ben a közvetlen támogatások 25%-át, 2005-ben 30%-át, 2006-ban 35 %-át kapják meg, majd ez további fokozatos emelkedés után 2013-ban éri el a 100%-ot. A tárgyalások eredményeként ugyanakkor mód van a közvetlen támogatások nemzeti költségvetésből történő kiegészítésére, minden évben max.: 30%-kal. Lényeges szempont, hogy a közösségi jog értelmében nemzeti támogatást közvetlen kifizetés céljára az EU hozzájárulása nélkül egyetlen tagország sem folyósíthat.

A közvetlen kifizetések ütemezése az átmeneti időszakban
A jelenlegi tagállamoknak járó teljes támogatás %-ában

	2004	**2005**	**2006**	**2007**	**2008**	**2009**	**2010**	**2011**	**2012**	**2013**
EU forrás	25	30	35	40	50	60	70	80	90	100
EU+nemzeti forrás	55	60	65	70	80	90	100	100	100	100