

BIOCHEMICKÉ VLASTNOSTI PROTEOLYTICKÝCH ENZÝMOV

MARTINA HRČKOVÁ^a, ERNEST ŠTURDÍK^b,
TIBOR MALIAR^c a JAROSLAV ZEMANOVIČ^a

^aKatedra potravinárskej technológie, ^bKatedra biochemickej technológie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, ^cVýskumný ústav liečiv Modra, Horná 36, 900 01, Slovenská republika
mdienstl@gmx.at

Došlo 30.10.02, prepracované 15.3.04, prijaté 8.4.04.

Kľúčové slová: proteolytické enzýmy, názvoslovie, štruktúra, stabilita, katalýza, farmakologické vlastnosti, peptidázy, potravinárske aplikácie

Obsah

1. Úvod
2. Názvoslovie a rozdelenie proteolytických enzýmov
3. Stabilita, štruktúra a mechanizmus katalýzy proteázy
 - 3.1. Serínové peptidázy
 - 3.2. Cysteínové peptidázy
 - 3.3. Aspartátové peptidázy
 - 3.4. Metalopeptidázy
4. Záver

1. Úvod

Proteolytické enzýmy sú prítomné prakticky vo všetkých živých bunkách a navyše sú vylučované aj do vonkajšieho prostredia, resp. do tráviaceho systému vyšších organizmov. Všeobecne sú známe ich rôzne regulačné funkcie v intermediárnom metabolizme (limitovaná proteolýza, účasť pri zrážaní krvi, aktivácia tráviacich enzýmov, aktivity pri rôznych obranných mechanizmoch atď.). Okrem toho sú známe aj ich rozsiahle praktické aplikácie vo forme enzýmových preparátov v priemyselnej praxi (biodetergenty, produkcia syrov, spracovanie kože, produkcia hydrolyzátov bielkovín, stabilizácia piva a i.), medicíne a farmácii (preparáty zlepšujúce trávenie, čistenie kontaktných šošoviek, využívanie pre terapeutický zásah), kozmetike (keratolytické zmäkčujúce prípravky, pleťové peelingové masky), v bežnej laboratórnej praxi a v rámci experimentálnej vedeckovýskumnej činnosti. Proteolytické enzýmy (peptidázy) katalyzujú hydrolyzu peptidových väzieb v proteínoch významne ovplyvňujú nutričné, senzorycké, textúrové a iné vlastnosti potravinárskych surovín, medziproduktov i konečných výrobkov. Množstvo a typ peptidových väzieb, ktoré môže peptidáza štiepiť je závislé

na tom, z ktorých aminokyselín sa proteín skladá, a ktoré sú navzájom príľahlé¹. Viaceré peptidázy sú v súčasnosti perspektívnym objektom farmaceutického výskumu v spojitosti s terapiou početných závažných humánných ochorení (nádorové, artritické, infekčné a zápalové).

2. Názvoslovie a rozdelenie proteolytických enzýmov

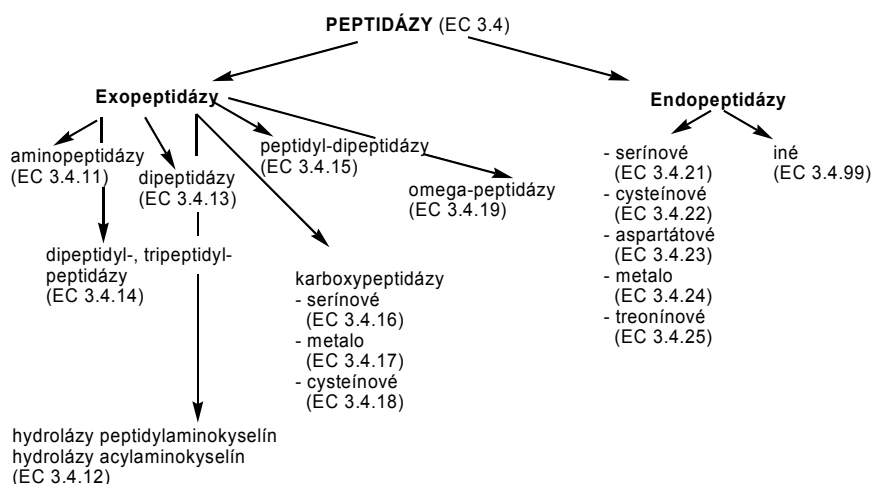
Podľa *Enzyme Nomenclature (1984)* sa výraz peptidázy používal striktno len pre enzýmy patriace do podtriedy EC 3.4.11–19, čiže pre exopeptidázy, a výraz proteinázy sa predtým používal pre enzýmy patriace do podtriedy EC 3.4.21–99, t.j. endopeptidázy. Názvoslovný výbor IUBMB (Medzinárodná únia pre biochémiu a molekulárnu biológiu) navrhol v r. 1992 používať pre proteolytické enzýmy jednotný všeobecný názov peptidázy. Je to synonymum výrazu proteáza, v minulosti používaného ako spoločný názov pre exopeptidázy aj endopeptidázy. Podľa tejto nomenklatury sa peptidázy delia na dve podtriedy, a to na exopeptidázy (EC 3.4.11–19) a endopeptidázy (EC 3.4.21–24 a EC 3.4.99). Tieto sa ďalej rozdeľujú tak, ako je to prezentované na obr. 1.

Exopeptidázy atakujú peptidové väzby na koncoch polypeptidových reťazcov, pričom aminopeptidázy (EC 3.4.11) odštiepujú voľné aminokyseliny z N-konca polypeptidového reťazca proteínu a dipeptidyl-peptidázy a tripeptidyl-peptidázy (EC 3.4.14) uvoľňujú príslušné dipeptidy a tripeptidy. Medzi exopeptidázy atakujúce voľný C-koniec polypeptidového reťazca proteínu sa zaraďujú karboxypeptidázy (EC 3.4.16–18) a peptidyl-dipeptidázy (EC 3.4.15). Karboxypeptidázy sa podľa štruktúry katalytického miesta ďalej rozdeľujú na karboxypeptidázy serínového typu (EC 3.4.16), metalokarboxypeptidázy (EC 3.4.17) a karboxypeptidázy cysteínového typu (EC 3.4.18). Iné exopeptidázy sú špecifické pre odštiepovanie dipeptidov, tzv. dipeptidázy (EC 3.4.13) alebo odštiepujú substituované, cyklizované alebo izopeptidovými väzbami spájané zvyšky, tzv. omega-peptidázy (EC 3.4.19).

Endopeptidázy sa podľa štruktúry katalytického miesta rozdeľujú na endopeptidázy serínové (EC 3.4.21), cysteínové (EC 3.4.22), aspartátové (EC 3.4.23), metaloendopeptidázy (EC 3.4.24), treonínové (EC 3.4.25) a iné endopeptidázy (EC 3.4.99) (cit.^{2–5}).

Špecifita peptidáz nezávisí na dĺžke reťazca, ale na povahe aminokyselín a na prítomnosti alebo neprítomnosti blízkych nabitých skupín⁶.

Peptidázy môžeme klasifikovať tiež na základe ďalších kritérií, a to podľa pôvodu (rastlinné, živočíšne, mikrobiálne), podľa ich lokalizácie (intracelulárne, extracelulárne), podľa optimálneho pH (kyslé, neutrálné, alkalické) atď.



Obr. 1. Rozdelenie peptidáz podľa Názvoslovného výboru IUBMB (Medzinárodná únia pre biochémiu a molekulárnu biológiu)

3. Stabilita, štruktúra a mechanizmus katalýzy proteolytických enzýmov

Pod pojmom stabilita enzýmu sa rozumie schopnosť zachovať si aktivitu pri rôznych podmienkach vonkajšieho prostredia. Medzi základné faktory, ktoré môžu najviac ovplyvniť stabilitu enzýmu patrí pH prostredia, teplota a čas pôsobenia⁷. K ďalším faktorom patrí napr. iónová sila, relatívna permitivita, redoxný potenciál (ak sa v aktívnom centre enzýmu nachádzajú skupiny –SH alebo –S–S–), ale aj koncentrácia bielkovín v samotnom roztoku⁸. Pri charakterizácii peptidáz sa často uvádza nielen teplotné a pH-rozmedzie, v ktorom je enzým stabilný, ale aj jeho optimálne hodnoty. Pri optimálnej teplote sa zaisťuje maximálna účinnosť enzýmu a jeho minimálna inaktívacia. Optimálne pH zase súvisí s priestorovým usporiadaním makromolekúl peptidáz, ktoré je pri rozličnej koncentrácii vodíkových iónov rozdielne.

Podľa mechanizmu katalýzy sa proteolytické enzýmy klasifikujú do 4 skupín, zahrňujúcich serínové, cysteínové, aspartátové a metalopeptidázy.

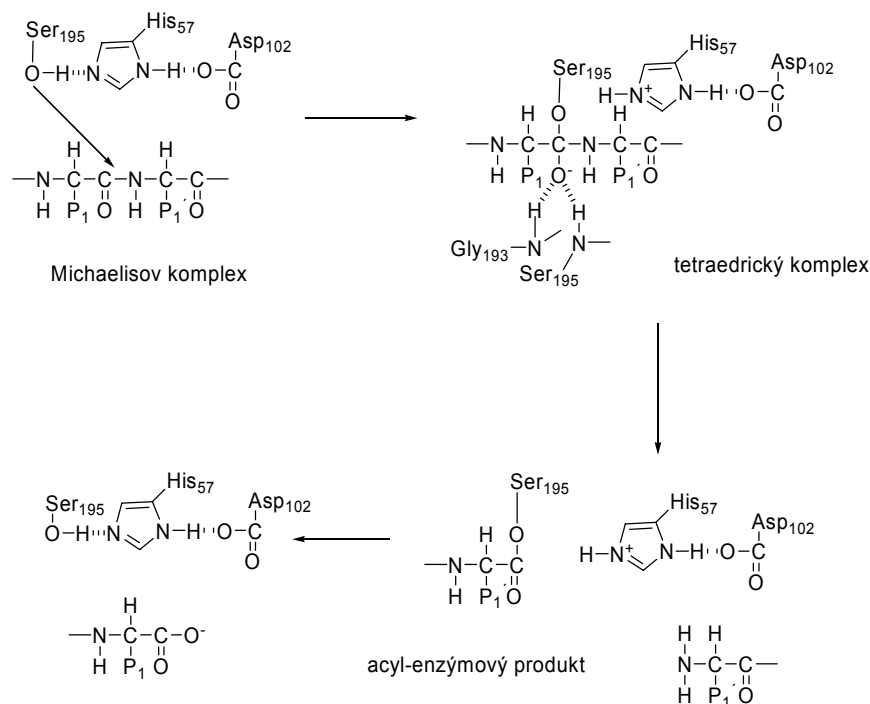
3.1. Serínové peptidázy

Najväčšiu skupinu proteolytických enzýmov mikrobiálneho a živočíšneho pôvodu tvoria serínové peptidázy. Súčasťou ich katalytického miesta je reaktívny serínový zvyšok. Mechanizmus ich účinku je zobrazený na obr. 2. Významnou črtou tohto mechanizmu je tvorba esteru medzi kyslíkom serínu a acylovým zvyškom substrátu za vzniku aminového zvyšku ako prvého produktu. Ďalším dôležitým prvkom katalýzy štiepenia peptidových väzieb serínových peptidáz je prítomnosť dvoch hlavných reťazcov so skupinami –NH–, ktoré sa podieľajú na tvorbe vodíkových väzieb s kyslíkovým atómom karbonylovej skupiny, ktorá je súčasťou štiepenej peptidovej väzby. Tento efekt je ťažké kvantitatívne zhodnotiť, pretože skupiny –NH– sú nevyhnutné pre štruktúrnu integritu

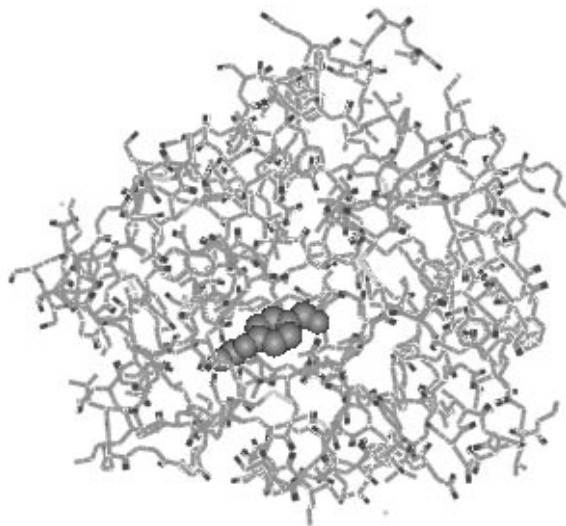
proteínu⁹. Tieto peptidázy sú inhibované DFP (diizopropylfluorofosfát) alebo PMSF (fenylnmetánsulfonylfluorid). Vo všeobecnosti sú serínové peptidázy aktívne pri neutrálnom a alkalickom pH s optimom medzi hodnotami 7–11. Majú širokú substrátovú špecifickosť so značnou esterolytickou aktivitou voči mnohým esterovým substrátom. Ich izoelektrické body sa pohybujú od pH 4,4 do 6,2 a molekulové hmotnosti sú väčšinou medzi 18,5–35 kDa.

Serínové peptidázy tvoria z farmakologického, potravinárskeho a iného praktického hľadiska významnú skupinu enzýmov pre reguláciu a využívanie, nakoľko je dostatočne popísaná a známa ich štruktúra, mechanizmus katalytického deja, spôsob inhibície rôznych skupín nízkomolekulovými inhibítormi i efektormi peptidového charakteru. Z najvýznamnejších enzýmov tejto skupiny možno spomenúť trypsin, trombin a ostatné hemokoagulačné faktory, urokinázu, faktory komplementu, z potravinárskeho hľadiska sú to predovšetkým alkalické subtilisiny z *Bacillus licheniformis*, ktoré sú dobre známe ako prípravky na úpravu textúry, nutričných a senzorických vlastností potravín, ale aj v oblasti detergentov ako súčasť pracích prostriedkov.

Z dôvodov štruktúrálnej i funkčnej príbuznosti je pre celú skupinu často zaužívaný názov trypsinové enzýmy alebo enzýmy trypsinovej rodiny. Trypsín [EC.3.4.21.4] je jedným z najpopisanejších enzýmov vďaka relatívne jednoduchšej štruktúre a ľahkej komerčnej dostupnosti. Základné typické štruktúrne prvky popisovaných peptidáz je možné demonštrovať na príklade tohto enzýmu. Pre celú skupinu je charakteristická protónová štafeta katalytickej triády Ser₁₉₅, His₅₆ a Asp₂₁₂. Štruktúru trypsinu možno demonštrovať v prevedení umožňujúcom 3D projekciu vhodne konvertovaných údajov X-ray alebo NMR súborov dostupných napríklad vo verejne prístupnej proteínovej databanke (www.rcsb.org/pdb). Databáza obsahuje niekoľko desiatok súborov hovädzieho β-trypsínu či už samotného alebo asociovaného s rôznymi nízkomolekulovými i peptidovými inhibítormi. Obr. 3 prezentuje sekun-



Obr. 2. Schématické znázornenie katalytického účinku serínovej peptidázy; reakcia prebieha za vzniku tetraedrického medziproduktu s následným odštiepením pravej polovice substrátu za vzniku acyl-enzýmového medziproduktu. Štiepenie tohto medziproduktu sa uskutočňuje enzýmovou katalýzou v prítomnosti vody za vzniku kyseliny; P₁, P₁' - zvyšky aminokyselín postranných reťazcov



Obr. 3. Terciárna štruktúra hovädzieho β -trypsínu v komplexe s 4-guanidínobenzoovou kyselinou ako inhibítorom¹⁰

dárnu štruktúru hovädzieho β -trypsínu a zároveň jeho komplex s 4-guanidínobenzoovou kyselinou (na obrázku vyznačená v strede molekuly tmavou farbou), kovalentne viazanou na katalytický serín Ser₁₉₅. Trypsín je relatívne malý enzým s molekulovou hmotnosťou 23,3 kDa vyskytujúci sa vo forme monomérskej bielkoviny. Tzv. „páskový model“ tohoto komplexu poukazuje na desať oblastí štruktúry skladaného listu označených 1 až 10 a dve typické α -helixové motívy označené A a B, prvý medzi doménami 6 a 7 a druhý na C-konci proteínu¹⁰.

Pankreatický trypsin Trypsin Novo (Novo Nordisk A/S) je potravinársky významný preparát izolovaný z pankreasu prasiat s optimálnou teplotou 45 až 50 °C a pH 7–8 (cit.¹¹). V kombinácii s chymotrypsínom sa trypsin používa na zníženie alergenicity bielkovín v potravinách¹². Samotným chymotrypsínom možno zlepšiť funkčné vlastnosti hydrolyzátoz gliadínu¹³.

Trypsínu podobné peptidázy sú produkované aj mikroorganizmami *Streptomyces erythreus*, *S. fradiae* a *S. griseus*. Táto podskupina peptidáz je špecifická pre zásadité aminokyseliny. Najviac je aktívna pri pH 8, citlivá je na trypsinové inhibítory, DFP a sójové trypsinové inhibítory. Ich molekulové hmotnosti sa pohybujú okolo 20 kDa a izoelektrické body sú okolo pH 9 (cit.⁷). Aminopeptidáza produkovaná *Streptomyces rimnosus* vykazuje optimálnu aktivitu pri pH 7,1–7,8 a teplote 25–41 °C. Úplná inhibícia nastáva v prítomnosti 0,1 mM EDTA alebo 1mM 1,10-fenantrolínu. Obnovenie aktivity možno do-

siahnúť prídavkom 0,05 mM Co^{2+} , Zn^{2+} alebo Ni^{2+} . Enzým inhibujú látky ako amastatín, bestatín a puromycín¹⁴.

Trombín je dostatočne známym enzýmom, ktorý je primárnym cieľom pre antitrombotický účinok látok vo všeobecnosti. Ako pre celú skupinu týchto enzýmov i pre trombín je charakteristická protónová štafeta katalytickej triády Ser₁₉₅, His₅₆ a Asp₂₁₂. Jedná sa o monoméry enzým s molekulovou hmotnosťou 29,7 kDa pozostávajúci z 259 aminokyselinových zvyškov. Zrejma je prítomnosť troch výraznejších α -helixových sekvencií, označených A, B a C, a 14 sekvencií skladaného listu. Trombín sa vyznačuje značne členitou a vetvenou povrchovou katalytickou kavitou, ktorá odpovedá regiónu P₁. Ním sa determinuje špecificita trombínu (napríklad v porovnaní s nešpecifickým trypsínom)¹⁵.

Podskupina alkalických peptidáz je špecifická pre aromatické a hydrofóbne zvyšky aminokyselín ako sú tyrozin, fenylalanín alebo leucín. Sú produkované rôznymi druhmi baktérií, plesní alebo kvasiniek a inhibované DFP a zemiakovým inhibítorom, ale nie špecifickými trypsínovými inhibítormi TLCK (1-chlóro-3-tosylamido-7-amino-2-heptanón) a TPCK (L-1-chlóro-3-[4-tosylamido]-4-phenyl-2-butanón). Najaktívnejšie sú pri pH 10. Molekulové hmotnosti sa pohybujú medzi 15 a 30 kDa a ich izoelektrické body sú normálne pri pH 9. Najlepšie prebádanými alkalickými serínovými peptidázami sú subtilizíny produkované *Bacillus licheniformis* (Subtilisin Carlsberg) a *B. amyloliquefaciens* (Subtilisin Novo, Bacterial Protease Nagase-BPN). Carlsberg a Novo Subtilisin sú veľmi podobné peptidázy. Ich molekulová hmotnosť sa pohybuje okolo 27,5 kDa, optimálna teplota je 60 °C a optimálne pH 10. Aktívne miesta oboch enzýmov tvoria zvyšky Ser₂₂₁, His₆₄ a Asp₃₂. Ich aktivita je inhibovaná činidlami DFP a PMSF. Sú širokošpecifické pre väčšinu peptidových väzieb a niektoré esterové väzby. Carlsberg-peptidáza je účinná aj pri transpeptidácii a transesterifikácii. Stabilita Novo Subtilisínu je, na rozdiel od Carlsberg-enzýmu, mierne závislá na prítomnosti Ca^{2+} . Obe peptidázy sa rýchlo deštruuju v prítomnosti oxidáčných reagensí ako sú chlórnaný alebo peroxid vodíka⁸. Potravinársky významnou peptidázou serínového typu je alkalická peptidáza Alcalase produkovaná selektívne kmeňom *Bacillus licheniformis*. Vo všeobecnosti sa používa na úpravu funkčných vlastností hydrolyzovaného proteínu^{16,17}. Používa sa pri získavaní arómu a chuti do polievok a mäsových konzerv zo zvyškov mäsa, ktoré pri bežnom spracovaní ostávajú na hlave alebo na kostiach zvierat. Hlavnou zložkou enzýmu je subtilizín A (= Subtilisin Carlsberg) [E.C.3.4.21.62]. Jej molekulová hmotnosť je 27,3 kDa. Optimálna teplota peptidázy sa pohybuje medzi 55 a 70 °C a pH medzi 6,5–8,5 (cit.¹⁸). Inými producentmi sú *Arthrobacter species*, *Flavobacterium arborescens* a *Streptomyces* sp. Alkalické peptidázy sú produkované taktiež plesňami *Aspergillus species.*, *Neurospora crassa*, termofilmi (napr. *Malbranchea pulchella*) a kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae*. Alkalická peptidáza produkovaná *Aspergillus oryzae* je serínová peptidáza s podobnými vlastnosťami ako serínová peptidáza z *Bacillus* spe-

cies. Enzým vykazuje optimálnu aktivitu pri pH 7,0–8,5 a je stabilný medzi pH 4,5 a 9,0. Citlivý je na teplotu, rýchlo sa inaktivuje pri 60 °C. Je stabilizovaný Ca^{2+} iónmi a inhibovaný serínovými činidlami a zemiakovým inhibítorom⁸. V potravinárskej praxi sa používa spomínaná serínová peptidáza z *Aspergillus oryzae*, známa ako preparát Flavourzyme® (Novo Nordisk), na produkciu mäsových arómov z rastlinných proteínov¹⁹ alebo na získavanie rybích hydrolyzátoov s dobrými funkčnými vlastnosťami^{20,21}.

Myxobacter- α -lytická peptidáza, produkovaná rodom *Sorangium*, vykazuje silnú lytickú aktivitu voči mnohým pôdnym baktériam. Podobne ako elastáza je špecifická na štiepenie väzieb obsahujúcich karboxylové skupiny neutrálnych alifatických aminokyselín. Uvedená serínová peptidáza je najaktívnejšia pri pH 9 a inhibuje ju DFP (cit.⁸).

3.2. Cysteínové peptidázy

Cysteínové peptidázy predstavujú v súčasnosti veľmi perspektívny objekt farmaceutického výskumu v spojitosti s terapiou mnohých závažných humánných ochorení (nádorové, artritické, infekčné a zápalové). Predmetom záujmu farmakológov sú zvlášť lyzozomálne katepsíny (katepsín B, H, L, S, O) a kalpainy (vápnik-dependentné cysteínové proteínázy²²). Tieto peptidázy sú významné tiež v potravinárstve, najmä v oblasti mäsového priemyslu pri tenderizácii mäsa²³. Mechanizmus účinku cysteínových peptidáz je veľmi podobný mechanizmu serínových peptidáz. Rovnako je založený na vzniku kovalentného medzi produktu s tým rozdielom, že v prípade cysteínových peptidáz je atakujúcim nukleofilom atóm sily postranného reťazca cysteínu. Aj tu je do mechanizmu zapojený postranný reťazec histidínu, ktorý funguje ako akceptor vodíkového atómu. Dôležitý je poznatok, že chemickou modifikáciou hyperaktívneho cysteínového zvyšku stráca enzým svoju aktivitu. Zistilo sa, že skupina –SH prítomného cysteínu musí byť v neviazanej forme a aktívne miesto enzýmu vždy obsahuje zvyšok histidínu⁹.

Štrukturálne typické prvky cysteínových proteínáz možno demonštrovať na príklade katepsínu B. Katepsín B [E.C.3.4.22.1] je jeden z najlepšie preskúmaných enzýmov skupiny cysteínových proteínáz. Pre celú skupinu je charakteristická protónová štafeta katalytickej triády Cys₂₉, His₁₉₉ a Gln₂₃, čo indikuje výraznú podobnosť so skupinou serínových proteínáz. Enzým pozostáva z reťazca obsahujúceho 253 aminokyselinových zvyškov, vzájomne prepojeného prostredníctvom siedmich disulfidických väzieb. Jeho inhibítorom je Ca-030 (epoxysukcinyl-Ile-Pro-OH etyl ester)¹². Katepsín B je relatívne malý enzým s molekulovou hmotnosťou 27,4 kDa vyskytujúci sa vo forme monoméry bielkoviny. Vyznačuje sa typickou povrchovou, stereošpecifickou pretiahnutou kavitou, ktorá zabezpečuje interakciu s inhibítorom Ca-030 (epoxysukcinyl-Ile-Pro-OH etyl ester). Sekundárnu štruktúru tohoto komplexu tvorí dvanásť oblastí štruktúry skladaného listu a štyri výrazné typické α -helixové motívy. V detailoch sa autori v špecifikovaní sekundárnej štruktúry čiastočne rozchádzajú.

Cysteínové peptidázy sú citlivé na tiolové činidlá ako kyselina jódoctová, jódoacetamid, ťažké kovy a aktivujú ich redukujúce činidlá ako kyanid draselný, cysteín alebo kyselina etyléndiamintetraoctová (EDTA). Výskyt cysteínových peptidáz sa okrem živočíchov zaznamenal v len obmedzenom množstve u plesní. Producentami extracelulárnych peptidáz s vlastnosťami podobným serínovým peptidázam sú *Trichosporus* species, *Oidiodendron kalrai* a *Nannizzia fulva*. Ďalšie extracelulárne cysteínové peptidázy sú produkované najmä *Microsporium* species, *Aspergillus oryzae*, *Sporotrichum pulverulentum* a *Bacteroides gingivalis*. Väčšina týchto enzýmov je aktívna pri pH 5–8. Na niektoré priaznivo pôsobí prítomnosť redukujúcich činidiel. Mnoho plesní, ktoré produkujú sliz priamo v bunke alebo mimo nej, napr. *Dictyostelium discoideum*, syntetizujú cysteínové peptidázy, ktoré vykazujú optimálnu aktivitu okolo pH 5. Najväčšia produkcia cysteínových peptidáz sa zistila v jednobunkovcoch. Ide väčšinou o intracelulárne enzýmy aktívne pri nízkych (kyslých) hodnotách pH (cit.⁸).

Clostripainová peptidáza pochádza z filtrátu kultúry *Clostridium histolyticum*. Enzým je špecifický voči zvyškom zásaditých aminokyselín na karboxylovej strane štiepeného reťazca. Jeho molekulová hmotnosť je 50 kDa a izoelektrický bod má hodnotu 4,8. Je citlivý na TLCK ale nie na TPCK.

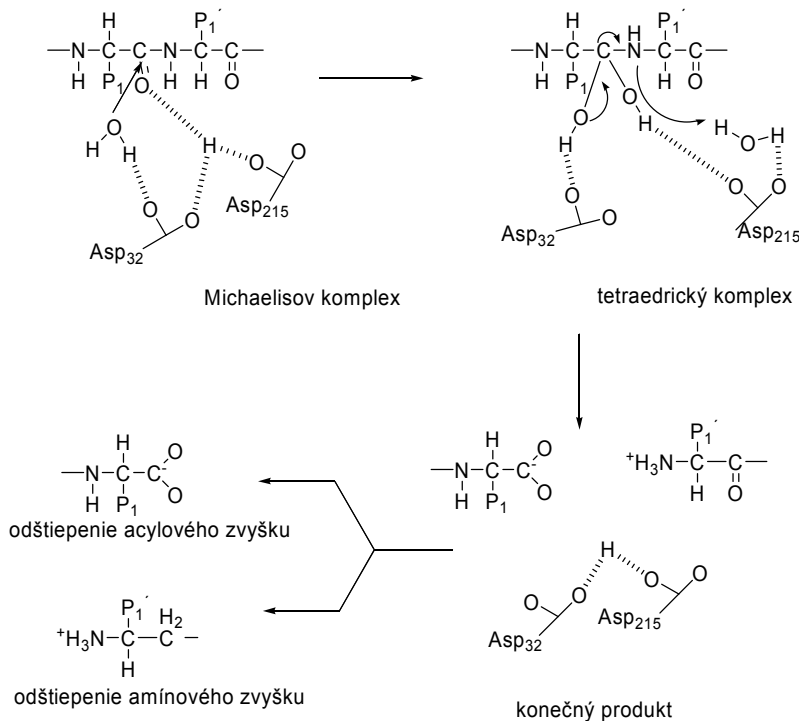
Streptokoková peptidáza je produkovaná ako zymogén baktériami *Streptococcus* species (skupina A). Tento sa autokatalýzou mení na aktívnu formu. Peptidáza má širokú aminokyselínovú špecificitu. Molekulová hmotnosť

enzýmu je 32 kDa a izoelektrický bod pri pH 8,4 (cit.⁸). V oblasti potravinárskeho priemyslu je známa aminopeptidáza zo *Streptococcus thermophilus*, ostraňujúca tzv. horké peptidy²⁴.

Medzi potravinársky významné cysteínové peptidázy patria aj peptidázy rastlinného pôvodu ako bromelaín, ficín a papaín^{25,26}. Bromelaín je známy svojou aplikáciou pri hydrolýze väčšiny rozpustných proteínov, napr. pri výrobe oblátiek a napolitániek²⁵. V procese výroby piva možno papaínom zvýšiť výtťažok mladiny a obsah dusíka v nej. Aplikuje sa aj pri čírení piva²⁸. Všetky tri peptidázy sa používajú aj v mäsovom priemysle pri tenderizácii mäsa²⁹.

3.3. Aspartátové peptidázy

Táto skupina peptidáz je charakteristická maximálnou aktivitou pri nízkom pH (3–4) a necitlivosťou na inhibítory zvyšných troch skupín peptidáz. Skôr ako bol známy charakter ich aktívneho miesta, označovali sa ako „kyslé“ vzhľadom k zníženému optimálnemu pH ich pôsobenia. Nachádzajú sa väčšinou u plesní, zriedkavo u baktérií alebo v jednobunkovcoch. Aspartátové peptidázy sú najcitlivejšie na epoxy- a diazoketónové zlúčeniny v prítomnosti kationov medi. Inhibuje ich pepstatín alebo pepsínový inhibítor izolovaný zo *Streptomyces* species. Avšak aspartátové peptidázy z *Aspergillus niger*, *Scytalidium lignicolum* a z mnohých bazídiomycét patriacich do čeľade *Tricholomataceae* nie sú na tieto špecifické inhibítory citlivé. Aspartátové peptidázy majú väčšinou molekulovú hmotnosť od 30–45 kDa a ich izoelektrické body sa pohybujú v rozsahu pH 3,4–4,6. Sú špecifické voči zvyškom aroma-

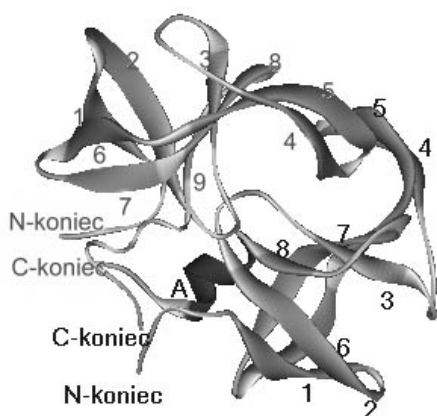


Obr. 4. Mechanizmus katalytického účinku aspartátových peptidáz

tických aminokyselín na oboch koncoch štiepeného reťazca. Táto skupina peptidáz katalyzuje hydrolýzu peptidových väzieb bez nukleofilného ataku funkčnej skupiny enzýmu. Z tohto dôvodu sa medzi enzýmom a substrátom nevytvára žiadny kovalentný medziprodukt. Katalytický aparát aspartátových peptidáz pozostáva z dvoch postranných reťazcov kyseliny asparágovej. Dôležitosť ich dvoch karboxylových skupín sa usúdila zo štúdií zahrňujúcich chemické modifikácie. Tento fakt prirodzene potvrdzuje aj nízke pH optimum tejto skupiny peptidáz. Umiestnenie týchto dvoch bočných reťazcov v mieste, v ktorom katalyzujú štiepenie peptidových väzieb, sa potvrdil aj kryštalografickou röntgenovou analýzou enzýmovej štruktúry. Tiež sa potvrdilo, že tieto dve karboxylové skupiny sú vedľa seba dosť blízko na to, aby sa podieľali na vodíkovej väzbe medzi ich atómami kyslíka. Okrem toho, enzým v natívnej forme má pomocou vodíkovej väzby pevne naviazanú molekulu vody na aktívne miesta oboch asparágových kyselín. Mechanizmus katalytického účinku aspartátových peptidáz je zobrazený na obr. 4 (cit.⁹).

Z farmakologicky najvýznamnejších enzýmov tejto skupiny možno spomenúť virálnu HIV-proteázu I, HIV-proteázu II a renín. Pre celú skupinu enzýmov tejto kategórie je možné charakterizovať určité spoločné prvky. Katalytický mechanizmus zabezpečuje katalytická diáda dvoch reziduí kyseliny asparágovej, pričom jeden karboxyl sa vyskytuje v ionizovanej a druhý v protonizovanej forme. HIV-proteáza I [EC.3.4.23.16] je relatívne malý enzým s molekulovou hmotnosťou 21,7 kDa (198 reziduí) vo forme dvoch symetrických monomérických jednotiek. Jej klinicky úspešným inhibítorom je Ro31-8959. „Páskový model“ tohto komplexu (obr. 5) odkrývajúci sekundárnu štruktúru HIV-proteázy I poukazuje na 17 oblastí typu skladaného listu označených 1 až 8 na reťazci α a 1 až 9 na reťazci β a jednu výraznejšiu helikálnu sekvenciu³⁰.

Veľa aspartátových peptidáz produkovaných plesňami, napr. *Mucor miehei* alebo *Mucor pusillus*, sú potravi-



Obr. 5. „Páskový model“ sekundárnej štruktúry HIV-proteázy I (cit.³⁰)

nársky významné. Používajú sa pre zrážanie proteínov mlieka pri výrobe tvarohu a syrov²⁹. Väčšina z nich je nestabilných pri pH > 7 a nevyskytujú sa v mikrobiálnych kultúrach, ktoré rastú v neutrálnom alebo alkalickom prostredí. Rozlišujú sa viaceré typy aspartátových peptidáz. Pepsínu podobné peptidázy sú produkované najmä plesňami rodov *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Trametes* a *Neurospora*. Ide o extracelulárne enzýmy, ktoré sa často používajú pri výrobe proteínových hydrolyzátoz so sóje, najmä pri výrobe sójových omáčiek. Mikrobiálne pepsínu podobné peptidázy majú veľa podobných fyzikálnych a chemických vlastností ako pepsín živočíšneho pôvodu, vrátane nízkej esterolytickej aktivity.

Renínu podobné peptidázy majú veľa spoločných vlastností s predchádzajúcimi peptidázami. Avšak, na rozdiel od pepsínu podobných peptidáz, sú schopné zrážať mlieko podobným spôsobom ako renín živočíšneho pôvodu. Renínu podobné peptidázy boli izolované z mnohých mikroorganizmov ako napr. *Endothia parasitica*, *Mucor species* a *Aspergillus candidus*. Enzýmy produkované rodmi *Endothia* a *Mucor* sa komerčne používajú pri výrobe syrov. Enzým produkovaný druhom *Mucor pusillus* je monomér o molekulovej hmotnosti 30 kDa. Jeho molekula obsahuje dva cysteinové zvyšky, ktoré však zjavne netvoria disulfidické väzby. Peptidáza z *Mucor miehei* je takisto monomér s molekulovou hmotnosťou 38 kDa. Obsahuje asi 6 % glycidov. Obidva enzýmy prednostne katalyzujú hydrolýzu peptidových väzieb s aromatickými a hydrofóbnymi bočnými reťazcami s optimálnou aktivitou pri pH 4,0–4,5. Sú stabilné v rozmedzí pH 3–6. Peptidáza z *M. miehei* (Fromase, Gist-brocades) je viac tepelne odolná ako peptidáza *M. pusillus*. Schopnosť zrážať mlieko, najmä v prípade *M. pusillus*, mierne závisí od prítomnosti vápnika⁸. Fromase je stabilná pri pH v rozsahu 3,0–6,5. Je to termolabilný enzým, ktorý je počas výroby syra inaktivovaný už pri bežných ohrevoch srvátky, takže nedochádza ku koagulácii pri zmiešaní srvátky s odstredeným mliekom³².

Chymozínový preparát, Maxiren[®] (Gist-brocades), získavaný z mliekárenskej kvasinky *Kluyveromyces lactis* je citlivý na teplotu. Optimum aktivity je v surovom mlieku s pH 6,6 dosahované pri teplote 42,5 °C a pri pasterizovanom mlieku s pH 6,5 pri teplote 45 °C. K jeho inaktivácii dochádza pri pasterizácii počas 15–16 s pri 72 °C (cit.³³).

3.4. Metalopeptidázy

Podobne ako aspartátové peptidázy ani metalopeptidázy počas štiepenia peptidových väzieb nevytvárajú kovalentné medziprodukty. Ich katalytický účinok je viacmenej spojený s koordináciou prítomného kovového iónu v enzýme. Týmto kovom je obvyčajne zinok. V niektorých prípadoch môže byť nahradený iným prechodným kovom. Kovový ión napomáha pri štiepení peptidovej väzby za prítomnosti molekuly vody najmä svojím silným elektrofilným charakterom. V natívnom enzýme je molekula vody koordinovaná k štvrtému tetraedrickému miestu (ďalšími ligandmi sú dva histidíny v karboxypeptidáze A,

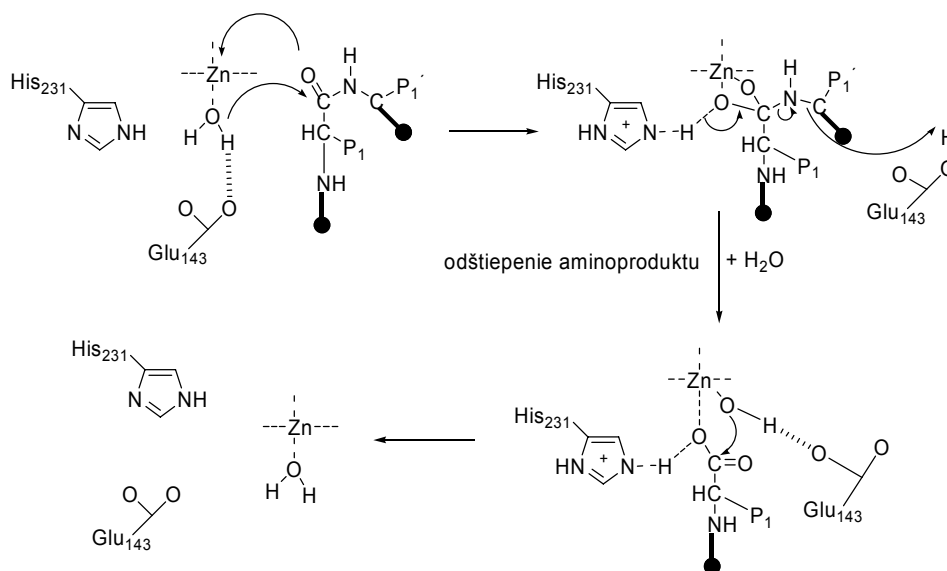
v termolyzine je to kyselina glutámová). Molekula vody je naviazaná vodíkovou väzbou na kyselinu glutámovú. Karboxylová skupina kyseliny glutámovej odoberá protón a zúčastňuje sa pri ataku tej istej molekuly vody na peptidovom karbonyle. Protón pochádzajúci z kyseliny glutámovej sa opäť presúva k východiskovému atómu dusíka, ktorý môže pochádzať z kyseliny glutámovej (obr.6, cit.⁹).

Metaloproteinázy tvoria zaujímavú skupinu enzýmov zodpovedných za progresiu chorôb asociovaných s degradáciou extracelulárneho matrixu. Z farmakologicky najvýznamnejších enzýmov tejto skupiny možno spomenúť matrilysin, kolagenázy a želatinázy rôzneho typu. Pre celú skupinu enzýmov tejto kategórie je spoločný katalytický mechanizmus využívajúci ión zinku koordinovaný tromi reziduami histidínu. Matrilysin [EC.3.4.24.23] je jeden z najmenších enzýmov tejto kategórie, ktorého aktivitu inhibuje inhibítor hydroxamátového typu³⁴. Ide o relatívne malý monomérny enzým s molekulovou hmotnosťou 18,7 kDa (170 reziduí). „Páskový model“ poukazuje na 7 oblastí štruktúry skladaného listu označených 1 až 7 a tri výrazné štruktúry α -hélixu. Optimálne pH tejto skupiny enzýmov sa pohybuje v rozmedzí hodnôt pH 5–9. Citlivé sú na chelatačné činidlá (EDTA). Serínové peptidázové inhibítory alebo tiolové činidlá neovplyvňujú ich aktivitu. Mnoho metalopeptidáz inhibovaných EDTA môže byť aktivovaných iónmi ako sú zinok, vápnik, kobalt. Z potravinárskeho hľadiska sú najznámejšie metalopeptidázy produkované baktériami a plesňami (Neutrase^{35–39}, termolyzín³¹) obsahujúce vo svojej molekule zinok, ktorý je nevyhnutný pre ich aktivitu. Vápnik je potrebný najmä na stabilizáciu ich proteínovej štruktúry. Množstvo vápnika v metalopeptidázach sa pohybuje od štyroch atómov na 1 molekulu termolyzínu z *Bacillus thermoproteolyticus* až po menej ako 0,2 atómu na molekulu enzýmu z *Aeromonas proteolytica*. Peptidáza mikroorganizmu *Bacillus ther-*

moproteolyticus termolyzín je stabilná v rozmedzí pH 5 až 10 pri teplote 80 °C. K inaktivácii nedochádza ani v 20% etanole a metanole. Pri teplote 4 °C ju môžeme uchovávať až niekoľko mesiacov⁶. Kyslé metalopeptidázy sa vyznačujú nižšími optimami pH (5–6) a molekulovými hmotnosťami (19–20 kDa). Vykazujú špecifickosť voči syntetickým peptidom a oxidovanému B-reťazcu inzulínu. Zaraďujú sa sem najmä peptidázy *Penicillium caseicola*, *P. roqueforti*, *Aspergillus sojae* a *A. oryzae*. Peptidázy *Penicillium* nie sú citlivé na fosforamidon, špecifický metalopeptidázový inhibítor.

Komerčné preparáty z *A. oryzae* používané v potravinárskom priemysle pri úprave vlastností múky⁴⁰, mäsa³¹, hydrolýze potravín¹⁹ obsahujú kyslé, neutrálne a alkalické peptidázy, ktoré sú aktívne v oblasti pH 4,0–4,5 a stabilné medzi pH 2,5 a 6,0. Štruktúra aktívneho centra je podobná aktívnemu centru pepsínu. *A. oryzae* produkuje dve neutrálne metalopeptidázy, ktoré sú inhibované sekvestračnými činidlami. Jeden z enzýmov vykazuje optimálnu aktivitu pri pH 7 a je stabilný v rozmedzí pH 5,5–12,0, ale ľahko sa inaktivuje pri teplote nad 50 °C. Druhá neutrálna metalopeptidáza má optimálnu aktivitu pri pH 5,5–6,0 a je pomerne termostabilná. Záhrevom pri 90 °C po 10 min stráca len 30 % svojej aktivity⁴¹. Potravinársky zaujímavou peptidázou produkovanou spomínaným mikroorganizmom je Flavozyme[®] (Novo Nordisk), používanou pri hydrolýze sójovej odtučnenej múky⁴². Metalopeptidázy vo všeobecnosti prednostne katalyzujú hydrolýzu peptidov s hydrofóbnymi postrannými reťazcami, obsahujúcimi napr. fenylalanín a leucín. Vykazujú veľmi slabú esterázovú aktivitu.

Neutrálne metalopeptidázy sú špecifické voči hydrofóbnym a objemným aminokyselinovým zvyškom. Ich optimálne pH je 7 a ich veľkosť je medzi 30–40 kDa. Ich



Obr. 6. Schématické zobrazenie katalytického štiepenia peptidovej väzby v prítomnosti metalopeptidázy; P₁, P'₁ – zvyšky aminokyselín postranných reťazcov

najväčšími producentami sú bacily a *Aspergillus* species. Neutrálne proteázy typu *Aspergillus* species sa v potravinárstve používajú na odstraňovanie horkej chuti hydrolyzáto^{41,43}. Najznámejšou neutrálnou metalopeptidázou je termolyzín produkovaný *Bacillus thermoproteolyticus*. Je stabilný do 80 °C. Jeho molekula obsahuje zinok, ktorý je viazaný dvoma zvyškami histidínu a jedným glutamátovým zvyškom. Aktívne miesto tvorí 6 aminokyselín, ktoré obklopujú atóm zinku. V jeho štruktúre sa nachádzajú aj 4 atómy vápnika zodpovedné za termostabilitu enzýmu. Termolyzín obsahuje 316 aminokyselín a jeho molekulová hmotnosť je 34,4 kDa.

Alkalické peptidázy sú produkované baktériami *Pseudomonas aeruginosa* a *Serratia marcescens*. Sú širokošpecifické s pH optimom 7 a o málo väčšie ako ostatné metalopeptidázy (48–60 kDa).

Myxobacter peptidáza I má molekulovú hmotnosť 14 kDa a optimálne pH 9. Je špecifická voči malým aminokyselinovým zvyškom na obidvoch koncoch štiepeného polypeptidového reťazca. Táto peptidáza je schopná lyzovať bunkové steny *Arthrobacter crystallopoites* a iných grampozitívnych baktérií. β -lytická peptidáza pochádzajúca zo *Sorangium* species obsahujúca zinok je špecifická voči oxidovanej forme B-reťazca inzulínu.

Myxobacter-peptidáza II s molekulovou hmotnosťou 17 kDa a optimálnym pH 8,5–9 je špecifická pre lyzínové zvyšky na N-konci štiepeného reťazca, ale nemá schopnosť lyzovať bakteriálne bunky. Je stabilná pri pH 3–9 a teplote 50 °C počas 18 h (cit.⁸).

4. Záver

Proteolytické enzýmy majú dôležité praktické uplatnenie v rôznych oblastiach potravinárskeho aj iného priemyslu. Sú významné tiež z medicínskeho hľadiska.

Podľa Názvoslovného výboru IUBMB (Medzinárodná únia pre biochémiu a molekulárnu biológiu) sa proteolytické enzýmy od roku 1992 označujú ako peptidázy.

Článok pojednáva o nomenklatúre, rozdelení týchto enzýmov, ich štruktúrach, stabilite, mechanizme katalýzy a ďalších biochemických parametroch významných pre farmakologické, potravinárske a iné aplikácie.

LITERATÚRA

- Adler-Nissen J.: *Enzymic Hydrolysis of Food Proteins*. Elsevier Applied Science Publishers, Londýn 1986.
- Grassmann W., Dykerhoff H.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 179, 41 (1928).
- Rawlings N. D., Barret A. J.: *Methods Enzymol.* 224, 461 (1994).
- Rawlings N. D., Barret A. J.: *Methods Enzymol.* 248, 105 (1995).
- Rawlings N. D., Barret A. J.: *Nucl. Acids Res.* 27, 325 (1999).
- Lowe C. R., Dean P. D.: *Afininí chromatografie*. STNL, Praha 1979.
- Shroomburg D., Salzman M.: *Enzyme Handbook 5. Class 3: Hydrolases*. Springer-Verlag, Berlín 1991.
- Kalitz H. M.: *Microbial Proteinases*. Springer-Verlag, Berlín 1988.
- Beyon R., Bond J. S.: *Proteolytic Enzymes*. Oxford University Press, New York 2001.
- Mangel W. F., Singer P. T., Cyr D. M., Umland T. C., Toledo D. L., Stroud R. M., Pflugrath J. W., Sweet R. M.: *Biochemistry* 29, 8351 (1990).
- Novo Nordisk A/S: *Product Sheet B 562b-GB 500* 1997.
- Bonomi F., Iametti S., Rasmussen P., Restani P., Rovere P.: *High Press. Res.* 19, 175 (2000).
- Popineau Y., Pineau F., Evon P., Bérot S.: *Nahrung* 43, 361 (1999).
- Vitale L., Škrtić I., Abramić, M.: *Arch. Microbiol.* 165, 409 (1996).
- Qiu X., Padmanabhan K. P., Carperos V. E., Tulinsky A., Kline T., Maraganore J. M., Fenton J. W.: *Biochemistry* 31, 11689 (1992).
- Mietsch F., Fehér J., Halasz A.: *Nahrung.* 33, 9 (1989).
- Kristinsson H. G., Rasco B. A.: *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 40, 43 (2000).
- Novo Nordisk A/S: *Product Sheet B 318d-GB 500* 1998.
- Wu Y. F., Baek H. H., Gerard P. D., Cadwallader K. R.: *J. Food Sci.* 65, 1220 (2000).
- Karam J., Nicell, J. A.: *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 69, 141 (1997).
- Hayakawa K., Ueno Y., Nakanishi S.: *J. Soc. Ferment. Bioeng.* 71, 245 (1993).
- Turk D., Podobnik M., Popovic T., Katunuma N., Bode W., Huber R., Turk V.: *Biochemistry* 34, 4791 (1995).
- Prates J. A., Ribeiro A. M., Correia A. A.: *Meat Sci.* 57, 283 (2001).
- Fernandez-Espia M. D., Rul F.: *Eur. J. Biochem.* 263, 502 (1999).
- Ortiz S. E. M., Añón M. C.: *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 77, 1293 (2000).
- Lieske B., Konrad G.: *Int. Dairy J.* 6, 359 (1996).
- Lukáčová V., Zemanovič, J.: *Bull. Food Res.* 1, 19 (1998).
- James J., Simpson B. K.: *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 36, 437 (1996).
- Fernández M., Ordóñez J. A., Bruna J. M., Herranz B., Hoz L.: *Trends Food Technol.* 11, 201 (2000).
- Krohn A., Redshaw S., Ritchie J. C., Graves B. J., Hatada M. H.: *J. Med. Chem.* 34, 3340 (1991).
- Olsen H. S.: *Enzymes in Food Processing*. Verlag Chemie, Weinheim 1995.
- Gist-brocades, Delft Holland: *Fromase*, 1994.
- Gist-brocades, Delft Holland: *Maxiren*[®], 1994.
- Browner M. F., Smith W. W., Castelhana A. L.: Bio-

- chemistry 34, 6602 (1995).
35. Zapelana M. J., Zalacain I., Paz de Peña M., Astiasarán I., Bello J.: *J. Agric. Food Chem.* 45, 472 (1997).
 36. Picón A., Medina M.: *Food Chem.* 52, 411 (1995).
 37. Hwang J. Y., Shueb Y. S., Chang H. M.: *Food Res. Int.* 34, 639 (2001).
 38. Parka S. Y., Gibbs B. F., Leea B. H.: *Food Res. Int.* 28, 43 (1995).
 39. Gomes A. M., Malcata F. X., Klaver F. A.: *J. Dairy Sci.* 81, 2817 (1998).
 40. Drago S. R., Gonzalez R. J.: *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 1, 269 (2001).
 41. Kanekanian A., Gallagher J., Evans E. P.: *Int. J. Dairy Technol.* 53, 1 (2000).
 42. Lee J. Y., Lee H. D., Lee Ch. H.: *Food Res. Int.* 34, 217 (2001).
 43. Saha B. C., Hayashi K.: *Biotechnol. Adv.* 19, 355 (2001).

M. Hřčková^a, E. Šturdík^b, T. Maliar^c, and J. Zemanovič^a (^a*Department of Food Technology*, ^b*Department of Biochemical Technology*, Faculty of Food and Chemical Technology, Slovak Technical University, Bratislava, Slovak Republic, ^c*VUML, Drug Research Institute, Inc., Modra, Slovak Republic*): **Biochemical Properties of Proteolytic Enzymes**

Classification and nomenclature of proteolytic enzymes (peptidases) and their biochemical properties are described. Peptidases catalyze hydrolysis of peptide bonds in proteins and thus significantly affect nutritional, sensoric and textural properties of food proteins in raw materials, intermediates and end products. They found application in pharmacological research as well as in washing powders, textile and leather industry, cosmetics, etc. Good knowledge of their properties, as well as their optimal processing parameters and enzyme specificity are essential for their successful applications both in research and industry.

Dovolte mi, abych Vás upozornil na nově vycházející knihu, kterou vydává Katedra organické chemie PřF UP v Olomouci ve spolupráci s Ústavem organické chemie a biochemie AVČR a vydavatelstvím UP v Olomouci

Principy bioorganické chemie ve vývoji antivirotik a cytostatik

autora pana **doc. RNDr. Antonína Holého, Dr.Sc., Dr.h.c.**

Bližší informace o této knize najdete na adrese www.orgchem.upol.cz

doc. RNDr. Jan Hlaváč, Ph.D.
Katedra organické chemie PřF UP Olomouc
