



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

OPTIMALIZACE PRODUKCE VYBRANÝCH ENZYMŮ POMOCÍ BACILLUS SUBTILIS

OPTIMIZATION OF THE PRODUCTION OF LIPASES BY BACILLUS SUBTILIS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. RADKA SLAVÍČKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. SOŇA HERMANOVÁ, Ph.D.

BRNO 2012



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce: **FCH-DIP0604/2011** Akademický rok: **2011/2012**
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student(ka): **Bc. Radka Slavičková**
Studijní program: Chemie a technologie potravin (N2901)
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)
Vedoucí práce: **Mgr. Soňa Hermanová, Ph.D.**
Konzultanti:

Název diplomové práce:

Optimalizace produkce vybraných enzymů pomocí *Bacillus subtilis*

Zadání diplomové práce:

Cílem je vypracování literární rešerše zaměřené na problematiku vlivu různých růstových faktorů (pH, teplota, způsob kultivace, složení kultivačních médií) na produkci lipáz u mikroorganismu *Bacillus subtilis*, stanovení lipolytické aktivity a využití tohoto mikroorganismu při degradaci polymerních materiálů na bázi polyesterů. Experimentálním cílem bude provedení série experimentů zaměřených na optimalizaci kultivačních podmínek pro produkci lipolytických enzymů. Bude sledován vliv teploty, pH, složení živného média nebo přítomnost lipidů na lipolytickou aktivitu kmene *Bacillus subtilis*. Lipolytická aktivita bude stanovena spektrofotometricky. Na závěr bude provedena série degradačních experimentů vybraných polymerních materiálů za použití nejvýhodnějších kultivačních podmínek s ohledem na lipolytickou aktivitu.

Termín odevzdání diplomové práce: 11.5.2012

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Radka Slavičková
Student(ka)

Mgr. Soňa Hermanová, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 15.1.2012

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

V diplomové práci byla studována optimalizace produkce lipolytických enzymů při submerzním způsobu kultivace *Bacillus subtilis* (*BS*). Produkce lipolytických enzymů byla testovaná v prostředí tří živných médií, která se lišila zejména hlavními zdroji uhlíku, resp. dusíku. První médium obsahovalo zejména extrakt z telecího mozku a hovězího srdce (BHIB), druhé médium pepton a kvasniční extrakt (NB) a třetí živné médium pepton a kvasniční extrakt s přidávkem 2% (w/v) glukózy (NBG). Nejvyšší lipolytické aktivity ($0,0784 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$) bylo dosaženo v médiu NBG, přičemž ve všech médiích bylo pozorováno maximum před koncem exponenciální fáze růstu. V NBG médiu bylo následně stanoveno teplotní optimum v rozmezí 30 - 50 °C, pH optimum v rozmezí 5 - 11 a tepelná stabilita lipolytických enzymů produkovaných *BS*. Aktivita byla stanovena spektrometricky za použití *p*-nitrofenyllaurátu jako substrátu. Produkované lipolytické enzymy vykazovaly nejvyšší aktivitu při teplotě 37 °C a v alkalické oblasti pH = 8,0. Měření tepelné stability ukázalo, že se jedná o poměrně termostabilní enzymy, které si i po 1 hodině kultivace při 30 - 50 °C zachovaly 100 % aktivity. Přítomnost 1% (w/v) olivového oleje v médiu NBG způsobovala po 14 dnech kultivace pokles lipolytické aktivity o 65 % a pokles hodnoty pH z 6,5 na 5,4. Po nahrazení glukózy fruktózou v živném médiu NBG vykazovala lipolytická aktivita během prvních 7 dní kultivace srovnatelné hodnoty, avšak po 14 dnech kultivace byl zaznamenán již pokles lipolytické aktivity o 29 %. Metodika identifikace lipolytických enzymů *BS* pomocí peptidového mapování byla vyvinuta za účelem porozumnění potenciálu syntetického polyesteru- poly(ϵ -kaprolaktonu) působit jako induktor tvorby lipáz.

Degradační studie komerčního polyesteru poly(ϵ -kaprolaktonu) byla vedena při submerzním způsobu kultivace *Bacillus subtilis* v médiu NBG při počáteční hodnotě pH 7,0 a teplotě 30 °C po dobu 14 dnů. PCL ($M_n=10\ 000$, $M_w=14\ 000$) byl studován ve formě filmů (1,0 x 1,0 cm), které byly připraveny lisováním, ochlazováním taveniny na 4 °C a odpařováním dichlormetanu z 2% roztoku. U degradovaných filmů v závislosti na způsobu jejich přípravy byl pozorován po 14 dnech úbytek hmotnosti (7,8 - 17,0 hm. %) a vznik četných děr a prasklin na povrchu vzorků. V degradačním médiu byly naměřeny hodnoty lipolytické aktivity vyšší o 9 - 17 % ve srovnání s kontrolními vzorky. Denzitometrické sledování nárůstu buněčné hmoty ukázalo rovněž vyšší hodnoty zákalů v degradačním médiu v porovnání s kontrolními vzorky. Na základě naměřených výsledků lze navrhnout, že studované vzorky byly degradovány v důsledku působení *BS*.

KLÍČOVÁ SLOVA

Bacillus subtilis, lipolytické enzymy, lipolytická aktivita, optimalizace, živné médium, pH optimum, teplotní optimum, tepelná stabilita, degradace, poly(ϵ -kaprolakton)

ABSTRACT

In this thesis, optimization of production of lipolytic enzymes by submerged cultivation of *Bacillus subtilis* (*BS*) was studied. Production of lipolytic enzymes was tested in three nutrient media, which differed mainly in main sources of carbon, respectively of nitrogen. The first medium contained mainly extract from calf brain and beef heart (BHIB), the second medium contained peptone and yeast extract (NB) and the third one contained peptone and yeast extract with the addition of 2% (w/v) glucose (NBG). The highest lipolytic activity ($0.0784 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$) was measured in NBG medium. Maximum of lipolytic activity was observed before the end of the exponential phase of *BS* growth in all the media. Temperature optimum in NBG medium was determined from 30 to 50 °C, pH optimum in the range of 5 to 11 and subsequently the temperature stability of lipolytic enzymes produced by the *BS* was estimated. The activity value was determined spectrometrically using *p*-nitrophenyllaurate as a substrate. Produced lipolytic enzymes showed maximum activity at 37 °C in the alkaline pH of 8.0. Measurement of temperature stability showed that lipolytic enzymes are relatively thermostable enzymes retaining 100 % of the activity even after 1 hour of cultivation at 30 - 50 °C. The presence of 1% (w/v) olive oil in medium NBG caused a decrease in lipolytic activity by 65 % as well as in pH from 6.5 to 5.4 after 14 days of cultivation. After substitution of glucose by fructose in medium NBG, lipolytic activity showed comparable values during the first week of cultivation. On the other hand, the decrease of lipolytic activity by 29 % in the medium with fructose was observed after 14 days of cultivation. A procedure for the identification of lipolytic enzymes of *BS* by peptide massfingerprinting was developed to understand the potential of synthetic polyester - poly(ϵ -caprolactone) as a lipase inductor.

Degradation study of commercial polyester poly(ϵ -caprolactone) was carried out by submerged cultivation of *Bacillus subtilis* in NBG medium at initial pH 7.0 and 30 °C for 14 days. PCL ($M_n = 10,000$, $M_w = 14\,000$) was studied in the form of films (1.0 x 1.0 cm), which were prepared by melt-pressing, rapid cooling of the melt to 4 °C and evaporation of the solvent from 2 % dichloromethane solution. The evaluation of the films shown occurrence of weight loss (7.8 - 17.0 wt.%) together with the formation of numerous holes and cracks in the sample surface in relation to the method of the films preparation. Lipolytic activity values increased by 9 - 17 % in the degradation media compared to control samples. Densitometric monitoring showed also higher increase in cell mass in the degradation medium compared with control samples. Based on the results obtained, the degradation process induced by *BS* could be suggested.

KEYWORDS

Bacillus subtilis, lipolytic enzymes, lipolytic activity, optimization, growth medium, pH optimum, temperature optimum, temperature stability, degradation, poly(ϵ -caprolactone)

SLAVÍČKOVÁ, R. *Optimalizace produkce vybraných enzymů pomocí Bacillus subtilis*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. 66 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Soňa Hermanová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala Mgr. Soně Hermanové, Ph.D. za odborné vedení a Mgr. Stanislavě Voběrkové, PhD. za konzultace a cenné rady při zpracovávání této diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala doc. Ing. Jiřině Omelkové, CSc. zejména za umožnění práce v laboratoři a za poskytnutí potřebných přístrojů a chemikálií pro experimenty. Mé poděkování patří také Ing. Radce Bálkové, PhD. za pořízení snímků na CLSM a Ing. Daně Flodrové, PhD. za ochotu a čas věnovaný při provádění proteomické analýzy.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	CÍL PRÁCE	9
3	TEORETICKÁ ČÁST	10
3.1	BACILLUS SUBTILIS – CHARAKTERISTIKA MIKROORGANISMU.....	10
3.2	TRANZITNÍ STAV BUŇKY	11
3.3	BAKTERIÁLNÍ LIPOLYTICKÉ ENZYMY	13
3.3.1	Lipolytické enzymy produkované rodem <i>Bacillus</i>	14
3.3.2	Optimalizace podmínek pro produkci lipolytických enzymů <i>B. subtilis</i>	18
3.3.2.1	<i>Zdroje uhlíku, dusíku a lipidů</i>	18
3.3.2.2	<i>Tepelná stabilita, pH a teplotní optimum</i>	19
3.3.2.3	<i>Organická rozpouštědla</i>	19
3.3.2.4	<i>Ionty kovů</i>	19
3.3.3	Způsoby kultivace <i>B. subtilis</i> pro produkci lipolytických enzymů.....	20
3.3.4	Metody stanovení katalytické aktivity enzymů	20
3.4	PROTEOMICKÁ IDENTIFIKACE BÍLKOVIN	21
3.4.1	Identifikace bílkovin metodou peptidového mapování.....	21
3.4.1.1	<i>Separace bílkovin</i>	21
3.4.1.2	<i>Štěpení bílkovin</i>	22
3.4.1.3	<i>Detekce peptidů</i>	23
3.4.2	Proteomické studie extracelulárních bílkovin <i>B. subtilis</i>	25
3.5	BIODEGRADACE POLYMERŮ S VYUŽITÍM ENZYMOVÉHO APARÁTU <i>B.SUBTILIS</i>	26
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	28
4.1	MATERIÁL A PŘÍSTROJE	28
4.1.1	Použité chemikálie	28
4.1.2	Přístrojové vybavení	28
4.1.3	Použité roztoky a jejich příprava	29
4.1.3.1	<i>Roztoky pro stanovení lipolytické aktivity</i>	29
4.1.3.2	<i>Tlumivé roztoky pro stanovení pH optima</i>	29
4.1.3.3	<i>Roztoky pro stanovení bílkovin podle Lowryho</i>	30
4.1.4	Biologický materiál.....	30
4.1.5	Polymerní materiál.....	30
4.1.6	Živná média	31
4.2	METODY	31
4.2.1	Příprava mikroorganismu na kultivaci v živném médiu	31
4.2.1.1	<i>Oživení B. subtilis z želatinových disků</i>	31
4.2.1.2	<i>Příprava inokula</i>	31
4.2.1.3	<i>Zkrácená doba přípravy inokula</i>	31
4.2.2	Stanovení kalibračních křivek	32
4.2.2.1	<i>Stanovení kalibrační křivky p-nitrofenolu</i>	32
4.2.2.2	<i>Stanovení kalibrační křivky albuminu</i>	32
4.2.3	Spektrometrické stanovení lipolytické aktivity	33
4.2.3.1	<i>Stanovení optimálního živného média pro produkci lipolytických enzymů</i>	34
4.2.3.2	<i>Stanovení teplotního a pH optima</i>	34

4.2.3.3	Stanovení tepelné stability.....	35
4.2.3.4	Stanovení vlivu přítomnosti olivového oleje na lipolytickou aktivitu.....	35
4.2.4	Stanovení nárůstu biomasy (Růstová křivka).....	35
4.2.4.1	Spektrometrické stanovení nárůstu biomasy.....	35
4.2.4.2	Denzitometrické stanovení nárůstu biomasy.....	35
4.2.5	Spektrometrické stanovení bílkovin podle Lowryho.....	36
4.2.6	Identifikace bílkovin metodou peptidového mapování (PMF).....	36
4.2.6.1	Úprava vzorku pro identifikaci bílkovin.....	37
4.2.6.2	1D elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s SDS (SDS-PAGE).....	37
4.2.6.3	Barvení gelu.....	37
4.2.6.4	Vyrážnutí proteinů z polyakrylamidového gelu.....	38
4.2.6.5	Omývání kousků gelu.....	38
4.2.6.6	Redukce a alkylace.....	38
4.2.6.7	Štěpení gelu.....	38
4.2.6.8	Extrakce peptidů.....	38
4.2.6.9	ZipTip®.....	38
4.2.6.10	Hmotnostní spektrometrie.....	39
4.2.7	Studium vlivu lipáz <i>Bacillus subtilis</i> na degradaci poly(ϵ -kaprolaktonu) PCL.....	39
4.2.7.1	Příprava polymeru pro degrační experiment.....	39
4.2.7.2	Biodegradace PCL folií.....	40
4.2.7.3	Stanovení zbytkové lipolytické aktivity a úbytku hmotnosti polymeru.....	40
4.2.7.4	Konfokální laserová skenovací mikroskopie (CLSM).....	40
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	41
5.1	OPTIMALIZACE PODMÍNEK PRO PRODUKCI LIPOLYTICKÝCH ENZYMŮ <i>B. SUBTILIS</i>	41
5.1.1	Optimalizace živného média.....	41
5.1.2	Teplotní optimum a tepelná stabilita.....	46
5.1.3	pH optimum.....	47
5.1.4	Vliv olivového oleje na produkci lipolytických enzymů.....	48
5.1.5	Srovnání lipolytické aktivity v přítomnosti různých cukrů jako zdrojů uhlíku.....	49
5.2	DEGRADACE PCL POMOCÍ <i>BACILLUS SUBTILIS</i>	50
5.2.1	Úbytek hmotnosti PCL.....	51
5.2.2	Konfokální laserová skenovací mikroskopie (CLSM).....	51
5.2.3	Zbytková lipolytická aktivita a pH živného média.....	54
5.2.4	Denzitometrické stanovení nárůstu biomasy.....	55
6	ZÁVĚR.....	57
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	59
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	65
9	PŘÍLOHY.....	66

1 ÚVOD

Lipolytické enzymy, triacylglycerol acylhydrolázy (EC 3.1.1.3) neboli lipázy a karboxylesterázy (EC 3.1.1.1), představují významnou skupinu serinových hydroláz. Hlavními producenty těchto ubikvitních enzymů jsou mikroorganismy (bakterie, plísně, kvasinky i aktinomycety) [1]. Bakterie jsou pro účely produkce lipolytických enzymů kultivovány především submerzním způsobem. Většina lipáz je produkována extracelulárně a je aktivní v širokém rozmezí pH i teplot, přičemž nejčastěji se vyskytují alkalické bakteriální lipázy. Lipázy jsou obvykle produkovány v přítomnosti lipidických zdrojů uhlíku, jakými jsou oleje, mastné kyseliny, propan-1,2,3-triol (glycerol) nebo tzv. tweeny, a zároveň v přítomnosti organických zdrojů dusíku [2]. Z hlediska celkového uplatnění v řadě průmyslových odvětví (Obr. 1) se jedná po proteolytických a sacharolytických enzimech o třetí největší skupinu enzymů [1] a intenzivně jsou rozvíjeny technologie místně cílené mutagenese nebo technologie rekombinantní DNA s cílem zlepšení jak selektivity, tak i stability těchto enzymů. Lipolytické enzymy našly své uplatnění v mnoha průmyslových odvětvích zejména díky své schopnosti katalyzovat vysoce specifické biotransformace. V současné době se využívají zejména v potravinářském průmyslu (pekárenství, mlékárenství, masné a rybí výrobky, zpracování tuků a olejů), v kožedělním a papírenském průmyslu. Dále jsou využívány ve farmaceutickém průmyslu při výrobě léčiv nebo také při výrobě čistících prostředků a kosmetických produktů. V environmentálních aplikacích našly své uplatnění v procesu bioremediace, tedy rozkladu organických polutantů. Působí jako biokatalyzátory v řadě organických syntéz jako jsou esterifikace, transesterifikace a hydrolýza esterů. Za určitých podmínek katalyzují transesterifikační syntézu polymerů [1][2][3].



Obr. 1: Biotechnologické využití lipolytických enzymů

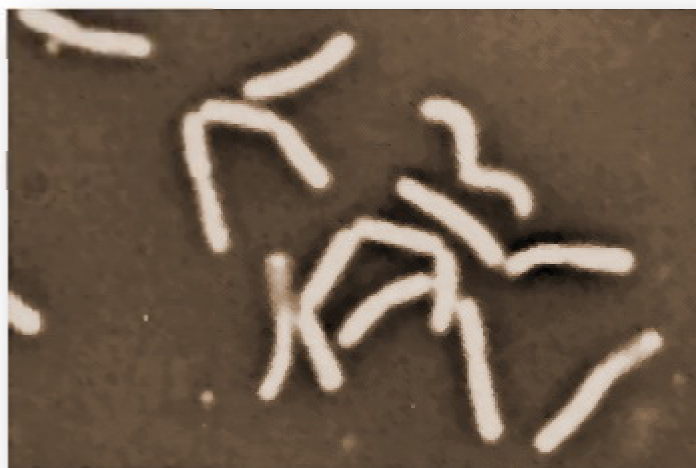
2 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo vypracování literární rešerše zaměřené na problematiku vlivu různých růstových faktorů (pH, teplota, způsob kultivace, složení kultivačních médií) na produkci lipáz u mikroorganismu *Bacillus subtilis*, stanovení lipolytické aktivity a využití tohoto mikroorganismu při degradaci polymerních materiálů na bázi polyesterů. V experimentální části byla provedena série experimentů zaměřených na optimalizaci kultivačních podmínek pro produkci lipolytických enzymů. Byl sledován vliv teploty, pH, složení živného média nebo přítomnost lipidů na lipolytickou aktivitu kmene *Bacillus subtilis*. Lipolytická aktivita byla stanovena spektrofotometricky. Na závěr byl proveden screeningový experiment degradace poly(ϵ -kaprolaktonu) při submerzním způsobu kultivace *Bacillus subtilis* v živném médiu *Nutrient Broth* s přidavkem 2% (w/v) glukózy, při počáteční hodnotě pH 7,0 a teplotě 30 °C.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 *Bacillus subtilis* – charakteristika mikroorganismu

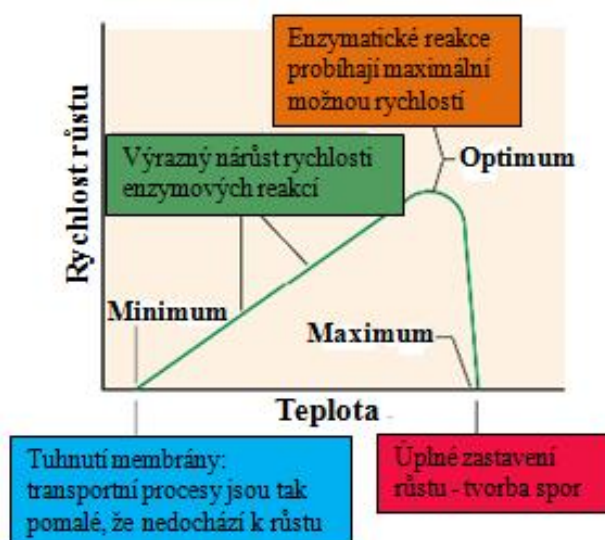
Bacillus subtilis (BS) je grampozitivní (G+), tyčinkovitá bakterie (Obr. 2) tvořící teplotně rezistentní, dormantní spory. Řadí se do skupiny GRAS (Generally Regarded As Safe), tedy do skupiny mikroorganismů, které jsou obecně považovány za bezpečné [4], a spolu s *Escherichia coli* patří k nejlépe prozkoumaným prokaryontním mikroorganismům [1]. Obvykle se vyskytuje v půdě a v asociaci s rostlinami. Tato bakterie je aerobní [5], za určitých podmínek však může růst i anaerobně [6].



Obr. 2: *Bacillus subtilis* - Imerzní mikroskopický snímek. Negativní barvení.

Nutnou podmínkou pro zajištění rychlého růstu konkrétního kmene společně se vznikem jeho specifických produktů je dodržení optimálních podmínek kultivace. Mezi tyto zásadní podmínky patří především teplota, pH, přísun vhodných živin a aerace.

Změny teploty představují klíčový faktor, který ovlivňuje jak růst buněk, tak jejich přežívání. Je známo, že BS roste v teplotním rozmezí 10 – 55 °C [5][7][8]. Při teplotách nad 44 °C se začínají tvořit spory v závislosti na příslušném kmenu a kultivačním médiu. Studie zaměřená na optimalizaci růstových podmínek uvádí optimální teplotu pro kultivace *B. subtilis* B246 v rozmezí 30 – 37 °C s minimem při 18 °C a maximem při 43 °C [9]. Nejvíce studií je prováděno při teplotě 37 °C. Při těchto teplotách se doba zdvojení mikroorganismu v médiu bohatém na živiny pohybuje přibližně kolem 30 minut [5]. Vliv teploty na rychlost růstu sporotvorných buněk znázorňuje Obr. 3.



Obr. 3: Vliv teploty na rychlost růstu sporotvorných buněk

BS je schopný růst v médiu, které obsahuje minimální množství esenciálních solí a zdrojů uhlíku, dusíku a fosforu. Jako zdroj uhlíku využívá řadu mono-, oligo- a polysacharidů, stejně tak jako aminokyseliny a peptidy, které slouží zároveň i jako zdroj dusíku. Dusík může být využit rovněž z dusičnanů, amonných iontů, močoviny nebo také z nukleosidů. *BS* umí využít vedle fosforečnanů také estery kyseliny fosforečné [5].

Ačkoliv byl *BS* považován původně za striktně aerobní organismus, bylo zjištěno, že za určitých podmínek může růst i v anaerobní atmosféře. Byly popsány dva způsoby anaerobního růstu mikroorganismu *BS* – dýcháním pomocí dusičnanů jako donorů elektronů [10][11] a fermentací v nepřítomnosti elektronových donorů [11]. Podstatou dusičnanového dýchání je redukce dusičnanů na dusitany (dusičnan slouží jako donor elektronů stejně jako vodík je donorem u aerobní respirace). Pro tento způsob respirace je zapotřebí dusičnanová reductáza navázaná na membránu a to pouze v kultuře s nízkou aerací [12]. Fermentační dráhy nebyly u *BS* doposud zcela dobře objasněny. Buňky *BS* rostou kvašením v přítomnosti glukózy a pyruvátu nebo alternativně glukózy a aminokyselin. Důvody, proč *BS* nemůže fermentovat buď glukózu, nebo pyruvát efektivně, a proč pyruvát podporuje fermentaci glukózy, jsou neznámé. NMR analýzy ukázaly, že mezi fermentační produkty patří acetát, aceton, ethanol, laktát, sukcinát a butan-2,3-diol, což naznačuje průběh smíšené kyselé fermentace [11].

3.2 Tranzitní stav buňky

Pokud mají bakterie vhodné podmínky pro růst a rozmnožování (optimální teplota, pH, dostatek živin a kyslíku, apod.), dochází k exponenciálnímu nárůstu jejich buněčné hmoty. Pokud se tyto buňky ale setkají s nějakou limitací (nejčastěji s nedostatkem živin, změnou teploty), dochází k řadě změn, které pomáhají buňkám přežít v nepříznivých podmínkách. Tato fáze postexponenciální aktivity je často nazývána jako tranzitní stav. Změny buněk jsou spojeny s rozvojem motility, kdy bakterie získávají schopnost pohybovat se pomocí bičků [5] a tak směřovat do míst s optimální koncentrací výživových látek. Tento jev se nazývá chemotaxe [13]. Bylo vyzkoušeno, že kromě rozvoje motility bakterie v tomto prostředí iniciují tvorbu biofilmů.

Biofilmy jsou hustě uspořádané multicelulární společenství mikroorganismů, které jsou schopné adheze na povrchy i mezifázová rozhraní. Přednostně se ale tvoří na rozhraní vzduch-voda, než na pevných površích, a to z důvodu aerotaxe buněk. S tvorbou biofilmů je spojena specifická produkce sekundárních metabolitů a významný nárůst odolnosti vůči biologickým, chemickým a fyzikálním útokům [14]. Odolnost biofilmů je úzce spojena s produkcí polymerního matrixu (obvykle exopolysacharidu), který obklopuje tyto strukturní komunity buněk, chrání je před stresovými faktory (osmotický šok, změna pH) a napomáhá zkoncentrování živin a jejich absorpci matrixem přímo k buňkám [15]. Obecně jsou biofilmy často zdrojem perzistentních infekcí. Jsou zodpovědné za vznik zubních kazů a různých druhů infekcí a nemocí [16]. Z průmyslového hlediska jsou biofilmy v mnoha případech škodlivé. Např. přirozené biofilmy mohou snížit přestup tepla v tepelných výměnících a chladicích věžích [17], rozložit membrány pro reverzní osmózu [18], korodovat kovové povrchy a kontaminovat zařízení pro potravinářské procesy [19]. Pokud jsou buňky biofilmu zanořeny do polysacharidového matrixu, stávají se vysoce rezistentní vůči antibiotikům [20]. Proto i po absolvované léčbě antibiotiky a léky buňky biofilmu přežívají, a stávají se zodpovědnými za vracející se příznaky a selhání v medicíně. V tohoto důvodu je kontrola škodlivých biofilmů stejně tak důležitá z klinického hlediska, jako i z hlediska průmyslového [14]. Nicméně existuje také několik případů pozitivního využití tzv. prospěšných biofilmů. Příkladem jsou půdní bakterie, které vytváří strukturní komunity mikrobiálních buněk a kolonizují rhizosféru. V tomto prostředí následně vykonávají důležité činnosti, jakými jsou bioremediace, stimulace růstu rostlin a ochrana před patogeny. Biofilmy *BS* mají také pravděpodobně významnou roli při degradaci organických polymerů v půdě [15].

Nejtypičtějším projevem tranzitního stavu je u bakterie *BS* tvorba teplotně rezistentních, dormantních spor [5]. Sporulace nastává při poklesu živin pod určitou hladinu a to nejčastěji před koncem aktivní fáze rozmnožování buněk [21]. Limitujícími se stávají zejména zdroje uhlíku, dusíku nebo fosforu [5][22]. Vzniklé spory jsou dormantní a nevykazují žádnou metabolickou aktivitu. Důležitá je zde rezistence vůči stresovým podmínkám, které by vegetativní buňku usmrtily. Stresovými faktory jsou teplo, škodlivé chemikálie, ultrafialové záření a vysušení. Tvorba spor trvá přibližně 7 hodin při 37 °C a je závislá na odpovědích tranzitního stavu, kterými bývá kompetence a motilita (bakterie tvořící spory nejsou ani kompetentní ani pohyblivé). Kontrastem je produkce biofilmu, který může být tvořen i během formace spor. Se začátkem sporulace je rovněž spojována sekrece enzymů a antibiotik [5].

Spory mohou přežít bez živin jako metabolicky inaktivní stovky let, možná i déle. Jakmile však přijdou do kontaktu s konkrétními živinami, ztrácí rezistenci a stávají se metabolicky aktivní během několika minut. Proces probíhající při této změně se nazývá germinace neboli klíčení spor, a živiny potřebné pro tento proces jsou různé druh od druhu. Pro *BS* jsou účinnými látkami L-alanin nebo směs asparaginu, glukózy, fruktózy a K⁺ iontů (GFAK). Tyto látky reagují s membránovými receptory spory a v okamžiku dochází k započatí klíčení [5].

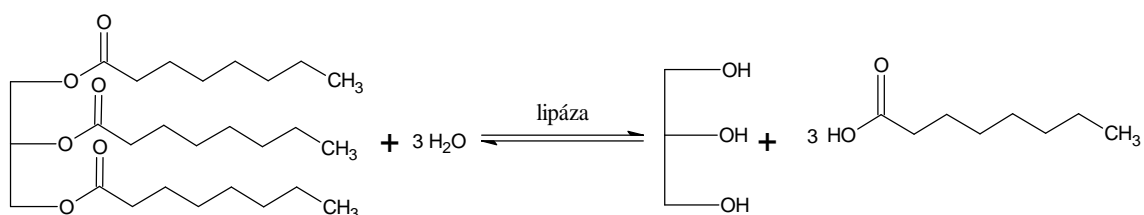
Jednou z nejcharakterističtějších vlastností tranzitního stavu je nahromadění extracelulárních enzymů a antibiotik v živném médiu. *BS* je schopen produkovat různé druhy extracelulárních enzymů. Tyto početné skupiny enzymů jsou schopné degradovat nejrůznější substráty a zároveň tak umožňují bakteriím přežít ve stále se měnícím životním prostředí. Mezi enzymy produkované druhem *BS* patří např. proteázy [23], α -amylázy [24], xylanázy [25], arabinázy [26], lipázy [27] a mnohé další.

3.3 Bakteriální lipolytické enzymy

Mikroorganismy produkují různé druhy lipolytických enzymů, které patří do skupiny serinových hydroláz. Většinou se jedná o extracelulární enzymy, které jsou uvolňovány do prostředí během pozdní exponenciální a částečně stacionární růstové fáze [28]. Tyto lipolytické enzymy jsou schopné katalyzovat hydrolytické štěpení vazeb a zároveň nevyžadují přítomnost kofaktoru [29]. Většina mikroorganismů může produkovat více než jeden typ extracelulárních lipáz, které se liší specifitou vůči substrátům s různou délkou řetězců mastných kyselin [28].

Obecně patří bakteriální lipázy mezi glykoproteiny, některé však byly charakterizovány jako lipoproteiny [29]. Pouze 47 různých lipolytických enzymů z celkem 217 záznamů o lipolytických enzymech bakterií bylo v přístupných databankách identifikováno [30]. Tyto enzymy byly rozděleny do celkem 8 skupin (1. skupina je ještě dále rozdělena na 6 podskupin) na základě podobné homologie aminokyselinové sekvence [31].

Mezi lipolytické enzymy patří jednak takzvané „pravé“ lipázy, triacylglycerol acylhydrolázy (EC 3.1.1.3), a dále karboxylesterázy (EC 3.1.1.1). Lipázy katalyzují stejně jako esterázy hydrolýzu esterových vazeb (viz Obr. 4). Upřednostňují ovšem jako substráty ve vodě nerozpustné triacylglyceroly obsahující řetězce mastných kyselin s počtem uhlíků ≥ 12 . Karboxylesterázy (EC 3.1.1.1) katalyzují hydrolýzu acylglycerolů s uhlíkatým řetězcem mastných kyselin < 12 C. Na rozdíl od lipáz je tedy jejich činnost omezena spíše na krátké, ve vodě rozpustné řetězce mastných kyselin [28].



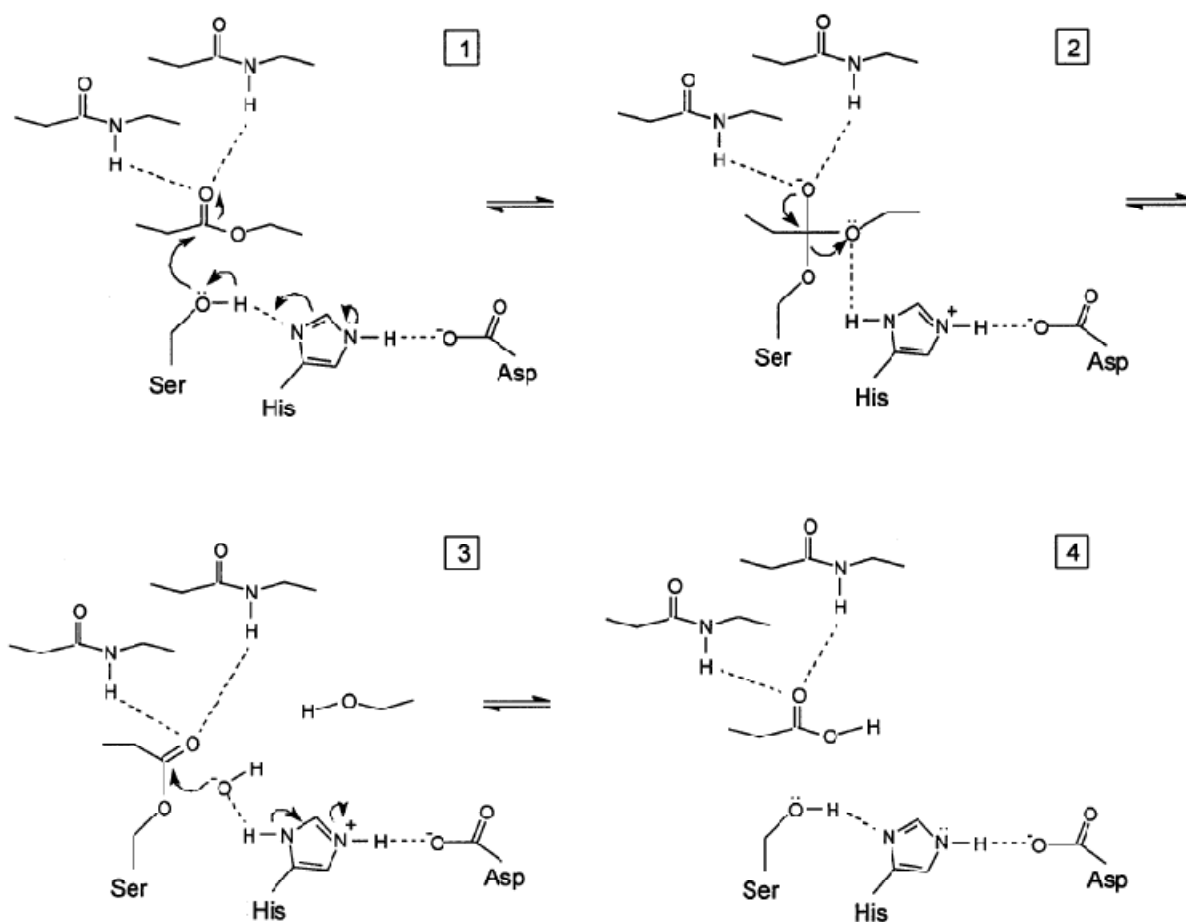
Obr. 4: Schéma enzymaticky katalyzované hydrolýzy triacylglycerolu

K aktivaci triacylglycerol acylhydroláz by mělo dojít v přítomnosti mezifáze, tedy by mělo dojít k významnému zvýšení jejich aktivity, jakmile triglyceridy vytvoří emulzi. Tento jev je nazýván mezifázová aktivace [32][33]. Zároveň studie struktury krystalů několika mikrobiálních lipáz prokázaly, že zaujímají α/β hydrolázový ohyb [34] a u většiny z nich se nachází helikální segment neboli „lid“, které stericly brání aktivní centrum v okamžiku, kdy se enzym nachází v tzv. uzavřené konformaci. V přítomnosti lipidického substrátu dochází ke změně konformace a zvyšuje se tak aktivita enzymu [35][36].

Štěpení esterové vazby díky působení lipolytických enzymů probíhá podobným mechanismem, jakým probíhá štěpení peptidové vazby katalýzou serinových proteáz. Substrát se váže na aktivní centrum enzymu, které je tvořené tzv. katalytickou triádou Ser – His – Asp/Glu (Ser – serin, His – histidin, Asp – aspartát, Glu – glutamát).

Nejprve dochází k nukleofilnímu ataku na uhlík karbonylové skupiny substrátu atomem kyslíku hydroxylové skupiny serinu, jehož nukleofilní charakter je zvýšen přítomností

histidinu (Obr. 5.1). Pro vlastní hydrolázovou aktivitu je tedy nezbytná přítomnost -OH skupina serinu. Dochází tak k tvorbě přechodného tetrahedrálního meziprojektu, který má ve svém středu oxidový anion O^- stabilizovaný interakcemi s dvěma peptidovými NH skupinami. Histidin je současně donorem protonu pro alkoholovou skupinu, která je následně uvolněna ze substrátu (Obr. 5.2). Vzniká kovalentní meziprojekt ("acyl-enzym"), ve kterém je karboxylová kyselina substrátu esterifikována serinem. Příchozí molekula vody je aktivována histidinem a vzniklý hydroxylový ion se nukleofilním atakem váže na uhlík karbonylové skupiny kovalentního meziprojektu (Obr. 5.3). Histidin poté donuje proton, atomu kyslíku serinového zbytku, přičemž dochází k zániku esterové vazby za vzniku acylu a obnovení aktivního místa enzymu (Obr. 5.4) [30].



Obr. 5: Předpokládaný mechanismus katalytického účinku lipáz. 1) Nukleofilní atak substrátu serinem SeO^- . 2) Tranzitní tetrahedrální meziprojekt 3) Kovalentní meziprojekt acyl-enzym 4) Deacylace – vznik produktu a regenerace enzymu [30]

3.3.1 Lipolytické enzymy produkované rodem *Bacillus*

Extracelulární lipolytická aktivita bakterií *BS* je známa již od roku 1979 [37]. Výzkum na molekulární úrovni začal až od roku 1992, kdy byl klonován, sekvencován a opětovně exprimován gen lipázy *lipA* [38][39].

U rodu *Bacillus* bylo popsáno do současné doby 6 extracelulárních lipáz a 2 esterázy [40], pro které je charakteristická Ala-X-Ser-X-Gly pentapeptidová sekvence obsahující katalytický zbytek serinu. U většiny ostatních bakteriálních lipáz je alanin nahrazen glycinem.

V Tab. 1 jsou uvedeny jednotlivé druhy *Bacillus*, které produkují lipázy/esterázy, včetně jejich pentapeptidové sekvence a charakteristiky sekvence aminokyselin. Čtyři velmi úzce související lipolytické enzymy produkované *B. subtilis* (LipA, LipB), *B. pulmitus* a *B. licheniformis* byly sdruženy do společné podskupiny lipáz, neboť sdílí v průměru 75 % identických aminokyselinových zbytků [41]. Tyto enzymy patří mezi lipázy s nejkratším řetězcem s molekulovou hmotností ~19 kDa [36] a také se vyznačují podobnými biochemickými vlastnostmi, zejména maximální aktivitou a stabilitou v alkalickém prostředí [38].

Tab. 1: Lipázy produkované rodem *Bacillus* [41]

Zdroj lipázy/esterázy	podobnost aminokyselinové sekvence (%)	pentapeptidová sekvence*
<i>B. subtilis</i> LipB	100,0	A - H - S - M - G
<i>B. pulmitus</i>	77,3	A - H - S - M - G
<i>B. licheniformis</i> lipáza	74,6	A - H - S - M - G
<i>B. subtilis</i> LipA	74,0	A - H - S - M - G
<i>B. licheniformis</i> esteráza	19,8	A - H - S - M - G
<i>B. stearothermophilus</i>	14,3	A - H - S - Q - G
<i>B. thermoleovorans</i>	12,6	A - H - S - Q - G
<i>B. thermocatenuatus</i> BTL2	12,6	A - H - S - Q - G
modelová sekvence bakteriální lipázy		G - X - S - X - G

*A-alanin, S-serin, G-glycin

Vzhledem k zaměření práce také na identifikaci lipolytických enzymů produkovaných *B. subtilis* (CCM 1999) je věnována pozornost publikovaným poznatkům o struktuře izolovaných a charakterizovaných lipáz produkovaných kmenem *Bacillus* v následující části rešerše.

Eggert a Jaeger zkoumali prostorovou strukturu a zabývali se biochemickou charakterizací lipolytických enzymů produkovaných bakterií BS 168 (*Bacillus* genetic stock center, OH, USA).

- **Struktura lipázy LipA**

Roentgenografická strukturní analýza potvrdila, že lipáza LipA *B. subtilis* má globulární tvar a je tvořena 181 aminokyselinami. Skládá se z jediné kompaktní strukturní domény (Obr. 6a) tvořené šesti β -řetězci uspořádanými v paralelním β -listu, které jsou obklopené α -helixy. Ve struktuře jsou dva α -helixy na jedné straně β -listu a tři α -helixy na druhé straně (jeden z těchto helixů je tvořen pouze čtyřmi aminokyselinovými zbytky) [36].

Aktivní centrum lipáz je tvořeno katalytickou triádou, tedy sekvencí nukleofilního serinu - Ser, histidinu - His a zbytku kyseliny asparagové - Asp [34]. Katalytický Ser77 (Obr. 6b) je lokalizován v ostrém ohybu mezi řetězcem β 5 a helixem α C. Tato oblast se nazývá

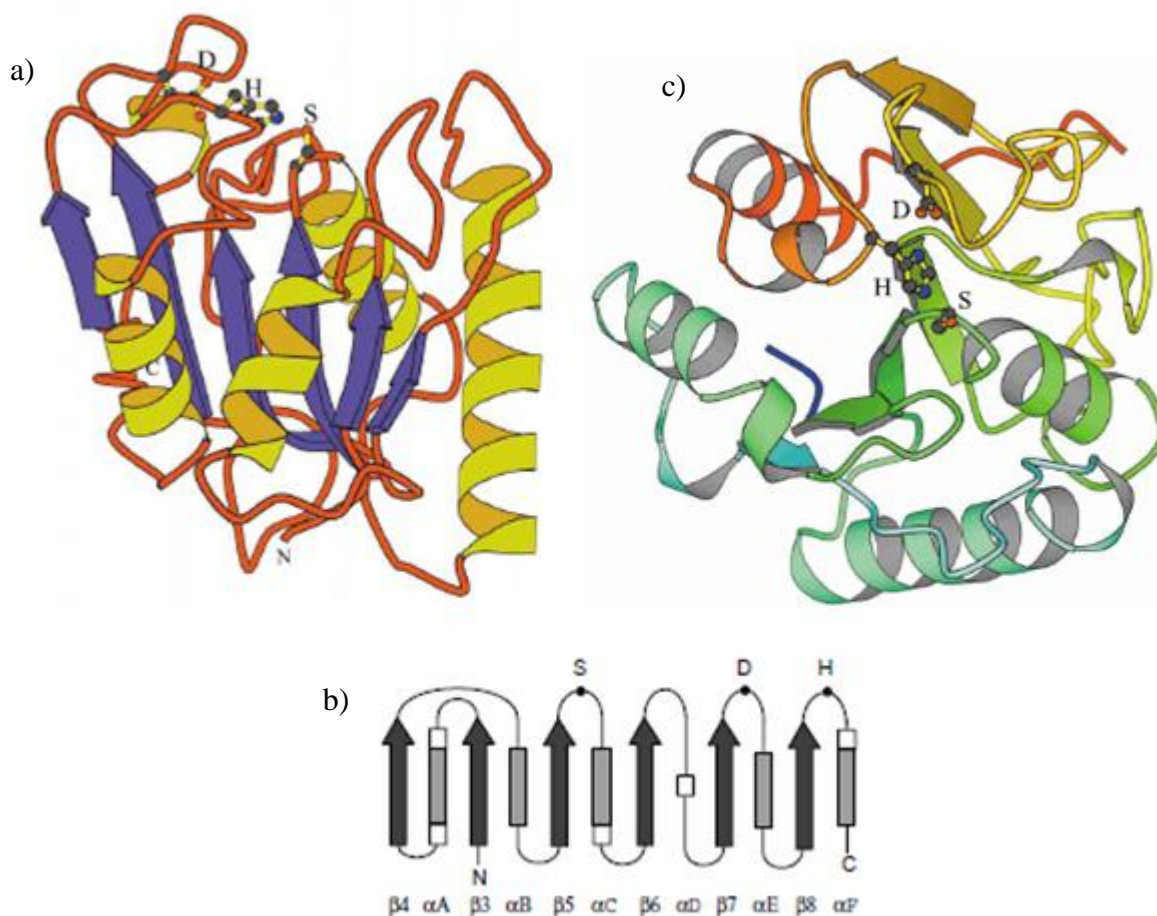
nukleofilní loket (*nucleophilic elbow*). Asp133 je umístěn na konci $\beta 7$ a His156 je situován ve smyčce nacházející se za $\beta 8$. Tyto lokalizace a relativní orientace bočních řetězců jsou podobné těm, které se nachází i v ostatních lipázách [36]. Pro aktivitu lipáz *BS* však nebyla prokázána nutnost mezifázové aktivace jako je tomu u těchto ostatních lipáz, a zároveň se předpokládá, že lipáza s tak krátkým řetězcem nemá „lid“ [36].

- **Struktura esterázy LipB**

Druhý charakterizovaný lipolytický enzym bakterie *BS*, esteráza LipB, se skládá ze 182 aminokyselinových zbytků a je ze 74 % identický s lipázou LipA. 45 aminokyselinových zbytků, které jsou odlišné od LipA, jsou většinou umístěny na povrchu molekuly proteinu a nevytváří žádná specifická uspořádání.

Na základě roentgenografické strukturní analýzy LipA a 74% podobnosti s LipB byl vytvořen model struktury LipB (Obr. 6c). Tento 3D model odhalil, že aktivní centra obou lipáz jsou téměř identická. Pouze aminokyseliny nacházející se na povrchu molekuly, včetně těch, které se nachází na okraji aktivního místa, mohou způsobit rozdíly v jednotlivých katalytických účincích LipA a LipB [42].

Eggert a kol. dále zjistili, že se produkce lipázy LipA a esterázy LipB je závislá na složení živného média. LipA je produkována v nutričním, tak i v minerálním médiu, zatímco LipB se vytváří pouze v nutričním médiu [42].



Obr. 6: a) 3D model struktury LipA *BS* b) topologická sekundární struktura LipA *BS* (Katalytická triáda: S= Ser77, H= His156, D = Asp133) c) 3D model struktury LipB *BS*. Pohled je z rozpouštědla do aktivního místa. Katalytická triáda Ser78 (S), Asp134 (D) a His157 (H) [41]

- **Substrátová specifita lipázy LipA a esterázy LipB**

Mikrobiální lipázy jsou z hlediska substrátové specifity děleny do tří kategorií: nespecifické, regiospecifické a specifické vzhledem k určitým mastným kyselinám [29]. LipA a LipB jsou regiospecifické lipázy, tzv. 1,3-specifické lipázy, které jsou schopné hydrolyzovat pouze primární esterové vazby (esterové vazby na atomech C1 a C3 glycerolu) za vzniku 1,2 (2,3)-diacylglycerolu a 2-monoacylglycerolu [38].

Eggert [40] a Lessuisse [38] studovali vliv různých substrátů na specifickou aktivitu lipáz. Při hydrolyze triacylglycerolů (TAG) vykazovaly LipA i LipB nejvyšší specifickou aktivitu vůči TAG s řetězcí mastných kyselin (MK) o délce C8 (trikaprylin C8:0). Avšak při hydrolyze TAG s delším řetězcem MK, jmenovitě trikaprinu (C10:0), trilaurinu (C12:0) a trioleinu (C18:1), byla specifická aktivita LipA vyšší než aktivita LipB, přičemž LipB nebyla vůbec schopna využít jako substrát TAG s MK o délce 18C. V případě použití *p*-nitrofenyl-esterů jako substrátů byly LipA a LipB schopny hydrolyzovat především řetězce MK o délce C6 - C18, přičemž nejvyšší specifická aktivita se opět týkala kratších řetězců mastných kyselin (C8 - C14). LipB měla v těchto případech absolutní specifickou aktivitu vždy vyšší než LipA. Nejvyšší specifická aktivita LipA i LipB byla zjištěna při hydrolyze vinyl-esterů s krátkými řetězcí MK (vinyl-propionát, vinyl-butyryát). Naopak u fosfolipidických substrátů nebyla nalezena žádná aktivita.

Specifické aktivity enzymů LipA a LipB vůči TAG, *p*-nitrofenyl-esterům, vinyl-esterům a fosfolipidům s různými délkami MK zobrazuje Tabulka 2.

Tab. 2: Specifické aktivity enzymů LipA a LipB vzhledem k různým substrátům. 1 U (unit) je množství enzymu, které hydrolyzuje 1 μ mol substrátu za 1 minutu.[40]

Substrát	Specifická aktivita (U·mg ⁻¹)		Substrát*	Specifická aktivita (U·mg ⁻¹)	
	LipA	LipB		LipA	LipB
Triacetin (C2:0)	12,2	6,8	<i>p</i> -NF-butyryát (C4:0)	92,5	99,3
Tripropionin (C3:0)	125,7	51,8	<i>p</i> -NF-kaproát (C6:0)	123,5	252,1
Tributyryl (C4:0)	262,2	322,2	<i>p</i> -NF-kaprylát(C8:0)	149,5	325,5
Trikaproin (C6:0)	301,9	422,6	<i>p</i> -NF-kaprát (C10:0)	108,5	253,6
Trikaprylin (C8:0)	337,0	512,8	<i>p</i> -NF-laurát (C12:0)	144,7	305,8
Trikaprin (C10:0)	265,8	183,0	<i>p</i> -NF-myristát (C14:0)	163,5	319,9
Trilaurin (C12:0)	46,0	3,0	<i>p</i> -NF-palmitát (C16:0)	129,5	202,5
Triolein (C18:1)	16,23	0	<i>p</i> -NF-stearát (C18:0)	86,5	156,9
Vinyl-propionát	1690	2700	fosfatidylglycerol	0	0
Vinyl-butyryát	1400	650	fosfatidylethanolamin	0	0
			fosfatidylcholin	0	0

* *p*-NF-...*p*-nitrofenyl-

Vysvětlení specifické aktivity enzymů LipA a LipB je pravděpodobně zakotveno ve struktuře aktivního místa a přilehlých oblastí. Při interakci se C8 acylové řetězce substrátů vážou na povrch proteinu a jsou stabilizovány hydrofobními interakcemi. Terminální methylová skupina C8 řetězce se nachází přesně na okraji hydrofobního povrchu a právě tato skutečnost umožňuje upřednostňovat trioktylglycerol jako substrát pro lipázy *B. subtilis* [36].

Vzhledem k tomu, že LipA a LipB mají stejnou velikost a velmi podobný hydrofobní povrch v blízkosti aktivního místa, oba upřednostňují substráty s délkou řetězce C8. Rozdílná substrátová specifita v případě hydrolýzy dlouhých řetězců může být důsledkem odlišné sekvence aminokyselin na okraji aktivního místa [36].

Proto přestože jsou si LipA a LipB vzhledem k nukleotidovému složení dosti podobné, LipB patří do VII. skupiny bakteriálních lipolytických enzymů a vyznačuje se vysokou účinností vůči hydrolýze *p*-nitrofenyl-esterů mastných kyselin, LipA oproti tomu patří do I.4 podskupiny, a je označována jako pravá lipáza se schopností katalyzovat hydrolýzu i TAG s dlouhými řetězci MK [31].

3.3.2 Optimalizace podmínek pro produkci lipolytických enzymů *B. subtilis*

Aby mohlo být dosaženo vysoké produktivity enzymů, je nutné zajistit optimální podmínky jednak pro samotný růst a rozmnožování použitého mikroorganismu, ale také pro samotnou produkci těchto katalyticky účinných proteinů. Podmínky měření je nutné optimalizovat tak, aby změřená aktivita enzymu byla co nejvyšší [43].

Je možné rozlišit dvě základní skupiny požadavků pro optimalizaci podmínek: fyzikální a výživové. Mezi fyzikální požadavky patří optimální teplota, pH, tepelná stabilita nebo i např. intenzita míchání. Druhá skupina zahrnuje přísun vhodných živin, především zdroje uhlíku, dusíku a lipidů. Aktivitu enzymů ve velké míře ovlivňuje také přítomnost různých iontů kovů nebo organický rozpouštědel, které mohou mít aktivační nebo inhibiční účinky.

3.3.2.1 Zdroje uhlíku, dusíku a lipidů

Uhlíkaté sloučeniny mají v živých systémech dvě hlavní funkce: jsou zdrojem uhlíku pro stavbu buněk a zároveň jsou zdrojem energie [44]. Bakterie obecně pro tvorbu lipáz většinou nevyužívají jako výhradní zdroj uhlíku jednoduché cukry ale raději lipidické substráty [45]. Avšak v některých studiích je uváděno, že jako zdroj uhlíku je využívána glukóza, zatímco lipidické substráty jsou považovány spíše za induktory produkce lipáz [46]. Jako induktor mohou sloužit např. Tween 20/80, rostlinné oleje, mastné kyseliny, žlučové kyseliny a triacylglyceroly. Produkce může být také významně ovlivněna přítomností dalších uhlíkatých zdrojů, jako jsou různé cukry a cukerné alkoholy, polysacharidy, syrovátka atd. [29]

Kromě zdroje uhlíku je produkce lipáz ovlivňována i dusíkatými látkami, jejichž přítomnost je v kultivačním médiu rovněž nezbytná [29]. *BS* obecně preferuje pro produkci lipolytických enzymů dusík v podobě peptonu a kvasničného extraktu [47].

Hasan a Hameed [44] použili pro zjištění optimálního složení media pro *Bacillus sp.* (4 kmeny *BS* izolované v půdy a odpadů z koželužen) různé druhy zdroje uhlíku (mannitol, maltóza, dextróza, sacharóza, salicin, fruktóza, glukóza a glycerol). Největší aktivitu lipáza vykazovala v prostředí sacharidů salicinu a fruktózy. Jako nejvhodnější zdroj dusíku byl zjištěn kvasniční extrakt, následoval pepton, trypton a hovězí extrakt. Produkce lipáz byla také zkoumána v závislosti na přítomnosti různých lipidů. Ukázalo se, že nejlepším induktorem lipolytické aktivity je polyoxyethylensorbitanmonooleát (Tween 80), poté olivový olej a nakonec polyoxyethylensorbitanmonolaurát (Tween 20). Také bylo u některých mikroorganismů zjištěno, že zatímco glukóza v živném médiu způsobuje nárůst lipolytické aktivity [48], kombinace glukózy a olivového oleje tuto aktivitu výrazně snižuje [49].

Fadinoglu a kol. [50] ve svých studiích zjistili, že zatímco kombinace olivového oleje se zdrojem dusíku podporuje nárůst lipolitické aktivity, kombinace olivového oleje s dalším zdrojem uhlíku naopak aktivitu snižuje.

3.3.2.2 *Tepelná stabilita, pH a teplotní optimum*

Bakteriální lipázy mají obecně teplotní optimum v rozmezí teplot 30 - 60 °C, avšak studie prokázaly, že některé lipázy mají své optimum i při teplotách nižších [51] i vyšších [52]. Většina bakteriálních lipáz vykazuje pH optimum v neutrálním nebo alkalickém prostředí [1].

Tepelnou stabilitu proteinu stanovovali Eggert a kol. [40] v sérii pufrů s pH 2 - 12. Po 48 hodinové inkubaci při laboratorní teplotě byla spektrometricky stanovena zbytková aktivita enzymu za použití *p*-nitrofenyl-palmitátu jako substrátu. Pro zjištění tepelné stability byl použit pH-termostat a měřena zbytková lipolytická aktivita enzymů při různých teplotách. Nejvyšší aktivita enzymů *LipA* a *LipB* byla naměřena při pH 11 - 12 a oba enzymy zůstaly stabilní až do inkubační teploty 45 °C.

Lesuisse a kol. [38] prováděli optimalizační studii purifikované extracelulární lipázy *BS 168*. Aktivita enzymu byla měřena spektrometricky. Při stanovení pH optima byl jako substrát použit tributylglycerol a při stanovení teplotního optima a tepelné stability *p*-nitrofenyl-palmitát. Výsledky ukázaly, že maximální aktivitu enzym vykazuje při pH 10 a k silnému poklesu aktivity dochází při pH vyšším než 10,5 a nižším než 6,5. Maximální aktivita byla zaznamenána při teplotě přibližně 35 °C a enzym si zachoval téměř 100 % aktivity i po 30 minutách inkubace při 40 °C. Při vyšších teplotách však docházelo k prudkému poklesu aktivity lipáz.

Hasan a Hameed [44] zjišťovali kromě optimálního složení média také vliv teploty a pH. Měření lipolytické aktivity bylo prováděno spektrometricky za použití *p*-nitrofenyl-laurátu jako substrátu. Bylo zjištěno, že enzymy *Bacillus sp.* vykazují maximální aktivitu při pH 8,0 - 9,0 a teplotě 37 °C. Naopak minimální produkce byla zaznamenána při pH 5,0.

3.3.2.3 *Organická rozpouštědla*

Stabilita a aktivita lipáz je obecně testována v přítomnosti organických rozpouštědel jako jsou butan-2-ol (isopropanol), metanol, ethanol, dimethylketon (aceton), propan-1,2,3-triol (glycerol), hexan, heptan, oktan, dekan, benzen, toluen, xylen, styren, etylbenzen, cyklohexan, dimethylsulfoxid, tetrahydrofuran, chloroform a kyselina octová [45]. Lipolytické enzymy produkované bakterií *BS* mají silnou tendenci tvořit agregáty, které do značné míry ovlivňují množství proteinů získaných během purifikace, specifickou aktivitu purifikovaného proteinu i jeho biochemické vlastnosti. Dimethylsulfoxid měl značný stimulační vliv na aktivitu lipolytických enzymů, pravděpodobně v důsledku de-agregačního působení a následného zvýšení množství substrátu přítomného v monomerní formě. Aceton, isopropanol, ethanol nebo pyridin vykazovaly naopak spíše denaturační účinky [38].

3.3.2.4 *Ionty kovů*

Na hodnotu celkové lipolytické aktivity může mít vliv i přítomnost iontů kovů. Dvojmocné kationty stimulují nebo inhibují produkci enzymů. Interpretace účinku těchto iontů je poměrně složitá, jelikož změna aktivity je pravděpodobně způsobena jednak změnou rozpustnosti a chování ionizovaných mastných kyselin a jednak změnami samotných katalytických vlastností enzymu. Kofaktory nebývají pro lipázy obecně potřebné, ukázalo se

však, že přidavek Ca^{2+} do reakční směsi zvyšuje lipolytickou aktivitu. Byly testovány i další dvojmocné kationty (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Sr^{2+}), ale žádný z nich nevykazoval podobný trend. V případě přidání Ca^{2+} přímo k lipáze, nikoliv do reakční směsi, byl stimulační efekt nižší ale stále pozorovatelný. U iontů Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} a Fe^{2+} bylo naopak zjištěno, že způsobují ztrátu katalytické aktivity enzymu a že většina dvojmocných iontů působí spíše jako inhibitor enzymu [38]. Významné snížení lipolytické aktivity bylo pozorováno v přítomnosti těžkých kovů, jako jsou Co^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} , Sn^{2+} [53].

3.3.3 Způsoby kultivace *B. subtilis* pro produkci lipolytických enzymů

U prováděných studií zabývajících se produkcí lipolytických enzymů *BS* byly studovány dva různé způsoby kultivace. V rámci tzv. *solid state* fermentace (SSF) je kultivován mikroorganismus na zvlhčeném pevném substrátu. Druhý způsob představuje tzv. submerzní neboli hloubková kultivace (SmF), kdy se mícháním a provzdušňováním dosahuje homogenního růstu buněk v celém objemu kapalného média. Dochází tak k intenzivnímu rozmnožování, maximálnímu využití živin a zvýšení množství produktů za kratší čas [54].

Ve většině případů jsou bakterie přednostně kultivovány submerzním způsobem a to zejména kvůli vysokým požadavkům na vodní aktivitu (vyšší než 0,9). Existují však některé výjimky, kdy jsou bakterie kultivovány na zvlhčeném pevném substrátu. Pokud jsou bakterie na způsob tohoto růstu dobře adaptované, množství získaných produktů je obvykle vysoké. Takto získané produkty se poněkud liší biochemickými vlastnostmi (např. termotolerance) a náklady na výrobu jsou poměrně nízké. Nevýhodou SSF je ale nedokonalá kontrola přenosu tepla a chlazení a zároveň během fermentace je obtížné dodržet stálou hodnotu pH nebo teploty. Navíc produkty SSF difundují pevným médiem, což vede k nutnosti zavedení extrakčních a purifikačních kroků, které přispívají ke zvýšení nákladů spojených se získáním čistého produktu [54][55]. Dalším faktorem, který ovlivňuje produkci lipáz je přenos kyslíku, který je závislý na koncentraci rozpuštěného kyslíku a rychlosti aerace [56]. Z těchto důvodů je výhodnější spíše submerzní způsob kultivace.

3.3.4 Metody stanovení katalytické aktivity enzymů

Při měření katalytické aktivity enzymu jsou výsledky závislé na použité metodě. Je proto nezbytné veškeré aktivity enzymů měřit za přesně definovaných experimentálních podmínek. Pouze takovéto výsledky je možné srovnávat a interpretovat. V případě, že analyzovaný roztok enzymu obsahuje ještě jiné enzymy, což je častý případ, mohou stanovení významně rušit [43].

Velmi často používané jsou spektrometrické metody. Základem měření je přímá úměrnost mezi změnou koncentrace substrátu nebo produktu za jednotku času a změnou absorpance za stejný časový interval. Při měření lipolytické aktivity se obvykle používá jako substrát *p*-nitrofenylester mastné kyseliny. Aktivita je následně stanovena na základě uvolněného množství *p*-nitrofenolu, které je možné zjistit změřením absorpance ve viditelné oblasti (420 nm), jelikož dochází ke vzniku různě intenzivního žlutého zbarvení v závislosti na aktivitě enzymu [57]. Pro určení specifické aktivity enzymu je nutné znát celkové množství bílkovin ve směsi. Nejčastěji se měření provádí rovněž spektrometricky. Používanou metodou stanovení bílkovin je Lowryho metoda, která kombinuje biuretovou reakci s redukcí fosfomolybdenové a fosfowolframové kyseliny působením tyrosinových (Tyr) a tryptofanových (Trp) zbytků peptidového řetězce [43]. Tato metoda je založená na změně

Cu^{2+} na Cu^+ v alkalickém prostředí. Výsledkem je modré zbarvení, jehož intenzita je závislá na množství Tyr a Trp ve vzorku [58].

3.4 Proteomická identifikace bílkovin

Proteomiku lze definovat jako obor zabývající se systematickou analýzou bílkovin z hlediska jejich identity, množství a funkcí [59]. Pojem proteom zahrnuje všechny bílkoviny, které tvoří převážující součást buněčných struktur a vykonávající prakticky všechny buněčné funkce (převádějí a zpracovávají biologickou informaci, uskutečňují výměnu látek a energie) [60]. Klasický postup představuje *bottom-up proteomika*, kdy je bílkovina nejprve izolována ze směsi, poté rozštěpena na směs peptidů pomocí speciálních enzymů (peptidáz – př. trypsinem), charakterizována hmotnostní spektrometrií [59] a fragmentovaný vzorek každého peptidu vytvářející specifické sekvence analyzován v databázi aminokyselin nebo bílkovin pro identifikaci dané bílkoviny [61].

3.4.1 Identifikace bílkovin metodou peptidového mapování

Peptidové mapování PMF (peptide massfingerprinting) představuje velmi účinnou metodu pro analýzu struktury bílkovin. Samotná technika peptidového mapování se skládá z několika kroků:

1. Separace bílkovin
2. Specifické štěpení bílkovin na řadu peptidových fragmentů
3. Detekce fragmentů a identifikace vzniklé peptidové mapy, která je pro danou bílkovinu charakteristická (tzv. fingerprint)

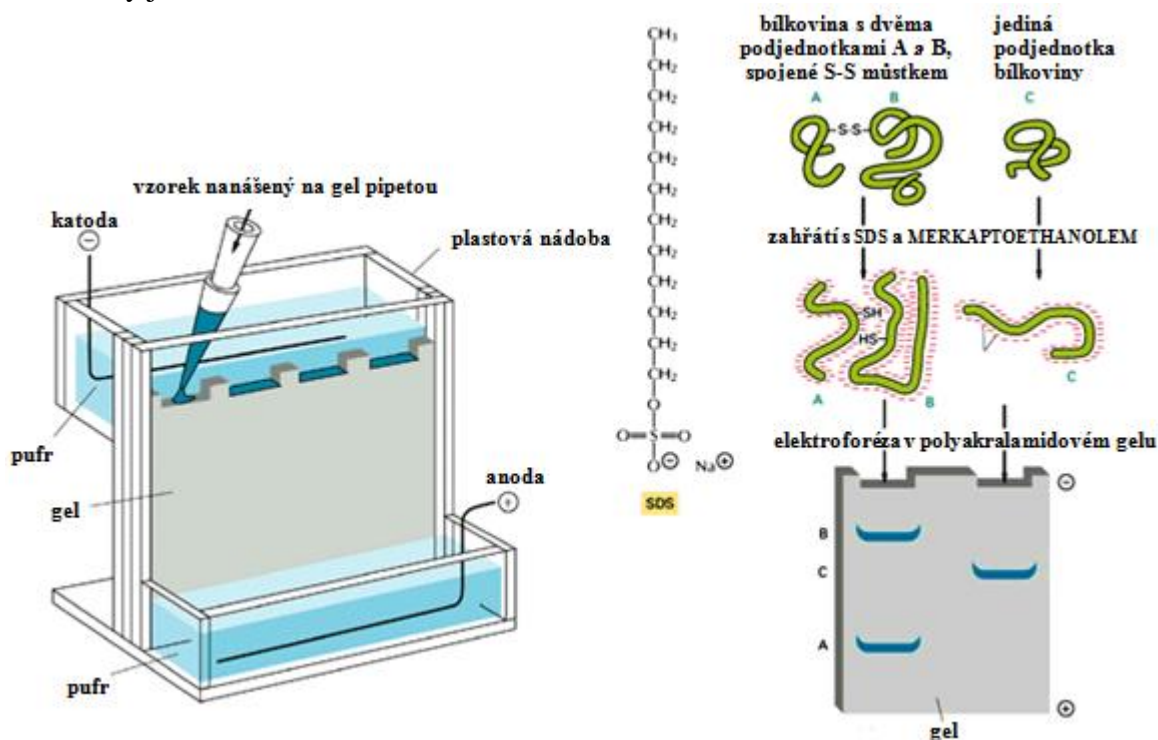
Pro identifikaci je důležité, aby srovnávané bílkoviny vykazovaly vysokou homologii, tedy aby obsahovaly určité identické sekvence. Pokud je homologie v aminokyselinové sekvenci menší než 80 %, rozdíly v bílkovinné struktuře nelze studovat z důvodu velmi malé podobnosti peptidové mapy [62].

3.4.1.1 Separace bílkovin

Před započítím samotné identifikace bílkovin je nezbytné analyzovaný vzorek vhodně upravit. Identifikace bílkovin je převážně založena na jejich purifikaci anebo zakoncentrování a separaci ze směsi bílkovin pomocí chromatografických, elektroforetických nebo jiných metod (ultracentrifugace, afinitní purifikace atd.) [63].

Pro separaci bílkovin se nejčastěji využívají elektromigrační metody založené na elektroforetickém pohybu ionizovaných částic ve stejnosměrném elektrickém poli [62]. V současné době velmi používanou metodu představuje dvourozměrná zónová elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (2D-SDS-PAGE), kdy nejprve dochází k rozdělení směsi bílkovin na základě rozdílného izoelektrického bodu a poté jsou tyto bílkoviny separovány na základě rozdílné velikosti [64]. Jednodušší způsob představuje však jednorozměrná varianta SDS-PAGE. Jejím základem je elektroforéza komplexů denaturovaných bílkovin s anionickým detergentem dodecylsulfátem sodným (SDS). SDS se specificky naváže na bílkovinu, vytvoří se tak komplex bílkovina-SDS, čímž dojde k úplnému potlačení nábojových rozdílů mezi různými bílkovinami. Komplexy bílkovina-SDS jsou v neutrálním a alkalickém prostředí silně negativně nabitě a putují k anodě, přičemž pohyblivost gelem je dána pouze velikostí molekuly. Separované fragmenty

jsou nejčastěji detekovány specifickým barvením (např. ninhydrinem, Commasie Blue), fluorescenčním nebo radioaktivním značením [62]. Princip působení SDS a schéma elektroforézy je znázorněno na Obr. 7 [65].



Obr. 7: Elektroforéza v polyakralamidovém gelu v přítomnosti SDS (SDS-PAGE) [65]

3.4.1.2 Štěpení bílkovin

Dalším důležitým krokem při stanovení peptidové mapy určité bílkoviny je její rozštěpení na menší fragmenty. Pro úplné a reprodukovatelné štěpení je nutné, aby analyzovaná bílkovina byla nejprve denaturována (např. je nutné přerušit S-S vazby). Denaturace se nejčastěji provádí zahřátím nebo rozpuštěním bílkoviny v denaturačním roztoku (např. 6 M HCl, 8 M močovina). Některé vysoce stabilní bílkoviny je nutno před denaturací vhodně modifikovat (např. karboxymethylací nebo redukcí). Pokud však proběhne modifikace neúplně, je možné že proběhne zpětná reoxidace a vznikne nerozpustná polymerní struktura bílkoviny [62].

Štěpení lze provést buď enzymaticky nebo chemicky [65]. Štěpení bílkovin pomocí enzymů je rozšířenější než štěpení specifickými chemickými činidly, které se používají pouze v případech, kdy potřebujeme, aby byla štěpena jen jedna nebo dvě peptidové vazby (např. kyanobromid štěpící v kyselém prostředí methionylové vazby). Výhodou enzymového štěpení je štěpení polypeptidů a bílkovin na více specifických místech a vznik různě dlouhých fragmentů v závislosti na četnosti aminokyselinové sekvence.

Při použití proteolytických enzymů dochází nejen ke štěpení substrátu, ale také probíhá vlastní autolýza proteináz. Výsledná směs pak obsahuje peptidové fragmenty nejen z analyzované bílkoviny, ale také z použitého enzymu, což zhoršuje interpretaci peptidových map [62].

K nejčastěji používaným enzymům patří trypsin a chymotrypsin. Trypsin katalyzuje hydrolýzu peptidových vazeb, na nichž se podílí karboxylovou skupinou bazické aminokyseliny lysin a arginin. Obecně platí, že vazba obsahující lysin je štěpena rychleji než vazba obsahující arginin. Štěpení nejčastěji probíhá při teplotě 37 °C a pH 8 - 8,5 po dobu

několika hodin. Příliš dlouhá doba štěpení určité bílkoviny vede k vysoké autolýze trypsinu, kterou lze zpomalit přidáním milimolární koncentrace Ca^{2+} . Chymotrypsin nemá tak vyhraněnou specifitu jako trypsin. Účinek chymotrypsinu lze jen těžko předpovědět, neboť štěpení je závislé na okolí štěpené vazby. Preferenčně štěpí vazby, na nichž se podílí aromatické aminokyseliny (tryptofan, tyrosin a fenylalanin) a aminokyseliny leucin a methionin. Podmínky štěpení jsou podobné jako u trypsinu. Pokud je doba štěpení krátká, vzniká směs poměrně dlouhých fragmentů. Štěpení delší než 24 hodin však vede ke směsi dostatečně malých peptidů [43][62]. Dalšími používanými enzymy jsou např. extracelulární proteináza ze *Staphylococcus aureus*, subtilisin, papain nebo pepsin [62].

3.4.1.3 Detekce peptidů

Posledním krokem při stanovení peptidových map je detekce separovaných peptidů. Detekce může být provedena pomocí přímého či nepřímého stanovení peptidů. Přímá měření jsou založena na měření určité fyzikální vlastnosti analyzovaného peptidu (např. hmotnostní spektrometrie, absorpční spektrometrie, emisní fluorescenční spektroskopie). Nepřímé metody využívají měření barevných komplexů peptidů vzniklých reakcí se specifickými detekčními činidly nebo měření peptidů značených radioaktivním izotopy [62].

3.4.1.3.1 Hmotnostní spektrometrie (MS)

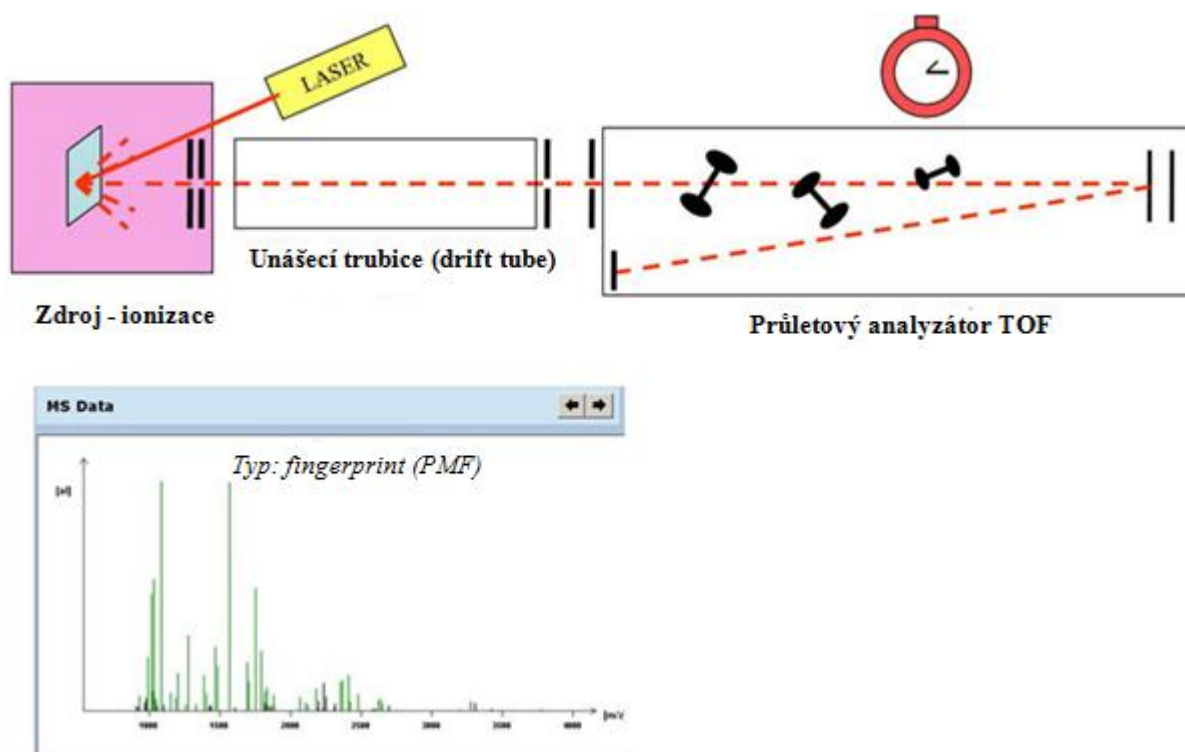
Proteomické přístupy založené na rozvoji hmotnostní spektrometrie (MS) jsou v současné době schopny detekovat s poměrně velkou citlivostí (10^{-9} - 10^{-18} molů) a přesností (~ 0,01 - 0,001 %) přítomnost nízkých koncentrací bílkovin v komplexních matricových biologických systémech [63]. Touto metodou je možné zjistit nejen molekulovou hmotnost, ale také totožnost odpovídajících aminokyselinových zbytků. Molekuly separované látky jsou nejprve ionizovány a poté se nabitě částice rozdělí v analyzátoru podle své hybnosti a energie (separace na základě rozdílného poměru hmotnost/náboj (m/z)) [66].

Hmotnostní spektrum získané ze směsi proteolytických štěpů představuje specifickou charakteristiku bílkoviny. Hodnoty m/z odečtené ze spektra lze v databázových programech porovnat s teoreticky vypočtenými hodnotami m/z peptidů vzniklých specifickým štěpením stejným enzymem všech bílkovin v databázích [67].

Až do relativně nedávné doby byla MS omezena na analýzy poměrně malých molekul. Rozvoj „měkkých“ ionizačních technik v 80. letech umožnil odpaření a ionizaci velkých, polárních a tepelně labilních molekul, jako jsou právě bílkoviny a peptidy, bez vyvolání fragmentace [68]. Vývoj dvou metod – ionizace elektrosprejem (ESI) a laserová desorpce za přítomnosti matrice (MALDI) vyřešil tento problém a otevřel cestu k výrobě nových přístrojů [69]. Iontové zdroje MALDI jsou nejčastěji spojeny s průletovým analyzátozem TOF (Time-of-Flight), zatímco ESI je obvykle spojen s iontovou pastí IT (ion trap) nebo kvadrupólovým (Q) radiofrakvenčním typem analyzátoru [60].

- **MALDI-TOF**

Metoda MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight) je separační technika založená na laserové desorpci a následné ionizaci za přítomnosti matrice usnadňující desorpci s průletovým hmotnostním analyzátozem [70]. Schéma separace je znázorněno na Obr. 8.

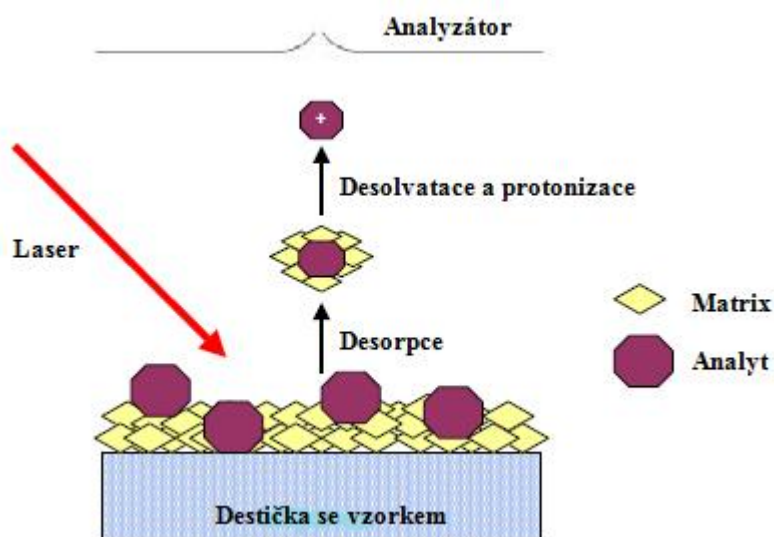


Obr. 8: Separace peptidů na základě jejich poměru m/z pomocí MALDI-TOF/MS [71]

Ionizace

Analyzované bílkoviny/peptidy jsou krystalizovány spolu s matricí (sloučeninou schopnou absorbovat energii z UV záření) a poté přeneseny do plynné fáze pulsním UV laserovým paprskem (Obr. 9) [63][71].

Existuje několik různých matric, které lze použít při analýze pomocí MALDI/MS. Pro analýzu bílkovin je typická 3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicová kyselina. Pokud jsou analyzovány peptidy, obvyklou matricí je α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina (CHCA). Analyt i matrice jsou společně naneseny v podobě teček na kovovou destičku, která je vložena do oblasti MS s vysokým vakuem, a následuje výše popsaná ionizace [72].



Obr. 9: Ionizace analytu v přítomnosti matrice metodou MALDI [69]

Hmotnostní analyzátor TOF (Time-of-flight)

TOF neboli průletový analyzátor patří k jednomu z nejjednodušších analyzátorů. Vzniklé ionty jsou nejprve urychleny elektrickým polem, přičemž získávají stejnou kinetickou energii. Následně ionty vnikají do dlouhé, rovné, evakuované trubice [73]. Ionty se zde pohybují různými rychlostmi a platí, že čím mají ionty menší hmotnost, tím rychleji se budou trubicí pohybovat a naopak. Potom čas, za který iont proletí trubicí je přímým poměrem m/z . Každý iont má tedy charakteristickou dobu průletu trubicí o určité délce [62][74].

3.4.1.3.2 Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS)

Aby bylo možné získat informaci o struktuře nebo peptidové sekvenci, je nezbytné provést fragmentaci již separovaných peptidů. Fragmentaci není možné provést pomocí měkkých ionizačních technik, jakými jsou ESI nebo MALDI. Nicméně použití těchto technik ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS) umožňuje objasnění struktury mnoha peptidů, i když vzniklá MS/MS spektra peptidů bývají často složitá a není jednoduché je správně interpretovat [75].

Podstatou této techniky je schopnost softwarového vybavení přístroje vybrat jednotlivé prekurzorové ionty pro tandemovou MS/MS analýzu. Ty jsou potom fragmentovány v kolizní cele naplněné inertními plyny (xenon, argon nebo dusík) za vzniku dceřiných iontů, které jsou dále změřeny a zobrazeny ve výsledném spektru MS/MS a udávají již aminokyselinovou sekvenci prekurzoru [60][76].

V posledních letech se úspěšně prosazují nové konfigurace iontových zdrojů a hmotnostních analyzátorů, např. MALDI-TOF/TOF, kde je mezi 2 analyzátorů TOF vložena kolizní cela. MALDI-generované prekurzorové ionty jsou v prvním analyzátoru TOF separovány podle poměru m/z , vybrané ionty pak procházejí kolizní celou, kde jsou dále fragmentovány a hmotnosti iontových fragmentů jsou měřeny ve druhém analyzátoru TOF [77].

3.4.2 Proteomické studie extracelulárních bílkovin *B. subtilis*

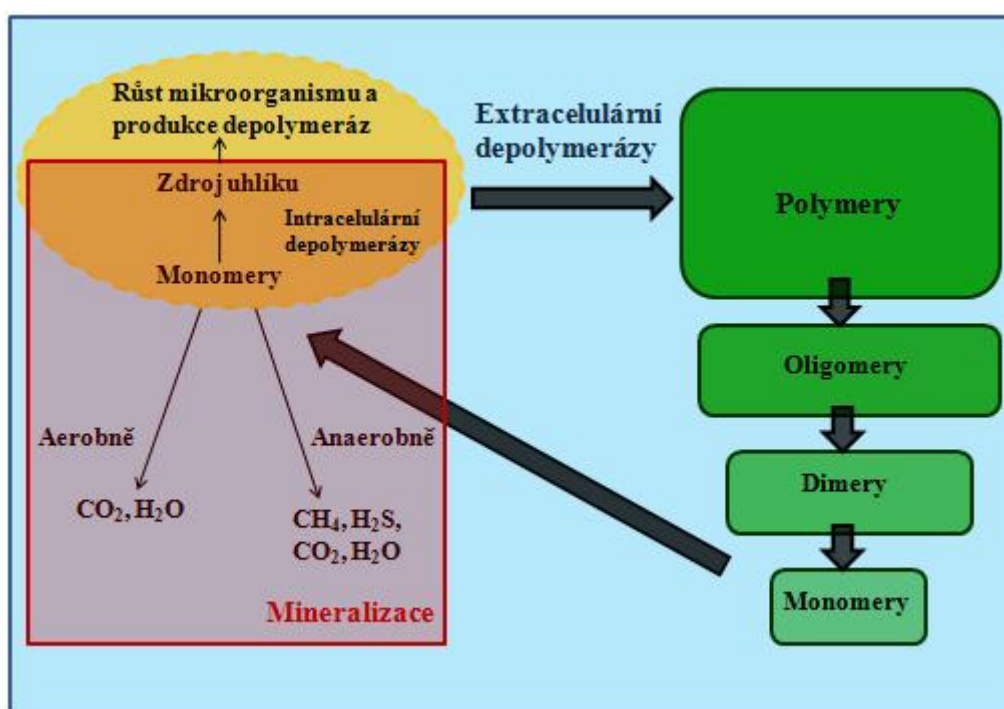
První proteomické přístupy použité pro identifikaci extracelulárního komplementu *B. subtilis* 168 učinili Hirose a kol. [78]. V jejich studiích byly buňky kultivovány v médiu s minimálním obsahem živin. V následujících studiích byl *BS* kultivován např. za nedostatku fosforečnanů [79] nebo v Luria-Bernati (LB) živném médiu (v médiu bohatém na živiny) [80]. Bylo zjištěno, že značný nárůst sekrece bílkovin nastává zejména během postexponenční fáze růstu, a proto byla ve většině případů v této fázi prováděna identifikace extracelulárních bílkovin. Extracelulární bílkoviny byly separovány pomocí dvojrozměrné elektroforézy v polyakrylamidovém gelu (2D-PAGE) a následně identifikovány pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie [79] a N-terminálních aminokyselinových sekvencí [78]. Celkem bylo identifikováno 90 extracelulárních bílkovin, z toho 53 bílkovin s již známými funkcemi a 37 „Y-bílkovin“ s neznámou funkcí. Identifikované extracelulární bílkoviny bakterie *B. subtilis* 168 ve shrnutí zahrnují enzymy související s metabolismem sacharidů, bílkovin nebo peptidů, enzymy zapojené do metabolismu aminokyselin nebo rozkladu DNA a RNA. Dalšími identifikovanými enzymy jsou lipázy, alkalické fosfatázy, fosfodiesterázy, enzymy zapojené do biogeneze buněčné stěny, enzymy pomáhající detoxikaci, bílkoviny potřebné při vlastní syntéze a foldingu, sporulační specifické bílkoviny a bílkoviny s neznámou funkcí. Přehled těchto identifikovaných bílkovin zveřejnili Tjalsma a kol. [81].

Kromě identifikace možných extracelulárních bílkovin *B. subtilis* 168 bylo zkoumáno, jaký vliv má složení živného média na jejich produkci. Hirose a kol. zjistili, že buňky rostoucí v minimálním médiu produkují mnohem méně extracelulárních bílkovin, a zároveň se domnívají, že přítomnost 0,4 % glukózy by mohla způsobovat katabolickou represi. Důvodem této domněnky je fakt, že při 2D-PAGE nebyly identifikovány žádné spoty typické pro extracelulární enzymy, jakými jsou α -amylázy nebo proteázy [78].

3.5 Biodegradace polymerů s využitím enzymového aparátu *B.subtilis*

Pojem biodegradace lze definovat jako schopnost jedné nebo více kultur mikroorganismů využívat syntetické polymery jako výhradní zdroj uhlíku [82].

V přirozených ekosystémech (půda, moře, kompost, aktivovaný kal, apod.) obecně dochází po adhezi mikroorganismů na povrchu plastů ke kolonizaci daného substrátu. Jedná se o hlavní mechanismus zahrnutý do mikrobiální degradace plastů. Poté následuje enzymaticky katalyzovaná hydrolytická degradace polymerních řetězců [83]. V procesu biodegradace polymerů působí dvě kategorie enzymů, a to extracelulární a intracelulární depolymerázy [84]. Během degradace pomocí extracelulárních enzymů dochází ke štěpení polymerního substrátu na kratší řetězce - oligomery, dimery až monomery, které následně procházejí do buňky přes polopropustnou membránu. Uvnitř buňky se na degradaci podílí intracelulární enzymy. Proces, během kterého jsou monomery využívány buňkami jako zdroj uhlíku a zároveň energie za vzniku konečných produktů CO_2 , H_2O (aerobní metabolismus) nebo CO_2 , H_2O , CH_4 a H_2S (anaerobní metabolismus) je nazýván mineralizace. Celý mechanismus mikrobiální degradace je znázorněn na Obr. 10.



Obr. 10: Schéma biodegradace polymerů

Biodegradace je řízena samotnými vlastnostmi polymeru a typem mikroorganismu, který produkuje příslušné enzymy. Každý mikroorganismus vyžaduje různé složení živného média tak, aby byly zajištěny podmínky pro jeho optimální růst a produkci biodegradabilních

enzymů. Kromě potřebných živin jsou důležitými faktory optimální teplota, pH, vlhkost a koncentrace kyslíku. Mezi vlastnosti polymeru patří molekulová hmotnost a distribuce molekulové hmotnosti, teplota tání, modul pružnosti a krystalinita. Biodegradční mechanismy jsou rovněž ovlivňovány vlastnostmi povrchu, jako jsou celková povrchová plocha, hydrofilní nebo hydrofobní vlastnosti povrchu [85]. Obecně platí, že rychlost biodegradace klesá se vzrůstající molekulovou hmotností, tedy monomery, dimery a oligomery jsou mnohem snáze degradovatelné a mineralizovatelné. Vysoká molekulová hmotnost vede k významnému poklesu rozpustnosti a tedy i poklesu rychlosti degradace.

Zástupcem biodegradabilních polymerů je poly(ϵ -kaprolakton) PCL, alifatický polyester, který je syntetizován polymerací za otevření kruhu ϵ -kaprolaktonu. Vyznačuje se kromě vysoké biodegradability i dobrou biokompatibilitou. Proto našel uplatnění v oblasti biomedicíny a obalových materiálů. Z důvodu relativně nízké teploty tání $\sim 60^\circ\text{C}$, nevyhovujících mechanických vlastností a vysoké pořizovací ceny se často používá ve formě kopolymerů nebo blendů [86].

Biodegradace PCL byla studována v přítomnosti řady různých mikroorganismů [87][88]. Publikované degradační studie byly zaměřeny především na využití produkovaných amyláz pro degradaci kopolymerů a blendů PCL se škrobem [89].

Wu a Chang zkoumali možnost degradace obalů na bázi PCL a blendů PCL se škrobem a/nebo jílem působením bakterií *Bacillus sp.* PG01 za účelem vyvinutí biologicky odbouratelného a zároveň kontrolovaně uvolňovaného bakteriálního hnojiva. Enkapsulované buňky *Bacillus sp.* PG01 byly ponořeny do sterilního roztoku NaCl (0,85 %) a inkubovány při teplotě 37°C a počátečním pH 7,0. Rychlost degradace klesala v pořadí PCL/škrob > PCL/škrob/jíl > PCL > PCL/jíl [90].

Rohindra a kol. [91] studovali biodegradaci blendů polykaprolaktonu a polyvinylbutyralu PCL/PVB v přítomnosti kmene *B. subtilis* izolovaného z půdy. Rychlost degradace byla vyšší v přírodních podmínkách (půda) než v laboratorních podmínkách (pH $7,0 \pm 0,2$; živné médium NB (nutrient broth – živný bujón), měněn každé 2 dny) a zároveň tato rychlost vzrůstala se zvyšujícím se zastoupením PCL v blendu.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál a přístroje

4.1.1 Použité chemikálie

- 4-20% Mini-PROTEAN[®]TGX[™]gel
- α -CHCA Matrix: C₁₀H₇NO₃, LaserBio Labs
- Aceton pro HPLC: CH₃COCH₃, Lach-Ner, s.r.o Neratovice
- Acetonitril ACN, Merck
- Azid sodný p.a., Lach-Ner, Neratovice
- Borax p.a. Na₂B₂O₇·10 H₂O – Lach Ner, Naratovice
- Commasie Brilliant Blue G-250
- D-glukóza C₆H₁₂O₆ – Lachema, Brno
- Destilovaná voda H₂O – Fakulta chemická VUT, Brno
- Dihydrogenfosforečnan draselný p.a. KH₂PO₄ – Lach Ner, Neratovice
- Dithiothreitol DTT – J.T. Baker
- Dodecylsírán sodný SDS – J.T.Baker
- Ethanol C₂H₅OH – Merci s.r.o, Brno
- Folin-Ciocalteovo činidlo – fa RNDR. Jan Kulich, Hradec Králové/Říčany
- Glycin – Lachema, Brno
- Hydrogenfosforečnan sodný p.a. Na₂HPO₄·12H₂O – Lachema, Brno
- Hydrogenuhličitan amonný – NH₄HCO₃, Lachema, n. p. Brno
- Hydroxid sodný p.a. NaOH – Lach Ner, Neratovice
- Hovězí sérový albumin – Sigma-Aldrich, Německo
- Chlorid sodný p.a. NaCl – Lach Ner, Neratovice
- Kyselina boritá p.a. H₃PO₃ – Lach Ner, Naratovice
- Kyselina citronová C₆H₈O₇·H₂O – Lach Ner, Naratovice
- Kyselina chlorovodíková p.a. HCl – Lach Ner, Naratovice
- Kyselina orthofosforečná p.a. H₃PO₄ – Lach Ner, Naratovice
- Kyselina octová p.a.CH₃COOH₃, Lachema, Brno
- Kyselina trichloroctová p.a.TCA, Sigma – Aldrich
- Kvasničný extrakt – Himedia Laboratories Limited
- Merkaptofenol p.a. – Merck
- Olivový olej: směs kyseliny olejové, linolové a linoleové – Fluka, Německo
- Pentahydrát síranu měďnatého p.a. CuSO₄·5H₂O – ML chemica; Troubsko
- Pepton – Himedia Laboratories Limited
- *p*-nitrofenol C₆H₅NO₃ – Lach Ner, Neratovice
- *p*-nitrofenyllaurát C₁₈H₂₇NO₄ – Fluka Chemische Fabrik, Německo
- Uhličitan sodný p.a. Na₂CO₃ – Lachema, Brno
- Vinan draselno-sodný tetrahydrát C₄H₄O₆KNa·4 H₂O – Lachema, Brno

4.1.2 Přístrojové vybavení

- Analytické váhy – AND GR-202-EC; Japonsko
- Autokláv, Vaspoteri – Brněnská medicínská technika a.s
- Automatické pipety, Hirschmann, Biohit Proline
- Centrifuga, Eppendorf Concentrator 5301, Hamburg, Německo

- Exsikátor
- Chladicí box
- Kuchyňský vaříč, ETA
- Laminární box AURA mini – Biotech a.s
- LEXT OLS 3000, OLYMPUS
- Lyofilizátor, Labconco
- MALDI-TOF/TOF, 4700 Proteomic Analyzer (Applied Biosystems), Nd:YAG laser (355 nm)
- McFarland denzitometr DEN-1B – LABOSERV s.r.o, Brno
- pH metr – inoLab pH 720, Merci .s.r.o, Brno
- Polypropylenové špičky ZipTip®, Millipore, C₁₈
- Předvážky – Scaltec, USA
- Spektrofotometr – UV/VIS HELIOS DELTA – Thermospectronic, Anglie
- Sušárna – Memmert
- Termostat – Huber
- Termostat – LTE SCIENTIFIC LTD, Anglie
- Mikrocentrifuga – Eppendorf centrifuge 5417R, Německo
- Ultrazvuk, Elma S 30H Elmasonic, Merci s.r.o., Česká Republika
- Vodní lázeň–Polystat cc1, Merci s.r.o., Česká republika
- Vortex – Heidolph, REAX top; Německo
- Inkubátor – Heidolph; Německo

4.1.3 Použité roztoky a jejich příprava

4.1.3.1 *Roztoky pro stanovení lipolytické aktivity*

Fosforečnanový pufr pH 7,2 (50 mM)

- 1,431 g hydrogenuhličitanu sodného Na₂HPO₄·12 H₂O a 0,549 g dihydrogenfosforečnanu draselného KH₂PO₄ bylo rozpuštěno ve 240 ml destilované vody, pH bylo upraveno na hodnotu 7,2 pomocí roztoku NaOH

Roztok p-nitrofenyllaurátu (2,5 mM)

- 0,02 g p-nitrofenyllaurátu bylo rozpuštěno ve 25 ml ethanolu

Roztok p-nitrofenolu (1 mM)

- 13,9 mg p-nitrofenolu bylo rozpuštěno ve 100 ml destilované vody

Roztok uhličitanu sodného (0,1M)

- 1,06 g uhličitanu sodného Na₂CO₃ bylo rozpuštěno ve 100 ml destilované vody

4.1.3.2 *Tlumivé roztoky pro stanovení pH optima*

Citran-fosforečnanový pufr (pH 5; 6; 6,5)

Byly připraveny zásobní roztoky 0,1 M kyseliny citronové (21,01 g C₆H₈O₇·H₂O/1000 ml) a 0,2 M fosforečnanu sodného (71,64 g Na₂HPO₄·12 H₂O/1000 ml)

- pH 5: 24,3 ml 0,1 M kyseliny citronové bylo smícháno s 25,7 ml 0,2 M fosforečnanu sodného a objem byl doplněn na 100 ml destilovanou vodou.

- *pH 6*: 17,9 ml 0,1 M kyseliny citronové bylo smícháno s 32,1 ml 0,2 M fosforečnanu sodného a objem byl doplněn na 100 ml destilovanou vodou.
- *pH 6,5*: 15,4 ml 0,1 M kyseliny citronové bylo smícháno s 34,6 ml 0,2 M fosforečnanu sodného a objem byl doplněn na 100 ml destilovanou vodou.

Kyselina boritá – borax pufr (pH 8; 9)

Byly připraveny zásobní roztoky 0,2 M kyseliny borité (12,4 g H₃BO₃/1000 ml) a 0,05 M borax (19,05 g Na₂B₂O₇·10 H₂O/1000 ml)

- *pH 8*: 50 ml 0,2 M kyseliny borité bylo smícháno s 4,9 ml 0,05 M boraxu a objem byl doplněn na 200 ml destilovanou vodou.
- *pH 9*: 50 ml 0,2 M kyseliny borité bylo smícháno s 59 ml 0,05 M boraxu a objem byl doplněn na 200 ml destilovanou vodou.

Glycin – hydroxid sodný pufr (pH 10)

Byly připraveny zásobní roztoky 0,2 M glycinu (15,01 g /1000 ml) a 0,2 M hydroxidu sodného (8 g NaOH/1000 ml)

- *pH10*: 50 ml 0,2 M glycinu bylo smícháno s 32 ml 0,2 M hydroxidu sodného.

Britton – Robinsonův pufr (pH 11)

Byly připraveny zásobní roztoky 0,04 M kyseliny fosforečné (0,89 ml koncentrované H₃PO₄/1000 ml) a 0,2 M hydroxidu sodného (8 g NaOH/1000 ml)

- *pH 11*: Ke 100 ml 0,04 M kyselině fosforečné bylo přidáno 84 ml 0,2 M hydroxidu sodného

Hodnota pH všech připravených pufrů byla v případě nutnosti upravena na požadovanou hodnotu pomocí 0,1 M NaOH, resp. 0,1 M HCl.

4.1.3.3 Roztoky pro stanovení bílkovin podle Lowryho

Roztok hovězího sérového albuminu (1mg/ml): 0,05 g albuminu/50 ml destil. vody

Roztok A: 2% Na₂CO₃ (20 g/1000 ml), 0,05% vitan sodný (0,05 g/1000ml), 0,1 M NaOH (4g/1000 ml)

Roztok B: 0,1% CuSO₄·5H₂O (1 g/1000 ml)

Roztok C: 45 ml roztoku A + 5 ml roztoku B (vždy čerstvý, ředění 9:1)

Roztok D: Folin-Ciocalteovo činidlo (1 ml FC + 1,6 ml H₂O)

4.1.4 Biologický materiál

- *Bacillus subtilis* CCM 1999 – použitá bakteriální kultura je ze sbírky Česká sbírka mikroorganismů (CCM), Masarykova Univerzita Brno, Přírodovědecká Fakulta

4.1.5 Polymerní materiál

- Poly(ε-kaprolakton) PCL – Sigma-Aldrich
M_w = 14 000, M_n = 10 000 stanovená metodou gelové permeační chromatografie
T_m = 60 °C

4.1.6 Živná média

- **BHIB (Brain Heart Infusion Broth)** – HIMEDIA Laboratories Pvt. Ltd.: Extrakt z telecího mozku 200 g/l; Extrakt z hovězího srdce 250 g/l; Pepton 10 g/l; Dextróza 2,00 g/l; Chlorid sodný 5 g/l, Fosforečnan sodný 2,50 g/l
- **NB (Nutrient Broth)** – HIMEDIA Laboratories Pvt. Ltd.: Pepton 30 g/l; Kvasničný extrakt 10 g/l; Chlorid sodný 5 g/l
- **NBG (Nutrient Broth + Glucose)**: Pepton 30 g/l; Kvasničný extrakt 10 g/l; Chlorid sodný 5 g/l; D-glukóza 20 g/l
- **NBF (Nutrient Broth + Fructose)**: Pepton 30 g/l; Kvasničný extrakt 10 g/l; Chlorid sodný 5 g/l; D-fruktóza 20 g/l
- **NBG+OO (Nutrient Broth + Glucose + Olive Oil)**: Pepton 30 g/l; Kvasničný extrakt 10 g/l; Chlorid sodný 5 g/l; D-glukóza 20 g/l; Olivový olej 1% (w/v)
- **MPA (MasoPeptonový Agar)** – HIMEDIA Laboratories Pvt. Ltd.

4.2 Metody

4.2.1 Příprava mikroorganismu na kultivaci v živném médiu

4.2.1.1 Oživení *B. subtilis* z želatinových disků

Bakteriální kultura byla při oživení z želatinových disků převedena na šikmý masopeptonový agar (MPA). Disky byly nejprve ponechány cca 10 minut při laboratorní teplotě. Následně byl disk přenesen do kondenzní vody MPA pomocí vyžíhané očkovací kličky. Zkumavka byla nakloněna tak, aby suspenze стекла po celém povrchu šikmého agaru a *BS* byl kultivován 2 dny při 30 °C v termostatu. Po 2 dnech byl přeočkován opět na šikmé agary z MPA a ponechán 3 dny kultivovat při 30 °C.

4.2.1.2 Příprava inokula

Po 3 dnech kultivace byl *BS* přeočkován z šikmého agaru do tekutého média a bylo připraveno inokulum. Inokulum bylo tvořeno 100 ml příslušného média, do něhož byly převedeny 2 šikmé agary následujícím způsobem: nejprve bylo do zkumavky s nakultivovanými buňkami sterilně přidáno 0,5 ml sterilní destilované vody. Buňky se uvolnily do půdy otíráním kličky o stěnu pod hladinou kapaliny. Poté byl obsah zkumavek dobře rozmíchán na vortexu a obsah zkumavky byl nakonec sterilně převeden do Erlenmeyerovy baňky. Takto připravené inokulum bylo kultivováno 3 dny na třepačce při laboratorní teplotě a intenzitě míchání 160 rpm. Poté bylo z inokula odebráno 15 ml kultury a zaočkováno s ní živné médium o objemu 150 ml (inokulum tvořilo 10 %). Takto připravená Erlenmeyerova baňka se umístila opět na třepačku a každý den byly prováděny příslušné analýzy.

4.2.1.3 Zkrácená doba přípravy inokula

Po oživení *B. subtilis* z želatinových disků (postup 4.2.1.1) byly buňky rovnou přeneseny do 100 ml tekutého média (byl vynechán krok přeočkování na šikmé agary) a pokračováno stejně jako v případě 4.2.1.2. Na zaočkování 100 ml inokula byly tedy použity 2 šikmé agary s přímo oživenými buňkami z želatinových disků, nikoliv přeočkované buňky.

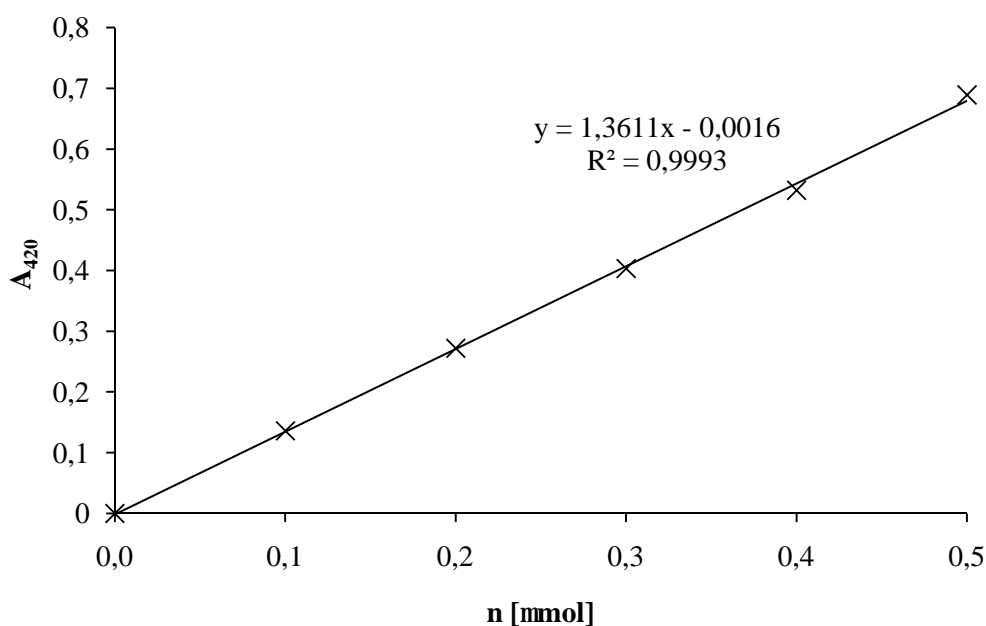
4.2.2 Stanovení kalibračních křivek

4.2.2.1 Stanovení kalibrační křivky *p*-nitrofenolu

Pro sestavení kalibrační křivky *p*-nitrofenolu (*p*-NF) byl použit základní roztok *p*-nitrofenolu o koncentraci 1,0 mM ($\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$). Z tohoto roztoku byla příslušným naředěním připravena kalibrační řada *p*-nitrofenolu o látkovém množství 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 a 0,5 μmol (viz Tab. 3). K roztokům bylo přidáno 3,25 ml 50 mM fosfátového pufru (pH 7,2). Obsah zkumavek byl promíchán a inkubován při 37 °C v termostatu po dobu 30 minut. Poté k nim bylo přidáno 0,5 ml 0,1 M Na_2CO_3 . Následně byla spektrometricky měřena absorbance při 420 nm.

Tab. 3: Kalibrační křivka *p*-nitrofenolu

zkumavka	1	2	3	4	5	Blank
<i>p</i> -NF [ml]	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,0
fosf. pufr [ml]	3,25	3,25	3,25	3,25	3,25	3,25
voda [ml]	0,4	0,3	0,2	0,1	0,0	0,5
Na_2CO_3 [ml]	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
$n_{p\text{-NF}}$ [μmol]	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,0



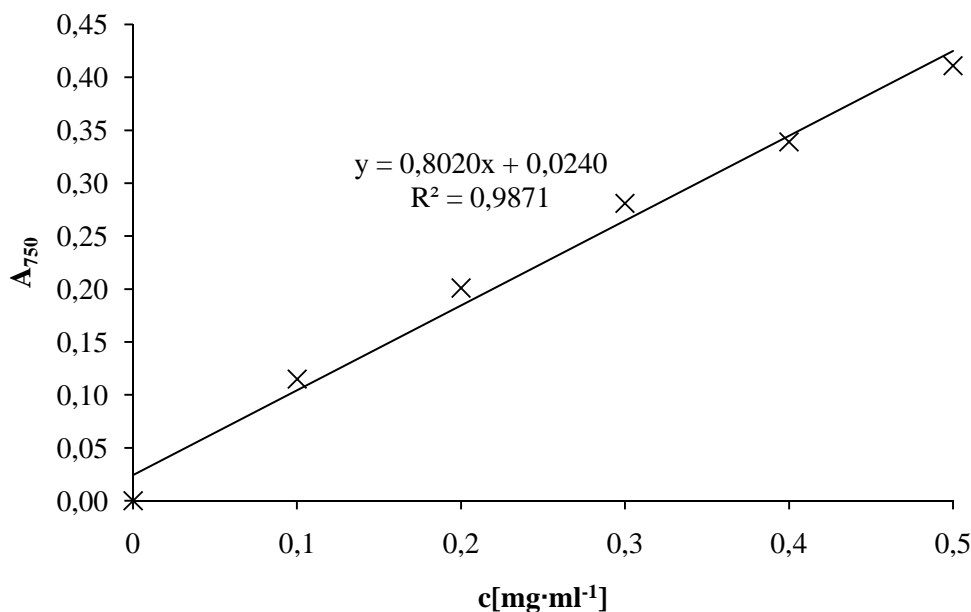
Graf 1: Kalibrační křivka *p*-nitrofenolu

4.2.2.2 Stanovení kalibrační křivky albuminu

Ředěním zásobního roztoku hovězího sérového albuminu o koncentraci 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ byla připravena kalibrační řada s koncentracemi albuminu 0,0 (blank); 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 a 0,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Tab. 4). K takto naředěným vzorkům albuminu bylo přidáno 5 ml roztoku C, směs se nechala 10 minut inkubovat při laboratorní teplotě. Poté bylo přidáno 0,5 ml roztoku D a po 30 minutách inkubace při laboratorní teplotě byla spektrometricky měřena absorbance vzorků při 750 nm.

Tab. 4: Kalibrační křivka albuminu

zkumavka	1	2	3	4	5	Blank
V_{alb} [ml]	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,0
$V_{\text{H}_2\text{O}}$ [ml]	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	1,0
roztok C [ml]	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
roztok D [ml]	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
c_{alb} [$\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$]	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,0

**Graf 2:** Kalibrační křivka albuminu

4.2.3 Spektrometrické stanovení lipolytické aktivity

Princip:

Principem spektrometrického měření lipolytické aktivity je měření množství uvolněného *p*-nitrofenolu v důsledku štěpení *p*-nitrofenylesteru mastné kyseliny působením enzymu po určitou dobu. Intenzita vzniklého žlutého zbarvení je přímo úměrná aktivitě enzymu a měří se při 420 nm.

Postup:

Lipolytická aktivita byla stanovena spektrometricky měřením absorpance při 420 nm. Jako substrát byl použit 2,5 mM roztok *p*-nitrofenyllaurátu (C12:0) v ethanolu. Před namícháním reakční směsi bylo třeba odstranit extracelulární produkty od vlastní buněčné hmoty a to centrifugací při 15000 ot/min (teplota +4°C) po dobu 5 minut. Vzorek enzymu byl odebírán ze supernatantu.

K 0,25 ml enzymu bylo přidáno 3,25 ml 50 mM fosfátového pufru (pH 7,2) a 0,25 ml substrátu (*p*-nitrofenyllaurátu) v ethanolu. Reakční směs byla promíchána a inkubována při 37 °C po dobu 30 minut v termostatu. Poté bylo k reakční směsi přidáno 0,5 ml 0,1 M roztoku Na_2CO_3 , směs byla opět promíchána a byla změřena absorpance při

420 nm. Jako blank byl použit vzorek, který místo 0,25 ml *p*-nitrofenyllaurátu obsahoval 0,25 ml destilované vody.



Obr. 11: Ilustrativní obrázek - spektrometrické měření lipolytické aktivity

Vyjádření aktivity:

Enzym má aktivitu 1 jednotka (U), jestliže dojde k uvolnění 1 μ molu *p*-nitrofenolu za minutu (za přesně definovaných podmínek testu).

Výpočet lipolytické aktivity:

Při výpočtu lipolytické aktivity se vychází z rovnice lineární regrese získané vyhodnocením kalibrační křivky *p*-nitrofenolu.

Vzorec pro výpočet lipolytické aktivity:

$$a = \frac{A_{420} + n_b}{n_a \cdot V \cdot t}, \text{ kde je}$$

a	lipolytická aktivita enzymu [$\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1} = \text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$]
A_{420}	absorbance naměřená u jednotlivých vzorků
t	doba inkubace [min]
V	objem enzymu [ml]
n_b, n_a	hodnoty z rovnice lineární regrese potřebné pro výpočet ($A = n_a \cdot n + n_b$)

4.2.3.1 Stanovení optimálního živného média pro produkci lipolytických enzymů

Pro stanovení optimálního živného média byla vybrána a testována různá živná média. Byla měřena lipolytická aktivita podle bodu 4.2.3 a zjišťováno, v kterém médiu je aktivita nejvyšší.

4.2.3.2 Stanovení teplotního a pH optima

Teplotní optimum bylo stanovováno stejně jako při stanovování lipolytické aktivity v bodě 4.2.3, ale při různých teplotách: 30, 35, 37, 40, 45 a 50 °C. Teplota, při které byla aktivita

nejvyšší, byla poté použita při měření pH optima. Měření probíhalo stejným způsobem ale za použití různých pufrů, konkrétně o hodnotách:

pH 5; 6; 6,5 – citrát-fosforečnanový pufr

pH 7,2 – fosfátový pufr

pH 8; 9 – kyselina boritá-borax

pH 10 – glycin-NaOH

pH 11 – Britton-Robinsonův pufr

4.2.3.3 Stanovení tepelné stability

Tepelná stabilita byla měřena stejným způsobem jako v bodě 4.2.3, pouze s tím rozdílem, že inkubační doba trvala 1 hodinu. Na stanovení teplotní stability byly použity teploty 30; 40; 50; 60 a 70 °C.

4.2.3.4 Stanovení vlivu přítomnosti olivového oleje na lipolytickou aktivitu

Do živného média, v jehož prostředí byla lipolytická aktivita nejvyšší, bylo přidáno 1 % (w/v) olivového oleje a porovnávána aktivita enzymu v médiu bez přítomnosti lipidického zdroje (NBG) a v jeho přítomnosti (NBG+OO) měřením lipolytické aktivity podle bodu 4.2.3.

4.2.4 Stanovení nárůstu biomasy (Růstová křivka)

Nárůst biomasy byl měřen dvěma různými způsoby: spektrometricky a denzitometricky.

4.2.4.1 Spektrometrické stanovení nárůstu biomasy

Nárůst buněčné hmoty byl měřen spektrometricky při vlnové délce 660 nm. V určitých časových intervalech bylo odebíráno médium z kultivace a intezita zákalu byla měřena proti čistému živnému médiu.

4.2.4.2 Denzitometrické stanovení nárůstu biomasy

Denzitometr (Obr. 12) je přístroj určen k měření turbidity/zákalu roztoků v rozmezí 0 - 15,0 jednotek stupnice dle McFarlanda. Princip měření je založen na měření optické absorpce s digitálním zobrazením výsledků v McFarland jednotkách na displeji přístroje.

Buňky byly pro měření kultivovány ve zkumavkách tvaru L a v určitých časových intervalech byl měřen zákal.



Obr. 12: Denzitometrické měření nárůstu/koncentrace biomasy

4.2.5 Spektrometrické stanovení bílkovin podle Lowryho

Princip:

Stanovení je založeno na spojení biuretové reakce (vazba Cu^{2+} na peptidové vazby v alkalickém prostředí) s redukcí Folin-Ciocalteova činidla (směs fosfowolframové a fosfomolybdenanové kyseliny) bílkoviny na komplexy molybdenanové modři. Redukce je způsobena především oxidací tyrosinu a tryptofanu, které jsou vázány v peptidovém řetězci. Intenzita modrého zbarvení je přímoúměrná množství těchto aminokyselin a měří se při 750 nm.

Postup:

Ze supernatantu, který byl použit i na stanovení lipolytické aktivity, byl odebrán 1 ml vzorku. K vzorku bylo přidáno 5 ml roztoku C a směs nechána 10 minut inkubovat při laboratorní teplotě. Poté bylo přáno 0,5 ml roztoku D a po 30 minutách inkubace byla měřena absorbance při 750 nm.

Výpočet množství bílkovin:

Při výpočtu množství bílkovin ve vzorku se vychází z rovnice lineární regrese získané vyhodnocením kalibrační křivky získané Lowryho metodou.

Vzorec pro výpočet celkového množství bílkovin:

$$c = \frac{A_{550} - c_b}{c_a} \cdot f, \text{ kde je}$$

c	množství bílkovin [$\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$]
A_{550}	absorbance naměřená u jednotlivých vzorků
f	ředící faktor
c_a, c_b	hodnoty z rovnice lineární regrese potřebné pro výpočet ($A = c_a \cdot c + c_b$)

Vzorec pro výpočet specifické aktivity:

Jedná se o aktivitu vyjádřenou v $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$:

$$a_{sp} = \frac{a}{c}, \text{ kde je}$$

a_{sp}	specifická aktivita enzymu [$\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$]
a	lipolytická aktivita enzymu [$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1} = \text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$]
c	množství bílkovin [$\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$]

4.2.6 Identifikace bílkovin metodou peptidového mapování (PMF)

Princip:

Identifikace bílkovin metodou peptidového mapování je založena na separaci bílkovin zejména pomocí elektroforetických metod, na následném vyříznutí bandů z gelu, jejich

redukci, alkylaci a štěpení proteázami na peptidy. Peptidy jsou nakonec identifikovány pomocí hmotností spektrometrie a aminokyselinové sekvence porovnány s databází.

4.2.6.1 Úprava vzorku pro identifikaci bílkovin

Vzorky byly odebrány během kultivace *BS* prováděné v živném médiu NBG a NBG+OO v daných časových intervalech (0, 24, 48 a 72 hodin) a zamrazeny. V tomto stavu byly posléze vysušeny pomocí lyofilizátoru a následně rozpuštěny v 1 ml vody. Vysrážení bílkovin probíhalo pomocí směsi 10% TCA/acetone při teplotě -20 °C přes noc. Poté následovala centrifugace vzorků po dobu 10 minut při 90 000 rpm. Supernatant byl odstraněn a vzorky vysušeny.

4.2.6.2 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s SDS (SDS-PAGE)

- Separací gel

Pro elektroforézu byl použit již hotový gradientový gel Mini-PROTEAN[®] TGX[™] (4-20%).

- Elektrodový pufr

Elektrodový pufr byl připraven rozpuštěním 3 g TRIS, 14,4 g glycinu a 1 g SDS v 1000 ml destilované vody.

- Vzorkovací pufr

Roztok A: 3 g TRIS rozpuštěné v 50 ml destilované vody, dotitované na pH 6,8 a doplněné do 100 ml destilovanou vodou.

Roztok B: 10 g SDS doplněné do 100 ml destilovanou vodou

Roztok C: 10 mg bromfenolové modři rozpuštěné v 1 ml roztoku A

Vzorkovací pufr se skládal z 2,4 ml roztoku A, 2 ml roztoku B, 3 ml glycerolu, 0,5 ml 2-merkaptóethanolu, 2 ml destilované vody a 0,1 ml roztoku C. Takto připravený pufr byl smíchán v poměru 19:1 s merkaptóethanolem a dále použit pro standard a vzorky.

Standard BioRad Broad Range byl smíchán v poměru 15:1 se vzorkovacím pufrem. Vysušené vzorky byly rozpuštěny v 200 µl vzorkovacího pufru, 10 minut povařeny společně se standardem a poté krátce zamíchány na vortexu. Jelikož bylo pH vzorků dosti kyselé (žlutá barva vzorků), bylo k nim přidáno 100 µl 1M bazického TRIS (vzorky změnil barvu na modrou). Takto připravené vzorky byly společně se standardem napipetovány v množství 13 µl do mezer separačního gelu. Gel byl vložen do vany, která byla následně doplněna elektrodovým pufrem.

Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 160 V po dobu 50 minut. Počáteční hodnota procházejícího proudu byla 100 mA, konečná 58 mA.

4.2.6.3 Barvení gelu

Po proběhnutí elektroforézy byl gel obarven pomocí barviva Commašie Brilliant Blue G-250.

Barvicí roztok obsahoval 0,08% Commašie Brilliant Blue G-250, 8% síran amonný, 1,6% kyselinu fosforečnou a 20% methanol. Jako fixační roztok byla použita 12% TCA trichloroctová kyselina. Gel byl vložen do misky se 100 ml takto nachystaného fixačního roztoku a nechán 30 minut na třepačce (intenzita 20 rpm). Poté byl fixační roztok odlit a gel byl třikrát po pěti minutách promyt destilovanou vodou. Nakonec se nechal barvit přes noc barvicím roztokem.

4.2.6.4 Vyříznutí proteinů z polyakrylamidového gelu

Gel byl po odstranění barvicího roztoku promyt dvakrát po deseti minutách vodou. Čistým skalpelem byly vyřezány vybrané bandy, a to tak, aby byla co nejvíce omezena přítomnost okolního gelu. Bandy byly rozřezány na rozměry o velikosti přibližně 1x1 mm a přeneseny do mikrozkušavky o objemu 1,5 ml.

4.2.6.5 Omývání kousků gelu

Kousky gelu byly dvakrát po 15 minutách promyty 50 µl směsí acetonitril (ACN)/voda v poměru 1:1. Po odstranění kapaliny byly kousky promyty 50 µl 100% ACN. Po zbělení a sražení kousků gelu k sobě byl ACN odstraněn a zpětně rehydratován pomocí 50 µl 0,1 M NH_4HCO_3 . Po pěti minutách bylo přidáno stejné množství ACN, aby byly kousky v roztoku v poměru $\text{NH}_4\text{HCO}_3/\text{ACN}$ 1:1. Po 15 minutách byla odstraněna veškerá kapalina a kousky gelu vysušeny na vakuové centrifuze.

4.2.6.6 Redukce a alkylace

Ke kouskům vysušeného gelu bylo přidáno 40 µl 10 mM dithiothreitolu DTT v 0,1 M NH_4HCO_3 (7,7 mg DTT/5 ml 0,1 M NH_4HCO_3). Proteiny byly redukovány po dobu 45 minut při 56 °C. Po ochlazení na laboratorní teplotu byl supernatant odstraněn a přidáno 40 µl 55 mM iodacetamidu v 0,1 M NH_4HCO_3 (1,1 mg iodacetamidu/1 ml 1 M NH_4HCO_3). Zkušavky byly ponechány 30 minut při laboratorní teplotě ve tmě. Poté byl iodacetamid odstraněn, do zkumavek přidáno 40 µl 0,1 M NH_4HCO_3 a po pěti minutách stejné množství ACN. Gelové kousky byly následně vysušeny ve vakuové centrifuze.

4.2.6.7 Štěpení gelu

Vysušené kousky gelu byly při 4 °C převrstveny 50 µl roztoku obsahujícího 1 ml 50 mM NH_4HCO_3 , 1 ml 5 mM CaCl_2 a 12,5 µg/µl trypsinu (chymotrypsinu). Po 45 minutách, kdy byl roztok částečně gelem absorbován, byl tento roztok nahrazen stejným množstvím stejného roztoku, ale tentokrát bez trypsinu. Enzymatické štěpení probíhalo přes noc při 37 °C a bylo poté ukončeno přidáním 20 µl 5% TFA.

4.2.6.8 Extrakce peptidů

Během probíhajícího štěpení došlo k uvolnění hlavního podílu bílkovin z gelu do roztoku. Tento roztok byl proto převeden do nových zkumavek. Bylo nutné provést extrakci zbylých bílkovin a to pomocí 40 µl směsi 0,1% roztoku TFA/ACN v poměru 1:1. Po 15 minutách v ultrazvuku byl supernatant odebrán a přenesen do zkumavek s již odebraným prvním extraktem. Proces byl opakován ještě dvakrát.

4.2.6.9 ZipTip®

ZipTip pipetovací špičky jsou 10 µl propylenové špičky s lůžkem chromatografického média C_{18} fixovaném na jejím konci. Slouží k purifikaci a zakoncentrování peptidů, bílkovin nebo i oligonukleotidů.

Chromatografické médium bylo aktivováno 3x navlhčením náplně 50% ACN. Následně byla špička 3x promyta 0,1% TFA. Vzorek byl pomalu pipetou napouštěn a vypouštěn (asi 10x) do zkumavky, aby došlo k absorpci na chromatografické médium. Poté byla špička 2x promyta 10 µl 0,1% TFA. Nakonec byly peptidy uvolněny do 7 µl směsi 0,1% TFA/ACN v poměru 1:1.

4.2.6.10 Hmotnostní spektrometrie

Z důvodu provedení analýzy pomocí MALDI-MS, bylo nutné nanést připravené vzorky společně se standardem na řádně očištěnou MALDI destičku a převrstvit matricí.

Matrice – 10 mg kyseliny α -kyanoskořicové CHCA bylo rozpuštěno v 1 ml 0,1% TFA/ACN (poměr 1:1). Na desku bylo nanášeno 0,45 μ l vzorku a poté stejné množství matrice (každý vzorek byl nanášen vždy 3x). Standard (peptide mix diluted) byl naředěn s matricí v poměru 1:9 (2 μ l standardu a 18 μ l matrice) a nanášen na kalibrační spoty.

Bylo provedeno měření a výsledky porovnány s databází.

4.2.7 Studium vlivu lipáz *Bacillus subtilis* na degradaci poly(ϵ -kapolaktonu) PCL

Po provedení optimalizace podmínek pro produkci lipáz *BS* byla provedena série degradačních experimentů poly(ϵ -kapolaktonu) PCL v živném médiu NBG při teplotě 30 °C a počáteční hodnotě pH 7,0.

4.2.7.1 Příprava polymeru pro degradační experiment

Pro degradační experiment byl polymer připraven ve formě fólie. Byly použity tři různé metody přípravy s cílem připravit fólie o tloušťce přibližně 250 μ m:

1. PCL fólie byla připravena lisováním pomocí laboratorního lisu Fontijne. Mezi leštěné nerezové plechy opatřené PET folií byl nanášen PCL ve formě prášku. Lisování bylo prováděno při teplotě 65 °C po dobu 5 minut.
2. Do připravených hliníkových forem o průměru 3 cm bylo naváženo 0,55 g polymeru ve formě prášku. Formy byly temperovány na varné desce až do teploty tání PCL. Tavenina PCL byla prudce ochlazená ponořením do chladicí lázně o teplotě 4 °C (voda/led).
3. 2% roztok PCL v dichlormetanu (doba přípravy 24 hodin) byl převeden do Petriho misek a ponechán volně odpařovat po dobu 48 hodin.

Ze všech připravených filmů byly sklapelem vyřezány čtvercové vzorky o rozměrech 1,0 x 1,0 cm, které byly následně sušeny do konstantní hmotnosti. Před biodegradačním experimentem byly vzorky zváženy na analytických vahách a sterilizovány UV zářením po dobu 30 minut na každé straně v laminárním kultivačním boxu (Bioair a Euro lone Division).

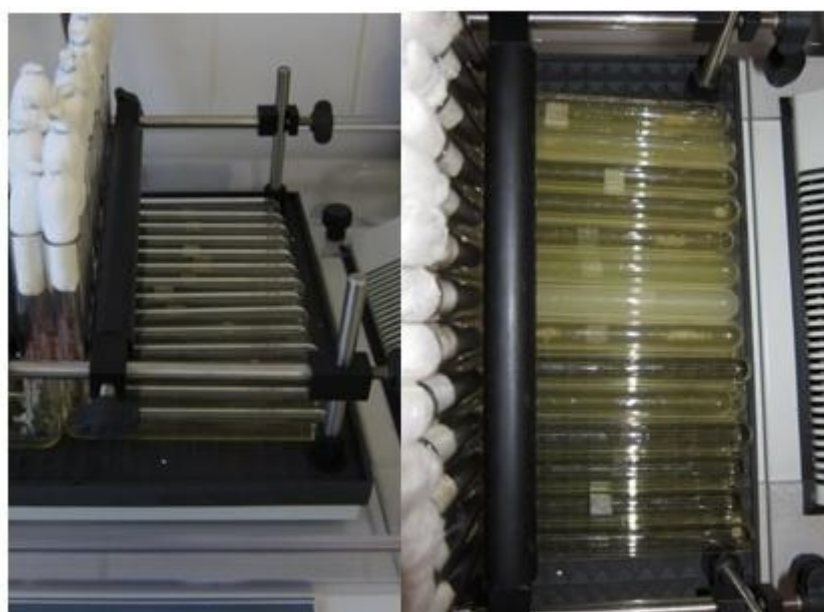


Obr. 13: Příprava polymeru. Film vzniklý odpařením 2% roztoku PCL v dichlormetanu

4.2.7.2 *Biodegradace PCL folií*

Degradační experimenty PCL fólií byly prováděny v tzv. L-zkumavkách. Do sterilních zkumavek byly opatrně vloženy vysterilizované vzorky polymeru. Následně bylo do zkumavek napipetováno 6 ml živného média NBG (pH 7,0). Do zkumavek, které sloužily jako kontrola, bylo přidáno 0,02 % (w/v) azidu sodného pro zabránění případné kontaminace okolními mikroorganismy. Do zkumavek, ve kterých byla testována degradace polymeru v přítomnosti *Bacillus subtilis*, bylo přidáno 0,6 ml inokula připraveného podle bodu 4.2.1.3. Takto připravené zkumavky byly umístěny na třepačku při teplotě 30 °C a míchání 200 rpm (pro zajištění dostatečného přístupu kyslíku). V průběhu kultivace byl denzitometricky měřen zákal a porovnávány hodnoty v biodegradačních zkumavkách (s polymerem i mikroorganismem; +PCL, +BS) a v dvou různých typech kontrolních zkumavek:

- A. Zkumavky s polymerem, bez mikroorganismu (+PCL, -BS)
- B. Zkumavky s mikroorganismem, bez polymeru (-PCL, +BS)



Obr. 14: Degradační experiment v L-zkumavkách

4.2.7.3 *Stanovení zbytkové lipolytické aktivity a úbytku hmotnosti polymeru*

Po ukončení degradačního testu byla ve všech médiích měřena zbytková lipolytická aktivita podle bodu 4.2.3. Vzorky polymerů byly důkladně opláchnuty destilovanou vodou, nechány vysušit do konstantního úbytku hmotnosti a dále analyzovány.

4.2.7.4 *Konfokální laserová rastrovací mikroskopie (CLSM)*

Konfokální mikroskopie je optickou zobrazovací technikou využívající bodového rastru laseru po povrchu vzorku. Díky konfokálnímu principu je dosaženo 3D zobrazení pozorovaného vzorku. K vytvoření kontrastu je v převážné většině využíváno fluorescence (biologické vědy) nebo reflexe (materiálové vědy). Těto metody bylo využito pro bližší zkoumání povrchu degradovaných polymerních vzorků. Povrch vzorků PCL byl analyzován na přístroji LEXT OLS 3000, OLYMPUS.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Optimalizace podmínek pro produkci lipolytických enzymů *B. subtilis*

Pro optimalizaci podmínek produkce lipolytických enzymů *B. subtilis* bylo nejprve stanovováno optimální živné médium. V tomto optimálním živném médiu byly následně zkoumány biochemické vlastnosti, jako jsou teplotní optimum, pH optimum a tepelná stabilita lipolytických enzymů produkovaných *BS*. Rovněž byl sledován vliv přítomnosti olivového oleje jako potenciálního induktoru produkce lipolytických enzymů a také sledován vztah mezi lipolytickou aktivitou a měnící se hodnotou pH živného média v průběhu kultivace.

5.1.1 Optimalizace živného média

Na základě literární rešerše byla zvolena série tří živných médií: BHIB (Brain Heart Infusion Broth), NB (Nutrient Broth) a NBG (Nutrient Broth + Glucose). Tato nutriční média se lišila zejména různými zdroji uhlíku, resp. dusíku. Z pohledu celkového nutričního složení se jednalo o základní médium tj. NB, které se běžně používá pro kultivaci *Bacillus subtilis* [92]. Dále bylo toto médium obohaceno o monosacharid glukózu – NBG, používaného z důvodu stimulace produkce lipázy [93]. Pro srovnání bylo použito nutričně bohaté živné médium BHIB. Tab. 5 shrnuje složení jednotlivých živných médií.

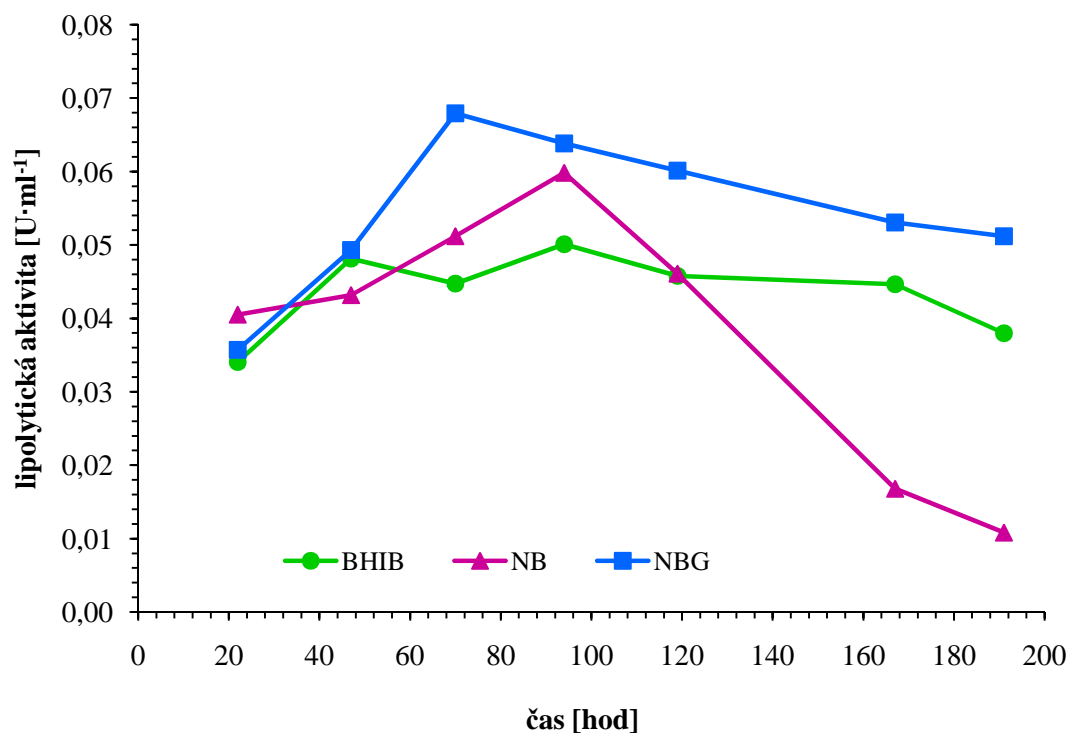
Tab. 5: Přehled médií použitých na stanovení optimálního média pro produkci lipolytických enzymů

Médium	Složení	Význam/zdroj živin
BHIB	Extrakt z telecího mozku (200 g/l)	uhlík, dusík, vitamíny
	Extrakt z hovězího srdce (250 g/l)	
	Dextróza (2 g/l)	uhlík
	Pepton (10 g/l)	aminokyseliny, dusík, síra a fosfor
	Chlorid sodný (5g/l)	osmotické podmínky
	Fosforečnan sodný (2,5 g/l)	pufr
NB	Pepton (10g/l)	aminokyseliny, dusík, síra a fosfor
	Kvasniční extrakt (10 g/l)	dusík, vitamíny
	Chlorid sodný (5 g/l)	osmotické podmínky
NBG	Pepton (10g/l)	aminokyseliny, dusík, síra a fosfor
	Kvasniční extrakt (10 g/l)	dusík, vitamíny
	Chlorid sodný (5 g/l)	osmotické podmínky
	D-glukóza (20g/l)	uhlík a energie

Kultivace prováděná submerzním způsobem byla zvolena za účelem zajištění intenzivní aerace po celou dobu experimentu, docílení homogenního rozptýlení kultury *BS* v kultivačním médiu a dosažení tak maximálního využití živin a zajištění intenzivního rozmnožování mikroorganismu. Submerzní způsob kultivace rovněž umožňuje konstantní udržení teploty a její regulaci po celou dobu kultivace. Intenzita míchání byla pro účel zjištění optimálního živného média zvolena 160 rpm (zajištění homogenní suspenze) a teplota 21 °C. Kultivace byla prováděna po dobu 196 hodin a každý den spektrometricky měřena lipolytická aktivita za

použití *p*-nitrofenyl-laurátu (C12:0) jako substrátu. Na základě vyhodnocených výsledků bylo zvoleno nejvhodnější živné médium pro produkci lipolytických enzymů *BS*.

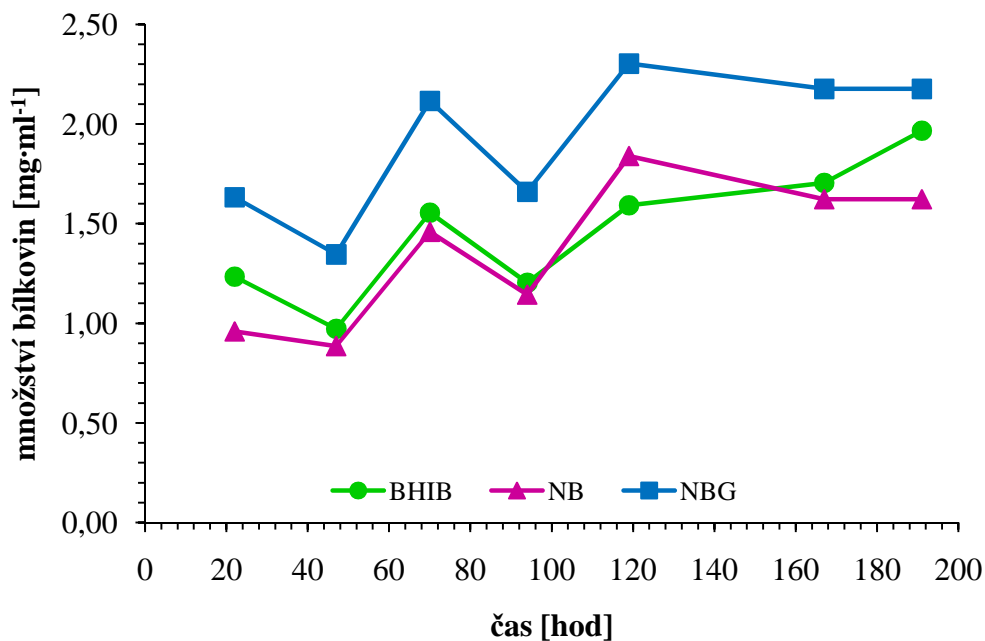
Z Grafu 3 je patrné, že jako nejvhodnější pro produkci lipolytických enzymů se ukázalo být živné médium Nutrient Broth s přidavkem 2% (w/v) glukózy (NBG). Nejvyšší aktivita 0,0679 U·ml⁻¹ zde byla naměřena po 70 hodinách kultivace. V médiích BHIB a NB byla maximální aktivita naměřena až po 94 hodinách kultivace, avšak i tak zde dosahovala aktivita pouze 74 %, resp. 88 % maximální lipolytické aktivity vzhledem k médiu NBG. Nejrychlejší pokles aktivity byl pozorován v případě média NB a to pravděpodobně z důvodu vyčerpání hlavních zdrojů uhlíku i dusíku (pepton, kvasniční extrakt) na rozdíl od média NBG, kde byl pozorován pozvolný pokles aktivity. Příčinou může být přítomnost glukózy v médiu NBG, která zde působí jako výhradní zdroj uhlíku potřebný pro produkci lipolytických enzymů [46], zatímco pepton a kvasniční extrakt je využíván spíše jako zdroj dusíku [47]. V médiu NB tak dochází k nižší produkci lipáz a zároveň k rychlejšímu poklesu lipolytické aktivity. Nižší ale poměrně vyrovnaná produkce lipáz v průběhu celé kultivace v médiu BHIB by mohla být z hlediska produkce lipolytických enzymů do jisté míry výhodná. Z hlediska složitosti tohoto komplexního média a potřeby případných dalších analýz, kdy je například nutné jednotlivé složky média odstranit, je vhodnější využít jednodušší živné médium. Tímto médiem je tedy NBG, kde byly zároveň měřeny vysoké hodnoty lipolytické aktivity.



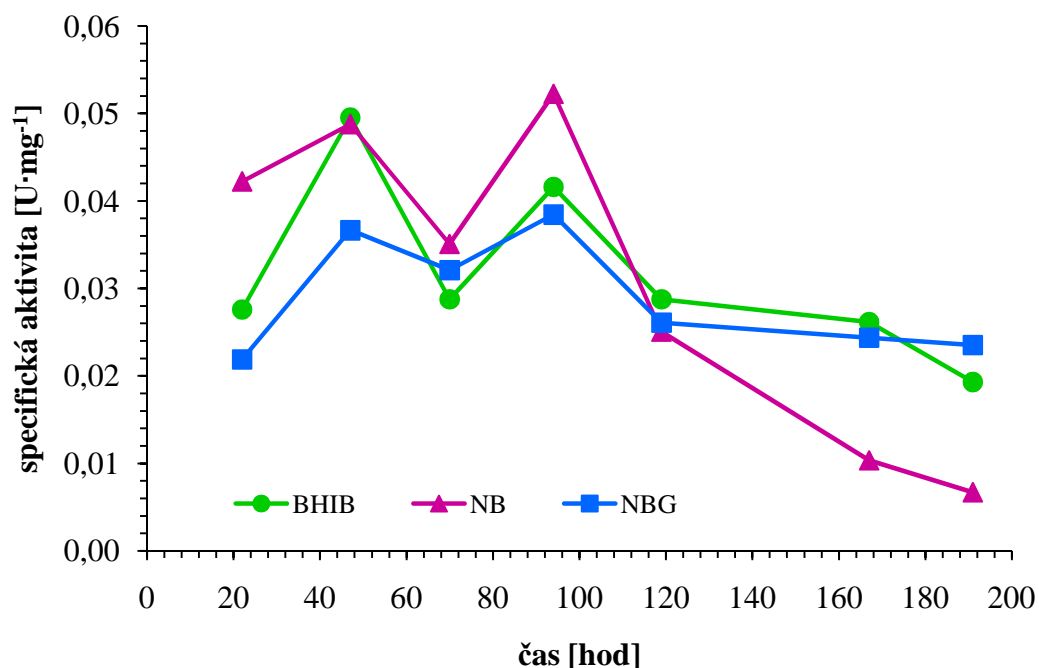
Graf 3: Porovnání lipolytické aktivity během kultivace *B. subtilis* ve třech různých živných médiích: BHIB, NB a NBG

Vedle lipolytické aktivity bylo v médiích měřeno i celkové množství bílkovin Lowryho metodou, čímž bylo možné stanovit specifickou aktivitu enzymu. Na Grafu 4 je zobrazeno celkové množství extracelulárních bílkovin v průběhu celé kultivace. Je vidět, že největší

množství bílkovin bylo produkováno v živném médiu NBG, přičemž u všech médií docházelo zejména v prvních pěti dnech kultivace (120 hodin) ke kolísání těchto hodnot, které však neměly téměř žádný vliv na kolísání hodnot lipolytické aktivity, jak je možné vidět na Grafu 3. Po přepočítání lipolytické aktivity na specifickou aktivitu (Graf 5), tedy lipolytickou aktivitu vztaženou na celkové množství bílkovin, byla specifická aktivita v prvních 5 dnech kultivace (120 hodin) nejvyšší v živném médiu NB a naopak nejnižší v NBG. Z tohoto je patrné, že v médiu NBG bylo v tomto časovém období kromě lipolytických enzymů produkováno ještě velké množství jiných extracelulárních bílkovin na rozdíl od médií NB i BHIB. Po 120 hodinách kultivace je však vidět, že specifická aktivita v médiu NB prudce klesala (docházelo rovněž k poklesu lipolytické aktivity), zatímco celkové množství bílkovin zůstávalo v tomto období ve všech médiích téměř neměnné. To znamená, že se množství lipolytických enzymů v NB snižovalo, zatímco v médiích NBG a BHIB zůstávalo téměř neměnné.

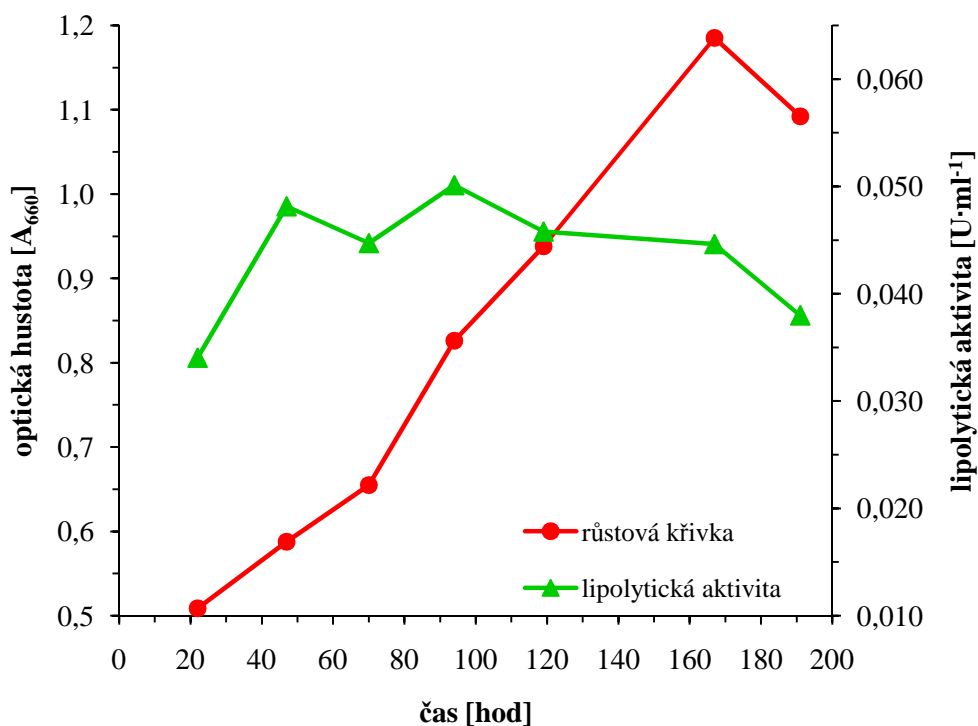


Graf 4: Porovnání koncentrace extracelulárních bílkovin během kultivace *B. subtilis* ve třech různých živných médiích: BHIB, NB a NBG

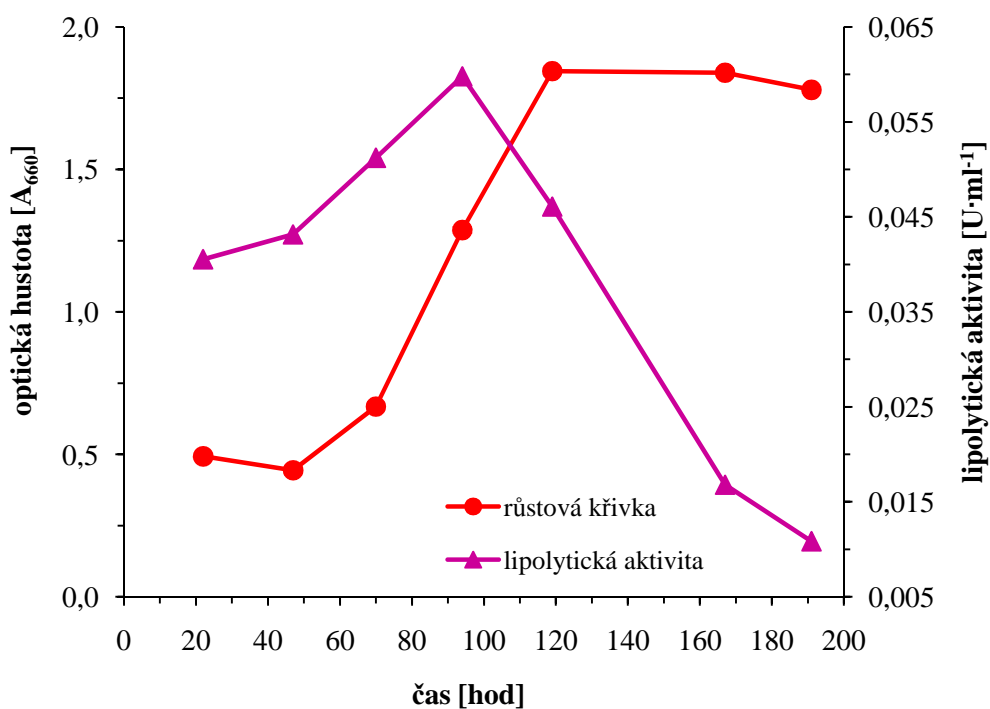


Graf 5: Porovnání specifické aktivity během kultivace *B. subtilis* ve třech různých živných médiích: BHIB, NB a NBG

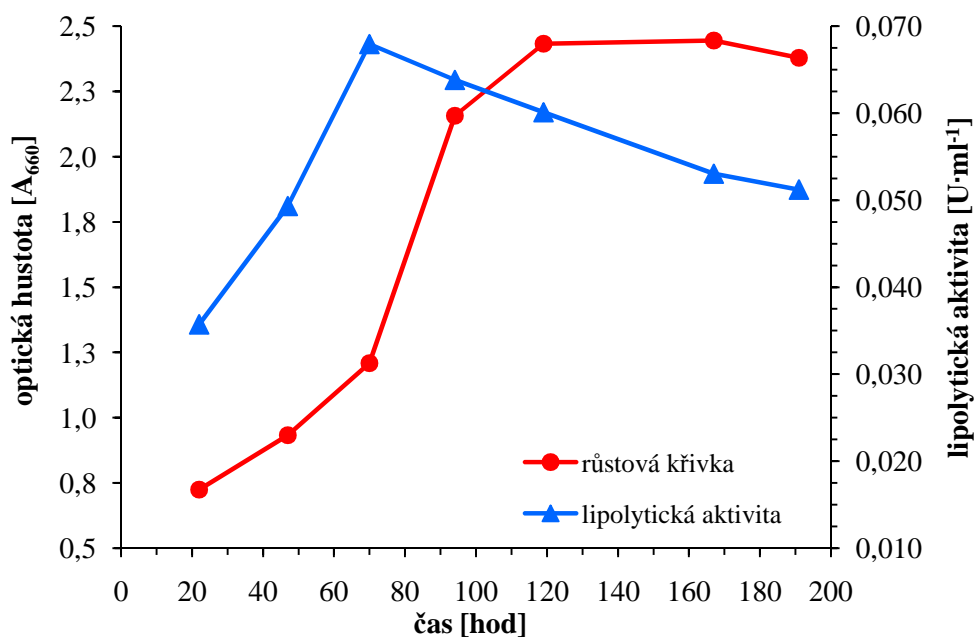
Současně s měřením lipolytické aktivity a množství bílkovin byl pozorován také nárůst buněčné hmoty a to měřením zákalu při 660 nm. Byl zjišťován vztah mezi nárůstem buněčné hmoty a lipolytickou aktivitou v těchto třech médiích. Vztahy mezi nárůstem buněčné hmoty a lipolytickou aktivitou jsou dokumentovány na Grafech 6 - 8. Na Grafu 7 a 8 (médiu NB a NBG) je možné na růstové křivce zřetelně pozorovat některé důležité fáze, zejména exponenciální a stacionární fázi růstu. Podle literatury by měly být bakteriální lipolytické enzymy produkovány a vylučovány do prostředí zejména na konci exponenciální a částečně během stacionární fáze růstu [28]. Výsledky ale ukazují, že maximální hodnoty lipolytické aktivity byly naměřeny ještě před koncem exponenciální fáze a během stacionární fáze docházelo už pouze k poklesu aktivity. Výsledky korelují se studiem Lesuisse a kol. [38], kde různé kmeny *BS* vykazovaly nejvyšší lipolytickou aktivitu během exponenciální růstové fáze a ve stacionární fázi došlo k jejímu prudkému poklesu.



Graf 6: Vztah mezi nárůstem buněčné hmoty *B. subtilis* v živném médiu BHIB a produkcí lipolytických enzymů



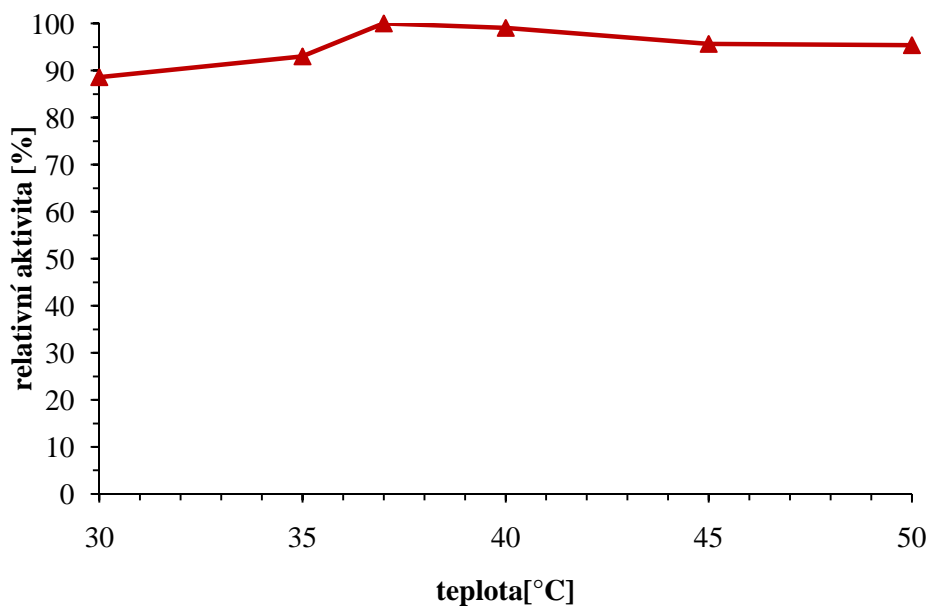
Graf 7: Vztah mezi nárůstem buněčné hmoty *B. subtilis* v živném médiu NB a produkcí lipolytických enzymů



Graf 8: Vztah mezi nárůstem buněčné hmoty *B. subtilis* v živném médiu NBG a produkcí lipolytických enzymů

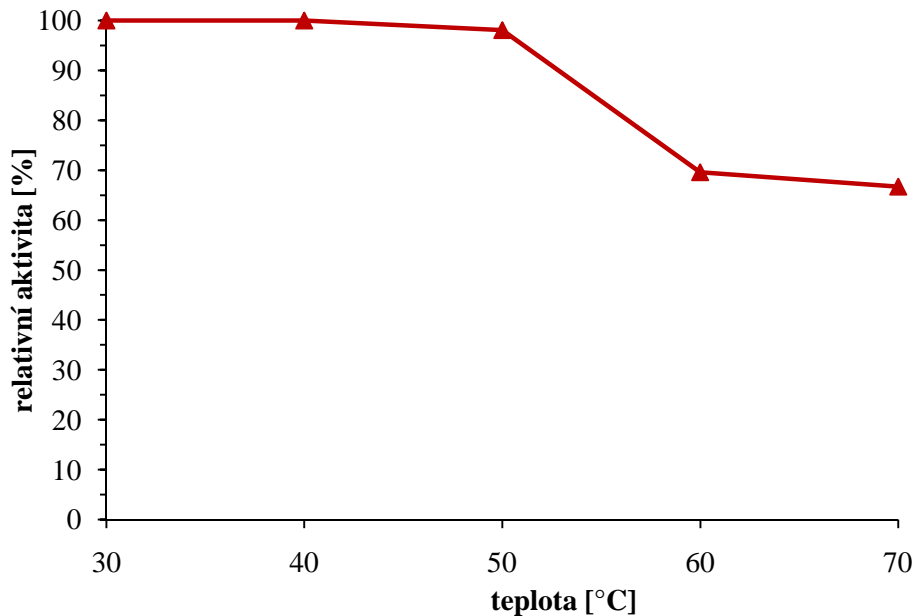
5.1.2 Teplotní optimum a tepelná stabilita

Optimální teplota pro produkci lipolytických enzymů *B. subtilis* byla stanovována ve výše zjištěném optimálním živném médiu NBG. Nejvyšší aktivita enzymu byla naměřena při 37 °C. Ve studovaném teplotním rozmezí 30 - 50 °C ale nebyly zaznamenány nijak významné rozdíly, jelikož byla naměřena nejmenší relativní aktivita vzhledem k zjištěnému teplotnímu optimu 89 %. Závislost relativní lipolytické aktivity na vzrůstající teplotě je znázorněna na Grafu 9.



Graf 9: Teplotní optimum lipolytických enzymů produkovaných pomocí *B. subtilis* v živném médiu NBG

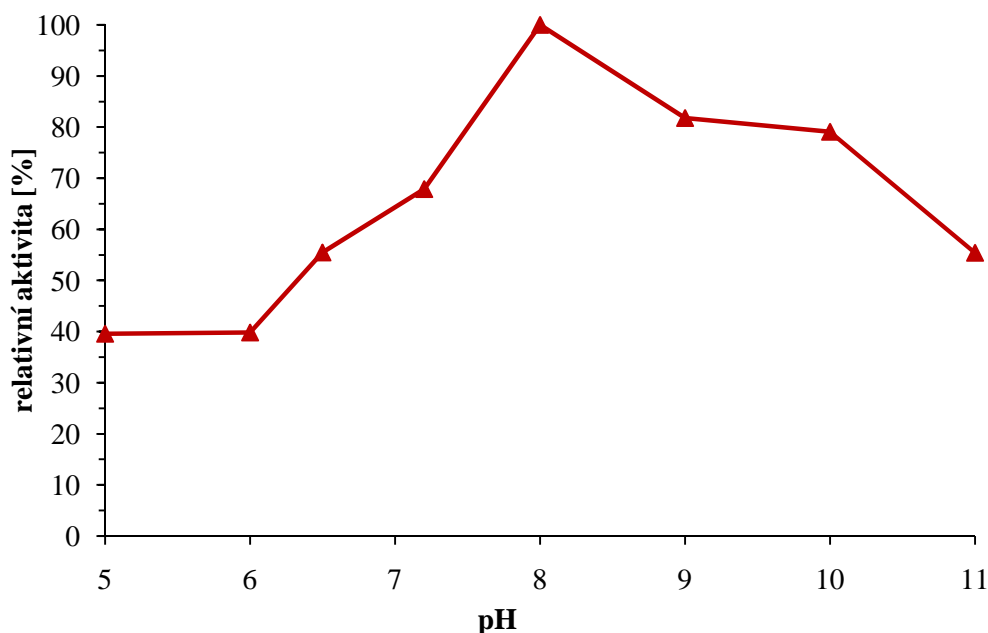
Tepelná stabilita byla měřena v živném médiu NBG v rozmezí teplot 30 - 70 °C. Po hodinové inkubaci při dané teplotě (viz Graf 10) bylo zjištěno, že se jedná o poměrně termostabilní enzym, jelikož po hodinové inkubaci při dané teplotě docházelo k poklesu aktivity až při teplotách vyšších než 50 °C. Při teplotách 60 - 70 °C byl zaznamenán pokles aktivity na 70 %, resp. 67 %.



Graf 10: Tepelná stabilita lipolytických enzymů produkovaných pomocí *B. subtilis* v živném médiu NBG po 1 hodině inkubace

5.1.3 pH optimum

Optimalizace pH prostředí byla provedena v živném médiu NBG při zjištěné optimální teplotě (37 °C) pro produkci lipolytických enzymů *BS*. Lipolytická aktivita byla měřena v rozmezí hodnot pH 5 - 11. Nejvyšší lipolytická aktivita byla zaznamenána při pH 8,0 a při hodnotách pH 9,0 a 10,0 byla relativní aktivita vzhledem k pH optimu 82 %, resp. 79 %. Z těchto výsledků vyplývá, že se jedná o lipolytické enzymy stabilní zejména v alkalické oblasti pH, což je patrné i z Grafu 11.



Graf 11: pH optimum lipolytických enzymů produkovaných pomocí *B. subtilis* v živném médiu NBG při teplotě 37 °C

Zjištěné hodnoty teplotního a pH optima kmene *B. subtilis* CCM 1999 zcela odpovídají výsledkům měření, které prováděli Hasan a Hameed [44] u *Bacillus* sp. Jejich pH optimum se pohybovalo v rozmezí pH 8,0 - 9,0 a teplotní optimum bylo 37 °C. Oproti tomu Eggert [40] i Lessuisse [38] naměřili vyšší pH optimum (pH 10 - 12) a tepelná stabilita lipolytických enzymů se pohybovala mezi 40 - 45 °C, tedy o něco níže než v našem případě. Při celkovém srovnání ale výsledky ukazují, že se jedná o poměrně stabilní enzym, aktivní zejména v alkalickém prostředí a s teplotním optimem kolem 37 °C.

5.1.4 Vliv přítomnosti olivového oleje v živném médiu na produkci lipolytických enzymů

Jako jeden z dalších faktorů ovlivňující produkci lipolytických enzymů *BS* byl studován vliv přítomnosti potencionálního induktoru - olivového oleje (OO) [49][50][94] - v médiu NBG. Současně byla také v průběhu kultivace měřena pH hodnota média.

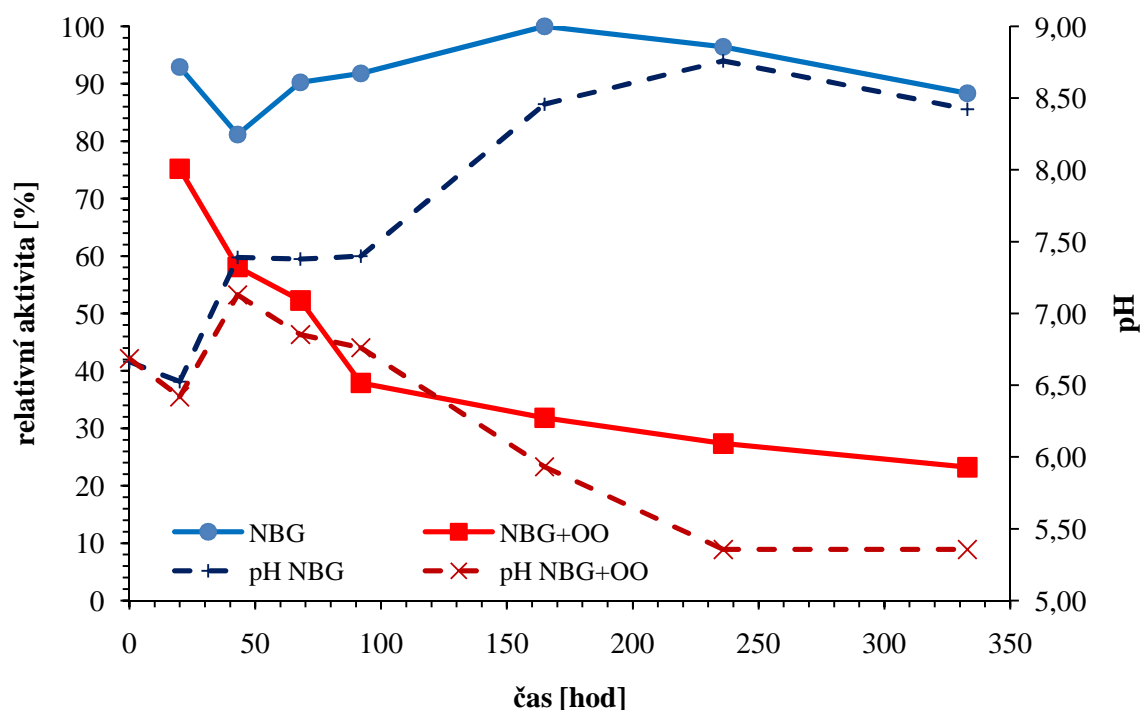
V případě kultivace *BS* byla zaznamenána nižší produkce lipolytických enzymů v médiu NBG s přidavkem olivového oleje (viz Graf 12). V médiu jak bez tak i s přidavkem oleje byl po prvním dni kultivace zaznamenán mírný pokles pH (Graf 12). Tento pokles pravděpodobně souvisí s metabolickým využitím glukózy a její přeměnou na kyselinu pyrohroznovou. Po vyčerpání tohoto zdroje uhlíku následoval u média NBG už pouze nárůst hodnoty na pH = 8,5, kdy mikroorganismus začal pravděpodobně využívat protonový základ média – pepton. U NBG+OO byl trend opačný a hodnoty postupně klesaly z pH = 6,7 na pH = 5,4.

Jelikož bylo v předchozím měření zjištěno, že pH optimum enzymu se nachází v alkalické oblasti pH = 8, je logické vysvětlení vyšší produkce lipolytických enzymů v médiu NBG. Naopak pokles hodnoty pH v médiu NBG+OO koreluje s postupným snížením lipolytické aktivity. Štěpením esterových vazeb lipidického zdroje uhlíku, tedy olivového oleje, dochází působením produkovaných lipolytických enzymů k uvolnění mastných kyselin. Rostoucí

koncentrace sloučenin s karboxylovými skupinami vede ke snížení hodnoty pH v médiu, které je pro produkci lipolytických enzymů nežádoucí. Proto zatímco v médiu NBG lipolytická aktivita postupně narůstala po dobu 5 dnů kultivace (165 hodin) na hodnotu $0,0784 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$ (pH~8,5), v médiu NBG+OO byla nejvyšší aktivita $0,0590 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$ (pH~6,4) zaznamenána již po prvním dnu kultivace (20 hodin). Výsledky také korespondují se zjištěními, kterých bylo dosaženo při podobných experimentech, kdy přítomnost glukózy lipolytickou aktivitu zvyšovala [48], kombinace glukózy a olivového oleje [49], resp. olivového oleje a dalšího zdroje uhlíku [50] lipolytickou aktivitu naopak výrazně snižovala. Ke stejným závěrům došli také Jonsson a Snygg [94], kteří měřili lipolytickou aktivitu v médiích NB a NB+OO, přičemž v přítomnosti olivového oleje lipolytická aktivita v médiu klesala.

Pokles aktivity mohl být tedy způsoben jednak nárůstem koncentrace vznikajících mastných kyselin v živném médiu, ale také poklesem koncentrace oleje v živném médiu, případně také nárůstem proteázové aktivity v médiu [95].

Přítomnost dalších komponent v živném médiu NBG znemožňuje jednoznačné potvrzení působení olivového oleje jako induktoru a tedy tato problematika je předmětem dalšího výzkumu.



Graf 12: Porovnání lipolytické aktivity v médiu s přidavkem olivového oleje – NBG+OO a bez přidavku - NBG a paralelně měřené pH kultivačních médií NBG+OO a NBG v průběhu celé kultivace

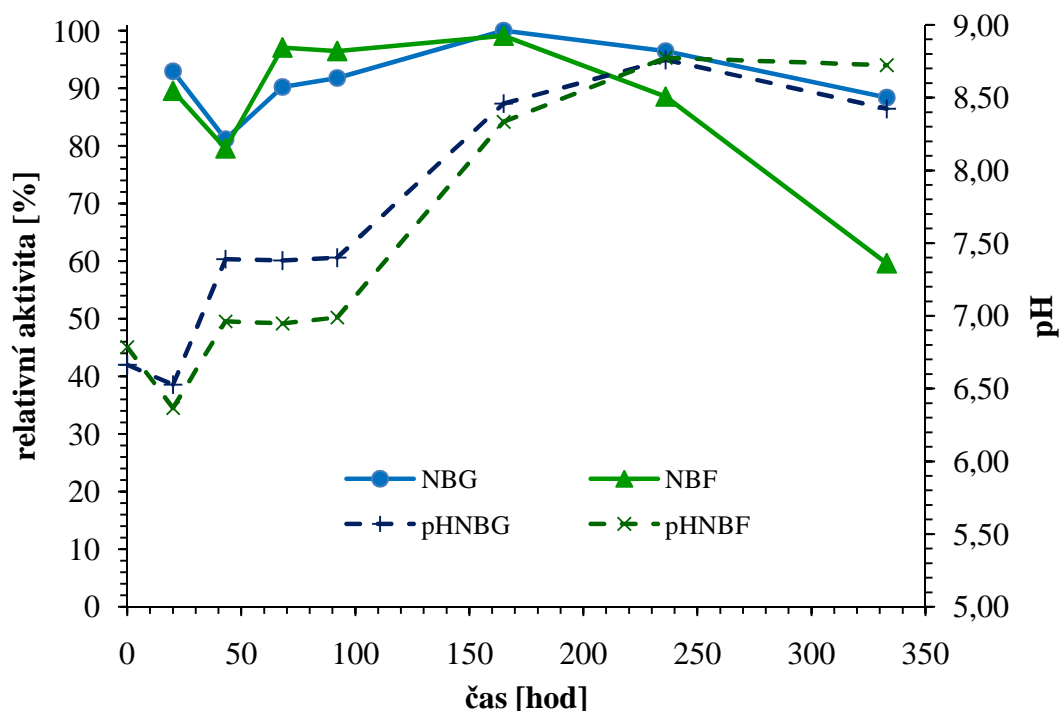
5.1.5 Srovnání lipolytické aktivity v přítomnosti různých cukrů jako zdrojů uhlíku

Jelikož bylo jako nejvhodnější médium pro produkci lipolytických enzymů *BS* vyhodnoceno médium NBG, tedy médium, které obsahuje jako hlavní zdroj uhlíku glukózu, dále nás zajímalo, jestli by mohl být vhodnější jiný cukr než glukóza. Na základě poznatků, které učinil Hasan a Hameed [44], byla jako potencionálně vhodný cukr vybrána fruktóza a porovnávána tedy lipolytická aktivita v médiích NBG (Nutrient broth+glukóza) a NBF (Nutrient broth+fruktóza). Tento experiment byl prováděn současně se zjišťováním vlivu

lipidického substrátu na lipolytickou aktivitu a kultivační podmínky byly tedy proto stejné (27 °C, 200 rpm).

Výsledky zaznamenané v Grafu 11 ukazují, že v obou médiích bylo maximální aktivity dosaženo po 7 dnech kultivace (0,0784 U·ml⁻¹ v médiu NBF a 0,0777 U·ml⁻¹ v NBF). Aktivita enzymů byla po tuto dobu velmi vyrovnaná a až posléze byl zaznamenán rychlejší pokles lipolytické aktivity v médiu NBF. Po celou dobu experimentu byly rovněž zaznamenávány hodnoty pH obou médií. Z Grafu 13 je jasně patrné, že pH hodnoty obou médií vykazovaly stejný trend, jaký byl popsán v kapitole 5.1.4 u média NBF.

Jako nejvhodnější médium se i zde ukázalo být médium NBF.



Graf 13: Porovnání lipolytické aktivity v médiu NBF a NBF a paralelně měřené pH v průběhu celé kultivace

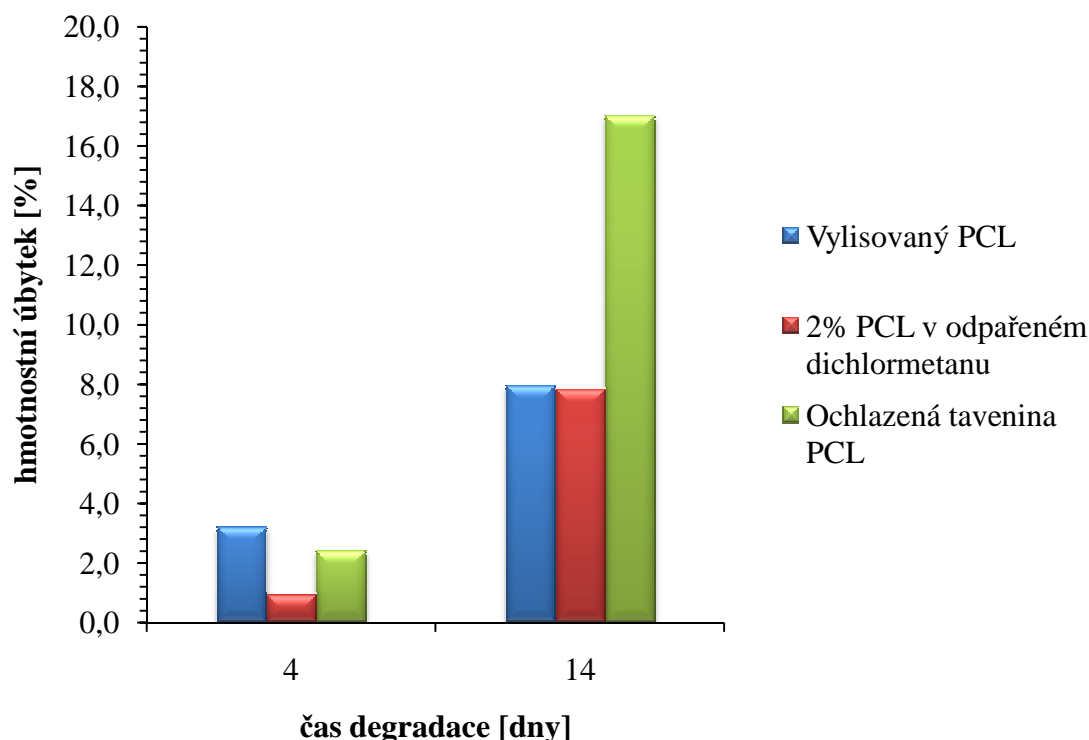
5.2 Degradace PCL pomocí *Bacillus subtilis*

Degradace polymerních vzorků PCL připravených třemi různými způsoby (viz. 4.2.7.1) byla sledována ve dvou časových periodách – 4 a 14 dní. Experiment probíhal v živném médiu NBF při teplotě 30 °C a počáteční hodnotě pH 7,0 v přítomnosti kultury *BS*. Vyhodnocování míry degradace těchto polymerních vzorků bylo prováděno několika způsoby. V první řadě byl měřen hmotnostní úbytek polymeru a pomocí konfokální laserové skenovací mikroskopie (CLSM) pozorovány povrchové změny těchto vzorků. Dále byla měřena zbytková lipolytická aktivita a také hodnota pH živného média. V průběhu celé kultivace byl denzitometricky sledován nárůst buněčné hmoty. Nakonec byly pozorovány rozdíly jak mezi jednotlivými degradačními vzorky (+PCL, +*BS*), tak mezi degradačními a kontrolními vzorky (+PCL, -*BS* resp. -PCL, +*BS*).

5.2.1 Úbytek hmotnosti PCL

Po 4 dnech degradace byl zaznamenán poměrně nízký úbytek hmotnosti (Graf 14). Hmotností úbytky rostly v pořadí odpařovaný PCL (0,93 hmot. %) < ochlazená tavenina PCL (2,40 hmot. %) < lisovaný PCL (3,20 hmot. %). Po 14 dnech degradačního experimentu byly zaznamenány již vyšší úbytky hmotností: lisovaný PCL (7,96 hmot. %) ≈ odpařovaný PCL (7,83 hmot. %) < ochlazená tavenina (17,03 hmot. %). Kontrolní vzorky (+PCL, -BS) ukázaly po 14 dnech minimální úbytky hmotností (0,8 - 1,06 hmot. %), tedy minimální vliv abiotických podmínek (světlo, teplo, vzduch, prostředí živného média) na degradaci PCL.

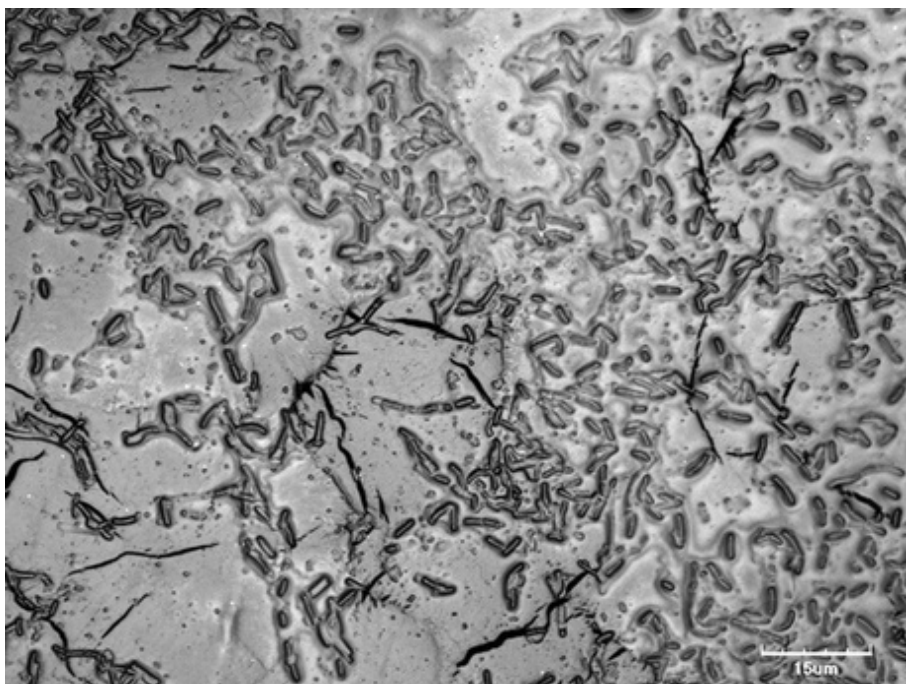
Podobné experimenty prováděli Wu a kol. [90], kteří po 14 dnech působení kultury *Bacillus sp.* PG01 zaznamenali hmotnostní úbytek přibližně 7 %, avšak molekulová hmotnost polymerního vzorku zde byla vyšší (80 000 g·mol⁻¹).



Graf 14: Úbytek hmotnosti vzorků PCL připravených různými způsoby v závislosti na čase degradace

5.2.2 Konfokální laserová rastrovací mikroskopie (CLSM)

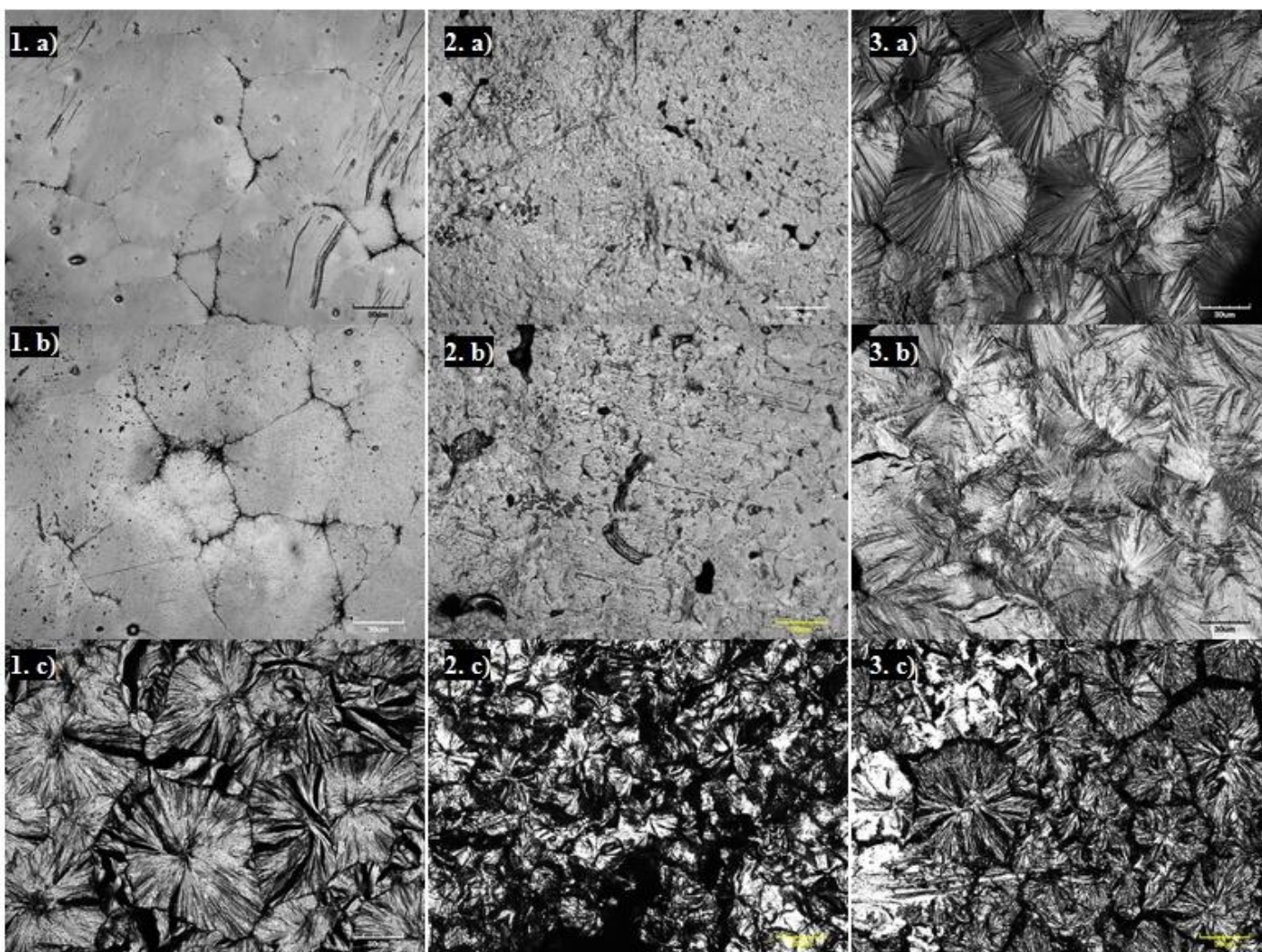
Degradace PCL se zpravidla odehrává převážně erozí povrchu, a tedy změny morfologie povrchu PCL vzorků byly analyzovány také pomocí konfokální laserové rastrovací mikroskopie (CLSM). V první fázi byly vzorky PCL po 3 dnech kultivace vyjmuty z živného média NBG a vysušeny, aniž by byly oplachovány destilovanou vodou. Ze snímků pořízených na CLSM (viz Obr. 15) je patrné, jak mikroorganismy adherují na povrch polymeru.



Obr. 15: CLSM snímek dokumentující adhezi *Bacillus subtilis* na povrch vylisovaného polymerního filmu po 3 dnech kultivace.

Jelikož byl po 4 dnech kultivace hmotnostní úbytek poměrně nízký (viz Graf 14), nebyly po této době zaznamenány významné změny morfologie povrchu filmů. Po 14 dnech experimentu byly pozorovány četné trhliny (kreky) ve srovnání s původními i kontrolními vzorky (Obr. 16). Z Obrázku 16 jsou rovněž patrné u vzorku vzniklého ochlazením taveniny (označení 2. c)) největší změny v povrchové struktuře v podobě vzniku četných děr a prasklin, což koreluje s nejvyšším hmotnostním úbytkem tohoto vzorku.

Vyhodnocení změny krystalinity PCL s v důsledku působení *BS* spadá do oblasti chemie polymerních materiálů a je tedy nad rámcem zadání diplomové práce.

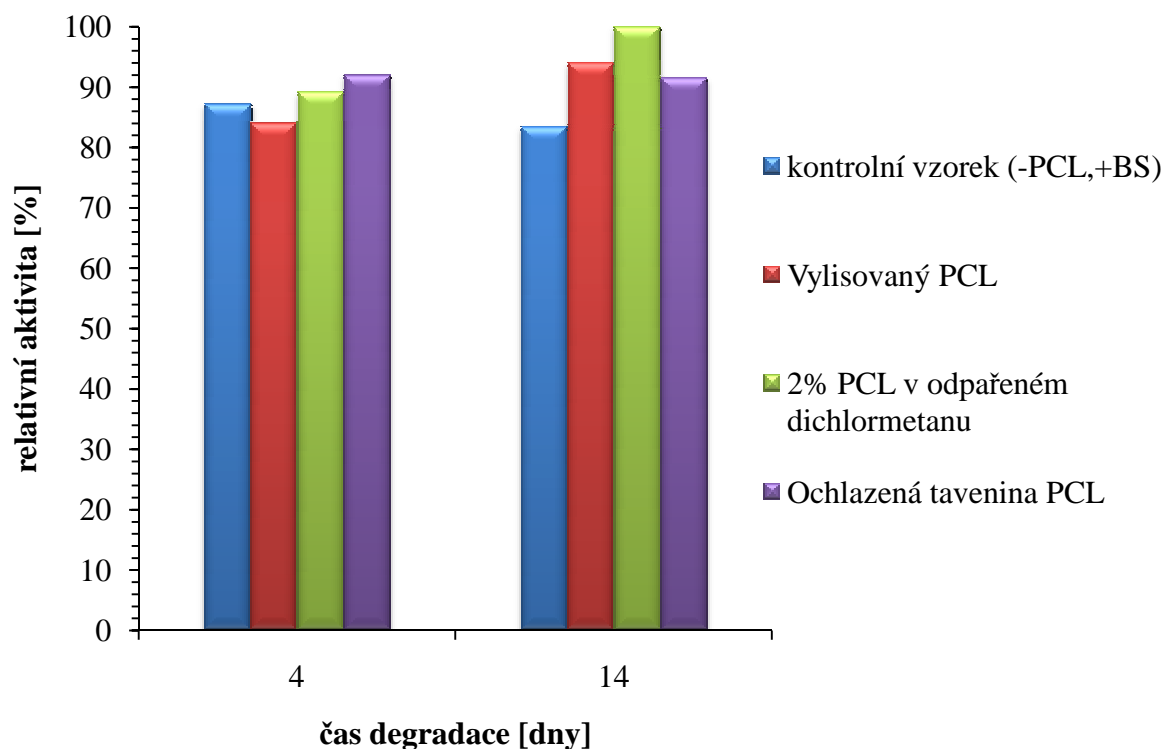


Obr. 16: CLSM snímky povrchu PCL filmů: 1. vylisovaný PCL 2. ochlazená tavenina PCL 3. 2% PCL v odpařovaném dichlormetanu vystavené působení *Bacillus subtilis*. a) vzorky před započítím experimentu b) kontrolní vzorky po 14 dnech c) degradované vzorky po 14 dnech

5.2.3 Zbytková lipolytická aktivita a pH živného média

Souběžně s hodnocením míry degradace po 4 a 14 dnech byla v živných médiích měřena zbytková lipolytická aktivita (Graf 15) a také pH hodnota (Graf 16).

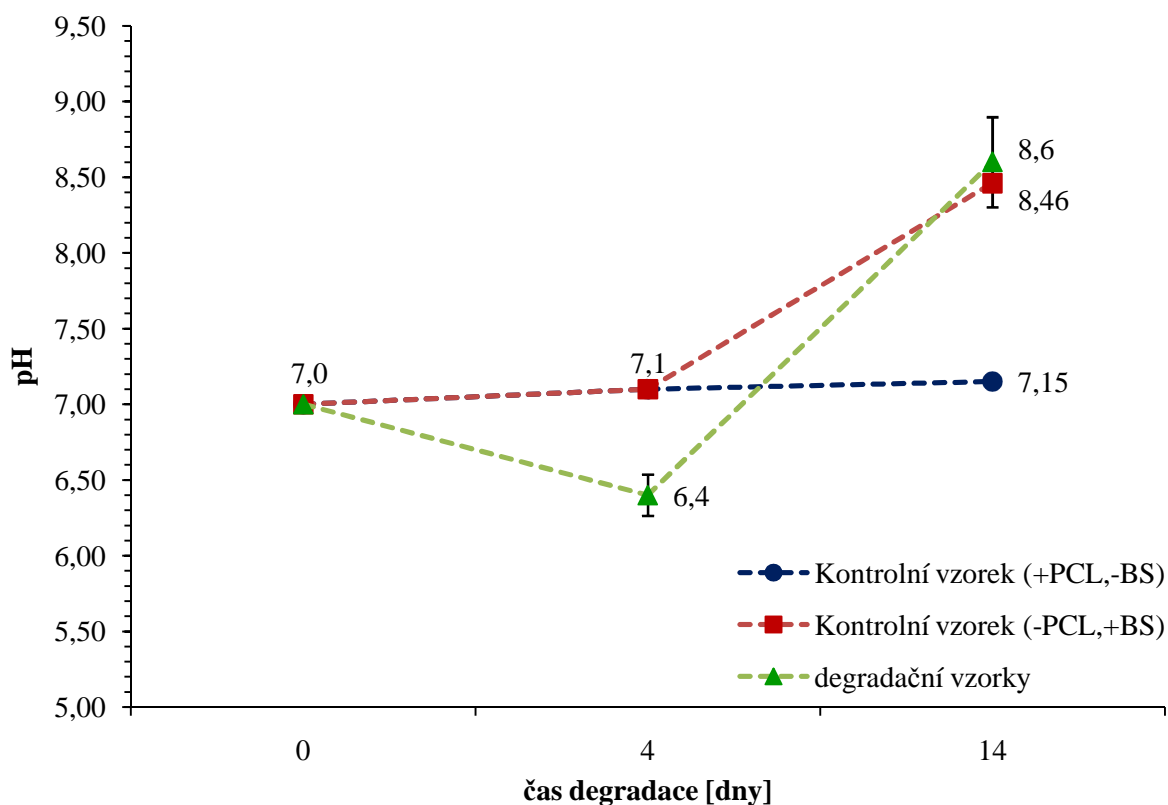
Zatímco po 4 dnech kultivace dosahovala lipolytická aktivita v degradačních vzorcích o 2 - 5 % vyšších hodnot než u kontrolního vzorku (nejvyšší aktivita zde byla $0,0760 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$), po 14 dnech kultivace došlo k ještě většímu navýšení lipolytické aktivity a to o 9 - 17 % oproti kontrole (nejvyšší aktivita zde byla $0,0826 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$). Lze navrhnout, že lipolytická aktivita narůstá v důsledku přítomnosti polymerního materiálu, a to pravděpodobně v závislosti na způsobu přípravy filmu. Důležitou roli hraje tedy prostové uspořádání uhlíkatých řetězců PCL obsahujících esterové vazby, které jsou specificky štěpeny podle jejich dostupnosti pro aktivní místa lipolytických enzymů produkovaných *BS in situ*.



Graf 15: Zbytková lipolytická aktivita po 4 a 14 dnech kultivace v kontrolních vzorcích a degradačních vzorcích a po 14 dnech v prostředí s kulturou *BS* bez polymerního vzorku

Dalším měřeným parametrem byla hodnota pH živného média s počáteční hodnotou 7,0 (Graf 16). Po 4 dnech experimentu došlo k mírnému poklesu u degradačních vzorků na pH 6,28 - 6,54, avšak po 14 dnech kultivace byl zaznamenán nárůst pH do alkalické oblasti pH 8,26 - 8,85. V případě kontrolního vzorku, který obsahoval kulturu *BS* bez polymerního materiálu (-PCL, +*BS*), byla po 4 dnech hodnota pH~7,1 a po 14 dnech velmi podobná degradačním vzorkům (pH~8,46). U kontrolního vzorku, který naopak obsahoval pouze polymerní materiál bez kultury *BS* (+PCL, -*BS*) byla po 14 dnech zaznamenána jen nepatrná změna pH (pH~7,15), což znamená, že samotný polymer v živném médiu NBG nijak výrazně hodnotu pH neovlivňuje. Rozdíly mezi kontrolním (-PCL, +*BS*) a degradačními vzorky po 4 dnech kultivace lze vysvětlit právě v důsledku již zmiňované lipolytické aktivity, kdy štěpením esterových vazeb, které jsou součástí chemické struktury PCL, dochází k uvolňování

uhlíkatých řetězců zakončených kyselými karboxylovými skupinami do živného média a tedy k poklesu hodnoty pH v degračních vzorcích narozdíl od vzorku kontrolního. Po 14 dnech je ale vidět, že se hodnoty pH degračních vzorků dostaly již do alkalické oblasti a jsou přibližně stejné jako v kontrolním vzorku. Vysvětlením může být předpoklad, že v této fázi jsou již rozpuštěné krátké uhlíkaté řetězce s karboxylovými skupinami metabolicky odbourávány a hodnoty pH proto odpovídají hodnotám kontrolního vzorku (Graf 12).



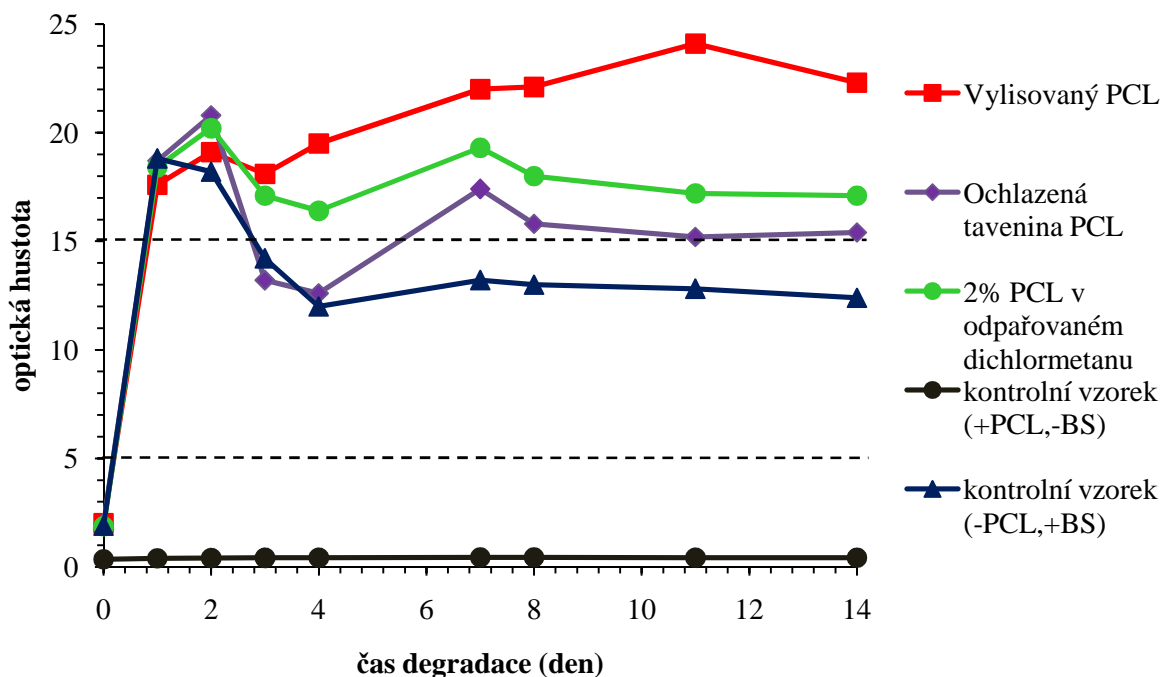
Graf 16: Hodnoty pH živného média u kontrolních a degračních vzorků v daných časových intervalech

5.2.4 Denzitometrické stanovení nárůstu biomasy

V průběhu kultivace byl denzitometricky pozorován nárůst buněčné hmoty v prostředí kultury *BS* v přítomnosti série tří typů degračních vzorků a v kontrolních vzorcích v živném médiu NBG. Výsledky na Grafu 17 ukazují stejný trend průběhu růstové křivky u všech degračních vzorků společně s kontrolním vzorkem obsahujícím pouze kulturu *BS* bez přídavku polymeru (-PCL, +*BS*). U kontrolních vzorků, které obsahovaly polymerní materiál bez kultury *BS* (+PCL, -*BS*), nebyla podle očekávání zaznamenána žádná růstová křivka. Dále můžeme pozorovat, že zákal u degračních vzorků, které obsahují kulturu *BS* společně s polymerním vzorkem, nabývá vyšších hodnot než je tomu v případě kontrolního vzorku *BS* bez polymeru. Jelikož ale nedochází u tohoto kontrolního vzorku k nijak výraznému poklesu zákalu a u degračních vzorků naopak k nárůstu těchto hodnot, nemůžeme v tomto případě zcela jasně posoudit, jestli *BS* degračuje PCL a jestli je tedy pro něj zdrojem uhlíku.

Na druhou stranu dochází k úbytku hmotnosti polymerních vzorků, dále jsou pomocí CLSM pozorovatelné změny v povrchové struktuře materiálu, a také naměřené hodnoty lipolytické aktivity jsou vyšší než je tomu v nepřítomnosti PCL.

Lze předpokládat, že vyšší hodnoty zákalu v porovnání s kontrolním vzorkem jsou způsobeny růstem *BS* lépe na mikroskopických částech polymeru, uvolněných během působení lipolytické aktivity. Vzhledem k přesnosti měření denzitometru pouze v oblasti 5,0 - 15,0 se jedná pouze o orientační měření. Přesto je měření růstové křivky dalším, i když nepřímým důkazem degradace PCL působením enzymového aparátu *BS*.



Graf 17: Denzitometrické měření nárůstu buněčné hmoty v degračních a kontrolních vzorcích

6 ZÁVĚR

V této práci byly optimalizovány podmínky pro produkci lipolytických enzymů *Bacillus subtilis* a za těchto podmínek byla vedena degradační studie poly(ϵ -kaprolaktonu) (PCL) jako zástupce biodegradabilních polymerů s aplikací v odbouratelných plastových obalových materiálech.

V první fázi byla provedena optimalizace živného média pro produkci lipolytických enzymů *BS*, kdy bylo jako nejvhodnější vyhodnoceno živné médium Nutrient Broth s přidavkem 2% (w/v) glukózy (NBG). Rovněž bylo zjištěno, že nejvyšší lipolytické aktivity bývá dosahováno před koncem exponenciální fáze růstu. Produkované lipolytické enzymy vykazovaly nejvyšší aktivitu při teplotě 37 °C a v alkalické oblasti pH=8,0. Měření tepelné stability ukázalo, že se jedná o poměrně termostabilní enzymy, které si i po 1 hodině kultivace při 30 - 50 °C zachovaly 100 % aktivity. Studium vlivu přítomnosti 1% (w/v) olivového oleje v živném médiu NBG ukázalo, že lipidický substrát zde způsobuje pokles lipolytické aktivity a také pokles hodnoty pH živného média pravděpodobně v důsledku štěpení esterových vazeb lipidického substrátu a uvolňování mastných kyselin. Nahrazení glukózy v živném médiu NBG jiným monosacharidem – fruktózou – vykazovalo v prvních 7 dnech kultivace podobné hodnoty lipolytické aktivity, ale posléze docházelo k výraznějšímu poklesu lipolytické aktivity. V rámci práce byla vyvíjena metodika proteomické identifikace lipolytických enzymů *BS* metodou peptidového mapování. Výsledky proteomické studie slouží k pochopení působení jak přirozeného substrátu, tak syntetického polyesteru - poly(ϵ -kaprolaktonu) jako induktoru na tvorbu lipáz.

PCL byl pro studium degradace použit ve formě filmů, které byly připraveny lisováním taveniny, prudkým ochlazením taveniny na 4 °C a volným odpařováním dichlormetanu z 2% roztoku PCL. Tyto filmy byly vystaveny po dobu 14 dnů působení kultury *BS* v živném médiu NBG. Podmínky kultivace při 30 °C a počátečním pH 7,0 byly dostatečné pro produkci lipolytických enzymů a zároveň eliminovaly vliv vyšší teploty a alkalického pH na urychlení degradace polyesteru bez přispění biologického činitele. Po 14 dnech degradačního experimentu byly zaznamenány úbytky hmotností: lisovaný PCL (7,96 hmot. %) \approx odpařovaný PCL (7,83 hmot. %) < ochlazená tavenina (17,03 hmot. %). Úbytek hmotnosti naznačil probíhající erozi povrchu filmů, která byla dále potvrzena pomocí CLSM. Po 4 dnech byl pozorován vznik biofilmu na povrchu degradovaných vzorků. Po 14 dnech byly na povrchu filmů pozorovány četné díry a praskliny.

Využití polymerních filmů PCL jako substrátu také potvrdila měřená lipolytická aktivita, jejíž hodnoty byly po 4 dnech v prostředí s přítomností PCL vyšší o 2 - 5 % a po 14 dnech vyšší o 9 - 17 %. Ze všech výsledků vyplývá schopnost *Bacillus subtilis* degradovat polymerní vzorky PCL, přičemž za stejných podmínek experimentu není úroveň degradace stejná, ale závisí od způsobu přípravy, tedy od struktury polymerního materiálu. Nejvíce degradovaný se ukázal být vzorek připravený prudkým ochlazením taveniny PCL.

Uplatnění vlivu *BS* na PCL filmy bylo dále prokázáno zanedbatelnými změnami charakteristik a hmotnostních úbytků (0,8 - 1,06 hmot. %) u kontrolních vzorků.

Z provedených měření a zpracovaných výsledků vyplývá, že *Bacillus subtilis* je bakterie nenáročná na kultivace a schopná produkovat vysoké množství lipolytických enzymů vylučovaných do živného média po poměrně dlouhou časovou periodu. Díky jejímu zařazení do skupiny mikroorganismů GRAS je velmi výhodné její využití pro různé biotechnologické aplikace, které byly již zmiňovány v úvodu práce, a kterými je právě i degradace biodegradabilních polymerů, mezi něž patří právě PCL.

Výsledky dílčí studie, které tvoří část této práce, byly prezentovány na odborné konferenci Chemistry and Life 2011, pod názvem *2Optimization of lipase production by Bacillus subtilis²* (viz příloha 1).

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] TAKAC, S. a B. MARUL. Effect of lipidic carbon sources on the extracellular lipolytic activity of a new isolated strain of *Bacillus subtilis*. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2008, 35, 1019-1025.
- [2] GUPTA, R., N. GUPTA a P. RATHI. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2004, 763-781.
- [3] SHARMA, D., B. SHARMA a A. K. SHUKLA. Biotechnological Approach of Microbial Lipase: A Review. *Biotechnology.* 2011, 10 (1), 23-40.
- [4] PRIEST, F. G. in C. R. Harwood (Ed.). *Biotechnology Handbooks 2: Bacillus.* Plenum Press. London, UK. 1989, 293-320.
- [5] PIGGOT, P. J. *Bacillus subtilis.* *Encyclopedia of microbiology.* 2009, 45-56.
- [6] NAKANOA, Michiko M. a Marion F. HULETTB. Adaptation of *Bacillus subtilis* to oxygen limitation. *FEMS Microbiology letters.* 1997, 157, 1-7.
- [7] NICHOLS, D. S., P. D. NICHOLS a T. A. MCMEEKIN. Ecology and physiology of psychrophilic bacteria from Antarctic saline lakes and ice-sea. *Sci Prog.* 1995, 78, 311-348.
- [8] HOLTSMANN, G., M. BRIGULLA, L. STEIL, A. SCHÜTZ, K. BARNEKOW, U. VÖLKER a E. BREMER. RsbV-independent induction of the SigB-dependent general stress regulon of *Bacillus subtilis* during growth at high temperature. *J Bacteriol.* 2004, 186, 6150-6158.
- [9] KORSTEN, L. a N. COOK. Optimizing Culturing Conditions for *Bacillus Subtilis.* *South African Avocado Growers' Association Yearbook.* 1996, 19, 54-58.
- [10] GLASER, P., A. DANCHIN, F. KUNST, P. ZUBER a M. M. NAKANO. Identification and isolation of a gene required for nitrate assimilation and anaerobic growth of *Bacillus subtilis.* *J. Bacteriol.* 1995, 177, 1112-1115.
- [11] NAKANO, M. M., Y. P. DAILLY, P. ZUBER a D. P. CLARK. Characterization of anaerobic fermentative growth in *Bacillus subtilis*: Identification of fermentation end products and genes required for the growth. *J. Bacteriol.* 1997.
- [12] BOHIN, J.-P., A. BOHIN a P. SHAEFFER. Increased nitrate reductase A activity as a sign of membrane alteration in early blocked asporogenous mutants of *Bacillus subtilis.* 1976.
- [13] WESTERS, L., H. WESTERS a W. J. QUAX. *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. *Biochim. Biophys. Acta.* 2004, 1694, 299-310.
- [14] MORIKAWA, M. Beneficial Biofilm formation by Industrial Bacteria *Bacillus subtilis* and Related Species. *Jornal of Bioscience and Bioengineering.* 2006, 101, 1-8.
- [15] HAMON, M. A. a B. A. LAZAZZERA. The sporulation transcription factor Spo0A is required for biofilm development in *Bacillus subtilis.* *Molecular Microbiology.* 2001, 42 (5), 1199-1209.
- [16] COSTERTON, J. W., P. S. STEWART a E. P. GREENBERG. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999, 284, 1318-1322.
- [17] MORTENSEN, K. P. a S. N. CONLEY. Film fill fouling in counterflow cooling towers: mechanism and design. *CTI J.* 1994, 15, 10-25.
- [18] MCDONOGH, R., G. SCHAULE a H.C. FLEMMING. The permeability of biofouling layers on membranes. *J. Membr. Sci.* 1994, 87, 199-217.

- [19] CARPENTIER, B. a O. CERF. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *J. Appl. Bacteriol.* 1993, 75, 499-511.
- [20] LI, Y. H., P. C. LAU, J. H. LEE, R. P. ELLEN a D.G. CVITCHOVITCH. Natural genetic transformation of *Streptococcus mutans* growing in biofilms. *J. Bacteriol.* 2001, 183, 897-908.
- [21] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 2. vydání. Praha: Victoria publishing, a.s., 1995. 361 s. ISBN 80-85605-71-6.
- [22] PIGGOT, Patrick J. a David W. HILBERT. Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology*. 2004, 7, 579-586.
- [23] DEGERING, CH. Optimization of Protease Secretion in *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* by Screening of Homologous and Heterologous Signal Peptides. *Appl. Environ. Microbiol.* 2010. 19, 6370-6376.
- [24] KONSULA, Z. a M. LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES. Hydrolysis of starches by the action of an α -amylase from *Bacillus subtilis*. *Process Biochemistry*. 2004, 39, 1745-1749.
- [25] SHANGHI, A. Optimization of xylanase production using inexpensive agro-residues by alkalophilic *Bacillus subtilis* ASH in solid-state fermentation. *World J Microbiol Biotechnol.* 2008, č. 24, s. 633-640.
- [26] FUKADA, Y. a kol. Endo-1,5- α -L-arabinanase from a Subseafloor *Bacillus subtilis*: Purification, Characterization and Nucleotide Sequence of Its Gene. *Journal of Applied Glycoscience*. 2011, 2, 61-66.
- [27] DARTOIS, V., A. BAULARD, K. SCHANCK a C. COLSON. Cloning, nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of a lipase gene from *Bacillus subtilis* 168. *Biochim. Biophys. Acta.* 1992, 1131, 253-260.
- [28] HORÁKOVÁ, Dana a Miroslav NĚMEC. Laboratorní cvičení z fyziologie bakterií. 2003, 48.
- [29] GHOSH, P. K., R. K. SAXENA, R. GUPTA, R. P. YADAV a S. DAVIDSON. Microbial lipases: production and applications. *Science Progress*. 1996, 79 (2), 119-157.
- [30] JAEGER, K-E., B. W. DIJKSTRA a M. T. REETZ. Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases. *Annu. Rev. Microbiol.* 1999, 53, 315-351.
- [31] ARPIGNY, JL. a K-E. JAEGER. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem. J.* 1999, 343, 177-183.
- [32] SARDA, L. a P. DESNUELE. Action de la lipase pancréatique sur les ester en emulsion. *Biochim. Biophys. Acta.* 1958, 30, 513-21.
- [33] NARDINI, M. a B. W. DIJKSTRA. α/β hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1999, 9, 732-737.
- [34] OLLIS, D. L. a kol. The α/β hydrolase fold. *Protein Eng.* 1992, 5, 197-211.
- [35] TILBEURGH, H., M.- P. EGLOFF, C. MARTINEZ, N. RUGANI, R. VERGER a kol. Interfacial activation of the lipase-procolipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography. *Nature*. 1993, 362, 814-820.
- [36] POUDEROYEN, G., T. EGGERT, K.- E. JAEGER a B. W. OIJKSTRA. The Crystal Structure of *Bacillus subtilis* Lipase: A minimal α/β Hydrolase Fold Enzyme. *J. Mol. Biol.* 2001, 309, 215-226.

- [37] KENNEDY, M. B. a W. J. LENNARZ. Characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* and its relationship to a membrane-bound lipase found in a mutant strain. *J. Biol. Chem.* 1979, 254, 1080-1089.
- [38] LESUISSE, E., K. SCHANCK a C. COLSON. Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. *Eur. J. Biochem.* 1993, 216, 155-160.
- [39] DARTOIS, V., J.-Y. COPPE'E, C. COLSON a A. BAULARD. Genetic analysis and overexpression of lipolytic activity in *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1994, 60, 1670-1673.
- [40] EGGERT, T., G. PANCREACH, I. DOUCHET, R. VERGER a K.-E. JAEGER. A novel extracellular esterase from *Bacillus subtilis* and its conversion to a monoacylglycerol hydrolase. *Eur. J. Biochem.* 2000, 267, 6459-6469.
- [41] EGGERT K.-E. a kol. Biochemical properties and three-dimensional structures of two extracellular lipolytic enzymes from *Bacillus subtilis*. *Colloids and Surfaces B:Biointerfaces.* 2002, 26, 37-46.
- [42] EGGERT, T., G. POUDEROYEN, B. W. DIJKSTRA a K.-E. JAEGER. Lipolytic enzymes LipA and LipB from *Bacillus subtilis* differ in regulation of gene expression, biochemical properties, and three-dimensional structure. *FEBS Letters.* 2001, 502, 89-92.
- [43] VODRÁŽKA, Zdeněk, Pavel RAUCH a Jan KÁŠ. Enzymologie. VŠCHT. 1998. s. ISBN 80-7080-330-4.
- [44] HASAN, F. a A. HAMEED. Optimization of lipase production from *Bacillus* sp. *Pak. J. Bot.* 2001, 33, 789-796.
- [45] ZHANG, H., F. ZHANG a Z. LI. Gene analysis, optimized production and property of marine lipase from *Bacillus pumilus* B106 associated with South China Sea sponge *Halichondria rugosa*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2009, 25, 1267-1274.
- [46] HUN, C. J., R. N. Z. A. RAHMAN, A. B. SALLEH a M. BASRI. A newly isolated organic solvent tolerant *Bacillus sphaericus* 205y producing organic solvent-stable lipase. *Biochem. Eng. J.* 2003, 15, 147-151.
- [47] WANG, Z., K. C. SRIVASTAVA, G.-J. SHEN a H.Y. WANG. Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus*, strain A30-1 (ATCC53841). *J Ferment Bioeng.* 1995, 79, 433-438.
- [48] BANERJEE, M., I. SENGPUTA a S. K. MAJUMDAR. Lipase Production by *Hansenula Antala* var. Schnegii. *J. Food Sci. Technol.* 1985, 22, 137-139.
- [49] NOVOTNY, C., L. DOLEZALOVA, P. MUSIL a M. NOVAK. The Production of Lipases by Some *Candida* and *Yarrowia* yeasts. *J. Basic Microbiol.* 1988, 28, 221-227.
- [50] FADINOGLU, S. a O. ERKMEN. Lipase Production by *Rhizopus oryzae* growing on different carbon and nitrogen sources. *J Sci Food Agric.* 1999, 79, 1936- 1938.
- [51] CAI, Y., L. WANG, X. LIAO, Y. DING a J. SUN. Purification and partial characterization of two new cold-adapted lipases from mesophilic *Geotrichum* sp. SYBC WU-3. *Process Biochem.* 2009, 44, 786-790.
- [52] KIM, E.-K., M.-H. SUNG, H.-M. KIM a T.-K. OH. Occurrence of thermostable lipase in thermophilic *Bacillus* sp. strain 398. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1994, 58, 961-962.
- [53] PATKAR, S. A. a F. BJORKKLING. Lipase inhibitors. In: Woolley P, Petersen SB (eds) Lipases - their structure, biochemistry and application. Cambridge University Press, Cambridge. 1994, 207-224.

- [54] SINGH, M. a kol. Lipase Production by *Bacillus subtilis* OCR-4 in Solid State Fermentation Using Ground Nut Oil Cakes as Substrate. *Current Research Journal of Biological Sciences*. 2010, 2(4), 241-245.
- [55] HÖLKER, U. a J. LENZ. Solid-state fermentation – are there any biotechnological advantages? *Current Opinion in Microbiology*. 2005, 8 (3), 301-306.
- [56] CHEN, J. Y., C. M. WEN a T. L. CHEN. Effect of oxygen transfer on lipase production by *Acinetobacter radioresistens*. *Biotechnol. Bioeng.* 1999, 62, 311-316.
- [57] SHUKLA, P., K. GUPTA a N. KANGO. Production of lipase by hyper-lipolytic *Rhizopus oryzae* KG-10 on low-value oil emulsions. *Res. J. Microbiol.* 2007, 2, 671-677.
- [58] *About Biotechnology: Lowry Method: A Protein Assay* [online]. 14. 1. 2010 [cit. 2011-03-19]. Dostupné z: <http://biotechnology.com/protein/lowry-method-a-protein-assay>
- [59] CHMELÍK, Josef. Proteomický průvodce. *Chemické listy*. 2005, 99, 12, 883-885.
- [60] KOVÁŘOVÁ, Hana. Proteomika v postgenomové době. *Chemické listy*. 2005, 99, 886-889.
- [61] BOGDANOV, B. a R. D. SMITH. Proteomics by FTICR mass spectrometry: Top down and bottom up. *Mass Spectrom Rev.* 2005, 24, s. 168-200.
- [62] VAŇKOVÁ, Hana. Peptidové mapy. *Chemické listy*. 1999, 93, s. 120-127.
- [63] ČEŠKOVÁ, Pavla, Kristýna BROŽKOVÁ, Lenka HERNYCHOVÁ, Jaroslav ŠTĚRBA, Dalibor VALÍK a Bořivoj VOJTĚŠEK. Hmotnostní spektrometrie v kvantitativní a diagnostické proteomice: Možnosti a limitace. *Chemické listy*. 2006, 100, 974-979.
- [64] ANSELSTETTER, V. a H.-J. HORSTMANN. Two-dimensional polyacrylamide-gel electrophoresis of the proteins and glycoproteins. *European Journal of Biochemistry*. 1975, 56 (1), 259-269.
- [65] *Bioinformatics* [online]. 2008 [cit. 2011-09-10]. Dostupné z: http://www.imb-jena.de/~rake/Bioinformatics_WEB/proteins_purification.html
- [66] WU, CC. a MJ. MAC COSS. Shotgun proteomics: tools for the analysis of complex biological systems. *Curr Opin Mol Ther.* 2002, 4, 242-250.
- [67] LENČO, J. a J. STULÍK. Identifikace proteinů kombinací peptidového mapování a fragmentace sulfonovaných peptidů. *Chemické listy*. 2004, 98, 264-267.
- [68] POLAND, G. A., I. G. OVSYANNIKOVA, KL. JOHNSON a S. NAYLOR. The role of mass spectrometry in vaccine development. *Vaccine*. 2001, 19, 17-19.
- [69] GRAHAM, R., C. GRAHAM a G. MCMULLAN. Microbial proteomice: a mass spektrometry primer for biologist. *Microbial Cell Factorories*. 2007, 6, s. 26.
- [70] HILLENKAMP, F., M. KARAS, R. C. BEAVIS a B. T. CHAIT. Matrix-Assisted Laser desorption/Ionization Mass Spectrometry of Biopolymers. *Anal. Chem.* 1991, 63, s. 1193.
- [71] *Max Planck Institute for Plant Breeding Research: Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight Mass Spectrometry* [online]. [cit. 2011-11-23]. Dostupné z: http://www.mpiz-koeln.mpg.de/english/services/Maldi/Maldi_2009/MALDI-TOF_TOF/index.html
- [72] KICKMAN, AT., MC. PARKIN a RK. ILES. An introduction to mass spektrometry based proteomics – Detection and characterization of gonadotropins and related molecules. *Mol Cell Endocrinol.* 2007, 212-227.

- [73] DOROSHENKO, VM. a RJ. COTTER. Ideal velocity focusing in a reflectron time-of-flight mass spectrometer. *J Am Soc Mass Spectrom.* 1999, 10, 992-999.
- [74] LI, L., RW. GARDEN a JV. SWEEDLER. Single-cell MALDI: a new tool for direct peptide profiling. *Trends Biotechnol.* 2000, 18, 151-160.
- [75] VACHET, RW., KL. RAY a GL. GLISH. Origin of product ions in the MS/MS spectra of peptides in a Quadrupole ion trap. *J Am Soc Mass Spectrom.* 1998, 9, 341-344.
- [76] GRIFFITHS, WJ., AP. JONSSON, S.LIU, DK.RAI a Y. WANG. Electrospray and tandem mass spectrometry in biochemistry. *Biochem J.* 2001, 355, s. 545-561.
- [77] MEDZIHRADESKY, K. F. „J. M. CAMPBELL, M. A. BALDWIN, A. M.FALICK, P. JUHASZ, M. L.VESTAL a A. L. BURLINGAME. The Characteristics of Peptide Collision-Induced Dissociation Using a High-Performance MALDI-TOF/TOF Tandem Mass Spectrometer. *Anal. Chem.* 2000, 72, 552.
- [78] HIROSE, I., K. SANO, I. SHIOSA, M. KUMANO, K. NAKAMURA, a K. YAMANE. Proteome analysis of *Bacillus subtilis* extracellular proteins: a twodimensional protein electrophoretic study. *Microbiology.* 2000, 146, 65-75.
- [79] ANTELMANN, H., C. SCHARF, a M. HECKER. Phosphate starvationinducible proteins of *Bacillus subtilis*: proteomics and transcriptional analysis. *J. Bacteriol.* 2000, 182, 4478–4490.
- [80] ANTELMANN, H., H. TJALSMA, B. VOIGT, S. OHLMEIER, S. BRON, J. M. van DIJL a M. HECKER. A proteomic view on genome-based signal peptide predictions. *Genome Res.* 2001, 11, 14984–14502.
- [81] TJALSMA a kol. Proteomics of Protein Secretion by *Bacillus subtilis*: Separating the „Secrets“ of the Secretome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68 (2), s. 207-233.
- [82] *Current Opinion in Biotechnology.* 2011, 22, 1-5.
- [83] TOKIWA, Yutaka, a kol. Biodegradability of Plastics. *Int. J. Mol. Sci.* 2009, 10, 3722-3742.
- [84] SHAH a kol. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances.* 2008, 26, 246 – 265.
- [85] MUELLER, R. J. Biological degradation of synthetic polyesters - enzymes as potential catalysts for polyester recycling. *Proc Biochem.* 2006, 41, s. 2124–2128.
- [86] YASIN, M. a B. TIGHE. *J.Biomaterials.* 1992, 13, s. 9.
- [87] SANCHEZ, J. G., A. TSUCHII a Y. TOKIWA. Degradation of polycaprolactone at 50 °C by a thermotolerant *Aspergillus sp.* *Biotechnol. Lett.* 2000, 22, 849-853.
- [88] ABOU-ZEID, D. M., R. J. MULLER a W. D. DECKWER. Degradation of natural and synthetic polyesters under anaerobic conditions. *J. Biotechnol.* 2001, 86, 113-126.
- [89] SHIGAKI, T., Y. KAWAGHOSHI, M. IKE a M. FUJITA. Biodegradation of a polyvinyl alcohol-starch blend plastic film. *World Journal of Microbiology & Biotechnology.* 1999, 15, 321-327.
- [90] WU, K.-J., CH.- S. WU a J.- S. CHANG. Biodegradability and mechanical properties of polycaprolactone composites encapsulating phosphate-solubilizing bakterium *Bacillus sp.* PG01, *Process Biochemistry.* 2007, 42, 669-675.
- [91] ROHINDRA, D., P.SHARMA a J. KHURMA. Soil and Microbial Degradation Study of Poly(ϵ -caprolactone) – Poly(vinyl butyral) Blends. *Macromol. Symp.* 2005, 224. 323-331.
- [92] DAHYIA, P. a S. PURKAYASTHA. Isolation, Screening and Production of Extracellular Alkaline Lipase from a Newly Isolated *Bacillus sp.* PD-12. *Journal of Biological Sciences.* 2011, 11 (5), 381 – 387.

- [93] DALMAU, E., J. L. MONTESINOS, M. LOTTI a C. CASAS. Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. *Enzyme Microb Technol.* 2000, 26, 657-663.
- [94] JONSSON, U. a B. G. SNYGG. Lipase Production and Activity as a Function of Incubation Time, pH and Temperature of four lipolytic Micro-organisms. *J. appl. Bact.* 1974, 37, 571 – 581.
- [95] RAJENDRAN, A. a V. THANGAVELU. Sequential optimization of culture medium composition for extracellular lipase production by *Bacillus sphaericus* using statistical methods. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.* 2007, 82, 460-470.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ACN	Acetonitril
Ala	Alanin
Asp	Aspartát
BHIB	Brain Heart Infusion Broth
<i>BS</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
CCM	Česká sbírka mikroorganismů
CHCA	α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina
CLSM	Konfokální laserová rastrovací mikroskopie
DTT	Dithiothreitol
ESI	Elektrosprej
Glu	Glutamát
GRAS	Všeobecně považovaný za bezpečný (Generally Recognized as Safe)
His	Histidin
IT	Iontová past
LipA	Lipáza
LipB	Esteráza
M_n	Početně průměrná molární hmotnost
M_w	Hmotnostně průměrná molární hmotnost
MALDI	laserová desorpce/ionizace za přítomnosti matrice (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization)
MK	Mastné kyseliny
MPA	Masopeptonový agar
MS	Hmotnostní spektrometrie
NB(G;F)	Nutrient Broth (Glucose; Fructose)
NMR	Nukleární magnetická rezonance
OO	Olivový olej
PAGE	Elektroforéza v polyakralamidovém gelu
PCL	Polykaprolakton
<i>p</i> -NF	<i>p</i> -nitrofenyl
Q	Kvadrupólový radiofrekvenční analyzátor
SDS	Dodecylsírán sodný
Ser	Serin
SmF	Submerzní fermentace
SSF	Solid-State fermentace
T_m	Teplota tání
TAG	Triacylglycerol
TCA	Trichloroctová kyselina
TFA	Trifluoroctová kyselina
TOF	Průletový analyzátor (Time-of-Flight)
Trp	Tryptofan
Tyr	Tyrosin
U	Unit – standardní jednotka aktivity
UV	Ultrafialová část spektra


9 PŘÍLOHY

Příloha 1: Optimization of lipase production by *Bacillus subtilis*


OPTIMIZATION OF LIPASE PRODUCTION BY *BACILLUS SUBTILIS*

Stanislava Voběrková¹, Jiřina Omelková², Soňa Hermanová¹,
Radka Slavičková², Lukáš Richtera¹


¹Institute of Materials Chemistry, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkyňova 118, 60200 Brno, Czech Republic (mailto:st.vob@vutbr.cz)
²Institute of Food Science and Biotechnology, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkyňova 118, 60200 Brno, Czech Republic




Central European Institute of Technology
BRNO | CZECH REPUBLIC



BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY
FACULTY OF CHEMISTRY
Purkyňova 118, 602 00 Brno, CZECH REPUBLIC
phone: +420 541 14 31 11, fax: +420 541 21 16 07
http://www.fch.vutbr.cz





INTRODUCTION - *Bacillus subtilis*

- a Gram-positive, aerobic bacterium naturally occurring in soil, aquatic habitats and associated with plants
- important expression host producing proteins of commercial interest

- GRAS organism
- secretion of at least two different lipolytic enzymes-lipases into the extracellular medium

OBJECTIVE

Enhancement of the production of lipases as potential biocatalysts for industrial use from renewable sources.

MATERIALS AND METHODS

Microorganism: *Bacillus subtilis* CCM 1999
 Cultivation media: Brain Heart Infusion Broth (BHIB), Nutrient broth (NB) and Nutrient broths supplemented with 2% glucose (NBG)
 Growth curves → measuring the optical density at 660 nm
 Enzyme activity → spectrophotometrically using p-nitrophenyl laurate (p-NPL) as substrate
 One enzyme unit (U) was the amount of enzyme liberating 1 μmol of p-nitrophenol (pNP) per minute under the assay conditions

RESULTS

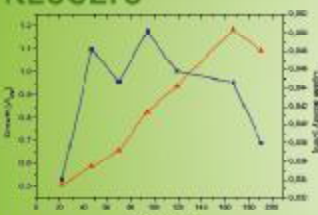


Fig. 1: Time course of lipase secretion by *B. subtilis*. The strain was grown on BHIB medium. Cell growth (Δ), lipase activity (□).

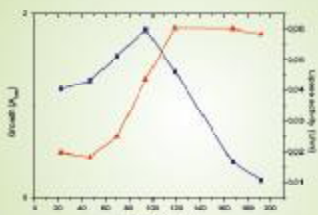


Fig. 2: Time course of lipase secretion by *B. subtilis*. The strain was grown on NB medium. Cell growth (Δ), lipase activity (□).

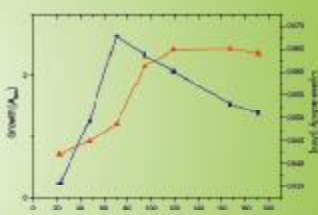


Fig. 3: Time course of lipase secretion by *B. subtilis*. The strain was grown on NBG medium. Cell growth (Δ), lipase activity (□).

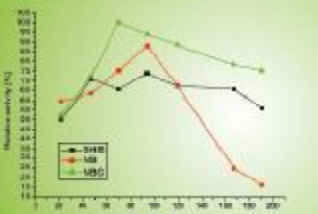
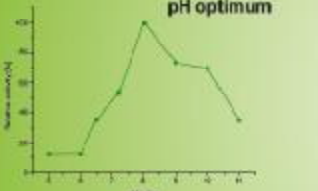


Fig. 4: Effect of medium composition on *B. subtilis* lipase activity. Results are expressed as a percentage of the maximal activity.

CONCLUSION

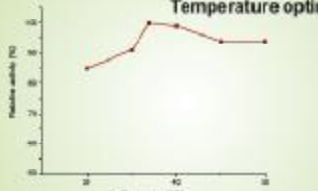
- ✓ The highest lipase activity was measured in nutrient broth with glucose as the carbon source after three days.
- ✓ Optimum pH of *Bacillus subtilis* lipase was 8.
- ✓ The optimum temperature was 37 °C.
- ✓ The enzyme was relatively thermostable, since it retained almost 100% of its activity at 30-50 °C and 60% at 60-70 °C.

pH optimum

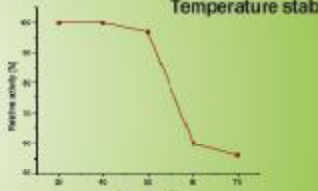


Results are expressed as a percentage of the maximal activity.

Temperature optimum





Temperature stability




ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by the Ministry of Education of the Czech Republic under project no. MSM00216305C1.





FUNKCE JAK
CENTRUM PRO INOVACI
PŘI VÝVOJI NOVÝCH
PRODUKTŮ



OP Vzdělávání a odborná příprava
pro inovace