



## Enzimológia Proteáz enzimek

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

2019.11.12.



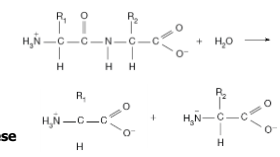
## Proteáz enzimek

### Enzimek

- fehérjék lebontása
- peptid kötések hidrolízise

### Fontosságuk

- a génállomány kb. 2%-a minden szervezetben (növény, állat)
- sok biológiai folyamatban
  - élelmiszerfehérjék **emésztése**
    - Pepszin, Tripszin*
  - intracelluláris fehérjék újrahasonosítása
  - 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 / Occurrence

- gomba eredetű / fungal
- bakteriális eredetű / bacterial

### Optimális pH tartomány / By optimal pH

- savas / acid
- semleges / neutral

### Ígus / basic



## Endopeptidázok

### Endopeptidázok / endopeptidases

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

### Oligopeptidázok / Oligopeptidases

- csak rövidebb peptidláncokon 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

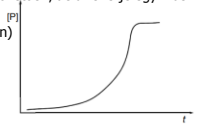
peptidáz	db aminosav lehasítása	N/C-terminálisról	Megjegyzés
Amino-	1	N	
Karboxi-	1	C	főleg fehérjék érésben játszanak szerepet
Dipeptidil-	2 (dipeptid)	N	polipeptidról
Peptidil-di- / Dipeptidil-karboxi-	2 (dipeptid)	C	oligopeptidről
Tripeptidil-	3 (tripeptid)	N	oligopeptidről
Di-	1-1	N+C	dipeptid hasítása, 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 **lefelel**
- Gyomorban termelődik (Gastrin hormon)
- Pepszinogénből autokatalízissel
- Savas közegben működik



### Tripszin

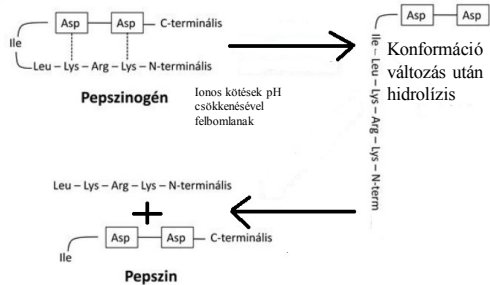
- Az aktív centrum csak a limitált proteolízist követő **szerkezetváltozáskapcsán** alakul ki
- Hasnyálmirigyben termelődik
- Hormon hatására a vékonybélbe ürül
- Enyhén bázikus közegben működik (bélrendszer)
- Autokatalízis kimotripszinből
- Több más emésztőenzim aktiválásában is részt vesz

A termék koncentrációjának változása az idő függvényében egy autokatalitikus folyamatban





## Pepszin



2010 Enzimológia – Proteáz enzimek

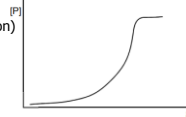
7



## Pepszin, Tripszin

Limitált hidrolízis

- Pepszin**
  - Az aktív centrum kialakul a szintézist követően, de a fehérje egy másik része **lefedti**
  - 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

2010 Enzimológia – Proteáz enzimek

8



## Serin-proteáz

Kimotripszin

- Kimotripszin hogyan katalizálja a peptid kötés hidrolízisét?
- 2 főszakasz**
  - Acilezés: kovalens enzim-szubstrát köztitermék, acil-serin
  - Deacilezés: acil-serin hidrolízissel bomlik
- Enzimen: Szubsztrátkötő zseb
  - Aktív hely
- Katalitikus triád
  - Ser, His, Asp

2010 Enzimológia – Proteáz enzimek

9



## 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 protonot von el a Ser oldalláncától → Ser aktivált állapotban
  - Ser támadja a szubsztrát karboxil csoportját
  - Eredmény egy tetraéderes 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-hid víz molekulával, víz molekula nukleofil támadást ad acilenzim karboxil C-atomja ellen → tetraéderes 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

2010 Enzimológia – Proteáz enzimek

10



## Növényi proteázok

### Papain

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

### Bromelin

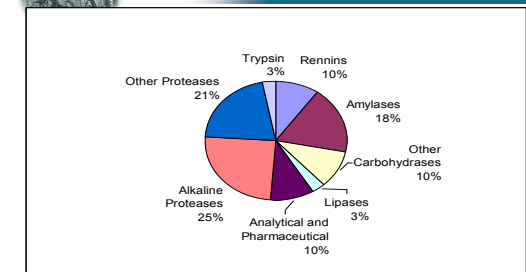
- az ananász (*Ananas comosus*) a Broméliafélék családjába tartozik, termése és szára tartalmazza
- 1950-es évek óta használják különböző terápiás célokra
- Németo.-ban a 13. leginkább alkalmazott gyógynövény hatóanyag
- Hatása:** segíti a fehérjeemésztést
  - gyorsítja az izmok regenerációját
  - gyulladáscsökkentő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

2010 Enzimológia – Proteáz enzimek

11



## Ipari enzimek



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

2010 Enzimológia – Proteáz enzimek

12



## Felhasználás /1

### Mosószeripar

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

### Sajtgyártás

- legkorábbi proteáz felhasználás

### Bőrgyártás, cserzés

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

### Gyógyászat

- gyógyszerekben: bélpaszták 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)

Enzimológia – Proteáz enzimek

13



## Felhasználás /2

### Reagens

- laboratóriumi részleges fehérje-lebontás
- peptidek előállítására 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)

Enzimológia – Proteáz enzimek

14



## Felhasználás /3

### 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 folyadékokban

2010 Enzimológia – Proteáz enzimek

15



## Tisztítószer

### Miért van enzim a tisztítószerekben?

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

### Mióta?

- **1913:** első szabadalom, emésztő enzim tartalmú előázató termékre
- hamarosan: proteáz-, amiláz-, lipáz tartalmú 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

Enzimológia – Proteáz enzimek

16



## 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 detergensszel
  - **vizes enzim oldat + propilén-glikol + más stabilizálók**

Enzimológia – Proteáz enzimek

17



## Mosószeripar

### 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)

Enzimológia – Proteáz enzimek

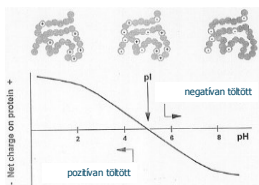
18



## 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
Bacillus firmus 7728	Soil samples taken from leather factories	9	40°C	7
Bacillus laterosporus 979A	Clade of carpenter's soil	8.5	40°C	8
Bacillus megaterium	Fermented broth of fish fish sauce	10	50°C	9
Bacillus clausii 1-52	Heavily polluted tidal mud flat	~11	40°C	10
Moraxella sp.	Marine sediment samples	10	50°C	11
Bacillus sp. SB1	Soil	10	-	12
Bacillus pumilus MRE-5	Soils soil sample	11.5	55-60°C	13
Bacillus horikoshi	Body fluid of the psatyhats, <i>Phormidium thuyaphysae</i>	9	Around 40°C	14
Bacillus sp. B001	Compost	10	60°C	15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MN1	Tannery waste water	8	60°C	16
<i>Serratia equicorrea</i>	Raw milk	8	-	17
Bacillus sp.	Soil	9	40°C	18
Bacillus sp.	Different wastes	8	50°C	19
<i>Vibrio</i> sp. parvoheliscus (MTC 4728)	Chicken meat samples	10	50°C	20
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain 9K	Slaughter house soil samples	9	40°C	21
Bacillus amylolentus	Degraded juice	8.5	37°C	22
<i>Flavobacterium meningospiraceae</i> K8042	Decomposing feather samples	10	60°C	23
<i>Halobacterium</i> sp.	Soil	10	37°C	24
Bacillus cereus R53	Beer soil	9	45°C	25



## Mosószeripar

ORGANISM	SOURCE	OPTIMUM PH	OPTIMUM TEMPERATURE	REFERENCE
<i>Streptomyces</i> sp. CNK02	Soil	9	45°C	26
<i>Mycophthora</i> sp.	-	9	40-45°C	27
<i>Penicillium</i> sp.	Soil	9	45°C	28
<i>Streptomyces fungicidicus</i> MM1014	Marine samples	9	40°C	29
<i>A. niger</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>Actinomyces</i> MA3-1	Marine sediment	9	50°C	32
<i>Aspergillus pasteurianus</i>	-	8	40°C	33
<i>Aspergillus terreus</i> sp.	Potato green soil fields	11	50°C	34
<i>Aspergillus nidulans</i> HA-10	Poultry farm soil	8	30°C	35
<i>Penicillium chrysogenum</i>	-	10	50°C	36

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



## Mosószeripar

### Milyen legyen a detergens proteáz?

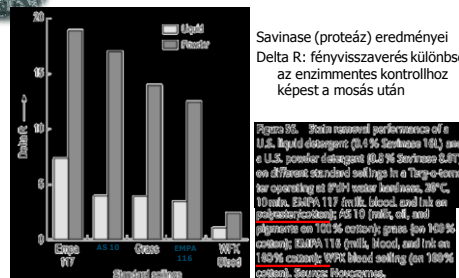
- kompatibilis a detergenssekkel
- nagy aktivitása legyen a mosási hőmérsékleten és pH-n (laboratóriumi analitikai adatok nem feltétlenül mérhetőek (standard proteáz aktivitás mérések)
- folyékony detergens → kis ionerősség
- mosóporok → nagy ionerősség
- az optimális ionerősség enzimfüggő, tesztelni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

### Hogyan tesztelik?

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



## Mosószeripar



Savinase (proteáz) eredményei Delta R: fényviszszaverés különböző az enzimmelles kontrollhoz képest a mosás után

Figure 55. Stain removal performance of a U.S. liquid detergent (0.4% Savinase 6.0 T) and a U.S. powder detergent (0.2% Savinase 6.0 T) on different standard soiling in a Tergo-Ometer operating at 60°C water hardness, 20°C, 10 min. Egefil 97 (oil, blood, and fat on polyester-cotton), AS 10 (oil, and pigments on 100% cotton), and SPPA 110 (milk, blood, and fat on 100% cotton), WFK Ultra (oil on 100% cotton). Source: Novozymes.

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



## Mosószeripar

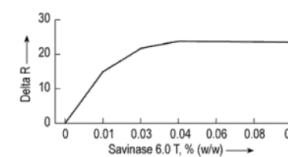


Figure 55. Example of a dose response curve for Savinase 6.0 T protease (Novozymes) in a powder detergent, 4 g/L in a Launder-o-meter test at 60°C for 40 min. Source: Novozymes.

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

Enzimológia – Proteáz enzimek



25



## Mosószeripar

**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)  
Ca<sup>2+</sup> adalék (kis mennyiségben, 100-1000 ppm)  
víztartalom (<50%), víz helyett propilén-glikol (vagy etanol, vagy izopropanol)  
reverzibilis proteáz inhibitor: inhideál, de a mosás során felhígul (borátok, glicin)

Enzimológia – Proteáz enzimek



26



## Mosószeripar

**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

Enzimológia – Proteáz enzimek



27



## Sajtgyártás

Cheese industry

**Proteázok alkalmazása**

- a tejfehérje, a kazein kicsapásához  
kazein: a tej fő foszfoproteinjé ( $\alpha S1, \beta, \gamma, \kappa$ )  
tehéntej és sajt fehérjetartalmának kb. 80%-a  
hidrofil része:  $\kappa$ -kazein  
hő hatására nem csapódik ki, de sav vagy proteáz hatására igen  
proteáz → para- $\kappa$ -kazein és glikopeptid → instabil micella,  
csomósodás, melyhez szabad Ca<sup>2+</sup> is szükséges
- legkorábbi proteáz felhasználás  
valószínűleg arab nomádok véletlenszerű felfedezése  
„kereskedelmi” enzimeként először **1874, Dánia**

Enzimológia – Proteáz enzimek



28



## Sajtgyártás

Cheese industry

**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

Enzimológia – Proteáz enzimek



29



## Sajtgyártás

Cheese industry

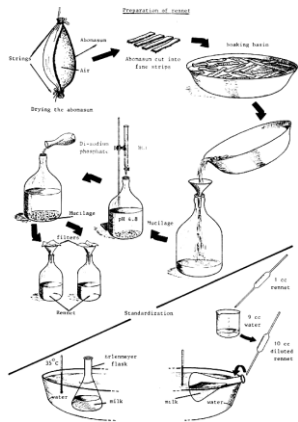
**Honnan nyerhetőek a koaguláló enzimek?**

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

Enzimológia – Proteáz enzimek



30



## Borjú rennin kinyerése

Production of natural calf rennet

### Hagyományos úton

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



31



## Borjú rennin kinyerése

Production of natural calf rennet

### Mai előállítás

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

### 1000 g rennin oldatban

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

Enzimológia – Proteáz enzimek



32



## Alternatív rennin források

Alternative sources of rennet

### Mikrobiális rennin / Microbial rennet

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

Enzimológia – Proteáz enzimek



33



## 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

Enzimológia – Proteáz enzimek



34



## 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

Enzimológia – Proteáz enzimek

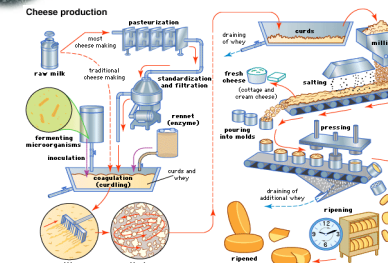


35



## Sajtgyártás

Cheese making



<http://www.pointnet.pds.hu/ujsegok/agraragazat/2006/10/2007012218226695000000382.html>

Enzimológia – Proteáz enzimek



36