



Fakulta zemědělská
a technologická
Faculty of Agriculture
and Technology

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH FAKULTA ZEMĚDĚLSKÁ A TECHNOLOGICKÁ

Katedra genetiky a biotechnologií

Diplomová práce

Optimalizace kultivačních podmínek vybraných kmenů *E. coli*
produkujících rekombinantní proteiny

Autorka práce: Bc. Zuzana Michalcová

Vedoucí práce: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

Konzultant práce: Ing. Karel Beneš, Ph.D.

České Budějovice
2023

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne

.....
Podpis

Abstrakt

Bakterie *Escherichia coli* je jedním z nejvíce preferovaných organismů pro produkci rekombinantních proteinů. *E. coli* je velmi dobře zavedeným hostitelem, který nabízí snadnou genetickou manipulaci, krátkou dobu kultivace, schopnost kontinuální fermentace a cenově dostupná kultivační media. Pro dosažení vysoké úrovně proteinové exprese, a tedy vysoké produkce rekombinantního proteinu je třeba provádět optimalizace kultivačních podmínek. Právě na optimalizaci kultivace se zaměřuje tato diplomová práce, kde praktická část je zaměřena na produkované enzymy uridin fosforylázu (UP) a purin nukleosid fosforylázu (PNP).

Bakterie *E. coli* produkující UP nebo PNP byly kultivovány na šesti mediích s různými zdroji živin. Produkce proteinů byla ověřena na spektrofotometru metodou dle Bradfordové a dále pomocí polyakrylamidové gelové elektroforézy s SDS (SDS-PAGE). Aktivita enzymů byla měřena HPLC analýzou. Dále byla u všech vzorků stanovena sušina.

Na základě výsledků z těchto analýz bylo vybráno medium Terrific Broth s přísadkou glukózy po 4 hodinách kultivace (TBG4), které bylo následně použito pro upscaling do fermentoru. Úspěšná kultivace ve fermentoru potvrdila výsledky kultivace v Erlenmeyerových baňkách.

Klíčová slova: *Escherichia coli*, rekombinantní proteiny, kultivace, upscaling, produkce rekombinantních proteinů

Abstract

Escherichia coli is one of the most preferred organisms to produce recombinant proteins. *E. coli* is a well-established host that offers ease of genetic manipulation, short culture times, continuous fermentation capability and affordable culture media. To achieve high levels of protein expression, and therefore high recombinant protein production, optimization of culture conditions is required. This thesis is focused on the optimization of cultivation, the practical part is focused on the production of Uridine Phosphorylase (UP) and Purine Nucleoside Phosphorylase (PNP) enzymes.

E. coli bacteria producing UP or PNP were cultured on six media with different nutrient sources. Protein production was verified on a spectrophotometer by the Bradford assay and further by polyacrylamide gel electrophoresis with SDS (SDS-PAGE). Enzyme activity was measured by HPLC assay. In addition, the dry weight biomass was determined for all samples.

Based on results from these assays, Terrific Broth medium with glucose addition after 4 h of cultivation (TBG4) was selected and subsequently used for upscaling to the fermenter. Successful cultivation in the fermenter confirmed the results of cultivation in Erlenmeyer flasks.

Keywords: *Escherichia coli*, recombinant proteins, cultivation, upscaling, recombinant protein production

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat panu prof. Ing. Vladislavu Čurnovi, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce a za podporu a trpělivost při jejím vytváření. Děkuji také Ing. Karlu Benešovi, Ph.D. a doc. Ing. Vladimíru Matřhovi, DrSc. za poskytnutí literatury a dalších podkladů k tématu, možnost konzultací a osobních setkání za účelem diskuse.

Obsah

Úvod.....	8
1 Literární rešerše.....	9
1.1 Bakterie rodu <i>Escherichia coli</i>	9
1.1.1 Morfologie, biochemické vlastnosti.....	9
1.1.2 Struktura genomu	12
1.1.3 Metabolismus	12
1.2 Rekombinantní proteiny	13
1.3 <i>E. coli</i> – hostitel pro expresi rekombinantních proteinů	14
1.4 Faktory ovlivňující expresi rekombinantních proteinů	17
1.4.1 Složení kultivačních medií.....	17
1.5 Podmínky kultivace	20
1.5.1 pH.....	21
1.5.2 Teplota.....	21
1.5.3 Aerace	21
1.5.4 Indukce.....	23
1.6 Metody analýzy proteinů.....	24
1.6.1 Separační metody	24
1.6.2 Detekce a identifikace proteinů.....	25
1.6.3 Stanovení enzymatické aktivity	25
1.6.4 Metody použité v této diplomové práci	26
2 Hypotézy a cíle práce	29
2.1 Hypotézy	29
2.2 Cíle práce.....	29
3 Metodika	30
3.1 Analyzovaný kmen <i>Escherichia coli</i>	30

3.1.1	Enzym Purine Nucleoside Phosphorylase (PNP).....	30
3.1.2	Enzym Uridine Phosphorylase (UP)	30
3.2	Kultivační media	31
3.2.1	Inokulace a kultivace vegetativního media	33
3.2.2	Inokulace a kultivace produkčních medií	33
3.3	Analýza proteinů	34
3.3.1	Stanovení koncentrace proteinů dle Bradfordové	34
3.3.2	Aktivita pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie	36
3.3.3	SDS-PAGE.....	39
3.3.4	Stanovení sušiny	43
3.4	Upscaling do fermentoru	43
3.4.1	Inokulace a kultivace vegetativního media	44
3.4.2	Inokulace produkčního media	45
3.4.3	Odběr a zpracování vzorků	46
4	Výsledky a diskuse.....	47
4.1	Hodnoty pH a OD.....	47
4.2	Stanovení koncentrace proteinů dle Bradfordové	48
4.3	Aktivita enzymu pomocí HPLC	50
4.4	SDS-PAGE.....	52
4.5	Stanovení sušiny.....	53
4.6	Upscaling.....	55
	Závěr	60
	Seznam použité literatury.....	62
	Seznam obrázků	76
	Seznam tabulek	77
	Seznam použitých zkratk.....	78
	Přílohy.....	80

Úvod

Escherichia coli se stala jednou z nejdůležitějších gramnegativních bakterií posledního desetiletí. Snadnost genetické manipulace, nízká cena, rychlý růst a množství předchozích studií učinily z *E. coli* jeden z nejrozšířenějších mikroorganismů pro produkci rekombinantních proteinů. Především produkce rekombinantních enzymů získává na důležitosti s ohledem na rostoucí ceny vstupních surovin a energetické náročnosti běžných syntetických postupů.

Využití rekombinantních kmenů *E. coli* za účelem „zelené syntézy“ nabývá na významu, nejen z důvodu syntézy aktivních substancí léků, ale i z důvodu výroby různých intermediátů, které se používají v dalších výrobních krocích.

Navzdory několika výhodným vlastnostem, které *E. coli* má, její neschopnost snadno sekretovat rekombinantní proteiny zůstává nevýhodou pro průmyslové výrobní procesy. Z toho důvodu je nutné neustále provádět optimalizaci kultivačních postupů za účelem zvýšení produkce rekombinantních enzymů.

Tato práce se zaměřuje na optimalizaci kultivačních podmínek, konkrétně zdroj živin a jejich dostupnost v mediu, vedoucích ke zvýšení produkce rekombinantních proteinů vybranými kmeny *E. coli*.

1 Literární rešerše

1.1 Bakterie rodu *Escherichia coli*

Rod *Escherichia* je pojmenován po německém pediatrovi Theodoru Escherichovi, který v roce 1885 popsal druh *Escherichia coli* během studií novorozenecké fekální mikrobioty (Shulman et al., 2007). *Escherichia coli*, známá také jako *E. coli*, patří do čeledi *Enterobacteriaceae*, kmen *Proteobacteria*, který zahrnuje velké množství kmenů lišící se patogenním potenciálem (Schaechter, 2009). Je nejběžnějším fakultativním anaerobem v lidském a zvířecím gastrointestinálním traktu (Kaper et al., 2004).

Většina kmenů *E. coli* tedy neškodně kolonizuje trakt lidí i zvířat a je součástí normální střevní flóry. Mohou být také pro své hostitele prospěšné tím, že produkují vitamin K2 (Bentley a Meganathan, 1982), prekursor protrombinu v játrech hostitele (Clarke a Bauchop, 1977) a brání kolonizaci střev patogenními bakteriemi. Existují však některé kmeny, které se vyvinuly v patogenní *E. coli* získáním faktorů virulence prostřednictvím plazmidů, transpozonů, bakteriofágů a/nebo tzv. ostrovů patogenity (Nataro a Kaper, 1998). Tyto patogenní kmeny se řadí do dvou skupin dle místa jejich působení, a to intestinální a extraintestinální (Votava et al., 2003).

E. coli je vylučována do prostředí ve výkalech, tedy fekálně-orální přenos je hlavní cestou, kterou patogenní kmeny této bakterie způsobují onemocnění. Buňky přežijí mimo tělo po omezenou dobu. Ve vodě však mohou přežít i několik týdnů, to z nich dělá potenciální organismy indikace fekální kontaminace vody a životního prostředí (Feng et al., 2007).

1.1.1 Morfologie, biochemické vlastnosti

E. coli jsou typicky gramnegativní, tyčinkovité bakterie 2,0 – 6,0 µm dlouhé a 1,1 – 1,5 µm široké, se zaoblenými konci. Skutečný tvar těchto bakterií se však pohybuje od kokovitých buněk až po protáhlé nebo vláknité tyčinky. Obvykle jsou pohyblivé působením peritrichózních bičků (Percival, 2014). Mnoho buněk *E. coli* je zapouzdřených nebo mikrokapsulovaných a tyto kapsle se skládají z kyselých polysacharidů. Mukoidní kmeny *E. coli* produkují extracelulární sliz skládající se buď z polysacharidu s určitými antigenovými specifitami nebo z běžného kyselého polysacharidu složeného z kyseliny colanové, často popisovaného jako M antigen (Jiménez et al., 2012).

E. coli netvoří spory, jsou fakultativně anaerobní, tedy využívají kyslík, pokud je dostupný, ale v růstu mohou pokračovat i v prostředí bez přítomnosti kyslíku. Produkcují plyn fermentací sacharidů, jsou oxidáza negativní, tvoří enzym katalázu (Holt, 1994). Většina kmenů *E. coli* může fermentovat laktózu a v přítomnosti laktózy bude také vykazovat pozitivní ONPG reakci prostřednictvím aktivity β -galaktosidázy. Na rozdíl od jiných střevních bakterií je pro *Escherichia coli* charakteristické, že produkuje indol z aminokyseliny tryptofan působením enzymu tryptofanázy (Chu et al., 2012).

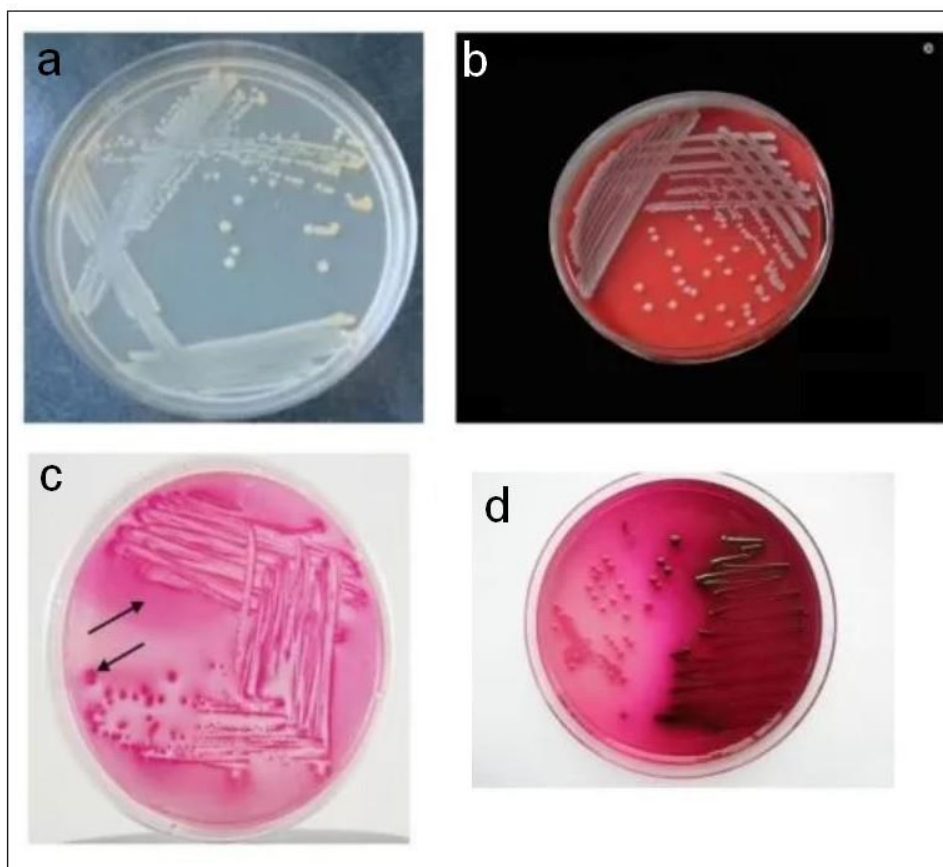
Jsou chemoorganotrofní, tedy získávají energii oxidací organických látek. Mají respirační i fermentační druh metabolismu a optimální teplotu růstu při 37 °C (Holt, 1994). Rozmezí teplot pro růst je 15 – 45 °C, některé kmeny mohou přežívat až 15 minut při teplotě 60 °C či 60 minut při 55 °C (Greenwood et al., 1999). Optimální pH pro růst je v rozmezí 6,5 – 7,5 v závislosti na teplotě (Davey, 1994). Během kultivace dochází k posunu pH v důsledku přeměny a produkce substrátů a metabolických sloučenin. Jedním z takových substrátů je NH_4^+ , který je preferovaným zdrojem dusíku podporujícím rychlý růst (Wang et al., 2011).

Escherichia coli roste v řadě definovaných laboratorních médií. Růst může být řízen aerobním nebo anaerobním dýcháním s použitím velkého množství redoxních párů, včetně oxidace kyseliny pyrohroznové, kyseliny mravenčí, vodíku a aminokyselin a redukce substrátů, jako je kyslík, dusičnany, fumarát, dimethylsulfoxid a trimethylamin N-oxid (Ingledew a Poole, 1984).

Při kultivaci na agaru v Petriho miskách se kolonie mohou lišit svým tvarem, barvou, konzistencí, tvarem okraje, velikostí a rychlostí růstu. To vše je ovlivněno podmínkami kultivace (kultivační medium, doba kultivace, teplota, pH), ať už na pevných agarrech či v tekutém mediu. Obecně jsou kolonie *E. coli* smetanově bílé až béžové barvy s lesklou strukturou. Kultura často vypadá jako zakalený film po celém povrchu agaru. Kolonie je mírně vyvýšená a má celistvý, pevný okraj a stabilní růstový vzor, který v kolonii tvoří soustředěné růstové prstence, které lze detekovat pod mikroskopem. Starší kolonie mají často tmavší střed (Gillespie, 2018).

Na živném agaru se kolonie *E. coli* jeví jako velká, kruhová, málo konvexní, vlhká, hladká a neprůhledná (Ananthanarayan a Paniker, 2006) o průměru 2 – 3 mm. Na krevním agaru jsou kolonie velké, kulaté, šedé a vlhké, vznikají nehemolytické kolonie (γ -kolonie) a hemolytické kolonie (β -kolonie). Na MacConkeyově agaru jsou

kolonie kruhové, vlhké, hladké a mají celý okraj, jsou ploché, mají růžovou až červenou barvu. Jedná se o kolonie fermentující laktózu (Allen, 2005). Na Endově půdě mají kolonie zelený kovový lesk, metabolizují laktózu za tvorby aldehydů a kyselin a agar mění barvu na tmavě růžovou. Při kultivaci v bujónu vykazují homogenní zákalový růst, tvoří sediment a na povrchu tekutého media tvoří povrchové membrány zvané pelikuly.



Obrázek 1.1 Morfologie kolonií *E. coli* na vybraných kultivačních médiích. a) Živné medium, b) Krevní agar, c) MacConkey agar, d) ENDO agar. Převzato a upraveno z <https://microbiology-note.com/>.

Bakterie *Escherichia coli* mohou růst na pevném povrchu také v podobě tzv. biofilmu. Tato interakce mezi povrchem a mikroorganismem vyžaduje přítomnost bičičků, fimbrií typu I, vnějšího membránového proteinu Ag43, kyseliny kolanové a curli (proteinové složky extracelulární matrice) (Madsen, 2008).

1.1.2 Struktura genomu

Escherichia coli má pouze jeden kruhový chromozom. Chromozomální DNA byla již v minulosti kompletně sekvenována. *E. coli* má jeden chromozom o přibližné velikosti 4600 kb, s přibližně 4300 potenciálními kódujícími sekvencemi, známých je ale pouze asi 1800 proteinů. 70 % chromozomu tvoří jednotlivé geny (monocistronické) a 6 % chromozomu je tvořeno polycistronickými geny. Asi 30 % sekvenovaných ORF (Open Reading Frames – oblasti, které by mohly být geny kódujícími protein) mají neznámé funkce (Reed, 2005). Kromě chromozomu mohou být v buňce obsaženy i malé cirkulární molekuly DNA – plazmidy.

1.1.3 Metabolismus

Escherichia coli má tři přirozené glykolytické dráhy – EMPP, EDP a OPPP. EMPP využívá deset enzymatických kroků k získání dvou pyruvátů, dvou ATP a dvou NADH na molekulu glukózy (Romano a Conway, 1996), zatímco OPPP slouží jako oxidační cesta pro syntézu NADPH. U *E. coli* se metabolismus glukózy opírá hlavně o EMPP a OPPP, EDP zůstává primárně neaktivní s výjimkou růstu s glukonátem (Eisenberg a Dobrogosz, 1967). EDP využívá pouze pět enzymů k produkci jednoho pyruvátu, jednoho glycerinaldehyd-3-fosfátu a jednoho NADPH na molekulu glukózy. S další konverzí glycerinaldehyd-3-fosfátu přes nižší EMPP vedou obě cesty (EDP a EMPP) ke stejné čisté produkci pyruvátu.

EMPP však obsahuje termodynamické překážky, které zahrnují fruktóza-1,6-bisfosfát-aldózu a trióza-fosfát-isomerázu. EDP se vyhýbá oběma těmito nepříznivým reakcím na úkor výtěžku ATP a vyžaduje podstatně méně enzymatického proteinu než EMPP (Flamholz et al., 2013). Bylo také prokázáno, že EDP zlepšuje výtěžky izoprenoidů (Liu et al, 2014; Li et al., 2015). Kromě toho může EDP také zmírnit oxidační stres (Klingner et al., 2015) a zlepšit tvorbu NADPH bez ztráty uhlíku (He et al., 2014).

EDP se opírá o dva jedinečné enzymy, a to fosfoglukonát dehydrogenázu (edd) a 2-dehydro-3-deoxyfosfoglukonát aldolázu (eda), které jsou oddělené od enzymů sdílených s EMPP a OPPP.

Katabolitová represe

Represe katabolitu je globální regulační mechanismus, který inhibuje expresi a aktivity funkcí pro použití sekundárních zdrojů, například uhlíku, pokud je přítomen preferovaný zdroj. To umožňuje bakteriím selektivně používat substráty ze směsi různých

zdrojů (Görke a Stülke, 2008). Tedy když *E. coli* rostou třeba v přítomnosti směsi cukrů, často konzumují cukry postupně prostřednictvím tohoto regulačního procesu. Potlačení exprese genů, které se podílejí na metabolizaci méně preferovaných cukrů, buňky obvykle nejprve spotřebují cukr poskytující nejvyšší rychlost růstu, následovaný cukrem poskytujícím další nejvyšší rychlost růstu a tak dále. Při tom buňky zajišťují, že jejich omezené metabolické zdroje jsou využívány k maximalizaci rychlosti růstu. Dobře používaný příklad tohoto s *E. coli* zahrnuje růst bakterie na glukóze a laktóze, kde bakterie spotřebuje glukózu před laktózou (Ammar et al., 2018).

1.2 Rekombinantní proteiny

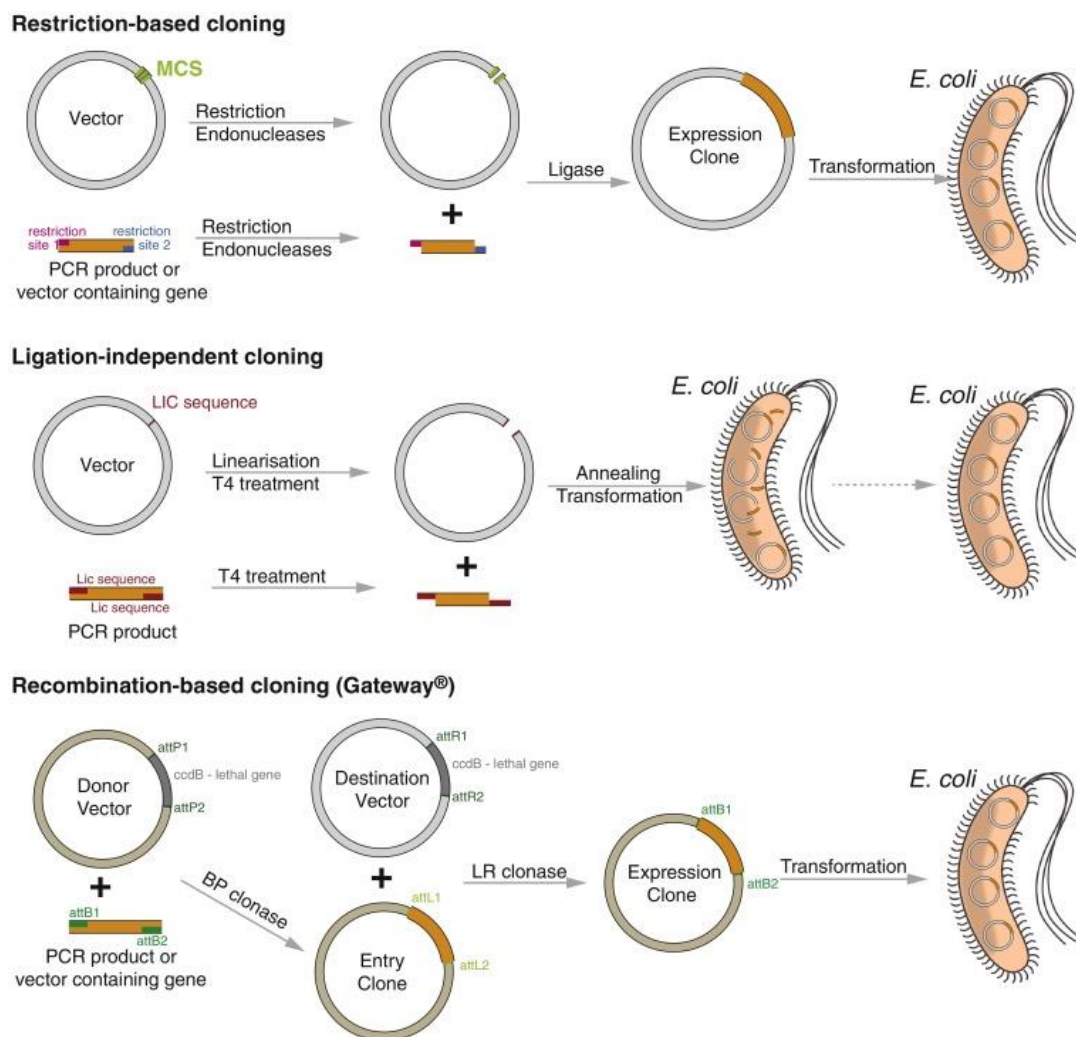
Nabídka mnoha cenných proteinů, které mají potenciální klinické nebo průmyslové využití, je často omezena jejich nízkou přirozenou dostupností. S moderními postupy a technologiemi se počet rekombinantních proteinů exponenciálně zvyšuje (Papaneophytou a Kontopidis, 2014). Používají se nejen v biomedicínském výzkumu, ale také v léčbě, jako léky.

Rekombinantní proteiny jednoznačně poskytly důležitý průlom v biomedicínské biotechnologii ve 2. polovině 20. století. V roce 1982 dosáhla technologie rekombinantních proteinů velkého průlomu s humulinem, rekombinantním lidským inzulínem exprimovaným v *Escherichia coli*, což bylo první schválené biofarmaceutikum (FDA, 1982). Od té doby je americkou FDA schváleno pro klinické použití více než 130 rekombinantních proteinů (Pham, 2018).

Rekombinantní proteiny jsou takové, které kóduje rekombinantní DNA (rDNA) obsahující klonovaný gen, který je buď izolován z prokaryot či eukaryot nebo vytvořen synteticky (Overton, 2014). Rekombinantní molekuly DNA jsou vytvořené laboratorními metodami genetické rekombinace, které spojují genetický materiál z více zdrojů a vytvářejí sekvence, které by se jinak v genomu nenacházely (Watson, 2007). Takto připravená rDNA s cílovým genem je vložena do vhodného vektoru a následně zavedena do buněk nebo organismů, kde je klonovaný gen transkribován, čímž se tvoří kopie mRNA, která je translatována do aminokyselinové sekvence proteinu.

Na obrázku 1.2 jsou znázorněny tři různé cesty klonování, ligace a transformace do expresního systému *E. coli*. První je založena na restrikci, vyžaduje restrikční endonukleázy k vytvoření kompatibilních přesahů ve vektoru a insertu, které mohou být spojeny ligázou (Celie et al., 2016). Další je klonování nezávislé na ligaci (Aslanidis

a de Jong, 1990), kde jsou kompatibilní přesahy v insertu a vektoru vytvořeny exonukleázovou aktivitou T4 polymerázy a k ligaci fragmentů dochází uvnitř *E. coli* po transfekci fragmentů. Třetí je tzv. systém Gateway, kde je vytvořena podmnožina vstupních klonů, které lze použít pro následné klonování insertu do cílových (expresních) vektorů (Celie et al., 2016).



Obrázek 1.2 Schematické znázornění tří různých technik klonování (Celie et al., 2016)

1.3 *E. coli* – hostitel pro expresi rekombinantních proteinů

Od raného vývoje technologie rekombinantní DNA se *E. coli* široce používá jako hostitel pro vysokou úroveň exprese rekombinantních proteinů, a to i navzdory velkému rozvoji, kterého dosud dosáhly eukaryotické expresní systémy. Klíč úspěchu souvisí s bohatými znalostmi její fyziologie, se snadnou manipulací, nižšími náklady, vyso-

kým výnosem a možností optimalizovat navazující procesy cenově dostupnými procesy škálování (Ferrer-Miralles et al., 2014). Má bezkonkurenční kinetiku rychlého růstu, avšak exprese rekombinantního proteinu může způsobit metabolickou zátěž, což způsobí značné zkrácení doby generování (Bentley et al., 1990). Kromě toho je k dispozici také velké množství nástrojů pro expresi proteinů (Ferrer-Miralles et al., 2014).

Produkce proteinů ve velkém měřítku v tomto expresním systému je obvykle dosaženo pomocí dvoustupňového procesu. V první fázi jsou buňky pěstovány do vysoké buněčné hustoty za příznivých růstových podmínek, ve kterých je syntéza proteinů udržována na minimu prostřednictvím přísně regulovaných promotorových systémů. Poté následuje druhá fáze, ve které je po indukci dosaženo vysoké hladiny exprese rekombinantního proteinu (Nikerel et al., 2006).

Jedním z nejčastěji používaných expresních systémů je *E. coli* T7 systém řízený lac operonem přítomným ve vektorech pET a pRhot. Exprese cílového proteinu může být indukována laktózou nebo nedegradovatelným analogem isopropyl β -D-thiogalaktopyranosidem (IPTG) (Katzke et al., 2010). Takové indukovatelné expresní systémy umožňují přesné a nastavitelné oddělení růstové a produkční fáze změnou koncentrace induktoru a doby indukce.

Existuje velké množství kmenů *E. coli*, které jsou dobře geneticky charakterizovány, snadno se s nimi manipuluje a některé jsou dokonce obecně považovány za bezpečné (Fijan, 2014). Exprese rekombinantního proteinu v *Escherichia coli* je poměrně jednoduchá, rychlá, levná a robustní, přičemž exprimovaný protein tvoří až 50 % celkového buněčného proteinu. Má to však i nevýhody. Například rychlost exprese bakteriálního proteinu často vede k nesbaleným nebo chybně složeným proteinům, zejména u heterologních proteinů, které vyžadují delší dobu a/nebo molekulární chaperony, aby se správně složily (Nannenga a Baneyx, 2011), neschopnost produkovat proteiny s komplexními disulfidovými vazbami, absence několika posttranslačních modifikací, akumulace proteinů jako inkluzních tělísek (Yoon et al., 2010; Baneyx a Mujacic, 2004) a nízká přirozená sekrece bílkovin (Mergulhão et al., 2005).

V *E. coli* mohou být proteiny lokalizovány v cytoplazmě, periplazmě, membránách nebo extracelulárně v kultivačním mediu. Proteiny mířené do cytoplazmy jsou nejúčinněji exprimovány a poskytují výtěžky až 30 % biomasy (Jana a Deb, 2005). Nicméně tato exprese a lokalizace rekombinantních proteinů v cytoplazmě má za následek vysokou akumulaci proteinů, které jsou ohroženy degradací proteázami a jsou často přítomny ve formě inaktivních inkluzních tělísek (Mergulhão a Monteiro, 2007).

Naproti tomu sekrece těchto proteinů do periplazmy nebo kultivačního media vede ke zvýšené rozpustnosti a stabilitě proteinu díky zředění celkového obsahu proteinu a je spojena se sníženým rizikem proteolýzy. V periplazmatickém prostoru je správné skládání proteinů a následně i vyšší biologická aktivita podporována oxida-tivnějším prostředím než v cytoplazmě (Billen et al., 2017) a také přítomnosti chape-ronů pro správné skládání disulfidicky vázaných proteinů a peptidyl-propyl izomeráz (Goemans et al., 2014). Během translokace do periplazmy jsou odstraněny N-termi-nální signální sekvence a methionin, což vede k autentickému N-konci rekombinan-tního proteinu, čímž se potenciálně zabrání negativním dopadům na aktivitu a stabilitu proteinu. Množství nativních extracelulárních proteinů v tomto hostiteli bývá spíše nízké, což zjednodušuje následné zpracování a snižují se náklady na proces (Choi a Lee, 2004).

Neschopnost *E.coli* vylučovat proteiny do růstového media byla dlouho považo-vána za hlavní nevýhodu systému. Nicméně dogma, že *E. coli* nevylučuje žádný pro-tein, bylo zpochybněno jednak uznáním její přirozené schopnosti vylučovat protein v běžných laboratorních kmenech, tak i zvýšené schopnosti produkce proteinu v upra-vených buňkách (Chen, 2012).

V ideální situaci je exprimován rekombinantní protein ze silného promotoru, vy-soce rozpustný a získaný ve vysokém výnosu a velmi aktivní. Bohužel je zcela běžné, že nadprodukovaný rekombinantní protein je buď škodlivý pro buňky nebo je kom-partmentalizovaný do nerozpustných inkluzních tělísek (Ventura a Villaverde, 2006). V některých případech může být rekombinantní protein získán v aktivní formě po de-naturaci a následné renaturaci (Armstrong et al., 1999). To je však méně žádoucí, pro-tože často není jisté, zda refoldovaný protein znovu získal svou plnou funkci. Obecně lze expresi a rozpustnost rekombinantního proteinu optimalizovat změnou podmínek exprese, jako je typ kultivačních medií a dodané živiny, teplota, aerace, správně nača-sovaná indukce a typ kmene *E. coli*.

V případě, že je protein nerozpustný, lze také provést četné záchranné postupy, jako je refolding denaturovaných proteinů (Buchner et al., 1992) nebo vytvoření fúz-ních proteinových konstruktů, jako je protein vázající maltózu (Hammarstrom et al., 2002).

1.4 Faktory ovlivňující expresi rekombinantních proteinů

Produkce rekombinantních proteinů vždy implikuje narušení metabolismu hostitelské buňky, což typicky vede k nižší rychlosti růstu biomasy (Basan et al., 2015). To pramení z vysokých nároků na údržbu replikace vložených plazmidů a na zdroje potřebné pro transkripci a translaci cílových genů (Bhattacharya a Dubey, 1995). Zejména plazmidy s vysokým počtem kopií mohou buňku přetížit a vyvolat metabolický kolaps, což má za následek nízké výtěžky produktu nebo dokonce buněčnou smrt (Rosano a Ceccarelli, 2014; Rahmen et al., 2015).

Pro dosažení vysoké produktivity rekombinantních proteinů, je třeba nalézt dobrou rovnováhu mezi růstem biomasy a tvorbou produktu spojenou s nevyhnutelným buněčným stresem. Proto musí být mnoho parametrů individuálně optimalizováno. To zahrnuje nejen volbu vektoru a promotorového systému, stabilitu plazmidu, ale také složení media, dodávku kyslíku, teplotu kultivace a podmínky indukce (Terpe, 2006; Diederichs et al., 2014).

1.4.1 Složení kultivačních medií

Pro dosažení optimální úrovně exprese rekombinantních proteinů je jedním z prvních parametrů složení kultivačních medií, protože je to snadné a poměrně levné řešení a bylo prokázáno, že má vliv také na úroveň rozpustnosti proteinů (Vincentelli et al., 2003). Nejběžnější kultivační media používaná pro expresi rekombinantního proteinu v kulturách *E. coli* jsou komplexní media založená na kvasinkovém extraktu a tryptickém kaseinovém štěpení (trypton) nebo jiném proteinovém štěpení. Tyto zdroje poskytují komplexní směs aminokyselin, peptidů, sacharidů, vitamínů, stopových prvků a nukleotidů, která v zásadě postačuje k podpoře růstu *E. coli* bez další suplementace (Ukkonen, 2014).

E. coli roste jak v bohatých komplexních organických mediích, tak i v chemicky definovaných mediích na bázi solí, pokud je poskytnut zdroj organického uhlíku. Prostřednictvím typu a koncentrace použitých ingrediencí přímo složení kultivačního media diktuje množství produkované biomasy, a proto může dramaticky ovlivnit výkon mikrobiálních procesů (Nikerel et al., 2006). Bohužel většina složek media potřebných pro růst se po přidání vysokých koncentrací stává pro *E. coli* inhibiční. Je známo, že živiny jako je glukóza v koncentraci 50 g/l, hořčík v koncentraci 8,7 g/l, fosfor v koncentraci 10 g/l a zinek v koncentraci 0,038 g/l inhibují růst *E. coli* (Riesenberg et al.,

1991). V některých případech může složení media, konkrétně koncentrace některých solí, peptonu a kvasinek, zvýšit koncentraci rekombinantního proteinu (El-Hellow et al., 2000).

Na druhé straně přidání protetických skupin nebo kofaktorů, které jsou nezbytné pro správné sbalení nebo pro stabilitu proteinu v kultivačním mediu, může zabránit tvorbě inkluzních tělísek (Georgiou a Valax, 1996). Přidání takových kofaktorů do kultivačního media může dramaticky zvýšit výtěžek rozpustného proteinu.

Agregace proteinů vylučovaných do periplazmatického prostoru může být potlačena pěstováním buněk v přítomnosti relativně vysokých koncentrací polyolů, například sorbitolu nebo sacharózy, nemetabolizovatelného cukru pro *E. coli*. Zvýšení osmotického tlaku způsobené těmito faktory vede k akumulaci osmoprotektiv (například glycinbetain, treholóza) v buňce, které stabilizují nativní proteinovou strukturu (Georgiou a Valax, 1996). Osmotický tlak a vodivost způsobená koncentrací iontů v růstovém mediu může být i problémem. Mohou ovlivnit membránový potenciál a mohou aktivovat různé stresové mechanismy, které vyvolávají snížení rychlosti růstu nebo ukončení růstového cyklu (Winzer et al., 2002).

Mezi další přísady, které mohou mít příznivý vliv na expresi proteinů patří ethanol (který vyvolává expresi proteinů tepelného šoku), nízkomolekulární thioly a disulfidy (které ovlivňují redoxní stav periplazmatického prostoru a tím ovlivňují tvorbu disulfidových vazeb) a NaCl (Chopra et al., 1994).

Expresi rekombinantních proteinů mohou ovlivňovat i jednotlivé prvky a jejich přístupnost v kultivačním mediu.

Dusík

Bakterie obecně asimilují různé zdroje anorganického dusíku, ale *Escherichia coli* aerobně asimiluje pouze amoniak. Schopnost asimilovat jednotlivé organické zdroje dusíku závisí také na organismu. Organické zdroje dusíku jsou obvykle monomerní jednotky makromolekul (například aminokyseliny nebo nukleobáze) nebo sloučeniny z nich odvozené (agmatin nebo putrescin). *E. coli* dokáže asimilovat dusík z adeninu, adenosinu, agmatinu, L- a D-alaninu, alantoninu (anaerobně), amoniaku, argininu, asparaginu, cytosinu, glukosaminu a několika dalších sloučenin (Reitzer, 1996). Amoniak podporuje nejrychlejší růst a je proto považován za preferovaný zdroj dusíku pro *E. coli* (Magasanik, 1996). Na metabolické úrovni jsou relevantními metabolity

v centrální síti asimilace amoniaku aminokyseliny glutamin a glutamát, které patří mezi hlavní metabolity v buněčném metabolismu (Wagner a Fell, 2001).

Po vstřebání je amonný iont zabudován přímo pouze do aminokyselin glutamátu a glutaminu, které následně fungují jako donory dusíku v transaminačních a transamidačních reakcích. Ty vedou k dalším aminokyselinám a prekurzorům pro biosyntézu purinů a pyrimidinů (Zalkin a Smith, 1998).

Glutamin poskytuje dusík pro puriny, pyrimidiny, asparagin (pokud je intracelulární amoniak nízký), tryptofan, histidin, glukosamin. Glutamát poskytuje dusík pro většinu transamináz *E. coli*. Glutamátdehydrogenáza (GDH) nebo glutaminsyntetáza (GS) asimiluje většinu amoniaku v *E. coli* (Reitzer, 1996).

Uhlík

Preferovaným zdrojem uhlíku pro *E. coli*, stejně jako pro mnoho jiných bakterií, je glukóza, která podporuje rychlejší růst ve srovnání s jinými cukry. Glukóza brání využití jiných zdrojů uhlíku, což je fenomén nazývaný uhlíková katabolická represe (CCR) (Magasanik, 1961).

Metabolismus uhlíku a dusíku je propojen, což vyžaduje společnou regulaci mezi těmito dvěma prvky. Tato sdílená regulace zahrnuje klíčový odbočný bod mezi cestami využití uhlíku a dusíku, ve kterých α -ketoglutarát (α KG) slouží jako meziproduct TCA i jako uhlíková kostra glutamátu a glutaminu, hlavních produktů asimilace dusíku (Yuan et al., 2009). α KG funguje jako regulační molekula a spolu s glutaminem reguluje systém asimilace dusíku (Jiang et al., 2007). Ukázalo se, že α KG má regulační roli také při asimilaci uhlíku (You et al., 2013). Tedy za podmínek omezujících dusík, které snižují tok α KG z cyklu TCA do biosyntézy aminokyselin, hladiny α KG stoupají, což vede k potlačení vychytávání glukózy (Doucette et al., 2011) a inhibici syntézy cAMP adenylátcyklázou (You et al., 2013), což poskytuje okruhy, které koordinují mezi uhlíkem a asimilací dusíku (Mao et al., 2007).

Otevřenou otázkou však zůstává, do jaké míry jsou tyto okruhy schopny optimalizovat rychlost růstu pro různé kombinace zdrojů uhlíku a dusíku. Bren et al. (2016) testovali mnoho různých kombinací zdrojů uhlíku a dusíku na mnoha laboratorních kmenech *E. coli* a zjistili, že pokud je chudý zdroj dusíku (některé aminokyseliny), glukóza se stává jedním z nejhorších zdrojů uhlíku, který podporuje nižší rychlost růstu než jiné cukry.

Fosfor

Fosfát je jedním z nejhodnějších prvků v *E. coli*, pokud jde o buněčný obsah, jelikož má významný vliv na růst buněk a fyziologii. Metabolismus fosfátů úzce souvisí s centrálním metabolismem uhlíku a energie. Všechny živé buňky sofistikovaně regulují vychytávání fosfátů, aby přežily a rostly i za podmínek omezujících fosfát (Baek a Lee, 2006). Wanner shrnul mnoho aspektů role fosfátu na buněčnou strukturu a funkci (Wanner, 1996). To zahrnuje inkorporaci anorganického fosfátu do membránových lipidů, nukleových kyselin, sacharidů a dalších buněčných metabolitů. Zde také působí fosfát jako efektor enzymatických reakcí (Ryan et al., 1989) a podílí se na mnoha metabolických drahách, zejména v energetickém metabolismu buňky (například jako vysokoenergetická fosfoanhydridová vazba v ATP). Dále působí jako polymer uchovávající energii, který se používá při omezení fosfátů (Van Dien a Keasling, 1999).

Kvůli této univerzální roli fosfátu má omezení této živiny ohromné účinky na buněčný růst a fyziologii. Proto se zjistilo, že mnoho genů je regulováno právě hladinou anorganického fosfátu v mediu (Torriani, 1990). Vyčerpání fosfátů při kultivaci *E. coli* vede k aktivaci regulonu Pho (Wanner, 1996).

Produkce rekombinantních proteinů se obvykle vyskytuje během procesů, kde je fosfát omezující živinou v nadbytkových podmínkách uhlíku a dusíku. Oddělení fáze růstu biomasy a fáze tvorby produktu je vysoce prospěšná pro produkci rekombinantního proteinu právě omezením fosfátu. Toto omezení snižuje rychlost růstu biomasy a odkloní tok uhlíku směrem k tvorbě produktu (Schuhmacher et al., 2014).

1.5 Podmínky kultivace

Dosažení vysokých hladin exprese cílového proteinu je jedním z hlavních cílů při kultivaci rekombinantních buněk. Kromě složení kultivačních medií jsou neméně důležité i podmínky kultivace, jako je pH media, indukční strategie atd., které vedou k optimální expresi nebo stabilitě produktu. Nemusí však být předvídatelné na základě typu kmene nebo konstrukce plazmidu.

1.5.1 pH

Pro *Escherichia coli* je optimální rozmezí pH pro růst a produkci mezi 6,5 a 7,5, také v závislosti na teplotě (Davey, 1994). Během kultivace dochází k posunu pH v důsledku přeměny a produkce substrátů a metabolických sloučenin. Jedním z takových substrátů mohou být amonné ionty, které jsou preferovaným zdrojem dusíku podporujícím rychlý růst (Reitzer, 2003; Wang et al., 2011). I když je přímý příjem amonných iontů možný prostřednictvím transportního proteinu AmtB při velmi nízkých hladinách amonia nebo prostředí s nízkým pH (Soupene et al., 1998), obvyklý příjem je prostřednictvím volné difúze nenabitého amoniaku přes buněčnou membránu (Winkler, 2006). Přeměna amonného iontu na amoniak na základě pH má za následek volný proton, který okyseluje okolní kultivační medium (Christensen a Eriksen, 2002).

Další snížení pH může být způsobeno „přetečením“ metabolitů. Například acetát, který je běžným vedlejším produktem růstu za anaerobních podmínek nebo podmínek omezujících kyslík. Produkce acetátu může být způsobena také za aerobních podmínek v přítomnosti glukózy (Kleman a Strohl, 1994). U různých kmenů *E. coli* bylo popsáno, že inhibice růstu prostřednictvím acetátu je výsledkem působení jako odpojovač protonové motorické síly nebo prostřednictvím snížení intracelulárního pH (Jensen a Carlsen, 1990). Transport acetátu z buněk způsobuje snížení pH v mediu. Po vyčerpání glukózy způsobí konzumace acetátu opět zvýšení pH (Scheidle et al., 2011).

1.5.2 Teplota

Buňky *E. coli* rostou v teplotním rozsahu přibližně 40 °C a je pozoruhodné, že rychlost růstu buněk se zvyšuje v reakci na zvyšující se teplotu jako chemická reakce v rozsahu růstových teplot 20 až 37 °C. Při vysokých i nízkých teplotách se tento vztah rozpadá. Broeze et al. v roce 1978 uvedl, že při nízké teplotě iniciace proteinu omezuje rychlost růstu, nebylo však známo, co omezuje rychlost při vysoké teplotě. Ze studií buněčného růstu v různých mediích je známo, že *E. coli* přísně kontroluje hladiny proteinového syntetizujícího aparátu.

1.5.3 Aerace

Dostupnost kyslíku je jedním z klíčových environmentálních faktorů přispívajícím k úspěchu exprese rekombinantního proteinu. Je široce uznáváno, že kapacita přenosu

kyslíku u třepacích bioreaktorů (např. Erlenameyrovky baňky) je omezená a často nedostatečná pro udržení aerobních kultivačních podmínek (Vasala et al., 2006), a že se může objevit závažné omezení kyslíku zejména v bohatých mediích určených k dosažení vyšších hustot buněk (Losen et al., 2004).

Některé dřívější zprávy (Qoronfleh, 1999; Tomazetto et al., 2007) naznačují, že kultivace *E. coli* za sníženého provzdušňování a hladin DOT může být prospěšná pro expresi určitých proteinů, ale nevýhodná pro jiné. Zejména v autoindukujících mediích může vysoká dostupnost kyslíku přispět k výrazně zhoršené úrovni exprese (Blommel et al., 2007). Je také známo, že dostupnost kyslíku ovlivňuje složení proteinů vnější membrány (Rolfe et al., 2011) a lipidů (Knivett a Cullen, 1965), což by mohlo mít zajímavé implikace na extracelulární únik rekombinantních proteinů zaměřených na periplazmatický prostor *E. coli*.

Provzdušňování kultury v třepáčkách se opírá o rozpouštění kyslíku ze vzduchu v horním prostoru do kapalného kultivačního media, což je podporováno neustálým mícháním kapaliny třepáním na rotačně se pohybující platformě. Maximální kapacita přenosu kyslíku je tedy závislá na maximální rozpustnosti kyslíku, která je ovlivněna teplotou a koncentrací elektrolytu, na fyzikálně-chemických vlastnostech kapaliny, vlastnostech kultivační nádoby, parametrech protřepávání (Maier a Büchs, 2001) a parciálním tlaku kyslíku v horním prostoru baňky. Vliv teploty je v rozmezí normálních růstových teplot zanedbatelný, protože snižování rozpustnosti kyslíku s rostoucí teplotou je vyrovnáno současným zvýšením difuzivity kyslíku (Enfors a Häggström, 2000).

Escherichia coli je fakultativní anaerobní bakterie, a proto je dostupnost kyslíku klíčovým parametrem ovlivňujícím její metabolismus a fyziologii (Smith a Neihardt, 1983). Dostupnost kyslíku mění expresi stovek genů spojených s metabolickými, biosyntetickými a regulačními funkcemi, transportem a buněčnou strukturou (Salmon et al., 2003). V důsledku toho je produkce cílových rekombinantních proteinů také ovlivněna dostupností kyslíku a změny v časovém profilu rozpuštěného kyslíku jsou typicky důvodem změněné výkonnosti procesu (Konz et al., 1998). Navíc různé metabolické a fyziologické režimy buňky nejsou jednoduše omezeny na plnou aerobiózu a plnou anaerobiózu, ale profil genové exprese se postupně mění pod různými hladinami středních koncentrací rozpuštěného kyslíku (Rolfe et al., 2011).

Výsledky publikované Herbertem et al. (1965) a později potvrzené Bauerem a Zivem (1976) ukazují, že konstanta výtěžnosti kyslíku kmene *E. coli* rostoucího na

glukóze jako zdroji uhlíku se blíží hodnotě 1 (1 g kyslíku je potřeba na produkci 1,06 g biomasy *E. coli*). Vzhledem k tomu, že průměrný fermentační systém při teplotě 25 °C může při provzdušňování dodávat 1,5 M O₂ l/h, mohla by kultura *E. coli* teoreticky narůst až do hustoty buněk 350 g/l suché biomasy za předpokladu, že jsou splněny všechny nutriční požadavky. Tato hodnota je nad limitem 250 g/l suché biomasy na základě tekutosti (Shiloach a Bauer, 1975). Pokud je tedy k dispozici přísun čistého kyslíku, rychlost přenosu kyslíku v tekutých kulturách by nebyla limitujícím faktorem (Shiloach a Fass, 2005).

1.5.4 Indukce

V případě produkce rekombinantních proteinů nemusí být jejich syntéza na začátku kultivace výhodná, protože mnoho proteinů je citlivých na proteázy a v důsledku toho budou náchylnější k degradaci před konečnou izolací (Schmidt et al., 1999). Jedním řešením tohoto problému je použití indukovatelného promotoru.

Pomocí malých molekul nebo stresů, které mohou modifikovat aktivaci promotoru, lze výrazně oddělit začátek produkce proteinu od růstové fáze. To také pomáhá, pokud je protein toxický nebo škodlivý pro růst buňky. Z použitých molekul je ve výzkumu nejrozšířenější isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG). Lze také použít laktózu jako induktor, jako alternativu k IPTG. Laktóza může aktivovat stejné promotory jako IPTG a zároveň slouží jako zdroj uhlíku pro bakterie (Gombert a Kilikian, 1998).

Mnoho expresních systémů využívá lac operon, jehož induktor, tedy IPTG, působí stochastickým a binárním způsobem. To znamená, že exprese je buď „zapnuto“ nebo „vypnuto“. Nízké koncentrace IPTG indukují syntézu v malé menšině buněk. Při vysokých koncentracích všechny buňky exprimují protein na vysoké úrovni. To vyžaduje, aby každá buňka obsahovala stejnou koncentraci proteinu, tedy že exprese musí být homogenní ve všech buňkách a výsledkem je pak homogenní exprese, kterou lze kontrolovat například změnou koncentrace induktoru (Speer et al., 2019).

Alternativou jak IPTG, tak laktózy je použití systému s teplotně citlivým promotorem/represorem. Nejčastěji používanými tepelně indukovanými promotory jsou PL a PR z fágu lambda. Když je indukovatelný promotor umístěn před gen kódující požadovaný protein, syntézu tohoto proteinu bude řídit teplota. Práce provedené v 80. letech minulého století ukázaly různé indukční profily. Ukázalo se, že skokové změny teploty během kontinuálních kultur, kdy se buňky nechají dosáhnout ustáleného stavu

při 40 °C, než se přivedou na 42 °C, vedou k vysokým úrovním aktivity rekombinantního proteinu (Villaverde et al., 1993).

1.6 Metody analýzy proteinů

1.6.1 Separační metody

Mezi separační metody se řadí tzv. elektroforetické metody separace. Elektroforéza proteinů je proces separace nebo čištění proteinů jejich umístěním do gelové matrice a následným sledováním mobility proteinu v přítomnosti elektrického pole. Mezi tyto metody patří:

- Elektroforéza na nativním polyakrylamidovém gelu (bez denaturantu).
- Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu s dodecylsíránem sodným (SDS).
- Izoelektrická fokusace – charakteristickou vlastností proteinů je jejich izoelektrický bod, což je pH, při kterém se jejich molekuly nepohybují v elektrickém poli. Princip spočívá v dělení směsi proteinů na nosiči se stabilním gradientem pH rovnoměrně stoupajícím od anody ke katodě. Proteiny jsou fokusovány do úzké zóny kolem svého izoelektrického bodu (Káš et al., 2006).
- Dvourozměrná gelová elektroforéza (2D PAGE) – metoda, která odděluje proteiny podle jejich izoelektrických bodů v prvním rozměru a podle molekulových hmotností ve druhém rozměru (Kendrick et al., 2019).

Dalšími jsou chromatografické metody separace, kde se nejčastěji užívají dva typy, a to vysokoúčinná kapalinová chromatografie a tenkovrstvá chromatografie. Obě tyto metody jsou užitečné jako doplněk k přístupům založeným na gelové elektroforéze.

Dále lze využít ionexovou (iontoměničovou) chromatografii, nejčastěji užívanou pro separaci a čištění proteinů, polypeptidů, nukleových kyselin a dalších nabitých molekul. Ionex lze definovat jako polyvalentní materiál, který je nerozpustný ve vodě, obsahuje navázané ionogenní skupiny a je schopný disociovat a vyměňovat ionty z okolního roztoku do ionexu (Mikeš, 1975). Tento proces je obousměrný. Rekombinantní proteiny jsou běžně exprimovány s afinitní značkou fúzovanou k N-konci nebo C-konci pro usnadnění purifikace a detekce. Jednou z nejčastěji užívaných pro rekombinantní proteiny je His-TAG, která obsahuje šest nebo více po sobě jdoucích histidinových zbytků (Waugh, 2005). Díky skutečnosti, že je při fyziologickém pH nenabitý, His-TAG obvykle neovlivňuje skládání a ve většině případů neinterferuje se strukturou nebo funkcí proteinu (Carson et al., 2007).

1.6.2 Detekce a identifikace proteinů

Detekovat lze celkové proteiny, kde metody závisí na absorbačních vlastnostech makromolekul:

- Test dle Bradfordové
- Lowryho test – kombinuje reakce iontů mědi s peptidovými vazbami za alkalických podmínek s oxidací aromatických proteinových zbytků (Everette et al, 2010).
- Warburg – Christian metoda – UV spektroskopická metoda stanovení proteinů založená na absorbanci UV světla při vlnových délkách 260 nm a 280 nm (Sørensen et al., 2007).

K identifikaci proteinů se běžně používají dvě metody:

- Edmanova degradace – metoda sekvenování aminokyselin v peptidu. Zde je amino – koncový zbytek značen a odštěpen z peptidu bez přerušení peptidových vazeb mezi jinými aminokyselinovými zbytky (Edman et al., 1950).
- Hmotnostní spektrometrie – postup identifikace proteinů na bázi hmotnostní spektrometrie zahrnuje štěpení proteinů, které jsou poté separovány, fragmentovány, ionizovány a zachyceny hmotnostními spektrometry. Proteiny jsou nakonec identifikovány z píků zachycených hmotnostních spekter pomocí výpočetních metod, kde každý pík teoreticky představuje iont peptidového fragmentu (Wong et al, 2007).

Typem hmotnostní spektrometrie je i MALDI. Principem této metody pro identifikaci proteinů je to, že štěpení proteinu specifickou proteázou vytvoří směs peptidů jedinečných pro tento protein. Měření molekulových hmotností těchto peptidů pak poskytuje charakteristický soubor dat zvaný otisk peptidové hmotnosti (PMF) (Pappi et al., 1993). Data PMF pak mohou být porovnána s teoretickými molekulovými hmotnostmi peptidu, které by byly vytvořeny použitím stejné proteázy ke štěpení každého proteinu v databázi sekvencí, aby se našla nejlepší shoda (Webster a Oxley, 2011).

1.6.3 Stanovení enzymatické aktivity

Cílem měření enzymové aktivity je stanovit rychlost přeměny substrátu na produkt za definovaných podmínek, jako je optimální pH, saturační koncentrace substrátu, teplota, množství enzymu a fyzikálně chemické vlastnosti prostředí (Scopes, 2002).

Standardní jednotkou aktivity je od roku 1961 I U (z anglického unit), která udává takové množství enzymu, které za standardních podmínek katalyzuje při saturaci substrátem přeměnu 1 μ mol substrátu za 1 minutu. Aktivitu enzymu lze stanovit sledováním přírůstkem koncentrace produktu nebo úbytkem koncentrace substrátu. Dle principu instrumentace a detekce lze metody rozdělit na kontinuální nebo nekontinuální testy (Harris a Kashwani, 2009).

Kontinuální testy jsou definovány schopností kontinuálně monitorovat vymizení nebo výskyt daného substrátu v daném prostředí. K těmto metodám patří spektrofotometrie, fluometrie, kolorimetrické stanovení, chemiluminiscence, rozptyl světla, termoforéza v mikroměřítku.

Diskontinuální testy jsou definovány neschopností kontinuálně a selektivně monitorovat změny koncentrace substrátu nebo produktu. Enzymatická reakce musí být zastavena v určitých časech. Vzorky jsou pak podrobeny analýze, kterou lze produkt účinně oddělit od substrátu, takže změna koncentrace kteréhokoli z nich může být určena pro každý jednotlivý časový bod (Harris a Kashwani, 2009). Počáteční rychlost reakce je určena úbytkem substrátu nebo tvorbou produktu v čase a řídí se dle rovnice Michaelise a Mentenové. Počáteční rychlost je dle definice rychlost v čase nula, než se vytvoří jakýkoliv produkt (Barthová et al., 1980). Zastavení reakce se většinou provádí denaturací, obvykle významnou změnou pH nebo přidáním vhodného inhibitoru (Kráal, 2014). K těmto testům se řadí radiometrie či chromatografie.

1.6.4 Metody použité v této diplomové práci

Stanovení koncentrace celkových proteinů dle Bradfordové

Stanovení celkových proteinů dle Bradfordové je kolorimetrický proteinový test, který je založen na posunu absorbance barviva Coomassie brilliant blue G-250. Barvivo existuje ve třech formách: aniontová (modrá barva), neutrální (zelená barva) a kationtová (červená barva) (Compton a Jones, 1985). V kyselém prostředí se červená forma barviva mění na modrou a naváže se na testovaný protein. Barvivo vytváří silný, nekovalentní komplex s karboxylovou skupinou proteinu působením van der Waalsovy síly a aminoskupiny prostřednictvím elektrostatických interakcí (Ninfa et al., 2008).

Během tvorby tohoto komplexu červená forma barviva nejprve daruje volný elektron ionizovatelným skupinám na proteinu, to způsobí narušení přirozeného stavu proteinu a následně obnaží jeho hydrofobní kapsy. Tyto kapsy v terciální struktuře pro-

teinu se vážou nekovalentně k nepolární oblasti barviva prostřednictvím van der Waalsovy síly, která umístí kladné aminové skupiny do blízkosti negativního náboje barviva. Vazba je dále posílena iontovou interakcí. Když se barvivo naváže na protein, způsobí posun z 465 nm na 595 nm, to je důvod, proč se absorbance odečítají právě při vlnové délce 595 nm (Bradford, 1976).

Nárůst absorbance měřené při 595 nm je úměrný množství barviva, které je navázáno, a tedy i koncentraci proteinu přítomného ve vzorku.

Stanovení aktivity enzymu pomocí HPLC

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie – HPLC (z anglického high-performance liquid chromatography) je specifická forma sloupcové chromatografie, která se obecně používá v biochemii a analýze k separaci, identifikaci a kvantifikaci aktivních sloučenin (Martin a Guiochon, 2005). HPLC využívá kolonu, která obsahuje náplňový materiál (stacionární fázi), čerpadlo, které pohybuje kolonou (mobilní fázi) a detektor, který ukazuje retenční časy molekul. Retenční doba se mění v závislosti na interakcích mezi stacionární fází, analyzovanými molekulami a použitým rozpouštědlem (Liu a Lee, 2006). Pro změnu polaritý mobilní fáze lze k eluci sloučenin použít směs rozpouštědel. Když složení takové směsi zůstává konstantní během elučního kroku, označuje se to jako izokratická eluce. Když se složení směsi rozpouštědel v průběhu elučního kroku mění, jde o tzv. gradientovou eluci (Bélanger et al., 1997).

V principu HPLC nabízí možnost monitorování substrátu a produktu. Předpokladem je oddělení substrátu a produktu. Separaci lze dosáhnout chromatografií a vzhledem k vysokému rozlišení je metodou volby HPLC na reverzní fázi (stacionární fáze má nepolární charakter, mobilní fáze je polární) (Lawrence a Frei, 1976). Obecný postup pro analýzu začíná homogenizací materiálu obsahujícího enzym a centrifugace. Supernatant se přidá k substrátu a reakce probíhá při dané teplotě. Ve vhodných časových intervalech se odebírají vzorky a reakce se ukončí (inaktivací enzymu například denaturací). Nebo se alternativně připraví mnoho podobných inkubačních směsí, substrát a enzym jsou přidány v čase 0 a reakce je ukončena v požadovaném čase, následuje analýza HPLC, detekce a vyhodnocení (Welling et al., 1994).

Základem pro vyhodnocení sledované látky je určení plochy, resp. výšky píku a platí, že metoda, která byla použita pro hodnocení plochy/výšky standardu musí být použita i pro vyhodnocení plochy/výšky stanovované látky (HPLC.cz, 2010). Aktivita

enzymu se následně přepočte pomocí rovnice na požadované jednotky ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$; $\text{mM}/\text{min}/\text{ml}$).

SDS polyakrylamidová gelová elektroforéza

SDS-PAGE (dodecylsulfát sodný – polyakrylamidová gelová elektroforéza) je elektroforetický systém, který je od 50. let 20. století důležitou metodou pro separaci a odhad molekulové hmotnosti proteinů (Hamdan et al., 2005). Principem je migrace nabíjených částic stejnosměrným elektrickým polem, které se vytváří vložením stejnosměrného napětí mezi elektrody (Klouda, 1996).

Nejpopulárnější postup SDS elektroforézy popsal Ulrich K. Laemmli v roce 1970. K dnešnímu dni existuje nespočet protokolů pro SDS-PAGE, které se liší složením pufru a permeabilitou gelu v závislosti na velikosti proteinů, které mají být separovány (Schagger, 2006). Všechny varianty postupu jsou založeny na schopnosti SDS vstoupit do komplexu s proteiny. Vzhledem k přítomnosti dvanácti uhlíkového konce, SDS asociuje s nepolárními oblastmi molekul proteinů prostřednictvím hydrofobních interakcí (Hamdan et al., 2005), zatímco polární část molekuly SDS dává čistý záporný náboj na komplex SDS-protein.

Medium, kterým migrují proteiny (také označované jako „matrix“) je diskontinuální gel na bázi polyakrylamidu, který obsahuje SDS (dodecylsulfát sodný). Množství SDS vázaného na protein, a tedy i náboj komplexu, je zhruba úměrný jeho velikosti. Běžně se na 1 gram proteinu váže 1,4 gramu SDS (Reynolds a Tanford, 1970; Smith, 1984).

SDS je detergent, působí jako povrchově aktivní látka, maskuje vnitřní náboj proteinů a uděluje jim velmi podobné poměry náboje k hmotnosti. Vnitřní náboje proteinů jsou zanedbatelné ve srovnání s SDS a kladné náboje proteinů jsou také sníženy díky pH separačního gelu. Zahřátím vzorku proteinů v pufru s SDS dochází k denaturaci proteinů včetně odstranění disulfidových můstků, molekuly proteinů se obalí molekulami dodecylsulfátu sodného, který udělí proteinům celkový záporný náboj. Při aplikaci konstantního elektrického pole proteiny migrují směrem k anodě rychlostí, která je závislá na její hmotnosti (Reynolds a Tanford, 1970).

2 Hypotézy a cíle práce

Cílem diplomové práce je optimalizace kultivačních podmínek za účelem zvýšení produkce rekombinantních proteinů syntetizovaných vybranými kmeny *E. coli*.

2.1 Hypotézy

- Kultivační podmínky ovlivňují rychlost růstu sledovaných kmenů *E. coli* a tato rychlost je přímo závislá na vybraném zdroji uhlíku a dusíku v kultivačním mediu.
- Kultivační podmínky (rychlost otáček třepačky) ovlivňují intenzitu aerace kultivačního media. S rostoucí aerací dochází ke zvýšení rychlosti růstu jednotlivých sledovaných kmenů *E. coli*.
- Složení kultivačního media a kultivační podmínky přímo ovlivňují množství rekombinantního proteinu, který bakterie vyprodukuje.

2.2 Cíle práce

Pro práci byly stanoveny následující dílčí cíle:

- Ověřit produkci rekombinantních proteinů v různých kultivačních médiích.
- Ověřit možnosti fed-batch kultivace s přidavkem zdrojů uhlíku (monosacharidy) a jejich vliv na produkci rekombinantních proteinů.
- Ověřit vliv formy dodaných živin (prvků) na produkci rekombinantních proteinů.
- Vyhodnotit vliv kultivačního media na produkci rekombinantních proteinů vybraných kmenů *E. coli*, a tedy stanovit optimální kultivační medium právě za účelem produkce rekombinantních proteinů.

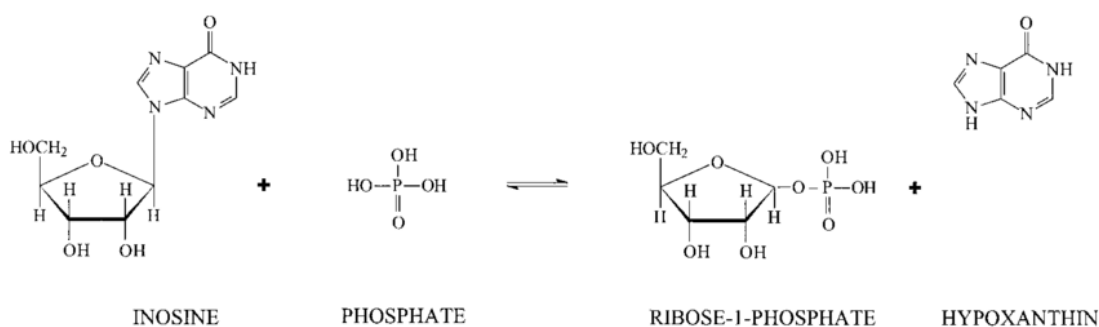
3 Metodika

3.1 Analyzovaný kmen *Escherichia coli*

Studované izoláty rekombinantních kmenů *Escherichia coli* byly poskytnuty firmou OncoRa s.r.o.

3.1.1 Enzym Purine Nucleoside Phosphorylase (PNP)

Purin nukleosid fosforyláza (PNP) je enzym, který katalyzuje první krok při záchraně purinových bází nebo katabolismu nukleosidů. Konkrétně PNP katalyzuje reverzibilní štěpení inosinu na hypoxanthin a guanosinu na guanin (Markert, 1994), jak je znázorněno na obrázku 3.1.

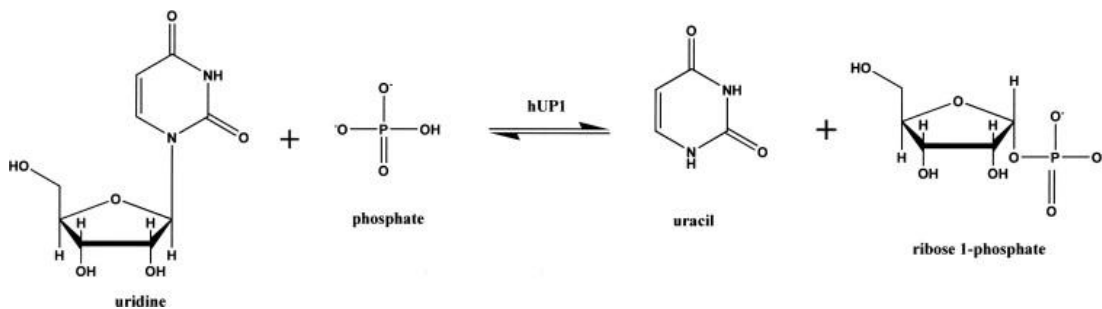


Obrázek 3.1 Reakce katalyzována PNP (Gregus a Nemeti, 2002)

Enzym PNP byl izolován z eukaryotických i prokaryotických organismů. Obecně platí, že PNP s trimerní strukturou (eukaryotní, tzv. savčí) přijímají jako substráty pouze guanosin a inosin, zatímco hexamerní PNP (prokaryotické) přijímají také adenosin (Jensen, 1978). *Escherichia coli* PNP je navíc tolerantnější k nukleosidům, které obsahují modifikované ribózové skupiny a ve srovnání s eukaryotickým PNP je její aktivita vůči purinovým arabinosidům desetkrát vyšší (Stoeckler et al., 1980). Je zajímavé, že u prokaryot, například *Bacillus subtilis* nebo *Escherichia coli*, byly pozorovány trimerní i hexamerní PNP (Buxton et al., 1980).

3.1.2 Enzym Uridine Phosphorylase (UP)

Uridin fosforyláza (UP) je klíčový enzym v pyrimidinové záchraně dráze, která katalyzuje reverzibilní fosforolýzu uridinu na uracil a ribóza-1-fosfát, jak je znázorněno na obrázku 3.2.



Obrázek 3.2 Reakce katalyzována UP (Renck et al., 2010)

UP jsou rozšířené, byly identifikovány u prokaryot, kvasinek a vyšších organismů. Aminokyselinová sekvence UP je vysoce konzervovaná mezi několika bakteriálními, lidskými a myšimi enzymy (Pugmire et al., 2002). Ve srovnání s UP z jiných zdrojů je *Escherichia coli* UP specifitější, působí téměř výhradně na uridin a jeho analogy jako substráty (Vita et al., 1986). *E. coli* UP je aktivní jako homohexamer. Strukturální důkazy potvrdily předpověď ze sekvenční analýzy, že UP je členem rodiny proteinů nukleosid fosforylázy I, a proto sdílí společný záhyb s trimerními a hexamerními purinovými nukleosidovými fosforylázami (PNP) (Pugmire a Ealick, 2002) a jako člen této rodiny s největší pravděpodobností sdílí podobný mechanismus pro fosforylační reakci.

3.2 Kultivační media

Pro kultivaci bakterií obou kmenů byla vybrána následující media. LB medium jako vegetativní medium. Jako produkční media byla vybrána media TB, TBG, TBG4, MSM, CAA a TRY. Složení a navážky chemikálií všech medií jsou shrnuty v tabulce 3.1.

Tabulka 3.1: Složení kultivačních medií

LB pH 7,3		MSM pH 7,0	
Chemikálie	Navážka na 1L	Chemikálie	Navážka na 1L
Casein hydrolysate	10 g	Yeast extract	5 g
NaCl	10 g	Na ₂ SO ₄	2 g
Yeast extract	5 g	(NH ₄) ₂ SO ₄	2,5 g
TB pH 7,0		NH ₄ Cl	0,5 g
Chemikálie	Navážka na 1L	K ₂ HPO ₄	14,6 g
Yeast extract	24 g	NaH ₂ PO ₄ x 7H ₂ O	4 g
Pancreatic peptone	20 g	(NH ₄) ₂ -H-Citrat	1 g
Glycerol	4 ml	NaCl	0,83 g
P-pufr *	100 ml	MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,25 g
TBG pH 7,0		TES **	1 ml
Chemikálie	Navážka na 1L	Glukóza ***	10 g
Yeast extract	24 g	CAA pH 7,0	
Pancreatic peptone	20 g	Chemikálie	Navážka na 1L
Glycerol	4 ml	Yeast extract	24 g
P-pufr *	100 ml	Casamino acids	20 g
Glukóza	30 g	Glycerol	4 ml
TBG4 pH 7,0		P-pufr *	100 ml
Chemikálie	Navážka na 1L	TRY pH 7,0	
Yeast extract	24 g	Chemikálie	Navážka na 1L
Pancreatic peptone	20 g	Yeast extract	24 g
Glycerol	4 ml	Tryptone	12,5 g
P-pufr *	100 ml	Glycerol	4 ml
Glukóza	30 g	P-pufr *	100 ml

* P-pufr – 0,17M KH₂PO₄ + 0,72M K₂HPO₄

** TES (Trace Elements Solution) – složení je uvedeno v tabulce 3.2

*** Glukóza pro MSM medium – 20% roztok glukózy sterilizovaný zvlášť

Tabulka 3.2 Složení TES pro medium MSM

Chemikálie	Navážka v g/l
CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,74
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,18
MnSO ₄ x H ₂ O	0,1
EDTA	20
FeCl ₃ x 6 H ₂ O	16,7
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,1
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,104

Media byla připravena navážením chemikálií do 250 ml Erlenmeyerových baněk, navážky byly přepočteny na objem media 50 ml. Navážené chemikálie byly rozpuštěné v destilované vodě a bylo upraveno pH na požadovanou hodnotu pomocí 2M roztoku

kyseliny chlorovodíkové a 2M roztoku hydroxidu sodného. Následně byla media sterilizována v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

Pro kultivační půdu na Petriho miskách bylo použito medium LB s přídavkem bakteriologického agaru o navážce 20 g/l. Sterilní medium byla nalito ve sterilním laminárním boxu do Petriho misek, které byly předem sterilizovány při 160 °C po dobu 2 h.

Všechna media byla připravena s přídavkem antibiotika kanamycinu o koncentraci 1 g/l. Roztok kanamycinu byl předem připraven rozpuštěním 1 g kanamycinu v 10 ml destilované vody, po dokonalém rozpuštění byl sterilně v laminárním boxu přefiltrován přes sterilní filtr 0,22 µm a po 1 ml uložen ve sterilních mikrozkuvkách do mrazáku. Z takto připraveného roztoku bylo odebíráno 0,5 ml do 50 ml media pro dodržení finální koncentrace 1 g/l kanamycinu.

3.2.1 Inokulace a kultivace vegetativního media

Vegetativní media pro kmeny *E. coli* s enzymy UP i PNP byla sterilně očkována z pevného LB media s přídavkem antibiotika kanamycinu o koncentraci 1 g/l. Do sterilního tekutého LB media o objemu 50 ml bylo přidáno 0,5 ml roztoku kanamycinu. Očkovací kličkou byla sterilně odebrána biomasa z pevného media a převedena to tekutého LB media.

Vegetativní medium bylo kultivováno v orbitální třepačce s RPM 250, při teplotě 32 °C po dobu 24 hodin.

3.2.2 Inokulace a kultivace produkčních medií

Před inokulací bylo do všech sterilních produkčních medií přidáno 0,5 ml roztoku kanamycinu. Do medií TB, TBG, TBG4, CAA a TRY bylo přidáno 5 ml P-pufu, který byl připraven a sterilizován zvlášť. Do media MSM bylo přidáno 2,5 ml sterilního 20% roztoku glukózy, který byl připraven zvlášť. Následně byla produkční media sterilně inokulována 2,5 ml vegetativního media. Byla kultivována v orbitální třepačce s RPM 250, při teplotě 32 °C po dobu 2 hodin.

Po 2 hodinách kultivace byly ze všech medií sterilně odebrány 2 ml pro měření optické density (dále OD), která je měřena při 595 nm na spektrofotometru. Toto měření bylo provedeno za účelem indukce syntézy rekombinantního proteinu přidáním

IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) [VWR]. Do medií bylo IPTG přidáno sterilně, a to ve fázi růstu, která odpovídala hodnotě OD při 595 nm mezi 0,5 – 0,9. Poté byly všechny baňky vloženy zpět do třepačky a kultivovány při RPM 250, při teplotě 32 °C po dobu 22 hodin. Celková doba kultivace byla 24 hodin. Do media TBG4 byly po 4 hodinách od přidání IPTG přidány sterilně 4 ml sterilního roztoku glukózy tak, aby byla dodržena koncentrace glukózy 30 g/l v mediu. Dále bylo medium TBG4 kultivováno jako ostatní media. Po ukončení kultivace byly baňky vyjmuty z třepačky a z medií byly postupně odebrány vzorky na jednotlivá měření. Ve vzorcích bylo dále měřeno pH a optická denzita (OD).

3.3 Analýza proteinů

3.3.1 Stanovení koncentrace proteinů dle Bradfordové

Použité chemikálie a roztoky:

- Bradfordovo činidlo

100 mg Coomassie G250 (VWR) rozmíchat v 50 ml 96% ethanolu (VWR) a 100 ml 85% H₃PO₄ (VWR), po rozmíchání doplnit destilovanou vodou do 1 l a přefiltrovat, roztok dlouhodobě uchovávat v tmavé lahvi

- Standard proteinu o známé koncentraci

navážít 10 mg BSA (Bovine Serum Albumine; VWR), dopočítat a doplnit objem destilované vody na finální koncentraci 1 mg/ml (do 10 ml) = zásobní roztok; následně připravit 1 ml roztoku o koncentraci 0,1 mg/ml ze zásobního roztoku – 10x ředit (1:9)

Kalibrační křivka:

Kalibrační řada byla připravena dle tabulky 3.3. Do 5 ml plastových zkumavek byl napipetován dle dané koncentrace objem BSA ze zásobního roztoku o koncentraci 0,1 mg/ml, poté objem destilované vody. Ke každému vzorku bylo přidáno 1800 μ l Bradfordova činidla. Celkový objem vzorku byl 3 ml.

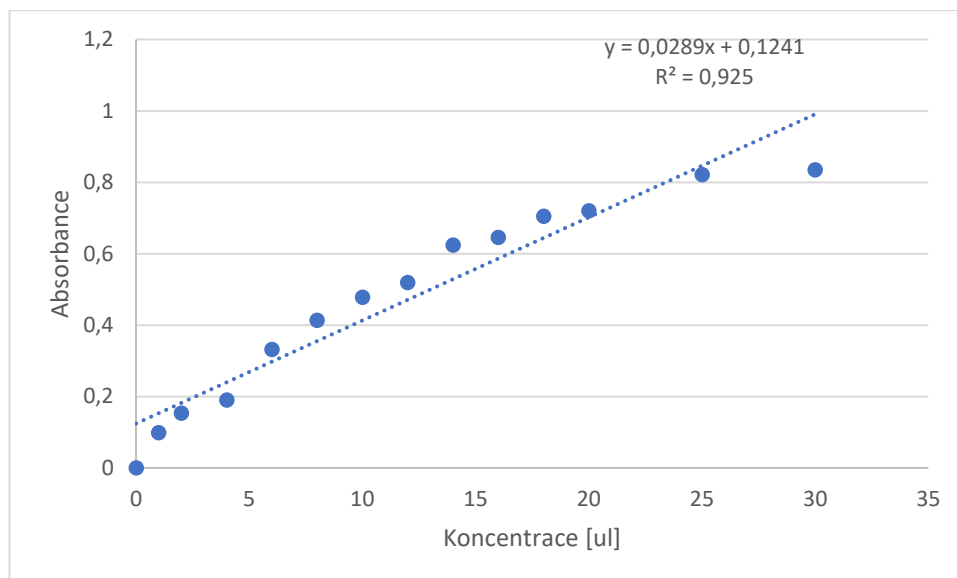
Tabulka 3.3: Tabulka pro přípravu kalibrační křivky

Koncentrace v $\mu\text{g/ml}$	BSA 0,1 mg/ml [μl]	destilovaná voda [μl]
0	0	1200
1	30	1170
2	60	1140
4	120	1080
6	180	1020
8	240	960
10	300	900
12	360	840
14	420	780
16	480	720
18	540	660
20	600	600
25	750	450
30	900	300

Po přidání činidla byl vzorek inkubován 3 minuty při pokojové teplotě. Poté byla měřena absorbance na spektrofotometru ve 3 ml skleněné kyvetě při vlnové délce 595 nm. Naměřené hodnoty pro sestavení kalibrační křivky jsou uvedeny v tabulce 3.4. Z hodnot absorbancí byla následně sestavena kalibrační křivka, hodnotami byla proložena přímka a vynesena rovnice regrese, ze které byla následně spočítána koncentrace celkových proteinů ve vzorcích. Graf kalibrační křivky je znázorněn na obrázku 3.3.

Tabulka 3.4: Naměřené absorbance pro sestavení kalibrační křivky

Koncentrace v $\mu\text{g/ml}$	Absorbance
0	0
1	0,0985
2	0,1535
4	0,19
6	0,3315
8	0,4135
10	0,4775
12	0,519
14	0,6235
16	0,6455
18	0,7045
20	0,7195
25	0,821
30	0,8345



Obrázek 3.3 Graf kalibrační křivky pro stanovení celkových proteinů (autor)

Vzorky:

Ze všech medií byly odebrány 2 ml vzorku v duplikátu. Vzorky byly stočeny v centrifuze při 13400 RPM a byly odebrány supernatanty, které sloužily jako vzorky pro měření celkových proteinů. Byly zředěny destilovanou vodou 10x.

Každý ředěný vzorek byl promíchán a bylo z něj odebráno 300 μ l do 5 ml zkumavky. Bylo přidáno 900 μ l destilované vody a 1800 μ l Bradfordova činidla. Takto připravený vzorek byl promíchán a inkubován 3 minuty při pokojové teplotě. Poté byla měřena absorbance ve 3 ml skleněné kyvetě na spektrofotometru při vlnové délce 595 nm. Konečné ředění vzorku bylo 100x.

3.3.2 Aktivita pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie

Příprava vzorků pro HPLC:

Ze všech medií byl sterilně odebrán 1 ml a stočen v centrifuze při 13400 RPM. Po stočení byl supernatant odebrán do zkumavky a použit pro měření enzymatické aktivity.

UP

Použité chemikálie a roztoky:

- 40 mM uridine (substrát)

97,7 mg uridinu rozpustit v 10 ml destilované vody

- Reakční pufr 200 mM K_2HPO_4

3,48 g K₂HPO₄ rozpustit v 80 ml destilované vody, pravit pH na 7,5 pomocí H₃PO₄ a doplnit destilovanou vodou na finální objem 100 ml

Assay:

Do 2 ml mikrozkušavky bylo napipetováno 500 µl 40 mM roztoku uridinu a 500 µl 200 mM roztoku K₂HPO₄ a promícháno na vortexu. K reakční směsi bylo přidáno 10 µl vzorku supernatantu a opět promícháno na vortexu. Vzorky byly inkubovány v termobloku při teplotě 60 ° a 1400 RPM a byly odebírány po 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 a 90 minutách.

Odebíráno bylo v každém čase 100 µl z inkubovaného vzorku do 1,5 ml mikrozkušavky, která obsahovala 400 µl methanolu pro zastavení reakce. Po ukončení odběrů všech vzorků byly vzorky stočeny při 13400 RPM, ze stočeného vzorku bylo odebráno 400 µl do skleněné vialky a analyzováno na HPLC. Podmínky analýzy pro UP jsou uvedeny v tabulce 3.5.

Tabulka 3.5 Podmínky HPLC analýzy pro UP (autor)

Chromatograf	Shimadzu Nexera
Kolona	YMC Triart C18, 250 x 4,6 mm 5 µm
Mobilní fáze	MP A – H ₃ PO ₄ pH 3,2; MP B – ACN 0–3 min: 96% MP A 3–8 min: 96–85% MP A 8–15 min: 96% MP A
Vlnová délka	264 nm
Detektor	UV/VIS
Průtok	1 ml/min
Celkový čas analýzy	15 minut
Retenční časy	uridin 6 minut uracil 4,5 minut
Injekční objem	1 µl
Gradientová eluce	

Výsledkem byla odečtená plocha peaku z každého času odběru, která byla pomocí vzorce

$$\frac{\text{plocha peaku uridinu}}{\text{plocha standardu}} [mg \cdot ml^{-1}] \quad \text{Rovnice 3.1}$$

přepočtena na jednotky mg/ml. Tato hodnota byla dále dělena molární hmotností uridinu a násobena 1000000, výsledek byl v jednotkách mM/ml. Aktivita enzymu byla stanovena dle vzorce

$$\frac{(mM/ml \text{ v čase 5 minut} - mM/ml \text{ v čase 60 minut})}{60} \quad \text{Rovnice 3.2}$$

a výsledek byl v jednotkách mM/min/ml.

PNP

Použité chemikálie a roztoky:

- 40 mM inosine (substrát)

107,3 mg inosinu rozpustit v 10 ml destilované vody

- Reakční pufr 200 mM K_2HPO_4

3,48 g K_2HPO_4 rozpustit v 80 ml destilované vody, pravit pH na 7,5 pomocí H_3PO_4 a doplnit destilovanou vodou na finální objem 100 ml

Assay:

Do 2 ml mikrozkušavky bylo napipetováno 500 μ l 40 mM roztoku Uridinu a 500 μ l 200 mM roztoku K_2HPO_4 a promícháno na vortexu. K reakční směsi bylo přidáno 10 μ l vzorku supernatantu a opět promícháno na vortexu. Vzorky byly inkubovány v termobloku při teplotě 55 ° a 1400 RPM a byly odebírány po 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 a 90 minutách.

Odebíráno bylo v každém čase 100 μ l z inkubovaného vzorku do 1,5 ml mikrozkušavky, která obsahovala 400 μ l methanolu pro zastavení reakce. Po ukončení odběrů všech vzorků byly vzorky stočeny při 13400 RPM, ze stočeného vzorku bylo odebráno 400 μ l do skleněné vialky a analyzováno na HPLC. Podmínky analýzy pro PNP jsou uvedeny v tabulce 3.6.

Tabulka 3.6 Podmínky HPLC analýzy pro PNP (autor)

Chromatograf	Shimadzu Nexera
Kolona	YMC Triart C18, 250 x 4,6 mm 5 μ m
Mobilní fáze	MP A – H_3PO_4 pH 3,2; MP B – ACN 0–3 min: 96% MP A 3–8 min: 96 – 85% MP A 8–15 min: 96% MP A
Vlnová délka	264 nm
Detektor	UV/VIS
Průtok	1 ml/min
Celkový čas analýzy	15 minut
Retenční časy	inosin 9 minut hypoxantin 5,5 minut
Injekční objem	1 μ l
Gradientová eluce	

Výsledkem byla odečtená plocha peaku z každého času odběru, která byla pomocí vzorce

$$\frac{\text{plocha peaku inosinu}}{\text{plocha standardu}} [\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}] \quad \text{Rovnice 3.3}$$

přepočtena na jednotky mg/ml. Tato hodnota byla dále dělena molární hmotností inosinu a násobena 1000000, výsledek byl v jednotkách mM/ml. Aktivita enzymu byla stanovena dle vzorce

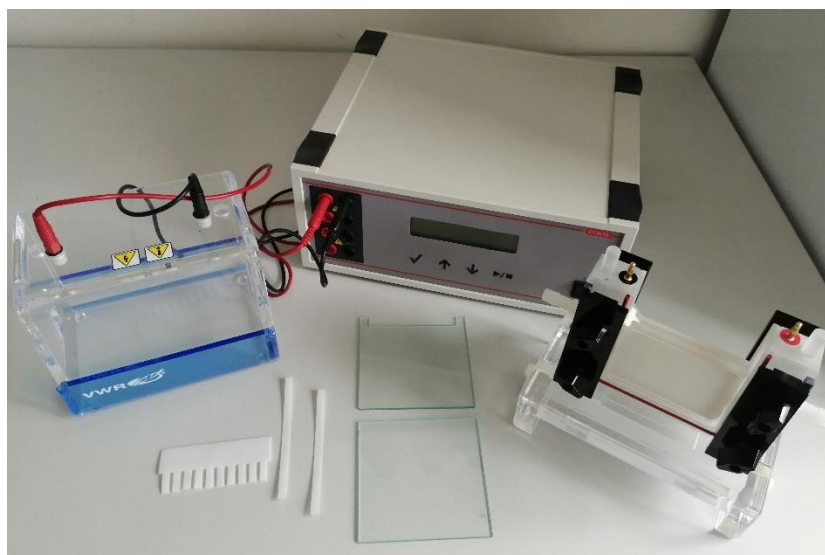
$$\frac{(\text{mM/ml v čase 5 minut} - \text{mM/ml v čase 60 minut})}{60} \quad \text{Rovnice 3.4}$$

a výsledek byl v jednotkách mM/min/ml.

3.3.3 SDS-PAGE

Příprava SDS-polyakrylamidového gelu

Přístrojové vybavení



Obrázek 3.4 Souprava pro vertikální elektroforézu VWR Perfect Blue Twin S, zdroj Consort EV3610 (autor)

Použité chemikálie a roztoky

- destilovaná voda
- roztok akrylamid-bisakryl amid (30%), Mix 37,5:1 (PanReac AppliChem)
- stacking gel buffer (pufr pro zaostřovací gel)

500 mM TRIS-HCl pH 6,8 s 0,4 % SDS

na 100 ml pufru - 6 g TRIS (VWR) rozpustit v 80 ml destilované vody, upravit pH pomocí 35% HCl na 6,8, přidat a rozpustit 400 mg dodecylsulfátu sodného (SDS) a doplnit destilovanou vodou do 100 ml

- separating gel buffer (pufr pro dělicí gel)

1500 mM TRIS-HCl pH 8,8 s 0,4 % SDS

na 100 ml pufru – 18,2 g TRIS (VWR) rozpustit v 80 ml destilované vody, upravit pH pomocí 35% HCl na 8,8, přidat a rozpustit 400 mg dodecylsulfátu sodného (SDS) a doplnit destilovanou vodou do 100 ml

- 10% roztok APS (persíran amonný, VWR)

100 mg APS, 900 µl destilované vody

- TEMED – tetramethylethyldiamine (VWR)
- elektrodový pufr

na 1000 ml pufru – 30,3 g TRIS (VWR), 144 g glycin (VWR), 10 g SDS (VWR), rozmíchat v 600 ml destilované vody, poté doplnit destilovanou vodou do 1000 ml; elektrodový pufr před použitím ředit 10x (1:9) destilovanou vodou

- 2-propanol (VWR)

Příprava gelů:

Jeden finální gel je přibližně 10 x 10 cm velký, tloušťky 1 mm.

Tabulka 3.7 12% dělicí gel (autor)

Destilovaná voda	6,6 ml
30% roztok akrylamidu	8,43 ml
Separating gel buffer	5,76 ml
Persíran amonný (APS)	210 µl
TEMED	8,4 µl
Celkový objem 21,0084 ml – pro dva gely	

Tabulka 3.8 5% zaostřovací gel (autor)

Destilovaná voda	3,825 ml
30% roztok akrylamidu	1,050 ml
Stacking gel buffer	645 µl
Persíran amonný (APS)	57 µl
TEMED	5,4 µl
Celkový objem 5,5824 ml – pro dva gely	

Postup:

- 1) Sestavit čisté a suché gelové kazety dle instrukčního manuálu dodaného k elektroforetické soupravě

-
- 2) 12% dělicí gel – do 50 ml kádinky přidávat pomocí pipety jednotlivé chemikálie dle tabulky 3.6, přidání APS a TEMEDu spouští polymeraci
 - 3) Opatrně promíchat a ihned nalévat gel pomocí pipety mezi skla tak, aby se netvořily vzduchové bubliny, kazety naplnit 2 cm pod horní okraj (prostor pro zaostřovací gel)
 - 4) Po nalití obou gelů převrstvit 0,5 ml 2-propanolu (odstranění bublin z povrchu a vyrovnání hladiny gelu), nechat polymerovat 1,5 hodiny
 - 5) Po ukončení polymerace odsát zbytek 2-propanolu pomocí filtračního papíru
 - 6) 5% zaostřovací gel – do 50 ml kádinky přidávat pomocí pipety jednotlivé chemikálie dle tabulky 3.7, opatrně promíchat a ihned nalít na dělicí gel, vložit hřeben pro tvorbu jamek a nechat 15 minut polymerovat
 - 7) Po ukončení polymerace vyjmout hřebeny a jamky promýt 2 – 3x stříčkou s destilovanou vodou
 - 8) Skla vložit i se stojanem do elektroforetické vany a ihned přelít 10x ředěným elektrodotvým pufrům tak, aby byly jamky zcela pod hladinou pufru

Příprava vzorků, nanesení vzorků, vlastní elektroforéza

Použité chemikálie a roztoky

- 2 – mercaptoethanol (VWR)
- 180 mM TRIS-HCl pH 6,8

na 100 ml pufru – 2,18 g TRIS (VWR) rozmíchat v 80 ml destilované vody, upravit pH pomocí 35% HCl na 6,8, doplnit destilovanou vodou do 100 ml

- vzorkový pufr SDS – zásobní

na 90 ml pufru – 20 ml glycerolu (VWR) smíchat s 20 ml destilované vody, přidat 4 g SDS (VWR) a 10 mg Bromphenol blue (VWR), po rozmíchání doplnit do 90 ml 180 mM TRIS-HCl pH 6,8

- vzorkový pufr SDS – pro použití

objem dle objemu vzorku – smíchat 2 – mercaptoethanol (VWR) se zásobním vzorkovým pufrům v poměru 1:9

- peqGOLD Protein Marker I (VWR)

Příprava vzorků:

Vzorky (2 ml) byly odebrány do uzavíratelných 2 ml mikrozkušavek z produkčních medií po 24 h kultivace. Sediment byl oddělen centrifugací při 13400 RPM po dobu

5 minut. Následně bylo z každého vzorku odebráno 50 μ l supernatantu do 1,5 ml plastové mikrozkušavky. Z původní 2 ml mikrozkušavky byl odebrán zbytek supernatantu a uchován pouze sediment.

K 50 μ l supernatantu byl přidán vzorkový pufr (pro použití) v poměru 1:1, tedy 50 μ l. K sedimentu bylo přidáno 200 μ l vzorkového pufru (pro použití). Oboje bylo promícháno pomocí vortexu, sediment tak dlouho, než se zcela rozmíchal v pufru. Vzorky byly umístěny do předem předeřátého termobloku a byly zahřívány na 99 °C po dobu 5 minut. Po zahřátí se vzorky nechaly zchladnout při pokojové teplotě.

Nanesení vzorků, vlastní elektroforéza:

Pomocí mikrostříkačky Hamilton bylo do vzorkovacích jamek nanášeno 5 μ l připravených vzorků. Do první a poslední jamky bylo nanášeno 5 μ l proteinového markeru. Před nanesením každého jednotlivého vzorku byla mikrostříkačka propláchnuta 2x ethanolem, 2x destilovanou vodou a 1x nanášeným vzorkem.

Po nanesení všech vzorků byla elektroforetická vana přiklopena víkem, připojena ke zdroji napětí. Elektroforéza proběhla při 15 mA po dobu přibližně 2 hodin.

Barvení, odbarvení gelu

Použité chemikálie a roztoky

- barvicí roztok Coomassie

na 500 ml roztoku – smíchat 125 ml 96% ethanolu (VWR), 60% kyseliny octové (VWR), 350 ml destilované vody, přidat 1 g Coomassie Brilliant blue R250 (VWR) a míchat 15 minut, poté doplnit destilovanou vodou do 500 ml

- odbarvovací roztok

na 1000 ml roztoku – 250 ml 96% ethanolu (VWR), 100 ml 60% kyseliny octové (VWR) a 650 ml destilované vody

- fixační roztok

na 1000 ml roztoku – 75 ml 60% kyseliny octové (VWR) a 925 ml destilované vody

Po ukončení elektroforézy byl stojan se skly vyndán z elektroforetické vany, skla byla vyjmuta ze stojanu a opatrně oddělena od sebe. Pomocí plastové špachtle byl odříznut zaostřovací gel a dělicí gel byl vložen do plastové vaničky s barvicím roztokem. Vanička s barveným gelem byla ponechána na horizontální stolní třepačce při 50 RPM po dobu 25 minut.

Po uplynutí času byl barvicí roztok slit do nádoby určené na odpad. Gel byl dvakrát promytý odbarvovacím roztokem, po promytí byl přelit odbarvovacím roztokem, vanička byla přiklopena víkem a ponechána opět na horizontální stolní třepačce do druhého dne.

Po úplném odbarvení gelu (odstranění modré barvy Coomassie z pozadí) byl odbarvovací roztok slit a gel byl ponořen do fixačního roztoku.

3.3.4 Stanovení sušiny

Vzorky pro stanovení sušiny byly provedeny v triplicátu. Z produkčních medií byly sterilně odebrány 3x 2 ml do předem zvážených sterilních uzavíratelných plastových zkumavek a byly stočeny v centrifuze při 13400 RPM po dobu 10 minut. Poté byl odstraněn supernatant. Otevřené zkumavky se sedimenty byly vloženy do sušárny a sušeny při 105 °C po dobu 24 hodin. Po uplynutí doby byly zkumavky uzavřeny a po vychladnutí opět zváženy. Hmotnost samotné sušiny byla vypočtena odečtením hmotnosti prázdné zkumavky od hmotnosti zkumavky se sušinou.

3.4 Upscaling do fermentoru

Pro kultivace ve fermentoru (Bench Compact Ferm 2.0, objem 5L, pracovní objem 3L) byly použity oba izoláty produkující enzym UP, resp. PNP. Příprava medií, kultivace i následné zpracování bylo pro oba kmeny totožné. Jako vegetativní medium bylo použito opět medium LB. Vegetativní medium bylo připraveno navážením chemikálií dle tabulky 3.9 do 500 ml Erlenmeyerovy baňky, navážky byly přepočteny na objem media 200 ml. Navážené chemikálie byly rozpuštěny v destilované vodě a pH před sterilizací bylo upraveno na 7,3 pomocí 2M roztoku kyseliny chlorovodíkové a 2M roztoku hydroxidu sodného. Medium bylo sterilizováno v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

Tabulka 3.9: Složení vegetativního media pro fermentor

LB pH 7,3	
Chemikálie	Navážka na 1L
Casein hydrolysate	10 g
NaCl	10 g
Yeast extract	5 g

Jako produkční medium do fermentoru bylo vybráno medium TBG4, tedy medium s přísávkem glukózy po 4 h kultivace, protože dle výsledků z kultivace v Erlenmeyerových baňkách v tomto mediu dosahovala produkce celkových proteinů nejvyšších hodnot. Složení tohoto media je uvedeno v tabulce 3.10.

Tabulka 3.10: Složení produkčního media pro fermentor

TBG4 pH 7,0	
Chemikálie	Navážka na 1L
Yeast extract	24 g
Pancreatic peptone	20 g
Glycerol	4 ml
P-pufr	100 ml
Odpěňovač (polypropylenglykol)	2 ml

Chemikálie byly naváženy přímo do fermentoru a rozpuštěny v destilované vodě do celkového objemu 2,7 litru. Výsledné pH bylo upraveno pomocí 5M NaOH a 2M HCl na hodnotu 7,0. Fermentor byl uzavřen a sterilizován v autoklávu při 121 °C po dobu 25 minut. P-pufr byl připraven zvlášť navážením 37,56 g K_2HPO_4 a 6,93 g KH_2PO_4 a rozpuštěním v destilované vodě do finálního objemu 300 ml a také sterilizován v autoklávu (stejně podmínky jako fermentor).

Dále byl připraven glukózový roztok, který byl do fermentoru přidáván v průběhu kultivace, a to navážením a rozpuštěním 30 g glukózy ve 100 ml destilované vody, po úplném rozpuštění byl objem doplněn do 150 ml.

Po sterilizaci byl fermentor připojen na externí vodní ohřev (Hüber 104A-E) pro udržení kultivační teploty 32 °C, ke kompresoru (Remeza SB4/C), který přes sterilní vzduchový filtr (PTFE 0,22 μ m; VWR) provzdušňuje medium, k motoru pohánějícímu míchadlo a zároveň byl připojen k teplotnímu čidlu.

3.4.1 Inokulace a kultivace vegetativního media

Vegetativní medium bylo sterilně inokulováno z pevného LB media s přísávkem kanamycinu o koncentraci 1 g/l. Do sterilního tekutého LB media o objemu 200 ml byly přidány 2 ml předem připraveného roztoku kanamycinu (finální koncentrace kanamycinu 1 g/l v mediu). Očkovací kličkou byla sterilně odebrána biomasa z pevného media a převedena to tekutého LB media.

Vegetativní medium bylo kultivováno v orbitální třepačce s RPM 250, při teplotě 32 °C po dobu 24 hodin.

3.4.2 Inokulace produkčního media

Před inokulací z vegetativního media byl do fermentoru přidán pomocí peristaltické pumpy sterilní P-pufr, tím byl objem fermentoru doplněn na 3 litry. Poté byl přidán roztok kanamycinu. Ten byl připraven rozpuštěním 300 mg kanamycinu v 15 ml destilované vody. Po dokonalém rozpuštění byl převeden do injekční stříkačky v laminárním boxu, následně byl na stříkačku nasazen sterilní, hydrofilní filtr (polyethersulon, 0,22 µm) a sterilní injekční jehla. Přes gumové septum ošetřené ethanolem byl kanamycin vstříknut do fermentoru. Koncentrace kanamycinu ve fermentoru byla 100 mg/l. Následně byl fermentor inokulován 150 ml vegetativního media. Kultivace začala při 350 RPM a aeraci 4 l/min. Po 1,5 hodině kultivace byly sterilně odebrány 2 ml pro měření OD při 595 nm z důvodu přidání IPTG v koncentraci 0,054 g/l. Po indukci IPTG probíhala kultivace dalších 22 hodin. Otáčky se zvyšovaly z počátečních 350 RPM po 2 hodinách kultivace na 400 RPM, následně po 1 hodině na 500 RPM a dále na 600 RPM (6 hodin kultivace) až do hodnoty 800 RPM (10 hodin kultivace), které takto zůstaly nastaveny až do konce kultivace. Aerace se v průběhu kultivace neměnila. Roztok glukózy byl přidán 4 hodiny po inokulaci fermentoru.



Obrázek 3.5 Kultivace ve fermentoru (autor)

3.4.3 Odběr a zpracování vzorků

Po ukončení kultivace bylo z fermentoru odebráno 2x 2 ml vzorku (duplikát) pro měření celkových proteinů, 2 ml vzorku pro elektroforézu, 3x 2 ml vzorku (triplikát) pro zjištění hmotnosti sušiny a 1 ml vzorku na enzymatickou aktivitu pomocí HPLC. Přípravy vzorků a metody analýz z fermentoru byly naprosto totožné s přípravou a analýzou vzorků z Erlenmeyerových baněk.

4 Výsledky a diskuse

Cílem této diplomové práce byla optimalizace kultivačních podmínek za cílem zvýšení produkce rekombinantních proteinů, které jsou syntetizovány vybranými kmeny *E. coli*. Izoláty bakteriálního kmene byly kultivovány v 6 různých kultivačních mediích.

4.1 Hodnoty pH a OD

Na konci kultivace bylo změřeno pH a optická denzita (OD při 595 nm) všech vzorků. Hodnota pH byla u všech medií na začátku kultivace 7,0. V tabulce 4.1 jsou uvedeny hodnoty pH na konci kultivace, OD při přidání IPTG a OD na konci kultivace.

Tabulka 4.1 Hodnoty pH a OD

Vzorek	pH (konec kultivace)	OD (přidání IPTG)	OD (konec kultivace)
TB	7,28	0,598	2,833
TBG	7,46	0,578	2,760
TBG4	7,20	0,759	2,834
MSM	6,64	0,502	1,652
CAA	7,35	0,570	2,231
TRY	7,30	0,683	2,556

Optická denzita byla měřena pro odhad koncentrace buněk ve vzorku. Měření se provádí za předpokladu, že získaná hodnota OD je úměrná koncentraci bakterií v kapalné kultuře (Caldwell, 1995).

Z tabulky 4.1 je zřejmé, že k nejvýraznějšímu poklesu pH došlo v případě media MSM (na hodnotu 6,64). Naopak u všech ostatních kultivačních medií došlo k nárůstu pH (nejvyšší u media TBG), což lze vysvětlit přidavkem pH stabilizujícího fosfátového pufru po parní sterilizaci kultivačních medií. Fosfát přidaný touto cestou udržuje pH během kultivace v optimálním rozmezí 7–8, což je dle Wanga et al. (2014) nejvhodnější pro kultivaci rekombinantních kmenů *E. coli* za účelem produkce rekombinantních proteinů. Optická denzita pak souvisí s množstvím buněk ve sledovaném vzorku. Dle Thakura et al. (2010) se OD buněk po kultivaci v minerálním mediu pohybuje mezi 1,5–1,9. Carbonell et al. (2002) pro nutričně bohaté medium udává OD 2,35 a 3,85. Sezonov et al. (2007) zmiňuje, že přidavek glukózy na finální koncentraci 0,4 % může v případě nutričně vyčerpaného media zvýšit OD na 2,0.

Změřené hodnoty odpovídají neřaděným vzorkům, proto je nutné je interpretovat jako relativní. Z toho hlediska byla nejnižší OD u media MSM, nejvyšší naopak u TBG4, což odpovídá i výsledkům stanovení biomasy (sušiny) – viz kapitola 4.5.

4.2 Stanovení koncentrace proteinů dle Bradfordové

Pro stanovení celkových proteinů byla měřena absorbance vzorků na spektrofotometru při 595 nm. Vzorky (2 ml) byly stočeny v centrifuze při 13400 RPM. Pro měření celkových proteinů byly použity pouze supernatanty z medií. Vzorky byly 100x ředěny a měřeny v duplikátu. Z těchto hodnot byla vypočtena průměrná absorbance. Pro výpočet koncentrace celkových proteinů byla použita rovnice $x = \frac{y-0,1241}{0,0289}$, která odpovídá grafu kalibrační křivky v kapitole 3.3.1, kde za y byla dosazena průměrná absorbance z obou měření. Výsledné hodnoty koncentrací celkových proteinů jsou v jednotkách g/l a jsou shrnuty v tabulce 4.2 pro kmen PNP a v tabulce 4.3 pro kmen UP.

Tabulka 4.2: Výsledné hodnoty měření celkových proteinů pro kmen PNP

Vzorek	ABS 1	ABS 2	Průměr	Výpočet z rovnice	Koncentrace proteinů [g/l]
TB	0,724	0,733	0,729	20,914	2,09
TBG	0,691	0,71	0,701	19,945	1,99
TBG4	0,78	0,785	0,783	22,782	2,28
MSM	0,543	0,61	0,577	15,654	1,57
CAA	0,613	0,617	0,615	16,986	1,70
TRY	0,63	0,655	0,643	17,938	1,79

Tabulka 4.3: Výsledné hodnoty měření celkových proteinů pro kmen UP

Vzorek	ABS 1	ABS 2	Průměr	Výpočet z rovnice	Koncentrace proteinů [g/l]
TB	0,755	0,758	0,757	21,882	2,19
TBG	0,623	0,667	0,645	18,024	1,80
TBG4	0,823	0,798	0,811	23,751	2,38
MSM	0,496	0,573	0,535	14,201	1,42
CAA	0,645	0,671	0,658	18,474	1,85
TRY	0,722	0,739	0,731	20,983	2,10

Z dosažených výsledků je zřejmé, že složení produkčního media má vliv na produkci celkových proteinů v mediu. Z tabulky 4.2 vyplývá, že nejvyšší koncentrace celkových proteinů pro kmen PNP byla zjištěna v mediu TBG4, kde koncentrace dosáhla hodnoty 2,28 g/l. TBG4 bylo medium s přidavkem glukózy o koncentraci 30 g/l, byla přidána po 4 hodinách od inokulace. Stejně tak je tomu v případě kmene UP, kde z tabulky 4.3 je patrné, že v mediu TBG4 s přidavkem glukózy je nejvyšší koncentrace celkových proteinů, a to 2,38 g/l.

Lze tedy uvažovat o pozitivním účinku glukózy na produkci celkových proteinů v produkčním mediu, ovšem za předpokladu, že byla glukóza přidána až po 4 hodinách, a nikoliv ihned na počátku kultivace, jako tomu bylo v mediu TBG, kde byla koncentrace celkových proteinů nižší, a to 1,99 g/l u kmene PNP a 1,80 g/l u kmene UP. Li a Taylor (1994) stanovili rychlost syntézy proteinů během růstu bez glukózy, s glukózou na počátku kultivace a s přísunem glukózy ve stacionární fázi. Výsledky naznačují, že rychlost syntézy RNA byla zvýšena v přítomnosti glukózy od počátku kultivace, zatímco syntéza rekombinantní mRNA byla zvýšena pouze při dodání glukózy ve stacionární fázi.

Nejnižší produkce byla u obou kmenů stanovena v mediu MSM, u PNP 1,57 g/l a u UP 1,42 g/l, to by mohlo být způsobeno nedostatkem živin v mediu (především uhlíku a nízkou koncentrací dusíku). Buňky *E. coli* rostou větší a rychleji v mediu bohatém na živiny (Weart et al., 2007). Když buňky *E. coli* změni svou velikost, změni také inverzibilně dobu své generace, ale udržují konstantní poměr buněčné hmoty k DNA (Donachie, 1968). Ale replikace DNA není zahájena, dokud buňka nedosáhne vhodné velikosti (Katayama et al., 2010), což naznačuje, že dostupné živiny v mediu ovlivňují kroky, které řídí velikost buněk a rychlost růstu a tím i koncentraci proteinů.

Media TB, TBG a TRY mají podobné koncentrace celkových proteinů. Tato media obsahují mimo jiné kvasinkový extrakt a pepton nebo trypton, o kterých je známo, že poskytují biosyntetické prekurzory, jako jsou vitaminy a aminokyseliny, které podporují expresi proteinů v *E. coli* (Goyal et al., 2009). Kromě toho Matsui et al. (1990) ukázali, že použití tryptonu a kvasinkového extraktu může zvýšit stabilitu plazmidu.

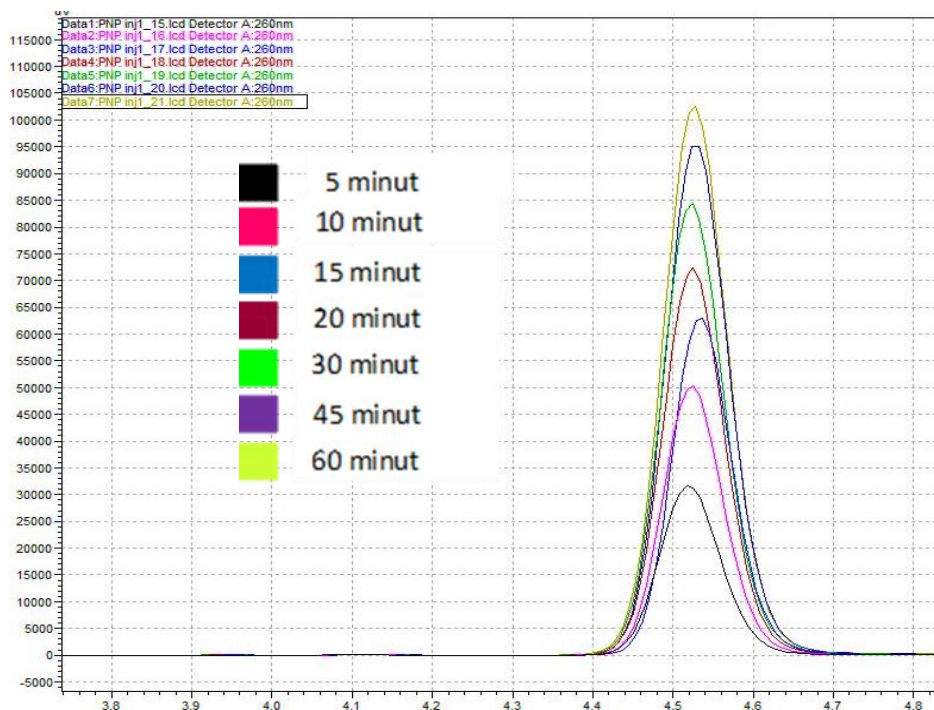
Velká většina zdrojů uvádí pouze koncentrace proteinů měřených z buněčného lyzátu, tedy intracelulární proteiny po úpravě buněčné biomasy. Ali a Hamza (2012) uvádějí koncentraci v buněčném homogenátu *E. coli* 0,82 g/l. Celkové množství proteinů udává Kangwa et al. (2015) pro medium TB na úrovni 3,02 g/l, pro minimální medium (M9, obdoba MSM) pak 1,4 g/l, což odpovídá zjištěným výsledkům.

4.3 Aktivita enzymu pomocí HPLC

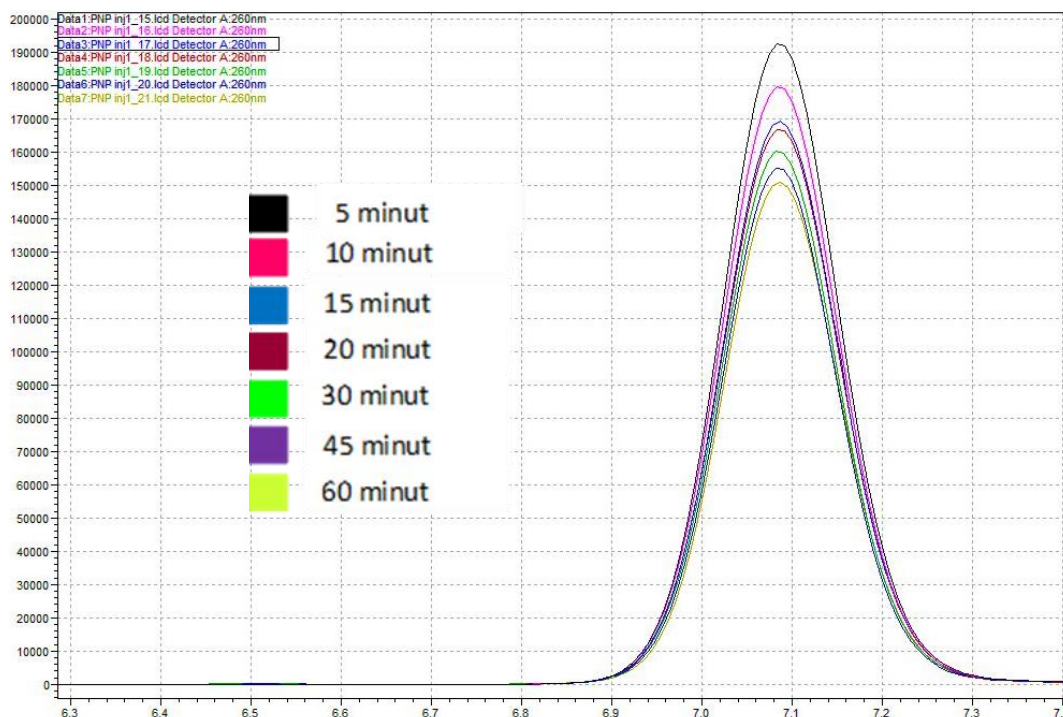
Enzymatická aktivita byla měřena pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Aktivita UP byla vypočtena dle rovnic 3.1 a 3.2 v kapitole 3.3.2, PNP dle rovnic 3.3 a 3.4 v též kapitole. V tabulce 4.4 je uvedena výsledná aktivita obou enzymů v jednotlivých mediích v jednotkách mM/min/ml a přepočtena na relativní enzymatickou aktivitu, která je uvedena v jednotkách $\mu\text{M}/\text{min}/\text{ml}$ (stejná koncentrace proteinu vstupujícího do reakce). Kompletní hodnoty měření jednotlivých časů odběrů jsou uvedeny v příloze 1.

Tabulka 4.4 Enzymatická aktivita UP a PNP v různých mediích

Medium	UP		PNP	
	absolutní aktivita [mM/min/ml]	relativní aktivita [$\mu\text{M}/\text{min}/\text{ml}$]	absolutní aktivita [mM/min/ml]	relativní aktivita [$\mu\text{M}/\text{min}/\text{ml}$]
TB	0,03248	14,83105	0,02068	9,89474
TBG	0,03128	17,37778	0,02020	10,15075
TBG4	0,02820	11,84874	0,02133	9,35526
MSM	0,00098	0,69014	0,00407	2,59236
CAA	0,02836	15,32973	0,01732	10,18824
TRY	0,02404	11,44762	0,02664	14,88268



Obrázek 4.1 Demonstrační obrázek peaků z jednoho měření na HPLC, enzym PNP v mediu TBG4-růst hypoxantinu v čase (autor)



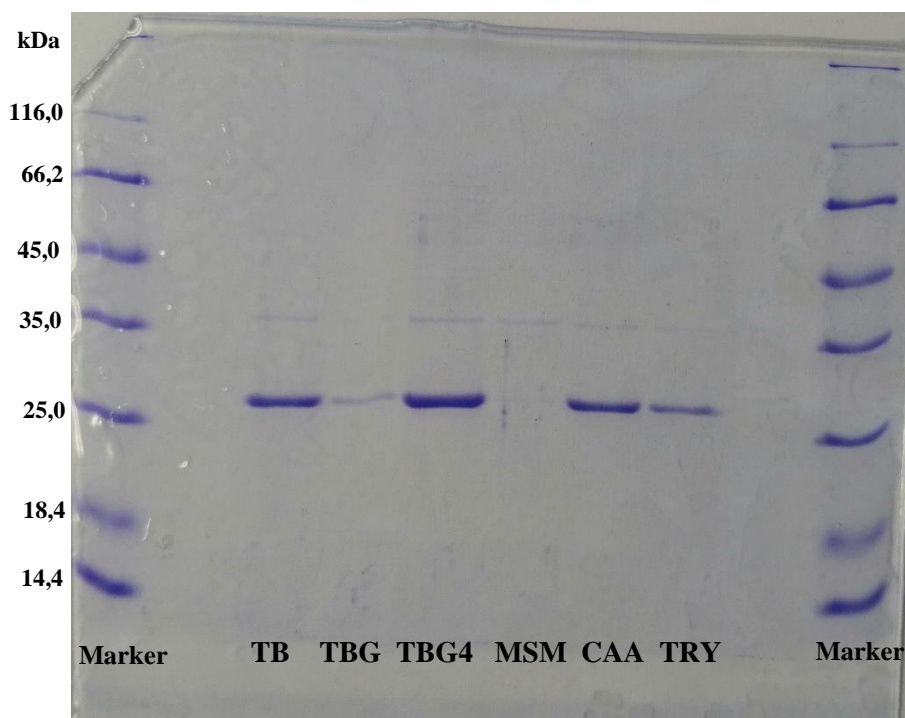
Obrázek 4.2 Demonstrační obrázek peaků z jednoho měření na HPLC, enzym PNP v mediu TBG4-úbytek inosinu v čase (autor)

Z tabulky 4.4 vyplývá, že enzymatická aktivita UP je nejvyšší v mediu TB, zatímco u PNP je nejvyšší aktivita v mediu TRY. Nejnižší aktivita je pro oba enzymy shodná v medium MSM. V literatuře je nejčastěji enzymatická aktivita uváděna v U/mg. U je jednotka enzymové aktivity, která katalyzuje přeměnu 1 μmol substrátu do produktu za 1 minutu. Komissarov et al. (1994) uvádí aktivitu enzymu UP izolovaného z *E. coli* K12 100 – 120 U/mg při 25 °C. Leer et al. (1976) uvedl aktivitu UP 183 U/mg, Drabikowska et al. (1987) dokonce 250 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, ovšem při 37 °C. Pro PNP uvádí Liu et al. (2019) aktivitu při 55 °C 83 U/mg. Specifickou aktivitu 257 U/mg uvedl Cook et al. (1985).

Přestože aktivita enzymů UP a PNP v mediu TBG4 nedosahovala nejvyšších hodnot, bylo toto medium vybráno pro upscaling do fermentoru. Důvodem je, že primárním cílem je produkce rekombinantních proteinů, jejichž koncentrace byla nejvyšší právě v tomto mediu. Enzymatická aktivita sloužila k ověření funkčnosti enzymu.

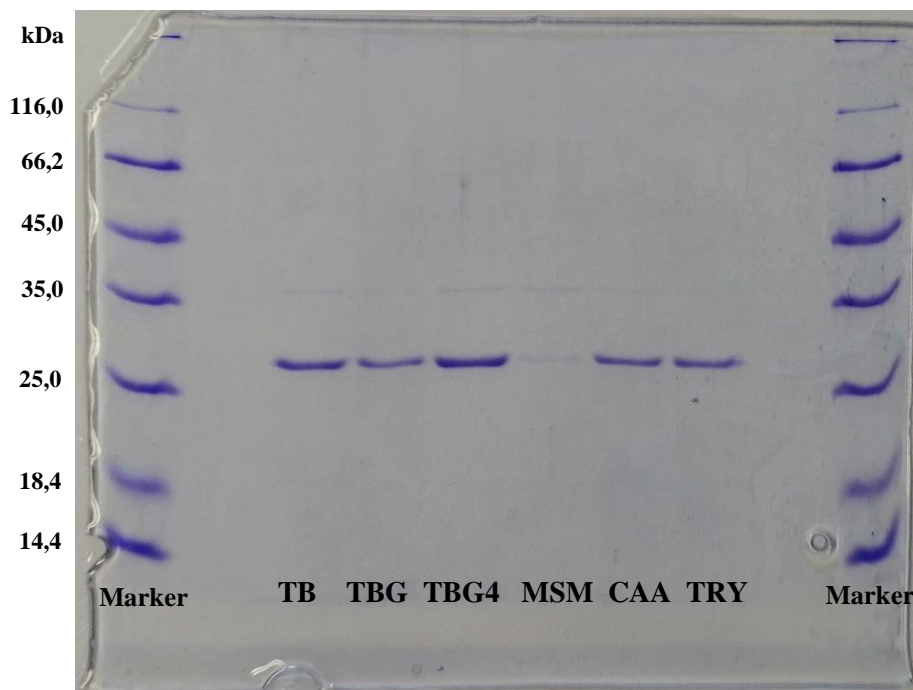
4.4 SDS-PAGE

Pro detekci získaného rekombinantního proteinu byla použita elektroforéza na polyakrylamidovém gelu s SDS (SDS-Page). Výsledky z elektroforézy PNP jsou na obrázku 4.3, UP na obrázku 4.4.



Obrázek 4.3 Odbarvený gel se vzorky z medií kmene s PNP (autor)

Očekávaná velikost PNP byla 25,95 kDa (UniProt, 2023). Z obrázku 4.3 je patrné, že band odpovídá velikosti kolem 26 kDa. Sledovaný enzym byl produkován ve všech kultivačních mediích. Dle síly bandu lze usoudit, že nejvyšší produkce byla v mediu TBG4. Nejnižší v mediu MSM, kde je band téměř neviditelný.



Obrázek 4.4 Odbarvený gel se vzorky z medií kmene s UP (autor)

Očekávaná velikost UP byla 27,16 kDa (UniProt, 2023). Z obrázku 4.4 vyplývá, že enzym UP bakterie produkovaly ve všech kultivačních mediích. Stejně jako u PNP je dle síly bandu nejvyšší produkce enzymu v mediu TBG4, nejnižší v mediu MSM.

Z výše uvedených výsledků vyplývá, že oba testované kmene produkují ve všech zkoušených kultivačních mediích rekombinantní proteiny a zároveň velikost těchto proteinů odpovídá v literatuře popisované velikosti.

4.5 Stanovení sušiny

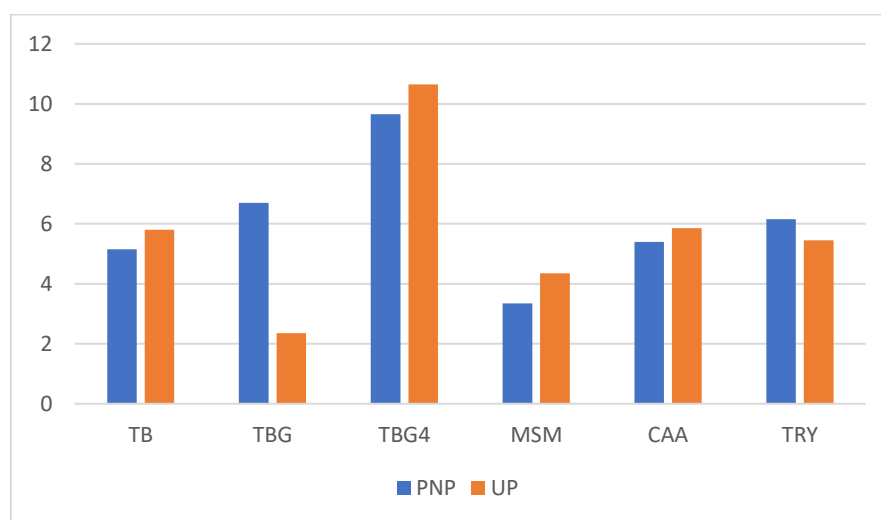
Hmotnost sušiny byla stanovena pro každý vzorek ze 2 ml, vzorky byly odebrány v triplicátu. V tabulce 4.5 jsou shrnuty konečné výsledky pro kmen PNP, v tabulce 4.6 pro kmen UP, porovnání jednotlivých druhů medií je znázorněno na obrázku 4.5. Kompletní data z jednotlivých měření jsou uvedena v příloze 2.

Tabulka 4.5: Přehledová tabulka hmotnosti sušiny pro kmen PNP

Vzorek	\bar{x} [g/l]	s_x	min [g/l]	max [g/l]
TB	2,95	3,34	0,25	7,65
TBG	2,35	1,56	0,35	4,15
TBG4	10,67	1,12	9,75	12,25
MSM	4,38	0,18	4,15	4,6
CAA	5,88	0,74	4,85	6,5
TRY	5,47	0,06	5,4	5,55

Tabulka 4.6: Přehledová tabulka hmotnosti sušiny pro kmen UP

Vzorek	\bar{x} [g/l]	s_x	min [g/l]	max [g/l]
TB	5,15	0,31	4,75	5,5
TBG	6,68	1,95	4,95	9,4
TBG4	9,65	3,17	5,35	12,9
MSM	3,38	0,15	3,25	3,6
CAA	5,42	0,19	5,15	5,6
TRY	6,15	0,23	5,9	6,45



Obrázek 4.5 Graf porovnání sušiny PNP a UP v g/l media (autor)

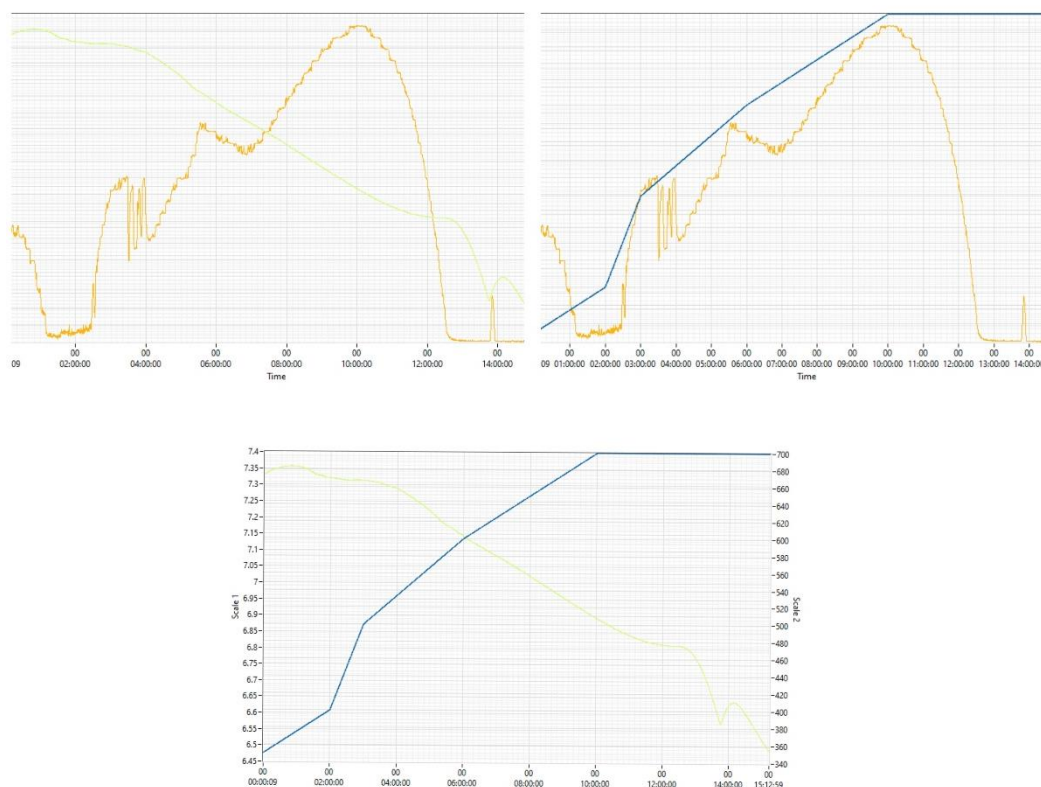
Pro kmen UP i PNP je nejvyšší průměrný výtěžek suché biomasy v mediu TBG4. Pro PNP je 10,67 g/l, pro UP 9,65 g/l. Odhaduje se, že maximální možná hustota kapalné kultury *E. coli* je přibližně 200 g/l hmotnost suchých buněk (Shiloach a Fass, 2005), podle Leeho (1996) se tekutost kultury *E. coli* ztrácí, pokud je hmotnost suchých buněk vyšší než 220 g/l. Märkl et al. (1993) uvedl hustotu suchých buněk 175 g/l, Nakano et al. (1997) dokonce 190 g/l suché biomasy. Překážkou neomezeného růstu bakterií v kapalné kultuře, a tedy i vyšší výtěžek suché biomasy, může být právě složení medií. Tato myšlenka vychází z předpokladu, že bakterie se budou dělit tak dlouho, dokud budou plněny jejich nutriční požadavky a dokud nebudou v průběhu růstu do media vylučovat žádné toxické a inhibiční faktory (Shiloach a Fass, 2005).

Z dosažených výsledků je zřejmé, že hmotnost sušiny je závislá na složení kultačních medií, na dostupnosti jednotlivých živin, a také na kultačních podmínkách. Souhrnně lze říct, že dodávání živin do media, ať už jednorázově nebo kontinuálně,

může uspokojit rostoucí poptávku po zdrojích energie, uhlíku a dusíku v rostoucí kultuře *E. coli*. Jak uvedli Hortsch a Weuster-Botz (2011), nejlepší růst byl pozorován v komplexním mediu, do kterého byla kontinuálně dodávána glukóza, s koncentrací sušiny buněk 14 g/l. Podobné hodnoty pro medium TB zmiňuje Kangwa et al. (2015), a to 14,6 g/l, resp. 7,45 g/l pro minimální medium (obdoba MSM). To je jeden z nejpravděpodobnějších důvodů, proč je právě v mediích TBG4 nejvyšší výtěžek suché biomasy, vzhledem k dodání glukózy v průběhu kultivace. Přesto že sušina dosahuje přibližně 10x nižších hodnot, než je popsáno v literatuře výše, některé práce nezjistily žádný vliv hustoty kultury na koncentraci konečného produktu nebo jeho kvalitu (Ryan et al., 1996; Shin et al., 1997). Jedním z možných důvodů nízkého obsahu biomasy je nedostatečná aerace v průběhu kultivace (McDaniel et al., 1965; Mounsef et al., 2015).

4.6 Upscaling

Pro upscaling ve fermentoru bylo použito medium TBG4. V průběhu kultivace bylo měřeno pH a množství rozpuštěného kyslíku – saturace (DO_2).



Obrázek 4.6 Grafické znázornění změn hodnot pH (zelená), DO_2 (žlutá) a RPM (modrá) v průběhu kultivace ve fermentoru (autor)

Na počátku kultivace bylo pH media ve fermentoru 7,0. V průběhu kultivace pH klesá až k hodnotám kolem 6,5. To může být způsobeno zvýšenou tvorbou acetátu při nadbytku glukózy (30 g/l). Jak uvádí Philip et al. (2018), s rostoucí akumulací acetátu je překročena kapacita pufru kultivačního media, čímž se pH pohybuje mimo optimální fyziologické rozmezí. Z průběhu saturace je pak patrné, že s rostoucími otáčkami míchadla docházelo i ke zvyšování saturace. Po dosažení maximálních otáček (800 RPM) dosáhla saturace maximální hodnoty, která s dalším růstem buněk začala klesat a nulové hodnoty dosáhla po přibližně 13 hodinách. Za anaerobních podmínek a za nepřítomnosti jakýchkoli jiných exogenních respiračních akceptorů elektronů bakterie *E. coli* provádí smíšenou kyselou fermentaci glukózy (Pinske a Sawers, 2016). Ta vede k tvorbě organických kyselin, především acetátu (Neidhardt et al., 1990; Hayes et al., 2006; Kram a Finkel, 2015). To by mohl být hlavní důvod dalšího okyselení media.

Stanovení celkových proteinů dle Bradfordové

Pro stanovení celkových proteinů u kmene s UP i s PNP byla měřena absorbance vzorků na spektrofotometru při 595 nm. Postup byl pro oba enzymy totožný. Odebrané vzorky (2 ml) byly stočeny v centrifuze při 13400 RPM, pro měření celkových proteinů byly použity pouze supernatanty. Vzorky byly 1000x ředěny a byly měřeny v duplikátu. Z těchto naměřených hodnot byla vypočtena průměrná absorbance. Pro výpočet celkových proteinů byla použita rovnice $x = \frac{y-0,1241}{0,0289}$, která vyplývá z obrázku grafu kalibrační křivky v kapitole 3.3.1, která byla použita při výpočtu celkových proteinů v Erlenmeyerových baňkách. Za y byla dosazena průměrná absorbance z obou měření. Výsledné hodnoty koncentrace celkových proteinů jsou shrnuty pro oba enzymy v tabulce 4.7.

Tabulka 4.7 Výsledné hodnoty měření celkových proteinů z fermentoru pro oba enzymy

Enzym	ABS 1	ABS 2	Průměr	Výpočet z rovnice	Výsledná koncentrace v g/l
UP	0,215	0,221	0,218	3,2491	3,25
PNP	0,196	0,200	0,198	2,5571	2,56

Z výsledků uvedených v tabulce 4.7 je patrné, že koncentrace celkových proteinů pro UP i PNP je vyšší než při kultivaci v baňkách. To by mohlo být důsledkem vyššího provzdušňování media či kontrolovatelnými změnami hodnot pH. Jelikož primární

metabolismus *E. coli* rychle reaguje na omezení kyslíku, změny pH a koncentrace acétátu (Ponce, 1999), které brání růstovým podmínkám. To vysvětluje rozdílné hodnoty mezi koncentracemi získanými při kultivaci v bioreaktorech ve srovnání s kultivací v třepacích baňkách (Aristidou et al., 1999), protože v baňkách je omezený přísun kyslíku a buňky nerostou do tak vysoké hustoty, jako při dostatečné aeraci. Společně s aerací působí i dosažení vyšších otáček ve fermentoru. Frekvence třepání usnadňuje čtyřnásobné zvýšení maximální kapacity přenosu kyslíku (Maier et al., 2004).

Aktivita enzymu pomocí HPLC

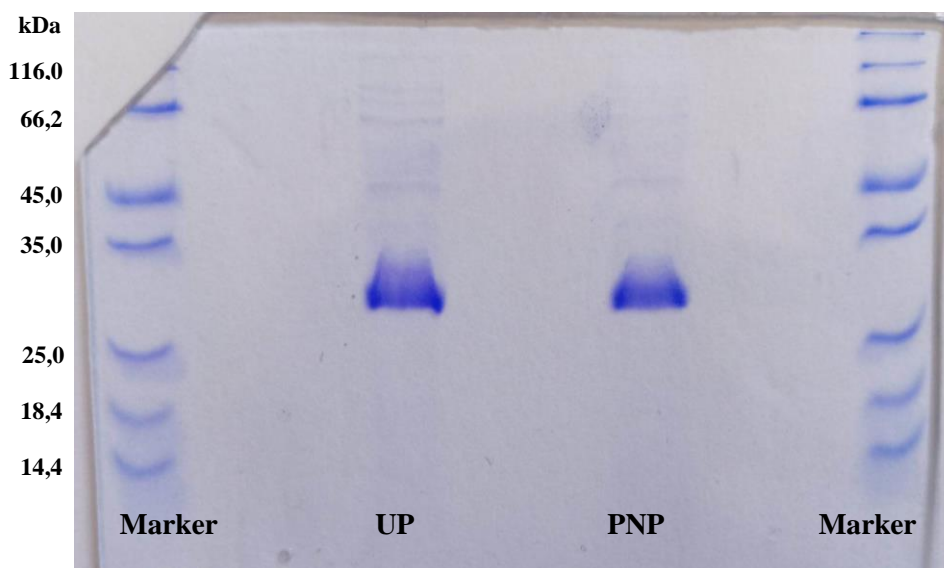
Enzymatická aktivita byla měřena pomocí HPLC. Aktivita UP byla vypočtena dle rovnic 3.1 a 3.2 a PNP dle rovnic 3.3 a 3.4 v kapitole 3.3.2. V tabulce 4.8 je uvedena výsledná aktivita obou enzymů v mediu TBG4 v jednotkách mM/min/ml a přepočtena na relativní enzymatickou aktivitu v jednotkách $\mu\text{M}/\text{min}/\text{ml}$ (stejná koncentrace proteinu vstupujícího do reakce).

Tabulka 4.8 Enzymatická aktivita UP a PNP ve fermentoru

Medium	UP		PNP	
	absolutní aktivita [mM/min/ml]	relativní aktivita [$\mu\text{M}/\text{min}/\text{ml}$]	absolutní aktivita [mM/min/ml]	relativní aktivita [$\mu\text{M}/\text{min}/\text{ml}$]
TBG4	0,039177	12,0578	0,027327	10,6867

Z tabulky 4.8 je zřejmé, že relativní aktivita enzymu UP i PNP při kultivaci ve fermentoru je vyšší než při kultivaci v Erlenmeyerových baňkách v též mediu. Přesto enzymatická aktivita v mediu TBG4 nedosáhla takových hodnot, jako je tomu u media TBG či CAA u enzymu UP nebo u media TRY v případě enzymu PNP. Toto měření sloužilo k ověření funkčnosti enzymu a primární bylo dosažení nejvyšší produkce biomasy a koncentrace proteinů.

SDS-PAGE



Obrázek 4.7 Odbarvený gel se vzorky z fermentoru (autor)

Z obrázku 4.7 je zřejmé, že oba testované kmeny produkují rekombinantní proteiny v očekávané velikosti UP 27,16 kDa a PNP 25,95 kDa dle databáze UniProt (2023). Dle síly bandu lze usoudit, že rekombinantní proteiny jsou produkovány v mnohem větší míře, než je tomu při kultivaci v Erlenmeyerových baňkách.

Stanovení sušiny

Sušina byla stanovena pro oba enzymy v triplicátu. V tabulce 4.9 jsou shrnuty výsledky pro enzym UP i PNP v mediu TBG4.

Tabulka 4.9 Hmotnosti sušiny pro oba kmeny v g/l media

Kmen	\bar{x} [g/l]	s_x	min [g/l]	max [g/l]
UP	20,70	3,82	15,35	24,00
PNP	21,87	2,61	18,3	24,45

Hmotnost sušiny pro kmen UP je 20,7 g/l, pro PNP 21,87 g/l. U obou enzymů dosahuje hmotnost sušiny téměř dvojnásobek oproti výsledkům z kultivace v baňkách. Za tím by mohly stát kultivační podmínky, a to rychlost otáček a především vyšší aerace ve fermentoru. Provdzušňování poskytuje více kyslíku pro napájení metabolismu a může vést k rychlejšímu tempu růstu. Ng (2018) uvádí, že vyšší aerace dostupná ve fermentoru.

toru zlepšila tvorbu biomasy v *E. coli* během růstu ve srovnání s 250 ml Erlenmeyero-
vou baňkou s vatovou zátkou. Vyšší úroveň aerace v průběhu fermentace v bioreak-
toru zároveň vede k vyšší stabilitě rekombinantních enzymů, vyšší specifické aktivitě
enzymů, ale i lepšímu růstu biomasy. Dle Othmana et al. (2012) množství vzduchu
uvnitř bioreaktoru přímo ovlivňuje množství biomasy *E. coli* – při vzdušnění 2 v/v/min
(objem vzduchu/objem media ve fermentoru) je přibližně 3,4 g/l, při 3 v/v/min pak 3,8
g/l.

Závěr

Bakterie *Escherichia coli* je jednou z nejvíce používaných bakterií při výrobě rekombinantních proteinů. Právě kultivace bakteriálních kmenů *E. coli*, které produkují rekombinantní proteiny, a optimalizace kultivačních podmínek je náplní této diplomové práce. Byla ověřena produkce rekombinantních proteinů bakteriálního kmene *E. coli* v několika kultivačních mediích, která se lišila složením a dostupností živin.

V rámci této diplomové práce bylo dosaženo všech cílů. Byla ověřena kultivace v různých kultivačních mediích a vliv dodaných živin (prvků) na produkci rekombinantních proteinů. Byla ověřena možnost fed-batch kultivace s přidavkem monosacharidu glukózy. Při kultivaci v Erlenmeyerových baňkách byl vyhodnocen vliv kultivačního media na produkci rekombinantních proteinů. Jako optimální medium bylo stanoveno medium TBG4 (medium s glukózou přidanou po 4 hodinách), které převyšuje hodnoty ostatních medií, a to jak v hmotnosti sušiny, tak v celkové koncentraci proteinů i v produkci sledovaného rekombinantního proteinu pro oba kmeny, UP i PNP. Aktivita enzymů UP a PNP nedosáhla v tomto mediu nejvyšších hodnot, ale primárním parametrem byla koncentrace a produkce rekombinantního proteinu. Proto bylo toto medium vybráno pro upscaling do fermentoru.

První hypotézu, že kultivační podmínky ovlivňují rychlost růstu sledovaných kmenů *E. coli* a že tato rychlost je přímo závislá na formě zdrojů základních živin (C, N, P), lze potvrdit. Při kultivaci v produkčních mediích, která měla jiné složení a lišila se jednak obsahem živin, tak i jejich formou (organický a anorganický dusík) bylo patrné, že nejvyšší nárůst biomasy byl v mediu s přidavkem uhlíku ve formě glukózy, s dusíkem v organické formě. Naopak nejméně rostly v mediu MSM s minimálním zdrojem dusíku (navíc pouze v anorganické formě).

Druhá hypotéza, že kultivační podmínky, konkrétně rychlost míchání, ovlivňují aeraci a tím dochází ke zvýšení rychlosti růstu jednotlivých kmenů, byla potvrzena při kultivaci ve fermentoru. V průběhu 24 hodin kultivace došlo ve fermentoru ke dvojnásobnému nárůstu biomasy oproti kultivaci v Erlenmeyerových baňkách za stejný čas.

Třetí hypotéza, že složení media a podmínky kultivace přímo ovlivňují množství rekombinantního proteinu, je pravdivá, a to na základě výsledků z SDS-PAGE a zároveň z množství celkových proteinů stanovených dle Bradfordové.

Vhodnější kultivační podmínky a složení kultivačního media vede k vyšší koncentraci rekombinantních proteinů.

V otázkách optimalizace kultivačních podmínek stále zůstává prostor pro další výzkum. Konkrétně testovat další produkční media s jinými zdroji dusíku a uhlíku. Spolu s nimi využít větších a lépe kontrolovatelných bioreaktorů, které umožňují lepší provzdušňování media (ať už lepší kontrolou otáček míchadla anebo udržením přetlaku uvnitř fermentační nádoby a tím zvýšení saturace O₂ v kultivačním mediu), lepší možnosti dávkování dusíkatých nebo uhlíkových zdrojů živin v reakci na změnu pH během kultivace. Všechny tyto možnosti mohou být studovány v další vědecké práci.

Seznam použité literatury

- Ali, A. a Hamza, N., 2012.** Purification and characterisation of alkaline phosphatase enzyme from the periplasmic space of *Escherichia coli* C90 using different methods. 2012
- Allen, M. E., 2005.** MacConkey agar plates protocols, American Society for Microbiology © 2016.
- Ammar, E. et al., 2018.** Regulation of metabolism in *Escherichia coli* during growth on mixtures of the non-glucose sugars: Arabinose, lactose, and xylose. *Scientific Reports*, 2018.
- Ananthanarayan, R. a Paniker, C. K. J., 2006.** *Ananthanarayan and Paniker's textbook of microbiology 7th edition*, Orient Longman, 657 pages, ISBN: 8125028080, 9788125028086.
- Aristidou, A. A. et al., 1999.** Improvement of biomass yield and recombinant gene expression in *Escherichia coli* by using fructose as the primary carbon source. *Biotechnology Progress*. 1999, 15, 140-5.
- Armstrong, N. et al., 1999.** A new protein folding screen: application to the ligand binding domains of a glutamate and kainate receptor and to lysozyme and carbonic anhydrase. *Protein Science*. 1999, 8, 1475-1483.
- Aslanidis, C. a de Jong, P. J., 1990.** Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). *Nucleic Acids Research*. 1990, 18, 6069-6074.
- Baek, J. H. a Lee, S. Y., 2006.** Novel gene members in the Pho regulon of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology letters*. 2006, 264, 104-109.
- Baneyx, F. a Mujacic, M., 2004.** Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*. 2004, 22, 1399-1408.
- Basan, M. et al., 2015.** Overflow metabolism in *Escherichia coli* results from efficient proteome allocation. *Nature*. 2015, 528, 99-104.
- Barthová, J. et al., 1980.** Základní praktikum z biochemie. Praha: Univerzita Karlova. 1980.
- Bauer, S. a Ziv, E., 1976.** Dense growth of aerobic bacteria in a bench-scale fermentor. *Biotechnology and Bioengineering*. 1976, 18, 81-94.
- Bentley, R. a Meganathan, R., 1982.** Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria. *Microbiological Reviews*. 1982, 46 (3), 241-80.

-
- Bentley, W. E. et al., 1990.** Plasmid-encoded protein: the principal factor in the „metabolic burden“ associated with recombinant bacteria. *Biotechnology and Bioengineering*. 1990, 35, 668-681.
- Bélanger, J. M. R. et al., 1997.** High performance liquid chromatography (HPLC): Principles and applications. *Instrumental methods in food analysis*. 1997, 37-59.
- Bhattacharya, S. K. a Dubey, A. K., 1995.** Metabolic burden as reflected by maintenance coefficient of recombinant *Escherichia coli* overexpressing target gene. *Biotechnology Letters*. 1995, 17, 1155-1160.
- Billen, B. et al., 2017.** Cytoplasmic versus periplasmic expression of site-specifically and bioorthogonally functionalized nanobodies using expressed protein ligation. *Protein Expression and Purification*. 2017, 133, 25-34.
- Blommel, P. G. et al., 2007.** Enhanced bacterial protein expression during auto-induction obtained by alternation of lac repressor dosage and medium composition. *Biotechnology Progress*. 2007, 23, 585-598.
- Bradford, M. M., 1976.** "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Analytical Biochemistry*. 72 (1-2): 248-254.
- Broeze, R. J. et al., 1978.** Effects of low temperature on in vivo and in vitro protein synthesis in *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Bacteriology*. 1978, 134, 861-874.
- Buchnes, J. et al., 1992.** A method for increasing the yield of properly folded recombinant fusion proteins: single-chain immunotoxins from renaturation of bacterial inclusion bodies. *Analytical Biochemistry*. 1992, 205, 263-270.
- Buxton, R. S. et al., 1980.** A second purine nucleoside phosphorylase in *Escherichia coli* K-12. I. Xanthosine phosphorylase regulatory mutants isolated as secondary-site revertants of a deoD mutant. *Molecular Genetics and Genomics*. 1980. 179, 331-340.
- Caldwell, D. R., 1995.** Microbial physiology and metabolism. *Wm. C. Brown Publishers*. 1995, 55-59.
- Carbonell, X. et al., 2002.** Control of *Escherichia coli* growth rate through cell density. *Microbiological Research*. 2002, 157, 4, 257-265.
- Carson, M. et al., 2007.** His-tag impact on structure. *Acta Crystallographica*. 2007, 63, 295-301.
- Celie, P. H. et al., 2016.** Recombinant cloning strategies for protein expression. *Current Opinion in Structural Biology*. 2016, 38, 145-154.
-

-
- Clarke, R. T. J. a Bauchop, T., 1977.** Microbial ecology of the gut. Academic Press, London, 1977.
- Compton, S. J. a Jones, C. G., 1985.** Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Analytical Biochemistry*. 1985, 151 (2), 369-74.
- Cook, W. J. et al., 1985.** Crystallization and preliminary x-ray investigation of purine-nucleoside phosphorylase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*. 1985, 260, 24, 12968-9.
- Davey, K.R., 1994.** Modelling the combined effect of temperature and pH on the rate coefficient for bacterial growth. *International Journal of Food Microbiology*. 1994, 23, 295–303.
- Diederichs, S. et al., 2014.** Phenotyping the quality of complex medium components by simple online-monitored shake flask experiments. *Microbial Cell Factories*. 2014, 13, 149.
- Donachie, W. D., 1968.** Relationship between cell size and time of initiation of DNA replication. *Nature*. 1968, 219, 1077-1079.
- Doucette, C. D. et al., 2011.** α -Ketoglutarate coordinates carbon and nitrogen utilization via enzyme I inhibition. *Nature Chemical Biology*. 2011, 7, 894-301.
- Drabikowska, A. K. et al., 1987.** Acyclonucleoside analogues consisting of 5- and 5,6-substituted uracils and different acyclic chains: inhibitory properties vs purifies *E. coli* uridine phosphorylase. *Zeitschrift fur Naturforschung – Journal of Biosciences*. 1987, 42, 3, 288-96.
- Edman, P. et al., 1950.** Method for determination of the amino acid sequence in peptides. *Acta Chemica Scandinavica*. 1950, 4, 283-293.
- Eisenberg, R.C. a Dobrogosz, W.J., 1967.** Gluconate metabolism in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 1967, 93:941–9.
- El-Helow, E. R. et al., 2000.** Application of the response surface methodology for optimizing the activity of an aprEdriven gene expression system in *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2000, 54, 515-520.
- Enfors, S. O. a Häggström, L., 2000.** Bioprocess technology fundamentals and applications. Stockholm, Royal Institute of technology, 2000.
- Everette, J. D., et al., 2010.** Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010, 58, 14, 8139-8144.

-
- FDA, 1982.** Human insulin receives FDA approval. *FDA drug bulletin*. 1982, 12, 18-19.
- Feng, P. et al., 2002.** "Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria". *Bacteriological Analytical Manual (8th ed.)*. FDA/Center for Food Safety & Applied Nutrition. Archived from the original on 19 May 2009. Retrieved 25 January 2007.
- Ferrer-Miralles, N. et al., 2014.** General Introduction: Recombinant protein production and purification of insoluble proteins. *Insoluble proteins*. 2014, 1–24.
- Fijan, S., 2014.** Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2014, 11, 4745-4767.
- Flamholz, A. et al., 2013.** Glycolytic strategy as a tradeoff between energy yield and protein cost. *Proceeding of the National Academy of Sciences*. 2013, 110:10039–44.
- Georgiou, G. a Valax, P., 1996.** Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*. 1996, 7, 190-197.
- Gillespie, C., 2022.** "Colony Characteristics of *E.Coli*" *sciencing.com*, <https://sciencing.com/colony-characteristics-ecoli-8507841.html>. 8 March 2022.
- Goemans, C. et al., 2014.** Folding mechanisms of periplasmic proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2014, 1843, 1517-1528.
- Gombert, A. K. a Kilikian, B. V., 1998.** Recombinant gene expression in *Escherichia coli* cultivation using lactose as inducer. *Journal of Biotechnology*. 1998, 60, 47-54.
- Goyal, D. et al., 2009.** Enhanced production of recombinant streptokinase in *Escherichia coli* using fed-batch culture. *Bioresource Technology*. 2009, 100, 4468-4474.
- Görke, B. a Stülke, J., 2008.** Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6, 613–624.
- Greenwood, D. et al., 1999.** *Lékařská mikrobiologie: přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. 1. vyd. Překlad Jiří Schindler. Praha: Grada, 1999, 686 s. ISBN 80-716-9365- 0.
- Hamdan, M. a Righetti, P. G., 2005.** *Proteomics Today: Protein assessment and biomarkers using mass spektrometry, 2D electrophoresis and microarray technology*. John Wiley & Sons. Hoboken, NJ, 2005, 274-240.

-
- Hammarstrom, M. et al., 2002.** Rapid screening for improved solubility of small human proteins produced as fusion proteins in *Escherichia coli*. *Protein Science*. 2002, 11, 313-321.
- Harris, T. K. a Keshwani, M. M., 2009.** Measurement of enzyme activity. *Guide to protein purification*, 2nd edition. 2009, 57-71.
- Hayes, E. T. et al., 2006.** Oxygen limitation modulates pH regulation of catabolism and hydrogenases, multidrug transporters and envelope composition in *Escherichia coli* K-12. *BMC Microbiol.* 2006, 6, 89.
- He, L. et al., 2014.** Central metabolic responses to the overproduction of fatty acids in *Escherichia coli* based on ¹³C-metabolic flux analysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 2014, 111, 575–85.
- Herbert, D. et al., 1965.** The chemostat: design and instrumentation. *Laboratory practise*. 1965, 14, 1150-61.
- Holt, J. G. et al., 1994.** *Bergey`s manual of determinative bacteriology*. 9th ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1994, s. 179-180. ISBN 0683006037.
- Hortsch, R. a Weuster-Botz, D., 2011.** Growth and recombinant protein expression with *Escherichia coli* in different batch cultivation media. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011, 90, 1, 69-76.
- HPLC.cz, 2010.** *Vyhodnocování výsledků v HPLC*. [online] [cit. 25.3.2023]. Dostupné z <http://hplc.cz/>. 2010.
- Chen, R. 2012.** Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. *Biotechnology Advances*. 2012, 30 (5), 1102-1107.
- Choi, J. H. a Lee, S. Y., 2004.** Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2004, 64, 625-635.
- Chopra, A. K. et al., 1994.** Improved synthesis of Salmonella typhimurium enterotoxin using gene fusion expression systems. *Gene*. 1994, 144, 81-85.
- Christensen, M. L. a Eriksen, N. T., 2002.** Growth and proton Exchange in recombinant *Escherichia coli* BL21. *Enzyme and Microbial Technology*. 2002, 31, 566-74.
- Chu, W. et al., 2012.** Indole production promotes *Escherichia coli* mixed-culture growth with *Pseudomonas aeruginosa* by inhibiting quorum signaling. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012, 78 (2), 411–419.
- Ingledeu, W. J. a Poole, R. K., 1984.** The respiratory chains of *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews*. 1984, 48(3), 222-271.

-
- Jana, S. a Deb, J. K., 2005.** Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005, 67, 289-298.
- Jensen, E. B. a Carlsen, S., 1990.** Production of recombinant human growth hormone in *Escherichia coli*: expression of different precursors and physiological effects of glucose, acetate and salts. *Biotechnology and Bioengineering*. 1990, 36, 1-11.
- Jensen, K. F., 1978.** Two purine nucleoside phosphorylase in *Bacillus subtilis*. Purification and some properties of the adenosine specific phosphorylase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1978, 525, 346-356.
- Jiang, P. et al., 2007.** *Escherichia coli* glutamine synthetase adenylyltransferase (ATase, EC 2.7.7.49): kinetic characterization of regulation by PII, PII-UMP, glutamine and alpha-ketoglutarate. *Biochemistry (Moscow)*. 2007, 46, 4133-4146.
- Jiménez, N. et al., 2012.** Effects of lipopolysaccharide biosynthesis mutations on K1 polysaccharide association with the *Escherichia coli* cell surface. *Journal of Bacteriology*. 2012, 194(13), 3356–3367.
- Kangwa, M. et al., 2015.** High-level fed-batch fermentative expression of an engineered Staphylococcal protein A based ligand in *E. coli*: purification and characterization. *AMB Express*. 2015, 5, 1.
- Kaper, J.B. et al., 2004.** Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Review Microbiology*. 2004, 2, 123–140.
- Katayama, T. et al., 2010.** Regulation of the replication cycle: Conserved and diverse regulatory systems for DnaA and oriC. *Nature Reviews Microbiology*. 2010, 8, 163-170.
- Katzke, N. et al., 2010.** A novel T7 RNA polymerase dependent expression system of high-level protein production in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Protein Expression and Purification*. 2010. 69,137-46.
- Káš, J. et al., 2006.** *Laboratorní techniky biochemie*. 1. vydání. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. Praha, 2006. ISBN 80-7080-586-2.
- Kendrick, N. et al., 2019.** 2D SDS PAGE in combination with Western Blotting and Mass Spectrometry is a robust method for protein analysis with many applications. *Advanced in Experimental Medicine and Biology*. 2019, 1140, 563-574.
- Kleman, G. a Strohl, W., 1994.** Metabolism by *Escherichia coli* in high-cell-density fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*. 1994, 60, 3952-8.

-
- Klingner, A. et al., 2015.** Large-scale ^{13}C -flux profiling reveals conservation of the Entner-Doudoroff pathway as a glycolytic strategy among marine bacteria that use glucose. *Applied and Environmental Microbiology*. 2015, 81:2408–22.
- Klouda, P., 1996.** *Moderní analytické metody: učebnice základů instrumentálních analytických metod*. Ostrava: Klouda P., 1996. ISBN 80-902155-0-5.
- Komissarov, A. A. et al., 1995.** Complete inactivation of *Escherichia coli* uridine phosphorylase by modification of Asp5 with Woodward's reagent K. *Journal of Biological Chemistry*. 1995, 270, 17, 10050-5.
- Konz, J. O. et al., 1998.** Effects of oxygen on recombinant expression. *Biotechnology Progress*. 1998, 14, 393-409.
- Knivett, V. A. a Cullet, J., 1965.** Some factors affecting cyclopropane acid formation in *Escherichia coli*. *Biochemical Journal*. 1965, 96, 771-776.
- Kram, K. E. a Finkel, S. E., 2015.** Rich medium composition affects *Escherichia coli* survival, glycation and mutation frequency during long-term batch culture. *Applied and Environmental Microbiology*. 2015, 81, 13, 4442-4450.
- Král, J., 2014.** *Enzymy a jejich reakce [online]*. Plzeň, 2014. [cit. 2023-03-25]. Bakalářská práce. Západočeská univerzita v Plzni, Fakulta pedagogická. Vedoucí práce doc. Mgr. Václav Richtr, CSc. 2014.
- Laemmli, U. K., 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227, 5259, 680-685.
- Lawrence, J. F. a Frei, R. W., 1976.** Chemical derivatisation in liquid chromatography. Elsevier, Amsterdam. 1976.
- Lee, S. Y., 1996.** High cell density culture of *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology*. 1996, 14, 98-105.
- Leer, J. C. et al., 1977.** Uridine phosphorylase from *Escherichia coli*. Physical and chemical characterization. *European Journal of Biochemistry*. 1977, 75, 1, 217-24.
- Li, C. et al., 2015.** Modification of targets related to the Entner–Doudoroff/pentose phosphate pathway route for methyl-d-erythritol 4-phosphate-dependent carotenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*. 2015, 14:1–12.
- Li, X. a Taylor, K. B., 1994.** Effect of glucose on the expression parameters of recombinant protein in *Escherichia coli* during batch growth in complex medium. *Biotechnology Progress*. 1994, 10, 2, 160-164.

-
- Liu, G. Et al., 2019.** Efficient synthesis of purine nukleoside analogs by a new trimeric purine nukleoside phosphorylase from *Aneurinibacillus migulanus* AM007. *Molecules*. 2019, 25, 1, 100.
- Liu, Y. a Lee, M. L., 2006.** Ultrahigh pressure liquid chromatography using elevated temperature. *Journal of Chromatography*. 2006, 1104, 1-2, 198-202.
- Liu, H. et al., 2014.** MEP pathway-mediated isopentenol production in metabolically engineered *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*. 2014, 13:1–8.
- Losen, M. et al., 2004.** Effect of oxygen limitation and medium composition on *Escherichia coli* fermentation in shake-flask cultures. *Biotechnology Progress*. 2004, 20, 1062-1068.
- Madsen, E. L., 2008.** *Environmental microbiology: from genomes to biogeochemistry*. Oxford: Blackwell Pub., 2008, 479 p. ISBN 14-051-3647-2.
- Magasanik, B., 1961.** Catabolite repression. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 1961, 26, 249-256.
- Magasanik, B., 1996.** Regulation of nitrogen utilization. *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*. 2nd ed. ASM Press, Washington, DC. 1996, 1344-1356.
- Maier, U. a Büchs, J., 2001.** Characterization of the gas-liquid mass transfer in shaking bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*. 2001, 7,99-106.
- Maier, U. et al., 2004.** Advances in understanding and modeling the gasliquid mass transfer in shaking flask. *Biochemical Engineering Journal*. 2004, 17, 155-168.
- Mao, X. J. et al., 2007.** Interplay between CRP-cAMP and PII-Ntr systems forms novel regulatory network between carbon metabolism and nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*. 2007, 35, 1432-1440.
- Markert, M. L., 1994.** Molecular basis of adenosine deaminase deficiency. *Immunodeficiency*. 1994, 5, 141-145.
- Martin, M. a Guiochon, G., 2005.** Effects of high pressures in liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2005, 1-2, 7:16-38.
- Matsui, T. et al., 1990.** Effects of nutritional conditions on plasmid stability and production of tryptophan synthase by a recombinant *Escherichia coli*. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1990, 54, 619-624.
- Märkl, H. et al., 1993.** Cultivation of *Escherichia coli* to high cell densities in a dialysis reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1993, 39, 48-52.

-
- McDaniel, L. E. et al., 1965.** Effect of oxygen supply rates on growth of *Escherichia coli*. *Applied Microbiology*. 13, 1, 109-114.
- Mergulhão, F. J. et al., 2005.** Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*. *Biotechnology advances*. 2005, 23, 177-202.
- Mergulhão, F. J. a Monteiro, G. A., 2007.** Periplasmic targeting of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Methods in Molecular Biology*. 2007, 390, 47-61.
- Mikeš, O., 1975.** Fundamentals of ion-exchange chromatography. *Liquid chromatography a survey of modern techniques and applications*. 1975, 69-87.
- Mounsef, J. R. et al., 2015.** The effect of aeration conditions, characterized by the volumetric mass transfer coefficient K_La, on the fermentation kinetics of *Bacillus thuringiensis kurstaki*. *Journal of Biotechnology*. 2015, 210, 100-106.
- Nakano, K. et al., 1997.** Influence of acetic acid on the growth of *Escherichia coli* K12 during high cell density cultivation in a dialysis reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1997, 48, 597-601.
- Nannenga, B. L. a Baneyx, F., 2011.** Reprogramming chaperone pathways to improve membrane protein expression in *Escherichia coli*. *Protein Science*. 2011, 20, 1411-1420.
- Nataro, J. P. a Kaper, J. B., 1998.** Diarrheogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 1998, 11(1), 142-201.
- Neidhardt, F. C. et al., 1990.** Physiology of the bacterial cell: a molecular approach. *Sunderland, Mass.: Sinauer associates*. 1990. ISBN 0-87893-608-4.
- Ng, W., 2018.** Effect of different aeration and polyethylene glycol concentration on growth of *Escherichia coli* DH5α in a 1L bioreactor. *PeerJ Preprints*. 2018, 6.
- Nikerel, I. E. et al., 2006.** Optimization of medium composition for biomass production of recombinant *Escherichia coli* cells using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*. 2006, 32(1), 1-6.
- Ninfa, A. J. et al., 2008.** Fundamental Laboratory Approaches for Biochemistry and Biotechnology. Wiley. 2008, 113.
- Othman, N. et al., 2012.** Effect of pH and aeration on plasmid stability and phytase expression in *Escherichia coli* BL21(DE3) during batch cultivation in semi-scale bioreactor. 2012.
- Overton, T. W., 2014.** Recombinant protein production in bacterial hosts. *Drug Discovery Today*. 2014, 19, 5, 590-601.

-
- Papaneophytou, Ch. P. a Kontopidis, G., 2014.** Statistical approaches to maximize recombinant protein expression in *Escherichia coli*: A general review. *Protein expression and purification*. 2014, 94, 22-32.
- Pappin, D. J. C. et al., 1993.** Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Current Biology*. 1993, 3, 327-332.
- Percival, S. L., 2014.** *Microbiology of Waterborne Diseases Escherichia coli*. 2014, 89–117.
- Pham, P. V., 2018.** Medical Biotechnology. *Omics Technologies and Bio-Engineering*. 2018, 449-469.
- Philip, P. et al., 2018.** Parallel substrate supply and pH stabilization for optimal screening of *E. coli* with the membrane-based fed-batch shake flask. *Microbial Cell Factories*. 2018, 17, 69.
- Pinske, C. a Sawers, R. G., 2016.** Anaerobic formate and hydrogen metabolism. *EcoSal Plus*. 2016, 7, 1.
- Ponce, E., 1999.** Effect of growth rate reduction and genetic modification on acetate accumulation and biomass yields in *Escherichia coli*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 1999, 87, 775-80.
- Pugmire, M. J. a Ealick, S. E., 2002.** Structural analyses reveal two distinct families of nukleoside phosphorylases. *Biochemical Journal*. 2002, 361, 1-25.
- Qoronfleh, M. W., 1999.** Dissolved oxygen concentration affects the accumulation of HIV-1 recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 1999, 80, 107-120.
- Rahmen, N. et al., 2015.** Exchange of single amino acids at different positions of a recombinant protein affects metabolic burden in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*. 2015, 14, 10.
- Reed, J., 2005.** Model driven analysis of *Escherichia coli* metabolism. *UC San Diego*.
- Reitzer, L. J., 1996.** Ammonia assimilation and the biosynthesis of glutamine, glutamate, aspartate, asparagine, L-alanine and D-alanine. *American Society for Microbiology*. 1996, 64a, 391-407.
- Reitzer, L. J., 1996.** Sources of nitrogen and their utilization. *Escherichia coli and Sallmonella: cellular and molecular biology. 2nd ed. ASM Press, Washington, DC*. 1996, 64a, 380-90.
- Reitzer, L., 2003.** Nitrogen assimilation and global regulation in *Escherichia coli*. *Annual Review of Microbiology*. 2003, 57, 155-76.

-
- Reynolds, J. A. a Tanford, Ch., 1970.** Binding of dodecyl sulfate to proteins at high binding ratios, possible implications for the state of proteins in biological membranes. *Proceedings of the National Academy of the USA*. 1970, 66(3), 1002-7.
- Riesenberg, D. et al., 1991.** High cell density cultivation of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate. *Journal of Biotechnology*. 1991, 20, 17-28.
- Rolfe, M. D. et al., 2011.** Transcript profiling and inference of *Escherichia coli* K-12 ArcA activity across the range of physiologically relevant oxygen concentrations. *Journal of Biological Chemistry*. 2011, 286, 10147-10154.
- Romano, A.H. a Conway, T., 1996.** Evolution of carbohydrate metabolic pathways. *Research in Microbiology*. 1996, 147:448–55.
- Rosano, G. L. a Ceccarelli, E. A., 2014.** Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*. 2014, 5, 116.
- Ryan, W. et al., 1989.** Expression of β -lactamase by recombinant *Escherichia coli* strains containing plasmids of different sizes-effect of pH, phosphate and dissolved oxygen. *Biotechnology and Bioengineering*. 1989, 34, 3, 309-319.
- Ryan, W. et al., 1996.** Growth kinetics of *Escherichia coli* and expression of a recombinant protein and its isoforms under heat shock conditions. *Biotechnology Progress*. 1996, 12, 596-601.
- Salmon, K. et al., 2003.** Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12. The effects of oxygen availability and FNR. *Journal of Biological Chemistry*. 2003, 278, 29837-29855.
- Sezonov, G. Et al., 2007.** *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *Journal of Bacteriology*. 2007, 189, 23, 8746-8749.
- Scopes, R. K., 2002.** Encyclopedia of life sciences: Enzyme activity and assays. 2002.
- Shiloah, J. a Bauer, S., 1975.** High yield growth of *E. coli* at different temperatures in a bench scale fermentor. *Biotechnology and Bioengineering*. 1975, 17, 227-239.
- Shiloach, J. a Fass, R., 2005.** Growing *E. coli* to high cell density – a historical perspective on method development. *Biotechnology Advances*. 2005, 23, 5, 345-357.
- Shin, C. S., et al., 1997.** Enhances production of human mini-proinsulin in fed-batch cultures at high cell density of *Escherichia coli* BL21 (DE3) [pET-3aT2M2]. *Biotechnology Progress*. 1997, 13, 249-57.
- Shulman, S. T. et al., 2007.** Theodor Escherich: the first pediatric infectious diseases physician? *Clin Infect Dis*. 2007, 45, 1025–1029.

-
- Schaechter, M., 2009.** *Encyclopedia of Microbiology - Escherichia Coli.* 2009, 125–132.
- Schagger, H., 2006.** Tricine-SDS-PAGE. *Nature protocols.* 2006, 1(1), 16-22.
- Scheidle, M. et al., 2011.** Controlling pH in shake flasks using polymer-based controlled-release discs with predetermined release kinetics. *BMC Biotechnology.* 2011, 11, 25.
- Schuhmacher, T. et al., 2014.** Phosphate limited fed-batch processes: impact on carbon usage and energy metabolism in *Escherichia coli.* *Journal of Bacteriology.* 2014, 190, 96-104.
- Schmidt, M. et al., 1999.** Temperature-induced production of recombinant human insulin in high cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli.* *Journal of Biotechnology.* 1999, 68, 71-83.
- Smith, B. J., 1984.** SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. *Proteins. Methods in molecular biology.* 1984, 41-56.
- Smith, M. W. a Neihardt F. C., 1983.** Proteins induced by anaerobiosis in *Escherichia coli.* *Journal of Bacteriology.* 1983, 154,336-343.
- Soupe, E. et al., 1998.** Ammonia acquisition in enteric bacteria: physiological role of ammonium/methylammonium transport B (AmtB) protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.* 1998, 95, 7030-4.
- Sørensen, H. et al., 2007.** Chromatography and capillary electrophoresis in food analysis. *Royal Society of Chemistry.* 2007, 99-101.
- Speer, S. L. et al., 2019.** Controlling and quantifying protein concentration in *Escherichia coli.* *Protein Science.* 2019, 28, 7, 1307-1311.
- Stoeckler, J. D. et al., 1980.** Human erythrocytic purine nukleoside phosphorylase: reaction with sugarmodifies nukleoside substrates. *Biochemistry.* 1980. 19. 102-107.
- Terpe, K., 2006.** Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2006, 72, 211.
- Thakur, C. S. et al., 2010.** Growth of wildtype and mutant *E. coli* strains in minimal media for optimal production of nucleic acids for preparing labeled nucleotides. *Applied mikrobiology and biotechnology.* 2010, 88, 3, 771-779.
- Tomazetto, G. et al., 2007.** Expression kinetics and plasmid stability of recombinant *E. coli* encoding urease-derived peptide with bioinsecticide activity. *Enzyme and Microbial Technology.* 2007, 41, 821-827.
-

-
- Torriani, A., 1990.** From cell membrane to nucleosides: the phosphate regulon in *Escherichia coli*. *BioEssays*. 1990, 12, 8, 371-376.
- Ukkonen, K., 2014.** Improvement of recombinant protein production in shaken cultures: focus on aeration and enzyme-controlled glucose feeding. 2014.
- Uniprot, 2023.** The Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Research*. 2023, 51, D523-D531.
- Van Dien, S. J. a Keasling, J. D., 1999.** Control of polyphosphate metabolism in genetically engineered *Escherichia coli*. *Enzyme and Microbial Technology*. 1999, 24, 1-2, 21-25.
- Vasala, A. et al., 2006.** A new wireless system for decentralised measurement of physiological parameters from shake flasks. *Microbial Cell Factories*. 2006, 5, 8.
- Ventura, S. a Villaverde, A., 2006.** Protein quality in bacterial inclusion bodies. *Trends in Biotechnology*. 2006, 24, 179-185.
- Villaverde, A. et al., 1993.** Fine regulation of cl857-controlled gene expression in continuous culture of recombinant *Escherichia coli* by temperature. *Applied and Environmental Microbiology*. 1993, 59, 10, 3458-3487.
- Vincentelli, R. et al., 2003.** Medium-scale structural genomics: strategies for protein expression and crystallization. *Accounts of Chemical Research*. 2003, 36, 165-172.
- Vita, A. et al., 1986.** *International Journal of Biochemistry*. 1986, 18, 431-435.
- Votava, M. et al., 2003.** *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003, s. 53-66. ISBN 80-902896-6-5.
- Wagner, A. a Fell, D. A., 2001.** The small world inside large metabolic networks. *Proceedings: Biological Sciences*. 2001, 268, 1803-1810.
- Wang, H. et al., 2014.** Improving the expression of recombinant proteins in *E. coli* BL21(DE3) under acetate stress: an alkaline pH shift approach. *PLoS One*. 2014, 9, 11, e112777.
- Wang, L. et al., 2011.** Flux balance analysis of ammonia assimilation network in *E. coli* predicts preferred regulation point. *PLoS ONE*. 2011, 6, 16362.
- Wanner, B. L., 1996.** Phosphorus assimilation and control of the phosphate regulon. *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*. 2 edition. ASM Press, Washington, DC. 1996, 1357-1381.
- Watson, J. D., 2007.** *Recombinant DNA: Genes and Genomes: A short course*. San Francisco: W. H. Freeman. 2007. ISBN 978-0-7167-2866-5.

-
- Waugh, D. S., 2005.** Making the most of affinity tags. *Trends in Biotechnology*. 2005, 23, 316-320.
- Weart, R. B. et al., 2007.** A metabolic sensor governing cell size in bacteria. *Cell*. 2007, 130, 335-347.
- Webster, J. a Oxley, D., 2011.** Protein identification by MALDI-TOF mass spectrometry. *Methods in Molecular Biology*. 2011, 227-240.
- Welling, G. W. et al., 1994.** Determination of enzyme activity by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography: Biomedical Sciences and Applications*. 1994, 659, 1-2, 209-225.
- Winkler, F. K., 2006.** Amt/MEP/Rh proteins conduct ammonia. *Pflügers archiv – European Journal of Physiology*. 2006, 451, 701-7.
- Winzer, K. et al., 2002.** Bacterial cell to cell communication: sorry, can't talk now – gone to lunch. *Current opinion in microbiology*. 2002, 5, 216-22.
- Wong, J. et al., 2007.** Eval: tandem mass spectral quality assignment for high-throughput proteomics. *BMC Bioinformatics*. 2007, 8, 51.
- Yoon, S. H. et al., 2010.** Secretory production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Recent Patents on Biotechnology*. 2010, 4, 23-29.
- You, C. et al., 2013.** Coordination of bacterial proteome with metabolism by cyclic AMP signalling. *Nature* 500. 2013, 301-6.
- Yuan, J. et al., 2009.** Metabolomics-driven quantitative analysis of ammonia assimilation in *E.coli*. *Molecular Systems Biology*. 2009, 5.
- Zalkin, H. a Smith, J. L., 1998.** Enzymes utilizing glutamine as an amide donor. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*. 1998, 72, 87-144.

Seznam obrázků

Obrázek 1.1 Morfologie kolonií E. coli na vybraných kultivačních médiích. a) Živné medium, b) Krevní agar, c) MacConkey agar, d) ENDO agar. Převzato a upraveno z https://microbiologynote.com/	11
Obrázek 1.2 Schematické znázornění tří různých technik klonování (Celie et al., 2016)	14
Obrázek 3.1 Reakce katalyzována PNP (Gregus a Nemeti, 2002)	30
Obrázek 3.2 Reakce katalyzována UP (Renck et al., 2010).....	31
Obrázek 3.3 Graf kalibrační křivky pro stanovení celkových proteinů (autor)	36
Obrázek 3.4 Souprava pro vertikální elektroforézu VWR Perfect Blue Twin S, zdroj Consort EV3610 (autor).....	39
Obrázek 3.5 Kultivace ve fermentoru (autor)	45
Obrázek 4.1 Demonstrační obrázek peaků z jednoho měření na HPLC, enzym PNP v mediu TBG4-růst hypoxantinu v čase (autor).....	50
Obrázek 4.2 Demonstrační obrázek peaků z jednoho měření na HPLC, enzym PNP v mediu TBG4-úbytek inosinu v čase (autor).....	51
Obrázek 4.3 Odbarvený gel se vzorky z medií kmene s PNP (autor).....	52
Obrázek 4.4 Odbarvený gel se vzorky z medií kmene s UP (autor).....	53
Obrázek 4.5 Graf porovnání sušiny PNP a UP v g/l media (autor)	54
Obrázek 4.6 Grafické znázornění změn hodnot pH (zelená), DO ₂ (žlutá) a RPM (modrá) v průběhu kultivace ve fermentoru (autor).....	55
Obrázek 4.7 Odbarvený gel se vzorky z fermentoru (autor).....	58

Seznam tabulek

Tabulka 3.1: Složení kultivačních medií.....	32
Tabulka 3.2 Složení TES pro medium MSM.....	32
Tabulka 3.3: Tabulka pro přípravu kalibrační křivky	35
Tabulka 3.4: Naměřené absorbance pro sestavení kalibrační křivky.....	35
Tabulka 3.5 Podmínky HPLC analýzy pro UP (autor)	37
Tabulka 3.6 Podmínky HPLC analýzy pro PNP (autor)	38
Tabulka 3.7 12% dělicí gel (autor).....	40
Tabulka 3.8 5% zaostřovací gel (autor)	40
Tabulka 3.9: Složení vegetativního media pro fermentor	43
Tabulka 3.10: Složení produkčního media pro fermentor	44
Tabulka 4.1 Hodnoty pH a OD	47
Tabulka 4.2: Výsledné hodnoty měření celkových proteinů pro kmen PNP.....	48
Tabulka 4.3: Výsledné hodnoty měření celkových proteinů pro kmen UP	48
Tabulka 4.4 Enzymatická aktivita UP a PNP v různých mediích.....	50
Tabulka 4.5: Přehledová tabulka hmotnosti sušiny pro kmen PNP	53
Tabulka 4.6: Přehledová tabulka hmotnosti sušiny pro kmen UP	54
Tabulka 4.7 Výsledné hodnoty měření celkových proteinů z fermentoru pro oba enzymy	56
Tabulka 4.8 Enzymatická aktivita UP a PNP ve fermentoru	57
Tabulka 4.9 Hmotnosti sušiny pro oba kmeny v g/l media.....	58

Seznam použitých zkratek

α KG – α -ketoglutarát

ATP – adenosintrifosfát

BSA – bovine serum albumin

CAA – Casamino acids medium

cAMP – cyklický adenosinmonofosfát

CCR – uhlíková katabolická represe

DNA – deoxyribonukleová kyselina

DO₂ – saturace kultivačního media kyslíkem

DOT – parciální tlak kyslíku (z angl. dissolved oxygen tension)

EDP – Entner-Doudoroff pathway (glykolýza)

EMPP – Embden-Meyerhof-Parnasova pathway (glykolýza)

GDH – glutamátdehydrogenáza

GS – glutaminsyntetáza

His-TAG – úsek několika histidinových zbytků na N- nebo C- konci rekombinantního proteinu

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

IPTG – isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

max – maximum

min – minimum

MSM – Mineral Salts medium

NADH – nikotinamidadeninnukleotid

NADPH – nikotinamidadenindinukleotidfosfát

NH₄⁺ – amonný iont

OD – optická denzita

ONPG – ortho-Nitrophenyl- β -galactoside

OPPP – Pentose phosphate pathway

PAGE – polyakrylamidová gelová elektroforéza

PMF – otisk peptidové hmotnosti (z angl. peptide mass fingerprinting)

PNP – purin nukleosid fosforyláza

RPM – otáčky za minutu (z angl. revolutions per minute)

SDS – dodecylsírán sodný

s_x – směrodatná odchylka

TB – Terrific broth medium

TBG – Terrific broth medium s glukózou

TBG4 – Terrific broth medium s glukózou přidanou po 4 hodinách kultivace

TCA – cyklus trikarboxylové kyselina (z angl. tricarboxylic acid cycle)

TRY – Medium s tryptonem

UP – uridin fosforyláza

\bar{x} – průměr

Přílohy

Příloha 1:

Kompletní hodnoty měření enzymatické aktivity pro jednotlivá media pro PNP

Medium	t [min]	Hypoxantin	Inosin	Inosin [mg/ml]	mM/ml
TB	5	273645	1737564	1,3502061	5,033837
	10	443920	1723742	1,3394654	4,993794
	15	529137	1607614	1,249226	4,657364
	20	596543	1580449	1,228117	4,578665
	30	639025	1453646	1,1295824	4,211308
	45	673104	1389754	1,0799339	4,026209
	60	705660	1400351	1,0881685	4,056909
TBG	5	88561	1946793	1,51279132	5,63998763
	10	148148	1872659	1,45518413	5,42521655
	15	189282	1760093	1,36771265	5,09910543
	20	236271	1788524	1,38980548	5,18147191
	30	288070	1675378	1,3018833	4,85368049
	45	358018	1639259	1,27381637	4,74904137
	60	410628	1605922	1,24791124	4,65246188
TBG4	5	177272	1844860	1,4335824	5,344681
	10	274122	1732243	1,3460713	5,018422
	15	343758	1629500	1,266233	4,720769
	20	406423	1620625	1,2593365	4,695057
	30	478985	1533238	1,1914308	4,441892
	45	548132	1469804	1,1421382	4,258119
	60	594573	1441290	1,1199809	4,175512
MSM	5	11849	2093507	1,6267981	6,065028
	10	12133	2025671	1,5740849	5,868502
	15	12011	1974646	1,534435	5,72068
	20	12483	2026540	1,5747602	5,87102
	30	12688	2062228	1,6024922	5,97441
	45	12460	2017671	1,5678684	5,845326
	60	12455	2009239	1,5613161	5,820898
CAA	5	280172	1754943	1,3637108	5,084186
	10	451549	1608837	1,2501764	4,660907
	15	516198	1584732	1,2314452	4,591073
	20	565863	1521959	1,1826662	4,409216
	30	624019	1454052	1,1298979	4,212484
	45	661011	1396277	1,0850027	4,045106
	60	688353	1396265	1,0849934	4,045072
TRY	5	309261	1966770	1,52831482	5,69786232
	10	671863	1351972	1,05057472	3,91675199
	15	682118	1345052	1,04519741	3,8967043
	20	508823	1763870	1,37064764	5,11004765
	30	525308	1456383	1,13170921	4,21923754
	45	595161	1464322	1,12787835	4,24223735
	60	653947	1415011	1,09956033	4,09938013

Kompletní hodnoty měření enzymatické aktivity pro jednotlivá media pro UP

Medium	t [min]	Uracil	Uridin	Uridin [mg/ml]	mM/ml
TB	5	536897	2107527	0,87227493	3,571969
	10	769104	1582967	0,65516713	2,682912
	15	929336	1319334	0,54605325	2,23609
	20	1061608	1187971	0,49168401	2,013448
	30	1163629	1034575	0,42819562	1,753463
	45	1228957	984253	0,40736807	1,668174
	60	1226868	957863	0,39644563	1,623446
TBG	5	354639	2157676	0,893030871	3,656965
	10	560302	1796649	0,743607021	3,045074
	15	714105	1570047	0,649819732	2,661014
	20	846046	1426699	0,590490069	2,418059
	30	1033677	1256052	0,519861746	2,128836
	45	1138063	1093940	0,452765935	1,854078
	60	1232591	1050272	0,434692382	1,780067
TBG4	5	374536	2013476	0,833348578	3,412566
	10	613014	1705038	0,705690554	2,889806
	15	780881	1486488	0,615235871	2,519393
	20	893137	1311800	0,542935036	2,223321
	30	1056405	1156039	0,478467812	1,959328
	45	1179025	1051094	0,435032596	1,78146
	60	1233419	1015062	0,420119472	1,720391
MSM	5	53601	2454757	1,015988398	4,160477
	10	76414	2362382	0,977755722	4,003914
	15	85879	2361553	0,977412611	4,002509
	20	92272	2443638	1,011386405	4,141631
	30	91718	2437654	1,008909714	4,131489
	45	85614	2410249	0,997567181	4,085042
	60	111151	2420000	1,001602979	4,101568
CAA	5	375440	2059370	0,85234344	3,49035
	10	568259	1735249	0,71819445	2,941009
	15	712998	1550724	0,64182222	2,628265
	20	812634	1418433	0,58706889	2,40405
	30	966069	1297714	0,53710504	2,199447
	45	1077223	1177661	0,48741685	1,995974
	60	1066067	1055353	0,43679533	1,788679
TRY	5	564811	1803912	0,746613071	3,057384
	10	829851	1418744	0,58719761	2,404577
	15	998942	1219369	0,504679183	2,066663
	20	1120834	1128991	0,467273037	1,913485
	30	1208183	1021225	0,422670249	1,730836
	45	1262060	992296	0,410696954	1,681806
	60	12222528	952853	0,394372067	1,614955

Příloha 2:

Kompletní hodnoty z měření hmotnosti sušiny pro kmen PNP

Vzorek	Hmotnost zkumavky [g]			Zkumavka + mokrá biomasa [g]			Mokrá biomasa [g]		
	TB	1,0407	1,0399	1,0302	1,0848	1,1267	1,1012	0,0441	0,0868
TBG	1,0237	1,0415	1,0356	1,0922	1,1209	1,1282	0,0545	0,0794	0,0926
TBG4	1,0377	1,0266	1,0317	1,0980	1,1330	1,1322	0,0743	0,1064	0,1005
MSM	1,0187	1,0189	1,0191	1,0875	1,0827	1,0832	0,0688	0,0638	0,0641
CAA	1,0257	1,0374	1,0263	1,1135	1,1275	1,1096	0,0878	0,0901	0,0833
TRY	1,0227	1,0368	1,0412	1,0977	1,1151	1,119	0,075	0,0783	0,0778
Vzorek	Zkumavka + sušina [g]			Hmotnost sušiny [g]			Průměr [g]		
TB	1,0426	1,0404	1,0455	0,0019	0,0005	0,0153	0,0059		
TBG	1,0384	1,0465	1,0439	0,0007	0,005	0,0083	0,0047		
TBG4	1,0437	1,0511	1,0512	0,02	0,0245	0,0195	0,0213		
MSM	1,0270	1,0277	1,0283	0,0083	0,0088	0,0092	0,0087		
CAA	1,0383	1,0504	1,036	0,0126	0,013	0,0097	0,0117		
TRY	1,0335	1,0477	1,0523	0,0108	0,0109	0,0111	0,0109		

Kompletní hodnoty z měření hmotnosti sušiny pro kmen UP

Vzorek	Hmotnost zkumavky [g]			Zkumavka + mokrá biomasa [g]			Mokrá biomasa [g]		
	TB	1,0392	1,0239	1,0195	1,1175	1,1004	1,1166	0,0783	0,0765
TBG	1,0234	1,0367	1,0226	1,0918	1,1089	1,122	0,0684	0,0722	0,0994
TBG4	1,019	1,0242	1,0327	1,108	1,1290	1,1404	0,089	0,1048	0,1077
MSM	1,0239	1,038	1,0335	1,0996	1,1129	1,1098	0,0757	0,0749	0,0763
CAA	1,035	1,0385	1,0385	1,1057	1,1175	1,1155	0,0707	0,079	0,077
TRY	1,0318	1,0333	1,0341	1,1198	1,1054	1,1133	0,085	0,0721	0,0792
Vzorek	Zkumavka + sušina [g]			Hmotnost sušiny [g]			Průměr [g]		
TB	1,0487	1,0343	1,0305	0,0095	0,0104	0,011	0,0103		
TBG	1,0333	1,0481	1,0414	0,0099	0,0114	0,0188	0,0134		
TBG4	1,0297	1,05	1,0541	0,0107	0,0258	0,0214	0,0193		
MSM	1,0305	1,0445	1,0407	0,0066	0,0065	0,0072	0,0067		
CAA	1,0453	1,0497	1,0495	0,0103	0,0112	0,011	0,0108		
TRY	1,0447	1,0451	1,0463	0,0129	0,0118	0,0122	0,0123		