

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

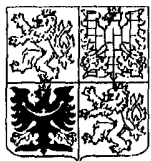
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2580-97

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **16. 02. 96**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **17.02.95**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **95/29904**

(33) Země priority: **JP**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14. 01. 98**
(Věstník č. 1/98)

(86) PCT číslo: **PCT/US96/02115**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 96/25489**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁶:

C 12 N 9/48
C 12 N 9/52
C 12 N 1/20
C 12 P 21/04

(71) Přihlášovatel:

THE PROCTER & GAMBLE COMPANY,
Cincinnati, OH, US;

(72) Původce:

Tamiya Eiichie, Ishikawa, JP;

(74) Zástupce:

PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1273,
Praha 4, 14021;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Psychrofilní proteáza a psychrofilní bakterie

(57) Anotace:

Vynález popisuje novou psychrofilní proteasu a mikroorganismus, který má schopnost produkovat psychrofilní proteasu. Proteasa působí na kasein a dimethylkasein a rozkládá je, avšak nerozkládá ribonukleasu. Optimální teplota pro uvedenou proteasu je 40°C. Je-li proteasa uchovávána 1 hodinu při pH 7, není při teplotě do 30 °C prakticky inaktivována, avšak při 40°C ztrácí přibližně 40 % své aktivity. Při teplotě 50 °C je proteasa rychle inaktivována, takže její aktivita úplně mizí do 15 minut. Rovněž je popisován mikroorganismus *Flavobacterium balustinum*, který má schopnost produkovat uvedenou proteasu.

CZ 2580-97 A3

Psychrofilní proteasa a psychrofilní bakterie

Oblast techniky

Vynález se týká proteasy, která má vysokou aktivitu v rozsahu nízkých teplot, jejího použití a psychrofilní bakterie, která proteasu produkuje.

Dosavadní stav techniky

Psychrofilní bakterie jsou známy dlouhou dobu a jejich existence v podmínkách nízkých teplot byla potvrzena v řadě případů. Psychrofilní bakterie lze izolovat z různých prostředí vyznačujících se nízkými teplotami, například z půdy, rybných produktů nebo mléčných výrobků, stejně jako z arteficiálního prostředí vyznačujícího se nízkými teplotami. Existují studie o psychrofilních bakteriích v potravinářské mikrobiologii, ale tyto studie se v podstatě týkají fylogenetiky mikroorganismů.

Existuje předpoklad, že enzymy získávané z psychrofilních bakterií budou rovněž psychrofilní, tedy, že jejich optimální teplota se bude nalézat v rozsahu nízkých teplot. Obecně platí, že psychrofilní enzym, který účinkuje efektivně při nízkých teplotách, lze přidat například do detergentu, který pak lze používat ve vodě při nízké teplotě. Lze se rovněž domnívat, že takový enzym lze použít v chemické reakci v přítomnosti organického rozpouštědla, které je těkavé při teplotě místnosti, i pro zlepšení kvality potravin při teplotě, kdy nedojde ke zkažení potravin. Studium enzymů

pocházejících z psychrofilních bakterií je velmi zajímavé i z hlediska fyziologické funkce a adaptačních mechanismů týkajících se nízkých teplot u psychrofilních bakterií.

Souhrn

Byl nalezen nový bakteriální kmen, který produkuje novou psychrofilní proteasu.

V souladu s tím, je předmětem tohoto vynálezu nová psychrofilní proteasa.

Dalším předmětem tohoto vynálezu je nový mikroorganismus, který tuto psychrofilní proteasu produkuje.

Dalším předmětem tohoto vynálezu je způsob přípravy této psychrofilní proteasy pomocí uvedeného nového mikroorganismu.

Psychrofilní proteasa podle tohoto vynálezu má následující fyzikálně-chemické vlastnosti.

- Specifická aktivita a substrátová specificita: proteasa rozkládá kasein a dimethylkasein, avšak nepůsobí na ribonukleasu.

- Optimální teplota: optimální teplota tohoto enzymu je přibližně 40 °C.

- Teplotní stabilita: za podmínek skladování při pH 7 po dobu 1 hodiny při 30 °C proteasa není prakticky inaktivována, avšak při 40 °C ztrácí přibližně 40 % své aktivity, a při 50 °C je rychle inaktivována, takže aktivita enzymu se úplně ztrácí během 15 minut.

Podle provedení vynálezu, kterému je dáвана přednost, má tato proteasa rovněž následující fyzikálně-chemické vlastnosti:

- Optimální pH: proteasa optimálně působí při pH 7,5;
- Stabilita enzymu z hlediska pH: proteasa je stabilní v rozsahu pH 6,0 až 10,0 v podmínkách skladování při 20 °C po dobu 1 hodiny;
- Molekulová hmotnost: přibližně 38 kDa (elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti sodium dodecylsulfátu a metody gelové filtrace);
- Izoelektrický bod: přibližně 4,5.

Nový mikroorganismus podle tohoto vynálezu je *Flavobacterium balustinum*, které má schopnost produkovat psychrofilní proteasu, jak je popsáno výše.

Způsob přípravy psychrofilní proteasy podle tohoto vynálezu zahrnuje kultivaci mikroorganismu *Flavobacterium balustinum* a získání psychrofilní proteasy z mikrobiální kultury.

Krátký popis zobrazení

Obr. 1 znázorňuje výsledek Příkladu 2, který ukazuje vztah mezi teplotou a aktivitou proteas kmene P104 a proteasy Subtilysin Carlsberg.

Obr. 2 znázorňuje výsledek Příkladu 4 (2), který ukazuje vliv počátečního pH na aktivitu extracelulární proteasy a růst *Flavobacterium balustinum* P104.

Obr. 3 znázorňuje výsledek Příkladu 4 (3), který ukazuje vliv kultivačních teplot na aktivitu extracelulární proteasy a růst *Flavobacterium balustinum* P104. Obr. 3 (A), (B) a (C) znázorňují výsledky získané při teplotách 10, 20 a 30 °C.

Obr. 4 znázorňuje výsledek eluce při gelové filtraci v Příkladu 5 (2) (c).

Obr. 5 znázorňuje výsledek chromatografické eluce v Příkladu 5 (2) (c).

Obr. 6 znázorňuje výsledek elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti sodium dodecylsulfátu pro zjištění molekulové hmotnosti v Příkladu 6.

Obr. 7 znázorňuje kalibrační křivku pro zjištění molekulové hmotnosti v Příkladu 4.

Obr. 8 znázorňuje kalibrační křivku pro gelovou filtraci pro zjištění molekulové hmotnosti v Příkladu 6.

Obr. 9 znázorňuje výsledek izoelektrické fokusace v Příkladu 7.

Obr. 10 znázorňuje kalibrační křivku izoelektrické fokusace v Příkladu 7.

Obr. 11 znázorňuje výsledek Příkladu 8, který ukazuje vliv pH na enzymovou reakci prováděnou enzymem podle tohoto vynálezu.

Obr. 12 znázorňuje výsledek Příkladu 9, který ukazuje stabilitu enzymu v závislosti na pH podle tohoto vynálezu.

Obr. 13 znázorňuje výsledek Příkladu 10, který ukazuje vliv teploty na enzymovou reakci prováděnou enzymem podle tohoto vynálezu.

Obr. 14 znázorňuje výsledek Příkladu 11, který ukazuje teplotní stabilitu enzymu podle tohoto vynálezu.

Obr. 15 znázorňuje výsledek Příkladu 13, který ukazuje vliv proteinového modifikátoru sodium dodecylsulfátu na enzym podle tohoto vynálezu.

Obr. 16 znázorňuje výsledek Příkladu 13, který ukazuje vliv proteinového modifikátoru močoviny na enzym podle tohoto vynálezu.

Obr. 17 představuje Lineweaver-Burkovo vynesení týkající se enzymu podle tohoto vynálezu zjišťované v Příkladu 16. Obr. 17 (A) ukazuje změnu hodnoty $1/v$ v rozsahu 0 až 2,0, obr. 17 (B) v rozsahu 0 až 0,2.

Podstata vynálezu

Bakterie produkující novou proteasu

Nová proteasa podle tohoto vynálezu je produkována mikroorganismy, které náleží k rodu *Flavobacterium* a mají schopnost produkovat proteasu, která má výše popsané vlastnosti.

Specifický příklad mikroorganismů, které mají schopnost produkovat proteasu podle tohoto vynálezu, výhodně zahrnuje *Flavobacterium balustinum* P104. Tento kmen je mikroorganismem izolovaným z vnitřností lososa a byl uložen v National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology pod číslem FERM BP-5006 dne 17. února 1995.

Bakteriologické vlastnosti *Flavobacterium balustinum* P104 podle tohoto vynálezu jsou vyjmenovány dále.

(1) Morfologické vlastnosti

Kmen má podobu krátkých bacilů o velikosti 0,4 až 0,5 x 1,7 až 1,9 mikrometrů.

(2) Povahy kultivačního media

Kmen roste na agarovém mediu a produkoval žlutý pigment.

(3) Optimální podmínky růstu

pH: kmen roste v rozmezí pH hodnot 5 až 9, a optimální pH růstu bylo přibližně neutrální.

Teplota: kmen rostl v rozmezí teplot 10 až 30 °C, a optimální růstová teplota byla přibližně 20 °C.

(4) Příslušnost k aerobním a anaerobním bakteriím: aerob.

(5) Příslušnost podle Gramova barvení: Gram negativní.

(6) Biochemické vlastnosti

Hlavní biochemické vlastnosti mikroorganismu *Flavobacterium balustinum* P104 jsou uvedeny v Tab. 1.

Tabulka 1

Testované vlastnosti	Výsledek
Galaktosidasa	-
Arginindihydrolasa	-
Lysinidekarboxylasa	-
Ornitindekarboxylasa	-
Využití kyseliny citronové	-
Produkce H ₂ S	-
Ureasa	+
Tryptofanaminasa	-
Produkce indolů	+
Želatinasa	+
Glukosa	-
D-manitol	-
Inositol	-
D-sorbitol	-
Rhamnosa	-
Sacharosa	-
D-melibiosa	-
D-amygdalin	-
L-arbinol	-
Oxidasa	-

Ačkoli se kmen jevil podle těchto vlastností jako *Flavobacterium indolgenes*, byl klasifikován jako *Flavobacterium balustinum* na základě porovnání sekvence DNA kódující 16S ribosomální RNA se sekvencí bazí známého mikroorganismu, jak je popsáno v Příkladu 3.

Kultivační medium používané pro kultivaci mikroorganismu je buď tekuté nebo pevné, ale obecně je používána třepaná kultura nebo aerovaná kultura obsahující tekuté medium.

Lze použít libovolné kultivační medium pro kultivaci

mikroorganismu, které je vhodné z hlediska růstu a produkce proteasy. Specificky příklady zdrojů uhlíku zahrnují glukosu, trehalosu, fruktosu, maltosu, sacharosu, škrob a oligosacharidy ze sladu. Příklady zdroje dusíku zahrnují kvasničný extrakt, sojovou moučku, moučku z bavlníkových semen, corn steep, různé aminokyseliny a jejich soli, a nitráty. Lze rovněž použít syntetická media nebo přírodní media obsahující vhodné anorganické soli jako fosfáty hořčíku, vápníku, sodíku, draslíku, železa a manganu, a jiné živiny podle potřeby.

Kultivační podmínky jako jsou pH a teplota lze určit v rozsahu produkce proteasy, třepaná kultura na tekutém mediu nebo aerovaná třepaná kultura se výhodně provádějí při neutrální hodnotě pH a teplotě okolo 20 °C.

Proteasa podle tohoto vynálezu je produkována v buněčné stěně bakteriální buňky, uvnitř buňky a v supernatantu kultury a je tudíž ve formě bakteriální stěny, hrubého enzymu získaného z bakteriální buňky, nebo supernatantu kultury na tekutém mediu, nebo ve formě extrahovaného a purifikovaného enzymu. Enzym též může být v podobě proteasy imobilizované na substrátu pomocí známé metody.

Izolace enzymu

Pro izolaci a purifikaci enzymu podle tohoto vynálezu z kultury na tekutém mediu lze použít dobře známé metody a to buď jednotlivě nebo v kombinaci.

Proteasa podle tohoto vynálezu je převážně vylučována extracelulárně, zvláště v kulturách na tekutém mediu, proto

lze bakteriální buňky snadno odstranit například filtrací nebo centrifugací a získat tak hrubý roztok enzymu. Hrubý roztok enzymu lze dále purifikovat známými metodami. Tyto metody zahrnují přednostně vysolování s použitím soli jako je amonium sulfát, precipitační metodu s organickými rozpouštědly jako jsou metanol, etanol, nebo aceton, adsorpční metodu se surovým škrobem, ultrafiltrační metodu, a různé chromatografické metody jako je gelová filtrační chromatografie nebo iontoměničová chromatografie. Typické příklady přednostně užívaných metod jsou uvedeny v Příkladech v dalším textu.

Vlastnosti proteasy

Byly zkoumány vlastnosti proteasy podle tohoto vynálezu a výsledky jsou uvedeny dále.

(1) Aktivita a substrátová specificita

Tento enzym dobře štěpí makromolekulární proteiny jako kasein či dimetylkasein nebo denaturované proteiny. Rovněž štěpí gelatin, což je denaturovaný protein kolagenu v rozsahu asi 50% ve srovnání s kaseinem. Málo působí na ostatní přirozené proteiny a vůbec nepůsobí na ribonukleasu.

Průmyslově používané proteasy jako subtilisin nemají substrátovou specifitu a působí na většinu proteinů. Naopak, enzym podle tohoto vynálezu působí jen na makromolekulární proteiny nebo na denaturované proteiny, do kterých se poměrně snadno dostává.

Proteasa, která je obdobou enzymu podle tohoto vynálezu a je získána z psychrofilní bakterie *Pseudomonas fluorescens*, dobře štěpí makromolekulární proteiny jako kasein nebo

dimetylkasein nebo denaturované proteiny. Avšak tato proteasa, která se liší od enzymu tohoto vynálezu, rovněž štěpí přirozené globulární proteiny jako hemoglobin a albumin hovězího séra v rozsahu asi 40 % ve srovnání s dimetylkaseinem. Proto má enzym podle tohoto vynálezu pravděpodobně vyšší substrátovou specifitu než známé enzymy.

(2) Optimální teplota a teplotní stabilita

Enzym podle tohoto vynálezu působí při teplotě 40 °C.

Když je enzym uchováván při pH 7 po dobu 1 hodiny, je zřídka inaktivován při teplotě do 30 °C, ale při 40 °C ztrácí 40 % své aktivity. Při teplotě 50 °C je rychle inaktivován, takže do 15 minut ztrácí veškerou aktivitu.

Enzym podle tohoto vynálezu je tedy psychrofilním enzymem, projevujícím účinnou katalytickou aktivitu při nízkých teplotách.

(3) Optimální pH a rozsah pH kdy je enzym stabilní

Enzym podle tohoto vynálezu má optimální pH 7,5.

Je stabilní v rozmezí pH 6,0 až 10,0 za podmínek uchovávání při 20 °C po dobu 1 hodiny.

Enzym je tedy neutrální proteasou, která nepůsobí v extrémně kyselém nebo zásaditém rozmezí hodnot pH. Enzym se inaktivuje při uchovávání v extrémně kyselém nebo zásaditém rozmezí hodnot pH.

(4) Molekulová hmotnost

Enzym podle tohoto vynálezu má molekulovou hmotnost 38 kDa, která byla měřena pomocí metod elektroforesy na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti sodium dodecylsulfátu a gelové filtrace.

(5) Izoelektrický bod

Enzym podle tohoto vynálezu má izoelektrický bod 4,5, který byl měřen pomocí izoelektrické fokusace.

(6) Inhibice aktivity

Proteasová aktivita enzymu není inhibována fenylmetylsulfonylfluoridem nebo jodoacetamidem, ale je značně inhibována kyselinou ethylendiamintetraoctovou, 2,2-bipyridylem, kyselinou citronovou nebo kyselinou šťavelovou. Proteasová aktivita tedy závisí na kovových iontech, proto je pravděpodobně enzym podle tohoto vynálezu metaloproteasou. Z inhibice proteasové aktivity kyselinou citronovou a šťavelovou vyplývá závislost enzymové aktivity na iontech vápníku.

Navíc je enzymová aktivita značně inhibována kovovými ionty jako Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} a Fe^{2+} , mezi nimi pak zvláště Ag^+ . Není však inhibována Mg^{2+} ani Ca^{2+} .

(7) Enzymová reakční kinetika

Enzym podle tohoto vynálezu vykazuje typ reakční rychlosti Michaelis-Mentenové v závislosti na koncentraci substrátu jako je kasein. Hodnoty K_m klesají a hodnoty $V_{\max}$ stoupají se zvyšující se teplotou. Navíc, K_{cat} enzymu vykazuje pozoruhodně vysoké hodnoty v rozmezí od 10 do 40 °C. Enzymy bývají obecně inhibovány nadbytkem substrátu. Avšak v případě enzymu podle tohoto vynálezu K_{cat} hodnota stoupá, když se systém blíží optimální pracovní teplotě. Enzym je tedy výhodný v tom ohledu, že nepozorujeme znatelnou inhibici rozkladnými produkty. Z Lineweaver-Burkeho závislosti lze rovněž usuzovat, že inhibice způsobená teplotou má smíšenou formu, to znamená, že vliv teploty představuje nekompetitivní nebo akompetitivní inhibici a vliv rozkladných produktů inhibici kompetitivní.

Použití enzymu

Psychrofilní proteasa podle tohoto vynálezu má optimální teplotu v nízkém teplotním rozsahu. Tedy, pomocí psychrofilní proteasy podle tohoto vynálezu, lze štěpit proteiny při nízké teplotě. Například detergent, který lze použít i ve vodě při nízké teplotě, je připraven přidáním proteasy podle tohoto vynálezu do detergentního přípravku. S výjimkou zahrnutí psychrofilní proteasy podle tohoto vynálezu, lze tento detergentní přípravek připravit konvenčními metodami. Stručně řečeno, lze jej připravit kombinací proteasy podle tohoto vynálezu s obvyklou detergentní složkou jako je povrchově aktivní činidlo pro detergenty, bělidlo nebo plnidlo.

Enzymová reakce psychrofilní proteasy podle tohoto vynálezu probíhá při nízké teplotě. Tedy, i když reakční systém obsahuje organické rozpouštědlo, které je těkavé při teplotě místnosti, může reakce probíhat za nízké teploty, kdy se organické rozpouštědlo neodpařuje. Navíc, když zamýšlíme zlepšit kvalitu potravin použitím proteasy podle tohoto vynálezu, je výhodné užít tuto proteasu, protože reakce probíhá při nízké teplotě, při které jsou potraviny účinně chráněny před rozkladem.

Vzhledem k tomu, že proteasa podle tohoto vynálezu je dostupná, očekáváme pokrok v dalším studiu fyziologických mechanismů psychrofilních bakterií a jejich aplikačních mechanismů při nízkých teplotách

Tento vynález je popsán podrobněji dále v souvislosti se specifickými příklady, ale rozsah vynálezu jimi není

omezen.

V této souvislosti byly proteiny kvantitativně stanoveny barvicí metodou Bio-Rad Protein Assay a proteinové frakce eluátu získané pomocí chromatografie byly měřeny s využitím absorpce ultrafialového záření při 280 nm, pokud není uvedeno jinak.

Kromě toho byla aktivita proteasy měřena následovně.

(a) Rozkladná aktivita proteinu měřená s azokaseinem

0,05 ml roztoku enzymu bylo přidáno k 0,3 ml 0,067 M fosfátového pufru, obsahujícího 1 % (W/V) azokaseinu (pH 7,0) a směs byla udržována při teplotě 30 °C po dobu 30 minut. Reakce byla ukončena přidáním 6% roztoku trichloroctové kyseliny. Po 15 minutách byla reakční směs centrifugována při 14 000 ot./min při teplotě místnosti po dobu 5 minut. Absorbance supernatantu byla měřena při 340 nm. Enzymová aktivita byla definována na základě ACU (jednotka rozkladu azokaseinu = azocasein digestion unit), která představuje nárůst absorpance o 0,001 za minutu při 340 nm.

(b) Rozkladná aktivita proteinu stanovená modifikovanou Ansonovou metodou

0,05 ml roztoku enzymu bylo přidáno k 0,3 ml 0,067 M fosfátového pufru obsahujícího 1% (W/V) koncentraci proteinu (pH 7,0) a směs byla potom udržována při teplotě 30 °C po dobu 30 minut. Reakce byla ukončena přidáním 7,5 % roztoku trichloroctové kyseliny. Po 30 minutách byla reakční směs centrifugována při 14 000 ot./min při teplotě místnosti po dobu 5 minut. Absorbance supernatantu byla změřena při 280 nm. Enzymová aktivita byla definována na základě AU (modifikovaná Ansonova jednotka = modified Anson unit), která představuje

produkci tyrosinu v množství 1 mol za minutu.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

(1) Vyhledávání nových bakteriálních kmenů

Izolace nového bakteriálního kmene byla provedena na agarovém mediu. Izolovaný vzorek vnitřních orgánů lososa byl resuspendován ve fyziologickém roztoku a supernatant byl použit jako zásobní roztok, ze kterého byl připraven 100 krát ředěný roztok. Objemy 0,2 ml zásobního roztoku a 100 krát ředěného roztoku byly nastříkány na agarové medium pro vyhledávání kmenů (polypepton 3 g/l, kvasničný extrakt 10 g/l, Na kasein 10 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/l, agar 2,0 g/l; Petriho misky o průměru 9 cm) a agarové plotny byly kultivovány při teplotě 10 °C po 3 dny. Z kolonií vyrostlých na agaru byly vybrány dobře rostoucí izoláty pro subkultivaci a inokulaci na agarových plotnách pro vytvoření zásobních kultur.

Aktivita exoenzymu byla stanovena na agarovém mediu. Izolovaný bakteriální kmen byl inokulován v pruzích na agarové medium pro vyhledávání, jak bylo popsáno výše, a kultivován při 10 °C po 3 dny. Na agarovou plotnu, na které rostly bakterie, byla následně nastříkána 10% kyselina trichloroctová a bakterie produkující proteasu byly detekovány vytvořením jasných skvrn.

(2) Kultivace izolovaného bakteriálního kmene a produkce enzymu

Izolované bakterie ze zásobního media byly inokulovány do 25 ml prekultivačního media (polypepton 10 g/l, endoextrakt 10 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/l, pH 7,0 ve 100 ml Erlenmeyerově baňce) a kultivovány na rotačním třepačce při 10 °C a 150 ot./min po dobu 48 hodin v TAITECNR-80, aby se stabilizovala růstová aktivita bakterií. Obvykle bylo inokulováno 0,25 ml prekultivačního roztoku do 25 ml media pro produkci enzymů (polypepton 5 g/l, kvasničný extrakt 2,5 g/l, Na kasein 5 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/l, pH 7,0 ve 100 ml Erlenmeyerově baňce) a kultivovány na rotační třepačce při 10 °C a 150 ot./min po dobu 72 hodin. Kultivační medium bylo předtím sterilizováno párou při 121 °C (1,2 kgf/cm²) po dobu 15 minut.

Izolovaný bakteriální kmen byl uchováván na agarovém mediu pro uchovávání bakterií při 10 °C a subkultivován po 2 týdnech až 1 měsíci.

(3) Měření proteasové aktivity

Kultivační roztok, získaný předchozím postupem (2), byl zcentrifugován (17 000 x g, 4 °C, 15 minut). Supernatant byl použit jako hrubý enzymový roztok. Proteasová aktivita byla měřena rozkladem azokaseinu. 0,05 ml hrubého enzymového roztoku bylo přidáno k 0,3 ml 0,067 M fosfátového roztoku, obsahujícího 1% (W/V) azokaseinu (pH 7,0) a směs byla inkubována při 20 °C po dobu 30 minut. Reakce byla potom ukončena 6% roztokem kyseliny trichloroctové a po 15 minutách byla reakční směs centrifugována při 14 000 ot./min a teplotě místnosti po dobu 5 minut. Absorbance supernatantu byla změřena při 340 nm pomocí spektrofotometru (Beckman DU640). Enzymová aktivita byla stanovena na základě ACU (jednotka rozkladu azokaseinu = azokasein digestion unit), která

představuje nárůst absorbance o 0,001 za minutu při 340 nm.

Výsledkem kroků (1) až (3) byla izolace bakteriálního kmene P104 s proteasovou aktivitou. Bakteriální kmen vykazoval proteasovou aktivitu, která je ukázána v následující tabulce.

V tabulce uvedená rychlost růstu kmene byla získána porovnáním s růstem kmene *Cytophaga xantha* IFO 14972.

Tabulka 2

Bakteriální kmen s proteasovou aktivitou

Kmen	Růstová rychlost	Proteasová aktivita (x 10 ³ ACU/ml)
P104	+++	0,982

Příklad 2

Proteasová aktivita u P104

Vliv teploty na enzymovou aktivitu byl zkoumán u kultivačního roztoku získaného kultivací kmene P104 produkujícího proteasu v teplotním rozmezí od 0 do 60 °C. Teplotní závislost enzymové aktivity byla stejným způsobem zkoumána u Subtilisinu Carlsberg (Sigma), což je komerčně dostupná enzymová proteasa pocházející z *Bacillus licheniformis*.

Výsledek je ukázán na obr. 1, na kterém je specifická aktivita kmene P104 znázorněna čtverečky a specifická aktivita Subtilisinu Carlsberg trojúhelníčky.

Optimální teploty byly 40 °C pro exoproteasu kmene P104 a 60 °C nebo více pro Subtilisin Carlsberg. Exoproteasa kmene P104 si zachovala při teplotě 20 °C a při optimální teplotě 40 a více procent proteasové aktivity. Proteasa Subtilisin

Carlsberg si zachovala jen asi 10% proteasové aktivity při optimální teplotě.

V rozmezí od 10 do 40 °C byla pro tyto exoproteasy vypočtena aktivační energie enzymové reakce. Výsledky ukazuje následující tabulka.

Tabulka 3

Bakteriální buňka	Aktivační energie (kJ/mol)
P104	39,8
<i>Bacillus subtilis</i>	58,3

Příklad 3

Identifikace kmene P104 na základě sekvence bazí v DNA pro 16S ribosomální RNA.

Vzorek kultivačního roztoku získaný podle Příkladu 2 byl odebrán do 1,5 ml mikrozkušavky a bakterie byly odděleny centrifugací. Genomová DNA byla extrahována s cílem amplifikovat DNA sekvenci bazí kódující 16S RNA pomocí PCR (polymerasová řetězová reakce). Sekvence bazí byla potom určena za použití Sangerovy metody a porovnána s databází Genové banky (Genbank) pro identifikaci. Seznam použitých primerů je uveden dále, jako PCR bylo použito 1F-Link a 5R-Link.

Primery:

1F-Link: 5'-TGTAACGACGGCCAGTAGTTTGATCATGGCTCAG-3';

3R-Link: 5'-CAGGAAACAGCTATGACCCGTCAATTCATTTGAGTT-3';

3F-Link: 5'-TGTTAAACGACGGCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTA-3';

5R-Link: 5'-TGTAACGACGGCCAGTAAGTCCCGCAACGAGCGCAA-3'.

24.10.97

Výsledky srovnání s databází Genové banky jsou uvedeny v následujících tabulkách. V těchto tabulkách Query představuje gen pro 16S ribosomální RNA pocházející z kmene P104 a Subject představuje 16S ribosomální RNA z *Flavobacterium balustinum* (FVBRR16SH). Bakteriální kmen byl identifikován jako *Flavobacterium balustinum*. Kmen P104 je tedy dále označován jako *Flavobacterium balustinum* P104.

24.10.97

(a) Použitý primer 1F-Link

Identita = 185/204 (90 %), podobnost = 185/204 (90 %)

```

Query:1  G A T G A A C G C T A G C G G G A G G C
          : : : : : : : : : : : : : : : :
Sbjct:31  G A T N A A C G C T A G C G G G A G G C
Query:21  C T A A C A C A T G C A A G C C G A G C
          : : : : : : : : : : : : : : : :
Sbjct:51  C T A A C A C A T G C A A G C C G A G C
Query:41  G G T A T T T G T C T T T C G G G A C A
          : : : : : : : : : : : : : : : :
Sbjct:71  G G T A T A G A T T C T T C G G A A T C
Query:61  G A G A G A G C G G A G T A C G G G T G
          : : : : : : : : : : : : : : : :
Sbjct:91  T A G A G A G C G G C G T A C G G G T G
Query:81  C G G A A C A C G T G T G C A A C C T A
          : : : : : : : : : : : : : : : :
Sbjct:111 C G G A A C A C G T G T G C A A C C T A
Query:101 C C T T T A T C A G G G G G A T A G C C
          : : : : : : : : : : : : : : : :
Sbjct:131 C C N T T A T C A G G G G G A T A G C C
Query:121 T T T C G A A A G G A A G A T T A A T A
          : : : : : : : : : : : : : : : :
Sbjct:151 T T T C G A A A G G A A G A T T A A T A
Query:141 C C C C A T A A T A T A T T G A T T G G
          : : : : : : : : : : : : : : : :
Sbjct:171 C C C N A T A A T A T A T T G A C T G G
Query:161 C A T C A G T T A C T A T T G A C A A C
          : : : : : : : : : : : : : : : :
Sbjct:191 C A T C A G T C G A T A T T G A A A A C
Query:181 T C C G G T G G A T A G A G A T G G T C
          : : : : : : : : : : : : : : : :
Sbjct:211 T C C G G T G G A T A G A G A T G G G C
Query:201 A C G C
          : : : :
Sbjct:231 A C G C

```

24.10.97

(b) Použitý primer 3F-Link

Identita = 208/330 (63 %), podobnost = 208/330 (63 %)

```

Query:1   G A T A T T A C T T A G A A C A C C A A
          : : : : : : : : : : : : : : : :
Sbjct:695 G A T A T T A C T T A G A A C A C C A A
Query:21  T T G C G A G G G A N G T T C A C T A T
          : : : : : : : : : : : : : : : :
Sbjct:715 T T G C G A A G G C A G G T C A C T A T
Query:41  G T N T N A C C T G A T G C N G A T G N
          : : : : : : : : : : : : : : : :
Sbjct:735 G T T T T A A C T G A C G C T G A T G G
Query:61  C C G A A A G T G N G N T G A G T G A A
          : : : : : : : : : : : : : : : :
Sbjct:755 A C G A A A G C G T G G G G A G C G A A
Query:81  C A G G A T T A G T T N C C A T G G T C
          : : : : : : : : : : : : : : : :
Sbjct:775 C A G G A T T A G A T A C C C T G G T A
Query:101 G N C C A C G N C G T N C A C N A T N T
          : : : : : : : : : : : : : : : :
Sbjct:795 G T C C A C G C C G T A A A C G A T G C
Query:121 T A T C T C G N T T N T G G G A T T A N
          : : : : : : : : : : : : : : : :
Sbjct:815 T A A C T C G T T T T T G G G C T T T A
Query:141 N A G T N C A G C G A G T A A C A N A G
          : : : : : : : : : : : : : : : :
Sbjct:835 G G G T T C A G A G A C T A A G C G A A
Query:161 A G T N G T A T G N N A G N C A C C N G
          : : : : : : : : : : : : : : : :
Sbjct:845 A G T G A T A A G T T A G C N A C C T G
Query:181 N C G N G T C N G T T C G C A G G T T T
          : : : : : : : : : : : : : : : :
Sbjct:865 G G G A G T A C G T T C G C A A G A A T
Query:201 C G A A N T C A G C N T C C T G G C G G
          : : : : : : : : : : : : : : : :
Sbjct:885 G A A A C T C A A A G G A A T T G A C G

```

19a

24.10.97

```

Query:201  N T G G C C N N T A C A C N C T G T G N
           | |           | | |           | | | |
Sbjct:905  G G N N C C N G C A C A A G C G G T G G
Query:221  T T T A T A T N G T N T A A N G C G T T
           | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct:925  A T T A T G T G G T T T A A T T C G A T
Query:241  N A T N C N A G A G G G T C C T N A C C
           | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct:945  G A T A C G C G A G G A A C C T T A C C
Query:261  A N G N T T N N T T N G G G T C N T C C
           | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct:965  A A G G C T T A A A T G G G A A T T G A
Query:281  C A G C C T T C G T C T N T A C T T G T
           | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct:985  C A G G T T T A G A A A T A G A C T T T
Query:301  G N T T C G G A C A
           | | | | | | | |
Sbjct:1005 T C T T C G G A C A

```

24.10.97

(c) Použitý primer 3R-Link

Identita = 128/162 (79 %), podobnost = 128/162 (79 %)

```

Query:162  T T N T T G G G N A T A A N A G G G N C
           : :      : : :      : : :      : : :      :
Sbjct:552  T T T A T T G G G T T T A A A G G G T C
Query:142  C N T C N G C G G A C C T G T A A A T C
           : :      : : : : :      : : : : : : : : :
Sbjct:572  C G T A G G C G G A T C T G T A A G T C
Query:122  A T T G G T G A T A T C T C A G A G C C
           : : : : : : :      : : : : : :      : : :
Sbjct:592  A G T G G T G A A A T C T C A T A G C T
Query:102  T G T C T A T G G G A C T A C C A T T G
           : :      : : : : :      : : :      : : : : :
Sbjct:612  T A A C T A T G A A A C T G C C A T T G
Query:82   A T G C T C C A G G T C A T G A G T C T
           : :      : : : : : : :      : : : : :
Sbjct:632  A T A C T G C A G G T C T T G A G T A A
Query:62   A G C A G G A G T G G C T G G A A T A A
           : :      : : : : : : : : : : : : : : :
Sbjct:652  A G T A G A A G T G G C T G G A A T A A
Query:42   G T A C T G T A A C G G T G T A A T G C
           : : :      : : : : :      : : : : :      : : : :
Sbjct:672  G T A G T G T A G C G G T G A A A T G C
Query:22   A T A G A T A T T A C T C A G A A C C C
           : : : : : : : : : : : : :      : : : : : :
Sbjct:692  A T A G A T A T T A C T T A G A A C A C
Query:2    C A
           : :
Sbjct:712  C A

```

24.10.97

(d) Použitý primer 5R-Link

Identita = 237/273 (86 %), podobnost = 237/273 (86 %)

```

Query:273  C C G G T A C N C C T T G G G C C A C A
           | |      | | | | | | | | | | | |
Sbjct:1193  C C C T T A C G C C T T G G G C C A C A
Query:253  C A C G T A A T A C A A T G N C A A G N
           | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct:1213  C A C G T A A T A C A A T G G C C A G T
Query:233  A C A G A G N G T A G C N A C C A G N C
           | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct:1233  A C A G A G G G C A G C T A C C A G G C
Query:213  G N C T G G A T G C G A A T C T C G A A
           | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct:1253  G A C T G G A T G C G A A T C T C G A A
Query:193  A N C T G C N C T C A G A N C G G A N T
           | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct:1273  A G C T N G N C T C A G T T C G G A T T
Query:173  G G A G T C T G C A A C T C G A C T C T
           | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct:1293  G G A G T C T G C A A C T C G A C T C T
Query:153  A T G A A A C T G G A T N C G C T A G T
           | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct:1313  A T G A A G C T G G A A T C G C T A G T

```

Query:133 A A T C G C A T A T C A G N C A T G A T
: : : : : : : : : : : : : : : : :
Sbjct:1333 A A T C G C A T A T C A G C C A T G A T
Query:113 N C G G T G A A N A C G T T G C C N G G
: : : : : : : : : : : : : : : : :
Sbjct:1353 G C G G T G A A T A C G T T C C C N G G
Query:93 C C T T G N A A A C A C C G C C C G T C
: : : : : : : : : : : : : : : : :
Sbjct:1373 C C T T G T A C A C A C C G C N C G T C
Query:73 A A C C C A T G G A A G T T T G G G G T
: : : : : : : : : : : : : : : : :
Sbjct:1393 A A G C C A T G G A A G T T T G G G G T
Query:53 A C C T G N A G T C G G T G A C C G T A
: : : : : : : : : : : : : : : : :
Sbjct:1413 A C C T G A A G T C G G T G A C C G T A
Query:33 A C N G G A C C T N C C T A G G G T A N
: : : : : : : : : : : : : : : : :
Sbjct:1433 A C A G G A G C T G C C T A G G G T A A
Query:13 N A C A A G T A A C T A G
: : : : : : : : : : : : : : : : :
Sbjct:1453 A A C A A G T A A C T A G

Příklad 4

Kultura *Flavobacterium balustinum* P104

(1) Měření koncentrace bakteriálních buněk

Kultivační roztok, získaný podle Příkladu 2, byl naředěn fyziologickým roztokem tak, aby byla zajištěna hodnota 0 až 5 buněk připadajících na komůrku počítáče bakterií (bacterial counter cell). Buňky byly počítány za pomoci optického mikroskopu. Aby se získala korelace mezi počtem buněk a turbiditou suspence buněk, byly turbidity jednotlivých ředění kultivačního roztoku měřeny spektroskopicky při 660 nm. Vztah mezi turbiditou a koncentrací bakteriálních buněk *Flavobacterium balustinum* P104 popisuje následující rovnice:

$$(\text{Buňky/ml}) = 1,13 \times 10^9 \times \text{Abs.660 nm},$$

kde $1,13 \times 10^9$ je faktor získaný z kalibrační křivky.

(2) Vliv pH

Bakteriální kmen byl kultivován při různých počátečních hodnotách pH kultivačních medií pro produkci proteasy v rozmezí od 5 do 9 se záměrem prozkoumat vliv počátečního pH na exoproteasovou aktivitu a růst.

Výsledky jsou zobrazeny na obr. 2.

Při alkalickém pH byl růst bakterií signifikantně snížen a rovněž se snížila proteasová aktivita. Nesignifikantní rozdíly, ať už v bakteriálním růstu nebo v proteasové aktivitě, byly pozorovány při kyselém pH. Růst bakteriálního kmene byl nejvyšší a proteasová aktivita dosahovala nejvyšší úroveň při neutrálním pH.

(3) Vliv kultivační teploty

Flavobacterium balustinum P104 bylo kultivováno při

různých teplotách v rozmezí od 10 do 30 °C s cílem prozkoumat fluktuaci exoproteasové aktivity a růst v průběhu kultivace.

Výsledky jsou zobrazeny na obr. 3.

Zatímco bakteriální kmen dobře rostl při teplotách 10 a 20 °C, celkový nárůst biomasy při 30 °C byl asi poloviční ve srovnání s ustáleným stavem na konci růstu při 10 a 20 °C. Nejvyšší rychlost růstu vykazoval kmen při 20 °C, takže optimální teplota pro kultivaci je pravděpodobně 20 °C.

Příklad 5

Purifikace proteasy *Flavobacterium balustinum* P104

(1) Kultivace bakteriálního kmene

Izolovaný bakteriální kmen, získaný z následujícího kultivačního media pro uchovávání bakterií, byl inokulován do 25 ml prekultivačního media (ve 100 ml Erlenmeyerově baňce) a kultivován na rotační třepačce při 150 ot./min v TAITEC NR-80 při 10 °C po dobu 48 hodin. Vlastní kultura byla připravena inokulací 0,25 ml prekultivačního roztoku do 25 ml vlastního kultivačního media ve 100 ml Erlenmeyerově baňce a kultivována na rotační třepačce při 150 ot./min a 10 °C po dobu 72 hodin.

Zásobní medium:

polypepton	3 g/l
enzymový extrakt	2,5 g/l
Na kasein	20 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g/l
agar	20 g/l
pH 7,0	

Prekultivační medium:

polypepton	3 g/l
enzymový extrakt	2,5 g/l
Na kasein	1 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g/l
pH 7,0	

Kultivační medium:

polypepton	3 g/l
enzymový extrakt	2,5 g/l
Na kasein	5 g/l
KH ₂ PO ₄ ·7H ₂ O	3 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g/l
pH 7,0	

Kultivační media byla sterilizována párou za vysokého tlaku v autoklávu při 120 °C (1,2 kgf/cm²) po dobu 15 minut.

Flavobacterium balustinum P104 bylo uchováváno na agarových zásobních plotnách při 10 °C. Kmen byl subkultivován po 2 týdnech až 1 měsíci.

(2) Purifikace proteasy

(a) Vysolování síranem amonným

Kultivační roztok, získaný v předchozím kroku (1), byl zcentrifugován (17 000 x g, 4 °C, 15 minut). Supernatant byl použit jako hrubý enzymový roztok. K hrubému enzymovému roztoku byl přidáván síran amonný tak, aby roztok obsahoval finální koncentraci síranu amonného rovnou 50 % jeho saturační koncentrace. Po pomalém míchání po dobu 1 hodiny, byl roztok zcentrifugován (17 000 x g, 4 °C, 15 minut) a byla získána

příslušná saturační frakce (0 až 50 %). Množství přidaného síranu amonného bylo počítáno na saturační koncentraci při 25 °C.

(b) Gelová filtrace

Gelová filtrace byla prováděna na preparační koloně HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade. Všechny operace sloupcové chromatografie byly prováděny při 4 °C s použitím systému HiLoad System 50 (Farmacia Biotec Co.).

Kolona HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade byla ekvilibrována průtokem 20 mM Bis-Tris pufru (pH 6,0) při lineární rychlosti 60 cm/hodinu (poměr k objemu gelu byl nejméně 3, tj. 400 ml).

5 ml vzorek enzymového roztoku po vysolování síranem amonným byl nanesen na kolonu vybavenou zařízením Superloop. Kolona byla eluována 20 mM Bis-Tris pufrem (pH 6,0) lineární rychlostí 60 cm/hodinu a byly odebírány 5 ml frakce.

Eluční křivka je zobrazena na obr. 4.

Transparentní žlutý protein o vysoké molekulové hmotnosti obsažený v kultivačním roztoku byl eluován jako vylučovací mez. Následující eluovaná frakce obsahovala bezbarvý transparentní protein vykazující UV absorpci při 280 nm. Fragment připojený k protease byl pravděpodobně odstraněn v důsledku přítomnosti proteasové aktivity v této frakci.

(c) Sloupcová chromatografie

Chromatografie na iontoměniči byla prováděna na koloně Sepharose Q HP. Jako chromatografický sloupec byla použita kolona 0,7 x 12,5 cm, vyrobená z pěti HiTrapQ (1ml) kolon zapojených v sérii. Kolona byla ekvilibrována průtokem 20 mM Bis-Tris pufru (pH 6,0) lineární rychlostí 35 cm/hodinu (poměr

k objemu gelu byl nejméně 5, tj. 25 ml).

Vzorek enzymového roztoku frakce eluované při gelové filtraci, která měla proteasovou aktivitu, byl nanesen na kolonu vybavenou Superloopem lineární rychlostí 17,5 cm/hodinu. Kolona byla poté promývána 80 ml 20 mM Bis-Tris pufru obsahujícího lineární gradient 0 až 150 mM NaCl lineární rychlostí 35 cm/hodinu a byly sbírány frakce o objemu 2 ml. Lineární gradient NaCl byl připraven přidáváním 1 M NaCl do uvedeného pufru, aby byla zvýšena jeho iontová síla.

Eluční křivka je zobrazena na obr. 5.

Kromě toho je výše popsán způsob purifikace shrnut v následující tabulce.

Tabulka 4

Shrnutí purifikace proteasy

	Množství (ml)	Protein (mg)	Enzymová aktivita ($\times 10^3$ ACU)	Spec. aktiv. ($\times 10^3$ ACU.mg ⁻¹)	Účinnost purifikace (%)	Stupeň purifikace (x)
Kultiv. materiál	270	13,0	365	28,1	100	1
Vysolení (NH ₄) ₂ SO ₄	5	3,38	273	80,8	74,8	2,9
Gelová filtrace	25	0,752	77,7	103	21,3	3,7
Chromato- grafie na iontomě- niči	18	0,154	29,3	190	8,03	6,8

Příklad 6

Stanovení čistoty a molekulové hmotnosti proteasy

(1) Elektroforéza

(a) Polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti sodium

dodecylsulfátu (SDS-PAGE)

Byl použit 10 % polyakrylamidový gel tloušťky 1 mm. Elektroforéza byla prováděna s použitím elektrického proudu o hodnotě 20 mA až do doby, kdy bromfenolová modř (BPB) dosáhla spodní hranice gelu. Gelová plotna byla barvena vodným roztokem obsahujícím 30 % metanol, 10 % kyselinu octovou a 0,02 % Coomasie Brilliant Blue R250 po dobu 1 hodiny a poté přes noc odbarvována odbarvovačem (30 % metanol a 10 % kyselina octová).

Molekulová hmotnost proteasy byla stanovena pomocí SDS-PAGE za použití fosforylasy, albuminu, ovalbuminu, karboanhydrasy, trypsinového inhibitoru a alfa-laktalbuminu jako markerů.

Výsledky a kalibrační křivka SDS-PAGE jsou uvedeny na obr. 6 a 7. Enzym vykazoval jedno maximum (band) a lze jej proto pokládat za jednoduchý protein nemající subjednotkovou strukturu.

(b) Gelová filtrace

Molekulová hmotnost byla stanovena gelovou filtrační metodou pomocí kolony Hiprep 16/60 Sephacryl S-100 HR. Kolona byla ekvilibrována průtokem 50 mM fosfátového pufru obsahujícího 0,15 M NaCl (pH 7,0) při lineární rychlosti 30 cm/hodinu (poměr k objemu gelu byl nejméně 3, tj. 400 ml). 1 ml vzorek enzymového roztoku byl nanesen na kolonu a eluován stejným pufrem lineární rychlostí 30 cm/hodinu a byly sbírány frakce o objemu 2 ml. Volný objem byl stanoven pro Blue Dextran 2000 s albuminem (67 kDa), ovalbuminem (43 kDa), chymotrypsinogenem A (25 kDa) a ribonukleasou A (13,7 kDa) jako proteinovými standardy.

Výsledky jsou ukázány na obr. 8. Kromě toho byly spolu korelovány hodnoty UV absorpce proteinu při 280 nm a enzymová aktivita. Absorpční křivka proteinu v UV oblasti spektra vykazovala maximální absorpci při 278 nm a žádnou absorpci v oblasti viditelného světla. Na základě těchto pozorování lze považovat protein za dostatečně čistý pro zkoumání jeho vlastností.

Příklad 7

Izoelektrická fokusace

Izoelektrická fokusace byla prováděna pomocí Phast systému (Farmacia-Biotec Co.). Byl použit gel IEF3-9 a vzorek byl nanesen na gel v místě vzdáleném 3 cm od anody. Elektroforéza byla prováděna za následujících podmínek: 2 000 V, 2,5 mA, 15 °C, 410 Vh. Gelová plotna byla fixována ve 20 % roztoku TCA při 20 °C po dobu 5 minut a poté omývána oplachovacím a odbarvovacím roztokem (30% metanol a 10% kyselina octová) po dobu 2 minut. Plotna byla nakonec opláchnuta a obarvena roztokem obsahujícím 0,02 % Coomassie Brilliant Blue R250 (50 °C, 10 minut). Jako pI marker byl použit Broad pI Calibration kit (Farmacia-Biotec Co.).

Výsledky a kalibrační křivka izoelektrické fokusace jsou zobrazeny na obr. 9 a 10.

Enzym se barvil jako jednotlivý pruh (band) s izoelektrickým bodem při pH 4,5.

Příklad 8

Vliv pH na enzymovou reakci

Azokasein byl štěpen enzymem při různých hodnotách pH.

Pufující roztoky v reakční směsi měly koncentraci 67 mM a obsahovaly acetátový pufr (pH 4-5,5), KH_2PO_4 - Na_2PO_4 (pH 6,0-8,0), $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ -HCl (pH 8,0-9,0), $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ -NaOH (pH 9,5-10,0) a Na_2HPO_4 -NaOH (pH 10,5-12,0).

Výsledky jsou ukázány na obr. 11.

Relativní aktivita enzymu při pH 7,5 jako optimálním pH se udržela na hodnotě 80 % v rozmezí pH 6,0 až 10,0. Enzym tedy funguje v poměrně širokém rozmezí okolo hodnoty neutrálního pH. Enzym však nefungoval uspokojivě při hodnotách pH 5,5 a nižších nebo při hodnotách pH 10,0 a vyšších, a při pH 12 byl inaktivován a ztrácel proteasovou aktivitu.

Příklad 9

Stabilita proteasy v závislosti na pH

Enzym byl zkoumán v pufrech o různém pH pomocí Econo-Pac (Biorad Co.). Pufující roztoky měly koncentraci 67 mM a obsahovaly acetátový pufr (pH 4-5), KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 (pH 6-8), glycin-NaOH (pH 9-10) a Na_2HPO_4 -NaOH (pH 11-12). Po výměně pufru byl enzym inkubován při 20 °C po dobu 1 hodiny, aby bylo možno vyhodnotit zbytkovou proteasovou aktivitu.

Výsledky jsou ukázány na obr. 12.

Bylo zjištěno, že enzym je stabilní v rozmezí pH 6,0 až 10,0 při teplotě 20 °C po dobu 1 hodiny, ale při zachování stejných podmínek je inaktivován při pH 4,0 a 12,0.

Příklad 10

Vliv teploty na enzymovou reakci

Azokasein byl štěpen enzymem při různých pH v teplotním rozmezí od 0 do 70 °C .

Podobná reakce byla prováděna s komerčně dostupnými enzymy jako jsou Subtilisin Carlsberg, V8 proteasa (izolovaná ze *Staphylococcus aureus* V8), Sabinasa (Novonordisc), a Alkalasa (Novonordisc).

Výsledky znázorňující K_{cat} za předpokladu, že substrát byl přítomen v nadbytku a veškerý enzym byl přítomen ve formě komplexu enzym-substrát, jsou uvedeny na obr. 13, kde □ představuje náš enzym, ◇ V8 proteasu, ○ Subtilisin Carlsberg, △ Sabinasu a ▽ Alkalasu.

Bylo zjištěno, že enzym má teplotní optimum při 40 °C a rychle se inaktivuje při reakční teplotě vyšší než je jeho optimální teplota. Bylo rovněž zjištěno, že všechny komerčně dostupné proteasy mají teplotní optimum 50 °C a vyšší, a že hodnota K_{cat} námi presentovaného enzymu je v rozmezí 10 až 40 °C vyšší než u kterékoliv ze srovnávaných proteas.

Příklad 11

Teplotní stabilita proteasy

Enzym byl inkubován při teplotách od 20 do 50 °C. Změny aktivity v závislosti na čase inkubace jsou uvedeny na obr. 14, kde □ představují změny při 20 °C, ◇ při 30 °C, ○ při 40 °C a △ při 50 °C.

Enzym nebyl prakticky inaktivován při 20 nebo 30 °C, ale

po jedné hodině inkubace při 40 °C se postupně snížila jeho aktivita na 60 % aktivity pozorované při 20 nebo 30 °C, a při 50 °C byl enzym úplně inaktivován do 15 minut.

Enzym lze považovat za tepelně nestabilní, protože výše zmíněné teploty jsou nižší než optimální teploty proteas použitých v předchozím experimentu pro srovnání.

Příklad 12

Vliv inhibitorů

Jako inhibitory byly použity fenylmetylsulfonylfluorid (PMSF) působící na serinové proteasy, jodoacetamid (IAA), působící na cysteinové proteasy, kyselina ethylendiaminotetraoctová (EDTA) působící na metaloproteasy, o-fenantrolin, 2,2'-bipyridyl, a citrát a oxalát působící specificky na Ca^{2+} ionty. Po přidání inhibitorů v různých koncentracích do enzymového reakčního systému, byl tento systém inkubován při 20 °C po dobu 1 hodiny, aby bylo možno stanovit zbytkovou proteasovou aktivitu. Výsledky ukazuje následující tabulka.

Tabulka 5

Vliv inhibitorů

Inhibitor	Koncentrace	Zbytková aktivita (%)
Bez inhibitoru	10 mM	100
PMSF	10 mM	99
Jodoacetamid	10 mM	94
EDTA	10 mM	8
o-Fenantrolin	10 mM	91
2,2'-Bipyridyl	10 mM	39
Citrát	10 mM	41
	100 mM	0
Oxalát	10 mM	45
	100 mM	0

Proteasová aktivita enzymu nebyla inhibována PMSF nebo IAA, ale výrazně ji inhibovaly EDTA, 2,2'-bipyridyl, citrát a oxalát. Bylo tak zjištěno, že proteasová aktivita je závislá na přítomnosti iontů kovů a tedy, že studovaný enzym je metaloproteasa. Z inhibice citrátem a oxalátem lze usuzovat, že proteasová aktivita je závislá na vápníku.

Příklad 13

Vliv látek denaturujících proteiny

Sodium dodecylsulfát (SDS) a močovina byly použity jako látky denaturující proteiny. Po přidání různých koncentrací látek denaturujících proteiny byl enzymový systém inkubován při 20 °C po dobu 1 hodiny, aby bylo možno stanovit zbytkovou proteasovou aktivitu.

Výsledky získané s SDS a močovinou jsou uvedeny na obrázcích 15 a 16.

Proteasa byla inhibována i v nízkých koncentracích SDS a úplné inaktivace bylo dosaženo při použití koncentrace 0,25 % SDS. Proteasa nebyla inhibována močovinou až do koncentrace 2 M, při použití 3 M močoviny činila zbytková aktivita 60 % a 4 M močovina úplně inhibovala aktivitu proteasy.

Příklad 14

Vliv iontů kovů

AgNO_3 , CuSO_4 , ZnSO_4 , CoSO_4 , FeSO_4 , MnSO_4 , CaCl_2 a MgSO_4 byly použity jako zdroj iontů kovů. Po přidání soli

příslušného kovu v konečné koncentraci 1 mM, byl enzymový systém inkubován při 20 °C po dobu 1 hodiny a byla stanovena zbytková aktivita enzymu.

Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 6

Vliv iontů kovů

Kovový ion	Zbytková aktivita (%)
Žádný kovový ion	100
Ag ⁺	11
Cu ²⁺	44
Zn ²⁺	61
Co ²⁺	63
Fe ²⁺	76
Mn ²⁺	95
Ca ²⁺	100
Mg ²⁺	100

Studovaný enzym byl výrazně inhibován ionty Ag⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Co²⁺, a Fe²⁺. Při inhibici Ag⁺ byla zbytková aktivita pouze 10 %. Enzym nebyl vůbec inhibován ionty Mg²⁺ a Ca²⁺.

Příklad 15

Substrátová specifita

Kasein (Hammarsten), dimethylkasein, želatina, hemoglobin, hovězí serumalbumin a ribonukleasa byly použity jako substrátové proteiny k měření proteolytické aktivity modifikovanou Ansonovou metodou. Azokasein a azoalbumin byly použity jako azoprotein-modifikující proteiny.

Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 7

Substrátová specifická

Substrát (1 %)	Rychlost hydrolysy (%)
Kasein (Hammarsten)	100
Dimethylkasein	93
Želatina	53
Hemoglobin	18
Hovězí serumalbumin	17
Ribonukleasa	0
Azokasein	100
Azoalbumin	20

Enzym podle tohoto vynálezu dobře rozkládá vysokomolekulární proteiny a denaturované proteiny jako například kasein a dimethylkasein a rovněž rozkládá želatinu jako protein denaturovaného kolagenu s 50 % účinností ve srovnání s kaseinem. Enzym prakticky nerozkládá jiné přírodní proteiny a zejména ne ribonukleasu.

Příklad 16

Kinetika enzymové reakce s kaseinem

Vynesení podle Lineweavera a Burka byla získána při různých teplotách od 5 do 40 °C s roztokem obsahujícím 0,05 až 1 % kaseinu jako enzymový substrát. Vynesení jsou znázorněna na obr. 17, kde horní graf (A) ukazuje změnu hodnoty $1/v$ v rozsahu 0 až 2,0 a spodní graf (B) změnu hodnoty $1/v$ v rozsahu 0 až 0,2. Na obrázku $\square$ představuje vynesení při 5 °C, $\diamond$ při 10 °C, $\circ$ při 20 °C, Δ při 30 °C a ∇ při 40 °C.

Kinetická konstanta enzymové reakce byla získána z vynesení podle Lineweavera a Burka tak jak je znázorněno v tabulce uvedené níže.

Tabulka 8

Substrátová specifická

Substrát (1 %)	Rychlost hydrolysy (%)
Kasein (Hammarsten)	100
Dimethylkasein	93
Želatina	53
Hemoglobin	18
Hovězí serumalbumin	17
Ribonukleasa	0
Azokasein	100
Azoalbumin	20

Jak je z tabulky zřejmé, enzym vykazuje reakční rychlost typu Michaelis-Mentenové pro různé koncentrace kaseinu. Hodnota K_m klesala a hodnota V_{max} naopak stoupala se zvyšující se teplotou. Enzymová aktivita byla inhibována při vysoké koncentraci kaseinu při 5 a 10 °C. Obecně měl enzym tendenci být inhibován při nadbytečné koncentraci substrátu. Avšak enzym nebyl inhibován při koncentraci kaseinu 1 % při zvýšené reakční teplotě. Domníváme se, že důvodem pro toto chování bylo zvýšení hodnoty K_{cat} tím, že teplota se přiblížila optimální hodnotě a docházelo k malé inhibici produkty rozkladu kaseinu. Na základě vynesení podle Lineweavera a Burka se rovněž domníváme, že teplotní inhibice je smíšeného typu. To znamená, že vliv teploty je považován za nekompetitivní nebo akompetitivní inhibici a vliv produktů rozkladu kaseinu za kompetitivní inhibici.

Průmyslová využitelnost

Psychrofilní proteasa podle tohoto vynálezu má optimální teplotu v nízkém teplotním rozsahu. Tedy, pomocí psychrofilní

proteasy podle tohoto vynálezu, lze štěpit proteiny při nízké teplotě. Například detergent, který lze použít i ve vodě při nízké teplotě, je připraven přidáním proteasy podle tohoto vynálezu do detergentního přípravku. S výjimkou zahrnutí psychrofilní proteasy podle tohoto vynálezu, lze tento detergentní přípravek připravit konvenčními metodami. Stručně řečeno, lze jej připravit kombinací proteasy podle tohoto vynálezu s obvyklou detergentní složkou jako je povrchově aktivní činidlo pro detergenty, bělidlo nebo plnidlo.

Enzymová reakce psychrofilní proteasy podle tohoto vynálezu probíhá při nízké teplotě. Tedy, i když reakční systém obsahuje organické rozpouštědlo, které je těkavé při teplotě místnosti, může reakce probíhat za nízké teploty, kdy se organické rozpouštědlo neodpařuje. Navíc, když zamýšlíme zlepšit kvalitu potravin použitím proteasy podle tohoto vynálezu, je výhodné užít tuto proteasu, protože reakce probíhá při nízké teplotě, při které jsou potraviny účinně chráněny před rozkladem.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Psychrofilní proteasa, která má následující fyzikálně-chemické vlastnosti:

- Specifická aktivita a substrátová specificita: enzym rozkládá kasein a dimethylkasein, ale nerozkládá ribonukleasu;

- Optimální teplota: enzym má optimální teplotu účinku 40 °C; a

- Teplotní stabilita: za podmínek uchovávání při pH 7 po dobu 1 hodiny není enzym prakticky inaktivován při teplotách do 30 °C, ale při 40 °C ztrácí přibližně 40 % své aktivity, a při 50 °C je rychle inaktivován, takže aktivita úplně mizí po 15 minutách.

2. Psychrofilní proteasa podle nároku 1, která má následující fyzikálně-chemické vlastnosti:

- Optimální pH: působí optimálně při pH 7,5 ; a

- Stabilita v závislosti na pH: enzym je stabilní při pH v rozmezí 6,0 až 10,0 za podmínek uchovávání při teplotě 20 °C po dobu 1 hodiny.

3. Psychrofilní proteasa podle nároku 1, kdy proteasa má molekulovou hmotnost 38 kDa podle měření polyakrylamidovou elektroforesou v přítomnosti sodium dodecylsulfátu a metodou gelové filtrace.

4. Psychrofilní proteasa podle nároku 1, kdy proteasa má

24.10.97

hodnotu izoelektrického bodu 4,5 podle měření pomocí izoelektrické fokusace.

5. Izolovaný mikroorganismus náležející druhu *Flavobacterium balustinum*, který je schopný produkovat proteasu podle nároků 1 až 4.

6. Izolovaný mikroorganismus náležející druhu *Flavobacterium balustinum* podle nároku 5, kdy mikroorganismus roste přednostně při teplotách v rozmezí 10 až 20 °C.

7. Izolovaný mikroorganismus náležející druhu *Flavobacterium balustinum* podle nároku 5, který představuje kmen *Flavobacterium balustinum* P104 (FERM BP-5006).

8. Způsob přípravy psychrofilní proteasy, v y z n a č u j í - c í s e t í m, že zahrnuje: kultivaci mikroorganismu *Flavobacterium balustinum* podle nároku 5, a

izolaci psychrofilní proteasy
podle nároku 1 z mikrobiální kultury.

9. Způsob přípravy psychrofilní proteasy, v y z n a č u j í - c í s e t í m, že zahrnuje: kultivaci mikroorganismu *Flavobacterium balustinum* podle nároku 6, a

izolaci psychrofilní proteasy
podle nároku 1 z mikrobiální kultury.

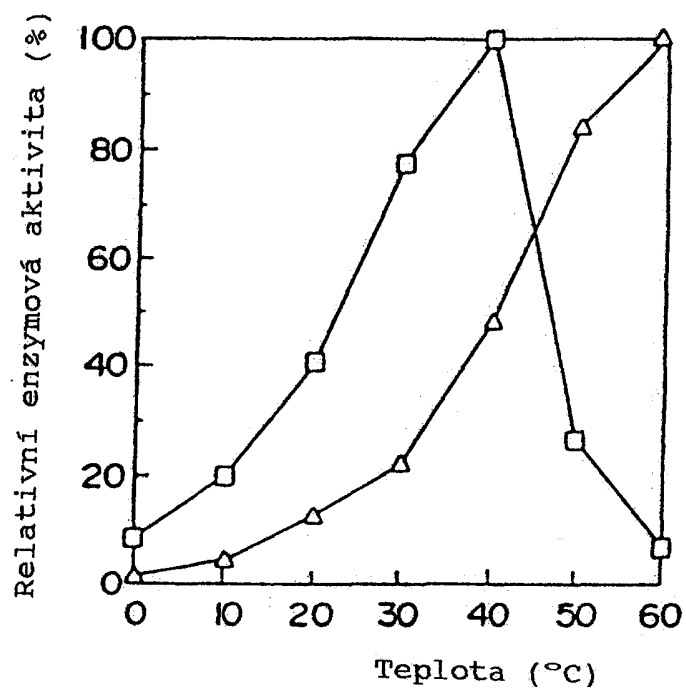
10. Způsob přípravy psychrofilní proteasy, v y z n a č u j í -
c í s e t í m, že zahrnuje: kultivaci mikroorganismu

Flavobacterium balustinum podle nároku 7, a

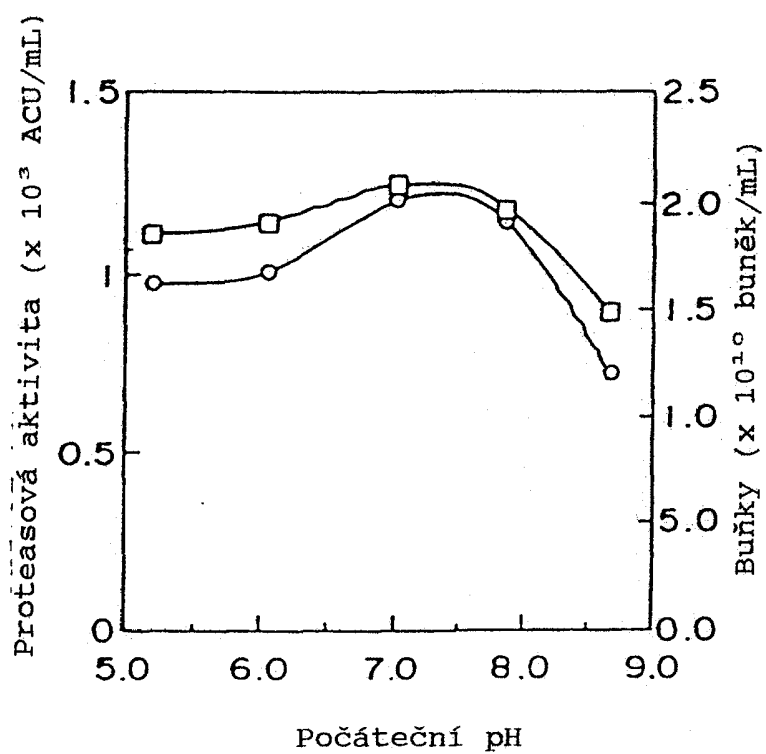
izolaci psychrofilní proteasy

podle nároku 1 z mikrobiální kultury.

1/11

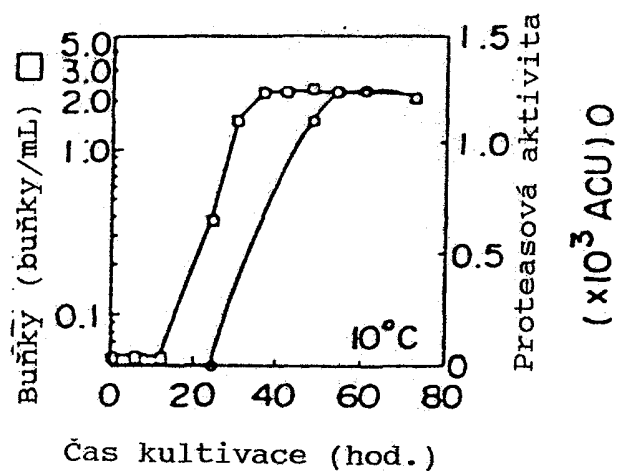


Obr. 1

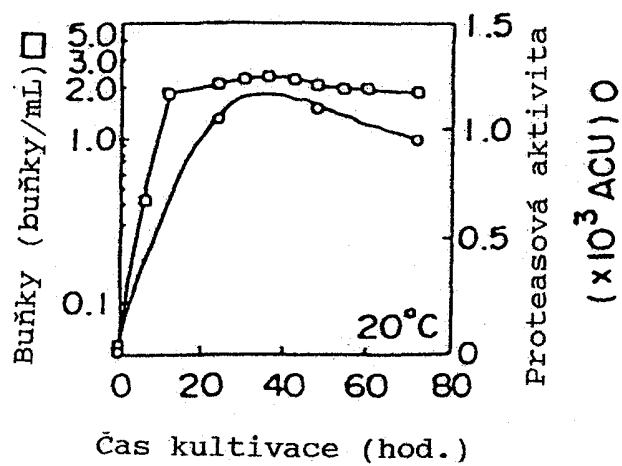


Obr. 2

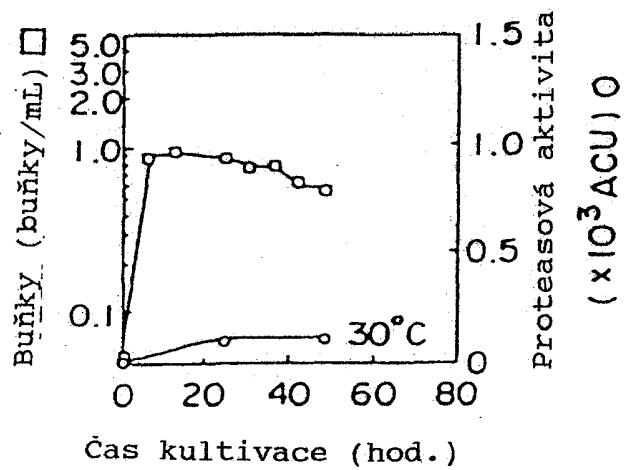
2/11



Obr. 3 (A)

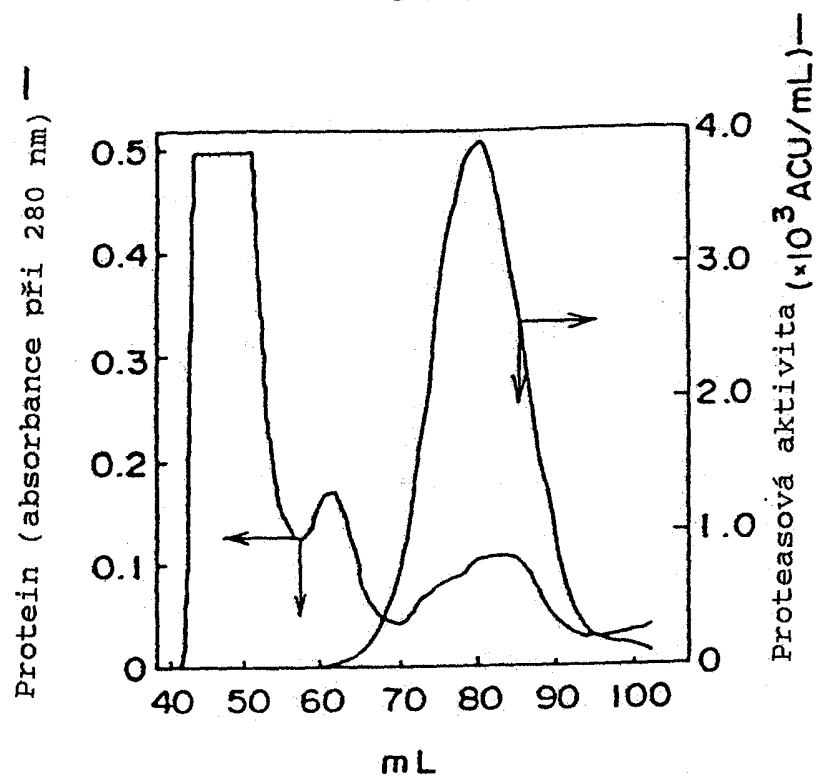


Obr. 3 (B)

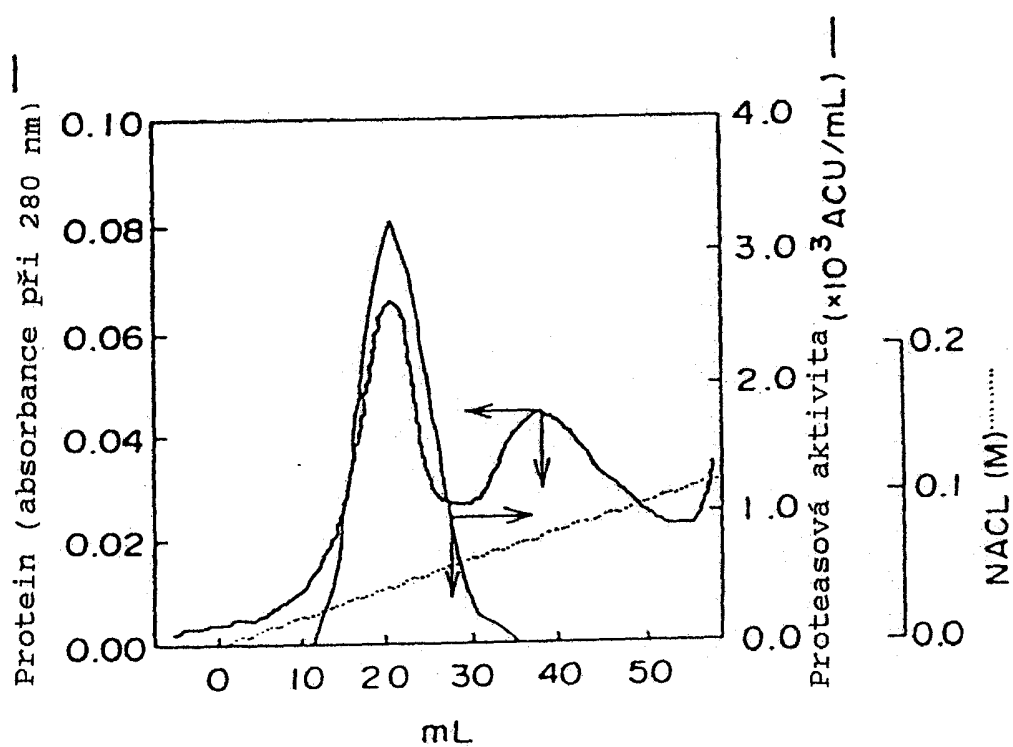


Obr. 3 (C)

3/11

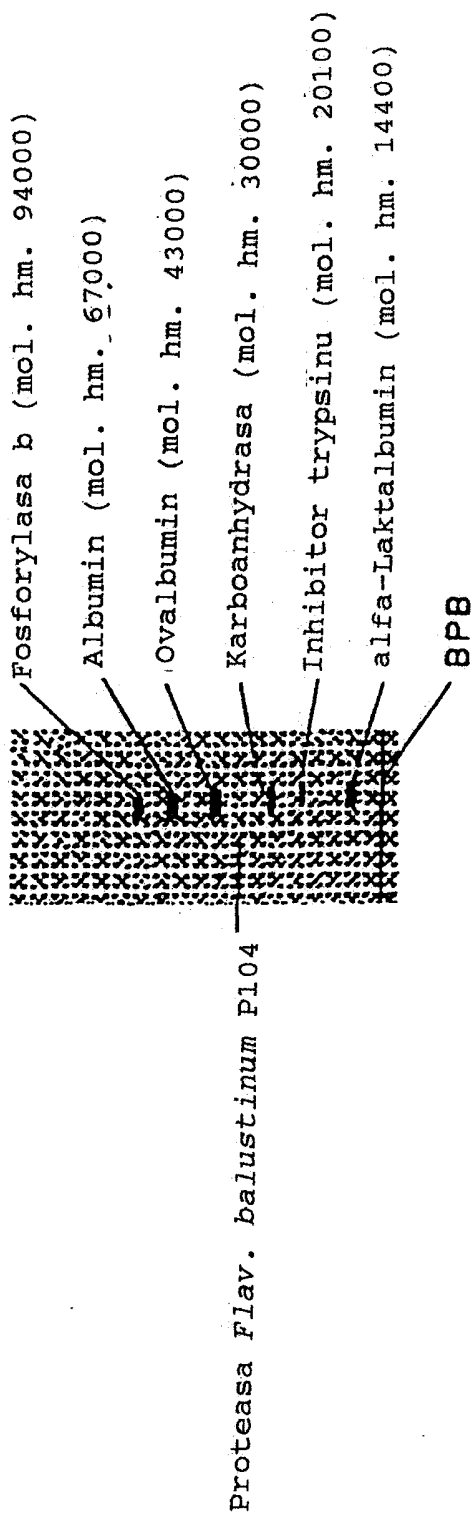


Obr. 4



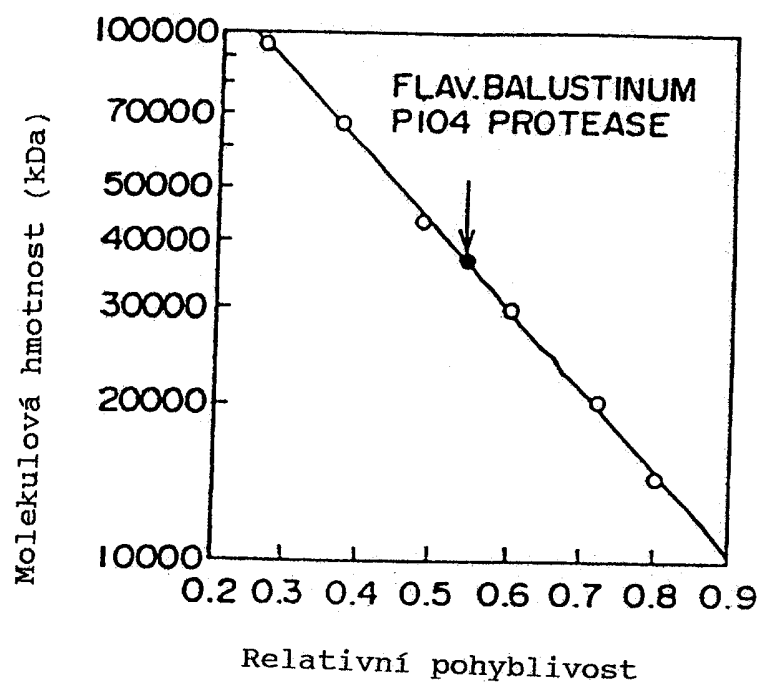
Obr 5

4/11

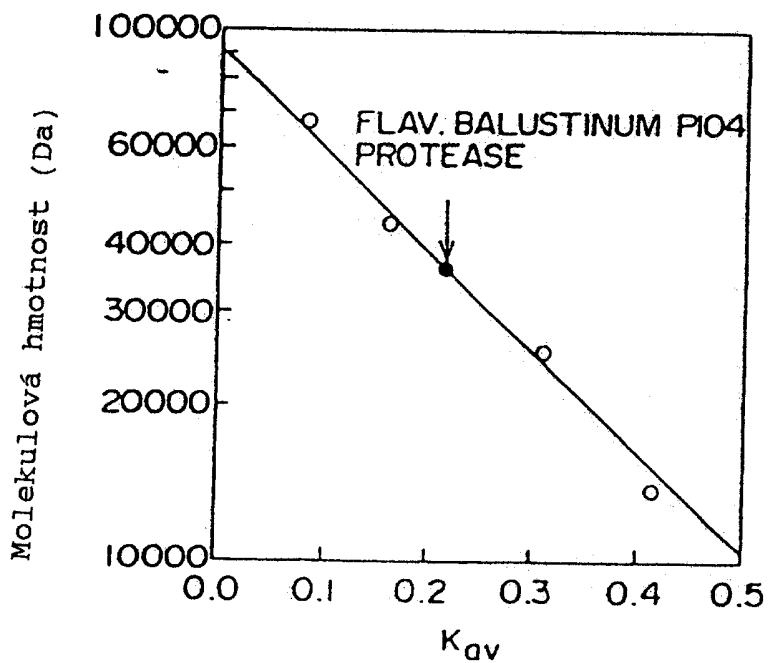


Obr. 6

5 / 11

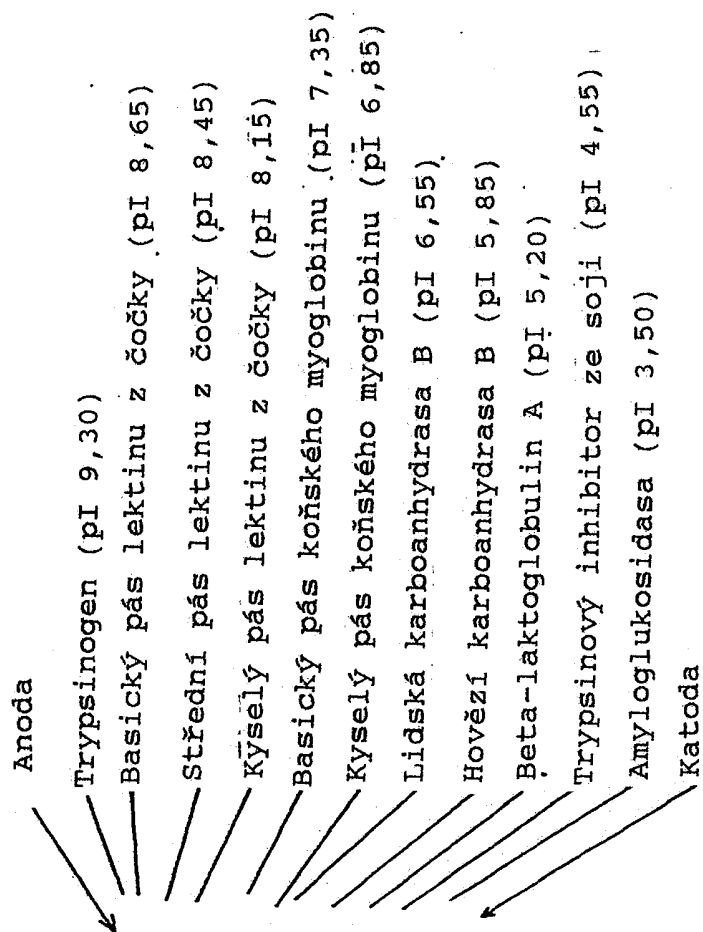


Obr. 7



Obr. 8

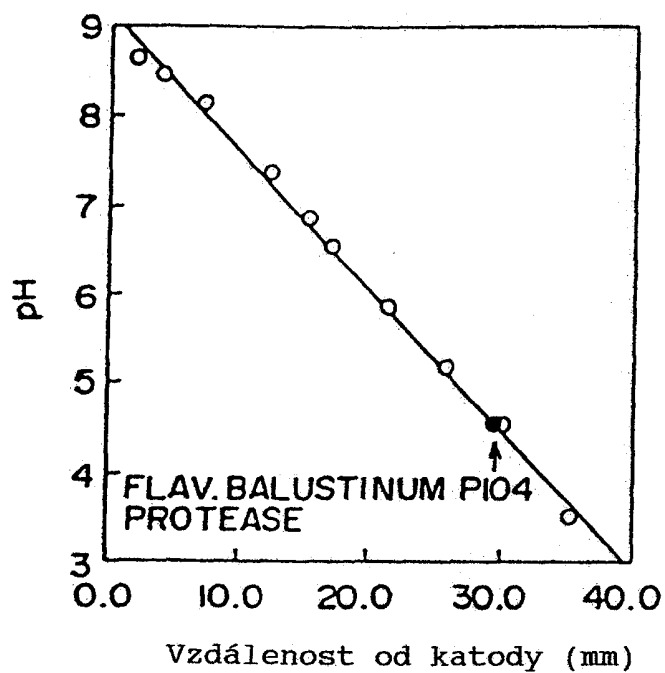
6/11



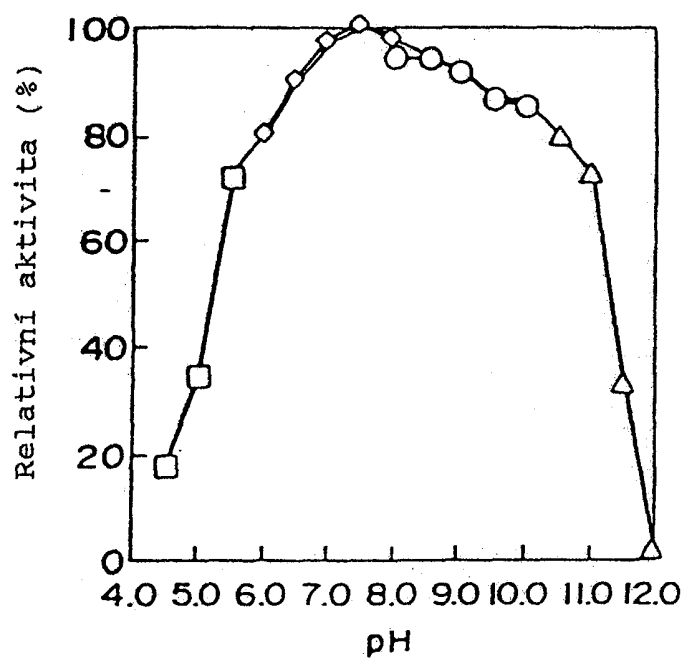
Proteasa Flav. balustinum P104 —

Obr. 9

7 / 11

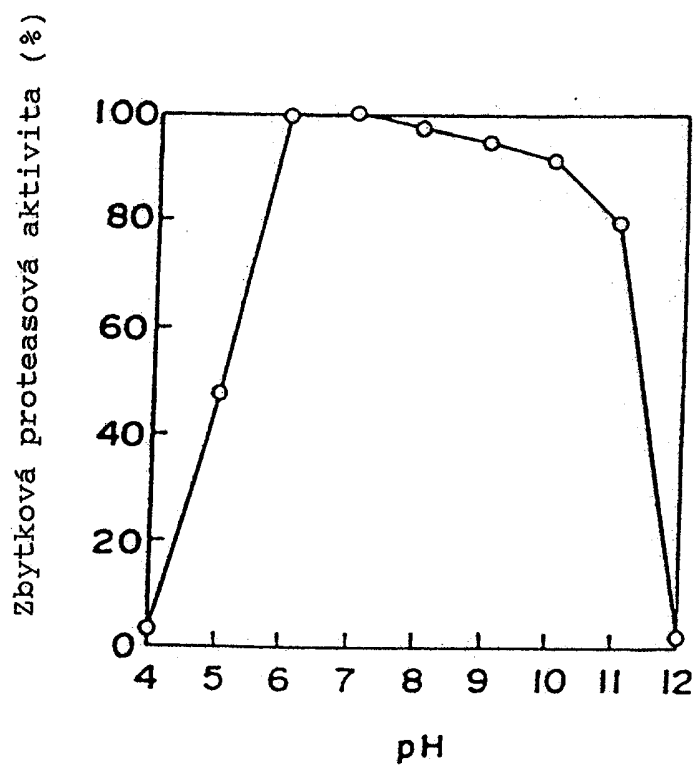


Obr. 10

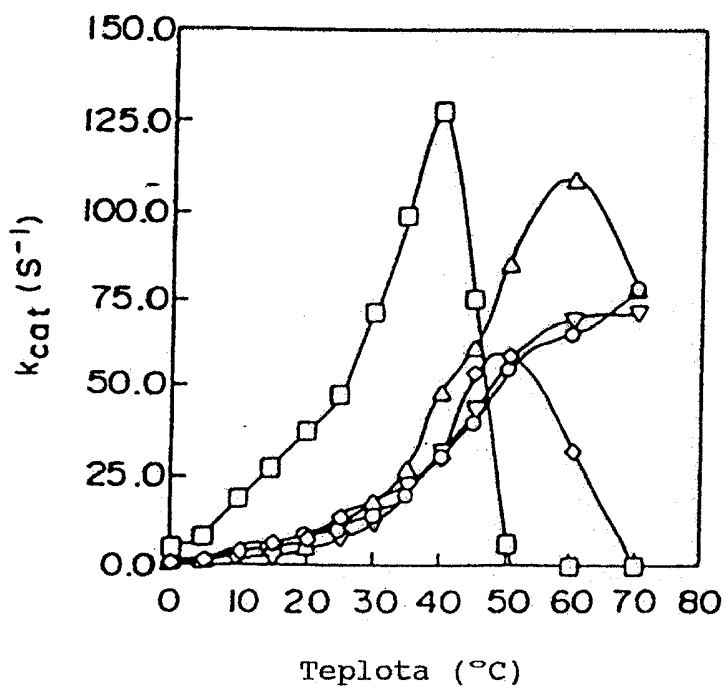


Obr. 11

8 / 11

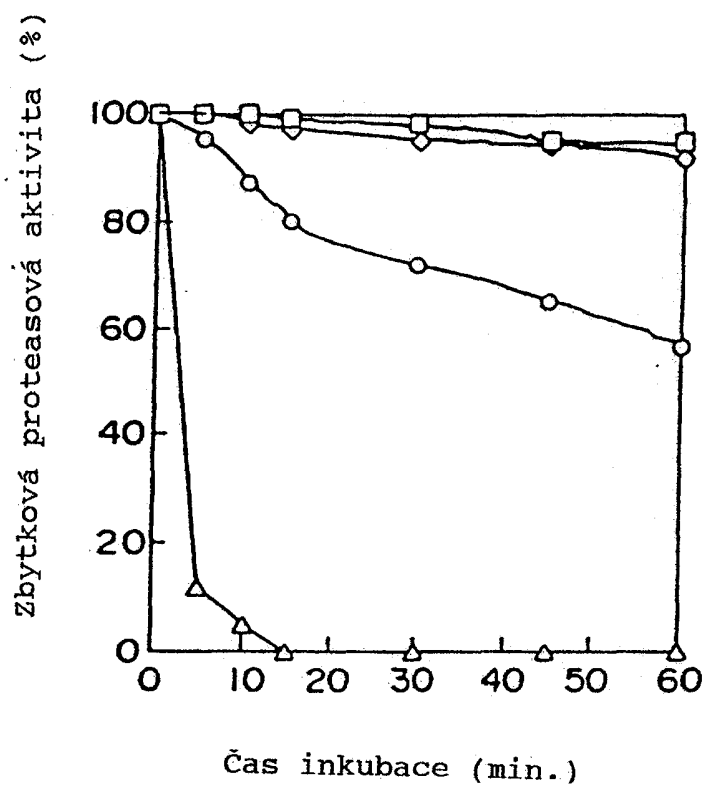


Obr. 12

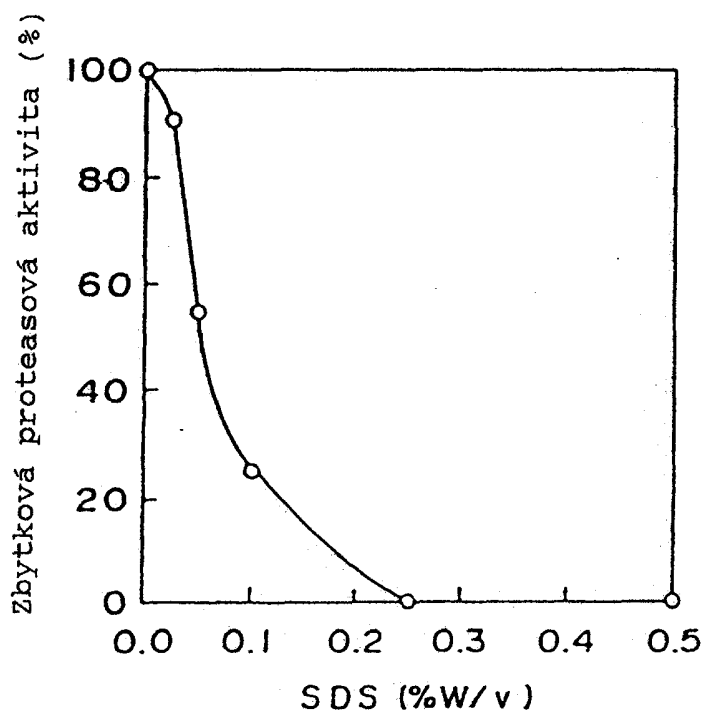


Obr. 13

9/11

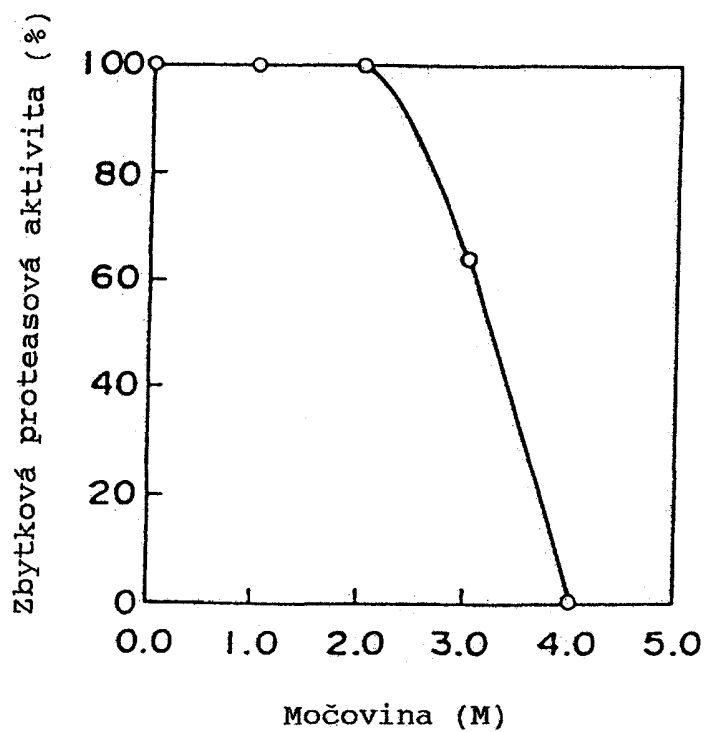


Obr. 14



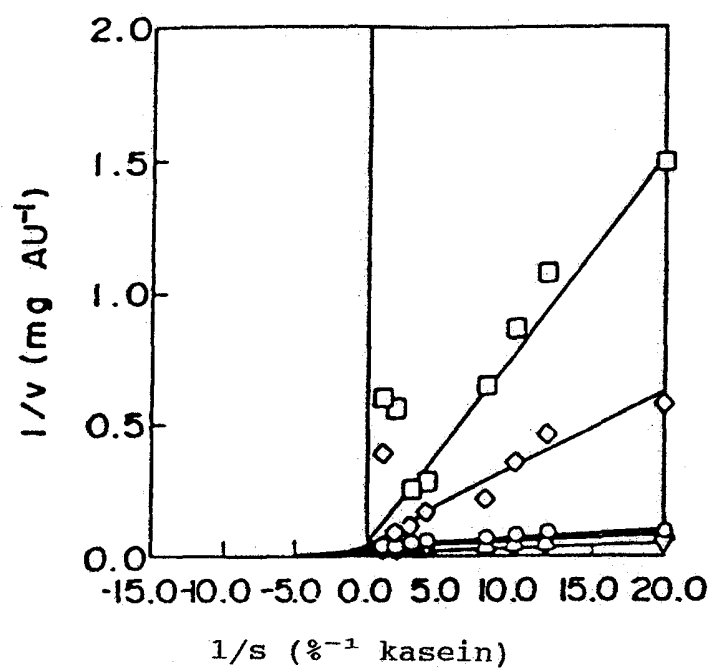
Obr. 15

10/11

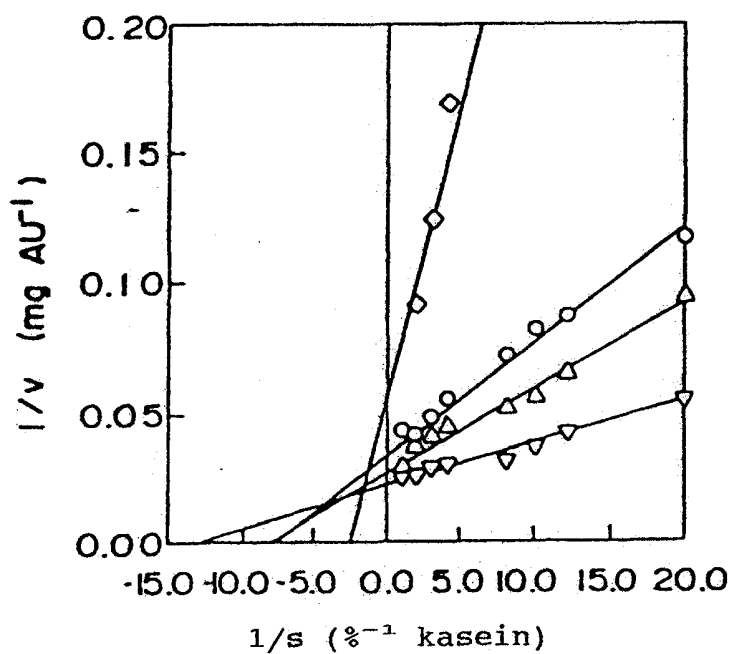


Obr. 16

///



Obr. 17 (A)



Obr. 17 (B)