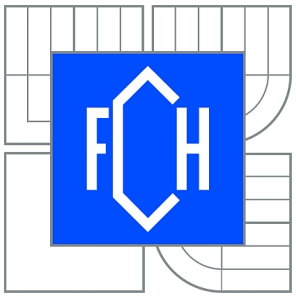
VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

PRODUKCE PROTEOLYTICKÝCH ENZYMŮ VYBRANÝMI MIKROORGANISMY

PRODUCTION OF PROTEOLYTIC ENZYMES BY SELECTED MICROORGANISMS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE — MARTIN PALA
AUTHOR

VEDOUCÍ PRÁCE — doc. RNDr. IVANA MÁROVÁ, CSc.
SUPERVISOR

BRNO 2011

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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	**FCH-BAK0605/2010**	Akademický rok:	**2010/2011**
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií		
Student(ka):	**Martin Pala**		
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (B2901)		
Studijní obor:	Biotechnologie (2810R001)		
Vedoucí práce	**doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.**		
Konzultanti:			

Název bakalářské práce:

Produkce proteolytických enzymů vybranými mikroorganismy

Zadání bakalářské práce:

1. Rešerše - extracelulární mikrobiální proteolytické enzymy, přehled bioproducentů a podmínek produkce.
2. Optimalizace metod stanovení růstových charakteristik a proteolytické aktivity.
3. Regulovaná produkce extracelulárních proteáz pomocí vybraných mikroorganismů.

Termín odevzdání bakalářské práce: 6.5.2011

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

Martin Pala Student(ka)	doc. RNDr. Ivana Márová, CSc. Vedoucí práce	doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc. Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2011

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Předložená práce se zabývala studiem možností mikrobiální produkce proteolytických enzymů používaných v řadě průmyslových aplikací. K produkci mikrobiálních proteolytických enzymů byla využita průmyslová bakterie *Bacillus subtilis*. V průběhu kultivace byl studován růst biomasy a produkce proteolytických enzymů v závislosti na typu substrátu a aplikaci vybraných stresových faktorů (osmotického šoku, peroxidu vodíku a etanolu). Nejvyšší produkce biomasy byla dosažena v koncentrovaném BM médiu ve 32. hodině kultivace. Výtěžek představoval 1,11 ± 0,03 g/l. Nejvyšší proteázová aktivita (88,28 ± 7,32 U/ml) byla stanovena ve stejném kultivačním médiu a čase. Na základě vyhodnocení výsledků stresových experimentů lze konstatovat, že převážná většina použitých stresových faktorů působí na bakteriální kulturu toxicky již v nízkých koncentracích.

ABSTRACT

Presented work was focused on study of microbial production of proteolytic enzymes used in many industrial applications. Bacterium *Bacillus subtilis* was used for laboratory production of microbial proteolytic enzymes. During cultivation production of biomass and proteolytic enzymes were studied influence of substrate type and stress factor application (osmotic shock, hydrogen peroxide and etanol) was tested too. The highest concentration of biomass was measured in concentrated BM medium after 32 hours of cultivation. Biomass yield was 1.11 ± 0.03 g/l. The highest protease activity (88.28 ± 7.32 U/ml) was obtained in the same cultivation medium and time of cultivation. According to results of stress experiments it can be concluded that most of used stress factors exhibited a toxic effects to bacterial culture even at low concentrations.

KLÍČOVÁ SLOVA

Mikrobiální proteolytické enzymy, Bacillus subtilis, proteolytická aktivita

KEY WORDS

Microbial proteolytic enzymes, Bacillus subtilis, proteolytic activity

PALA, M. *Produkce proteolytických enzymů vybranými mikroorganismy*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 44 s. Vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

..……
podpis

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěl poděkovat mé vedoucí bakalářské práce paní doc. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za všestrannou pomoc a rady a dále také Ing. Stanislavu Obručovi, PhD. za trpělivost a pomoc při práci v laboratoři. Předložená práce byla finančně podpořena z prostředků projektu CZ.1.05/2.1.00/01.0012/ERDF.

OBSAH

1 ÚVOD 8
2 TEORETICKÁ ČÁST 9
2.1 OBECNÝ POPIS ENZYMŮ 9
2.2 SLOŽENÍ A MOLEKULÁRNÍ VLASTNOSTI ENZYMŮ 10
2.3 DEFINICE HYDROLÁZ A PROTEÁZ 10
2.3.1 Živočišné proteázy 10
2.3.2 Rostlinné proteázy 11
2.3.3 Mikrobiální proteázy 11
2.4 VLASTNOSTI MIKROBIÁLNÍCH ALKALICKÝCH PROTEÁZ 11
2.4.1 pH a teplota 12
2.4.2 Efekt stabilizátorů/aditiv a kovových iontů 12
2.4.3 Substrátová specifita 12
2.4.4 Kinetické parametry 12
2.5 MIKROBIÁLNÍ PROTEOLYTICKÉ ENZYMY RODU *BACILLUS* 13
2.6 MECHANISMUS ÚČINKU SERINOVÝCH PROTEÁZ 13
2.6.1 Tvorba tetraedrálního intermediátu 13
2.6.2 Tvorba intermediátu acyl-enzym 14
2.6.3 Deacylační krok 14
2.7 MIKROBIÁLNÍ PRODUCENTI ALKALICKÝCH PROTEÁZ 15
2.7.1 Bakterie Bacillus subtilis 15
2.8 PRŮMYSLOVÉ VYUŽITÍ PROTEÁZ 16
2.8.1 Výroba biodetergentů 16
2.8.2 Mlékarenský průmysl 17
2.8.3 Kožedělný průmysl 17
2.8.4 Pekárenský průmysl 18
2.8.5 Pivovarství 18
2.8.6 Masný průmysl 18
3 PRAKTICKÁ ČÁST 19
3.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, MATERIÁL A PŘÍSTROJE 19
3.1.1 Bakteriální kmeny 19
3.1.2 Chemikálie pro kultivaci mikroorganismů 19
3.1.3 Ostatní chemikálie 19
3.1.4 Přístroje 19
3.2 KULTIVACE BAKTERIE *BACILLUS SUBTILIS* 20
3.2.1 Živná média 20
3.3 STANOVENÍ KONCENTRACE BIOMASY V JEDNOTLIVÝCH KULTIVACÍCH 20

3.3.1 Stanovení kalibrační křivky ... 20
3.3.2 Stanovení koncentrace biomasy ... 21
3.4 STANOVENÍ PROTEÁZOVÉ AKTIVITY VYBRANÝMI METODAMI ... 21
3.4.1 Stanovení proteázové aktivity pomocí azokaseinu ... 21
3.4.2 Stanovení proteázové aktivity v UV-VIS oblasti ... 21
3.4.3 Stanovení proteázové aktivity biuretovou metodou ... 22
3.5 STUDIUM RŮSTU BIOMASY A PROTEÁZOVÉ AKTIVITY V ZÁKLADNÍM MÉDIU ... 22
3.5.1 Růst biomasy v základním médiu v závislosti na čase ... 22
3.5.2 Proteázová aktivita v základním médiu v závislosti na čase ... 22
3.6 STUDIUM VLIVU SUBSTRÁTU NA RŮST BIOMASY A PROTEÁZOVOU AKTIVITU ... 22
3.6.1 Vliv substrátu na růst biomasy ... 22
3.6.2 Vliv substrátu na proteázovou aktivitu ... 23
3.7 STANOVENÍ RŮSTOVÉ A PRODUKČNÍ KŘIVKY VE DVOU KONCENTROVANÝCH MÉDIÍCH ... 23
3.7.1 Stanovení růstové křivky ... 23
3.7.2 Stanovení produkční křivky ... 23
3.8 STUDIUM VLIVU STRESOVÝCH FAKTORŮ NA RŮST A PROTEÁZOVOU AKTIVITU ... 23
3.8.1 Vliv etanolového stresu na růst a proteázovou aktivitu ... 23
3.8.2 Vliv osmotického stresu na růst a proteázovou aktivitu ... 24
3.8.3 Vliv peroxidového stresu na růst a proteázovou aktivitu ... 24
4 VÝSLEDKY A DISKUZE ... 25
4.1 KALIBRACE SPEKTROFOTOMETRICKÉHO STANOVENÍ BIOMASY ... 25
4.2 MNOŽSTVÍ BIOMASY A PROTEÁZOVÁ AKTIVITA V ZÁKLADNÍM MÉDIU ... 26
4.2.1 Výsledky stanovení růstové křivky v základním médiu ... 26
4.2.2 Výsledky stanovení proteázové aktivity v základním médiu ... 27
4.2.3 Diskuze výsledků stanovení růstové křivky a proteázové aktivity v základním médiu ... 28
4.3 VÝSLEDKY STANOVENÍ PROTEÁZOVÉ AKTIVITY RŮZNÝMI METODAMI ... 29
4.3.1 Výsledek stanovení proteázové aktivity pomocí azokaseinu ... 29
4.3.2 Výsledek stanovení proteázové aktivity v UV-VIS oblasti ... 29
4.3.3 Výsledek stanovení proteázové aktivity biuretovou metodou ... 30
4.3.4 Diskuze výsledků stanovení proteázových aktivit různými metodami ... 30
4.4 VÝSLEDKY STUDIA VLIVU SUBSTRÁTU NA RŮST BIOMASY A PROTEÁZOVOU AKTIVITU ... 31
4.4.1 Výsledky studia vlivu substrátu na růst biomasy ... 31
4.4.2 Výsledky studia vlivu substrátu na proteázovou aktivitu ... 32
4.4.3 Diskuze výsledků studia vlivu substrátu na růst a produkci ... 33
4.5 VÝSLEDKY STANOVENÍ RŮSTOVÉ A PRODUKČNÍ KŘIVKY ... 34
4.5.1 Výsledky stanovení růstové křivky ... 34
4.5.2 Výsledky stanovení produkční křivky ... 35

4.5.3 Diskuze výsledků stanovení růstových a produkčních křivek 36
4.6 VÝSLEDKY STUDIA VLIVU STRESOVÝCH FAKTORŮ NA RŮST A PROTEÁZOVOU AKTIVITU .. 37
4.6.1 Výsledky studia vlivu etanolového stresu na růst biomasy 37
4.6.2 Výsledky studia vlivu etanolového stresu na proteázovou aktivitu 37
4.6.3 Výsledky studia vlivu osmotického stresu na růst biomasy 38
4.6.4 Výsledky studia vlivu osmotického stresu na proteázovou aktivitu 38
4.6.5 Výsledky studia vlivu peroxidového stresu na růst biomasy 38
4.6.6 Výsledky studia vlivu peroxidového stresu na proteázovou aktivitu 39
4.6.7 Diskuze výsledků vlivu stresových faktorů na růst B.subtilis a produkci proteáz 40
5 ZÁVĚR 41
6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 43

1 ÚVOD

Produkce enzymů je vlastní všem živým organismům, tj. živočichům, rostlinám i všem mikroorganismům. Život tak jak jej známe by bez enzymů nebyl možný, enzymy jako biokatalyzátory regulující rychlost fyziologických procesů mají ústřední úlohu ve zdraví i nemoci. Zatímco ve zdravém těle probíhají všechny fyziologické procesy uspořádaným regulovaným způsobem, porucha aktivity i pouze jediného enzymu vede ke škodlivým, nezřídka i smrtelným genetickým poruchám, což platí pro všechny živé organismy. Pro velkoobjemovou průmyslovou výrobu enzymů jsou využívány především mikroorganismy. Různé enzymy jsou produkovány především bakteriemi, plísněmi nebo také kvasinkami. Co se týče proteolytických enzymů produkovaných mikroorganismy, mezi největší průmyslové producenty patří bakterie rodu *Bacillus*. Zkoumány byly také jiné bakterie, kvasinky či plísně.

Mikrobiální proteolytické enzymy jsou biotechnologicky získávány již řadu let. Tyto enzymy představují důležitou skupinu látek využitelných v průmyslu. Mikrobiální proteolytické enzymy představují 40% všech enzymů vyrobených a použitých v různých odvětvích průmyslu. Jejich důležitost znázorňuje především fakt, že v roce 2002 v Evropské unii činila produkce a využití těchto enzymů 900 tun čistého enzymu, což je v porovnání s ostatními průmyslově vyráběnými enzymy několikanásobně větší množství. Použití těchto enzymů v průmyslu zvýšilo komfort a kvalitu našeho života.

Největší uplatnění mají mikrobiální proteolytické enzymy v oblasti biodetergentů, což jsou prací a čistící prostředky, obsahující vedle povrchově aktivních látek také právě proteolytické enzymy. Důvodem přidávání těchto látek je ten, že enzym degraduje denaturovanou bílkovinu ulpívající na prádle peptidy, které se následně odplaví. Myšlenka použití proteáz v pracích prostředcích je poměrně stará, ale cesta k jejich dnešnímu použití nebyla snadná. Komerčně uplatnila přídavek do namáčecích prášků německá firma již v roce 1913. Trypsin byl přidáván ve formě dehydrovaného hovězího nebo vepřového pankreatu. Ovšem používání naznačilo spoustu problémů, např. nízká aktivita enzymu, nízká stabilita při vyšších hodnotách pH prací lázně, inaktivace zvýšením teploty prací lázně atd. Ukázalo se, že trypsin není pro tyto účely vhodný, přestože je alkalickou proteázou. Tyto náročné podmínky splňují pouze mikrobiální proteázy. První velké úspěchy byly dosaženy v šedesátých letech. Přestože donedávna ovládaly trh pouze práškové prací prostředky, snahy o energeticky méně náročné výroby a omezení používaných fosfátů vyvolaly obrat ke kapalným detergentům. Aplikace enzymů do pracích a čistících prostředků je zatím bezkonkurenčním úspěchem praktické enzymologie. Velký význam mají mikrobiální proteolytické enzymy také např. v mlékárenském průmyslu, kožedělném či pekárenském průmyslu.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Obecný popis enzymů

U živých organismů je přísun energie a stavebního materiálu z okolí zajišťován složitou síti chemických dějů. Na řízení a koordinaci tohoto organisovaného souboru chemických reakcí se podílí pestrá škála biokatalyzátorů. Jejich nejpočetnější a nejdůležitější skupinu tvoří bílkovinné makromolekuly s katalytickými funkcemi. Pokud urychlují chemické přeměny, nazýváme je enzymy [1].

Padesát let se předpokládalo, že všechny enzymy jsou bílkoviny. V poslední době se však ukázalo, že i molekuly RNA mohou být vysoce aktivními enzymy. Enzymy nacházíme ve všech živých systémech a předpokládá se, že i nejjednodušší buňky obsahují přes 3000 enzymů, které řídí rychlosti prakticky všech reakcí v nich probíhajících. Protože enzymy, stejně jako jiné kategorie bílkovin, jeví druhovou specifitu (každý biologický druh má své vlastní enzymy), odhaduje se počet existujících enzymů na miliardy. Nebílkovinná část enzymů povahy složených bílkovin se obecně nazývá kofaktor. Enzymy vykazují značnou specifitu jak co do typu katalyzované reakce (reakční nebo účinková specifita), tak co do struktury přeměňovaných substrátů (substrátová specifita). Pracují většinou za mírných podmínek (teplota 20-40 °C, tlak 0,1 MPa a pH většinou kolem 7). Nezanedbatelnou předností enzymů při jejich průmyslových aplikacích je i jejich netoxičnost, na rozdíl od umělých katalysátorů, které jsou většinou toxické [2].

Historicky nejstarší objevené enzymy byly označovány názvy, které souvisely s jejich výskytem a celkovou funkcí v organismu. S růstem počtu definovaných enzymů bylo nutno názvosloví "systematizovat", proto byl název řady enzymů vytvořen tak, že se ke kmeni substrátu, což je molekula, na kterou enzym působí, připojilo zakončení –áza. Tato nomenklatura nebyla vždy praktická, protože nevystihovala chemickou podstatu děje. Z těchto důvodů byla zavedena systematická klasifikace enzymů. Podle mezinárodní nomenklatury bylo vytvořeno i české názvosloví enzymů. Snaží se o co největší podobnost s názvoslovím mezinárodním. Je zachována koncovka –áza a názvy se píší (až na výjimky) jako jedno slovo. Základem jednotné klasifikace a nomenklatury enzymů je jejich rozdělení do šesti hlavních tříd, podle typu katalyzované reakce na:

1) Oxidoreduktázy – katalyzují intermolekulové oxidačně redukční přeměny
2) Transferázy – realizují přenos skupin (-CH_3, -NH_2, zbytek glukosy apod.) v aktivované formě z jejich donoru na akceptor
3) Hydrolázy – štěpí hydrolyticky vazby, které vznikly kondensací, např. peptidové (a jiné amidové), glykosidové, esterové. Zde řadíme proteázy.
4) Lyázy – katalyzují nehydrolytické štěpení a vznik (pokud není energeticky náročný) vazeb C-C, C-O, C-N.
5) Isomerázy – realizují vnitromolekulé přesuny atomů a jejich skupin, tedy vzájemné přeměny isomerů.
6) Ligázy – katalyzují vznik energeticky náročných vazeb za současného rozkladu látky uvolňující energii, např. ATP [3].

2.2 Složení a molekulární vlastnosti enzymů

Některé katalyticky aktivní enzymy jsou tvořeny jen peptidovými řetězci, kdežto jiné obsahují nebílkovinné součásti (kofaktory) nazývané koenzymy. Kofaktor je nebílkovinná složka enzymu. Může to být kovový ion nebo organická molekula, popřípadě obě složky najednou. Kofaktory jsou obecně stálé při zahřívání, kdežto většina enzymových bílkovin je při vyšších teplotách denaturována a ztrácí svoji aktivitu. Katalyticky aktivní komplex enzym-kofaktor je nazýván holoenzym. Po oddělení kofaktoru je zbývající bílkovinná část, obvykle enzymově inaktivní, nazývána apoenzym. Pro organický kofaktor enzymu se užívají názvy koenzym a prostetická skupina [3].

2.3 Definice hydroláz a proteáz

Proteázy jsou početná skupiny enzymů z třídy hydroláz. Hydrolázy katalyzují hydrolytické štěpení substrátů, tj. jejich štěpení za účasti vody. Mechanismus působení hydroláz si představme tak, že část hydrolyzovaného substrátu (XY) je přenášena na molekulu vody:

$$XY + H - OH \Leftrightarrow H - X + Y - OH$$

Která ze složek hydrolyzovaného substrátu (X nebo Y) se spojí s hydroxylovou skupinou vody, je možno zjistit pomocí vody značené radionuklidem ^{18}O. V enzymové nomenklatuře jsou hydrolázy klasifikovány do jednotlivých podtříd podle charakteru hydrolyzované vazby (esterové, glyskosidové, etherové, peptidové atd.) [3].

Jak již bylo zmíněno, proteázy jsou početná skupina enzymů, které řadíme do širší skupiny hydroláz. Společným rysem proteáz je schopnost hydrolyzovat peptidové vazby bílkovinných substrátů. Celá řada z nich se liší původem, lokalizací, fyzikálně chemickými vlastnostmi, specifitou, mechanismem působení, fyziologickými funkcemi i možnostmi jejich praktického využití. Podle původu dělíme proteázy na živočišné, rostlinné a mikrobiální. Tato práce se zabývá mikrobiálními alkalickými proteázami, které budou důkladněji popsány [1].

2.3.1 Živočišné proteázy

Z živočišných proteáz mají největší význam trypsin, chymotrypsin, pepsin a chymozin. Komerčně se vyrábějí ještě např. elastáza a karboxypeptidáza A.

Trypsin štěpí specificky peptidové vazby, na nichž se podílejí karboxylovou skupinou basické aminokyseliny (lysin a arginin). Chymotrypsin má optimální pH zhruba ve stejné oblasti jako trypsin. Mechanismus jeho aktivace z inaktivního zymogenu je složitější než u trypsinu. Chymotrypsin nemá tak vyhraněnou specifitu. Pepsin patří mezi karboxylové (kyselé) protézy. Izoluje se z vepřové nebo hovězí žaludeční mukosy. Má poměrně širokou specifitu. Chymozin je vyráběn extrakcí ze žaludků sajících telat. Jeho specifita je podobná pepsinu [1].

2.3.2 Rostlinné proteázy

Z rostlinných proteáz mají význam papain, ficin a bromelain. Jsou to sulfhydrylové proteázy obdobných vlastností i praktického použití. Nejvíce je používán papain.

Jako papainový preparát je nejčastěji užíván sušený latex z nezralých papájovníkových plodů (*Carica papaya*). Papain má proteolytickou i mléko srážející aktivitu. Ficinové preparáty jsou analogicky sušeným latexem z různých rostlin rodu *Ficus*. Ficin je používán ke stabilizaci piva, k získání stříbra z použitých filmů a k hydrolýze bílkovin. Bromelain je získáván buď z ananasové šťávy, nebo ze zbytků (stonků) po výrobě ananasových kompotů. Na rozdíl od papainu a ficinu je glykoproteinem [1].

2.3.3 Mikrobiální proteázy

Nejdůležitější skupinou, co se týče použití proteáz v praxi, je skupina mikrobiálních proteolytických enzymů. Jejich velkou předností je snadnost velkoobjemové výroby a možnost volby vhodných vlastností enzymu změnou produkčního kmene [10].

Mikrobiální protézy můžeme rozdělit do dvou velkých skupin, proteázy bakteriální a plísňové. Bakteriální proteázy dominují co do objemu výroby i počtu praktických aplikací. Největší kvanta bakteriálních proteáz se spotřebují při výrobě biologicky aktivních pracích prostředků. Dále jsou používány k výrobě hydrolyzátů pro krmivářské účely, v koželužském i mlékárenském průmyslu [1].

Hlavní oblastí aplikace plísňových proteáz je pekárenský průmysl, neboť příznivě ovlivňují vlastnosti těsta. Mírná degradace glutenu zkracuje dobu potřebnou k hnětení, zvyšuje roztažnost těsta, ale nepoškozuje jeho strukturu. Další možnosti aplikace nalezly plísňové proteázy v mlékárenském průmyslu a při odstraňování masa z kostí [1].

Mikrobiální proteázy jsou nejčastěji rozdělovány podle jejich pH optima na kyselé, neutrální a alkalické proteázy. Z hlediska mechanismu působení nejpoužívanější alkalické proteázy (s optimálním pH 6-12) patří mezi serinové proteázy. Neutrální proteázy s optimem působení při 7-8 jsou většinou metalloenzymy, mající v aktivním místě zinek. Jsou bakteriálního (rod *Bacillus*) a plísňového (rod *Aspergillus*) původu. Kyselé (aspartátové) proteázy mají pH optimum mezi 3-5, jsou vesměs plísňového původu a připomínají svými vlastnostmi živočišný pepsin [4].

2.4 Vlastnosti mikrobiálních alkalických proteáz

Vlastnosti mikrobiálních alkalických proteáz několika mikroorganismů byly detailně studovány a přehled nejdůležitějších vlastností, podle kterých jsou užívány v průmyslu, jsou níže popsány. Mezi tyto vlastnosti řadíme pH a teplotu, efekt stabilizátorů/aditiv a kovových iontů, substrátovou specifitu a parametry kinetiky enzymové reakce (např. maximální rychlost reakce v_{max}, Michaelisova konstanta K_m nebo aktivační energie E_a) [5].

2.4.1 pH a teplota

Obecně všechny v současné době užívané proteázy v pracích a čistících prostředcích jsou alkalické a termostabilní, mají široké pH optimum, mezi 8-12 a teplotní optimum je mezi 50-70°C. Dle současných trendů ve výrobě biodetergentů, je potřeba takových alkalických proteáz, které jsou aktivní při praní již při nízkých teplotách např. při 10-20°C [5].

2.4.2 Efekt stabilizátorů/aditiv a kovových iontů

Některé z hlavních komerčně užívaných alkalických proteáz jsou aktivní při vysokých teplotách. Zvýšení termostability můžeme docílit buď přidáním určitých stabilizátorů (např. PEG – polyetylenglykol nebo škrob) do reakční směsi nebo změnou terciální struktury enzymu pomocí proteinového inženýrství [5].

Vápenatý kation Ca^{2+} hraje také velkou roli při stabilizaci enzymů zvyšováním termostability při vyšších teplotách. Podobným efektem se vyznačuje celá řada dalších kovových iontů, jako ionty barnaté Ba^{2+}, manganaté Mn^{2+}, hořečnaté Mg^{2+}, kobaltnaté Co^{2+}, železité Fe^{3+} a zinečnaté Zn^{2+}. Tyto kovové ionty chrání enzym vůči teplotní denaturaci a hrají důležitou roli při udržování aktivní konformace enzymu při vysokých teplotách [5].

2.4.3 Substrátová specifita

Alkalické proteázy jsou specifické vůči mnoha substrátům a jsou aktivní jak vůči přírodním bílkovinám, tak i vůči syntetickým substrátům. Alkalické proteázy jsou aktivnější např. vůči kaseinu než azokaseinu, hemoglobinu nebo hovězímu albuminu (BSA). Mezi tyto specifické enzymy řadíme např. kolagenázu, elastázu a keratinázu štěpící proteiny jako kolagen, elastin či keratin. Alkalické proteázy jsou aktivní také vůči aromatickým nebo hydrofobním aminokyselinám jako tyrosin, fenylalanin nebo leucin [5].

2.4.4 Kinetické parametry

Kinetické parametry jako maximální rychlost enzymatické reakce V_{max}, Michealisova konstanta K_m nebo aktivační energie E_a jsou pro pochopení vlastností daného enzymu velice důležité [13].

Pro alkalické proteázy produkující *Bacillus mojavensis* klesá hodnota Michaelisovy konstanty K_m pro substrát kasein s rostoucí maximální rychlosti reakce V_{max}, dojde-li ke zvýšení teploty ze 45°C na 60°C. Jako protiklad lze zde uvést např. proteázy produkované kmenem *Rhizopus oryzae*, kdy při zvýšení teploty z 37°C na 70°C dochází ke zvýšení hodnoty Michaelisovy konstanty K_m i maximální rychlosti reakce V_{max} [5].

2.5 Mikrobiální proteolytické enzymy rodu *Bacillus*

Mezi enzymy produkované bakteriálním rodem *Bacillus* řadíme tzv. subtilisiny. Jedná se o mikrobiální alkalické proteázy serinového typu. Stabilní jsou v alkalickém prostředí. Tyto enzymy nacházejí největší uplatnění v tzv. biodetergentech, což jsou prací a čistící prostředky [6].

Enzym subtilisin je jeden z nejlépe prostudovaných bakteriálních enzymů. Tento enzym je produkován na počátku sporulace. Většinou je vylučován extracelulárně za účelem vyplavování živin. Velký význam tohoto enzymu dokazuje fakt, že v roce 2002 bylo v Evropské Unii vyprodukováno 900 tun čistého enzymu [6].

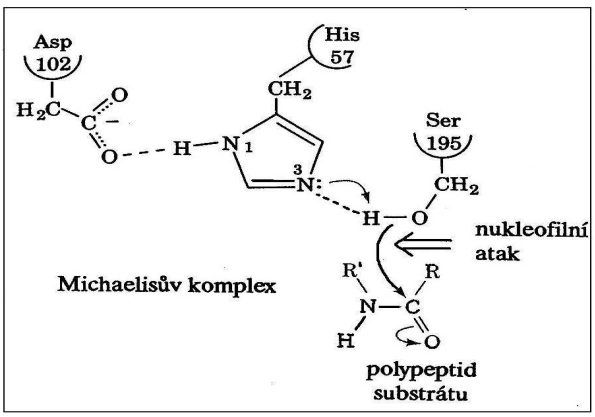
2.6 Mechanismus účinku serinových proteáz

Enzymy známé jako serinové proteázy byly pojmenovány podle toho, že mají společný mechanismus katalýzy, charakterizovaný přítomností výjimečně reaktivního serinového zbytku, který je podstatný pro enzymovou aktivitu [7].

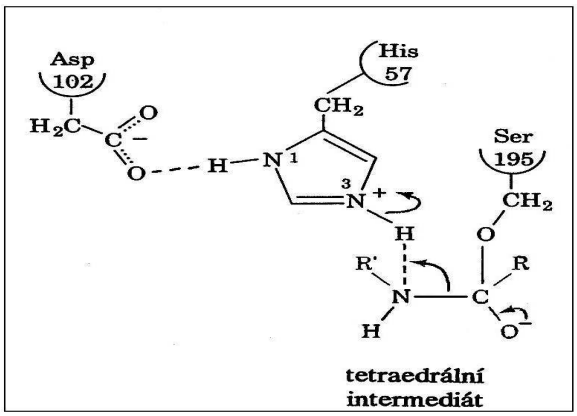
Rozsáhlá homologie aktivních míst různých serinových proteáz dokazuje, že všechny mají stejný katalytický mechanismus. Na základě mnoha údajů o chemických a strukturních vlastnostech serinových proteáz shromážděných v různých laboratořích byl mechanismus jejich účinnosti formulován. V dalším textu je uveden mechanismus enzymového účinku pro chymotrypsin [7].

2.6.1 Tvorba tetraedrálního intermediátu

Jakmile chymotrypsin naváže substrát za vzniku Michaelisova komplexu (obr. 1), Ser-195 nukleofilně napadá štěpenou karbonylovou skupinu peptidu, čímž vzniká tetraedrální intermediát (obr. 2). Ser-195 je ideálně umístěn, aby mohl uskutečňovat toto nukleofilní napadení. Tento proces podporuje polarizační účinek nesolvatovaného karboxylátového iontu Asp-102, jehož vodíkový atom je vázán na His-57. Tetraedrální intermediát má dobře definovanou existenci. Většina katalytické síle chymotrypsinu pochází z jeho preferenční vazby tohoto přechodného stavu [7].



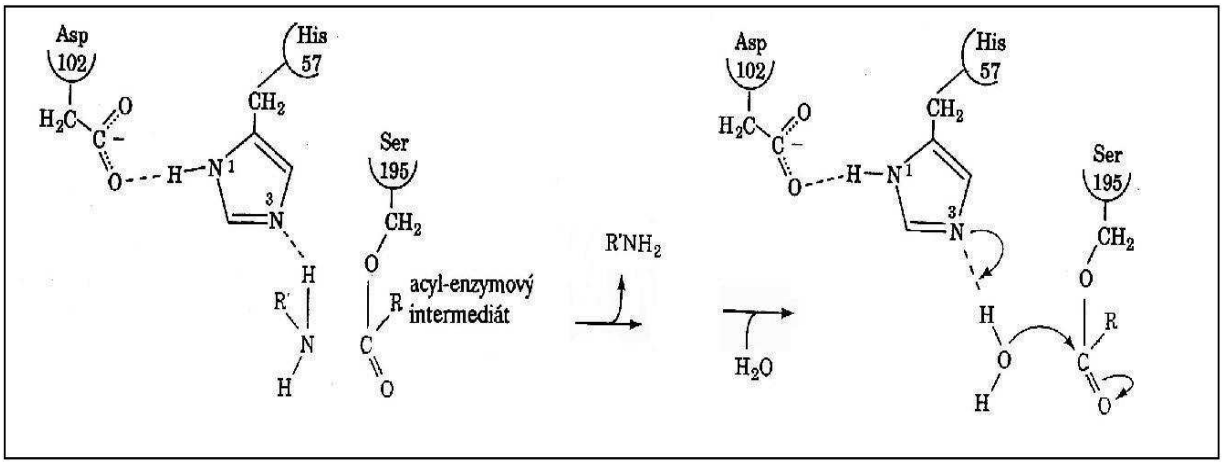
Obr. 1 Vznik Michaelisova komplexu [7]



O**br. 2** Vznik tetraedrálního intermediátu [7]

2.6.2 Tvorba intermediátu acyl-enzym

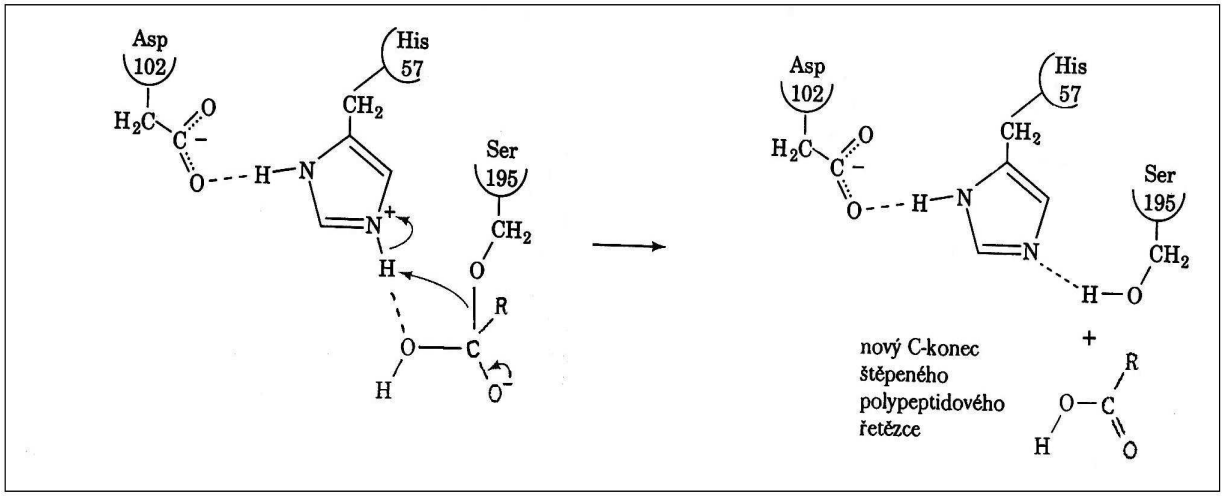
Tetraedrální intermediát se rozkládá na acyl-enzymový intermediát (obr. 3) vlivem poskytnutí protonu z $N_{(3)}$ His-57. Odštěpovaná aminoskupina ($R´NH_2$, nová N-koncová část štěpeného polypeptidového řetězce) se z enzymu uvolňuje a je nahrazena vodou z roztoku. Následkem katalytických vlastností enzymu je acyl-enzymový intermediát velice nestabilní a snadno podléhá hydrolytickému štěpení [7].



Obr. 3 Tvorba intermediátu acyl-enzym [7]

2.6.3 Deacylační krok

Deacylační krok probíhá z velké části obrácením předchozího kroku, přičemž se uvolňuje karboxylátový produkt (nová C-koncová část štěpeného peptidového řetězce). Uvolňování produktu je provázeno regenerací enzymu. V tomto procesu je atakujícím nukleofilem voda, Ser-195 je odštěpovanou skupinou (obr. 4) [7].



Obr. 4 Deacylační krok [7]

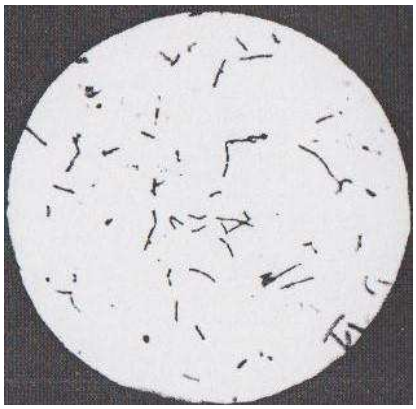
2.7 Mikrobiální producenti alkalických proteáz

Produkce proteáz je vlastní všem organismům. Mikroorganismy představují atraktivní zdroj proteáz, mohou být kultivovány ve velkém množství a za krátkou dobu pomocí fermentace produkují hojné a pravidelné množství požadovaného produktu. Mimo jiné výhody mají mikrobiální proteiny i delší skladovatelnost a mohou být uskladněné za horších než ideálních podmínek bez výrazné ztráty aktivity. Mikrobiální proteázy jsou extracelulární a jsou přímo vylučovány do fermentačního média mikrobiálními producenty [5].

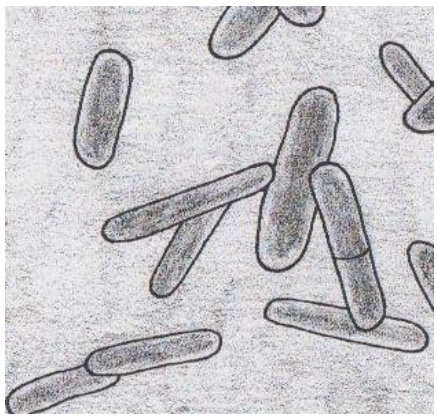
Mikrobiálních producentů alkalických proteáz je celá řada, ovšem pouze několik z nich je považováno za vhodné producenty pro komerční účely. Tyto mikroorganismy jsou obecně považovány za bezpečné, netoxické a nepatogenní producenty. Mnoho mikroorganismů patřících např. mezi bakterie, houby nebo kvasinky produkují proteázy známé jako alkalické proteázy serinového typu. Bakterie jsou dominantní skupinou producentů alkalických proteáz, konkrétně bakterie rodu *Bacillus* (např. *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquifaciens* a *Bacillus mojavensis*). Jiným bakteriálním rodem známým jako potenciální producenti proteáz jsou bakterie rodu *Pseudomonas* sp. Mezi aktinomycetami jsou preferujícím zdrojem kmeny *Streptomyces*. Mezi houbami je dominující skupinou rod *Aspergillus*, dále *Conidiobolus* sp. a *Rhizopus* sp. Z kvasinek byla do detailů studována jako potenciální producent alkalických proteáz *Candida* sp [5].

2.7.1 Bakterie *Bacillus subtilis*

Mezi nejrozšířenější bakterie rodu *Bacillus* patří *Bacillus subtilis*. Je téměř všudypřítomný, často je označován jako "senný bacil". Druhový název je utvořen z lat. subtilis = štíhlý, jemný. Tato bakterie má velmi rezistentní spory, objevené v roce 1871 F. J. Johnem, německým botanikem a bakteriologem. Ten také jako první zařadil bakterie v systému organismů do rostlinné říše. Právě s ohledem na tvorbu spor je *Bacillus subtilis* obávaným kontaminantem v potravinářských provozovnách a výrobnách. Tvoří poměrně malé peritrichní buňky (0,7 x 2 až 3 μm) a je producentem jak několika polypeptidových antibiotik, tak serinových proteáz jako je subtilisin [8]. Je výrazně aerobní a proto roste v tekutých půdách převážně ve formě povrchové blanky. Používá se k testování účinnosti horkovzdušných sterilizátorů [9].



Obr. 5 *Bacillus subtilis* (mikrofoto) [8]



Obr. 6 *Bacillus subtilis* (nákres) [8]

2.8 Průmyslové využití proteáz

Proteolytické enzymy mají široké uplatnění v mnoha odvětvích průmyslu. Je to zejména využití při výrobě pracích a čistících prostředků neboli detergentů, v mlékárenském průmyslu, kožedělném průmyslu, v pivovarnictví, v masném průmyslu, při výrobě krmných směsí, ve farmacii a medicíně, při výrobě bílkovinných hydrolyzátů a ve výzkumu. V dalších řádcích budou detailněji zdůvodněny výhody aplikace především mikrobiálních proteolytických enzymů [13].

2.8.1 Výroba biodetergentů

Jako biodetergenty jsou označovány prací a čistící prostředky obsahující vedle povrchově aktivních látek povahy detergentů jako účinné složky též enzymy. Důvod přidávání proteáz do pracích prostředků lze vysvětlit následující úvahou. Na prádle ulpívající bílkoviny (potu, moče, ale i krve) jsou denaturovány, a proto je lze z povrchu prádla odstranit jen obtížně. Navíc překrývají různé nečistoty, které se pak odstraňují daleko hůře. Je-li v pracím prostředku přítomna proteáza, degraduje denaturovanou bílkovinu ulpívající na prádle na štěpy (peptidy), které se odplaví. Detergent se snadno dostane k zašpiněným místům na prádle a špínu odstraní [1].

Na podobném principu zvyšují prací účinnost i některé další enzymy, např. amylasy a lipasy. Uvažuje se ovšem i o přídavku enzymů, odbourávajících jiné nečistoty na rozpustné fragmenty, např. enzymů degradujících alkanové řetězce. Myšlenka použití proteáz v pracích prostředcích je poměrně stará, ale cesta k jejich dnešnímu použití nebyla snadná. Komerčně uplatnila přídavek do namáčecích prášků německá firma již v roce 1913. Trypsin byl přidáván ve formě dehydrovaného hovězího nebo vepřového pankreatu. Ovšem používání naznačilo spoustu problémů, např. nízká aktivita enzymu, nízká stabilita při vyšších hodnotách pH prací lázně, inaktivace zvýšením teploty prací lázně atd [1].

Ukázalo se, že trypsin není pro tyto účely vhodný (přestože je alkalickou proteázou). Tyto náročné podmínky splňují pouze mikrobiální proteázy. První velké úspěchy byly dosaženy v šedesátých letech. Původně práškové enzymy byly později nahrazeny enkapsulovanou formou, která je též označována jako "prilování". Prilování (granulování) enzymů přineslo jejich zvýšenou stabilitu při skladování a prakticky eliminovalo riziko vzniku alergií při přímém styku s enzymem, které bylo příčinou určité stagnace výroby proteáz na počátku sedmdesátých let [1].

Přestože donedávna ovládaly trh pouze práškové prací prostředky, snahy o energeticky méně náročné výroby a omezení používaných fosfátů vyvolaly obrat ke kapalným detergentům. V souvislosti s tímto patentovala řada firem různé typy tekutých enzymových pracích prostředků. Tyto změněné požadavky přinesly sebou nové problémy se stabilizací enzymů pro období mezi výrobou a použitím. Značný význam v tomto směru má složení směsi detergentů. Dalším významným trendem ve vývoji biodetergentů je snaha hledat takové mikrobiální enzymy, které budou vykazovat vysokou enzymovou aktivitu při nízkých teplotách (např. v Japonsku se pere prádlo běžně při nižších teplotách než v Evropě) [1].

Kromě enzymových pracích prostředků se rozšiřuje i sortiment enzymových čistících prostředků, u nichž mohou být používány mnohem vyšší enzymové aktivity zaručující vyšší čistící efekt. Existují výrazné rozdíly ve schopnostech jednotlivých enzymů likvidovat

nečistotu na bavlně, polyakrylamidu a jiných typech tkanin (příprava k odstranění jednotlivých typů špíny z určitého typu tkaniny) [1].

Zajímavostí také je, že i rostlinnou proteázu papain, u kterého proběhla chemická modifikace použitím anhydridu kyseliny jantarové, je možné také použít k výrobě biodetergentů. Takto upravený papain může sloužit jako levná alternativa mikrobiálních alkalických proteáz [11].

Aplikace enzymů do pracích a čistících prostředků je zatím bezkonkurenčním úspěchem praktické enzymologie [1].

2.8.2 Mlékarenský průmysl

Syřidlové enzymy zaujímají významné postavení v celosvětové produkci technických enzymů. Ideálním syřidlovým enzymem stále zůstává chymozin, vyráběný ze čtvrtého žaludku sajících telat [1].

Rostlinné proteázy, i když vykazují koagulační aktivitu, se pro výrobu sýru nehodí, protože při proteolýze mléčných bílkovin vznikají hořké peptidy [1].

Vhodnou alternativou živočišných syřidel jsou syřidla mikrobiální. Hlavními producenty mikrobních syřidel jsou *Mucor mihei*, *Mucor rouxii*, *Mucor pusillus* a *Endothia parasitica*.. Vzhledem k nízkým cenám a propracovaným způsobům použití při výrobě určitých typů sýrů se staly mikrobiální proteázy trvalou položkou na trhu syřidlových enzymů a jejich podíl stále vzrůstá. Známé jsou především preparáty "Fromase" a "Rennilase" z *Mucor mihei* [1].

2.8.3 Kožedělný průmysl

Proteázy jsou v kožedělném průmyslu používány pro dvě odlišné operace. První je odstraňování chlupů a druhou činění kůží [1].

Prvá operace se provádí řadou postupů s enzymy i bez nich. Použití alkalických proteáz umožňuje aplikaci enzymů s vápenným roztokem v jediné operaci. Tak např. lze doporučit postup využívající k odchlupení kůží 1,5-10 násobnou hmotnost roztoku obsahujícího 0,1% proteázy a 8% vápna. Odchlupení proběhne při 20-30°C za 18-24 hod. Aplikace enzymů je výhodná z hlediska ekologického i technologického. Z kůže se zároveň odstraní nežádoucí pigmenty, zvětší se její povrch až o 6% a usnadní se následující úprava [1].

Další operací úpravy kůží je činění, jehož účelem je učinit kůži měkkou a pružnou. Dříve byly pro tyto účely používány bakteriální enzymy ptačího trusu nebo psích výkalů, později pankreatické enzymy. V současné době se užívají bakteriální proteázy z *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Aspergillus oryzae* nebo jejich směsi s pankreatickými enzymy. Jako ingredience jsou přidávány dřevěné piliny. Aplikace enzymů v kožedělném průmyslu je podmíněna jejich nízkou cenou [1].

2.8.4 Pekárenský průmysl

V pekárenském průmyslu se proteázy používají ke zkrácení doby kynutí a mechanického hnětení, používají se plísňové proteázy, především z *Aspergillus oryzae*. Účinek plísňových proteáz lze zvýšit přídavkem nasycených monoacylglycerolů [1].

2.8.5 Pivovarství

K prevenci chladových zákalů se již od roku 1911 používají preparáty obsahující papain, ficin, bromelain, případně i pepsin. Bakteriální enzymy nebyly ke stabilizaci piva užity, i když byly zkoušeny [1].

2.8.6 Masný průmysl

V masném průmyslu jsou proteázy používány především k tenderizaci masa. Je založena na částečné hydrolýze bílkovin pojivové tkáně papainem (případně bromelinem nebo ficinem). Mikrobiální enzymy nebyly dosud k tenderizaci masa použity, neboť jejich aktivita vůči pojivové tkáni je vesměs nízká [1].

3 PRAKTICKÁ ČÁST

3.1 Použité chemikálie, materiál a přístroje

3.1.1 Bakteriální kmeny

V práci byla použita bakteriální kultura *Bacillus subtilis* CCM 2793, která byla získána z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně.

3.1.2 Chemikálie pro kultivaci mikroorganismů

Agar Powder, Himedia (India)
Beef Extract, Difco laboratories (USA)
Peptone, Himedia (India)
$MnSO_4$, Labner (ČR)

3.1.3 Ostatní chemikálie

Azocasein, azoalbumin, Sigma-Aldrich (Německo)
Casein, Fluka (Německo)
Bovine serum albumin, Sigma-Aldrich (Německo)

Všechny ostatní chemikálie byly čistoty p.a.

3.1.4 Přístroje

Spektrofotometer VIS, Helios δ, Unicam (Velká Británie)
Spektrofotometer UV-VIS, Helios α, Unicam (Velká Británie)
Centrifuga Boeco U-32R, Hettich Zentrifugen (Německo)
Analytické váhy, Boeco (Německo)
Termostat IP 60, LTE Scientific, Ltd. (Německo)
Termostatovaná třepačka, Heidolph Unimax 1010, Labicom s.r.o. (ČR)
Termostat, LS-35 (ČR)
Vortex, TK3S, Kartell spa (USA)
Běžné laboratorní sklo a vybavení

3.2 Kultivace bakterie *Bacillus subtilis*

3.2.1 Živná média

Pro uchování i kultivaci bakteriální kultury bylo použito médium Bacillus Medium (BM) dle České sbírky mikroorganismů, a to v případě pevného média s přídavkem agaru, v případě tekutého bez agaru. BM médium mělo následující složení:

Pepton	5 g
Beef extract	3 g
$MnSO_4 \cdot H2O$	0,01 g
Agar	20 g
Destilovaná voda	1000 ml
pH	7

Při některých experimentech bylo použito tekuté médium Bacillus Medium dle České sbírky mikroorganismů o dvojnásobné koncentraci o složení:

Pepton	10 g
Beef extract	6 g
$MnSO_4 \cdot H2O$	0,02 g
Destilovaná voda	1000 ml
pH	7

Po oživení lyofilizované sbírkové kultury byla kultura uchovávána na čtyřech Petriho miskách obsahující pevné BM médium v lednici. Inokulum bylo vždy připraveno tak, že do Erlenmayerových baněk o objemu 250 ml bylo přidáno 50 ml kultivačního média. Poté se nechalo sterilovat 25 minut v páře a po sterilizaci bylo inokulum zaočkováno třikrát bakteriologickou kličkou z agarové plotny. Nakonec bylo médium s kulturou kultivováno 24 hodin při 30°C na rotační třepačce při 170 rpm.

3.3 Stanovení koncentrace biomasy v jednotlivých kultivacích

3.3.1 Stanovení kalibrační křivky

Během jednotlivých kultivací byla biomasa stanovována pomocí spektrofotometrického stanovení zákalu. Měření bylo prováděno při vlnové délce $\lambda = 630$ nm proti destilované vodě jako blanku. Přepočet na suchou hmotnost biomasy byl proveden pomocí sestrojené kalibrační přímky.

Kalibrační přímka byla sestrojena ředěním suspenze buněk destilovanou vodou. Pro stanovení sušiny bylo odebráno 10 ml roztoku buněčné suspenze. Roztok biomasy byl stočen (6000 otáček, 10 minut). Roztok nad biomasou byl slit a biomasa byla rozsuspendovaná

v 1 ml destilované vody. Připravený roztok biomasy byl kvantitativně přenesen do předem zvážených a vysušených hliníkových misek, které byly následně sušeny při t = 105°C do konstantní hmotnosti. Po vyjmutí a ochlazení v exsikátoru byly znovu zváženy. Rozdíl hmotností váženek udával hmotnost biomasy v 10 ml. Nakonec byla zjištěná koncentrace převedená na jednotku g/l. Ředěním kultury o známé koncentraci biomasy byla sestrojena kalibrační přímka $A_{630nm} = f(c_{biomasa})$. Kalibrační křivka se skládala z 10 hodnot, kdy bylo postupně přidáváno 300 μl kultury a doplněno na 3 ml destilovanou vodou.

3.3.2 Stanovení koncentrace biomasy

Koncentrace biomasy pomocí spektrofotometrického měření zákalu byla stanovována vždy v určitých časových intervalech od začátku kultivace. Bylo odebráno zhruba 5 ml z kultivačního média a roztok byl měřen nenaředěný, nebo v případě potřeby po naředění při vlnové délce $\lambda = 630$ nm proti destilované vodě jako blanku. Přepočet na suchou hmotnost biomasy byl proveden pomocí sestrojené kalibrační přímky.

3.4 Stanovení proteázové aktivity vybranými metodami

3.4.1 Stanovení proteázové aktivity pomocí azokaseinu

Principem stanovení proteázové aktivity je enzymové štěpení azokaseinu na azooligopeptidy rozpustné v kyselině trichloroctové. Azokasein je bílkovina, jejíž některé aminokyseliny jsou substituovány vhodným azobarvivem. Princip testu spočívá ve vysrážení azokaseinu působením trichloroctové. Vzniklá sraženina přechází při centifugaci do sraženiny, zatímco azopeptidy vzniklé enzymovou hydrolýzou azokaseinu zůstávají v supernatantu. Rozdíl absorbance supernatantu ($\lambda = 440$ nm) a blanku udává po přepočtu enzymovou aktivitu přítomných proteáz. Z takto získané absorbance byla vypočtena aktivita enzymu. Jednotka v tomto případě je U/ml, což je množství enzymu, které katalyzuje přeměnu substrátu doprovázenou vzrůstem absorbance o 0,001 za 1 minutu při podmínkách testu [12].

3.4.2 Stanovení proteázové aktivity v UV-VIS oblasti

Proteázová aktivita touto metodou je založena na stejném principu jako stanovení proteázové aktivity pomocí azokaseinu, jen jsou v tomto případě spektorofometricky detekovány aromatické aminokyseliny při vlnové délce 280 nm. Byl použit komerčně (alkaláza) dostupný enzym, který byl přidán ke kaseinu a albuminu, kdy vzorky byly 10x, 100x a 1000x naředěny. Nakonec byla proměřena absorbance v UV-VIS oblasti. Jednotku v tomto případě představuje množství enzymu, které uvolní 1 μmol tyrosinu za 1 minutu za podmínek testu.

Byla sestrojena také kalibrační křivka tyrosinu. Byly proměřeny hodnoty 10 koncentrací tyrosinu v rozmezí 0,1 – 1 mmol/l. Z kalibrační křivky bylo poté vypočteno množství uvolněného tyrosinu.

3.4.3 Stanovení proteázové aktivity biuretovou metodou

Biuretová metoda je založena na tvorbě fialově zbarvených chelátů mědi s bílkovinou. Různé bílkoviny dávají tuto reakci se stejnou intenzitou. Touto metodou byla použita bílkovina kasein a albumin, které byly 10-, 100- a 1000-krát naředěny. Do zkumavky byl odměřen 1 ml vzorku bílkoviny a bylo doplněno fyziologickým roztokem na 3 ml. Poté bylo přidáno 0,3 ml biuretového činidla. Vzorky byly dány do termostatu a byly inkubovány po dobu 30 minut. Aktivita v tomto případě byla vypočtena jako úbytek peptidových vazeb z rozdílu absorbance před a po inkubaci [8].

3.5 Studium růstu biomasy a proteázové aktivity v základním médiu

3.5.1 Růst biomasy v základním médiu v závislosti na čase

Byly připraveny kultivační média tvořené základním BM médiem o objemu 30 ml, které byly posléze sterilovány a poté zaočkovány 1 ml inokula. Kultivace probíhala 34 hodin, kdy jednotlivé odběry byly provedeny po 4, 8, 12, 26, 30 a 34 hodinách. Při každém odběru bylo odebráno 5 ml kultury v očkovacím boxu a byla proměřena absorbance při vlnové délce λ = 630 nm proti destilované vodě jako blanku. V případě potřeby byl roztok zředěn. Byla získána základní růstová křivka bakterie *Bacillus subtilis*.

3.5.2 Proteázová aktivita v základním médiu v závislosti na čase

Při jednotlivých odběrech (4, 8, 12, 26, 30, 34 hodin) bylo odebráno 5 ml vzorku, ze kterého bylo odpipetováno 1,5 ml do mikrozkumavek typu Eppendorf. Roztoky byly stočeny v mikrocentrifuze (10000 rpm., 8 minut). Čirý roztok byl přelit do nových mikrozkumavek typu Eppendorf , byla v něm stanovena proteázová aktivita s využitím azokaseinu a byl určen čas, při kterém byla proteázová aktivita nejvyšší.

3.6 Studium vlivu substrátu na růst biomasy a proteázovou aktivitu

3.6.1 Vliv substrátu na růst biomasy

Bylo připraveno 7 kultivačních médií obsahující základní komponenty pro přípravu kultivačního BM média. Baňka č. 1 obsahovala toto základní médium, baňka č. 2 obsahovala základní médium o dvojnásobné koncentraci všech složek, do dalších baněk byly přidány k základnímu médiu cukry sacharóza (baňka č. 3), glukóza (č. 4), laktóza (č. 5) a xylóza (č. 6), do baňky č. 7 byla přidána mléčná bílkovina kasein o koncentraci 8 g/l. Byly připraveny kultivační média o objemu 30 ml do Erlenmayerových baněk o objemu 100 ml. Takto byly připraveny dvě sady kultivačních médií, která byla posléze sterilovány a zaočkovány 1 ml inokula pipetou. Kultura byla kultivována 32 hodin při 30 °C na rotační

třepačce při 170 rpm. Po 32 hodinách bylo z každé baňky odebráno zhruba 5 ml kultury a byla proměřena absorbance při vlnové délce λ = 630 nm proti destilované vodě jako blanku. Přepočet na suchou hmotnost biomasy byl proveden pomocí sestrojené kalibrační přímky a hodnoty byly porovnány.

3.6.2 Vliv substrátu na proteázovou aktivitu

Po 32 hodinách kultivace bylo odebráno zhruba 5 ml kultury a do mikrozkumavek typu Eppendorf bylo odpipetováno 1,5 ml této kultury, centrifugováno v mikrocentrifuze (10000 rpm., 8 minut). Stočený roztok obsahující enzym byl přelit do nových mikrozkumavek typu Eppendorf a byla stanovena proteázová aktivita metodou pomocí azokaseinu u všech kultur a hodnoty byly porovnány.

3.7 Stanovení růstové a produkční křivky ve dvou koncentrovaných médiích

3.7.1 Stanovení růstové křivky

Byly připraveny 2 kultivační média, první bylo tvořeno základním BM médiem a druhé bylo tvořeno stejným médiem obsahující dvojnásobné koncentrace daných složek. Takto byly připraveny kultivační média o objemu 30 ml, které byly posléze sterilovány a poté zaočkovány 1 ml inokula pipetou. Kultivace probíhala 48 hodin, kdy jednotlivé odběry byly provedeny po 4, 8, 20, 24, 28, 32, 44 a 48 hodinách. Při každém odběru bylo odebráno 5 ml kultury v očkovacím boxu a byla proměřena absorbance při vlnové délce λ = 630 nm proti destilované vodě jako blanku. V případě potřeby byl roztok zředěn.

3.7.2 Stanovení produkční křivky

Při jednotlivých odběrech (4, 8, 20,24, 28, 32, 44 a 48 hodin) bylo odebráno 5 ml vzorku, ze kterého bylo odpipetováno 1,5 ml do mikrozkumavek typu Eppendorf, centrifugováno v mikrocentrifuze (10000 rpm., 8 minut). Čirý roztok byl přelit do nových mikrozkumavek typu Eppendorf a byla stanovena proteázová aktivita metodou pomocí azokaseinu a byl určen čas, při kterém byla proteázová aktivita nejvyšší.

3.8 Studium vlivu stresových faktorů na růst a proteázovou aktivitu

3.8.1 Vliv etanolového stresu na růst a proteázovou aktivitu

V Erlenmayerových baňkách o objemu 100 ml byla kultivována bakterie *Bacillus subtilis* v 30 ml kultivačního BM média o dvojnásobné koncentraci všech složek. Kultura byla po zaočkování kultivována 32 hodin při 30°C na rotační třepačce při 170 rpm. Aplikace

etanolového stresu byla provedena ve dvacáté hodině, kdy byl přidán do jedné baňky 1% etanol a do druhé 3% etanol. Bylo provedeno paralelní stanovení a také byla zároveň kultivována kontrola.

Obsah biomasy po kultivaci byl stanoven spektrofotometricky a proteázová aktivita metodou pomocí azokaseinu.

3.8.2 Vliv osmotického stresu na růst a proteázovou aktivitu

V Erlenmayerových baňkách o objemu 250 ml byla kultivována bakterie *Bacillus subtilis* v 30 ml kultivačního BM média o dvojnásobné koncentraci všech složek. Kultura byla po zaočkování kultivována 32 hodin při 30°C na rotační třepačce při 170 rpm. Aplikace chloridu sodného byla provedena ve dvacáté hodině, kdy byl přidán do jedné baňky 1% NaCl a do druhé 3% NaCl. Bylo provedeno paralelní stanovení a také byla zároveň kultivována kontrola. Obsah biomasy po kultivaci byl stanoven spektrofotometricky a proteázová aktivita metodou pomocí azokaseinu.

3.8.3 Vliv peroxidového stresu na růst a proteázovou aktivitu

V Erlenmayerových baňkách o objemu 250 ml byla kultivována bakterie *Bacillus subtilis* v 30 ml kultivačního BM média o dvojnásobné koncentraci všech složek. Kultura byla po zaočkování kultivována 32 hodin při 30°C na rotační třepačce při 170 rpm. Aplikace peroxidového stresu byla provedena ve dvacáté hodině, kdy byl přidán do jedné baňky 0,5 mmol H_2O_2 a do druhé 3 mmol H_2O_2. Bylo provedeno paralelní stanovení a také byla zároveň kultivována kontrola.

Obsah biomasy po kultivaci byl stanoven spektrofotometricky a proteázová aktivita metodou pomocí azokaseinu.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Kalibrace spektrofotometrického stanovení biomasy

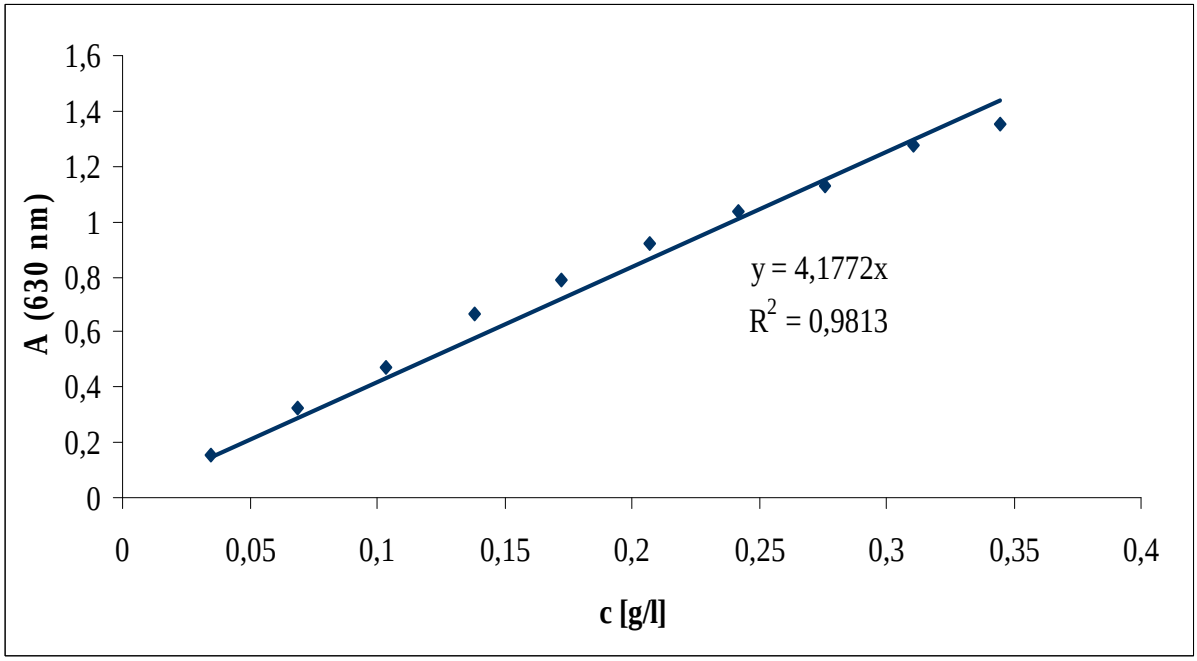
Kalibrační závislost množství suché biomasy a zákalu byla stanovena z hodnot spektrofotometrického měření zákalu suspenze buněk při vlnové délce λ = 630 nm, která byla připravena přesným ředěním kultury, jejíž počáteční suchá hmotnost biomasy byla stanovena ve dvou paralelních měřeních. Získaná koncentrace byla získána v g/10ml a nakonec převedena na g/l.

Tab. 1: Stanovení koncentrace biomasy

Hmotnost prázdné váženky [g]	**Hmotnost váženky s biomasou [g]**	**Hmotnost biomasy [g]**	**Koncentrace biomasy [g/l]**
16,4494	16,4527	0,0033	0,330
16,0418	16,0454	0,0036	0,360
		Průměr	**0,345**

Tab. 2: Kalibrační křivka pro stanovení koncentrace

Objem kultury [ml]	**Objem vody [ml]**	**A (630 nm)**	**Koncentrace biomasy [g/l]**
0,30	2,70	0,158	0,0345
0,60	2,40	0,321	0,0690
0,90	2,10	0,469	0,1035
1,20	1,80	0,663	0,1380
1,50	1,50	0,788	0,1725
1,80	1,20	0,916	0,2070
2,10	0,90	1,032	0,2415
2,40	0,60	1,126	0,2760
2,70	0,30	1,273	0,3105
3,00	0	1,350	0,3450



Graf 1: Kalibrační závislost zákalu stanoveného při 630 nm na suché hmotnosti biomasy

Z grafické závislosti zákalu na hmotnosti biomasy byla stanovena kalibrační závislost $y = 4{,}1772\ x$, která byla dále používána pro stanovení koncentrace biomasy při všech kultivacích, regresní koeficient byl stanoven na $R^2 = 0{,}9813$.

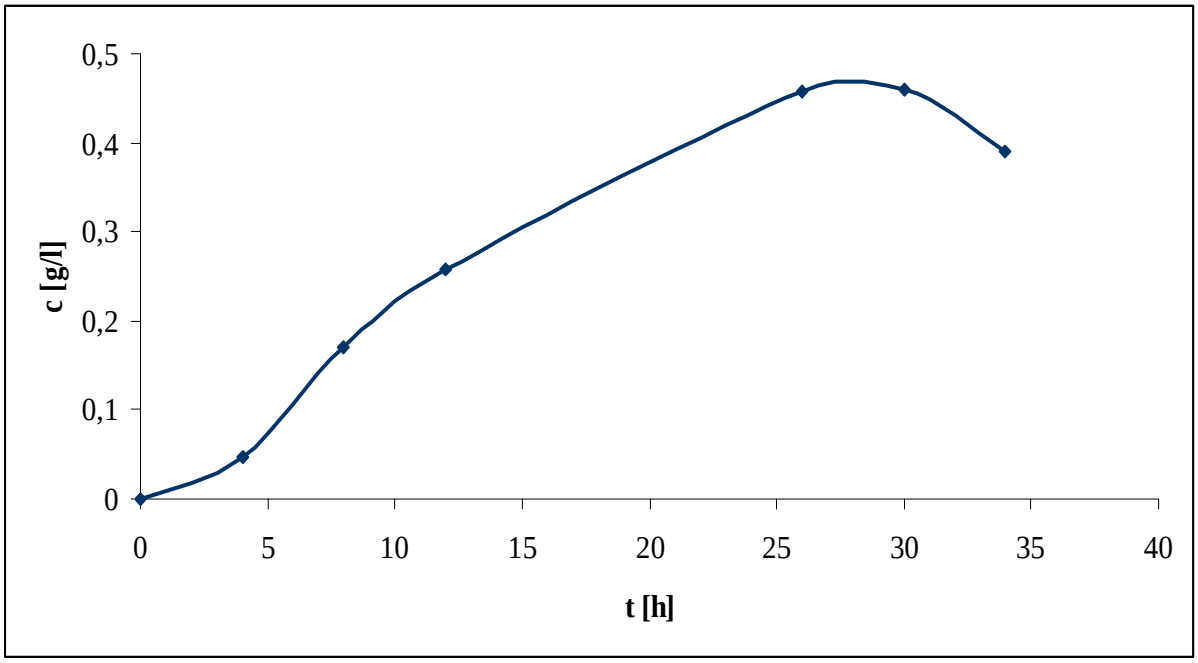
4.2 Množství biomasy a proteázová aktivita v základním médiu

4.2.1 Výsledky stanovení růstové křivky v základním médiu

Pro základní médium byly naměřeny hodnoty absorbancí (vždy třikrát a poté stanoven průměr) pro jednotlivé odběry, při 4, 8, 12, 26, 30 a 34 hodinách. Z průměru jednotlivých absorbancí byla vypočtena koncentrace biomasy v jednotlivých vzorcích pomocí kalibrační závislosti $y = 4{,}1772\ x$. V případě potřeby bylo nutné roztok zředit. Z takto získaných hodnot koncentrací byla vytvořena růstová křivka. Hodnoty absorbancí jsou v tabulce uvedeny po vynásobení koeficientem zředění.

Tab. 3: Závislost koncentrace biomasy na čase kultivace

Čas odběru [h]	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	A_6	$A_{prům}$	c [g/l]
4	0,178	0,181	0,185	0,207	0,213	0,203	0,195	0,047 ± 0,003
8	0,652	0,665	0,679	0,735	0,754	0,760	0,708	0,169 ± 0,010
12	1,016	1,035	1,043	1,137	1,128	1,123	1,080	0,259 ± 0,012
26	1,881	1,887	1,827	2,007	2,034	1,806	1,907	0,457 ± 0,010
30	1,914	1,878	1,971	1,914	1,884	1,947	1,918	0,459 ± 0,001
34	1,650	1,623	1,614	1,638	1,632	1,614	1,629	0,390 ± 0,000



Graf 2: Růstová křivka bakterie *Bacillus subtilis* v základním kultivačním médiu

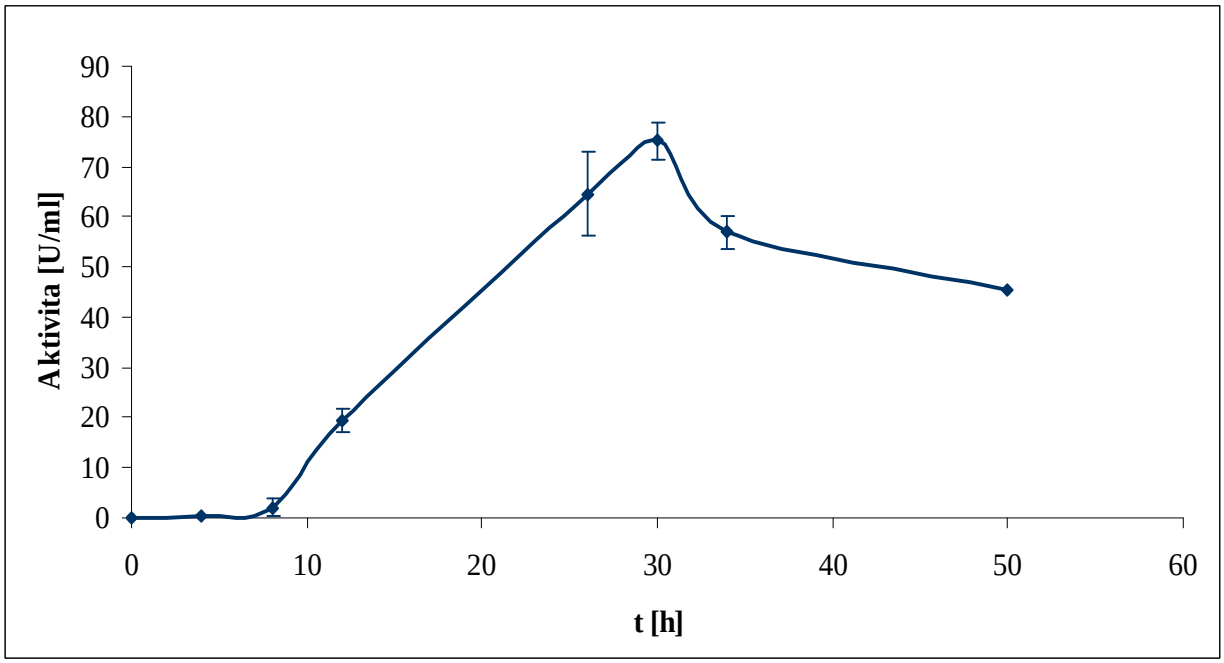
Ze spektrofotometricky naměřených hodnot byly vypočteny hodnoty koncentrací a byla sestrojena růstová křivka *Bacillus subtilis* v základním médiu.

4.2.2 Výsledky stanovení proteázové aktivity v základním médiu

Pro základní médium byly metodou pomocí azokaseinu získány hodnoty absorbancí při jednotlivých odběrech, ze kterých byla vypočtena proteázová aktivita podle vzorce: $a = \frac{A \cdot 1000}{45} \cdot 10$, kde A je absorbance a 45 je počet minut inkubace v termostatu. Z výsledných hodnot aktivity byla sestrojena závislost na čase.

Tab. 4: Závislost proteázové aktivity na čase kultivace

Čas odběru [h]	**A_1**	**A_2**	**A_3**	**A_4**	**$A_{prům}$**	**a [U/ml]**
4	0,004	0,001	0,002	0,001	0,002	0,44 ± 0,11
8	0,008	0,009	0,012	0,007	0,009	2,00 ± 0,11
12	0,082	0,078	0,104	0,087	0,088	19,50 ± 1,72
26	0,304	0,298	0,286	0,274	0,291	64,56 ± 2,33
30	0,385	0,366	0,298	0,303	0,338	75,11 ± 8,33
34	0,268	0,276	0,234	0,245	0,256	56,83 ± 3,61
50	0,226	0,212	0,184	0,196	0,205	45,44 ± 3,22



Graf 3: Závislost proteázové aktivity na čase kultivace pro základní médium

Ze spektrofotometricky naměřených hodnot byly vypočteny hodnoty proteázových aktivit metodou pomocí azokaseinu a byla sestrojena závislost proteázové aktivity na čase pro základní médium.

4.2.3 Diskuze výsledků stanovení růstové křivky a proteázové aktivity v základním médiu

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, v jakém čase kultivace bakterie *Bacillus subtilis* v základním kultivačním BM médiu dochází k maximu koncentrace biomasy a při jakém čase kultivace je nejvyšší proteázová aktivita. Pro kvalitní srovnání byl vždy použit stejný vzorek ve dvou paralelních stanoveních.

Při stanovení koncentrace biomasy spektrofotometrickou metodou měření zákalu nedošlo k nějakým větším nepřesnostem při stanovení. Maximum koncentrace biomasy bylo stanoveno v čase 30 hodin. Stanovená koncentrace biomasy byla 0,459 ± 0,001 g/l. Nejvyšší proteázová aktivita byla stanovena také v čase 30 hodin. Stanovená aktivita byla 75,11 ± 8,33 U/ml. Sestrojená růstová křivka má předpokládaný průběh, kdy nejdříve docházelo k exponenciálnímu růstu biomasy, kdy maxima dosáhla v čase 34 hodin, a poté začaly buňky hynout v důsledku vyčerpání substrátu a tvorby produktů metabolismů.

Protože nejvyšší proteázová aktivita korelovala s maximem růstu a byla pozorována ve 30. hodině kultivace, v následujícím experimentu byly stanovení proteázové aktivity provedeny právě v tomto čase kultivace.

4.3 Výsledky stanovení proteázové aktivity různými metodami

4.3.1 Výsledek stanovení proteázové aktivity pomocí azokaseinu

Byly získány hodnoty absorbancí 10-, 100- a 1000-krát naředěných vzorků. Proteázová aktivita byla vypočítána jako v předchozích případech (kap 3.4.1.).

Tab. 5: Naměřené a vypočítané hodnoty pro stanovení pomocí azokaseinu

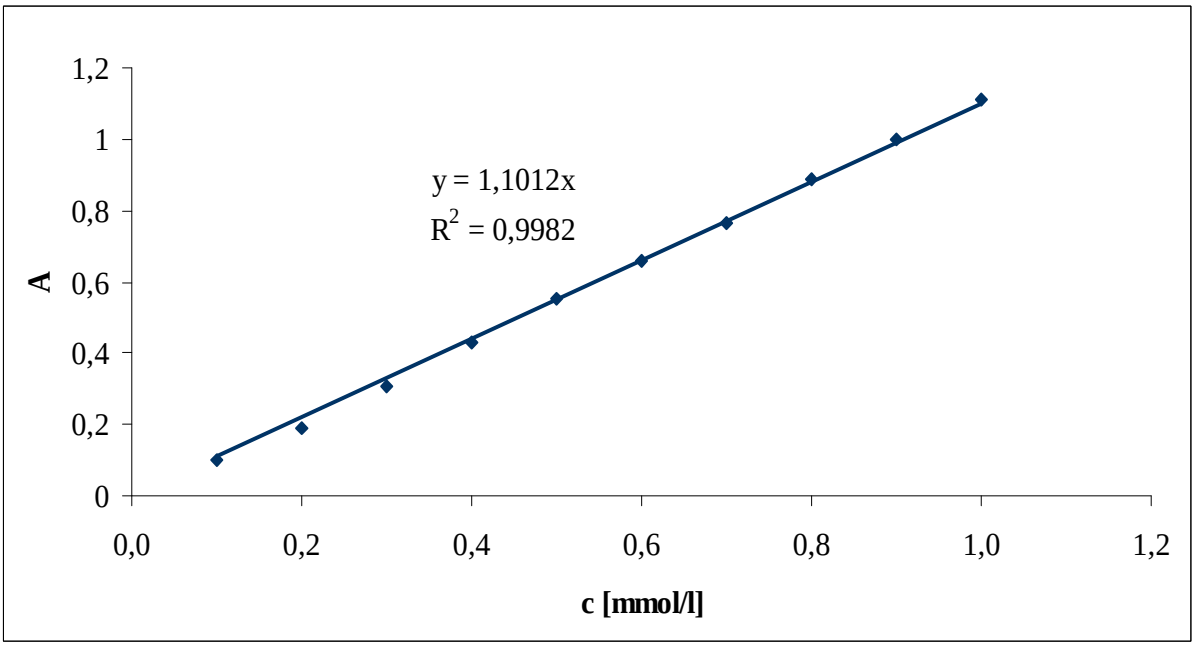
Vzorek	A_1	A_2	$A_{prům}$	a [U/ml]
Kasein–ředěno 10x	0,643	0,657	0,650	144,44 ± 1,56
Kasein–100x	0,666	0,642	0,654	145,33 ± 2,67
Kasein–1000x	0,774	0,706	0,740	164,44 ± 7,56
Albumin–10x	0,483	0,492	0,488	108,33 ± 1,00
Albumin–100x	0,488	0,489	0,489	108,56 ± 0,11
Albumin–1000x	0,583	0,524	0,554	123,00 ± 6,56

4.3.2 Výsledek stanovení proteázové aktivity v UV-VIS oblasti

Byly získány hodnoty absorbancí 10-, 100- a 1000-krát naředěných vzorků a hodnota absorbance pro blank. Z kalibrační křivky tyrosinu bylo vypočteno množství uvolněného tyrosinu (kap 3.4.2.).

Tab. 6: Naměřené a vypočítané hodnoty pro stanovení aktivity v UV-VIS

Vzorek	A_1	A_2	$A_{prům}$	$A_{prům\text{-}blank}$	c [mmol/l]	n [mmol]	a [µmol/min]
Kasein–ředěno 10x	1,820	1,844	1,832	1,202	1,09	$6{,}66 \cdot 10^{-4}$	0,015
Kasein–100x	0,791	0,708	0,750	0,120	0,11	$6{,}62 \cdot 10^{-5}$	0,001
Kasein–1000x	0,571	0,537	0,554	-	-	-	-
Kasein–blank	-	-	0,630	-	-	-	-
Albumin–10x	2,750	2,894	2,822	1,543	1,40	$8{,}55 \cdot 10^{-4}$	0,019
Albumin–100x	1,706	1,656	1,681	0,402	0,37	$2{,}22 \cdot 10^{-4}$	0,005
Albumin–1000x	1,491	1,440	1,466	0,187	0,169	$1{,}03 \cdot 10^{-4}$	0,002
Albumin–blank	-	-	1,279	-	-	-	-



Graf 4: Kalibrační křivka tyrosinu

Byla stanovena kalibrační závislost $y = 1{,}1012x$, která byla dále použita pro stanovení koncentrace uvolněného tyrosinu, regresní koeficient byl stanoven na $R^2 = 0{,}9982$.

4.3.3 Výsledek stanovení proteázové aktivity biuretovou metodou

Byly získány hodnoty absorbancí 10-, 100- a 1000-krát naředěných vzorků před a po inkubaci. Proteázová aktivita byla vypočtena jako úbytek peptidových vazeb z rozdílů absorbancí před a po inkubaci (kap. 3.4.3.).

Tab. 7: Naměřené a vypočítané hodnoty

vzorek	A_1	A_2	A_3	$A_{prům}$	rozdíl	%
Albumin před	0,230	0,255	0,250	0,245	0,033	13,5
Albumin po	0,220	0,202	0,214	0,212		
Kasein před	0,183	0,184	0,180	0,182	0,024	13,2
Kasein po	0,165	0,162	0,148	0,158		

4.3.4 Diskuze výsledků stanovení proteázových aktivit různými metodami

Cílem bylo stanovit proteázovou aktivitu enzymu různými metodami. Jako hlavní metoda pro stanovení proteázové aktivity byla používána metoda pomocí azokaseinu, jednotlivé výsledky jsou uvedeny vždy v příslušné části ve výsledcích a diskuzi. V případě ředění vzorku docházelo k naměření vyšších hodnot proteázové aktivity.

Dále byla využita metoda stanovení proteázové aktivity, kdy byla detekce prováděna v UV-VIS oblasti. Aktivita byla vyjádřena jako množství uvolněného tyrosinu, jehož množství bylo vypočítáno ze sestrojené kalibrační závislost tyrosinu. Jako substrát byl zkoumán kasein a albumin. Výsledky ukazují, že s klesající koncentrací substrátu klesalo

i množství uvolněného tyrosinu, tedy proteázová aktivita. Větší proteázová aktivita byla naměřena u albuminu, u 10-krát ředěného vzorku byla hodnota uvolněného tyrosinu $8{,}55 \cdot 10^{-4}$ mmol. Hodnota uvolněného tyrosinu u kaseinu byla $6{,}66 \cdot 10^{-4}$ mmol. S klesající koncentrací aktivita klesala.

Jako druhá metoda byla použita biuretová metoda pro stanovení proteázové aktivity. Aktivita v tomto případě byla vyjádřena jako úbytek peptidových vazeb vypočtený z rozdílu absorbancí před a po inkubaci. Z výsledků měření vyplývá, že v případě albuminu došlo k úbytku 13,5% peptidových vazeb, v případě kaseinu byl úbytek 13,2%. Stanovení proteázové aktivity touto metodou není příliš přesné a slouží pouze jako orientační hodnota.

4.4 Výsledky studia vlivu substrátu na růst biomasy a proteázovou aktivitu

4.4.1 Výsledky studia vlivu substrátu na růst biomasy

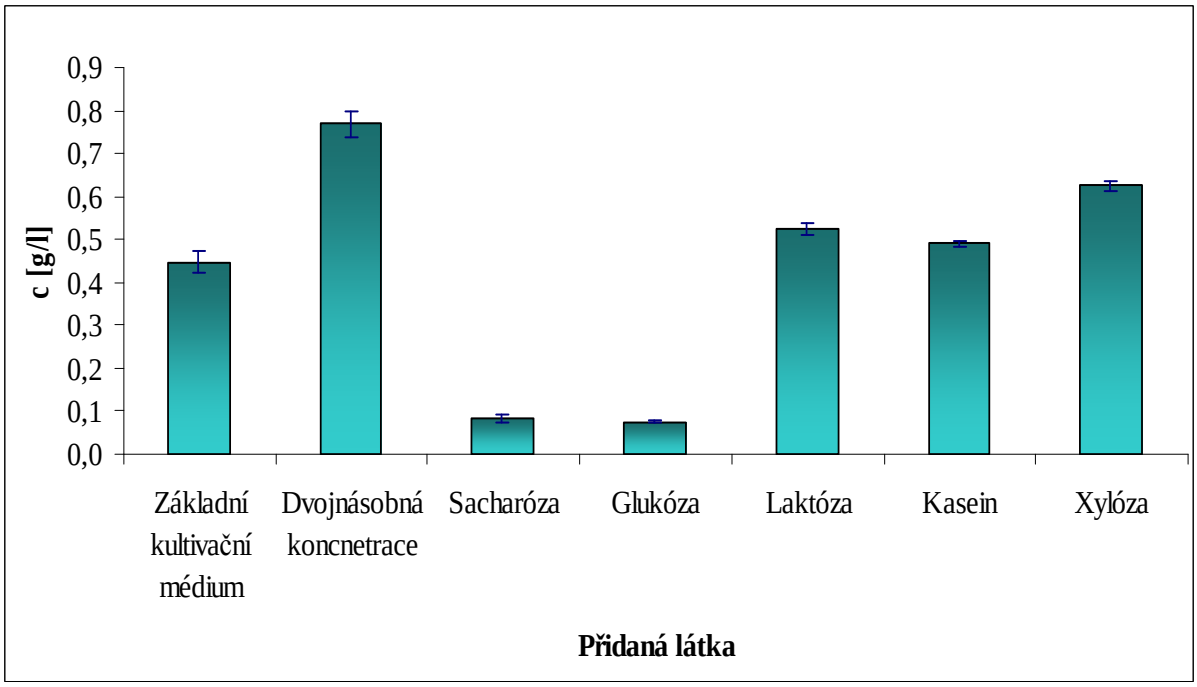
Byly naměřeny hodnoty absorbancí pro 7 různých kultivačních médií (vždy třikrát a poté stanoven průměr) v čase 32 hodin od začátku kultivace. První médium obsahovalo základní BM médium, druhé médium stejné složení daných látek o dvojnásobné koncentraci, do třetího média byla přidána sacharóza, do čtvrtého glukóza, do pátého laktóza, do šestého kasein a do posledního xylóza, vše v množství 8 g/l.

Z průměru jednotlivých absorbancí byla vypočtena koncentrace biomasy v jednotlivých vzorcích pomocí kalibrační závislosti $y = 4{,}1772x$. V případě potřeby bylo nutné roztok zředit. Hodnoty koncentrací jsou uvedeny přehledně v tabulce. Z takto získaných hodnot koncentrací bylo získáno kultivační médium, ve kterém se bakterii *Bacillus subtilis* dařilo nejvíce. Hodnoty absorbancí jsou v tabulce uvedeny po vynásobení koeficientem zředění.

Tab. 8: Vliv substrátu na růst biomasy

Médium	**A_1**	**A_2**	**A_3**	**A_4**	**A_5**	**A_6**	**$A_{prům}$**	**c [g/l]**
Základní BM	1,578	1,722	1,986	1,914	1,980	2,010	1,865	0,447 ± 0,025
Konc. BM	3,628	3,660	3,644	3,128	2,592	2,620	3,212	0,769 ± 0,031
BM+sacharóza	0,471	0,381	0,354	0,354	0,285	0,258	0,351	0,084 ± 0,011
BM+glukóza	0,309	0,294	0,243	0,357	0,366	0,345	0,319	0,076 ± 0,004
BM+laktóza	2,385	2,280	2,184	2,028	2,115	2,133	2,188	0,524 ± 0,015
BM+kasein	2,256	2,271	2,247	1,785	1,875	1,863	2,050	0,491 ± 0,006
BM+xylóza	2,532	2,583	2,694	2,610	2,649	2,601	2,612	0,625 ± 0,011

Poznámka: BM – Bacillus Medium



Graf 5: Koncentrace biomasy po 32 hodinách v 7 různých kultivačních médiích

Ze spektrofotometricky naměřených hodnot byly vypočteny hodnoty koncentrací a byl sestrojen graf udávající vliv substrátu na růst biomasy.

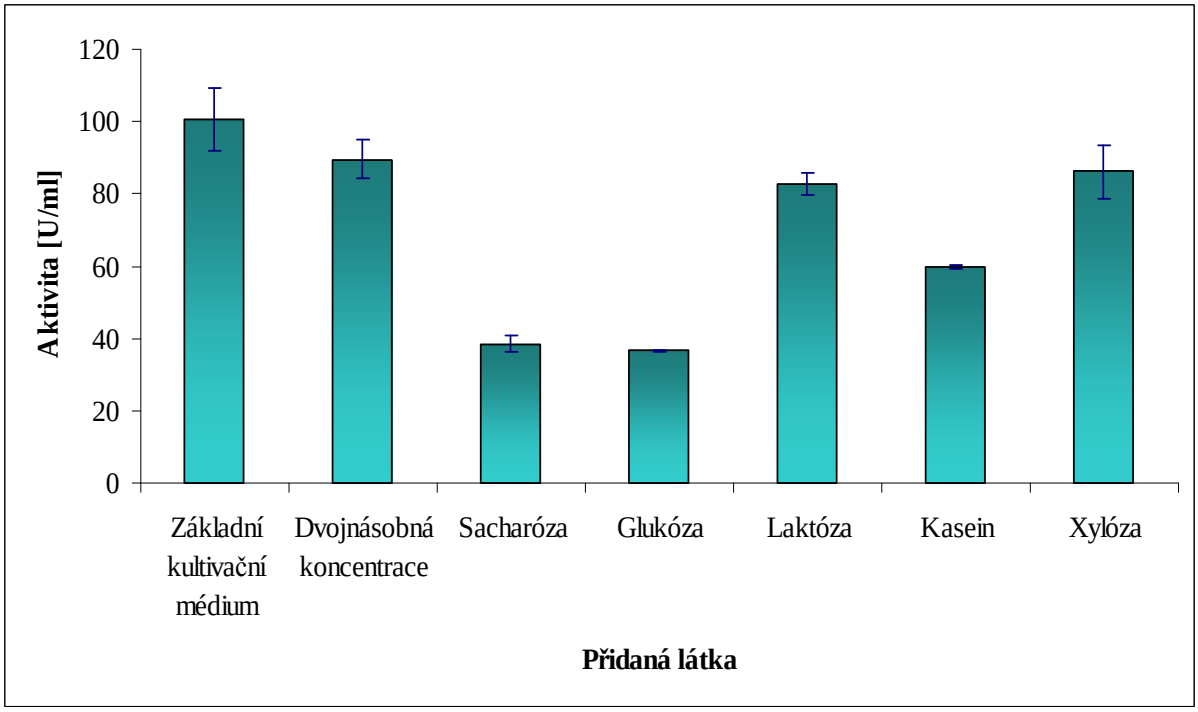
4.4.2 Výsledky studia vlivu substrátu na proteázovou aktivitu

Pro 7 kultivačních médií byly metodou pomocí kaseinu získány hodnoty absorbancí v čase 32 hodin od začátku kultivace, ze kterých byla vypočtena proteázová aktivita podle vzorce: $a = \frac{A \cdot 1000}{45} \cdot 10$,

kde A je absorbance a 45 je počet minut inkubace v termostatu. Z výsledných hodnot aktivity byl sestrojen graf udávající vliv substrátu na proteázovou aktivitu.

Tab. 9: Vliv substrátu na produkci proteáz

Médium	A_1	A_2	A_3	A_4	$A_{prům}$	a [U/ml]
Základní BM	0,434	0,509	0,392	0,473	0,452	100,44 ± 8,67
Konc. BM	0,437	0,381	0,375	0,417	0,403	89,44 ± 5,44
BM+sacharóza	0,191	0,158	0,175	0,168	0,173	38,44 ± 2,22
BM+glukóza	0,174	0,169	0,159	0,159	0,165	36,72 ± 0,28
BM+laktóza	0,325	0,361	0,390	0,413	0,372	82,72 ± 3,28
BM+kasein	0,247	0,252	0,285	0,291	0,269	59,72 ± 0,61
BM+xylóza	0,347	0,469	0,363	0,372	0,388	86,17 ± 7,28



Graf 6: Proteázová aktivita po 32 hodinách v 7 kultivačních médiích

Ze spektrofotometricky naměřených hodnot byly vypočteny hodnoty proteázových aktivit a byl sestrojen graf udávající vliv substrátu na proteázovou aktivitu.

4.4.3 Diskuze výsledků studia vlivu substrátu na růst a produkci

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, zda-li nedochází vlivem přidaného substrátu k základnímu kultivačnímu médiu *Bacillus subtilis* k rychlejšímu či většímu růstu biomasy, než tomu bylo v případě základního BM média. Pro kvalitní srovnání byl vždy použit stejný vzorek ve dvou paralelních stanoveních. Každá kultivace byla povedena paralelně a každý sledovaný parametr byl pak také paralelně analyzován.

Při stanovení koncentrace biomasy spektrofotometrickou metodou měření zákalu nedocházelo k nějakým větším nepřesnostem při stanovení. Paralelní stanovení se trochu lišila, jednotlivé kultivace vykazovaly rozptyl hodnot maximálně o 20%. Vzorky byly odebírány po 32 hodinách kultivace od počátku, a to vzhledem k tomu že v prvním experimentu byla koncentrace nejvyšší právě při 32 hodinách. Nejvyšší koncentrace biomasy byla stanovena v kultivačním médiu obsahujícím dvojnásobné koncentrace složek BM média, než udává Česká sbírka mikroorganismů pro optimální kultivační médium pro bakterie rodu *Bacillus*. Tato koncentrace byla stanovena na 0,768 ± 0,031 g/l. Pro srovnání koncentrace v základním médiu byla stanovena na 0,447 ± 0,025 g/l.

Nejmenší nárůst biomasy byl pozorován v kultivačním médiu obsahujícím mimo základních složek monosacharid glukózu a disacharid sacharózu. Koncentrace biomasy byla stanovena na 0,076 ± 0,004 g/l resp. 0,084 ± 0,011 g/l. Přídavkem xylózy, laktózy a kaseinu došlo také k většímu nárůstu biomasy než tomu bylo u základního média, hodnoty koncentrací činily 0,625 ± 0,011 g/l, 0,527 ± 0,015 g/l resp. 0,491 ± 0,011 g/l.

Nejvyšší proteázová aktivita metodou pomocí kaseinu byla stanovena v základním BM médiu na 100,44 ± 8,67 U/ml. Proteázová aktivita v kultivačním médiu o dvojnásobném složení daných komponent byla stanovena na 89,44 ± 8,44 U/ml, tedy jako druhá nejvyšší. Nejnižší hodnoty proteázových aktivit byly naměřeny u kultivačních médií s přídavkem glukózy a sacharózy.

Tyto výsledky sloužily k dalšímu experimentu. V dalším experimentu byly detailněji studovány a porovnány růstové charakteristiky a proteázová aktivita v základním médiu a médiu o dvojnásobné koncentraci.

4.5 Výsledky stanovení růstové a produkční křivky

4.5.1 Výsledky stanovení růstové křivky

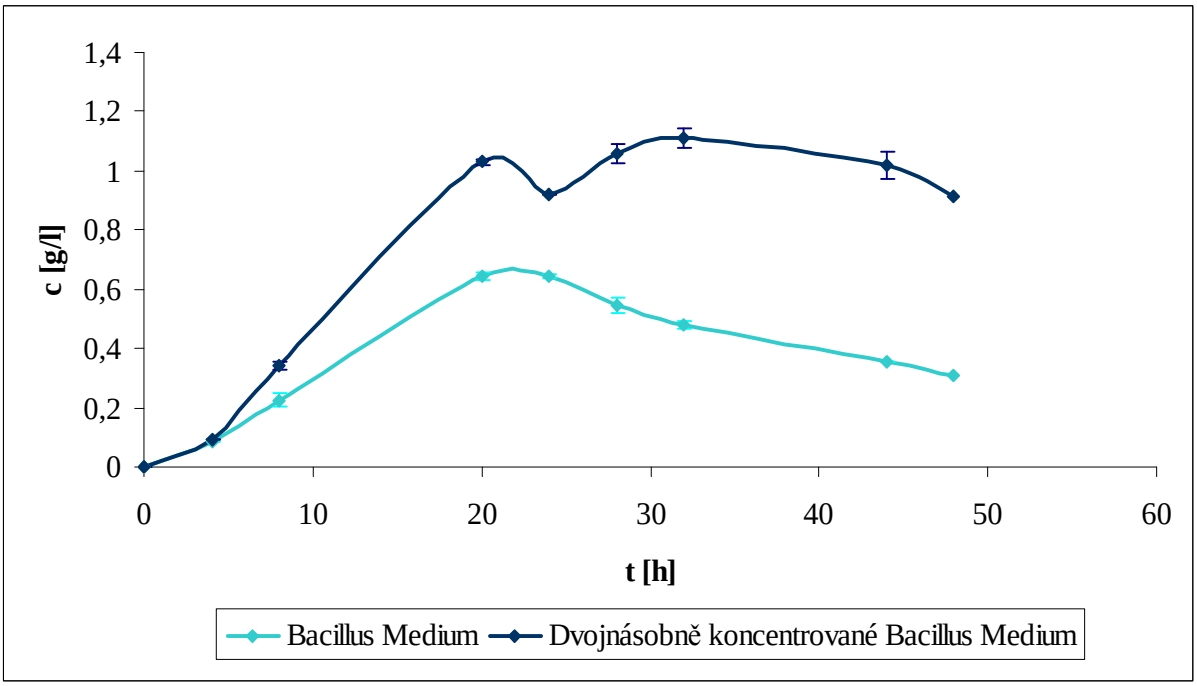
Byly naměřeny hodnoty absorbancí pro základní BM médium a BM médium o dvojnásobné koncentraci jednotlivých složek (vždy třikrát a poté stanoven průměr) pro jednotlivé odběry, při 4, 8, 20, 24, 28, 32, 44 a 48 hodinách. Z průměru jednotlivých absorbancí byla vypočtena koncentrace biomasy v jednotlivých vzorcích pomocí kalibrační závislosti $y = 4{,}1772x$. V případě potřeby bylo nutné roztok zředit. Z takto získaných hodnot koncentrací byla vytvořena růstová křivka pro srovnání pro základní médium a pro médium o dvojnásobné koncentraci.

Tab. 10: Koncentrace biomasy při jednotlivých odběrech v základním médiu

Čas odběru [h]	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	A_6	$A_{prům}$	c [g/l]
4	0,359	0,379	0,371	0,352	0,376	0,370	0,368	0,088 ± 0,000
8	0,906	0,964	0,932	0,956	0,954	0,963	0,946	0,226 ± 0,003
20	2,610	2,592	2,595	0,354	2,871	2,799	2,696	0,645 ± 0,023
24	2,592	2,646	2,640	2,745	2,757	2,721	2,684	0,642 ± 0,014
28	2,181	2,262	2,292	2,289	2,322	2,289	2,273	0,544 ± 0,007
32	1,962	1,842	1,905	2,130	2,091	2,106	2,006	0,480 ± 0,025
44	1,509	1,524	1,578	1,341	1,485	1,398	1,473	0,353 ± 0,015
48	1,254	1,323	1,311	1,296	1,248	1,338	1,295	0,310 ± 0,000

Tab. 11: Koncentrace biomasy ve dvojnásobně koncentrovaném médiu

Čas odběru [h]	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	A_6	$A_{prům}$	c [g/l]
4	0,394	0,391	0,392	0,370	0,376	0,370	0,382	0,092 ± 0,002
8	1,452	1,395	1,422	1,455	1,404	1,398	1,421	0,340 ± 0,000
20	4,320	4,435	4,310	4,170	4,225	4,335	4,299	1,029 ± 0,013
24	3,900	3,840	3,925	3,770	3,790	3,835	3,843	0,920 ± 0,011
28	4,464	4,434	4,350	4,356	4,440	4,448	4,422	1,059 ± 0,001
32	5,226	4,530	4,614	4,596	4,488	4,440	4,469	1,113 ± 0,034
44	4,170	4,188	3,984	4,734	4,824	3,630	4,255	1,019 ± 0,034
48	3,630	3,606	3,624	3,990	4,164	3,810	3,804	0,911 ± 0,044



Graf 7: Porovnání růstových křivek bakterie v základním a dvojnásobném kultivačním médiu

Ze spektrofotometricky naměřených hodnot byly vypočteny hodnoty koncentrací a byla sestrojena růstová křivka bakterie *Bacillus subtilis* jak pro základní médium, tak pro základní médium o dvojnásobné koncentraci.

4.5.2 Výsledky stanovení produkční křivky

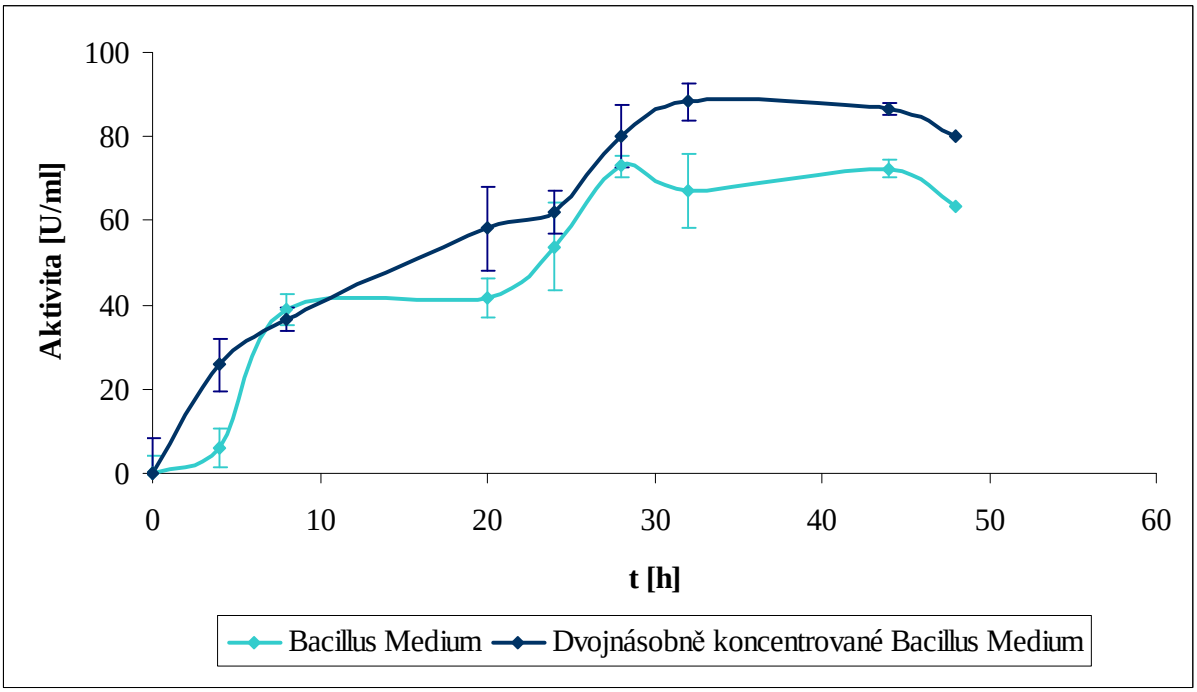
Byly získány hodnoty absorbancí metodou pomocí azokaseinu pro základní kultivační médium Bacillus Medium dle České sbírky mikroorganismů a pro toto základní médium o dvojnásobné koncentraci při odběrech v čase 4, 8, 20, 24, 28, 32, 44 a 48 hodin od začátku kultivace. Z výsledných hodnot aktivity byl sestrojen graf porovnávající proteázové aktivity v obou médiích na čase.

Tab. 12: Proteázová aktivita při jednotlivých odběrech v základním médiu

Čas odběru [h]	A_1	A_2	A_3	A_4	$A_{prům}$	a [U/ml]
4	0,044	0,048	0,010	0,008	0,028	6,11 ± 4,13
8	0,195	0,193	0,168	0,145	0,175	38,94 ± 4,54
20	0,185	0,199	0,163	0,205	0,188	41,78 ± 3,59
24	0,263	0,210	0,260	0,237	0,243	53,89 ± 4,73
28	0,297	0,269	0,370	0,380	0,329	73,11 ± 10,49
32	0,306	0,299	0,286	0,318	0,302	67,17 ± 2,57
44	0,365	0,364	0,298	0,276	0,286	72,39 ± 8,78
48	0,301	0,288	0,278	0,276	0,286	63,50 ± 2,20

Tab. 13: Proteázová aktivita ve dvojnásobně koncentrovaném médiu

Čas odběru [h]	A_1	A_2	A_3	A_4	$A_{prům}$	a [U/ml]
4	0,075	0,085	0,163	0,141	0,116	25,78 ± 8,22
8	0,195	0,182	0,122	0,158	0,164	36,50 ± 6,17
20	0,264	0,242	0,277	0,265	0,262	58,22 ± 2,81
24	0,227	0,312	0,244	0,333	0,279	62,00 ± 9,90
28	0,351	0,401	0,343	0,346	0,360	80,06 ± 5,27
32	0,364	0,387	0,386	0,452	0,397	88,28 ± 7,32
44	0,405	0,412	0,374	0,365	0,389	86,44 ± 4,42
48	0,352	0,354	0,368	0,364	0,360	79,89 ± 1,49



Graf 8: Porovnání proteázových aktivit v základním a dvojnásobně koncentrovaném médiu

Ze spektrofotometricky naměřených hodnot byly vypočteny hodnoty proteázových aktivit metodou pomocí kaseinu a byla sestrojena závislost proteázových aktivit na čase bakterie *Bacillus subtilis* jak pro základní médium, tak pro základní médium o dvojnásobné koncentraci.

4.5.3 Diskuze výsledků stanovení růstových a produkčních křivek

Cílem tohoto experimentu bylo porovnat růstové křivky a hodnoty proteázových aktivit v jednotlivých odběrech bakterie *Bacillus subtilis*. Odběry byly prováděny v časech 4, 8, 20, 24, 28, 32, 44 a 48 hodin. Pro kvalitní srovnání byl vždy použit stejný vzorek ve dvou paralelních stanoveních.

Při stanovení růstové křivky pro základní médium spektrofotometrickou metodou měření zákalu nedocházelo k nějakým větším nepřesnostem při stanovení. Paralelní stanovení se trochu lišila, kdy jednotlivé kultivace se liší maximálně o 20%. Maximálního růstu

v základním médiu bylo dosaženo překvapivě již v čase 20 a 24 hodin od začátku kultivace, poté koncentrace biomasy klesala. Maximálního růstu ve dvojnásobně koncentrovaném médiu dosáhla bakterie *Bacillus subtilis* v čase 32 hodin, konkrétně 1,113 ± 0,013 g/l, což odpovídá předchozím experimentům. Hodnoty koncentrací biomasy ve dvojnásobně koncentrovaném médiu jsou oproti koncentracím biomasy v základním médiu zhruba dvakrát větší. Nejvyšší proteázová aktivita v základním médiu byla naměřena v čase 28 hodin od začátku kultivace (73,11 ± 10,49 U/ml). Pro porovnání, nejvyšší proteázová aktivita ve dvojnásobně koncentrovaném médiu byla naměřena v čase 32 hodin (88,28 ± 7,32 U/ml), kdy byla také stanovena nejvyšší koncentrace biomasy. Hodnoty proteázových aktivit jsou ve dvojnásobně koncentrovaném médiu o něco vyšší než v základním médiu.

Výsledkem tohoto experimentu tedy je, že ve dvojnásobně koncentrovaném médiu, nežli je předepsaná koncentrace BM média dochází k většímu a rychlejšímu růstu biomasy a také hodnoty proteázových aktivit jsou vyšší. Tyto výsledky sloužily k dalšímu experimentu. V dalším experimentu bylo použito již dvojnásobně koncentrované médium a byl zkoumán vliv stresových faktorů v tomto kultivačním médiu.

4.6 Výsledky studia vlivu stresových faktorů na růst a proteázovou aktivitu

4.6.1 Výsledky studia vlivu etanolového stresu na růst biomasy

Koncentrace biomasy byla stanovena spektrofotometrickým měřením zákalu vzorku, který byl odebrán ve 32. hodině od počátku kultivace, kdy ve 20. hodině došlo k aplikaci 1% a 3% etanolu do dvojnásobně koncentrovaného kultivačního BM média. Hodnoty absorbancí jsou v tabulce udány již po vynásobení zřeďovacím koeficientem.

Tab. 14: Koncentrace biomasy po aplikaci etanolového stresu

	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	A_6	$A_{prům}$	c [g/l]
EtOH 1%	2,610	2,442	2,310	3,390	2,832	2,748	2,722	0,652 ± 0,049
EtOH 3%	0,702	0,594	0,684	1,524	1,572	1,644	1,120	0,268 ± 0,012
Kontrola	4,590	4,560	4,632	4,926	4,830	4,872	4,735	1,134 ± 0,008

4.6.2 Výsledky studia vlivu etanolového stresu na proteázovou aktivitu

Proteázová aktivita byla vypočtena podle vzorce: $a = \frac{A \cdot 1000}{45} \cdot 10$,

kde A je absorbance a 45 je počet minut inkubace v termostatu. Vzorky byly odebrány v čase 32 hodin od začátku kultivace, kdy v čase 20 hodin byl přidán 1% a 3% etanol do dvojnásobně koncentrovaného kultivačního BM média.

Tab. 15: Proteázová aktivita po aplikaci etanolového stresu

	A_1	A_2	A_3	A_4	$A_{prům}$	A [U/ml]
EtOH 1%	0,012	0,103	0,042	0,039	0,049	10,89 ± 7,40
EtOH 3%	0,123	0,173	0,045	0,063	0,101	22,44 ± 11,25
Kontrola	0,254	0,231	0,235	0,264	0,246	54,67 ± 3,01

4.6.3 Výsledky studia vlivu osmotického stresu na růst biomasy

Koncentrace biomasy byla vypočítána spektrofotometrickým měřením zákalu vzorku, který byl odebrán ve 32. hodině od počátku kultivace, kdy ve 20. hodině došlo k aplikaci 1% a 3% NaCl do dvojnásobně koncentrovaného BM média. Hodnoty absorbancí jsou v tabulce udány již po vynásobení zřeďovacím koeficientem.

Tab. 16: Koncentrace biomasy po aplikaci osmotického stresu

	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	A_6	$A_{prům}$	c [g/l]
NaCl 1%	5,460	5,718	5,778	5,016	4,938	5,076	5,331	1,276 ± 0,023
NaCl 3%	3,744	3,618	3,672	3,270	4,110	3,270	3,614	0,865 ± 0,054
Kontrola	4,590	4,560	4,632	4,926	4,830	4,872	4,735	1,134 ± 0,008

4.6.4 Výsledky studia vlivu osmotického stresu na proteázovou aktivitu

Proteázová aktivita byla vypočtena podle vzorce: $a = \frac{A \cdot 1000}{45} \cdot 10$,

kde A je absorbance a 45 je počet minut inkubace v termostatu. Vzorky byly odebrány v čase 32 hodin od začátku kultivace, kdy v čase 20 hodin byl přidán 1% a 3% NaCl do dvojnásobně koncentrovaného kultivačního BM média.

Tab. 17: Proteázová aktivita po aplikaci osmotického stresu

	A_1	A_2	A_3	A_4	$A_{prům}$	a [U/ml]
EtOH 1%	0,232	0,235	0,198	0,202	0,217	48,17 ± 3,74
EtOH 3%	0,182	0,094	0,153	0,163	0,148	32,89 ± 7,30
Kontrola	0,254	0,231	0,235	0,264	0,246	54,67 ± 3,01

4.6.5 Výsledky studia vlivu peroxidového stresu na růst biomasy

Koncentrace biomasy byla vypočítána spektrofotometrickým měřením zákalu vzorku, který byl odebrán ve 32. hodině od počátku kultivace, kdy ve 20. hodině došlo k aplikaci 0,5 mmol a 3 mmol H_2O_2 do dvojnásobně koncentrovaného kultivačního BM média. Hodnoty absorbancí jsou v tabulce udány již po vynásobení zřeďovacím koeficientem.

Tab. 18: Koncentrace biomasy po aplikaci peroxidového stresu

	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	A_6	$A_{prům}$	c [g/l]
H_2O_2 0,5 mmol	3,638	3,714	3,732	4,248	4,572	4,464	4,063	0,973 ± 0,020
H_2O_2 3 mmol	4,566	4,272	4,464	5,076	5,046	5,064	4,748	1,137 ± 0,016
Kontrola	4,590	4,560	4,632	4,926	4,830	4,872	4,735	1,134 ± 0,008

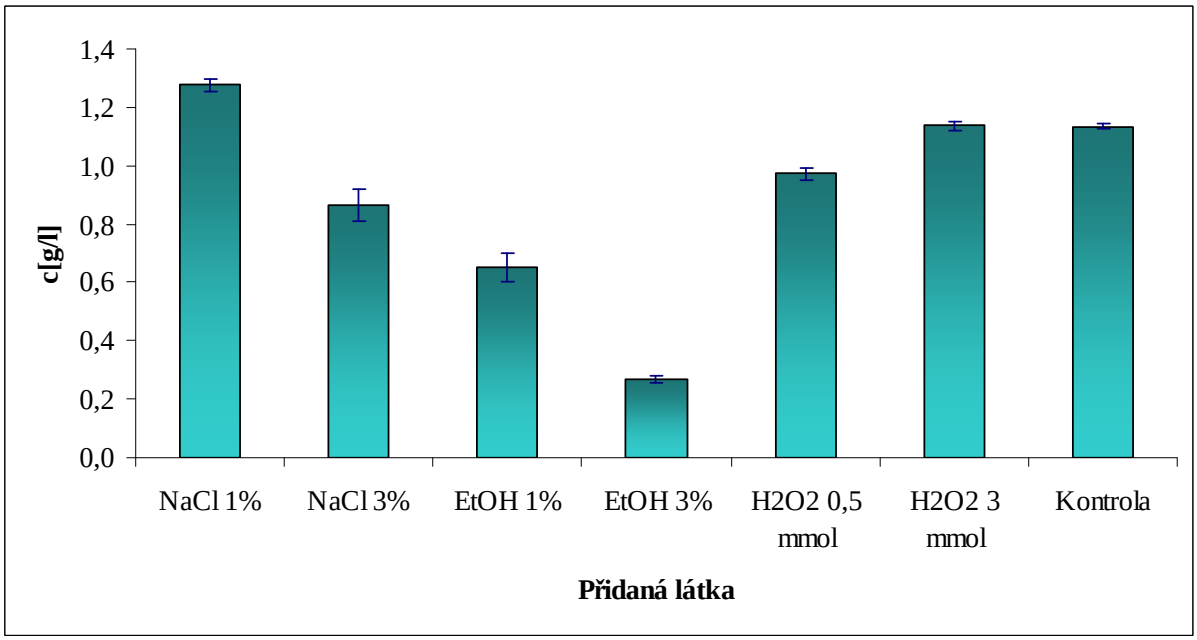
4.6.6 Výsledky studia vlivu peroxidového stresu na proteázovou aktivitu

Proteázová aktivita byla vypočtena podle vzorce: $a = \frac{A \cdot 1000}{45} \cdot 10$,

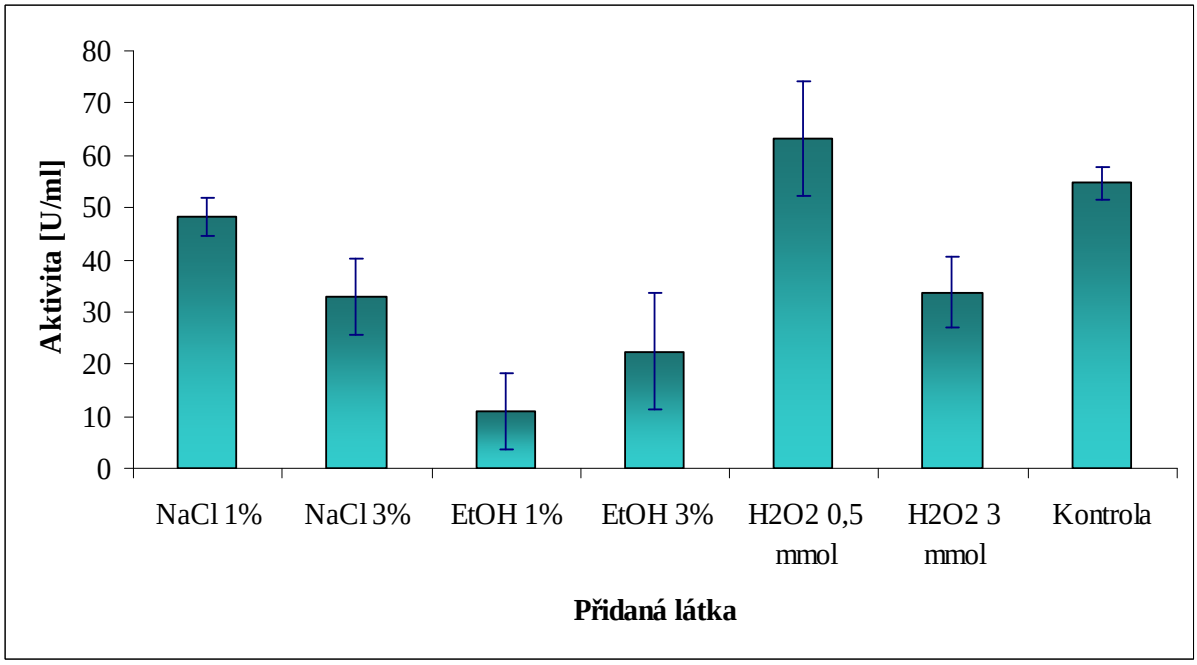
kde *A* je absorbance a 45 je počet minut inkubace v termostatu. Vzorky byly odebrány v čase 32 hodin od začátku kultivace, kdy v čase 20 hodin byl přidán 0,5 mmol a 3 mmol H_2O_2 do dvojnásobně koncentrovaného kultivačního BM média

Tab. 19: Proteázová aktivita po aplikaci peroxidového stresu

	A_1	A_2	A_3	A_4	$A_{prům}$	a [U/ml]
H_2O_2 0,5 mmol	0,214	0,346	0,311	0,266	0,284	63,17 ± 11,00
H_2O_2 3 mmol	0,190	0,174	0,120	0,123	0,152	33,72 ± 6,84
Kontrola	0,254	0,231	0,235	0,264	0,246	54,67 ± 3,01



Graf 9: Porovnání koncentrace biomasy *B.subtilis* po aplikaci stresových faktorů



Graf 10: Porovnání proteázových aktivit po aplikaci stresových faktorů

4.6.7 Diskuze výsledků vlivu stresových faktorů na růst *B.subtilis* a produkci proteáz

Provedenou studií bylo zjištěno, že přídavkem jakéhokoliv stresu ve 20. hodině dochází jak ke změnám v růstu biomasy, tak ke změnám u proteolytické aktivity. Z daných výsledků lze usoudit, že aplikace etanolového, peroxidového a osmotického stresu má negativní vliv jak na růst biomasy, tak na proteázovou aktivitu. Výjimkou je zvýšení proteázové aktivity po aplikaci peroxidového stresu, konkrétně 0,5 mmol H_2O_2, kdy došlo k nárůstu proteolytické aktivity v porovnání s kontrolou.

Po aplikaci etanolového stresu došlo ke snížení produkce biomasy, a to jak po aplikaci 1% i 3% etanolu oproti kontrole. Po aplikaci 1% etanolu došlo ke snížení produkce biomasy zhruba o 43%. Po aplikaci 3% etanolu došlo ke snížení produkce o více než 73%. Je tedy zřejmé, že etanol je pro bakteriální kultury toxický již v těchto relativně nízkých koncentracích. Po aplikaci osmotického stresu došlo po aplikaci 1% NaCl ke zvýšení produkce biomasy o 12,5%. Po aplikaci 3% NaCl došlo již ke snížení produkce o více než 25%. I v tomto případě lze konstatovat, že silnější osmotický stres měl výrazný inhibiční účinek na růst biomasy. V případě peroxidového stresu došlo po aplikaci 0,5 mmol H_2O_2 ke snížení produkce o 15%, v případě aplikace 3 mmol H_2O_2 nedošlo k prakticky k žádné změně u produkce biomasy.

Co se týče hodnot proteolytických aktivit, docházelo vždy ke snížení proteolytické aktivity, až na jednu výjimku, kdy po aplikaci 0,5 mmol H_2O_2 došlo ke zvýšení hodnoty proteolytické aktivity. U kontroly byla hodnota zjištěna 54,67 ± 3,01 U/ml, po aplikaci 0,5 mol H_2O_2 byla hodnota proteolytické aktivity stanovena na 63,17 ± 11,00 U/ml. Narozdíl od studie [9], kdy vystavením bakteriální kultury osmotickému šoku docházelo k navýšení produkce proteolytických enzymů, jsme v našem případě navýšení produkce těchto enzymů nepozorovali.

5 ZÁVĚR

V rámci předložené práce byly studovány možnosti produkce mikrobiálních proteolytických enzymů. K produkci těchto enzymů byla využita bakterie *Bacillus subtilis*, což je bakterie využívána k průmyslové výrobě těchto enzymů. V průběhu kultivací byl studován růst biomasy a produkce proteolytických enzymů v závislosti na typu substrátu a aplikaci vybraných stresových faktorů (chloridu sodného, peroxidu vodíku a etanolu).

V teoretické části byly shrnuty základní informace zabývající se popisem, vlastnostmi, mechanismem působení a mikrobiálními producenty proteolytických enzymů. Část teoretické práce je také věnována průmyslovému využití proteolytických enzymů, především mikrobiálních proteolytických enzymů. Největší využití těchto enzymů je v tzv. detergentech, což jsou prací a čistící prostředky. Důvodem přidávání těchto látek je ten, že enzym degraduje denaturovanou bílkovinu ulpívající na prádle na peptidy, které se následně odplaví.

V prvním experimentu praktické části byla stanovena růstová a produkční křivka v základním BM médiu. Maximální koncentrace ($0{,}459 \pm 0{,}011$ g/l) bylo dosaženo v 30. hodině kultivace. Nejvyšší proteázová aktivita byla naměřena ve stejné hodině kultivace. Hodnota proteázové aktivity činila $75{,}11 \pm 8{,}11$ U/ml. Koncentrace biomasy v každém odběru byla stanovena spektrofotometrickým měřením zákalu při vlnové délce λ = 630 nm. Přepočet na koncentraci biomasy byl proveden pomocí sestrojené kalibrační přímky. Proteázová aktivita byla ve všech případech stanovována metodou pomocí azokaseinu.

V dalším experimentu byla pro porovnání stanovena proteázová aktivita různými metodami. Jako hlavní metoda pro stanovení proteázových aktivit byla používána metoda pomocí azokaseinu. Jako druhá byla použita metoda stanovení proteázové aktivity v UV-VIS oblasti, jejíž provedení od první liší pouze tím, že k detekci uvolněných aromatických aminokyselin dochází v UV-VIS oblasti. Jako poslední byla použita metoda stanovení proteázové aktivity biuretovou metodou, která je založena na tvorbě fialově zbarvených chelátů mědi s bílkovinou. Tato metoda není příliš přesná a slouží pouze jako orientační.

V dalším experimentu byl studován vliv substrátu na růst a proteázovou aktivitu. Bylo zde použito základní kultivační BM médium o dvojnásobné koncentraci, dále BM médium s přídavkem dalších látek, což byla sacharóza, glukóza, laktóza, xylóza a kasein. Největšího nárůstu biomasy v 32. hodině kultivace bylo dosaženo v základním kultivačním médiu o dvojnásobné koncentraci. Největší proteázová aktivita byla naměřena v základním kultivačním médiu, ve dvojnásobně koncentrovaném médiu byla aktivita naměřena o něco nižší. Naopak silnými inhibitory růstu biomasy a proteázové aktivity byly sacharóza a glukóza.

Vzhledem k výsledkům předchozího experimentu byly v dalším experimentu stanoveny a porovnány růstové a produkční křivky v základním kultivačním BM médiu ve stejném kultivačním médiu o dvojnásobné koncentraci. Hodnoty koncentrací biomasy i hodnoty proteázových aktivit byly ve dvojnásobně koncentrovaném médiu zhruba dvakrát vyšší.

Ve stresových experimentech byl studován vliv vybraných stresových faktorů na růst biomasy a proteázovou aktivitu. Jako stresové faktory byly použity etanol (1% a 3%), NaCl (1% a 3%) a H_2O_2 (0,5 a 3 mmol). Z výsledků je patrné, že aplikace těchto stresů má spíše toxický účinek jak na růst biomasy, tak na proteázovou aktivitu. Výjimkou je zvýšení proteázové aktivity po aplikaci peroxidového stresu, (0,5 mmol H_2O_2) kdy došlo k nepatrnému nárůstu proteolytické aktivity v porovnání s kontrolou. Na rozdíl od jiných

autorů, kteří prokázali zvýšení produkce proteáz vystavením bakteriální kultury osmotickému šoku, v našem případě takové navýšení pozorováno nebylo. Aplikace použitých stresových faktorů tedy nevedla ke zvýšení výtěžků jak biomasy, tak proteolytických enzymů.

Využití mikrobiálních proteolytických enzymů má v průmyslu své místo a v současné době je prováděno mnoho studií vedoucí k vylepšení vlastností těchto látek a zefektivnění jejich biotechnologické produkce.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1 VODRÁŽKA, Zdeněk; RAUCH, Pavel; KÁŠ, Jan. *Enzymologie*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, třetí přepracované. Praha : FIRMA - JK, 1998. 171 s. ISBN 80-7080-330-4.

2 VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. Academia, 2., opravené vydání. Legerova 61, 120 00 Praha 2 : Nakladatelství Akademie věd České republiky, 1996. 191 s. ISBN 80-200-0600-1.

3 GUPTA, R., et al. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Applied Microbiology and Biotechnology*. October 2002, 10.1007, s. 60:381-395.

4 GUANGRONG, Huang; TIEJING, Ying; JIAXING, Jiang. Purification and characterization of a protease from Thermophilic bacillus strain HS08. *African Journal of Biotechnology*. December 2006, No. 5, s. pp. 2433-2438. ISSN 1684-5315.

5 ŠÍPAL, Zdeněk, et al. *Biochemie*. 1. vydání. Praha : Státní pedagogické nakladatelství v Praze, 1992. 480 s. ISBN 80-04-21736-2.

6 NAVANEETH, S., et al. Optimization of Medium for the production of subtilisin from Bacillus subtilis MTCC 441.*African Journal of Biotechnology*. November 2009, No. 8, s. pp. 6327-6331. ISSN 1684-5315.

7 VOET, Donald; VOETOVÁ, Judith G. *Biochemie*. 1. vydání. Praha : VICTORIA PUBLISHING, a.s., Klimentská 30, Praha 1, 1995. 1325 s. ISBN 80-85605-44-9.

8 KLABAN, Vladimír. *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*. První české vydání. Na Bělidle 34, 150 00 Praha 5 : Galén, 2005. 654 s. ISBN 80-7262-341-9.

9 ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Vydala Academia, vydání 3., opravené a doplněné. Praha : Nakladatelství Akademie věd České republiky, 2002. 363 s. ISBN 80-200-1024-6.

10 KAYUMOV, A. R., et al. Biosynthesis of the Subtilisin-like Serine Proteinase of *Bacillus intermedius* under Salt Stress Conditions. *Microbiology*. February 2006, No. 5, s. pp. 557-562. ISSN 0026-2617.

11 KHAPARDE, Shilpa S.; SINGHAL, Rekha S. Chemically modified papain for applications in detergent formulations. *Science*. May 2001, No. 78, s. Pages 1-4.

12 RAI, Sudhir K.; MUKHERJEE, Ashis K. Statistical optimalization of production, purification and industrial applications of a laundry detergent and organis solvent-stable subtilisin-like serine pretease from Bacillus subtilis DM-04. *Biochemical Engineering Journal* . September 2009, No. 1, s. 173-180.

13 MCKEE, Trudy; MCKEE, James R. *Biochemistry*. York Graphic Services. United States of America : York Production Services, 1996. 638 s. ISBN 0-697-21159-2.