

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra botaniky

(2006)



Diplomová práce

Fungální α -*N*-acetylgalaktosaminidasa –
screening, produkce a charakterizace enzymu

Tomáš Filipi

Vedoucí diplomové práce:	Prof. Ing. Vladimír Křen, DrSc.
Garant diplomové práce:	RNDr. Alena Kubátová, CSc.
Studijní obor:	Biologie
Studijní zaměření:	Systematika a ekologie bezcévných rostlin

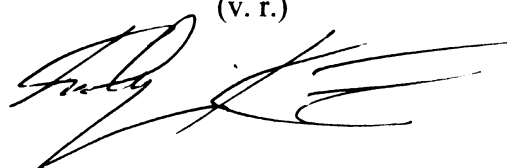
Diplomová práce **Tomáše Filipiho** byla obhájena na katedře botaniky PřF UK v Praze dne 23.5.2006 a ohodnocena klasifikačním stupněm **v ý b o r n ě**.

Prohlašuji, že jsem v předložené diplomové práci použil jen pramenů, které cituji
a uvádím v seznamu použité literatury.

V Říčanech, Strašíně dne 1.5.2006

Podpis: Tomáš Filipi

(v. r.)

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Tomáš Filipi', written in a cursive style.

ABSTRAKT

Extracelulární α -*N*-acetylgalaktosaminidasa byla izolována hlavně ze zvířecích zdrojů a minimálně z mikrobiálních zdrojů (*Clostridium perfringens*, *Aspergillus niger*, *Acremonium* sp. No. 413). Kultivace patogenní bakterie *Clostridium perfringens* je obtížná, protože vyžaduje anaerobní podmínky. Produkční kmeny *Aspergillus niger* a *Acremonium* sp No. 413 nejsou veřejně dostupné a mimoto není zcela jisté, že jsou oba kmeny správně taxonomicky determinovány.

Proto byl proveden screening producentů α -*N*-acetylgalaktosaminidasy vybraných kmenů mikroskopických vláknitých hub z veřejně dostupných sbírek (CCF a CCIM). Za aerobních podmínek byly houby kultivovány v submersním médiu obsahující sójovou mouku jako zdroj uhlíku. Potencionálně dobří producenti α -*N*-acetylgalaktosaminidasy jsou zástupci rodu *Aspergillus* ze sekce *Nigri* a nejlepším producentem α -*N*-acetylgalaktosaminidasy byl *Aspergillus niger* CCIM K2.

α -*N*-Acetylgalaktosaminidasa izolovaná z *Aspergillus niger* CCIM K2 je relativně stabilní v rozmezí pH 2 – 6 a její stabilita při teplotě 35 °C se vzrůstající hodnotou pH klesá. **pH Optimum enzymu je 1,5 při teplotě 35 °C.** Teplotní optimum enzymu je 55 °C při pH 2,5 a 45 °C při pH 1,5. Enzym v přítomnosti redučních činidel merkaptoethanolu a dithiothreitolu vykazuje vysokou stabilitu. Enzym v koncentrovaných roztocích neztrácí aktivitu ani po 14 dnech uchování při teplotě 4 °C. Enzym akceptoval *p*NP- α -GalpNAc a *o*NP- α -GalpNAc jako své substráty.

α -*N*-Acetylgalaktosaminidasa z *Aspergillus niger* CCIM K2 byla v kombinaci katexové (Fractogel EMD SO₃⁻ (S)) a gelové chromatografie (Sephacryl S-200 a Superdex 200) purifikována. Přesto byla v purifikovaném podílu přítomna vedlejší α -galaktosidasová aktivita, která může být způsobena částečnou nespecifitou α -*N*-acetylgalaktosaminidasy, nebo kontaminací α -galaktosidasou. Metodou SDS-PAGE bylo zjištěno, že molekulová velikost majoritní denaturované jednotky α -*N*-acetylgalaktosaminidasy je kolem 116 kDa.

ABSTRACT

Fungal α -*N*-acetylgalactosaminidase – Enzyme screening, production and characterization

Extracellular α -*N*-acetylgalactosaminidase was so far isolated mostly from animal and microbial sources (*Clostridium perfringens*, *Aspergillus niger*, *Acremonium* sp. No. 413). Cultivation of pathogenic bacteria *Clostridium perfringens* was complicated by production of toxins and by the need of anaerobic cultivation. Two published fungal production strains (*Aspergillus niger*, *Acremonium* sp. No. 413) are not available to public and unfortunately they are not taxonomically properly determined.

Therefore, screening for α -*N*-acetylgalactosaminidase in the fungal strains from public collection (CCF, CCIM) was performed. Fungal strains were cultivated in a complex liquid media containing soya flour as inductor under aerobic condition. Good strains from *Nigri* section were found to be producers of α -*N*-acetylgalactosaminidase; the best producer being *Aspergillus niger* CCIM K2

pH Optimum of the enzyme reaction was 1.5 at 35 °C. The enzyme was active over the range pH 2 – 6 and quite unstable at neutral or alkaline pH levels. Temperature optimum of enzymatic reaction was found to be 55 °C at pH 2.5 and 45 °C at pH 1.5. The enzyme was stable in solutions in the presence of mercaptoethanol and dithiothreitol and it was stable over 14 days' storage at 4 °C in concentrated solutions without preservatives. α -*N*-Acetylgalactosaminidase accepted both *p*NP- α -GalpNAc and *o*NP- α -GalpNAc as a substrate.

The purified α -*N*-acetylgalactosaminidase from *Aspergillus niger* CCIM K2 was obtained from cultivation broth by ion-change chromatography (Fractogel EMD SO₃⁻ (S)) and gel chromatography (Sephacryl S-200 and Superdex 200), however α -galactosidase activity was still detectible. This activity could be result of the contamination of α -galactosidase or an intrinsic broader specificity of α -*N*-acetylgalactosaminidase. Molecular mass estimated was approximately 116 kDa by SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) under reducing conditions.

Děkuji svému školiteli Prof. Ing. Vladimíru Křenovi, DrSc. a garantovi RNDr. Aleně Kubátové, CSc. za vedení diplomové práce, za jejich připomínky a cenné podněty.

Dále děkuji všem pracovníkům Laboratoře biotransformací MBÚ AV ČR, zejména Ing. Lence Weignerové, PhD., Ing. Andree Charvátové a paní Ivě Hrdličkové za jejich ochotnou pomoc při práci na řešeném úkolu.

Hlavní díky však patří celé mé rodině, především mým rodičům, kteří mi byli po celou dobu studia oporou a v maximální možné míře mě podporovali a vycházeli mi vstříc.

OBSAH

1. ÚVOD	1
2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1. SACHARIDY	2
2.1.1 α - <i>N</i> -Acetylgalaktosamin	3
2.1.2 Synthesa <i>O</i> -glykoproteinů	3
2.1.3 Výskyt a vlastnosti <i>O</i> -glykoproteinů v biologických systémech	4
2.1.3.1 Muciny	5
2.1.3.2 Proteoglykany	5
2.1.3.3 Sacharidové krevní determinanty systému ABO(H)	6
2.2 GLYKOSIDASY	8
2.2.1 <i>exo</i>-α-<i>N</i>-Acetylgalaktosaminidasa	9
2.2.1.1 Systematické zařazení	9
2.2.1.2 Fylogeneze α - <i>N</i> -acetylgalaktosaminidasy a α -galaktosidasy	10
2.2.1.3 Struktura proteinu	11
2.2.1.4 Reakční mechanismus α - <i>N</i> -acetylgalaktosaminidasy	13
2.2.1.5 Poruchy funkce α - <i>N</i> -acetylgalaktosaminidasy	14
2.2.1.6 Dosavadní výzkum α - <i>N</i> -acetylgalaktosaminidasy	15
2.2.1.6.1 α - <i>N</i> -Acetylgalaktosaminidasa z nemikrobiálních zdrojů	15
2.2.1.6.2 α - <i>N</i> -Acetylgalaktosaminidasa z mikroskopických vláknitých hub	18
2.2.1.6.3 Bakteriální α - <i>N</i> -acetylgalaktosaminidasa	23
2.2.2 Praktické využití glykosidas	24
2.2.2.1 Chemická synthesa glykosidů	24
2.2.2.2 Enzymová synthesa glykosidů	25
3. METODIKA	27
3.1 Kultivace hub	27
3.1.1 Použité kmeny mikroskopických vláknitých hub	27
3.1.2 Kultivační podmínky	28
3.2 Analytické metody	29
3.2.1 Stanovení enzymové aktivity	29
3.2.2 Výpočet koncentrace katalytické aktivity α - <i>N</i> -acetylgalaktosaminidasy	30

3.2.3 pH Optimum a pH stabilita	32
3.2.4 Teplotní optimum a stabilita	32
3.2.5 Vliv redukčních činidel	33
3.2.6 Stanovení koncentrace proteinů dle Bradfordové	33
3.3 Purifikace	33
3.3.1 Zpracování média	33
3.3.2 Ultrafiltrace	33
3.3.3 Sloupcová středotlaká chromatografie	34
3.3.3.1 Hydrofobí chromatografie	34
3.3.3.2 Gelová chromatografie	34
3.3.3.3 Ionexová chromatografie	34
3.4 Elektroforesa	35
3.4.1 SDS-PAGE	35
3.4.2 Detekce a visualisace proteinů	37
4. VÝSLEDKY	38
4.1 Screening produkce extracelulární α-N-acetylgalaktosaminidasy	38
4.1.1 Vliv koncentrace sójové mouky na produkci α -N-acetylgalaktosaminidasy	38
4.1.2 Vliv teploty a rotace na produkci α -N-acetylgalaktosaminidasy	39
4.1.3 Objemové aktivity α -N-acetylgalaktosaminidasy testovaných kmenů hub	39
4.1.4 Vliv změny pH média během kultivace na produkci α -N-acetylgalaktosaminidasy	43
4.2 Optimalisace kultivačních podmínek pro <i>Aspergillus niger</i> CCIM K2	44
4.2.1 Vliv koncentrace sójové mouky na produkci α -N-acetylgalaktosaminidasy	44
4.2.2 Vliv objemu kultivačního média na produkci α -N-acetylgalaktosaminidasy	45
4.2.3 Vliv teploty na produkci α -N-acetylgalaktosaminidasy	47
4.2.4 Vliv výchozího pH média na produkci α -N-acetylgalaktosaminidasy	47
4.2.5 Optimalisované parametry kultivačního média a kultivačních podmínek	48
4.3 Charakterisace vlastností α-N-acetylgalaktosaminidasy z <i>Aspergillus niger</i> CCIM K2	49
4.3.1 Stabilita enzymu při laboratorní teplotě, při 4 °C a při -70 °C	50
4.3.2 pH Optimum α -N-acetylgalaktosaminidasy	51
4.3.3 pH Stabilita α -N-acetylgalaktosaminidasy	52

4.3.4 Teplotní optimum α - <i>N</i> -acetylgalaktosaminidasy	53
4.3.5 Vliv redukčního prostředí na aktivitu α - <i>N</i> -acetylgalaktosaminidasy	54
4.4 Purifikace α-<i>N</i>-acetylgalaktosaminidasy z <i>Aspergillus niger</i> CCIM K2	55
4.4.1 Ultrafiltrace	55
4.4.2 Středotlaká sloupcová kapalinová chromatografie	55
4.4.2.1 Anexová chromatografie (Q-Sepharose)	56
4.4.2.2 Hydrofobní chromatografie (Phenyl-Sepharose)	56
4.4.2.3 Gelová chromatografie (Sephacryl S-200) a (Superdex 200)	56
4.4.2.4 Katexová chromatografie (Fractogel EMD SO ₃ ⁻ (S))	57
4.4.3 Vyhodnocení purifikační procedury	58
4.4.4 Bilanční tabulka	62
4.4.5 SDS-PAGE	63
5. DISKUSE	64
6. ZÁVĚR	71
7. OBRAZOVÁ PŘÍLOHA	72
7.1 Fotografie kolonií hub	73
7.2 Mikrofotografie hub	75
8. SEZNAMY	80
8.1 Seznam použitých chemikálií	80
8.2 Seznam použitých přístrojů a dalšího vybavení	82
8.3 Seznam obrázků, tabulek a grafů	85
8.4 Seznam zkratk a použitých symbolů	87
8.5 Seznam literatury	88

1. ÚVOD

Práce řeší screening a produkci extracelulární *exo- α -N-acetylgalaktosaminidasy* (dále jen *α -N-acetylgalaktosaminidasa*) produkované mikroskopickými vláknitými houbami. *α -N-Acetylgalaktosaminidasa* je u mikrobiálních organismů vzácně se vyskytující enzym, který z *O*-glykosidů selektivně odštěpuje terminálně α -vázaný *N*-acetylgalaktosamin. Tento enzym má značný aplikační potenciál v biomedicíně (konverse determinantů krevní skupiny A na universální 0(H)). Jako součást multienzymových testů by mohla sloužit jako marker k determinaci a taxonomické revisi nejrozličnějších mikrobiálních zástupců. Změnou reakčních podmínek lze uskutečnit *in vitro* syntézu přesně definovaných glykosidů (počet glykosylových jednotek 2 – 4).

Další část práce se zabývá optimalisací kultivačních podmínek a optimalisací složení kultivačního média pro maximalisaci produkce extracelulární *α -N-acetylgalaktosaminidasy* při současném snížení produkce *α -galaktosidasy* a *β -N-acetylglukosaminidasy* produkované kmenem *Aspergillus niger* CCIM K2. Extracelulární *α -N-acetylgalaktosaminidasa* je do kultivačního média produkována pouze inducibilně, a to ve velmi malém množství (setiny – desetitisíciny U.ml⁻¹). Nejlepším induktorem a zároveň zdrojem uhlíku pro produkci *α -N-acetylgalaktosaminidasové*, ale i *α -galaktosidasové* aktivity je odtučněná sójová mouka a deriváty guanidinu (guanidinkarbonát).

Poslední část práce řeší charakterisaci, izolaci a purifikaci extracelulární *α -N-acetylgalaktosaminidasy* produkované *Aspergillus niger* CCIM K2. Cílem je provést základní charakterisaci vlastností enzymu (pH optimum, pH stabilita, teplotní optimum, stabilita při uchování při různých teplotách a stabilita v prostředí redukčních činidel). Dále navrhnout a realizovat vhodnou purifikační proceduru *α -N-acetylgalaktosaminidasy*, pokud možno s vyloučením kroku precipitace proteinů síranem amonným, kterého se běžně používá, ale při kterém také dochází k velkým ztrátám.

2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

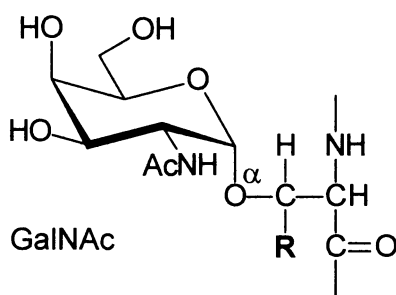
2.1. SACHARIDY

2.1.1 α -*N*-Acetylgalaktosamin

α -*N*-Acetylgalaktosamin plní velmi důležitou úlohu v biologických systémech. Je součástí celé řady klíčových biologických makromolekulárních systémů. α -*N*-Acetylgalaktosamin se nachází v *O*-glykoproteinech a proteoglykanech, které se vyskytují např. v semenné tekutině, v mléce, v žaludeční šťávě, ve slinách a v moči.

Ve výskytu *O*-glykoproteinů lze v savčím organismu nalézt jisté trendy. Plasmatické proteiny jsou velice málo *O*-glykosylovány, na rozdíl od extracelulárních glykoproteinů (leukosialin), kde je substituováno až 85 % všech Ser a Thr residuí [1]. U kvasinek je situace odlišná, u nich jsou proteiny modifikovány pomocí jedné, nebo pěti molekul α -D-mannosy (α -D-mannosa se k aglykonové složce také váže *O*-glykosidovou vazbou přes Ser, nebo Thr). U hub je situace zatím méně probádaná. Lze předpokládat, že zde budou nalezeny analogie s říší Animalia, ale také zde jistě budou nalezeny zcela unikátní strukturní motivy.

Základní strukturní jednotkou těchto *O*-glykosidově vázaných glykoproteidů je 2-acetamido-2-deoxy- α -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow O)-serin/threonin (T_n antigen) (Obr. 1).

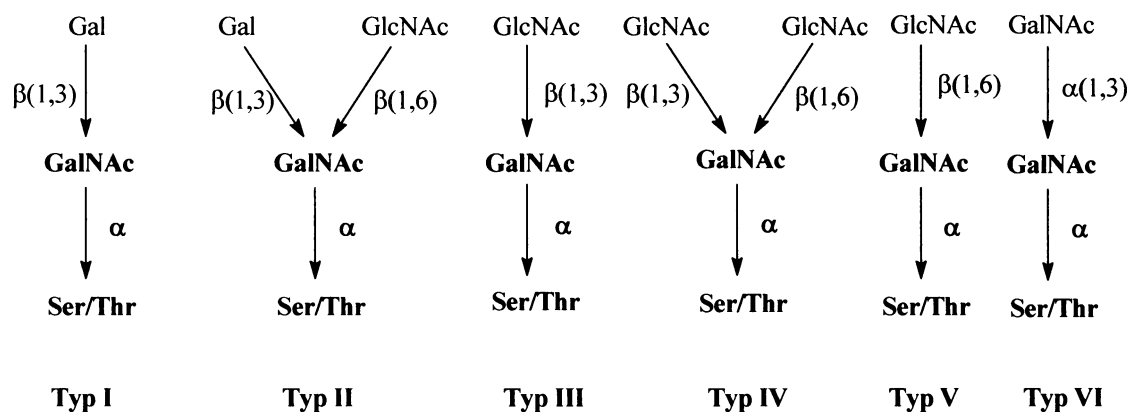


R=H - Serin
R=CH₃ - Threonin

(Obr. 1) Základní strukturní motiv (T_n antigen)

2.1.2 Synthesa *O*-glykoproteinů

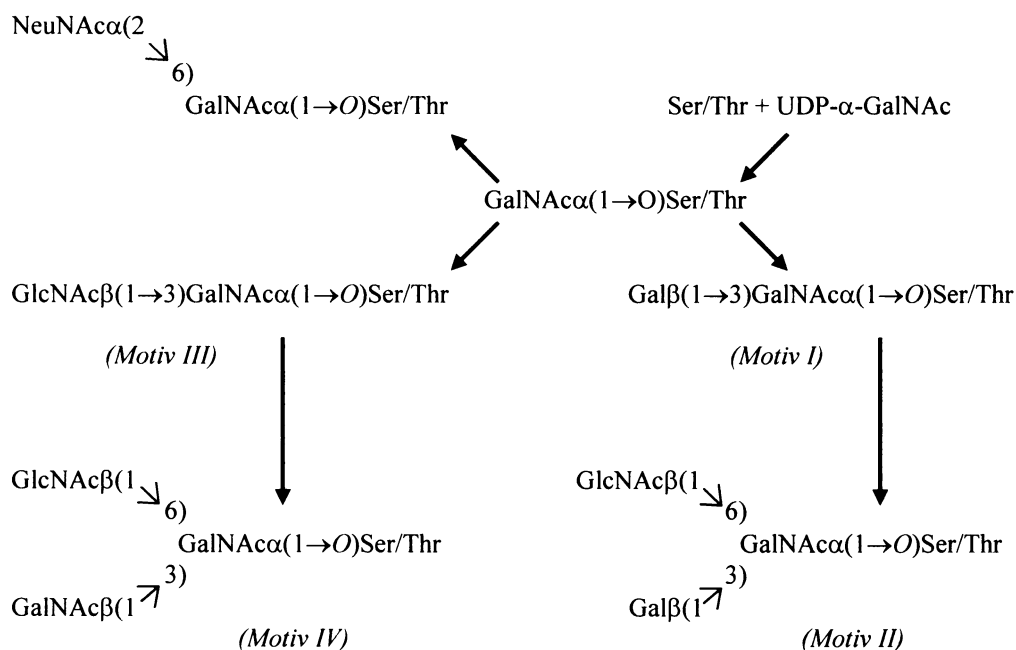
U jednotlivých živých organismů lze nalézt přibližně 7 strukturálních motivů, které vykazují další různé modifikace (*Obr. 2*). Je tedy pravděpodobné, že množství nalezených motivů bude přibývat.



(*Obr. 2*) Strukturální motivy *O*-vázaných glykoproteinů (dle [2])

Synthetická dráha *O*-glykoproteinů se zásadně liší od synthetické dráhy *N*-glykoproteinů. Iniclace je zahájena aktivací enzymu α -(1 \rightarrow 3)-2-acetamido-2-deoxygalaktosyltransferasy. *O*-glykosylace je započata v endoplasmatickém retikulu, nebo pre-Golgiho kompartmentech [1]. Některé práce naznačují, že iniciace reakce probíhá v Golgiho komplexu [1].

Enzym α -(1 \rightarrow 3)-GalNAc-transferasa přenáší α -GalNAc z donoru UDP-GalNAc, na -OH skupinu Ser, nebo Thr [1, 2]. *O*-Glykoproteiny jsou pak sestavovány tak, že na již *O*-glykosidově navázané α -GalNAc jsou enzymově (specifické UDP-hexostransferasy) navazovány další sacharidové jednotky, a to v následujícím pořadí: α -Gal nebo β -Gal, β -GalNAc nebo α -GalNAc, především vazbou (1 \rightarrow 3), nebo (1 \rightarrow 6), což ukazuje (*Obr. 2*). Nakonec jsou za katalýzy α -(2 \rightarrow 3)-sialyltransferasy, nebo α -(2 \rightarrow 6)-sialyltransferasy jednotky α -GalNAc substituovány kyselinou sialovou (α -5-*N*-acetyl-neuraminovou). Biosynthesa *O*-glykoproteinů je znázorněna na (*Obr 3*).



(Obr. 3) Schématické znázornění syntesy jednotlivých strukturních motivů [3]

2.1.3 Výskyt a vlastnosti *O*-glykoproteinů v biologických systémech

O-Glykoproteiny mají velice proměnlivou velikost. Proteinová část *O*-glykosidově vázaných sacharidů tvoří strukturní motiv, tzv. β -ohyb. Sacharidová složka *O*-glykoproteinů je díky svému hydrofilnímu charakteru lokalizována na vnější straně membrány. Funkce sacharidových složek zůstává z valné části nejasná. Obecně však platí, že *O*-glykoproteiny jsou hůře charakterisovány než *N*-glykoproteiny. Polysacharidy a zejména α -*N*-acetylgalaktosamin, vázané *O*-glykosidovou vazbou jsou nerovnoměrně rozloženy podél polypeptidového řetězce a spíše jsou součástí silně glykosylovaných shluků (obsahující hmotnostně 65 – 85 % různých sacharidů), v nichž serinové a threoninové aminokyselinové zbytky představují 25 – 40 % polypeptidové sekvence. Hydrofilní a sterické interakce sacharidů zapříčiňují, že tyto silně glykosylované oblasti mají protaženou konformaci [4]. Příkladem jsou muciny.

2.1.3.1 Muciny

Muciny se skládají z α -*N*-acetyl-muramyl-(2→3)- α -*N*-acetylgalaktosaminidylových, nebo α -*N*-acetyl-muramyl-(2→6)- α -*N*-acetylgalaktosaminidylových jednotek. Tyto sacharidové jednotky bývají často sulfatovány. Serin/threonin, na který je *O*-glykosidově vázán α -*N*-acetylgalaktosamin, bývá součástí buď membránového, nebo integrálního proteinu [5]. Muciny vykazují vysokou strukturní heterogenitu, determinovanou druhem tkáně [4]. Přítomností glykosyltransferas zodpovědných za syntézu základních strukturních motivů II, III a IV lze determinovat daný typ tkáně [3]. Muciny ochraňují buňky před proteasovými aktivitami, mnohé sacharidové struktury mucinů slouží jako adhesní místa pro antigenní lektiny v glykokalyxu bakterií, jimiž se bakterie kotví na buněčný povrch při ataku buňky. Vysoká dynamická variabilita sacharidových jednotek v mucinech snižuje pravděpodobnost bakteriálního ataku [3].

Terminálně α -vázané jednotky *N*-acetylgalaktosaminu se vyskytují v glykoforinu A a B (erythorocyty) a leukosialinu (leukocyty) a jsou rozeznávány interakčními strukturami ostatních buněk [2].

2.1.3.2 Proteoglykany

Dalším makromolekulárním systémem, kde se vyskytují *O*-glykosidově vázané molekuly α -*N*-acetylgalaktosaminu, jsou proteoglykany. Proteoglykany jsou velice složité molekulární systémy, které se skládají z řady stavebních prvků. Proteoglykany tvoří typickou kartáčovitou strukturu. Díky variabilitě v zastoupení jednotlivých polysacharidů v systému proteoglykanů se velice výrazně projevuje rozdíl mezi jejich velikostmi a relativními molekulovými hmotnostmi. Molekulová velikost může u některých typů proteoglykanů dosahovat až několika milionů daltonů [4].

2.1.3.3 Sacharidové krevní determinanty systému AB0(H)

α -*N*-Acetylgalaktosaminylové a též α -galaktosylové zbytky jsou důležité složky krevních determinantů systému AB0(H). Tato glykosylová rezidua mají rozhodující úlohu v určení krevních skupin. Sacharidové antény, vázané na sfingoglykolipidech na povrchu membrány erythrocytů *O*-glykosidovou vazbou, jsou nositelem místa pro vazbu krevní determinanty systému AB0(H).

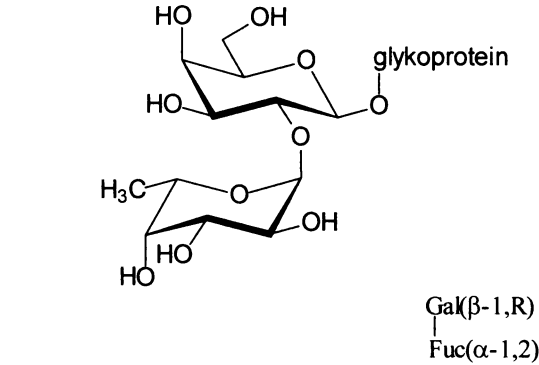
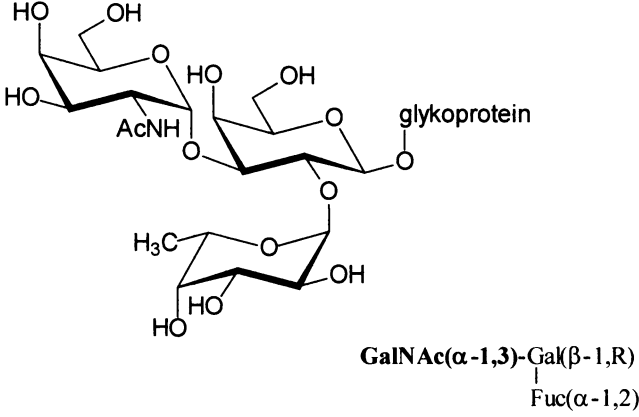
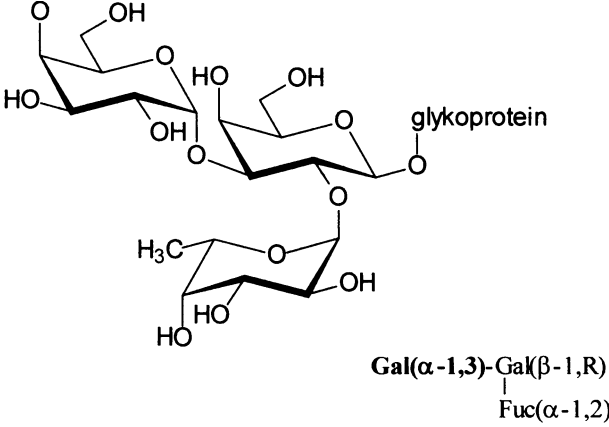
Erythrocyty krevní skupiny 0(H) neobsahují terminálně α -vázaný *N*-acetylgalaktosamin. Krevní determinanta skupiny 0(H) se nazývá H-antigen (*Tab. 1*). Z tohoto důvodu může být skupina typu 0 universálním donorem (záleží ještě samozřejmě na dalších neméně důležitých krevních determinantech, které podmiňují vhodnost dárcovství). Krevní plazma skupiny 0 obsahuje aglutininy A a B [5, 6].

Erythrocyty krevní skupiny typu A obsahují terminálně vázaný *N*-acetylgalaktosamin, který je připojen na galaktosu $\alpha(1\rightarrow3)$ vazbou (*Tab. 1*). Krevní plazma obsahuje aglutininy typu B [5, 6].

Erythrocyty krevní skupiny typu B obsahují terminálně vázanou galaktosu, která je připojená na další galakosovou jednotku $\alpha(1\rightarrow3)$ vazbou (*Tab. 1*). Krevní plazma obsahuje aglutininy typu A [5, 6].

Krevní skupina typu AB je nositelem obou krevních determinant. Krevní plazma neobsahuje aglutinin typu A a B (*Tab. 1*). Krevní skupina AB může pak být universálním akceptorem (tedy pokud je splněna kompatibilita i ostatních krevních determinant) [5, 6].

Tabulka 1 – Sacharidové krevní determinanty systému AB0(H)

Fenotyp (krevní skupina)	Krevní sacharidová antigenní determinanta (sacharidový epitop / antigen)	Aglutinin v plasmě
O (H)	 <p style="text-align: right;">glykoprotein</p> <p style="text-align: right;">Gak(β-1,R) Fuc(α-1,2)</p>	anti-A a anti-B
A	 <p style="text-align: right;">glykoprotein</p> <p style="text-align: right;">GaNac(α-1,3)-Gak(β-1,R) Fuc(α-1,2)</p>	anti-B
B	 <p style="text-align: right;">glykoprotein</p> <p style="text-align: right;">Gal(α-1,3)-Gak(β-1,R) Fuc(α-1,2)</p>	anti-A
AB	A i B	-----

Na základě interakce mezi aglutinogenem (antigen) a aglutininem (specifická protilátka), lze přesně determinovat krevní skupinu (aglutinace erythrocytů). Jako aglutininy se používají aglutininy izolované z lidské plazmy, nebo přesně determinované rostlinné a živočišné lektiny. Specifický aglutinin rozpoznává jen terminálně α -vázanou galaktosu, nebo α -vázaný *N*-acetylgalaktosamin. Lektiny a aglutininy dokáží rozpoznávat i jiné antigenní struktury, např. Forssmanův antigen.

α -*N*-Acetylgalaktosamin je obsažen ve struktuře tzv. Forssmanova antigenu (F_p antigen). Forssmanův antigen je pentasacharid α -D-GalpNAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalpNAc-(1 \rightarrow 3)- α -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-D-Glcp), jenž byl nalezen ve glykosfingolipidech četných živočišných tkání. Jako specifická protilátka proti obsaženému α -*N*-acetylgalaktosaminu byl použit lektin izolovaný z plodů keře druhu *Caragana arborescens* [2].

2.2 GLYKOSIDASY

Glykosidasy dokáží za fyziologických podmínek selektivně štěpit glykosidovou vazbu. Glykosidasy striktně rozlišují anomerickou konfiguraci glykosidové vazby. Většina enzymů je selektivní k typu stejného sacharidu. Některé glykosidasy jsou méně selektivní a jsou schopny z řetězce oligo(poly)sacharidu odštěpovat různé sacharidové jednotky. Příkladem je β -*N*-acetylhexosaminidasa, která je schopná odštěpit jak β -*N*-acetylglukosamin, tak i β -*N*-acetylgalaktosamin. Glykosidasy vykazují nižší selektivitu k aglykonu, resp. k typu dalšího navázaného sacharidu v řetězci. Glykosidasy jsou specifické vůči atomu v glykosidové vazbě – *O*-vázané glykosidy a *N*-vázané glykosidy, tzv. *O*-glykosidasy a *N*-glykosidasy. Glykosidasy vykazují buď *endo*-aktivitu, nebo *exo*-aktivitu – enzym, který rozeznává sacharid na konci řetězce, vykazuje tzv. *exo*-aktivitu. Dalším kognitivním faktorem glykosidas je i konformace jednotlivých rozpoznávaných sacharidových jednotek, tj. pyranosa, nebo furanosa. Regioselektivita glykosidas bývá obvykle nízká. U mnohých glykosidas je pozorována reversní hydrolytická, či transglykosidasová aktivita [7, 8].

2.2.1 *exo- α -N-Acetylgalaktosaminidasa*

2.2.1.1 Systematické zařazení

α -N-Acetyl-D-galaktosaminid-N-acetylgalaktosaminohydrolasa (EC 3.2.1.49, *α -N-Acetylgalaktosaminidasa*, dříve označována jako *α -galaktosidasa B*) je dle enzymové nomenklatury IUB-MB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) řazena mezi:

3.-.- hydrolasy

3.2.- glykosidasy

3.2.1.- glykosidasy hydrolyzující *O*- a *S*- glykosidové vazby.

Prokaryotní a eukaryotní *α -N-acetylgalaktosaminidasy* jsou v CAZY systému (Carbohydrate-Active Enzymes) řazeny do [9]:

enzymové rodiny 27, Klan GH-D (eukaryota)

enzymové rodiny 36, Klan GH-D (prokaryota)

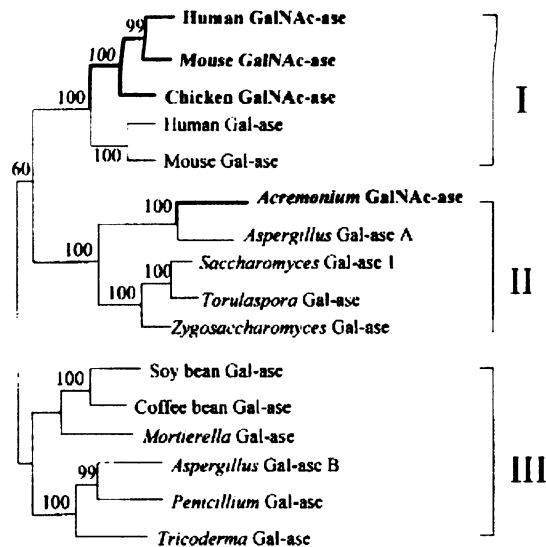
Enzymová nomenklatura IUB-MB je založena především na substrátové specifitě, popř. na reakčním mechanismu. CAZY (Carbohydrate-Active Enzymes) systém řadí glykosidasy na základě podobnosti aminokyselinových sekvencí do jednotlivých rodin a na základě typu strukturního motivu tvořící katalytickou doménu do klanů [9]. CAZY systém řeší přímý vztah mezi sekvencí, 3D strukturou katalytické domény a reakčním mechanismem glykosidas, čímž lze tyto enzymy evolučně mapovat. Klan GH-D je charakterisován $(\beta/\alpha)_8$ strukturou katalytické domény.

2.2.1.2 Fylogeneze α -*N*-acetylgalaktosaminidasy a α -galaktosidasy

α -*N*-Acetylgalaktosaminidasy a α -galaktosidasy patřící do enzymové rodiny 27 vykazují 30% – 45% shodu v aminokyselinové sekvenci. Metodou Neighbor joining (NJ) byl zkonstruován fylogenetický strom pro enzymovou rodinu 27 (Obr. 4) [10].

Enzymy jsou rozděleny do tří hlavních skupin. V první skupině jsou přítomny α -*N*-acetylgalaktosaminidasy a α -galaktosidasy obratlovců, ve druhé skupině jsou přítomny α -galaktosidasy (a α -*N*-acetylgalaktosaminidasa) kvasinek a hub a ve třetí skupině jsou α -galaktosidasy (a α -*N*-acetylgalaktosaminidasa) rostlin a hub [10]. α -*N*-Acetylgalaktosaminidasa izolovaná z *Acromonium* sp. No. 413 byla lokalizována ve druhé skupině, z čehož vyplývá, že není příliš příbuzná s α -*N*-acetylgalaktosaminidasami a α -galaktosidasami obratlovců – podobnost je jen 32% – 35%. Naopak, největší strukturní podobnost vykazuje s α -galaktosidasou (α -galaktosidasou A) z *Aspergillus niger*. Experimentálně byla prokázána velmi blízká příbuznost lidské α -*N*-acetylgalaktosaminidasy a α -galaktosidasy s kuřecí α -*N*-acetylgalaktosaminidasou. Lidská α -*N*-acetylgalaktosaminidasa je identická s kuřecí α -*N*-acetylgalaktosaminidasou ze 75 %, kuřecí α -*N*-acetylgalaktosaminidasa je identická s lidskou α -galaktosidasou z 54 % a lidská α -*N*-acetylgalaktosaminidasa je identická s lidskou α -galaktosidasou z 50 % [11]. Myší α -*N*-acetylgalaktosaminidasa vykazuje 82% identitu a 89% homologii s lidskou α -*N*-acetylgalaktosaminidasou, 70% identitu a 80% homologii s kuřecí α -*N*-acetylgalaktosaminidasou, 39% identitu a 53% homologii s α -*N*-acetylgalaktosaminidasou z *Coenorhabditis elegans* [12]. Na základě příbuznosti genů enzymů a izozymů je možné konstruovat fylogenetické mapy a sledovat evoluci jednotlivých genových rodin [10].

Fylogenetickým mapováním bylo dokázáno, že evoluční počátek genu (evolutionary origin) α -*N*-acetylgalaktosaminidasy hub a obratlovců byl odlišný, což je příklad evolučního paralelismu. Je možné, že se α -*N*-acetylgalaktosaminidasa postupně vyvinula u hub osidlujících pevné substráty z α -galaktosidasy, a to jako adaptace na možnou utilitaci sloučenin, obsahující terminálně α -vázaný *N*-acetylgalaktosamin, které se nacházejí v rostlinných tkáních [10].



(Obr. 4) Fylogenetická studie enzymové rodiny 27, klanu GH-D, [10]

2.2.1.3 Struktura proteinu

Organismy mohou produkovat buď jen jednu α -*N*-acetylgalaktosaminidasu [11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30], nebo jsou schopny tvořit více izozymů [31, 32, 33].

α -*N*-Acetylgalaktosaminidasa se vyskytuje ve dvou formách. Monomerní forma je enzymově nefunkční. Naopak katalycky aktivní formou je forma dimerní, či tetramerní. Hlavním faktorem ovlivňujícím aktivaci a inaktivaci enzymu je pH. Při nízkých hodnotách pH cca 2,5 – 7 je enzym v dimerní, nebo oligomerní podobě, tudíž aktivní. Naopak v oblasti alkalického pH je enzym v monomerní formě, tudíž je inaktivní. Toto zjištění zcela koreluje s faktem, že většina testovaných hub má růstová a enzymová produkční optima v nižších oblastech pH. Dříve, než-li byla známa reálná skutečnost týkající se aktivní a inaktivní formy enzymu se soudilo, že se jedná o isoenzymy [2].

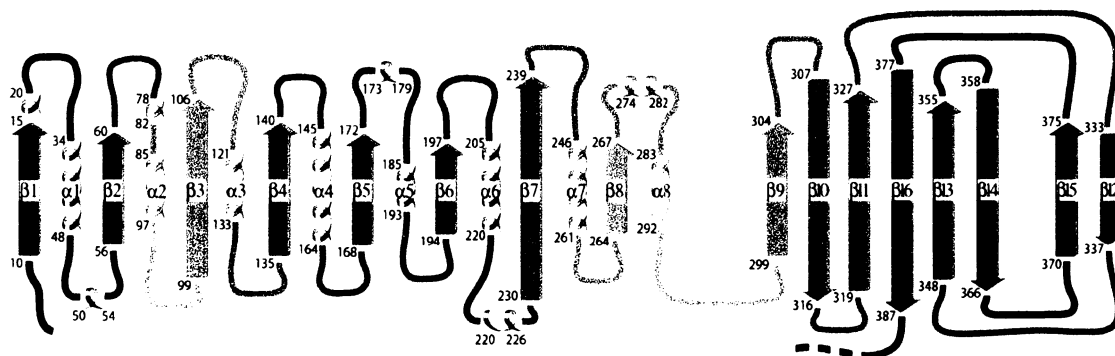
Teprve v roce 2002 byl připraven monokrystal α -*N*-acetylgalaktosaminidasy izolované z jater *Gallus gallus* [29]. Struktura aktivního enzymu získaného z kuřecích jater je zobrazena na (Obr. 5) [29].

Monomerní jednotka enzymu izolovaného z jater *Gallus gallus* [29] je složena ze dvou aktivních domén [29]. 2D Struktura monomerní jednotky lidské α -N-acetylgalaktosaminidasy je zobrazena na (Obr 5, Obr. 6).



(Obr. 5) Dimerní aktivní forma kuřecí α -GalNAc-asy (Ribbonsovo zobrazení), (N-konec modře, C-konec červeně), [29]

(Obr. 6) Monomerní neaktivní forma lidské α -GalNAc-asy (Ribbonsovo zobrazení), (N-konec modře, C-konec červeně), [11]

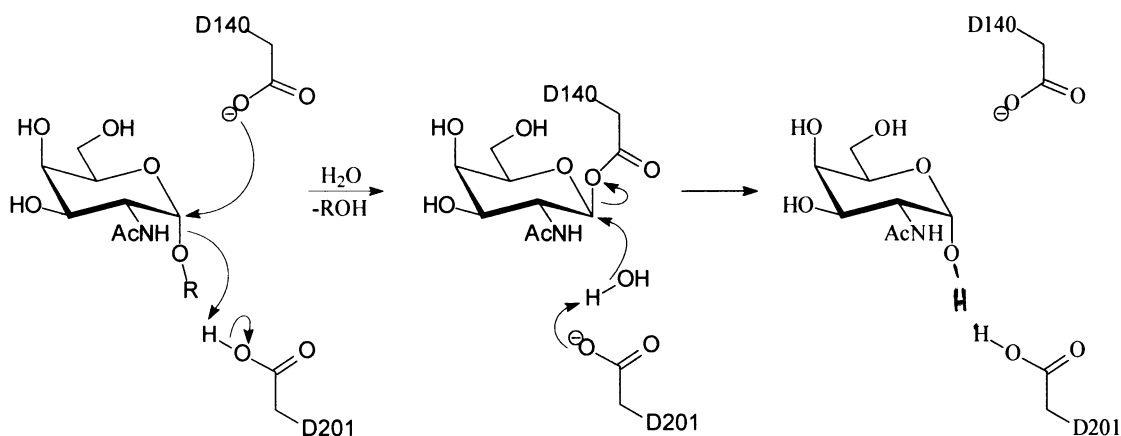


(Obr. 7) 2D Struktura monomerní jednotky lidské α -GalNAc-asy (modře N-konec modře, červeně C-konec), [11]

2.2.1.4 Reakční mechanismus α -*N*-acetylgalaktosaminidasy

α -*N*-Acetylgalaktosaminidasová (EC 3.2.1.49) a α -galaktosidasová (EC 3.2.1.22) aktivita byla poprvé nalezena a popsána v roce 1935 Freudenbergem a Eichelem v enzymovém preparátu extrahovaného z hepatopankreatu plže *Helix pomatia*. Tento enzymový extrakt dokáže inaktivovat krevní skupinu A tak, že z erythrocytů skupiny A odštěpuje terminálně α -vázaný *N*-acetylgalaktosamin.

Enzym *exo*- α -*N*-acetylgalaktosaminidasa na neredukujícím konci selektivně odštěpuje terminálně α -vázaný *N*-acetylgalaktosamin, spojený buď s oligosacharidovým řetězcem, nebo s aglykonem (Ser, Thr) α -D-glykosidovou vazbou. Před více jak padesáti lety byla vyslovena hypotéza reakčního mechanismu enzymové reakce, která je nyní plně akceptována – jedná se o tzv. „double-displacement“ (dvojitou záměnu) [11]. Enzymová hydrolysa glykosidové vazby probíhá retenujícím mechanismem, kdy konfigurace anomerie vazby substrátu a produktu je nezměněna. Uhlík C1 α -*N*-acetylgalaktosaminidu podléhá dvěma následným nukleofilním atakám, při kterých dochází ke změně v anomerii vazby. V prvním kroku atom kyslíku Asp140 atakuje elektrofilní uhlík C1 (podílející se na glykosidové vazbě) v sacharidové kostře, což vede k vytvoření kovalentního intermediátu enzym-substrát. Ve druhém kroku je kovalentní intermediát nukleofilně atakován deprotonovanou molekulou vody (deprotonace pomocí Asp201), což vede k regeneraci enzymu a uvolnění produktu (Obr. 8).



(Obr. 8) – Reakční mechanismus α -*N*-acetylgalaktosaminidasy (dle [11])

2.2.1.5 Poruchy funkce α -*N*-acetylgalaktosaminidasy

Extracelulární *exo*- α -GalNAc-asa se podílí u mikroorganismů na utilisaci zdrojů energie, obsahující terminálně α -vázaný *N*-acetylgalaktosamin, nebo na modifikacích *O*-glykoproteinů. Intracelulární *exo*- α -GalNAc-asa významně kontroluje hladinu *O*-glykoproteinů.

Ve velmi vzácných případech byla u člověka pozorována akumulace *O*-glykoproteinů ve tkáních [11, 25, 26], způsobená nízkou aktivitou α -*N*-acetylgalaktosaminidasy. Genetickými studiiemi byly determinovány mutace vedoucí k nízké aktivitě. Bodová mutace v lidské α -*N*-acetylgalaktosaminidase Glu325→Lys325 způsobuje vznik Shindlerovy choroby, projevující se již v novorozeneckém věku, vedoucí k neurodegradaci [11]. V roce 1989 byla popsána zcela nová choroba – Kanzakiho nemoc. Vyšetřena byla 46letá japonská žena, trpící syndromem silné angiokeratoma corporis diffusum, střední mentální retardací (IQ = 70), nízkou psychomotorickou aktivitou. Molekulární analýsa odhalila záměnu C→T v nukleotidu 985 vedoucí k bodové mutaci Arg329→Trp329, označované jako R329W. Druhou pacientkou byla 59letá japonská žena trpící lehkou formou angiokeratoma corporis diffusum. Mentální retardace nebyla zjištěna (IQ = 112). Molekulární analýsa odhalila záměnu G→A v nukleotidu 986 vedoucí k bodové mutaci Arg329→Gln329, označované jako R329Q [25]. Další studie odhalily i jiné bodové mutace Ser160→Cys160, Glu367→Lys367 [11].

2.2.1.6 Dosavadní výzkum α -N-acetylgalaktosaminidasy

Tabulka 2 – Současný stav výzkumu α -N-acetylgalaktosaminidasy

Testovaný organismus	Izolace a purifikace	Strukturní analýza	Klonování (cDNA)	Odkaz
<i>Helix pomatia</i>	Částečně ano	Ne	Ne	[14]
Osel ¹	Částečně ano	Ne	Ne	[15]
Prase ¹	Částečně ano	Ne	Ne	[31]
<i>Patella vulgata</i>	Částečně ano	Ne	Ne	[16]
Oliheň ¹	Částečně ano	Ne	Ne	[32]
Tuňák ¹	Částečně ano	Ne	Ne	[17]
<i>Aspergillus niger</i> ²	Ano	Ne	Ne	[18, 19]
<i>Acremonium</i> sp. ³	Ano/Ano	Ano/Ano	Ne/Ano	[13]/[10]
<i>Styela plicata</i>	Ano	Ne	Ne	[20]
<i>Ruminococcus torques</i>	Ano	Ano	Ne	[33]
<i>Mus musculus</i>	Ano	Ano	Ano	[12, 21]
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Ano	Ano	Ne	[12]
<i>Clostridium perfringens</i>	Ano	Ne/Ano	Ne/Ano	[22]/[23, 24]
<i>Homo sapiens</i>	Ano	Ano	Ano/Ne/Ne	[11]/[25, 26]
<i>Gallus gallus</i>	Ano	Ano	Ano	[27, 28, 29, 30]

¹Taxonomická determinace v pracích není uvedena

²V citované práci není specifikováno sbírkové zařazení

³V citované práci není specifikováno druhové určení a sbírkové zařazení

2.2.1.6.1 α -N-Acetylgalaktosaminidasa z nemikrobiálních zdrojů

α -N-Acetylgalaktosaminidasa byla izolována a také purifikována (někde jen částečně) z různých nemikrobiálních zdrojů – z různých zvířat (*Tab. 2.*), člověk (*Tab.2.*).

Substrátová specifita

α -*N*-Acetylgalaktosaminidasa byla schopna štěpit prasečí žaludeční mucin [14], desialovaný ovčí mucin [15, 20, 22, 28, 31], hovězí mucin [15, 16, 31] a $\alpha(1\rightarrow4)$ vázané jednotky *N*-acetylgalaktosaminu (3 – 4 jednotek) [20], krevní determinanty skupiny A [20]. Vždy byl nejlépe hydrolyzován *p*NP- α -GalNAc*p* [15, 16, 18, 20].

Teplotní stabilita

α -*N*-Acetylgalaktosaminidasa je poměrně stabilní, při dané optimální hodnotě pH, v rozmezí teplot 37 °C – 50 °C [16, 17, 19, 20, 31, 32].

pH Optimum a pH stabilita

pH Optimum hlemýždí α -*N*-acetylgalaktosaminidasy se pohybuje v rozmezích pH 3 – 4, při pH 6 se enzym stává neaktivní [14]; α -*N*-acetylgalaktosaminidasa z přílipky *Patella vulgata* byla aktivní v oblasti pH 3,6 – 6,8 (pH optimum 3,8) [16]; pH optimum izozymu I a II α -*N*-acetylgalaktosaminidasy z olihně se pohybuje v rozmezí 2,5 – 3,5 (izozym I byl aktivní do pH 5,5, zatímco izozym II do pH 6,5) [32]; α -*N*-acetylgalaktosaminidasa z tuňáka byla aktivní v oblasti pH 4 – 6 s pH optimem 4 [17]; stabilita kuřecí a rekombinantí kuřecí α -*N*-acetylgalaktosaminidasy klonované v *Pichia pastoris* je v rozmezí pH 5 – 8 [30]; α -*N*-acetylgalaktosaminidasa ze *Styela plicata* byla aktivní v rozmezí pH 4 – 5 (pH optimum 4) [20].

Kontaminanty

Ve frakcích částečně purifikované α -*N*-acetylgalaktosaminidasy byly velmi často přítomny vedlejší enzymové aktivity, především α -galaktosidasová aktivita [14, 16, 17, 32].

Inhibitory

Byla zjištěna inhibice α -*N*-acetylgalaktosaminidasové aktivity některými monovalentními a bivalentními kationy. To, zda se inhibiční efekt projeví, či nikoliv je dáno specifickými vlastnostmi enzymu a jeho původem. α -*N*-Acetylgalaktosaminidasa z olihně byla inhibována kationy Hg^{2+} a Ag^+ [32]; α -*N*-Acetylgalaktosaminidasa ze *Styela plicata* byla inhibována Hg^{2+} a Cu^{2+} a EDTA [20]. Kationy Al^{3+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , Mn^{2+} , Pb^{2+} , Sr^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} nemusí enzymovou aktivitu vůbec ovlivnit, nebo ji mohou mírně zvyšovat [16, 20, 32]. Nejúčinnější inhibiční účinek vykazuje *N*-acetylgalaktosamin (zpětnovazebná inhibice) [16, 17], druhým nejúčinnějším inhibitorem je galaktosa [31, 32].

Stabilisace enzymových preparátů

Enzymová frakce částečně purifikované α -*N*-acetylgalaktosaminidasy byla vždy zahuštěna na minimální objem a uchovávána jako precipitát v roztoku $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ [15].

α -*N*-Acetylgalaktosaminidasa purifikovaná do homeginity byla v nepřítomnosti kryoprotektiva uchovávána při teplotě $-20\text{ }^\circ\text{C}$ bez ztráty aktivity po dobu šesti měsíců [20].

V přítomnosti protektiva (autor nespecifikuje) [14], nebo BSA a sacharosy [17] byla uchovávána při teplotě $-20\text{ }^\circ\text{C}$ bez ztráty aktivity po dobu několika let.

Strukturální analýsa a klonování

α -*N*-Acetylgalaktosaminidasa byla strukturně popsána [11, 25] a geneticky determinována [11, 12, 21, 25, 27, 28, 30, 33] a exprimována jako heterogenní protein [12, 21, 27, 28, 29, 30, 33].

2.2.1.6.2 α -*N*-Acetylgalaktosaminidasa z mikroskopických vláknitých hub

McDonald et al. [18] provedli purifikaci α -*N*-acetylgalaktosaminidasy z vláknité houby *Aspergillus niger* (kmen v publikaci není uveden). Jako substrát byl testován fenylo- α -*N*-acetylgalaktosaminid a desialovaný ovčí mucin.

Enzym byl aktivní při pH 3 – 6,5. Při pH nižších než 3 a vyšších než 7 aktivita výrazně klesala. Optimum degradace desialovaného ovčího mucinu bylo při pH 4,0 – 4,2 a teplotě 45 °C. Enzym byl schopen štěpit *O*-glykosidovou vazbu mezi serinem a α -*N*-acetylgalaktosaminem. α -*N*-Acetylgalaktosaminidasa bylo možné dlouhodobě skladovat při pH 4,6 v 0,05M citrátovém pufru obsahujícím 50 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ [18].

Naudorf et al. [19] provedli izolaci a purifikaci α -*N*-acetylgalaktosaminidasy ze sušeného hemicelulázového preparátu vyrobeného z *Aspergillus niger* (v publikaci není uveden kmen). pH Optimum enzymu bylo pozorováno v oblasti hodnot 2,6 – 3,2 při teplotě 37 °C. Enzym byl stabilní v rozmezí hodnot pH 2,5 – 8 při teplotě 37°C. Teplotní optimum enzymu nastávalo v rozmezí teplot 55 °C – 60 °C (autor neuvádí hodnotu pH). *N*-Acetylgalaktosamin vykazuje silný inhibiční efekt. Enzymová aktivita nebyla přidavkem kationů Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} ovlivněna. Molekulová velikost nativního enzymu byla cca 116 kDa. Isoelektrický bod enzymu byl detekován při hodnotě pH 4,6.

Purifikovaná α -*N*-acetylgalaktosaminidasa byla použita k synthese GalNAc- α -(1→*O*)-Serinu (*Obr. 11*).

Kadowaki et al. [13] provedli izolaci, purifikaci a charakterisaci α -*N*-acetylgalaktosaminidasy z druhu *Acremonium* sp. No. 413.

Submersní kultivace byla prováděna v peptonovém médiu. Produkční maximum α -*N*-acetylgalaktosaminidasy nastalo v 72. hodině. Enzymové produkční maximum přesně koreluje s jejím maximem růstovým.

Exo-aktivita byla ověřena reakcí s *p*-nitrofenyl- α -*N*-acetylgalaktosaminidem jako substrátem. Enzym degradoval desialovaný ovčí mucin produkovaný slinnou žlázou, desialovaný lidský mucin separovaný ze slin, desialovaný koňský žaludeční mucin. Enzym konvertoval erythrocyty skupiny A na erythrocyty skupiny 0(H).

pH Optimum bylo stanoveno v oblastech 4,0 – 4,5. Enzym byl inaktivován při pH 2,5 a nižším a při pH 6 a vyšším. α -*N*-Acetylgalaktosaminidasa byla za podmínek ($t = 5$ min; pH 7) stabilní do teploty 40 °C. Při teplotě nad 60 °C docházelo k nevratné inaktivaci.

Kation Hg^{2+} vykazoval inhibiční účinky. Kationy Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , EDTA, merkaptany, glutathion, galaktosa a glukosamin nevykazovaly žádný efekt. *N*-acetylgalaktosamin vykazoval jen malý inhibiční efekt.

α -*N*-Acetylgalaktosaminidasa byla purifikována do homogenity (tak uvádí autor), přestože v purifikovaném vzorku byly nalezeny stopy β -glukosidasové a β -*N*-acetylhexosaminidasové aktivity [13] – tyto vedlejší aktivity však mohou být způsobeny částečnou nespecifitou enzymu.

Byla provedena analýza aminokyselinového složení monomerní jednotky o relativní molekulové hmotnosti 57000. Jednotlivá aminokyselinová residua jsou uvedena v následující tabulce (*Tab. 3*) [13].

*Tabulka č. 3 – Aminokyselinová analýza α -*N*-acetylgalaktosaminidasy z *Acremonium sp.**

AMK	Residua/mol proteinu
Asp	79
Thr	36
Ser	76
Gln	41
Pro	17
Ala	45
Val	29
Met	5
Iso	17
Leu	25
Tyr	19
Phe	15
Lys	4
His	10
Arg	10
Trp	9
Hemi-Cys	8

α -*N*-Acetylgalaktosaminidasa z *Acremonium* sp. No. 413 byla klonována v *Pichia pastoris*. Rekombinantní protein byl purifikován a charakterisován. Pomocí Edmanova *N*-terminálního odbourávání byla zjištěna unikátní aminokyselinová sekvence ASQPLLPLPPMGFNNWARF.

α -*N*-Acetylgalaktosaminidasová aktivita byla ověřena hydrolysou *pNP* α -Gal*pNAc* jako substrátu [10].

Borzova et al. [34] provedli výzkum řady mikrobiálních producentů (mikroskopické vláknité houby a kvasinky) na přítomnost α -*N*-acetylgalaktosaminidasové a α -galaktosidasové aktivity. Autoři se odkazují na literaturu, která však není citována, kde má být popsána celá řada mikrobiálních producentů α -*N*-acetylgalaktosaminidasy a α -galaktosidasy.

Všechny kmeny testovaných organismů pocházejí z IVM NAN Ukrajini, ale nejsou veřejně dostupné. Autoři rovněž neuvádějí přesnou taxonomickou determinaci testovaných organismů, ani sbírkové zařazení, což znemožňuje reprodukovatelnost.

Metodou submersní kultivace byly testovány někteří zástupci rodů mikroskopických vláknitých hub *Alternaria*, *Aspergillus*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Penicillium* a *Trichoderma* (autoři neuvádějí, v jakém médiu byly testovány). Dále kvasinky rodu *Candida*, *Kluyveromyces* a *Saccharomyces* (autoři neuvádějí, v jakém médiu byly testovány).

Houbové organismy byly kultivovány při teplotě 26 °C – 28 °C a rychlosti otáček 220 ot.min⁻¹.

Aktivita glykosidas byla stanovena za použití příslušných *pNP*- α -glykosaminidů (pH citráto-fosfátového pufru 5,2; λ = 400 mn, t = 10 min; t = 37 °C.).

α -*N*-Acetylgalaktosaminidasová aktivita byla prokázána u rodu *Aspergillus* (0,142 U.ml⁻¹), *Penicillium* (0,110 U.ml⁻¹) a *Eurotium* (0,06 U.ml⁻¹). Rody *Alternaria*, *Trichoderma*, *Kluyveromyces* a *Saccharomyces* produkci nevykazovaly. Médium výrazně kontaminovala β -*N*-acetylgalaktosaminidasa, β -galaktosidas, β -*N*-acetylglukosaminidasa a β -glukosidas. V médiích naopak nebyly prokázány žádné α -*N*-acetylglukosidasové, α -glukosidasové, α -xylosidasové (až na jeden vzorek), α -mannosidasové a α -fukosidasové aktivity.

Nejlepšími C-induktory byly *N*-acetylgalaktosamin, který α -*N*-acetylgalaktosaminidasovou aktivitu zvyšoval o 5 – 150 % a galaktosa, která α -galaktosidasovou aktivitu zvyšovala až o 180 %. Jako *N*-induktory byly použity býčí krev a poprvé vůbec deriváty guanidinu.

Reakční optimum α -*N*-acetylgalaktosaminidasy nastávalo při pH 2 – 5 a teplotě 37 °C. Reakční optimum α -galaktosidasy nastávalo při pH 4 – 6 a teplotě 37 °C.

V médiu α -*N*-acetylgalaktosaminidasa vykazovala vyšší stabilitu než α -galaktosidasa [34].

V roce 2001 Borzova et al. [35] publikovali optimalisaci kultivačního média pro maximalisaci zisku enzymů α -*N*-acetylgalaktosaminidasy a α -galaktosidasy produkovaných *Aspergillus niger* IMV NAM 185.

Bylo testováno složení kultivačního média, včetně podmínek kultivace. Základní použité médium [g.l⁻¹]: (2,0 – KH₂PO₄; 0,3 – MgSO₄ · 7H₂O (po sterilisaci jako roztok); 0,3 – CaCl₂; 0,6 – (NH₄)₂SO₄; 0,4 – močovina). pH média bylo upraveno na 5,2.

Jako zdroje uhlíku byly testovány: glukosa, galaktosa, laktosa, maltosa, arabinosa, xylosa, rhamnosa, mannosy, rafinosa, fruktosa, trehalosa, sacharosa, mannitol, sorbosa, inositol, kukuřičná a sojová mouka v koncentraci 10 g.l⁻¹.

Aspergillus niger dokáže využívat jak organicky, tak anorganicky vázaný dusík. Jako zdroje dusíku byly testovány: NaNO₃, NaNO₂, (NH₄)₂SO₄, (NH₄)₂NO₃, močovina, močovina:(NH₄)₂SO₄ (2:3), pepton a deriváty guanidinu (jako induktor a současně zdroj dusíku).

Byl testován vliv objemu kultivačního média (50 ml, 100 ml, 150 ml, 200 ml); pH prostředí (3, 4, 5, 6, 7); teploty (28 °C a 32 °C); množství inokula (odpovídající 5 %, 10 % a 20 % objemu celkového objemu média); rychlosti míchání inokulovaného média (160 ot.min⁻¹, 220 ot.min⁻¹ a 240 ot.min⁻¹). Byla také zjišťována hmotnost suché biomasy.

Sójová mouka byla vyhodnocena jako nejlepší zdroj uhlíku (pak následovala kukuřičná – 2krát menší produkce). Zdroj dusíku výrazně ovlivňoval produkci obou enzymů. Optimální je podle výsledků použít koncentraci 7,5 g.l⁻¹ mykologického peptonu a 0,8 g.l⁻¹ (NH₄)₂SO₄ současně. (Při použití močoviny společně se síranem amonným nebyla α -galaktosidasová aktivita indukována vůbec).

Tento fakt poukazuje na to, že jednotlivé mikromycety mají zcela individuální nutriční nároky na zdroje dusíku. Použité deriváty guanidinu v koncentraci 0,01 % působily na oba enzymy inhibičně (ztráta aktivity o 7 % – 28 %), ale 0,1 % koncentrace měla na produkci α -galaktosidasy výrazně stimulační účinky, vliv na produkci α -*N*-acetylgalaktosaminidasy byl nulový. *N*-Nitro-*N'*-salicylidenamino-guanidin a *N*-(4-dimethylamino-benzylidenamino)-*N'*-nitro-guanidin zvýšily aktivitu α -galaktosidasy dvakrát. Bylo prokázáno, že 0,25% koncentrace guanidinkarbonátu zvýšila produkci α -*N*-acetylgalaktosaminidasy o 65 % a aktivitu u α -galaktosidasy o 108 %. Přídavek guanidinových derivátů indukovalo především produkci α -galaktosidasy.

Přídavek (1 %) býčí krve indukuje produkci obou enzymů natolik, že jejich aktivita vzrůstá 2 – 2,5krát. Na zvýšení produkce obou enzymů je nejlépe použít oba *N*-induktory současně.

Během prvních 24 hodin dochází ke snížení pH média na hodnotu 3,2 – 3 (této hodnoty pH médium dosáhne vždy, bez ohledu na počáteční pH média), a to proto, že houba produkuje do prostředí kyselinu šťavelovou a citrónovou. Počáteční hodnota pH není pro růst houby signifikantní, ale je velmi důležitá pro produkci enzymů.

Při výchozí hodnotě pH 3 byla produkce obou enzymů velice slabá, naopak při výchozím pH 6 byla produkce obou enzymů nejvyšší.

Největší produkce α -*N*-acetylgalaktosaminidasy byla sledována v médiu o $V = 50$ ml. Teplotní optimum kultivace bylo stanoveno při teplotě 25 °C a rychlosti míchání 220 ot.min⁻¹. Různé objemy inokula produkci enzymů neovlivňovaly. Při aplikaci optimálních podmínek bylo produkční maximum obou enzymů v 6. den kultivace [35].

2.2.1.6.3 Bakteriální α -*N*-acetylgalaktosaminidasa

V roce 1970 McGuire et al. [22] částečně purifikovali α -*N*-acetylgalaktosaminidasu z *Clostridium perfringens*. *Exo*-aktivita byla ověřena reakcí s fenyl- α -*N*-acetylgalaktosaminidem jako substrátem. Enzym degradoval desialovaný ovčí mucin separovaný ze slinné žlázy. pH Optimum enzymu bylo 5,8. Enzymová aktivita byla zvyšována přidavkem kationů Co^{2+} , Mn^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} a nejvíce Ca^{2+} . Enzym byl zcela inhibován kationy Hg^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} a cysteinem [22].

V roce 1997 Lansing et al. [33] charakterisovali a purifikovali 3 izozymy α -*N*-acetylgalaktosaminidasové frakce z *Ruminococcus torques* IX-70. Všechny izozymy hydrolysovaly *p*NP- α -Gal*p*NAc a Forssmanův antigen. pH Optimum izozymu IA a IB se nalézají v oblasti 5,8 – 6,8, izozymu III v oblasti 5,6 – 6,1. Izozymy IA a IB byly stabilní v oblasti pH 5,0 – 9,5, izozym III je stabilní v oblasti 4,5 – 9,5.

Enzymová aktivita byla mírně zvýšena přidavkem Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} a Ca^{2+} , naopak Hg^{2+} a Cu^{2+} ionty vykazovaly silný inhibiční efekt. U všech izozymů byla charakterisována unikátní aminokyselinová sekvence.

V roce 2002 Callcut et al. [23] v *Clostridium perfringens* charakterizovali gen kódující α -*N*-acetylgalaktosaminidasu a jediný odpovídající ORF region.

Metodou Edmanova *N*-terminálního odbourávání byla charakterisována i unikátní aminokyselinová sekvence (K)VLGNYIQRFHYDYGKSTYT(T)(S)FLN [23].

V roce 2003 Hsin-Yeh Hsieh et al. [24] provedli charakterisaci a purifikaci rekombinantní α -*N*-acetylgalaktosaminidasy z *Clostridium perfringens* v kvasince *Pichia pastoris*. Rekombinantní α -*N*-acetylgalaktosaminidasa se od nerekombinantní odlišovala především větší molekulovou hmotností (větší míra glykosylace rekombinantního enzymu).

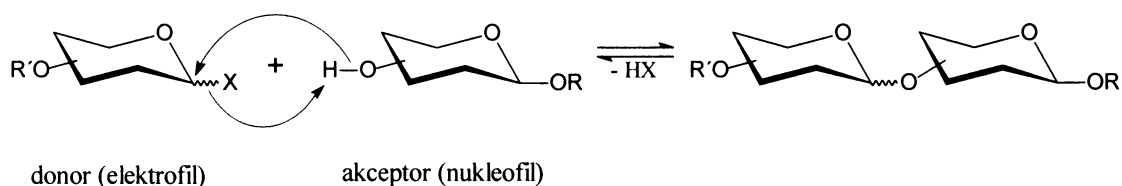
2.2.2 Praktické využití glykosidas

2.2.2.1 Synthesa glykosidů

Každá základní monosacharidová jednotka obsahuje pět alkoholových skupin vykazujících podobnou reaktivitu, a proto je chemická syntéza oligosacharidů velmi obtížná. K přípravě většího množství produktů je vhodné použít enzymy vykazující stereo- a regioselektivitu [36].

2.2.2.1.1 Chemická syntéza glykosidů

Chemická glykosylace je poměrně složitá a vždy vyžaduje několikastupňovou syntézu za přítomnosti vhodného katalyzátoru. Při glykosylaci je nutné sacharid převést na vhodný glykosylový donor, který vybaven odstupující skupinou, je stereoselektivně vázán na akceptor glykosylu s dostatečně chráněnými OH-skupinami (Obr. 9) [37].



R'O bránící skupina
X odstupující skupina
OR aglykon

(Obr. 9) Princip glykosylace (dle [37])

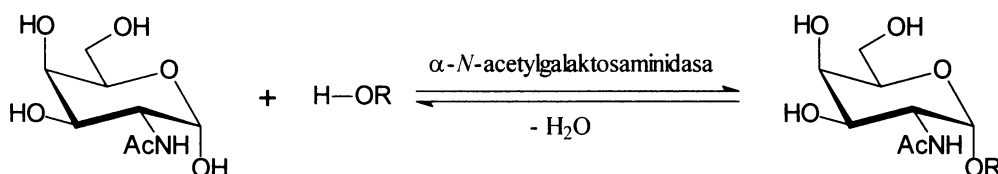
Chráněny jsou jen ty –OH skupiny, které se nemají účastnit na vzniku glykosidové vazby, a to v prostředí s vhodným katalyzátorem (těžký kov) [38]. Používanými chránícími skupinami jsou např: acetyl, benzyl, benzoyl, chloroacetyl. Objemné chránící skupiny vhodné nejsou, protože stericly brání vazbě glykosylu na akceptor. Výtěžky glykosylací jsou relativně nízké a výroba je finančně náročná.

2.2.2.2 Enzymová syntéza glykosidů

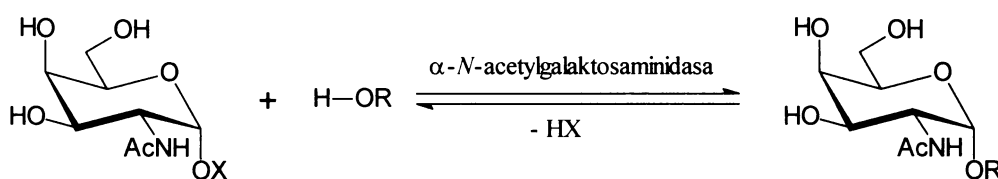
V přírodě jsou oligosacharidy syntetisovány glykosyltransferasami (EC 2.4.-.-), které akceptují cukerné nukleotidy jako své substráty (UDP-GalNAc, UDP-Gal, UDP-Glc, apod.) [2]. Energie, nutná k proběhnutí reakce je získána hydrolysou makroergické vazby v substrátu. Použití glykosyltransferas je omezeno selektivitou vůči substrátu, jelikož jednotlivé glykosyltransferasy jsou schopny využít jen některé akceptory [7, 8].

Další skupinou enzymů, které umožňují syntézu oligosacharidů jsou glykosidasy (EC 3.2.-.-), které za fyziologických podmínek glykosidové vazby hydrolyzují, avšak úpravou podmínek *in vitro* lze glykosidovou vazbu syntetisovat [7, 8].

1)



2)



X ... odstupující skupina

HO-R ... akceptor - kterákoliv molekula nesoucí OH-skupinu

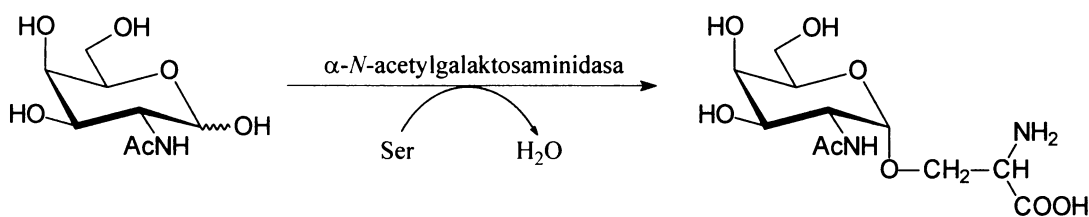
(Obr. 10) Enzymová glykosylace – 1) reverzní hydrolysa; 2) transglykosylace (dle [7])

Reverzní hydrolysou je možné syntetisovat glykosidovou vazbu mezi sacharidovými jednotkami, nebo mezi sacharidem a aglykonem (Obr. 10–1). Reverzní glykosylace je řízena termodynamicky. Výhodou reverzní hydrolysy je, že jako zdroj glykosylu slouží volný monosacharid, který je relativně levný [7, 8] (Obr. 10–1).

Nevýhodou této reakce jsou malé výtěžky; nízká regioselektivita enzymu (tvorba isomerů); s prodlužující se reakční dobou se zvyšuje intenzita hydrolysy produktu, který je zároveň přirozeným substrátem enzymu [8]. Tyto nevýhody lze ale částečně eliminovat posunem rovnováhy reakce směrem doprava ve prospěch vzniku produktů a minimalisovat tak nežádoucí hydrolysu produktu na původní jednotky.

Rovnováhu lze posunout směrem doprava následujícími postupy: reakční směs bude neustále obsahovat nadbytek reaktantů; snižováním koncentrace vznikající vody; odebíráním produktu extrakcí, precipitací, nebo konversí na jinou sloučeninu [7, 8]; přidáním anorganické soli, nebo organického rozpouštědla [7].

Příkladem použití purifikované α -*N*-acetylgalaktosaminidasy z *Aspergillus niger* [19], kdy byl syntetisován GalNAc- α -(1 \rightarrow O)-Serin (Obr. 11).



(Obr. 11) Schéma reakce enzymové syntesy GalNAc- α -(1 \rightarrow O)-serinu (dle [19])

Transglykosylace (přenos glykosylové skupiny) je kineticky kontrolovaná kondensace, závisící na zachycení intermediátu z glykosylového donoru nukleofilem (Obr. 10–2). Reakce intermediátu s nukleofilem (akceptorem glykosylu) musí probíhat rychleji než jeho reakce s vodou. Jako vhodné aktivované donory se nejčastěji používají nitrofenylglykosidy, glykosylazidy, či fluoroglykosidy [39]. Výtěžky transglykosylačních reakcí bývají vyšší, než při reversních hydrolyzách [7, 8].

Relativně vysoká regioselektivita a nízká výtěžnost vedla k výzkumu cílených mutací glykosidas. Enzymy, které vzniknou nahrazením nukleofilu v aktivním místě za nepolární skupinu (Gly, Ala), jsou označovány jako glykosynthasy. Tato cílená bodová mutace způsobuje neschopnost enzymu glykosidové vazby hydrolysovat, je schopen jen jejich syntesy. Glykosynthasy jsou aktivní pouze v přítomnosti externího nukleofilu a aktivovaného donoru (fluoroglykosid) [40].

3. METODIKA

3.1 Kultivace hub

3.1.1 Použité mikroskopické vláknité houby

Studované houby pocházejí ze sbírky CCF (Culture Collection of Fungi) a CCIM (Culture Collection of the Institute of Microbiology) a jsou uchovávány ve zkumavkách na šikmých agarech (sladinový, sporulační) při teplotě 5 °C.

Tabulka 4 – Použité kmeny mikroskopických vláknitých hub

Použité kmeny mikroskopických vláknitých hub	
<i>Absidia macrospora</i> CCF 1006	<i>Aspergillus niger</i> CCF 1837
<i>Aspergillus aculeatus</i> CCF 3134	<i>Aspergillus niger</i> CCF 2477
<i>Aspergillus awamori</i> CCF 549	<i>Aspergillus niger</i> CCF 2818
<i>Aspergillus awamori</i> CCF 641	<i>Aspergillus niger</i> CCF 2875
<i>Aspergillus awamori</i> CCF 763	<i>Aspergillus niger</i> CCF 3264
<i>Aspergillus carbonarius</i> CCF 1877	<i>Aspergillus oryzae</i> CCF 1066
<i>Aspergillus carbonarius</i> CCF 2952	<i>Aspergillus sojae</i> CCF 3060
<i>Aspergillus carbonarius</i> CCF 3388	<i>Aspergillus tamarii</i> CCF 1665
<i>Aspergillus niger</i> CCIM K2	<i>Aspergillus tamarii</i> CCF 2492
<i>Aspergillus niger</i> CCF 629	<i>Aspergillus tamarii</i> CCF 3085
<i>Aspergillus niger</i> CCF 701	<i>Aspergillus versicolor</i> CCF 2491
<i>Aspergillus niger</i> CCF 717	<i>Emericella nidulans</i> CCF 2912
<i>Aspergillus niger</i> CCF 799	<i>Eurotium amstelodamii</i> CCF 2723
<i>Aspergillus niger</i> CCF 831	<i>Humicola brunea</i> CCF 982
<i>Aspergillus niger</i> CCF 870	<i>Penicillium brasilianum</i> CCF 2155
<i>Aspergillus niger</i> CCF 889	<i>Penicillium daleae</i> CCF 2365
<i>Aspergillus carbonarius</i> CCF 943	<i>Penicillium multicolor</i> CCF 2244
<i>Aspergillus niger</i> CCF 1279	<i>Penicillium ochrochloron</i> CCF 2379
<i>Aspergillus niger</i> CCF 1597	<i>Penicillium oxalicum</i> CCF 2430
<i>Aspergillus niger</i> CCF 1598	<i>Penicillium vinaceum</i> CCF 2384
<i>Aspergillus niger</i> CCF 1599	<i>Talaromyces flavus</i> CCF 2686
<i>Aspergillus niger</i> CCF 1600	

Sporulační agar [g.l⁻¹]:

Glycerol – 125

Sladový výtažek – 45

NaCl – 15

NH₄NO₃ – 0,44

MgSO₄ – 0,06

CuSO₄ – 0,0015

Bakteriologický agar No.1 – 25

pH 5,5

Sladinový agar [g.l⁻¹]

Agar se sladinovým extraktem – 53,3

pH 5,5 – 5,9

3.1.2 Kultivační podmínky

Složení kapalného submersního média dle Borzové [g.l⁻¹]: (25,0 nebo 50,0 – sójová mouka; 2,0 – KH₂PO₄; 0,3 – MgSO₄ · 7H₂O; 0,3 – CaCl₂; 7,5 – mykologický pepton) [35]. Objem kultivačního média je 50 ml, popř. 100 ml. pH Média bylo upraveno roztokem KOH a H₂SO₄ na hodnotu 6,0. Před vlastní inokulací spor je studené vychladlé médium doplněno 0,3 g.l⁻¹ MgSO₄.7H₂O ve formě roztoku (10 % w/v). Jako kultivační nádoby jsou používány kulaté baňky s plochým dnem (V = 500 ml).

Médium (50 ml) je inokulováno 0,25 ml suspenze spor a fragmentů mycelia v 0,1% roztoku TWEENu.

Inokulované médium je kultivováno při T = 28 °C (v některých případech při 25 °C, popř. 26 °C) po dobu 7 dnů (v některých případech i více dnů) za stálého míchání 200 ot.min⁻¹ (v některých případech 220 ot.min⁻¹).

3.2 Analytické metody

3.2.1 Stanovení enzymové aktivity

Katalytická aktivita enzymů byla stanovena metodou spektrofotometrickou ve VIS pomocí chromogenních substrátů (*Tab. 5*), kdy koncentrace uvolněného produktu je přímo úměrná absorbanci.

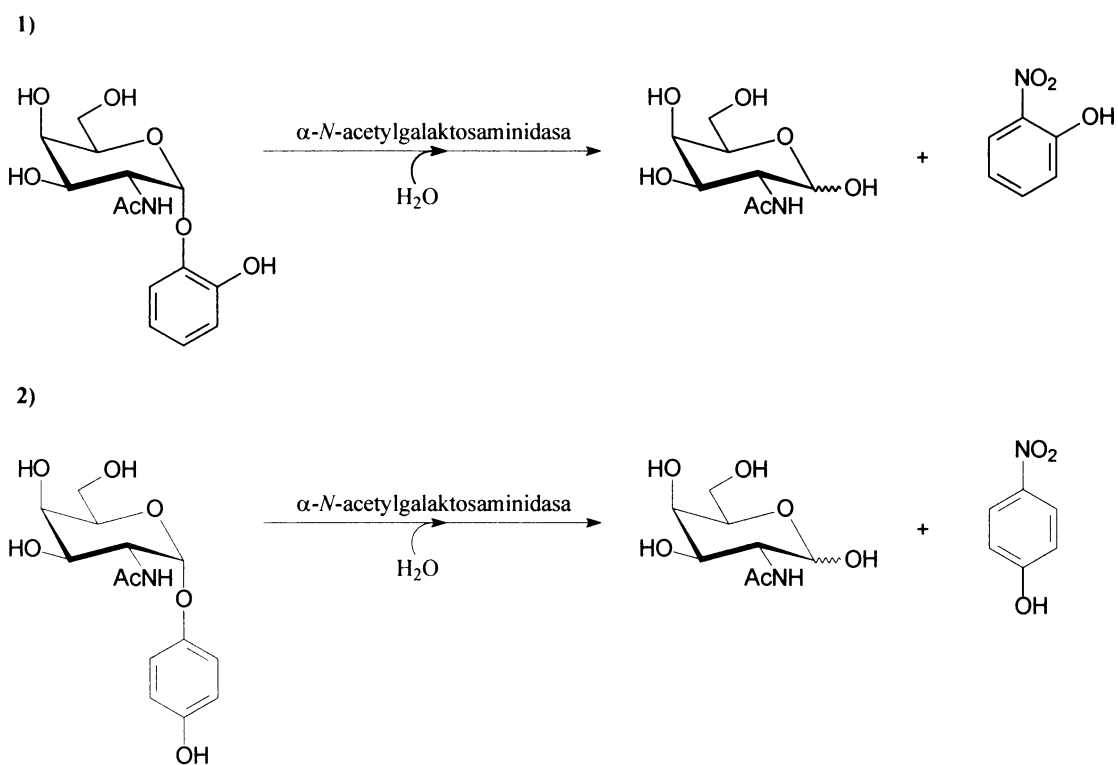
Při diskontinuálním stanovení je změřena absorbance *p*-nitrofenolu (*p*NP-OH), nebo *o*-nitrofenolu (*o*NP-OH) v alkalickém prostředí, kdy vzniká protonisovaná žlutě zbarvená forma, mající absorpční maximum v oblasti 405 nm – 420 nm. Enzymová aktivita je stanovována při $\lambda = 420$ nm. Schéma reakce hydrolysy substrátu *o*NP- α -GalNAcp a *p*NP- α -GalNAcp je na (*Obr. 12*).

Jednotka enzymové aktivity [U] je definována jako množství enzymu nutné k uvolnění 1 μ mol *p*NP-OH, nebo *o*NP-OH z chromogenního substrátu za 1 minutu při definovaném pH a teplotě. (Stanovení katalytické aktivity enzymu se obvykle počítá jako tzv. koncentrace katalytické aktivity, což je katalytická aktivita enzymu v daném objemu kapaliny udávaná v jednotkách [U.ml⁻¹]. Správnou jednotkou enzymové aktivity dle SI je 1 [katal]. V související literatuře autoři však uvádějí výhradně jednotky U. Pro lepší možnost srovnání byly použity tyto jednotky.

Koncentrace katalytické aktivity enzymu vztažená na hmotnost všech proteinů je udávána jako specifická aktivita v jednotkách [U.mg⁻¹] proteinu.

Tabulka 5 – Chromogenní substráty pro stanovení enzymových aktivit

Chromogenní substrát	Stanovovaný enzym
<i>p</i> -nitrofenyl- α -D-galaktopyranosid (<i>p</i> NP- α -Gal <i>p</i>)	α -galaktosidasa
<i>o</i> -nitrofenyl- α -D- <i>N</i> -acetylgalaktopyranosid (<i>p</i> NP- α -Gal <i>p</i> NAc)	α - <i>N</i> -acetylgalaktosaminidasa
<i>p</i> -nitrofenyl- β -D- <i>N</i> -acetylgalaktopyranosid (<i>p</i> NP- β -Gal <i>p</i> NAc)	β - <i>N</i> -acetylgalaktosaminidasa
<i>p</i> -nitrofenyl- β -D- <i>N</i> -acetylglukopyranosid (<i>p</i> NP- β -Glc <i>p</i> NAc)	β - <i>N</i> -acetylglukosaminidasa



Obr. 12 Schéma hydrolysy substrátu: 1 – *o*NP- α -GalpNAc; 2 – *p*NP- α -GalpNAc

3.2.2 Výpočet koncentrace katalytické aktivity α -N-acetylgalaktosaminidasy

$$\text{Aktivita}_{obj} = n(p/oNP-OH) \times V^{-1} \times t^{-1} \quad [U \cdot ml^{-1}]$$

$n(p/oNP-OH)$	látkové množství uvolněného <i>p</i> NP-OH, nebo <i>o</i> NP-OH [mol]
V	objem tekutiny [ml]
t	doba reakce [min]

Látkové množství uvolněného *o*NP-OH, nebo *p*NP-OH lze určit vypočtením koncentrace z naměřené absorbance podle Lambert-Beerova zákona:

$$A = \varepsilon \times c_{celk} \times l$$

A	absorbance
ϵ	molární absorpční koeficient <i>p</i> NP-OH, nebo <i>o</i> NP-OH při dané vlnové délce [dm.mol ⁻¹]
c_{celk}	koncentrace <i>p</i> NP-OH, nebo <i>o</i> NP-OH v měřeném roztoku [mol.l ⁻¹]
l	optická dráha [dm]

Koncentraci *p/o*NP-OH ve vzorku lze vypočítat ze vztahu:

$$c = \frac{A \times \epsilon^{-1} \times l^{-1} \times V_{\text{celk}} \times F_Z}{V_{\text{vz}}} \quad [\text{mol.l}^{-1}]$$

c	koncentrace <i>o/p</i> NP-OH ve vzorku [mol.l ⁻¹]
V_{celk}	celkový objem [ml]
V_{vz}	objem vzorku [ml]
F_Z	faktor ředění

Koncentraci katalytické aktivity lze pak vyjádřit jako $\frac{c}{t}$ [U.ml⁻¹]

Rovnici výpočtu koncentrace katalytické aktivity lze převést do tvaru:

$$\mathbf{Aktivita}_{\text{obj}} = A \times k^{-1} \times V_{\text{vz}} \times V_{\text{celk}}^{-1} \times t^{-1} \times F_Z \quad [\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}]$$

A	absorbance <i>o/p</i> NP-OH v reakční směsi
K	směrnice tečny z kalibrační křivky standardisace <i>o</i> NP-OH [ml.mol ⁻¹]
V_{vz}	objem vzorku (obsahujícího enzym) [ml]
V_{celk}	celkový objem reakční směsi [ml]
T	doba reakce [min]
F_Z	faktor zředění

Při diskontinuálním stanovení enzymové aktivity reakční směs obsahuje vzorek (30 μ l), chromogenní substrát (10,0 μ l; 2 mM) a citráto-fosfátový pufr Mc Ilvaine (10 μ l; 50 mM; pH 5). Reakční směs je inkubována při 900 ot.min⁻¹ za teploty 35 °C (Thermomixer Compact Eppendorf, DE). Po 10 minutách inkubace je reakce ukončena přidávkem Na₂CO₃ (1 ml; 0,1 M). Absorbance uvolněného *p*NP-OH, nebo *o*NP-OH je měřena oproti slepému vzorku při $\lambda = 420$ nm v křemenných semimikrokyvetách (Shimadzu UV-1202). Akceptovatelná absorbance je v mezích 0,100 – 0,250. (Při stanovení enzymových aktivit v izolovaných frakcích během purifikačních procedur byl použit citráto-fosfátový pufr Mc Ilvaine (50 mM; pH 3) a při charakterisaci vlastností enzymu byl použit citráto-fosfátový pufr Mc Ilvaine (100 mM; pH 2,5 – 8,5) a HCl/Glycinový pufr (100 mM; pH 1,1 – 3,5)).

Při purifikacích vzorků na chromatografických kolonách je třeba ve velkém množství frakcí rychle stanovit enzymové aktivity (α -galaktosidasová, α -*N*-acetylgalaktosaminidasová a β -*N*-acetylglukosaminidasová). Tato stanovení byla realizována pomocí spektrofotometru Sunrise (Tecan, AT) v mikrodestičkách. Metodika, složení kultivační směsi a reakční podmínky jsou shodné jako při měření absorbance na přístroji Shimadzu UV-1202. Při zachování stejného poměru všech reagensů bylo nutné zmenšit objem Na₂CO₃ při současném zvýšení jeho koncentrace (100 μ l; 1 M). Jako vyhodnocovací software byl použit systém Magellan 4.0 (Tecan, AT).

3.2.3 pH Optimum a pH stabilita

pH Optimum α -*N*-acetylgalaktosaminidasy bylo stanoveno v daném rozsahu pH 1,1 – 8,5 při teplotě 35 °C. pH Stabilita α -*N*-acetylgalaktosaminidasy byla stanovena při daných hodnotách pH a dané teplotě v závislosti na čase. Aktivita α -*N*-acetylgalaktosaminidasy byla ve všech případech stanovena dle (kapitola 3.2.1).

3.2.4 Teplotní optimum a stabilita

Teplotní optimum α -*N*-acetylgalaktosaminidasy bylo stanoveno při dané hodnotě pH. Stabilita enzymu byla měřena během uchování při laboratorní teplotě, při teplotě 4 °C a -70 °C při dané hodnotě pH. Aktivita α -*N*-acetylgalaktosaminidasy byla stanovena dle metodiky (kapitola 3.2.1).

3.2.5 Vliv redukčních činidel

Byl testován vliv redukčních činidel ME (merkptoethanolu) a DTT (dithiothreitolu) o koncentracích 2 mM, 5 mM a 10 mM na aktivitu α -*N*-acetylgalaktosaminidasy. Enzymová aktivita byla stanovena dle (kapitola 3.2.1).

3.2.6 Stanovení koncentrace proteinů dle Bradfordové

Celkový obsah proteinů, přítomných ve vzorcích byl stanoven metodou dle Bradfordové [41]. Vazbou specifického barviva Coomassie Brilliant Blue na protein dochází k posunu absorpčního maxima ze 465 nm na 595 nm.

Ke vzorku (100 μ l) je přidáno činidlo Biorad protein Assay (1 ml) (obsahuje Coomassie Brilliant Blue) standardisované na BSA. Po 5 minutách je absorbance vzorku změřena při $\lambda = 595$.

3.3 Purifikace

3.3.1 Zpracování kultivačního média

Média ze všech kultur byla spojena. Purifikační procedura byla vždy zahájena přidáním Cellitu 512 (3,0 g/100 ml) a centrifugováním při 10000 ot.min⁻¹ po dobu 40 minut (odstranění mycelia, mouky a koloidů). Supernatant byl přefiltrován přes celuloasoasbestovou desku (Kreuznach K01, Seitz, DE), poté přes filtrační membránu Supor 47 mm s průměrem pórů 0,45 μ m (Pall, USA).

3.3.2 Ultrafiltrace

Přefiltrované médium bylo vždy před dalšími operacemi zkoncentrováno metodou ultrafiltrace v ultrafiltrační cele Amicon 8400 (Millipore) přes ultrafiltrační polyestersulfonovou membránu Millipore 76 mm s cut off 100 kDa (Millipore, USA).

Vzorky frakcí nanášených na SDS-PAGE jsou zkoncentrovány přes centrifugační kyvety Centricon YM-3 (Millipore) při 6000 ot.min⁻¹.

3.3.3 Sloupcová středotlaká kapalinová chromatografie

K purifikaci α -N-acetylgalaktosaminidasy kapalinovou chromatografií byl používán přístroj Äkta prime plus (Amersham Biosciences, SWE) vybaven pumpou, sběračem frakcí, detektorem teploty, tlaku a konduktivity, UV detektorem. Získaná data byla vyhodnocována a zpracována softwarem PrimeView 5.0.

3.3.3.1 Hydrofobní chromatografie

Hydrofobní chromatografie je separační metoda založená na hydrofobních interakcích mezi vzorkem v mobilní fázi a hydrofobními skupinami kotvených na nosič stacionární fáze. K interakcím molekul dochází při vysoké iontové síle a jejím postupným snižováním se nekovalentní interakce ruší, čímž dochází k eluci kotvených proteinů.

Jako stacionární fáze byla použita Phenyl-Sepharosa (HiPrep 16/10 Phenyl FF (low sub)) a pufr A (50 mM Mc Ilvaine pH 3 s 1M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) a pufr B (50 mM Mc Ilvaine pH 3) jako mobilní fáze.

3.3.3.2 Gelová chromatografie

Gelová chromatografie je separační metoda, která umožňuje dělení molekul podle jejich tvaru a velikosti v závislosti na velikosti pórů stacionární fáze.

Pro separaci látek gelovou chromatografií byl jako stacionární fáze použit gel Sephacryl S-200 (HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 High Resolution) a pufr Mc Ilvaine (50 mM; pH 3), nebo Britton-Robinsonův pufr (160 mM; pH 3) jako mobilní fáze.

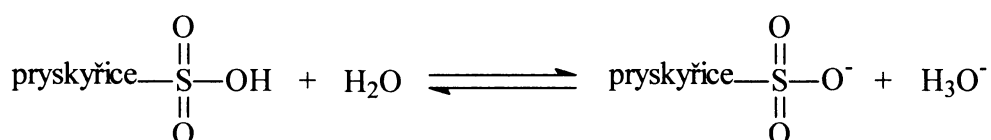
Dále byla použita kolona s náplní Superdex 200 (Tricorn Superdex 200 10/300 GL), jako mobilní fáze byl použit acetátový pufr (50 mM; pH 3,6).

3.3.3.3 Ionexová chromatografie

Ionexová chromatografie je separační metoda, při níž lze látky dělit na základě jejich náboje při daném pH. Mezi stacionární fází a ionty opačného náboje nalézajících se v mobilní fázi dochází k elektrostatickým interakcím, jejichž intenzita se mění se změnou pH, nebo iontové síly mobilní fáze.

Při anexové chromatografii byl jako stacionární fáze použit silný anex Q-Sepharosa (HiPrep 16/10 Q FF = fast flow) a pufr A (50mM citráto-fosfátový pufr Mc Ilvaine) a pufr B (50mM citráto-fosfátový pufr Mc Ilvaine s 1M NaCl) jako mobilní fáze. K eluci složek byl zvolen gradient 0 – 100 % pufru B. Byly testovány pufrы o pH 6 a 7,8.

Při katexové chromatografii byl jako stacionární fáze použit silný katex Fractogel EMD SO₃⁻ (Merck) (Schéma je na *Obr. 13*) a pufr A (50mM citráto-fosfátový pufr Mc Ilvaine) a pufr B (50mM citráto-fosfátový pufr Mc Ilvaine s 1M NaCl) jako mobilní fáze. K eluci složek byl zvolen gradient 0 % – 100 % pufru B. Byly testovány pufrы o různých pH a různá velikost gradientu [ml] a rychlosti průtoku [ml.min⁻¹].



Obr. 13 Schéma mechanismu funkce katexu Fractogel EMD SO₃⁻ (S) (Merck)

3.4 Elektroforesa

Elektroforetická analýsa proteinů byla použita pro stanovení molekulové hmotnosti proteinů a pro sledování čistoty vzorků v jednotlivých frakcích v průběhu purifikace.

3.4.1 SDS-PAGE

Metodou SDS-PAGE (elektroforesa v přítomnosti dodecylsíranu sodného) jsou jednotlivé proteiny separovány na základě různé mobility, která je dána jejich molekulovou hmotností, ve stejnosměrném elektromagnetickém poli. Molekulovou hmotnost separovaných proteinů lze určit na základě porovnání jejich relativních mobilit s mobilitami standardů.

5% zaostřovací gel [ml]:

H₂O – 6,8

30% akrylamid. směs (29 % (w/v) akrylamid a 1 (w/v) *N,N'*-metylenbisakrylamid – 1,7

1,5M Tris (pH 8,8) – 1,25

10% SDS – 0,1

10% persíran amonný – 0,1

TEMED – 0,01

8% Tris-glycinový SDS-Polyakrylamidový dělicí gel [ml]:

H₂O – 4,6

30% akrylamid. směs (29 % (w/v) akrylamid a 1% (w/v) *N,N'*-metylenbisakrylamid – 2,7

1,5M Tris (pH 8,8) – 2,5

10% SDS – 0,1

10% persíran amonný – 0,1

TEMED – 0,006

SDS vzorkovací pufr:

50mM Tris·HCl (pH 6,8)

2% SDS

0,1% bromfenolová modř

10% glycerol

100mM DTT (v případě SDS v redukujícím prostředí je v pufru obsažen)

Tris-glycinový elektroforetický pufr:

25mM Tris

250mM glycin (pH 8,3)

0,1% SDS

V průběhu elektroforesy jsou nastaveny tyto parametry:

pro průchod vzorku zaostřovacím gelem: $U = 80 \text{ V}$, $I = 30 \text{ mA}$, $P = 3 \text{ W}$

pro průchod vzorku dělicím gelem: $U = 130 \text{ V}$; $I = 50 \text{ mA}$, $P = 7 \text{ W}$

3.4.2 Detekce a visualisace proteinů

Dělicí gel byl po proběhnutí elektroforesy barven v roztoku připraveného rozpuštěním 0,25 g Coomassie Brilliant blue ve 45 ml methanolu, 45 ml H_2O a 10 ml CH_3COOH po dobu 5 hodin. K odbarvení se používá směs stejného složení, avšak bez přítomnosti Coomassie Brilliant blue. Vyvolaný gel je skladován v 1% CH_3COOH .

4. VÝSLEDKY

4.1 Screening produkce extracelulární α -*N*-acetylgalaktosaminidasy

Byl proveden screening producentů extracelulární α -*N*-acetylgalaktosaminidasy u 42 vybraných kmenů mikroskopických vláknitých hub ze sbírky CCF (Culture Collection of Fungy) Katedry botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze a u 1 kmene ze sbírky CCIM (Culture Collection of Institute of the Microbiology).

Zároveň byly zjišťovány i vedlejší α -galaktosidasové a β -*N*-acetylglukosaminidasové aktivity.

4.1.1 Vliv koncentrace sójové mouky na produkci α -*N*-acetylgalaktosaminidasy

α -*N*-Acetylgalaktosaminidasa je extracelulární inducibilní enzym, který není (nebo jen v nepatrném množství) do média produkován konstitutivně (srov. s Borzovou et. al [34]). Jako hlavní zdroj uhlíku byla použita odtučněná sójová mouka, která mj. vykazuje indukční efekt na produkci α -*N*-acetylgalaktosaminidasy, ale i α -galaktosidasy. Sójová mouka obsahuje množství glykoproteinů, které jsou terminálně α -*N*-acetylgalaktosaminidylovány a α -galaktosylovány. U *Aspergillus tamaris* CCF 1665 byl testován vliv koncentrace sójové mouky v koncentraci 50 g.l⁻¹ a 25 g.l⁻¹ na produkci α -*N*-acetylgalaktosaminidasy a α -galaktosidasy při teplotě 25 °C a 220 ot.min⁻¹. Při koncentraci 50 g.l⁻¹ je sice nepatrně vyšší produkce α -*N*-acetylgalaktosaminidasy, avšak podstatně vzrůstá aktivita α -galaktosidasy (poměr α -galaktosidasy a β -*N*-acetylglukosaminidasy ku α -*N*-acetylgalaktosaminidase je vysoký v neprospěch α -*N*-acetylgalaktosaminidasy). Výchozí koncentrace sójové mouky – 25 g.l⁻¹ – byla volena také proto, že by větší koncentrace mouky mohla při purifikačních procedurách činit obtíže, což se později potvrdilo.

N-Acetylgalaktosamin, laktosa a sójový hydrolyzátní nevykazovaly na produkci α -*N*-acetylgalaktosaminidasy u *Aspergillus niger* CCIM K2 (jinak nejlepší producent α -*N*-acetylgalaktosaminidasy) žádný indukční efekt.

4.1.2 Vliv teploty a rotace na produkci α -*N*-acetylgalaktosaminidasy

Některé testované kmeny (Tab. 4) byly kultivovány při teplotě 25 °C a 220 ot.min⁻¹. Bylo zjištěno, že produkční maxima jsou v důsledku pomalejšího metabolismu posunuta a nastávají později, což není výhodné, protože při delší kultivaci jsou do média houbou produkovány další proteiny (např. proteasy, apod.). Houby tedy byly kultivovány při teplotě 28 °C.

Rychlost otáček nemá na produkci α -*N*-acetylgalaktosaminidasy rozhodující vliv. Homogenita kultivované houby a média byla při 220 ot.min⁻¹ vyšší než při 200 ot.min⁻¹ a činila těžkosti při odebrání vzorků. Z tohoto důvodu byla zvolena rotace 200 ot.min⁻¹.

4.1.3 Objemové aktivity α -*N*-acetylgalaktosaminidasy testovaných kmenů hub

Výběr kmenů hub byl činěn s přihlédnutím k publikovaným datům Borzové et al. [34]. Byly vybrány především druhy rodu *Aspergillus* a *Penicillium*. Všechny testované kmeny mikroskopických vláknitých hub jsou uvedeny v (Tab. 4 a Tab. 6).

Submersní kultivace hub byla prováděna po dobu 7 dní (u *Aspergillus tamarii* CCF 1665 a *Aspergillus niger* CCIM K2 probíhala déle). Délka kultivace byla časově omezena, protože ve stacionární fázi dochází k částečné lysi hyf a do kultivačního média se uvolňuje obsah cytosolu, který obsahuje intracelulární enzymy. Druhým důvodem byl i vysoký nárůst vedlejších aktivit během kultivace (poměr objemových aktivit α -*N*-acetylgalaktosaminidasy ku α -galaktosidase a β -*N*-acetylglukosaminidase s délkou kultivace vzrůstal v neprospěch α -*N*-acetylgalaktosaminidasy).

Specifická aktivita během screeningu stanovována nebyla, neboť základní nezaočkované médium obsahovalo velké množství proteinů. Stanovené specifické enzymové aktivity by pak nepopisovaly skutečný stav. Situaci by neřešila ani aproximace specifické aktivity na počáteční koncentraci proteinů, protože se během kultivace ze sójové mouky působením houby do kultivačního média uvolňuje velké množství proteinů.

α -*N*-Acetylgalaktosaminidasa je u testovaných hub produkována ve velmi malém množství (nebo není produkována vůbec), přesto v sekci *Nigri* byli nalezeni potenciálně dobří producenti – *Aspergillus niger* CCIM K2 (154 mU.ml⁻¹), *Aspergillus niger* CCF 2477 (105,60 mU.ml⁻¹), *Aspergillus niger* CCF 629 (95,40 mU.ml⁻¹), *Aspergillus niger* CCF 1837 (78,60 mU.ml⁻¹) (Tab. 6).

Mimo sekci *Nigri* jsou to – *Aspergillus tamaris* CCF 3085 (74,30 mU.ml⁻¹) a *Penicillium daleae* CCF 2365 (64,10 mU.ml⁻¹). Vzhledem k tomu, že *Aspergillus niger* CCIM K2 opakovaně vykazoval nejvyšší objemovou aktivitu α -*N*-acetylgalaktosaminidasy, byla provedena optimalisace submersního kultivačního média pro jeho kultivaci.

Souběžně s α -*N*-acetylgalaktosaminidasovou aktivitou byla stanovována i α -galaktosidasová a β -*N*-acetylglukosaminidasová aktivita. Byly nalezeny vysoce produktivní kmeny α -galaktosidasy a β -*N*-acetylglukosaminidasy. Nejlepšími producenty α -galaktosidasy jsou především zástupci rodu *Penicillium* – *Penicillium vinaceum* CCF 2384 (5,59 U.ml⁻¹), *Penicillium multicolor* CCF 2244 (5,42 U.ml⁻¹), *Penicillium brasilianum* CCF 2155 (4,80 U.ml⁻¹) (Tab. 6).

Nejlepšími producenty β -*N*-acetylglukosaminidasy jsou především zástupci rodu *Aspergillus* – *Aspergillus niger* CCF 3264 (4,30 U.ml⁻¹), *Aspergillus niger* CCF 2477 (2,16 U.ml⁻¹), *Aspergillus niger* CCF 799 (2,08 U.ml⁻¹) (Tab. 6).

Tabulka 6. Zjištěné objemové aktivity α -N-acetylgalaktosaminidasy testovaných kmenů hub

Testovaný kmen houby	Průměrná obj. aktivita α -galNAc-asy [mU.ml ⁻¹]	Produkční maximum [den]
<i>Absidia macrospora</i> CCF 1006	4,00	5
<i>Aspergillus aculeatus</i> CCF 3134	2,20 ⁽¹⁾	4
<i>Aspergillus awamori</i> CCF 549	1,50	6
<i>Aspergillus awamori</i> CCF 641	5,50	6
<i>Aspergillus awamori</i> CCF 763	27,70	3
<i>Aspergillus carbonarius</i> CCF 1877	3,30	4
<i>Aspergillus carbonarius</i> CCF 2952	9,50	5
<i>Aspergillus carbonarius</i> CCF 3388	3,60	3
<i>Aspergillus niger</i> CCIM K2	153,60 ⁽²⁾ / 134,30 ⁽³⁾	6 / 7
<i>Aspergillus niger</i> CCF 629	95,40	5
<i>Aspergillus niger</i> CCF 701	65,20	3
<i>Aspergillus niger</i> CCF 717	34,60	3
<i>Aspergillus niger</i> CCF 799	10,90	5
<i>Aspergillus niger</i> CCF 831	9,80	3
<i>Aspergillus niger</i> CCF 870	2,20	5
<i>Aspergillus niger</i> CCF 889	9,50	4
<i>Aspergillus carbonarius</i> CCF 943	32,80	3
<i>Aspergillus niger</i> CCF 1279	6,90	7
<i>Aspergillus niger</i> CCF 1597	55,70	6
<i>Aspergillus niger</i> CCF 1598	12,00	6
<i>Aspergillus niger</i> CCF 1599	60,80	3
<i>Aspergillus niger</i> CCF 1600	100,80	4
<i>Aspergillus niger</i> CCF 1837	78,60	4
<i>Aspergillus niger</i> CCF 2477	105,60	4
<i>Aspergillus niger</i> CCF 2818	10,60	5
<i>Aspergillus niger</i> CCF 2875	49,90	4
<i>Aspergillus niger</i> CCF 3264	58,20 ⁽¹⁾	5
<i>Aspergillus oryzae</i> CCF 1066	Neprodukoval ⁽¹⁾	---

Testovaný kmen houby	Průměrná obj. aktivita α -galNAc-asy [mU.ml ⁻¹]	Produkční maximum [den]
<i>Aspergillus tamarii</i> CCF 1665	13,50 ⁽²⁾ / 9,50 ⁽³⁾	5 / 7
<i>Aspergillus tamarii</i> CCF 2492	4,40	6
<i>Aspergillus tamarii</i> CCF 3085	74,30	3
<i>Aspergillus versicolor</i> CCF 2491	5,50 ⁽¹⁾	5
<i>Emericella nidulans</i> CCF 2912	10,90 ⁽³⁾	7
<i>Eurotium amstelodamii</i> CCF 2723	12,40 ⁽¹⁾	6
<i>Humicola brunea</i> CCF 982	9,80 ⁽¹⁾	4
<i>Penicillium brasilianum</i> CCF 2155	2,50 ⁽¹⁾	5
<i>Penicillium daleae</i> CCF 2365	64,10	3
<i>Penicillium ochrochloron</i> CCF 2379	6,20 ⁽¹⁾	6
<i>Penicillium oxalicum</i> CCF 2430	3,60 ⁽¹⁾	6
<i>Penicillium vinaceum</i> CCF 2384	59,00	3
<i>Talaromyces flavus</i> CCF 2686	2,50 ⁽¹⁾	6

⁽¹⁾ Sójová mouka (50 g.l⁻¹); Kultivační teplota (28 °C); Rotace (200 ot.min⁻¹)

⁽²⁾ Sójová mouka (50 g.l⁻¹); Kultivační teplota (25 °C); Rotace (220 ot.min⁻¹)

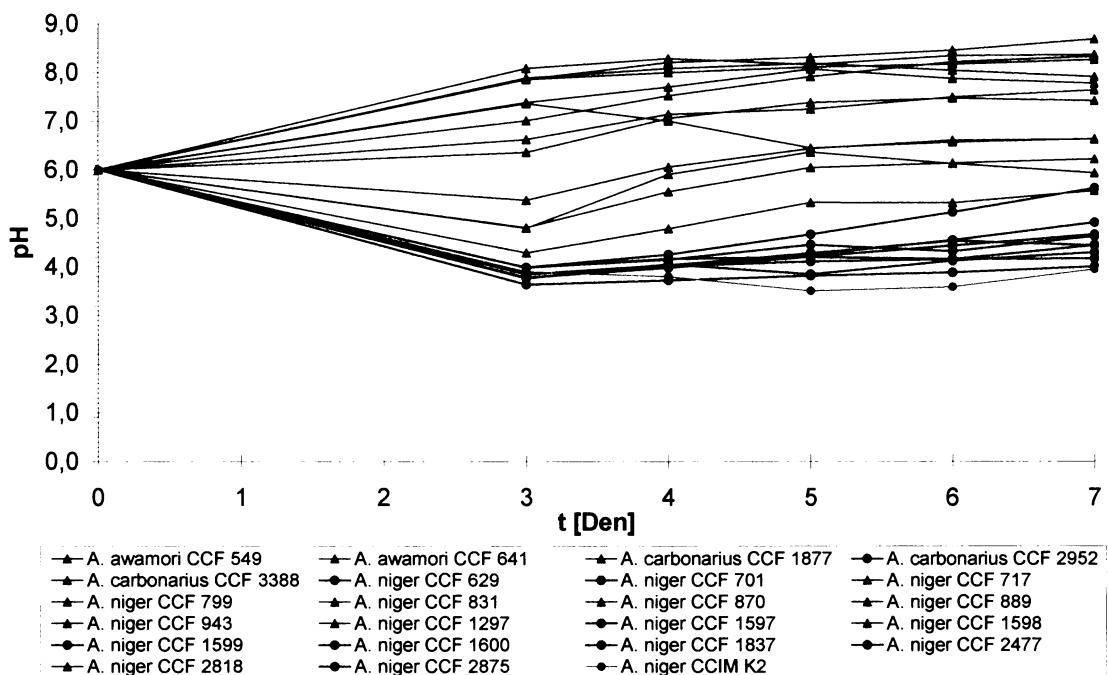
⁽³⁾ Sójová mouka (25 g.l⁻¹); Kultivační teplota (25 °C); Rotace (220 ot.min⁻¹)

Kultivační médium: [g.l⁻¹]: (25,0 – sójová mouka; 2,0 – KH₂PO₄; 0,3 – MgSO₄ · 7H₂O;
0,3 – CaCl₂; 7,5 – mykologický pepton)

Kultivační podmínky: Kultivační teplota (28 °C); Rotace (200 ot.min⁻¹)

4.1.4 Vliv změny pH média během kultivace na produkci α -N-acetylgalaktosaminidasy

Bylo potvrzeno, že *Aspergillus niger* je potenciálně dobrý producent α -N-acetylgalaktosaminidasy. Z tohoto důvodu byli otestováni dostupní zástupci ze sekce *Nigri* (CCF) na produkci α -N-acetylgalaktosaminidasy. Druhy rodu *Aspergillus* ze sekce *Nigri* bývají častými producenty kyseliny citrónové (také kys. šřavelové). Proto byla zjišťována změna pH zaočkovaného média v korelaci s produkcí α -N-acetylgalaktosaminidasy. U producentů α -N-acetylgalaktosaminidasy během tří dnů pH média klesalo pod hodnotu 4,0. Naopak pH média slabě produkčních (nebo téměř neprodukčních) kmenů nikdy nekleslo pod hodnotu pH 4,0, nebo rostlo (*Graf 1*).



červeně jsou uvedeny neprodukční kmeny, modře jsou označeny produkční kmeny, zeleně je označen *Aspergillus niger* CCIM K2

(Graf 1) – Změna pH média během kultivace u kmenů ze sekce *Nigri* – producenti α -N-acetylgalaktosaminidasy

4.2 Optimalisace kultivačních podmínek pro *Aspergillus niger* CCIM K2

Nejlepším producentem α -*N*-acetylgalaktosaminidasy je *Aspergillus niger* CCIM K2. Při optimalisaci kultivace pro produkci α -*N*-acetylgalaktosaminidasy byly sledovány tyto parametry: koncentrace sójové mouky (25,0 a 50,0 g.l⁻¹), pH kultivačního média (2, 3, 4, 6), kultivační teplota (25, 26 a 28 °C) a objem kultivační směsi (50 ml, 100 ml, 200 ml). Rotace byla ponechána na 200 ot.min⁻¹. Rozhodujícími kritérii, s ohledem na následnou purifikaci α -*N*-acetylgalaktosaminidasy, byly: minimalisace koncentrace sójové mouky, docílení co nejkratší doby kultivace a zvýšení poměru aktivit α -*N*-acetylgalaktosaminidasy ku α -galaktosidase, β -*N*-acetylglukosaminidase ve prospěch produkce α -*N*-acetylgalaktosaminidasy. Enzymové aktivity byly měřeny dle (kapitola 3.2.1) v prostředí citráto-fosfátového pufru Mc Ilvaine (50 mM; pH 5) při teplotě 35 °C.

4.2.1 Vliv koncentrace sójové mouky na produkci α -*N*-acetylgalaktosaminidasy

Koncentrace sójové mouky aktivitu a produkční maximum α -*N*-acetylgalaktosaminidasy příliš neovlivňovala (rozdíl mezi 6. a 7. dnem byl zcela zanedbatelný). Koncentrace sójové mouky naopak výrazně ovlivňovala produkci α -galaktosidasy a β -*N*-acetylglukosaminidasy. Snížením koncentrace sójové mouky z 50 g.l⁻¹ na 25 g.l⁻¹ došlo v den maximální produkce α -*N*-acetylgalaktosaminidasy k poklesu produkce α -galaktosidasy až o polovinu (Tab. 7).

Tabulka 7 – Vliv koncentrace sójové mouky na produkci α -*N*-acetylgalaktosaminidasy

Objem média [ml]	Sójová mouka [g.l ⁻¹]	Kultivační teplota [°C]	Výchozí pH média	Aktivita α -galNAc-asy [U.ml ⁻¹]	Aktivita α -gal-asy ⁽²⁾ [U.ml ⁻¹]	Aktivita β -glcNAc-asy ⁽²⁾ [U.ml ⁻¹]	Den ⁽¹⁾
50	50	25	6,0	0,154	0,805	0,954	6
50	25	25	6,0	0,134	0,543	0,458	7

⁽¹⁾ Produkční maximum α -*N*-acetylgalaktosaminidasy

⁽²⁾ Objemová aktivita α -galaktosidasy a β -*N*-acetylglukosaminidasy v produkčním maximu α -*N*-acetylgalaktosaminidasy

4.2.2 Vliv objemu kultivačního média na produkci α -*N*-acetylgalaktosaminidasy

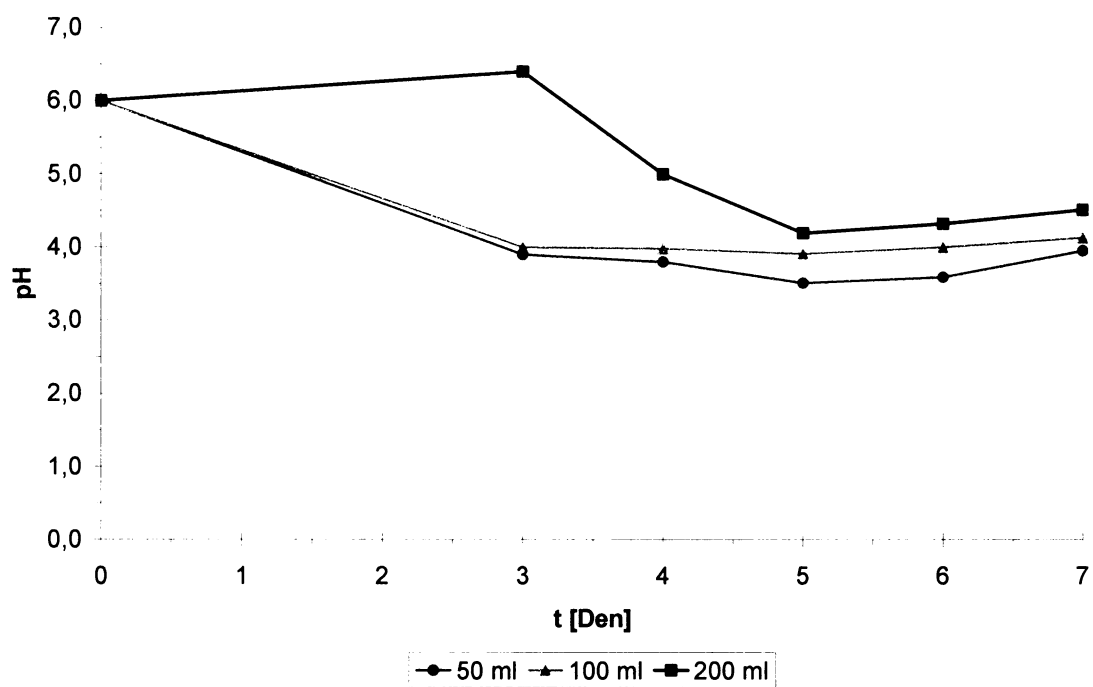
Nejvyšší aktivity α -*N*-acetylgalaktosaminidasy bylo dosaženo v kultivačním médiu o objemu 50 ml. Se stoupajícím objemem roztoku aktivita α -*N*-acetylgalaktosaminidasy výrazně klesá. Velikost změny pH média koreluje s objemem kultivační směsi a zároveň s produkcí α -*N*-acetylgalaktosaminidasy – čím je větší objem kultivační směsi, tím pomaleji hodnota pH média v průběhu kultivace klesá (*Graf 2*) a tím je menší produkce α -*N*-acetylgalaktosaminidasy (*Graf 3*). Poměr aktivit α -*N*-acetylgalaktosaminidasy ku α -galaktosidase, β -*N*-acetylglukosaminidase se zvýšil ve prospěch produkce α -*N*-acetylgalaktosaminidasy (*Tab. 8*).

*Tabulka 8 – Vliv objemu kultivačního média na produkci α -*N*-acetylgalaktosaminidasy*

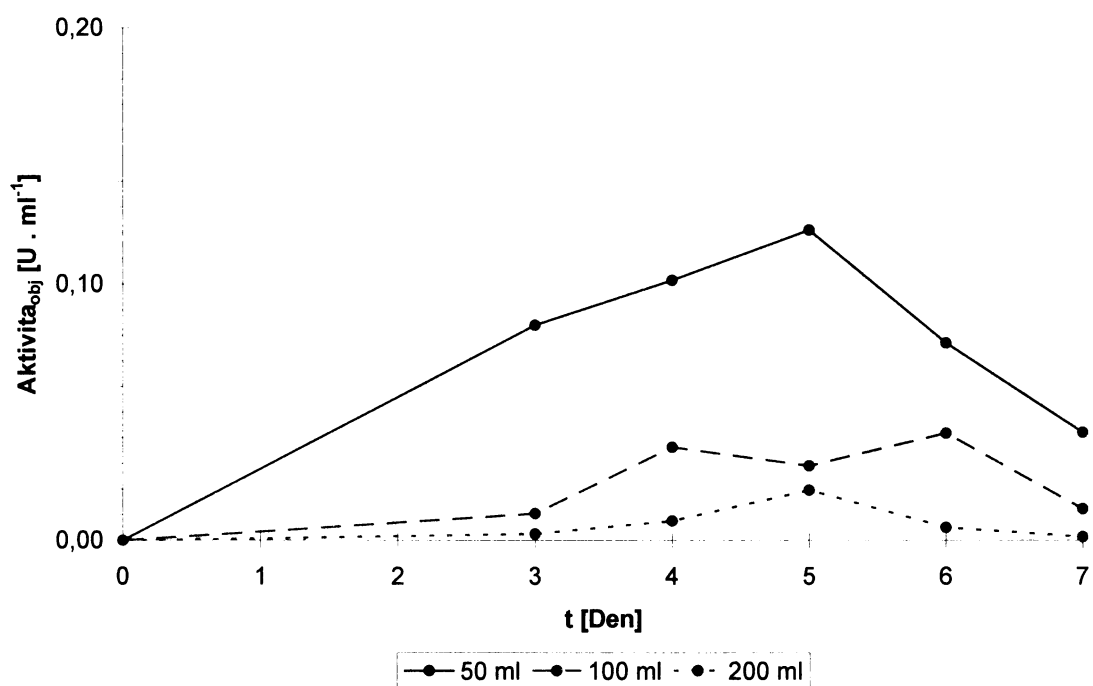
<i>Objem média [ml]</i>	<i>Sójová mouka [g.l⁻¹]</i>	<i>Kultivační teplota [°C]</i>	<i>Výchozí pH média</i>	Aktivita α-galNAc-asy [U.ml⁻¹]	<i>Aktivita α-gal-asy⁽²⁾ [U.ml⁻¹]</i>	<i>Aktivita β-glcNAc-asy⁽²⁾ [U.ml⁻¹]</i>	<i>Den⁽¹⁾</i>
50	25	25	6,0	0,121	0,291	0,766	5
100	25	25	6,0	0,042	0,384	0,686	6
200	25	25	6,0	0,020	0,375	0,360	5

⁽¹⁾ Produkční maximum α -*N*-acetylgalaktosaminidasy

⁽²⁾ Objemová aktivita α -galaktosidasy a β -*N*-acetylglukosaminidasy v produkčním maximu α -*N*-acetylgalaktosaminidasy



(Graf 2) – Vliv objemu kultivačního média na změnu pH během kultivace



(Graf 3) – Vliv objemu kultivační směsi na produkci α -N-acetylgalaktosaminidasy

4.2.3 Vliv teploty na produkci α -*N*-acetylglaktosaminidasy

Při kultivační teplotě 25 °C vykazovala α -*N*-acetylglaktosaminidasa nepatrně vyšší růstová maxima, než při teplotě 28 °C. Rovněž poměr aktivit α -*N*-acetylglaktosaminidasy ku α -galaktosidase a β -*N*-acetylglukosaminidase se zvýšil ve prospěch α -*N*-acetylglaktosaminidasy (Tab. 9).

Během kultivace nastával problém s udržení teploty na 25 °C (přehřívání třepačky), proto byla zvolena kompromisní varianta – všechny následující kultivace byly prováděny při teplotě 26 °C.

Tabulka 9 – Vliv teploty na produkci α -*N*-acetylglaktosaminidasy

Objem média [ml]	Sójová mouka [g.l ⁻¹]	Kultivační teplota [°C]	Výchozí pH média	Aktivita α -galNAc-asy [U.ml ⁻¹]	Aktivita α -gal-asy ⁽²⁾ [U.ml ⁻¹]	Aktivita β -glcNAc-asy ⁽²⁾ [U.ml ⁻¹]	Den ⁽¹⁾
50	25	25	6,0	0,134	0,543	0,458	7
50	25	28	6,0	0,076	0,400	1,050	5

⁽¹⁾ Produkční maximum α -*N*-acetylglaktosaminidasy

⁽²⁾ Objemová aktivita α -galaktosidasy a β -*N*-acetylglukosaminidasy v produkčním maximu α -*N*-acetylglaktosaminidasy

4.2.4 Vliv výchozího pH média na produkci α -*N*-acetylglaktosaminidasy

Se snižujícím se pH kultivačního média produkce α -*N*-acetylglaktosaminidasy mírně roste. Při pH 2 produkční maximum nastává 11. den, což není z hlediska optimalisace žádoucí (Tab. 10). Produkční maximum α -*N*-acetylglaktosaminidasy při pH 3 nastává šestý den, avšak poměr aktivit α -*N*-acetylglaktosaminidasy ku α -galaktosidase, β -*N*-acetylglukosaminidase je vysoký v neprospěch α -*N*-acetylglaktosaminidasy.

Pro separaci média byl vhodný pátý den kultivace, neboť při zanedbatelně nižší α -*N*-acetylglaktosaminidasové aktivitě (0,097 U.ml⁻¹) byla pozorována výrazně nižší produkce α -galaktosidasy (0,462 U.ml⁻¹) a β -*N*-acetylglukosaminidasy (0,585 U.ml⁻¹) (Tab. 10, Graf 4).

Tabulka 10 – Vliv výchozího pH kultivačního média na produkci α -N-acetylgalaktosaminidasy

Objem média [ml]	Sójová mouka [g.l ⁻¹]	Kultivační teplota [°C]	Výchozí pH média	Aktivita α -galNAc-asy [U.ml ⁻¹]	Aktivita α -gal-asy ⁽²⁾ [U.ml ⁻¹]	Aktivita β -glcNAc-asy ⁽²⁾ [U.ml ⁻¹]	Den ⁽¹⁾
50	25	26	2,0	0,154	0,425	1,833	11
50	25	26	3,0	0,103	0,567	0,856	6
50	25	26	4,0	0,106	0,678	0,812	4

⁽¹⁾ Produkční maximum α -N-acetylgalaktosaminidasy

⁽²⁾ Objemová aktivita α -galaktosidasy a β -N-acetylglukosaminidasy v produkčním maximu α -N-acetylgalaktosaminidasy

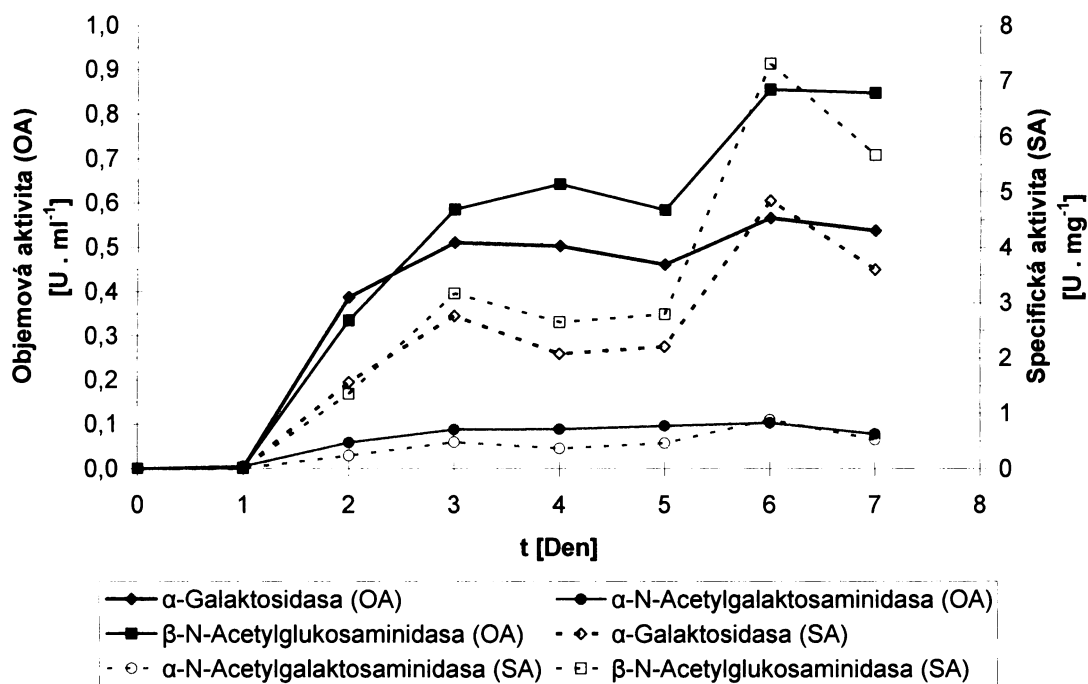
4.2.5 Optimalisované parametry kultivačního média a kultivačních podmínek

Optimalisací kultivačního média bylo dosaženo výrazného snížení α -galaktosidasové aktivity na cca 0,5 U.ml⁻¹ a β -N-acetylglukosaminidasové aktivity na cca 0,6 U.ml⁻¹. Objemová aktivita α -N-acetylgalaktosaminidasy se pohybuje v rozmezí 0,09 – 0,11 U.ml⁻¹, specifická aktivita v rozmezí 0,45 – 0,85 U.mg⁻¹ proteinů (Graf 4).

Z výše získaných údajů (kapitola 4.2) bylo navrženo kompromisní, optimální nastavení podmínek pro kultivaci *Aspergillus niger* CCIM K2:

Kultivační médium: [g.l⁻¹): (25,0 – hladká sójová odtučněná mouka; 2,0 – KH₂PO₄; 0,3 – MgSO₄ · 7H₂O; 0,3 – CaCl₂; 7,5 – mykologický pepton).

Kultivační podmínky: Kultivační teplota – 26 °C; Rotace 200 ot.min⁻¹; Objem média – 50 ml; pH média 3; Den zpracování média – 5. den



(Graf 4) – Objemová a specifická aktivita α -N-acetylglaktosaminidasy, α -galaktosidasy a β -N-acetylglukosaminidasy po optimalisaci kultivačních podmínek

4.3 Charakterisace vlastností α -N-acetylglaktosaminidasy z *Aspergillus niger* CCIM K2

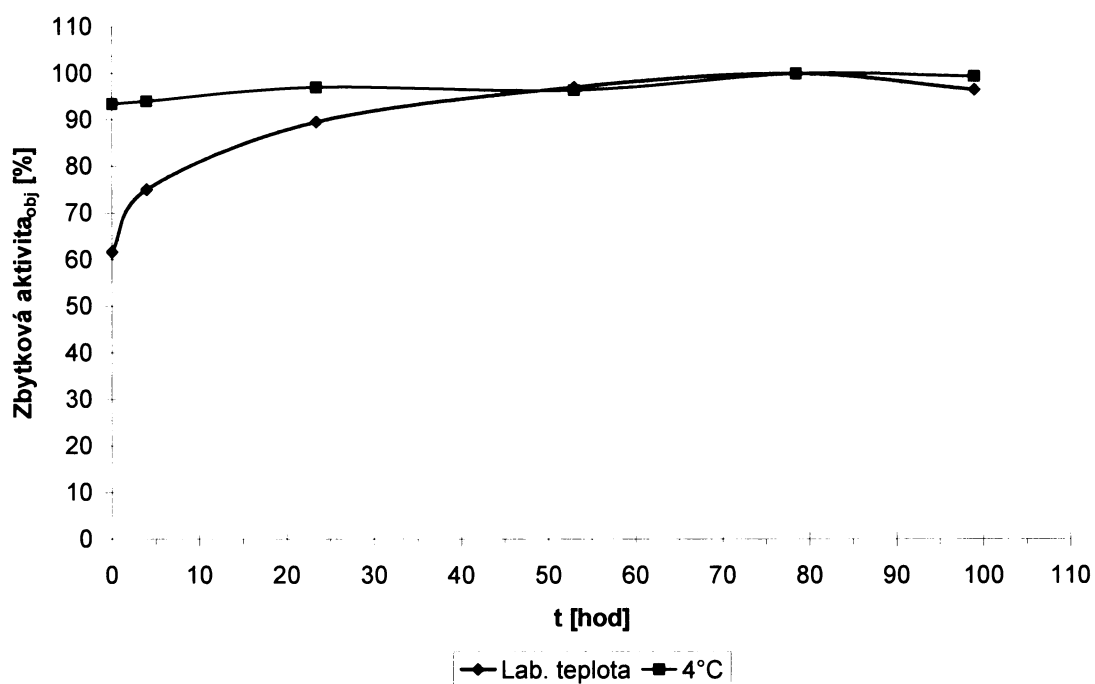
Screeningem bylo zjištěno, že *Aspergillus niger* CCIM K2 je nejen dobrým producentem α -N-acetylglaktosaminidasy, ale i α -galaktosidasy a β -N-acetylglaktosaminidasy. Cílem řešeného projektu v Laboratoři biotransformací MBÚ AV ČR je provést strukturální a následně fylogenetickou studii obou enzymů, které jsou evolučně příbuzné. Primárním krokem je provést základní charakterisaci α -N-acetylglaktosaminidasy (tato práce) a α -galaktosidasy [42].

Před purifikačními procedurami bylo nutné zjistit základní vlastnosti a chování α -N-acetylglaktosaminidasy – pH optimum; pH stabilita; teplotní optimum; vliv redukčních činidel a stabilita v roztoku při daných teplotách (s ohledem na skladování).

Pátý den kultivace bylo vždy médium s kultivovanou houbou slito, přefiltrováno (kapitola 3.3.1) a zkoncentrováno (kapitola 3.3.2) na cca třetinový objem, protože α -N-acetylglaktosaminidasa ve zředěných roztocích ztrácí aktivitu.

4.3.1 Stabilita enzymu při laboratorní teplotě, při 4 °C a při -70 °C

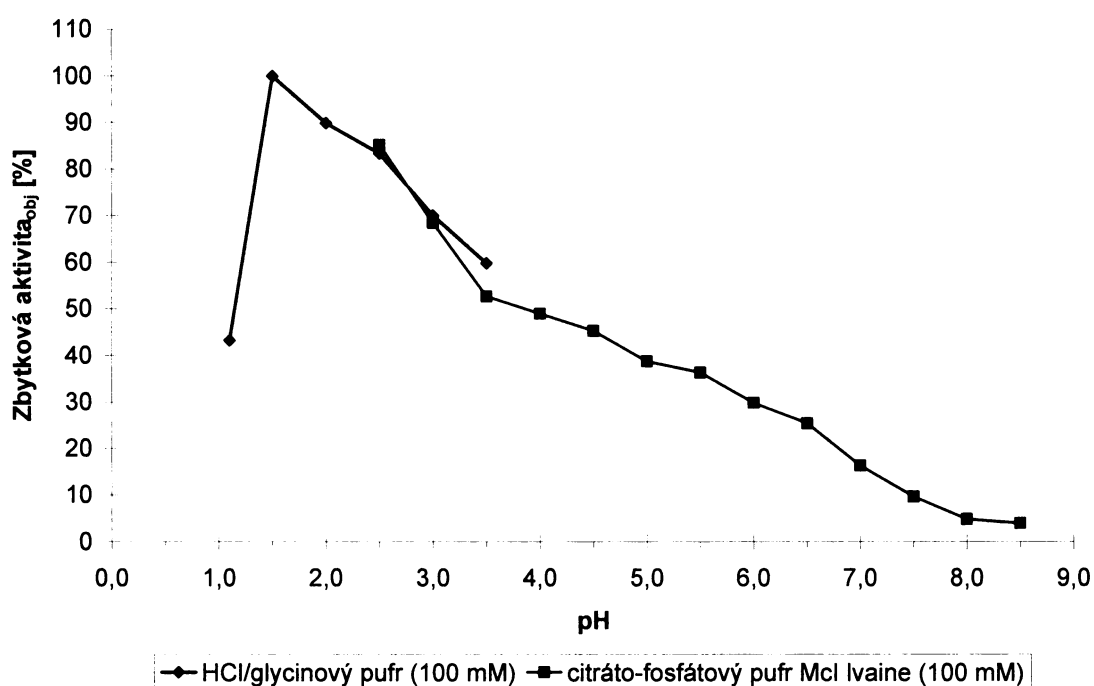
Enzymová aktivita byla stanovena dle (kapitola 3.2.1) v prostředí citrát-fosfátového pufru Mc Ilvaine (100 mM; pH 3) při teplotě 35 °C. α -N-Acetylgalaktosaminidasa vykazuje po dobu min. 100 hodin při teplotě 4 °C (lednice) vysokou stabilitu a pokles aktivity nebyl pozorován ani po 14 dnech skladování (Graf 5). Při laboratorní teplotě během prvních 40 hodin aktivita α -N-acetylgalaktosaminidasy mírně rostla. Tento efekt je možné vysvětlit tím, že v roztoku mohou monomerní neaktivní enzymové podjednotky reasociovat a vytvářet aktivní enzym. V dalších 60 hodinách nebyl zaznamenán ani růst a ani pokles stability. α -N-Acetylgalaktosaminidasa uchovávaná 6 dní při -18 °C vykazuje jen zanedbatelnou ztrátu aktivity (4 – 6 %), uchovávaná 6 dní bez kryoprotektiva a nutnosti precipitace síranem amonným při teplotě -70 °C ztrácí jen 7 – 10 % své aktivity. Lyofilisací aktivita klesá o necelých 40 %.



(Graf 5) – Stabilita α -N-acetylgalaktosaminidasy během skladování

4.3.2 pH Optimum α -N-acetylgalaktosaminidasy

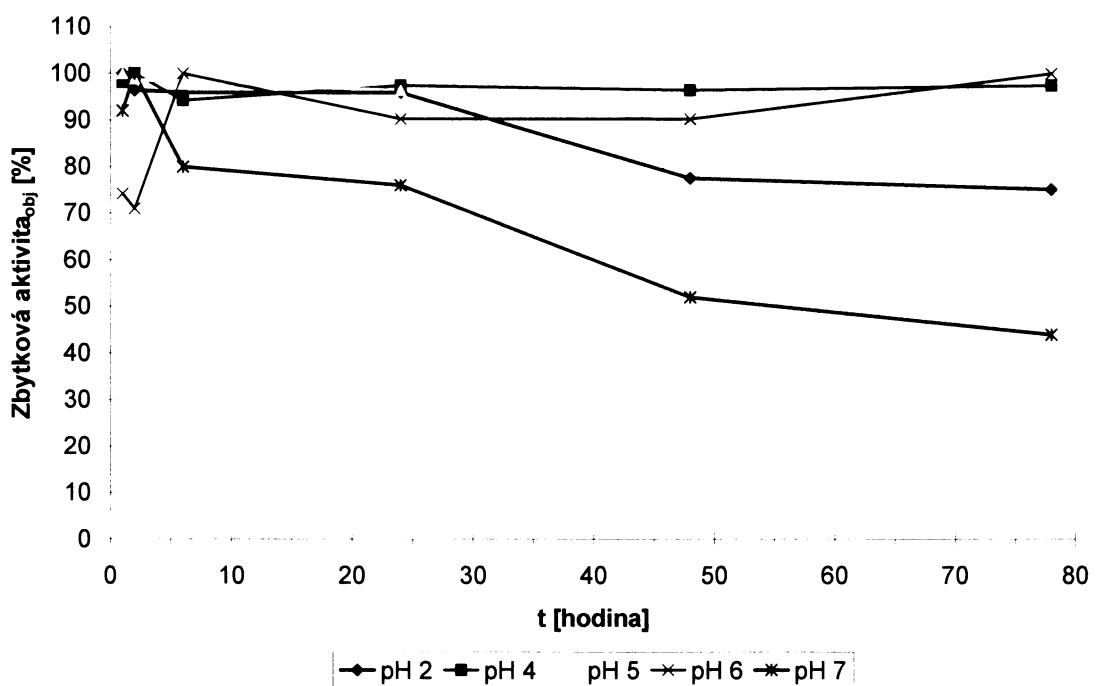
pH Optimum α -N-acetylgalaktosaminidasy bylo stanoveno dle (kapitola 3.2.3) v prostředí citráto-fosfátového pufru Mc Ilvaine (100 mM; pH 2,5 – 8,5) a v prostředí HCl/Glycinového pufru (100 mM; pH 1,1 – 3,5) při teplotě 35 °C. Při všech měřeních byly vyloučeny abiotické reakce, které by mohly stanovení zkreslit. **Osm opakovaných měření prokázalo, že pH optimum enzymu je 1,5 (Graf 6). Hodnota zjištěného pH optima je zcela unikátní a nikdy dosud nebyla u tohoto enzymu publikována.**



(Graf 6) – pH Optimum α -N-acetylgalaktosaminidasy

4.3.3 pH Stabilita α -N-acetylgalaktosaminidasy

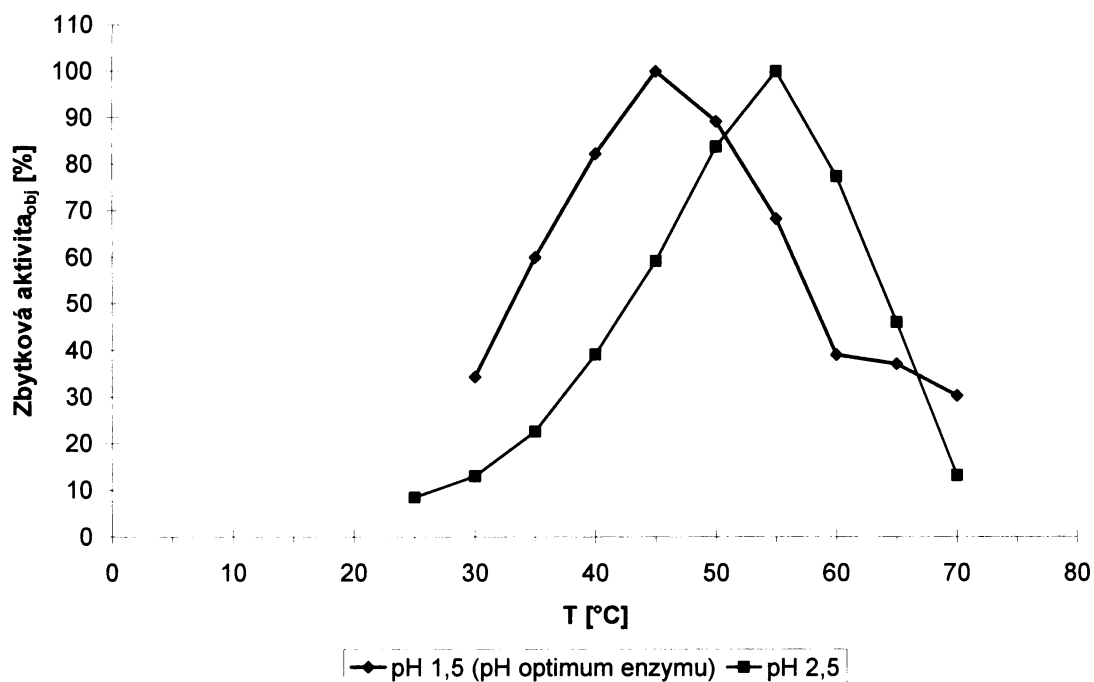
pH Stabilita α -N-acetylgalaktosaminidasy byla stanovena dle (kapitola 3.2.3) v prostředí HCl/Glycinového pufru (100 mM; pH 2) a v prostředí citráto-fosfátového pufru Mc Ilvaine (100 mM; pH 4, 5, 6 a 7) při teplotě 35 °C (Graf 7). V silně kyselém prostředí při pH 2 během druhého byl zaznamenán mírný pokles aktivity. Nejvyšší stabilita je pozorována při pH 4, 5 a 6 (po dobu 4 dnů). α -N-Acetylgalaktosaminidasa je nejméně stabilní v neutrálním prostředí, kdy s časem její aktivita rychle klesá.



(Graf 7) – pH Stabilita α -N-acetylgalaktosaminidasy

4.3.4 Teplotní optimum α -N-acetylgalaktosaminidasy

Teplotní optimum bylo stanoveno dle (kapitola 3.2.4) v prostředí HCl/Glycinového pufru (100 mM; pH 1,5 a 2,5). Teplotní optimum α -N-acetylgalaktosaminidasy při pH 2,5 je 55 °C, při pH 1,5 (pH optimum enzymu) 45 °C (Graf 8).



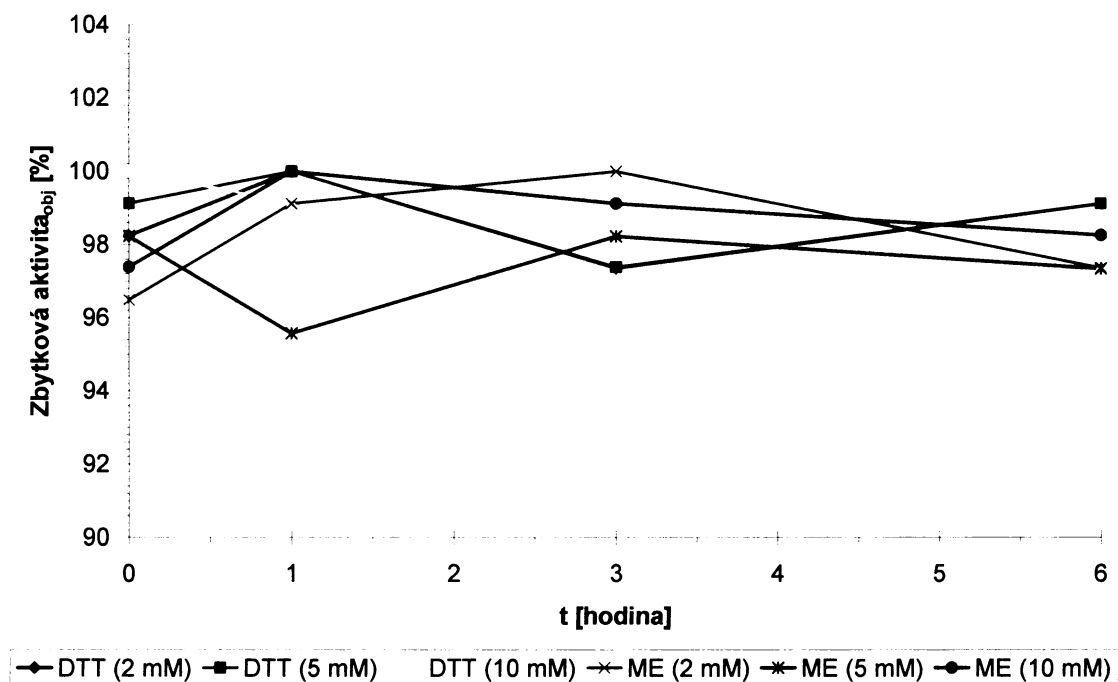
(Graf 8) – Teplotní optimum α -N-acetylgalaktosaminidasy

4.3.5 Vliv redukčního prostředí na aktivitu α -N-acetylgalaktosaminidasy

Redukční činidla DTT (dithiothreitol) a ME (merkapt ethanol) ovlivňují vznik disulfidických můstků, čímž mění strukturní uspořádání proteinů a u enzymů tak mohou výrazně ovlivňovat jejich aktivitu.

DTT a ME v koncentracích 2 mM, 5 mM a 10 mM v prostředí citrát-fosfátového pufru Mc Ilvaine (100 mM; pH 3) a teplotě 35 °C enzymovou aktivitu neovlivňují (ztráta cca 5 %) (Graf 9). Enzym neztrácí aktivitu ani po 4 dnech v prostředí těchto redukčních činidel.

To, že enzym je v prostředí redukčních činidel stabilní, může vypovídat o absenci, nebo malém počtu disulfidických můstků.



(Graf 9) – Vliv redukčních činidel na aktivitu α -N-acetylgalaktosaminidasy

4.4 Purifikace α -*N*-acetylgalaktosaminidasy z *Aspergillus niger* CCIM K2

Během purifikace α -*N*-acetylgalaktosaminidasy byla také měřena aktivita α -galaktosidasy a β -*N*-acetylglukosaminidasy, které byly v kultivačním médiu přítomny ve vysoké koncentraci.

Pro porovnání čistoty vzorků, srovnání přítomných proteinů a určení jejich molekulové hmotnosti byla prováděna denaturující elektroforesa (SDS-PAGE).

4.4.1 Ultrafiltrace

Prvním krokem purifikace byla vždy separace média od pevných částic a koloidů, následným zahuštěním roztoku pomocí ultrafiltrace přes ultrafiltrační membránu propouštějící částice menší než 100 kDa. Schopnost membrány oddělit molekuly na základě jejich velikosti není zcela stoprocentní a před ustanovením rovnováhy membránou pronikaly i částice větší než 100 kDa. Metodou SDS-PAGE bylo potvrzeno, že membránou částečně prochází všechny přítomné látky. pH Média bylo vždy upraveno na hodnotu pH pufru používaného při dané purifikační proceduře. Z cut off membrány lze alespoň částečně usuzovat, že velikost α -*N*-acetylgalaktosaminidasy bude větší než 100 kDa.

Po separaci pevných částic a koloidů bývají proteiny precipitovány $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a precipitát je pak dále zpracováván. Tento krok nebyl do purifikační procedury zahrnut, neboť během manipulace s precipitátem by vznikaly vysoké ztráty.

4.4.2 Středotlaká sloupcová kapalinová chromatografie

Při purifikaci α -*N*-acetylgalaktosaminidasy byly testovány čtyři hlavní purifikační kroky:

- anexová chromatografie (Q-Sepharose)
- hydrofobní chromatografie (Phenyl-Sepharose)
- gelová chromatografie (Sephacryl S-200), (Superdex 200)
- katexová chromatografie (Fractogel EMD SO_3^- (S))

4.4.2.1 Anexová chromatografie (Q-Sepharose)

Anexová chromatografie vůbec nevyhovovala požadavkům purifikační procedury. Jako stacionární fáze byla použita Q-Sepharosa, jako mobilní fáze pufr A (citráto-fosfátový pufr Mc Ilvaine 50 mM; pH 6, nebo 7,8) a pufr B (citráto-fosfátový pufr Mc Ilvaine 50 mM s 1M NaCl; pH 6, nebo 7,8). Při hodnotách pH 6 a 7,8 nedošlo k žádnému záchytu enzymů na kolonu. α -N-acetylgalaktosaminidasa nebyla detekována ani v eluátu. Příčinou může být volená hodnota pH, nebo vlastnosti stacionární fáze, kdy enzym mohl zcela pozbýt aktivity.

4.4.2.2 Hydrofobní chromatografie (Phenyl-Sepharose)

Při hydrofobní chromatografii, kdy byla použita Phenyl-Sepharosa jako stacionární fáze a pufr A (citráto-fosfátový pufr Mc Ilvaine 50 mM s 1M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; pH 3,0) a pufr B (citráto-fosfátový Mc Ilvaine 50 mM; pH 3,0) jako mobilní fáze, při lineárním gradientu 140 ml, nedošlo k žádnému záchytu sledovaných enzymů na kolonu. Z tohoto důvodu nebyla hydrofobní chromatografie při purifikaci vůbec použita.

4.4.2.3 Gelová chromatografie (Sephacryl S-200) a (Superdex 200)

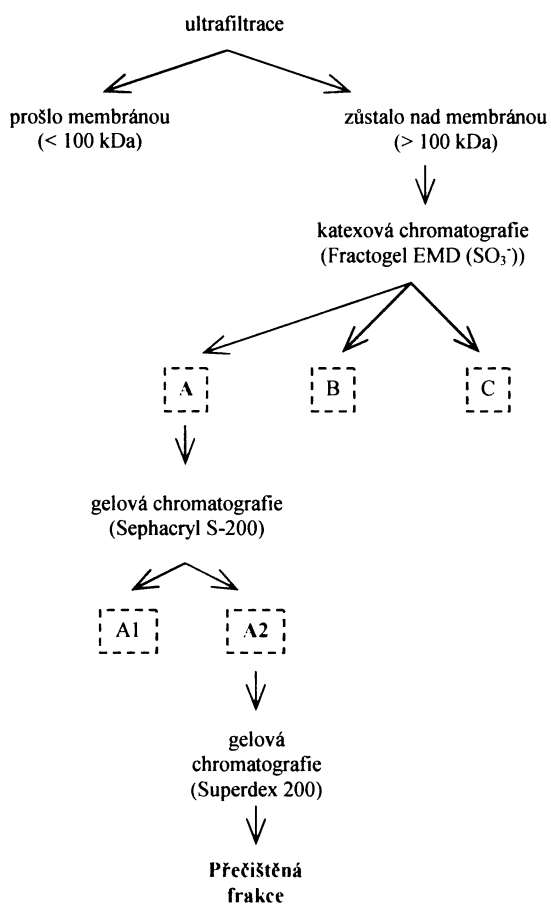
Při použití gelové chromatografie, kdy byl použit Sephacryl S-200 jako stacionární fáze a pufru (Mc Ilvaine 50 mM; pH 3,0), nebo pufru (Britton-Robinsonův 160 mM; pH 3,0) jako mobilní fáze, hledané enzymy prošly kolonou "s čelem". Došlo však k výraznému přečištění a odsolení vzorku, proto byla v kombinaci s jinými technikami k purifikaci použita. Účinnějšího oddělení proteinů touto gelovou chromatografií by pravděpodobně bylo možné při použití delší kolony s větším separačním rozsahem. Pro preciznější dělení složek byl použit gel Superdex 200 jako stacionární fáze a pufr (acetátový pufr 50 mM; pH 3,6) jako mobilní fáze.

4.4.2.4 Katexová chromatografie (Fractogel EMD SO_3^- (S))

Požadavky na purifikaci svými parametry nejlépe splnila použitá katexová chromatografie. Jako stacionární fáze byl v tomto případě použit silný katex (Fractogel EMD SO_3^- (S)) a pufr A (Mc Ilvaine 50 mM) a B (Mc Ilvaine 50 mM s 1M NaCl) jako mobilní fáze o daném pH. Byly testovány různé hodnoty pH (pH 3; 3,5; 4), při kterých docházelo k různě silné vazbě proteinů na stacionární fázi. Z grafů vytvořených na základě zjištění enzymových aktivit v získaných frakcích bylo zjištěno, že nejvhodnější je hodnota pH 3,5. Při této hodnotě pH β -*N*-acetylglukosaminidasa prochází kolonou bez zadržení a sledované enzymy α -galaktosidasa a α -*N*-acetylgalaktosaminidasa se na kolonu váží. Při pH 3 byl na kolonu zachycen i podíl β -*N*-acetylglukosaminidasy a naopak při pH 4 dochází již k slabší vazbě sledovaných enzymů na kolonu a k jejich částečnému procházení kolonou (pH 4 se pravděpodobně příliš blíží isoelektrickému bodu α -*N*-acetylgalaktosaminidasy a α -galaktosidasy). Proteiny vázané na kolonu byly uvolňovány lineárním gradientem pufru B 0 – 100 %. Během katexové chromatografie byl použit gradient 50 ml.

4.4.3 Vyhodnocení purifikační procedury

Schéma realizované purifikační procedury je na (Obr. 14).



Obr. 14 Schéma purifikační procedury α -N-acetylgalaktosaminidasy

1) Katexová chromatografie (Fractogel EMD SO_3^- (S))

Vzorek: Přefiltrované zkoncentrované kultivační médium

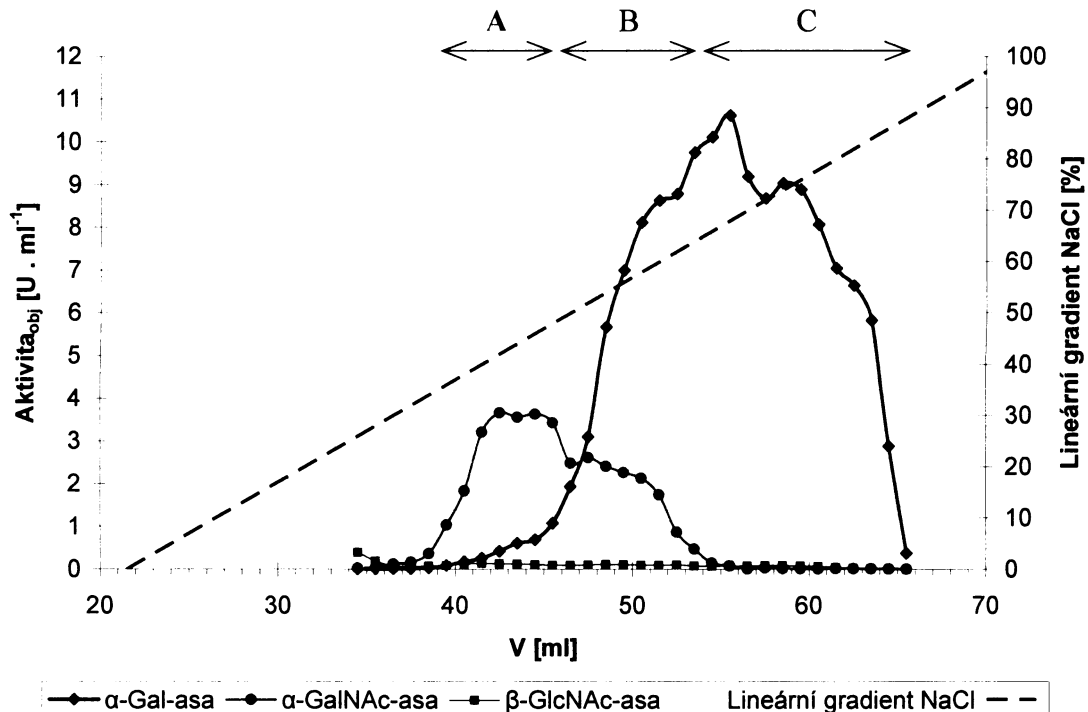
Pufr A: citráto-fosfátový pufr Mc Ilvaine (50 mM; pH 3,5)

Pufr B: citráto-fosfátový pufr Mc Ilvaine s 1M NaCl (50 mM; pH 3,5)

Rychlost průtoku: $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$

Tlak: max. 0,35 MPa

Při zvolených podmínkách byla téměř všechna β -*N*-acetylglukosaminidasa **odstraněna**, neboť se na kolonu nevázala (*Graf 10*). Získané frakce byly rozděleny na tři podíly – podíl A (39,5 ml – 45,5 ml), podíl B (46,0 – 53,5 ml) a podíl C (54,0 – 65,5 ml). Podíl A obsahuje především α -*N*-acetylgalaktosaminidasu, podíl B obsahuje směs α -*N*-acetylgalaktosaminidasy a α -galaktosidasu a podíl C obsahuje především α -galaktosidasu. Podíl A byl dále purifikován gelovou chromatografií (Sephacryl S-200).



(*Graf 10*) – Chromatogram (Fractogel EMD SO_3^- (S))

2) Gelová chromatografie (Sephacryl S-200)

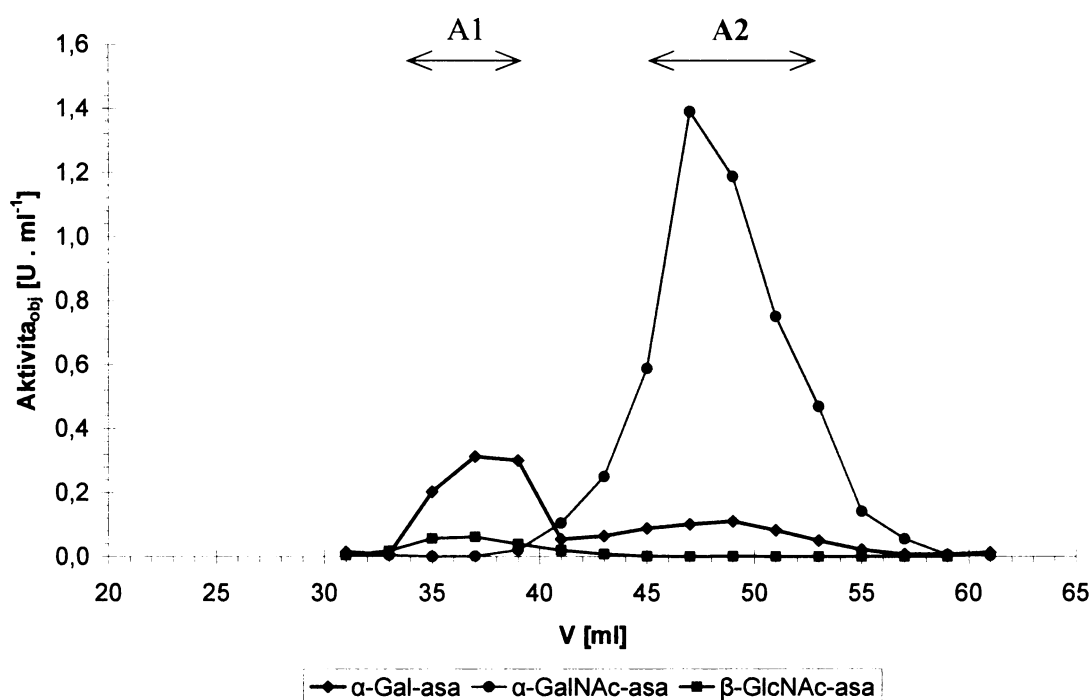
Vzorek: Frakce A

Pufr : Britton-Robinsonův pufr (160 mM; pH 3)

Rychlost průtoku: 0,6 ml.min⁻¹

Tlak: max. 0,35 MPa

Při zvolených podmínkách, přestože byly oba enzymy eluovány s čelem a jejich retenční časy si byly velmi blízké, došlo k poměrně dobrému oddělení α -N-acetylgalaktosaminidasové aktivity od α -galaktosidasové (*Graf 11*), přičemž byly odstraněny i malé globulární proteiny. Z chromatogramu jasně vyplývá, že separovaná α -N-acetylgalaktosaminidasa má ve svém nativním stavu menší molekulovou velikost než α -galaktosidasa, a proto prochází stacionární fází pomaleji. Získané frakce byly opět rozděleny na dva podíly – podíl A1 (34 – 39 ml) a podíl A2 (45 – 53 ml). Podíl A2 byl dále purifikován gelovou chromatografií (Superdex 200).



(*Graf 11*) – Chromatogram (Sephacryl S-200)

3) Gelová chromatografie (Superdex 200)

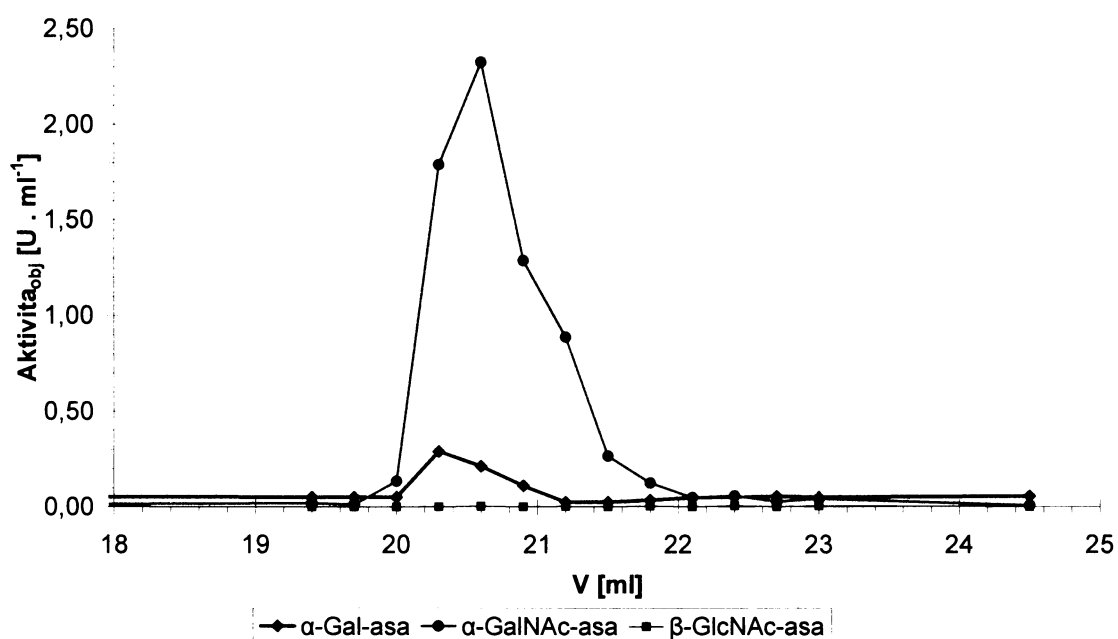
Vzorek: Frakce A2

Pufr: acetátový pufr (50 mM, pH 3,6)

Rychlost průtoku: 0,3 ml.min⁻¹

Tlak: max. 0,35 MPa

Při zvolených podmínkách došlo k velmi dobrému přečištění α -*N*-acetylgalaktosaminidasy. Z chromatogramu vyplývá, že vedle α -*N*-acetylgalaktosaminidasové aktivity je přítomna i zbytková α -galaktosidasová aktivita (β -*N*-acetylgalaktosaminidasová aktivita je zcela zanedbatelná). Tato skutečnost může poukazovat na to, že α -*N*-acetylgalaktosaminidasa by mohla vykazovat i vedlejší, nespecifickou α -galaktosidasovou aktivitu, nebo by se mohlo jednat o multienzymový komplex, případně je α -*N*-acetylgalaktosaminidasa ještě stále kontaminována vedlejší α -galaktosidasovou aktivitou (Graf 12). Rozhodnutí, ke které variantě se přiklonit, lze jen na základě substrátové specifity enzymu purifikovaného do homogenity, nebo exprimovaného jako heterogenní protein. Z retenčních časů vyplývá, že velikost nativní α -*N*-acetylgalaktosaminidasy je cca 440 kDa.



(Graf 12) – Chromatogram (Superdex 200)

4.4.4 Bilanční tabulka

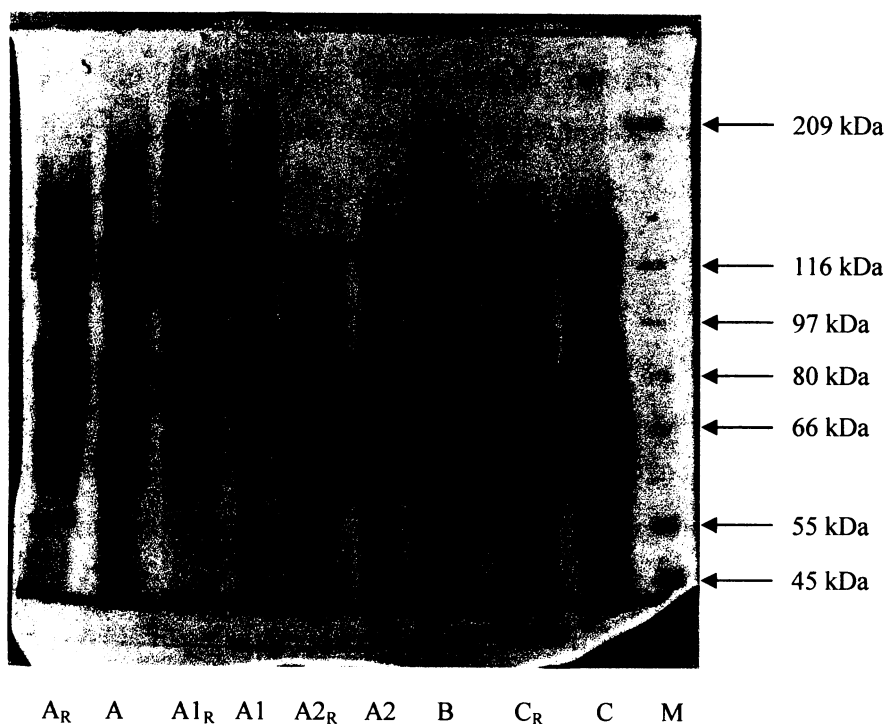
Bilance purifikační procedury je zobrazena v (Tab. 11). Nízký výtěžek je dán především ztrátami na koloně, při manipulaci se vzorky, ale i jejich odběry, které byly dále testovány pomocí SDS-PAGE.

Tabulka 11 – Bilanční tabulka purifikace α -N-acetylgalaktosaminidasy

	Proteiny [mg]	Aktivita [U]	Specifická aktivita [U.mg ⁻¹]	Purifikační faktor
Médium	89,04	33,92	0,38	-
Ultrafiltrace	59,33	35,83	0,60	1,6
Fractogel EMD	2,79	14,31	5,13	8,6
Sephacryl S-200	0,55	8,30	15,09	2,9
Superdex 200	0,16	1,80	11,18	0,7
Výtěžek		5,30 %		

4.4.5 SDS-PAGE

Elektroforetogram jednotlivých podílů v prostředí SDS je na (Obr. 15).



(Obr. 15) SDS-elektroforesa na 8% gelu

A, A_R – Podíl A (Graf 10); A1, A1_R – Podíl A1 (Graf 11); A2, A2_R – Podíl A2 (Graf 12); B – Podíl B (Graf 10); C, C_R – Podíl C (Graf 10), M - Markery

Indexem **R** jsou označeny podíly, které byly naneseny v pufru obsahujícím redukční činidlo DTT (dithiothreitol).

Pravděpodobná lokalizace majoritní denaturované subjednotky α -N-acetylgalaktosaminidasy na elektroforetogramu je označena šedými rámečky (Obr. 15).

5. DISKUSE

Jak již bylo v teoretické pasáži zmíněno, extracelulární α -*N*-acetylgalaktosaminidasa je enzym, který má vysoký potenciál použití – biomedicína – konverse krevních determinantů skupiny A na universální O(H); inkorporovaná do enzymových testů může sloužit jako jeden z markerů pro determinaci mikroorganismů, či k jejich taxonomické revisi; organická chemie – syntéza přesně definovaných glykosidů. Extracelulární α -*N*-acetylgalaktosaminidasa se u mikrobiálních organismů vyskytuje vzácně.

Hlavním komerčně používaným producentem α -*N*-acetylgalaktosaminidasy je bakterie *Clostridium perfringens*. Velkou nevýhodou této bakterie je její patogenita, produkce extracelulárních toxinů a nutnost kultivace v anaerobních podmínkách. Proto je velmi žádoucí nalézt jiné a výkonnější, pokud možno eukaryotické producenty extracelulární α -*N*-acetylgalaktosaminidasy. Vhodnými organismy jsou mikroskopické vláknité houby, neboť splňují důležité předpoklady – lze s nimi manipulovat jako s prokaryoty, rychle rostou a nevykazují tak vysokou mutační rychlost jako bakterie.

Výběr zástupců mikroskopických vláknitých hub pro screening produkce extracelulární *exo*- α -*N*-acetylgalaktosaminidasové aktivity byl proveden s přihlédnutím k výsledkům Borzové et al. [34], kde nejlepší producent je *Aspergillus niger*. Cílem práce bylo nalézt dobrého producenta extracelulární α -*N*-acetylgalaktosaminidasy, který by zároveň produkoval co nejméně těžce odstranitelných vedlejších enzymových aktivit (α -galaktosidasa, β -*N*-acetylglukosaminidasa). Jako zdroj mikroskopických vláknitých hub sloužila sbírka CCF (Culture Collection of Fungy) a CCIM (Culture Collection of the Institute of Microbiology).

Vybráni byli především zástupci rodů *Aspergillus* a *Penicillium*. Výběr kmenů testovaných druhů byl víceméně náhodný. Protože se jedná o primární výzkum, míra úspěšného nalezení producenta α -*N*-acetylgalaktosaminidasové aktivity je funkcí četnosti provedených screeningů jednotlivých kmenů hub. Kultivační médium bylo zvoleno dle Borzové et al. [35], včetně kultivačních podmínek a stanovení enzymových aktivit bylo provedeno dle (kapitola 3.2.1) při pH 5.

V ranných fázích screeningu byly testovány různé podmínky kultivace (teplota – 25 °C a 28 °C a otáčky – 220 ot.min⁻¹ a 200 ot.min⁻¹) a koncentrace sójové mouky v kultivačním médiu (50 g.l⁻¹ a 25 g.l⁻¹).

Jako optimální byla zvolena standardní kultivační teplota 28 °C.

Rychlost rotace neměla na produkci enzymu téměř žádný vliv a navíc při této rychlosti médium se zaočkovanou houbou bylo velmi homogenní a jeho odběr činil značné obtíže. Snížením rotace na 200 ot.min⁻¹ došlo ke snížení homogenity média, což podstatně usnadnilo odběr vzorků.

Sójová mouka je nejdůležitější složkou kultivačního média, která zároveň plní funkci induktoru α -*N*-acetylgalaktosaminidasové (především α -galaktosidasové a částečně také β -*N*-acetylglukosaminidasové) aktivity. Obsahuje řadu α -*N*-acetylgalaktosaminidylovaných a α -galaktosylovaných glykoproteinů. Byly provedeny pokusy o náhradu sójové mouky sójovým hydrolysátem, laktosou, nebo monosacharidem *N*-acetylgalaktosaminem. Při použití těchto látek α -*N*-acetylgalaktosaminidasa nebyla vůbec produkována (α -galaktosidasa jen v nepatrných koncentracích). Nevýhodou mouky je, že způsobuje kašovitou konzistenci kultivačního média. Při koncentraci 50 g.l⁻¹ je produkce α -*N*-acetylgalaktosaminidasy nepatrně vyšší, než při koncentraci 25 g.l⁻¹, výrazně však stoupá produkce α -galaktosidasy a β -*N*-acetylglukosaminidasy, proto byla koncentrace sójové mouky snížena na 25 g.l⁻¹ (kapitola 4.1.1).

Délka screeningu byla omezena na 7 dnů. Literatura udává, že během prvních sedmi dnů kultivace nastává produkční maximum α -*N*-acetylgalaktosaminidasy [34, 35]. Toto zjištění bylo potvrzeno (Tab. 6). Produkční maximum α -*N*-acetylgalaktosaminidasy vhodného producenta by mělo nastávat co nejdříve, neboť s prodlužující se dobou kultivace jsou do média uvolňovány i jiné enzymy. Při dlouhodobější kultivaci α -*N*-acetylgalaktosaminidasová aktivita klesá, za současného výrazného růstu α -galaktosidasové a β -*N*-acetylglukosaminidasové aktivity. Produkční maximum by nemělo nastávat ve chvíli, kdy se kultura nachází ve stacionární fázi růstu, při které dochází k částečné degradaci hyf a uvolňování cytosolu. Do média by tak mohly být uvolňovány intracelulární enzymy, které by svojí aktivitou stanovení zkreslily. Uvolněné proteasy by navíc mohly extracelulární α -*N*-acetylgalaktosaminidasu rozkládat.

Screening u testovaných kmenů mikroskopických vláknitých hub odhalil, že α -*N*-acetylgalaktosaminidasa je do média produkována ve velmi malých koncentracích a produkční maximum nastává během 3. – 7. dne kultivace (Tab. 6). Bylo zjištěno, že *Aspergillus niger* CCIM K2 (Tab. 6) je nejlepším producentem α -*N*-acetylgalaktosaminidasy.

Na základě tohoto zjištění byly otestovány dostupné kmeny sekce *Nigri* ze sbírky CCF. Během kultivace byla sledována i změna pH média. Bylo pozorováno, že u producentů α -*N*-acetylgalaktosaminidasy pH média vždy klesalo z výchozí hodnoty 6 a v třetí den kultivace nikdy nepřevyšovalo hodnotu 4 (Graf 1). Poté hodnota pH mírně stoupala (k podobnému závěru došla i Borzova et al. [35]). Výrazné snížení pH je pravděpodobně způsobeno produkcí kyseliny citrónové. Je možné, že existuje souvislost mezi poklesem pH a produkcí α -*N*-acetylgalaktosaminidasy. U kmenů, které enzym neprodukovaly, nebo jen minimálně byl během kultivace naopak pozorován vzrůst pH, nebo jen nepatrný pokles, který nikdy nedosáhl hodnoty pH 4 (Graf 1).

Opakovanými testy bylo dokázáno, že produkční křivky jsou pro každý kmen zcela unikátní a měření jsou reprodukovatelná. Změny v produkcích α -*N*-acetylgalaktosaminidasy u *Aspergillus niger* CCIM K2 během různých kultivací nebyly pozorovány.

Nejlepším producentem α -*N*-acetylgalaktosaminidasy je *Aspergillus niger* CCIM K2. K maximalisaci produkce α -*N*-acetylgalaktosaminidasy za současného snížení α -galaktosidasové aktivity a β -*N*-acetylglukosaminidasové aktivity bylo třeba testovat různé kultivační podmínky. Rozhodujícím kritériem byl poměr mezi jednotlivými měřeními enzymovými aktivitami.

Při kultivaci *Aspergillus niger* CCIM K2, při teplotě 25 °C, 220 ot.min⁻¹ a koncentraci 50 g.l⁻¹ sójové mouky, nastávalo produkční maximum α -*N*-acetylgalaktosaminidasy 6. den (0,153 U.ml⁻¹). Snížením koncentrace sójové mouky na 25 g.l⁻¹ za současného zachování všech ostatních parametrů došlo jen k zanedbatelnému snížení objemové aktivity α -*N*-acetylgalaktosaminidasy na 0,134 U.ml⁻¹ a posunu produkčního maxima na sedmý den. Zároveň však došlo k výraznému snížení vedlejší α -galaktosidasové aktivity, a to až o polovinu (1,0 U.ml⁻¹ → 0,5 U.ml⁻¹) (Tab. 7).

Při teplotě 25 °C α -*N*-acetylgalaktosaminidasová aktivita dosahuje nepatrně vyšších produkčních maxim, než při teplotě 28 °C (Tab. 9). Nebylo však spolehlivě zaručeno, že kultivační box bude korektně temperován, byla tedy zvolena kompromisní varianta – teplota 26 °C.

Nejvyšších aktivit bylo dosaženo při objemu kultivačního média 50 ml, nejnižších naopak při objemu 200 ml (shoda s Borzovou et al. [35]). Se změnou objemu z 50 ml na 200 ml, klesne α -*N*-acetylgalaktosaminidasová aktivita ve svém maximu o 84 % (Tab. 8). Tento efekt lze vysvětlit tak, že se zvyšujícím se objemem kapaliny roste i nestabilita enzymu, který disociuje na monomerní neaktivní jednotky.

Dalším faktorem, který ovlivňuje produkci enzymu, byla i výchozí hodnota pH kultivačního média. Testy prokázaly, že čím je výchozí hodnota pH média nižší, tím je α -*N*-acetylgalaktosaminidasa produkována ve vyšších koncentracích. Se změnou pH z hodnoty 4 na 2, vzroste α -*N*-acetylgalaktosaminidasová aktivita ve svém maximu o 31 % (Tab. 10). Jak bylo posléze zjištěno, enzym je stabilní pouze v kyselém prostředí, proto je pravděpodobné, že v neutrálním, či alkalickém nemusí být vůbec produkována.

S přihlédnutím ke všem zjištěným skutečnostem byly upraveny podmínky a složení kultivačního média (kapitola 4.2.5).

Před zahájením vlastní purifikační procedury bylo nutné provést základní charakterisaci enzymu. Vzhledem k nestabilitě enzymu ve zředěných roztocích bylo provedeno zkoncentrování na cca 1/3 – 1/4 původního objemu. Naundorf et al. [19] uvádí, že molekulová velikost enzymu je vyšší než 100 kDa, proto byla volena i membrána s cut off 100 kDa. Ve zkoncentrovaném roztoku při teplotě 4 °C α -*N*-acetylgalaktosaminidasa nevykazovala ztrátu aktivity ani po dvou týdnech. Při laboratorní teplotě v ranných fázích uchovávání naopak aktivita mírně rostla – pravděpodobně v důsledku reasociace neaktivních monomerů v aktivní dimery (oligomery). Délka skladování je důležitá pro purifikaci a další zpracování. Uchováváním při -70 °C po dobu 14 dnů α -*N*-acetylgalaktosaminidasa ztratila jen 7 – 10% své aktivity (kapitola 4.3.1). Jednoznačnou výhodou je, že enzym během skladování nevyžaduje přítomnost kryoprotektiva, či precipitaci síranem amonným.

α -*N*-Acetylgalaktosaminidasa vykazuje vysokou stabilitu i v prostředí redukčních činidel DTT a ME, což poukazuje na absenci, nebo přítomnost jen malého počtu disulfidických můstků (kapitola 4.3.5, (Graf 9)).

Velkým překvapením byla hodnota pH optima, která při teplotě 35 °C činí 1,5 (*Graf 6*). Měření bylo nezávisle opakováno v rámci různých vzorků (různé sběry média) 8x a pokaždé byla tato hodnota potvrzena. Během testování byly vyloučeny možné abiotické reakce (rozklad substrátu v kyselém prostředí), které by stanovení zkreslovaly. Nikde v dostupné literatuře není tak extrémně nízká hodnota pH optima α -*N*-acetylgalaktosaminidasy dosud publikována. Křivka pH optima má jen jeden vrchol, což může poukazovat na to, že α -*N*-acetylgalaktosaminidasa je přítomna jen v jedné isoformě. Souběžně bylo zjištěno pH optimum α -galaktosidasy (pH optimum 3,5) [42]. Je pravděpodobné, že i ostatní glykosidasy budou vykazovat podobně nízké hodnoty. Vzhledem ke zjištěnému pH optimu α -*N*-acetylgalaktosaminidasy, bylo vhodné snížit pH pufru, ve kterém byly enzymové aktivity stanovovány. pH 1,5 je příliš extrémní, proto byla zvolena kompromisní varianta pH 3. Je známo, že používané substráty v kyselém prostředí podléhají hydrolyse, opakovaně však bylo prokázáno, že k žádným abiotickým reakcím nedochází.

Enzym je stabilní v kyselé oblasti pH 3 – 6, což je v důsledku se zjištěným vlastnostmi očekávatelné. V neutrální oblasti pH enzym poměrně rychle začíná ztrácet svoji aktivitu (kapitola 4.3.3, (*Graf 7*)).

Teplotní optimum α -*N*-acetylgalaktosaminidasy nastává při 55 °C (pH 2,5) a při 45 °C (optimum pH 1,5). Jedno ostré maximum v grafu naznačuje, že produkovaný enzym se vyskytuje jen v jedné isoformě (*Graf 8*).

Během purifikační procedury byly sledovány společně s α -*N*-acetylgalaktosaminidasovou aktivitou i vedlejší α -galaktosidasové a β -*N*-acetylglukosaminidasové enzymové aktivity, které se velmi těžce odstraňují.

V publikacích jsou zmíněny především dvě používané metodiky purifikace. Každá zahrnuje precipitaci proteinů síranem amonným v kombinaci s anexovou (Q-Sepharosa) a gelovou chromatografií, či dialysou, nebo v kombinaci s hydrofobní a gelovou chromatografií. Cílem bylo navrhnout postup purifikace α -*N*-acetylgalaktosaminidasy, pokud možno s co nejmenším počtem purifikačních kroků. Precipitace síranem amonným nebyla provedena záměrně, protože během manipulace s precipitátem dochází k velkým ztrátám.

Použití silného anexu Q-Sepharosy se vůbec neosvědčilo, neboť při zvolených pH 6 a 7,8 nebyla α -*N*-acetylgalaktosaminidasa zachycena na kolonu, ani detekována v eluátu. Během purifikační procedury mohlo dojít k inaktivaci enzymu, což mohlo být způsobeno volbou pH, nebo vlastnostmi kolony. S přihlédnutím k pH optimu a stabilitě enzymu bylo pH pufru upraveno na hodnotu 3,5.

Phenyl-Sepharosa nebyla k purifikaci také vhodná a změnou podmínek by pravděpodobně k separaci α -*N*-acetylgalaktosaminidasy nedošlo.

Použité gelové chromatografie – Sephacryl S-200 a Superdex 200 – jsou vhodné jen v kombinaci s jinými purifikačními procedurami a slouží především k odstranění určitého podílu malých globulárních proteinů a solí.

Klíčovým purifikačním krokem bylo použití silného katexu Fractogelu EMD SO_3^- (S) (kapitola 4.4.2.4). Při pH 3,5 byla odstraněna téměř veškerá β -*N*-acetylglukosaminidasa, která stacionární fází nebyla téměř vůbec zachycena. Její isoelektrický bod je patrně níže než při hodnotě pH 4. K eluci α -*N*-acetylgalaktosaminidasy docházelo dříve, než k eluci α -galaktosidasy, přesto se oba vrcholy zčásti překrývaly (*Graf 10*).

Frakce obsahující největší aktivity α -*N*-acetylgalaktosaminidasy byly spojeny do jednoho podílu, který byl purifikován gelovou chromatografií za použití Sephacrylu S-200 jako stacionární fáze. Tímto purifikačním krokem došlo k poměrně dobrému rozdělení α -galaktosidasy a α -*N*-acetylgalaktosaminidasy. Z chromatogramu vyplývá, že α -*N*-acetylgalaktosaminidasa má ve svém nativním stavu menší molekulovou hmotnost než α -galaktosidasa, protože prochází stacionární fází rychleji (*Graf 11*).

Frakce obsahující největší aktivity α -*N*-acetylgalaktosaminidasy byly spojeny do jednoho podílu, který byl purifikován gelovou filtrací za použití Superdexu 200 jako stacionární fáze. Na chromatogramu jsou přítomny dva překrývající se vrcholy (*Graf 12*). Vyšší odpovídá α -*N*-acetylgalaktosaminidasové aktivitě a nižší α -galaktosidasové aktivitě. Z retenčních časů vyplývá, že se jedná buď o jeden protein, nebo o dva proteiny, které jsou eluovány ve stejný okamžik. α -*N*-Acetylgalaktosaminidasa může tedy být kontaminována vedlejší α -galaktosidasovou aktivitou, případně může vykazovat vedlejší, nespecifickou α -galaktosidasovu aktivitu, anebo může být vázána v multienzymovém komplexu. Rozhodnutí, ke které variantě se přiklonit, lze jen na základě substrátové specifity enzymu purifikovaného do homogenity, nebo exprimovaného jako heterogenní protein.

Z retenčních časů dále vyplývá, že molekulová velikost nativní α -*N*-acetylgalaktosaminidasy je cca 440 kDa.

Z výsledků SDS-PAGE je pravděpodobnější, že vedlejší α -galaktosidasová aktivita je pravděpodobně způsobena jedním z izozymů α -galaktosidasy, který má nepatrně větší molekulovou velikost než α -*N*-acetylgalaktosaminidasa.

Z elektroforetogramu dále vyplývá, že velikost monomerní denaturované jednotky α -*N*-acetylgalaktosaminidasy se pohybuje kolem 116 kDa (*Obr. 15*). Identifikaci bude možné potvrdit např. Edmanovou sekvenací vzorku z gelu a strukturu porovnat s databázemi.

Purifikační procedura byla ve fázi vývoje a testování, proto docházelo k vysokým ztrátám. Ztráty nastávaly také při zakoncentrování částí podílů, nanášených na SDS-PAGE a při stanovení enzymových aktivit a opětovném ověřování správnosti jednotlivých kroků. Jakmile bude purifikační procedura optimalisována, lze jistě očekávat větší výtěžky než jen 5,3 % (*Tab. 11*).

6. ZÁVĚR

Byl proveden screening producentů extracelulární *exo- α -N-acetylgalaktosaminidasy*, α -galaktosidasy a β -*N-acetylglukosaminidasy* u 42 vybraných kmenů hub ze sbírky CCF (Culture Collection of Fungi) a 1 kmene ze sbírky CCIM (Culture Collection of the Institute of Microbiology). Bylo zjištěno, že nejlepšími producenty α -*N-acetylgalaktosaminidasy* jsou některé kmeny *Aspergillus niger*, nejlepším producentem je *Aspergillus niger* CCIM K2. Zároveň bylo zjištěno, že nejlepšími producenty α -galaktosidasy jsou především zástupci rodu *Penicillium* a nejlepšími producenty β -*N-acetylglukosaminidasy* jsou především zástupci rodu *Aspergillus*.

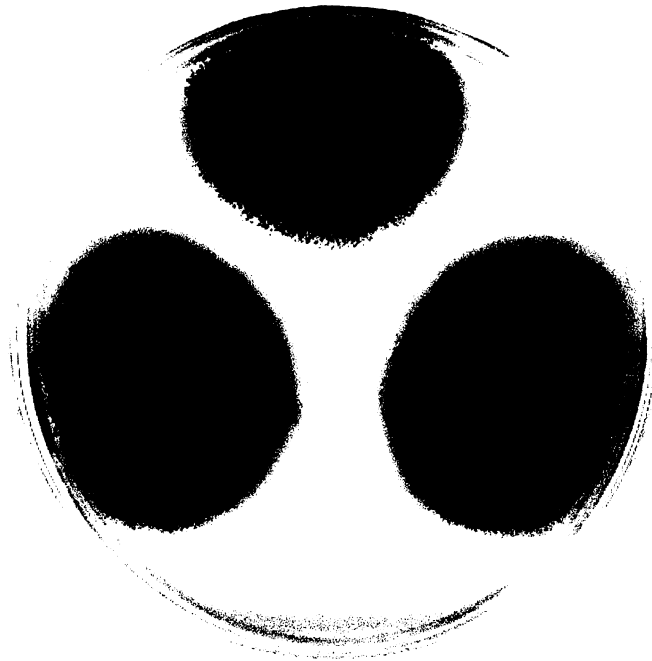
U kmene *Aspergillus niger* CCIM K2 byly optimalisovány kultivační podmínky a složení kultivačního média pro maximalisaci produkce extracelulární *exo- α -N-acetylgalaktosaminidasy*, při současném snížení α -galaktosidasové a β -*N-acetylglukosaminidasové* aktivity.

Extracelulární *exo- α -N-acetylgalaktosaminidasa* produkovaná *Aspergillus niger* CCIM K2 byla částečně charakterisována, izolována a částečně purifikována.

7. OBRAZOVÁ PŘÍLOHA

Obrazová příloha obsahuje fotografie kolonií na agaru (tříbodová inokulace) a mikrofotografie některých zástupců testovaných mikroskopických hub. Obrazová příloha má jen ilustrativní charakter.

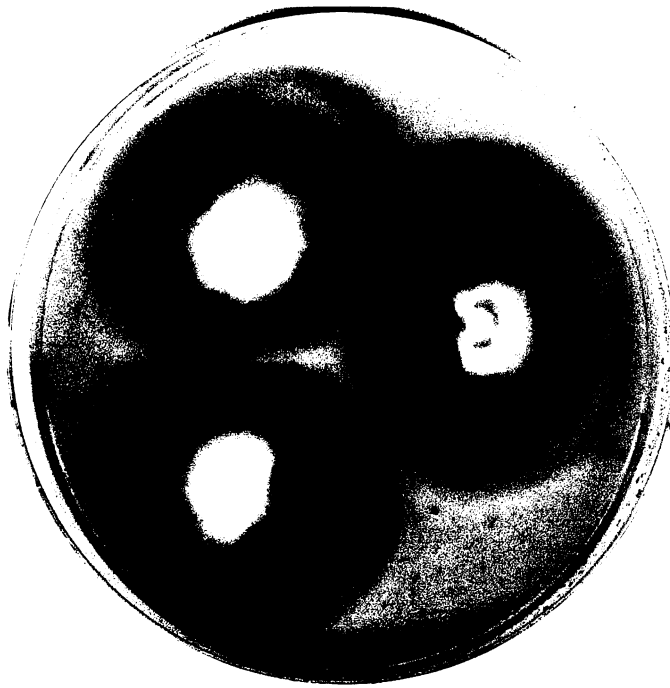
7.1 Fotografie kolonií hub



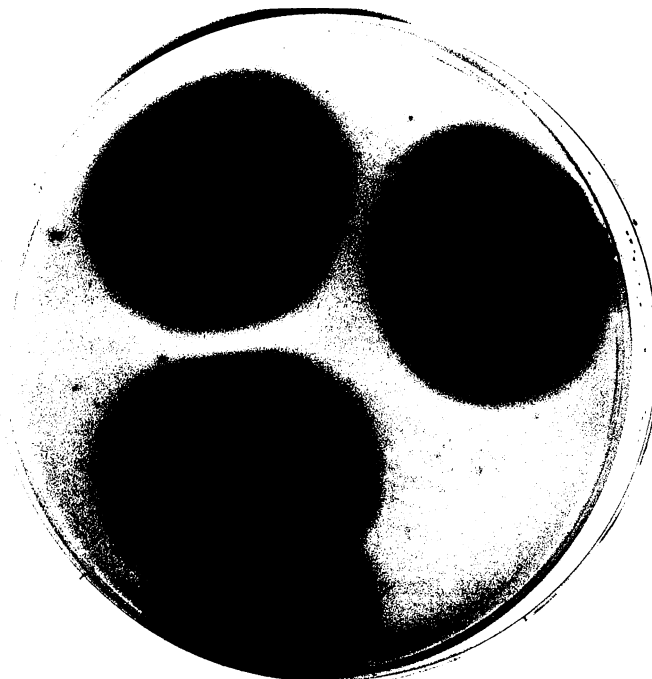
(Makrofoto 1) Aspergillus niger CCIM K2 (MEA; 28 °C; stáří 6 dnů)



(Makrofoto 2) Aspergillus tamarii CCF 1665 (MEA; 28 °C; stáří 6 dnů)



(Makrofoto 3) *Penicillium brasilianum* CCF 2155 (MEA; 25 °C; stáří 6 dnů)

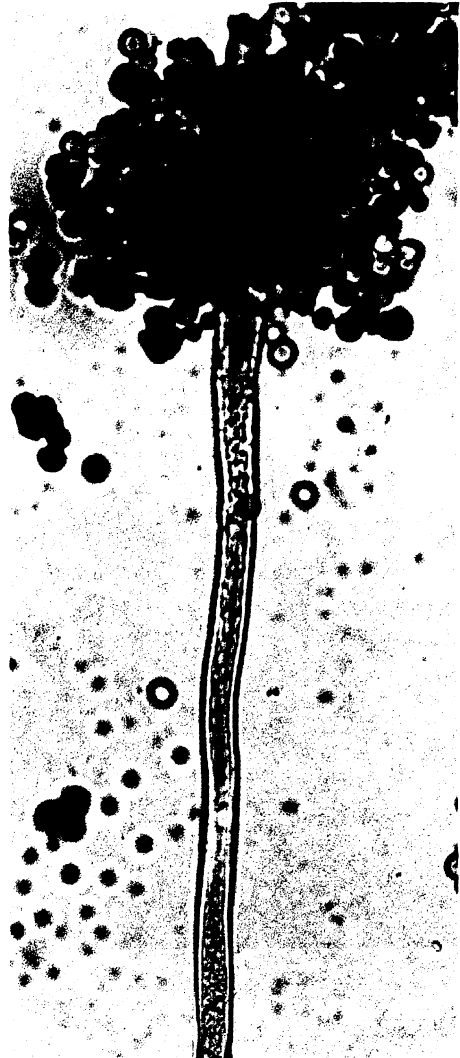


(Makrofoto 4) *Penicillium oxalicum* CCF 2430 (MEA; 25 °C; stáří 6 dnů)

7.2 Mikrofotografie hub



(Mikrofoto 1)



(Mikrofoto 2)

(Mikrofoto 1)

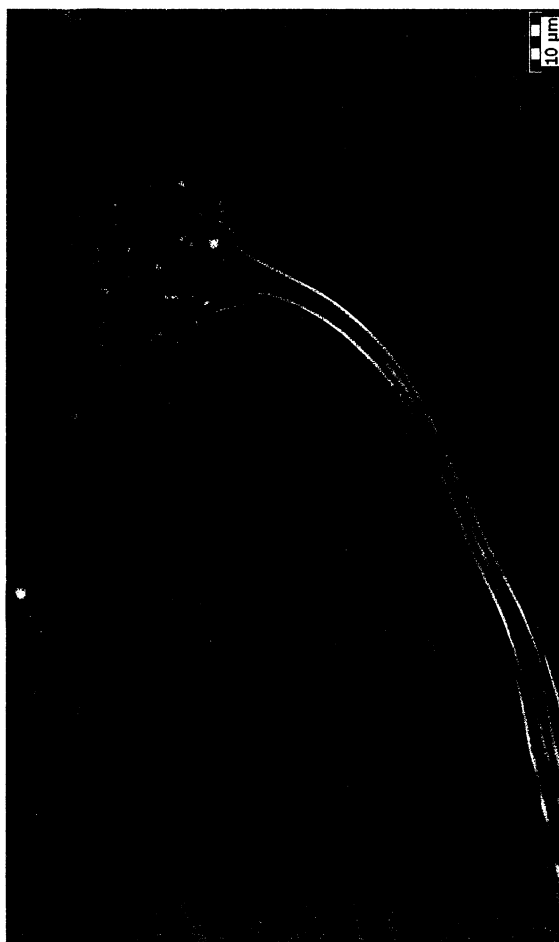
Aspergillus niger CCIM K2 – /konidiofor/ (Nomarského kontrast, 40x obj., laktofenol s bavlnovou modří)

(Mikrofoto 2)

Aspergillus tamarii CCF 1665 – /konidiofor/ (Nomarského kontrast, 40x obj., laktofenol s bavlnovou modří)



(Mikrofoto 3)



(Mikrofoto 4)

(Mikrofoto 3)

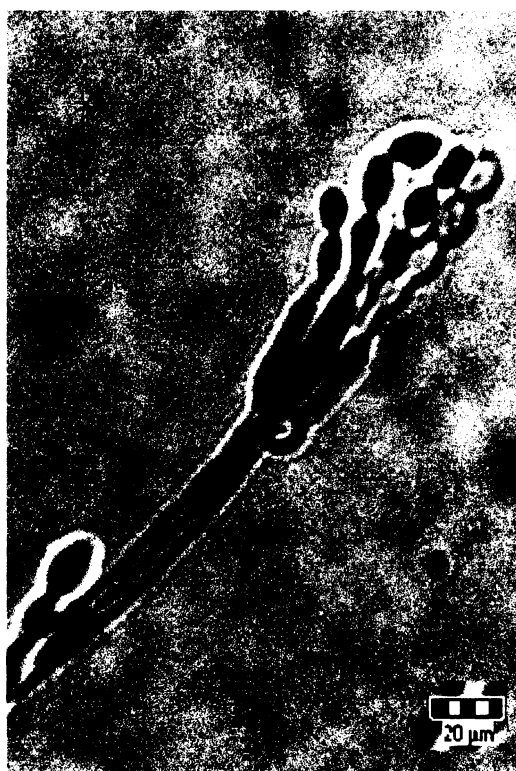
Aspergillus sojae CCF 3060 – /konidiofor/ (Nomarského kontrast, 40x obj., laktofenol s bavlnovou modří)

(Mikrofoto 4)

Aspergillus aculeatus CCF 3134 – /konidiofor/ (Nomarského kontrast, 40x obj., laktofenol s bavlnovou modří)



(Mikrofoto 5)



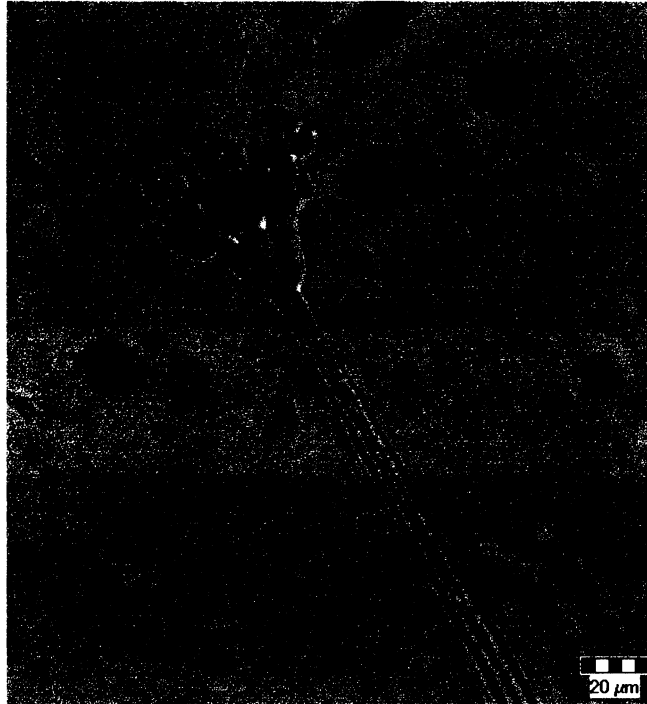
(Mikrofoto 6)

(Mikrofoto 5)

Aspergillus oryzae CCF 1066 – /konidiofor/ (Nomarského kontrast, 40x obj., laktofenol s bavlnovou modří)

(Mikrofoto 6)

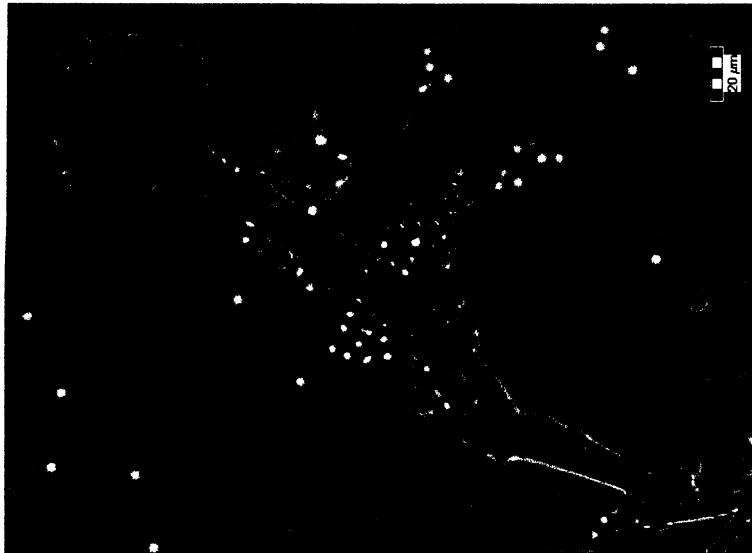
Penicillium oxalicum CCF 2430 – /konidiofor/ (Nomarského kontrast, 40x obj., laktofenol s bavlnovou modří)



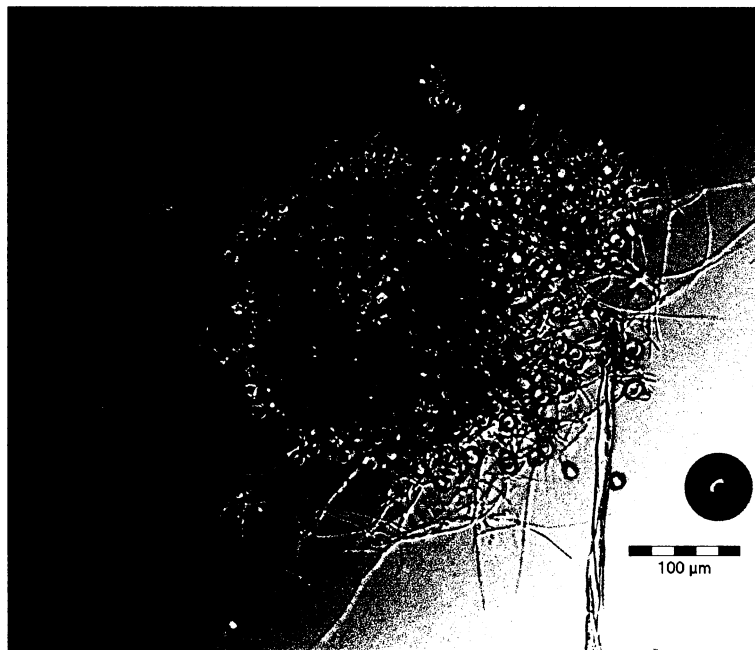
(Mikrofoto 7)

(Mikrofoto 7)

Penicillium brasilianum CCF 2155 – /konidiofor/ (Nomarského kontrast, 40x obj., laktofenol s bavlnovou modří)



(Mikrofoto 8-1)



(Mikrofoto 8-2)

(Mikrofoto 8-1)

Emericella nidulans CCF 2912 – /konidiofor/ (Nomarského kontrast, 40x obj., laktofenol s bavlnovou modří)

(Mikrofoto 8-2)

Emericella nidulans CCF 2912 – /plodnice – kleistothecium/ (Nomarského kontrast, 10x obj., laktofenol s bavlnovou modří)

8. SEZNAMY

8.1 Seznam použitých chemikálií

Sporulační agar

Síran měďnatý pentahydrát (LACHEMA, CZ)

Glycerol (LACHEMA, CZ)

Síran hořečnatý (Lach-Ner, CZ)

NaCl (Lach-Ner, CZ)

Sladový výtažek (SLADOVINA, CZ)

Dusičnan amonný (LACHEMA, CZ)

Síran hořečnatý (Lach-Ner, CZ)

Bacteriological agar No.1 (OXOID, UK)

Sladinový agar

Agar so sladinovým extraktom (IMUNA, SK)

Kultivace mikroskopických vláknitých hub

Dihydrogenfosforečnan draselný (LACHEMA, CZ)

Chlorid vápenatý (LACHEMA, CZ)

Odtučněná hladká sójová mouka (baleno v – Paleta, s.r.o., Plzeň)

Mykologický pepton (OXOID, UK)

Guanidinkarbonát (ALDRICH, USA)

Síran hořečnatý (Lach-Ner, CZ)

Tween[®]80 (ALDRICH, USA)

Kyselina citrónová (LACHEMA, CZ)

Hydroxid draselný (LACHEMA, CZ)

CELLITE 512 (LACHEMA, CZ)

Enzymové aktivity

p-nitrofenyl- α -D-galaktopyranosid (Sigma Chemical Co., USA)

o-nitrofenyl- α -D-*N*-acetylgalaktopyranosid (Sigma Chemical Co., USA)

p-nitrofenyl- α -D-*N*-acetylgalaktopyranosid (Sigma Chemical Co., USA)

p-nitrofenyl- β -D-*N*-acetylgalaktopyranosid (Sigma Chemical Co., USA)

p-nitrofenyl- β -D-*N*-acetylglukopyranosid (SENN CHEMICALS, SUI)

Albumin standard (PIERCE Biotechnology, USA)

Biorad protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA)

p-nitrofenol (LACHEMA, CZ)

o-nitrofenol (LACHEMA, CZ)

Uhličitan sodný (LACHEMA, CZ)

Dithiothreitol (Sigma Chemical Co., USA)

Merkaptoethanol (Merck, DE)

Pufry

Dihydrogenfosforečnan sodný (LACHEMA, CZ)

Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát (LACHEMA, CZ)

Kyselina citrónová (Lach-Ner, CZ)

Kyselina sírová (Výrobce neuveden, CZ)

Kyselina trihydrogenboritá (Lach-Ner, CZ)

Kyselina octová (Lach-Ner, CZ)

Octan sodný (LACHEMA, CZ)

SDS-PAGE

Protein molecular weights standards MW 6500 – 205000 (Amersham pharmacia, Biotech, SWE)

TEMED (*N,N,N,N'*-tetramethylediamin) (Sigma Chemical Co., USA)

Comassie™ Brilliant blue R-250; C.I. 42600 (usb, USA)

Glycin (SERVA Electrophoresis GmbH, DE)

Persíran amonný (usb, USA)

Tris (SERVA Feinbiochemica, DE)

Bromfenolová modř – Na sůl (SERVA Feinbiochemica, DE)

Dithiothreitol (Sigma Chemical Co., USA)

Akrylamid (Sigma Chemical Co., USA)

N,N'-metylenbisakrylamid (SERVA Feinbiochemica, DE)

SDS (Dodecylíran sodný) (SERVA Feinbiochemica, DE)

8.2 Seznam používaných přístrojů a dalšího vybavení

Kultivace

Inkubační box s regulací otáček a teploty SANYO (JAP)
Biohazard flow box – JOUAN MSG9 (JOUAN-BIO OMEGA, FR)
Spektrofotometr – Shimadzu UV-1202 (Shimadzu, JAP)
Spektrofotometr – Sunrise (TECAN, AT)
Vyhodnocovací software – Magellan 5.0 (TECAN, AT)
Centrifuga na zkumavky „eppendorf“ – Universal 16R (Hettich, DE)
Centrifuga – Beckman J2-21 (Beckman Instruments. Inc., USA)
Vortex – IKA-VERK VF 2 (JANKE&KUNKEL, DE)
pH metr – Gryf HB (P-LAB, CZ)
pH elektroda – THETA '90 (gdw) HC 114 (P-LAB, CZ)
pH elektroda – THETA '90 (jdw) HC 153 (P-LAB, CZ)

Elektroforeza

Cela k vyvýjení chromatogramu – Mighty small SE 250/SE 260 (Hoefer, DE)
Zdroj a ovládání – Electrophoresis Power Supply – EPS 601(Amersham pharmacia, Biotech, SWE)

Filtrace a zahušťování vzorků

Filtrační celuloasoasbestová deska (Kreuznach K01, Seitz, DE)
Filtrační membrána Supor 47 mm s průměrem pórů 0,45 μm (Pall, USA)
Filtrační polyestersulfonová membrána Millipore 76 mm s cut off 100 kDa (Millipore, USA)
Zkoncentrování proteinů na SDS-PAGE – Centricon YM-3; 3000 MW cut off (Millipore, USA)
Zahušťovací cela – Amicon 8400 (Millipore, USA)

Purifikace

Kapalinový chromatograf – Äkta prime plus (Amersham Biosciences, SWE)
Obslužný software – PRIMIEWIEW 5.0 (Amersham Biosciences, SWE)

Kolony

Q-Sepharose (HiPrep 16/60 Q FF) (Amersham Biosciences, SWE)

Matrix: 6% vysoce zesíťovaná agarosa

Objem: 20 ml

Průměrná velikost částic: 90 μm

Nabitá skupina: $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$

Operační rozsah pH: 2 – 12

Průtok 2 – 10 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$

Max. tlak: 0,15 MPa

Iontová kapacita: 0,18 – 0,25 $\text{mmol}\cdot\text{ml}^{-1}$ gelu (Cl^-)

Vzorek: Objem neomezen, 2400 mg proteinů, (120 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ gelu – pro HSA)

Phenyl-Sepharose (16/60 Phenyl FF (low sub)) (Amersham Biosciences, SWE)

Matrix: 6% vysoce zesíťovaná fenyl-agarosa

Objem: 20 ml

Průměrná velikost částic: 90 μm

Interakční skupina: –fenyl

Operační rozsah pH: 3 – 13

Hustota ligandu: 40 $\text{mmol}\cdot\text{ml}^{-1}$ gelu

Průtok 2 – 10 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$

Max. tlak: 0,15 MPa

Sephacryl S-200 (HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 High Resolution) (HiPrep, USA)

Matrix: Zesíťovaný kopolymer allyldextranů a *N,N'*-metylenbisakrylamidu

Velikost částic: (25 – 75 μm), průměrná velikost: 47 μm

Separční rozsah pro globulární proteiny o M_r : 5000 – 250000

Objem kolony: 120 ml

Maximální objem vzorku: 5 ml

Maximální průtok vzorku: 0,5 ml

Maximální tlak: 0,15 MPa

Operační rozsah pH: 3 – 11

Superdex 200 (Tricorn Superdex 200 10/30 GL) (Amersham Biosciences, SWE)

Matrix: Kompozitní zesíťovaná agarosa a dextran

Objem kolony: 24 ml

Operační rozsah pH: 3 – 11

Separační rozsah pro globulární proteiny o velikosti: 5 – 250 kDa

Maximální průtok: 0,15 – 1 ml.min⁻¹

Maximální tlak: 0,15 MPa

Maximální objem vzorku: 5 ml

Fractogel EMD SO₃⁻ (S) (Merck, DE)

Matrix: Silný katex

Funkční skupina: -SO₃⁻

8.3 Seznam obrázků, tabulek a grafů

Označení	Obrázek, tabulka, graf	Strana
Obr. 1	Základní strukturní motiv (T_n antigen)	2
Obr. 2	Strukturní motivy <i>O</i> -vázaných glykoproteinů	3
Obr. 3	Schématické znázornění syntesy jednotlivých strukturních motivů	4
Obr. 4	Fylogenetická studie enzymové rodiny 27, klan GH-D	10
Obr. 5	Dimerní aktivní forma kuřecí α -GalNAc-asy	12
Obr. 6	Monomerní neaktivní forma lidské α -GalNAc-asy	12
Obr. 7	2D Struktura monomerní neaktivní jednotky lidské α -GalNAc-asy	12
Obr. 8	Reakční mechanismus α - <i>N</i> -acetylgalaktosaminidasy	13
Obr. 9	Princip glykosylace	24
Obr. 10	Enzymová glykosylace	25
Obr. 11	Schéma enzymové syntesy GalNAc- α -(1 \rightarrow O)-serinu	26
Obr. 12	Schéma hydrolysy substrátu	30
Obr. 13	Schéma mechanismu funkce katexu Fractogelu EMD SO_3^- (S)	35
Obr. 14	Schéma purifikační procedury α - <i>N</i> -acetylgalaktosaminidasy	58
Obr. 15	SDS-elektroforesa na 8% gelu	63
Tab. 1	Sacharidové krevní determinanty systému AB0(H)	7
Tab. 2	Současný výzkum α - <i>N</i> -acetylgalaktosaminidasy	15
Tab. 3	Aminokyselinová analýza α - <i>N</i> -acetylgalaktosaminidasy z <i>Acremonium</i> sp.	19
Tab. 4	Použité kmeny mikroskopických vláknitých hub	27
Tab. 5	Chromogení substráty pro stanovení enzymových aktivit	29
Tab. 6	Zjištěné objemové enzymové aktivity α - <i>N</i> -acetylgalaktosaminidasy testovaných kmenů hub	41
Tab. 7	Vliv koncentrace sójové mouky na produkci α - <i>N</i> -acetylgalaktosaminidasy	44
Tab. 8	Vliv objemu kultivačního média na produkci α - <i>N</i> -acetylgalaktosaminidasy	45
Tab. 9	Vliv teploty na produkci α - <i>N</i> -acetylgalaktosaminidasy	47
Tab. 10	Vliv výchozího pH kultivačního média na produkci α - <i>N</i> -acetylgalaktosaminidasy	48
Tab. 11	Bilanční tabulka purifikace α - <i>N</i> -acetylgalaktosaminidasy	62
Graf 1	Změna pH média během kultivace u kmenů ze sekce <i>Nigri</i> – producenti α - <i>N</i> -acetylgalaktosaminidasy	43
Graf 2	Vliv objemu kultivačního média na změnu pH během kultivace	46
Graf 3	Vliv objemu kultivační směsi na produkci α - <i>N</i> -acetylgalaktosaminidasy	46

Označení	Obrázek, tabulka, graf	Strana
<i>Graf 4</i>	Objemová a specifická aktivita α - <i>N</i> -acetylgalaktosaminidasy, α -galaktosidasy a β - <i>N</i> -acetylglukosaminidasy po optimalisaci kultivačních podmínek	49
<i>Graf 5</i>	Stabilita α - <i>N</i> -acetylgalaktosaminidasy během skladování	50
<i>Graf 6</i>	pH Optimum α - <i>N</i> -acetylgalaktosaminidasy	51
<i>Graf 7</i>	pH Stabilita α - <i>N</i> -acetylgalaktosaminidasy	52
<i>Graf 8</i>	Teplotní optimum α - <i>N</i> -acetylgalaktosaminidasy	53
<i>Graf 9</i>	Vliv redukčních činidel na aktivitu α - <i>N</i> -acetylgalaktosaminidasy	54
<i>Graf 10</i>	Chromatogram (Fractogel EMD SO ₃ ⁻ (S))	59
<i>Graf 11</i>	Chromatogram (Sephacryl S-200)	60
<i>Graf 12</i>	Chromatogram (Superdex 200)	61

8.4 Seznam zkratek a použitých symbolů

<i>p</i> NP- α -Gal <i>p</i> NAc	4-nitrofenyl-2-acetamido-2-deoxy- α -D-galaktopyranosid
<i>o</i> NP- α -Gal <i>p</i> NAc	2-nitrofenyl-2-acetamido-2-deoxy- α -D-galaktopyranosid
<i>p</i> NP- α -Gal <i>p</i>	4-nitrofenyl- α -D-galaktospyranosid
<i>p</i> NP- β -Glc <i>p</i> NAc	4-nitrofenyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosid
<i>p</i> NP- β -Gal <i>p</i> NAc	4-nitrofenyl-2-acetamido-2-deoxy- α -D-galaktopyranosid
α -Gal-asa	α -galaktosidasa
α -GalNAc-asa	α - <i>N</i> -acetylgalaktosaminidasa
β -GlcNAc-asa	β - <i>N</i> -acetylglukosaminidasa
GalNAc- α -(1 \rightarrow O)-Serin	2-acetamido-2-deoxy- α -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow O)-serin
UDP-Glc	uridin-5'-difosfo-D-glukopyranosa
UDP-GalNAc	uridin-5'-difosfo-2-acetamido-2-deoxy-D-galaktopyranosa
UDP-Gal	uridin-5'-difosfo-D-galaktopyranosa
Ser	L-serin
Thr	L-threonin
UDP-hexostransferasa	uridinyl-difosfát-hexostransferasa
Gal	D-galaktopyranosa
Fuc	L-fukopyranosa
Glc	D-glukopyranosa
GalNAc	2-acetamido-2-deoxy-D-galaktopyranosa
<i>p</i> NP-OH	<i>p</i> -nitrofenol
<i>o</i> NP-OH	<i>o</i> -nitrofenol
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylendiamin
SDS	dodecylsíran sodný
Tris	hydroxymethyl-aminomethan
ME	merkptoethanol
DTT	dithiothreitol
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová

8.5 Seznam literatury

- [1] A. Savage: Mammalian Cell Biotechnology in Protein Production, *Carbohydr. Res.*, **325**, 233 – 276, (1997).
- [2] J. Rauvolfová: Disertační práce, VŠCHT, Praha, (2004).
- [3] M. Fukuda: O. Hindsgaul, Molecular glykobiology, Oxford University Press, Oxford, (1994).
- [4] D. Voet, J. G. Voetová: Biochemie, Victoria Publishing, Praha (1995).
- [5] T. Matsui, J. Hamako, Y. Ozeki, K. Tinani: Comparative study of blood group-recognizing lectins towards AB0 blood group antigens on neoglycoproteins, glycoproteins and komplex-type oligosaccharides, *Biochem. Biophys. Acta*, **1525**, 50 – 57, (2001).
- [6] R. K. Murray, D.K. Granner, P.A. Mayes, V. W. Rodwell: Harperova biochemie, z anglického originálu Harper's Biochemistry, H&H, Praha, (2001).
- [7] L. Weignerová; E. Rajnochová-Herkommerová; V. Křen, Enzymová reversní glykosylace, *Chem. listy*, **93**, 781 – 787, (1999).
- [8] P. Monsan, F. Paul: Enzymatic synthesis of oligosaccharides, *FEMS Microbiol. Rev.*, **16**, 187 – 192, (1995).
- [9] <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>
- [10] H. Ashida, H. Tamaki, T. Fujimoto, K. Yamamoto, H. Kumagai: Molecular cloning of cDNA encoding α -N-Acetylgalactosaminidase from *Acremonium* sp. and its expression in Yeast, *Arch. Biochem. Biophys.*, **384**, 305 – 310, (2000).
- [11] S. C. Garman, L. Hannick, A.Zhu, D. N. Garboczi: The 1.9 Å Structure of α -N-Acetylgalactosaminidase: Molecular basis of glycosidase deficiency disease, *Structure*, **10**, 425 – 434, (2002).
- [12] A. M. Wang, I. A. Ioannou, K. M. Zeidner, R. J. Desnick Murine α -N-Acetylgalactosaminidase: Isolation and expression of full-length cDNA and genomic organisation: Further evidence of α -Galactosidase gene family, *Mol. Genet. Metabol.*, **65**, 165 – 173, (1998).
- [13] S. Kadowaki, T. Ueda, K. Yamamoto, H. Kumagai, T. Tochikura: Isolation and characterisation of a blood group A substance degrading α -N-acetylgalactosaminidase from an *Acremonium* sp., *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 111 – 120, (1989).

- [14] H. Tuppy, W.L. Staudenbauer: The action on soluble blood group A substances of an α -N-acetylgalactosaminidase from *Helix pomatia*, *Biochemistry*, **5**, 1742 – 1747, (1966).
- [15] E. Werries, E. Wollek, A. Gottschalk, E. Buddecke: Separation of α -N-acetylglucosaminidase and α -N-acetylgalactosaminidase from ox spleen, *Eur. J. Biochem.*, **10**, 445 – 449, (1969).
- [16] Y. Uda, S.Ch. Li, Y.T. Li: α -N-Acetylgalactosaminidase from the limpet, *Patella vulgata*, *J. Biol. Chem.*, **252**, 5194 – 5200, (1977).
- [17] H. Nakagawa, M. Asakawa, N. Enomoto: Purification and characterisation of α -N-acetylgalactosaminidase from skipjak liver, *J. Biochem.*, **101**, 855 – 862, (1987).
- [18] M.J. McDonalds, O.P. Bahl: α -N-Acetylgalactosaminidase from *Aspergillus niger*, *Methods Enzymol.*, **28**, 734 – 738, (1972).
- [19] A. Naundorf, K. Ajisaka: Purification of α -N-acetylgalactosaminidase from *Aspergillus niger* and its use in the synthesis of GalNAc- α -(1 \rightarrow O)-serine, *Enzyme Microb. Technol.*, **25**, 483 – 488, (1999).
- [20] S. Shigeta, O. Suzuki, Y. Aki, S. Kawamoto, K. Ono: Purification and Characterization of Sea Squirt α -N-Acetylgalactosaminidase, *J. Biosci. Bioeng.*, **89**, 84 – 86, (2000).
- [21] T. Herrmann, D. Schindler, H. Tabe, O. Onodera, S. Igarashi, A. Polach, D. Zehnpfennig, S. Tsuji: Molecular cloning, structural organization, sequence, chromosomal assignment, and expression of the mouse alpha-N-acetylgalactosaminidase gene, *Gene*, **211**, 205 – 214, (1998).
- [22] E.J. McGuire, S. Chipovsky, S. Roseman: β -N-acetylglucosaminidase, α -N-acetylgalactosaminidase and β -galactosidase from *Clostridium perfringens*, *Methods Enzymol.*, **28**, 755 – 763, (1972).
- [23] M. J. Calcutt, Hsin-Yeh Hsieh, L. F. Chapman, D. S. Smith: Identification molecular cloning and expression of an α -N-acetylgalaktosaminidase gene from *Clostridium perfringens*, *FEMS Microbiol. Rev.*, **214**, 77 – 80, (2002).
- [24] Hsin-Yeh Hsieh, M. J. Calcutt, L. F. Chapman. M. Mitra, D. S. Smith: Purification and characterization of recombinant α -N-acetylgalactosaminidase from *Clostridium perfringens*, *Protein Expr. Purif.*, **32**, 309 – 316, (2003).

- [25] T. Kanekura, H. Sakuraba, F. Matsuzawa, S. Aikawa, H. Doi, Y. Hirabayashi, N. Yoshii, T. Fukushige, T. Kanzaki: Three dimensional structural studies of α -N-acetylgalactosaminidase (α -NAGA) in α -NAGA deficiency (Kanzaki disease): different gene mutations cause peculiar changes in α -NAGAs resulting in different substrate specificities and clinical phenotypes, *J. Dermatol. Sci.*, **37**, 15 – 20, (2005).
- [26] A. Kimura, T. Kanekura, Y. Saito, K. Sagawa, M. Nosaka, T. Kanzaki, T. Tsuji: Blood group A glycosphingolipid accumulation in the hair of patients with α -N-acetylgalactosaminidase deficiency, *Life Sciences*, **76**, 1817 – 1824, (2005).
- [27] Alex Zhu, Jack Goldstein: Cloning and characterization of cDNA encoding chicken liver α -N-acetylgalactosaminidase, *Gene*, **137**, 309 – 314, (1993).
- [28] Melissa O. Davis, D. Jane Hata, Daniel Smith, John C. Walker: Cloning and sequence of a chicken α -N-acetylgalactosaminidase gene, *Biochem. Biophys. Acta*, **1216**, 296 – 298, (1993).
- [29] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- [30] Alex Zhu, Catherine Monahan, Zhong-Kun Wang, Jack Goldstein: Expression, Purification and Characterization of Recombinant α -N-Acetylgalactosaminidase Produced in the Yeast *Pichia pastoris*, *Protein Expression Purif.*, **8**, 456 – 462, (1996).
- [31] B. Weissman, D.F. Hindrichsen: Mammalian α -N-acetylgalactosaminidase, occurrence, partial purification and action on linkages in submaxillary mucins, *Biochemistry*, **8**, 2034 – 2043, (1969).
- [32] T. Itoh, Y. Uda: α -N-Acetylgalactosaminidase from squid liver: Purification and characterisation of two enzymes, *J. Biochem.*, **95**, 959 – 970, (1984).
- [33] L. C. Hoskins, E. T. Boulding, G. Larson: Purification and Characterization of Blood Group A-degrading Isoforms of α -N-Acetylgalactosaminidase from *Ruminococcus torques* Strain IX-70, *J. Biol.Chem*, **272**, 7932 – 7939, (1997).
- [34] N.V. Borzova, V. M. Malanchuk: Screening of α -N-acetylgalactosaminidase producers microorganisms of different taxonomic groups, *Mikrobiol. žurnal*, **62**, 3 – 12, (2000).
- [35] N.V. Borzova, V.M. Malanchuk: Optimalization of cultivation conditions of *Asperillus niger* synthesising α -N-acetylgalactosaminidase and α -galactosidase, *Mikrobiol. žurnal*, **63**, 27 – 46, (2001).

- [36] Ch. Bucke: Oligosaccharide synthesis using glycosidases, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **67**, 217 – 220, (1996).
- [37] T. K. Lindhorst: Essentials of carbohydrate chemistry and biochemistry, WILEY-VCH, Weinheim (2003).
- [38] V. Křen, J. Thiem: Glycosylation employing bio-systems: from enzymes to whole cells. *Chem. Soc. Rev.*, **26**, 463 – 473, (1997).
- [39] P. Fialová, A. T. Carmona, I. Robina, R. Ettrich, P. Sedmera, V. Přikrylová, L. Petrásková-Hušáková, V. Křen: Glycosyl azide – a novel substrate for enzymatic transglycosylations. *Tetrahedron Lett.* **46**, 8715 – 8718, (2005).
- [40] D. L. Zechel, S. G. Withers: Glycosidase mechanisms: Anatomy of a finely tuned catalyst, *Acc. Chem. Res.*, **33**, 11 – 18, (2000).
- [41] M. Bradford: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding., *Anal. Biochem.*, **72**, 248 – 254, (1976).
- [42] I. Čechová: Diplomová práce – Vlastnosti a aplikace plísňových alfa-galaktosidas, VŠCHT, Praha, (2005).