



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

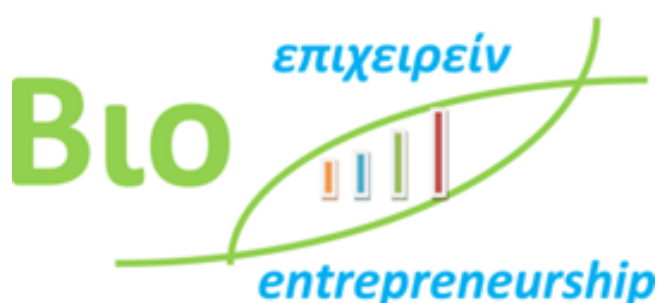
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ

ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΧΗΜΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ



ΔΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΒΙΟΕΠΙΧΕΙΡΕΙΝ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΝΖΥΜΩΝ ΑΠΟ ΦΥΤΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΣ ΥΛΕΣ ΓΙΑ ΤΙΣ
ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΕΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΚΑΛΛΥΝΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΩΝ.
ΜΕΛΕΤΗ ΣΚΟΠΙΜΟΤΗΤΑΣ.
CLOUDPHARM**

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΛΕΩΝΙΔΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

ΚΑΡΑΟΥΛΗ ΡΑΦΑΗΛΙΑ ΑΡΓΥΡΩ

A.M. 00115

ΛΑΡΙΣΑ, 2023



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY
NATIONAL HELLENIC RESEARCH FOUNDATION
INSTITUTE OF CHEMICAL BIOLOGY



INTERSTITUTIONAL PROGRAM OF POSTGRADUATE STUDIES

IN

BIOENTREPRENEURSHIP



MASTER THESIS

**PRODUCTION OF ENZYMES FROM PLANT RAW MATERIALS FOR
THE FOOD, COSMETICS AND PHARMACEUTICAL INDUSTRIES.
FEASABILITY STYDY.
CLOUDPHARM**

SUPERVISOR: LEONIDAS DIMITRIOS, PROFESSOR OF BIOCHEMISTRY

**KARAOULI RAFAILIA ARGYRO
A.M. 00115
LARISSA, 2023**

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο σπουδών για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στο

ΒΙΟΕΠΙΧΕΙΡΕΙΝ

που απονέμει το Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, σε συνεργασία με *χώρος εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας* (αν υπάρχει).

Εγκρίθηκε την από την τριμελή εξεταστική επιτροπή:

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ

ΒΑΘΜΙΔΑ

ΥΠΟΓΡΑΦΗ

(Επιβλέπων/ουσα)

(Μέλος 1)

(Μέλος 2)

Ευχαριστίες

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο πλαίσιο του μεταπτυχιακού προγράμματος ΒΙΟΕΠΙΧΕΙΡΕΙΝ που συνδιοργανώνεται από το Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών και το Τμήμα Βιοχημείας Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου και να ευχαριστήσω έναν αριθμό ανθρώπων, χωρίς τους οποίους δεν θα ήταν δυνατή η πραγματοποίηση της μεταπτυχιακής μου εργασίας, όπως επίσης δε θα ήταν ίδια και η εμπειρία του μεταπτυχιακού.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου Λεωνίδα Δημήτριο για την υπομονή και την καθοδήγηση που μου παρείχε κατά την διάρκεια της εργασίας. Επιπλέον θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στον καθηγητή Ζουμπουλάκη Παναγιώτη και την εταιρεία CloudPharm για την πολύτιμη στήριξη που μου παρείχαν ώστε να δομήσω την διατριβή μου. Θα ήθελα επίσης να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στις τεχνικούς συμβούλους της CloudPharm κ. Ζαρμπαλά Λία και κ. Ρουσσάκη Μαρίνα για την βοήθεια τους. Κατόπιν θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Ζωγράφο Σπύρο για την βοήθεια που μου παρείχε για την εκπόνηση της εργασίας μου.

Τέλος θα ήθελα να πω ένα τεράστιο ευχαριστώ στην οικογένεια μου και στους δικούς μου ανθρώπους για την στήριξη που μου παρείχαν καθ' όλη την διάρκεια του μεταπτυχιακού και της παρούσας διατριβής.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT.....	7
ΛΕΞΕΙΣ-ΚΛΕΙΔΙΑ.....	8
ΣΚΟΠΟΣ.....	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
2. ΚΥΡΙΟ ΜΕΡΟΣ.....	9
2.1. ENZYMA ΣΤΗΝ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ.....	9
2.1.2. ENZYMA ΣΤΗΝ ΓΑΛΑΚΤΟΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ.....	10
2.1.3. ENZYMA ΣΤΗΝ ΑΡΤΟΠΟΙΕΙΑ.....	15
2.1.4. ENZYMA ΣΤΗΝ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΛΙΕΥΜΑΤΩΝ.....	17
2.1.5. ENZYMA ΣΤΗΝ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΡΕΑΤΩΝ.....	19
2.2. ENZYMA ΣΤΗΝ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ ΚΑΛΛΥΝΤΙΚΩΝ.....	25
2.3. ENZYMA ΣΤΗΝ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ ΦΑΡΜΑΚΩΝ.....	29
3. ΜΕΛΕΤΗ ΣΚΟΠΙΜΟΤΗΤΑΣ.....	35
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	45
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	47

Περίληψη

Η σημασία της παραγωγής και της χρήσης των ενζύμων στη σύγχρονη βιομηχανική βιοτεχνολογία αυξάνεται συνεχώς. Η έλευση της γενετικής μηχανικής έχει πλέον διευκολύνει την παραγωγή σε μεγάλη κλίμακα φυτικών ενζύμων που παράγονται φυσικά μόνο σε μικρές ποσότητες. Η εξέλιξη αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική όσον αφορά την παραγωγή ενζύμων και άλλων πρωτεϊνών θεραπευτικής σημασίας, οι οποίες είναι πλέον διαθέσιμες σε κλινικά χρήσιμες ποσότητες. Τα ένζυμα που προορίζονται για θεραπευτικές εφαρμογές υπόκεινται σε πολύ υψηλότερο βαθμό μεταγενέστερης επεξεργασίας, που συχνά περιλαμβάνει 3-4 χρωματογραφικά στάδια. Αν και η ενζυμολογία είναι ένας από τους παλαιότερους κλάδους των βιοχημικών επιστημών, εξακολουθεί να είναι ένας τομέας συνεχιζόμενης, ενεργής έρευνας. Η συνεχής ανακάλυψη νέων ενζύμων και η καλύτερη κατανόηση των ήδη ανακαλυφθέντων ενζύμων και της λειτουργικής τους σημασίας υποδηλώνουν πολλές νέες εφαρμογές για αυτές τις καταλυτικές δραστηριότητες. Η παγκόσμια αγορά ενζύμων έχει καθιερωθεί με κύριες εφαρμογές στα τρόφιμα τα φαρμακευτικά προϊόντα και τα καλλυντικά. Η αγορά οδηγείται κυρίως από την αυξανόμενη ζήτηση από τις βιομηχανίες γαλακτοκομικών προϊόντων και ζυθοποιίας. Η ανάπτυξη της αγοράς μπορεί επίσης να αποδοθεί στην αλλαγή των προτιμήσεων των καταναλωτών σε σχέση με τις μεταποιημένα και συσκευασμένα τρόφιμα λόγω της αυξανόμενης ευαισθητοποίησης προς την ασφάλεια και την προστασία των τροφίμων. Ο τομέας των βιομηχανικών ενζύμων κατηγοριοποιείται σε ένζυμα έντασης επένδυσης και ένζυμα μακράς διάρκειας κύκλου ανάπτυξης από τους βασικούς κατασκευαστές ενζύμων. Η αγορά έχει παρατηρήσει αύξηση της ζήτησης για υψηλής ποιότητας φυτικών ενζύμων. Ως αποτέλεσμα, οι προμηθευτές και οι κατασκευαστές πρώτων υλών έχουν σημαντικές ευκαιρίες για την παροχή ομοιόμορφων και υψηλής ποιότητας ενζύμων μέσω μιας αναθεωρημένης αλυσίδας εφοδιασμού. Η αγορά ενζύμων επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από από τις εταιρίες Novozymes AG, DuPont Danisco, και DSM. Η αγορά βιομηχανικών ενζύμων είναι ενοποιημένη και κυριαρχείται από τους πέντε κορυφαίους παίκτες, δηλαδή τις Novozymes, DuPont, Royal DSM, AB Enzymes και BASF. Τον Δεκέμβριο του 2022, η Novozymes ανακοίνωσε τη συγχώνευση με την Chr. Hansen, μια δανέζικη εταιρεία γεωργικών, φαρμακευτικών και διατροφικών συστατικών. Η συγχώνευση αυτή αποτελεί μια στρατηγική κίνηση για τη Novozymes προκειμένου να ενισχύσει τη θέση της στην αγορά. Τον Αύγουστο του 2022, η BASF εκχώρησε τον επιχειρηματικό τομέα των ενζύμων αρτοποιίας BASF Nutrilife στην Lallemand Inc, η οποία είναι παραγωγός ενζύμων. Η Lallemand διαθέτει ένα μοναδικό χαρτοφυλάκιο προϊόντων, όπως οι τεχνολογικές πλατφόρμες ζύμης και βακτηρίων Lallemand. Τον Νοέμβριο του 2021, η Novozymes και η Novo Nordisk Pharmatech συνεργάστηκαν για την ανάπτυξη των καλύτερων στην κατηγορία τους τεχνικών ενζύμων για την υποστήριξη των

διαδικασιών παραγωγής στη βιοφαρμακευτική βιομηχανία. Η συνεργασία αυτή θα βοηθήσει τη Novozymes να επεκτείνει τις διαδικασίες στην αγορά των αναγεννητικών φαρμάκων.

Abstract

The importance of the production and use of enzymes in modern industrial biotechnology is growing. The advent of genetic engineering has now facilitated the large-scale production of plant enzymes that are only naturally produced in small quantities. This development is particularly important for the production of enzymes and other proteins of therapeutic importance, which are now available in clinically useful quantities. Enzymes intended for therapeutic applications are subject to a much higher degree of downstream processing, often involving 3-4 chromatographic steps. Although enzymology is one of the oldest branches of the biochemical sciences, it is still an area of ongoing, active research. The continued discovery of new enzymes and a better understanding of already discovered enzymes and their functional significance suggest many new applications for these catalytic activities. The global enzyme market is well established with major applications in food, pharmaceuticals and personal care and cosmetics. The market is mainly driven by the increasing demand from the dairy and brewing industries. The market growth can also be attributed to the changing consumer preferences towards processed and packaged foods due to increasing awareness towards food safety and security. The industrial enzymes segment is categorized into investment-intensive enzymes and long development cycle enzymes by key enzyme manufacturers. The market has witnessed an increase in demand for high quality plant enzymes. As a result, suppliers and raw material manufacturers have significant opportunities to provide uniform and high-quality enzymes through a revised supply chain. The enzyme market is largely influenced by the dominant supply from Novozymes AG, DuPont Danisco, and DSM. The industrial enzymes market is consolidated in nature and is dominated by the top five players, namely, Novozymes, DuPont, Royal DSM, AB Enzymes, and BASF. In December 2022, Novozymes announced the merger with Chr. Hansen, a Danish company of agricultural, pharmaceutical, and food ingredients. This merger is a strategic move for Novozymes to strengthen its hold in the market. In August 2022, BASF divested its BASF Nutrilife baking enzymes business segment to Lallemand Inc which is an enzyme manufacturer. Lallemand has a unique product portfolio such as Lallemand yeast and bacteria technology platforms. In November 2021, Novozymes and Novo Nordisk Pharmatech collaborated on the development of best-in-class technical enzymes to support production processes in the biopharmaceutical industry. This collaboration will help Novozymes to scale up the processes in the regenerative medicines market.

Λέξεις κλειδιά : Φυτικά ένζυμα, βιομηχανία τροφίμων, καλλυντικών, φαρμάκων, μελέτη σκοπιμότητας

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής είναι η μελέτη φυτικών ενζύμων καθώς η ζήτηση τους στον τομέα της βιομηχανίας αυξάνεται συνεχώς. Στο πρώτο μέρος της διπλωματικής διεξάγεται η ανάλυση της χρήσης και της παραγωγής φυτικών ενζύμων στις βιομηχανίες τροφίμων φαρμάκων και καλλυντικών. Στην συνέχεια, στο δεύτερο μέρος της διπλωματικής ακολουθεί μελέτη σκοπιμότητας στην οποία αναλύεται η δυναμική της αγοράς φυτικών ενζύμων σε παγκόσμιο επίπεδο, ο ανταγωνισμός, το κόστος παραγωγής και μέσω μιας SWOT analysis προκύπτουν οι δυνάμεις, οι αδυναμίες, οι ευκαιρίες και οι απειλές που λαμβάνουν χώρα σε μια βιομηχανία η οποία θέλει να εισχωρήσει στον τομέα της αγοράς και της παραγωγής φυτικών ενζύμων.

1.Εισαγωγή

Τα ένζυμα είναι μια κατηγορία ειδικών λειτουργικών πρωτεϊνών, τα οποία δρουν ως βιοκαταλύτες, με ευρεία χρήση στη βιοτεχνολογία τροφίμων. Ανάμεσα στα ένζυμα φυτικής προέλευσης περιλαμβάνονται η αμυλάση, η ιμβερτάση, η παπαΐνη, η βρωμελαΐνη, η φικίνη, η λιποξυγενάση κ.λπ. Αυτή η κατηγορία ενζύμων έχει διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην διαδικασία παραγωγή τροφίμων, όπως για παράδειγμα σε σιρόπια, προϊόντα αρτοποιίας, αλκοολούχα ποτά, γαλακτοκομικά προϊόντα κ.λπ. καθώς επίσης μπορούν να χρησιμεύσουν ως πρώτη ύλη στις βιομηχανίες φαρμάκων και καλλυντικών. Παλαιότερα τα ένζυμα απομονώνονταν από ζωντανά κύτταρα (φυτά και ζώα), γεγονός που οδήγησε στην εμπορική παραγωγή τους σε μεγάλη κλίμακα και στην ευρύτερη εφαρμογή τους στη βιομηχανία τροφίμων, καλλυντικών και φαρμάκων. Σήμερα, οι φυτικοί μικροοργανισμοί αποτελούν τη σημαντικότερη πηγή εμπορικών ενζύμων. Ωστόσο, η ασφάλεια του οργανισμού-πηγής είναι το πρωταρχικό κριτήριο για την αξιολόγηση ενός ενζυμικού προϊόντος. Τα βρώσιμα φυτά έχουν ιστορικό ασφαλούς χρήσης ως πηγές ενζύμων για τις βιομηχανίες που προαναφέρθηκαν. (Enzymes in Food Biotechnology, Anju Meshram, Gauri Singhal, Sameer S. Bhagyawant, Nidhi Srivastava)

2.Κύριο Μέρος της Εργασίας

2.1 Ένζυμα στην βιομηχανία τροφίμων

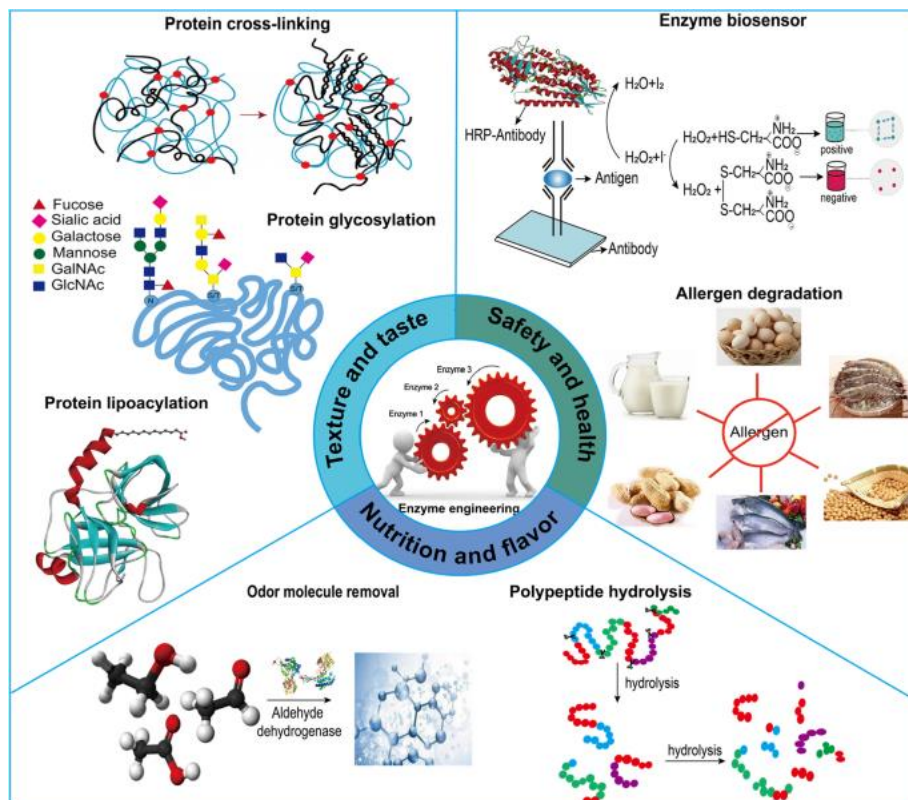
Τα ένζυμα μπορούν να τροποποιήσουν και να βελτιώσουν τις λειτουργικές και διατροφικές ιδιότητες των προϊόντων και, ως εκ τούτου, έχουν βρει ευρείες εφαρμογές στην επεξεργασία και παραγωγή όλων των ειδών τροφίμων προσφέροντας ποικίλα πλεονεκτήματα.

Τα ένζυμα χρησιμοποιούνται ως εναλλακτικές λύσεις στην παραδοσιακή τεχνολογία με βάση τα χημικά αντικαθιστώντας έτσι τις συνθετικές χημικές ουσίες μέσω ενός ευρέως φάσματος διεργασιών. Το γεγονός αυτό προσφέρει πλεονεκτήματα στις περιβαλλοντικές επιδόσεις των διεργασιών μειώνοντας έτσι τα επίπεδα κατανάλωσης ενέργειας και τη βιοδιάσπαση των προϊόντων.

Επιπλέον, δεδομένης της εξειδίκευσης από τα χημικά αντιδραστήρια, οι ενζυμοκαταλυόμενες διεργασίες έχουν λιγότερες παρενέργειες και υποπροϊόντα (απόβλητα). Το αποτέλεσμα είναι παραγωγή προϊόντων υψηλότερης ποιότητας με μικρότερο περιβαλλοντικό αποτύπωμα.

Τα ένζυμα μπορούν να καταλύουν αντιδράσεις υπό πολύ ήπιες συνθήκες επεξεργασίας που δεν καταστρέφουν τα χαρακτηριστικά των τροφίμων και των συστατικών αυτών. Τέλος, τα ένζυμα επιτρέπουν την εκτέλεση χρήσιμων διεργασιών για τη βιομηχανία τροφίμων που διαφορετικά θα ήταν αδύνατες. (Εικόνα 1)

Το πρώτο εμπορικό προϊόν τροφίμων που παρήχθη με τη βιοτεχνολογία ήταν ένα ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε στην παρασκευή τυριού. Πριν από την χρήση του στις βιοτεχνολογικές εφαρμογές, το ένζυμο αυτό έπρεπε να εξαχθεί από το στομάχι μοσχαριών, αρνιών και μικρών κασικιών, αλλά τώρα παράγεται από γενετικά τροποποιημένους μικροοργανισμούς στους οποίους δόθηκε το γονίδιο για την παραγωγή αυτού του ενζύμου. Η βιομηχανία τροφίμων χρησιμοποιεί περισσότερα από 55 διαφορετικά προϊόντα ενζύμων στην επεξεργασία τροφίμων. Αυτός ο αριθμός τείνει να αυξάνεται καθώς συνεχώς ανακαλύπτονται τρόποι αξιοποίησης της εξαιρετική ποικιλομορφίας του μικροβιακού κόσμου ώστε να ανακαλυφθούν νέα ένζυμα που θα αποδειχθούν σημαντικά στην παραγωγή και επεξεργασία των τροφίμων.



Εικόνα 1: Η επίδραση και οι εφαρμογές των φυτικών ενζύμων στην βιομηχανία τροφίμων (<https://www.mdpi.com/1420-3049/26/16/4751>)

2.1.1 Ένζυμα στην γαλακτοβιομηχανία

Ο τομέας των γαλακτοκομικών προϊόντων στη βιομηχανία τροφίμων χρησιμοποιεί ευρέως τα ένζυμα. Ο σύνθετος ετήσιος ρυθμός ανάπτυξης της παγκόσμιας αγοράς φυτικών ενζύμων στην

βιομηχανία γαλακτοκομικών προϊόντων αναμένεται να ξεπεράσει το 7% μέχρι το 2030. (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Πρόβλεψη παγκόσμιας αγοράς φυτικών ενζύμων στην βιομηχανία γαλακτοκομικών προϊόντων μέχρι το 2030.

Το γνωστότερο παρασκεύασμα γαλακτοκομικών ενζύμων είναι η πυτιά, μια συλλογική ονομασία για εμπορικά παρασκευάσματα που περιέχουν όξινες πρωτεάσες που εξαγονται από ζωικούς ιστούς. (Harboe, M. and Budtz, P. (1999) The production, action and application of rennet and coagulants. In: Technology of Cheesemaking (ed. B.A. Law). Sheffield Academic Press, Sheffield, pp. 33–65).

Τα προϊόντα αυτά συσσωματώνονται στο γάλα με την απομάκρυνση ενός υψηλά φορτισμένου πεπτιδικού θραύσματος από την κ-καζεΐνη στην επιφάνεια της μικροκυτταρικής καζεΐνης, της πλειοψηφικής μορφής της πρωτεΐνης του γάλακτος. Τα αποσταθεροποιημένα μικκύλια καζεΐνης συσσωρεύονται και σχηματίζουν τη δομή του θρόμβου γάλακτος που στη συνέχεια οξινίζεται από γαλακτικές καλλιέργειες για να γίνει τυρόπηγμα. (Lomholt, S.B. and Qvist, K.B. (1999) The formation of cheese curd. In: Technology of Cheesemaking (ed. B.A. Law). Sheffield Academic Press, Sheffield, pp. 66–98).

Αν και αυτή η χρήση των ενζύμων είναι η πιο σημαντική στον γαλακτοκομικό τομέα, οι σύγχρονες μέθοδοι παραγωγής έχουν καταστήσει δυνατές και άλλες εφαρμογές για την κάλυψη των μεταβαλλόμενων αναγκών και προτεραιοτήτων. Για παράδειγμα, στο Ηνωμένο Βασίλειο και στις ΗΠΑ η έλλειψη μοσχαριών από τα οποία θα μπορούσε να παραχθεί η παραδοσιακή πυτιά οδήγησε στην ανάπτυξη της τεχνολογίας παραγωγής ενζύμων με φυτικές πρώτες ύλες. Πάνω από το ήμισυ του συνόλου των ενζύμων πήξης του γάλακτος που χρησιμοποιούνται σε αυτές τις περιοχές είναι φυτικής και μικροβιακής προέλευσης, κυρίως

από γενετικά τροποποιημένα (ΓΤ) τρόφιμα, ζύμες και μύκητες που περιέχουν αντίγραφα του γονιδίου του μόσχου για την παραγωγή της χυμοσίνης, την κύρια όξινη πρωτεΐνάση που εμπλέκεται στην πήξη του γάλακτος.

Εκτός από τη χρήση των γαλακτοποιητικών ενζύμων για την παρασκευή τυριού, η γαλακτοβιομηχανία επίσης χρησιμοποιεί ένζυμα όπως λιπάσες, μη πηκτικές πρωτεάσες, αμινοπεπτιδάσες, λακτάσες, λυσοζύμη, λακτοπεροξειδάση και τρανσγλουταμινάση. Ορισμένες από αυτές τις εφαρμογές είναι παραδοσιακές (λιπάση για την ενίσχυση της γεύσης) ενώ άλλες είναι σχετικά νέες (υδρόλυση λακτόζης, επιταχυνόμενη ωρίμανση τυριού, έλεγχος μικροβιολογικής αλλοίωσης, τροποποίηση της λειτουργικότητας των πρωτεϊνών) κ.τ.λ.

Η επιτυχής εφαρμογή ορισμένων πηγών φυτικών πρωτεασών ως παράγοντες πήξης του γάλακτος για την τυροκομία έχει αποτελέσει παραδοσιακή πρακτική σε ορισμένες περιοχές του κόσμου, όπως στις χώρες της Μεσογείου, της Ινδίας και της Λατινικής Αμερικής.

Η παγκόσμια έλλειψη πτυιάς μοσχαριών και η αύξηση της παραγωγής τυριών έχουν αυξήσει τη ζήτηση για νέες πηγές πηκτικών ενζύμων, πρόβλημα που επιλύθηκε εν μέρει με τη χρήση ανασυνδυασμένης χυμοσίνης. Η προτίμηση για φυσικές πηγές πήξης θα ωθήσει την αναζήτηση νέων, φυσικών, σταθερών και αποτελεσματικών πηκτικών. Τάσεις στην κατανάλωση καθαρής ετικέτας (π.χ. μη γενετικά τροποποιημένα και φυσικά τρόφιμα) οδηγεί τις βιομηχανίες στην παραγωγή φυσικών γαλακτοπηκτικών ενζύμων που καλύπτουν τις προτιμήσεις των καταναλωτών και τις ανάγκες την σύγχρονης κοινωνίας.

Η μεγάλη διαθεσιμότητα και ποικιλομορφία των φυτικών πηγών πρωτεασών με πιθανή χρήση στην τυροκομία οδήγησε στη διερεύνηση νέων στρατηγικών για τη μείωση των περιορισμούς που σχετίζονται με τη διαθεσιμότητα των πηγών, τη φυσική διακύμανση της συγκέντρωσης (π.χ. καλλιέργεια φυτικών ιστών) και τη σταθερότητα κατά την αποθήκευση. Η παρουσία πρωτεασών με περιορισμένης εξειδίκευσης σε ορισμένα φυτικά εκχυλίσματα θα επιλυθεί με τον χαρακτηρισμό και την χρήση νέων στρατηγικών καθαρισμού για τη λήψη αναπαραγωγίμων και σταθερών παρασκευασμάτων για επιτυχή παραγωγή τυριού. Επιπλέον, η διαλογή νέων φυτικών πηγών μέσω πρωτεωμικών και γονιδιωματικών προσεγγίσεων διευκολύνει τον εντοπισμό νέων υποσχόμενων πηγών φυτικών πρωτεασών με πιθανή εφαρμογή σε άλλες βιοτεχνολογικές εφαρμογές-διαδικασίες, όπως η παραγωγή πρωτεϊνικών υδρολυμάτων με λειτουργικές ή/και βιοδραστικές ιδιότητες.

Τύποι και πηγές φυτικών πρωτεασών

Οι πρωτεάσες είναι πρωτεολυτικά ένζυμα τα οποία απαιτούνται και στα φυτά σε όλες τις πτυχές του κύκλου ζωής τους. Συμμετέχουν τόσο στην κινητοποίηση των αποθηκευτικών

πρωτεΐνών κατά τη βλάστηση των σπόρων μέχρι την έναρξη της του κυτταρικού θανάτου και των προγραμμάτων γήρανσης (Schaller 2004). Οι πρωτεάσες έχουν χωριστεί σε ομάδες με βάση τον καταλυτικό μηχανισμό που χρησιμοποιείται κατά την υδρολυτική διαδικασία. Οι κύριοι καταλυτικοί τύποι είναι οι ασπαρτικές, οι σερινικές, και οι πρωτεάσες κυστεϊνικές. (Bah et al. 2006).

Ασπαρτικές πρωτεάσες

Οι ασπαρτικές πρωτεάσες έχουν δύο ασπαρτικά κατάλοιπα στην καταλυτική τους θέση. Είναι οι περισσότερο δραστικές σε όξινο pH και παρουσιάζουν εξειδίκευση στη διάσπαση πεπτιδικών δεσμών μεταξύ υδρόφοβων καταλοίπων αμινοξέων που είναι υπεύθυνα για την καταλυτική δράση (Domingos et al. 2000). Ασπαρτικές πρωτεάσες με γαλακτοπηκτική δραστηριότητα έχουν αναφερθεί στην αγκινάρα (*Cynara scolymus L.*) (Llorente et al. 1997)- στο γαϊδουράγκαθο (*Silybum marianum L. Gaertn.*) (Vairo-Cavalli et al. 2005)- *Onopordum turcicum* (Tamer 1993)- στους πυρήνες ρυζιού (Asakura et al. 1997)- *Centaurea calcitrapa* (Domingos et al. 2000), στο *Cynara cardunculus*) και χρησιμοποιούνται παραδοσιακά στην τυροκομία περιοχή της Μεσογείου. (Barros et al. 2003).

Πρωτεάσες κυστεΐνης

Οι πρωτεάσες κυστεΐνης έχουν μεγάλες δυνατότητες στις βιομηχανίες τροφίμων, βιοτεχνολογίας και φαρμακευτικών προϊόντων λόγω της ιδιότητά τους να είναι ενεργές σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών και pH. Τα φυτά προσφέρουν μια ελκυστική εναλλακτική λύση για την παραγωγή CPs (Σύνθεση φωσφορικού καρβαμοϋλίου) καθώς απαντώνται φυσικά σε διάφορες ιστούς, σε ορισμένες περιπτώσεις σε υπερβολική ποσότητα (Gonzalez-Rabade et al. 2011).

Οι φικίνες που απομονώνονται από το καουτσούκ διαφόρων ειδών *Ficus* διαθέτουν ορισμένες χαρακτηριστικές ιδιότητες. Μια φικίνη που απομονώθηκε από το καουτσούκ του *Ficus racemosa*, έδειξε την ικανότητα να απορροφά την καζεΐνη, γεγονός που υποδηλώνει ότι έχει πηκτική ιδιότητα στο γάλα (Devaraj et al. 2008). Εκχυλίσματα πρωτεΐνών από σπόρους ηλίανθου και αλμπίζιας παρασκευάστηκαν για τον προσδιορισμό της γαλακτοπηκτικής δραστηριότητας και της δράσης αυτών των φυτικών εκχυλισμάτων σε ολόκληρη καζεΐνη βοοειδών (Egito et al. 2007).

Η ακτινιδίνη απομονώθηκε από ώριμα φρέσκα ακτινίδια (*Actinidia chinensis*) (Katsaros et al. 2010). Η πρωτεάση της πιπερόριζας απομονώθηκε από ριζώματα πιπερόριζας (*Zingiber officinale*) που έχουν μοριακή μάζα 36 kDa (Hashim et al. 2011).

Πρωτεάσες σερίνης

Φυτικές πρωτεάσες σερίνης έχουν ανακαλυφθεί και απομονωθεί από καουτσούκ, σπόρους, άνθη, στελέχη, φύλλα και ρίζες φυτών. Η νεριφολίνη, μια πρωτεάση σερίνης που μοιάζει με την χυμοθρυψίνη, έχει καθαριστεί από το καουτσούκης *Euphorbia neriifolia* (Yadav et al. 2011). Ένα άλλο ένζυμο με όνομα *Neriifolin S*, είναι μια διμερής πρωτεάση σερίνης μοριακής μάζας 94 kDa με γαλακτοπηκτική και έχει απομονωθεί από το καουτσούκ της *E. neriifolia* (Yadav et al. 2012). Religiosin (43,3 kDa), Religiosin B (63 kDa) και Religiosin C (80 kDa) απομονώθηκαν από το *Ficus religiosa* από τους Kumari et al. (2010), Kumari et al. (2012) και Sharma et al. (2012). αντίστοιχα. Η στρεμπλίνη, ένα θερμοσταθερό ένζυμο με μοριακή μάζα 63 kDa απομονώθηκε από το *Streblus asper* (Tripathi et al. 2011). Η Dubiumin απομονώθηκε από τους σπόρους του *Solanum dubium*, με μοριακή μάζα 66 kDa (Ahmed et al. 2009b). Η κουκουμισίνη από το *Cucumis melo* (Uchikoba και Kaneda 1996) και η λετουμίνη από το *Lactuca sativa* (Lo Piero et al. 2002) απομονώθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν ως πηκτικά του γάλακτος.

Παραγωγή φυτικών πρωτεασών

Οι πρωτεάσες που χρησιμοποιούνται ως πηκτικά του γάλακτος έχουν εντοπιστεί και μελετηθεί από σχεδόν κάθε μέρος του φυτού, είτε πρόκειται για σπόρο, είτε για άνθος. Τα ένζυμα αυτά μπορούν να ληφθούν από τη φυσική τους πηγή ή μέσω καλλιέργειας *in vitro* για να εξασφαλιστεί μια συνεχής προμήθεια φυτικών πρωτεασών (Gonzalez-Rabade et al. 2011).

Φυτικές πρωτεάσες ως ένζυμα πήξης του γάλακτος στην τυροκομία

Οι καρδοσίνες A και B εξήχθησαν από τα στίγματα και τους στύλους αποξηραμένων ανθών του *C. cardunculus* (Silva et al., 2003). Οι πρωτεάσες εκχυλίστηκαν από στίγματα του *C. Scolymus* (Sidrach et al. 2005), αποξηραμένα άνθη του *Moringa oleifera* (Pontual et al. 2012), φρέσκα άνθη *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (Vairo-Cavalli et al. 2005, 2008). Ένα ενζυμικό εκχύλισμα, με την ονομασία ονοπορδοσίνη ελήφθη από τα ανώτερα τμήματα (στίγματα και στύλοι) των νωπών ανθών του *Oenothera acanthium* (Brutti et al. 2012).

Εκχυλίσματα πρωτεϊνών ελήφθησαν από καρπούς *Bromelia hieronymi* (Bruno et al. 2002) και το παρασκεύασμα ονομάστηκε *hieronymain* (Bruno et al. 2010). Αποφλοιωμένα ριζώματα τζίντζερ χρησιμοποιήθηκαν για τη λήψη του ενζυμικού εκχυλίσματος (Hashim et al. 2011). Σπόροι διαφόρων φυτών έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή φυτικών εκχυλισμάτων για την τυροκομία. Τα εκχυλίσματα πρωτεασών λαμβάνονται από τους σπόρους του *Solanum dubium* (Ahmed et al. 2009a, 2010), από αποφλοιωμένους σπόρους ηλιάνθου

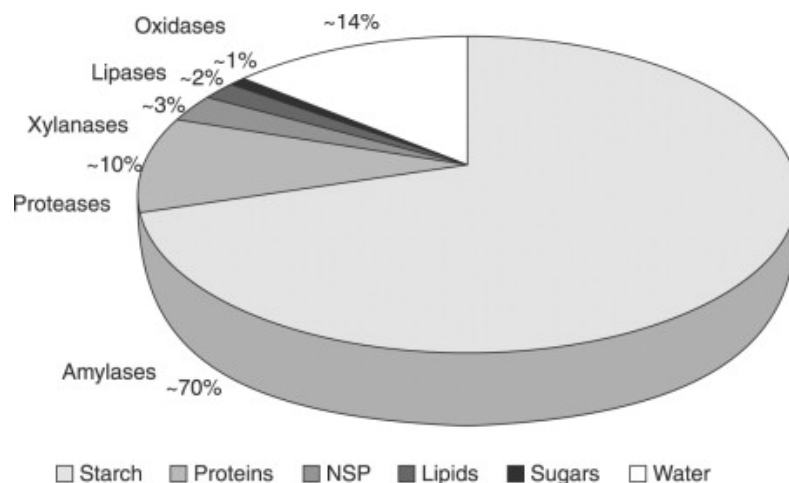
(*Helianthus annuus*) και από ολόκληρους σπόρους αλμπίζιας (*Albizia lebbek*) (Egito et al. 2007). Οι Nestor et al. (2012) έλαβαν το ενζυμικό εκχύλισμα από τα μούρα του *Solanum elaeagnifolium*. Επίσης πρωτεάσες από τους καρπούς της συκιάς αξιολογήθηκαν για τις ιδιότητες τους στην πήξη του γάλακτος (Kumari et al. 2012- Sharma et al. 2012).

2.1.2 Ένζυμα στην αρτοποιία

Τα προϊόντα αρτοποιίας έχουν υποστεί ριζική βελτίωση της ποιότητας τους τα τελευταία 10 χρόνια όσον αφορά τη γεύση, την υφή και τη διάρκεια ζωής. Η χρήση ενζύμων είναι ο σημαντικότερος παράγοντας που συμβάλλει σε αυτές τις βελτιώσεις. Μεταξύ των ενζύμων που χρησιμοποιούνται σε εφαρμογές τροφίμων, εκείνα που χρησιμοποιούνται στην αρτοποιία αποτελούν σχεδόν το ένα τρίτο της αγοράς. Τα ένζυμα αρτοποιίας χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα αλεύρων και ως βελτιωτικά ζύμης για να αντικαταστήσουν χημικά συστατικά και να επιτελέσουν άλλες λειτουργίες με τρόπο όσο πιο κοντά γίνεται στις σύγχρονες προδιαγραφές και απαιτήσεις. (Εικόνα 3)

Η βιομηχανία αρτοποιίας χρησιμοποιεί κατά κύριο λόγο πέντε τύπους ενζύμων. Οι αμυλάσες χρησιμοποιούνται για τη μετατροπή του αμύλου σε σάκχαρο και για την παραγωγή δεξτρινών. Για την ενίσχυση και τη λεύκανση της ζύμης, χρησιμοποιούνται οξειδάσες. Οι ημικυτταρινάσες και οι πρωτεάσες είναι τα ένζυμα που επιδρούν στη γλουτένη του σιταριού. Οι ημικυτταρινάσες βελτιώνουν την αντοχή της γλουτένης, οι πρωτεάσες μειώνουν την ελαστικότητα της γλουτένης. Οι ξυναλάσες χρησιμοποιούνται για τη βελτίωση της εργασιμότητας της ζύμης και την απορρόφηση νερού.

Όλα αυτά τα ένζυμα μαζί παίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση του όγκου του ψωμιού, της μαλακότητας της ψίχας, της τραγανότητας της κρούστας, του χρωματισμού της κρούστας ή του μαυρίσματος και τη διατήρηση της φρεσκάδας.



Εικόνα 3: Φυτικά ένζυμα στην αρτοποιία

Αμυλάσες στην αρτοποιία

Οι α-αμυλάσες είναι ενδογλυκανάσες οι οποίες υδρολύουν τυχαία τους α-1,4 και α-1,6 δεσμούς. Οι αμυλάσες μπορούν να δράσουν μόνο σε κατεστραμμένο ή ζελατινοποιημένο άμυλο. Η ποσότητα του κατεστραμμένου αμύλου εξαρτάται από την ποικιλία του σιταριού και ιδιαίτερα από τις συνθήκες άλεσης.

Ένζυμα κατά της σκλήρυνσης του ψωμιού

Το ψωμί χάνει γρήγορα τη φρεσκάδα του και υπόκειται σε μικροβιακή αλλοίωση. Αλλαγές στη γεύση και την υφή, εκτός από τη μικροβιακή αλλοίωση, που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης ονομάζονται μαρασμός. Το φαινόμενο αυτό, που καθιστά το ψωμί σκληρό και ξηρό, αποδίδεται συχνά στην αναβάθμιση του αμύλου. Οι αλλαγές που παρατηρούνται είναι η σκλήρυνση της ψίχας, η τραχύτητα, η αύξηση της αδιαφάνειας της ψίχας, απώλεια της τραγανότητας της κρούστας, εξαφάνιση της γεύσης φρέσκου ψωμιού και εμφάνιση γεύσης μπαγιάτικου ψωμιού. (Kulp, K. and Ponte, J.G. (1981) Staling of white pan bread: fundamental causes. *CRC Critical Reviews Food Science and Nutrition* 15, 1–48).

Όλοι αυτοί οι παράγοντες έχουν ως αποτέλεσμα την απώλεια της αποδοχής του προϊόντος από τους καταναλωτές. Περίπου 85 εκατομμύρια τόνοι αλεύρου σίτου χρησιμοποιούνται κάθε χρόνο στην αρτοποιία. Θεωρείται ότι το 10-15% του ψωμιού απορρίπτεται επειδή δεν ανταποκρίνεται πλέον στις απαιτήσεις ποιότητας των καταναλωτών. Εάν υπήρχε η δυνατότητα να διατηρηθεί φρέσκο για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα θα εξοικονομούσαν 2 εκατομμύρια ευρώ τόνοι αλεύρι ετησίως. Αυτό είναι το 40% της ετήσιας κατανάλωσης ψωμιού στις ΗΠΑ. Η αναβάθμιση του αμύλου θεωρείται ο κύριος παράγοντας που ευθύνεται για την παραπάνω φυσική διεργασία. (Kim, S.K. and D'Appolonia, B.L. (1977b) Bread staling studies II: effect of protein content and storage temperature on the role of starch. *Cereal Chemistry* 54, 216–224, Schoch, T.J. and French, D. (1947) Studies on bread staling. I: the role of starch. *Cereal Chemistry* 24,231–249, MacRitchie, F. (1980) *Advances in Cereal Science and Technology III* (ed. Y. Pomeranz). American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN, Chapter 7).

Με την προσθήκη ειδικών παραγόντων, όπως γαλακτωματοποιητές ή φυτικά ένζυμα, το ψωμί παραμένει φρέσκο για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

Ωστόσο, αρκετοί επιστήμονες αναφέρουν ότι εκτός από την αναβάθμιση του αμύλου η γλουτένη, τα λιπίδια και/ή συγκεκριμένες δεξτρίνες παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στη μη διατήρηση της φρεσκότητας του ψωμιού.

Τέλος ποιότητα του αλεύρου σίτου από επηρεάζει την ολική απόδοση της αμυλάσης και συνεπώς την ποιότητα του ψωμιού.(Dragsdorf, R.D. and Varriano-Marston, E. (1980) Bread

staling: X-ray diffraction studies on bread supplemented with α -amylases from different sources. *Cereal Chemistry* 57, 310–314, Gerrard, J.A., Every, D., Sutton, K.H. and Gilpin, M.J. (1997) The role of maltodextrins in the staling of bread. *Journal of Cereal Science* 26, 201–209).

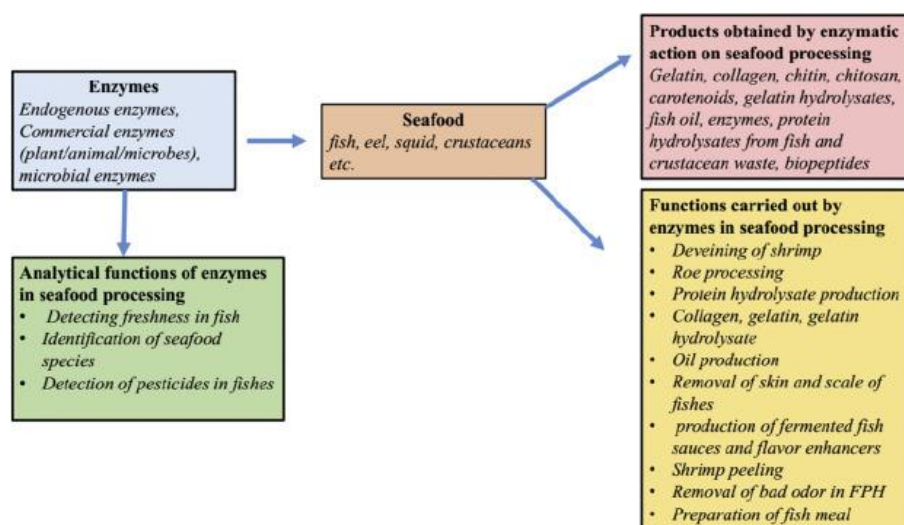
2.1.3 Ένζυμα στην επεξεργασία αλιευμάτων

Η τεχνολογία των ενζύμων εφαρμόζεται σήμερα στη βιομηχανία επεξεργασίας ψαριών για την αύξηση της απόδοσης του κρέατος των ψαριών και τη διευκόλυνση της επεξεργασίας, καθώς και τη βελτίωση της ποιότητας των τελικών προϊόντων. (Εικόνα 5)

Τα φυτικά ένζυμα είναι ικανά να επιταχύνουν τις επιθυμητές αντιδράσεις, από τις οποίες ένας αριθμός πλεονεκτημάτων μπορούν να αποκτηθούν. Επιπλέον, οι ενζυμικές αντιδράσεις που χρησιμοποιούνται είναι ήπιες και δεν προκαλούν δυσμενείς επιπτώσεις, όπως η απώλεια της θρεπτικής αξίας των προϊόντων. Οι αντιδράσεις μπορούν να ρυθμιστούν εύκολα χωρίς ανεπιθύμητες επιπτώσεις.

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορα ένζυμα στη βιομηχανία ιχθύων για την αύξηση της αποτελεσματικότητας της επεξεργασίας τους. Ωστόσο, η μεγιστοποίηση των επιθυμητών ενδογενών ενζύμων ή η μείωση των ενζύμων που προκαλούν αρνητικές επιπτώσεις είναι το μέσο αύξησης της ποιότητας στα προϊόντα ιχθύων.

Λόγο του υψηλού κόστους των ενζύμων έχει δοθεί έμφαση, στην ανάκτηση των ενζύμων των ίδιων των ιχθύων για περαιτέρω χρήσεις. (Εικόνα 4)



Εικόνα 4: Η χρήση των φυτικών ενζύμων στην επεξεργασία των αλιευμάτων

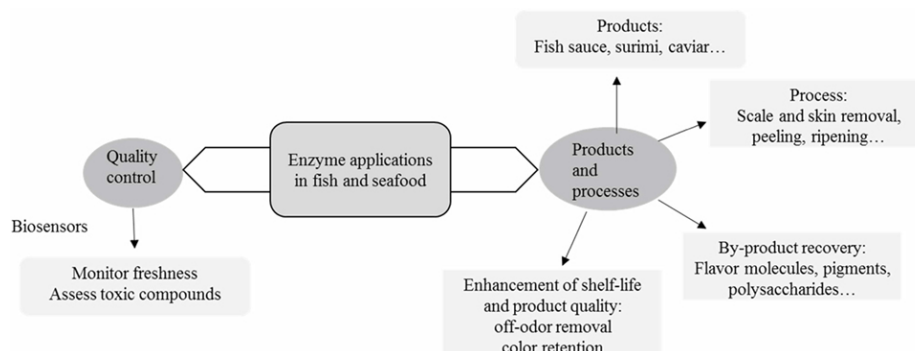
Ένζυμα βελτίωσης γεύσης

Οι γεύσεις θαλασσινών διαδραματίζουν αρκετά μεγάλο ρόλο σε τεχνητά προϊόντα όπως η καβουρόψυχα και το λουκάνικο ψαριού καθώς επηρεάζουν την αποδοχή των προϊόντων αυτών από το καταναλωτικό κοινό.

Τα πρωτεολυτικά ένζυμα μπορούν να βοηθήσουν στην εξαγωγή αρωματικών ενώσεων από τα κελύφη και άλλα υλικά. Η γεύση και τα πτητικά συστατικά των κεφαλών γαρίδας ανακτώνται με ενζυματική χώνευση με τη χρήση *Corolase N*. και *Koji* (πηγή πρωτεάσης από *Aspergillus oryzae*) ή βακτηριακά στελέχη με υψηλούς ρυθμούς πρωτεόλυσης, ακολουθούμενα από συμπύκνωση και ξήρανση με ψεκασμό. Pan, B.S. (1990) Recovery of shrimp waste for flavourant. In: Advance in Fisheries Technology and Biotechnology for Increased Profitability (eds M.N. Voigt and J.R. Botta). (Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, PA, pp. 437–452, Haard, N.F. (1992) A review of protolytic enzymes from marine organisms and their application in the food industry. Journal of Aquatic Food Product Technology 1(1), 17–35).

Το κεφάλι της γαρίδας περιέχει 9-12% ελεύθερα αμινοξέα, κυρίως ταυρίνη, αργινίνη, γλυκίνη και προλίνη και μονοφωσφορική ινositίνη ως το κύριο νουκλεοτίδιο. Το άρωμα γαρίδας μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρόσθετο σε προϊόντα με βάση το σουρίμι και σε προϊόντα εξώθησης με βάση τα δημητριακά, όπως τα τσιπς γαρίδας.

Στη διαδικασία αυτή χρησιμοποιούνται πρωτεάσες, αν και μπορεί να συμμετέχουν και άλλοι τύποι ενζύμων, για να ρευστοποιηθεί το υλικό που επιτρέπει το διαχωρισμό των οστών και του κελύφους και διευκολύνει τη συγκέντρωση στο 50-60% της ξηρής ύλης. Ο βαθμός υδρόλυσης των πρωτεϊνών χρησιμοποιείται για τη βελτιστοποίηση της διαδικασίας όσον αφορά την απόδοση και το σχηματισμό αρώματος. Έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί ένζυμα για την ανάκτηση της γεύσης από τα στρείδια. (Haard, N.F. (1992) A review of protolytic enzymes from marine organisms and their application in the food industry. Journal of Aquatic Food Product Technology 1(1), 17–35).



Εικόνα 5: Πλεονεκτήματα της χρήσης φυτικών ενζύμων στην επεξεργασία των αλιευμάτων

2.1.4 Ένζυμα στην επεξεργασία κρέατων

Οι απαιτήσεις των καταναλωτών για προϊόντα κρέατος υψηλής ποιότητας και μέτριας τιμής ήταν οι κινητήριες δυνάμεις για την ανάπτυξη ενζυμικών μεθόδων για την προσθήκη αξίας σε κομμάτια κρέατος χαμηλότερης ποιότητας, με αποτέλεσμα την μεγιστοποίηση της αποτελεσματικότητας, της αξιοποίησης του σφαγίου και φυσικά τη βελτίωση της αξίας της αγοράς.

Στη βιομηχανία κρέατος, υπάρχουν δύο διαφορετικές εφαρμογές στις οποίες τα ένζυμα μπορούν να συμβάλουν σημαντικά, η τρυφεροποίηση πολύ σκληρών τμημάτων κρέατος και η αναδιάρθρωση νωπών κομματιών κρέατος χαμηλής αξίας σε μπριζόλες υψηλότερης ποιότητας. Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται είναι κυρίως ένζυμα αποικοδόμησης πρωτεϊνών.

Γενικά, η γεύση του επεξεργασμένου κρέατος είναι αποτέλεσμα είτε ενζυμικής δράσης είτε χημικών αντιδράσεων, όπως η πυρόλυση αμινοξέων και πεπτιδίων, αποικοδόμηση σακχάρων, αποικοδόμηση των ριβονουκλεοτιδίων, αντιδράσεις Maillard, αποικοδόμηση της θειαμίνης και αποικοδόμηση των λιπιδίων. Οι κύριες ενζυμικές αντιδράσεις που επηρεάζουν τη γεύση του κρέατος ή το σχηματισμό πρόδρομων ουσιών γεύσης είναι η πρωτεόλυση και η λιπόλυση. Και οι δύο ομάδες αντιδράσεων οφείλονται στη συμβολή είτε ενδογενών πρωτεασών και λιπάσων, είτε ενζύμων φυτικής ή μικροβιακής προέλευσης που υπάρχουν φυσικά στο προϊόν ή ενζύμων που προστίθενται κατά τη διαδικασία παρασκευής.

Τρυφεροποίηση του κρέατος με προσθήκη ενζύμων

Η διαδικασία της τρυφεροποίησης του κρέατος περιλαμβάνει ουσιαστικά μια περιορισμένη πρωτεόλυση των πρωτεϊνικών δομών υψηλότερης τάξης στο κρέας. Οι ενδογενείς πρωτεάσες που υπάρχουν στο κρέας είναι υπεύθυνες για το αποτέλεσμα της τρυφερότητας που επιτυγχάνεται κατά τη διάρκεια της γήρανσης του κρέατος. Υπάρχει η δυνατότητα προσθήκης εξωγενών πρωτεασών από διαφορετικές πηγές για την επίτευξη πρόσθετης τρυφερότητας (Lantto et al. 2009). Μελέτες έχουν δείξει ότι οι συνδετικοί ιστοί και οι μυϊκές πρωτεΐνες μπορούν να αφομοιωθούν από εξωγενείς πρωτεάσες (Abdel-Naeem and Mohamed 2016, Grzonka et al. 2007).

Αν και υπάρχει μεγάλη ποικιλία πρωτεασών που διατίθενται από βακτήρια, και μύκητες, οι φυτικές πρωτεάσες έχουν μελετηθεί περισσότερο. Κατά προσέγγιση, το 95% των εμπορικών πρωτεασών που χρησιμοποιούνται στις ΗΠΑ είναι φυτικής προέλευσης. (Ionescu et al. 2008a, b).

Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες πρωτεάσες για το εμπορικό κρέας είναι η παπαΐνη, η βρωμελαΐνη, η φικίνη και η ακτινιδίνη (Abdel-Naeem and Mohamed 2016). Οι εκθέσεις των

Garg και Mendiratta (2006) και των Naveena et al. (2004) επισήμαναν επίσης ότι οι πρωτεάσες που προέρχονται από το ρίζωμα του τζίντζερ (*Zingibain*) και τους καρπούς του φυτού *Cucumis trigonus* Roxb (*Cucumin*) ήταν αποτελεσματικές στην τρυφεροποίηση προϊόντων κρέατος.

Αν και, ορισμένες φυτικές πρωτεάσες έχουν αποδειχθεί ότι έχουν σχετικά ευρεία εξειδίκευση υποστρώματος καθώς και εξαιρετική υδρολυτική ικανότητα, η έκταση της πρωτεόλυσης μπορεί να είναι δύσκολο να ελεγχθεί, και οι πρωτεάσες συχνά υδρολύουν εκτενώς ένα πρωτεϊνικό υπόστρωμα οδηγώντας σε ένα ανεπιθύμητο, υπερβολικά πρωτεολυμένο προϊόν (Schaller 2004). Τα αποτελέσματα μιας μελέτης που διεξήχθη από τους Ha κ.ά. (2012) έδειξαν σημαντικές διαφορές στη δραστικότητα των πρωτεασών ανάλογα με το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε για τη δοκιμή και ότι οι δοκιμές πρωτεάσης με συνδετικό ιστό και μυοϊνίδια κρέατος εκχυλίσματα παρέχουν μια ρεαλιστική αξιολόγηση των δυνατοτήτων μιας πρωτεάσης για εφαρμογή στην τρυφεροποίηση του κρέατος. Το παρασκεύασμα πρωτεάσης ακτινιδίνης βρέθηκε ότι είναι πιο αποτελεσματικό στην υδρόλυση των πρωτεϊνών των μυοϊνιδίων του βόειου κρέατος λόγω της ήπιας υδρολυτικής ικανότητας και το παρασκεύασμα πρωτεάσης ζινγκιμπαΐνης βρέθηκε να είναι το πιο αποτελεσματικό στην υδρόλυση των πρωτεϊνών του συνδετικού ιστού. Αυτό δείχνει τις πιθανές χρήσεις των αυτών των πρωτεασών φυτικής προέλευσης για εφαρμογές τρυφεροποίησης κρέατος, σε αντίθεση με την πρόκληση της προσπάθειας ελέγχου του βαθμού τρυφερότητας του κρέατος με τις πιο δραστικές πρωτεάσες παπαΐνη και βρωμελίνη. (Rao et al. 1998)

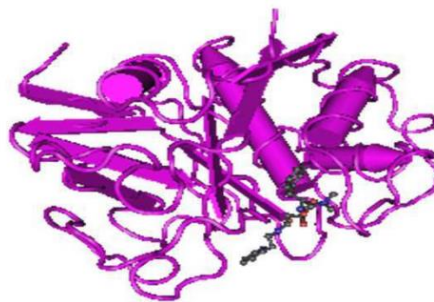
Παπαΐνη

Η παπαΐνη (EC 3.4.22.2) (μοριακό βάρος 23,4 kDa) είναι μια πρωτεάση κυστεΐνης της οικογένειας πεπτιδάσης C1. Προέρχεται από το φυτό παπάγια (*Carica papaya*). Ο λειτουργικός ρόλος της παπαΐνης στη φυσιολογία των φυτών είναι η παροχή προστασίας έναντι των εντόμων (Konno et al. 2004). Η τρισδιάστατη δομή της παπαΐνης προσδιορίστηκε από τους Kamphuis κ.ά. (1984). Είναι ένα πρωτεολυτικό ένζυμο, μια θειολική ενδοπεπτιδάση, που βρίσκεται σε συγκέντρωση περίπου 8% στους καρπούς παπάγιας (*Carica papaya*).

Η παπαΐνη έχει βέλτιστη δραστηριότητα σε θερμοκρασία περίπου 65 °C και pH 6,0-7,0, ανάλογα με την το υπόστρωμα (Kilara et al. 1977- Smith and Hong-Shum 2011). Η μελέτη των Berger και Schechter (1970) έδειξε ότι η παπαΐνη έχει εξειδίκευση για αμινοξέα με αρωματικές πλευρικές αλυσίδες όπως η φαινυλαλανίνη και η τυροσίνη στη θέση P2. Συνθετικά πεπτίδια και αναστολείς χρησιμοποιήθηκαν για τη χαρτογράφηση των ενεργών κέντρων της παπαΐνης.

Η παπαΐνη (Εικόνα 6) έχει υψηλή θερμική σταθερότητα και σταθερότητα υπό πίεση, έχει χρησιμοποιηθεί στη βιομηχανία κρέατος ως μαλακτικό λόγω της πρωτεολυτικής της δράσης και της ικανότητάς της να υδρολύει τις μυοϊνιδιακές πρωτεΐνες.

Επιπλέον, η υδρολυτική ικανότητα της παπαΐνης ενισχύεται με θερμικά μετουσιωμένο κολλαγόνο. Ως εκ τούτου, η παπαΐνη έχει εφαρμοστεί σε τεμάχια κρέατος από ηλικιωμένα ζώα, όπως όταν το κρέας φθάνει σε υψηλότερες θερμοκρασίες κατά το μαγείρεμα, το ιδιαίτερα διασταυρωμένο κολλαγόνο που χαρακτηρίζει τα ηλικιωμένα ζώα συρρικνώνεται και αρχίζει να μετατρέπεται σε ζελατίνη και είναι πιο ευαίσθητη στην υδρόλυση από την παπαΐνη (Wilson et al. 1992). Για πολλά χρόνια, η παπαΐνη χρησιμοποιείται για τη διάσπαση σκληρών ινών. Ωστόσο, η πρωτεόλυση της παπαΐνης μπορεί είναι δύσκολο να ελεγχθεί και τείνει να υπερυδρολύει το κρέας λόγω υπερβολικής πρωτεόλυσης της μυοσίνης, η οποία οδηγεί σε μια "χυλώδη και/ή κοκκώδη" υφή στο τρυφερότερο κρέας. Το γεγονός αυτό έχει περιορίσει τη χρήση της παπαΐνης ως εμπορικού βελτιωτικού κρέατος.



Εικόνα 6: Δομή παπαΐνης (PDB DOI: [10.2210/pdb9PAP/pdb](https://doi.org/10.2210/pdb9PAP/pdb))

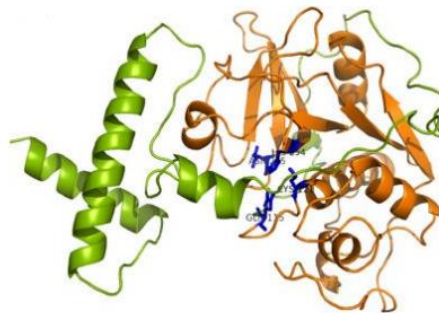
Βρωμελαΐνη

Η βρωμελαΐνη (Εικόνα 7) περιλαμβάνει μια ομάδα ενδοπεπτιδασών που υπάρχουν στα φύλλα, στα στελέχη και στη ρίζα, και σε μεγάλη αφθονία στους καρπούς της οικογένειας *Bromeliaceae*. Από την *Bromeliaceae*, η βρωμελαΐνη από το φυτό του ανανά (*Ananas comosus*) είναι το πιο γνωστό και καλά μελετημένο μέλος. Η βρωμελαΐνη του καρπού και του στελέχους είναι ανοσολογικά διαφορετικές, όπου οι βρωμελαΐνες του στελέχους (EC 3.4.22.32) είναι ενδοπεπτιδάσες κυστεΐνης, ενώ οι βρωμελαΐνες των καρπών (EC 3.4.22.33) είναι ασπαρτικές ενδοπεπτιδάσες. Ακατέργαστα εκχυλίσματα της βρωμελαΐνης στελέχους (EC 3.4.22.32) περιέχουν ένα μείγμα άλλων δευτερευουσών ενδοπεπτιδασών κυστεΐνης, όπως η ανααΐνη και η κομοσαΐνη. Η βρωμελαΐνη είναι μια γλυκοζυλιωμένη μονή αλυσίδα πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 24,5 kDa. Η δομή της αποτελείται από 212 αμινοξέων και περιλαμβάνει επτά κυστεΐνες, εκ των οποίων η μία συμμετέχει στην κατάλυση.

Οι υπόλοιπες έξι κυστεΐνες σχηματίζουν τρεις δισουλφιδικές γέφυρες. Η καθαρισμένη βρωμελαΐνη είναι σταθερή όταν αποθηκεύεται στους -20 °C. Έχει βέλτιστη δραστηριότητα σε

pH 6-8,5 και εντός ενός εύρους θερμοκρασιών 50-60 °C. Αν και οι δομές των βρωμελαϊνών είναι παρόμοιες, δεδομένου ότι και οι δύο είναι γλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες μονής αλυσίδας με παρόμοιο μοριακό βάρος (MW της βρωμελαΐνης φρούτων = 25 kDa), η βρωμελαΐνη φρούτων έχει πολύ υψηλότερη πρωτεολυτική δραστικότητα και ευρύτερη εξειδίκευση για πεπτιδικούς δεσμούς σε σύγκριση με τη βλαστική βρωμελαΐνη (Kim και Taub 1991). Η υδρολυτική εξειδίκευση της βρωμελαΐνης είναι ελαφρώς μικρότερη από εκείνη της παπαΐνης, όπως διαπιστώθηκε με την πρωτεόλυση συνθετικών πεπτιδίων σε pH 5,0-7,0 και βέλτιστη θερμοκρασία 50 °C (Smith and Hong-Shum 2011). Ενώ μόνο δύο κύριες πρωτεάσες έχουν ανιχνευθεί στους καρπούς του ανανά, έως και τέσσερα συστατικά πρωτεασών έχουν διαχωριστεί με χρωματογραφία των ακατέργαστων εκχυλισμάτων του στελέχους του ανανά (Rowan et al. 1990). Η καταλυτική δραστηριότητα των περισσότερων από αυτές τις πρωτεάσες έχει διερευνηθεί εκτενώς σε πολλαπλές μελέτες με τη χρήση διαφόρων συνθετικών πεπτιδίων (Inagami and Murachi 1963- Napper et al. 1994- Rowan et al. 1990).

Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών έδειξαν ότι, αν και οι πρωτεάσες είναι συγγενείς, δεν είναι διακριτές όσον αφορά την υδρολυτική εξειδίκευση και έχουν μικρές διαφορές αλληλουχίας (Lee et al. 1997). Η βρωμελαΐνη είναι σημαντική για την τρυφεροποίηση του κρέατος σε βιομηχανίες με ελεγχόμενο περιβάλλον και είναι χρήσιμη για τη διασφάλιση της μικροβιολογικής ποιότητας και καθαρότητας. Όπως και άλλες πρωτεάσες, η βρωμελαΐνη αποικοδομεί τις μυοϊνδιακές πρωτεΐνες και το κολλαγόνο, με αποτέλεσμα συχνά την υπερβολική τρυφεροποίηση του κρέατος (Melendo et al. 1996). (Ionescu et al. 2008a, b) διερεύνησαν τη χρήση της βρωμελαΐνης με τεμάχια βοδινού κρέατος ενηλίκων, με την καλύτερη αποτελέσματα επιτεύχθηκαν με τη χρήση 10 mg πρωτεάσης/100 g κρέατος, με χρόνο τρυφερότητας 24 ωρών στους 4 °C, ακολουθούμενη από θερμική αδρανοποίηση με ρυθμό 1 °C/min στους 70 °C.



Εικόνα 7: Δομή βρωμελαΐνης (PDB DOI: [10.2210/pdb6YCF/pdb](https://doi.org/10.2210/pdb6YCF/pdb))

Φικίνη (Ficin)

Η φικίνη (EC 3.4.22.3) (Εικόνα 8) ανήκει στην κατηγορία κυστεϊνών (με λειτουργική ομάδα θειόλης) ή σουλφυδρυλικών πρωτεασών από το γένος *Ficus*. Η φικίνη είναι μια γνωστή φυτική πρωτεάση που χρησιμοποιείται για την τρυφεροποίηση του κρέατος (Maróstica and Pastore 2010), καθώς και ως ενισχυτής της διαλυτότητας των μυϊκών πρωτεϊνών (Ramezani et al. 2003). Έχει αποδειχθεί ότι τα ακατέργαστα εκχυλίσματα φικίνης περιέχουν 10 πρωτεάσες (Kramer και Whitaker 1964). Αυτές οι πρωτεάσες έχουν διαφορετικές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένου του μοριακού βάρους και των συνθηκών για βέλτιστη δραστηριότητα. Οι πιο εκτενώς μελετημένες φικίνες είναι οι ενδοτεπιπιδάσες κυστεΐνης που βρίσκονται στο καουτσούκ του *Ficus glabrata* και *Ficus carica*. Οι πρωτεάσες από άλλα είδη που προέρχονται από το καουτσούκ του *Ficus glabrata*, *Ficus anthelmintica* και *Ficus laurifolia* είναι λιγότερο γνωστές. Το 2008, αποδείχθηκε ότι η φικίνη που λαμβάνεται από το *F. racemose* έχει μοριακό βάρος 44,5 kDa και παρουσίασε μέγιστη δραστικότητα στη βέλτιστη περιοχή pH 4,5-6,5 στους 60 °C (Arshad et al. 2016- Maróstica και Pastore 2010). Η πρωτεάση της φικίνης είχε βέλτιστη δραστικότητα σε ένα εύρος pH 5-8 και θερμοκρασίας 45-55 °C, καθιστώντας την κατάλληλη για την επεξεργασία νωπού κρέατος.

Προηγούμενες μελέτες για τη φικίνη παρατήρησαν ότι το pH εξαρτάται από τη συγκέντρωση του υποστρώματος και έχει χρόνο ημιζωής στους 60 °C 1,5 h (Kramer και Whitaker 1964). Αυτές οι ιδιότητες καθιστούν τις φικίνες μια ευεργετική κατηγορία φυτικής πρωτεάσης για χρήση στην τρυφεροποίηση του κρέατος.

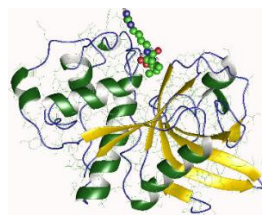


Εικόνα 8: Δομή Φικίνης (PDB DOI: [10.2210/pdb4YYQ/pdb](https://doi.org/10.2210/pdb4YYQ/pdb))

Ακτινιδίνη

Η ακτινιδίνη (EC 3.4.22.14) (Εικόνα 9), επίσης γνωστή ως ακτινιδίνη ή ανιονική πρωτεάση της ακτινιδίνης) είναι μια νέα σουλφυδρυλική ή κυστεϊνική πρωτεάση που εξάγεται από ακτινίδια. Η ποικιλία *Actinidia deliciosa* είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη φυτική πηγή για την ακτινιδίνη. Ανήκει επίσης στην οικογένεια της παπαΐνης λόγω της αλληλουχίας και των

δομικών ομοιοτήτων της με τις πρωτεάσες της παπαΐνης (Baker 1980- Carne and Moore 1978- Kamphuis et al. 1985). Η ακτινιδίνη έχει κλασματοποιηθεί με χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων σε έξι ισομορφές παρόμοιου μοριακού βάρους 23,5 kDa με ισοηλεκτρικό σημείο (pI) που κυμαίνεται από 3,9 έως 9,3, και η οι όξινης ισομορφές είναι τα πιο εμφανή είδη (Nieuwenhuizen et al. 2007, Sugiyama et al. 1996). Η ειδική δραστικότητα της ακτινιδίνης έχει χαρακτηριστεί καλά και εμφανίζει ευρεία ειδικότητα υποστρώματος και εύρος pH (4,5-6,0) (McDowall 1970) με η βέλτιστη θερμοκρασία είναι 58-62 °C (Dufour 1988). Παρά την εντυπωσιακή ομοιότητα στη δομική ομολογία, η ειδικότητα της ακτινιδίνης είναι κάπως διαφορετική από εκείνη της παπαΐνης. Τα υποστρώματα με αρωματικούς N-υποκαταστάτες είχαν υψηλότερες τιμές Km για την ακτινιδίνη σε σύγκριση με την παπαΐνη, υποδεικνύοντας διαφορές στη συγγένεια υποστρώματος-ενζύμου μεταξύ των δύο πρωτεασών. Η διαφορά αυτή αποδόθηκε σε διαφορές αμινοξέων εντός του ενεργού κέντρου της ακτινιδίνης, ιδίως στην αντικατάσταση της Ser 205 στην παπαΐνη με μια Met στην ακτινιδίνη (Met 211), η οποία καθιστά τον υδρόφοβο θύλακα στο υποτοπίο S2 ιδιαίτερα μικρότερη. Έχει μοριακό βάρος 32 kDa. Η ακτινιδίνη χρησιμοποιείται στο εμπόριο στη βιομηχανία κρέατος για να μαλακώσει το κρέας (Varughese et al. 1992) και να ενισχύσει τις χημικές διεργασίες που σχετίζονται με την αποικοδόμηση των μυοϊνωδών πρωτεϊνών σε πεπτίδια. Εμπλέκεται επίσης στην ενεργοποίηση της m-καλπαΐνης κατά τη διάρκεια της μεταθανάτιας γήρανσης (Ha et al. 2012). Η ακτινιδίνη έχει πολλές εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων λόγω των πλεονεκτημάτων της έναντι άλλων φυτικών πρωτεασών, όπως η παπαΐνη και η φικίνη. Η ακτινιδίνη παρουσιάζει ήπια δραστηριότητα τρυφεροποίησης, ακόμη και σε υψηλές συγκεντρώσεις, αποτρέποντας την επιφανειακή χυλώδη κατάσταση. Έχει μια σχετικά χαμηλή θερμοκρασία αδρανοποίησης (60 °C), γεγονός που καθιστά τη διαδικασία τρυφεροποίησης ευκολότερη στον έλεγχο (Eshamah et al. 2014- Tarté 2009). Με προηγούμενη εφαρμογή στο κρέας, διαπιστώθηκε ότι η ακτινιδίνη έχει ηπιότερη επίδραση στην τρυφεροποίηση (Han et al. 2009) και στο κολλαγόνο από άλλες παραδοσιακά χρησιμοποιούμενες πρωτεάσες, όπως η παπαΐνη (Lewis and Luh 1988). Αυτό το μπορεί να περιορίσει τη χρησιμότητά της για υποβαθμισμένα τεμάχια με υψηλή περιεκτικότητα σε συνδετικό ιστό, ωστόσο, παρουσιάζει πιο ελεγχόμενη δράση τρυφεροποίησης στη μυοϊνδιακή δομή, η οποία είναι πλεονεκτική όσον αφορά την ελαχιστοποίηση της χυλώδους υφής και των εκτός γεύσεων που παρατηρούνται συχνά με τη χρήση πρωτεασών παπαΐνης (Ashie et al. 2002).

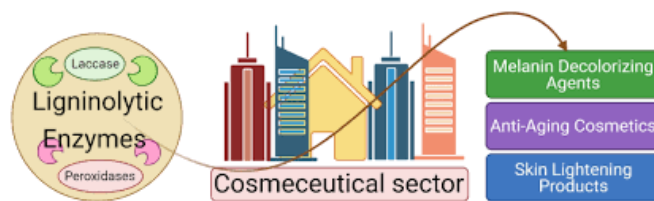


Εικόνα 9: Δομή Ακτινιδίνης (PDB DOI: [10.2210/pdb3P5V/pdb](https://doi.org/10.2210/pdb3P5V/pdb))

2.2 Ένζυμα στην βιομηχανία καλλυντικών

Επί του παρόντος, η αγορά καλλυντικών έχει αποκτήσει παγκόσμιο ενδιαφέρον, λόγω της πιο ενεργής και συνεπής συμμετοχής των καταναλωτών. Ως εκ τούτου, οι εφαρμογές των ενζύμων στα καλλυντικά αυξάνονται συνεχώς και φυτικά ένζυμα χρησιμοποιούνται ως ελεύθερες ρίζες σε αντηλιακές κρέμες, οδοντόκρεμες, στοματικά διαλύματα, βαφές μαλλιών κ.α. (Li et al. 2012).

Η βιομηχανία καλλυντικών, μέσω βιοτεχνολογικών διαδικασιών, έχει συμβάλει στην απόκτηση μιας ευρείας ποικιλίας καλλυντικών δραστικών συστατικών. Μέσω αυτών των διαδικασιών, είναι δυνατή η παραγωγή δραστικών συστατικών σε μεγάλη κλίμακα, με χαμηλότερο κόστος και χωρίς προσμίξεις. Για παράδειγμα, τα φυτικά ένζυμα τα οποία συναντώνται σε διάφορους τύπους καλλυντικών προϊόντων, ιδίως για την περιποίηση του δέρματος. (Εικόνα 10) Έτσι, η βιοτεχνολογία, τα καλλυντικά και τα αισθητικά φάρμακα έχουν συνδεθεί στενά μεταξύ τους, επιτρέποντας νέες αποτελεσματικές και ασφαλείς συνθέσεις των δραστικών συστατικών. Παρά το γεγονός ότι πρόκειται για έναν πολλά υποσχόμενο τομέα, επί του παρόντος, ο αριθμός των βιοτεχνολογικών καλλυντικών προϊόντων είναι σχετικά μικρός, αν και αναμένεται σύντομα η αύξησή του.



Εικόνα 10: Τα φυτικά ένζυμα στην βιομηχανία καλλυντικών

Η χρήση συνενζύμων και συμπαραγόντων στα καλλυντικά συμβάλει με ασφαλή τρόπο στη διατήρηση της υγιούς εμφάνισης του δέρματος μέσω ενζυμικών λειτουργιών στο δέρμα. Τα συνένζυμα και οι συμπαραγόντες είναι χαμηλού μοριακού βάρους και διεισδύουν μέσω της κεράτινης στιβάδας για να βοηθήσουν στην ενεργοποίηση των ενζύμων που υπάρχουν. Στη βιομηχανία καλλυντικών, διάφοροι τύποι ενζύμων χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη σκευασμάτων που διευκολύνουν την πορεία των βιοχημικών δερματικών αντιδράσεων, προστατεύοντας το δέρμα από τη γήρανση. Τα ένζυμα αυτά είναι επίσης υπεύθυνα για την προστασία του δέρματος από ορισμένους εξωτερικούς παράγοντες (όπως η υπεριώδης ακτινοβολία) και από ελεύθερες ρίζες. (Sim, Y.C.; Nam, Y.S.; Shin, E.; Kim, S.; Chang, I. Proteolytic enzyme conjugated to SC-glucan as transdermal drug penetration enhancer. Pharmazie 2003, 58, 252–256).

Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται συχνότερα στα καλλυντικά, ονομάζονται πρωτεολυτικά ένζυμα, και διασπούν τις πρωτεΐνες έτσι ώστε το δέρμα να απορροφά καλύτερα τα συστατικά τους και έτσι να προωθεί την ανάπτυξη και την ανανέωση των κυττάρων. (Cho et al. 2007). Για

παράδειγμα η αποτελεσματικότητα της παπαΐνης (από την παπάγια) και της βρωμελαΐνης (από τον ανανά) είναι αποδεδειγμένη για την υγεία του δέρματος.

Πέρα από τα πρωτεολυτικά ένζυμα, η βιομηχανία καλλυντικών έχει επεκτείνει τη γκάμα των προϊόντων ομορφιάς με βάση τα ένζυμα για να καλύψει τις ανάγκες κάθε τύπου δέρματος, ειδικά εκείνων που προάγουν το σχηματισμό λιπών, αντιοξειδωτικών και κολλαγόνου.

Η SOD, υπεροξειδική δισμουτάση αποτελεί ένα βασικό συστατικό σε αντιγηραντικές φόρμουλες με προστατευτική δράση έναντι του οξειδωτικού στρες ελέγχοντας για τυχόν βλάβες στο δέρμα που προκαλούνται από τον αέρα και το νερό, την ρύπανση, τα μικρόβια και άλλους επιβλαβείς παράγοντες. Τα ένζυμα SOD ελέγχουν τα επίπεδα μιας ποικιλίας δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και δραστικών ειδών αζώτου (που σχηματίζονται μέσω της έκθεσης στην υπεριώδη ακτινοβολία και άλλων ακτινοβολιών, καθώς και από το φυσιολογικό κυτταρικό μεταβολισμό), περιορίζοντας τη δυνητική τοξικότητα αυτών των μορίων και ελέγχοντας τις κυτταρικές πτυχές που ρυθμίζονται από τις σηματοδοτικές τους λειτουργίες. (Wang, Y.; Branicky, R.; Noë, A.; Hekimi, S. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J. Cell Biol.* 2018, 217, 1915–1928).

Οι ROS που παράγονται στα μεταβολικά μονοπάτια έχουν αποδειχθεί ότι οδηγούν σε φθορά του δέρματος και, ως εκ τούτου, η SOD θεωρείται ένζυμο κατά της γήρανσης, καθώς συμβάλλει στην απομάκρυνση των ROS. Επιπλέον, η SOD διατηρεί αναπόσπαστη τη δομή της κερατίνης, προάγει την ελαστικότητα του δέρματος και παρέχει λεία αίσθηση στο δέρμα. (Younus, H. Therapeutic potentials of superoxide dismutase. *Int. J. Health Sci.* 2018, 12, 88–93. Η SOD μπορεί να ληφθεί μέσω γενετικής τροποποίησης του *S. Cerevisiae*. Levin, E.D. Extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) quenches free radicals and attenuates age-related cognitive decline: Opportunities for novel drug development in aging. *Curr. Alzheimer Res.* 2005, 2, 191–196).

Οι πρωτεάσες χρησιμοποιούνται σε κρέμες για το δέρμα για τον καθαρισμό και την εξομάλυνση του δέρματος μέσω της απολέπισης των νεκρών ή κατεστραμμένων δερματικών κυττάρων (Cho et al. 2007). Οι πρωτεάσες είναι ένζυμα που διασπούν τις πρωτεΐνες σε πεπτιδία και έπειτα σε αμινοξέα. (Waites, M.J.; Morgan, N.L.; Rockey, J.S.; Higton, G. *Industrial microbiology: An introduction*, 1st ed.; Blackwell Science: Oxford, UK, 2001; pp. 1–79).

Στα καλλυντικά, οι πρωτεάσες στοχεύουν κυρίως στην απολέπιση του κερατινοποιημένου δέρματος και στην αύξηση της απορρόφησης του νερού και των άλλων συστατικών που υπάρχουν στα καλλυντικά. Μέσω της απολέπισης οι πρωτεάσες θα βελτιώσουν την εμφάνιση του δέρματος. Η βρωμελαΐνη, η παπαΐνη και η χυμοθρυψίνη είναι παραδείγματα φυτικών πρωτεασών που χρησιμοποιούνται στα καλλυντικά, αλλά δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν

από τα περισσότερα άτομα, λόγω πιθανής εμφάνισης αλλεργίας. (Pandey, A.; Höfer, R.; Larroche, C.; Taherzadeh, M.; Nampoothiri, M. *Industrial Biorefineries: Industrial Biorefineries and White Biotechnology*, 1st ed.; Elsevier Science: New York, NY, USA, 2015; pp. 608–640).

Οι Seki et al. ανέφεραν ότι η σουμππιλισίνη, μια πρωτεάση σερίνης που παράγεται από το *Bacillus licheniformis*, είναι ένα αποτελεσματικό δερματικό απολεπιστικό. (Seki, T.; Yajima, I.; Yabu, T.; Ooguri, M.; Nakanishi, J. *Examining an exfoliation-promoting enzyme for cosmetic applications*. *Cosmet. Toilet.* 2005, 120, 87). Οι εμπορικές πρωτεάσες για καλλυντική χρήση μπορούν να ληφθούν μέσω της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA. (Pandey, A.; Höfer, R.; Larroche, C.; Taherzadeh, M.; Nampoothiri, M. *Industrial Biorefineries: Industrial Biorefineries and White Biotechnology*, 1st ed.; Elsevier Science: New York, NY, USA, 2015; pp. 608–640).

Άλλα φυτικά ένζυμα που χρησιμοποιούνται ευρέως σε οδοντόκρεμες, στοματικά διαλύματα και αρώματα (Εικόνα 11) είναι η ενδογλυκοσιδάση και η παπαΐνη, τα οποία χρησιμοποιούνται για να λευκαίνουν τα δόντια, για την απομάκρυνση της πλάκας και για την απομάκρυνση των οσμών που προκαλούν αποθέσεις στα δόντια και στον ιστό των ούλων (Buckingham 1985).



Εικόνα 11: Η χρήση των φυτικών ενζύμων στην βιομηχανία καλλυντικών

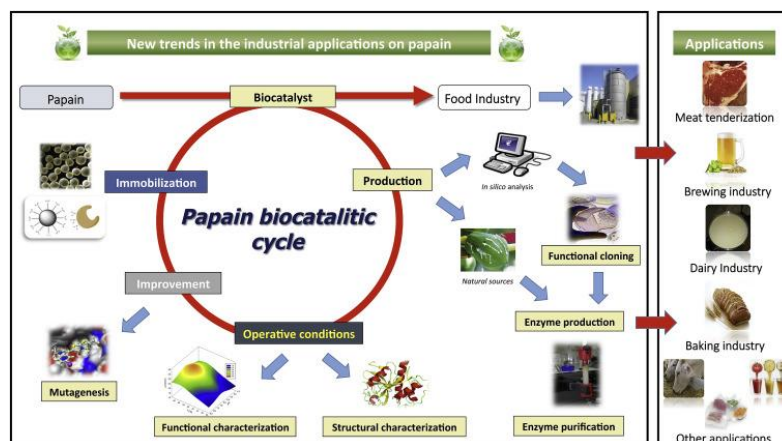
Τα ένζυμα λακκάση, οξειδάσες, υπεροξειδάσες και οξειδάσες πολυφαινολών χρησιμοποιούνται στις βαφές των μαλλιών (Lang και Cotteret 2004), η λιπάση, η καταλάση, η παπαΐνη, η βρωμελίνη και η υποτιλίνη στην περιποίηση του δέρματος. (Diehl 2008)- και η πρωτεϊνική δισουλφιδική ισομεράση, η γλουταθειόνη σουλφυδρυλο-οξειδάση και η τρανσγλουταμινάση στην περιποίηση των μαλλιών (Liet al. 2012). Η ακυλοτρανσφεράση διακυλογλυκερόλης ενισχύει τη δράση του ρετινοϊκού οξέος, το οποίο επιταχύνει την ανανέωση της επιδερμίδας και των μαλλιών. Το λυσύλιο και οι προλυλυδροξυλάσες συνθέτουν το κολλαγόνο που είναι απαραίτητο για τη διατήρηση της δομής του δέρματος (χρειάζονται βιταμίνη C για να λειτουργήσουν). Επιπλέον, τα ένζυμα χρησιμοποιούνται στα καθαριστικά φακών επαφής για την απομάκρυνση των πρωτεϊνικών μεμβρανών. (Alfa και Jackson 2001)

Ενζυμικά peelings

Τα ενζυμικά peelings, που αναφέρονται επίσης ως ενζυμοκαλλυντικά, είναι καλλυντικά προϊόντα με πρωτεολυτικά ένζυμα που υδρολύουν ειδικά τους πεπτιδικούς δεσμούς των πρωτεϊνών της κεράτινης στιβάδας. (Janeš D, Kočevar Glavač N. *Modern Cosmetics, Ingredients of Natural Origin, A Scientific View, Volume 1.* 1st ed. Velenje: Širimo dobro besedo; 2018. , Gomes RK, Damazio MG. *Cosmetologia: descomplicando os princípios ativos* 4th ed. São Paulo: LMP; 2013). Χρησιμοποιούνται για καλλυντικούς και θεραπευτικούς σκοπούς και πρέπει να έχουν υψηλό βαθμό καθαρότητας, υψηλή εξειδίκευση, χαμηλή αντιγονικότητα και σταθερότητα σε φυσιολογικές συνθήκες. (Cruz M, Cruz M, Martins B, Corvo L, Gaspar M, Maria E, et al. *Enzimas em medicamentos e diagnósticos. Enzimas Em Biotecnol. Produção Apl. E Merc., Interciencia;* 2008, p. 305–29).

Προάγουν τη βιολογική απολέπιση, την ταχύτερη ανάπλαση του δέρματος, παρέχουν βαθύ καθαρισμό και διευκολύνουν τη διείσδυση των καλλυντικά δραστικών ουσιών. (Monteiro VN, Silva R do N. *Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. Rev Process Quím.* 2009;3:9–23). Το πάχος της κεράτινης στιβάδας μειώνεται, δίνοντας στο δέρμα περισσότερη υφή και πλαστικότητα. Τα κύρια φυτικά ένζυμα που χρησιμοποιούνται στην απολέπιση του δέρματος είναι η παπαΐνη από την παπάγια, η βρωμελαΐνη από τον ανανά και η φικαΐνη από τη συκιά. (Packianathan N, Kandasamy R. *Skin Care with Herbal Exfoliants. Funct Plant Sci Biotechnol.* 2011;5:94–7).

- Σε δερματική χρήση, η κύρια εφαρμογή της παπαΐνης είναι στον ιατρικό τομέα για τον καθαρισμό των αποσυντεθειμένων ιστών, επιταχύνοντας τη διαδικασία επούλωσης των πληγών και εγκαυμάτων. (Εικόνα 12) (Ferreira AM, Oliveira KA, Vieira LC, Rol JL. ReMerck).



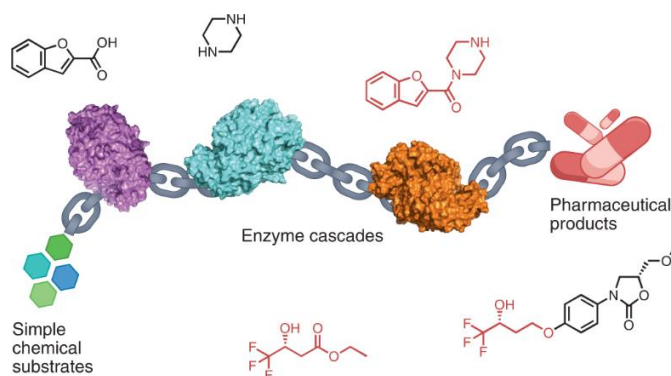
Εικόνα 12: Οι εφαρμογές της παπαΐνης στην βιομηχανία

(<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224417301838>)

- Η βρωμελαΐνη στην βιομηχανία καλλυντικών χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της ακμής, των ρυτίδων και το ξηρό δέρμα. Ανταγωνίζεται τις πρωτεΐνες των νεκρών κυττάρων στο ανώτερο στρώμα του δέρματος, με αποτέλεσμα την αντικατάστασή τους από νεότερα δερματικά κύτταρα. Επίσης συμβάλλει στη μείωση των μωλώπων και του οιδήματος από ενέσεις. (Abbas S, Shanbhag T, Kothare A. Applications of bromelain from pineapple waste towards acne. Saudi J Biol Sci. 2021; 28:1001–9, Ozlen S. Cosmetic composition containing alpha hydroxy acids, salicylic acid, and enzyme mixture of bromelain and papain. Biotechnol Adv. 1996; 4:562).
- Η φικίνη στην βιομηχανία καλλυντικών έχει ενζυμική δράση ως εξαιρετικό απολεπιστικό. Έχει επίσης αντιοξειδωτικά οφέλη. (Michalun MV, Dinardo JC. Milady Skin Care and Cosmetic Ingredients Dictionary, 4th ed. Cengage Learning: Independence 2014). Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η φικίνη έχει αντιοξειδωτική και λευκαντική δράση στα κύτταρα του δέρματος και ότι έχει δυνατότητες να αναπτυχθεί ως ένα νέο βιο-καλλυντικό υλικό. (Cho UM, Choi DH, Yoo DS, Park SJ, Hwang HS. Inhibitory Effect of Ficin Derived from Fig Latex on Inflammation and Melanin Production in Skin Cells. Biotechnol Bioprocess Eng. 2019;24:288–97).

2.3 Ένζυμα στην βιομηχανία φαρμάκων

Τα ένζυμα έχουν ευρύ φάσμα εφαρμογών στη φαρμακευτική βιομηχανία και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για θεραπευτικά φάρμακα σε ασθένειες που σχετίζονται με ανεπάρκεια ενζύμων, διαταραχές της πέψης κ.α. Επιπλέον, τα ένζυμα χρησιμοποιούνται εκτενώς για ερευνητικούς και αναλυτικούς σκοπούς(R&D).



Εικόνα 13: Η χρήση φυτικών ενζύμων στην βιομηχανία φαρμάκων

Η επιλογή των κατάλληλων φυτικών πρώτων υλών για την παραγωγή διαφόρων βιομηχανικών ενζύμων είναι μια πολύ σημαντική πτυχή για τις επιτυχείς βιομηχανικές

εφαρμογές τους. Τα φαρμακευτικά ένζυμα παράγονται με τη χρήση της τεχνολογίας της ζύμωσης, κυρίως χρησιμοποιώντας τους φυτικούς μικροοργανισμούς, οι οποίοι κατατάσσονται στην κατηγορία των γενικά αναγνωρισμένων ως ασφαλών . (Yang, H., Li, J., Du, G., and Liu, L., Eds. 2017 *Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications*. pp. 151–165, Academic Press Books, Elsevier).

Αυτή η παραγωγή πραγματοποιείται κυρίως με τη χρήση δύο διαδικασιών, την υποβρύχια ζύμωση (SmF) και τη ζύμωση στερεάς κατάστασης (SSF). (Meghwanshi, GK, and Vashishtha, A. 2018). Και οι δύο διεργασίες έχουν τα δικά τους πλεονεκτήματα και περιορισμούς. Οι περισσότερες βιομηχανίες έχουν υιοθετήσει τη διαδικασία SmF για την ενζυμική παραγωγή αλλά έχει ανανεωθεί το ενδιαφέρον για την SSF για την παραγωγή σε ορισμένες συγκεκριμένες βιομηχανίες. (Patel, A. K., Singhanian, R. R., Pandey, A., Eds. (2017) *Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications*. pp. 13–41, Academic Press Book, Thomas, L., Arumugam, M., and Pandey, A. (2013) *Indian J. Exp. Biol.* 51,875–884).

Τα ένζυμα που εξάγονται από τα φυτά είναι κυρίως ένζυμα αποικοδόμησης μακρομορίων. Φυτικά ένζυμα χρησιμοποιούνται ως φάρμακα με τη μορφή καψακίων που περιέχουν ένα μείγμα ενζύμων που βοηθούν στην υποστήριξη της πέψης και είναι ειδικά σχεδιασμένα για vegan ή χορτοφάγους ασθενείς. Τα ένζυμα λυοφιλοποιούνται (αποξηραίνονται με κατάψυξη) και συσκευάζονται σε κάψουλα ή άλλες μορφές φαρμάκων. Αυτά αποθηκεύονται σε ξηρές και δροσερές συνθήκες. Αυτά τα ένζυμα βοηθούν στην αποικοδόμηση των λιπών, των ινών, των λιπιδίων, των πρωτεϊνών, των υδατανθράκων και των άλλων μακρομορίων, τα οποία βοηθούν στην απελευθέρωση βιταμινών και θρεπτικών συστατικών από το τρόφιμο ώστε να απορροφηθούν μέσω των εντερικών τοιχωμάτων μετά την κατάποση. Τα φυτικά ένζυμα επίσης περιλαμβάνουν τη λακτάση για την υποστήριξη των ασθενών με δυσανεξία στη λακτόζη, τα οποία βοηθούν στην πέψη των γαλακτοκομικών προϊόντων. Για παράδειγμα, η NOW Health Group, Inc. έχει αναπτύξει ένα προϊόν με την ονομασία "NOW Plant Enzymes" (Φυτικά ένζυμα). Το προϊόν περιέχει διαιτητικά ένζυμα για τη θεραπεία ασθενών που πάσχουν από προβλήματα δυσπεψίας. Τα ένζυμα όπως η πρωτεάση, η όξινη-σταθερή πρωτεάση, η αμυλάση, η λιπάση, η κυτταρινάση, η λακτάση, η παπαΐνη, η βρομελίνη κ.λπ. απομονώνονται, καθαρίζονται ξεχωριστά και αναμειγνύονται μαζί σε επιθυμητή αναλογία και συσκευάζονται σε κάψουλα.

Η αποτελεσματικότητα των πρωτεϊνών στις πεπτικές διαταραχές

Η αποτελεσματικότητα των πρωτεϊνών έχει μελετηθεί τουλάχιστον σε ορισμένες πεπτικές διαταραχές. Μία από αυτές είναι η Νόσος του Crohn.

Η από του στόματος κατανάλωση βρωμελαΐνης αναφέρθηκε αρχικά ότι μειώνει τη σοβαρότητα της φλεγμονής του παχέος εντέρου σε ένα μοντέλο τρωκτικών (Hale et al. 2005) και ο φρέσκος χυμός ανανά μειώνει τη φλεγμονή σε IL-10 σε ποντίκια με ελκώδη κολίτιδα (Hale et al. 2010). Βιοψίες παχέος εντέρου από ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα και νόσο του Crohn είχαν μειωμένα επίπεδα φλεγμονωδών κυτταροκινών όταν έλαβαν θεραπεία με βρωμελαΐνη (Onken et al. 2008). Επιπλέον, η βρωμελαΐνη μειώνει αποτελεσματικά τη μετανάστευση των ουδετερόφιλων σε σημεία οξείας φλεγμονής και υποστηρίζει την ειδική απομάκρυνση του υποδοχέα της χημειοκίνης CD128 που είναι υπεύθυνος για την ενεργοποίηση των IL-8 (Fitzhugh et al. 2008).

Μια πρόσφατη έκθεση υποδηλώνει τη συμμετοχή των υποδοχέων TNF-α στην αντιφλεγμονώδη δράση της βρωμελαΐνης (Zhou et al. 2017). Σε μια σχετική μελέτη, η παπαΐνη που εφαρμόστηκε περιτοναϊκά ή η βρωμελαΐνη από το στόμα χρησιμοποιήθηκαν για τη μείωση ή την πρόληψη των ενδοπεριτοναϊκών συμφύσεων που προέκυψαν κυρίως από χειρουργικές επεμβάσεις στην κοιλιά (Ochsner and Storck 1936- Sahbaz et al. 2015). Ωστόσο, ο Stevens (1968) δεν μπόρεσε να επιβεβαιώσει την προστατευτική δράση της παπαΐνης σε ένα ζωικό μοντέλο.

Οι εντερικές διαταραχές που προκαλούνται από παράσιτα έχουν αντιμετωπιστεί με πρωτεολυτικά φυτικά ένζυμα. Η αποτελεσματικότητα της παπαΐνης και της βρωμελαΐνης έναντι των τρωκτικών κεστωδών (*Hymenolepis diminuta* και *Hymenolepis microstoma* και *Trichuris suis*) αποδείχθηκε *in vitro* και *in vivo* (Leveck et al. 2014- Mansur et al. 2014- Luoga et al. 2015). Σε μια μελέτη που ανέλυσε την αποτελεσματικότητα της βρωμελαΐνης, της ακτινιδίνης και της παπαΐνης κατά του *Heligmosomoides bakeri*, η παπαΐνη ήταν πιο αποτελεσματική από τη βρωμελαΐνη ή την η ακτινιδίνη ως ανθελμινθικό (Luoga et al. 2015).

Σακροσιδάση (β-φρουκτοφουρανοσιδική φρουκτοϋδρολάση)

Η σακροσιδάση (β-φρουκτοφουρανοσιδική φρουκτοϋδρολάση) είναι ένα άλλο ένζυμο που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της συγγενούς ανεπάρκειας σακχαράσης-ισομαλτάσης (CSID). Οι ασθενείς με CSID δεν μπορούν να πέψουν τον δισακχαρίτη σακχαρόζη. Το φάρμακο με βάση τη σακροσιδάση υδρολύει τη σακχαρόζη, βοηθώντας στην πέψη της, επιτρέποντας την κατανάλωση τροφίμων που έχει προστεθεί σακχαρόζη ή αλλιώς φρούτα που περιέχουν σακχαρόζη. (Lwin, A., Orvisky, E., Goker-Alpan, O., LaMarca, M. E., and Sidransky, E. (2004) *Mol. Genet. Metab.* 81, 70–73). Μια σακροσιδάση από το *S. Cerevisiae*

που μπορεί να ληφθεί από το στόμα, έχει χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία. (Matta, M. C., Vairo, F., Torres, L. C., and Schwartz, I. (2018) *Blood Cells Mol Dis.* 68, 200–202).

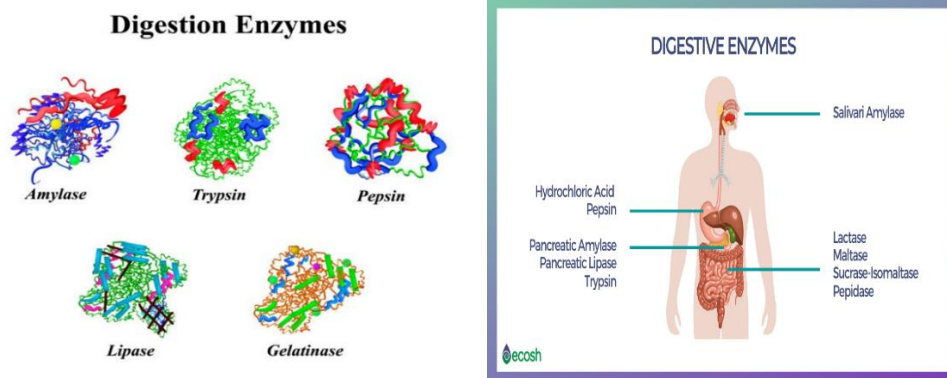
Ένζυμα που χρησιμοποιούνται ως πεπτικά βοηθήματα

Ορισμένα ένζυμα χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση των πεπτικών προβλημάτων που προκαλούνται από ορισμένα σάκχαρα (Εικόνα 14) . Το ένζυμο α-γαλακτοσιδάση λαμβάνεται ως πεπτικό βοήθημα για τα άτομα που εμφανίζουν τα συμπτώματα φούσκωμα, αέρια και διάρροια κατά την κατανάλωση τροφών όπως τα φασόλια τα λαχανικά Brassica, το λάχανο, το μπρόκολο και ούτω καθεξής. (Lule, V. K., Garg, S., Tomar, S. K., Khedkar, C. D., Nalage, D. N., eds. (2016) *Reference Module in Food Science-Encyclopedia of Food and Health.* pp. 43–48, Elsevier). Η υδρολάση α-γαλακτοσιδάση βοηθά στη διάσπαση των τελικών α-γαλακτοσιδικών μονάδων του υποστρώματος σακχάρου που υπάρχει σε αυτά τα τρόφιμα, τα οποία όταν παραμένουν άπεπτα προκαλούν δυσφορία, πιθανώς λόγω της βακτηριακής ζύμωσης των άπεπτων σακχάρων. (Shang, Q. H., Ma, X. K., Li, M., Zhang, L. H., Piao, X. S. (2018) *Feed Sci. Technol.* 236, 48-56). Σήμερα η α-γαλακτοσιδάση και η λακτάση είναι διαθέσιμες ως ένας αριθμός έτοιμων προς χρήση συμπληρωμάτων.

Η δυσανεξία στη λακτόζη είναι μια κατάσταση κατά την οποία ο ασθενής δεν είναι σε θέση να παράγει επαρκείς ποσότητες του ενζύμου λακτάση το οποίο είναι υπεύθυνο για την πέψη του σακχάρου του γάλακτος λακτόζη. (Treem, W. R., McAdams, L., Stanford, L., Kastoff, G., Justinich, C., and Hyams, J. (1999) *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 28, 137–142). Τα άτομα με δυσανεξία στη λακτόζη δεν μπορούν να χωνέψουν τις τροφές που περιέχουν λακτόζη και, ως εκ τούτου, υποφέρουν από στομαχικές διαταραχές όταν καταναλώνουν τρόφιμα που περιέχουν λακτόζη, όπως το γάλα και το γαλακτοκομικά προϊόντα. (Parker, A. M., and Watson, R. R., eds. (2017) *Nutrients in Dairy and their Implications on Health and Disease.* pp. 205–211, Academic Press Books – Elsevier). Τα άτομα αυτά χρησιμοποιούν συμπληρώματα, όπως το γάλα εμπλουτισμένο σε λακτάση, η σκόνη λακτάσης, και ούτω καθεξής. Αυτά τα συμπληρώματα βοηθούν στη διάσπαση της λακτόζης στα μονομερή της, δηλαδή τη γλυκόζη και τη γαλακτόζη και ανακουφίζουν από τα συμπτώματα της δυσανεξίας στη λακτόζη, όπως φούσκωμα, αέρια και διάρροια. (Kumar, R., Henrissat, B., and Coutinho, P. M. (2019) *Sci. Rep.* 9, 10346, Hertzler, S., Savaiano, D. A., Dilk, A., Jackson, K. A., Fabrizis, S. N. B., and Suarez, L., eds. (2017) *Nutrition in the Prevention and Treatment of Disease (4th Edition)*–. pp. 875–892, Academic Press Books – Elsevier).

Μια άλλη ασθένεια (γενετική διαταραχή) είναι η φαινυλκετονουρία (Phenylketonurie, PKU), μια κληρονομική διαταραχή, που απαιτεί αυστηρή συμμόρφωση με εξειδικευμένη δίαιτα. Η PKU εμφανίζεται λόγω της ανεπάρκειας ή της απουσίας του ενζύμου υδροξυλάση της

φαινυλαλανίνης. Αυτό το ένζυμο βοηθά στη μετατροπή της φαινυλαλανίνης σε τυροσίνη, διατηρώντας έτσι τα φυσιολογικά επίπεδά της στον οργανισμό. (Wallig, M. A., eds. 2018 *Fundamentals of Toxicologic Pathology* (3rd Edition). pp. 395–442, Academic Press Books – Elsevier). Η θεραπεία από το στόμα που έχει αναπτυχθεί για αυτή τη διαταραχή περιλαμβάνει μια φυτική λύση της αμμωνίας της φαινυλαλανίνης (PAL) που υπερεκφράζεται και λαμβάνεται από ανασυνδυασμένη ζύμη, η οποία διατίθεται στην αγορά με την εμπορική ονομασία Phenylase™. Η PAL έχει αποδειχθεί ότι υδρολύει τη φαινυλαλανίνη στο γαστρεντερικό σύστημα. (MacDonald, A., eds. (2013) *Brenner's Encyclopedia of Genetics* (Second Edition). pp. 300–303, Elsevier). Ως γενικό πεπτικό βοήθημα προς όφελος των ατόμων με αδύναμο ανοσοποιητικό σύστημα, αποτελεί ένα κοκτέιλ παγκρεατικών ενζύμων, όπως αμυλάσες πρωτεάσες και λιπάσες. Ο συνδιασμός αυτός έχει αποδειχθεί ότι είναι αποτελεσματικός στην ανακούφιση του προβλήματος της δυσασπορρόφησης του λίπους σε ασθενείς που πάσχουν από HIV. (Sarkissian, C. N., Shao, Z., Blain, F., Peevers, R., Su, H., Heft, R., Chang, T. M., and Scriver, C. R. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 2339–2344). Αυτό το κοκτέιλ ενζύμων είναι επίσης ευεργετικό στη θεραπεία της παγκρεατικής ανεπάρκειας, η οποία είναι συχνή σε ασθενείς με ΚΙ. (Schibli, S., Durie, P. R., and Tullis, E. D. (2002) *Current Opin. Pulm. Med.* 8, 542–546). Ένα κοκτέιλ παγκρεατικών ενζύμων με την εμπορική ονομασία "TheraCLEC Total™" είναι διαθέσιμο στο εμπόριο.



Εικόνα 14: Πεπτικά ένζυμα

Πρωτεολυτικά και γλυκολυτικά ένζυμα για τη θεραπεία κατεστραμμένων ιστών

Πρωτεολυτικά ένζυμα φυτικής προέλευσης χρησιμοποιούνται για την απομάκρυνση του νεκρού δέρματος των εγκαυμάτων. Λόγω των ασυνεπών αποτελεσμάτων και της χαμηλής αποτελεσματικότητας αυτών των ενζύμων φυτικής προέλευσης, η εμπορική τους διάθεση δεν μπόρεσε να πραγματοποιηθεί. Ωστόσο, μέσω της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA, αποτελεσματικά ενζυμικά σκευάσματα, όπως το Debrase gel dressing, με ικανοποιητικά

αποτελέσματα είναι πλέον διαθέσιμα. Το Debrase gel dressing αποτελείται από ένα μείγμα ενζύμων που εξάγονται από τον ανανά, εγκρίθηκε από το FDA των ΗΠΑ το 2002, και τέθηκε σε κλινική δοκιμή, σε ασθενείς με βαθιά θερμικά εγκαύματα μερικού πάχους ή πλήρους πάχους, στην Ευρώπη και τις Ηνωμένες Πολιτείες. (Harish, B. S, and Uppuluri, K. B. (2018) Int. J. Biol. Macromol. 107 (Pt B), 1373–1387).

Ο θρομβολυτικός ρόλος των φυτικών πρωτεασών

Ο θρομβολυτικός ρόλος των φυτικών πρωτεασών μπορεί να εξεταστεί με δύο τρόπους: με άμεση δράση των πρωτεασών εντός του κυκλοφορικού δικτύου ή με έμμεση δράση μέσω διάσπασης των υποστρωμάτων των πρωτεϊνών-στόχων που απελευθερώνουν πεπτίδια με αντιθρομβωτική ή προθρομβωτική δράση. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει δύο δραστηριότητες-προπηκτικές και αντιπηκτικές, ωστόσο, υπάρχει και μια τρίτη ομάδα ενζύμων που μπορεί να δράσει τόσο ως προπηκτικό όσο και ως αντιπηκτικό, ανάλογα με τη συγκέντρωση που χρησιμοποιείται στην ανάλυση.

Η θρομβολυτική δράση των φυτικών πρωτεασών κυστεΐνης έχει αποδειχθεί σε *hevein-a* πρωτεάση από το καουτσούκ της *Ervatamia heyneana* (Uday et al. 2017), μια πρωτεάση που μοιάζει με σερίνη από το *Solanum tuberosum* (StSBTc-3) (Pepe et al. 2016), μια γλυκοζυλιωμένη πρωτεάση σερίνης από το καουτσούκ της *Euphorbia cf. lactea* (Siritapetawee et al. 2015), μια πρωτεάση που μοιάζει με σερίνη από το *Petasites japonicas* (Kim et al. 2015), ένα ένζυμο που μοιάζει με μεταλλοπρωτεάση από το βρώσιμο και φαρμακευτικό φυτό *Aster yomena Kitamura-Honda* (Choi et al. 2014), και το πρωτεολυτικό κλάσμα P1G10 από το *V. cundinamarcensis* (Bilheiro et al. 2013). Από την άλλη πλευρά, μια προπηκτική δραστηριότητα περιγράφηκε σε μια πρωτεάση σερίνης από το *Curcuma Aromatica Salisb* (Shivalingu et al. 2016), μια πρωτεάση κυστεΐνης στα φύλλα του *Cnidioscolus Urens (L.)* (de Menezes et al. 2014), και σε μια δραστηριότητα που μοιάζει με θρομβίνη στο καουτσούκ του *Asclepias Curassavica L.* (Shivaprasad et al. 2009). Εν τω μεταξύ, τόσο η προθρομβωτική όσο και η θρομβολυτική δραστηριότητα έχουν περιγραφεί σε πρωτεάσες κυστεΐνης από *Bromelia balansae*, *Pseudananas macrodentes* και *B. hieronymi* (Errasti et al. 2016). Συνοπτικά, τα φυτικά πρωτεολυτικά ένζυμα μπορούν να δράσουν τόσο ως προπηκτικοί όσο και ως αντιπηκτικοί παράγοντες.

3. Μελέτη Σκοπιμότητας για τον σχεδιασμό και παραγωγή συμπληρωμάτων διατροφής με φυτικά ένζυμα.

Η εταιρεία Cloudpharm

Η Cloudpharm είναι μια εταιρεία έρευνας και ανάπτυξης στη φαρμακευτική βιομηχανία που ιδρύθηκε στην Ελλάδα το 2016. Οι βασικές της υπηρεσίες επικεντρώνονται στην ανακάλυψη βιοδραστικών ενώσεων και τον σχεδιασμό συμπληρωμάτων διατροφής. Στα πλαίσια αυτά, η Cloudpharm σχεδιάζει και αναπτύσσει αλγόριθμους στο πεδίο της χημειοπληροφορικής που υποστηρίζουν τις υπηρεσίες της. Συγκεκριμένα, η πλατφόρμα CNATURAL® υποστηρίζει το σχεδιασμό διατροφικών συμπληρωμάτων και η πλατφόρμα CLOUDSCREEN® υποστηρίζει την επανατοποθέτηση φαρμάκων.

Η CloudPharm εξετάζει την ευκαιρία να διαφοροποιηθεί από τον ανταγωνισμό σχεδιάζοντας και παράγοντας εξειδικευμένα προϊόντα διατροφής (διατροφικά συμπληρώματα) βασισμένα στις ιδιότητες φυτικών ενζύμων. Τα ένζυμα θα έχουν ως στόχο την αύξηση της αποτελεσματικότητας των φυτοχημικών προϊόντων μέσω διαφορετικών μηχανισμών (π.χ. αύξηση της απορρόφησης των δραστικών συστατικών).

Το επιχειρηματικό μοντέλο περιλαμβάνει τον σχεδιασμό από την Cloudpharm ενώ η παραγωγική διαδικασία θα πραγματοποιείται από συνεργαζόμενη βιομηχανική μονάδα στην Ελλάδα.

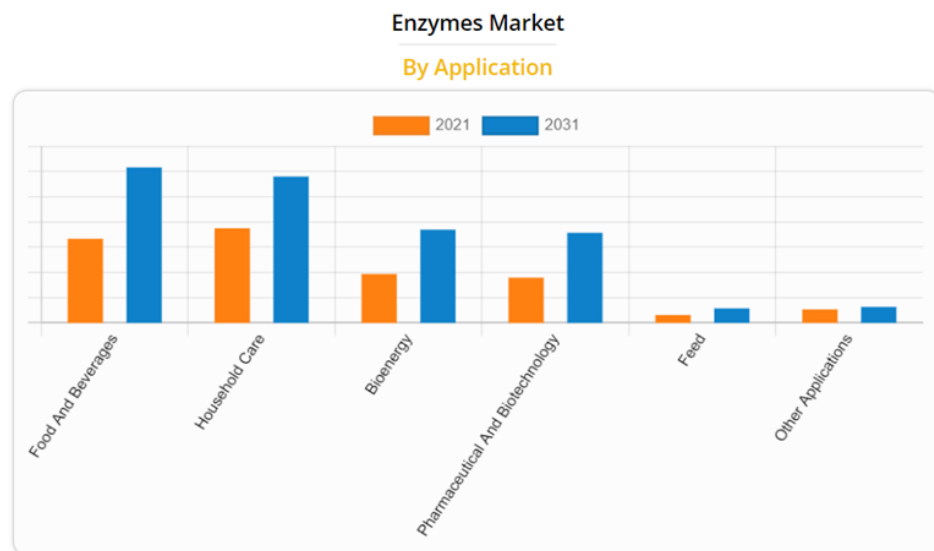
Η αγορά των φυτικών ενζύμων

Οι εξελίξεις στη μηχανική των ενζύμων και άλλες τεχνολογίες έχουν οδηγήσει στην επέκταση της αγοράς ενζύμων. Επιπλέον, η εξάντληση των μη ανανεώσιμων πόρων έχει αυξήσει τις περιβαλλοντικές ανησυχίες των ανθρώπων, όπως και τη σημασία της παραγωγής φυτικών ενζύμων. Οι βασικοί παράγοντες που οδηγούν στην ανάπτυξη της αγοράς ενζύμων περιλαμβάνουν την αυξανόμενη ζήτηση για βιομηχανικά και ειδικά ένζυμα στον τομέα των τροφίμων και ποτών, των φαρμακευτικών προϊόντων και των ζωοτροφών. Επιπλέον η ζήτηση για προϊόντα φυτικής προέλευσης αυξάνεται με σημαντικό ρυθμό λόγω της ικανότητάς τους να μειώνουν την όξινη δυσπεψία, τις καούρες και διάφορες άλλες πεπτικές διαταραχές.

Η βιομηχανία τροφίμων καλύπτει το 37% της αγοράς ενζύμων και έχει τις ταχύτερα αναπτυσσόμενες εφαρμογές λόγω των αυξανόμενων απαιτήσεων του παγκόσμιου πληθυσμού, καθώς και της ανάγκης για υψηλότερη ποιότητα τροφίμων και των επερχόμενων νέων τεχνολογιών στη βιομηχανία τροφίμων.

Η παγκόσμια αγορά ενζύμων αναμένεται να αναπτυχθεί με αξιοσημείωτο ρυθμό λόγω της αυξανόμενης ζήτησης για ειδικά ένζυμα σε διάφορες εφαρμογές, όπως η έρευνα, η φαρμακευτική, διαγνωστικά και βιοτεχνολογία. Τα βιομηχανικά ένζυμα αναμένεται να παρουσιάσουν σημαντική ανάπτυξη λόγω αυξανόμενης ζήτησής τους από τις βιομηχανίες ζωοτροφών και διατροφικών προϊόντων. Αύξηση της ευαισθητοποίησης των καταναλωτών για την υγεία έχει ως αποτέλεσμα την αυξανόμενη κατανάλωση λειτουργικών προϊόντων διατροφής, η οποία αναμένεται να προκαλέσει τη ζήτηση προϊόντων τα επόμενα χρόνια (Εικόνα 15). Οι βιομηχανίες χρησιμοποιούν εκτενώς ένζυμα που προέρχονται από φυτικές πρώτες ύλες, καθώς τα ένζυμα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να την παρασκευή διαφόρων προϊόντων και το πεδίο εφαρμογής τους δεν είναι περιορισμένο.

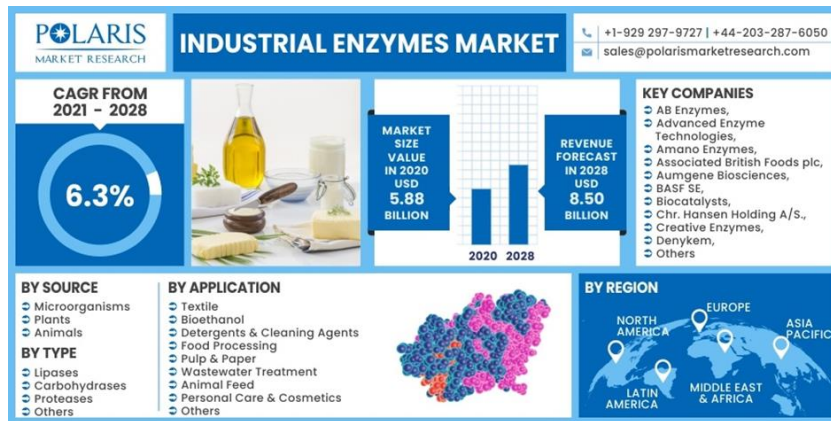
By Application



The household care segment dominated the market in 2021, and this trend is expected to continue during the forecast period

Εικόνα 15: Πρόβλεψη της χρήσης των ενζύμων από το 2021-2031 στους τομείς της βιομηχανίας.

Τα ένζυμα ωφελούν τη βιοτεχνολογική, τη φαρμακευτική, τη βιομηχανία τροφίμων και ποτών και τη βιομηχανία βιοκαυσίμων. Η αυξημένη ζήτηση ενζύμων στη φαρμακευτική βιομηχανία για τη σύνθεση ενδιάμεσων προϊόντων στην παραγωγή δραστικών φαρμακευτικών συστατικών (API) για αποτελεσματικά φάρμακα αναμένεται να οδηγήσει την αγορά ενζύμων προς τα εμπρός. Ομοίως, η ικανότητα ενός ενζύμου να μετατρέπει σύνθετα μόρια σε απλούστερα μόρια (άμυλο σε γλυκόζη) στις εταιρείες τροφίμων και ποτών αναμένεται να ωθήσουν τη ζήτηση ενζύμων τα επόμενα χρόνια.

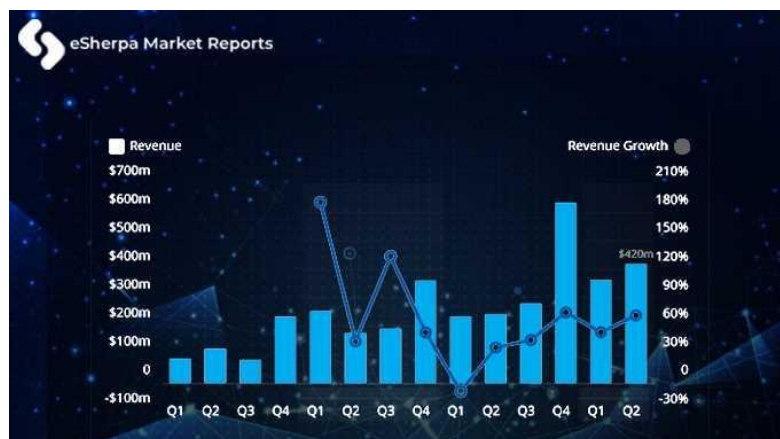


Εικόνα 16: Πρόβλεψη της αγοράς των ενζύμων 2021-2028

Η Data Bridge Market Research αναλύει ότι η αγορά φυτικών ενζύμων, η οποία αποτιμήθηκε στα 5.88 εκατ. δολάρια το 2020 παγκοσμίως, αναμένεται να φτάσει την αξία των 8.50 εκατ. δολαρίων μέχρι το 2028, με CAGR 6,30% κατά την περίοδο πρόβλεψης. (Εικόνα 16). Η Βόρεια Αμερική κυριαρχεί στην αγορά ενζύμων με μερίδιο 37,6% το 2021 και αναμένεται να φθάσει τα 12,28 δισ. δολάρια ΗΠΑ το 2022. Αυτό οφείλεται στην αυξανόμενη ζήτηση από τον τομέα της φαρμακευτικής και της βιοτεχνολογίας στις ΗΠΑ.

Ο ρόλος του COVID-19 στην αγορά φυτικών ενζύμων

Η αγορά ενζύμων επωφελήθηκε από την κρίση του COVID-19. (Εικόνα 17). Αυτό οφείλεται στην αύξηση της ζήτησης για ένζυμα σε προϊόντα διατροφής και ενίσχυσης του ανοσοποιητικού συστήματος, στην εστίαση των καταναλωτών στη φροντίδα του νοικοκυριού και στην εσωτερική κατανάλωση τροφίμων. Ωστόσο, οι εταιρείες αντιμετώπισαν προκλήσεις λόγω των διακοπόμενων δραστηριοτήτων της αλυσίδας εφοδιασμού και των αβέβαιων συνθηκών της αγοράς λόγω των εμπορικών περιορισμών και των αποκλεισμών. Αυτός ο αρνητικός αντίκτυπος αντισταθμίστηκε σε μεγάλο βαθμό από την αύξηση της ζήτησης για ένζυμα στις βιομηχανίες τροφίμων και ποτών και στις φαρμακευτικές βιομηχανίες. Ως αποτέλεσμα της αυξημένης ευαισθητοποίησης σχετικά με την προληπτική υγεία και τις διατροφικές λύσεις και σκευάσματα που υποστηρίζουν την υγεία του ανοσοποιητικού σε όλη τη φάση της πανδημίας, ο συνολικός αντίκτυπος παραμένει θετικός για τους βασικούς παράγοντες του κλάδου.

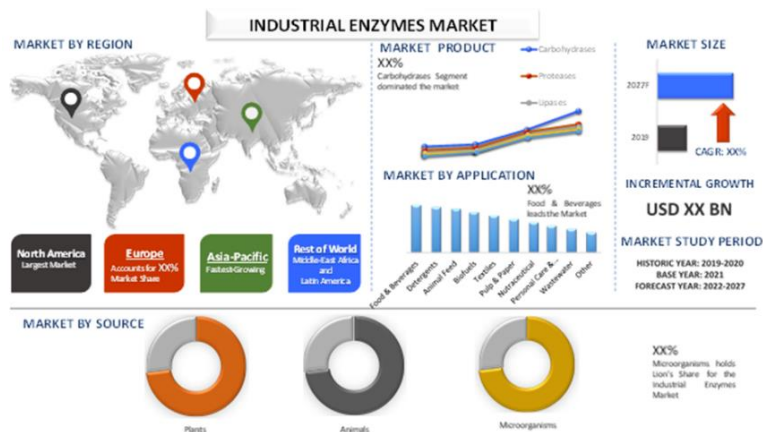


Εικόνα 17: Επίδραση της επιδημίας COVID-19 στην παγκόσμια αγορά ενζύμων πρωτεασών 2020 | Novozymes, DuPont (Danisco), AB Enzymes, DSM.

Γεωγραφική τμηματοποίηση της αγοράς φυτικών ενζύμων

Οι χώρες οι οποίες δραστηριοποιούνται στην αγορά φυτικών ενζύμων είναι οι ΗΠΑ, ο Καναδάς, το Μεξικό στη Βόρεια Αμερική, η Γερμανία, η Σουηδία, η Πολωνία, η Δανία, η Ιταλία, το Ηνωμένο Βασίλειο, Γαλλία, Ισπανία, Ολλανδία, Βέλγιο, Ελβετία, Τουρκία, Ρωσία, Υπόλοιπη Ευρώπη στην Ευρώπη, Ιαπωνία, Κίνα, Ινδία, Νότια Κορέα, Νέα Ζηλανδία, Βιετνάμ, Αυστραλία, Σιγκαπούρη, Μαλαισία, Ταϊλάνδη, Ινδονησία, Φιλιππίνες, Υπόλοιπη Ασία-Ειρηνικός (APAC) στην Ασία-Ειρηνικός (APAC), Βραζιλία, Αργεντινή, Υπόλοιπη Νότια Αμερική ως μέρος της Νότιας Αμερικής, Ηνωμένα Αραβικά Εμιράτα, Σαουδική Αραβία, Ομάν, Κατάρ, Κουβέιτ, Νότια Αφρική, Υπόλοιπη Μέση Ανατολή και Αφρική (MEA) ως μέρος της Μέσης Ανατολής και Αφρικής (MEA). (Εικόνα 18)

Η Ευρώπη αποδείχθηκε η περιοχή που είναι υπεύθυνη για την πλειονότητα των δραστηριοτήτων της αγοράς λόγω της παρουσίας μεγάλου αριθμού βιομηχανιών οι οποίες δραστηριοποιούνται στην παραγωγή φυτικών ενζύμων.



Εικόνα 18: Η αγορά βιομηχανικών ενζύμων ανά γεωγραφική περιοχή

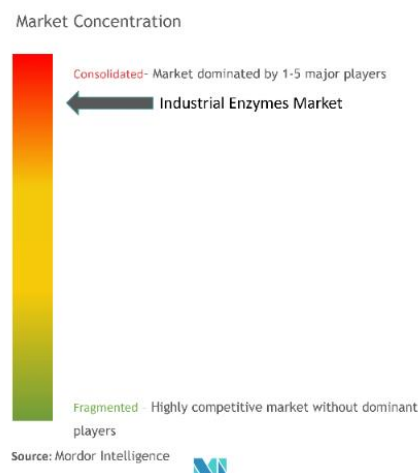
Κύριες εταιρείες που δραστηριοποιούνται στην παραγωγή φυτικών ενζύμων.

Επί του παρόντος, υπάρχουν 4000 γνωστά ένζυμα, εκ των οποίων μόνο 200 χρησιμοποιούνται για εμπορικούς σκοπούς και μόνο 20 είδη ενζύμων παράγονται σε βιομηχανική κλίμακα. Η αγορά κυριαρχείται από τους τρεις κορυφαίους παίκτες, και συγκεκριμένα η Novozymes (Δανία), η Dupont (ΗΠΑ) και η Roche (Ελβετία) που αντιπροσωπεύουν περίπου 75% της συνολικής αγοράς. Η αγορά μπορεί να περιγραφεί ως ανταγωνιστική και τεχνολογικά εντατική. (Εικόνα 19)

Industrial Enzymes Market Top Players

- 1 Novozymes
- 2 DuPont
- 3 AB Enzymes
- 4 BASF SE
- 5 DSM

*Disclaimer: Major Players sorted in no particular order



Εικόνα 19: Οι μεγαλύτεροι ανταγωνιστές στην παραγωγή φυτικών ενζύμων.

Οι εταιρείες ανταγωνίζονται κυρίως με βάση την ποιότητα των προϊόντων, επιδόσεων, της χρήσης των δικαιωμάτων πνευματικής ιδιοκτησίας και της ικανότητας καινοτομίας, μεταξύ άλλων τέτοιων παραγόντων.

Ορισμένες εξέχοντες εταιρείες στην παγκόσμια αγορά ενζύμων είναι οι:

- BASF SE: Χημική βιομηχανία. Η έδρα της βρίσκεται στο Λούντβιχσχαφεν αμ Ράιν (Ρηνανία-Παλατινάτο στη Γερμανία). Στο πεδίο δράσης της συμπεριλαμβάνονται προϊόντα χημικά, πλαστικά, γεωργικά, χημικά κατασκευών, καθώς και αργό πετρέλαιο και φυσικό αέριο.
- Novozymes: Πολυεθνική εταιρεία βιοτεχνολογίας με έδρα στο Bagsværd έξω από την Κοπεγχάγη της Δανίας. Στόχος της εταιρείας είναι η έρευνα, ανάπτυξη και παραγωγή βιομηχανικών ενζύμων, μικροοργανισμών και βιοφαρμακευτικών συστατικών. Στα τέλη της δεκαετίας του 1980 η Novozymes παρουσίασε το πρώτο ένζυμο διάσπασης λίπους στον κόσμο

<p>για απορρυπαντικά που παρασκευάστηκε με γενετικά τροποποιημένους μικροοργανισμούς , που ονομάζονται Lipolase.</p>
<ul style="list-style-type: none"> • DuPont Danisco: Δανέζικη εταιρεία βιολογικής βάσης με δραστηριότητες στην παραγωγή τροφίμων, ενζύμων και άλλων βιοπροϊόντων, καθώς και μια μεγάλη ποικιλία από έκδοχα φαρμακευτικής ποιότητας. Ιδρύθηκε το 1989.
<ul style="list-style-type: none"> • DSM: Ολλανδική πολυεθνική εταιρεία που δραστηριοποιείται στους τομείς της υγείας, της διατροφής και των υλικών.
<ul style="list-style-type: none"> • Novus International: Αμερικανική εταιρεία υγείας και διατροφής ζώων με έδρα στο St. Charles, Missouri. Τα προϊόντα της Novus περιλαμβάνουν αμινοξέα, οργανικά ιχνοστοιχεία, συντηρητικά ζωοτροφών και διάφορα προϊόντα διατροφής και υγείας. Στους πελάτες της περιλαμβάνονται διατροφολόγοι ζώων, κτηνίατροι και μεμονωμένοι ιδιοκτήτες ζώων.
<ul style="list-style-type: none"> • Bayer AG (Γερμανία): χημική και φαρμακευτική εταιρία που ιδρύθηκε στο Μπάρμεν της Γερμανίας το 1863. Σήμερα έχει την έδρα της στο Λεβερκούζεν, Βόρεια Ρηνανία-Βεσφαλία, Γερμανία. Είναι γνωστή για το σήμα κατατεθέν της ασπιρίνης.
<ul style="list-style-type: none"> • Yara (Νορβηγία): Η Yara International ASA είναι μια νορβηγική χημική εταιρεία. Παράγει, διανέμει και πουλά ορυκτά λιπάσματα με βάση το άζωτο και συναφή βιομηχανικά προϊόντα. Η σειρά προϊόντων της περιλαμβάνει επίσης ορυκτά λιπάσματα με βάση φωσφορικά και ποτάσα, καθώς και σύνθετα και εξειδικευμένα ορυκτά λιπάσματα.
<ul style="list-style-type: none"> • Compass Minerals (ΗΠΑ): Η Compass Minerals International, Inc είναι μια δημόσια εταιρεία που, μέσω των θυγατρικών της, είναι κορυφαίος παραγωγός ορυκτών, όπως αλάτι, χλωριούχο μαγνήσιο, θειικό άλας ποτάσας και άλλα φυτικά θρεπτικά προϊόντα.
<ul style="list-style-type: none"> • Syngenta Crop Protection AG (Ελβετία): Η Syngenta AG είναι πάροχος γεωργικής επιστήμης και τεχνολογίας, ιδίως σπόρων και φυτοφαρμάκων με έδρα τη διαχείρισή της στη Βασιλεία της Ελβετίας .Ανήκει στην ChemChina , μια κινεζική κρατική επιχείρηση . Ιδρύθηκε το 2000 από τη συγχώνευση των αγροχημικών επιχειρήσεων της Novartis και της AstraZeneca και εξαγοράστηκε από την China National Chemical Corporation (ChemChina) το 2017.
<ul style="list-style-type: none"> • ADAMA (Ισραήλ): Μαζί με την εξ ολοκλήρου θυγατρική της, την Adama Agricultural Solutions Ltd., η ADAMA κατασκευάζει και εμπορεύεται ζιζανιοκτόνα, εντομοκτόνα και μυκητοκτόνα. Η εταιρεία διαθέτει

<p>εγκαταστάσεις έρευνας και ανάπτυξης (R&D) και κατασκευής σε διάφορες τοποθεσίες σε όλο τον κόσμο, με δύο κύρια κέντρα στο Ισραήλ και την Κίνα. Διαπραγματεύεται στο Χρηματιστήριο του Shenzhen και έχει την έδρα του στην πόλη Ashdod του Ισραήλ. Το 2017, η Adama Agricultural Solutions Ltd. εξαγοράστηκε από την Hubei Sanonda Co. Ltd., μια κινεζική παραγωγό αγροχημικών και μερική θυγατρική της ChemChina.</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Η F. Hoffmann-La Roche AG, κοινώς γνωστή ως Roche, είναι μια ελβετική πολυεθνική εταιρεία υγειονομικής περίθαλψης που δραστηριοποιείται παγκοσμίως σε δύο τομείς: Φαρμακευτικά και Διαγνωστικά
<ul style="list-style-type: none"> • Nufarm (Αυστραλία): Γεωργική χημική εταιρεία με έδρα τη Μελβούρνη της Αυστραλίας . Ιδρύθηκε το 1956 από τον Max Fremder. Κατέχει περισσότερες από 2.100 εγγραφές προϊόντων και εμπορεύεται προϊόντα σε περισσότερες από 100 χώρες σε όλο τον κόσμο. Η εταιρεία είναι κατασκευαστής rhenoxies , μια κατηγορία ζιζανιοκτόνων που ελέγχει και εξαφανίζει τα πλατύφυλλα ζιζάνια . Αυτά τα προϊόντα κατασκευάζονται σε εγκαταστάσεις παγκοσμίου δικτύου στην Αυστραλία, την Αγγλία , την Αυστρία και την Ολλανδία .
<ul style="list-style-type: none"> • UPL (Ινδία): Πολυεθνική εταιρεία που κατασκευάζει και εμπορεύεται αγροχημικά, βιομηχανικά χημικά, χημικά ενδιάμεσα και εξειδικευμένα χημικά προϊόντα και προσφέρει επίσης λύσεις φυτοπροστασίας. Με έδρα τη Βομβάη , Μαχαράστρα, η εταιρεία δραστηριοποιείται τόσο σε αγροτικές όσο και σε μη αγροτικές δραστηριότητες.
<ul style="list-style-type: none"> • K+S Aktiengesellschaft (Γερμανία): Χημική εταιρεία με έδρα το Κάσελ . Η εταιρεία είναι ο μεγαλύτερος προμηθευτής ποτάσας στην Ευρώπη για χρήση σε λιπάσματα . Η εταιρεία παράγει επίσης και διανέμει άλλα ορυκτά λιπάσματα, όπως αυτά από μαγνήσιο και θείο.
<ul style="list-style-type: none"> • ICL (Ισραήλ): Πολυεθνική εταιρεία παραγωγής που αναπτύσσει, παράγει και εμπορεύεται λιπάσματα, μέταλλα και άλλα ειδικά- Η ICL εξυπηρετεί κυρίως τρεις αγορές: γεωργία, τρόφιμα και μηχανικά υλικά. Η ICL παράγει περίπου το ένα τρίτο του βρωμίου στον κόσμο και είναι ο έκτος μεγαλύτερος παραγωγός ποτάσας στον κόσμο. Είναι κατασκευαστής εξειδικευμένων λιπασμάτων και ειδικών φωσφορικών αλάτων, επιβραδυντικών φλόγας και διαλυμάτων επεξεργασίας νερού.

Πίνακας 1: Οι μεγαλύτερες εταιρείες στην παγκόσμια αγορά ενζύμων

Επιλογή ενζύμων και παραγωγή

Η CloudPharm ενδιαφέρεται να εισέλθει στον χώρο του σχεδιασμού νέων προϊόντων συμπληρωμάτων διατροφής που θα στηρίζονται σε φόρμουλες με ενζυμικά σύμπλοκα. Σε πρώτο βήμα θα πραγματοποιείται επιλογή των συγκεκριμένων ενζύμων με βάση τις ιδιότητές τους και συνδυασμός αυτών με απώτερο στόχο τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας των συμπληρωμάτων διατροφής όπως για παράδειγμα η αύξηση της απορρόφησης και της βιοδιαθεσιμότητας των φυσικών βιοδραστικών συστατικών τους.

Κόστος παραγωγής φυτικών ενζύμων

Τα ένζυμα έχουν υψηλό κόστος λόγω του αντίστοιχου κόστους απομόνωσης, καθαρισμού και παραγωγής. Ορισμένες πρόσφατες έρευνες έχουν επικεντρωθεί στη μείωση του κόστους των ενζυμικών συστημάτων μέσω της άμεσης χρήσης φυτικών υλικών που περιέχουν ένζυμα, της χρήσης ακατέργαστων ενζυμικών εκχυλισμάτων, της ανάπτυξης κλωνοποιημένων κυττάρων για την έκφραση και παραγωγή ενζύμων βιοτεχνολογικής καθώς και της διαγονιδιακής διέγερσης φυτών για τη παραγωγή ενζύμων.

Το κόστος παραγωγής ενός συγκεκριμένου ενζύμου εξαρτάται άμεσα από τα εξής στάδια: παραγωγή, εκχύλιση, καθαρισμός, συμπύκνωση, σταθεροποίηση/ακίνητοποίηση, που εμπλέκονται στην εμπορία του, στον βαθμό καθαρισμού και την απόδοση του. Εκτιμάται ότι η αξία παραγωγής των ενζύμων μπορεί να κυμαίνεται μεταξύ 25 και 110 δολαρίων/kg (2018; Tournier et al. 2020), αν και ένζυμα όπως οι κυτταρινάσες μπορούν να έχουν χαμηλότερες τιμές, περίπου 5 δολάρια/kg (Klein-Marcuschamer et al. 2012).

Αξία παραγωγής φυτικών ενζύμων

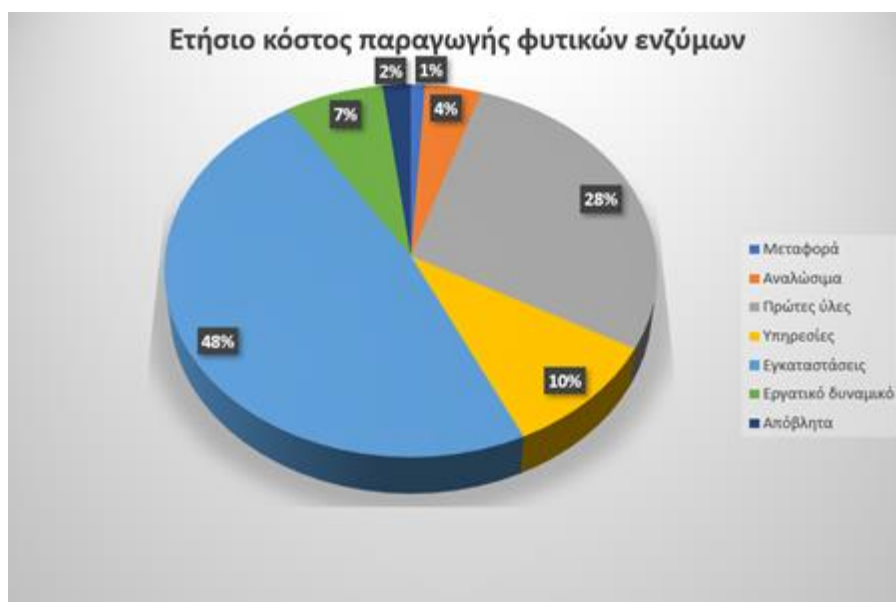
25-110 δολάρια/ kg

Πίνακας 2: Αξία παραγωγής φυτικών ενζύμων.

Το κόστος των ενζύμων αποτελεί σημαντικό ποσοστό του συνολικού κόστους παραγωγής φυτικών ενζύμων, το οποίο κυμαίνεται από 48% για τις εγκαταστάσεις παραγωγής, 28% για τις πρώτες ύλες, 10% για τις υπηρεσίες, 7% για το εργατικό δυναμικό, 4% για τα αναλώσιμα, 2% για τα απόβλητα και 1% το κόστος μεταφοράς. (Εικόνα 20). Μαζί με το κόστος για την πρώτη ύλη, τα γενικά έξοδα την ασφάλιση και το κόστος κεφαλαίου/χρηματοδότησης, η παραγωγή ενζύμων συγκαταλέγεται μεταξύ των τεσσάρων μεγαλύτερων παραγόντων κόστους, που μαζί αντιπροσωπεύουν περισσότερο από το 80% του συνολικού κόστους παραγωγής. (Πίνακας 2)

Κόστος παραγωγής φυτικών ενζύμων	
Εγκαταστάσεις παραγωγής	48%
Πρώτες ύλες	28%
Υπηρεσίες	10%
Εργατικό δυναμικό	7%
Αναλώσιμα	4 %
Απόβλητα	2%
Κόστος μεταφοράς	1%

Πίνακας 3: Κόστος παραγωγής φυτικών ενζύμων



Εικόνα 20: Ετήσιο κόστος παραγωγής φυτικών ενζύμων

SWOT Analysis

Δυνατά σημεία

- Η Clouderpharm σχεδιάζει καινοτόμα διατροφικά συμπληρώματα με βάση φυτοχημικά συστατικά για τρίτους. Ήδη έχει αναπτύξει προϊόντα που θα μπορούσαν να βελτιωθούν με τη χρήση ενζύμων..
- Υπάρχουν οι οικονομικοί πόροι για την επένδυση.
- Υφιστάμενο πελατολόγιο που θα στηρίξει τα νέα προϊόντα.
- Οι στρατηγικοί συνεργάτες της εταιρείας μπορούν να υποστηρίξουν τεχνολογικά το νέο εγχείρημα.

- Το εξειδικευμένο προσωπικό της εταιρείας εγγυάται την άρτια επιστημονική υποστήριξη του εγχειρήματος.
- Η Cloudpharm, μέσω των ακαδημαϊκών συνεργασιών της, προσπαθεί επιπλέον μπορεί να προσφέρει μια βιώσιμη εναλλακτική λύση για τις τρέχουσες διαδικασίες βιομηχανικής παραγωγής φυτικών ενζύμων.

Αδυναμίες

- Η τεχνολογική λύση της παραλαβής και καθαρισμού από φυτικούς ιστούς εξαρτάται από τις πρώτες ύλες και τους προμηθευτές αυτών. Επιπλέον, οι κανονισμοί για τους ΓΤΟ είναι πολύ αυστηροί στην Ευρώπη.
- Μη προγενέστερη τεχνογνωσία.
- Αυξημένο κόστος των τελικών προϊόντων.

Ευκαιρίες

- Η αγορά των φυτικών ενζύμων αναπτύσσεται και θα συνεχίσει να αναπτύσσεται τα επόμενα 5 χρόνια, διότι οι εφαρμογές των ενζύμων επεκτείνονται και σήμερα οι εταιρείες αναζητούν όλο και περισσότερο βιώσιμους εναλλακτικούς τρόπους.
- Η αγορά φυτικών ενζύμων έχει ποικίλες εφαρμογές σε διαφορετικές βιομηχανίες όπως τρόφιμα, καλλυντικά, φάρμακα κ.λπ. Αυτό διευρύνει το δυνητικό πελατολόγιο της εταιρείας
- Η εμπλοκή του κράτους στην προώθηση της καθαρής ενέργειας θα μπορούσε να αποτελέσει σημαντικό μοχλό ανάπτυξης της αγοράς φυτικών ενζύμων.
- Παρόλο που πολλές μέθοδοι ακινητοποίησης ενζύμων έχουν περιγραφεί σε διπλώματα ευρεσιτεχνίας και δημοσιεύσεις, σχετικά λίγες διεργασίες που χρησιμοποιούν κινητοποιημένα ένζυμα έχουν εμπορευματοποιηθεί με επιτυχία.

Απειλές

- Στην αγορά δραστηριοποιούνται μεγάλες εταιρείες όπως η Novozymes, η Dupont και η Roche οι οποίες μπορούν εύκολα να προσχωρήσουν στο σχεδιασμό τελικών προϊόντων και να αποτελέσουν άμεσους ανταγωνιστές.
- Φυτά που καλλιεργούνται για την εμπορική εξαγωγή ενζύμων, όπως ο ανανάς και η παπάγια εκτίθενται γενικά σε σκληρούς χημικούς μολυσματικούς παράγοντες φυτοφαρμάκων, συντηρητικά και ενισχυτές ανάπτυξης. Μια ποικιλία επιβλαβών

φυτοφαρμάκων χρησιμοποιούνται σε διάφορες χώρες για τη βελτίωση της παραγωγικότητας. Σε τέτοιες καταστάσεις, οι μελέτες που σχετίζονται με την επίδραση των φυτοφαρμάκων, των συντηρητικών και των ενισχυτών ανάπτυξης στις κυτταρικές και μοριακό επίπεδο είναι πολύ περιορισμένες.

- Επιπλέον, τα ίχνη αυτών των επιβλαβών χημικών ουσιών σε στο τελικό προϊόν θα πρέπει επίσης να μελετηθούν, καθώς αυτός μπορεί να είναι ο λόγος για ορισμένους ασθενείς που αναπτύσσουν αλλεργικές αντιδράσεις στα φυτικά ένζυμα.

4. Συμπεράσματα

Η παρουσίαση και ανάλυση των εταιρειών στο παρόν κεφάλαιο οδηγεί σε ορισμένα συμπεράσματα:

Οι μοναδικές ιδιότητες των ενζύμων, όπως η υψηλή εξειδίκευση, η γρήγορη δράση και η βιοκατάλυση επιτρέπουν στις διεργασίες με τη βοήθεια ενζύμων στη βιομηχανία να λειτουργούν υπό ηπιότερες συνθήκες αντίδρασης, με βελτιωμένες αποδόσεις και μείωση της παραγωγής αποβλήτων.

Η αξιοποίηση των φυτικών πηγών ,που δεν είναι τοξικά για τον άνθρωπο, παρουσιάζουν υψηλό στρατηγικό ενδιαφέρον. Εκτός από τη διασφάλιση του ενζυμικού εφοδιασμού των βιομηχανικών διεργασιών, η ανάπτυξη νέων ενζυμικών συστημάτων καθίσταται δυνατή και σημαντική πρόοδος στις βιομηχανίες τροφίμων καλλυντικών και φαρμάκων.

Ο τομέας των τροφίμων κυριαρχεί στην αγορά των βιομηχανικών ενζύμων. Πρόκειται για τον ταχύτερα αναπτυσσόμενο τομέα εφαρμογών, ο οποίος υποστηρίζεται κυρίως από τον συνεχώς αυξανόμενο παγκόσμιο πληθυσμό και την αυξανόμενη αγοραστική του δύναμη. Η ευαισθητοποίηση σε θέματα υγείας αποτελεί επίσης παράγοντα της αυξανόμενης ζήτησης των ανθρώπων για ποιότητα τροφίμων, ασφαλέστερη επεξεργασία παραγωγής και βελτιωμένη διατροφική αξία.

Η αυξανόμενη ζήτηση για τρόφιμα υψηλής ποιότητας όσον αφορά το φυσικό άρωμα και τη γεύση έχει γίνει κοινή τάση μεταξύ των σημερινών καταναλωτών. Η τάση αυτή προκάλεσε την ανάγκη για την ανάπτυξη αρωματισμένων και γευστικών επεξεργασμένων τροφίμων με τη χρήση βιομηχανικών ενζυμικών εφαρμογών. Αυτά τα ένζυμα δρουν ως καταλύτες διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στη διάσπαση βιταμινών και θρεπτικών συστατικών στις μεταβολικές αντιδράσεις και στη μετατροπή σύνθετων μορίων σε μικρότερα μόρια.

Η βιομηχανία τροφίμων ασχολείται συνεχώς με την ανάπτυξη νέων γαλακτοκομικών προϊόντων, ποτών και τροφίμων για τους καταναλωτές. Με την ανάπτυξη νέων προϊόντων στη βιομηχανία τροφίμων, καλλυντικών και φαρμάκων η εφαρμογή των ενζύμων στη βιομηχανία αυξάνεται συνεχώς.

Η υψηλή κατανάλωση στις βιομηχανίες των ΗΠΑ συσχετίζεται με την ευαισθητοποίηση σχετικά με τις πράσινες τεχνολογίες που αντιμετωπίζουν περιβαλλοντικά ζητήματα, την αυξημένη παραγωγικότητα και την καλύτερη αξία των προϊόντων, οδηγώντας έτσι στην ανάπτυξη του τομέα της έρευνας και της ανάπτυξης και των βιομηχανιών που χρησιμοποιούν ένζυμα.

Οι κύριοι παράγοντες που οδηγούν στην ανάπτυξη της αγοράς βιομηχανικών ενζύμων είναι η αυξανόμενη ποικιλομορφία στις εφαρμογές ενζύμων, όπως τα τρόφιμα και τα ποτά, τα φαρμακευτικά προϊόντα, τα απορρυπαντικά, τα καλλυντικά και άλλες βιομηχανίες. Επίσης, η αυξανόμενη ζήτηση για ένζυμα λόγω των αυξανόμενων περιβαλλοντικών κανόνων και κανονισμών σχετικά με τη χρήση χημικών ουσιών είναι πιθανό να ενισχύσει την ανάπτυξη της αγοράς βιομηχανικών ενζύμων. Από την άλλη πλευρά, παράγοντες όπως η περιορισμένη θερμοκρασία και το επίπεδο pH των ενζύμων, οι κανονιστικοί περιορισμοί για διάφορες αγορές και ο ανταγωνισμός για πρώτες ύλες αναμένεται να εμποδίσουν την ανάπτυξη της αγοράς.

Η παραπάνω μελέτη αποδεικνύει την αναγκαιότητα της παραγωγής και της χρήσης φυτικών ενζύμων στις βιομηχανίες τροφίμων, καλλυντικών και φαρμάκων καθώς επίσης και τον μεγάλο αντίκτυπο στην παγκόσμια αγορά. Οι βιομηχανίες οι οποίες θα καταφέρουν να εισχωρήσουν στην παγκόσμια αγορά της παραγωγής φυτικών ενζύμων θα επωφεληθούν και θα καταφέρουν να διεκδικήσουν μια εξέχουσα θέση η οποία θα επιφέρει αρκετά πλεονεκτήματα στην βιωσιμότητά τους και τέλος θα ανοίξει νέους δρόμους-ορίζοντες για περεταίρω ανάπτυξη.

Εν κατακλείδι σύμφωνα με την παραπάνω μελέτη σκοπιμότητας προκύπτει το συμπέρασμα ότι η CloudPharm έχει την δυνατότητα να εισχωρήσει με επιτυχία στην παγκόσμια και ιδιαίτερα ανταγωνιστική αγορά των φυτικών ενζύμων με την παραγωγή συμπληρωμάτων διατροφής με εξειδικευμένα προϊόντα βασισμένα στις ιδιότητές τους, τα οποία θα έχουν ως στόχο την αύξηση της αποτελεσματικότητας των φυτοχημικών προϊόντων μέσω διαφορετικών μηχανισμών (π.χ. αύξηση της απορρόφησης των δραστικών συστατικών), όπως προαναφέρθηκε.

5. Βιβλιογραφία

Harboe, M. and Budtz, P. (1999) The production, action and application of rennet and coagulants. In: *Technology of Cheesemaking* (ed. B.A. Law). Sheffield Academic Press, Sheffield, pp. 33–65.

Lomholt, S.B. and Qvist, K.B. (1999) The formation of cheese curd. In: *Technology of Cheesemaking* (ed. B.A. Law). Sheffield Academic Press, Sheffield, pp. 66–98.

Harboe, M. and Budtz, P. (1999) The production, action and application of rennet and coagulants. In: *Technology of Cheesemaking* (ed. B.A. Law). Sheffield Academic Press, Sheffield, pp. 33–65.

Kulp, K. and Ponte, J.G. (1981) Staling of white pan bread: fundamental causes. *CRC Critical Reviews Food Science and Nutrition* 15, 1–48.

Kim, S.K. and D'Appolonia, B.L. (1977b) Bread staling studies II: effect of protein content and storagetemperature on the role of starch. *Cereal Chemistry* 54, 216–224, Schoch, T.J. and French, D. (1947) Studies on bread staling. I: the role of starch. *Cereal Chemistry* 24, 231–249, MacRitchie, F. (1980) *Advances in Cereal Science and Technology III* (ed. Y. Pomeranz). American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN, Chapter 7.

Dragsdorf, R.D. and Varriano-Marston, E. (1980) Bread staling: X-ray diffraction studies on bread supplemented with α -amylases from different sources. *Cereal Chemistry* 57, 310–314, Gerrard, J.A., Every, D., Sutton, K.H. and Gilpin, M.J. (1997) The role of maltodextrins in the staling of bread. *Journal of Cereal Science* 26, 201–209.

. Pan, B.S. (1990) Recovery of shrimp waste for flavourant. In: *Advance in Fisheries Technology and Biotechnology for Increased Profitability* (eds M.N. Voigt and J.R. Botta). Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, PA, pp. 437–452, Haard, N.F. (1992) A review of protolytic enzymes from marine organisms and their application in the food industry. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 1(1), 17–35.

Haard, N.F. (1992) A review of protolytic enzymes from marine organisms and their application in the food industry. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 1(1), 17–35.

Vihelmsson, O. (1997) The isolate of enzyme biotechnology in the fish processing industry. *Trends in Food Science and Technology* 8, 266–270.

Stefansson, G. and Steingrimsdottir, U. (1990) Application of enzymes for fish processing in Iceland –present and future aspects. In: *Advance in Fisheries Technology and*

Biotechnology for Increased Profit(eds M.N. Voigt and J.R. Botta). Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, PA, pp. 237–250.

Fehmerling, G.B. (1973) Separation of edible tissue from edible flesh of marine creatures. United States

Haard, N.F. (1994) Protein hydrolysis in seafoods. In: Seafood Chemistry Processing Technology and Quality (eds F. Shahidi and J.R. Botta). Chapman & Hall, New York, pp. 10–33.

. Raa, J. (1990) Biotechnology in aquaculture and the fish processing industry: a success story in Norway. In: Advance in Fisheries Technology and Biotechnology for Increased Profit (eds M.N. Voigt and J.R.Botta). Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, PA, pp. 509–524.

. Pawar, V.D., Mule, B.D. and Machewad, G.M. (2007) Effect of marination with ginger rhizome extract on properties of raw and cooked chevon. Journal of Muscle Foods 18, 349–369.

Quaglia et al. και Naveena και Mendiratta). Quaglia, G.B., Lombardi, M., Sinesio, F., Bertone, A. and Menesatti, P. (1992) Effect of enzymatic treatment on tenderness characteristics of freeze-dried meat. LWT – Food Science and Technology 25,43–145, Naveena, B.M. and Mendiratta, S.K. (2004) The tenderization of buffalo meat using ginger extract. Journal of Muscle Foods 15, 235–244.

Lawrie, R.A. (1998) Lawrie's Meat Science, 6th edn. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge.

. Ashie, I.N.A., Sorensen, T.L. and Nielsen, P.M. (2002) Effect of papain and a microbial enzyme on proteins and beef tenderness. Journal of Food Science 67, 2138–2142.

Janz, J.A.M., Pietrasik, Z., Aalhus, J.L. and Shand, P.J. (2005) The effects of enzyme and phosphate injections on the quality of beef semitendinosus. Canadian Journal of Animal Science 85, 327–334.

Huerta-Montauti, D., Miller, R.K., Schuehle Pfeiffer, C.E., Pfeiffer, K.D., Nicholson, K.L., Osburn, W.N. and Savell, J.W. (2008) Identifying muscle and processing combinations suitable for use as beef for fajitas. Meat Science 80, 259–271.

Fogle, D.R., Plimpton, R.F., Ockerman, H.W., Jarenback, L. and Persson, T. (1982) Tenderization of beef: effect of enzyme, enzyme level, and cooking method. Journal of Food Science 47, 1113–1118.

Ramezani, R., Aminlari, M. and Fallahi, F. (2003) Effect of chemically modified soy proteins and ficin-tenderized meat on the quality attributes of sausage. *Journal of Food Science* 68, 85–88.

Sugiyama, S., Hirota, A., Okada, C., Yorita, T., Sato, K. and Ohtsuki, K. (2005) Effect of kiwifruit juice on beef collagen. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 51, 27–33., Iizuka, K. and Aishima, T. (1999) Tenderization of beef with pineapple juice monitored by fourier transform infrared spectroscopy and chemometric analysis. *Journal of Food Science* 64, 973–977.

Sim, Y.C.; Nam, Y.S.; Shin, E.; Kim, S.; Chang, I. Proteolytic enzyme conjugated to SC-glucan as transdermal drug penetration enhancer. *Pharmazie* 2003, 58, 252–256.

Pandey, A.; Höfer, R.; Larroche, C.; Taherzadeh, M.; Nampoothiri, M. *Industrial Biorefineries: Industrial Biorefineries and White Biotechnology*, 1st ed.; Elsevier Science: New York, NY, USA, 2015; pp. 608–640

. Wang, Y.; Branicky, R.; Noë, A.; Hekimi, S. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J. Cell Biol.* 2018, 217, 1915–1928.

Levin, E.D. Extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) quenches free radicals and attenuates age-related cognitive decline: Opportunities for novel drug development in aging. *Curr. Alzheimer Res.* 2005, 2, 191–196.

Waites, M.J.; Morgan, N.L.; Rockey, J.S.; Higton, G. *Industrial microbiology: An introduction*, 1st ed.; Blackwell Science: Oxford, UK, 2001; pp. 1–79

Pandey, A.; Höfer, R.; Larroche, C.; Taherzadeh, M.; Nampoothiri, M. *Industrial Biorefineries: Industrial Biorefineries and White Biotechnology*, 1st ed.; Elsevier Science: New York, NY, USA, 2015; pp. 608–640.

Pandey, A.; Höfer, R.; Larroche, C.; Taherzadeh, M.; Nampoothiri, M. *Industrial Biorefineries: Industrial Biorefineries and White Biotechnology*, 1st ed.; Elsevier Science: New York, NY, USA, 2015; pp. 608–640.

McNeil, E.; Melton, D. The good and bad sides of DNA repair: DNA damage in the skin and melanoma. *Biochemist* 2013, 35, 25–29.

Navarrete-Dechent, C.; Molgó, M. The use of a sunscreen containing DNA-photolyase in the treatment of patients with field cancerization and multiple actinic keratoses: A case-series. *Dermatol. Online J.* 2017, 23, 18.

Marizcurrena, J.J.; Martínez-López, W.; Ma, H.; Lamparter, T.; Castro-Sowinski, S. A highly efficient and cost-effective recombinant production of a bacterial photolyase from the Antarctic isolate *Hymenobacter* sp. UV11. *Extremophiles* 2019, 23, 49–57

Cruz M, Cruz M, Martins B, Corvo L, Gaspar M, Maria E, et al. Enzimas em medicamentos e diagnósticos. *Enzimas Em Biotecnol. Produção Apl. E Merc., Interciencia*; 2008, p. 305–29.

Janeš D, Kočevár Glavač N. *Modern Cosmetics, Ingredients of Natural Origin, A Scientific View*, Volume 1. 1st ed. Velenje: Širimo dobro besedo; 2018. <https://moderncosmethics.com/product/modern-cosmet>, Gomes RK, Damazio MG. *Cosmetologia: descomplicando os princípios ativos*. 4th ed. São Paulo: LMP; 2013.

. Monteiro VN, Silva R do N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. *Rev Process Quím.* 2009;3:9–23

Packianathan N, Kandasamy R. Skin Care with Herbal Exfoliants. *Funct Plant Sci Biotechnol.* 2011;5:94–7.

Ferreira AM, Oliveira KA, Vieira LC, Rol JL. Revisão de estudos clínicos de enfermagem: utilização de papaína para o tratamento de feridas. *Rev Enferm UERJ.* 2005;13:382–9.

Merck. Papain . Darmstadt: Merck KGaA; 2021 [cited 2021 Sept 18]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/PT/en/technical-documents/technical-article/research-and-disease-areas/metabolism-research/papain>

.Mitchel RE, Chaiken IM, Smith EL. The complete amino acid sequence of papain. Additions and corrections. *J Biol Chem.* 1970;245:3485–92.

Amid A, Ismail NA, Yusof F, Salleh HM. Expression, purification, and characterization of a recombinant stem bromelain from *Ananas comosus*. *Process Biochem.* 2011;46:2232–9, . Ferreira JF, Santana JCC, Tambourgi EB.

.Arshad ZIM, Amid A, Yusof F, Jaswir I, Ahmad K, Loke SP. Bromelain: an overview of industrial application and purification strategies. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014;98:7283–97

.Abbas S, Shanbhag T, Kothare A. Applications of bromelain from pineapple waste towards acne. *Saudi J Biol Sci.* 2021;28:1001–9, Ozlen S. Cosmetic composition containing alpha hydroxy acids, salicylic acid, and enzyme mixture of bromelain and papain. *Biotechnol Adv.* 1996;4:562.

Baeyens-Volant D, Matagne A, El Mahyaoui R, Wattiez R, Azarkan M. A novel form of ficin from *Ficus carica* latex: Purification and characterization. *Phytochemistry*. 2015;117:154–67

. Cho UM, Choi DH, Yoo DS, Park SJ, Hwang HS. Inhibitory Effect of Ficin Derived from Fig Latex on Inflammation and Melanin Production in Skin Cells. *Biotechnol Bioprocess Eng*. 2019;24:288–97

Saxena, R. K., Malhotra, B., and Batra, A. (2004) *Handbook of Fungal Biotechnology*. pp. 287–297, Marcel Dekker, Inc. New York. Saxena, R. K., Agarwal, L., and Meghwanshi, G. K. Eds. (2006) *Microbial Diversity: Current Perspectives and Potential Applications*. pp. 791–814, I.K. International Pvt. Ltd, J Patel, A. K., Singhania, R. R., Pandey, A., Eds. (2017) *Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications* pp. 13–41, Academic Press Books.

Shang, Q. H., Ma, X. K., Li, M., Zhang, L. H., Piao, X. S. (2018) *Feed Sci. Technol*. 236, 48-56.

Enzymes Market Estimates and Forecasts To 2030 ©Grand View Research, Inc., USA. All Rights Reserved

Enzymes Market Size, Share & Trends Analysis Report By Product (Lipases, Polymerases & Nucleases, Carbohydrase), By Type (Industrial, Specialty), By Source (Plants, Animals), By Region, And Segment Forecasts, 2022 – 2030

<https://www.polarismarketresearch.com/industry-analysis/industrial-enzymes-market>

<https://www.globenewswire.com/en/news-release/2022/08/03/2491516/0/en/By-2028-Size-of-Global-Enzymes-Market-to-Hit-12167-9-Million-Exhibit-a-CAGR-of-6-10-Growth-Comprehensive-Research-Report-by-Facts-Factors.html>

<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/enzymes-industry>