

# PROTEAZE

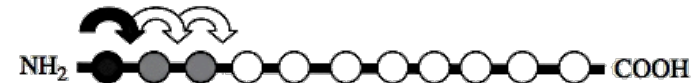
---

- hidroliza peptidne vezi
- v industrijski rabi običajno mešanica
- izvor encimov
  - rastline, živali, mo
  
- široka uporabnost proteaz
  - prehrambena industrija
    - priprava sira
    - mehčanje mesa
    - bistrenje sokov, priprava piva in vina
    - živalska prehrana
  - industrija usnja
  - čistila, detergenti
  - zdravstvene namene
    - odstranjevanje git parazitov
    - odstranjevanje mrtve kože po opeklinah
    - razgradnja medvretenčnega hrustanca pri hernii disci
    - laboratorijska uporaba

# PEPTIDAZE - uvod

- razvrstitev peptidaz (proteaze)
  - [MEROPS](#) podatkovna baza
  - razvrstitev glede na mesto cepitve
    - endopeptidaze
    - eksopeptidaze
      - aminopeptidaze
      - dipeptidaze
      - di-, tri-, peptidil-peptidaze
      - karboksipeptidaze
  - razvrstitev po katalitičnem nukleofilu
    - nukleofil reaktivna skupina na ak –OH, -SH
      - serinske
      - treoninske
      - cisteinske
    - nukleofil aktivirana voda
      - aspartatne
      - metalo
    - glutaminske (Glu/Gln diada)
  - katalitična diada/triada/oksanionska luknja
  - Berger Schechterjeva nomenklatura  
Substrat: -P3-P2-P1+P1'-P2'-P3' -  
Encim: -S3-S2-S1\*S1'-S2'-S3' -

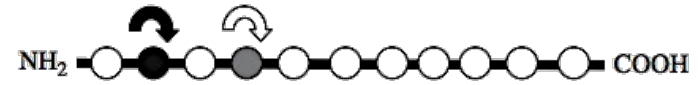
Aminopeptidase  
(EC 3.4.11)



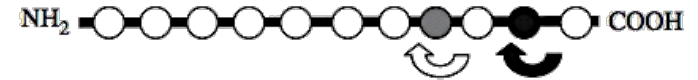
Dipeptidase  
(EC 3.4.12)



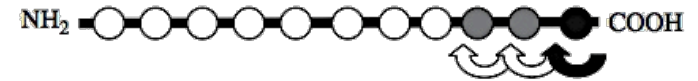
Dipeptidyl-peptidase  
(EC 3.4.14)



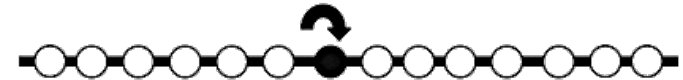
Peptidyl-dipeptidase  
(EC 3.4.15)



Carboxypeptidase  
(EC 3.4.16-18)



Endopeptidase  
(EC 3.4.21-24)



# PROTEAZE – cisteinske proteaze

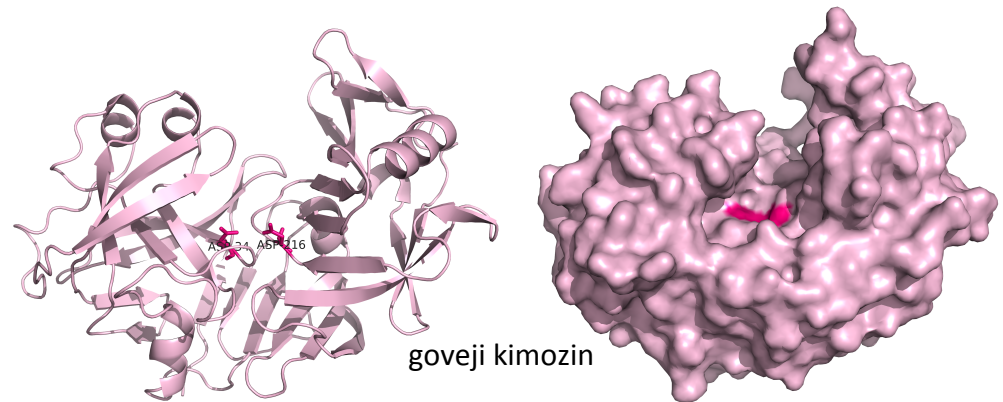
- CP prisotne v vseh orgaizmih
- 20 različnih družin CP
  - industrijsko pomembni encimi
    - papain
    - bromelain
    - ficin
    - živalski katepsini
- **papain** (*Carica papaya*)
  - 1 drevo → ~1/2 kg lateksa → ~100 mg neočiščenega papaina
  - 15 ton /leto → ~15 milijonov \$
  - surovi preparat
    - 10% papain
    - 45% kimopapain, caricain
    - 10% endo-β-1,4 glukanaza, karboksipeptidaza, lizocim, lipaze, amilaze
  - tehnični pripravek
    - v prahu → alergija
    - tekoči
- **bromelain** (*Ananas comosus*)
  - stebelni bromelain
  - bromelain v sadežu
- **ficin** (*Ficus carica*)
  - iz lateksa fig
- **Industrijska uporaba:**
  - pivovarstvo ( papain, bromelain za bistrenje)
  - pekarstvo (bromelain za preprečuje krčenje testa)
  - procesiranje hrane, priprava proteinskih hidrolizotov z dobrim okusom, marinade
  - živalska krma
  - industrija usnja
  - tekstilna industrija (procesiranje volne, svile)
  - kozmetika (papain glajenje kože)
  - v zdravstvu
    - preprečuje agregacijo trombocitov (bromelain)
    - čisti kožo po opeklinah (bromelain)
    - prebava (bromelain, papain)
    - odstranjevanje nekrotičnega tkiva (papain)



# PROTEAZE – aspartatne proteaze

- uporaba AP v sirarstvu ena prvih aplikacij encimov pri procesiranju hrane
- iz želodčkov telet, jagenjčkov pridobili renet
  - kimozin
  - pepsin
- struktura AP
  - sintetizirajo se kot preproencim
  - proencim se avtokatalitično aktivira v kislem
  - aktivno mesto Asp, Asp
- živalske AP
  - v sirarstvu
  - **kimozin**
    - rekombinantni v *S. cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *A. niger*
  - **pepsin**
- AP iz gliv
  - **mukorpepsin**
    - *Mucor miehei*, *M. pusillus*
    - bolj glikozilirani kot goveji → večja stabilnost

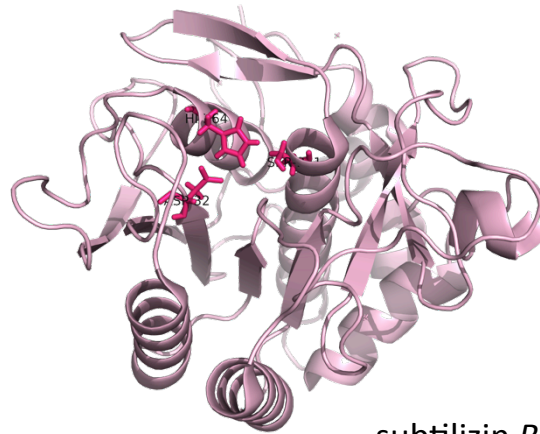
$$\text{renet aktivnost} = \frac{10 \text{ ml mleka}}{\text{koag. čas} \times \text{konc. reneta}}$$



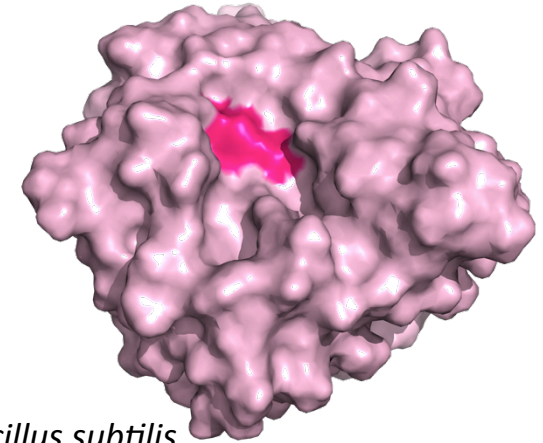


# PROTEAZE – serinske proteaze

- živalske SP
  - tripsin
  - kimotripsin
  - pankreasna elastaza
- bakterijske SP
  - subtilizin
- lastnosti SP
  - sintetizirani kot proencimi
    - pomembno pri rekombinantnih proteinih za pravilno zvijanje
  - katalitična triada Ser, His, Asp
- uporabnost SP
  - detergenti (stabilni v alkalnem)
  - digestiv (pankreatin-tehnični pripravek pankreasa)
  - predelava usnja (tripsin, pankreatin)
  - razgradnja elastina (pankreasna elastaza)
  - tretiranje rane (tripsin)



subtilizin *Bacillus subtilis*  
Carlsberg

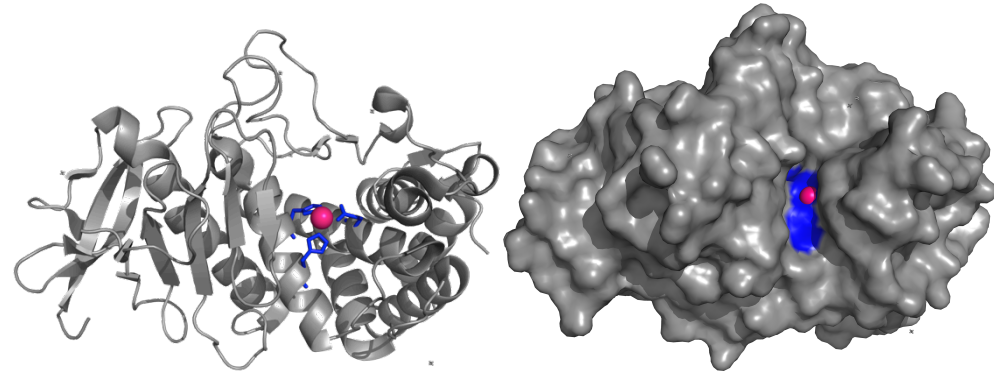


# PROTEAZE - metaloproteaze

- številni predstavniki
- večina poroteaz ima  $Zn^{2+}$  ( $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ )
- kov. ion kompleksiran s His, Asp, Glu ali Lys

- **termolizin** (*Bacillus*)

- preproencim (proregija -200ak)
- specifičnost velike hidrofobne ak
- uporaba:
  - priprava proteinskih hidrolizatov
  - priprava "okusnih" peptidov
  - pivovarstvo
  - priprava usnja
  - pekarstvo
  - čiščenje odpadkov v klavnici
  - znanost: ak zaporedje

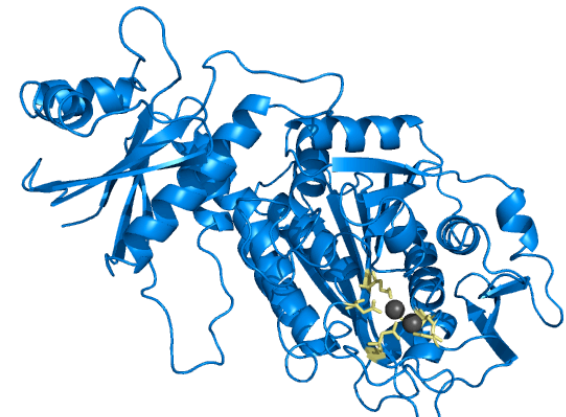


termolizin ( $Zn^{2+}$ )  
*Bacillus thermoproteolyticus*

- metaloaminopeptidaze

- **leucin aminopeptidaza** (*Rhizopus, Aspergillus*)

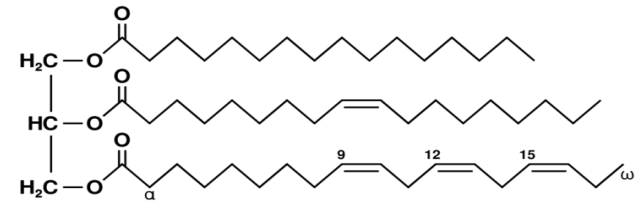
- dvodomenski protein
- aktivno mesto na C-koncu
- Asp in Arg katalitični ak
- tvori heksamerno kvartarno strukturo
- uporaba:
  - priprava proteinskih hidrolizatov



goveja leucinaminopeptidaza ( $2 Zn^{2+}$ )

# LIPAZE

- maščobe, olja → estri mk in glicerola
- pomembna vloga pri hrani
  - okus
  - prenašalci arome
- uporaba maščob
  - številne aplikacije
    - mehčalci, lubrikanti, tekstil, barve, dodatek hrani
  - mk in glicerol osnova za druge produkte
- razgradnja maščob:
  - fizikalno kemijske metode
  - encimske modifikacije
    - lipolitični encimi
      - esteraze
      - lipaze
      - fosfolipaze
- vir lipaz:
  - pankreas (lipaze)
  - jetra (esteraze)
  - rastline (semena)
  - mo (na površini)
    - *Bacillus*, *Pseudomonas*
    - *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*
    - *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*



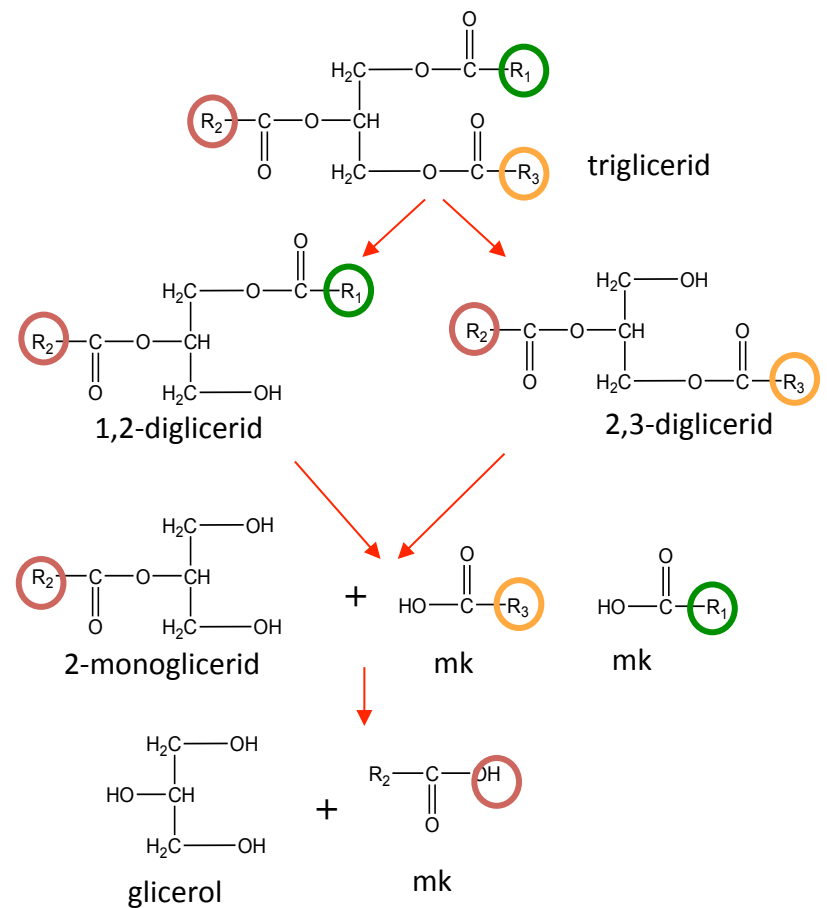
nenasičen triglicerid

# LIPAZE

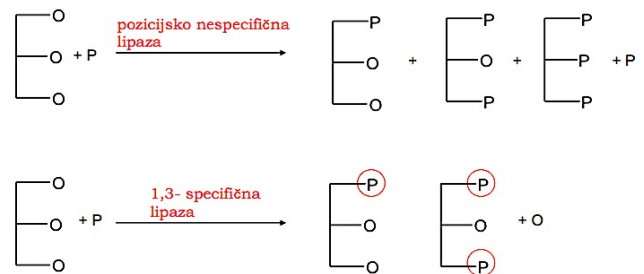
- **esteraze/lipaze/fosfolipaze**  
triacilglicerol acilhidrolaze (EC 3.1.1.3)

- **aktivnosti:**
  - esterazna
    - hidroliza estrov maščobnih kislin
  - lipazna
    - hidrolizirajo estre na meji olje/voda
    - večina lipaz nespecifičnih
  - fosfolipazna
    - hidrolizirajo fosfolipide

- **uporabnost lipaz:**
  - procesiranje maščob in olj
  - prehrambena
  - detergenti
  - papirna industrija
  - okolje
  - procesiranje čaja
  - biosenzorji
  - za določevanje količine trigliceridov v krvi

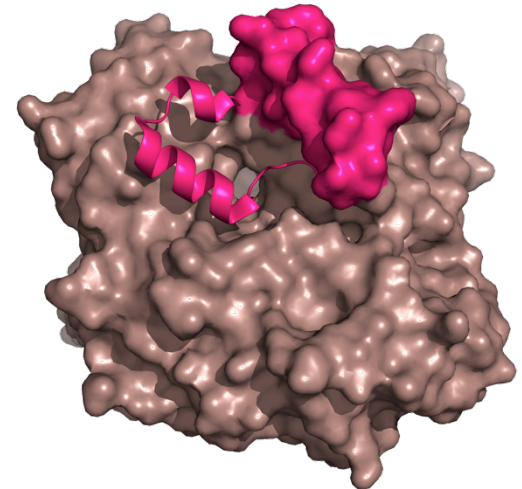


Regiospecifičnost se določa z transesterifikacijsko reakcijo trioleina s palmitinsko kislino.

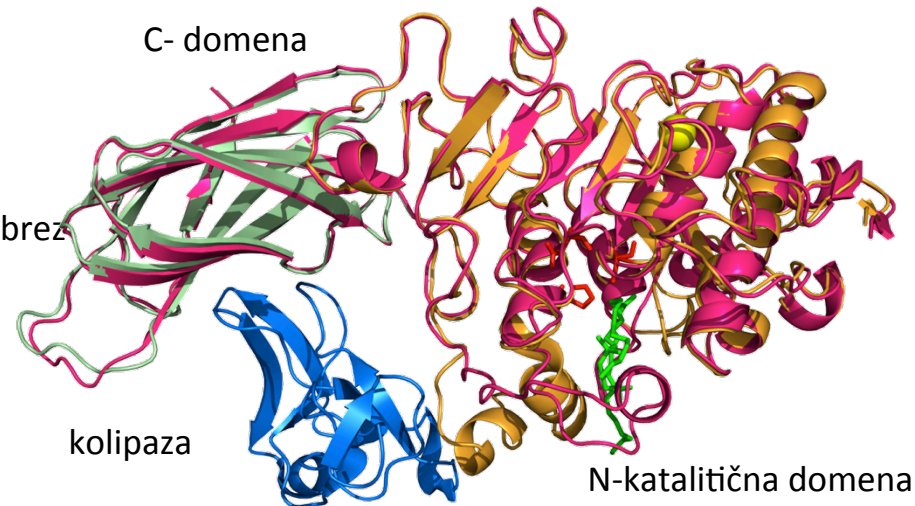


# LIPAZE

- lipaze so podrazred esteraz
- lipaze hidrolizirajo netopne maščobe
  - delujejo na topne in netopne substrate
  - za slednje MM kinetika ne velja
  - medfazna kinetika
- strukturne lastnosti
  - 7 družin
  - različno velike in različno kompleksne
  - $\alpha/\beta$  hidrolaze
  - katalitična triada His, Ser, Asp/Glu
  - aktivno mest je zaščiteno s pokrovom
  - pri pogojih z malo vode delujejo reverzibilno
  - evkariontske lipaze kompleksne (PL)
    - N-katalitična domena
    - C-končna domena
    - kolipaza (pripne lipazo na lipidno površino) – brez konf. sprememb
- lipazna specifičnost
  - v aktivnem mestu žep
  - specifičnost določa velikost, oblika in hidrofobnost
  - pomembno za načrtovanje boljših lastnosti



lipaza *Candida rugosa*  
odprta/zaprta oblika

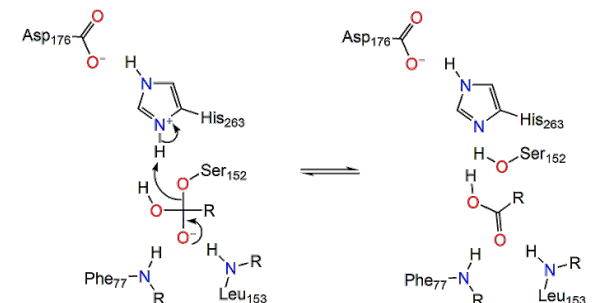
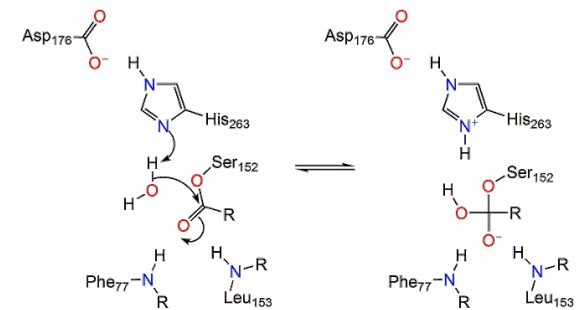
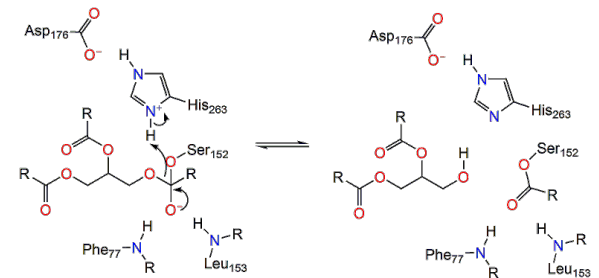
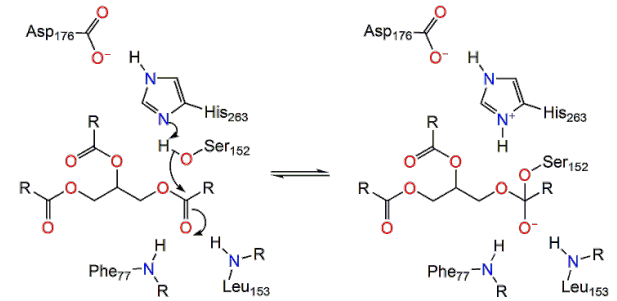


pankreasna lipaza (PL)

# LIPAZE – lipaze

- mehanizem reakcije

- katalitična triada podobna kimotripsinu
- His, Ser, Asp/Glu
- Asp tvori H-vez s His
- His deluje kot baza in deprotonira Ser
- Ser nukleofilno napade karbonilno sk. estrske vezi na mestih 1 ali 3 glicerolnega ogrodja
- nastane negativno nabiti tetraedrični intermediat
- oksanionska luknja
- voda donira proton His
- reaktivni hidroksilni ion izvede nukl. napad na karbonilni atom lipida
- drugi tetraedrični intermediat
- oksanionska luknja
- vzpostavi se izhodno stanje katalitičnega mesta





# LIPAZE – lipaze in biodizel

- biodizel

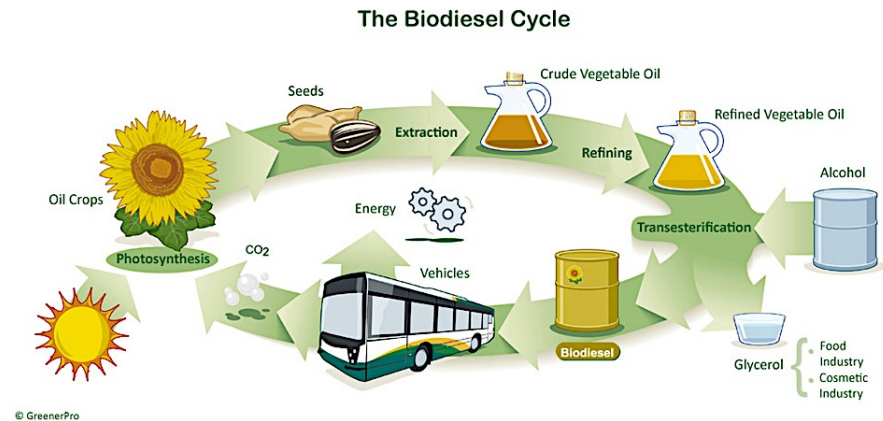
- mešanica alkilnih estrov mk
- nadomestek dizla pridobljenega iz nafte
- ima boljše specifikacije
  - gostota
  - viskoznost
  - cetansko število je višje (*nagnjenost goriva za samovžig vžig*)
  - plamenišče 120°C vs. 61°C dizel (*najnižja T pri kateri je nad tekočino toliko hlapov, da se zmes hlapov in zraka v stiku s plamenom vname*)

- industrijsko se izvaja s transesterifikacijo rastlinskih olj ali živalskih maščob s krakoverižnimi alkoholi

- metanol (najcenejši)
- etanol
- izopropanol
- daljši linearni ali razvejani alkoholi

- biodizel je ekološko bolj primeren kot naftni dizel

- manj CO<sub>2</sub> polucije
  - Kyoto deklaracija zniževanje CO<sub>2</sub>
  - EU planira vse večjo uporabo biodizla
- manj nevaren

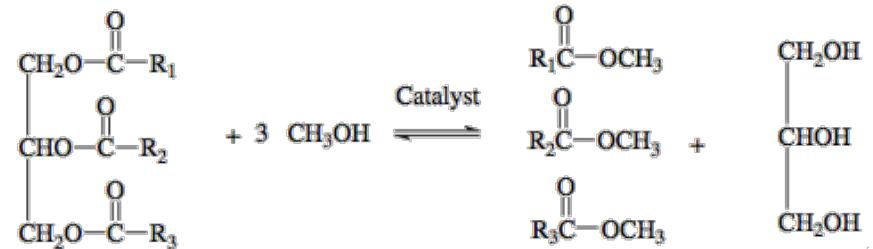


World production (million tons)	Fats and oils	Five major producers
24.4	Animal fat	USA, China, Brazil, Germany, and France
3.7	Coconut oil	Philippines, Indonesia, India, Vietnam, and Mexico
4.8	Cottonseed oil	China, India, Pakistan, Uzbekistan, and USA
5.3	Groundnut oil	China, India, Nigeria, Myanmar, and Sudan
0.6	Linseed oil	China, Belgium, USA, Ethiopia, and India
2.3	Maize oil	USA, China, Japan, Brazil, and South Africa
2.9	Olive oil	Spain, Italy, Greece, Syrian Arab Republic, and Tunisia
5.6	Palm kernel oil	Indonesia, Malaysia, Nigeria, Thailand, and Colombia
23.9	Palm oil	Malaysia, Nigeria, Thailand, Colombia, and Côte d'Ivoire
21.2	Rapeseed oil	China, Germany, India, Canada, and France
0.1	Safflower oil	India, USA, and Argentina
0.9	Sesame oil	Myanmar, China, India, Sudan, and Japan
36.0	Soybean oil	USA, China, Brazil, Argentina and India
13.0	Sunflower oil	Russian Federation, Ukraine, Argentina, Turkey, and France

# LIPAZE – lipaze in biodizel

- kemijska priprava biodizla

- prebitek MeOH
- katalizator NaOH
- transesterifikacija
- iz trigliceridov nastanejo metilni estri in glicerol



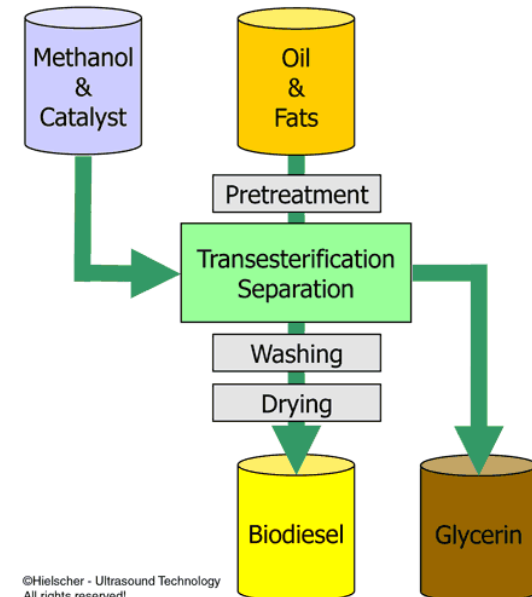
- znotraj sistema poteče več reakcij:

- najprej NaOH reagira z MeOH → Na-metoksid
- Na-metoksid reagira z trigliceridi in nastane → FAME (fatty acid methyl esters)



- stranski produkti

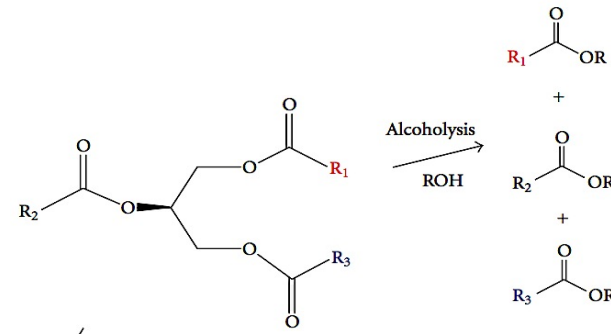
- glicerol → kozmetična, farmavevtska ind.
- di, mono gliceridi (delna alkoholiza)
- pri povečani kislosti nastane še milo





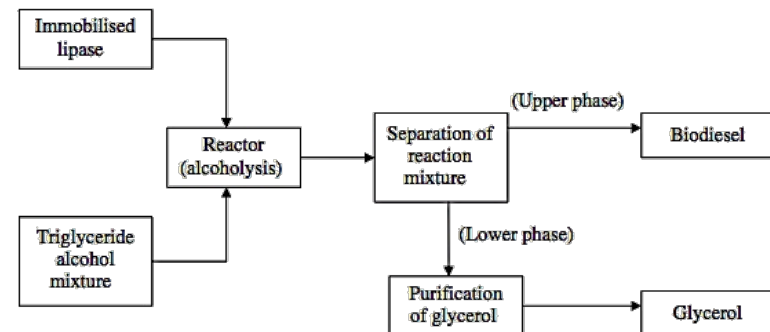
# LIPAZE – lipaze in biodizel

- encimska priprava biodizla
  - prvič opisano 1990
  - lipaze katalizirajo alkoholizo in esterifikacijo prostih mk v mediju z nizko vsebnostjo vode
    - lipaze v nevodnem mediju katalizirajo transesterifikacijo (ne pa hidrolize)
  - končni produkt estri mk in glicerol (brez stranskih produktov)
  - cena lipaz komercialno neugodna za pripravo biodizla
  - številne lipaze v uporabi



Sources	pH	T (°C)
<i>Candida rugosa</i>	5–8	35–50
<i>Pseudozyma antarctica A</i>	6–10	35–70
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	6–9	30–50
<i>Aspergillus niger</i>	6–8	40–55
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5.5–7.5	35–45
<i>Bacillus subtilis</i>	8–10	30–40
<i>Geotrichum candidum</i>	6.5–8.0	32–42
<i>Streptomyces rimosus</i>	8.5–10.0	45–60
<i>Yarrowia lipolytica</i>	4–7	30–45
<i>Rhizopus niveus</i>	5–7	30–45
<i>Rhizomucor miehei</i>	6.5–7.5	30–40
Porcine pancreatin	6–9	40–55
Castor bean ( <i>Ricinus communis</i> )	4.0–4.5	30–35

- prednosti imobilizirane lipaze
  - recikliranje
  - kontinuirna uporaba
  - imobilizacija na kaolinit  $\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$
  - reakcija poteka pri molarjem razmerju olje:alkohol 1:3



# LIPAZE - fosfolipaze

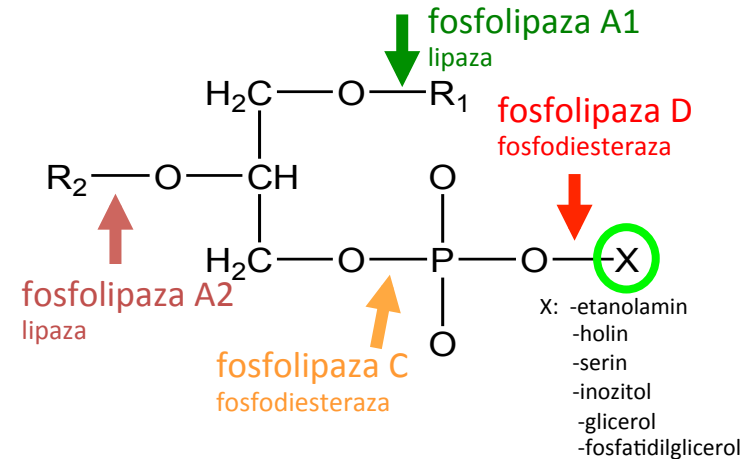
- fosfolipaza

- hidrolizirajo fosfolipide

- fosfolipaza A1 (kačji strup)
- fosfolipaza A2 (pankreas)
- fosfolipaza C (*Clostridium*, *Bacillus*, *Aspergillus*)
- fosfolipaza D (rastline, mo)

- fosfolipaza A2

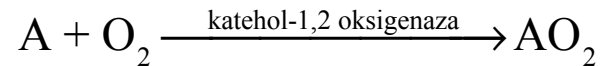
- za hidrolizo lecitina na mestu 2
- **lecitin** je rumeno-rjava maščoba v rastlinah in živalih (rumenjaki, soja, žitarice)
  - fosforna k., m.k.
  - glicerol, glikolipidi, trigliceridi
  - fosfolipidi, fosfatidil etanolamin,
  - fosfatidil holin, fosfatidil inozitol
- uporabnost
  - kozmetika-emulzifikator
  - surfaktant
  - lubrikant



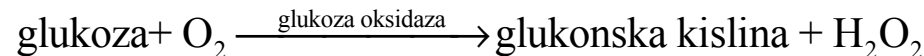
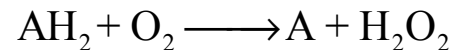
# OKSIDOREDUKTAZE

- Reakcije, ki jih katalizirajo oksidaze

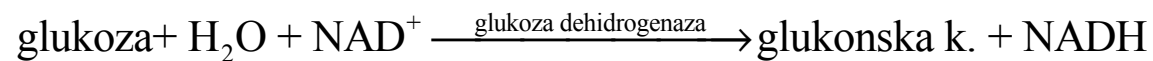
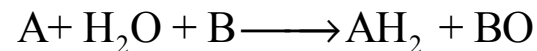
- dva atoma kisika se preneseta na substrat



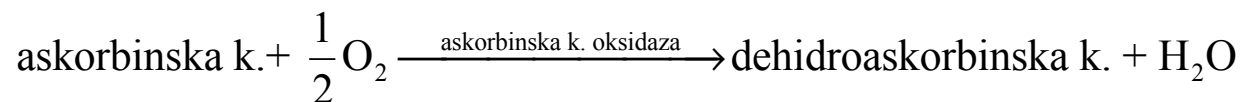
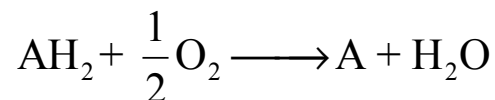
- substrat se oksidira preko prenosa 2H do  $O_2$  ob nastanku  $H_2O_2$



- prenos enega kisika na substrat

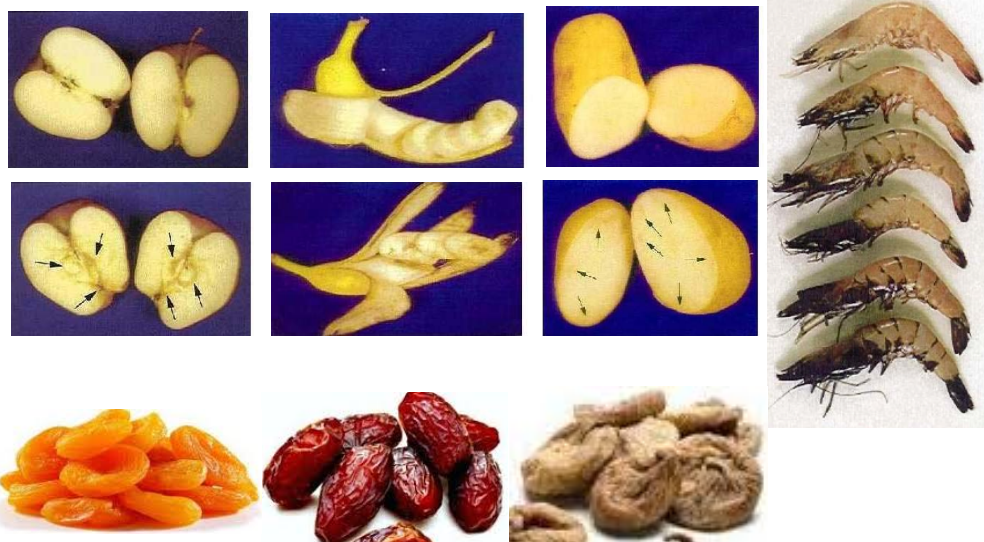


- kisikov atom potreben za oksidacijo prihaja iz  $H_2O$



# OKSIDOREDUKTAZE – polifenol oksidaza

- pri hrani zelo pomembna izgled, tekstura in nutrijska vrednost
- rjavenje (melanoza) je kemijski proces
  - sadje
  - zelenjava
  - morska hrana
  - gobe



- rjavenje pri posušenem sadju
  - datelji
  - marelice
  - fige

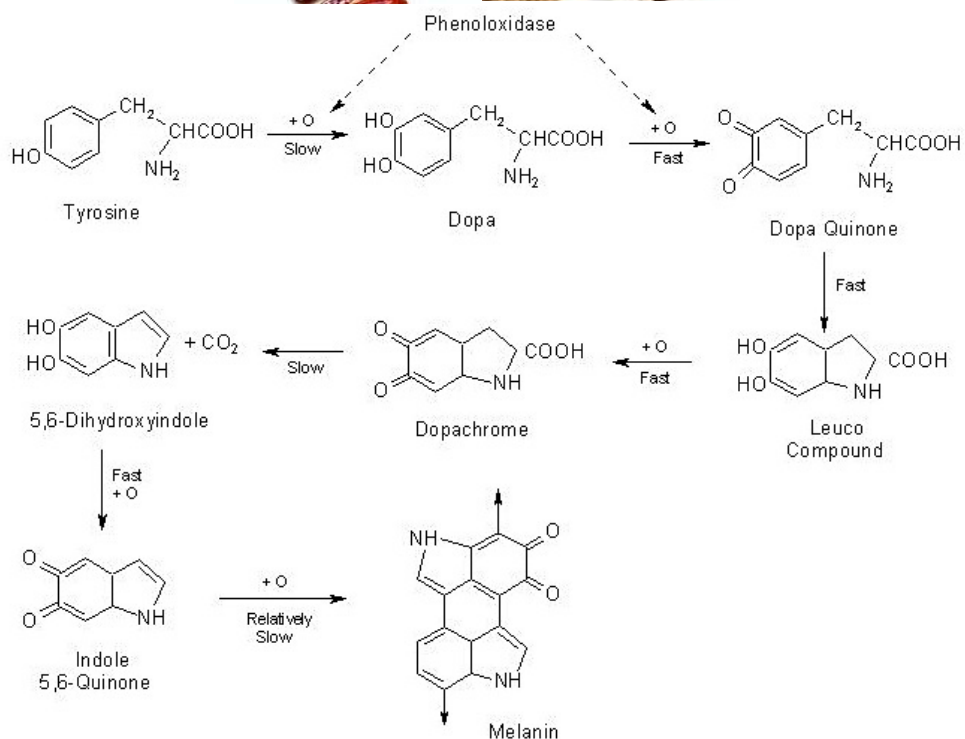
## nastanek melanoze

- endogeni encimi katalizirajo nastanek kinonov iz fenolnih spojin
- molekularni  $O_2$  se reducira do  $H_2O$
- nastali kinoni polimerizirajo do melanina

## polifenol oksidaza katalizira dve osnovni reakciji

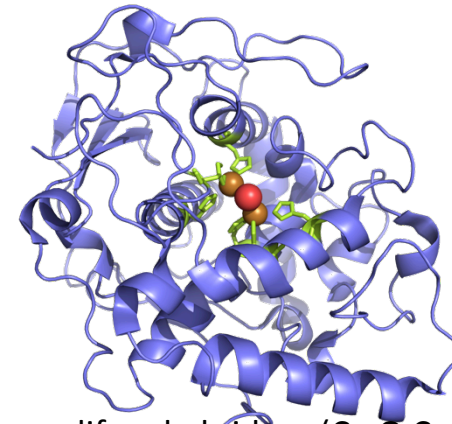
- hidroksilacijo na o-mestu monofenola (monofenolna oksidazna aktivnost)
- oksidacija difenola do o-benzokinona (difenol oksidazna aktivnost)

- pomen limone

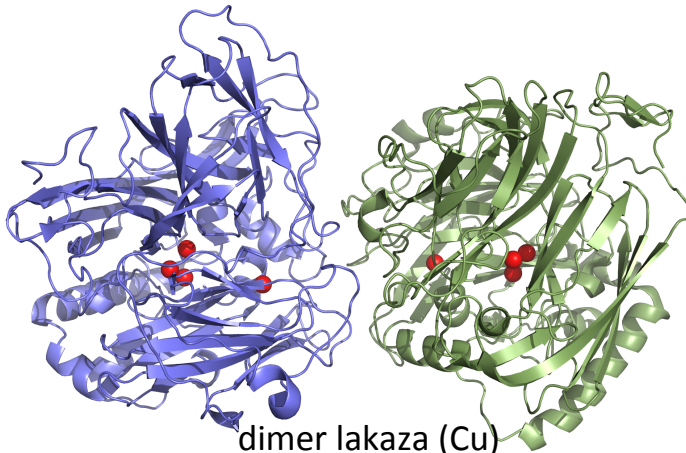


# OKSIDOREDUKTAZE– polifenol oksidaza

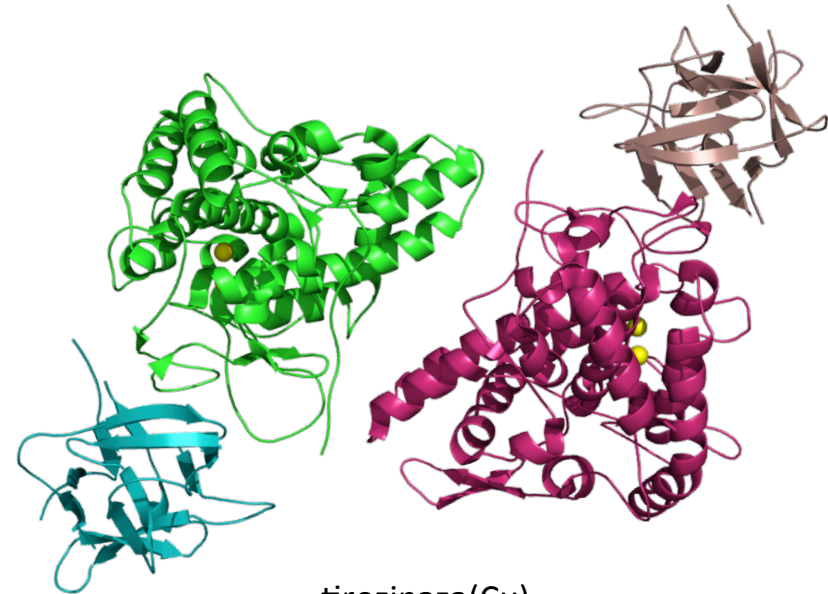
- polifenol oksidaze :
  - lakaze
    - dimer
  - katehol oksidaze
    - monomer
  - tirozinaze
    - substrat je tirozin
    - tetramer



polifenol oksidaza (Cu O Cu)  
*Vitis vinifera*



dimer lakaza (Cu)  
*Melanocarpus albomyces*



tirozinaza(Cu)  
*Agaricus bisporus*

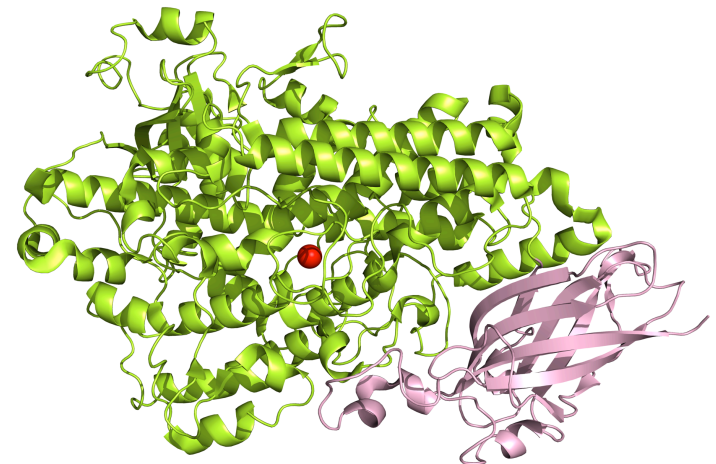
# OKSIDOREDUKTAZE– polifenol oksidaza

## KONTROLA RJAVENTJA:

- oksidacija se lahko prepreči na več načinov
  - eliminacija O<sub>2</sub>
    - zelo zavleče rjavenje
    - namakanjem v vodi ali sirupu
    - vakuum
    - dodatek glukoze oksidaze (porabi O<sub>2</sub> za oksidacijo glukoze do glukonske k.)
  - vpliv na aktivnost encima
    - inaktivacija E s toplotno obdelavo (primerna samo za zmrznjeno sadje ali zelenjavo)
    - pasterizacija 60-80°C
    - hitra obdelava s T 75-105°C (grah)
    - obdelava s pritiskom
    - inhibitorji
      - alifatski alkoholi
      - peptidi
      - aromatske kisline
  - odstranitev Cu<sup>2+</sup>
    - dodajanjem kelirajočih agensov
  - substrat
    - dodatek spojin, ki reagirajo s produkti PPO → ni melanizacije
- obsevanje z γ- ali X-žarki se tudi uporabljajo za ohranjanje svežine sadja

# OKSIDOREDUKTAZE– lipoksigenaza

- ne-hem vsebujoča Fe dioksigenaza
- regioselektivno in stereospecifično katalizira
  - peroksidacijo poli nenasičene m.k
  - kooksidacijo drugih spojin
  - $\text{Fe}^{2+} \leftrightarrow \text{Fe}^{3+}$
  - His v aktivnem mestu
- rastline, mo in živali.
- uporablja se za procesiranje maščob



lipoksigenaza ( $\text{Fe}^{2+}$ )

soja