



Enzimológia

Proteáz enzimek

Fehér Anikó
Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

2019.11.12.





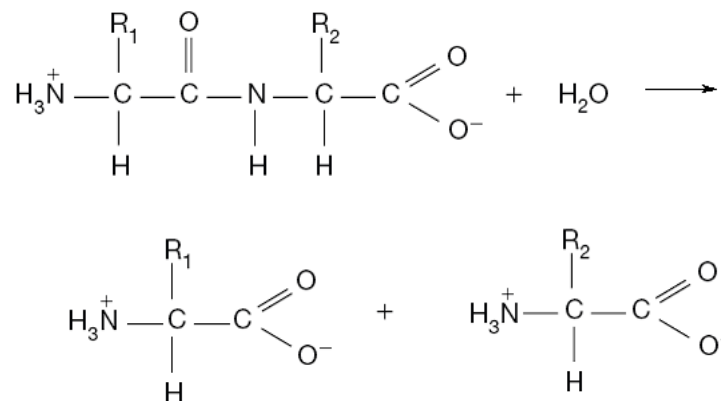
Proteáz enzimek

Enzimek

- fehérjék lebontása
- peptid kötések hidrolízise

Fontosságuk

- a génállomány kb. 2%-a minden organizmusban (növény, állat)
- sok biológiai folyamatban
 - élelmiszerfehérjék **emésztése**
 - *Pepszin, Tripszin*
 - intracelluláris fehérjék újrahasznosítása
 - véralvadás
 - fehérjék aktiválása





Csoportosításuk

A hasítás helye / By type of reaction catalyzed

- Exopeptidázok / exopeptidases
- Endopeptidázok / endopeptidases

Az aktív helyen levő aminosav szerint / Catalytic site (Standard classification)

- Szerin proteázok / Serine proteases
- Aszpartát proteázok / Aspartate proteases
- Cisztein proteázok / Cysteine proteases
- Metalloproteázok / Metalloproteases
- Treonin proteázok / Threonine proteases (1995-)
- Glutaminsav proteázok / Glutamic acid proteases (2004-)

Termelő szervezetek szerint / Occurance

- gomba eredetű / fungal
- bakteriális eredetű / bacterial

Optimális pH tartomány / By optimal pH

- savas / acid
- semleges / neutral
- lúgos / basic



Endopeptidázok

Endopeptidázok / endopeptidas

- fehérjén vagy hosszú polipeptid láncokon aktívak
- láncközben, az N- vagy C-terminálistól távol hasítanak
- pl. kimotripszin, pepszin, papain
- a hidrolízis lehet **limitált** (csak jól definiált helyen történik) (pl: emésztőenzimek) előalakkként, zimogén formában szintetizálódnak, szignál peptidek levágása után, aktiválás poszttranszlációs módosítással
- élelem fehérjetartalmának bontása
- új N- és C-terminális létrehozása, melyeken az exopeptidázok hatnak szinergizmus a két enzimescsoport között
- néhányuk a láncvégtől meghatározott távolságra hasít
pl. oktapeptid hasítása az N-terminálistól

Oligopeptidázok / Oligopeptidas

- csak rövidebb peptidláncon aktívak



Exopeptidázok

Exopeptidázok / exopeptidases

- ált. rövidebb peptidláncokon aktívak
- szabad N-terminális **amino-csoporton** aktívak
- szabad C-terminális **karboxil-csoporton** aktívak
- mindkettőn
- max. 3 aminosav-maradékot hidrolizálnak le a végről
- további felosztásuk aszerint, hogy N/C végről, ill. 1/2/3 AS-at vágnak le: amino-, karboxi-, dipeptidil-, peptidil-dipeptidázok, tripeptidil-peptidázok, dipeptidázok

-peptidáz	db aminosav lehasítása	N/C-terminálisról	Megjegyzés
Amino-	1	N	
Karboxi-	1	C	főleg fehérjék érésében játszanak szerepet
Dipeptidil-	2 (dipeptid)	N	polipeptidről
Peptidil-di- / Dipeptidil-karboxi-	2 (dipeptid)	C	oligopeptidekről
Tripeptidil-	3 (tripeptid)	N	oligopeptidekről
Di-	1-1	N+C	dipeptid hasítása, ha a C- és az N-terminális is szabad

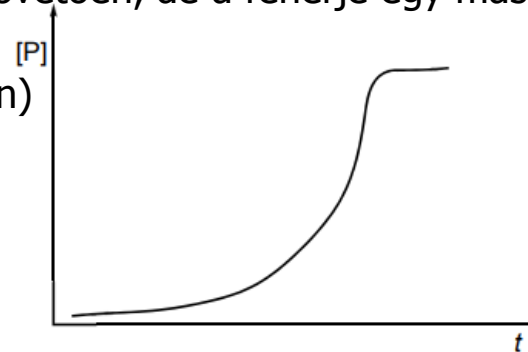


Pepszin, Tripszin

Limitált hidrolízis

▪ Pepszin

- Az aktív centrum kialakul a szintézist követően, de a fehérje egy másik része **lefedi**
- Gyomorban termelődik (Gastrin hormon)
- Pepszinogénből autokatalízissel
- Savas közegben működik



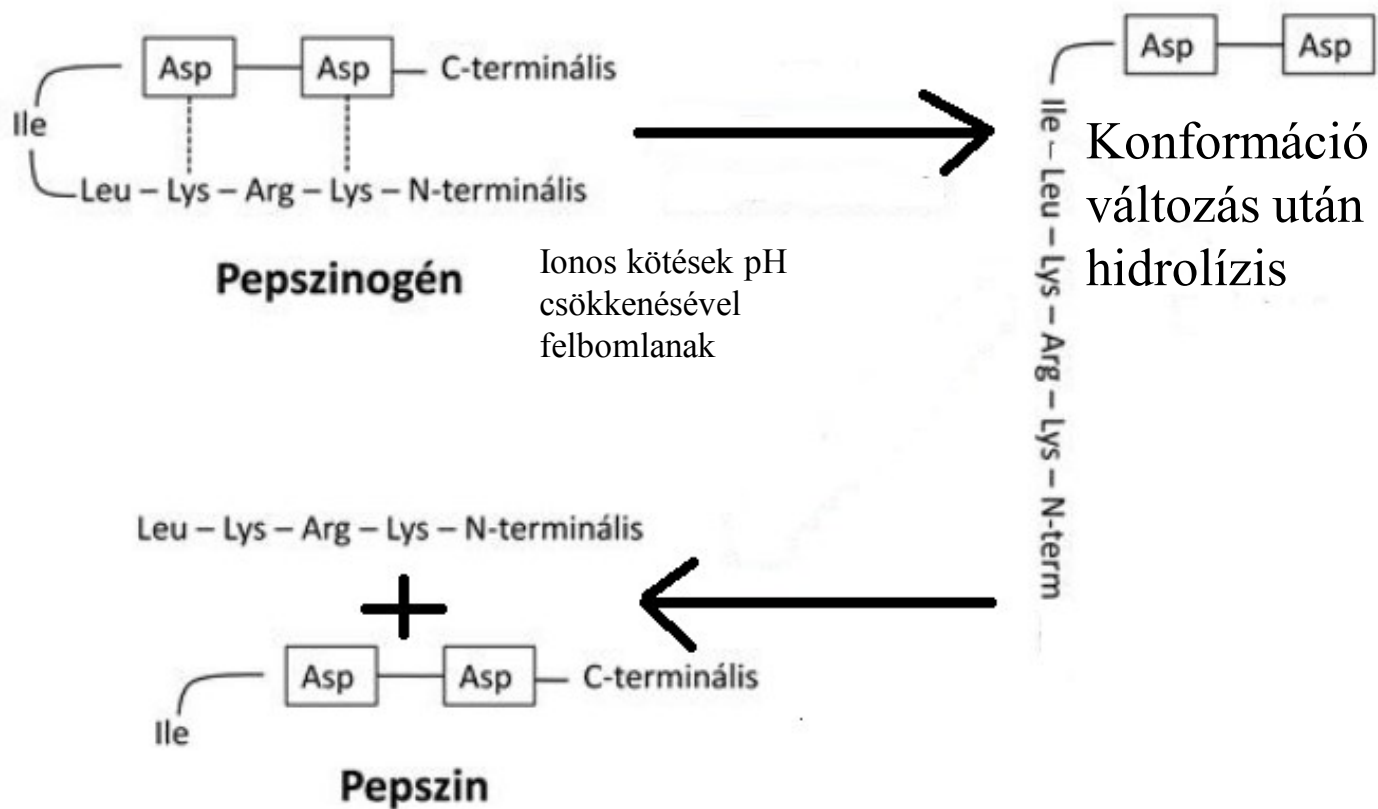
▪ Tripszin

- Az aktív centrum csak a limitált proteolízist követő **szerkezetváltozás** kapcsán alakul ki
- Hasnyálmirigyben termelődik
- Hormon hatására a vékonybélbe ürül
- Enyhén bázikus közegben működik (bélrendszer)
- Autokatalízis kimotripszinből
- Több más emésztőenzim aktiválásában is részt vesz

A termék koncentrációjának változása az idő függvényében egy autokatalitikus folyamatban



Pepszin



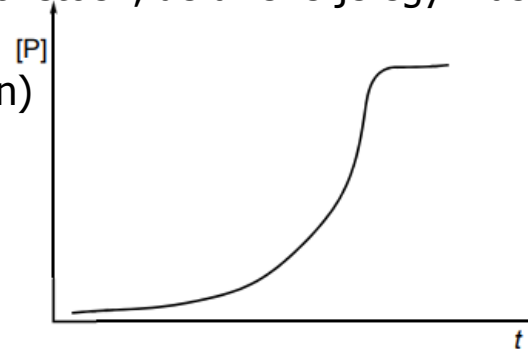


Pepszin, Tripszin

Limitált hidrolízis

▪ Pepszin

- Az aktív centrum kialakul a szintézist követően, de a fehérje egy másik része **lefedi**
- Gyomorban termelődik (Gastrin hormon)
- Pepszinogénből autokatalízissel
- Savas közegben működik



▪ Tripszin

- Az aktív centrum csak a limitált proteolízist követő **szerkezetváltozás** kapcsán alakul ki
- Hasnyálmirigyben termelődik
- Hormon hatására a vékonybélbe ürül
- Enyhén bázikus közegben működik (bélrendszer)
- Autokatalízis kimotripszinből
- Több más emésztőenzim aktiválásában is részt vesz

A termék koncentrációjának változása az idő függvényében egy autokatalitikus folyamatban



Serin-proteáz

Kimotripszin

- Kimotripszin hogyan katalizálja a peptid kötés hidrolízisét?

2 főszakasz

Acilezés: kovalens enzim-szubsztárt köztitermék, acil-szerin

Deacilezés: acil-szerin hidrolízissel bomlik

- Enzimen: Szubsztrátkötő zseb
 - Aktív hely
- Katalitikus triád
 - Ser, His, Asp



Serin-proteáz

Kimotripszin

- <https://www.youtube.com/watch?v=6kYpu1eZZHs>

Acilezés

- 1. lépés: - Szubsztrátkötő zseb megköti a szubsztrátot
 - Peptid optimális helyzetben
 - Peptid C-atomja közel kerül a Ser OH csoport oxigénjéhez (Michaelis komplex)
- 2. lépés: - His protont von el a Ser oldalláncától → Ser aktivált állapotban
 - Ser támadja a szubsztrát karboxil csoportját
 - Eredmény egy tetraédes átmeneti állapot
- 3. lépés: - His protonálja az első termék távozó csoportját, C-terminális felé eső rész távozik
 - N-terminális felé eső rész észter kötésen keresztül kovalensen kötve marad, intermedier: acilenzim

Deacilezés

- 4. lépés: - His H-híd víz molekulával, víz molekula nukleofil támadást az acilenzim karboxil C-atomja ellen → tetraédes átmeneti állapot
- 5. lépés: - His víztől elvett protonnal H-hidat alakít ki a Ser O-val
- 6. lépés: - Második termék távozik, enzim eredeti állapotába kerül



Növényi proteázok

Papain

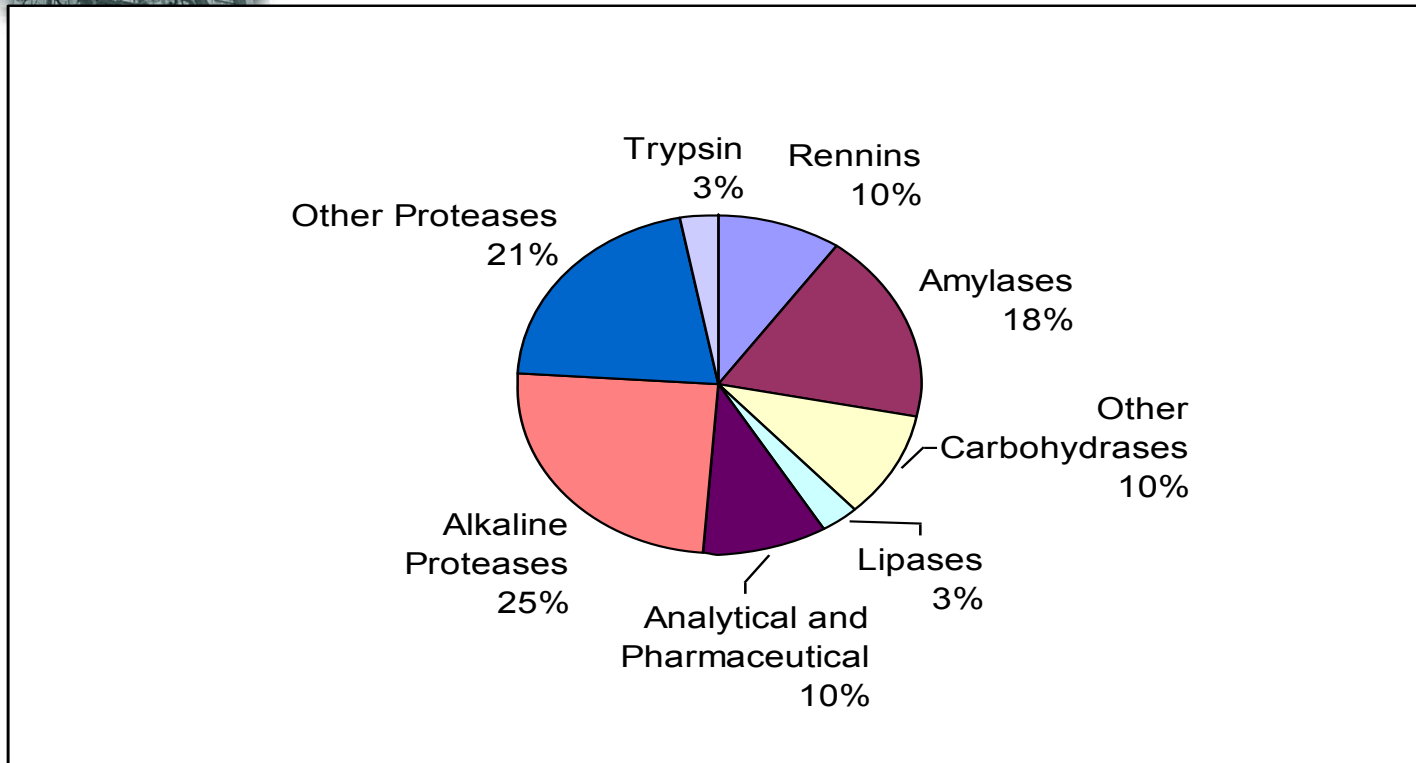
- a papajában (*Carica papaya*) található
- cisztein-proteáz
- hatékonyságát nem befolyásolja a tápcsatorna adott szakaszának kémhatása
- **Hatása:** gyulladáscsökkentő
 - fogkrémekben, fogfehérítőkben
 - rák elleni kezelések kiegészítéséhez
 - cukorbetegség szövődményei ellen
 - csökkenti a reumás artritisz okozta gyulladásokat és fájdalmakat
 - megtisztítja a bélfalakat

Bromelin

- az ananász (*Ananas comosus*) a Broméliafélek családjába tartozik, termése és szára tartalmazza
- 1950-es évek óta használják különböző terápiás célokra
- Németo.-ban a 13. leginkább alkalmazott gyógynövény hatóanyag
- **Hatása:** segíti a fehérjeemésztést
 - gyorsítja az izmok regenerációját
 - gyulladáscsökkentő
 - probiotikus (élettanilag hasznos) hatást fejt ki



Ipari enzimek



Ipari léptékben mikrobákkal, vagy mikrobákba klónozott állati enzim génnel (rennin) állítják elő



Felhasználás /1

Mosószeripar

- a mosószerek **70-80%-a tartalmaz proteázokat** ⇒ termelési mennyiségüket tekintve a legjelentősebb enzimcsoport

Sajtgyártás

- legkorábbi proteáz felhasználás

Bőrgyártás, cserzés

- szőrők eltávolítására, rugalmasság fokozására
- semleges kémhatás mellett aktív proteázok
- Bacillus, Pseudomonas, Streptomyces baktériumok és Aspergillus gombák enzimei

Gyógyászat

- gyógyszerekben: bélparaziták elpusztítására (Aspergillus oryzae proteázok)
- elhalt bőr eltávolítására égési sérülést követően (Subtilizin)
- vércsoport meghatározásban
- hátfájás enyhítésére (porctartalom csökkentése a csigolyák között)
- Leukémia: aszparagin eltávolítása a véráramból (E.coliból izolált proteáz)



Felhasználás /2

Reagens

- laboratóriumi részleges fehérje-lebontás
- peptidok előállítása fehérje szekvenáláshoz

Állati takarmányok

- kisállateledelek ízének fokozására
- gomba eredetű savas proteázok

Söripar

- *Bacillus subtilis*
- Árpából peptid felszabadítás, nitrogén forrás, jobban növekszik az élesztő
- Csapadékképződés megakadályozása a hűtés során

Rizspálinka (szaké)

- rizsalapú SSF eljárás proteáz, amiláz és egyéb enzimek előállításához (koji)
- ezzel hidrolizálják a rizst, majd élesztővel erjesztik → szaké (rizsbor, -pálinka)



Fehérje hidrolizátumok

- Pl.: anyatej-helyettesítő tápszer, táplálék kiegészítők
 - Gond: keserű íz (hidrofób aminosavak okozzák)
 - mo.: szelektív elválasztás, izoelektromos kicsapás, alkoholos extrakció, kromatográfia, keserű íz elfedése
- Szója, hal, savó hidrolizátum

Egyéb

- húspuhítás (papain, bromelin)
- kontakt lencse tisztító folyadékban



Miért van enzim a tisztítószerekben?

- hatékonyság fokozása
- környezetbarát termék – kevesebb hatóanyagra van szükség
- alacsonyabb mosási hőmérséklet

Mióta?

- **1913:** első szabadalom, emésztő enzim tartalmú előáztató termékre
- hamarosan: proteáz-, amiláz-, lipáztartalmú kereskedelmi termék
- 1963: „Alcalase” (Novo Industry, Dánia) bakteriális proteáz termelés (fermentáció) tisztítószerekbe
- később detergens amilázok termelése
- 1988: „Lipolase” (Novo Nordisk A/S, Dánia) detergens lipáz termelés
- 1980-90-es évek: detergens cellulázok elterjedése



Tisztítószer

Mit csinálnak?

- proteáz: a fehérje-alapú szennyeződések ellen (pl. vér, fű, étel)
- amiláz: keményítő-alapú szennyezők lebontása (étel)
- lipáz: a zsíros, olajos szennyeződések bontása (étel, emberi zsíros/olajos váladékok)
- celluláz: pamutruházat mosás és viselés → bolyhok, lebontásuk → élénkebb szín, puhaság

Milyen formában?

- granulátum
belső mag: enzim + szerves sók + kötőanyag + cellulóz rostok (erős, de rugalmas)
viasz bevonat → kopás miatt ne jusson ki az enzim por
inert bevonat színezékekkel
- folyékony
könnyen elegyedik vizes detergenssekkel
vizes enzim oldat + propilén-glikol + más stabilizálók



Proteázok a mosószerekben

- ma: Bacillus eredetű szerin proteázok
sokuk szubtilizin enzim (pl. Alcalase)
Szubtilizin: szerin-endopeptidáz, először *Bacillus subtilis*-ből izolálták
sok Bacillus faj nagy mennyiségben termeli
- hőmérséklet optimumuk 60°C körül (ált. >80% aktivitás 55-65°C)
- lúgos proteázok
„Alcalase” (Novozymes) pH opt. pH 8-9 (>80% aktivitás pH 7-11)
„Esperase” (Novozymes) pH opt. pH 9-10 (>80% aktivitás pH 8-12)



Mosószeripar

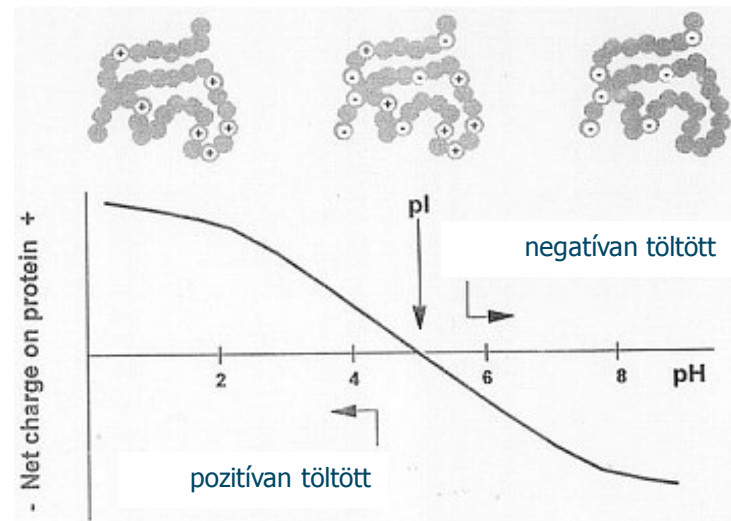
enzymes for laundry

Proteázok a mosószerekben

- pH optimumuk kb. = pI értékük

pI: izoelektromos pont, az a pH, ahol a fehérje kifelé neutrális, azaz töltést nem mutat

(egyenlő kis mennyiségben jelen van a kationos és anionos forma is)





Mosószeripar

ORGANISM	SOURCE OF ISOLATION	OPTIMUM PH	OPTIMUM TEMPERATURE	REFERENCE
<i>Bacillus firmus</i> 7728	Soil samples taken from leather factories	9	40°C	7
<i>Bacillus licheniformis</i> YP1A	Crude oil contaminated soil	9.5	60°C	8
<i>Bacillus megaterium</i>	Fermented broth of Thai fish sauce	10	50°C	9
<i>Bacillus clausii</i> I-52	Heavily polluted tidal mud flat	~ 11	60°C	10
<i>Micrococcus</i> sp.	Marine sediment samples	10	50°C	11
<i>Bacillus</i> sp. SSR1	Soil	10	-	12
<i>Bacillus pumilus</i> MK6-5.	Soda soil sample	11.5	55–60°C	13
<i>Bacillus horikoshii</i>	Body fluid of the polychaeta, <i>Periserrula leucophryna</i>	9	Around 45°C	14
<i>Bacillus</i> sp. B001	Compost	10	60°C	15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MN1	Tannery waste water	8	60°C	16
<i>Serratia liquefaciens</i>	Raw milk	8	-	17
<i>Bacillus</i> sp	Soil	9	40°C	18
<i>Bacillus</i> sp	Different wastes	8	50°C	19
<i>Virgibacillus pantothenicus</i> (MTCC 6729)	Chicken meat samples	10	50°C	20
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain SK	Slaughter house soil samples	9	40°C	21
<i>Bacillus amovivorus</i>	Degraded pulse	8.5	37°C	22
<i>Elizabethkingia meningoseptica</i> KB042	Decomposing feather samples	10	60°C	23
<i>Halobacterium</i> sp.	Soil	10	37°C	24
<i>Bacillus cereus</i> RS3	Desert soil	9	45°C	25



Mosószeripar

Table 2. Optimum pH and Temperature Required for the Production of Alkaline Protease Isolated from Different Fungal Species

ORGANISM	SOURCE	OPTIMUM PH	OPTIMUM TEMPERATURE	REFERENCE
<i>Streptomyces sp. CN902</i>	Soil	9	45°C	26
<i>Myceliophora sp.</i>	-	9	40–45°C	27
<i>Penicillium sp</i>	Soil	9	45°C	28
<i>Streptomyces fungicidicus</i> MML1614	Marine samples	9	40°C	29
<i>A. oryzae</i> CH93	-	8	50°C	30
<i>Aspergillus niger</i>	Soil	8	30°C	31
<i>Aspergillus clavatus</i>	-	9.5	40°C	32
<i>Actinomycete</i> MA1-1	Marine sediment	9	50°C	32
<i>Aspergillus parasiticus</i>	-	8	40°C	33
<i>Aspergillus terreus gr.</i>	Potato grown soil fields	11	50°C	34
<i>Aspergillus nidulans</i> HA-10	Poultry farm soil	8	35°C	35
<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	-	10	50°C	36

Sharma et. al: A Review on Microbial Alkaline Protease: An Essential Tool for Various Industrial Approaches (2019)



Milyen legyen a detergens proteáz?

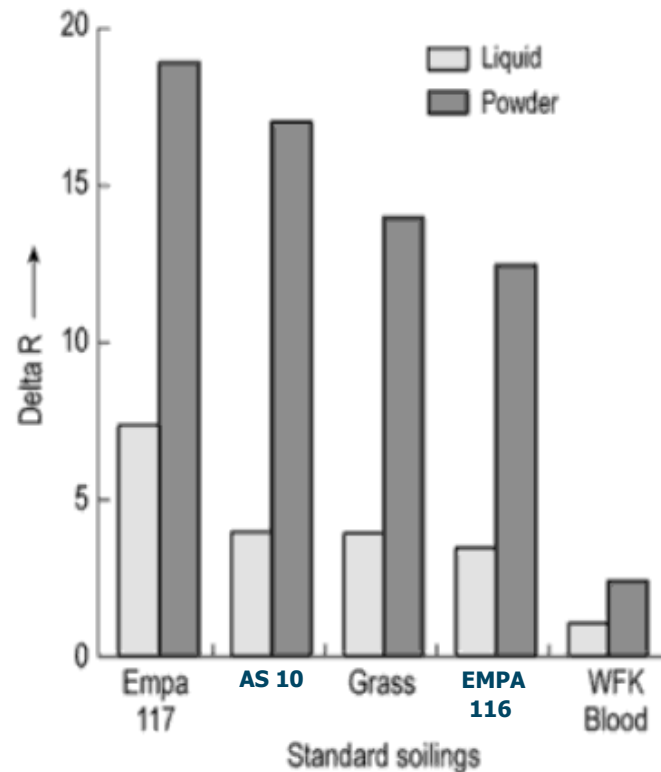
- kompatibilis a detergensekkel
- nagy aktivitása legyen a mosási hőmérsékleten és pH-n
laboratóriumi analitikai adatok nem feltétlenül mérvadóak
(standard proteáz aktivitás mérések)
- folyékony detergensok → kis ionerősség
mosóporok → nagy ionerősség
az optimális ionerősség enzimfüggő, tesztelni kell

Hogyan tesztelik?

- valós mosási próbák mosógépek kisméretű modelljeiben
- szennyezett szöveten (tej, vér, fű)
- értékelés: vizuálisan vagy fényvisszaverés vizsgálattal



Mosószeripar



Savinase (proteáz) eredményei
Delta R: fényvisszaverés különbség
az enzimentes kontrollhoz
képest a mosás után

Figure 56. Stain removal performance of a U.S. liquid detergent (0.4 % Savinase 16L) and a U.S. powder detergent (0.8 % Savinase 8.0T) on different standard soiling in a Terg-o-tometer operating at 6°dH water hardness, 20°C, 10 min. EMPA 117 (milk, blood, and ink on polyester/cotton); AS 10 (milk, oil, and pigments on 100 % cotton); grass (on 100 % cotton); EMPA 116 (milk, blood, and ink on 100 % cotton); WFK blood soiling (on 100 % cotton). Source: Novozymes.

Wolfgang Aehle (ed.) Enzymes in industry: production and applications, 2004





Mosószeripar

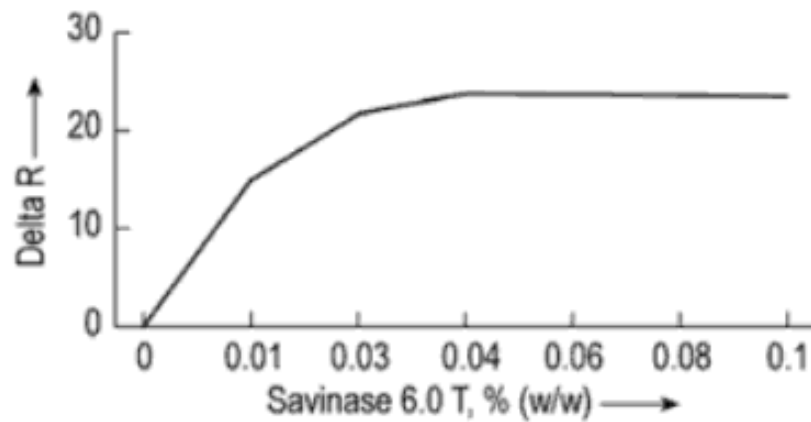


Figure 55. Example of a dose response curve for Savinase 6.0 T protease (Novozymes) in a powder detergent, 4 g/L in a Launder-o-meter test at 60 °C for 40 min. Source: Novozymes.

Milyen dózisban kell alkalmazni az enzimet?

Wolfgang Aehle (ed.) Enzymes in industry: production and applications, 2004



Mosószeripar

A mosószerben **csökkenhet az enzim aktivitása**, mert történhet

- **denaturáció**

magas hőmérséklet és/vagy más komponensek (pl. anionok) →
szerkezet megbomlása

- **kémiai reakció**

lúgos közegben → fehérjelánc vagy a meghatározó AS szakasz
hidrolízise

oxidáló vegyületek (fehérítők) → a meghatározó AS szakasz
oxidációja

(detergens enzimek oxidációra való érzékenysége: amiláz > proteáz
> lipáz)

- **proteolízis**

az enzim, mint fehérje bomlása proteáz hatására



Enzim stabilitás a tárolás során

- folyékony mosószer
más komponensek közvetlen hatása
felületaktív anyagok: anionos → denaturál, nem-ionos → semleges vagy stabilizál proteolízis
- granulátum
a belül levő enzim „el van zárva” a környezettől
tárolási hőmérséklet, páratartalom, fehérítő jelenléte → hatás az enzim stabilitására
instabil fehérítő komponens → szabad aktív oxigén → enzim oxidációja
- stabilizálás (a proteolízis sebességének csökkentése)
Ca²⁺ adalék (kis mennyiségben, 100-1000 ppm)
víztartalom (<50%), víz helyett propilén-glikol (vagy etanol, vagy izopropanol)
reverzibilis proteáz inhibitor: inhibeál, de a mosás során felhígul (borátok, glicin)



Enzim stabilitás a mosás során függ:

- mosószer összetétele, dózisa (pl. anionos felületaktív anyagok)
- pH
- ionerősség
- mosás hőmérséklete
- mosás időtartama
- mechanikai hatás
- vízkeménység
- szennyeződés mértéke
- textília minősége



Proteázok alkalmazása

- a tejfehérje, a kazein kicsapásához
kazein: a tej fő foszfoproteinje ($\alpha S1$, β , γ , κ)
tehéntej és sajt fehérjetartalmának kb. 80%-a
hidrofil része: κ -kazein
hő hatására nem csapódik ki, de sav vagy proteáz hatására igen
proteáz \rightarrow para- κ -kazein és glikopeptid \rightarrow instabil micella,
csomósodás, melyhez szabad Ca^{2+} is szükséges
- legkorábbi proteáz felhasználás
valószínűleg arab nomádok véletlenszerű felfedezése
„kereskedelmi” enzimként először **1874, Dánia**



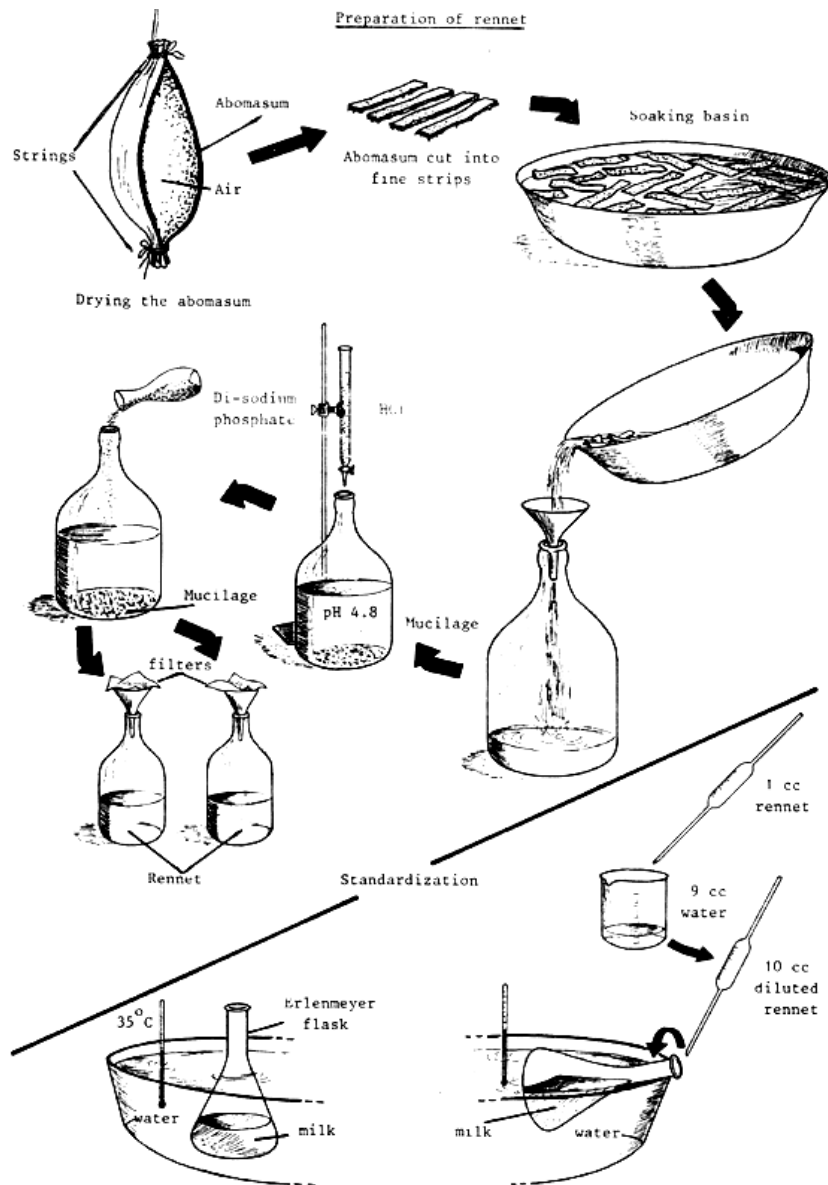
Proteázok alkalmazása

- tejet koaguláló rennin típusú proteázok
fiatal emlősök gyomrában természetes enzimkeverék az anyatej emésztéséhez
(az íz kialakításában lipázok is részt vesznek, beállítva a jellemző szabad zsírsav arányokat)
- rennin
másnéven: kimozin
savas aszpartát proteáz (optimális pH ~5,2)
kb. 40 000 Da



Honnan nyerhetőek a koaguláló enzimek?

- gyomorból
 - borjú
 - bárány
 - kecskegida
- mikrobiális eredetű
 - gomba eredetű savas proteázok (pl. Mucor fajok)
 - genetikai módosítással baktérium/gomba által szarvasmarha rennin termelése rekombináns *E. colival*, *Aspergillus nigerrel*, *Kluyveromyces lactisszal*
- növényi levek a tej alvasztásának elősegítésére (pl. fikain, mely cisztein endopeptidáz fügeből)



Borjú rennin kinyerése

Production of natural calf rennet

Hagyományos úton

ma már csak a hagyományos módon készült sajtok eá.-nál Európában:

Svájc, Franciaó., Ausztria, Románia

- borjú gyomor (4. rész, oltógyomor) (borjúhús eá. mellékterméke)
 - tisztítása
 - szárítása
 - feldarabolása
- áztatás 1/2 - néhány napig
 - sós vízben
 - + ecet / bor → pH ↓
- szűrés → rennin az oldatban
- 1 g rennin oldat 2-4 l tejhez





Borjú rennin kinyerése

Production of natural calf rennet

Mai előállítás

- borjú gyomor
 - mélyfagyasztása
 - őrlése
- enzim extrakció
- sav → aktív E forma
- semlegesítés
- szűrés
- koncentrálás
- 1 g rennin oldat 15 l tejhez

1000 g rennin oldatban

- 0.7 g aktív enzim, 0.5-1% Na-benzoát tartósító



Alternatív rennin források

Alternative sources of rennet

Mikrobiális rennin / Microbial rennet

- néhány penész pl. *Rhizomucor miehei* termel
 - fermentáció
 - koncentráálás, tisztítás
- a sajt hajlamos kissé keserű ízűvé válni
nem specifikus proteázok miatt → peptid bomlástermékek
megoldás: peptidáz (pl. Accelase)
- Mucor fajok,
 - Aspergillus,
 - Thermomyces,
 - Humicola gombák



Alternatív rennin források

Alternative sources of rennet

Genetikai módosítással termelt rennin / Genetically engineered rennet

Tehén rennin génje

- baktériumba
- gombába (ma jellemzően *Aspergillus niger*-rel termeltetik)

2008 USA, Nagy-Britannia

kereskedelemben kapható sajtok 80-90%-a GM renninnel előállított

A GM rennin a természetes rennin változatok közül csak egyet tartalmaz (A vagy B), így analitikai úton megállapítható, hogy milyen módon állították elő a sajtot

Gyakran GM rennin és természetes pepszin keverékét használják a kapott illat és íz közelebb áll a hagyományos módon készített sajtéhoz



Alternatív rennin források

Alternative sources of rennet

Növényi rennin / Vegetable rennet

- görögök füge-kivonatot használtak (Homérosz Íliász)
- csalán
- bogáncs (mediterrán területeken hagyományos)
- mályva
- borostyán

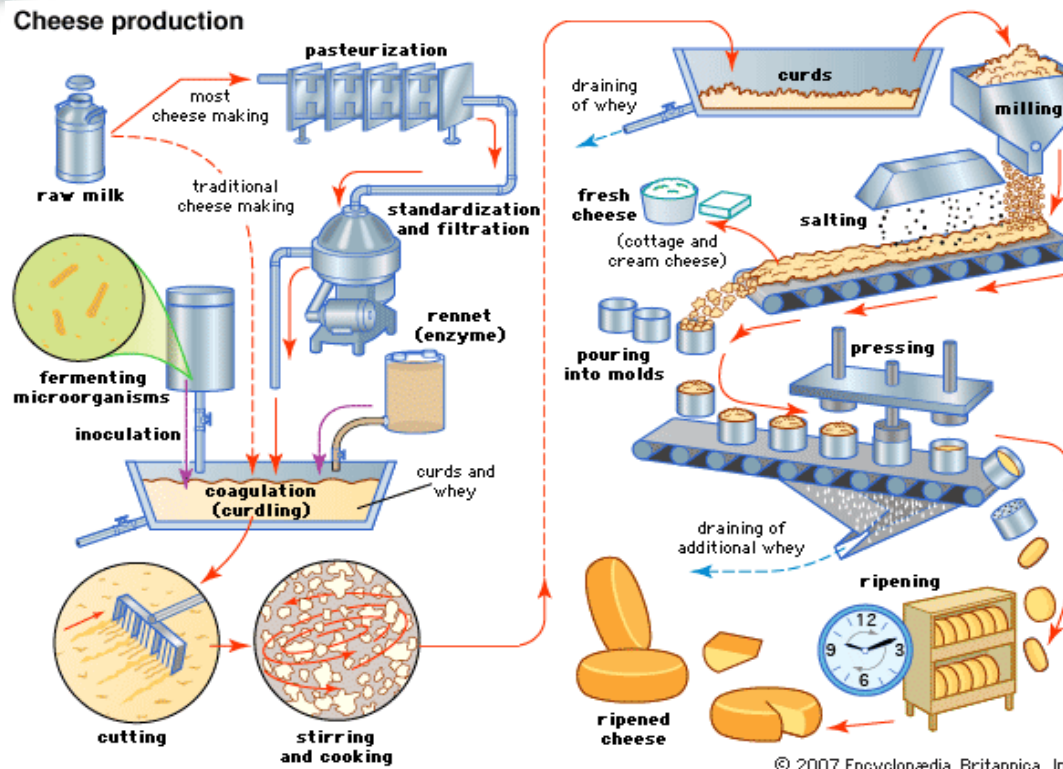
nincs ipari méretű termelés

a kereskedelmi „növényi” rennin: Mucor penész által termelt mikrobiális rennin



Sajtgyártás

Cheese making



- <http://www.pointernet.pds.hu/ujsagok/agraragazat/2006/10/20070122182226695000000382.html>

