



## Przydatność termostabilnych enzymów w udoskonalaniu przetwórstwa skrobi

Józef Synowiecki, Beata Grzybowska

Katedra Chemii i Technologii Żywności, Wydział Chemii, Politechnika Gdańska, Gdańsk

### Suitability of thermostable enzymes for improvement of starch processing

#### Summary

Commercial processing of starch to mono- and oligosaccharides depends on the availability and properties of the applied enzymes such as  $\alpha$ -amylase, glucoamylase,  $\alpha$ -glucosidase and xylose isomerase. Each of these enzymes has a different pH and temperature optimum for use. Therefore starch processing is carried out in the stages of liquefaction, saccharification, and isomerisation. This article discusses the application of thermostable enzymes leading to higher quality products and lower production costs caused by the simplification of the processing.

#### Key words:

thermostable enzymes, liquefaction, saccharification, xylose isomerase.

#### Adres do korespondencji

Józef Synowiecki,  
Katedra Chemii  
i Technologii Żywności,  
Wydział Chemiczny,  
Politechnika Gdańska,  
ul. Gabriela Narutowicza  
11/12,  
80-952 Gdańsk.

---

#### biotechnologia

2 (53) 26–35 2001

### 1. Wprowadzenie

Enzymatyczną hydrolizę skrobi przeprowadza się podczas wytwarzania maltodekstryn i syropów skrobiowych, maltotetraozowych, maltozowych i glukozy, stosowanych m.in. w produkcji odżywek dla niemowląt, wyrobów cukierniczych i piekarskich, mleka w proszku, sosów, keczupów, zabielaaczy do kawy, słodzików, dżemów oraz polioli użytecznych jako zamienniki sacharozy. Wysokoscukrzony syrop służy także do otrzymywania karmelu używanego do barwienia i nadawania specyficznego aro-

matu i smaku żywności oraz do wytwarzania glukozy i syropów fruktozowych. W browarnictwie są one dodawane do brzeczki przy warzeniu piwa.

Zależnie od pożądanego stopnia hydrolizy i wytwarzanego produktu w poszczególnych etapach przetwórstwa skrobi stosuje się kolejno rozmaite enzymy różniące się niekiedy dość znacznie optymalną temperaturą i kwasowością reakcji. Uniemożliwia to równoczesne ich stosowanie i stwarza konieczność podziału procesu na etapy upłynniania i scukrzania, poprzedzone regulacją pH i temperatury substratu oraz produktów pośrednich. Zwiększa to koszt procesu wskutek zużycia energii podczas ogrzewania i chłodzenia mieszaniny reakcyjnej oraz roztworów NaOH i HCl używanych do regulacji pH. Rozpuszczalność ziaren skrobi dopiero w temperaturze około 100°C jest główną przyczyną stosowania w etapie upłynniania termostabilnych  $\alpha$ -amylaz nie ulegających inaktywacji w warunkach procesu. Możliwość stworzenia układu multienzymatycznego zapewniającego jednoetapową hydrolizę skrobi i obniżenie kosztów zależy od znalezienia nowych źródeł enzymów amylolytycznych i ewentualnie izomerazy glukozy o dużej termostabilności i podobnym optymalnym pH i temperaturze działania. Obiecującym źródłem takich enzymów są intensywnie obecnie badane mikroorganizmy rozwijające się w ekstremalnych warunkach.

## 2. Pożądane modyfikacje upłynniania skrobi

Celem upłynniania jest przekształcenie stężonej zawiesiny ziaren skrobiowych, zawierającej 30-35% suchej masy, w roztwór maltodekstryn, poddawany zazwyczaj dalszej hydrolizie przez glukoamylazę odszczepiającą reszty glukozy, pullulanazę znoszącą rozgałęzienia cząsteczek amylopektyny oraz  $\alpha$ -glukozydazę wykazującą preferencyjną aktywność względem maltozy i niższych oligosacharydów. Mleczko skrobiowe ogrzewa się w początkowym stadium upłynniania aż do dość znacznego przekroczenia temperatury kleikowania, zależnej od pochodzenia polisacharydu i wynoszącej zazwyczaj 70-90°C. Wskutek rozpuszczania amylozy następuje wzrost lepkości zolu osiągający maksimum w około 95°C, któremu przeciwdziałają przebiegająca po dodaniu enzymu hydroliza wewnątrzcząsteczkowych wiązań  $\alpha$ -1,4-glikozydowych. W celu rozłożenia występujących w ziarnach kompleksów skrobiowo-lipidowych znajdujących się w helikalnych obszarach cząsteczek upłynnianie należy początkowo prowadzić w temperaturze przekraczającej 100°C (1). Stosowane w tym celu  $\alpha$ -amylazy (EC 3.2.1.1) są zazwyczaj izolowane z grzybów strzępkowych i bakterii. Enzymy te odcinają duże fragmenty cząsteczek amylozy i amylopektyny, co prowadzi do szybkiego spadku lepkości zolu. W przypadku upłynniania skrobi zbożowej oprócz  $\alpha$ -amylazy powinna być stosowana ksylanaza (EC 3.2.1.32) rozkładająca zanieczyszczające ziarna polisacharydu pentozany, które zwiększają lepkość zawiesin skrobiowych (1). Obecnie znanych jest kilka ksylanaz o optymalnej temperaturze 90-100°C działających w umiarkowanie kwaśnym środowisku o pH 5,3-6,0



(tab. 1). Produktami długotrwałego upłynnienia są maltoza, maltotetraoza oraz maltotrioza hydrolizowana następnie z niewielką wydajnością do maltozy i glukozy oraz dekstryny graniczne wytwarzane z rozgałęzień cząsteczek amylopektyny, które zawierają nie rozszczepiane przez  $\alpha$ -amylazy wiązanie  $\alpha$ -1,6-glikozydowe.

Tabela 1

Źródła i optymalne warunki działania niektórych termostabilnych enzymów użytecznych w przetwórstwie skrobi

Enzym	Mikroorganizm źródłowy	Optymalne warunki działania		Literatura
		temperatura (°C)	pH reakcji	
$\alpha$ -amylaza	<i>Pyrococcus woesei</i>	100	5,5	(6)
	<i>Pyrococcus furiosus</i>	100	5,5-6,0	(3)
	<i>Thermococcus celer</i>	95	6,0	(4)
	<i>Thermotoga maritima</i>	70-100	6,0	(25)
	<i>Desulfurococcus mucosus</i>	105	6,0	(4)
	Szczep TY5S	100	5,0-6,0	(4)
	<i>Thermus filiformis</i>	95	5,5-6,0	(26)
glukoamylaza	<i>Halobacterium sodomense</i>	65	7,5	(16)
	<i>Humicola lanuginosa</i>	65-70	6,6	(16)
	<i>Cl. thermohydrosulphuricum</i>	75	4,0-6,0	(27)
	<i>Cl. thermosaccharolyticum</i>	70	5,0	(28)
	<i>Aspergillus niger</i>	60	4,5-5,0	(16)
pullulanaza	<i>Pyrococcus woesei</i>	105	6,0	(29)
	<i>Pyrococcus furiosus</i>	100	6,0	(30)
	<i>Thermococcus celer</i>	95	5,5-6,0	(4)
	<i>Desulfurococcus mucosus</i>	105	5,5	(4)
	Szczep TYS	100	6,5	(4)
	<i>Cl. thermohydrosulphuricum</i>	85-95	5,6	(17)
$\alpha$ -glukozydaza	<i>Pyrococcus woesei</i>	110	5,0-5,5	(29)
	<i>Pyrococcus furiosus</i>	115	5,5	(31)
	<i>Thermococcus hydrothermalis</i>	110	5,0-5,5	(19)
	<i>Sulfolobus sibiricae</i>	85	5,5	(32)
ksylanaza	<i>Thermotoga sp.</i>	100	5,3	(33)
	<i>Thermotoga maritima</i>	95	6,0	(34)
	<i>Thermotoga neapolitana</i>	95	6,0	(34)
	<i>Thermotoga thermarum</i>	90	6,0	(34)

Hydrolizę katalizowaną  $\alpha$ -amylazą prowadzi się przez około 2 h i w tym czasie tworzą się głównie maltodekstryny. Zależnie od pochodzenia  $\alpha$ -amylazy różnią się strukturą, ilością podjednostek, masą cząsteczkową, termostabilnością, aktywnością, wrażliwością na działanie aktywatorów i inhibitorów oraz warunkami działania. Pierwszym produkowanym na skalę przemysłową i dotychczas jeszcze stosowanym enzymem jest  $\alpha$ -amylaza z *Aspergillus oryzae* o optymalnej temperaturze reakcji 52°C. Preparat działa skutecznie w zakresie 45-60°C (Amylopol P), ale w wyższej temperaturze następuje gwałtowne zmniejszenie jego aktywności. Obecnie do



upłynniania skrobi stosuje się najczęściej termostabilne  $\alpha$ -amylazy z *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* oraz dostępny jako Termamyl® enzym z *Bacillus licheniformis*, którego czas półtrwania w temperaturze 95°C przy pH 6,5 wynosi około 11 h i maleje do 50 min w temperaturze 105°C. Producent preparatu sugeruje upłynnianie skrobi w dwóch etapach, najpierw przez 5-8 min w temperaturze 105-107°C niezbędnej do rozpuszczenia zawiesiny substratu, a następnie przez 1-2 h w 95°C, aż do uzyskania oligosacharydów zawierających 10-13 reszt glukozy (2). Aby ograniczyć wpływ inaktywacji enzymu na wydajność reakcji korzystne jest dodanie dodatkowej porcji preparatu po pierwszym etapie upłynniania przebiegającym w wyższej temperaturze. Termamyl®, podobnie jak i inne najczęściej stosowane  $\alpha$ -amylazy, jest aktywowany wapniem wiążącym domeny strukturalne enzymu stabilizując miejsce wiążące substrat oraz centrum aktywne. Dodanie jonów  $\text{Ca}^{2+}$  do uzyskania ich 5 mM stężenia w środowisku reakcji około 20-krotnie zwiększa czas półtrwania  $\alpha$ -amylazy z *Bacillus licheniformis* w temperaturze 90°C (3). Sole wapniowe polepszają stabilność wielu  $\alpha$ -amylaz z wyjątkiem enzymów wyizolowanych z niektórych archebakterii, które nie są aktywowane jonami  $\text{Ca}^{2+}$ .

Optymalne pH reakcji katalizowanej przez prawie wszystkie stosowane w przetwórstwie skrobi  $\alpha$ -amylazy mieści się w zakresie 5,5-6,5 (4). Natomiast pH zawiesiny skrobi (3,2-4,5) jest niższe i dla zapewnienia efektywnego działania enzymu należy zmniejszyć kwasowość środowiska roztworem NaOH (5). Niekorzystnym tego skutkiem jest wzrost zanieczyszczenia hydrolizatu maltulozą i innymi niepożądanymi produktami ubocznymi. Używane obecnie w dalszych etapach procesu glukozamylaza, pullulanaza i  $\alpha$ -glukozydaza przejawiają maksymalną aktywność przy pH około 4,5. Przed rozpoczęciem scukrzania konieczne jest zatem ponowne zakwaszenie substratu roztworem HCl, a po zakończeniu procesu zobojętnienie hydrolizatu. Wytwarzany wskutek kilkukrotnej regulacji pH chlorek sodu jest niepożądanym składnikiem końcowego produktu.

Koszt upłynniania skrobi w dużym stopniu zależy od zużycia energii podczas zagęszczania produktu. Można go zmniejszyć podwyższając temperaturę hydrolizy do 120-140°C. Obniża to lepkość zolu skrobiowego wytwarzanego w początkowym etapie reakcji umożliwiając zwiększenie stężenia skrobi w zawieszynie. Warunkiem przebiegu reakcji w wyższej temperaturze jest jednak zastąpienie dotychczas używanych  $\alpha$ -amylaz ich odpowiednikami o większej termostabilności, uzyskanymi z hipertermofili. Źródłem takich enzymów są, np. archebakterie *Pyrococcus furiosus* lub *Pyrococcus woesei*, których  $\alpha$ -amylazy przejawiają maksymalną aktywność w 100°C, różniąc się jednak optymalnym pH (tab. 1). Obie  $\alpha$ -amylazy mają podobny czas półtrwania w temperaturze 120°C wynoszący około 2 h i tylko w niewielkim stopniu różnią się składem aminokwasowym. Enzym z *Pyrococcus woesei* jest monomerem o masie cząsteczkowej 66 kDa aktywnym w zakresie temperatur 40-130°C (3,6,7). Natomiast  $\alpha$ -amylaza z *Pyrococcus furiosus* jest dimerem o masie cząsteczkowej około 132 kDa, zbudowanym z dwóch identycznych podjednostek i hydrolizującym amylopektynę, amylozę i glikogen bez wytwarzania glukozy, znajdującej się za-



zwyczaj w produktach reakcji katalizowanej enzymami z innych mikroorganizmów (3,6). W przeciwieństwie do  $\alpha$ -amylaz z bakterii, organizmów zwierzęcych i roślin, jony  $\text{Ca}^{2+}$  nie aktywują enzymu, a kationy  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$  są jego inhibitorami (6,7). Możliwość wyeliminowania ze środowiska reakcji jonów wapnia, które są inhibitorem izomerazy glukozy jest korzystna przy wytwarzaniu syropu fruktozowego (3). Źródłem  $\alpha$ -amylaz o równie wysokiej optymalnej temperaturze działania (95-105°C) są też szczepy archebakterii *TYS*, *TY*, *Thermococcus celer* i *Desulfurococcus mucosus* oraz termofilne eubakterie *Thermotoga maritima* i *Fervidobacterium pennavorans* (4,8). Zastąpienie  $\alpha$ -amylaz z *Bacillus licheniformis* enzymem wyizolowanym z *Pyrococcus furiosus* lub *Pyrococcus woesei* eliminuje stosowanie soli wapniowych i zapewnia wyższą optymalną temperaturę działania, znacznie większą termostabilność, niższe pH reakcji zapobiegające tworzeniu się niepożądanych barwnych zanieczyszczeń oraz około 2-krotnie wyższą aktywność preparatu (3).

Praktyczne wykorzystanie enzymów z archebakterii jest ograniczone dość trudną hodowlą tych mikroorganizmów przebiegającą w podwyższonej temperaturze i najczęściej w środowisku beztlenowym (9). Wytwarzające termostabilne  $\alpha$ -amylazy archebakterie *Pyrococcus furiosus* i *Pyrococcus woesei* dobrze rozwijają się w 90-100°C w atmosferze  $\text{CO}_2/\text{N}_2$  (1:4, v/v) w podłożach zawierających ekstrakt drożdżowy, pepton, skrobię i cysteinę, wzbogaconych chlorkami, węglanami, siarczanami (VI), selenianami (IV) i fosforanami (V), zawierającymi kationy  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{2+}$  (3,6). Produktami fermentacji są m.in. kwas octowy, wodór i dwutlenek węgla (9). Dodanie do podłoża siarki elementarnej zwiększa wydajność biomasy wskutek wyeliminowania wydzielania wodoru działającego jako inhibitor wzrostu tych mikroorganizmów, powodując jednak tworzenie toksycznego i działającego korozyjnie siarkowodoru (9). Niepożądane metabolity i wysoka temperatura rozwoju utrudniają hodowlę hipertermofili użytecznych jako źródło enzymów o dużej ciepłoodporności. Rozwiązaniem problemu jest sklonowanie genu kodującego syntezę termostabilnego enzymu do mikroorganizmu mezofilnego. Zapewnia to obniżenie temperatury hodowli, zwiększenie wydajności biomasy i wyeliminowanie niepożądanych produktów oraz uzyskanie znacznej nadekspresji wytwarzania enzymu, nawet do 30% ogólnej ilości białek komórkowych (10). Wytworzony enzym jest jedynym termostabilnym białkiem w komórce i pozostaje w roztworze po cieplnym strąceniu innych białek. Umożliwia to oczyszczenie enzymu w stopniu wystarczającym w przetwórstwie skrobi bez stosowania kosztownych technik chromatograficznych (11). Badania możliwości zastosowania termostabilnych enzymów nie są zbyt zaawansowane i według aktualnych informacji przeprowadzono dotychczas ekspresję genów kodujących termostabilne  $\alpha$ -amylazy z *Pyrococcus furiosus*, *Bacillus* sp. TS-23 i *Dictyoglomus thermophilum* do *Escherichia coli*, a w przypadku *Pyrococcus furiosus* także do *Bacillus subtilis* (12-15).



### 3. Ulepszenia procesu scukrzania

Do scukrzania stosuje się glukoamylazę (EC 3.2.1.3.) oddzielającą reszty glukozy z nieredukujących końców cząsteczek maltodekstryn wytworzonych podczas upłynniania skrobi. Enzym ten występuje, np. w grzybach strzępkowych: *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus candidus*, *Humicola lanuginosa* i *Thermomyces lanuginosa*, drożdżach: *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia burloni*, *Saccharomyces fibuligera* oraz w bakteriach: *Bacillus stearothermophilus*, *Flavobacterium* sp., *Clostridium hydrosulphuricum* i *Halobacterium sodomense* (16). Najlepiej zbadane glukoamylazy grzybowe są zazwyczaj glikoproteinami o masie cząsteczkowej 26-112 kDa zawierającymi 5-20% reszt glukozy, glukozaminy galaktozy i mannozy. Optymalne pH glukoamylaz mieści się przeważnie w zakresie 4,5-5,5, a optymalna temperatura działania nie przekracza 40-60°C. Wyjątkiem są termostabilne glukoamylazy z *Clostridium thermosaccharolyticum* i *Clostridium thermohydrosulphuricum* przejawiające maksymalną aktywność w 70 i 75°C oraz enzym z *Humicola lanuginosa* działający także w alkalicznym środowisku o pH nie większym od 11,0 (16,17). Jony metali nie aktywują glukoamylaz, a kationy  $Hg^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  i  $Cu^{2+}$  są ich inhibitorami.

Głównie ze względu na właściwości aktualnie stosowanych preparatów enzymu z *Aspergillus niger* lub *Aspergillus awamori* pH hydrolizatu otrzymanego w etapie upłynniania jest ponownie zmniejszane do 4,2-4,5, a temperaturę reakcji obniża się do około 60°C (1). Zakwaszenie środowiska inaktywuje też pozostałość  $\alpha$ -amylazy stosowanej do upłynniania skrobi, co zabezpiecza przed nadmierną hydrolizą i zmniejszeniem cząsteczek dekstryn poniżej wielkości zapewniającej najskuteczniejsze działanie glukoamylazy (1). W początkowym etapie scukrzania aktywność  $\alpha$ -amylazy jest jednak korzystna zwiększając liczbę dostatecznie dużych jeszcze cząsteczek z nieredukującymi końcami od których oddzielane są reszty glukozy (16). Glukoamylaza najszybciej rozszczepia wiązania  $\alpha$ -1,4-glikozydowe, natomiast względem znajdujących się w rozgałęzieniach cząsteczek wiązań ( $\alpha$ -1,6) ma niewielką aktywność (16). Aby zwiększyć równoważnik glukozowy (DE) produktu łącznie z glukoamylazą stosuje się często pullulanazę (EC 3.2.1.41) o znacznie wyższej od glukoamylazy zdolności hydrolizy tych wiązań. Skuteczność scukrzania obniża też resynteza maltozy, izomaltozy oraz  $\alpha$ -1,4- i  $\alpha$ -1,6-oligosacharydów, zachodząca po zwiększeniu stężenia glukozy w syropie ponad 35-40% (5,16). Liczbę tych produktów można ograniczyć dobierając odpowiedni czas i temperaturę reakcji, rodzaj enzymu i stężenie substratu oraz stosując hydrolizujące maltozę  $\alpha$ -glukozydazy (EC 3.2.1.20). Synteza  $\alpha$ -1,6-oligosacharydów jest niepożądana m.in. w przypadku gdy hydrolizat przetwarza się na syrop fruktozowy przeznaczony w dalszym etapie do produkcji słodzików. Podczas długotrwałego scukrzania związki te kumulują się w produkcie wskutek przesunięcia równowagi reakcji wywołanego małą szybkością ich enzymatycznej hydrolizy. Resyntezę  $\alpha$ -1,6-oligosacharydów ograniczono ostatnio poprzez wymianę kilku reszt aminokwasowych w okolicy centrum aktywnego enzymu, uzyskując około 300-krotne zmniejszenie udziału tych węglowodanów w ogólnej ilości produktów rewersji glukozy (18).



Scukrzanie jest etapem ograniczającym wydajność procesu ze względu na długi czas reakcji wynoszący 48-72 h. Ponadto regulacja pH wytwarza chlorek sodu niepożądany w końcowym produkcie. Zmniejszenie czasu reakcji i obniżenie kosztu można by osiągnąć stosując termostabilne glukoamylazy umożliwiające jednoetapową hydrolizę w 90-100°C przy pH zbliżonym do optymalnych warunków działania użytej  $\alpha$ -amylazy. Dotychczas nie stwierdzono jednak występowania glukoamylaz o optymalnej temperaturze działania wyższej od 75°C. Hipertermofile syntetyzujące najbardziej termostabilne enzymy hydrolizują skrobię zewnątrzkomórkowo transportowanymi do środowiska amylazami i/lub amylopullulanazami rozszczepiającymi wiązania  $\alpha$ -1,6-glikozydowe, znosząc rozgałęzienia cząsteczek amylopektyny i przekształcając ją w makrocząsteczki liniowych oligosacharydów. Związki te są wchłaniane do komórek, gdzie następuje dalsza degradacja katalizowana  $\alpha$ -glukozydazą. Oba enzymy występujące, np. w *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus woesei* i *Thermococcus hydrothermalis* mogą być stosowane zamiast glukoamylazy do scukrzania maltodekstryn w temperaturze powyżej 75°C (4,19). W przeciwieństwie do dotychczas zbadanych glukoamylaz termostabilne pullulanazy przejawiają maksymalną aktywność w wyższej temperaturze nawet około 100°C, a ich optymalne pH mieści się w zakresie 5,5-6,5 (tab. 1). Najbardziej przydatne są pullulanazy z *Pyrococcus woesei*, *Pyrococcus furiosus* i *Thermus aquaticus* YT1 o okresach półtrwania w temperaturze 95-98°C wynoszących odpowiednio 11, 13 i 4,5 h (3,6,20). Natomiast pullulanaza z *Bacillus stearothermophilus* tracąca połowę pierwotnej aktywności po 10 min inkubacji w 70°C i enzym z *Clostridium thermohydrosulphuricum* o czasie półtrwania nie przekraczającym 25 min w 85°C są zbyt mało stabilne (17,21).

Dobre współdziałanie z termostabilnymi pullulanozami wykazują izolowane z archebakterii  $\alpha$ -glukozydazy, których optymalna temperatura działania wynosi 95-115°C, a optymalne pH 5,0-5,5 (tab. 1). Wszystkie  $\alpha$ -glukozydazy są enzymami wewnątrzkomórkowymi hydrolizującymi wiązania  $\alpha$ -1,4- i/lub  $\alpha$ -1,6-glikozydowe w cząsteczkach oligosacharydów. Najbardziej termostabilne  $\alpha$ -glukozydazy występujące w komórkach *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus woesei* i *Thermococcus hydrothermalis* osiągają maksymalną aktywność w temperaturze 115, 110 i 110°C przy pH 5,5-6,0 (6,19). Izolowana z archebakterii *Thermococcus hydrothermalis*  $\alpha$ -glukozydaza jest preferencyjnie aktywna względem maltozy, ale hydrolizuje też wydajnie oligosacharydy zbudowane z 3 do 7 reszt glukozydowych, uwalniając glukozę i maltozę. Natomiast skrobia i wielkocząsteczkowe dekstryny nie są degradowane (19). Znaczna odporność cieplna tej  $\alpha$ -glukozydazy przejawiająca się 27 h okresem półtrwania w temperaturze 96°C przy pH 5,5 w obecności 10% zolu skrobiowego zapewnia dobre współdziałanie enzymu, np. z termostabilną  $\alpha$ -amylazą z *Bacillus licheniformis*. Syrop skrobiowy wytworzony po 2 h jednoetapowej hydrolizy zawiera w suchej masie 74% maltozy i glukozy (19).



#### 4. Zastosowanie termostabilnych enzymów w produkcji syropu fruktozowego

Hydrolizaty skrobiowe po zobojętnieniu, odbarwieniu węglem aktywnym i demineralizacji na żywicach jonowymiennych są często stosowane do produkcji syropów fruktozowych, używanych m.in. jako zamienniki sacharozy, np. w żywności dla diabetyków. Do przekształcenia glukozy we fruktozę stosuje się unieruchomioną izomerazę ksylozową (EC 3.1.5) wytwarzaną wewnątrzkomórkowo przez *Actinoplanes missouriensis*, *Bacillus coagulans*, *Streptomyces albus* i inne mezofilne drobnoustroje wykorzystujące ksylozę jako źródło węgla. Enzymy izolowane z tych mikroorganizmów mają dość dużą termostabilność w optymalnym pH mieszczącym się w zakresie 7,5-8,5 (1). Ich zdolność katalityczną zapewniają znajdujące się w centrum aktywnym kationy  $Mg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  i niekiedy  $Mn^{2+}$  współdziałające w reakcjach izomeryzacji D-ksylozy lub D-glukozy wytwarzających odpowiednio D-ksylulozę albo D-fruktozę (24). Natomiast jony  $Ca^{2+}$  stosowane jako aktywator  $\alpha$ -amylazy wprowadzonej w początkowym stadium procesu są zazwyczaj inhibitorem izomerazy ksylozowej i powinny być usunięte z substratu (22). Izolowana na skalę przemysłową izomeraza ksylozowa ze szczepu *Actinoplanes missouriensis* przejawia prawie 2-krotnie większą aktywność izomeryzacji glukozy niż ksylozy.

Udział fruktozy w suchej masie syropu po izomeryzacji powinien być większy od 55%. Ze względu na zbyt małą stałą równowagi reakcji w dotychczas stosowanej temperaturze 55-65°C stopień konwersji glukozy nie przekracza jednak 42% (1,5). Niezbędne jest zatem kosztowne frakcjonowanie chromatograficzne produktu. Można by jego uniknąć stosując enzym aktywny w temperaturze około 110°C, zwiększającej konwersję glukozy w stopniu wystarczającym do zapewnienia wymaganego udziału fruktozy w syropie. Inną zaletą podwyższenia temperatury jest zmniejszenie lepkości roztworu, umożliwiające zwiększenie wydajności procesu poprzez wzrost szybkości przepływu substratu przez reaktor z unieruchomionym enzymem. Tak wysoka temperatura znacznie jednak przyśpiesza przebiegające w alkalicznym środowisku reakcje brunatnienia wytwarzające niepożądane produkty uboczne i to jest przyczyną prowadzenia konwersji glukozy w temperaturze niekiedy niższej od optimum temperaturowego stosowanego w procesie enzymu (5). Aby temu zapobiec należy zastosować termostabilną izomerazę ksylozową aktywną w przeciwieństwie do obecnie używanych enzymów w umiarkowanie kwaśnym środowisku hamującym niepożądane reakcje. Niektóre izomerazy ksylozowe są nieprzydatne do wytwarzania syropu fruktozowego z powodu konieczności ich aktywacji działającymi toksycznie solami kobaltu.

Niewielkie obniżenie pH i zwiększenie temperatury reakcji do około 85°C umożliwiają izomerazy ksylozowe wytwarzane przez *Thermoanaerobacter* i *Clostridium thermosulphurogenes*. Oba enzymy przejawiają maksymalną aktywność w temperaturze 80°C przy pH 7,0-7,5. Ich czasy półtrwania w 70°C w obecności działających stabilizująco kationów  $Mg^{2+}$  i  $Co^{2+}$  wynoszą około 42 h. Natomiast po 1 h inkubacji



w 85°C następuje zmniejszenie aktywności do około 90% pierwotnej wartości (23). Znacznie lepsza jest izomeraza ksylozowa o optymalnej temperaturze 105°C i optymalnym pH 6,5 wyizolowana ze szczepu *Thermotoga maritima*. Enzym ten ma dużą stabilność w 100°C, a jego czas półtrwania w 115°C przy pH 5,6 wynosi 10 min (35).

## 5. Podsumowanie

Kilkuetapowe wytwarzanie rozmaitych syropów skrobiowych znacznie zwiększa koszty procesu, które można ograniczyć stosując enzymy działające w kompatybilnych warunkach, eliminujących wytwarzanie niepożądanych produktów ubocznych. Źródłem takich enzymów są mało jeszcze zbadane drobnoustroje termofilne oraz zmodyfikowane genetycznie, łatwe do hodowli szczepy różnych drobnoustrojów.

## Literatura

1. Crabb W. D., Mitchinson C., (1997), TIBTECH., 15, 349-352.
2. Novo Nordisk, Dania, (1998), Use termamyl® for starch liquefaction. Materiały firmowe, 1-4.
3. Dong G., Vieille C., Savchenko A., Zeikus G., (1997), Appl. Environm. Microbiol., 63, 3569-3576.
4. Leuschner C., Antranikian G., (1995), World J. Microbiol. Biotechnol., 11, 95-114.
5. Crabb W. D., Shetty J. K., (1999), Curr. Op. Microbiol., 2, 252-256.
6. Koch R., Spreinat A., Lemke K., Antranikian G., (1991), Arch. Microbiol., 15, 572-578.
7. Laderman K. A., Davist B. R., Krutzsch H. C., Lewis M. S., Griko Y. V., Privalov P. L., Anfinsen C. B., (1993), J.Biol.Chem., 268, 24394-24401.
8. Kelly R. M., Brown S. H., (1993), Curr. Op. Biotechnol., 4, 188-192.
9. Synowiecki J., (1998), Biotechnologia, 42, 98-105.
10. Kidwell J., Kolibachuk D., Dennis D., (1996), Biotechnol. Bioeng., 50, 108-114.
11. Dąbrowski S., Maciuńska J., Synowiecki J., (1998), Mol. Biotechnol., 10, 217-222.
12. Fukusumi S., Kamizono A., Horinouchi S., Beppu T., (1988), Eur. J. Biochem., 174, 15-21.
13. Laderman K. A., Asada K, Uemori T., Mukai H., Taguchi Y., Kato I., Anfinsen C. B., (1993), J. Biol. Chem., 268, 24404-24407.
14. Jorgenesen S., Vorgias C. E., Antranikian G., (1997), J. Biol. Chem., 272, 16335-16342.
15. Lin L. L., Hsu W. H., (1997), Lett. Appl. Microbiol., 24, 365-368.
16. James J. A., Lee B. H., (1997). J. Food Biochem., 21, 1-52.
17. Melasniemi H., (1987), Biochem. J., 246, 193-197.
18. Sierks M., Svennson B., (1994), Protein Eng., 7, 1479-1484.
19. Legin E., Copinet A., Duchiron F., (1998), Biotechnol. Lett., 20, 363-367.
20. Plant A. R., Morgan H. W., Daniel R. M., (1986), Enzyme Microb. Technol., 8, 668-672.
21. Suzuki Y., Chishiro M., (1983), Appl. Microbiol. Biotechnol., 17, 24-29.
22. Smith A., Rangarajan M., Hartley B. S., (1991), Biochem. J., 277, 255-261.
23. Lee C., Zeikus G. J., (1991), Biochem. J., 273, 565-571.
24. van Bastelaere P., Vangrysperre W., Kersters-Hilderson H., (1991), Biochem. J., 278, 285-292.
25. Schumann J., Wirba A., Jaenicke R., Stetter K. O., (1991), FEBS Lett., 282, 122-126.
26. Egas M. C. V., da Costa M. S., Covan D. A., (1998), Extremophiles, 2, 23-32.
27. Hyun H. H., Zeikus J. G., (1985), Appl. Env. Microbiol., 49, 1168-1173.
28. Specka U., Mayer F., Antranikian G., (1991), Appl. Env. Microbiol., 57, 2317-2323.



29. Linke B., Rudiger A., Wittenberg G., Jorgensen P. L., Antranikian G., (1992), DECHEMA Biotechnol. Conf., 5, 161-163.
30. Brown S. H., Constantino H. R., (1990), Appl. Env. Microbiol., 56, 1985-1991.
31. Constantino H. R., Brown S. H., Kelly R. M., (1990), J. Bacteriol., 172, 3654-3660.
32. Di Lernia I., Morana A., Ottombrino A., Fusco S., Rossi M., de Rosa M., (1998), Extremophiles, 2, 409-416.
33. Ruttersmith L. D., Daniel R. M., (1991), Biochem. J., 277, 887-890.
34. Sunna A., Staffregen T., Antranikian G., (1992), DECHEMA Biotechnol. Conf., 5, 97-99.
35. Brown S. H., Sloholm C., Kelly R. M., (1993), Biotech. Bioeng., 41, 878-886.