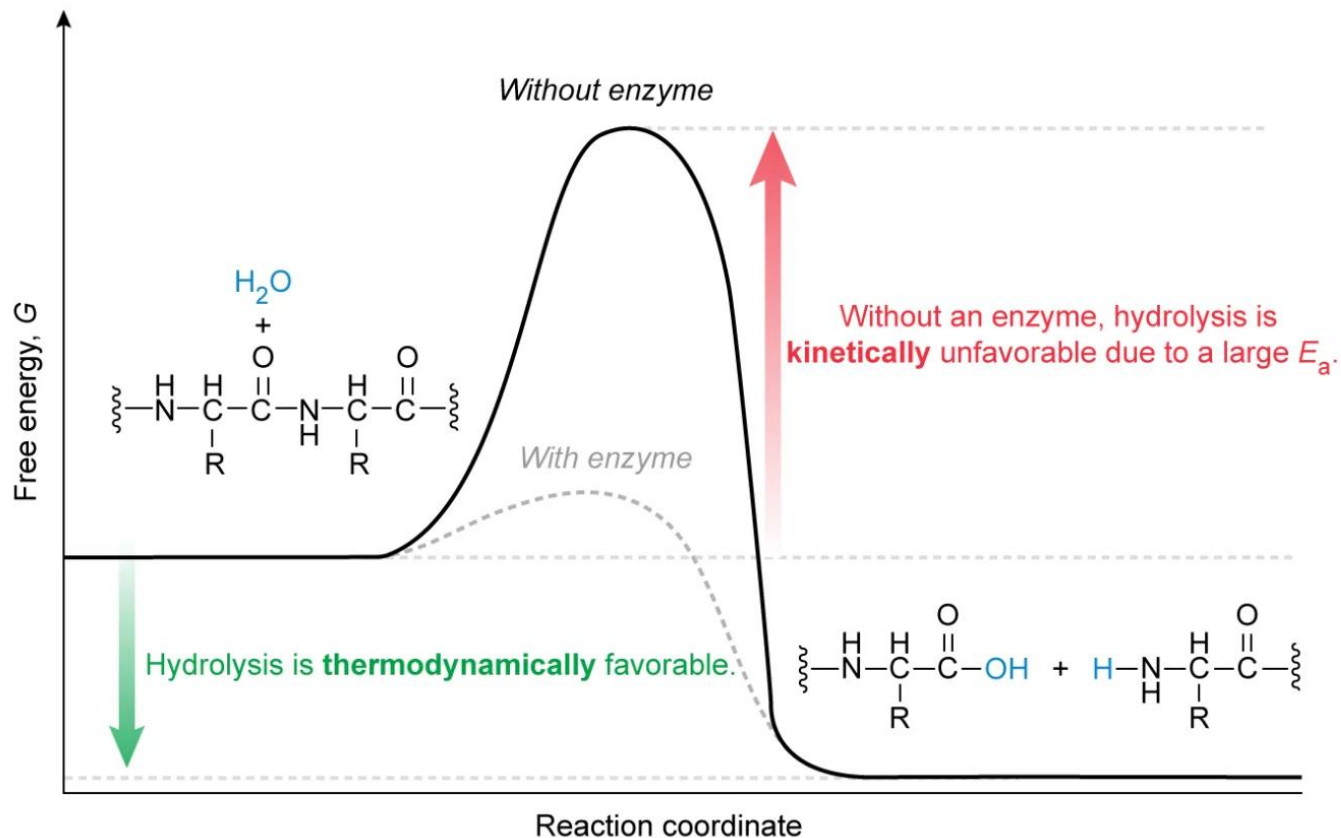


Applicazioni biotecnologiche degli enzimi: le proteasi

Idrolisi di legami peptidici

Peptide bond hydrolysis is thermodynamically favorable
but kinetically unfavorable without an enzyme



Campi di applicazione delle proteasi

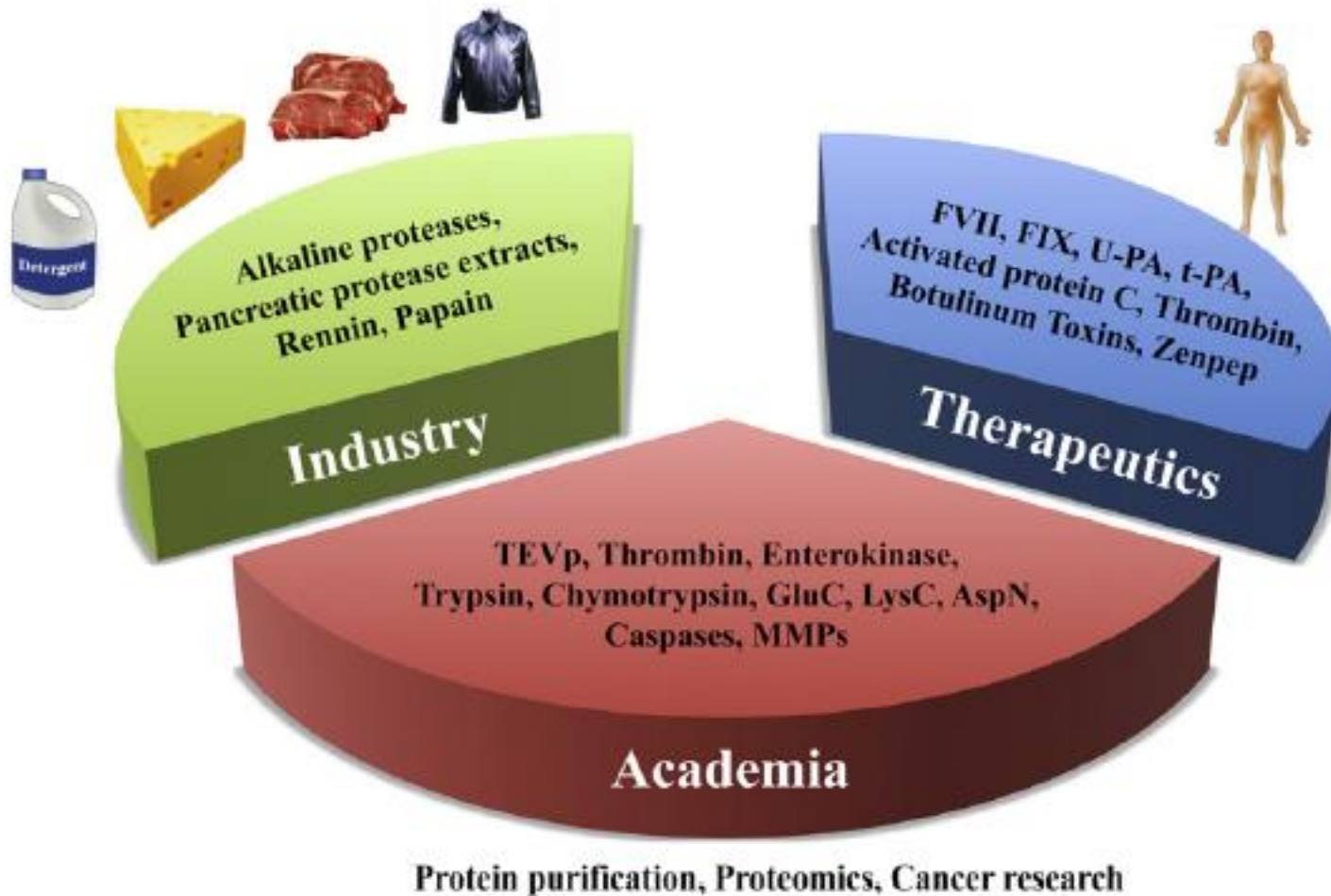


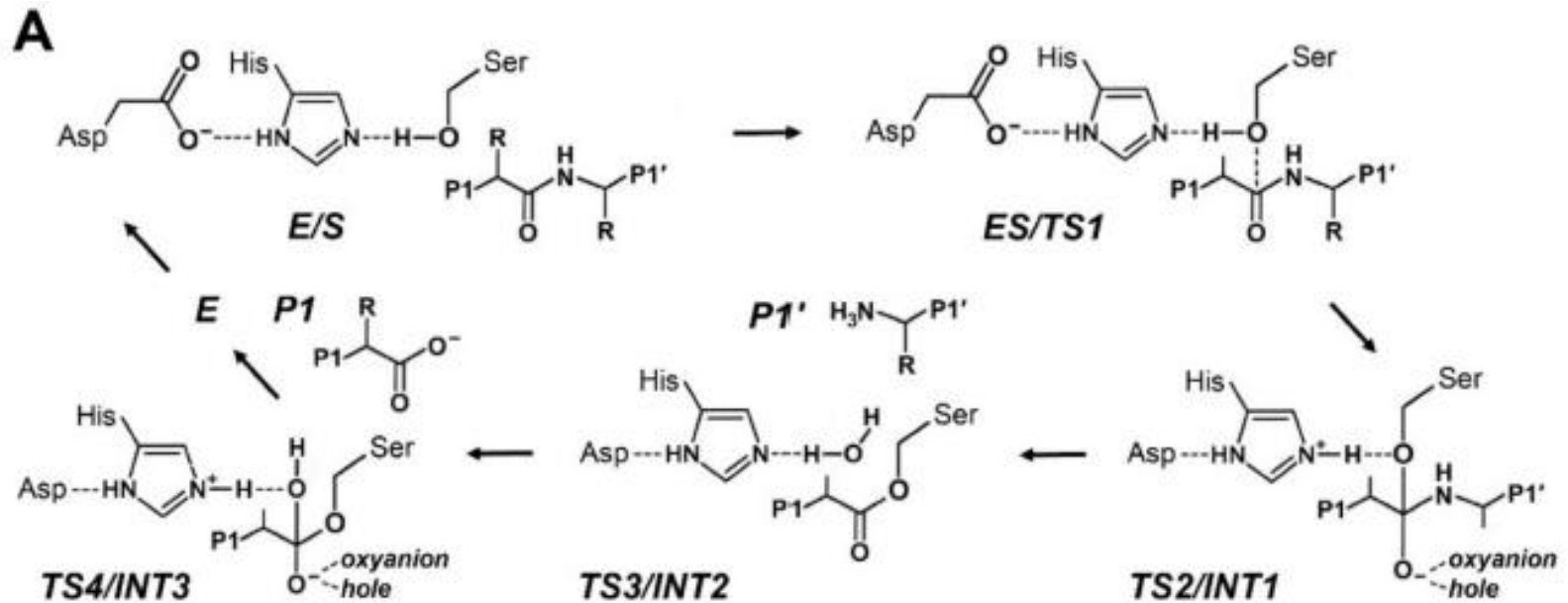
Fig. 1. An overview of protease applications.

Le proteasi catalizzano l'idrolisi di legami peptidici

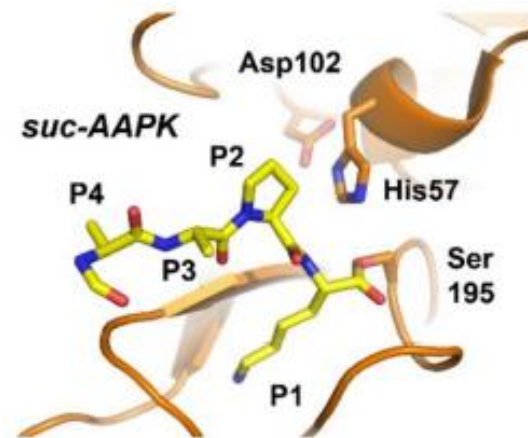
- Esopeptidasi ed endopeptidasi
- Specificità di riconoscimento più o meno elevata
- 4 classi sulla base del meccanismo d'azione:
 - Proteasi a serina (chimotripsina, tripsina, elastasi, subtilisina)
 - Proteasi a cisteina (papaina, caspasi)
 - Proteasi acide (pepsina, chimosina, proteasi di HIV)
 - Metalloproteasi (carbossipeptidasi A, termolisina)

Molte proteasi hanno anche attività **esterasica**

Meccanismo d'azione delle proteasi a serina: catalisi covalente



Tripsina



Aspartil-proteasi

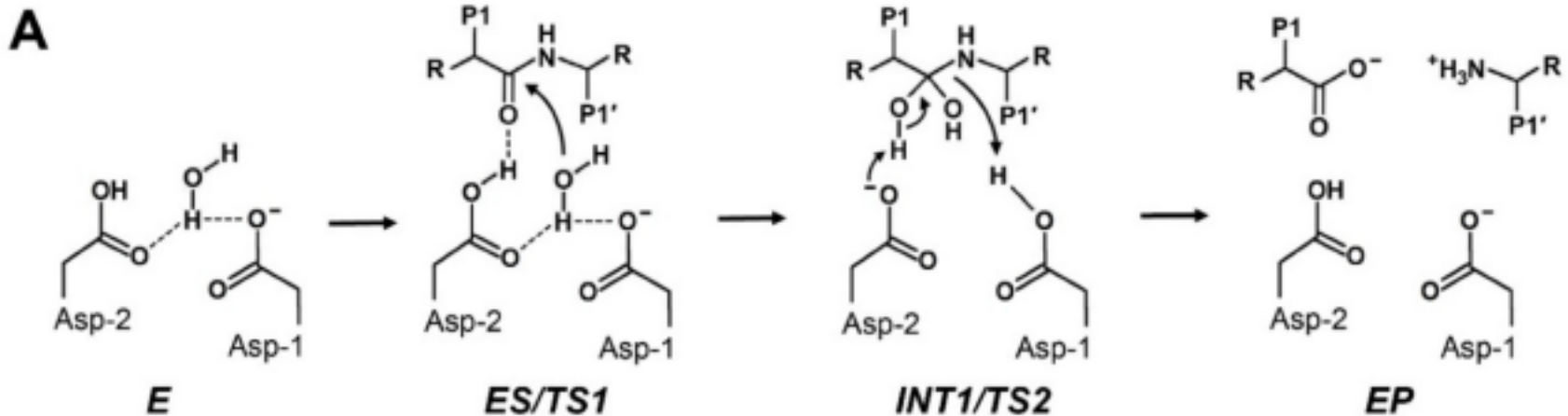
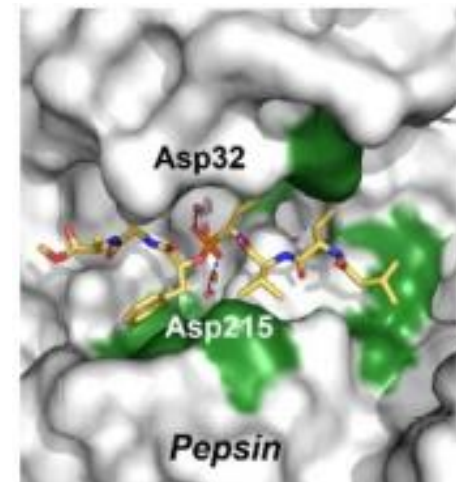
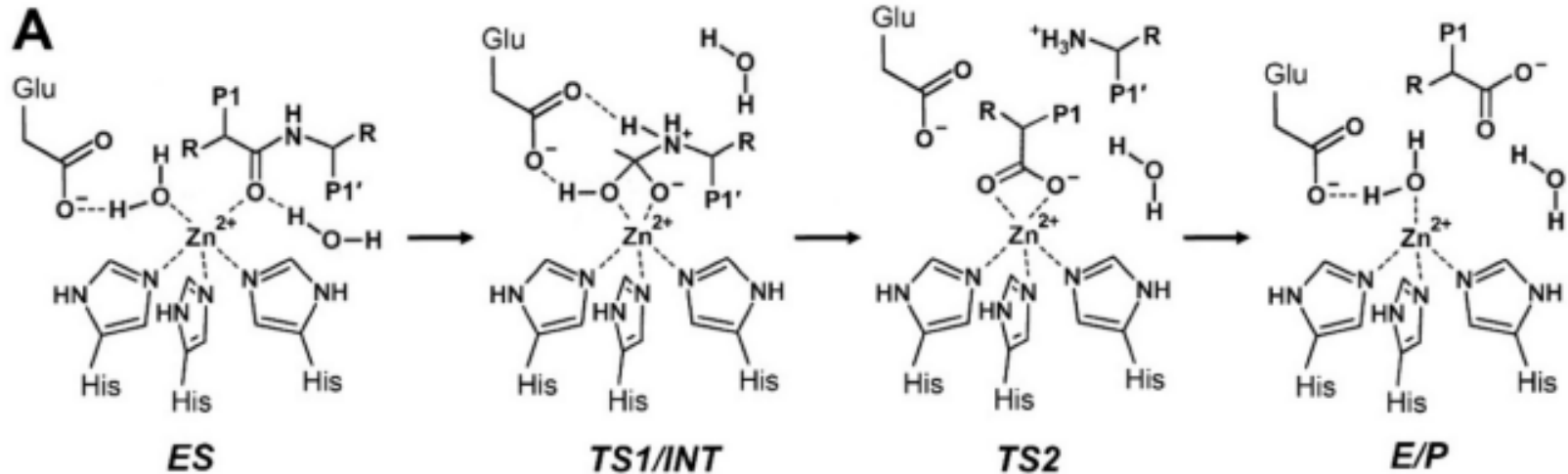


Figura 11.23 Un meccanismo per le aspartato proteasi. Nella prima fase, il trasferimento concertato di due protoni facilita l'attacco nucleofilo dell'acqua sul carbonio carbonilico del substrato. Nella terza fase, un residuo di aspartato (Asp³² nella pepsina) accetta un protone da uno dei gruppi ossidrilici dell'ammide diidrato mentre l'altro aspartato (Asp²¹⁵) cede un protone all'azoto dell'ammide che verrà rilasciata.



White: polar
Green: hydrophobic

Metalloproteasi



Termolisina e
Carbossi-peptidasi A



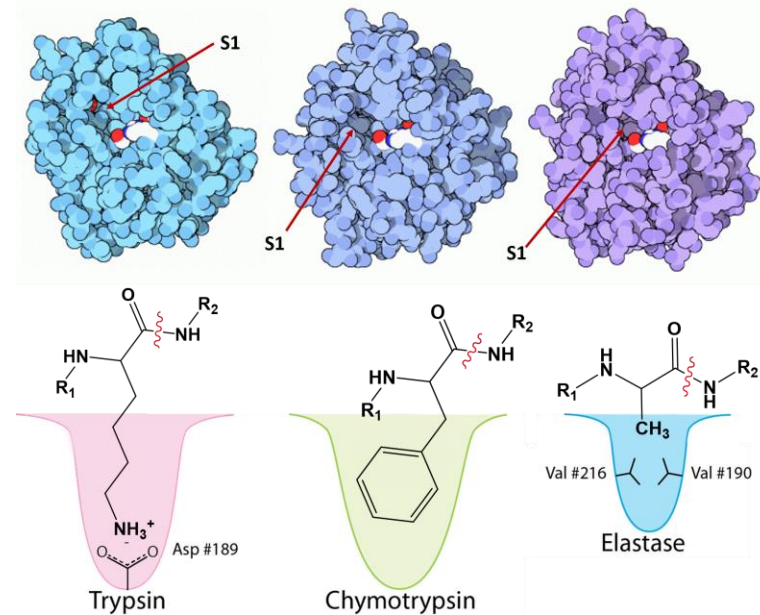
Specificità di riconoscimento di proteasi

Table 1
Specificity of proteases^a

Enzyme	Preferred cleavage site ^b	
	N-terminal	C-terminal
Serine proteases		
Trypsin	↓	—Arg (or Lys)—Yaa—
<i>Achromobacter</i> protease	↓	—Lys—Yaa—
Chymotrypsin, subtilisin	↓	—Trp (or Tyr, Phe, Leu)—Yaa—
Elastase, α-lytic protease	↓	—Ala (or Ser)—Yaa—
Proline-specific protease	↓	—Pro—Yaa—
<i>Staphylococcus</i> V8 protease	↓	—Asp (or Glu)—Yaa—
Carboxypeptidase Y	↓	—Xaa—Yaa—
Thiol proteases		
Papain, <i>Streptococcus</i> protease	↓	—Phe (or Val, Leu)—Xaa—Yaa—
Clostripain, cathepsin B	↓	—Arg—Yaa—
Cathepsin C	↓	H-X-Phe (or Tyr, Arg)—Yaa—
Metal proteases		
Thermolysin	↓	—Xaa—Leu (or Phe)—
<i>Myxobacter</i> protease II	↓	—Xaa—Lys—
Aspartic proteases		
Pepsin	↓	—Phe (or Tyr, Leu)—Trp (or Phe, Tyr)—

^aData from Ref. 3.

^bXaa, various amino acid residues; Yaa, various amino acid residues, ester or amide.



Utilizzo di proteasi come additivi nei detersivi

Le proteasi utilizzate come additivi nei detersivi devono:

- Avere bassa specificità di substrato
- Avere elevata attività sia ad alta che a bassa T
- Avere elevato optimum di pH
- Essere resistenti agli agenti contenuti nei detersivi (saponi, chelanti dei metalli, ossidanti etc.).

Le **subtilisine** sono proteasi a serina con queste caratteristiche

Table 1

Subtilisin variants used in detergents.

Trade mark	Producer	Origin	WT/PE ^c	Production strain	Synonym
Alcalase [®]	Novozymes	<i>B. licheniformis</i>	WT	<i>B. licheniformis</i>	Subtilisin Carlsberg
FNA ^a	Genencor	<i>B. amyloliquefaciens</i>	PE	<i>B. subtilis</i>	
Savinase [®]	Novozymes	<i>B. clausii</i>	WT	<i>B. clausii</i>	Subtilisin 309
Purafect [™]	Genencor	<i>B. lentus</i>	WT	<i>B. subtilis</i>	
KAP ^b	Kao	<i>B. alkalophilus</i>	WT	<i>B. alkalophilus</i>	
Everlase [™]	Novozymes	<i>B. clausii</i>	PE	<i>B. clausii</i>	
Purafect OxP [™]	Genencor	<i>B. lentus</i>	PE	<i>B. subtilis</i>	
FN4 ^a	Genencor	<i>B. lentus</i>	PE	<i>B. subtilis</i>	
BLAP S ^b	Henkel	<i>B. lentus</i>	PE	<i>B. licheniformis</i>	
BLAP X ^b	Henkel	<i>B. lentus</i>	PE	<i>B. licheniformis</i>	
Esperase [®]	Novozymes	<i>B. halodurans</i>	WT	<i>B. halodurans</i>	Subtilisin 147
Kannase [™]	Novozymes	<i>B. clausii</i>	PE	<i>B. clausii</i>	
Properase [™]	Genencor	<i>B. alkalophilus PB92</i>	PE	<i>B. alkaliphilus</i>	

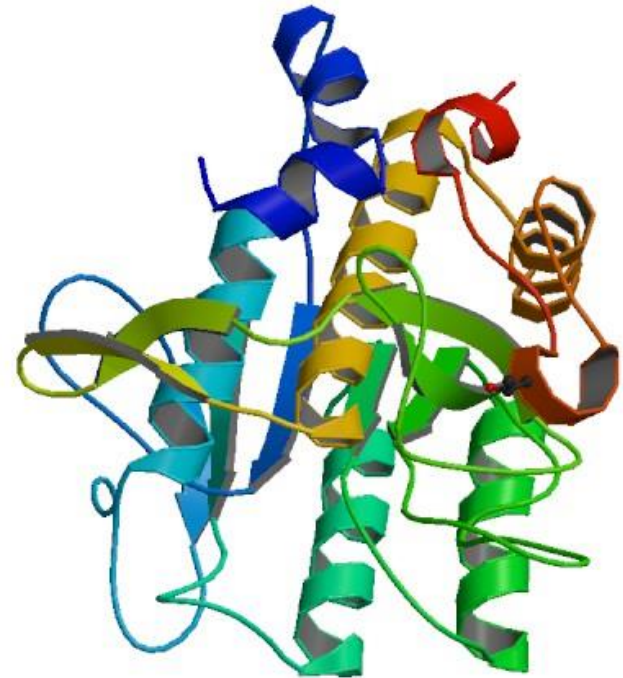
^aExclusive molecules for specific customer.

^bExclusive molecules for captive use. The names of captive use products are often based on technical terms or acronyms.

^cPE, protein engineered; WT, wild type.

Le subtilisine

- Prodotte da *Bacillus* sp., sono proteasi alcaline extracellulari
- Proteasi a serina di circa 27 kDa, bassa specificità di substrato e alta stabilità
- Nell'Unione Europea sono prodotte e/o importate > 1000 tonnellate di subtilisina pura per anno
- Usate come additivo in tutti i tipi di detersivi
- La subtilisina è uno degli enzimi più ingegnerizzati: oltre metà dei 275 aminoacidi che la compongono sono stati oggetto di mutagenesi!



Strategie per migliorare le proprietà di un enzima

Quali proprietà migliorare?

- Attività catalitica
- Specificità di substrato
- Nuove attività
- Stabilità
- Stabilità in ambienti 'esotici' (non fisiologici)

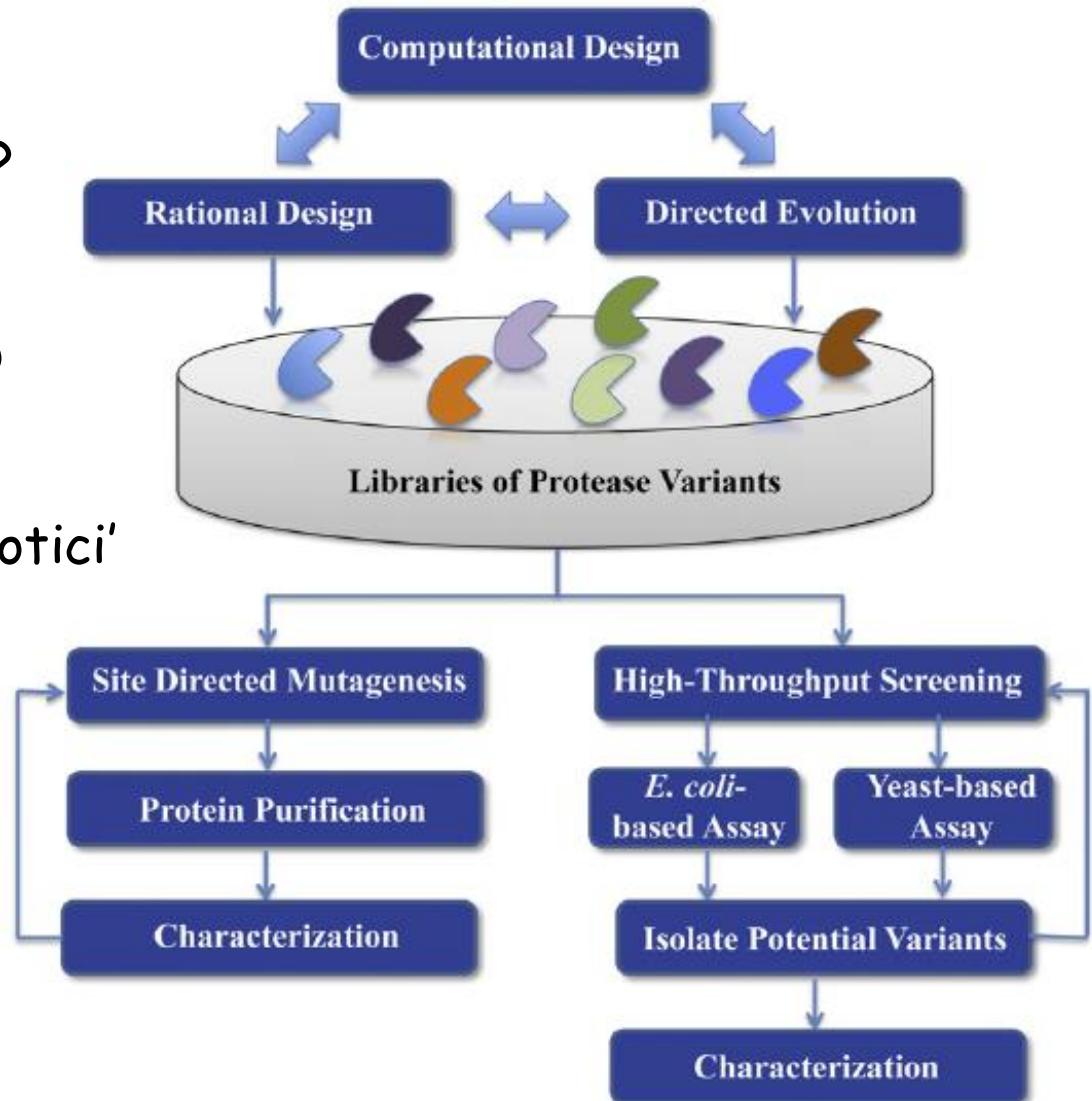


Fig. 2. Schematic diagram outlining the general approaches of protease engineering.

Utilizzo di proteasi come additivi nei detersivi.

Maxacal è una proteasi di *Bacillus lentus* che possiede elevata attività ad alto pH ed è termostabile.

Appartiene alla famiglia delle subtilisine.

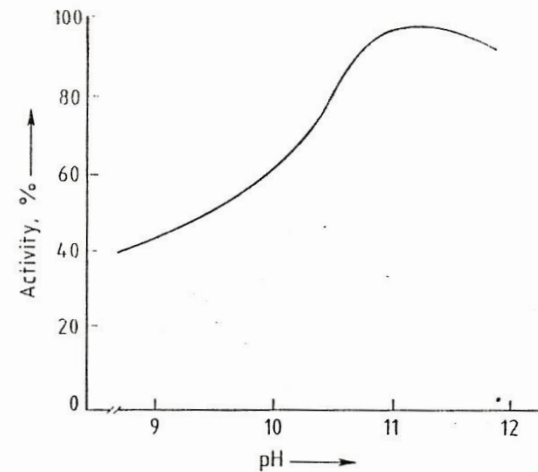
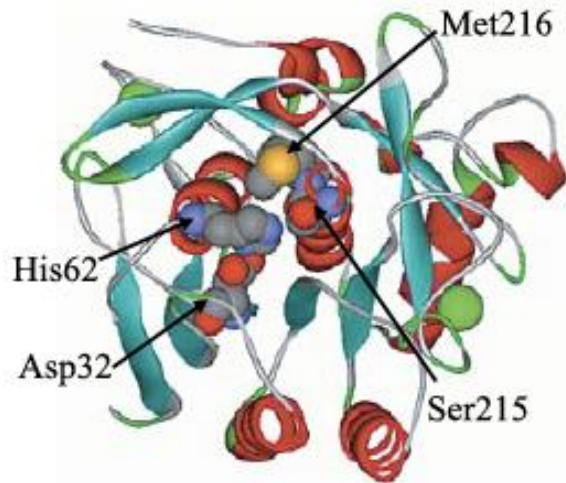


Figure 36. Activity -pH profile of Maxacal, a commercial high-alkaline protease. Activity is determined by incubating the enzyme for 48 min at 40°C with casein as substrate. The reaction is terminated by adding trichloroacetic acid; the amount of acid-soluble material, measured spectrophotometrically at 260 nm, represents the protease activity (DU).

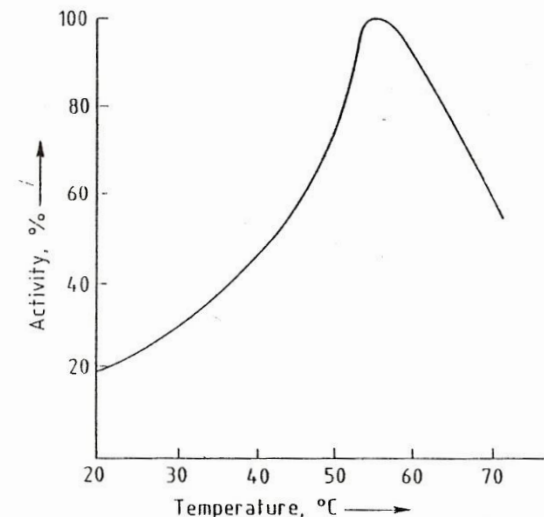


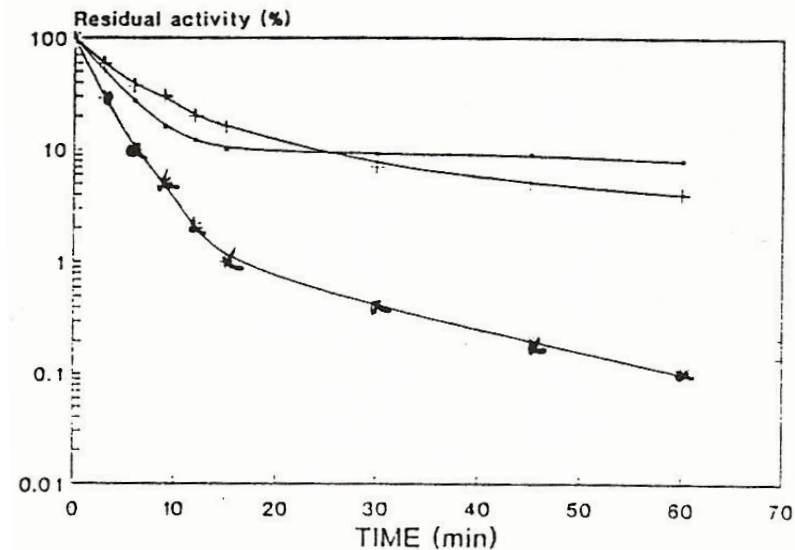
Figure 37. Temperature-activity profile of Maxacal. Activity is determined at pH 10 as described in Figure 36.

Stabilizzazione di Maxacal all'ossidazione

Maxacal perde attività enzimatica in presenza di ossidanti come l' H_2O_2 o perossiacidi, che si trovano comunemente nei detersivi.

I residui di cisteina e metionina sono i bersagli principali degli ossidanti.

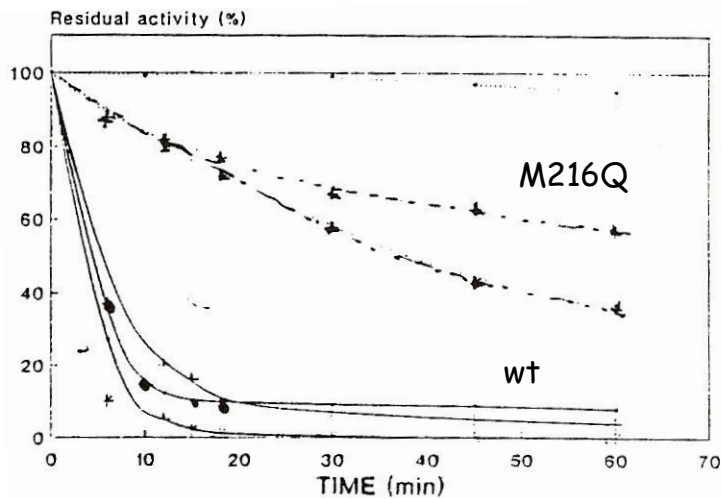
Maxacal non contiene cisteine, ma presenta 3 metionine.



1. Residual activity of Maxacal after oxidation with 20 mM H_2O_2 (■), 20 mM NaBO_3 + 10 mM Tetra Acetyl Ethylene Diamine (+), and 10 mM diperoxidodecanoic diacid (*). Activity was measured with succinyl-(L)-Ala-(L)-Ala-(L)-Pro-(L)-Phe-para-nitroanilide as a substrate [7].

Stabilizzazione di Maxacal all'ossidazione.

La sostituzione della metionina 216 (M216Q) rende la proteasi più resistente agli ossidanti



Residual activity of Maxacal (solid lines) and [redacted] (dotted lines) after oxidation: (■) 20 mM H_2O_2 , (+) 20 mM $NaBO_3$ + 10 mM Tetra Acetyl Ethylene Diamine, (*) 10 mM diperoxidodecanoic diacid (see further legend Figure 4).

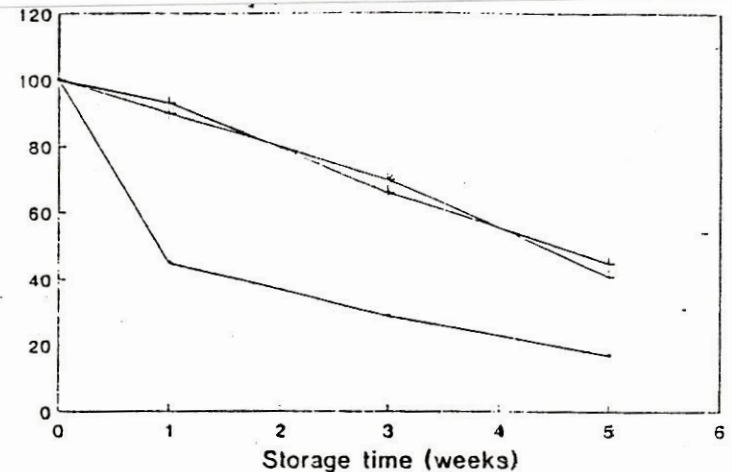


Figure 7. Detergent storage stability of Maxacal (■) and two M216-mutants: M216S (+) and M216Q (*). The storage conditions were 30°C and 80% relative humidity; the detergent contained $NaBO_3$ /TAED as a bleaching system. Residual activity was measured with casein as a substrate (see [7] for further experimental details).

Evoluzione guidata in vitro per migliorare la termostabilità di una subtilisina di psicrofilo

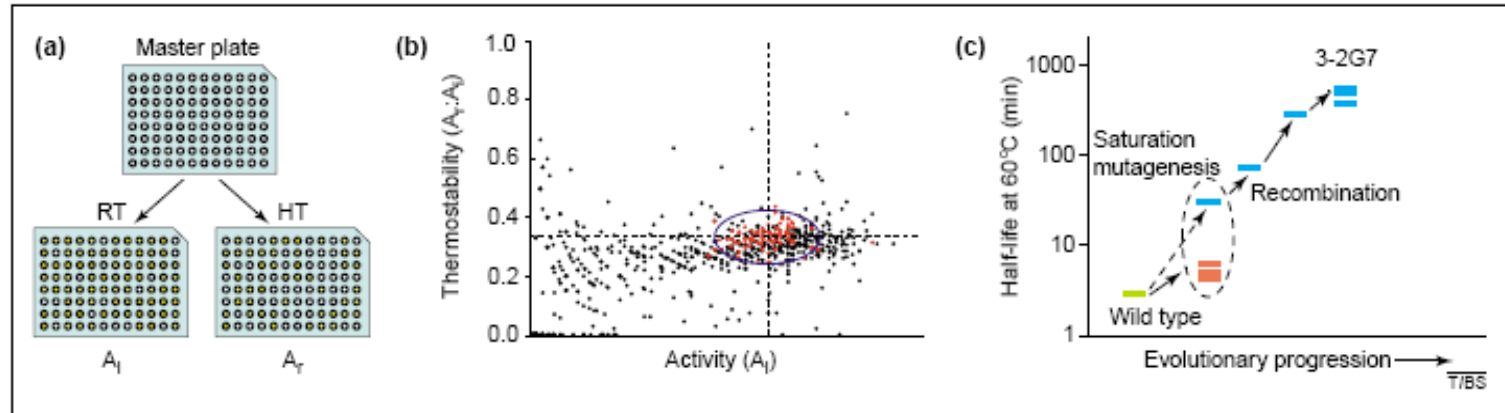


Fig. 3. Directed evolution of a psychrophilic enzyme, subtilisin S41, from the Antarctic bacterium TA41 (Ref. 12). (a) Rapid screening for thermostability and activity is performed by taking replicas from a master plate that contains individual clones. One replica plate is assayed for activity at room temperature (RT), and the second is incubated at high temperature (HT) before activity is measured. The ratio of the residual activity (A_r), calculated from the HT plate, to the initial activity (A_i), from the RT plate, provides a measure of thermostability for this irreversibly inactivated enzyme. (b) Activities and stabilities of random S41 mutants¹³. The distribution of wild-type clones measured under the same conditions (red dots inside ellipse) shows the reproducibility of the screen. Mutants distribute well outside this region. Most improvements in activity come at the cost of stability, and vice versa. (c) Progression of the evolution of S41 thermostability, as measured by the half-life of enzyme activity at 60°C, in 1 mM CaCl₂. One of the mutants discovered in the first generation contained two amino acid substitutions in a loop region. These were subjected to saturation mutagenesis, and the best mutant was recombined with other random mutants. Further rounds of random mutagenesis and screening produced 3-2G7, which has seven amino acid substitutions.

Oligonucleotidi per 'saturation mutagenesis': come ridurre ridondanza e codoni di stop prematuri?

Oligo degenerati per il codone bersaglio

- **NNK** o **NNS**
- Miscela di oligo:
 - **NDT**, **VMA**, **ATG** e **TGG** in rapporto 12:6:1:1
 - **NDT**, **VHG** e **TGG** in rapporto 12:9:1
- Codoni di stop: TAG, TAA, TGA

Degenerate base designation	Actual bases coded
N	A or C or G or T
B	C or G or T
D	A or G or T
H	A or C or T
V	A or C or G
K	G or T
M	A or C
R	A or G
S	C or G
W	A or T
Y	C or T

Evoluzione guidata in vitro della proteasi alcalina di *B. gibsonii* per migliorare attività a bassa T e termostabilità

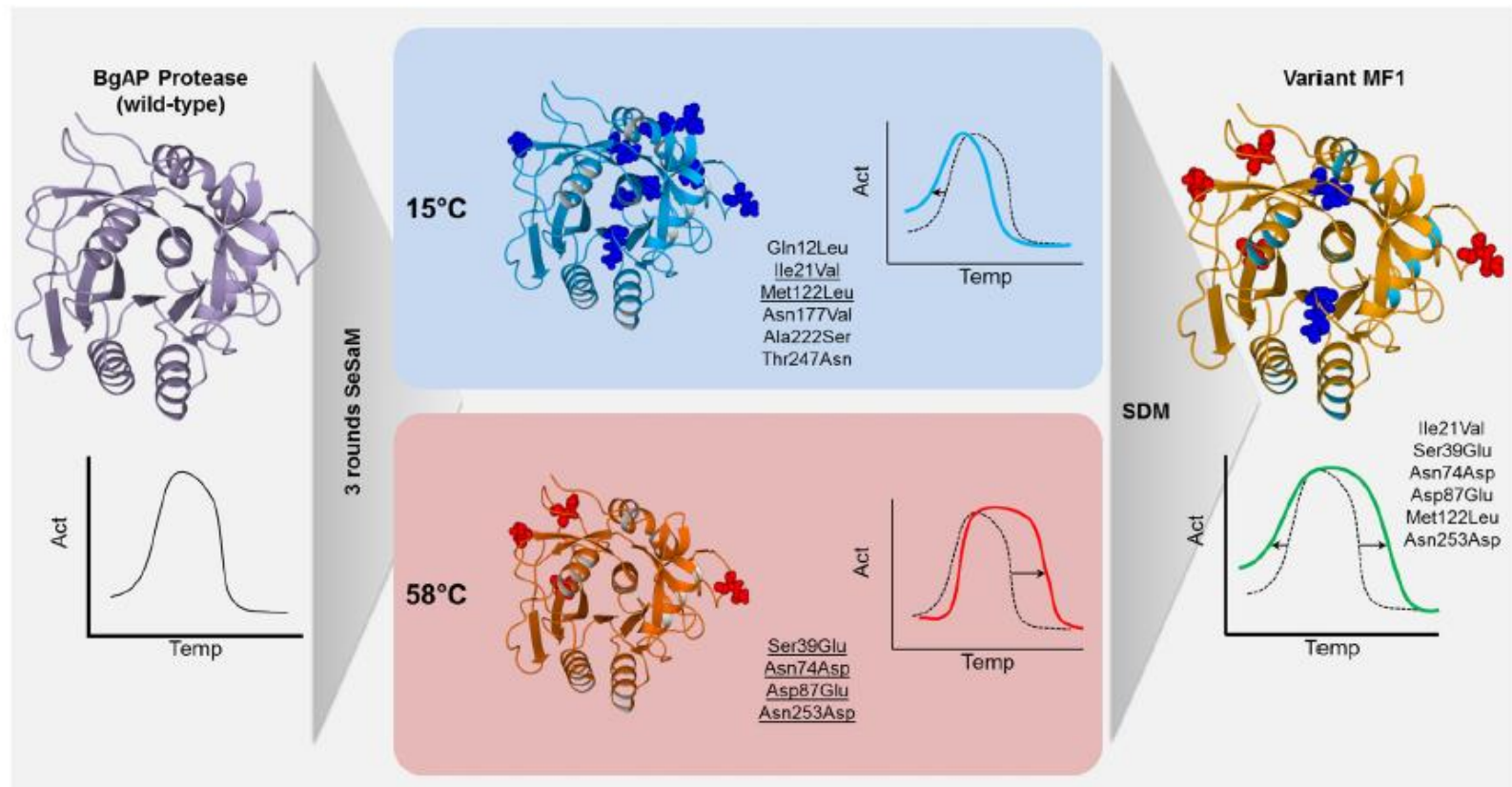


FIGURE 1

Summary of the directed evolution campaign for *Bacillus gibsonii* alkaline protease (BgAP) using sequence saturation mutagenesis (SeSaM) and a parallel screening towards high activity at low temperatures (upper path) and thermal resistance (lower path). Variants with improved temperature-activity profiles were identified, and beneficial amino acid substitutions were combined to generate one single enzyme variant with a wider temperature profile compared to the wild type [9].

Utilizzo di proteasi nell'industria alimentare

- Per migliorare il valore nutrizionale e la digeribilità dei cibi
- Per diminuire l'allergenicità di idrolizzati proteici usati come supplementi nutritivi (es. latte artificiale, farine di grano)
- Per la produzione di formaggio: chimosina e pepsina per l'idrolisi della caseina e la formazione del caglio, mix di proteasi per la maturazione del formaggio
- Per ammorbidire la carne: papaina, bromelaina



A novel catalytic material for hydrolyzing cow's milk allergenic proteins: Papain-Cu₃(PO₄)₂·3H₂O-magnetic nanoflowers

Nuan Feng^{a,b,1}, Haiyang Zhang^{b,1}, Yao Li^c, Yangkaixi Liu^c, Longquan Xu^a, Yi Wang^b, Xu Fei^{a,*}, Jing Tian^{b,*}



Fig. 1. Schematic diagram of the proposed growth mechanism of PCMN.

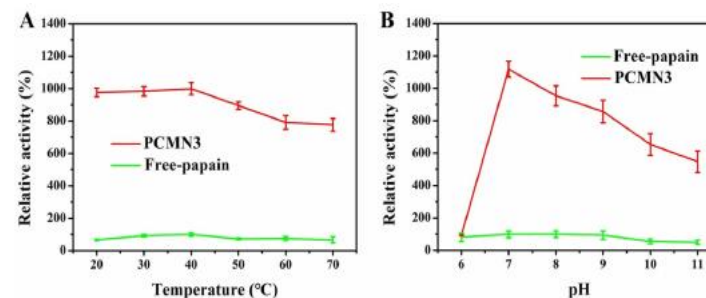


Fig. 4. Thermal stabilities (A) and pH stabilities (B) of free papain and PCMN3.

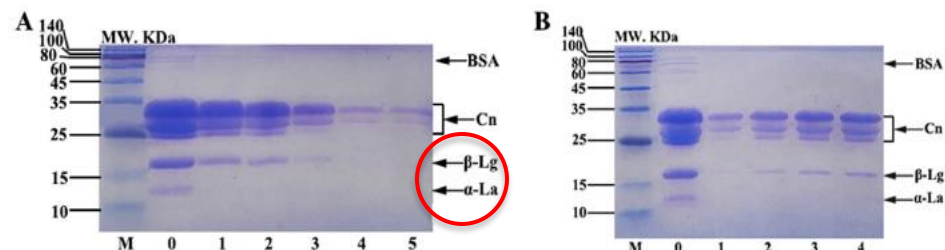
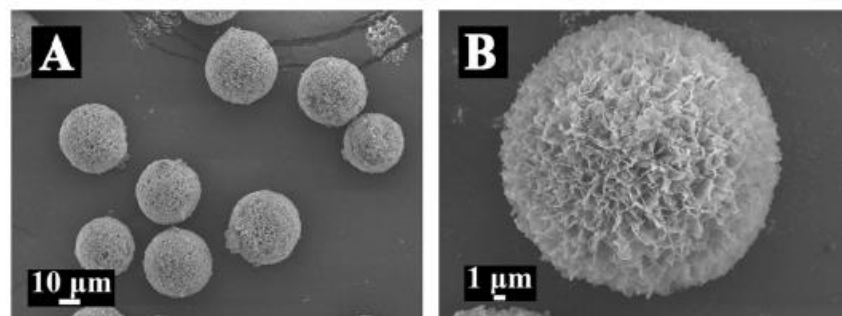


Fig. 5. SDS-PAGE patterns (A) of the hydrolysates, M: protein marker (140–10 KDa); 0: 1% (w/w) milk powder aqueous solution; 1–5: the hydrolysates with different reaction times (10 min, 20 min, 30 min, 40 min and 50 min). SDS-PAGE patterns (B) of the hydrolysates from reuse experiment, M: protein marker (140–10 KDa); 0: 1% (w/w) milk powder aqueous solution; 1–4: the hydrolysates with different reuse times (first, second, third and fourth time).

Processo di produzione del formaggio

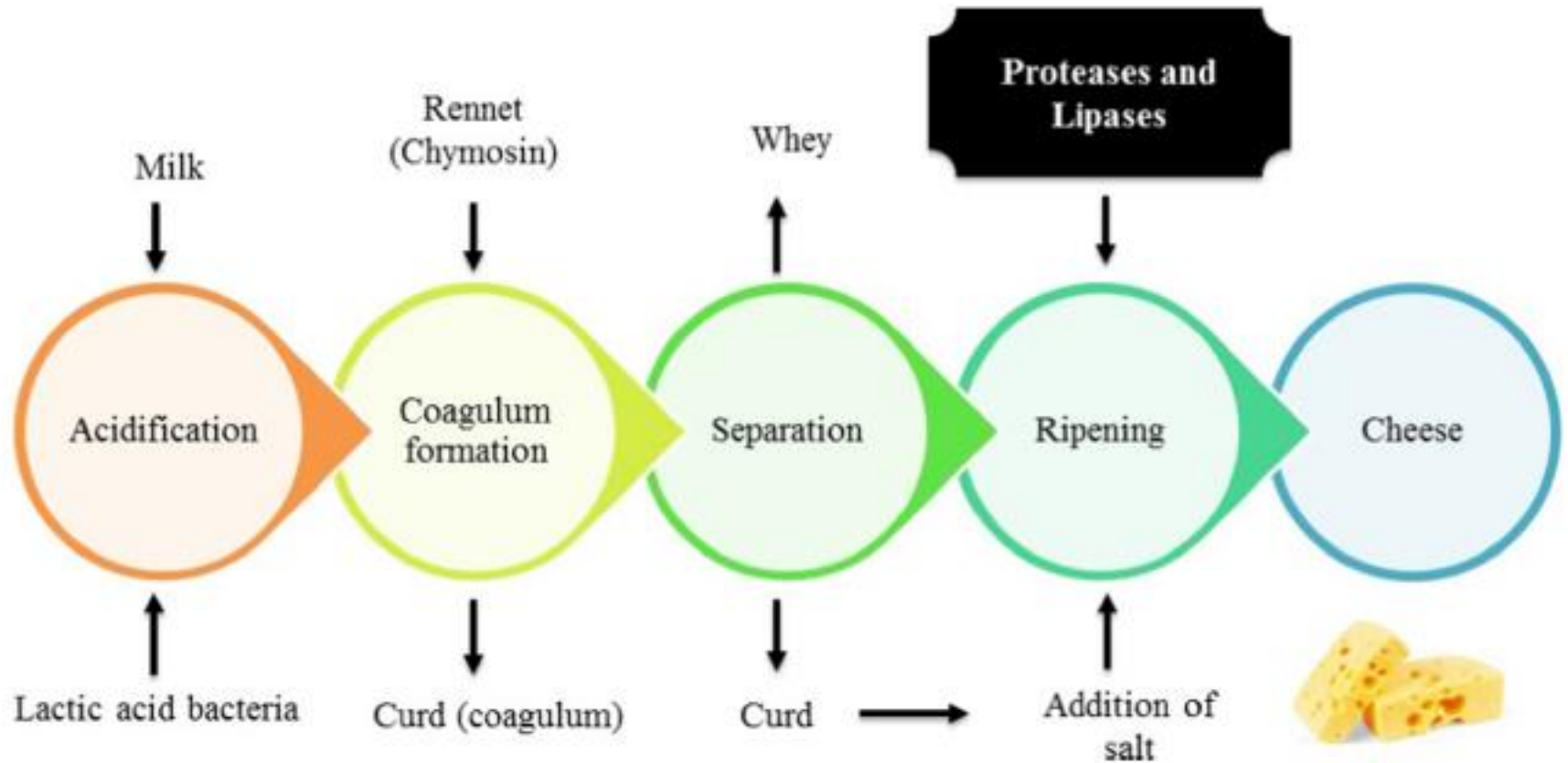
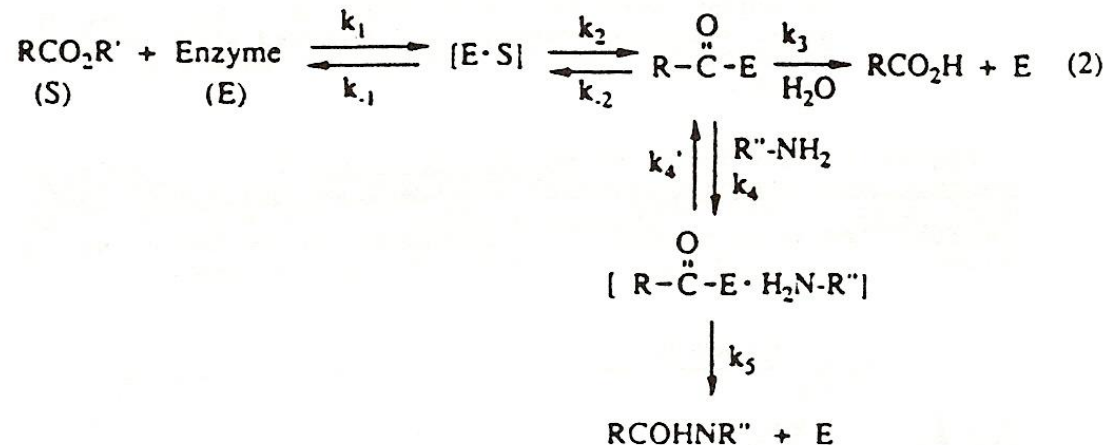
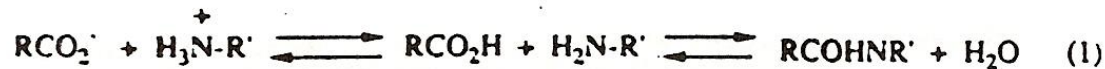


Fig. 6. Steps in cheese making.

Sintesi enzimatica di legami peptidici: transpeptidazione

Le proteasi possono essere utilizzate per catalizzare la sintesi di legami peptidici mediante due approcci:

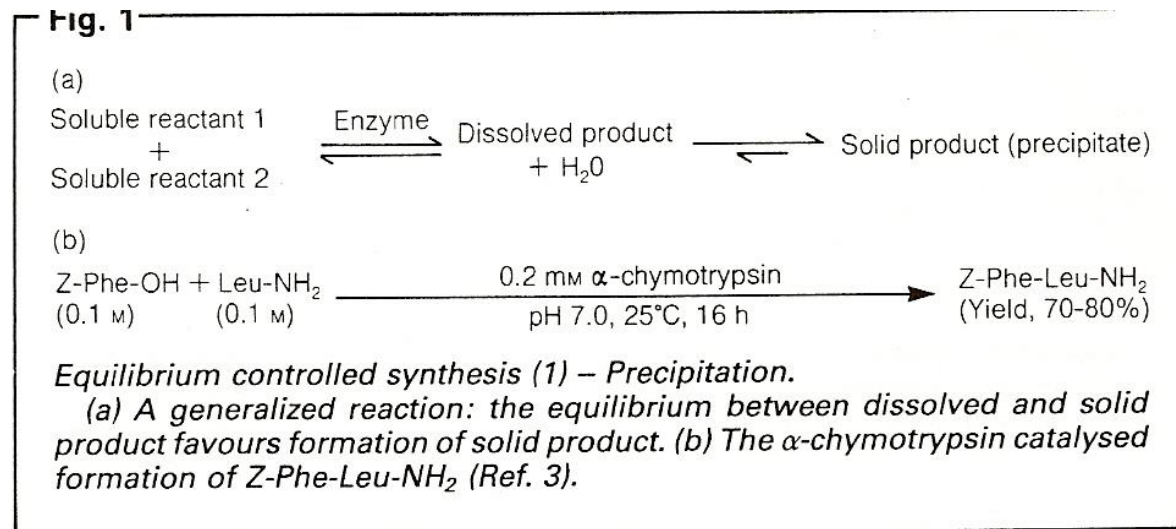
1. Approccio termodinamico (inverso della reazione di idrolisi)
2. Approccio cinetico (reazione di aminolisi)



Strategie per la sintesi di legami peptidici mediante l'approccio termodinamico

L'equilibrio apparente viene spostato verso la sintesi rimuovendo dalla miscela di reazione il peptide prodotto:

precipitazione



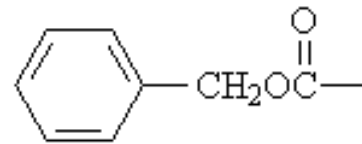
Strategie per la sintesi di legami peptidici mediante proteasi

Gruppi chimici che bloccano -NH_2 e -COOH servono a conferire **direzionalità** al legame e a modificare la **solubilità** di reagenti e prodotti

Gruppi NH_2

Gruppo Z: benzilossicarbonile

Gruppo Ac: acetile



Gruppi COOH

Gruppo OBu^t : tert-butil estere

Gruppo NH_2 : ammidine

Table 2

Effect of blocking residues on product solubility

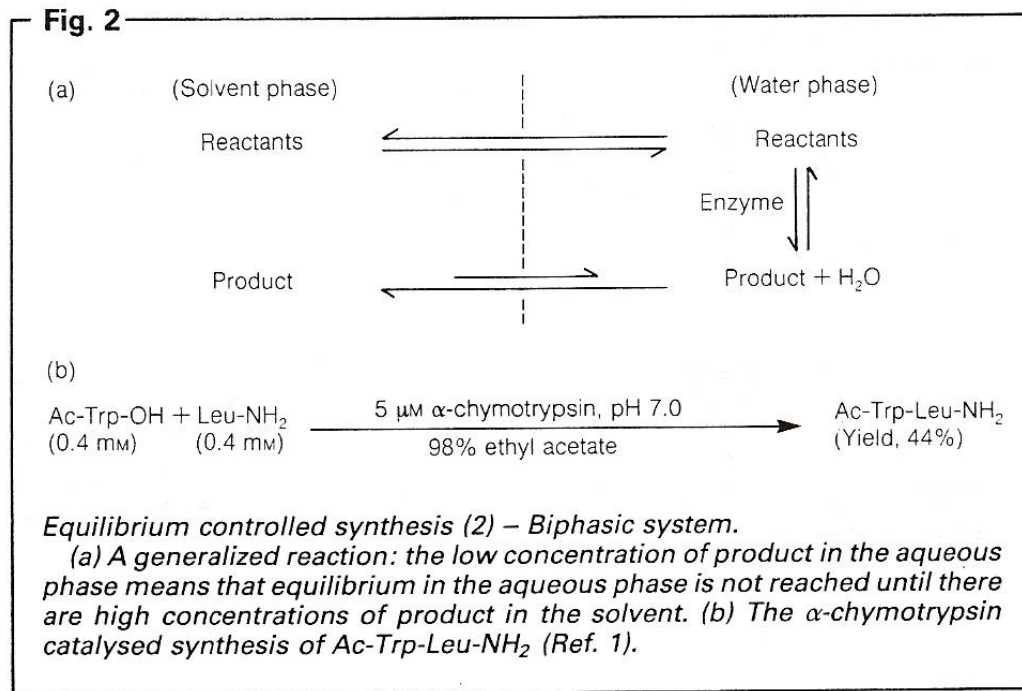
Product	Solubility ^a / μM
Ac-Phe-Leu- NH_2	10^4 (in water)
Z-Phe-Leu- NH_2	27
Z-Phe-Leu-OEt	17
Z-Phe-Leu- OBu^t	1.7
Z-Phe-Leu- NHC_6H_5	0.8
Z-Phe-Leu-ODPM	0.03

^aIn pH 7.0 buffer containing 10% dimethylformamide.

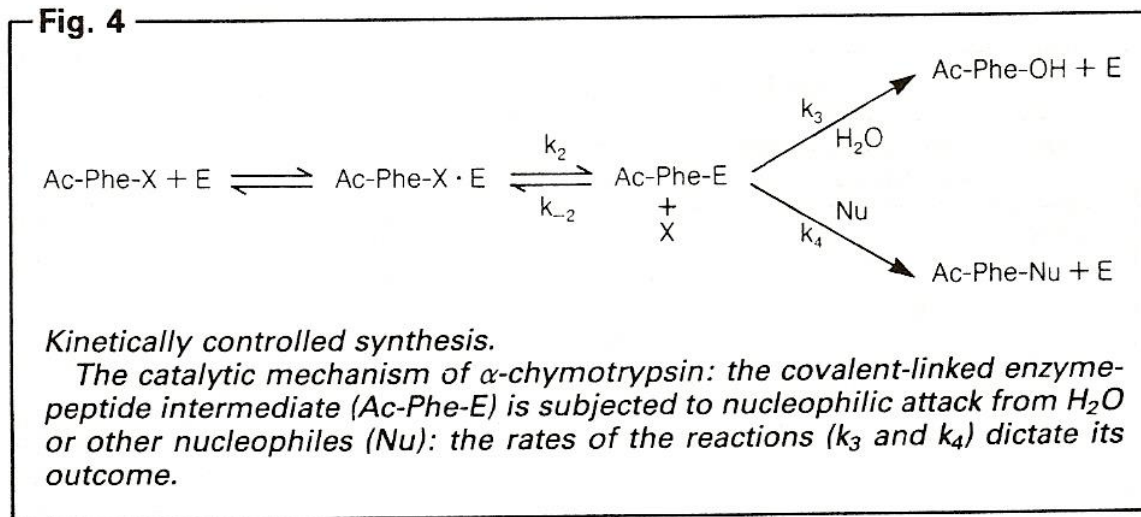
Strategie per la sintesi di legami peptidici mediante l'approccio termodinamico

L'equilibrio apparente viene spostato verso la sintesi rimuovendo dalla miscela di reazione il peptide prodotto:

sistema bifasico: acqua + solvente immiscibile



Strategia per la sintesi di legami peptidici mediante l'approccio cinetico



Questo approccio può essere utilizzato con proteasi a serina o a cisteina che formano l'intermedio covalente acil-enzima.

Si utilizzano esteri o ammidi degli aminoacidi come donatori di gruppi acilici per formare l'acil-enzima.

La deacilazione avviene in **competizione** tra idrolisi e aminolisi.

La reazione di aminolisi può essere favorita in solventi organici.

Gli enzimi mantengono attività catalitica in solvente organico

Gli enzimi sono in grado di mantenere la loro attività in solventi organici perché mantengono un sottile guscio di molecole di acqua. Inoltre conservano lo stato di ionizzazione esistente prima del trasferimento in solvente organico (memoria del pH).

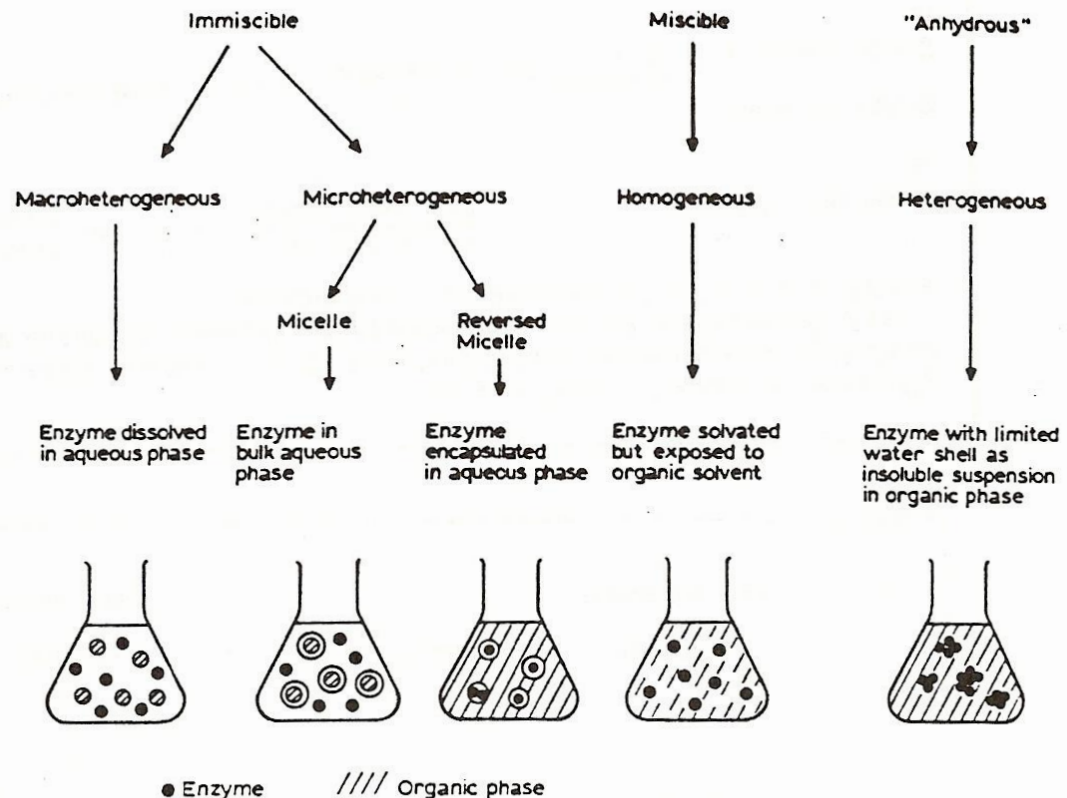


Figure 25. Schematic representation of the alternative miscible and immiscible organic: aqueous solvent systems.

Inversione dell'enantioselettività di un enzima mediata dal solvente

Reazione di transesterificazione catalizzata da una proteasi di *Aspergillus oryzae* in diversi solventi organici
N-acetil-(**D** o **L**)-fenilalanina-cloroetilestere + propanolo

Solvente	Enantioselettività (V_L/V_D)
Acetonitrile	7.1
Dimetilformamide	5.7
Acetone	1.3
Toluene	0.26
Ottano	0.24

La modalità di legame del substrato D è produttiva in solvente organico perché la catena laterale idrofobica Phe è esposta

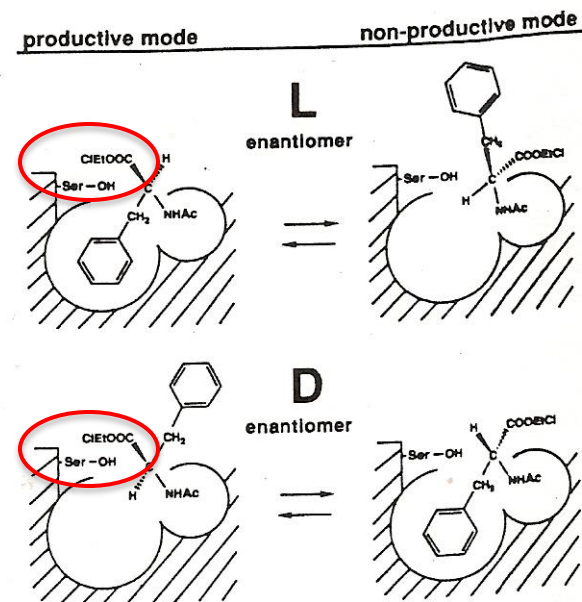


Figure 1. Schematic representation of binding of L (top) and D (bottom) enantiomers of 1 to the active center of *A. oryzae* protease. The bigger enantiomers of 1 to the active center of *A. oryzae* protease. The serine unfinished circle depicts the hydrophobic binding pocket. The serine residue shown is the head nucleophile of the enzyme; its hydroxyl is properly aligned to attack the ester carbonyl only in the productive binding mode.

Strategie per la sintesi enzimatica di peptidi

Table 5
Strategy for peptide synthesis by enzymatic method

	Equilibrium controlled synthesis	Kinetically controlled synthesis
Type of enzymes	All proteases (proteinases)	Serine and thiol proteases
Size of peptides (amino acid residues)	2–10 (Precipitation) 2–10 (Biphasic) 2–100 (Dissolved)	2–100
Specificity requirement in fragment (> hexapeptides) condensation	Strict	Not strict

Condizioni sperimentali per la sintesi enzimatica di peptidi

Table 3
Experimental conditions for peptide bond synthesis^a

Enzyme	Carboxyl component (Concn., M)	Amine component (Concn., M)	pH	Enzyme conc. (μ M)	Reaction time (h)	Yield (%)
Equilibrium controlled processes						
α -Chymotrypsin	Z-Phe-OH (0.05)	Leu-NH ₂ (0.05)	7	200	20	72
Trypsin	Bz-Arg-OH (0.05)	Leu-OBu ^t (1.0)	6.5	100	20	60 (soluble)
Subtilisin	Z-Gly-Pro-Leu-OH (0.05)	Leu-NHC ₆ H ₅ (0.05)	7	100	20	54
Papain ^b	Z-Ala-OH (0.05)	Leu-ODPM (0.05)	5	10	5	75
Papain	Z-Arg-OH (0.05)	Leu-OBu ^t (1.0)	5.5	8	5	50 (soluble)
Thermolysin	Z-Phe-OH (0.05)	Leu-NH ₂ (0.05)	7	3	5	70
Pepsin	Z-Gly-Phe-OH (0.05)	Leu-NHC ₆ H ₅ (0.05)	4.5	200	20	70
Kinetically controlled processes						
α -Chymotrypsin	Ac-Phe-OEt (0.1)	Leu-NH ₂ (0.1)	10	10	0.03 (2 min)	80
Trypsin ^c	Bz-Arg-OEt (0.2)	Leu-NH ₂ (0.2)	10	10	0.03 (2 min)	70 (soluble)
Carboxypeptidase Y ^d	Bz-Ala-OMe (0.055)	Val-NH ₂ (0.6)	9.7	4.5	1	80
Papain	Bz-Ala-OMe (0.1)	Val-NH ₂ (0.2)	8	200 ^e	1	82

^aData from Ref. 3. Except where otherwise specified, the reaction was carried out at 37 or 25°C using commercially available crystalline enzyme. The reaction with papain was performed in the presence of 10–50 mM KCN and 5 mM EDTA or 0.2 mM EDTA and 0.2 M dithiothreitol (for kinetically controlled process).

^bThe reaction mixture contained 40% dimethylformamide.

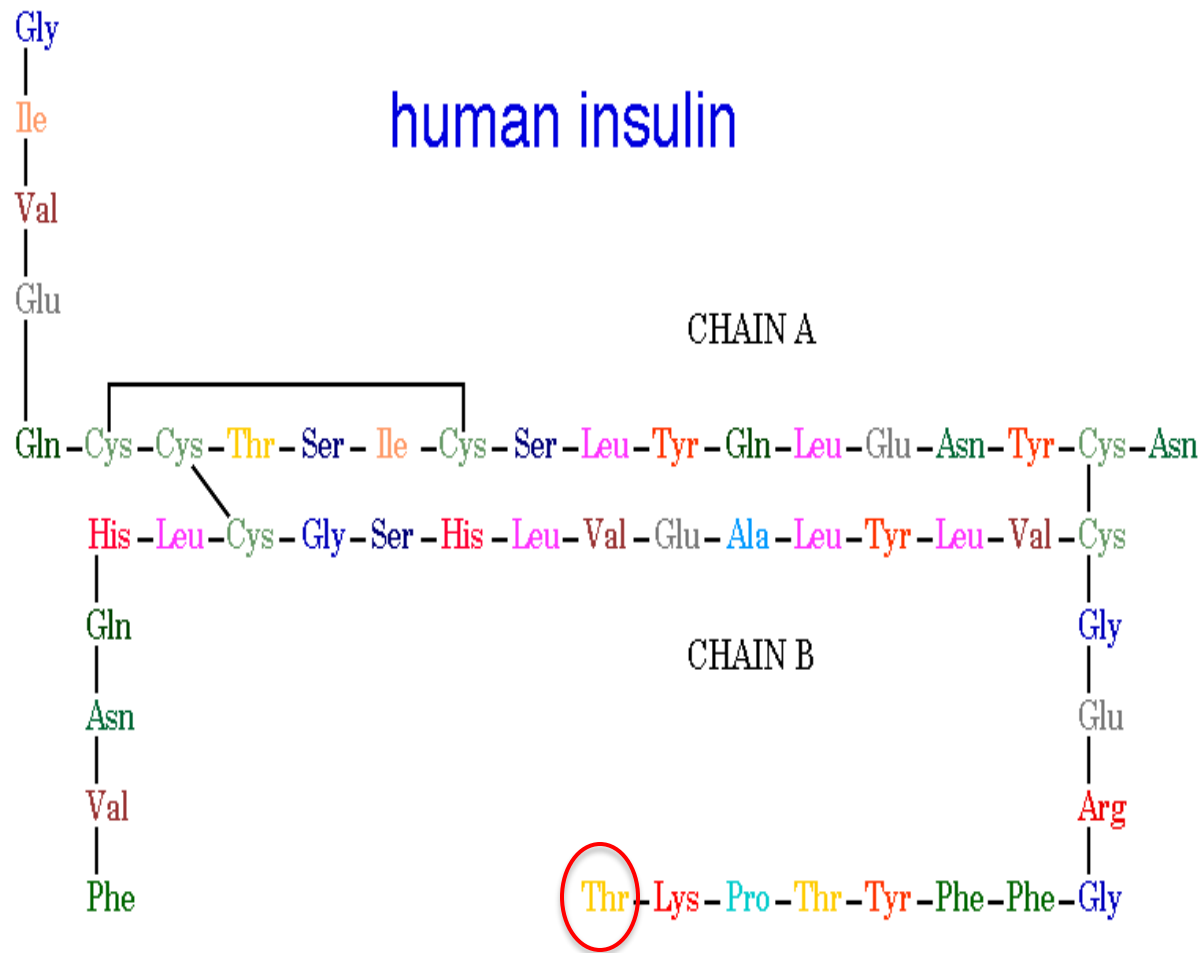
^cThe reaction mixture contained 20% dimethylformamide.

^dHighly purified preparation.

^eCrude preparation from Merck, 3.5 U/mg.

Semi-sintesi dell'insulina umana dall'insulina di maiale

L'insulina umana
differisce da quella
di maiale solo per
l'ultima posizione
della catena B:
Thr B30 vs Ala B30.



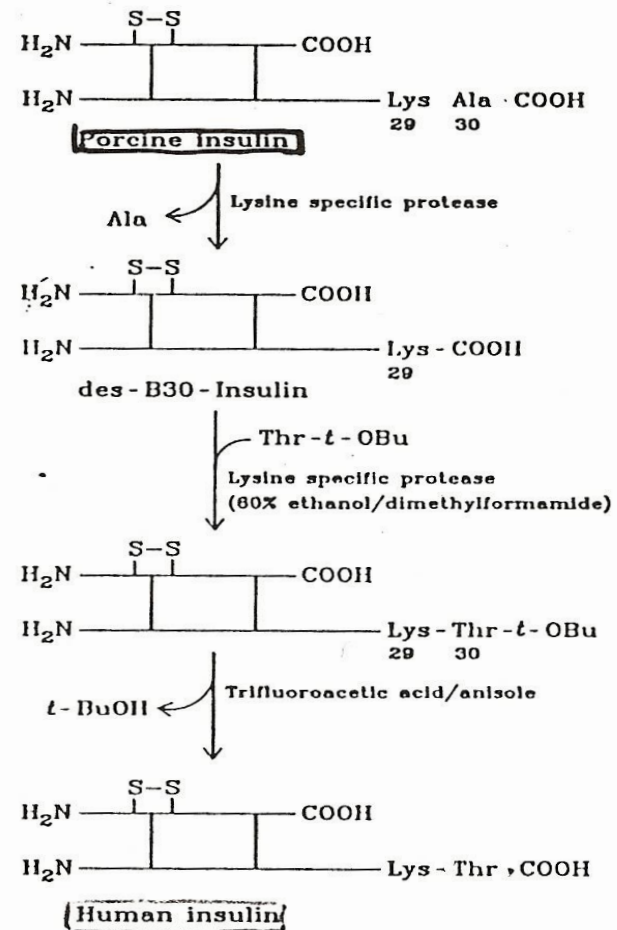
Semi-sintesi dell'insulina umana dall'insulina di maiale

Ala30 viene rimossa dalla carbossipeptidasi o da una proteasi lisina-specifica.

Una proteasi lisina-specifica viene utilizzata per catalizzare la sintesi del legame Lys29-Thr.

Procedura brevettata dalla Novo nel 1982.

Transpeptidazione dell'insulina ricombinante (catena B priva di Thr30) prodotta in *S. cerevisiae*

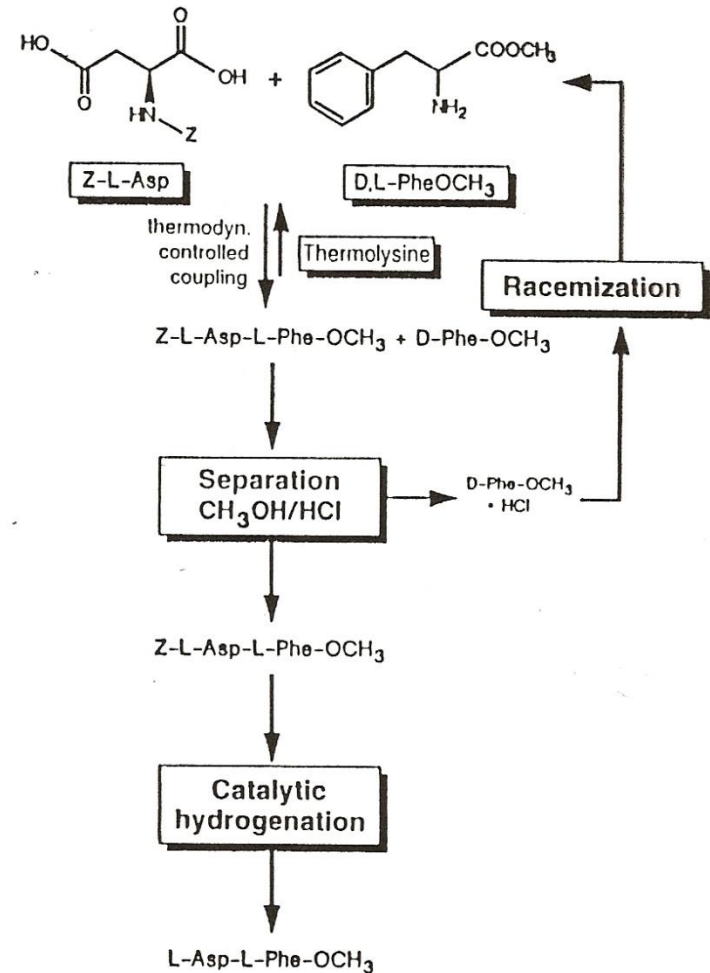
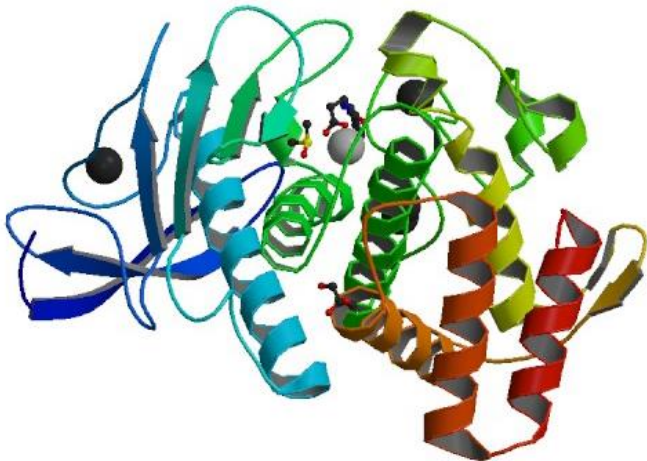


Enzymatic preparation of human insulin from porcine insulin.

Sintesi dell'aspartame

L'aspartame è un dipeptide formato da aspartato e fenilalanina-metilestere, 100-200 volte più dolce del saccarosio. La sintesi del legame peptidico è catalizzata dalla metalloproteasi termolisina.

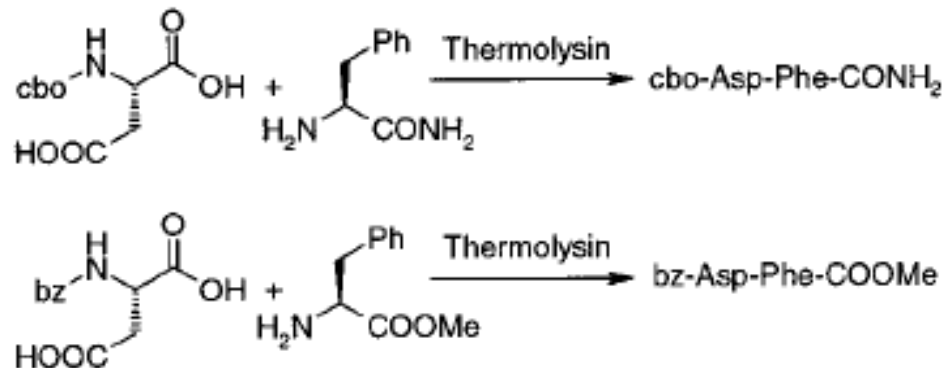
Termolisina: enantiospecifica (D,L-Phe)
regiospecifica (isomero α)
termostabile (50-60° C)
non ha attività esterasica



Tosoh process for the enzymatic manufacture of aspartame (OYAMA and KIHARA, 1984).

Sintesi dell'aspartame

Scheme 17. Thermolysin catalyzed synthesis of aspartame precursors; bz: benzoyl, cbo: carbobenzyloxy



Immobilizzazione della termolisina su Eupergit C in presenza di uno dei substrati aumenta l'attività di due volte

- Enzima libero in acqua
 - 95% resa Cbo-Asp-PheCONH₂
 - 50% resa bz-Asp-PheCOOMe
- Eupergit-termolisina in etil acetato
 - 50% resa Cbo-Asp-PheCONH₂
 - >95% resa bz-Asp-PheCOOMe