

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Imobilizace Penicilin G acylasy na magnetické mikročástice a její využití v biotechnologických procesech

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Miroslav Jořenek
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Ludmila Zajoncová, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	23. 4. 2012

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracoval samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne 20. 4. 2012

/vlastnoruční podpis/

Poděkování: Chtěl bych poděkovat hlavně své vedoucí práce doc. RNDr. Ludmile Zajoncové za cenné rady, odborné vedení a také za trpělivost a čas, jenž mi věnovala. Tytéž díky patří zároveň také všem pracovníkům a členům katedry biochemie, kteří díky ochotě a spolupraci vytvořili příjemné prostředí pro řešení této diplomové práce.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Bc. Miroslav Jořenek
Název práce	Imobilizace penicilin G acylasy na magnetické mikročástice a její využití v biotechnologických procesech
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Ludmila Zajoncová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2012

Abstrakt

Tato diplomová práce je zaměřena na imobilizaci penicilin G acylasy z *Escherichia coli* na neporézní magnetické nosiče. Teoretická část obsahuje základní charakteristiku enzymu, jejímž obsahem je výskyt penicilin G acylasy a její získání z různých zdrojů a její vlastnosti od struktury přes biosyntetickou dráhu až po chemické reakce, kterých se účastní. Teoretická část zahrnuje také průmyslové využití penicilin G acylasy a její imobilizaci. Experimentální část se zabývá nejen imobilizací penicilin G acylasy na magnetické mikročástice, ale i identifikací dalších proteinů, které se v komerčním preparátu vyskytují, charakterizací volného a imobilizovaného enzymu a možnostmi opakovaného použití enzymu.

Klíčová slova	penicilin G acylasa, imobilizace, mikročástice, K_m , operační stabilita, SDS-PAGE, MALDI-TOF MS, teplotní stabilita, pH optimum
Počet stran	95
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Bc. Miroslav Jořenek
Title	Immobilization of penicillin G acylase on magnetic microparticles and its use in biotechnological processes.
Type of thesis	master
Department	Department of biochemistry
Supervisor	doc. RNDr.Ludmila Zajoncová, Ph.D.
The year of presentation	2012

Abstrakt

This thesis is focused on the immobilization of penicillin G acylase from *Escherichia coli* on non-porous magnetic carriers. The theoretical part contains the basic characteristics of the enzyme, whose content is the occurrence of penicillin G acylase and getting from various sources and properties of the structure through biosynthetic pathway to the chemical reaction in which it participates. The theoretical part includes the industrial use of penicillin G acylase and its immobilization. Experimental section doesn't deal only immobilization of penicillin G acylase on magnetic microparticles, but also identify other proteins that are present in the commercial preparation, characterization of free and immobilized enzyme and the possibilities of reuse of the enzyme.

Keywords	penicillin G acylase, immobilization, microparticles, K_m , operation stability, SDS-PAGE, MALDI-TOF MS, temperature stability, pH optimum
Number of pages	95
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

1. Cíle práce	6
2. Úvod.....	7
3. Teoretická část	8
3. 1. Penicilin G acylasa	9
3. 1. 1. Výskyt acylas	10
3. 1. 1. 1. Organismy	10
3. 1. 1. 2. Mutace.....	11
3. 1. 1. 3. Zisk z těchto zdrojů.....	14
3. 1. 2. Vlastnosti PGA	17
3. 1. 2. 1. Molekulární biologie penicilin G acylasy	17
3. 1. 2. 2. Struktura.....	20
3. 1. 2. 3. Chemické reakce penicilin G acylasy	30
3. 1. 2. 4. Substrátová specifita	34
3. 1. 2. 4. 1. Inhibitory.....	35
3. 1. 3. Využití PGA v biotechnologických procesech	37
3. 1. 3. 1. Historie.....	37
3. 1. 3. 2. Průmyslové využití PGA	41
3. 1. 4. Imobilizace penicilin G acylasy	48
3. 1. 4. 1. Akrylové pryskyřice.....	49
3. 1. 4. 2. Biopolymery.....	49
3. 1. 4. 3. Anorganické nosiče.....	49
3. 1. 4. 4. CLEC a CLEA	50
3. 1. 4. 5. Nově vznikající techniky.....	51
3. 1. 4. 6. Magnetické nosiče.....	51
4. Experimentální část.....	53
4. 1. Materiály	54
4. 2. Přístroje	56
4. 3. Metody	57
4. 3. 1. Stanovení aktivity enzymu I	57
4. 3. 2. Stanovení aktivity enzymu II	57
4. 3. 3. Stanovení koncentrace proteinu	58
4. 3. 4. SDS-PAGE.....	59
4. 3. 5. MALDI-TOF MS	60
4. 3. 6. Imobilizace PGA adsorpcí	60
4. 3. 7. Imobilizace PGA adsorpcí z následným zesíťováním	61
4. 3. 8. Imobilizace PGA pomocí glutaraldehydu.....	61
4. 3. 9. Imobilizace PGA pomocí karbodiimidu	62
4. 3. 10. Imobilizace PGA pomocí 1,4-butandioldiglycidyletheru	62
4. 3. 11. Imobilizace PGA pomocí jodistanu	62
4. 3. 12. Imobilizace PGA pomocí jodistanu a borohydridu sodného	63
4. 3. 13. Stanovení Michaelisovy konstanty (K_m).....	64
4. 3. 14. Operační stabilita imobilizované PGA.....	64
4. 3. 15. Stanovení závislosti aktivity PGA na teplotě inkubace	64
4. 3. 16. Stanovení závislosti aktivity PGA na pH.....	64
4. 3. 17. Funkční stabilita PGA	65
4. 3. 18. Stabilita při skladování.....	65
6. Literatura	66
7. Seznam použitých zkratk.....	71

1. Cíle práce

- Provést literární rešerši na téma penicilin G acylasa a její vlastnosti, použití a imobilizace.
- Určení proteinů v komerčním preparátu penicilin G acylasy a obou podjednotek penicilin G acylasy.
- Imobilizace penicilin G acylasy na neporézní magnetické nosiče (mikročástice).
- Stanovení některých vlastností volné a imobilizované penicilin G acylasy.

2. Úvod

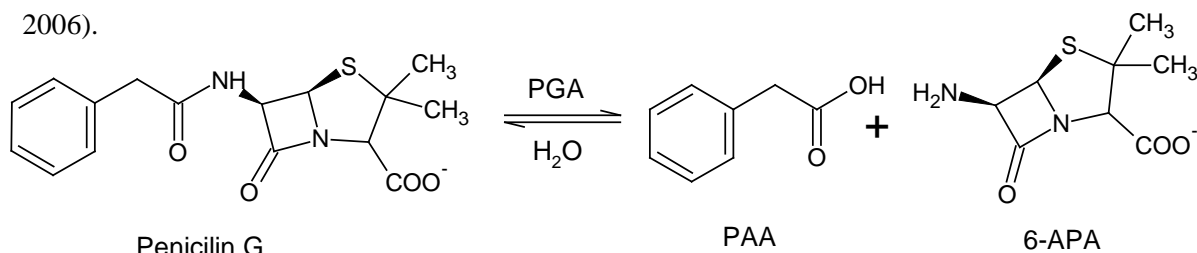
Penicilin G acylasa je velmi důležitý enzym. V průmyslu a hlavně ve farmaceutickém se používá pro výrobu 6-aminopenicilánové kyseliny z penicilinu G. Protože jsou mikroorganismy na penicilin G již delší dobu rezistentní, je toto antibiotikum už neúčinné pro lékařské účely a 6-aminopenicilánová kyselina slouží k výrobě mnoha nových β -laktamových antibiotik. Penicilin G acylasa je získávána z mnoha mikroorganismů, ale nejvíce využívanými zdroji jsou *Escherichia coli* a *Bacillus megaterium*. Tato práce je věnována imobilizaci penicilin G acylasy z *Escherichia coli*. V menší míře je používána penicilin G acylasa z mikroorganismu *Achromobacter*. Penicilin G acylasa byla už mnoha způsoby imobilizována na různé nosiče. Menší pozornost však byla věnována neporézním magnetickým nosičům jakými jsou např. magnetické mikročástice. Hlavní význam imobilizace enzymů na pevné nosiče spočívá v jejich opakovaném použití, snadné manipulaci s enzymem a v neposlední řadě se imobilizací mohou zlepšit vlastnosti enzymů, jako je zvýšení termostability, změna optimálního pH či delší doba skladování. Použití imobilizovaných enzymů v biotechnologických procesech má především velký ekonomický přínos.

3. Teoretická část

3. 1. Penicilin G acylasa

Penicilinacylasy (PA) jsou ve farmaceutickém průmyslu důležitými enzymy. Hlavní průmyslové použití je pro výrobu 6-aminopenicilánové kyseliny (6-APA) a hydrolýzu dalších penicilinů, což může být využito v několika biotechnologických aplikacích jako v syntéze β -laktamových antibiotik, syntéze peptidů nebo rozlišení racemátů. Tato skupina enzymů je rozdělena do tří podskupin v závislosti na preferovaném substrátu: penicilin V acylasy (PVA), penicilin G acylasy (PGA) a ampicilinamidasy. PA patří do superrodiny N-koncových hydrolas. Nicméně penicilinacylasy nejsou jedinými enzymy schopnými syntetizovat β -laktamová antibiotika. Příkladem mohou být cefalosporinacylasy nebo hydrolasy esterů α -aminokyselin z *Xanthomonas citri* a *Acetobacter turbidans* (Giordano et al., 2006). Nejčastěji používané PGA v průmyslu pochází z *Escherichia coli* kmene ATCC 11105, z *Bacillus megaterium* kmene ATCC 14945 a z mutantů těchto dvou kmenů (Rajendhran a Gunasekaran, 2004). V dnešní době vzrůstá zájem také o PGA z mikroorganismu *Achromobacter*.

Penicilin G acylasa (PGA; EC 3.5.1.11) je hydrolytický enzym, který působí na postranní řetězce penicilinu G, cefalosporinu G a dalších antibiotik. Hydrolýzou vznikají meziproducty β -laktamových antibiotik jako 6-APA nebo 7-aminodeacetoxycefalosporinová kyselina (7-ADCA) spolu s fenylactovou kyselinou (PAA) jako běžným produktem (Obr.1). Tyto meziproducty antibiotik se mohou stát stavebními kameny polosyntetických antibiotik jako penicilinů (ampicilin, amoxicilin, cloxacilin a salbactam) a cefalosporinů (cefalexin, cefadroxil a cefatoxim), které mají širší inhibiční profily a vyšší účinnost. Bohužel penicilin G acylasa není schopna snadno vytvářet 7-aminocefalosporinovou kyselinu (7-ACA) analogickou reakcí z cefalosporinu C. β -laktamových antibiotik se v současné době prodá asi za 15 miliard dolarů a tvoří asi 65 % celkového trhu s antibiotiky. Roční spotřeba PGA je odhadnuta asi na 10 – 30 milionů tun. Zvýšení produkce PGA také pomohl screening mikroorganismů, místně specifická mutagenese, imobilizační techniky a úpravy fermentačního procesu (Chandel et al., 2008; Klei et al., 1995). PGA, jejíž hlavní zdroj je z *E. coli*, byla objevena v 50. letech 20. století. Enzym byl imobilizován na různé materiály. Fyziologická role PGA je nejasná, i když bylo navrženo, že by mohl být zapojen do katabolismu fenylactových sloučenin, kdy oddělené fenylacetylové skupiny organismus používá jako zdroj uhlíku (Liljeblad a Kanerva, 2006; Giordano et al., 2006).



Obr.1 Přirozená reakce penicilin G acylasy (přepřacováno podle Liljeblad a Kanerva, 2006).

3. 1. 1. Výskyt acylas

3. 1. 1. 1. Organismy

Penicilin G acylasy se vyskytují v přírodě v různých mikroorganismech včetně bakterií, aktinomycet, kvasinek a plísní (McLanahan, 2011). PVA, která preferuje hydrolýzu penicilinu V, je k nalezení u mnoha mikroorganismů jako např.: *Achromobacter* sp. NCIB 9424, *Actinoplanes* sp., *Bacillus megaterium*, *Bacillus sphaericus*, *Cryptococcus* sp., *Erwinia aroideae*, *Fusarium* sp., *Micrococcus ureae*, *Penicillium chrysogenum*, *Pleurotus ostreatus*, *Pseudomonas acidovorans*, *Rhodotorula glutinis* nebo *Streptomyces lavendulae* (Škrob et al., 2003). Penicilin G acylasu produkuje několik mikroorganismů např. *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium*, *Arthrobacter viscosus* nebo *Kluyvera citrophila* (Massoliny et al., 2008). PGA z gram-negativních bakterií jako *Escherichia coli*, *Kluyvera citrophila*, *Providencia rettgeri* a *Alcaligenes faecalis* se hromadí v periplasmatickém prostoru, zatímco PGA gram-pozitivních bakterií jako *Arthrobacter viscosus* a *Bacillus megaterium* je sekretována ven (Tab.1). Byla také nalezena intracelulární PGA u *Bacillus* sp. (Rajendhran a Gunasekaran, 2004; Giordano et al., 2006). Mikroorganismy vždy dávaly přednost produkci různých primárních a sekundárních metabolitů z různých zdrojů sacharidů. Vysoké množství PGA je získáváno fermentačními procesy především z mikroorganismů jako *E. coli* a *B. megaterium*. Např. β -laktamové antibiotikum ampicilin je produkován z penicilinu G získaného z fermentace *Penicillium chrysogenum* (Chandel et al., 2008; Barends et al., 2004).

Tab.1 Mikrobiální zdroje penicilin G acylasy (Rajendhran a Gunasekaran, 2004).

Organismus	Lokace enzymu
<i>Escherichia coli</i>	periplasmatický
<i>Kluyvera citrophila</i>	periplasmatický
<i>Providencia rettgeri</i>	periplasmatický
<i>Alcaligenes faecalis</i>	periplasmatický
<i>Arthrobacter viscosus</i>	extracelulární
<i>Bacillus megaterium</i>	extracelulární
<i>Bacillus</i> sp.	intracelulární

3. 1. 1. 2. Mutace

Kromě možných mikroorganismů, které by mohly produkovat PGA, lze zlepšit produkci PGA i mutagenézí, klonováním a expresí a optimalizací parametrů fermentace. Vhodné mikroorganismy musí být schopné přežít v širokém rozsahu substrátů s vysokým množstvím sacharidů a s malou nebo žádnou toxicitou pro produkt (Chandel et al., 2008). Geny kódující PGA byly klonovány a exprimovány s významným zlepšením transkripce, translace a posttranskripčních procesů. V enzymovém inženýrství může být PGA upravena pro získání konformační stability a požadované funkce (Rajendhran a Gunasekaran, 2004). Pro zvýšení produktivity kmenů nesoucích *pac* gen byly použity konvenční mutagenní techniky. Na základě hypersenzitivity k penicilinu G byly některé mutantní kmeny izolovány a vybrán byl nejlepší kmen, který měl vyšší aktivitu, než kmen mateřský. K izolaci mutantů se používá médium, kde jediným zdrojem dusíku jsou amidy. Při použití glukosy v kultivačním médiu, byli izolováni mutanti odolní vůči katabolické represi a s 8-20x vyšší produkcí PGA. Podobně byl vybrán i hyperproduktivní mutant *P. rettgeri* ATTC 31052, který je rezistentní vůči sukcinátu. Umístění *pac* genu pod kontrolu silným promotorem a vložení spaceru mezi vazebné místo ribosomu (RBS) a start kodon, vedlo k zvýšení efektivity transkripce a translace a k výraznému zvýšení produkce PGA. Spontánní mutace byly také získány použitím různých amidů jako zdrojů dusíku v médiu. Pro mutace byl dále také použit bakteriofág (Rajendhran a Gunasekaran, 2004). U mutantního kmene *E. coli* (PCS 1R-102) byla pozorována více než třikrát zvýšená aktivita (231 $\mu\text{kat}/\text{mg}$) PGA s MNNG (N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin) oproti wild-typu (1,28 $\mu\text{kat}/\text{mg}$). Místně řízená mutageneze byla také použita k úpravě rychlosti enzymové hydrolýzy a syntézy β -laktamových antibiotik. Mutageneze fenylyalaninu na alanin v pozici 24 na β podjednotce PGA u *E.coli* produkovala protein s vyšším poměrem syntézy/hydrolýzy (S/H), s vyšší aktivitou acylasy a s vyšší odolností vůči inhibici PAA. Místně řízené mutageneze jsou shrnuty v Tab.2. U mutací je konečným cílem většinou dosažení stabilního produktu po několika generacích modifikovaných mikroorganismů, což je důležité hlavně pro fermentační průmysl. PGA geny byly úspěšně naklonovány a exprimovány v *E. coli*, *A. viscosus*, *P. rettgeri*, *K. citrophila*, *B. megaterium*, *Achromobacter xylosoxidans* a *A. faecalis*. Bakterie nesoucí plasmid s genovou sekvencí pro acylasu z *K.citrophila* produkovala třicetkrát více PGA než rodičovský kmen. Dále byl také klonován a exprimován PGA gen z *A. viscosus* v *E. coli* a v *B. subtilis*. Zde byla zaznamenána 72x zvýšená aktivita PGA v intracelulárním prostoru *E. coli* a extracelulárním prostoru *B. subtilis*. V druhu *Bacillus* se při použití dvou po sobě jdoucích fermentačních médií zdvojnásobila produkce PGA. Pro zvýšení množství PGA v intracelulárním prostoru byl také klonován gen pro PGA z *B. megaterium* ATCC 14945 do *E. coli* HB101. Ještě vyšší množství PGA vzniklo, když *E.coli* RE3 nesla rekombinantní plasmid pKA 18. V tomto systému byla zaznamenána aktivita kolem 75 $\mu\text{kat}/\text{l}$ a specifická aktivita asi 16,7 $\mu\text{kat}/\text{g}$ buněčné sušiny. Gen pro PGA byl exprimován pod vlastním promotorem v různých

kmenech *E.coli* a maximální aktivita (30,3 $\mu\text{kat/l}$) byla získána u *E. coli* DH5 α . Nyní je i možné klonovat a exprimovat gen pod stabilním vektorem. Rekombinantní plasmidy *pRS11* (4,91 kbp), *pRS 12* (4,91 kbp), *pRS 2* (2,996 kbp) a *pRS 3* (2,623 kbp), které nesou rezistenci pro spectinomycin, byly nalezeny ve stabilním stavu v 63. generaci *E. coli*. Stabilní rekombinantní kmen tedy může zajistit jednodušší a levnější způsob přeměny sacharidů na PGA (Chandel et al., 2008).

Tab.2 Místně řízené mutace a upravená produkce penicilin G acylasy (Chandel et al., 2008).

Organismus	Místo mutace	Úprava produkce PGA
<i>E. coli</i>	Ser290	Zlepšení aktivity PGA o (92%) u T289C, (85 %) u T289S a (20 %) u T289G.
	Ser290 nahrazený Cys nebo Secys	20 % pokles mutovaného proteinu.
	nahrazení Phe β 71 Cys nebo Leu	Stonásobné zvýšení K_{cat}/K_m vůči glutaryl-L-leucinu.
	Lys (K299) v aktivním místě	Dva mutanti (K299S; K2999Q) nevykazovali aktivitu. Jeden mutant (K299H) měl velmi malou aktivitu a celkovou ztrátu aktivity (90 %).
<i>K. citrophila</i>	Transverze thyminu za guanin v pozici 1163	90 a 50 % ztráta PGA aktivity u penicilinu G a fenylacetyl-L-leucinu.
	Gly21	Akumulace prekurzoru v periplasmě.
	serin v domnělém aktivním místě	Pokles katalytické aktivity (kcat) s faktorem větším než 10.
<i>P. rettgeri</i>	Met α 140	Mutantní kmen Bro1 vykazoval jinou substrátovou specifitu stejnou se schopností mutantu katalyzovat 6-bromohexanamid.
<i>B. megaterium</i>	Lys β 427 a Lys β 430	Mutant K β 427A vykazoval velkou stabilitu v organických rozpouštědlech. K β 430A, K β 430A/ K β 427A vykazoval dobrou stabilitu v rozpouštědlech a dobrou termostabilitu. Poločas rozpadu K β 427A a K β 430A se zlepšil o 60% a 166% ve srovnání s původní PGA.

3. 1. 1. 3. Zisk z těchto zdrojů

S ohledem na roční produkci jsou peniciliny nejdůležitější antibiotika. Přírodní peniciliny (penicilin G a V) se vyrábějí fermentačními postupy. Ale jako terapeutický prostředek se přírodní peniciliny používají jen zřídka. Obvykle se využívají pro výrobu 6-APA. Tyto nové polosyntetické penicilánové deriváty mají lepší vlastnosti (zvýšení stability, lepší vstřebávání, méně nežádoucích účinků a také řeší problém mikrobiální rezistence vůči antibiotikům). K přípravě těchto syntetických derivátů se jako katalyzátor využívá PGA. Penicilin G acylasy se získávají z různých zdrojů, různými purifikačními postupy (Rajendhran a Gunasekaran, 2004). Oddělení extracelulárních enzymů od nežádoucích bílkovin je jednodušší, než oddělení enzymu vytvořeného uvnitř buněčných organel. V minulých letech byla pro fermentace použita rekombinantní *E. coli*, *B. megaterium* a *A. viscosus* společně se sacharosou a glukosou jako zdroji sacharidů. Tento proces byl jednoduchý, ale pro své systémově specifické požadavky a vysokou cenu sacharidů neefektivní. To přispělo k vysoké ceně PGA. Vysoké ceny PGA vyřešilo až klonování a exprese PGA genů v různých hostitelích. U *E. coli* je gen pro PGA exprimován do periplasmatického prostoru, proto vytváření značného množství biomasy během fermentace vede k zvýšení produkce PGA. Pro zvýšení biomasy a tudíž i PGA je u fermentace doporučena nižší koncentrace substrátu. Vzhledem ke klesající produktivitě a vysokému podílu lidské práce se tyto procesy nedoporučují pro průmyslový provoz. Pro průmysl lze využít kontinuální fermentaci. Ta je ale náchylná na kontaminaci a má různá specifická omezení. Za použití permeabilizace buněk z *A. faecalis* 0,3 % (w/v) cetyltrimethylamoniumbromidem bylo extrahováno 7,5x více PGA. Při použití monolitické kolony u surového extraktu z *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951 a *P. purpurogenum* obsahující metakryoylantipyrin, byla návratnost při 10 násobném čištění 90 % a při 35 násobném čištění 89 %. Při fermentaci je vždy důležitý vhodný zdroj uhlíku a dusíku. Optimalizace fermentačního media pro PGA je uvedena v Tab.3. (Chandel et al., 2008). Přídavek sacharosy nebo glycerolu v médiu výrazně snižuje agregaci proenzymu v periplasmatickém prostoru. Sacharosa nebo glycerol se akumulují v periplasmatickém prostoru a mají pozitivní vliv na složení a rozpustnost proteinů a tím zvyšují tvorbu PGA. Pro uvolnění mnoha rekombinantních proteinů z buněk se používá skupinu proteinů mezi něž patří i Bakteriocin uvolňující protein (BRP). Po expresi *brp* genu se u *E. coli* stává buněčná stěna permeabilní a periplasmatické proteiny jsou uvolňovány do média. Expese *brp* usnadňuje uvolnění až 40 % overexprimovaných PGA (Rajendhran a Gunasekaran, 2004). Pro ekonomickou produkci β -laktamových antibiotik je potřeba purifikovat velká množství PGA za co nejnižší cenu. Pro tento účel bylo použito několik purifikačních metod, mezi něž patří pseudoafinitní chromatografie (ligand je selektivně vázán pro držení enzymu nebo jiných proteinů), vodné dvoufázové systémy, hydrofóbní chromatografie a afinitní chromatografie s imobilizovaným kovem (IMAC). Pro purifikaci PGA byl nejlepší IMAC. IMAC je chromatografická metoda, kde na pevný povrch jsou aplikována chelatační činidla, která

imobilizují kovové ionty jako Cu^{2+} , Zn^{2+} nebo Al^{3+} , které interagují svými nevázebnými volnými elektronovými páry s aminokyselinami (donory elektronů) na proteinu (His, Cys, Trp, Asp nebo Glu). Na základě IMAC byla vytvořena afinitní membrána s imobilizovaným kovem (IMAM) a stala se tak nejslibnější metodou purifikace. IMAM zvládne asi 9 purifikací s 90,25 % návratností PGA. U IMAM metody byla použita regenerovaná celulosová membrána (médium, kde je největší šance, že se aminokyseliny budou vázat s chelátorem) s vázanou iminodioctovou kyselinou (IDA) jako chelátorem (McLanahan, 2011).

Tab.3 Optimalizace fermentačního média a parametry pro úpravu produkce penicilin G acylasy (Chandel et al., 2008).

Organismus	Optimalizace/Optimální parametry	Aktivita penicilin G acylasy
Mutantní kmen <i>E. coli</i> EP1 (pGL-5)	Zdroje uhlíku: glukosa, sorbitol, glycerol, PAA	Koncentrace buněk - 162 g mokré váhy/l. 2,4x vyšší ve srovnání s původním provozem. Specifická aktivita PGA (0,62 μ kat/g mokré váhy).
<i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14945	Zdroje uhlíku a dusíku	Maximum aktivity PGA - 2,3 μ kat/l při použití kaseinového hydrolyzátu doplněného 0,6 l alkalasy a syrovátky.
<i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14945	Inokulační fáze zrání a inokulační velikost	Koncentrace spór - $1,5 \cdot 10^7$ spór/ml a maximum aktivity PGA při klíčení během 24 a 72 hodin.
Izolovaný <i>Bacillus</i> sp.	Dílčí provedení na druhé úrovni se sedmi komponenty	Dvoukroková optimalizace média vyústila v dvojnásobné zvýšení aktivity PGA.
<i>Bacillus</i> sp.	Sacharosa, PAA a trypton	2x vyšší aktivita PGA než při produkci na základním médiu
PGA z <i>K. citrophila</i> exprimována v <i>E. coli</i>	TB médium (Trypton, kvasinkový extrakt a glycerol), doplněné IPTG (isopropylthio- β -D-galaktosidem)	Faktor 2,4 zvýšil aktivitu PGA.
<i>B. megaterium</i> ATCC14945	Roztok vitamínů	7-násobné zlepšení aktivity PGA. Ca^{2+} (2,5 mM) 2,6 x zvýšil specifickou aktivitu PGA. Výměna přírodního signálního peptidu 1,7 x zvýšila aktivitu v místě extracelulární lipasy Lip A.
<i>B. megaterium</i> ATCC 14945	Kultivace za použití volných aminokyselin a syrovátkou obohacené médium	Maximum aktivity PGA - 3,7 μ kat/ml, při požití koncentrace biomasy 5,5 g/l během kultivace.
<i>B. subtilis</i> WB 600 (pMA5)	Produkce PGA u kultury za použití škrobu jako zdroje uhlíku.	5-násobné zvýšení aktivity PGA (32,7 μ kat/ml) během krmení na hydrolyzovaném škrobu a tryptonu v médiu. Míra produktivity - 0,33 μ kat/l/h.

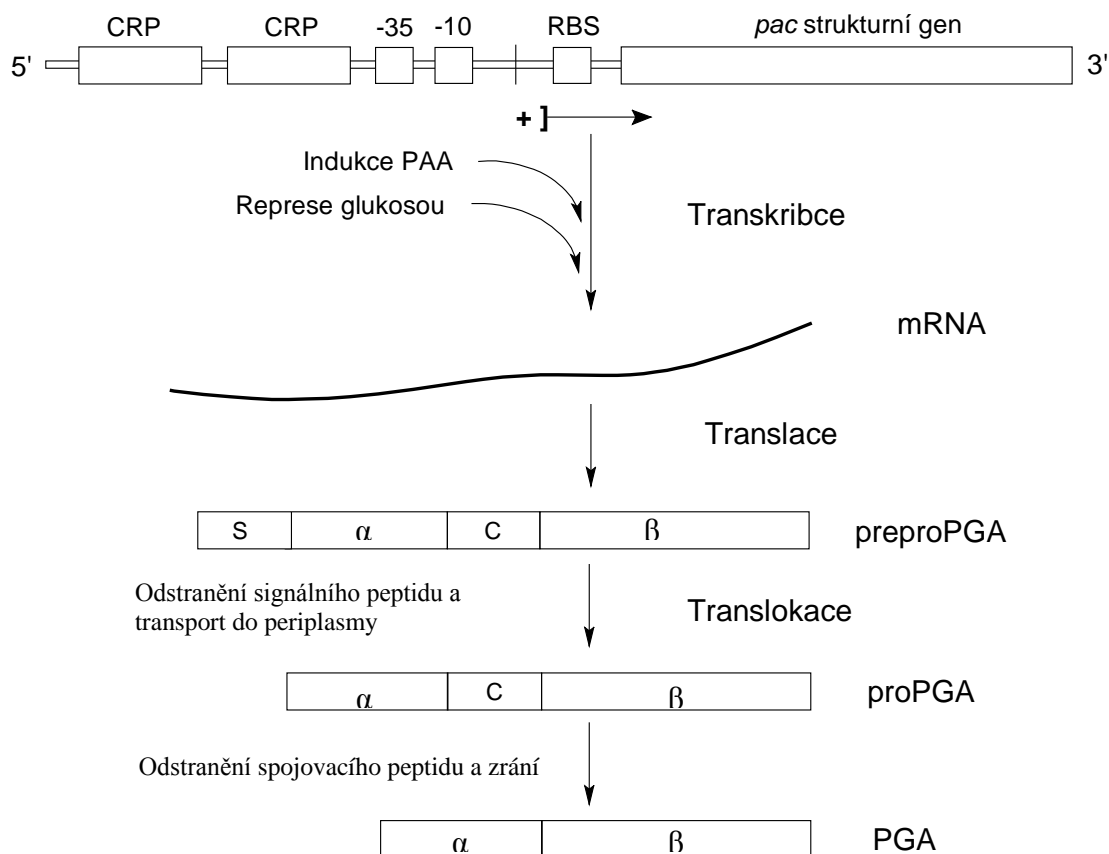
3. 1. 2. Vlastnosti PGA

3. 1. 2. 1. Molekulární biologie penicilin G acylasy

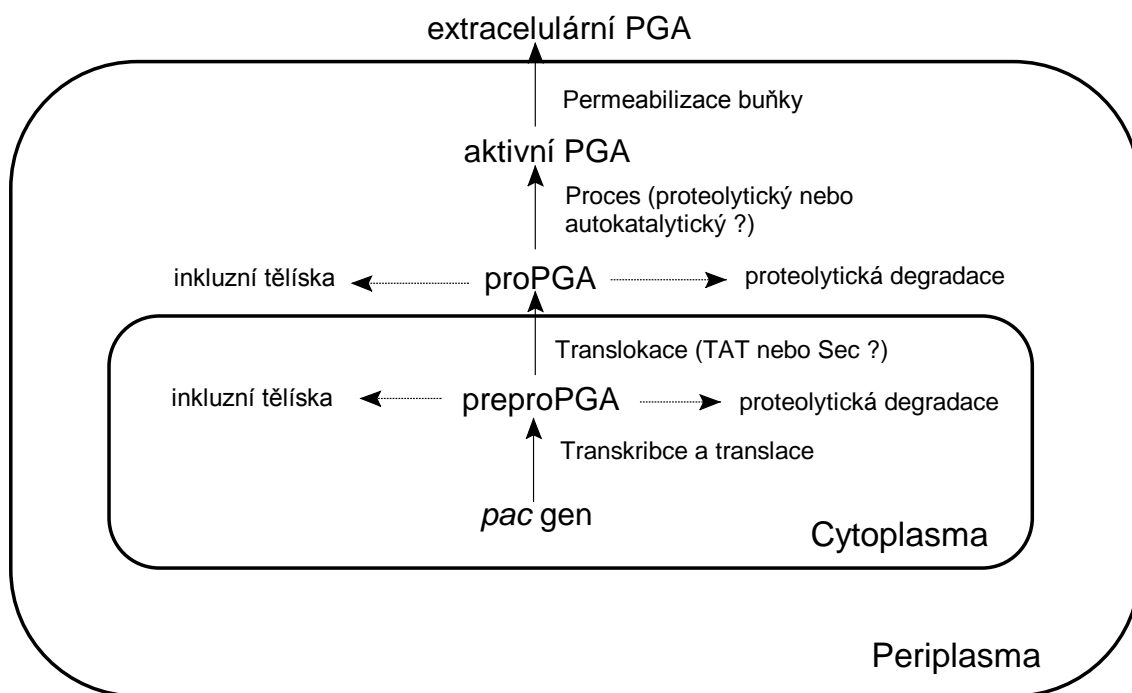
Hotovému enzymu předchází jeho vznik, který obvykle jako většina peptidů spočívá na molekulárních mechanismech buňky. Prekurzor penicilin G acylasy je u *E. coli* kódován *pac* genem (přístupové číslo AF109125) a je v cytoplasmě produkován jako jeden řetězec obsahující 846 aminokyselin. Mechanismus autoproteolytického procesu je složitý, ale několika studiemi byl uveden možný postup aktivace enzymu. Prekurzor PGA obsahuje dvacetišestiaminokyselinovou signální sekvenci a peptidové raménko složené z 54 aminokyselin. Signální sekvence slouží k translokaci proenzymu do periplasmy, zatímco sekvence raménka, která je mezi oběma podjednotkami, blokuje aktivní místo a ovlivňuje také konečné skládání enzymu. Transkripce genu je indukována PAA a regulována cyklickým AMP (cAMP) receptorovým proteinem (CRP) v závislosti na zdroji uhlíku. *Pac* gen obsahuje 2460bp, včetně 150bp esenciální sekvence pro transkripční regulaci CRP. V nepřítomnosti CRP nebo při delecí DNA-CRP vazebného místa je exprese prekurzoru velmi snížena, což vede k přesvědčení, že CRP je aktivátor proteinové transkripce. Posttranslační úpravy začínají štěpením signálního peptidu po translokaci membránou (McVey et al., 2001; McLanahan, 2011). Toto štěpení začíná odstraněním raménka mezi α a β podjednotkou, což je neobvyklé pro bílkoviny prokaryotického původu. Pro získání aktivního periplasmatického enzymu je nutné také úspěšné zpracování a zformování $\alpha\beta$ -heterodimeru (Klei et al., 1995). První štěpení odstraní 26 aminokyselinovou signální sekvenci a pro vytvoření zralého enzymu jsou nezbytná nejméně další čtyři proteolytická štěpení. Jedno z těchto štěpení zahrnuje štěpení vazby Thr263-Ser264 k odkrytí katalytického Ser264. Štěpení Thr263-Ser264 vazby vyústí v odstranění vázajícího peptidu, odhalení primární aminoskupiny Ser β 1 (Ser β 264 ve struktuře prekurzoru) a ve formování aktivního centra PGA. V periplasmě nastává současně s autoproteolytickým štěpením a procesem skládání enzymu i vazba vápníku na enzym. Pro náhled do procesu aktivace byla vytvořena řada mutantů prekurzoru enzymu. Mutantní proenzym byl pak purifikován imunoafinitní chromatografií za použití imobilizovaných monoklonálních protilátek vůči PGA. Thr263 hraje důležitou roli při rychlosti autoproteolytické reakce (McLanahan, 2011). Signální sekvence řídí transport PGA do periplasmatického prostoru zatímco peptidové raménko zajišťuje správné skládání polypeptidu před štěpením, při němž vzniká zralý enzym (McVey et al., 2001). Regulace syntézy PGA byla studována hlavně u *E. coli*. Do syntézy PGA jsou zapojeny tři hlavní regulační mechanismy: katabolická represe, indukce PAA a termoregulace Obr.2. Exprese genu *pac* u wild-typu *E. coli* je vyvolána PAA a potlačena glukosou. Tyto dvě látky mají vliv na genovou expresi v úrovni transkripce. Indukční mechanismus PAA je nejasný, ale zřejmě funguje přes *pac*-specifický receptorový protein,

kodovaný *pacR* genem, který je lokalizován uvnitř *pac* strukturního genu a transkribován v opačném směru než gen *pac*. Pro indukci pomocí PAA není tedy důležitá přítomnost kompletního *pac* genu. Katabolická represe může být vysvětlena přítomností domnělého CRP-vázacího místa v protisměru *pac* genu. Kromě toho je CRP protein přímo zapojen v indukci pomocí PAA a expresi *pac* genu. PGA je běžně produkována v optimální teplotě od 24 -30 °C. Na produkci aktivního enzymu se podílí teplotně citlivé proteolytické procesy. Neschopnost kmenů produkovat aktivní enzym při vysoké teplotě je zřejmě způsobena špatným skládáním. Zpracování PGA je analogické ke zpracování některých zvířecích peptidových preprohormonů, což je u bakterií neobvyklé (Rajendhran a Gunasekaran, 2004). Propeptid penicilin G acylasy z *Providencia rettgeri* je proteolyticky stejně zpracován jako propeptid penicilin G acylasy z *Escherichia coli* a *Kluyvera citrophila* (Klei et al., 1995). Syntéza PGA je u *K. citrophila* také vyvolána PAA a potlačena glukosou a podobně regulovaná jako u *E. coli*. U *P. rettgeri* není gen *pac* indukován PAA a nedochází zde ke katabolické represí glukosou, ale C₄-dikarboxylovou kyselinou z TCA cyklu (např.: sukcinát, fumarát, malát). Tvorba PGA u *A. faecalis*, *A. viscosus* a *B. megaterium* je indukována také PAA, ale nedochází zde k regulaci katabolickou represí. Teplotně závislá syntéza byla pozorována u všech organismů. Mnoho proteinů je u *E. coli* exportováno přes vnitřní membránu pomocí Sec translokasy. Sec systém rozezná signální peptidy, které mají podobnou sekvenci, ale společné fyzikálněchemické vlastnosti. Krátké úseky s aromatickými a kladně nabitými zbytky u zralé části signálního řetězce jsou rozpoznány SecB šaperonem a dále zpracovány Sec translokasou. Šaperon zde pomáhá správnému složení a v translokaci enzymu. SecB je hlavní složkou podílející se na translokaci mnoha sekrečních a periplasmatických proteinů. SecB šaperon pomáhá také skládat aktivní PGA. Zvýšení exprese SecB však nezvyšuje produkci PGA, ale spíše minimalizuje vznik inkluzních tělísek v cytoplasmě, z čeho vyplývá, že SecB šaperon účinně translokuje proenzym do periplasmatického prostoru. Druhá proteinová sekreční dráha je známa jako dvouargininová translokační dráha (TAT). Tato dráha je zcela nezávislá na Sec. Signální peptid pro TAT dráhu musí mít dva argininy vložené do SRRXFLK signálního peptidu. Signální sekvence pro proenzym PGA u *E. coli* má dva argininy oddělené jedním asparaginem a nepřipomíná tak TAT rozpoznávací motiv. Tato sekvence zde však efektivně zprostředkovává translokaci přes TAT dráhu. K výrazné ztrátě aktivních PGA dochází v důsledku intracelulární proteolýzy. V cytoplasmě je tak až 90% proenzymu degradováno. Proto je výnos PGA regulován na posttranskripční úrovni dvěma konkurenčními procesy: intracelulární proteolýzou proenzymu a aktivní translokací a zráním PGA Obr.3 (Rajendhran a Gunasekaran, 2004). Výše uvedené informace platí pro penicilin G acylasu z *E. coli*, která je také nejlépe prostudována a poskytuje tak nejvíce molekulárně biochemických informací o PGA. V experimentální části byla použita PGA právě z tohoto mikroorganismu. PGA z *Achromobacter* se jen v malé míře liší od PGA ostatních mikroorganismů. Struktura PGA z *A. xylosoxidans* obsahuje signální sekvenci, obě

podjednotky i spojovací peptid mezi nimi. Signální peptid obsahuje 21 aminokyselin a určuje tak umístění enzymu do periplasmatického prostoru. Podjednotka α obsahuje 247 aminokyselin a podjednotka β 557 aminokyselin (Cai et al., 2004). U *Achromobacter* sp. CCM 4824 probíhá syntéza enzymu do cytoplasmy. Tento mikroorganismus je striktně aerobní, obsahuje více jak jeden bičík a je negativní v Gramově barvení. Ideální teplota pro jeho růst je 37 – 42 °C (Plháčková et al., 2003).



Obr. 2 Genetická organizace *pac* genu a kroky v syntéze PGA u *E. coli* (přepřacováno podle Rajendhran a Gunasekaran, 2004).

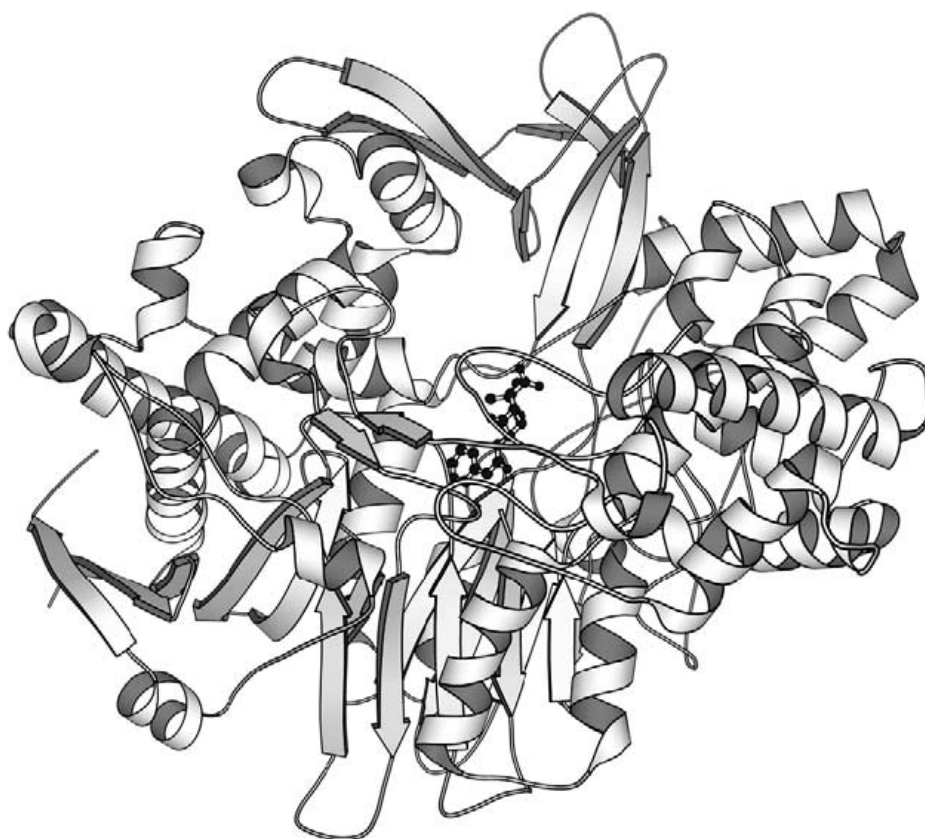


Obr.3 Posttranslační úpravy při produkci PGA v *E. coli*. Tvorba inkluzních tělísek a proteolytická degradace prekurzoru PGA v cytoplasmě a periplasmě snižuje množství aktivní PGA (přepřacováno podle Rajendhran a Gunasekaran, 2004).

3. 1. 2. 2. Struktura

Penicilin G acylasa (PGA) (Obr.4) patří do superrodiny N-koncových nukleofilních hydrolas složených z typické dvojvrstvy β -listů vmezeřených mezi α -šroubovice, což představuje čtyři vrstevnatá katalyticky aktivní $\alpha\beta\alpha$ -jádra tvořena dvěma antiparalelními β -listy zabalenými proti sobě a které jsou z jedné strany pokryté vrstvou antiparalelních α -šroubovic (Obr.5). N-koncové nukleofilní hydrolasy sdílejí stejnou strukturu kolem aktivního místa a jsou obvykle syntetizovány jako prekurzorové proteiny, kde posttranslačními autokatalytickými procesy je vytvářen zralý protein s aktivním katalytickým místem na novém N konci. Nemají katalytickou triádu, ale N-koncový serin je aktivován molekulou vody. Aktivní enzym vzniká z jednoho peptidového prekurzoru tím, že se z proenzymu odstraní spojovací peptid (30 – 50 aminokyselin) a vytvoří se heterodimer z α a β podjednotek s nukleofilním N-koncem. Enzym podporuje nukleofilní útok na karbonylový uhlík amidové nebo esterové vazby. N-terminální konec β -řetězce je tvořen většinou serinem, threoninem nebo cysteinem, který působí jako nukleofil, jak v reakci tvorby molekuly enzymu, tak v hydrolýze substrátu. Nukleofilita hydroxylové nebo thiolové skupiny těchto zbytků je posílena v obecné katalýze N-terminálními částmi molekuly. V PGA je N-koncovým nukleofilním zbytkem Ser β 1 s nukleofilitou k O γ zesílenou jeho aminoskupinou. Tato superrodina enzymů sdílí kromě

procesu vzniku také podobnou terciální strukturu (McLanahan, 2011; Rajendhran a Gunasekaran, 2004; Barends et al., 2004; Chandel et al., 2008; Giordano et al., 2006). Určení struktury penicilin G acylasy pomohlo ke zvýšení používání tohoto enzymu v enzymových výrobních procesech. Struktura mohla být použita k odvození dalších β -laktamových antibiotik a změnám enzymu, jenž by produkoval jiná antibiotika, pro která ještě nebyla vyvinuta rezistence. Pro vytváření mutantů PGA se zvýšenou úrovní produkce tohoto enzymu bylo nutné znát způsob, jakým se amino- β -laktamy a antibiotické produkty váží na acylenzym. Bohužel vazebná kapsa pro β -laktamová jádra nešla jasně odlišit v krystalové struktuře wild-typu PGA. Byly však vytvořeny krystalové struktury se substrátem, což vedlo k návrhům mutací aktivního místa PGA (Barends et al., 2004). Většina struktur byla získána rengenostрукturní analýzou (většinou za přítomnosti ligandu). Nelze však vytvořit enzym- β -laktamové komplexy, protože rozpustnost β -laktamového jádra je podobná s rozpustností PGA, takže jejich kokrystalizace je neproveditelná stejně jako namáčení proteinových krystalů s těmito jádry. Obejít tento problém lze vyřešit namáčením krystalů z neaktivních mutantů (získaných řízenou mutagenezí) s např. penicilinem nebo přírodního enzymu s modifikovaným inertním substrátem. Byly studovány wild-typy i mutanti enzymu (Giordano et al., 2006).



Obr.4 Struktura penicilin acylasy z inaktivního mutantu *E. coli* v komplexu s penicilinem. Penicilin je znázorněn čárkami a kuličkami (Barends et al., 2004).



Obr.5 Charakteristická struktura N-koncových nukleofilních hydrolas se serinem v aktivním místě znázorněném čárkami a kuličkami (McLanahan, 2011).

Zralý PGA je 86 kDa heterodimer s podjednotkou α (209 aminokyselin) a β (557 aminokyselin), které jsou vázány těsně u sebe nekovalentními silami. Dva řetězce tvoří pyramidální strukturu, kde uvnitř pyramidy je hydrofóbní aktivní místo složené s několika hydrofóbních aminokyselin obou podjednotek a stává se tak velice specifickým pro fenylacetylovou skupinu penicilinu G (McLanahan, 2011). Struktury s různými substráty ukázaly jednu přibližně hydrofóbní kónickou drážku, která pojme fenylacetylové části ligandů. Více aminových zbytků leží v otevřené části drážky a jsou obklopeny několika polárními aminokyselinovými zbytky. U vazebného místa PGA bylo zjištěno, že se skládá ze tří hlavních oblastí, které jsou zodpovědné za rozeznání ligandu: katalytický zbytek Ser β 1, oxyanionový otvor (stabilizuje negativní náboj, který je na karboxylové skupině ligandu) tvořený Gln β 23, Ala β 69, Asn β 241 a hydrofóbní kapsa, která je schopná pojmout lipofilní skupiny (Massoliny et al., 2008). Místně specifická mutace PGA umožnila identifikaci důležitých aminokyselin v reakci enzymu a vazbě substrátu Tab.4 (Rajendhran a Gunasekaran, 2004). Krystalová struktura Asn β 241 Ala oxyanionové díry mutantního enzymu byla určena v nativní formě a v komplexu s penicilinem G a penicilin G sulfoxidem. Asn β 241 má důležitou roli v udržování geometrie aktivního místa a k vazbě substrátu. Proto byla vytvořena struktura wild-typu enzymu s pomalu zpracovávajícím se substrátem (penicilin G sulfoxidem) (McVey et al., 2001). Aktivní místo PGA je hluboká kapsa, která je lemována hlavně zbytky aromatických aminokyselin a hydrofóbních postranní řetězců, které jsou zapojené do vazby substrátu (Obr.6). Tyto hydrofóbní zbytky tvoří místo pro navázání acylové skupiny a jsou hlavní příčinou substrátové specifity PGA. Vazba substrátu způsobuje konformační změny stericou interakcí mezi substrátem a Phe α 146, která posunuje enzym do otevřené konformace s nižší energií. Konformační změna se týká posunutí zbytků Phe α 146 a Arg α 145 od aktivního místa asi o 3Å a

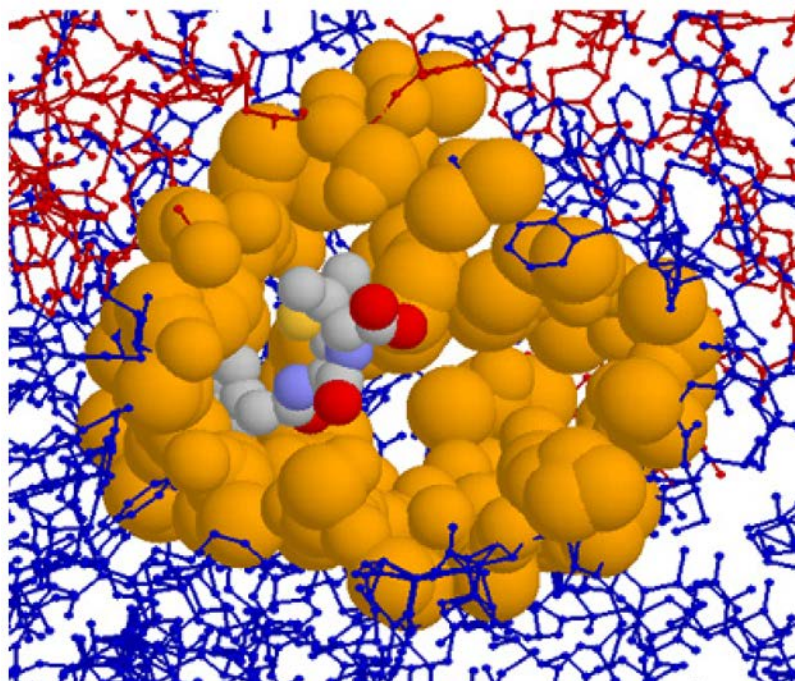
8Å. Vazba penicilinu G tedy probíhá přes mechanismus, který rozšíří ústí a otevře tak aktivní místo. Kromě toho, důležitou roli v navázání substrátu hrají také aromatické zbytky Phe β 71 a Phe α 146, které jsou spojené s iontem vápníku typickou koordinační geometrií. Enzym využívá vápenatých iontů vázaných na okraji aktivního místa k pomoci při vytváření struktury vazebné kapsy. Zbytky řetězce β (Phe71, Asp73, Val75 a Asp76), které koordinují vápenatý ion, jsou součástí regionu β -smyčky. Tento vápenatý ion drží obě podjednotky u sebe. Phe α 146 se nachází na začátku smyčky, která se rozšiřuje i na Glu α 152 a přispívá prostřednictvím α -řetězce ke koordinaci vápenatého iontu (Obr.7) (McVey et al., 2001; McLanahan, 2011). Substrát se váže s Phe β 24, Ser β 67 a Phe β 57 vodíkovou vazbou (Obr.8). V katalýze penicilinu G hrají klíčovou roli asparaginové zbytky. Katalyticky významné aminokyseliny jsou uvedeny v Tab.5. Zbytek Ser β 1 na N-konci β řetězce v aktivním místě funguje nejen jako nukleofil, ale i jako katalytická báze pro zvýšení nukleofility. Nukleofilita N-koncového Ser β 1 je zesílena také vlastní α -aminoskupinou a je posunuta Asn β 241 a tvoří tak katalytický potenciál serinového zbytku (McLanahan, 2011). Tetrahedrální meziproduct je stabilizován interakcí s amidy hlavního řetězce Gln β 23, Ala β 69 a s N $^{\circ}$ Asn β 241 a vytváří oxyanionovou díru. Vazebné místo substrátu bylo identifikováno pomocí přítomnosti reakčních produktů. PAA se váže v přesně definované kapse tvořené oběma podjednotkami enzymu. Tato kapsa odpovídá S1 místu u proteinas. Komplex s PAA byl výsledkem namáčení krystalu s penicilin G sulfoxidem (PGSO), který byl popsán jako nehydrolyzovatelný substrátový analog pro PGA. Ve skutečnosti je PGSO špatný substrát pro PGA s aktivitou menší než 1 % oproti PG. Pouze chemický rozdíl mezi PG a PGSO je v oxidaci atomu síry thiazolidinového kruhu a PGA má srovnatelnou afinitu k oběma těmito substrátům. Oxidace síry je zodpovědná za dramatický pokles enzymové aktivity bez ztráty afinity. Strukturální a kinetické studie s různými analogy PAA vedly ke dvěma modelům vazby ligandů. Jednou je silná vazba molekul, která je stejná jako u PAA a druhou je vazba analogů s jejich fenylovými skupinami, kdy dojde k posunutí o 1 Å a tudíž k žádnému kontaktu s oxyanionovou dírou. Navíc pozice těchto ligandů byla spojena s pohybem Arg α 145 and Phe α 146. Tyto dva zbytky leží na konci 16tiaminokyselinového zbytku α -šroubovice (α 131 – α 146) přerušenu uzlem ($\phi = 116^{\circ}$ a $\psi = 65^{\circ}$) mezi zbytky Met α 142 a Ala α 143, které jsou umístěny na zadní straně S1 specifické kapsy. Uzel destabilizuje konec šroubovice, což způsobuje dvě energeticky výhodné konformace. Pohyb těchto zbytků spojený se slabou vazbou ligandu způsobí omezené rozbalení šroubovice, tzv „coil“ (cívka) konformaci odlišnou od šroubovicové konformace u PAA. Některé zbytky kolem aktivního místa vykazují v pozicích značnou flexibilitu. Enzymová aktivita může být tedy dána těmito alternativními konformacemi (McVey et al., 2001).

Tab.4 Efekt místně řízené mutace na zpracování a aktivitu PGA (Rajendran et al., 2004).

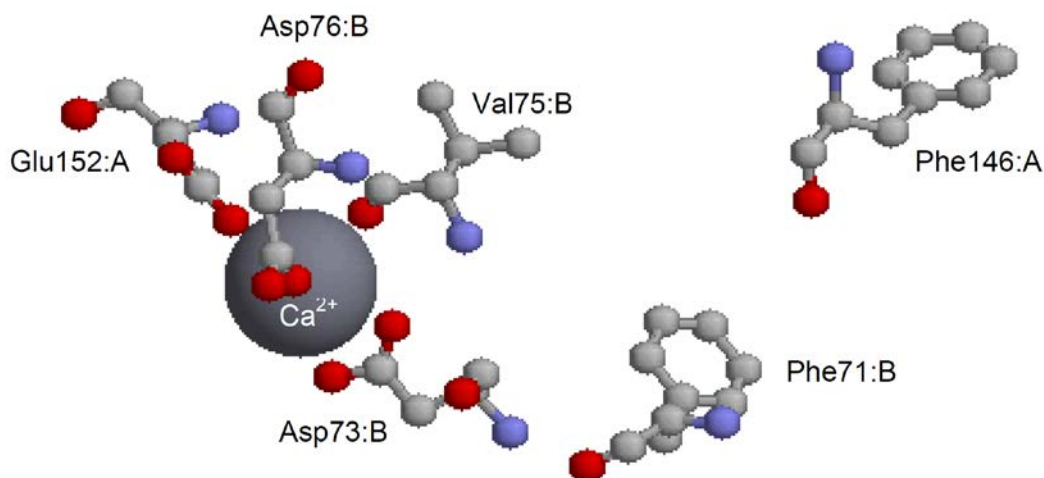
Mutantí PGA	Efekt (y)
<i>E. coli</i>	
A235P	akumulace meziprojektu, normální aktivita
A236P	akumulace meziprojektu, normální aktivita
T289S	pokles účinnosti procesu, zachování 85 % aktivity
T289G	akumulace prekursoru ve velkém množství, zachování 20 % aktivity
T289C	pokles účinnosti procesu, zachování 92 % aktivity
S290T	žádné zpracování
S290R	žádné zpracování
S290G	žádné zpracování
S290C	normální zpracování, žádná aktivita
G359D	schopnost hydrolyzovat ftalyl-L-leucin jako nový substrát, ale neschopnost hydrolyzovat penicilin G
K299H	snížené zpracování, zachování 10 % aktivity
K299S	žádné zpracování
K299Q	žádné zpracování
F α 146A	3-násobné zvýšení afinity pro 6-APA, zvýšení poměru S/H
F α 146L	3-násobné zvýšení afinity pro 6-APA, zvýšení poměru S/H
F α 146W	4-násobné snížení poměru S/H
F α 146Y	snížení hodnoty K_m v hydrolýze NIPAB, 40-násobné snížení poměru S/H
R α 145L	3-násobně vyšší K_m v hydrolýze NIPAB, zvýšení poměru S/H
R α 145C	6-násobně vyšší K_m v hydrolýze NIPAB, zvýšení poměru S/H
R α 145K	2-násobně vyšší K_m v hydrolýze NIPAB, zvýšení poměru S/H
N β 241A	narušené zpracování, žádná aktivita
F β 24L	vyšší K_m v hydrolýze NIPAB, zvýšení poměru S/H
F β 24A	vyšší hodnota K_m v hydrolýze NIPAB, zvýšení poměru S/H
R β 263I	akumulace proPGA prekursoru v periplasmě
R β 263L	akumulace proPGA prekursoru v periplasmě, vyšší K_m v hydrolýze NIPAB
R β 263N	akumulace proPGA prekursoru v periplasmě, vyšší K_m v hydrolýze NIPAB
R β 263K	50 % akumulace pro PGA, vyšší K_m v hydrolýze NIPAB
F β 71C	zvýšení specifické aktivity pro glutaryl-L-leucin
F β 71L	zvýšení specifické aktivity pro glutaryl-L-leucin
<i>K. citrophila</i>	
M168A	snížení specifity pro penicilin G
M168V	změna z α šroubovice na β list, snížení specifity pro penicilin G
G310E	akumulace prekursoru v periplasmě
S290C	žádná aktivita
F360V	možnost hydrolýzy adipyl-L-leucinu, ztráta 90 % aktivity v hydrolýze penicilinu G
<i>P. rettgeri</i>	
M α 140L	zvýšení specifické aktivity pro 6-bromohexanamid

<i>B. megaterium</i>	
Kβ427A	vyšší stabilita v organických rozpouštědlech
Kβ430A	vyšší stabilita v organických rozpouštědlech a vyšší termostabilita
Kβ427A/ Kβ430A	vyšší stabilita v organických rozpouštědlech a vyšší termostabilita

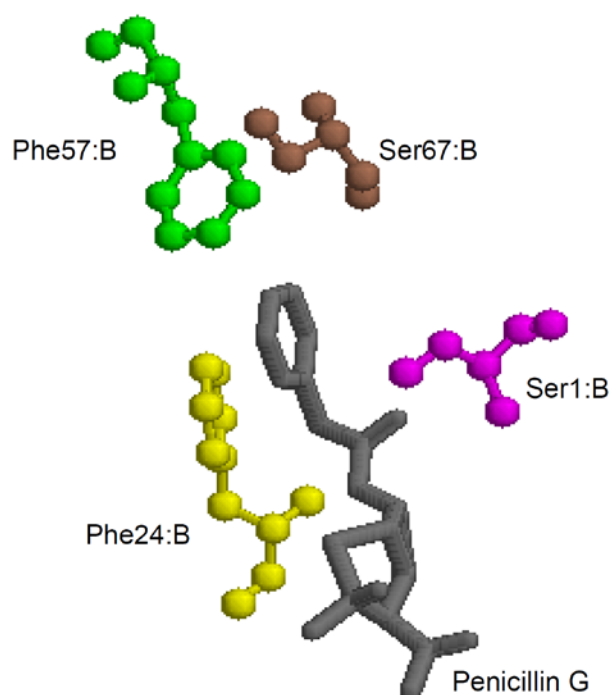
NIPAB = 2-nitro-5-[(fenylacetyl)amino]benzoová kyselina, chromogenní substrát pro PGA



Obr.6 Struktura PGA s penicilinem G v hydrofóbní vazebné kapse (oranžová) (McLanahan, 2011).



Obr.7 Důležité zbytky při koordinaci Ca^{2+} iontu (McLanahan, 2011).



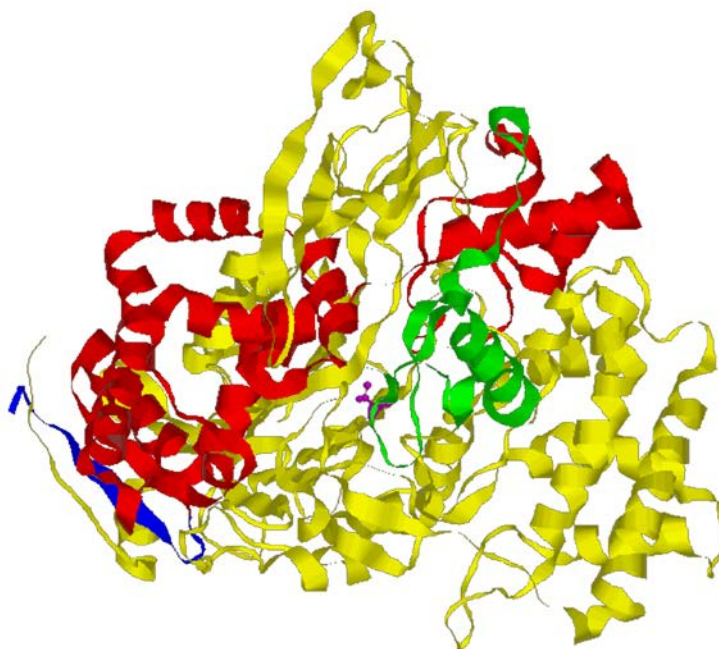
Obr.8 Důležité zbytky vázající substrát Phe β 24, Phe β 57 a Ser β 67 a katalytický Ser β 1 v komplexu s penicilinem G v aktivním místě PGA (McLanahan, 2011).

Tab.5 Katalyticky důležité aminokyselinové zbytky u PGA (McLanahan, 2011).

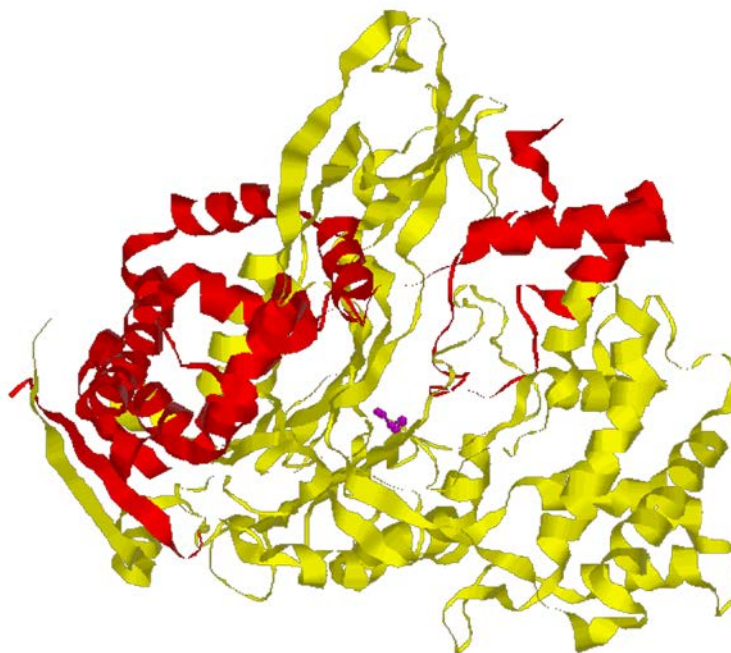
Nukleofil	Blízko nukleofilu	Blízko N α	Oxyanionová díra	Vazba substrátu	Koordinace Ca $^{2+}$ ionu
Ser β 1	Gln β 23	Asn β 241 Gln β 23	Ala β 69 Asn β 241 Gln β 23	Phe β 24 Phe β 57 Ser β 67	Phe β 71
					Asp β 73
					Val β 75
					Asp β 76
					Phe α 146
					Glu α 152

Popis struktury je věnován inaktivnímu PGA mutantu (Asn β 241 na Ala) a jejich komplexům s PG a PGSO a struktuře wild-typu PGA ve vysokém rozlišení 1,3 Å a jeho komplexu s PGSO. Při mutaci Ser β 1 byl produkován inaktivní enzym. Jeho výměna za Ala vedla k akumulaci prekurzoru. Asn β 241 je součástí oxyanionové díry, kde vyrovnává negativní náboj tetrahedrálního meziprojektu. Mutace Asn β 241 za Ala měla na proces malý vliv, ale snížila katalytickou aktivitu o čtyři řády, která byla měřena pomocí chromogenního substrátu N-(3-karboxy-4-nitrofenyl)fenylacetamidu. Struktura těchto mutantů byla srovnána se strukturou wild-typu (McVey et al., 2001). Na Obr.9 a 10 je zobrazena struktura jak proenzymu tak PGA. Prekurzor (Obr.9) je tvořen 4 zřetelnými částmi: signální sekvence s 26 aminokyselinami, α -podjednotka (α 1 - α 209), spojovací peptid (zbytky 210 – 263) a β -podjednotka (β 1 – β 557).

Studium prekurzorů ze čtyř gram negativních a dvou gram pozitivních bakterií ukázalo, že Ser290 je plně konzervován. Mezi druhy je silně konzervován Lys β 299, včetně PGA z *E. coli* W. Lys299 a Ser290 jsou kritické zbytky pro autokatalytický proces prekurzoru PGA. Jsou také pravděpodobně zodpovědné za pH závislou aktivaci autokatalytického procesu v periplasmě (McLanahan, 2011).



Obr.9 Sekundární struktura prekurzoru PGA. Signální sekvence je zobrazena modře, sekvence linkeru zeleně (blokující aktivní místo) a sekvence aminokyselin α podjednotky červeně a β podjednotky žlutě. Zbytek v aktivním místě (Ser β 1) je zbarven červenofialově (McLanahan, 2011).



Obr.10 Struktura zralé PGA zobrazující α podjednotku červeně a β podjednotku žlutě. Zbytek v aktivním místě (Ser β 1) je zbarven červenofialově (McLanahan, 2011).

Krystalová struktura z *E. coli* byla získána v rozlišení 1,3 Å. V nedávné době byla určena také PGA z *Providencia rettgeri* s rozlišením 2,5 Å. Struktura wild-typu PGA (WT) byla určena z monoklinické krystalové formy za přítomnosti ethylenglykolu, kdy docházelo k lepší difrakci než u triklinické formy. Údaje potřebné pro rozlišení 1,3 Å byly získány z jediného krystalu při 100 K. Vyšší rozlišení umožnilo určit dvě překrývající se podkonformace pro postranní řetězce Phe β 71 a Phe α 146. Tyto aromatické zbytky a jejich dvě pozice hrají významnou roli ve vazbě substrátu a přítomnost alternativních souvisejících konformací ukazuje na vlastní flexibilitu a koordinovaný pohyb mezi těmito dvěma zbytky. I když jsou tyto fenylalaninové zbytky β 71 a α 146 umístěny na jiných podjednotkách, je mezi nimi strukturální vazba pomocí vápenatého ionu s typickou koordinační geometrií. Krystalová struktura nevazebného mutanta (MUT) je velmi podobná WT. Alaninová mutace na pozici β 241 však způsobuje konformační změny v jeho okolí. Zejména postranní řetězce Arg α 145 a Phe α 146 jsou ve dvou alternativních konformacích odpovídajících nevazebnému šroubovicovému tvaru wild-typu ve 30% a „coil“ formě ve 70%. Krystalová struktura mutanta Asn β 241 Ala v komplexu s PG (MUT-PG) je v podstatě totožná s WT a MUT. Výrazná odlišnost je pouze v elektronové hustotě kapsy aktivního místa. Vazba PG indukují pohyb Arg α 145 a Phe α 146 do „coil“ formy. Tato změna tvaru vede ke ztrátě van der Waalsových vazeb mezi fenylacetylovou skupinou PG a postranním řetězcem Phe α 146. Aktivní místo O γ nukleofilního Ser β 1 leží 3,3 Å od uhlíku karbonylu (C15) penicilinu G. Je tak příliš vzdálené pro katalytickou interakci a je to okolo 0,5 Å dále než odpovídající vzdálenost v PAA komplexu. Výsledkem je, že se PG posune více ven z aktivního místa. Struktura mutanta v komplexu s PGSO (MUT-PGSO) má podobnou elektronovou hustotu v aktivním místě jako u

komplexu s PG. Struktura obsahuje jen malé změny v konformaci a vazbě proteinů. Důležitým prvkem u MUT-PGSO je přítomnost vnitřní vodíkové vazby mezi O5 atomem PGSO přes vrchol penamového kruhu k dusíku amidu. U PGSO komplexu, stejně jako u komplexu s PG, je u $\alpha 142$ a $\alpha 146$ viděna pouze „coil“ konformace. Struktura WT PGA v komplexu s PGSO (WT-PGSO) poskytla nejvíce informací o mechanismu enzymu. Ve srovnání s MUT-PGSO je fenylnacetyl posunut 0,5 Å do kapsy, do polohy podobné jako u PAA v triklinické formě komplexu. O^γ Serβ1 je vzdálen 2,9 Å od uhlíku karbonylu substrátového analoga a ideálně umístěn pro nukleofilní atak. Kromě toho kyslík (O17) karbonylu vytváří 2,6 Å vodíkovou vazbu s O^γ Serβ1 a β-laktamový kyslík vytváří vodíkovou vazbu s α-aminoskupinou Serβ1. Na rozdíl od inaktivních mutantních komplexů je pozice Argα145 a Pheα146 stejná jako u ne vazebného WT enzymu. Je možné, že se aktivní místo musí otevřít, aby umožnilo přístup objemnému substrátu, než se uzavře pozice substrátu pro katalýzu z „coil“ na šroubovicovou konformaci. Stejně jako u MUT-PGSO jsou i zde přítomné intramolekulární vodíkové vazby. Tyto vodíkové vazby mohou být klíčem k nízké aktivitě při navázání PGSO (McVey et al., 2001).

PGA z kmene *Achromobacter* sp. CCM 4824 se skládá ze dvou různých podjednotek (α a β), které mají molekulovou hmotnost 27,0 a 62,4 kDa. N-koncová sekvence aminokyselin β podjednotky je (SNMWIVGRDHAKDARSILLN) a vnitřní aminokyselinová sekvence α podjednotky je (YGYGYAVAQDRLFQMEMAR). Různé velikosti jednotek jsou patrné z Tab.6. Na Obr.11 jsou vidět aminokyselinové sekvence u různých mikroorganismů. Vnitřní aminokyselinová sekvence α podjednotky tohoto enzymu obsahuje 19 aminokyselin a je z 95 % identická se sekvencí u *A. faecalis*, *E. coli*, *K. citrophila* a *P. rettgeri*. N-koncová sekvence aminokyselin β podjednotky je pouze v 55 % identická s PGA u *P. rettgeri* a jen 50 % identická s PGA z *E. coli* a *K. citrophila* (Škrob et al., 2003).

Tab.6 Srovnání molekulových hmotností podjednotek PGA z *Achromobacter* sp. s dalšími publikovanými penicilin G acylasami (Škrob et al., 2003).

Bakterie	Vlastní enzym (kDa)	α podjednotka (kDa)	β podjednotka (kDa)
<i>Achromobacter</i> sp.	89,4	27,0	62,4
<i>A. faecalis</i>	85,7	23,0	62,7
<i>A. viscosus</i>	85,7	24,3	61,4
<i>B. megaterium</i>	85,6	24,2	61,4
<i>E. coli</i>	86,0	23,8	62,2
<i>K. citrophila</i>	85,2	23,6	61,6
<i>P. rettgeri</i>	85,8	23,7	62,1

	Internal sequence of α subunit		N-terminal sequence of β subunit		
<i>Achromobacter</i> sp.		YGYGYAVAQDRLFQMEMAR		SNMWIVGRDHAKDARSILLN	
<i>A. faecalis</i>	53	YGYGYAVAQDRLFQMDMAR	71	266 SNLWSTRPERVQEGSTVLIN	285
<i>A. viscosus</i>	54	EAYGYVMAKDRLFQLEMFR	72	266 SNAAIVGSEKSATGNALLFS	285
<i>B. megaterium</i>	54	EAYGYVMAKDRLFQLEMFR	72	266 SNAAIVGSEKSATGNALLFS	285
<i>E. coli</i>	55	YGYGYVVAQDRLFQMEMAR	73	290 SNMWVIGKSKAQDAKAIMVN	309
<i>K. citrophila</i>	55	YGYGYVVAQDRLFQMEMAR	73	290 SNMWVIGKKNKAQDAKAIMVN	309
<i>P. rettgeri</i>	50	YGYGYAVAQDRLFQMEMAK	69	285 SNVWLVGKTKASGAKAILLN	304

Obr.11 Srovnání aminokyselinových sekvencí penicilin G acylas z *Achromobacter* sp.

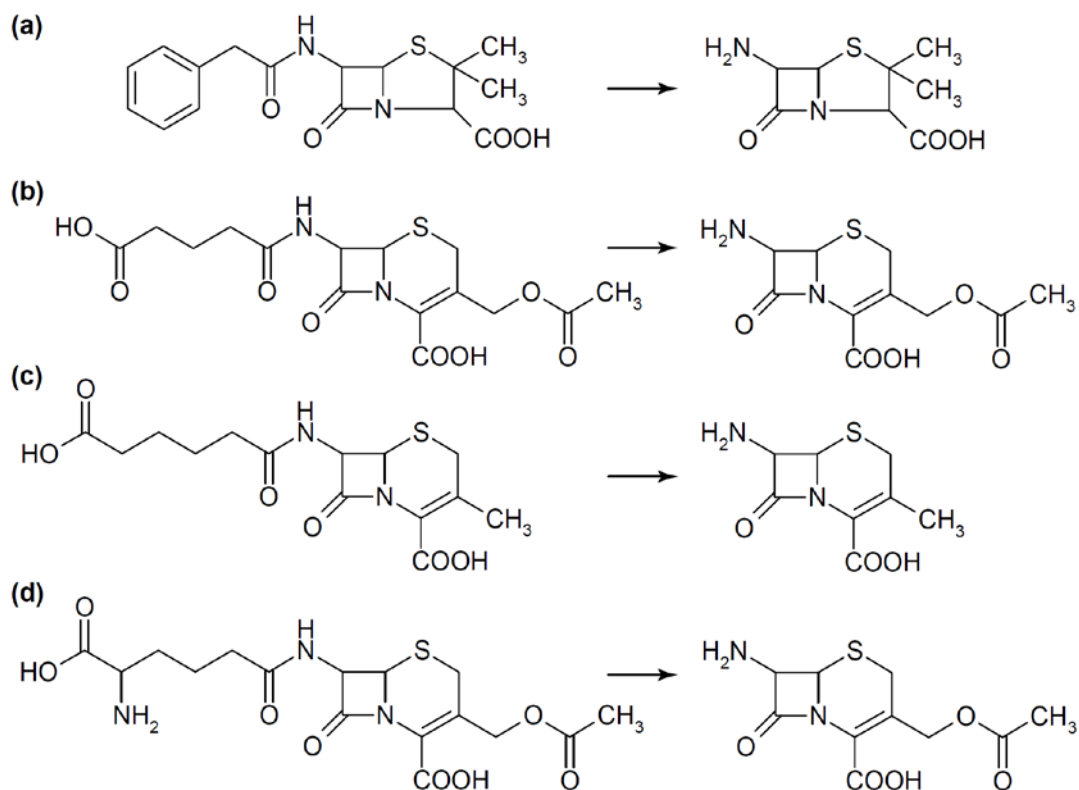
s dalšími publikovanými penicilin G acylasami. Aminokyselinové sekvence ostatních jsou k nalezení na NCBI-Entrez databázi pod kódy: *A. faecalis*, AAD11517; *A. viscosus*, AAA22077; *B. megaterium*, AAD45609; *E. coli*, AAB71221; *K. citrophila*, A26528; *P. rettgeri*, A56681. Tučné písmo označuje identické aminokyseliny. Číslování sekvence začíná prvním methioninem prekursoru enzymu (Škrob et al., 2003).

Krystalografické studie ukazují, že hlavními faktory, které řídí interakce PGA s ligandy, jsou nepolární vazby a konformační vlastnosti PGA. Aromatické zbytky v aktivním místě jsou hlavními přispěvateli v rozeznávání a vazbě substrátu. Konformace Arg α 145, Phe α 146 a Phe β 71 jsou flexibilní a mohou zaujímat jiné pozice v závislosti na substrátu. Vzájemný vztah mezi pohybem Phe α 146 a Phe β 71 a přechod mezi šroubovicovou a „coil“ konformací může být důležitý pro přístup substrátu do specifické kapsy, jejíž hrdlo je zúžené Phe α 146. Souhra vazby ligandu a konformačních změn naznačuje, že tento mechanismus může být také zapojen při procesu zrání enzymu (McVey et al., 2001).

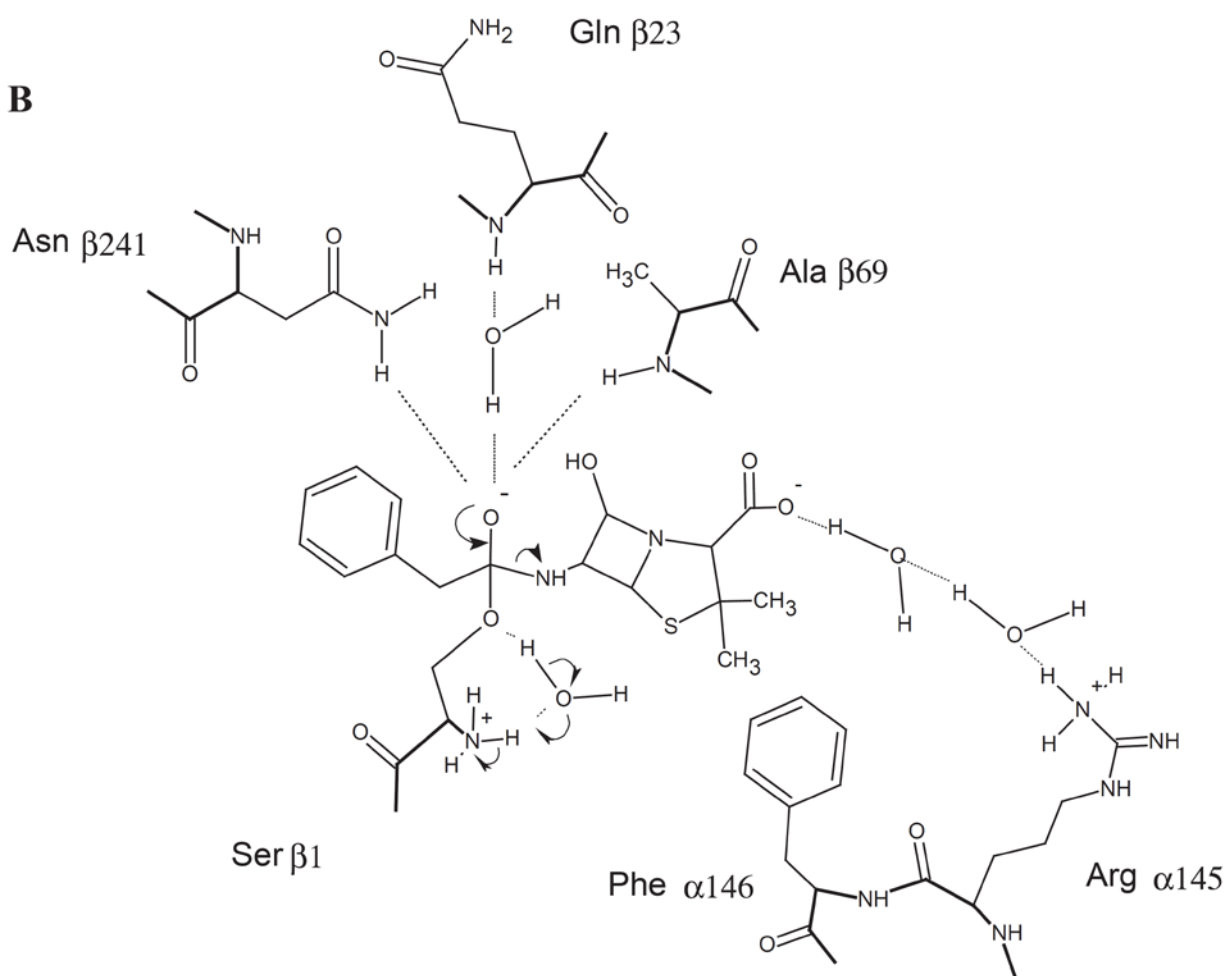
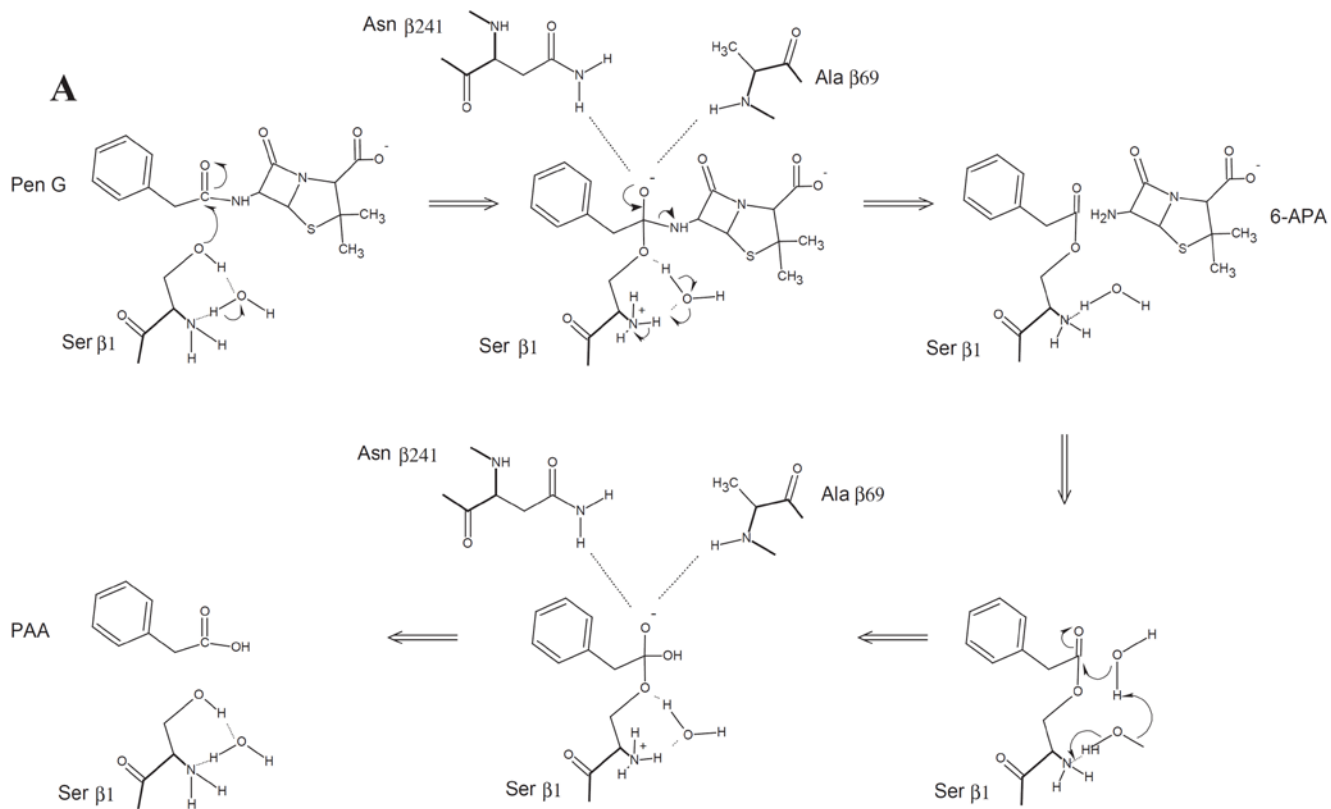
3. 1. 2. 3. Chemické reakce penicilin G acylasy

PGA může reagovat jako transferasa nebo hydrolasa (Giordano et al., 2006). Hydrolýza β -laktamů je zobrazena na Obr.11 (Sio a Quax, 2004). Reakční mechanismus zahrnuje vytvoření kovalentního meziprojektu a je podobný známému mechanismu serinproteas (Rajendhran a Gunasekaran, 2004). Katalytickou aminoskupinou je Ser β 1, který nukleofilně atakuje penicilin G na karbonylové skupině amidové vazby mezi fenyloctovou kyselinou a 6-APA β -laktamovým jádrem, což vede ke zformování acylenzymu. Asn241 β podjednotky stabilizuje meziprojekt. Acylenzym je poté hydrolyzován a výsledkem je fenyloctová kyselina a regenerované aktivní místo. Hlavní rozdíl oproti mechanismu serinových hydrolas je nedostatek běžné acidobazické katalýzy, způsobené přilehlým histidinem při formování meziprojektu. pH ovlivňuje katalytické vlastnosti PGA. K hydrolýze dochází v rozsahu pH 7 - 8,5, zatímco pH 5 - 6 podporuje acylaci (Liljeblad a Kanerva, 2006; Barends et al., 2004). Mechanismus PGA začíná nukleofilním atakem N-koncovou O γ hydroxylovou skupinou Ser β 1 zbytku na uhlík karbonylu

peptidové vazby substrátu (asi 3,1 Å od sebe), což má za následek vznik oxyaniontu (tetrahedrálního transitního stavu). Oxyaniontová forma je stabilizována vodíkovou vazbou negativně nabitého kyslíku meziprojektu se zbytky oxyaniontové díry (McLanahan, 2011). V průběhu hydrolyzy penicilinu po nukleofilním ataku $O\gamma$ vzniká acylenzymový meziprojekt (Obr.12(A)). Výsledný oxianion může být stabilizován $N\delta$ Asn β 241, který tvoří NH páteř Ala β 69 a Gln β 23 (Obr.12(B)). Páteřní kyslík Gln β 23 vytváří vodíkovou vazbu, přes molekulu vody, s karbonylovým kyslíkem PAA. Po navázání fenylacetamidových derivátů na PGA z *E. coli* dochází na molekule enzymu ke konformačním změnám. Jsou zde dvě skupiny. První, kdy konformace nativní proteinové struktury zůstává zachována (sem patří i PAA) a druhá, kdy ligand způsobí konformační změnu Arg α 145 a Phe α 146, které hrají významnou roli v interakci s β -laktamovým jádrem, se posunou směrem k rozpouštědлу. Tyto dva zbytky leží na konci α -šroubovice tvořené 16 aminokyselinami (α 131- α 146), která je prakticky neovlivněna jejich velkým pohybem. Penicilin G tak způsobuje přechod Arg α 145 a Phe α 146 k otevřené konformaci. Arg α 145 vyčnívá 8 Å směrem k rozpouštědлу, ale je stále schopen interagovat s karboxylovou skupinou jádra pomocí dvou přemostěných molekul vody (Obr.12(B)). Vznik acylenzymové komplexu požaduje, aby byl Ser β 1 deprotonovaný (Obr.12(A)). Při hydrolyze penicilinu je použito pH okolo 8. I přesto je optimální pH pro syntézu antibiotik z acyl esterů mezi 6,0 a 6,5, protože selektivita stoupá s klesajícím pH, ale zároveň klesá produktivita. Rozpustnost β -laktamů však stoupá s pH, což je obtížnější při krystalizaci produktu (Giordano et al., 2006). Kolaps tranzitního stavu vyústí ve formování acylenzymu a současně je první produkt (PAA) uvolněn z aktivního místa. Acylenzymový meziprojekt je poté hydrolyzován nukleofilním atakem vody a skrz podobný transitní stav, je z aktivního místa uvolněn druhý produkt (6-APA) a enzym je regenerován (McLanahan, 2011). U PGA z kmene *Achromobacter* sp. CCM 4824 byla maximální hydrolytická aktivita enzymu naměřena v pH 7,5 a při 60 °C. Tento enzym má oproti penicilinu G dvojnásobnou hydrolytickou aktivitu pro ampicilin, amoxicilin a cefalexin (Škrob et al., 2003). PGA může být také použita k výrobě polosyntetického antibiotika, kdy enzym katalyzuje kondenzaci acylové skupiny a 6-APA molekuly. V této kondenzační reakci, aktivovaný acylový donor (amid nebo methylesterový derivát PAA) acyluje enzym na serinu v aktivním místě za uvolnění amoniaku nebo methanolu. Výsledný acylenzym je deacetylován β -laktamovým nukleofilem jako 6-APA nebo 7-ADCA a dává tak polosyntetický penicilin nebo cefalosporin. Acylenzym může také reagovat s molekulou vody a být hydrolyzován. Pro zvýšení produkce antibiotik je nutné tuto vedlejší hydrolytickou reakci snížit. Kromě těchto hlavních reakcí je PGA také schopen hydrolyzovat fenylacetylové deriváty mnoha peptidů a rozlišit organické sloučeniny (Rajendhran a Gunasekaran, 2004; Barends et al., 2004).



Obr.11 Hydrolyza β -laktamových fermentačních produktů acylasami β -laktamů. (a) penicilin G je hydrolyzován PGA na 6-APA. (b) Glutaryl-7-ACA je hydrolyzován cefalosporinacylasou na 7-ACA. (c) Adipyl-7-ADCA je hydrolyzován mutanty cefalosporinacylasy na 7-ADCA. (d) CPC je hydrolyzován mutanty cefalosporinacylasy na 7-ACA (Sio a Quax, 2004).



Obr.12 Pravděpodobný mechanismus hydrolýzy penicilinu G. (A) Uhlíkový atom karbonylu amidové vazby je atakován Ser β 1 a přes tetrahedrální tranzitní stav je formován kovalentní acylenzym. Tetrahedrální tranzitní stav je stabilizován vodíkovými vazbami k Asn β 241 and Ala β 69. Poté dojde k uvolnění 6-APA. Acylenzym je atakován vodou, kde se stejným mechanismem formuje druhý tetrahedrální meziprodukt, který je stabilizován stejnými vodíkovými vazbami. Nakonec se tetrahedrální meziprodukt rozpadne a uvolní tak PAA. Čárkované čáry reprezentují možné vodíkové vazby. (B) Schéma zprostředkovaného kroku hydrolýzy penicilinu G. Obrázek znázorňuje interakci Arg α 145 s karbonylovou skupinou β -laktamové části molekuly. Tučné čáry znázorňují páteř enzymu (Rajendhran a Gunasekaran, 2004; Giordano et al., 2006).

3. 1. 2. 4. Substrátová specifita

Klasifikace penicilin acylas je založena na jejich substrátové specifitě. Typ I (penicilin V acylasa (PVA)) upřednostňuje hydrolýzu fenoxymethylpenicilinu (penicilin V). Typ II (penicilin G acylasa (PGA)) převážně reaguje s benzylpenicilinem (penicilin G) a typ III (ampicilin acylasa) hydrolyzuje ampicilin (D- α -aminobenzylpenicilin) (Rajendhran a Gunasekaran, 2004). Tento enzym má acyl vazebné místo, které pojme skupiny a deriváty fenylactové kyseliny a nukleofil-vázací místo, které může vázat 6-APA, 7-ACA nebo jiné nukleofily. Substrátová specifita je určena především acylovou částí molekuly substrátu a je tedy přičítána řetězci s místem pro laktam a ne rozdílům mezi 6-APA pětičlenným a 7-ACA šestičlenným kruhem. Termín acylasa je používán přednostněji než termín amidasa. Enzym je schopen hydrolyzovat širokou škálu amidů (R-CO-NH-R'), kdy preferuje, když je R hydrofóbní, zatímco R' může být různé. Skupina opouštějící substrát má minimální vliv na rychlost hydrolýzy. Penamový kruh může být nahrazen cephemovým jádrem, cukry, nukleosidy nebo aminokyselinami. Specifita k acylům u PGA je omezena na aromatické molekuly a zkoumána především se substráty obsahující fenylacetyl, fenylglycyl, mandelyl, pyridylacetyl nebo jiné arylacetylové molekuly. Tato široká substrátová specifita PGA pro fenylacetylované amidy a estery vedla k řadě využití enzymu včetně rozlišení racemických směsí a návrh nových chránících skupin peptidu (McVey et al., 2001; Massoliny et al., 2008). Trojrozměrná struktura enzymu ukazuje kapsu pro navázání fenylactové skupiny, ale enzym může vázat také další sloučeniny díky konformačním změnám týkajících se především postranního řetězce s Arg α 145 a Phe α 146 (Barends et al., 2004). Substrátová specifita je obvykle závislá na α podjednotce, ale některé poslední práce uvádějí malou specifitu závislou také na β podjednotce. N-koncový fenylmethylsulfonylfluorid senzitivní serinový zbytek potřebný pro katalytickou aktivitu enzymu je obsažen v β podjednotce. Změna specifity způsobená spontánní mutací navrhla, aby další změna proběhla s amidy, které se více podobají laktamovému postrannímu řetězci z cefalosporinu C, kdy by nakonec mohly vzniknout mutantní kmeny schopné deacetylovat

cefalosporin C. Tato reakce by byla použita pro produkci 7-ACA a z této kyseliny pak dalších polosyntetických cefalosporinů. Bohužel mutant s touto aktivitou nebyl izolován (Klei et al., 1995). PGA do jisté míry také přijímá jako substráty i jiné skupiny než fenylacetyly např.: 4-pyridylacetyl a fenoxycetyl, zatímco odcházející skupiny (aminová část amidů) mohou být velmi strukturálně odlišné, což je velmi užitečné. PGA vykazuje výbornou kinetiku u β^3 - a $\beta^{2,3}$ -aminokyselin, kdy je fenylacetylová skupiny přesunuta do nebo z aminoskupiny. Na druhé straně, PGA katalyzovaná hydrolýza N-fenylacetylovaného α -methyl- β -alaninu probíhá s nízkou enantioselektivitou, což naznačuje, že β^2 -aminokyselinové deriváty jsou pro enzym méně vhodné substráty (Liljeblad a Kanerva, 2006).

3. 1. 2. 4. 1. Inhibitory

Expresa PGA in vivo je regulována koncentrací PAA. Efekt tohoto inhibitoru byl určen kompetitivním inhibičním měřením spojeným s rentgenovou krystalografií. Vazby inhibitorů na PGA lze rozdělit do dvou skupin. Mezi první skupiny patří ty, které nezpůsobují konformační změny na nativní struktuře proteinu (např. substráty obsahující trifenyloctovou kyselinu, fenylloctovou kyselinu, fenol a *p*-hydroxyfenylloctovou kyselinu) a mezi druhou skupinu ty, kdy vazbou dochází k indukované konformační změně Arg α 145 a Phe α 146 (např. substráty obsahující *m*-nitrofenylloctovou kyselinu, 3,4-dihydroxyfenylloctovou kyselinu, 2,5-dihydroxyfenylloctovou kyselinu a *p*-nitrofenylloctovou kyselinu). Ligandy patřící do první kategorie mají karboxylové skupiny v hydrofóbní kapse, zatímco ligandy patřící do druhé kategorie mají karboxylové skupiny umístěné ven k rozpouštědлу, a nutí tak ke konformační změně. Pohyb řetězců s Arg α 145 a Phe α 146 vyústí ve zlom a destabilizaci konce α -šroubovice. PAA je silný kompetitivní inhibitor ($K_i = 0.098$ mM) PGA, ale nezpůsobuje žádné výrazné konformační změny. Rozpad acylenzymu je mnohem rychlejší než rychlost jeho vzniku (McLanahan, 2011). Chování PGA z *E. coli* není jednoznačné. Antibiotika jsou inhibitorem hydrolýzy esterů a naopak. Pozitivní náboj C α -aminu zabraňuje propojení PG do nepolárního místa. Protonovaný amin způsobuje při syntéze ampicilinu nízkou afinitu enzymu k PG derivátům (Giordano et al., 2006). Chirální rozpoznávací mechanismu PGA byl zkoumán pomocí molekulárního modelování za použití (S)-2-(4-chlorofenyl)-2-fenoxycetové kyseliny. Pokud jde o (R)-2-(4-chlorofenyl)-2-fenoxycetovou kyselinu, vypočítaná pozice byla stejná jako ta, co se našla pro (S)-isomer, i když zde chyběla vodíková interakce mezi kyslíkem éteru a postranním řetězcem Arg β 263 a fenoxycetová část molekuly je ve stejné pozici jako fenylový kruh u (S)-isomeru (Haginaka, 2008). PGA z *E. coli* specificky acyluje R-enantiomer fenylglycinonitrilu s PAA (Sio a Quax, 2004). Substrátová specifita PGacylas je uvedena v Tab.7 (Škrob et al., 2003).

Tab.7 Substrátové specifity penicilin G acylas z různých mikroorganismů (Škrob et al., 2003).

Bakterie	Enzym	Relativní rychlost (%)							
		penicilin G	penicilin V	ampicilin	amoxicilin	cefalexin	DAOC G	DAOC V	NIPAB
<i>Achromobacter</i> sp. CCM 2428	PGA	100	23	197	199	190	99	19	65
<i>E. coli</i> RE3(pKA18)	PGA	100	10	51	38	61	95	6	62
<i>E. coli</i> ATCC 11105	PGA	100	7	19	n.a	n.a	n.a	n.a	48
<i>A. faecalis</i> ATCC 15246	PGA	100	12	83	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
<i>B. megaterium</i> ATCC 14945	PGA	100	0	35	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
<i>P. rettgeri</i> PCM 1384	PGA	100	13	25	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a

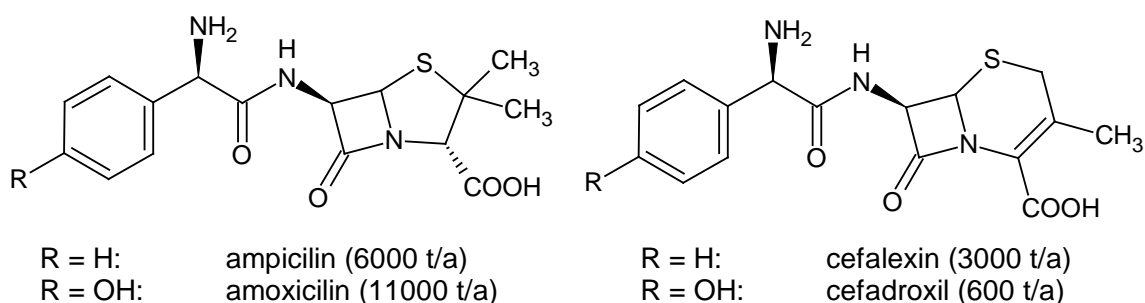
DAOC G ... deacetoxycefalosporin G; DAOC V ... deacetoxycefalosporin V; NIPAB ... 6-nitro-3-fenylacetylamidobenzoová kyselina; n.a ... nenalezeno;
Aktivita PGA měřená s penicilinem G byla brána jako 100 %.

3. 1. 3. Využití PGA v biotechnologických procesech

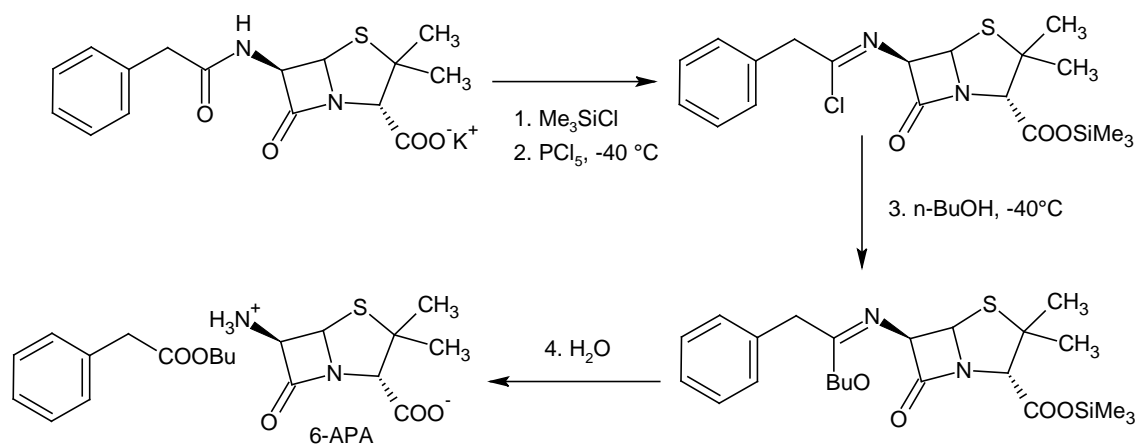
3. 1. 3. 1. Historie

β -laktamová antibiotika, mezi něž patří peniciliny a cefalosporiny, jsou široce používány k léčení infekce více než 50 let. Tyto látky jsou pro tento účel velmi vhodné, protože není žádný savčí protějšek cílený na D-alanyl-D-alaninkarboxypeptidasy nebo transpeptidasy, což jsou důležité enzymy v biosyntéze bakteriální buněčné stěny. Dlouhodobé používání β -laktamů jako antibakteriálních léků vedlo k rozšíření bakteriální rezistence k těmto lékům. Nejčastější mechanismus, kterým bakteriální kmeny získaly rezistenci, je prostřednictvím přenosu plazmidu nesoucího gen pro tuto rezistenci. Rezistentní enzymy, známé jako β -laktamasy, rychle hydrolyzují β -laktamové vazby a znemožňují tak použití těchto léků jako antibakteriálních látek. Rezistence na konkrétní a historicky efektivní β -laktamové sloučeniny může být také způsobena mutací peptidasového genu. Farmaceutické společnosti proto musí neustále vymýšlet a syntetizovat nová a efektivnější antibiotika. De novo syntéza β -laktamů je obtížná a drahá. Proto je také penicilin G acylasa cenný enzym při výrobě penicilinů (Klei et al., 1995). Polosyntetickým penicilinům a cefalosporinům (amoxicilin, ampicilin, cefalexin, cefadroxil, cefazolin a několik dalších) odpovídá asi 65% stále rostoucí celosvětové výrobě antibiotik, přesahující v roce 2000 asi 45000 tun (Giordano et al., 2006; McLanahan, 2011). Více než 10 let uplynulo od objevu antibakteriální aktivity plísně *Penicillium notatum* Alexanderem Flemingem v roce 1928, než v roce 1940 Florey a Chain izolovali penicilin G (Obr.13). Ten byl velmi rychle charakterizován a použit v klinické praxi. Poté se rozšířil do celého farmaceutického průmyslu. Bohužel se stále více bakteriálních kmenů stávalo odolným vůči penicilinu G. A tak byl penicilin G v 1960 vyřazen z klinické praxe. Naneštěstí acylace β -laktamového jádra penicilinu G (6-APA) s různými vedlejšími řetězci poskytovala nové aktivní polosyntetické peniciliny. Nejdůležitějšími z nich se staly ampicilin a amoxicilin (Obr.13), ve kterých je postranní řetězec D-fenylglycyl a D-p-hydroxyfenylglycyl. Až do roku 1985 byly tyto polosyntetické peniciliny a související β -laktamová antibiotika vyráběny pomocí chemických postupů s výjimkou penicilinu G, který byl získáván fermentací z *Penicillium chrysogenum*. Následně byl fenylacetylový postranní řetězec odštěpen pryč a výsledná 6-APA byla chráněna a kondenzována s příslušnými aktivačními a chránícími deriváty postranních řetězců. Ty byly rovněž syntetizovány klasickými metodami (Obr.14). Dokonce ještě v roce 2000 byly tyto tradiční postupy výroby β -laktamových antibiotik v průmyslovém měřítku převažující. 6-APA: Na začátku 60. let 20. století byla 6-APA vyráběna enzymovou deacylací penicilinu G za použití PGA. Oproti dnešním standardům byla metoda nepraktická a neefektivní. Vzhledem k velkým reakčním objemům byla produktivita nízká. Efektivní deacylace penicilinu G nebyla jednoduchá, protože jsou zde terciární a sekundární amidové prvky. Sekundární mohou být

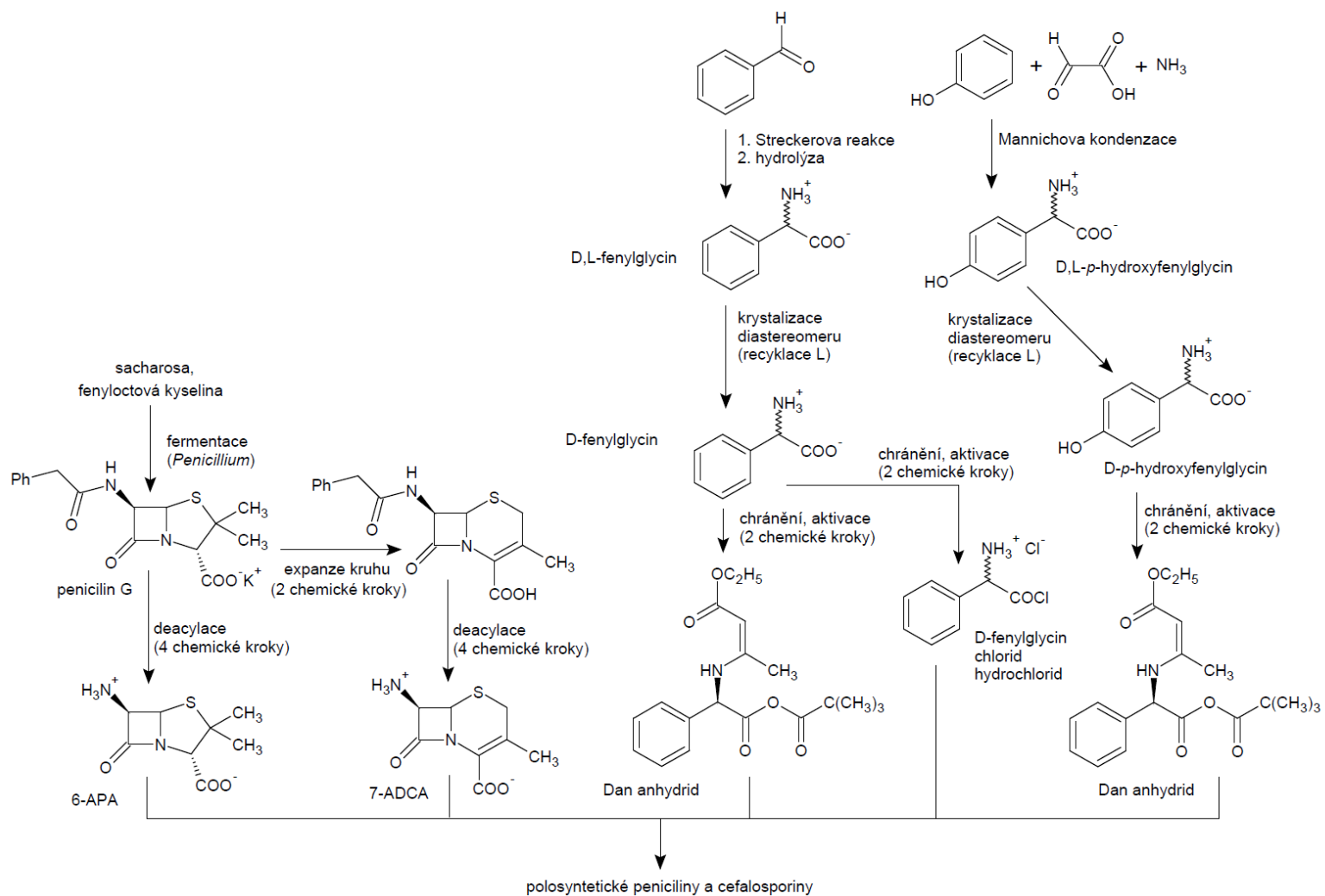
štěpeny, zatímco terciární jsou náchylnější k bazickým a nukleofilním podmínkám. Selektivní štěpení sekundární amidové vazby je možné přes transformaci na iminchlorid, použitím chloridu fosforečného v dichloromethanu a následnou hydrolýzou. Klíčovým krokem v tomto procesu je použití silylové skupiny (např. $-\text{SiMe}_3$) k chránění karboxylové skupiny penicilinu. Tato reakce je na Obr.15. Je to chemická reakce, která probíhá za nízkých teplot, je závislá na vysoce aktivních chemikáliích a produkuje velké množství odpadu. Přesto byla tato metoda velmi dlouhou dobu používána. Na začátku 60. let 20. století byla popsána termodynamicky kontrolovaná kondenzace fenylactové kys. a 6-APA pomocí PGA z *E. coli*. Bylo by tedy možné spojit 6-APA a D-fenylglycin. V roce 1963 byla poprvé uveřejněna metody výroby ampicilinu spojením 6-APA a amidu nebo esteru D-fenylglycinu pomocí PGA z *E. coli* (Wegman et al., 2001). Průmyslová výroba těchto látek začala během šedesátých a sedmdesátých let 20. století (Beecham patentoval ampicilin v 1961 a amoxicilin v 1972; Lilly cefalexin v 1970; BMS, cefadroxil v 1977). Tyto procesy potřebovaly nízkou teplotu (menší než $-30\text{ }^\circ\text{C}$), organochloridová rozpouštědla, chránění/nechránění postranních skupin a vytvářely spoustu nerecyklovatelného odpadu. Cole v roce 1969 představil možnost nahradit chemickou syntézu enzymovou a to nejlépe ve vodném prostředí a za fyziologických podmínek. Přesto má enzymová syntéza stále velkou nevýhodu. Tou je dlouhý čas související s optimalizací procesů (Giordano et al., 2006; McLanahan, 2011).



Obr.13 Čtyři nejdůležitější polosyntetické peniciliny a cefalosporiny spolu s penicilinem G (přepřacováno podle Wegman et al., 2001).



Obr.15 Chemická deacetylace penicilinu G na 6-APA (Wegman et al., 2001).

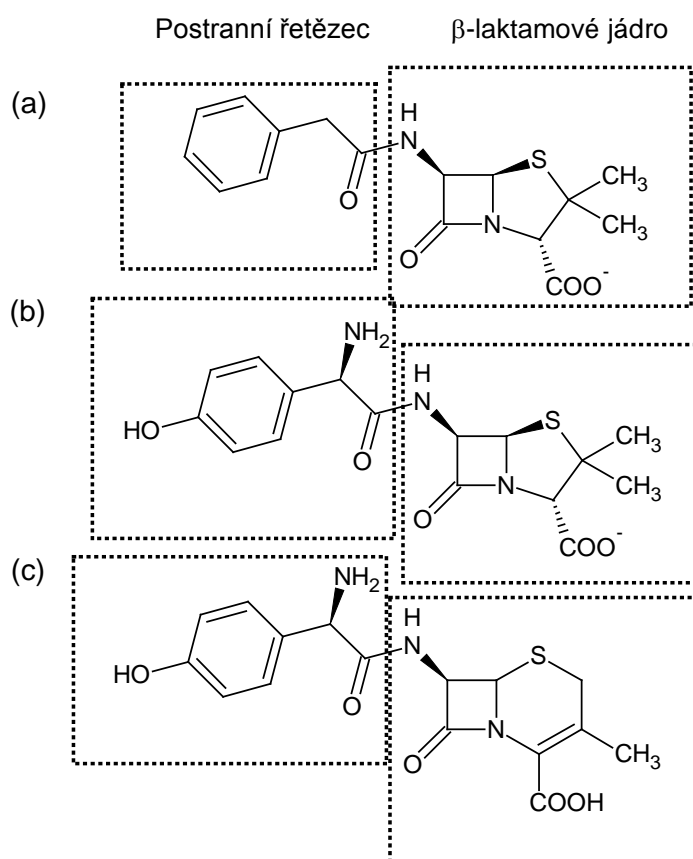


Obr.14 Přehled tradiční chemické syntézy β -laktamových antibiotik (přepřacováno podle Wegman et al., 2001).

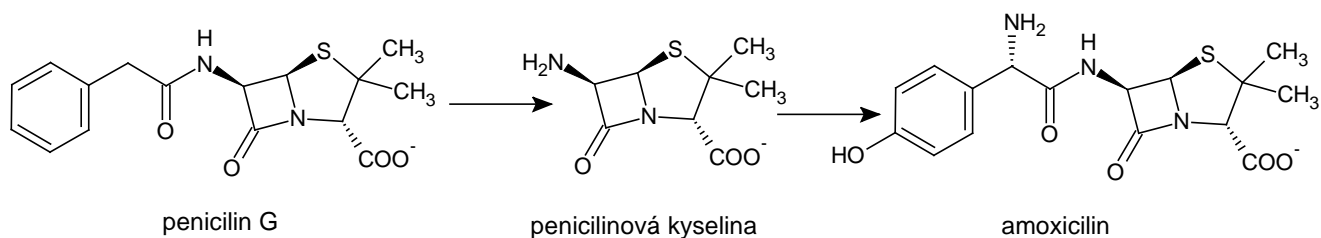
3. 1. 3. 2. Průmyslové využití PGA

Dobře zavedené a vyladěné chemické procesy jsou velkou výzvou pro průmyslové provedení enzymové syntézy β -laktamových antibiotik. Cesty založené na reakcích enzymů jsou známé jako přátelské k životnímu prostředí, vynechávající organická rozpouštědla a pracující při laboratorní teplotě. Mezi různými alternativami je nejperspektivnější kineticky kontrolovaná syntéza, pomocí imobilizované penicilin G acylasy, ve vodném prostředí a při současné krystalizaci produktu (Giordano et al., 2006). Přestože jsou chemické metody syntézy 6-APA dobře zavedené, kvůli mírným podmínkám, stereospecifitě a ekonomickým nákladům se dává přednost enzymové syntéze hydrolýzou penicilinu G pomocí penicilin G acylasy (Burns a May, 2003). Pro hydrolýzu aromatických penicilinů byl dříve používán třístupňový proces v CH_2Cl_2 v $-40\text{ }^\circ\text{C}$, ale nyní se tento proces provádí jednou enzymovou reakcí s penicilin G acylasou ve vodě při $37\text{ }^\circ\text{C}$ (Powell et al., 2001). β -laktamová antibiotika mohou být popsána jako β -laktamové jádro s postranními řetězci (Obr.16). V dnešní době je u používaných antibiotik k nalezení mnoho různých jader a postranních řetězců. Přirozeně se vyskytující penicilin G se skládá z β -laktamového jádra (6-APA), které je spojena amidovou vazbou s postranním řetězcem (PAA) přes 6-aminoskupinu 6-APA. Různé kombinace postranních řetězců a jader dávají antibiotikům charakteristické vlastnosti. Např. výměna fenyloctové kyseliny na penicilinu G za *D-p*-hydroxyfenylglycin vyústí v β -laktamové antibiotikum amoxicilin, který je na rozdíl od penicilinu G stabilní v prostředí ústní dutiny. Podobná změna může být také u jádra, kdy kombinací postranního řetězce *D-p*-hydroxyfenylglycinu v amoxicilinu a 7-ADCA v cefalosporinovém jádře, vznikne cefalosporin cefadroxil. Tyto různé kombinace vedou k novým β -laktamovým antibiotikům. I když jsou v průmyslu pomocí chemických prostředků různé postranní řetězce relativně snadno syntetizovány, složitost β -laktamového jádra znemožňuje syntetizovat tyto molekuly v ekonomicky využitelném množství. Spojením 6-APA s postranním řetězcem *D*-fenylglycinem vzniká ampicilin. Toto spojení lze provést chemicky, ale jsou vyvíjeny i enzymové metody. Používají se dva různé enzymy: penicilin G acylasa (PGA) a penicilin V acylasa (PVA), z nichž PGA z *Escherichia coli* je nejdůležitější. Oba enzymy jsou zodpovědné za produkci tisíců tun 6-APA ročně (Barends et al., 2004). Penicilin V acylasa je oproti PGA o 10 – 15 % dražší. Má však větší stabilitu ve vodném prostředí a hlavně při nižším pH během extrakce, vyšší toleranci k fenyloctové kyselině. Většina PGA je používána při pH mezi 7,8 – 8,5. PVA má optimální rozsah pH mezi 5,6 – 8,5, kde při nižším pH dochází k menší degradaci 6-APA (Shewale a Sudhakaran, 1997). Ve výrobě polosyntetických β -laktamových antibiotik probíhá kineticky a termodynamicky řízená hydrolytická reakce s konkurenční acylační reakcí. V termodynamicky řízeném procesu je rovnováha reakce udržována kontrolou pH, teploty, iontové síly a složením rozpouštědla. V kineticky řízeném procesu je substrát přeměněn v produkt před dosažením rovnováhy (Powell et al., 2001). Enzymová hydrolýza preferuje spíše vyšší pH (7-8), zatímco

pro syntézu β -laktamových antibiotik se používá nižší pH (Wang et al., 2007a). Acylační chemie je součástí syntéz řady antibakteriálních, antifungálních léčiv a různých malých molekul, používaných jako léčiva. Přírodní acylové řetězce penicilinu G, penicilinu V a cefalosporinu C jsou hydrolyticky odstraněny a zbylé jádro je reacylováno a vytváří se tak řada různých derivátů jako amoxicilin, carbenicilin, piperacilin, cefalexin, cefaclor a cefotaxim (Obr.17). Přírodní postranní řetězce penicilinu G, penicilinu V a cefalosporinu C jsou fenylacetyl, fenoxycetyl a aminoadipyl. PGA je tedy specifická pro fenylacetylový postranní řetězec penicilinu G. To brání použití enzymu pro enzymové acylace 6-APA a 7-ADCA s různými donory acylů. Vytvořený enzym se širokou substrátovou specifikitou pro donory acylů by mohl usnadnit výrobu polosyntetických β -laktamových antibiotik (Powell et al., 2001).



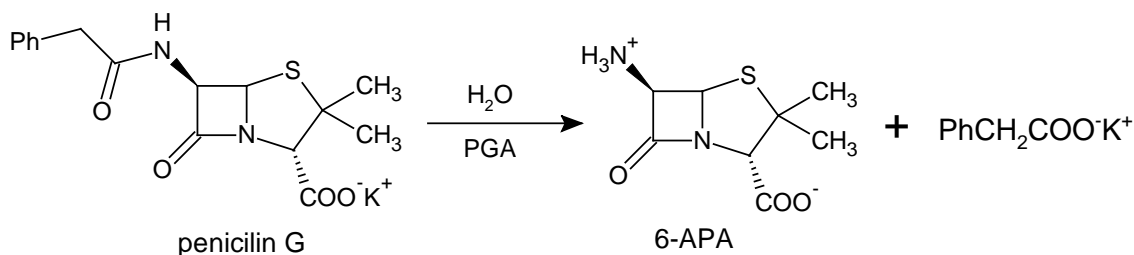
Obr.16 Příklady β -laktamových antibiotik, které se skládají z β -laktamového jádra a postranního řetězce. Peniciliny: (a) penicilin G a (b) amoxicilin. Cefalosporiny: (c) cefadroxil (přepřacováno podle Barends et al., 2004).



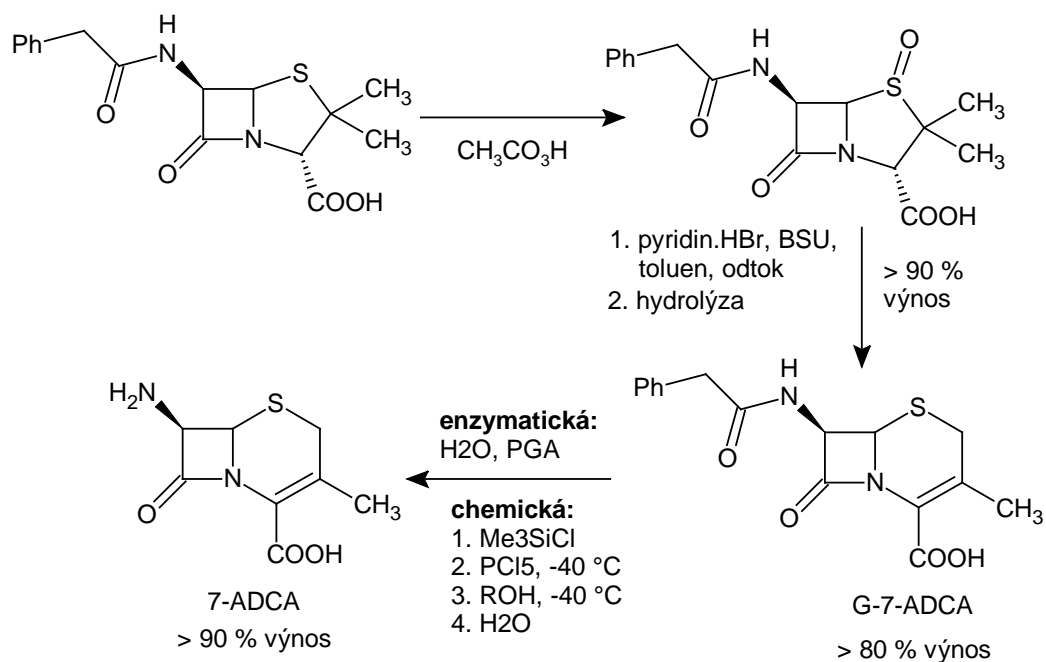
Obr.17 Reakce katalyzovaná penicilin acylasou (přepřacováno podle Powell et al., 2001).

Biotransformační procesy minimalizují nebo odstraňují tvorbu hlavně anorganických odpadů a použití toxických nebo jinak nebezpečných chemikálií a rozpouštědel. Dříve nebyl s odpady problém, protože byla věnována pozornost hlavně oblastem energetiky. Biokatalytické procesy nabízejí jasné výhody: reakce probíhá většinou ve vodě při neutrálním pH a teplotě blízké okolnímu prostředí, bez nutnosti velkých ochranných nebo aktivací/inaktivací funkčních skupin a jsou vysoce chemo-, regio- a stereoselektivní. Enzymové štěpení penicilinu G (Obr.18) je prováděno ve vodě za normální teploty a vzniká zde velké množství 6-APA. Navíc je vznikající PAA recyklována ve fermentaci. Cefalosporinové jádro může vzniknout sulfoxidací, esterifikací a dehydratací/expanzí penicilinového jádra. Reakcí penicilin G sulfoxidu s pyridinium hydrobromidem a N,N'-bis(trimethylsilyl)močovinou v toluenu vzniká cefalosporinový derivát (G-7-ADCA) ve výtěžnosti vyšší jak 80 % (Obr.19). Stejně jako u 6-APA je produkce 7-ADCA chemickou deacylací nahrazena jednoduchou enzymovou konverzí za použití imobilizované penicilin G acylasy. Hydrolýza produktu může být potlačena selektivním odstraněním produktu z reakční směsi např. kokrystalizací s jinou látkou. Kineticky kontrovaná enzymová syntéza β -laktamových antibiotik je zobrazena na Obr.20 (Wegman et al., 2001). V kineticky kontrovaném procesu reaguje aktivovaný prekurzor acylové části molekuly (např. ester nebo amid D-acylu postranního řetězce antibiotika) s β -laktamovým jádrem za uvolnění antibiotika a alkoholu nebo amoniaku (Obr.21(B)). Změnou donoru acylu dostaneme jiný polosyntetický penicilin. Když vyměníme 6-APA za 7-ACA nebo 7-ADCA vzniknou cefalosporiny. PGA působí buď jako transferasa nebo jako hydrolasa a molekula vody může soutěžit s β -laktamovým jádrem v nukleofilním útoku na acylenzymový meziprodukt. Ekonomická proveditelnost této cesty závisí tedy do značné míry na optimalizaci reaktorových podmínek. Vysoká koncentrace 6-APA může zvýšit selektivitu reakce, ale na úkor produktivity. Pro zlepšení procesu lze produkt krystalizovat, použít pH gradient, použít vícebodové kovalentní imobilizace enzymu, zvýšit afinitu enzymu k donorům acylů řízenou mutací, zvýšit enantioselektivitu imobilizací PGA z různých mikroorganismů a mnoho dalších (Giordano et al., 2006). Enzymová syntéza β -laktamových antibiotik je vidět na Obr.21, kde v případě první (Obr.21(A)) reakce se jedná o klasický termodynamicky řízený proces, kdy rovnováha je posunuta k výrobě produktu. Tento proces je sice elegantní, ale v případě použití PGA

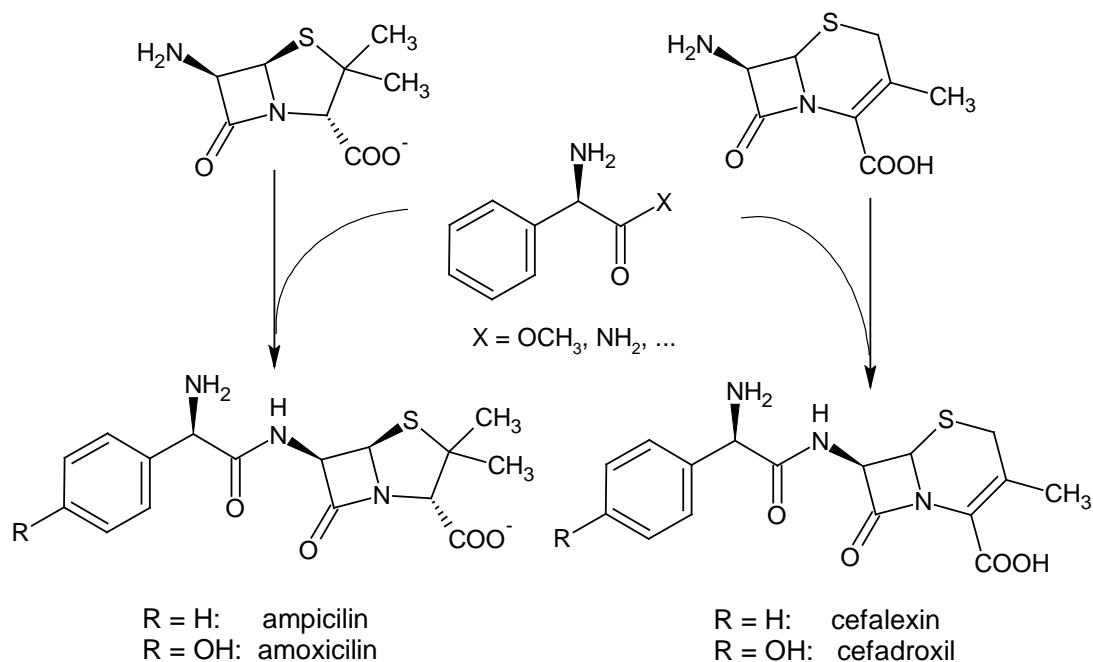
z různých organismů a s použitím vhodných rozpouštědel je vhodný pouze pro přípravu některých β -laktamů. Nízká rozpustnost fenylglycinu narušuje rovnováhu směřující k syntéze. Další nevýhodou termodynamicky řízeného procesu je ztráta enzymové aktivity v přítomnosti organických rozpouštědel. Vícebodové kovalentní uchycení enzymu na imobilizovanou matici a existence hydrofilního mikroprostředí kolem molekuly enzymu, může tento enzym stabilizovat. Alternativní cestou je tedy pak kineticky kontrovaná syntéza (Giordano et al., 2006).



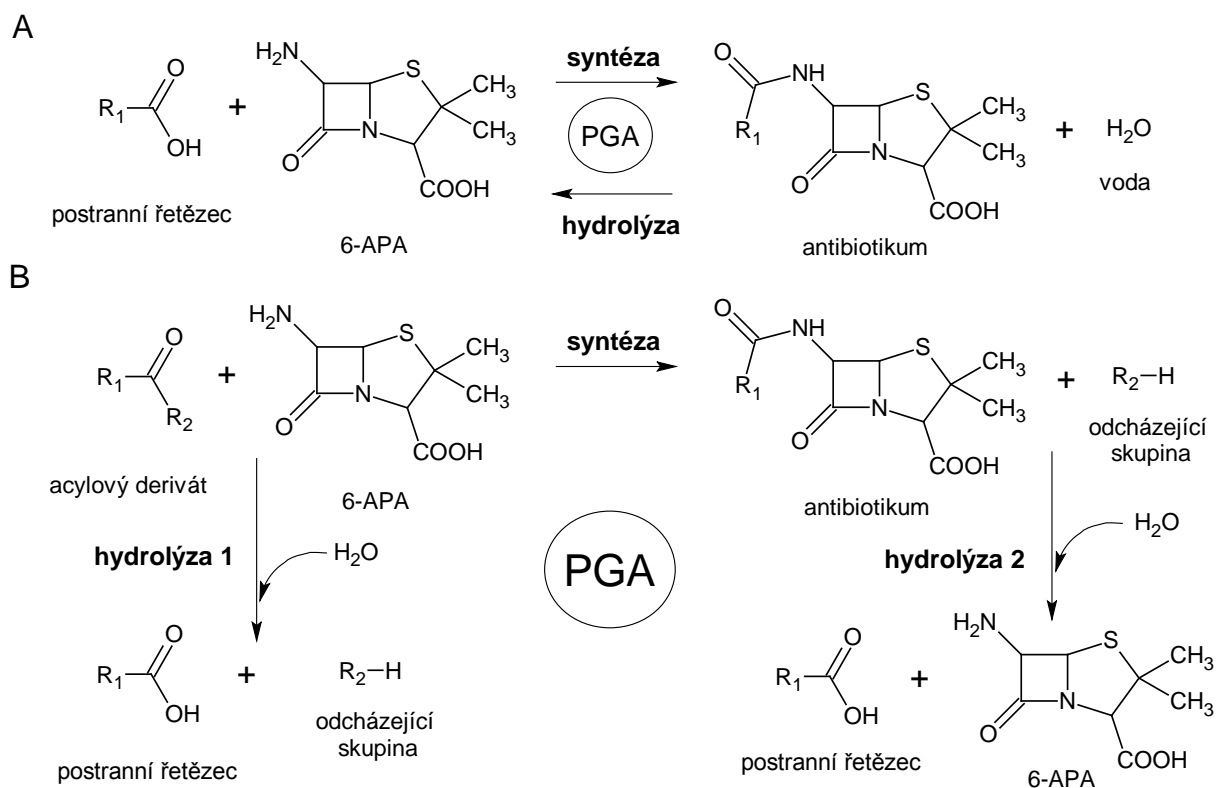
Obr.18 Enzymová deacetylace penicilinu G na 6-APA (přepřacováno podle Wegman et al., 2001).



Obr.19 Chemická syntéza 7-ADCA z penicilinu G (BSU: N,N'-bis(trimethylsilyl)močovina) (přepřacováno podle Wegman et al., 2001).



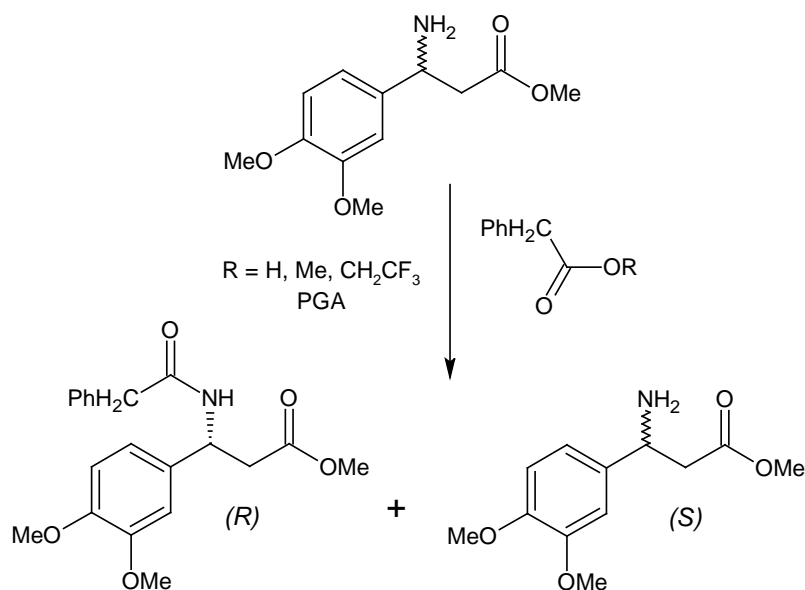
Obr.20 Kineticky kontrolovaná enzymová syntéza β -laktamových antibiotik (přepřacováno podle Wegman et al., 2001).



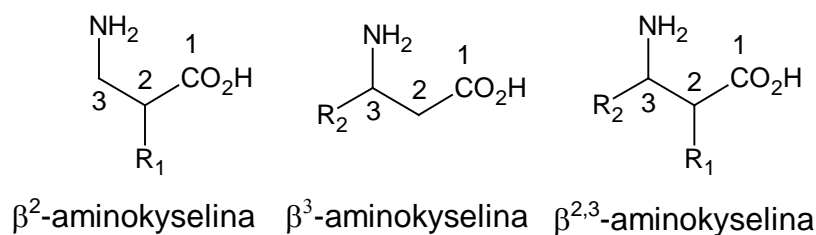
Obr.21 (A) Termodynamicky kontrolovaná syntéza polosyntetických penicilinů, katalyzovaná penicilin G acylasou (PGA). (B) Kineticky kontrolovaná syntéza. PGA zde

působí jako transferasa (pro syntézu) a jako hydrolasa podporující dvě nežádoucí reakce (hydrolýzu 1, postranního řetězce derivátu donoru acylu, a hydrolýzu 2, antibiotika). Např. při syntéze ampicilinu $R_1\text{-COOH} = \text{D-(-)-fenylglycin (PG)}$; pro amoxicilin $R_1\text{-COOH} = \text{p-OH-D-(-)-PG}$, atd. Derivát donoru acylu může být ester (např. $R_2 = \text{-OCH}_3$) nebo amid ($R_2 = \text{-NH}_2$). Polosyntetické cefalosporiny mají cefamové jádro, 7-ADCA nebo 7-ACA, na místě penamového jádra, 6-APA (přepřacováno podle Giordano et al., 2006).

Nedávno našla penicilin G acylasa také použití v rozdělení racemických β -aminoesterů (Obr.22) nebo ve vzniku čistých enantiomerů aminokyselin, ze kterých mohou vzniknout užitečné trans-oxazolinové meziproducty. Alkylací oxazolinu, následovanou jeho hydrolýzou, lze získat příslušnou anti- α -alkyl- α -hydroxy- β -aminokyselinu. Použití PGA lze i pro rozlišení různých β -fluoroalkyl- β -aminokyselin, k odstranění fenylacetylových nebo p-acetoxybenzyloxykarbonylových ochranných skupin. Zrušením ochrany aminoskupiny pomocí PGA byl získán čistý enantiomer (S)-3-aminoazetidin-2-on, jádro mnoha velmi důležitých β -laktamových antibiotik (penicilinů, cefalosporinů a monobaktamů). PGA může být také použita k přenosu různých donorů acylů na volnou aminoskupinu. Uvolněním aminoskupiny použitím imobilizované PGA a následným spontánním uzavřením kruhu byly syntetizovány deriváty pyrolinu (Davis a Boyer, 2001). PGA je i jeden z nejlepších nástrojů pro přípravu vysoce čistých β^3 - a $\beta^{2,3}$ -aminokyselin. β -aminokyseliny mají jedinečné farmakologické vlastnosti kdy slouží jako stavební kameny pro β -peptidy. β^2 , β^3 - a $\beta^{2,3}$ -aminokyseliny jsou vidět na Obr.23 (Liljebblad a Kanerva, 2006).



Obr.22 oddělení racemických β -aminoesterů (přepřacováno podle Davis a Boyer, 2001).



Obr.23 Obecné struktury β -aminokyselin (přepřacováno podle Liljeblad a Kanerva,2006).

Vzhledem k rostoucímu zájmu o procesy šetrné k životnímu prostředí, se začaly upřednostňovat enzymové procesy před chemickými. Nejvíce využívaná β -laktamová antibiotika jsou zejména peniciliny a cefalosporiny. Výrazný růst výroby začal v posledních dvou desetiletích, kdy průmysl vyměnil proces víceúhňové přeměny za levnější enzymovou přeměnu, která dosahuje účinnosti asi 80-90 %. Kromě hydrolýzy β -laktamů je PGA také využívána i v jiných aplikacích včetně syntézy peptidů, rozlišování racemických směsí nebo enantioselektivní acylaci. V Tab.8 jsou uvedeny specifické aplikace PGA (Chandel et al., 2008).

Tab.8 Specifické aplikace PGA (Chandel et al., 2008).

Mechanismus	Mechanistická aplikace
Syntéza peptidů (chránění aminoskupin)	Produkce D-fenyldipeptidů, esterů používaných v potravinářských aditivech, inhibitorů chitinasy, produkce antifungicidních, antialergických a antivirálních sloučenin.
Rozlišení racemických směsí	Odstranění chirálních sloučenin (aminokyseliny), Loracarbef, syntéza Carba cefalosporinových antibiotik, Xemilofiban, syntéza anti-krevních destiček, syntéza β -aminokyselin.
Syntéza cefalothionu	Produkce cefalothionu z 7-ADCA a amidových derivátů 2-thienyloctové kyseliny (2-AT) za použití PGA.
Enantioselektivita (regulace enantioselektivity imobilizované PGA)	Hydrolýza racemického iso-propylamidu mandelové kyseliny. Deriváty jsou použity pro přípravu cefamandolu a cefonicidu.
Enantioselektivní acylace (enantioselektivní rozeznání)	Syntéza série strukturálně souvisejících sloučenin 2-aryloxy-2-aryloctových kyselin spolu s deriváty thioisoesterů.
Chirální hydrolýza (hydrolýza prochirálního diethyl a dimethylfenylmalonatu)	Syntéza +(-)methylfenylmalonatu.

3. 1. 4. Imobilizace penicilin G acylasy

Protože cena 6-APA má přímý dopad na zisk z produkce polosyntetických penicilinů, je snaha její produkci vylepšit. Toto vylepšení se většinou týká imobilizace PGA, která katalyzuje výrobu asi 88 % celosvětového množství 6-APA. Zbývá procenta vyrábí imobilizovaná penicilin V acylasa, protože cena PVA je o 10-15 % vyšší než PGA (Rajendhran a Gunasekaran, 2004). Imobilizace enzymu má vliv na S/H (syntéza/hydrolyza). β -laktamové jádro a jeho produkty jsou mnohem většími molekulami než voda a difúzní omezení u imobilizovaného enzymu vede k očekávanému snížení S/H (Wegman et al., 2001). Existuje pět základních typů imobilizace: kovalentní zachycení na pevný nosič, adsorpce na pevný nosič, zachycení v polymerním gelu, mezimolekulární zesíťování a enkapsulace. Při imobilizaci na porézní povrch je kvůli difúznímu omezení obtížné rozšířit enzym po celém povrchu nosiče (Xie et al., 2009). U imobilizací na nerozpustné částice je také důležitý difúzní odpor uvnitř pórů. Také gradientová koncentrace a pH uvnitř pórů může mít vliv na kineticky řízený proces. Navíc nelze uvnitř pórů krystalizovat produkt (Giordano et al., 2006). Jedním z hlavních nedostatků při používání enzymů v průmyslu je jejich nestabilita. Zvláště složitý problém je ve stabilizaci multimerních proteinů, kdy disociací podjednotek dojde k inaktivaci enzymu a také ke kontaminaci produktu (Fernandez-Lafuente, 2009). Imobilizace enzymů nevyžaduje příliš velkou čistotu enzymu ani velké množství proteinu. Důležité je, aby se zvýšila enzymová stabilita vůči teplu, organickým rozpouštědlům a pH, bez velké ztráty katalytické aktivity. Enzym se tak stává katalyzátorem na nosiči, kde je často použit opakovaně tak dlouho, dokud zůstává aktivní (Girelli a Mattei, 2005). Pro zvýšení stability enzymu se dají použít i jiné než genetické metody. Příkladem může být zjišťování, u kterých mikroorganismů se nachází stabilnější enzym, přidání různých přísad pro zvýšení stability, imobilizace enzymu nebo chemická modifikace enzymu. Všechny tyto metody byly použity pro zvýšení stability PGA vůči teplotě, pH a organickým rozpouštědlům. Teplotní stabilita enzymů je v průmyslu velmi důležitá. Použití termostabilního enzymu může mít některé výhodné vlastnosti jako vysokou reakční rychlost a operační stabilitu, vyšší rozpustnost substrátu a dalších látek v reakční směsi, nižší viskozitu reakčního média a také omezení mikrobiální kontaminace. Zvýšení stability proti teplotnímu rozkladu lze také dosáhnout chemickou modifikací pomocí zesíťovacích činidel. Nejvíce užívanou látkou pro zesíťování je glutaraldehyd. PGA byla imobilizována na různé matrice od přírodních až po syntetické polymery. Imobilizace byla prováděna pro zlepšení kinetiky enzymu. Byly imobilizovány také celé buňky. Zde však byla naměřena nízká specifická aktivita a docházelo k difúzním omezením. K zlepšení specifické aktivity došlo pomocí genetického inženýrství a difúzní omezení se snížilo permeabilizací membrány (Rajendhran a Gunasekaran, 2004). Imobilizace enzymu na pevný podklad zvýšila robustnost enzymu vůči organickým rozpouštědlům, nefyziologickému pH a teplotě (Sio a Quax, 2004). Vlastnost imobilizovaného enzymu je dána jak vlastnostmi enzymu, tak vlastnostmi nosiče. Interakce mezi nimi uděluje imobilizovanému

enzymu specifické chemické, biochemické, mechanické a kinetické vlastnosti (Kallenberg et al., 2005).

3. 1. 4. 1. Akrylové pryskyřice

PGA byla kovalentně navázána na Eupergit C (Kallenberg et al., 2005; Hernandez a Fernandez-Lafuente, 2011). Eupergit C je makroporézní kopolymer metakrylamidu, glycidylmetakrylátu a alylglycidyletheru, zesíťovaný N,N'-methylen-bis(metakrylamidem). Průměrná velikost částic je asi 170 μm a velikost pórů 25 nm. Dalším použitým nosičem byly Sepabeads FP-EP. Sepabeads FP-EP jsou založené na polymetakrylátu s oxiranovými funkčními skupinami podobně jako Eupergit C s velmi podobou charakteristikou vazby PGA (Kallenberg et al., 2005). Sepabeads jsou robustní a jednoduše se separují od roztoku se substrátem (Chandel et al., 2008). Kombinací adsorpce a zesíťování, byla PGA kovalentně imobilizována také na velmi hydrofilní polyakrylový ester (XAD-7) (Tischer a Wedekind, 1999). Amberlit XAD-7 je porézní polymetakrylesterová pryskyřice se specifickým povrchem 450 m^2/g a s velikostí pórů 9 nm (Kallenberg et al., 2005).

3. 1. 4. 2. Biopolymery

Mezi biopolymery na které došlo k navázání PGA patří např. dextran, agarosa nebo Nylon 6 (Tischer a Wedekind, 1999). Agarosa je lineární polysacharid, který je získáván z mořských řas a skládá se z D-galaktosy a 3,6-anhydro-D-galaktosy. Aldehyd-agarosa obsahuje volné aldehydové skupiny na které se kovalentně váže enzym svými aminoskupinami lysinu za tvorby Schiffovy báze. Používají se také zesíťované aldehyd-agarosové gely (Kallenberg et al., 2005). Inkluze do biopolymerního gelu jako želatiny nebo alginátu byla použity už v počátcích biokatalýzy. Jelikož želatina obsahuje málo volných aminoskupin může tak zesíťování želatiny s polymerem (chitosanem) počet těchto skupin zvýšit. Volné aminoskupiny může poskytovat včetně chitosanu také alginátamin nebo polyethylenimin. Konkavalin A patří do skupiny lektinů, proteinů, které reagují se specifickými koncovými cukernými zbytky a je většinou používán pro studium cukrů na povrchu buněk. Byl také použit jako linker při imobilizaci glykosylovaných enzymů. Nativní PGA není glykosylována, proto neinteraguje s konkavalinem A. Byly však připraveny glykokonjugáty PGA např. s mannanem, které tuto schopnost interakce mají (Kallenberg et al., 2005).

3. 1. 4. 3. Anorganické nosiče

Oxid křemičitý (silikát) je velmi dobře prozkoumaný materiál a lze připravit v širokém rozsahu velikostí částic (5-100 μm) a velikostí pórů (10-20 nm). Pro kapalinovou chromatografii byly vyvinuty kovalentní modifikace povrchu oxidu křemičitého, který se

později uplatnil i při kovalentní imobilizaci enzymů. Vazby na aktivovaný oxid křemičitý tak může být dosaženo prostřednictvím volných aminoskupin lysinu na povrchu enzymu (Massoliny et al., 2008). Enzym může být také zachycen uvnitř silikátového nosiče (Kallenberg et al., 2005). Mezi modifikovaný oxid křemičitý můžeme zařadit např. epoxidovou monolytickou silikátovou matici. Další imobilizace se uskutečnila na aminosilikát (Chromolith). Takto imobilizovaná PGA byla použita jako monolitická kolona nebo předkolonka zejména pro syntézu čistých enantiomerních látek (Bertucci et al., 2003; Girelli a Mattei, 2005). PGA byla také imobilizována na mesopórézní křemen (MPS). Tento materiál umožňuje vytvářet přesnou velikost pórů, strukturu, velikost částic a chemické složení. Proteiny jsou na tento nosič vázány především adsorpcí. Vznik tohoto materiálu je založen na tvorbě tekutých krystalů. Tekuté krystaly vznikají ve směsi polárních rozpouštědel (voda) a povrchově aktivních látek s nepolárním koncem. Molekuly povrchově aktivní látky se shlukují do micel a jejich hydrofóbní konce chrání hydrofilní část před vodou. Po přidání anorganického materiálu se začínají formovat kapalně krystaly. Tento materiál však může být opatřen mnoha různými funkčními skupinami. PGA byla na MPS imobilizována pomocí glutaraldehydu (Hudson et al., 2008). Proteiny se mohou vázat i dovnitř MPS (Lee et al., 2009).

3. 1. 4. 4. CLEC a CLEA

Výsledkem stabilizace a imobilizace enzymu zároveň jsou zesíťované enzymové krystaly (CLECs). Začali se používat od roku 1993 a dosahují velikostí 1-100 μm . V dnešní době jsou ve velké míře používány pro imobilizaci PGA. Jsou vyrobeny postupnou krystalizací enzymu a molekulárního zesíťování, kdy dojde k zachování krystalické struktury. CLECs jsou velmi stabilní nejen v teplotě, ale i v organických rozpouštědlech. Stabilizace je důsledkem intenzivních polárních a hydrofóbních interakcí. CLECs PGA pracují stejně dobře jak při syntéze tak při hydrolýze a byly použity pro komerční využití acylas jako chirálních biokatalyzátorů pro asymetrické syntézy (Cao et al., 2003; Rajendhran a Gunasekaran, 2004). Podobně vznikly také zesíťované enzymové agregáty (CLEAs) s PGA, které jsou připraveny pomalým přidáváním sraženiny síranu amonného, PEG 8000 nebo *tert*-butylalkoholu do roztoku enzymu při 0 °C a pH 8. V dalším kroku fyzikálně agregovaná PGA je chemicky zesíťována pomocí glutaraldehydu. CLEAs mají v syntéze polosyntetických β -laktamových antibiotik ve vodním prostředí vysokou specifickou aktivitu, vysokou produktivitu a poměr S/H. Kromě toho jsou aktivní a stabilní v širokém rozsahu polárních a nepolárních organických rozpouštědel (Rajendhran a Gunasekaran, 2004). CLEAs-PGA byly také enkapsulovány do polymerního nosiče připraveného z polyvinylalkoholu. Enkapsulací došlo ke snížení aktivity na 60 % oproti CLEAs-PGA (Roessl et al., 2010). Katalytické chování CLEAs se liší v závislosti na vlastnostech precipitantů. CLEAs PGA srážená síranem amonným vykazovala podobné chování v syntéze ampicilinu jako nativní enzym, zatímco CLEAs srážená *tert*-butanolem měla

v průběhu reakce relativně konstantní selektivitu (poměr S/H). Pozoruhodné je, že různé CLEAs PGA měli téměř dvojnásobnou selektivitu oproti příslušným CLECs. Je pravděpodobné, že různé precipitanty vyvolají různé konformace enzymu, které jsou následně „zmrazeny“ zesíťováním (Cao et al., 2003). CLEAs PGA, které zprostředkovávaly syntézu ampicilinu, vykazovaly S/H podobné rozpuštěnému enzymu (Wegman et al., 2001). CLEC PGA oproti CLEA PGA dosahovaly vyšší aktivity vzhledem k volnému enzymu (Kallenberg et al., 2005).

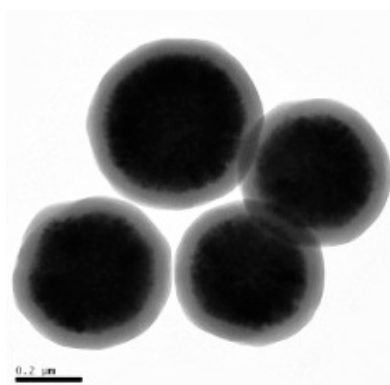
3. 1. 4. 5. Nově vznikající techniky

Mezi nově vznikající techniky můžeme zařadit kovalentní navázání na teplotně citlivý polymer jako poly-N-isopropylakrylamid (polyNIPAM), který precipituje z vodných roztoků při zahřátí na 32 °C. Při jeho spojení s proteiny může být protein snadno separován z vodného prostředí malou změnou teploty. Jak je vidět u názvu výhodou i nevýhodou nosiče je jeho citlivost na teplotu (Kallenberg et al., 2005; Rzaev et al., 2007). PGA byla také kovalentně imobilizována na mesostrukturní buněčné pěny s epoxidovými funkčními skupinami. Tyto pěny mají velký specifický povrch (400 m²/g) a velké póry (17 nm). Jsou vyrobeny kondenzací 3-glycidoxypropyltriethoxysilanu (GPTS) a silanovými skupinami povrchu mesoporézních buněčných pěn (MCFs) (Xue et al., 2008). Dalším novým způsobem je termodialýza přes katalytickou membránu. Termodialýza spočívá v rozdílné teplotě na stranách membrány, které jsou např. z nylonu. Několika koncovými skupinami může být enzym na nosič kovalentně navázán (Kallenberg et al., 2005). Čas pro imobilizaci jde výrazně snížit při použití mikrovlnného záření. Ozáření došlo k lepší adsorpční imobilizaci PGA na mesocelulární křemičité pěny (MCFs). Mikrovlnným zářením docházelo také k lepší kovalentní imobilizaci (Xie et al., 2009).

3. 1. 4. 6. Magnetické nosiče

Mezi nově vznikající techniky imobilizace by bylo možné zařadit i imobilizaci na magnetické nosiče. Jako magnetické nosiče byly použity především magnetické polymerní mikročástice a magnetické křemíkové kompozity. Magnetické nosiče se většinou připravují uzavřením anorganické magnetické částice (obvykle magnetitu nebo maghemitu) v organických polymerech jako polystyren nebo poly(alkylakrylát) nebo v anorganickém silikátu. Magnetické polymerové mikročástice tak kombinují výborné vlastnosti polymeru (modifikace povrchu a vysoká dispergovatelnost) s magnetickou reakcí magnetických částic (Shi et al., 2010). Příkladem těchto nosičů tak mohou být hydroxylové magnetické částice syntetizované a aktivované epoxylchloropropanem pomocí suspenzní polymerace (Chandel et al., 2008; Wang et al., 2007b). Nejlepší výsledky kovalentní imobilizace PGA na magnetické částice poskytovaly magnetické oxiranem aktivované poly(vinylalkoholové) mikročástice, které měly velikost asi 1,8 μm a specifický povrch asi 84 m²/g. PGA byla kovalentně imobilizována na

oxiranové skupiny skrz 1,6-diaminohexanové raménko a glutaraldehydový linker (Kallenberg et al., 2005). Došlo také k imobilizaci na poly(glycidylmetakrylát)-ko-(glycerolmonometakrylátem) pokryté magnetické mikročástice. Tento nosič obsahoval epoxidové funkční skupiny, které byly náhodně rozděleny mezi diolové skupiny poly(glycerolmonometakrylátových) jednotek podél polymerních řetězců. Kovalentně imobilizovaná PGA měla vysokou tepelnou stabilitu a stabilitu v širokém rozsahu pH (Huang et al., 2008). Mezi další magnetické nosiče použité pro imobilizaci PGA můžeme zařadit i magnetické celulosové mikročástice s epoxidovými funkčními skupinami (Luo a Zhang, 2010). Příkladem magnetického nosiče s velmi vysokou magnetizací mohou být superparamagnetické silikátové core-shell mikročástice s aminopropylovými funkčními skupinami, které obsahují Fe_2O_3 a mají průměr okolo 300 nm (Obr.24) (Shi et al., 2010). Pro imobilizaci PGA byly použity také magnetické nanočástice. Šlo ale pouze o jediný případ imobilizace na nanočástice (Zhou et al., 2012).



Obr.24 Superparamagnetické silikátové core-shell mikročástice s aminopropylovými funkčními skupinami. Obrázek byl pořízen transmisním elektronovým mikroskopem a průměr mikročástic se pohyboval okolo 300 nm (Shi et al., 2010).

4. Experimentální část

4. 1. Materiály

1,4-butandioldiglycidylether (95 %)	Sigma Aldrich (USA)
2-jodacetamid (IAA)	Sigma Aldrich (USA)
4-(dimethylamino)benzaldehyd (PDAB)	Sigma Aldrich (USA)
6-aminopenicilánová kyselina (6-APA)	Sigma Aldrich (USA)
Acetonitril	Sigma Aldrich (USA)
Akrylamid	Bio-Rad (USA)
Borohydrid sodný	Sigma Aldrich (USA)
Bromfenolová modř	Lachema (Česká republika)
Coomassie Brilliant Blue G250	Fluka (Švýcarsko)
Coomassie Brilliant Blue R250	Fluka (Švýcarsko)
Dihydrogenfosforečnan sodný ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$)	Lach-Ner (Česká republika)
Dithiotreitol (DTT)	Fluka (Švýcarsko)
Dodecylsírán sodný (SDS)	Fluka (Švýcarsko)
Ethanol (96 %, denaturovaný)	lihovar Kojetín (Česká republika)
Fenol Red	Sigma Aldrich (USA)
Fenyloctová kyselina	Lachema (Česká republika)
Glutaraldehyd (50%)	Sigma Aldrich (USA)
Glycerol	Lach-Ner (Česká republika)
Glycin	MP-biomedicals (USA)
Hovězí sérový albumin (BSA)	Sigma Aldrich (USA)
Hydrogenfosforečnan sodný ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)	Lach-Ner (Česká republika)
Hydrogenuhlíčan amonný	Sigma Aldrich (USA)
Hydroxid sodný	Lach-Ner (Česká republika)
Jodistan sodný	Sigma Aldrich (USA)
Kyselina boritá (H_3BO_3)	Lachema (Česká republika)
Kyselina fosforečná (H_3PO_4)	Lachema (Česká republika)
Kyselina chlorovodíková	Lach-Ner (Česká republika)
Kyselina mravenčí	Sigma Aldrich (USA)
Kyselina octová (99 %)	Lach-Ner (Česká republika)
Magnetické mikročástice obalené chitosanem (Fe_3O_4)	Ivo Šafařík (ČR)
Magnetické nanočástice obalené chitosanem (Fe_3O_4)	Ivo Šafařík (ČR)
Methanol (99 %)	Lach-Ner (Česká republika)
Monoisotopické standardy pro MS	Bruker (Německo)

N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid hydrochlorid (EDC.HCl) (99 %)	Fluka (Švýcarsko)
N,N, N',N'-tetramethylethyldiamin (99 %)	SERVA (Německo)
N,N'-methylenbisakrylamid	MP-biomedicals (USA)
n-butanol	Lach-Ner (Česká republika)
N-hydroxysukcinimid (NHS) (98 %)	Sigma Aldrich (USA)
Penicilin G acylasa (<i>E. coli</i>)	Lentikat's (Česká republika)
Penicilin G draselná sůl (98 %)	Fluka (Švýcarsko)
Perlosa MG 100 (50 – 80 μm)	Iontosorb (ČR)
Perlosa MG 200 (50 – 80 μm)	Iontosorb (ČR)
Persíran amonný (APS)	Serva (Německo)
Stachyosou modifikovaný trypsin	Marek Šebela (ČR)
Standardy molekulových hmotností (SDS6H2)	Sigma Aldrich (USA)
Trifluoroctová kyselina (TFA)	Sigma Aldrich (USA)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	MP-biomedicals (USA)
α-kyanoskořicová kyselina	Sigma Aldrich (USA)

4. 2. Přístroje

Analytické váhy	Sartorius (Německo)
Automatický rotátor	Biosan (Lotyšsko)
Centrifuga	Eppendorf (Německo)
Digitální předvážky	Kern (Německo)
Elektromagnetická míchačka	IKA (Německo)
Fotografická komora BioSpectrum	UVP (USA)
Hmotnostní spektrometr Microflex MALDI-TOF LRF20	Bruker Daltonik (Německo)
Mikrodestičkový reader Synergy HT	BioTek (USA)
Minicentrifuga miniSpin plus	Eppendorf (Německo)
Minicentrifuga quick-spin minifuge	Labnet (USA)
Minitřepačka TTS 2	IKA (Německo)
pH metr inoLab Level 1	WTW (Německo)
Pipety 1µl – 5 ml	Eppendorf (Německo), Biohit (Finsko)
Spektrofotometr Biochrom (WPA)	Biochrom Ltd. (Velká Británie)
Termomixer comfort	Eppendorf (Německo)
Termostat plus	Eppendorf (Německo)
Termostat SUB 6	Grant (Velká Británie)
Transiluminátor UVT-40W	Herolab (Německo)
Vakuová centrifugační odparka Concentrator plus 5305	Eppendorf (Německo)
Vortex SA8	Stuart Scientific (Velká Británie)
Vortex MS-1	IKA (Německo)
Zařízení pro vertikální elektroforézu	Bio-Rad (USA)
Zdroj napětí	Bio-Rad (USA)

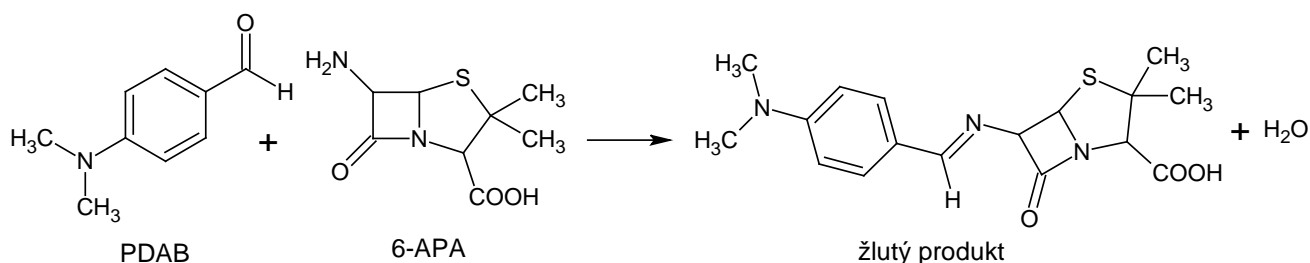
4. 3. Metody

4. 3. 1. Stanovení aktivity enzymu I

Stanovení aktivity enzymu bylo prováděno spektrofotometrickou metodou. Směs 1,0 ml vzorku (t.j. promytá buněčná suspenze v 0,05 mol.l⁻¹ Na-fosfátovém pufru (pH 8,0) nebo roztok enzymu v tomto pufru) a 1,0 ml pufru byla temperována 5 min ve vodní lázni na 37 °C. Enzymová reakce byla startována přidáním 1,0 ml 164 mmol.l⁻¹ roztoku penicilinu G (K⁺ sůl) v pufru. V pravidelných intervalech byly odebírány 0,5 ml vzorky, které byly okamžitě přidány ke 3 ml roztoku 20 % kyseliny octové s 0,05 mol.l⁻¹ NaOH v poměru 2 : 1 pro zastavení reakce. Po centrifugaci (4 min, 12 000 g), bylo k supernatantu přidáno 0,5 ml 33,5 mmol.l⁻¹ roztoku *p*-dimethylaminobenzaldehydu (PDAB). Po 15 min byla měřena absorbance při 415 nm. Ke kalibraci byla zvolena koncentrační řada (0,5 – 5 mmol.l⁻¹) reakčního produktu (6-APA) v použitém pufru. 0,5 ml každého kalibračního roztoku bylo zpracováno stejným způsobem jako při stanovení aktivity enzymu. Pro výpočet enzymové aktivity byl použit vzorec

$$\mu\text{kat/l} = \frac{\left(\frac{A_{415} \cdot \text{faktor} \cdot 5000}{t(\text{min}) \cdot 0,9} \right)}{60}, \text{ kde } A_{415} \text{ byla absorbance vzorku v čase } t. \text{ Faktor byl}$$

stanoven jako směrnice přímky $y = ax + b$ kalibračních roztoků 6-APA, kde faktor byl určen jako písmeno a v rovnici. Reakce 6-APA s PDAB je zobrazena na Obr.25.

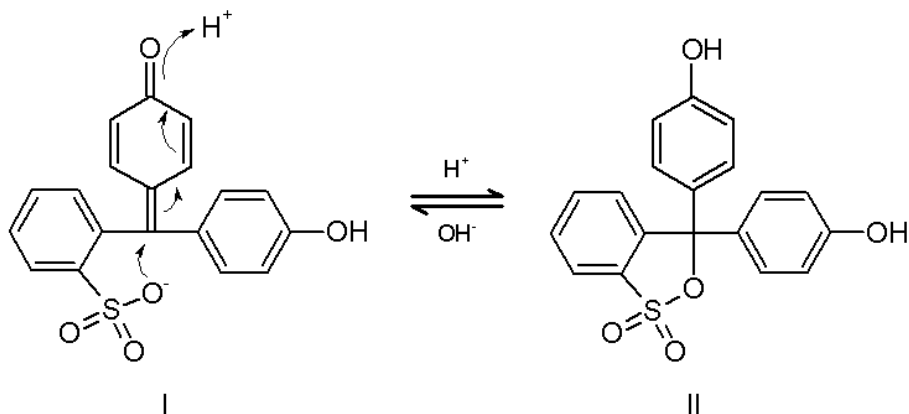


Obr.25 Reakce 6-aminopenicilánové kyseliny s *p*-dimethylaminobenzaldehydem, při které vzniká žlutý produkt (přepřacováno podle Yatsimirskaya et al., 1995).

4. 3. 2. Stanovení aktivity enzymu II

Stanovení aktivity enzymu se provádělo spektrofotometrickou metodou za použití barviva Fenolu Red, které mění svoji barvu v závislosti na pH. Se vznikajícími kyselinami se tedy pH reakční směsi snižuje a barva přechází z červené na žlutou. Reakční směs v květetě byla vytvořena smícháním 13,3 μl 0,3 % Fenolu Red v pufru (0,05 mol.l⁻¹, Na-Pi, pH = 8), 1500 μl 45 mmol.l⁻¹ draselné soli penicilinu G v pufru, 100 μl zásobního roztoku enzymu (12,7 mg.ml⁻¹)

a 386,7 μl používaného pufru. Před smícháním enzymu s reakční směsí byly obě složky vytemperovány na 37 $^{\circ}\text{C}$. Za současného míchání reakční směsi byla měřena absorbance při 430 nm po 10 s po dobu 5 minut. K vypočtení aktivity PGA byla vytvořena kalibrační přímka závislosti absorbance na koncentraci PAA (2, 4, 6, 8 a 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ v používaném pufru). Reakce Fenolu Red je zobrazena na Obr.26 a Obr.27.



Obr.26 I) Alkalická forma Fenolu Red; II) Kyselá forma Fenolu Red

(http://en.wikipedia.org/wiki/File:Phenol_red_-_acid_base_equilibria.gif).



Obr.27 Přechod barev Fenolu Red ze žluté (kyselé pH) přes oranžovou (neutrální pH) po červenou (bazické pH). Efektivní rozsah Fenolu Red je u pH 6,8 – 8,4

(<http://fphoto.photoshelter.com/image/I00004JmkWfIXyE>).

4. 3. 3. Stanovení koncentrace proteinu

Ke stanovení koncentrace celkových proteinů v zásobním roztoku byla použita metoda Bradfordové. Stanovení bylo prováděno na mikrodestičkovém readru. Do jamek bylo pipetováno postupně 45 μl deionizované H_2O , 5 μl standardu nebo vzorku proteinu a 200 μl pracovního roztoku činidla Bradfordové. Pracovní roztok činidla Bradfordové byl připraven

smícháním zásobního roztoku Coomassie Brilliant Blue G250 a deionizované vody v poměru 1:4. Zásobní roztok Coomassie Brilliant Blue G250 byl připraven rozpuštěním 50 mg Coomassie Brilliant Blue G250 v 25 ml methanolu a 50 ml 85 % kyseliny fosforečné a byl doplněn do 100 ml deionizovanou vodou. Jako standardy byly použity roztoky BSA o různých koncentracích (1; 5; 10; 25; 50; 75; 100; 200; 300; 400; 500; 750; 1000; 1500; 2000 µg/ml). Byly stanoveny proteiny v zásobním komerčním roztoku enzymu (25 x, 50 x a 100 x zředěný). Destička byla mírně protřepána, ponechána minimálně 5 min pro vyvíjení zbarvení a poté byla proměřena absorbance při 595 nm.

4. 3. 4. SDS-PAGE

Pro zjištění proteinového složení v zásobním roztoku enzymu byla provedena vertikální SDS-PAGE. Gel byl připraven smícháním roztoku akrylamidu (30 % (w/v)) a N,N'-metylenbisakrylamidu (0,8 % (w/v)). Jako pufr do dělicího gelu byl použit Tris / HCl 1,5 mol.l⁻¹ pH 8,8 pufr a jako pufr do zaostřovacího gelu Tris / HCl 0,5 mol.l⁻¹ pH 6,8 pufr. Dále byl použit 10 % dodecylsírán sodný (SDS) a persíran amonný (APS) a N,N, N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED). Spodní gel byl převrstven vodou nasyceným n-butanolem. Jako elektrodový pufr byl zvolen 0,025 mol.l⁻¹ Tris, 0,192 mol.l⁻¹ glycin, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,3. Složení dělicího a zaostřovacího gelu je uvedeno v Tab.9.

Tab.9 Složení separačního a zaostřovacího gelu. Objemy jsou uvedeny v ml pro současně dva gely.

Typ gelu	AA/BIS 30%/0,8%	Tris/HCl 1,5 mol.l ⁻¹ pH 8,8	Tris/HCl 0,5 mol.l ⁻¹ pH 6,8	H ₂ O	SDS	TEMED	start APS
dělicí	3,4	2,5	-	3,8	0,1	0,01	0,07
zaostřovací	1,3	-	2,5	5,9	0,2	0,02	0,12

Vzorkovací pufr byl připraven jako 0,125 mol.l⁻¹ Tris / HCl, 4 % (w/v) SDS, 20 % (w/v) glycerol, 0,2 M DTT, 20 % (w/v) bromfenolová modř, pH 6,8. Do jamek bylo pipetováno 20 µl připravených vzorků různě zředěných (10; 8,47; 7,26 a 6,35 x) a smíchaných se stejným množstvím vzorkovacího pufru a stejným množstvím 10 % SDS. Elektroforéza probíhala nejprve při napětí 100 V a po doputování bromfenolové modři na rozhraní zaostřovacího a dělicího gelu bylo napětí nastaveno na 200 V. Pro barvení byl použit roztok 0,1 % CBB R-250 v 15 % kys. octové a 45 % methanolu a ve vodě. Pro odbarvení byl použit roztok 40 % methanolu s 10 % kys. octovou ve vodě. Jako markery molekulových hmotností byly použity

Sigma-Aldrich markery (SDS6H2) s molekulovými hmotnostmi 30000 – 200000 (29000; 45000; 66000; 97000; 116000; 200000). Po odbarvení byl gel umístěn na skleněnou desku a vyfocen.

4. 3. 5. MALDI-TOF MS

Před použitím byl gel několikrát promyt deionizovanou vodou pro odstranění solí z gelu. Pro identifikaci byly jednotlivé bandy vyřezány z gelu a rozřezány asi na 3-4 kousky. Kousky byly vysušeny 150 μl acetonitrilu. Po odsátí acetonitrilu bylo ke kouskům přidáno 50 μl 10 mmol.l^{-1} roztoku dithiotreitolu v 0,1 mol.l^{-1} NH_4HCO_3 a mikrozkušavky byly inkubovány 30 min při 56 $^\circ\text{C}$. Po inkubaci byly kousky znovu vysušeny acetonitrem a po odsátí bylo ke kouskům přidáno 50 μl 55 mmol.l^{-1} roztoku jodoacetamidu v 0,1 mol.l^{-1} NH_4HCO_3 . Mikrozkušavky byly inkubovány ve tmě 20 min. Po inkubaci byly kousky gelu znovu vysušeny acetonitrem. Po odsátí acetonitrilu byly mikrozkušavky dány do vakuové centrifugy na 20 min pro dokonalé odstranění acetonitrilu. Po dokonalém odsátí bylo do mikrozkušavek přidáno 30 μl 2 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ roztoku stachyosou modifikovaného trypsinu v 50 mmol.l^{-1} NH_4HCO_3 a kousky gelu se nechaly rehydratovat 60 min. Rehydratace byla prováděna v chladícím boxu, aby nedošlo k předčasné aktivaci enzymu. Po rehydrataci se přebytečná kapalina odsála a ke kouskům bylo přidáno 20 μl 50 mmol.l^{-1} NH_4HCO_3 , aby nedošlo k vyschnutí gelu. Mikrozkušavky se nechaly inkubovat přes noc při 37 $^\circ\text{C}$.

Další den byly vzorky smíchány se 100 μl roztoku kyselina mravenčí (5%), acetonitrilu (30%) a vody a byly inkubovány 15 min při 37 $^\circ\text{C}$ s protřepáváním. Po krátké centrifugaci byl supernatant přepipetován do nové mikrozkušavky a ke zbylým kouskům gelu byl znova přidán roztok. Tento krok byl proveden 2x a poté byl roztok odpařen na vakuové odparce při 30 $^\circ\text{C}$. Vzorek byl rozpuštěn v 10 μl TFA (0,1 % trifluoroctová kyselina). Na destičku AnchorChip bylo technikou vysušené kapky nanášeno 0,8 μl vzorku a matrice (α -kyanoskořicová) a 0,5 μl monoisotopických standardů. Po uschnutí (asi 20 min) byly vzorky změřeny. K analýze vzorků byly použity softwary flexControl 3.0, flexAnalysis 3.0, BioTools 3.2, mMass a databázový software Mascot.

4. 3. 6. Imobilizace PGA adsorpcí

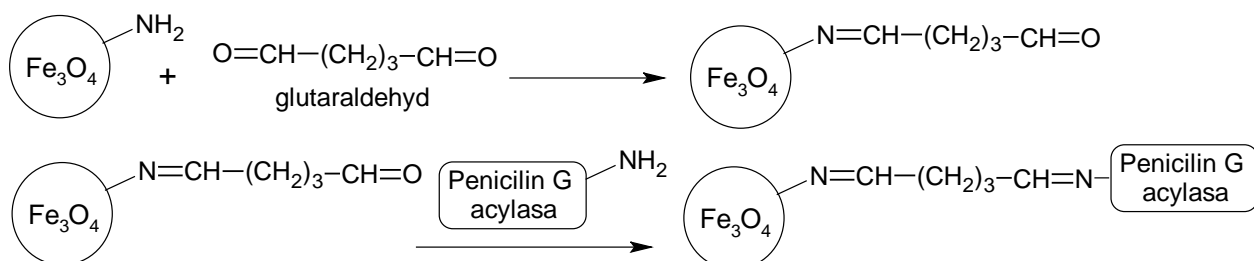
Do 0,6 ml ependorfky bylo naváženo 15 mg magnetických mikročástic nebo nanočástic obalených chitosanem. Poté bylo přidáno 100 μl pufru (0,05 mol.l^{-1} , Na-P_i , $\text{pH} = 8$) a 200 μl zásobního roztoku PGA (12,7 mg.ml^{-1}). Směs byla protřepávána při 4 $^\circ\text{C}$ v lednici pomocí automatického rotátoru do dalšího dne. Magnetické částice byly odděleny od roztoku magnetickým separátorem, zbylý roztok byl odpipetován a částice byly 10 x promyty, aby zde nezůstal nenavázaný enzym. U supernatantu po promytí byla zkoušena aktivita PGA.

4. 3. 7. Imobilizace PGA adsorpcí z následným zesítováním

Do 0,6 ml ependorfky bylo naváženo 15 mg magnetických mikročástic nebo nanočástic obalených chitosanem. Poté bylo přidáno 100 μl pufru ($0,05 \text{ mol.l}^{-1}$, Na-P_i, pH = 8) a 200 μl zásobního roztoku PGA ($12,7 \text{ mg.ml}^{-1}$). Směs byla protřepávána při 4 °C v lednici pomocí automatického rotátoru do dalšího dne. Magnetické částice byly odděleny od roztoku magnetickým separátorem, zbylý roztok byl odpipetován a magnetické částice byly jednou propláchnuty stejným pufrem, aby nedocházelo k vymytí enzymu. Do ependorfky bylo následně napipetováno 200 μl 3% glutaraldehydu v pufru ($0,05 \text{ mol.l}^{-1}$, Na-P_i, pH = 8) a 100 μl stejného pufru pro lepší promíchávání při protřepávání. Směs byla protřepávána při 4 °C pomocí automatického rotátoru do dalšího dne. Magnetické částice byly odděleny od roztoku magnetickým separátorem, zbylý roztok byl odpipetován a částice byly 10 x promyty, aby zde nezůstal nenavázaný enzym. U supernatantu po promytí byla zkoušena aktivita PGA.

4. 3. 8. Imobilizace PGA pomocí glutaraldehydu

Do 0,6 ml ependorfky bylo naváženo 15 mg magnetických mikročástic nebo nanočástic obalených chitosanem. Poté bylo přidáno 200 μl 5% glutaraldehydu ve vodě a směs byla protřepávána při 4 °C v lednici nebo při laboratorní teplotě pomocí automatického rotátoru do dalšího dne. Magnetické částice byly odděleny od roztoku magnetickým separátorem, zbylý roztok byl odpipetován a částice byly 10 x promyty pufrem ($0,05 \text{ mol.l}^{-1}$, Na-P_i, pH = 8), aby zde nezůstal žádný nenavázaný glutaraldehyd, který by mohl zesítovat poté přidáný enzym. Do ependorfky bylo následně napipetováno 100 μl stejného pufru a 200 μl zásobního roztoku PGA ($12,7 \text{ mg.ml}^{-1}$). Směs byla protřepávána při 4 °C v lednici pomocí automatického rotátoru do dalšího dne. Magnetické částice byly odděleny od roztoku magnetickým separátorem, zbylý roztok byl odpipetován a částice byly 10 x promyty pufrem ($0,05 \text{ mol.l}^{-1}$, Na-P_i, pH = 8), aby zde nezůstal nenavázaný enzym. U supernatantu po promytí byla zkoušena aktivita PGA. Proces imobilizace je zobrazen na Obr.28.



Obr.28 Imobilizace PGA na magnetické mikročástice nebo nanočástice obalené chitosanem pomocí glutaraldehydu.

4. 3. 9. Imobilizace PGA pomocí karbodiimidu

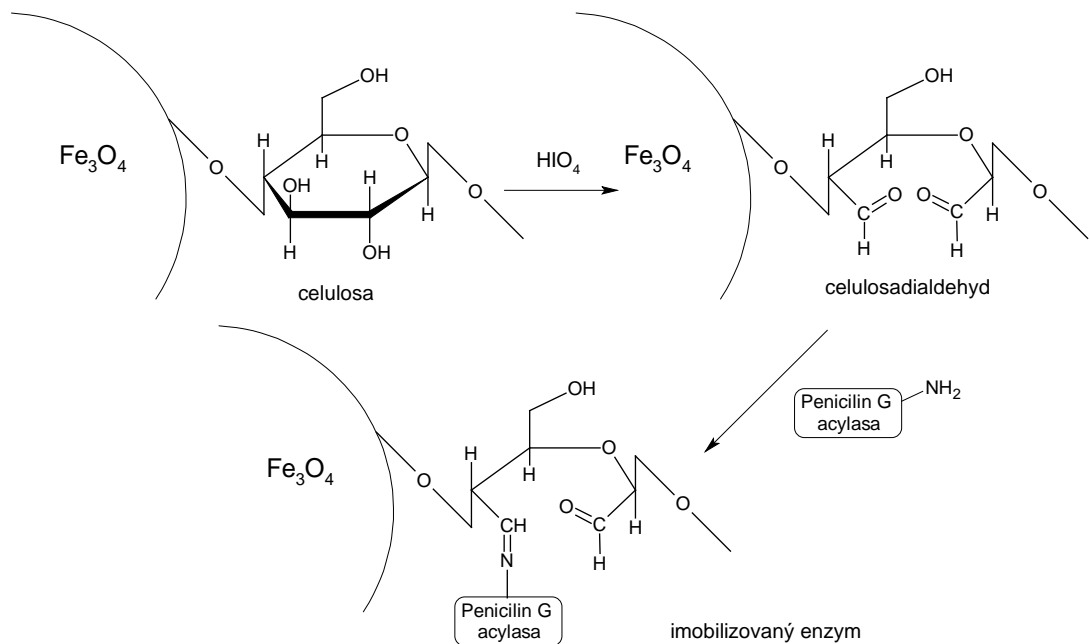
Do 0,6 ml ependorfky bylo naváženo 15 mg magnetických nanočástic obalených chitosanem. Poté bylo přidáno 100 μl 26 mmol.l^{-1} roztoku EDC.HCl v pufru (0,05 mol.l^{-1} , Na-P_i, pH = 7), 100 μl 52 mmol.l^{-1} roztoku NHS ve stejném pufru a 200 μl zásobního roztoku PGA (12,7 mg.ml^{-1}). Směs byla protřepávána při 4 °C v lednici pomocí automatického rotátoru do dalšího dne. Magnetické nanočástice byly odděleny od roztoku magnetickým separátorem, zbylý roztok byl odpipetován a nanočástice byly 10 x promyty puftrem (0,05 mol.l^{-1} , Na-P_i, pH = 8), aby zde nezůstal nenavázaný enzym. U supernatantu po promytí byla zkoušena aktivita PGA.

4. 3. 10. Imobilizace PGA pomocí 1,4-butandioldiglycidyletheru

Do 0,6 ml ependorfky bylo naváženo 15 mg magnetických nanočástic obalených chitosanem. Poté bylo přidáno 200 μl 3 % roztoku 1,4-butandioldiglycidyletheru v 0,5 mol.l^{-1} roztoku NaOH. Směs byla protřepávána při 4 °C v lednici nebo při laboratorní teplotě pomocí automatického rotátoru do dalšího dne. Magnetické nanočástice byly odděleny od roztoku magnetickým separátorem, zbylý roztok byl odpipetován a mikročástice byly 10 x promyty puftrem (0,05 mol.l^{-1} , Na-P_i, pH = 8), aby zde nezůstal žádný zbylý roztok. Do ependorfky bylo následně napipetováno 200 μl zásobního roztoku PGA (12,7 mg.ml^{-1}). Směs byla protřepávána při 4 °C v lednici pomocí automatického rotátoru do dalšího dne. Magnetické nanočástice byly odděleny od roztoku magnetickým separátorem, zbylý roztok byl odpipetován a nanočástice byly 10 x promyty, aby zde nezůstal nenavázaný enzym. U supernatantu po promytí byla zkoušena aktivita PGA.

4. 3. 11. Imobilizace PGA pomocí jodistanu

Do 0,6 ml ependorfky bylo naváženo 15 mg magnetických mikročástic (Perlosa MG 100 nebo Perlosa MG 200) a k nim bylo napipetováno 600 μl 0,1 mol.l^{-1} NaIO₄ ve vodě. Směs byla protřepávána při 4 °C v lednici nebo při laboratorní teplotě pomocí automatického rotátoru do dalšího dne. Magnetické mikročástice byly odděleny od roztoku magnetickým separátorem, zbylý roztok byl odpipetován a mikročástice byly 10 x promyty puftrem (0,05 mol.l^{-1} , Na-P_i, pH = 8), aby zde nezůstal žádný jodistan. Do ependorfky bylo následně napipetováno 100 μl pufru (0,05 mol.l^{-1} , Na-P_i, pH = 8) a 200 μl zásobního roztoku PGA (12,7 mg.ml^{-1}). Směs byla protřepávána při 4 °C v lednici pomocí automatického rotátoru do dalšího dne. Magnetické mikročástice byly odděleny od roztoku magnetickým separátorem, zbylý roztok byl odpipetován a mikročástice byly 15 x promyty puftrem (0,05 mol.l^{-1} , Na-P_i, pH = 8), aby zde nezůstal nenavázaný enzym. U supernatantu po promytí byla zkoušena aktivita PGA. Proces imobilizace je zobrazen na Obr.29.



Obr.38 Imobilizace PGA na magnetické mikročástičce (Perlosa MG 100 nebo Perlosa MG 200) pomocí jodistanu (přepřacováno podle Namdeo a Bajpai, 2009).

4. 3. 12. Imobilizace PGA pomocí jodistanu a borohydridu sodného

Do 0,6 ml ependorfky bylo naváženo 15 mg magnetických mikročástiček (Perlosa MG 200) a k nim bylo napipetováno 600 μl 0,1 mol.l^{-1} NaIO_4 ve vodě. Směs byla protřepávána při 4 °C v lednici nebo při laboratorní teplotě pomocí automatického rotátoru do dalšího dne. Magnetické mikročástičky byly odděleny od roztoku magnetickým separátorem, zbylý roztok byl odpipetován a mikročástičky byly 10 x promyty pufrům (0,05 mol.l^{-1} , Na-P_i , $\text{pH} = 8$), aby zde nezůstal žádný jodistan. Do ependorfky bylo následně napipetováno 100 μl pufru (0,05 mol.l^{-1} , Na-P_i , $\text{pH} = 8$) a 200 μl zásobního roztoku PGA (12,7 mg.ml^{-1}). Směs byla protřepávána při 4 °C v lednici pomocí automatického rotátoru do dalšího dne. Magnetické mikročástičky byly odděleny od roztoku magnetickým separátorem a bylo k nim přidáno 300 μl 0,08 mol.l^{-1} NaBH_4 . Směs byla protřepávána při 4 °C v lednici pomocí automatického rotátoru do dalšího dne. Magnetické mikročástičky byly odděleny od roztoku magnetickým separátorem, zbylý roztok byl odpipetován a mikročástičky byly 15 x promyty pufrům (0,05 mol.l^{-1} , Na-P_i , $\text{pH} = 8$), aby zde nezůstal nenavázaný enzym. U supernatantu po promytí byla zkoušena aktivita PGA.

4. 3. 13. Stanovení Michaelisovy konstanty (K_m)

Ke stanovení Michaelisovy konstanty (K_m) byl použit 25 x zředěný zásobní roztok enzymu a 27; 55; 82; 110; 137 a 164 mmol.l⁻¹ koncentrace substrátu. Stanovení probíhalo stejným způsobem jako metoda stanovení aktivity enzymu I. Pomocí spektrofotometru byla změřena absorbance barevného produktu. Hodnoty byly použity k sestavení Lineweaver-Burkova grafu a z rovnice byla vypočítána Michaelisova konstanta. Stanovení K_m bylo provedeno stejným způsobem i u imobilizovaného enzymu. Pro toto stanovení byl enzym imobilizován pomocí jodistanu na magnetických mikročásticích Perlosa MG 100.

4. 3. 14. Operační stabilita imobilizované PGA

Magnetické mikročástice s imobilizovanou PGA byly přeneseny do zkumavky, kde k nim byly napipetovány 2 ml pufru (0,05 mol.l⁻¹, Na-P_i, pH = 8) a směs byla temperována 5 min ve vodní lázni na 37 °C. Aktivita imobilizované PGA byla určena metodou stanovení aktivity enzymu I. Aktivita PGA po prvním měření byla označena jako 100 %. Poté byly mikročástice 7x promyty, aby zde nezůstaly některé komponenty reakční směsi, které by ovlivňovaly další měření. Mikročástice byly poté použity pro další měření, které probíhalo stejným způsobem. Takto bylo provedeno osm měření.

4. 3. 15. Stanovení závislosti aktivity PGA na teplotě inkubace

Roztoky volné a imobilizované penicilin G acylasa v pufru (0,05 mol.l⁻¹, Na-P_i, pH = 8) byly inkubovány při sedmi různých teplotách (4 °C, 22 °C, 30 °C, 37°C, 45 °C, 50 °C a 60 °C) po dobu 30 minut. PGA byla imobilizována pomocí jodistanu na magnetických mikročásticích Perlosa MG 100. Po inkubaci byly roztoky ponechány při skladovací teplotě 4 °C. Pro určení aktivity obou penicilin G acylas byla použita metoda stanovení aktivity enzymu I s 5 minutovou inkubací enzymů při 37 °C před začátkem reakce. Pro srovnání teplotní stability volné a imobilizované PGA byla určena hodnota T_{50} , což je teplota, při které si enzym zachovává 50 % aktivitu oproti nejvyšší naměřené hodnotě aktivity.

4. 3. 16. Stanovení závislosti aktivity PGA na pH

Aktivita volné a imobilizované penicilin G acylasy byla určena metodou stanovení aktivity enzymu I. U této metody byl použitý pufr zaměněn za Britton-Robinsonův pufr různých hodnot pH (1,98; 2,87; 4,10; 5,02; 6,09; 7,00; 7,96; 8,95; 9,91; 11,20 a 11,98). PGA byla imobilizována pomocí jodistanu na magnetických mikročásticích Perlosa MG 100.

4. 3. 17. Funkční stabilita PGA

U volné PGA a imobilizované PGA pomocí jodistanu na magnetických mikročástečích Perlosa MG 100 byla změřena funkční stabilita enzymu. Mikročástečice s navázaným enzymem byly přeneseny do zkumavky, kde k nim byly napipetovány 2 ml pufru ($0,05 \text{ mol.l}^{-1}$, Na-P_i, pH = 8) a směs byla temperována 5 min ve vodní lázni na 37 °C. U takto imobilizovaného enzymu a u volné PGA byla změřena aktivita pomocí metody stanovení aktivity enzymu I. Po třech hodinách skladování při laboratorní teplotě (22 °C) byla změřena aktivita u dalšího vzorku imobilizovaného a volného enzymu a tímto způsobem bylo po 48 hodin provedeno sedm měření.

4. 3. 18. Stabilita při skladování

PGA byla imobilizována pomocí jodistanu na magnetických mikročástečích Perlosa MG 100. Bylo připraveno 18 vzorků. Ihned po imobilizaci byla změřena aktivita prvních třech vzorků a ostatní vzorky byly uchovávány při 4 °C v lednici. Mikročástečice s navázaným enzymem byly poté přeneseny do zkumavky, kde k nim byly napipetovány 2 ml pufru ($0,05 \text{ mol.l}^{-1}$, Na-P_i, pH = 8) a směs byla temperována 5 min ve vodní lázni na 37 °C. U takto imobilizovaného enzymu byla změřena aktivita pomocí metody stanovení aktivity enzymu I. Po 14 dnech skladování při 4 °C v lednici byla změřena aktivita u dalších třech vzorků imobilizovaného enzymu a tímto způsobem bylo provedeno šest měření.

6. Literatura

- Abian O., Grazú V., Hermoso J., González R., García J. L., Fernández-Lafuente R., Guisán J. M. (2004) Stabilization of penicillin G acylase from *Escherichia coli*: site-directed mutagenesis of the protein surface to increase multipoint covalent attachment. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 1249-1251.
- Adikane H. V., Thakar D. M. (2010) Studies of penicillin G acylase immobilization using highly porous cellulose-based polymeric membrane. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **160**, 1130-1145.
- Barends T. R. M., Yoshida H., Dijkstra B. W. (2004) Three-dimensional structures of enzymes useful for β -lactam antibiotic production. *Curr. Opin. Biotechnol.* **15**, 356–363.
- Bernardino S., Estrela N., Ochoa-Mendes V., Fernandes P., Fonseca L. P. (2011) Optimization in the immobilization of penicillin G acylase by entrapment in xerogel particles with magnetic properties. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **58**, 545-556.
- Bertucci C., Bartolini M., Gotti R., Andrisano V. (2003) Drug affinity to immobilized target bio-polymers by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *J. Chromatogr., B* **797**, 111–129.
- Bílková Z., Slováková M., Lyčka A., Horák D., Lenfeld J., Turková J., Churáček J. (2002) Oriented immobilization of galactose oxidase to bead and magnetic bead cellulose and poly(HEMA-co-EDMA) and magnetic poly(HEMA-co-EDMA) microspheres. *J. Chromatogr., B* **770**, 25-34.
- Burns K. L., May S. W. (2003) Separation methods applicable to the evaluation of enzyme–inhibitor and enzyme–substrate interactions. *J. Chromatogr., B* **797**, 175–190.
- Cai G., Zhu S., Yang S., Zhao G., Jiang W. (2004) Cloning, overexpression and characterization of a novel thermostable penicillin G acylase from *Achromobacter xylosoxidans*: probing the molecular basis for its high thermostability. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 2764-2770.
- Cao L., Langen L., Sheldon R. A. (2003) Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free? *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**, 387–394.
- Davis B. G., Boyer V. (2001) Biocatalysis and enzymes in organic synthesis. *Nat. Prod. Rep.* **18**, 618–640.
- Elnashar M. M. M., Yassin M. A., Kahil T. (2008) Novel thermally and mechanically stable hydrogel for enzyme immobilization of penicillin G acylase via covalent technique. *J. Appl. Polym. Sci.* **109**, 4105-4111.
- Fernandez-Lafuente R. (2009) Stabilization of multimeric enzymes: Strategies to prevent subunit dissociation. *Enzyme Microb. Technol.* **45**, 405–418.

- Giordano R.C., Ribeiro M. P. A., Giordano R. L. C. (2006) Kinetics of β -lactam antibiotics synthesis by penicillin G acylase (PGA) from the viewpoint of the industrial enzymatic reactor optimization. *Biotechnol. Adv.* **24**, 27-41.
- Girelli A. M., Mattei E. (2005) Application of immobilized enzyme reactor in on-line high performance liquid chromatography: A review. *J. Chromatogr., B* **819**, 3–16.
- Haginaka J. (2008) Recent progresses in protein-based chiral stationary phases for enantioseparations in liquid chromatography. *J. Chromatogr., B* **875**, 12–19.
- Hernandez K., Fernandez-Lafuente R. (2011) Control of protein immobilization: Coupling immobilization and site-directed mutagenesis to improve biocatalyst or biosensor performance. *Enzyme Microb. Technol.* **48**, 107–122.
- http://en.wikipedia.org/wiki/File:Phenol_red_-_acid_base_equilibria.gif, 12. dubna 2012.
- <http://fphoto.photoshelter.com/image/I00004JmkWflXyE>, 12. dubna 2012.
- Huang J., Li X., Zheng Y., Zhang Y., Zhao R., Gao X., Yan H. (2008) Immobilization of penicillin G acylase on poly[(glycidyl methacrylate)-co-(glycerol monomethacrylate)]-grafted magnetic microspheres. *Macromol. Biosci.* **8**, 508–515.
- Hudson S., Cooney J., Magner E. (2008) Proteins in mesoporous silicates. *Angew. Chem., Int. Ed.* **47**, 8582 – 8594.
- Chandel A. K., Rao L. V., Narasu M. L., Singh O. V. (2008) The realm of penicillin G acylase in β -lactam antibiotics. *Enzyme Microb. Technol.* **42**, 199–207.
- Chen Ch., Ko Y., Shieh Ch., Liu Y. (2011) Direct penicillin G acylase immobilization by using the self-prepared immobilized metal affinity membrane. *J. Membr. Sci.* **380**, 34-40.
- Cheng S., Wei D., Song Q., Zhao X. (2006) Immobilization of permeabilized whole cell penicillin G acylase from *Alcaligenes faecalis* using pore matrix crosslinked with glutaraldehyde. *Biotechnol. Lett.* **28**, 1129-1133.
- Illanes A., González J. M., Gómez J. M., Valencia P., Wilson L. (2010) Diffusional restrictions in glyoxyl-agarose immobilized penicillin G acylase of different particle size and protein loading. *Electron. J. Biotechnol.* **13**, 1-9.
- Jin X., Wu Q., Chen Q., Chen Ch., Lin X. (2008) Immobilization of penicillin G acylase on a composite carrier with a biocompatible microenvironment of chitosan. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **83**, 1710-1716.
- Kallenberg A. I., Rantwijk F., Sheldon R. A. (2005) Immobilization of penicillin G acylase: The key to optimum performance. *Adv. Synth. Catal.* **347**, 905 –926.
- Klei H. E., Daumy G. O., Kelly J. A. (1995) Purification and preliminary crystallographic studies of penicillin G acylase from *Providencia rettgeri*. *Protein Sci.* **4**, 433-441.
- Lee Ch., Lin T., Mou Ch. (2009) Mesoporous materials for encapsulating enzymes. *Nano Today* **4**, 165-179.

- Liljeblad A., Kanerva L. T. (2006) Biocatalysis as a profound tool in the preparation of highly enantiopure β -amino acids. *Tetrahedron* **62**, 5831–5854.
- Luo X., Zhang L. (2010) Immobilization of penicillin G acylase in epoxy-activated magnetic cellulose microspheres for improvement of biocatalytic stability and activities. *Biomacromolecules* **11**, 2896-2903.
- Massolini G., Temporini C., Calleri E. (2008) Penicillin G acylase as chiral selector in LC and CE: Exploring the origins of enantioselectivity. *J. Chromatogr., B* **875**, 20–29.
- Mateo C., Palomo J. M., Fuentes M., Betancor L., Grazu V., López-Gallego F., Pessela B. C., Hidalgo A., Fernández-Lorente G., Fernández-Lafuente R., Guisán J. M. (2006) Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. *Enzyme Microb. Technol.* **39**, 274-280.
- McLanahan E. D. <http://evad.myweb.uga.edu/bcmb8010/mclanahan.pdf>; 28. března 2012.
- McVey C. E., Walsh M. A., Dodson G. G., Wilson K. S., Brannigan J. A. (2001) Crystal structures of penicillin acylase enzyme-substrate complexes: Structural insights into the catalytic mechanism. *J. Molecul. Biol.* **313**, 139-150.
- Montes T., Grazu V., Manso I., Galán B., López-Gallego F., González R., Hermoso J. A., García J. L., Guisán J. M., Fernández-Lafuente R. (2007) Improved stabilization of genetically modified penicillin G acylase in the presence of organic cosolvents by co-immobilization of the enzyme with polyethyleneimine. *Adv. Synth. Catal.* **349**, 459-464.
- Namdeo M., Bajpai S. K. (2009) Immobilization of α -amylase onto cellulose-coated magnetite (CCM) nanoparticles and preliminary starch degradation study. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **59**, 134-139.
- Plháčková K., Bečka S., Škrob F., Kyslík P. (2003) Isolation and characterization of a new strain of *Achromobacter* sp. with β -lactam antibiotic acylase activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62**, 507–516.
- Powell K. A., Ramer S. W., Cardayré S. B., Stemmer W. P. C., Tobin M. B., Longchamp P. F., Huisman G. W. (2001) Directed Evolution and Biocatalysis. *Angew. Chem., Int. Ed.* **40**, 3948-3959.
- Rajendhran J., Gunasekaran P. (2004) Recent biotechnological interventions for developing improved penicillin G acylases. *J. Biosci. Bioeng.* **97**, 1-13.
- Roessl U., Nahálka J., Nidetzky B. (2010) Carrier-free immobilized enzymes for biocatalysis. *Biotechnol. Lett.* **32**, 341–350.
- Rzaev Z. M. O., Dinçer S., Pişkin E. (2007) Functional copolymers of N-isopropylacrylamide for bioengineering applications. *Prog. Polym. Sci.* **32**, 534–595.
- Shah P., Sridevi N., Prabhune A., Ramaswamy V. (2008) Structural features of penicillin acylase adsorption on APTES functionalized SBA-15. *Microporous Mesoporous Mater.* **116**, 157-165.

- Shewale J. G., Sudhakaran V. K. (1997) Penicillin V acylase: Its potential in the production of 6-aminopenicillanic acid. *Enzyme Microb. Technol.* **20**, 402-410.
- Shi B., Wang Y., Ren J., Liu X., Zhang Y., Guo Y., Guo Y., Lu G. (2010) Superparamagnetic aminopropyl-functionalized silica core-shell microspheres as magnetically separable carriers for immobilization of penicillin G acylase. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **63**, 50-56.
- Silva J. A., Neto E. H. C., Adriano W. S., Ferreira A. L. O., Gonçalves L. R. B. (2008) Use of neural networks in the mathematical modelling of the enzymic synthesis of amoxicillin catalysed by penicillin G acylase immobilized in chitosan. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 1761-1767.
- Simons H., Gibson T. D. (1999) Rapid continuous colorimetric enzyme assay for penicillin G acylase. *Biotechnol. Tech.* **13**, 365-367.
- Sio Ch. F., Quax W. J. (2004) Improved β -lactam acylases and their use as industrial biocatalysts. *Curr. Opin. Biotechnol.* **15**, 349-355.
- Sun J., Zhou Y., Yuan Z., Xu G. (2009) Immobilization of *Alcaligenes faecalis* penicillin G acylase on epoxy-type supports. *Appl. Biochem. Microbiol.* **45**, 478-483.
- Škrob F., Bečka S., Plháčková K., Fotopulosová V., Kyslík P. (2003) Novel penicillin G acylase from *Achromobacter* sp. CCM 4824. *Enzyme Microb. Technol.* **32**, 738-744.
- Tischer W., Wedekind F. (1999) Immobilized enzymes: Methods and applications. *Top. Curr. Chem.* **200**, 95-126.
- Wang W., Deng L., Peng Z. H., Xiao X. (2007b) Study of the epoxydized magnetic hydroxyl particles as a carrier for immobilizing penicillin G acylase. *Enzyme Microb. Technol.* **40**, 255-261.
- Wang Z., Wang L., Xu J., Bao D., Qi H. (2007a) Enzymatic hydrolysis of penicillin G to 6-aminopenicillanic acid in cloud point system with discrete countercurrent experiment. *Enzyme Microb. Technol.* **41**, 121-126.
- Wegman M. A., Janssen M. H. A., Rantwijk F., Sheldon R. A. (2001) Towards biocatalytic synthesis of β -lactam antibiotics. *Adv. Synth. Catal.* **343**, 6-7.
- Xiao Q., Tao X., Zhang J., Chen J. (2006) Hollow silica nanotubes for immobilization of penicillin G acylase enzyme. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **42**, 14-19.
- Xie T., Wang A., Huang L., Li H., Chen Z., Wang Q., Yin X. (2009) Recent advance in the support and technology used in enzyme immobilization. *Afr. J. Biotechnol.* **8**, 4724-4733.
- Xue P., Lu G. Z., Liu W. Y. (2006) Poly(GMA/MA/MBAA) copolymer beads: a highly efficient support immobilizing penicillin G acylase. *Chin. Chem. Lett.* **17**, 129-132.
- Xue P., Xu F., Xu L. (2008) Epoxy-functionalized mesostructured cellular foams as effective support for covalent immobilization of penicillin G acylase. *Appl. Surf. Sci.* **255**, 1625-1630.

- Yatsimirskaya N. T., Sosnovskaya I. N., Yatsimirsky A. K. (1995) Spectrophotometric determination of 6-aminopenicillanic and 7-aminocephalosporanic acids as the schiff bases with para-dimethylaminobenzaldehyde in the presence of sodium dodecyl sulfate micelles. *Anal. Biochem.* **229**, 249-255.
- Zhou H., Li W., Shou Q., Gao H., Xu P., Deng F., Liu H. (2012) Immobilization of penicillin G acylase on magnetic nanoparticles modified by ionic liquids. *Chin. J. Chem. Eng.* **20**, 146-151.
- Zhou H., Yang L., Li W., Shou Q., Xu P., Li W., Wang F., Yu P., Liu H. (2012) Improving the stability of immobilized penicillin G acylase via the modification of supports with ionic liquids. *Ind. Eng. Chem. Res.* **51**, 4582-4590.
- Žuža M. G., Obradović B. M., Knežević-Jugović Z. D. (2011) Hydrolysis of penicillin G by penicillin G acylase immobilized on chitosan microbeads in different reactor systems. *Chem. Eng. Technol.* **34**, 1706-1714.
- Žuža M. G., Šiler-Marinković S. S., Knežević Z. D. (2007) Immobilization of penicillin acylase from *Escherichia coli* on commercial Sepabeads EC-EP carrier. *Acta periodica technologica* **38**, 173-182.
- Žuža M. G., Šiler-Marinković S. S., Knežević Z. D. (2007) Preparation and characterization of penicillin acylase immobilized on sepabeads EC-EP carrier. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly* **13**, 205-210.

7. Seznam použitých zkratek

2-AT	2-thienyloctová kyselina
6-APA	6-aminopenicilánová kyselina
7-ACA	7-aminocefalosporinová kyselina
7-ADCA	7-aminodeacetoxycefalosporinová kyselina
AA	akrylamid
APS	persíran amonný
BIS	N,N'-mythylenbisakrylamid
BRP	bakteriocin uvolňující protein
BSA	hovězí sérový albumin
BSU	N,N'-bis(trimethylsilyl)močovina
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CBB	Coomassie Brilliant Blue
CLEA	zesíťované enzymové agregáty
CLEC	zesíťované enzymové krystaly
CPC	cefalosporin C
CRP	cAMP receptorový protein
DAOC G	deacetoxycefalosporin G
DAOC V	deacetoxycefalosporin V
DMF	dimethylformamid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	dithiotreitol
EDC.HCl	N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid hydrochlorid
G-7-ADCA	fenylacetyl-7-aminodeacetoxycefalosporinová kyselina
GGBP	D-Glucose/D-Galactose-binding protein
GPTS	3-glycidoxypropyltriethoxysilan
HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie
IAA	2-jodacetamid
IDA	iminodioctová kyselina
IMAC	afinitní chromatografie s imobilizovaným kovem
IMAM	afinitní membrána s imobilizovaným kovem
IPTG	isopropylthio- β -D-galaktosid
kcat	katalytická aktivita
K_{cat}	katalytická konstanta
K_m	Michaelisova konstanta

LDH	vrstevnaté dvojité hydroxidy
MALDI	desorpce/ionizace laserem za účasti matrice
MCF	mesoporézní buněčná pěna, mesocelulární křemičitá pěna
MNNG	N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin
MPS	makroporézní křemen
M_r	molekulová hmotnost
MS	hmotnostní spektrometr
MUT	struktura mutantního enzymu
MUT-PG	struktura mutantního enzymu v komplexu s penicilin G
MUT-PGSO	struktura mutantního enzymu v komplexu s penicilin G sulfoxidem
n.a.	nenalezeno
NHS	N-hydroxysukcinimid
NIPAB	2-nitro-5-[(fenylacetyl)amino]benzoová kyselina
NIPAB	6-nitro-3-[(fenylacetyl)amino]benzoová kyselina
PA	penicilin acylasy
PAA	fenyloctová kyselina
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
PDAB	4-(dimethylamino)benzaldehyd
PEI	polyethylenimin
PG	D-(-)-fenylglycin
PG	penicilin G
PGA	penicilin G acylasa
PGSO	penicilin G sulfoxid
PVA	penicilin V acylasa
RBS	vazebné místo ribosomu
R_f	retenční faktor
S/H	poměr syntézy ku hydrolýze
SDS	dodecylsírán sodný
TAT	dvouargininová translokační dráha
TCA	cyklus trikarboxylových kyselin
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TEOS	tetraethylortosilikát
TFA	trifluoroctová kyselina
TOF	analyzátor doby letu
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
WT	wild-typ
WT-PGSO	struktura wild-typu enzymu v komplexu s penicilin G sulfoxidem