

## PŘEHLEDOVÝ ČLÁNEK / REVIEW ARTICLE

# MIKROBIÁLNÍ PROTEÁZY A JEJICH APLIKAČNÍ VYUŽITÍ MICROBIAL PROTEASES AND THEIR APPLICATIONS

Tomáš Válek, Miroslav Pohanka

Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany, Hradec Králové

Přijato 6. listopadu 2017.

Zrevidováno 4. ledna 2018.

Zveřejněno 9. března 2018.

### Souhrn

Proteasy jsou skupina enzymů mikrobiálního, rostlinného i živočišného původu s nezastupitelným významem v základním metabolismu. Jedná se však i o materiál, který je vhodný k biotechnologickým aplikacím v širokém spektru oblastí jako je potravinový průmysl, výroba čisticích prostředků a medicínské využití. Tento přehledový článek shrnuje základní informace o proteasách a nastiňuje příklady jejich použití.

*Klíčová slova: proteasy; enzym; biotechnologie; mikrobiální*

### Summary

Proteases are enzymes microbial, plant or animal origin with crucial importance in the basic metabolism. It is also a suitable material for biotechnological applications in a wide range of fields of interests like food industry, cleaning agents and medicine applications. This review paper surveys basic data about proteases and provides representative examples of their application.

*Key words: protease; enzyme; biotechnology; microbial*

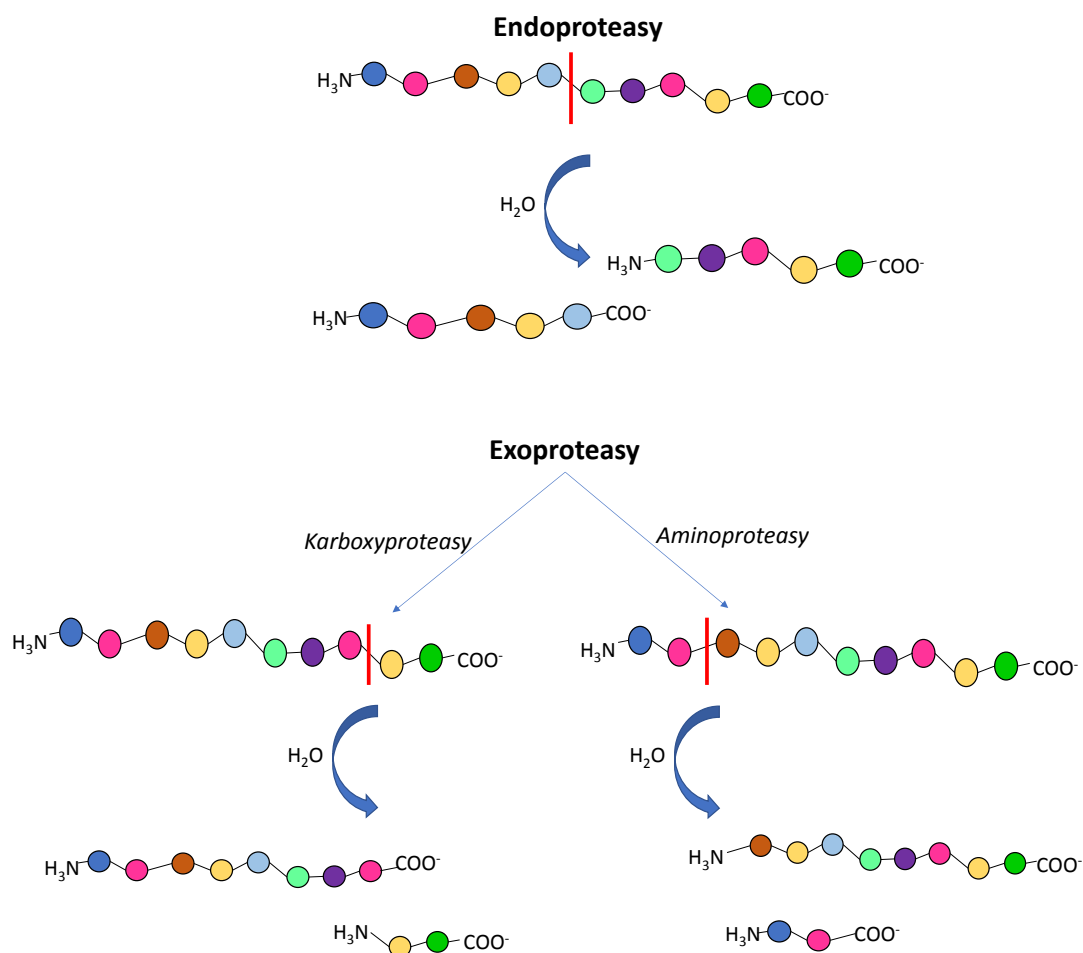
### Úvod

Proteasy jsou hydrolytické enzymy běžně se vyskytující v těle živočichů, rostlin, hub a mikroorganismů včetně virů (1, 2). Majoritně se využívají v průmyslu a biotechnologiích, kde je lze označit za významnou komoditu. Celosvětový obchod s enzymy byl v roce 2015 odhadován na 7 mld. USD, z toho proteasy tvoří 60% celosvětového prodeje enzymů (3). V současné době jsou z proteas nejvíce využívány mikrobiální proteasy, které tvoří 40 % celkového obchodního obrátu a poptávka se neustále zvyšuje v souvislosti s tím, jak roste zájem o aplikační využití (2, 3). Vzhledem k nízké efektivitě produkce proteas z rostlin a živočichů se začaly, jako producenti velkého množství, využívat mikroorganismy (2). Existuje mnoho mikroorganismů schopných produkovat proteasy, ale jen malé procento z nich je vhodné k průmyslovému, medicínskému a jinému aplikačnímu využití (4). Proteasy mohou katalyzovat řadu odlišných reakcí a je zapotřebí vybrat právě ty, jež splňují kritéria pro využití v analytické chemii, medicíně či biotechnologiích (2). Většina komerčně využívaných proteas pochází z mikroorganismů rodu *Bacillus*. Využití mikrobiálních forem života pro produkci enzymů má několik výhod: produkce velkého množství enzymu

za krátkou časovou jednotku, rychlý generační cyklus, nízké nároky na vybavení a prostor a snadná genetická manipulace (1, 5). Dnes na průmyslový sektor vzniká tlak k využívání co nejvíce ekologicky šetrných postupů a metod zpracování, proto technologie využívající enzymy jsou jednou z nejperspektivnějších cest. Biotechnologie využívající proteasy stále více nahrazují tradiční průmyslové výrobní postupy a vytlačují neekologické chemické katalyzátory (1, 3). Moderní metody genetického inženýrství vedou k produkci proteas přímo navržených tak, aby jejich struktura a vlastnosti co nejvíce odpovídaly kladeným požadavkům (1). To vede k tvorbě nových proteas s vylepšenými vlastnostmi jako jsou vyšší katalytická aktivita, teplotní a pH stabilita či specifická reakce (1, 4, 6).

### Funkce a klasifikace

Proteasy jsou hydrolytické enzymy štěpící peptidové vazby, čímž dávají vzniknout kratším peptidům nebo jednotlivým aminokyselinám. Klasifikace proteas dle běžné nomenklatury je do jisté míry neustálená, vzhledem k obrovské rozmanitosti složení a funkcí, ale dle základní EC klasifikace patří do skupiny 3 a podskupiny 4 (EC.3.4) s výjimkou asparaginových peptidových lyas. Proteasy můžeme rozdělit na dvě hlavní skupiny vzhledem ke schopnosti štěpit peptidy na konkrétních místech na exo- a endoproteasy. Exoproteasy mají schopnost štěpit peptidové vazby na N- nebo C- koncích peptidů a řadíme sem amino- a karboxyproteasy. Aminoproteasy štěpí peptidové vazby na N- konci a odstříhnou jednu, dvě nebo tři aminokyseliny. Karboxyproteasy štěpí aminokyseliny na C- konci peptidu a hydrolyticky odštěpí jednu nebo dvě aminokyseliny. Schopnost štěpit vnitřní vazby v molekule polypeptidu mají proteasy řazené do skupiny endoproteas (2, 7, 8). Rozdělení proteas podle schopnosti štěpit proteiny na peptidy je znázorněno na Obrázku 1.



Obrázek 1. Rozdělení proteas podle schopnosti štěpit proteiny.

Proteasy dále dělíme do sedmi podskupin dle typu aktivního místa (serinové proteasy, aspartátové proteasy, cysteinové proteasy, metaloproteasy, threoninové proteasy, glutamátové proteasy, asparaginové peptidové lyasy) (1). Serinové proteasy jsou charakterizovány podle přítomnosti serinové skupiny v aktivním místě enzymu, které tvoří katalytická triáda serin-aspartát-histidin. Vyznačují se širokým optimálním rozmezím pH (7 – 11), při kterém jsou schopné katalýzy a širokou substrátovou specifitou (9-11). Vyskytují se v každém typu organismu a zastávají mnoho funkcí. Napomáhají bakteriím získávat živiny, ale mohou mít i význam mimo metabolismus – podílejí se například na infekčním procesu virů. V lidském těle jsou součástí trávicích šťáv, imunitního systému a účastní se srážení krve a patří sem např. trypsin, chymotrypsin, elastasa, proteinasa K, trombin, enterokinas a další (12, 13). Aspartátové proteasy jsou známy jako kyselé proteasy, jejichž název je odvozen od zbytků kyseliny asparagové v aktivním centru. Většina aspartátových proteas má maximální katalytickou aktivitu při nízkém pH (pH 3 – 4) a u obratlovců slouží především jako trávicí enzymy. Mezi nejznámější aspartátové proteasy patří pepsin, první charakterizovaný enzym vůbec. Cysteinové proteasy se vyskytují v eukaryotních i prokaryotních organismech. Aktivním centrem je dyáda složená z cysteinu a histidinu. Cysteinové proteasy jsou obsaženy v ovoci jako je například papája, kiwi či fíky a patří sem papain, bromelin a ficin. Ve větším množství se vyskytují, pokud je ovoce nezralé. Metaloproteasy jsou spolu se serinovými proteasami nejrozmanitější skupinou proteas. Vyžadují dvojjazyčný kovový iont (nejčastěji zinek, ale třeba i kobalt nebo mangan) pro jejich katalytickou aktivitu a mají širokou substrátovou specifitu (2, 13, 14). V organismu zastávají řadu důležitých funkcí, podílí se na buněčné proliferaci a diferenciaci, remodelaci extracelulární matrix, vaskularizaci, buněčné migraci atd. (15). Abnormální aktivita těchto enzymů může poukazovat na onemocnění jako jsou artritida, rakovina, kardiovaskulární onemocnění apod. (5). Mikrobiální metaloproteasy mohou být izolovány jak z grampozitivních, tak z gramnegativních bakterií. Mezi proteasy z grampozitivních bakterií patří např. termolysin (*Bacillus thermoproteolyticus*), kolagenasa (*Clostridium histolyticum*), botulotoxin a tetanový neurotoxin (*Clostridium botulinum* a *Clostridium tetani*), IgA (*Streptococcus sanguis*), proteasa V8 (*Staphylococcus aureus*) atd. Mezi proteasy původem z gramnegativních bakterií řadíme elastasu a alkalickou proteasu (*Pseudomonas aeruginosa*), proteiny HA 70 a HA 89 štěpící mucin, fibronektin a laktoferrin (*Vibrio cholerae*) a další proteasy (16). Threoninové proteasy označujeme jako N-terminální nukleofilní hydrolasy, kde navázaný threoninový zbytek na N-konci nukleofilně štěpí konkrétní vazby. Vyskytují se v prokaryotních organismech a patří sem např. penicilinacylasa. Glutamátové proteasy byly dříve řazeny do skupiny aspartátových proteas, dnes jsou díky analýze katalytického systému řazeny do samostatné skupiny. Vyznačují se katalytickou dyádou glutaminu a glutamátu aktivující nukleofilní molekulu vody. Glutamátové proteasy byly objeveny pouze u vřecokvůtrných hub (*Ascomycota*). Asparaginové peptidové lyasy byly jako sedmý typ proteas objeveny až v roce 2004. Ačkoli do té doby převládal názor, že všechny proteasy jsou proteolytické enzymy, které peptidy štěpí hydrolyticky, s objevem asparaginových peptidových lyas musel být tento názor změněn, protože tento typ proteas mezi hydrolasy nepatří (17, 18). Rozdělení proteas je shrnuto v Tabulce 1.

### Průmyslové aplikace

Vzhledem k faktu že, proteasy se vyskytují ve všech typech organismů, a tvoří je řada enzymů různých vlastností, využívají se hojně v medicíně i v průmyslu. V současnosti jsou proteasy nejvíce využívanými enzymy

**Tabulka 1.** Rozdělení proteas

Skupina proteas	EC klasifikace	Aktivní centrum	Typ reakce
<i>Serinové proteasy</i>	EC 3.4.21	serin	endopeptidasa
<i>Threoninové proteasy</i>	EC 3.4.25	threonin	endopeptidasa
<i>Aspartátové proteasy</i>	EC 3.4.23	kyselina asparagová	endopeptidasa
<i>Cysteinové proteasy</i>	EC 3.4.18 (exopeptidáza) EC3.4.22 (endopeptidáza)	cystein	exo- i endopeptidasa
<i>Glutamátové proteasy</i>	EC 3.4.23.32	glutamát	endopeptidasa
<i>Asparaginové peptidové lyasy</i>	EC 4.3.2	asparagin	endopeptidasa
<i>Metaloproteasy</i>	EC 3.4.17 (exopeptidáza) EC 3.4.24 (endopeptidáza)	obvykle zinek nebo kobalt	exo- i endopeptidasa

v široké škále průmyslových odvětví. Jakožto velice rozmanitá skupina katalyzátorů mají proteasy mnoho výhod hned z několika důvodů: mají velkou specifitu vazebného místa, vysokou katalytickou aktivitu a jsou stabilní při širokém teplotním a pH spektru. Nejvíce se proteasy využívají v potravinářském, farmaceutickém a kožesnickém průmyslu a při výrobě detergentů (1, 2, 6). V detergentech se využívají jako složka čistících prostředků do domácnosti, přípravků pro čištění kontaktních čoček, čističů zubních protéz a pracích prášků (19-21). Čtvrtinu celosvětového komerčního obrátu proteas tvoří právě výroba pracích prášků. Je třeba zdůraznit, že zájem o proteasy je dlouhodobé povahy. Například první přípravek obsahující detergent spolu s bakteriálními proteasami a dalšími enzymy byl vyroben pod názvem BIO-40 v roce 1956 (2). Současné metody, které využívá kožesnický průmysl, pracují s nebezpečnými chemikáliemi, jenž mají velký dopad na životní prostředí. Enzymy představují jejich šetrnou alternativu, protože jsou schopné zároveň zlepšit kvalitu kůže a redukovat znečištění životního prostředí (19, 20). V potravinářském průmyslu se proteasy využívají již od antiky, např. při zpracování sýrů. V té době ještě nebyly známy mikroorganismy ani enzymy, nicméně jejich katalytické aktivity při zpracování mléčných výrobků bylo využito již v minulých tisíciletích. Dnes se běžně využívají proteasy z rodu *Bacillus* při zpracování mléčných výrobků (především sýrů), v pekařství, při zpracování masa a sóji atd. (14, 21, 22). Hlavními funkcemi je koagulace mléka a dodání charakteristické chuti při zrácích procesech (2). V pekařství se endo- i exoproteasy z *Aspergillus ozyzae* využívají k proteolýze nerozpustného proteinu glutenu (23). Jeho proteolýzou se mění vlastnosti při zpracování těsta a dle způsobu aplikace lze připravit široké spektrum finálních produktů. Přidáním bakteriálních proteas se zkracuje čas potřebný ke zpracování těsta a zlepšují se jeho vlastnosti, což vede k vyšší produkci (2). Sójové boby mají velkou výživovou hodnotu díky vysokému obsahu bílkovin. Při procesech úpravy sóji se využívají houbové proteasy ke zvýšení rozpustnosti a stravitelnosti proteinů a pro redukci hořkosti (14, 22). Proteinové hydrolyzáty jsou součástí dietetických, zdravotních a výživových produktů. Nevýhodou je jejich hořká chuť, způsobená přítomností hydrofobních aminokyselin nebo prolinu v hydrolyzátu. Peptidasy schopné odštěpit nežádoucí hořké komponenty jsou využívány ke zlepšení chuti produktů.

### Využití proteas v medicíně a výzkumu

Velká rozmanitost a specifita je rovněž výhodou při vývoji terapeutických, medicínských či farmaceutických metod. Proteasy se v lidském organismu účastní řady důležitých biochemických reakcí, jsou nezbytné při trávení potravy v trávicím traktu, srážení krve a imunologických a zánětlivých reakcích, podílí se na apoptose i nekróze, jsou důležitou součástí kožní bariéry, ovlivňují DNA replikaci a transkripci, buněčnou proliferaci a diferenciaci, tkáňovou morfogenezi a remodelaci, účastní re angiogeneze, neurogeneze, ovulace a fertilizace a mají řadu dalších důležitých funkcí. Nedostatek nebo abnormální aktivita těchto enzymů navozuje závažná onemocnění, jejichž léčba často vyžaduje umělé dodání těchto enzymů do organismu a mikrobiální enzymy se ukázaly být vhodnou alternativou (24, 25). Např. orální podání proteas z *Aspergillus ozyzae* napomáhá trávení při syndromu deficiencie lytických enzymů, kolagenasa z rodu *Clostridium* se používá jako součást léčebných procesů při popáleninách a asparagináza z *E. coli* je využívána k eliminaci asparaginu z krve při akutní lymfoblastické leukemii, serratiopeptidasa z bakterií rodu *Serratia* jsou velmi účinné protizánětlivé léčivo, nattokinasa z *Bacillus subtilis* se používá jako potravinový doplněk při kardiovaskulárních chorobách, kde by měla předcházet srážení krve a rozpouštění trombus (2, 11). V dermatologii se proteasy využívají k odstranění keratinizované kůže, k odstranění jizev, rychlejší regeneraci epitelu a k tvorbě vakcín proti dermatofytózám (11). Kromě léčby jsou proteasy i významnými biomarkery pomáhající při diagnostice onemocnění. Např. matrixové metaloproteasy (MMPs), katepsiny a kaspasy byly na základě výzkumu navrženy jako markery kardiometabolických poruch. V nedávných studiích byly zjištěny zvýšené hladiny MMPs u pacientů s arteriosklerosou karotid, sérový katepsin L byl zvýšen u pacientů s akutním infarktem myokardu a při koronární srdeční chorobě a sérová kaspasa-1 byla zvýšena u anginy pectoris (26). Proteasy mají čím dál tím důležitější roli i v oblasti výzkumu. Zatímco se dříve peptidy nebo proteiny pro molekulární biologii připravovaly chemickou syntézou, dnes se k jejich produkci používají právě proteasy. Např. termolysin nebo chymotrypsin se využívají k produkci somatostatinu či vasopresinu a papain se používá k přípravě oxytocinu a myší EGF. I produkce Klenowova fragmentu, který je využíván v technologiích rekombinantní DNA, může být zajištěna proteolytickým štěpením pomocí proteas, ale tento proces má dnes již spíše historický význam kvůli dostupnosti rekombinantních metod. Prvním nezbytným krokem při izolaci nukleových kyselin, DNA i RNA, je odstranění makromolekul, hlavně proteinů, ze vzorku. K tomu se využívá právě proteas, konkrétně Proteasa K je používána nejčastěji. Podobně je tomu i při izolaci buněk, kde je třeba vzorek zbavit polysacharidů, nukleových kyselin, lipidů a proteinů. Z proteas se k tomuto kroku používají kolegenasy (např. z bakterií druhu *Clostridium histolyticum*), elastasy, papain (z bakterií druhu *Carica papaya*), trypsin, chymotrypsin atd. Přípravu fragmentů

protilátek, které mají výhodné použití v diagnostice, terapii a biofarmaceutickém výzkumu kvůli jejich malé velikosti a snížené imunogenicitě, mají rovněž na starosti proteasy, konkrétně papain, pepsin a ficin. V proteomické analýze pomocí hmotností spektrometrie se ke štěpení proteinů na peptidy používá nejčastěji trypsin, ale i chemotrypsin, papain, pepsin, elastasa, subtilisin, proteasa K, trombin, faktor Xa a některé další proteasy se ukázaly být vhodné k proteomické analýze (13). Aplikační využití konkrétních mikrobiálních proteas, jak průmyslové, tak medicínské, je patrné z tabulky číslo 2.

**Tabulka 2.** Aplikační využití proteas

Aplikace	význam/princip	Použitá proteasa
<i>Prací a čistící prostředky</i>	degradace znečištění proteinové povahy	široké spektrum bakteriálních i rekombinantních proteas
<i>Kožešnický průmysl</i>	vylepšení vlastností kůže, odbourání nežádoucích peptidů	široké spektrum bakteriálních proteas
<i>Pekárenství</i>	úprava glutenu a tím vlastností i chuti potraviny	endo- i exoproteasy z <i>Aspergillus oryzae</i>
<i>Mlékárenství</i>	koagulace mléka, dodání chuti při zrání	proteasy z rodu <i>Bacillus</i> , specifické plísňové enzymy
<i>Zpracování sóji</i>	stravitelnost sójových bílkovin, redukce hořkosti	široké spektrum houbových proteas
<i>Léčba akutní lymfoblastické leukemie</i>	Eliminace asparaginu z krve	asparaginasa z <i>E. coli</i>
<i>Léčba popálenin</i>	urychlení hojení, odbourávání poškozených proteinů	kolagenasa z rodu <i>Clostridium</i>
<i>Léčba infekcí</i>	Protizánětlivý efekt	serratiopeptidasa z bakterií rodu <i>Serratia</i>
<i>Prevence kardiovaskulárních chorob</i>	Prevence srážení krve a rozpouštění trombu	nattokinasa z <i>Bacillus subtilis</i>

## Závěr

Proteasy jsou a postupem času budou stále více ceněnou komoditou v průmyslu i medicíně. Jejich využití napomáhá ekologickým metodám zpracování, nahrazuje tradiční postupy nebo jsou využity jako součást léčebných či diagnostických metod. Produkce mikrobiálních proteas je nejelegantnější variantou, jak získat velké množství enzymů, které jsou vhodné pro konkrétní účely nebo se dají pomocí moderních metod genetického inženýrství vytvořit proteasy se specifickými vlastnostmi. Aplikační využití proteas se neustále rozšiřuje ve všech zmíněných odvětvích průmyslu i medicíny a díky genetickým modifikacím se vylepšují nebo upravují jejich katalytické vlastnosti. Očekává se, že bakteriální enzymy budou stále více nahrazovat tradiční postupy a poptávka se bude zvyšovat (2).

## Prohlášení o střetu zájmu

Prohlašuji, že v souvislosti s uvedeným příspěvkem, jehož jsem autorem/spoluautorem, nemám žádný střet zájmů.

## Disclosure statement

The authors proclaim that they have no competing interests.

## Literatura

1. Rao M B et al. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 1998;62(3):597-635.
2. Sumantha A, Larroche C and Pandey A. Microbiology and Industrial Biotechnology of Food-Grade Proteases: A Perspective. *Food Technology and Biotechnology*. 2006;44(2):211-220.

3. Vermelho A B et al. Diversity and Biotechnological Applications of Prokaryotic Enzymes. In: Rosenberg E et al, The Prokaryotes: Applied Bacteriology and Biotechnology. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg; 2013. p. 213-240.
4. Gupta R, Beg Q K, Lorenz P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2002;59(1):15-32.
5. Nagase H, Woessner J F Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999;274(31):21491-4.
6. Garcia-Carreón F L. Classification of Proteases without tears. *Biochemical Education.* 1997;25(3):161-167.
7. Theron L W, Divol B. Microbial aspartic proteases: current and potential applications in industry. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2014;98(21):8853-8868.
8. Jisha N V et al. Versatility of microbial proteases. *Advances in Enzyme Research.* 2013;1:39-51.
9. Anbu P et al. *Microbial Enzymes and Their Applications in Industries and Medicine 2016.* BioMed Research International. 2017;2017:3.
10. Ruiz-Perez F, Nataro J P. Bacterial serine proteases secreted by the autotransporter pathway: classification, specificity, and role in virulence. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71(5):745-70.
11. Singh R et al. Microbial Proteases in Commercial Applications. *Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences.* 2016;4(3):365-374.
12. Neitzel J J. Enzyme Catalysis: The Serine Proteases. *Nature Education.* 2010;3(9):21.
13. Mótyán JA, Tóth F, Tózsér J. Research Applications of Proteolytic Enzymes in Molecular Biology. *Biomolecules.* 2013;3(4):923-942.
14. Singh R et al. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech.* 2016;6(2):174.
15. Chang C, Werb Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol.* 2001;11(11):37-43.
16. Hase C C, Finkelstein R A. Bacterial extracellular zinc-containing metalloproteases. *Microbiol Rev.* 1993;57(4):823-37.
17. Sims A H et al. Glutamic protease distribution is limited to filamentous fungi. *FEMS Microbiol Lett.* 2004;239(1):95-101.
18. Rawlings N D, Barrett A J, Bateman A. Asparagine peptide lyases: a seventh catalytic type of proteolytic enzymes. *J Biol Chem.* 2011;286(44):38321-8.
19. Khan F. New microbial proteases in leather and detergent industries. *Inn Res Chem.* 2013;1:1-6.
20. Jemli S et al. Biocatalysts: application and engineering for industrial purposes. *Critical Reviews in Biotechnology.* 2016;36(2):246-258.
21. Anwar A, Saleemuddin M. Alkaline proteases: A review. *Bioresource Technology.* 1998;64(3):175-183.
22. Don L S B, Pulosof A M R, Bartholomai G B. Enzymatic modification of soy protein concentrates by fungal and bacterial proteases. *Journal of the American Oil Chemists Society.* 1991;68(2):102-105.
23. Hamada S et al. Improvements in the qualities of gluten-free bread after using a protease obtained from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Cereal Science.* 2013;57(1):91-97.
24. Del Rosso J Q. Application of Protease Technology in Dermatology: Rationale for Incorporation into Skin Care with Initial Observations on Formulations Designed for Skin Cleansing, Maintenance of Hydration, and Restoration of the Epidermal Permeability Barrier. *The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology.* 2013;6(6):14-22.
25. López-Otín C, Bond J S. Proteases: Multifunctional Enzymes in Life and Disease. *The Journal of Biological Chemistry.* 2008;283(45):30433-30437.
26. Hua Y, Nair S. Proteases in cardiometabolic diseases: Pathophysiology, molecular mechanisms and clinical applications. *Biochimica et biophysica acta.* 2015;1852(2):195-208.