

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA MIKROBIOLOGIE A GENETIKY

**Nová penicilin-G-acylasa z bakteriálního kmene
Achromobacter sp. CCM 4824**

Dizertační práce

Ing. František Škrob

Praha 2007

Experimentální část této práce byla vypracována v Laboratoři enzymových technologií Mikrobiologického ústavu AVČR v období září 2000 – červen 2003. Práce byla dokončena v rámci kombinované formy studia v květnu 2007.

„Prohlašuji, že jsem dizertační práci zpracoval samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním dizertační práce podle zákona č. 111/1998/Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Tato dizertační práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.“

V Praze dne 10. června 2007

Na tomto místě bych chtěl nejprve poděkovat svému školiteli RNDr. Pavlu Kyslíkovi, CSc. za odborné vedení a všestrannou pomoc po celou dobu studia. Dále děkuji mému konzultantovi RNDr. Stanislavu Bečkovi, CSc. a také RNDr. Kamile Plháčkové, CSc. za cenné rady při zpracování této dizertační práce. Současně také děkuji všem ostatním kolegům z Laboratoře enzymových technologií v Mikrobiologickém ústavu AVČR, kteří tvořili přátelský kolektiv na pracovišti.

Velké poděkování patří mé přítelkyni Vladce za morální podporu v průběhu celé dizertační práce. Poděkování patří rovněž mým současným kolegům ze společnosti EXBIO Praha, a.s. za udržování motivace, která byla esenciálním prvkem potřebným pro dokončení práce v rámci kombinovaného studia.

Obsah

1.	Úvod	6
2.	Literární přehled	7
2.1	Amidohydrolasy β -laktamových antibiotik a jejich význam	7
2.2	Rozdělení penicilinamidohydrolas	8
2.2.1	<i>Rozdělení penicilinacylas (PA)</i>	8
2.2.2	<i>Rozdělení cefalosporinacylas</i>	10
2.2.3	<i>Alternativní rozdělení penicilinamidohydrolas</i>	12
2.3	Molekulární struktura penicilin-G-acylas	12
2.4	Struktura aktivního místa PGA z <i>E. coli</i> a reakční mechanismus	14
2.5	Semisyntetická antibiotika a jejich výroba	16
2.5.1	<i>Chemická syntéza semisyntetických β-laktamových antibiotik</i>	19
2.5.2	<i>Enzymová syntéza semisyntetických β-laktamových antibiotik</i>	21
2.6	Bakteriální kmen <i>Achromobacter</i> sp. CCM 4824	25
3.	Materiál a metody	27
3.1	Materiál a přístrojové vybavení	27
3.2	Metody	29
3.2.1	<i>Uchovávaní a kultivace bakteriální kultury</i>	29
3.2.2	<i>Desintegrace bakteriální biomasy</i>	30
3.2.3	<i>Srážení PGA pomocí síranu amonného</i>	30
3.2.4	<i>První ionexová chromatografie na katexu Fractogel COO⁻</i>	31
3.2.5	<i>Druhá ionexová chromatografie na katexu Fractogel COO⁻</i>	31
3.2.6	<i>Gelová filtrace na koloně Superdex 200</i>	32
3.2.7	<i>Stanovení koncentrace proteinu</i>	32
3.2.8	<i>Stanovení aktivity PGA pomocí umělého substrátu NIPAB</i>	32
3.2.9	<i>SDS-PAGE elektroforéza</i>	33
3.2.10	<i>Izoelektrická fokusace</i>	35
3.2.11	<i>Nativní-PAGE elektroforéza v kyselém prostředí</i>	36
3.2.12	<i>Stanovení MW enzymu metodou hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF</i>	37
3.2.13	<i>Stanovení interní aminokyselinové sekvence</i>	37
3.2.14	<i>Stanovení N-koncové aminokyselinové sekvence Edmanovým štěpením</i>	37
3.2.15	<i>Stanovení substrátové specifity enzymu</i>	38
3.2.16	<i>Stanovení koncentrace penicilinů a cefalosporinů na HPLC</i>	39
3.2.17	<i>Titrační stanovení počtu aktivních center enzymu</i>	40
3.2.18	<i>Stanovení kinetických parametrů hydrolytických reakcí</i>	41
3.2.19	<i>Modelové syntézy semisyntetických β-laktamových antibiotik</i>	42
4.	Výsledky	43
4.1	Kultivace bakteriálního kmene <i>Achromobacter</i> sp. CCM 4824	43
4.2	Izolace PGA z biomasy kmene <i>Achromobacter</i> sp. CCM 4824	47
4.2.1	<i>Desintegrace buněk</i>	47
4.2.2	<i>Srážení PGA pomocí síranu amonného</i>	47
4.2.3	<i>První ionexová chromatografie na katexu Fractogel COO⁻</i>	48
4.2.4	<i>Druhá ionexová chromatografie na katexu Fractogel COO⁻</i>	48
4.2.5	<i>Gelová filtrace</i>	49
4.2.6	<i>Uchování purifikované PGA</i>	49
4.3	Charakterizace PGA izolované z kmene <i>Achromobacter</i> sp. CCM 4824	54
4.3.1	<i>Stanovení přibližné molekulové hmotnosti nativní PGA pomocí gelové filtrace</i>	54
4.3.2	<i>Stanovení podjednotkového složení PGA pomocí SDS elektroforézy</i>	55

4.3.3	Stanovení přesné hmotnosti podjednotek α a β pomocí MALDI-TOF	55
4.3.4	Nativní elektroforéza purifikované PGA	56
4.3.5	Izoelektrická fokusace purifikovaného enzymu PGA	57
4.3.6	Stanovení N-koncové aminokyselinové sekvence Edmanovým štěpením	58
4.3.7	Stanovení interní aminokyselinové sekvence hmotnostní spektrometrií	59
4.3.8	Stanovení substrátové specifity PGA z kmene <i>Achromobacter sp. CCM 4824</i>	60
4.3.9	Stanovení teplotního profilu hydrolytické aktivity PGA	62
4.3.10	Stanovení pH profilu hydrolytické aktivity PGA	63
4.4	Stanovení kinetických parametrů PGA pro hydrolyzu vybraných substrátů	63
4.4.1	Titrační stanovení počtu aktivních center enzymu ve vzorku PGA	64
4.4.2	Stanovení kinetických par. purif. PGA pro hydrolyzu vybraných substrátů	65
4.5	Modelové syntézy semisyntetického antibiotika ampicilinu	69
4.5.1	Optimalizace reakčních podmínek pro syntézu ampicilinu	69
4.5.2	Enzymová syntéza ampicilinu pomocí PGA	72
5.	Diskuse	75
6.	Závěr	83
7.	Seznam použité literatury	85
8.	Seznam použitých zkratk	92
9.	Příloha	93

1. Úvod

Penicilinacylasy patří mezi průmyslově nejvýznamnější enzymy, které měly zásadní přínos pro zdraví lidstva, neboť umožnily masivní průmyslovou výrobu celé řady účinných semisyntetických β -laktamových antibiotik zaujímajících dnes zhruba 20% podíl na světovém trhu s antibiotiky, což představuje 35.000 tun roční světové produkce (Parmar et al. 2000). Principem technologie je enzymová konverze přírodních penicilinů G a V a z nich chemicky připravených deacetoxycefalosporinů G a V pomocí penicilinacylasy na klíčové meziproducty výroby semisyntetických β -laktamových antibiotik 6-aminopenicilanové kyseliny a 7-aminodeacetoxycefalosporanové kyseliny. Z těchto klíčových meziproductů se dále připravují buď chemickou nebo enzymovou syntézou semisyntetické deriváty, které vykazují v porovnání s přírodními peniciliny výrazně lepší antibiotické vlastnosti: širší spektrum účinku, lepší inhibiční účinek, nižší toxicitu a vhodné farmako-kinetické vlastnosti.

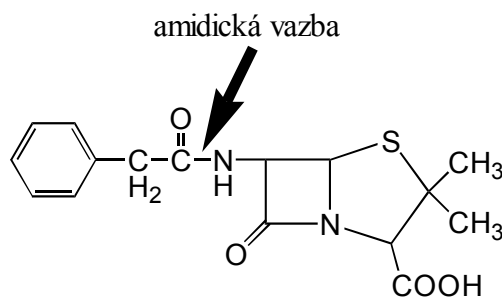
V současné době je výzkum a vývoj na poli β -laktamových antibiotik výrazně zaměřen na enzymové syntézy semisyntetických β -laktamových antibiotik, které postupně nahrazují tradiční postupy chemické syntézy. Tyto projekty nejenže zahrnují hledání postupů jak účinně posunovat chemickou rovnováhu ve směru syntézy, ale také hledání nových a vhodnějších enzymů.

Cílem této dizertační práce bylo izolovat a charakterizovat novou penicilin-G-acylasu z bakteriálního kmene *Achromobacter* sp. CCM 4824, který byl nalezen v rámci rozsáhlého screeningu provedeného v Laboratoři enzymových technologií v Mikrobiologickém ústavu AVČR, v.v.i. Součástí projektu bylo také ověření vlastností nové penicilin-G-acylasy pro enzymovou syntézu ampicilinu, jakožto nejvýznamnějšího zástupce semisyntetických β -laktamových antibiotik.

2. Literární přehled

2.1 Amidohydrolasy β -laktamových antibiotik a jejich význam

Amidohydrolasy β -laktamových antibiotik jsou široká skupina hydrolytických enzymů, které se používají pro deacylaci β -laktamových sloučenin. Oficiálně je tato skupina enzymů dle EC nomenklatury klasifikována jako penicilinamidohydrolasy (EC 3.5.1.11). Neoficiálně se tyto enzymy nazývají penicilinacylasy nebo penicilinamidasy. Mezi penicilinamidohydrolasy patří oficiálně i enzymy štěpící různé cefalosporiny. Společnou vlastností těchto amidohydrolas je schopnost specificky hydrolyzovat stabilní amidickou vazbu penicilinů a cefalosporinů, přičemž β -laktamové jádro zůstává nepoškozeno (obr. 2.1).



Obr. 2.1: Amidická vazba v molekule penicilinu G; místo, kde dochází k hydrolyze

Hlavní význam penicilinamidohydrolas spočívá v přípravě klíčových meziproductů výroby semisyntetických β -laktamových antibiotik: 6-aminopenicilanové kyseliny (6-APA), 7-aminocefalosporanové kyseliny (7-ACA) a 7-aminodeacetoxycefalosporanové kyseliny (7-ADCA). Vychází se při tom z přírodních β -laktamů (penicilin G, penicilin V, cefalosporin C), které jsou dostupné ve velkém množství fermentační technologií (Sudhakaran et al.1992).

První zmínka o penicilinacylase (PA), izolované z plísně *Penicilium chrysogenum*, pochází z roku 1950, kdy autoři Sakaguchi a Murao (Parmar et al. 2000) poprvé popsali možnost enzymové hydrolyzy penicilinu G na fenyloctovou kyselinu a 6-aminopenicilanovou kyselinu. Od té doby bylo nalezeno mnoho amidohydrolas β -laktamových antibiotik, které jsou produkovány bakteriemi, kvasinkami i vláknitými houbami.

Předpokládá se, že hlavní význam penicilinamidohydrolas pro mikroorganismy spočívá v asimilaci aromatických sloučenin, kdy acylasy díky své široké substrátové specifitě dokáží například degradovat fenylacetylované sloučeniny rostlinného původu (Valle et al. 1991).

2.2 Rozdělení penicilinamidohydrolas

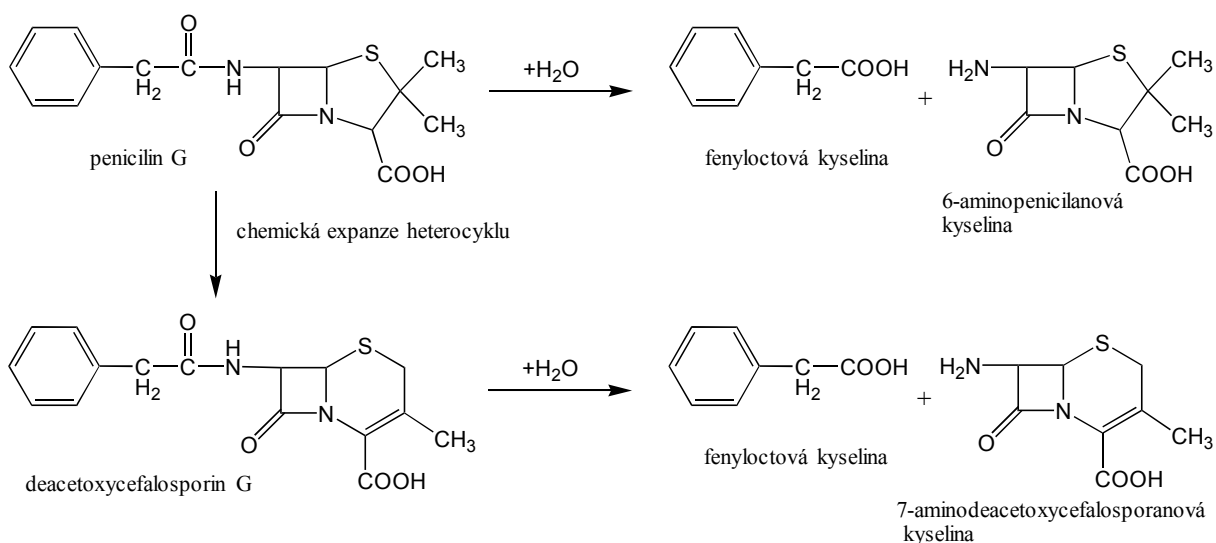
Penicilinamidohydrolasy se dělí jednak podle substrátové specifity tak také podle molekulové struktury. Na základě substrátové specifity byly penicilinamidohydrolasy rozděleny na dvě hlavní skupiny: **penicilinacylasy** a **cefalosporinacylasy**, které se dále dělí na podskupiny (Valle et al. 1991, Sudhakaran et al. 1992, Gabor et al. 2004).

2.2.1 Rozdělení penicilinacylas (PA)

Penicilinacylasy byly původně rozděleny na základě preference substrátů do tří podskupin: **penicilin-G-acylasy**, **penicilin-V-acylasy** a **ampicilinacylasy** (Sudhakaran et al. 1992). V současné době jsou však **ampicilinacylasy** definitivně zařazeny do skupiny enzymů **α -aminoacidesterhydrolas**, které mají odlišné zařazení EC 3.1.1.43 (Polderman et al. 2002, Škrob et al. 2003), a nejsou to tedy již enzymy ze skupiny penicilinamidohydrolas.

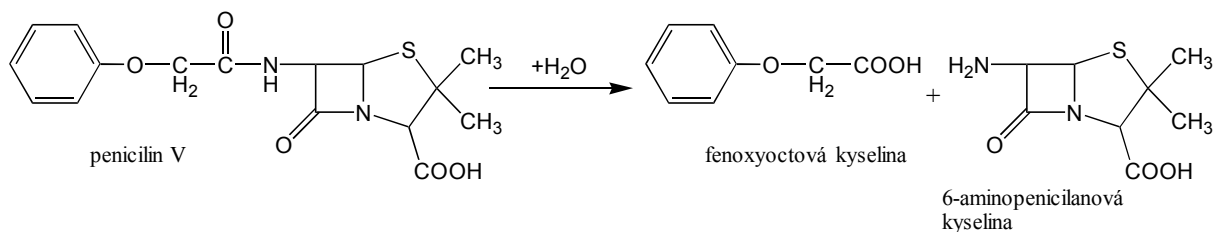
Penicilin-G-acylasy (PGA, EC 3.5.1.11) jsou enzymy, jež mají nejvyšší afinitu ke sloučeninám s amidicky vázanou fenylacetylovou skupinou, kterou hydrolyticky odštěpují. Jelikož byly tyto enzymy izolovány za účelem štěpení penicilinu G, byly pojmenovány penicilin-G-acylasami. Všechny PGA mají podobnou molekulovou strukturu (kap. 1.4) a byly nalezeny v mnoha bakteriích: *Alcaligenes faecalis* (Verhaert et al. 1997), *Arthrobacter viscosus* (Konstantinović et al. 1994), *Bacillus megaterium* (Senthilvel et al. 1996), *Escherichia coli* (Kutzbach et al. 1974), *Kluyvera citrophila* (Alvaro et al. 1992), *Providencia rettgeri* (McDonough et al. 1999) a dalších. PGA mají dominantní postavení mezi penicilinacylasami, neboť již několik desetiletí slouží k průmyslové konverzi penicilinu G na klíčový meziprodukt výroby semisyntetických penicilinů, 6-aminopenicilanovou kyselinu (obr. 2.2). PGA se také používají na průmyslovou výrobu 7-aminodeacetoxy-cefalosporanové kyseliny konverzí deacetoxycefalosporinu G (obr. 2.2), který se připravuje z penicilinu G chemickou modifikací. Princip modifikace spočívá v expanzi pětičlenného heterocyklu na

šestičlenný heterocyklus, přičemž postup zahrnuje několik chemických kroků (Bruggink et al. 2001).



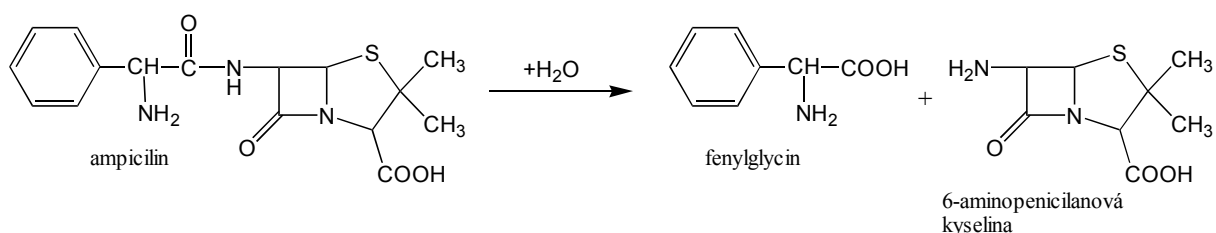
Obr. 2.2: Hydrolýza penicilinu G a deacetoxycefalosporinu G pomocí PGA

Penicilin-V-acylasy (PVA, EC 3.5.1.11) jsou enzymy, které mají nejvyšší afinitu ke sloučeninám s amidicky vázanou fenoxycetylovou skupinou, kterou hydrolyticky odštěpují. Jelikož byly tyto enzymy izolovány za účelem štěpení penicilinu V, byly pojmenovány penicilin-V-acylasami. Jednotlivé PVA jsou na rozdíl od PGA odlišné v molekulární struktuře a byly nalezeny v mnoha mikroorganismech zahrnující bakterie, kvasinky i vláknité houby: *Achromobacter* sp., *Actinoplanes* sp., *Bacillus megaterium*, *Bacillus sphaericus*, *Cryptococcus* sp., *Erwinia aroideae*, *Fusarium* sp., *Micrococcus ureae*, *Penicillium chrysogenum*, *Pleurotus ostreatus*, *Pseudomonas acidovorans*, *Rhodotorula glutinis* a *Streptomyces lavendulae* (Sudhakaran et al. 1992, Shewale et al. 1997, Parmar et al. 2000). Penicilin-V-acylasy jsou také průmyslově významné, neboť zhruba 15 % světové produkce 6-aminopenicilanové kyseliny je vyráběno konverzí penicilinu V pomocí PVA (obr. 2.3). Stejně jako v případě PGA, PVA se používá pro průmyslovou výrobu 7-aminodeacetoxycefalosporanové kyseliny konverzí deacetoxycefalosporinu V, který se připravuje z penicilinu V chemickou modifikací (Bruggink et al. 2001).



Obr. 2.3: Hydrolyza penicilinu V pomocí PVA

α -aminoacidesterhydrolasy (AEH, EC 3.1.1.43) sice nepatří mezi penicilinacylasy, nicméně byly dříve považovány za ampicilinacylasy, podskupinu penicilinacylas. α -aminoacidesterhydrolasy obecně katalyzují přenos acylové skupiny z esteru α -aminokyseliny na H₂O, avšak některé enzymy patřící mezi AEH dokáží hydrolyzovat i syntetizovat β -laktamová antibiotika nesoucí výhradně α -aminoacyl (např. ampicilin, amoxicilin, cefalexin). První enzym tohoto druhu byl nalezen v bakterii *Pseudomonas melanogenum* IFO 12020 (Kim et al. 1990) a byl původně pojmenován ampicilinacylasa, neboť na rozdíl od známých penicilinacylas účinně štěpil ampicilin (obr. 2.4), zatímco penicilin G a V štěpit nedokázal. Další obdobné enzymy byly izolovány z *Xanthomonas citri* IFO 3835 (Kim et al. 1990, Polderman et al. 2002) a *Acetobacter turbidans* ATCC 9325 (Fernández-Lafuente et al. 2001, Polderman et al. 2002). Všechny tři enzymy mají podobnou podjednotkovou hmotnost 70 nebo 72 kDa, ale liší se podjednotkovým složením: *A. turbidans* - $\alpha_2\beta_2$, *X. citri* - α_4 , *P. melanogenum* - α_2 .

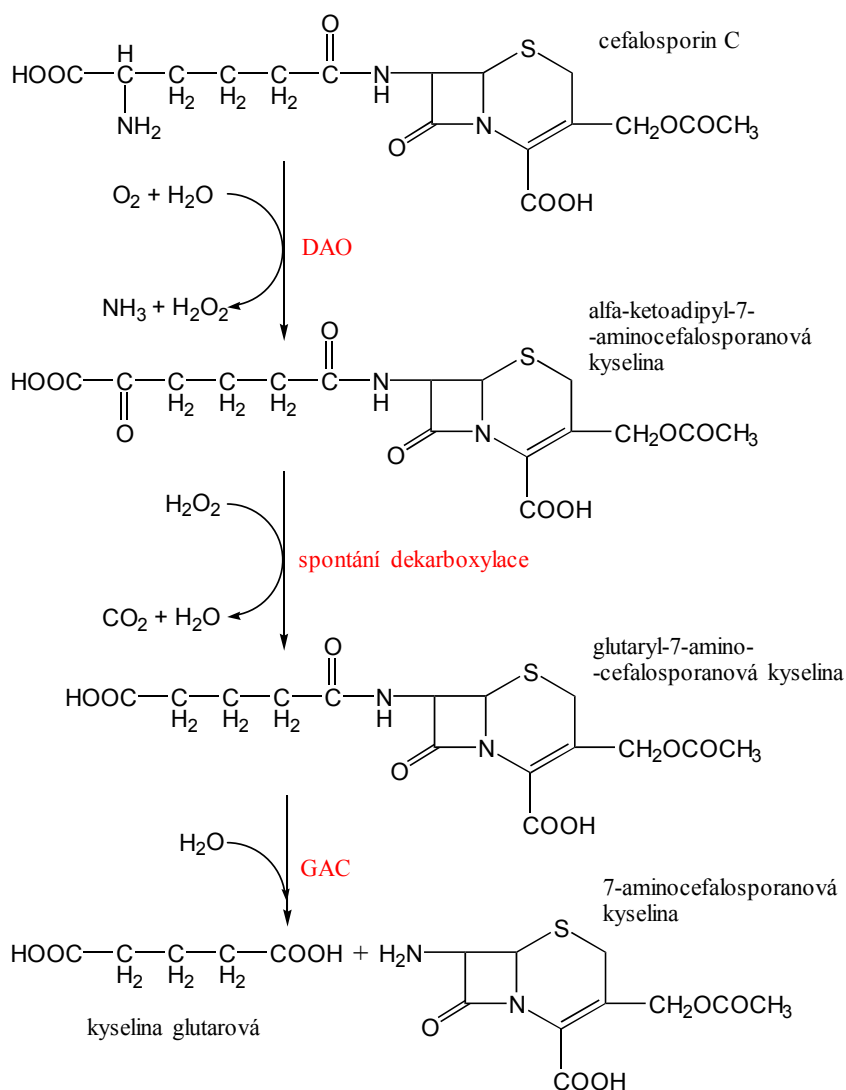


Obr. 2.4: Hydrolyza ampicilinu pomocí AEH

2.2.2 Rozdělení cefalosporinacylas

Mezi cefalosporinacylasy patří dvě skupiny enzymů: **glutaryl-7-ACA-acylasa** a **cefalosporin-C-acylasa**.

Glutaryl-7-ACA-acylasa (GAC, EC 3.5.1.14) se správně nazývá 7-β-(4-karboxybutan-amido)cefalosporinacylasa. Tento enzym byl izolován z několika kmenů bakterie *Pseudomonas* sp. a svojí molekulární strukturou se podobá penicilin-G-acylasam (Sudhakaran et al. 1992). GAC je průmyslově významný enzym, neboť slouží k dvojstupňové enzymové konverzi cefalosporinu C na klíčový meziprodukt 7-aminocefalosporanovou kyselinu (7-ACA). Princip konverze spočívá v prvotní oxidaci cefalosporinu C na ketoadipyl derivát pomocí enzymu oxidasy-D-aminokyselin (DAO, EC 1.4.3.3), který spontánně s pomocí vzniklého H₂O₂ dekarboxyluje na glutaryl-7-aminocefalosporanovou kyselinu. Vzniklá glutaryl-7-aminocefalosporanová kyselina je ve druhém kroku enzymově hydrolyzována pomocí GAC na 7-ACA a kyselinu glutarovou (Bečka et al. 2003, Gabor et al. 2004). Schéma celé konverze cefalosporinu C na 7-ACA je uvedeno na obr. 2.5.



Obr. 2.5: Konverze cefalosporinu C na 7-aminocefalosporanovou kyselinu

Cefalosporin-C-acylasa je zatím spíše hypotetický enzym, o němž je v literatuře málo informací (Matsuda et al. 1987). Tento enzym hydrolyzuje přímo cefalosporin C na 7-aminocefalosporanovou kyselinu bez nutnosti použití dvoustupňového procesu.

2.2.3 *Alternativní rozdělení penicilinamidohydrolas*

Kromě rozdělení na základě substrátové specifity byly penicilinamidohydrolasy rozděleny také podle jejich molekulární struktury (Valle et al. 1991, Verhaert et al. 1997, Gabor et al. 2004):

- **Typ I** - jedná se o penicilin-V-acylasy, které jsou složené ze čtyř identických podjednotek o molekulové hmotnosti kolem 35 kDa.
- **Typ II** - jedná se o acylasy složené ze dvou nestejně velkých podjednotek α (16-27 kDa) a β (54-66 kDa). Tento typ je dále rozdělen na dvě podskupiny:
 - **Typ IIA** – penicilin-G-acylasy.
 - **Typ IIB** - glutaryl-7-ACA-acylasy.
- **Typ III** - jedná se o α -aminoacidesterhydrolasy (ampicilinacylasy), které se skládají ze dvou nebo čtyřech podjednotek o molekulové hmotnosti kolem 70 kDa.

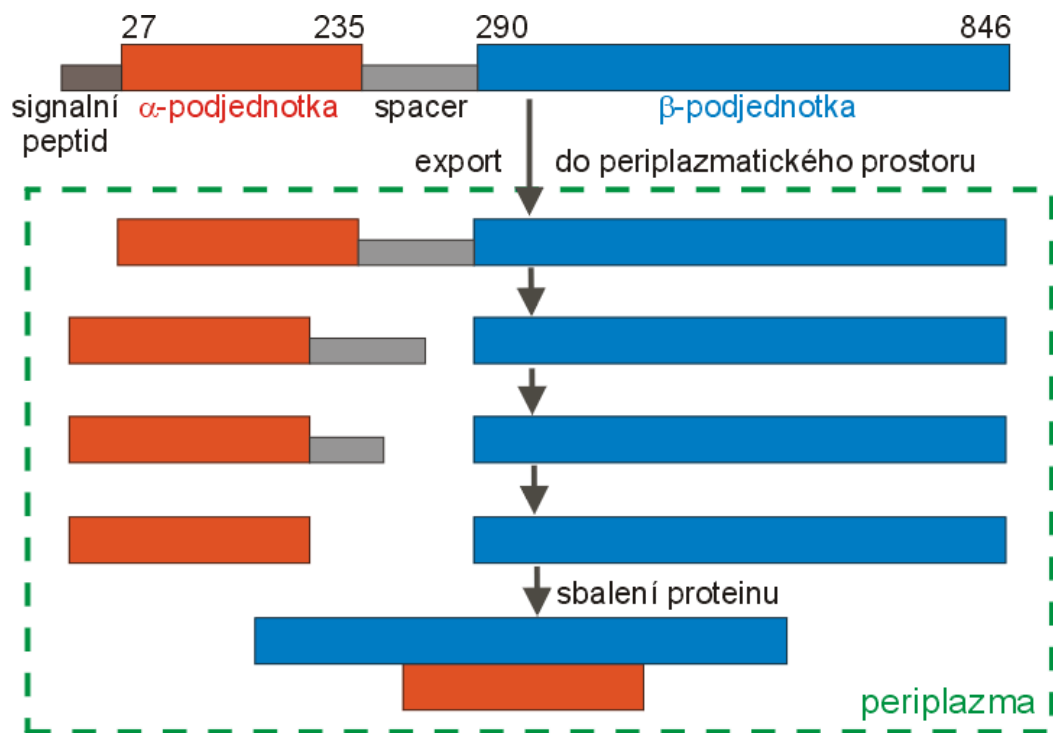
2.2.4 *Modifikované penicilinamidohydrolasy*

Kromě enzymů, které byly izolovány z přírodních nebo sbírkových kmenů, byla popsána řada enzymů, jež byly připraveny mutací a následnou selekcí produkčního kmene nebo přímo cílenou úpravou strukturního genu enzymu (Sio et al. 2004). Cílem úpravy přírodních enzymů bylo především zvýšení stability enzymu nebo zvýšení S/H poměru (kap. 2.5.2). Některé modifikované enzymy jsou známy pouze pod komerčními názvy např. Asemblase® 7500 a Asemblase® 3750 (DSM Gist, Holandsko).

2.3 **Molekulární struktura penicilin-G-acylas**

Aktivní formy penicilin-G-acylas (PGA) jsou lokalizovány buď v periplasmatickém prostoru G^- bakterií (*Alcaligenes faecalis*, *Escherichia coli*, *Kluyvera citrophila*, *Providencia rettgeri*), a nebo jsou produkovány extracelulárně (*Arthrobacter viscosus*, *Bacillus megaterium*). PGA jsou heterodimery, které mají molekulovou hmotnost kolem 85 kDa. Skládají se ze dvou nekovalentně propojených podjednotek α (cca 24 kDa) a β (cca 62 kDa) (přesné molekulové

hmotnosti jsou uvedené v tab. 2.1). Společným znakem PGA je vznik podjednotek α a β ze společného prekurzoru post-translační úpravou (Böck et al. 1983). Tento proces byl nejlépe prostudován u PGA z *E. coli* ATCC 11105 (Sizmann et al. 1990, Kasche et al. 1999). Princip post-translační úpravy je následující (obr. 2.6). Transkripcí a translací strukturního genu pro PGA (*pac*) vzniká neaktivní 98 kDa preproprotein obsahující od N-konce: signální peptid, α -podjednotku, endopeptid neboli spacer a β -podjednotku. V prvním kroku signální peptid dlouhý 26 aminokyselin směřuje preproprotein do periplazmatického prostoru, přičemž průchodem periplazmatickou membránou je signální peptid odštěpen. V periplazmatickém prostoru je nejprve autoproteolyticky odštěpena β -podjednotka obsahující 557 aminokyselin a nakonec je dvoustupňově odštěpen endopeptid dlouhý 54 aminokyselin z C-konce α -podjednotky. Finálním sbalením α a β -podjednotek vznikne aktivní enzym.



Obr. 2.6: Schéma post-translační úpravy preproproteinu PGA z *E. coli* ATCC 11105

Tabulka 2.1: Molekulární parametry známých PGA

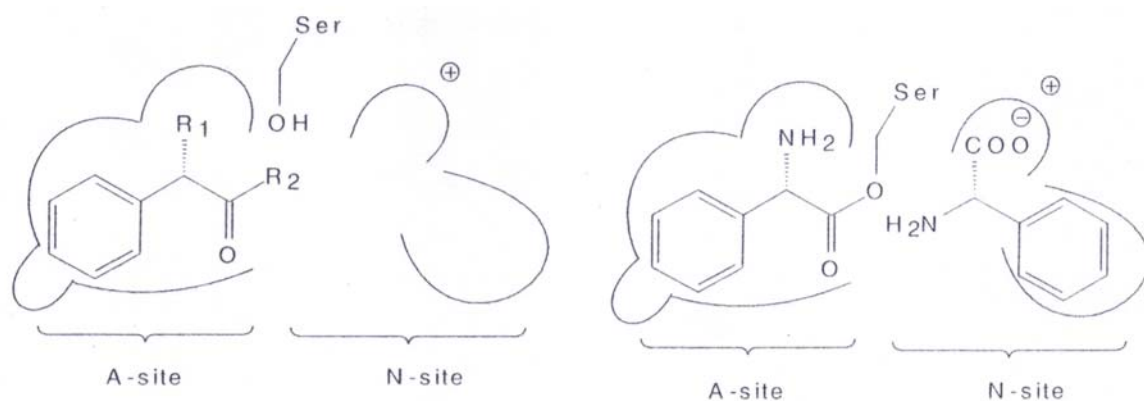
	<i>A. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. citrophila</i>	<i>P. rettgeri</i>	<i>A. viscosus</i>	<i>B. megaterium</i>
aktivní enzym	85,7 kDa	86,2 kDa	85,2 kDa	86,1 kDa	85,7 kDa	85,6 kDa
signální sekvence	26 AA	26 AA	26 AA	23 AA	26 AA	26 AA
α -podjednotka	23,0 kDa 202AA	23,8 kDa 209 AA	23,6 kDa 209 AA	23,7 kDa 205 AA	24,3 kDa 208 AA	24,2 kDa 208 AA
endopeptid	37 AA	54 AA	54 AA	56 AA	31 AA	31 AA
β -podjednotka	62,7 kDa 551 AA	63,4 kDa 557 AA	61,7 kDa 555 AA	62,2 kDa 553 AA	61,4 kDa 537 AA	61,4 kDa 537 AA

AA – aminokyselinové zbytky

Data byla převzata z publikace Verhaert et al. (1997). Přístupová čísla sekvencí známých PGA v databázi GenBank jsou následující: *A. faecalis*, U93881; *A. viscosus*, L04471; *B. megaterium*, U07682; *E. coli*, X04114; *K. citrophila*, M15418; *P. rettgeri*, M86533.

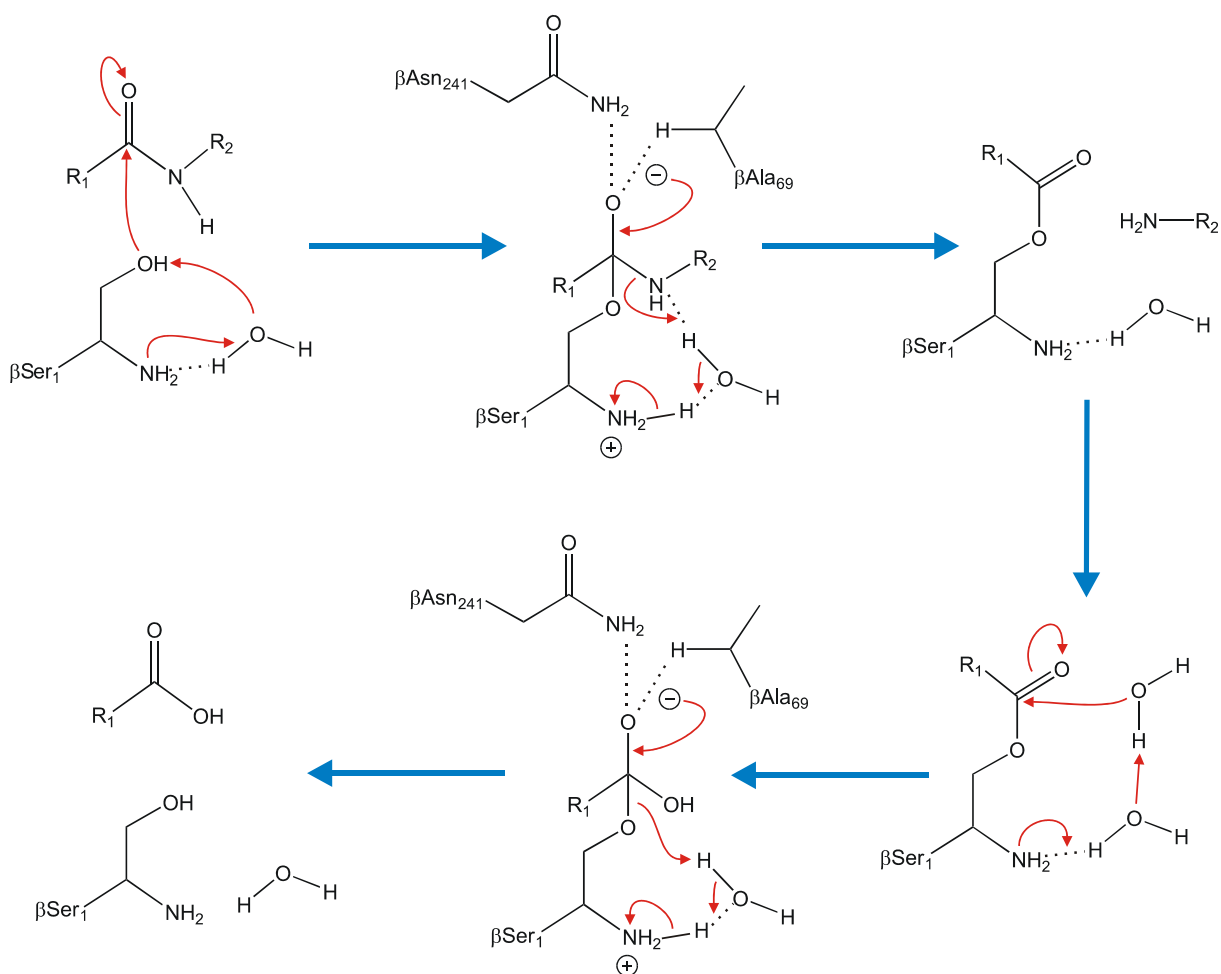
2.4 Struktura aktivního místa PGA z *E. coli* a reakční mechanismus

Dříve než byla známa struktura penicilinacylas, biochemické studie ukázaly, že serin č. 1 β -podjednotky má klíčovou roli v aktivním místě PGA. Na základě substrátové specifity byl navržen model aktivního místa PGA z *E. coli* (Švedas et al. 1996). Na obr. 2.7 je schéma aktivního místa, které se skládá z A-kapsy (A-site) a N-kapsy (N-site). A-kapsa (acyl binding pocket) je hydrofobní a velmi dobře váže nepolární aromatické molekuly. A-kapsa má i prostor pro R_1 substituent α -uhlíku. Jako R_1 substituent jsou akceptovány skupiny NH_2 , OH a CH_3 . Dále malá skupina (OH) je akceptována i v poloze 4 fenylvého kruhu, čímž je uvolněn přístup i antibiotikům amoxicilin a cefadroxil (obr. 2.9). Na druhé straně N-kapsa (nucleophile binding pocket) je schopna akceptovat širokou skupinu molekul od velkých β -laktamových struktur až po malé molekuly, jako například alkoholy, aminy a aminokyseliny.



Obr 2.7: Schéma aktivního místa PGA z *E. coli* s postranním řetězcem v místě A a nukleofilem v místě N

V roce 1995 byla stanovena 3-D struktura PGA (Duggleby et al. 1995) z *E. coli*, což zároveň objasnilo i reakční mechanismus v aktivním místě enzymu. Reakční mechanismus PGA (obr. 2.8) se podobá dobře známému reakčnímu mechanismu serinových proteas. Mechanismus hydrolýzy substrátu je následující: serin β 1 se sám aktivuje pomocí vlastní aminoskupiny a poté nukleofilně atakuje karbonylový uhlík substrátu, přičemž vznikne tranzitní komplex stabilizovaný vazbou na asparagin β 241 a alanin β 69. Přeskupením vazeb vznikne acyl-enzym intermediát. Poté je intermediát rozštěpen vodou opět skrz tranzitní komplex stabilizovaný asparaginem β 241 a alaninem β 69. Reakční mechanismus syntézy antibiotika je analogický (kap. 2.5.2) s tím rozdílem, že acyl-enzym intermediát není rozštěpen vodou, ale jiným nukleofilním činidlem (např. 6-APA).



Obr 2.8: Reakční mechanismus probíhající v aktivním místě PGA z *E. coli*

2.5 Semisyntetická antibiotika a jejich výroba

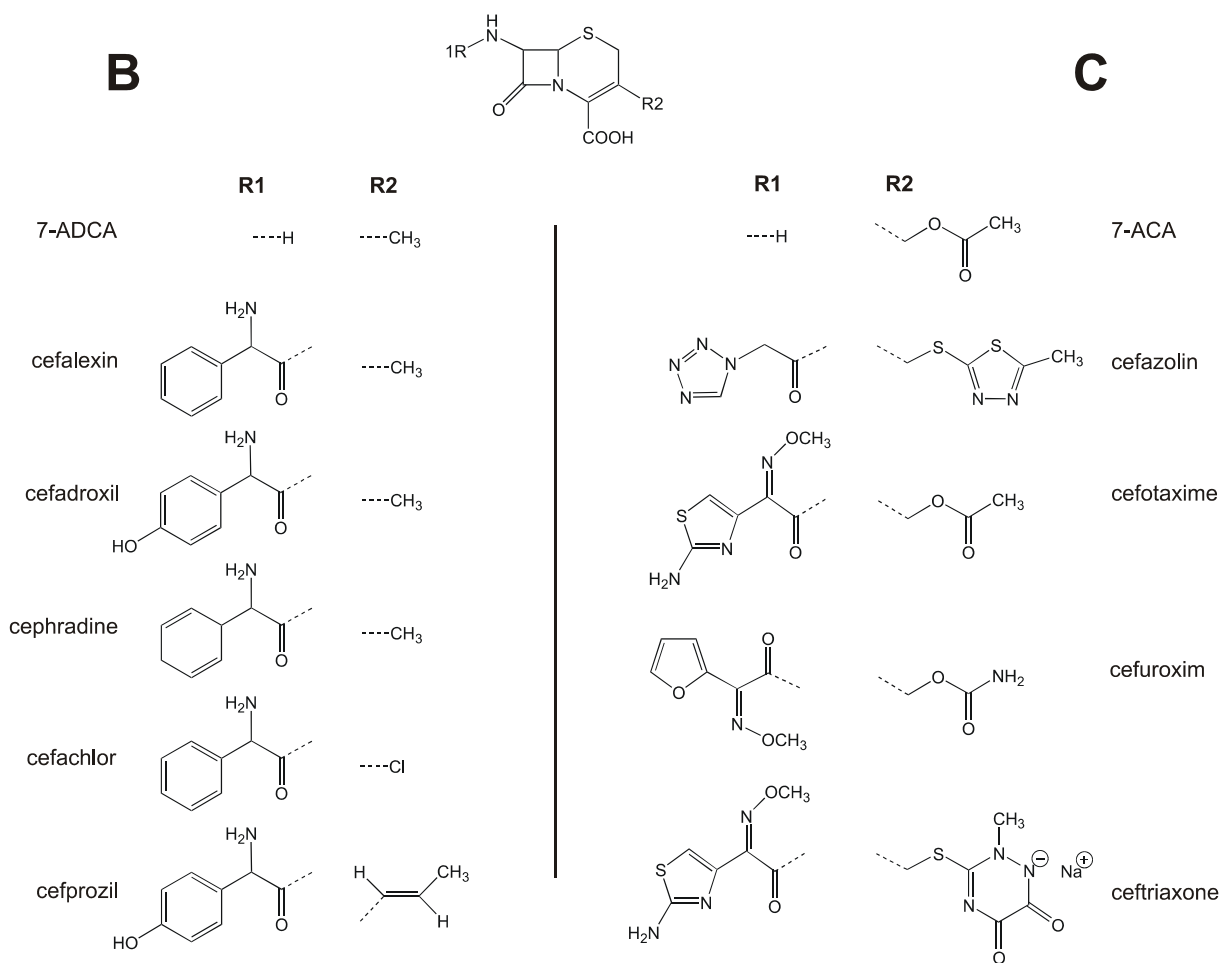
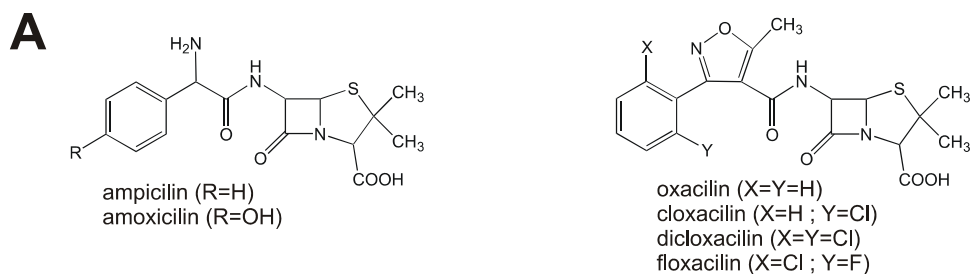
Počátky vývoje modifikovaných (semisyntetických) penicilinů se datují do doby 40. a 50. let 20. století, kdy byly v průběhu kultivace produkčních mikroorganismů přidávány do média různé deriváty kyseliny octové. Během mikrobiální syntézy penicilinu byly přidány deriváty inkorporovány do struktury penicilinu místo fenyloctové kyseliny a tím vznikaly nové varianty penicilinových antibiotik (Bruggink et al. 2001). Tímto přístupem byla vyvinuta příprava penicilinu V (fenoxymethylpenicilin), který spolu s penicilinem G měl největší klinický význam do začátku 60. let 20. století. Bohužel fermentační postup přípravy modifikovaných penicilinů byl limitován pouze na inkorporaci alifatických a arylalifatických karboxylových kyselin, neboť produkční kmeny vláknitých hub rodu *Penicillium* využívaly při syntéze penicilinů enzymy s omezenou substrátovou specifitou.

Přestože peniciliny vyráběné fermentační technologií (penicilin G, penicilin V) měly v polovině 50. let 20. století výborné antibiotické účinky, začala se jejich účinnost vlivem masivního klinického použití postupně snižovat. Pokles účinku byl způsoben postupnou selekcí rezistentních patogenních bakteriálních kmenů, které syntetizovaly enzym β -laktamasu, štěpící β -laktamový kruh penicilinových antibiotik. Bylo tedy třeba vyvinout nové výrobní postupy, umožňující připravit různě modifikovaná (semisyntetická) antibiotika nezávisle na možnostech fermentační technologie. Ve stejné době byla popsána i fermentační příprava cefalosporinu C, který je produkován plísní *Acremonium chrysogenum*. Na rozdíl od přírodních penicilinů cefalosporin C měl minimální antibiotický účinek.

Potupně byly vyvinuty technologie přípravy různých semisyntetických β -laktamových antibiotik, které zahrnovaly dva hlavní kroky (Bruggink et al. 2001):

- 1. krok** – příprava klíčových meziproductů výroby (6-APA, 7-ADCA, 7-ACA) enzymovým odštěpením N-acylového postranního řetězce β -laktamových antibiotik, které byly dostupné fermentační technologií (penicilin G, penicilin V, cefalosporin C) (kap. 2.2).
- 2. krok** – syntéza modifikovaného antibiotika opětovným navázáním vhodného acylu na volnou aminoskupinu v poloze 6 či 7 β -laktamového jádra (klíčového meziproductu). Syntéza se provádí buď tradičně chemickou cestou, nebo moderními postupy enzymové syntézy, které se v současnosti zavádějí do průmyslu.

Na obr. 2.9 jsou uvedeny strukturní varianty nejvýznamnějších β -laktamových antibiotik a v tab. 2.2 je uvedena doba jejich zavedení na trh a přibližný objem celosvětové výroby. Z tab. 2.2 je zřejmé, že dominantní postavení na trhu mají dvě antibiotika: ampicilin a amoxicilin, které se vyrábějí v největším množství.



Obr 2.9: Strukturní varianty nejvýznamnějších derivátů β -laktamových antibiotik odvozených od 6-APA (A), 7-ADCA (B) a 7-ACA (C)

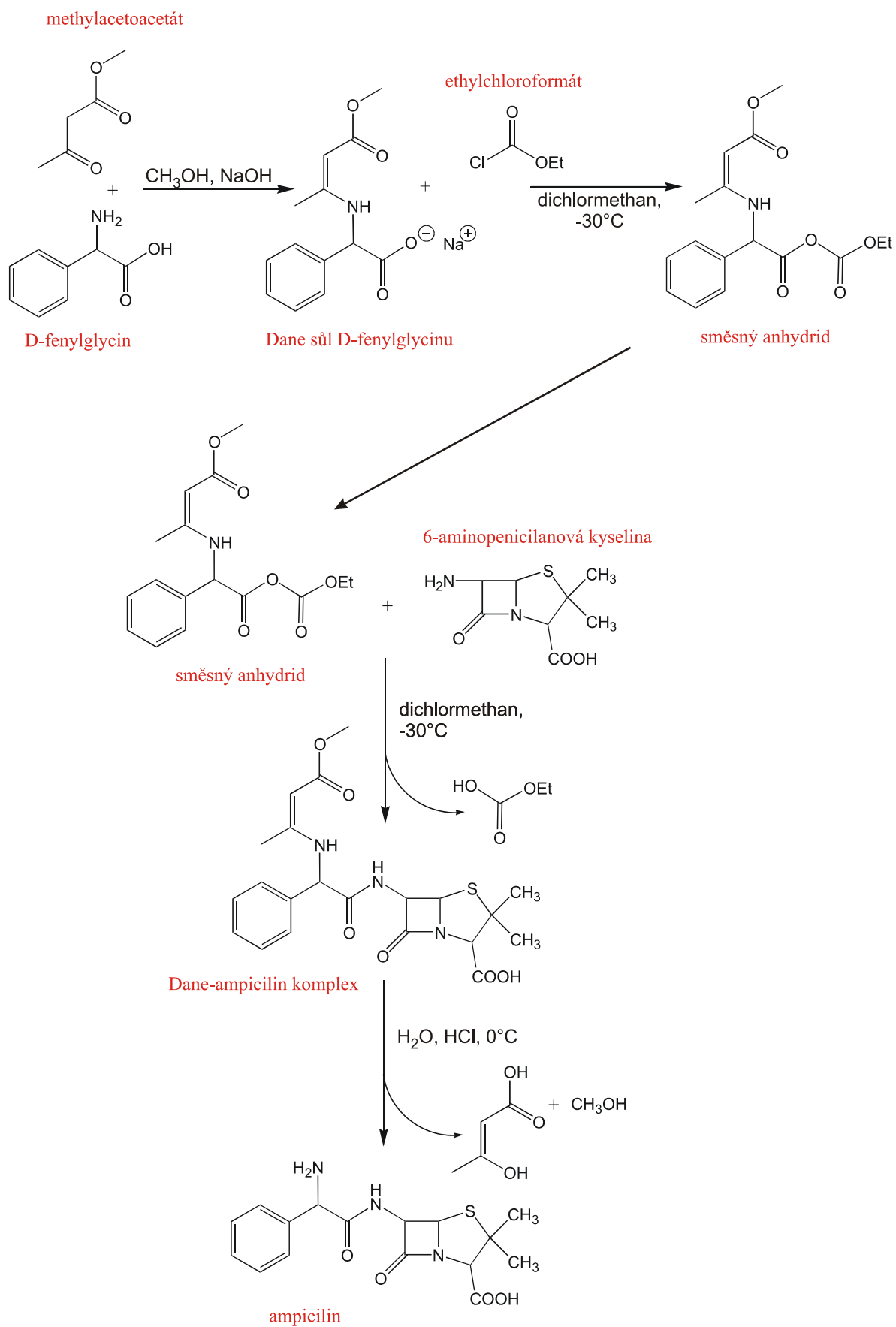
Tabulka 2.2: Přehled zavedení jednotlivých antibiotik na trh a jejich celosvětová produkce. Převzato z publikace Bruggink et al. (2001)

produkt	rok zavedení na trh	výroba v roce 1970 (tuny)	výroba v roce 2000 (tuny)
penicilin G	1941	3.000	25.000*
penicilin V	1953		
ampicilin	1961	900	20.000
amoxicilin	1972	-	
ostatní peniciliny	-	100	2.000
cefalexin	1970	-	4.000
cephradine	1972		
cefadroxyl	1977		
cefachlor	1979		
cefazolin	1971	-	3.000
cefotaxime	1980		
ceftriaxime	1983		
cefuroxim	1987		
cefprozil	1992		
ostatní cefalosporiny	-		

* včetně materiálu pro výrobu semisyntetických antibiotik

2.5.1 Chemická syntéza semisyntetických β -laktamových antibiotik

Princip chemické syntézy (Bruggink et al. 2001) je zde uveden, aby byl zřejmý význam enzymové syntézy. Syntézou semisyntetických β -laktamových antibiotik je míněn vznik amidické vazby mezi vhodným acylem a volnou aminoskupinou v poloze 6 či 7 β -laktamového jádra (6-APA, 7-ACA, 7-ADCA). Tuto reakci lze provést různými metodami používanými v peptidové chemii, například přímou reakcí acylchloridu s volnou aminoskupinou β -laktamového jádra. Bohužel některé acyly obsahují také volnou aminoskupinu, kterou je třeba blokovat. Zásadní zlepšení chemické syntézy přineslo vypracování technologie syntézy využívající blokování volné aminoskupiny acylu pomocí methylacetoacetátu. Tato technologie byla pojmenována podle své objevitelky Elisabeth Dane jako „Dane salt route“ a byla využívána například firmou Beecham k výrobě ampicilinu. Schéma syntézy ampicilinu je znázorněno na obr. 2.10.



Obr. 2.10: Schéma chemické syntézy ampicilinu

Jednotlivé stupně chemické syntézy ampicilinu jsou následující (Bruggink et al. 2001). Prvním krokem je příprava Dane soli D-fenylglycinu kondenzací D-fenylglycinu s methylacetoacetátem. Tím je blokována volná aminoskupina D-fenylglycinu. V dalším kroku se připraví reaktivní směsný anhydrid Dane soli a ethylchloroformátu. Směsný anhydrid přímo reaguje s volnou aminoskupinou β -laktamového jádra, v tomto případě s 6-aminopenicilanovou kyselinou. Vzniká ampicilin, který má stále blokovanou α -aminoskupinu acylu. Blokační skupina je nakonec odstraněna kyselou hydrolyzou. Ampicilin je poté z reakční směsi precipitován v izoelektrickém bodě (pH 5) jako krystalický trihydrát ampicilinu. Celá technologie syntézy je velice energeticky náročná, neboť reakční podmínky vyžadují intenzivní chlazení na teplotu $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nemalé množství energie je také spotřebováno na regeneraci velkého množství organických rozpouštědel, která jsou zapotřebí v reakčních směsích.

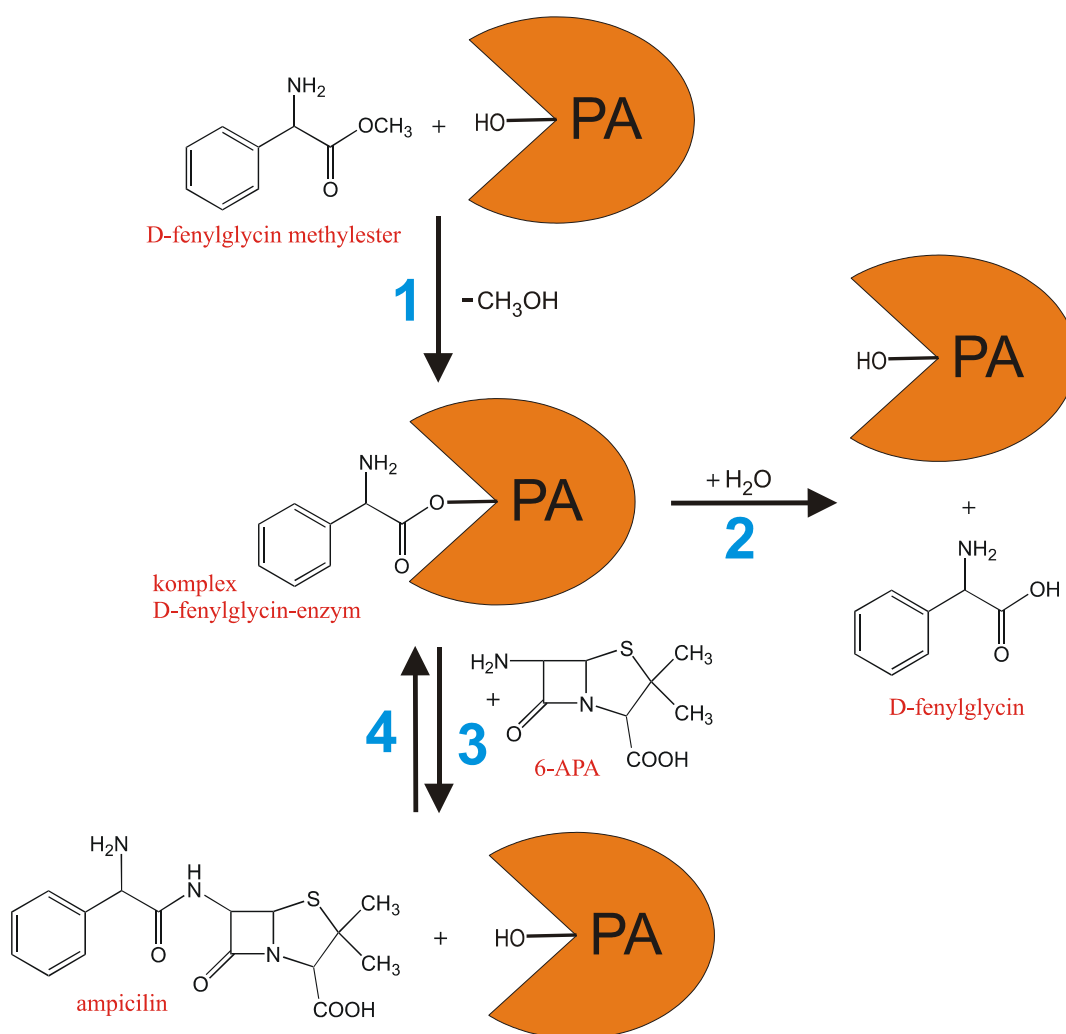
2.5.2 Enzymová syntéza semisyntetických β -laktamových antibiotik

Enzymová syntéza přináší oproti chemické syntéze mnoho výhod. Reakce se provádí ve vodném prostředí, nejsou potřeba organická rozpouštědla, blokační a aktivační činidla. Dále není třeba reakční směs intenzivně chladit na velmi nízké teploty a také není potřeba vynakládat energii na regeneraci organických rozpouštědel. Přínos enzymové syntézy tedy spočívá hlavně v technologii šetrné k přírodnímu prostředí a ve snížení energetické náročnosti (Bruggink et al. 1998, Sheldon et al. 2001). Pro průmyslovou syntézu se používá penicilinacylasa imobilizovaná vhodným způsobem, což umožňuje snadnou separaci biokatalyzátoru z reakční směsi a zajistí dostatečnou stability enzymu pro opakované použití. Hlavním problémem enzymové syntézy β -laktamových antibiotik je boj s chemickou rovnováhou, která je ve vodném prostředí značně posunuta ve prospěch hydrolyzy produktu (Sheldon et al. 2001, van der Wielen et al. 2001). Pokud by probíhala jednoduchá syntéza ampicilinu z 6-APA a D-fenylglycinu ve vodném prostředí za přítomnosti penicilinacylasy, ustanovila by se chemická rovnováha, ve které by se v reakční směsi nacházelo pouze asi 1-2 % ampicilinu (v závislosti na pH). Aby byla enzymová syntéza rentabilní, byly navrženy různé postupy (Bruggink et al. 1998) jak chemickou rovnováhu posunout ve prospěch syntézy antibiotika. Společným přístupem k rentabilní enzymové syntéze je tzv. kineticky řízená reakce (Bruggink et al. 1998, Hernández-Jústiz et al. 1999). Kineticky řízená reakce je proces, v němž jsou reakční podmínky nastaveny tak, aby v určitém okamžiku v reakční směsi vzniklo kinetické maximum koncentrace produktu. V tomto okamžiku je vhodné reakci zastavit

a izolovat produkt s maximálním výtěžkem. Princip kineticky řízené reakce je dále vysvětlen na enzymové syntéze ampicilinu.

Kineticky řízená syntéza ampicilinu

Při kinetické syntéze ampicilinu (obr. 2.11) se nevychází z D-fenylglycinu, ale z energeticky bohatší sloučeniny D-fenylglycin methylesteru nebo amidu (Sheldon et al. 2001, van der Wielen et al. 2001). Tato sloučenina vytvoří nejprve přechodný komplex s penicilinacylasou, kdy se naváže v aktivním místě na OH skupinu serinu č.1 β-pojednotky (platí pro penicilin-G-acylasy). Vzniklý komplex je dále štěpen nukleofilním činidlem (H₂O nebo 6-APA). Pokud komplex reaguje s 6-APA, vznikne ampicilin, pokud komplex reaguje s H₂O, vzniká vedlejší produkt syntézy, D-fenylglycin. Jelikož je syntéza ampicilinu reverzibilní reakce, vzniklý ampicilin slouží také jako substrát penicilinacylasy a je zpětně štěpen na 6-APA a D-fenylglycin. Podrobný reakční mechanismus je uveden v kap. 2.4.



Obr. 2.11: Zjednodušený reakční mechanismus enzymové syntézy ampicilinu

Výsledkem kineticky řízené syntézy je skutečnost, že v určitém čase se v reakční směsi nahromadí maximální koncentrace ampicilinu, která se poté snižuje až na rovnovážnou koncentraci. Při průmyslové syntéze je tedy třeba reakci neustále monitorovat pomocí HPLC a ve vhodný okamžik zastavit. Průběh kineticky řízené syntézy ovlivňuje mnoho faktorů: výběr vhodného enzymu, posun chemické rovnováhy odčerpáváním produktu a reakční podmínky (teplota, pH, koncentrace reaktantů, a to jak koncentrace nukleofilu 6-APA, tak i koncentrace acyldonoru D-fenylglycin methylesteru).

Důležitým faktorem ovlivňujícím rentabilitu syntézy je výběr vhodného enzymu, neboť enzymy se mezi sebou liší tzv. S/H poměrem. S/H poměr nepřímě vyjadřuje, jestli enzym více preferuje jako nukleofilní činidlo 6-APA nebo H₂O. Tento parametr je závislý na pH a teplotě a používá se pro srovnání vhodnosti enzymů k syntéze. S/H parametr je poměr rychlosti syntetické reakce (3 na obr. 2.11) ku rychlosti hydrolytické reakce (2 na obr. 2.11). Prakticky se měří jako poměr počátečních rychlostí přírůstků koncentrací ampicilinu a D-fenylglycinu (v případě syntézy ampicilinu, viz vzorec č. 2.1). Čím je S/H poměr větší, tím je enzym vhodnější pro danou syntetickou reakci. Obecně platí pro všechny penicilinacylasy, že S/H poměr výrazně roste se snižující se reakční teplotou, což je způsobeno potlačením hydrolytické reakce (Schroën et al. 2002). V literatuře je popsána syntéza β-laktamových antibiotik ve zmražené reakční směsi (van Langen et al. 1999). Autoři uvádějí, že v případě syntézy cefalexinu S/H poměr 1,3 při 20 °C stoupl na 25 zmražením na teplotu -20 °C. Problémem syntézy při nízké teplotě je snížená reakční rychlost. V tab. 2.3 jsou uvedeny S/H poměry čtyř různých penicilinacylas pro syntézu vybraných antibiotik.

$$S/H = v_s/v_h = \Delta c^{AMP}/\Delta c^{PG} \quad (2.1)$$

Další možností, jak dále zvýšit výtěžek, je odčerpávání produktu během syntézy. V literatuře byl například popsán postup, který využíval snížené rozpustnosti ampicilinu, kdy vznikající ampicilin precipitoval přímo v reakční směsi, a tudíž byl chráněn před nežádoucí zpětnou hydrolyzou enzymem (Youshko et al. 2000, 2001, 2002). Princip technologie spočíval v extrémně vysokých počátečních koncentracích reaktantů (např. $c^{6-APA} = 0,6 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $c^{D-PGM} = 0,9 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Jelikož maximální rozpustnost ampicilinu byla za daných podmínek jen kolem $c^{AMP} = 20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), vznikající ampicilin hranici rozpustnosti rychle dosáhl a začal precipitovat. Autoři uvádějí, že dosáhli celkového výtěžku vyššího než 90 % vztaženo na vstupní 6-APA. Popsaná technologie je aplikovatelná i na syntézy jiných β-laktamových

antibiotik, které mají přirozeně nižší rozpustnost (např. amoxicilin). V případě lépe rozpustných produktů je možné produkt odčerpávat během syntézy precipitací pomocí komplexačního činidla. Firma NOVO Nordisk například patentovala postup precipitace cefalexinu pomocí β -naftolu (Faarup 1977). Cefalexin a β -naftol tvoří v reakční směsi nerozpustný komplex v molárním poměru 2:1. Po separaci je sraženina snadno rozpuštěna snížením pH. Analogicky lze precipitovat různá antibiotika řadou komplexačních činidel (Zwanenburg et al. 2001).

Někteří autoři uvádějí ještě další možnosti, jak posunout chemickou rovnováhu ve směru syntézy antibiotika. Nejčastěji je zmiňováno přidávání různých rozpouštědel do reakční směsi, která jsou mísitelná s vodou (Kim et al. 1996, Illanes et al. 2001, Aguirre et al. 2002). Přídavek rozpouštědla do reakční směsi způsobí potlačení vodní aktivity a tím posun chemické rovnováhy ve směru syntézy. Nevýhodou tohoto přístupu je práce s organickými rozpouštědly spojená s jejich regenerací. Autoři také popisovali snížení stability katalyzátoru v porovnání s reakcí ve vodném prostředí bez požití organických rozpouštědel.

Tabulka 2.3: Publikované hodnoty S/H poměrů různých penicilinacylas pro syntézu ampicilinu, cefalexinu a cefamandolu. Reakce byly prováděny při teplotě 4 °C a pH 6,5. Data byla převzata z publikace Hernandez-Jústiz et al. (1999)

producent PA	ampicilin	cefalexin	cefamandole
<i>E. coli</i>	1,86	6,25	3,87
<i>K. citophila</i>	1,14	0,64	2,05
<i>A. turbidans</i>	5,00	2,15	1,44
<i>B. megaterium</i>	0,61	0,60	1,25

2.6 Bakteriální kmen *Achromobacter* sp. CCM 4824

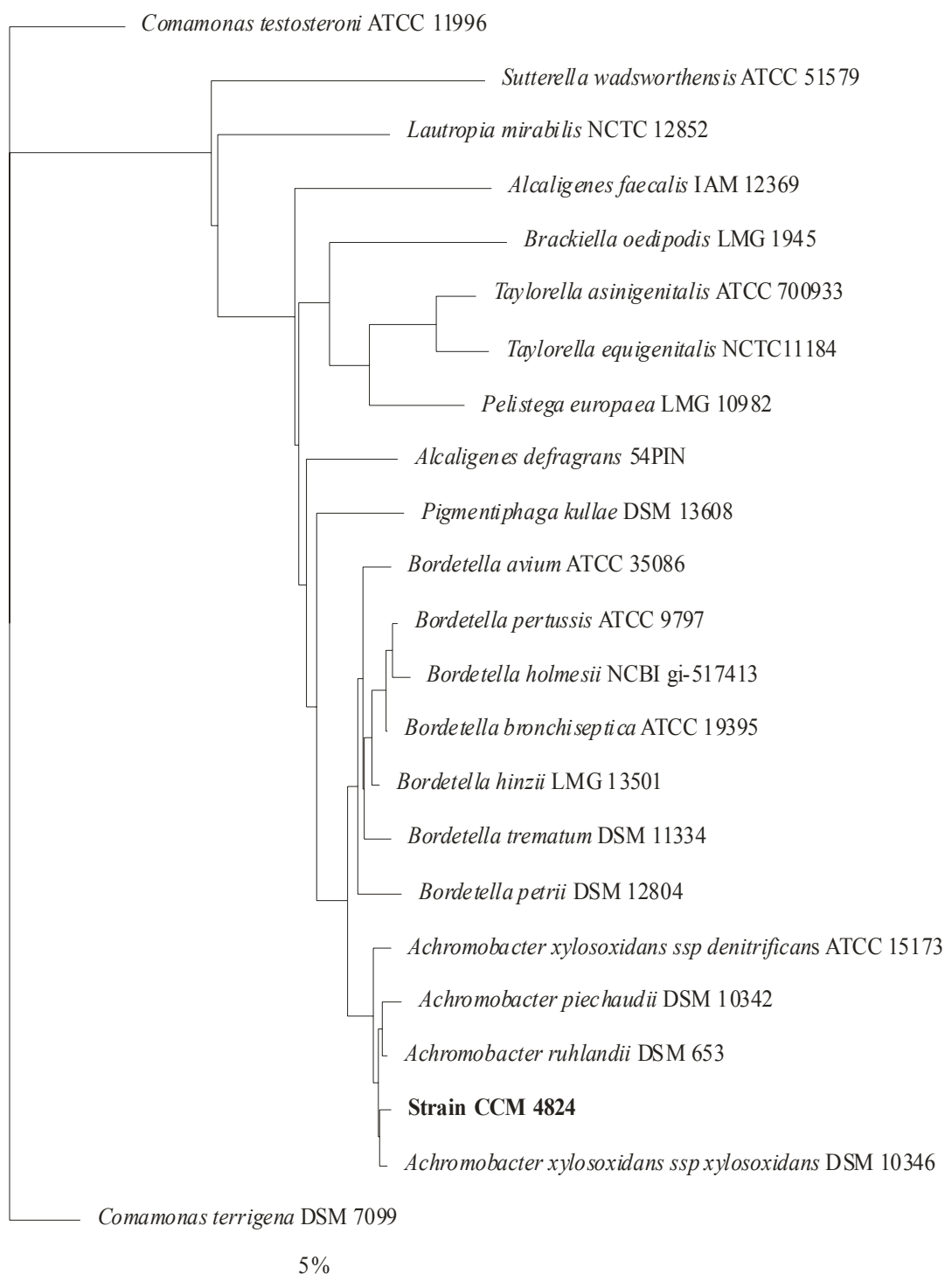
Bakteriální kmen CCM 4824 byl nalezen v rámci screeningu, při kterém byl cíleně hledán kmen, který produkuje enzym penicilinacylasu účinně štěpící ampicilin na 6-aminopenicilanovou kyselinu a fenylglycin (Plháčková et al. 2003). Předpokládalo se, že pokud enzym dokáže hydrolyzovat ampicilin, mohl by být vhodný i pro jeho zpětnou syntézu. Celkem bylo otestováno přibližně 2.000 sbírkových kmenů a přírodních izolátů, ze kterých byl vybrán bakteriální kmen produkující enzym, který dokázal štěpit vybraná semisyntetická β -laktamová antibiotika (ampicilin, amoxicilin, cefalexin) větší rychlostí než přírodní substráty (penicilin G, penicilin V). Tato vlastnost se zdála být v porovnání se známými penicilinacylasami zajímavá.

Jelikož izolovaný kmen vykazoval současně β -laktamasovou aktivitu, která degradovala β -laktamová antibiotika nežádoucím způsobem, byla provedena chemická mutageneze bakteriálního kmene pomocí N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidinu s cílem odstranit nežádoucí nežádoucí aktivitu.

β -laktamasa negativní kmen s aktivitou penicilinacylasy byl klasifikován na základě morfologických a fyziologických testů jako *Comamonas testosteroni*. Tento kmen byl uložen do České sbírky mikroorganismů na Masarykově univerzitě v Brně pod označením CCM 4824 (Plháčková et al. 2002).

Kmen CCM 4824 byl dále podroben přesnější identifikaci pomocí analýzy mastných kyselin a také pomocí analýzy sekvence genu 16S rRNA (Plháčková et al. 2003). Analýzou mastných kyselin, která byla provedena v Regionální hygienické stanici v Ostravě plynovou chromatografií a vyhodnocena pomocí Sherlock Microbial Identification System, bylo zjištěno, že zastoupení mastných kyselin se nejvíce podobá bakterii *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* (similarity index 0,701). Analýza sekvence genu 16S rRNA byla provedena v German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Braunschweig, Německo). Analýzou bylo zjištěno, že sekvence genu 16S rRNA kmene CCM 4824 vykazovala nejvyšší podobnost se sekvencemi genů 16S rRNA bakterie *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* (99,6 %) a bakterie *Achromobacter ruhlandii* (99,4 %). Naopak podobnost sekvencí kmene CCM 4824 a *Comamonas testosteroni* byla nízká. Na obr. 2.12 je uveden fylogenetický strom podobností genů 16S rRNA.

Na základě analýzy mastných kyselin a sekvence genu 16S rRNA byl bakteriální kmen definitivně klasifikován jako *Achromobacter* sp. CCM 4824.



Obr. 2.12: Fylogenetický strom sestavený na základě podobností genů 16S rRNA. Měřítko představuje substituci 5 nukleotidů na 100 nukleotidů.

3. Materiál a metody

3.1 Materiál a přístrojové vybavení

Chemikálie

NaCl, KCl, NaOH, NaH₂PO₄·2H₂O, KH₂PO₄, (NH₄)₂SO₄, MgSO₄·7H₂O, HCl, H₃PO₄, H₃BO₄, CH₃COOH, CH₃OH (p.a.), CH₃OH (HPLC grade), 2-propanol, močovina

Yeast extract (OHLY, DHW Hamburg), LB médium (Difco), agarosa

6-nitro-3-fenylacetylamidobenzoová kyselina (NIPAB), penicilin G, penicilin V, deacetoxycefalosporin G (DAOC-G), deacetoxycefalosporin V (DAOC-V), ampicilin, amoxicilin, cefalexin, 6-aminopenicilanová kyselina (6-APA), 7-aminocefalosporanová kyselina (7-ACA), 7-aminodeacetoxycefalosporanová kyselina (7-ADCA), fenylglycin metylester (PGME), fenylloctová kyselina (FOK), fenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF), *p*-dimethylaminobenzaldehyd (DAB)

Bromfenolová modř, Coomassie Brilliant Blue R-250, tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), glycin, β-alanin, glycerol, merkaptoethanol, dodecylsulfát sodný (SDS), acrylamid, bis-acrylamid, N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED), persíran amonný, riboflavin, Pharmalyte 3-10 (Amersham Biosciences), standardy molekulových hmotností Perfect Protein™ Markers 10-225 kDa (Novagen), nativní standardy molekulových hmotností (Sigma): ferritin, katalasa, aldolasa, hovězí sérový albumin, ovalbumin IEF Markers 3-10 (Serva)

Penicilin-G-acylasa z rekombinantního kmene *Escherichia coli* RE3(pKA18), lyofilizovaná (Mikrobiologický ústav AV ČR)

Voda použitá pro přípravu všech roztoků byla demineralizována zařízením firmy Watrex (moduly Rowapur 200 + Ultrapur)

Soupravy

BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce)

Přístroje a zařízení

spektrofotometr Shimadzu UV-1601 s temperovanou optickou celou
orbitální třepačka Gallenkamp, model INR-401
laboratorní bioreaktor Biostat MD (BBraun Biotech Int.)
centrifuga Beckman, model J2-21
stolní chlazená centrifuga Eppendorf, model 5403
ultrazvukový desintegrátor Clevedon, model Microson XL2000
vysokoúčinný kapalinový chromatograf Dionex Summit
automatický titrátor Radiometer (moduly ABU 80 + TTT 80 + PHM 82)
laboratorní termostat Techne, model Tempette TE-8D
ultrafiltrační cela Amicon, model 8050
vertikální elektroforéza Bio-Rad, model Miniprotean II
horizontální, vodou chlazená elektroforéza Bio-Rad, model 1415
ELISA reader Tecan, model Sunrise

Software

Enzfitter v. 1.03 pro MS-DOS (Biosoft, Cambridge, UK)

Ostatní materiál

dialyzační střeva různých průměrů (Hoechst)
chromatografická kolona (100 mm × 16 mm) naplněná gelem Fractogel COO⁻ (Merck)
chromatografická kolona (700 mm × 16 mm) naplněná gelem Superdex 200 (Amersham Biosciences)
ultrafiltrační membrány YM10 (Amicon)
fólie Gelfix pro polyakrylamidové gely (Serva)
PlusOne Repel-Silane ES (Amersham Biosciences)

3.2 Metody

3.2.1 Uchovávání a kultivace bakteriální kultury

Bakteriální kmen *Achromobacter* sp. CCM 4824 byl uchováván zmražený v konzervách při teplotě $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Konzervy byly připraveny zamražením směsi buněčné kultury z exponenciální fáze růstu na kompletním médiu (2% LB medium) a 40% (w/v) glycerolu v poměru 1:1.

Jednorázová kultivace v míchaném bioreaktoru byla provedena trojstupňově. Nejprve byl ze zamražené konzervy zaočkován šikmý agar obsahující 2% LB médium. Poté byly z narostlého šikmého agaru zaočkovány 4 kultivační 500ml baňky obsahující 50 ml 2% LB média s $0,4\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ fenyloctové kyseliny (FOK). Baňky byly umístěny na orbitální třepačku a byly kultivovány při teplotě $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ a frekvenci třepání $200\text{ ot}\cdot\text{min}^{-1}$ po dobu přibližně 12 hod. Baňky s narostlými kulturami byly použity k inokulaci bioreaktoru.

Produkční kultivace byla provedena v laboratorním 10litrovém bioreaktoru Biostat MD v médiu (PM) obsahujícím:

yeast extract (OHL Y, DHW, Germany)	$10,0\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$
NaCl	$2,0\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$
KH_2PO_4	$1,0\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$0,2\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$
fenyloctová kyselina	$4,0\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$

Kultivace byla prováděna v pracovním objemu 8 litrů při teplotě $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 24 hodin. pH média bylo udržováno na hodnotě 7,6. Počáteční rychlost míchadla byla $300\text{ ot}\cdot\text{min}^{-1}$ a průtok vzduchu byl $4\text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$. Koncentrace rozpuštěného kyslíku (pO_2) byla udržována na hodnotě 15 % regulací frekvence míchání při konstantní aeraci. Během kultivace byly odebírány vzorky média na stanovení optické hustoty buněk (měřeno spektroskopicky při $\lambda = 600\text{ nm}$), sušiny, na stanovení aktivity PGA v biomase a stanovení zbytkové koncentrace fenyloctové kyseliny v médiu. Sušina byla stanovována gravimetricky sušením promyté suspenze buněk v termostatu nastaveném na teplotu $105\text{ }^{\circ}\text{C}$. Aktivita PGA byla stanovována na substrát penicilin G dle postupu v kap. 3.2.15. Koncentrace fenyloctové kyseliny byla stanovována pomocí HPLC dle postupu v kap. 3.2.16.

Po skončení kultivace byla biomasa oddělena z kultivačního média centrifugací při 5000×g. Odstředěná biomasa byla pro další zpracování uchována zamražením na teplotu -20 °C.

3.2.2 Desintegrace bakteriální biomasy

Rozmražená biomasa o obsahu sušiny přibližně 20 % byla 4× naředěna roztokem NaCl (0,1 mol·l⁻¹) na hodnotu sušiny přibližně 5 %. Výsledná suspenze byla za stálého chlazení v ledové lázni opakovaně desintegrovaná (5×1 min., 25 W na cca 30 ml suspenze) pomocí ultrazvukového desintegrátoru. Buněčný detrit byl odstraněn centrifugací (15000×g, 4 °C, 15 min.).

3.2.3 Srážení PGA pomocí síranu amonného

Nasyčený roztok síranu amonného byl připraven rozpuštěním za tepla 0,8 kg (NH₄)₂SO₄ v 1 l H₂O. Po úplném rozpuštění síranu byl roztok přefiltrován přes filtrační papír a ochlazen na teplotu 4 °C. Po ochlazení roztoku vykrytalizoval přebytek síranu na dně zásobní láhve. Výpočet objemu nasyceného roztoku (NH₄)₂SO₄ potřebného k úpravě 100 ml buněčného extraktu z hodnoty nasycení *X1* na požadovanou hodnotu nasycení *X2* byl proveden podle vzorce č. 3.1.

$$V^{X1 \rightarrow X2} = 100 \cdot (X2 - X1) / (1 - X2) \quad [\text{ml nasyceného síranu na 100 ml roztoku}] \quad (3.1)$$

Nasyčený roztok (NH₄)₂SO₄ (4 °C) byl za stálého míchání a chlazení postupně přikapáván k surovému extraktu z buněčné biomasy do celkového relativního nasycení 35 %. Vzniklá sraženina byla po 30 min. stání odstraněna centrifugací (15000×g, 4 °C, 15 min.). K odstředěnému roztoku byl za stálého míchání a chlazení postupně přikapáván další vychlazený nasycený roztok (NH₄)₂SO₄ do celkového relativního nasycení 55 %. Vzniklá sraženina, obsahující PGA, byla po 30 min. stání odstředěna (15000×g, 4 °C, 15 min.) a rozpuštěna ve 20 mmol·l⁻¹ fosfátovém pufru (pH 6,0).

3.2.4 První ionexová chromatografie na katexu *Fractogel COO*⁻

20ml chromatografická kolona (16×100 mm) obsahující *Fractogel COO*⁻ byla připojena k HPLC přístroji (Dionex Summit) a byla ekvilibrována 20 mmol·l⁻¹ fosfátovým pufrům (pH 6,0). Rozpuštěná sraženina obsahující PGA byla dialyzována přes noc proti 20 mmol·l⁻¹ fosfátovému pufru (pH 6,0, 4 °C). Dialyzovaný roztok obsahující celkové množství cca 300 mg proteinu byl nanesen na chromatografickou kolonu pomocí peristaltické pumpy. Poté byl spuštěn průtok mobilní fáze (20 mmol·l⁻¹ fosfátový pufr, pH 6,0) kolonou, dokud se nevymyly všechny nenavázané proteiny, tj. dokud neklesla absorbance eluátu měřená při $\lambda=280$ nm na úroveň promývacího pufru. Jednotlivé frakce byly z kolony eluovány lineárním gradientem KCl v rozmezí koncentrací 0-250 mmol·l⁻¹ ve 20 mmol·l⁻¹ fosfátovém pufru (pH 6,0). Celkový objem elučního pufru byl 240 ml (při průtoku 2 ml·min⁻¹), přičemž byly jímány 4ml frakce. Po skončení chromatografie byly všechny frakce otestovány na přítomnost PGA na mikrotitrační destičce (100 μ l 1 mmol·l⁻¹ substrátu NIPAB + 20 μ l vzorku). Aktivní frakce (žlutě zbarvené jamky na destičce) byly proměřeny na obsah proteinu a aktivitu enzymu.

3.2.5 Druhá ionexová chromatografie na katexu *Fractogel COO*⁻

Vybrané aktivní frakce z první ionexové chromatografie (pH 6,0) byly slity, celkový objem byl 4× naředěn H₂O a pH bylo pomocí 0,1 mol·l⁻¹ NaOH upraveno na hodnotu 7,0. Takto upravený roztok byl nanesen pomocí peristaltické pumpy na 20ml chromatografickou kolonu (16×100 mm) obsahující *Fractogel COO*⁻, která byla ekvilibrována 20 mmol·l⁻¹ fosfátovým pufrům (pH 7,0). Poté byl spuštěn průtok mobilní fáze (20 mmol·l⁻¹ fosfátový pufr, pH 7,0) kolonou, dokud se nevymyly všechny nenavázané proteiny. Jednotlivé frakce byly z kolony eluovány lineárním gradientem KCl v rozmezí koncentrací 0-140 mmol·l⁻¹ ve 20 mmol·l⁻¹ fosfátovém pufru (pH 7,0). Celkový objem elučního pufru byl 240 ml (při průtoku 2 ml·min⁻¹), přičemž byly jímány 4ml frakce. Po skončení chromatografie byly všechny frakce opět otestovány na přítomnost PGA (kap. 3.2.4) a aktivní frakce byly proměřeny na obsah proteinu a aktivitu enzymu.

3.2.6 Gelová filtrace na koloně Superdex 200

Vybrané aktivní frakce z druhé ionexové chromatografie při pH 7,0 byly slity a zahuštěny ultrafiltrací (Amicon, membrána YM10, cut-off 10 kDa) na objem přibližně 1 ml. Zahuštěný roztok PGA byl nanesen na kolonu Superdex 200 (16×700 mm), která byla ekvilibrována 300 ml mobilní fáze (50 mmol·l⁻¹ fosfátový pufr, 150 mmol·l⁻¹ NaCl, pH 7,0). Průtok mobilní fáze kolonou byl nastaven na 1 ml·min⁻¹, přičemž byly jímány 2ml frakce. Po skončení chromatografie byly opět všechny frakce otestovány na přítomnost PGA (kap. 3.2.4). Aktivní frakce byly proměřeny na obsah proteinu a aktivitu enzymu. Vybrané frakce vyčištěné PGA byly slity a znovu zahuštěny ultrafiltrací. Zahuštěný roztok PGA byl rozdělen na malé podíly, které byly zamrazeny na teplotu -70 °C pro další použití.

Gelová kolona byla také kalibrována standardy molekulových hmotností: ferritin (450 kDa), katalasa (232 kDa), aldolasa (158 kDa), hovězí sérový albumin (67 kDa), ovalbumin (43 kDa). Ze získaných retenčních objemů standardů a PGA byla vypočtena přibližná celková molekulová hmotnost nativní PGA.

3.2.7 Stanovení koncentrace proteinu

Koncentrace proteinu byla stanovována u všech aktivních frakcích při každém purifikačním kroku. Pro stanovení koncentrace byl používán BCA Protein Assay Reagent Kit. Stanovení bylo prováděno dle návodu výrobce. Metoda byla kalibrována pomocí standardního roztoku BSA dodávaného s kitem v rozsahu koncentrací 0-2 mg·ml⁻¹. Princip této metody stanovení proteinů spočívá v redukci iontů Cu²⁺ pomocí peptidových vazeb v alkalickém prostředí (Biuretova reakce). Vzniklý ion Cu¹⁺ tvoří barevný komplex se dvěma molekulami BCA (bicinchonic acid), jehož absorbance je měřena spektrofotometrem při λ=562 nm.

3.2.8 Stanovení aktivity PGA pomocí umělého substrátu NIPAB

Stanovení aktivity PGA pomocí chromogenního substrátu 6-nitro-3-fenylacetylamidobenzoové kyseliny (NIPAB, Alkema et al. 1999) bylo používáno díky své jednoduchosti a rychlosti pro rutinní stanovení aktivit PGA během všech purifikačních kroků. PGA rozpozná na molekule NIPAB stejně jako na molekule penicilinu G fenylacetylovou skupinu, kterou hydrolyticky odštěpí. Hydrolýzou molekuly NIPAB vznikne fenylactová kyselina a barevný produkt 5-amino-2-nitrobenzoová kyselina, jež je detekována

spektrofotometricky při $\lambda=405$ nm ($\epsilon^{405}=9,09$ mM⁻¹cm⁻¹). Hodnota ϵ^{405} pro 5-amino-2-nitrobenzoovou kyselinu je stabilní v rozsahu pH 4-11. Jedna jednotka (1 U) enzymové aktivity PGA je definována jako množství enzymu, které hydrolyticky rozštěpí 1 μ mol substrátu za minutu. Měření probíhalo na dvoupaprskovém spektrofotometru Shimadzu UV-1601, který byl vybaven temperací měřících kyvet. Chromogenní substrát NIPAB o koncentraci 1 mmol·l⁻¹ ve 100 mmol·l⁻¹ fosfátovém pufru (pH 7,5) byl vytemperován na teplotu 37 °C přímo ve spektrofotometru v 1cm kyvetě. Po 3 minutách temperace byl do kyvety připipetován měřený vzorek, který svým objemem nepřesahoval 5 % objemu substrátu. Kyveta byla shora uzavřena a promíchána několikanásobným převrácením. Poté byla kyveta co nejrychleji vrácena do spektrofotometru a bylo provedeno kinetické měření při $\lambda=405$ nm po dobu 3 minut. Po skončení měření spektrofotometr vypočítal směrnicí ΔA^{405} . Enzymová aktivita byla počítána podle vzorce č. 3.2, kde ředění znamená ředění vzorku substrátem v kyvetě.

$$\text{aktivita} = \Delta A^{405} / 9,09 \cdot \text{ředění} \quad [\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}] \quad (3.2)$$

3.2.9 SDS-PAGE elektroforéza

Čistota purifikovaného enzymu a velikost podjednotek enzymu byla v průběhu purifikace kontrolována pomocí SDS elektroforézy v 12% polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE) (Laemmli et al. 1970). Zařízení Miniprotean II (Bio-Rad) bylo použito dle návodu výrobce. Mezi skla byl nejprve nalit 12% isokratický separační gel (viz dále) a převrstven H₂O. Po zpolymerování separačního gelu byla H₂O odstraněna a vzniklý prostor byl vyplněn 5% zaostřovacím gelem, do kterého byly umístěny hřebeny tvarující jamky. Po zpolymerování zaostřovacího gelu byly hřebeny vyjmuty a vzniklé jamky byly propláchnuty pomocí H₂O. Poté byly gely umístěny do elektroforetické vany a elektrodové prostory byly vyplněny elektrodovým pufrem. Bílkovinné vzorky z jednotlivých stádií purifikace byly smíchány s redukujícím vzorkovacím pufrem v poměru: 4 díly vzorku + 1 díl vzorkovacího pufru (5× koncentrovaný). Poté byly vzorky krátce povařeny a po zchladnutí nanášeny do jamek gelu. Do krajní jamky byl nanášen standard molekulových hmotností (Perfect ProteinTM Markers 10-225 kDa) pro odhad hmotností jednotlivých složek. Elektroforéza probíhala při napětí 100 V, dokud bromfenolová modř ze vzorkovacího pufru nedosáhla spodního okraje separačního gelu. Poté byla elektroforéza zastavena, gely byly vyjmuty z prostoru mezi skly a umístěny do barvicího roztoku. Po asi 20 minutách barvení za pomalého míchání byly gely

přemístěny do odbarvovacího roztoku. Odbarvovací roztok byl několikrát vyměněn. Po odbarvení byly gely usušeny v rámečku mezi dvěma celofánovými foliemi.

Příprava 12% separačního gelu (10 ml):

H ₂ O	3,3 ml
30% (w/v) akrylamid (29% akrylamid + 1% bis-akrylamid)	4,0 ml
1,5 mol·l ⁻¹ pufr TRIS-HCl (pH 8,8)	2,5 ml
10% (w/v) SDS	0,1 ml
10% (w/v) persíran amonný	0,1 ml
TEMED	4 µl

Příprava 5% zaostřovacího gelu (4 ml):

H ₂ O	2,7 ml
30% (w/v) akrylamid (29% akrylamid + 1% bis-akrylamid)	0,67 ml
1,0 mol·l ⁻¹ pufr TRIS-HCl (pH 6,8)	0,5 ml
10% (w/v) SDS	40 µl
10% (w/v) persíran amonný	40 µl
TEMED	4 µl

Složení 5× koncentrovaného vzorkovacího pufru:

5% (w/v) SDS, 25% (v/v) merkptoethanol, 50% (w/v) glycerol, 0,1% (w/v) bromfenolová modř, 50 mmol·l⁻¹ TRIS-HCl (pH 6,8)

Elektrodový pufr:

25 mmol·l⁻¹ TRIS, 192 mmol·l⁻¹ glycin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,3

Barvicí roztok:

0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250, 45% (v/v) methanol, 10% (v/v) kyselina octová

Odbarvovací roztok:

25% (v/v) methanol, 10% (v/v) kyselina octová

3.2.10 Izoelektrická fokusace

Izoelektrická fokusace (Låås 1998) byla modifikována a byla použita pro určení izoelektrického bodu enzymu. Gel o velikosti cca 4×7,5 cm byl připraven v nalévacím stojánku zařízení Miniprotean II (Bio-Rad). Na větší sklo byla za mokra umístěna podpůrná fólie Gel-Fix tak, aby přesně lícovala se spodním okrajem skla. Druhé, menší sklo bylo ošetřeno přípravkem PlusOne Repel-Silane ES pro snazší oddělení skla od gelu. Roztok pro přípravu 6% gelu pro IEF (viz níže) byl po namíchání důkladně odvzdušněn, poté byl přidán persíran a TEMED, nalit mezi skla a převrstven petrolejem. Po zpolymerování byl gel vyjmut ze skel a zastříhnut tak, aby na podélných stranách lícovál s podpůrnou fólií. Takto upravený gel byl umístěn na horizontální vodou chlazenou elektroforézu Bio-Rad, přičemž mezi elektroforézou a podpůrnou fólií byla dána kapka petroleje pro lepší přenos tepla. Do katodového prostoru byl nalit roztok 1 mol·l⁻¹ NaOH a do anodového prostoru byl nalit roztok 1 mol·l⁻¹ H₃PO₄. Gel byl z obou stran spojen s elektrodovými prostory pomocí pruhů filtračního papíru namočených v elektrodových pufrech. Celý vnitřek zařízení byl pomalu proplachován dusíkem, aby se zabránilo kontaktu CO₂ s povrchem gelu v průběhu fokusace. Před nanesením vzorků byl aparát připojen ke zdroji napětí (20 min., 400 V), aby amfolyty přítomné v gelu vytvořily gradient pH v rozsahu hodnot přibližně 3-10. Poté bylo zařízení krátce otevřeno a přibližně uprostřed gelu byly vedle sebe umístěny malé kousky filtračního papíru (cca 5×5 mm) pro nanesení vzorků a standardu pI (IEF Markers 3-10). Po nanesení vzorků bylo napětí postupně zvyšováno dle následujícího programu: 20 min. – 350 V, 60 min. – 1125 V, 30 min. – 1500 V. Po skončení fokusace byl gel fixován 20 min. ve 20% (w/v) trichloroctové kyselině, 3× promýván po 30 min. v odbarvovacím roztoku (složení viz kap. 3.2.9) a dále barven a odbarvován jako v případě SDS-PAGE (kap. 3.2.9).

Příprava 6% gelu pro IEF (6,7 ml):

H ₂ O	4,4 ml
30% (w/v) akrylamid (29% akrylamid + 1% bis-akrylamid)	1,33 ml
Pharmalyte 3-10	0,33 ml
glycerol	0,67 g

důkladně odvzdušněno a dále přidáno:

10% (w/v) persíran amonný	20 µl
TEMED	4 µl

3.2.11 Nativní-PAGE elektroforéza v kyselém prostředí

Kromě SDS-PAGE elektroforézy byla čistota enzymového roztoku ověřována i nativní elektroforézou v polyakrylamidovém gelu. Jelikož izoelektrický bod purifikovaného enzymu leží kolem pI 8,2, byl zvolen systém obsahující kyselý separační pufr (pH 4,3) umožňující separovat bazické proteiny (Reisfeld et al. 1962). Nativní elektroforéza byla provedena podobně jako SDS-PAGE (kap. 3.2.9) s tím rozdílem, že pufrы měly jiné složení, vzorek nebyl denaturován a polarita elektrod byla opačná. Separační gel obsahoval místo persíranu riboflavin, proto byla polymerace zahájena intenzivním osvětlením UV lampou.

Příprava 7,5% separačního gelu (10 ml):

H ₂ O	4,94ml
30% (w/v) akrylamid (29% akrylamid + 1% bis-akrylamid)	2,5ml
1,5 mol·l ⁻¹ acetátový pufr (pH 4,3)	2,5ml
riboflavin (4 mg·ml ⁻¹ H ₂ O)	40μl
TEMED	16μl

Příprava 5% zaostřovacího gelu (3 ml):

H ₂ O	2,1ml
30% (w/v) akrylamid (29% akrylamid + 1% bis-akrylamid)	0,5ml
0,5 mol·l ⁻¹ acetátový pufr (pH 6,8)	0,38ml
10% (w/v) persíran amonný	30μl
TEMED	5μl

Složení 5× koncentrovaného vzorkovacího pufru:

50% (w/v) glycerol, 0,5 mol·l⁻¹ acetátový pufr (pH 6,8)

Elektrodový pufr:

31,2 g·l⁻¹ β-alaninu, upraveno pomocí kyseliny octové na pH 4,5

3.2.12 Stanovení molekulové hmotnosti enzymu metodou hmotnostní spektrometrie

MALDI-TOF

Přesné molekulové hmotnosti podjednotek enzymu PGA byly stanoveny pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionisation reflectron time-of-flight) na přístroji BIFLEX (Bruker-Frazer, Germany). Měření bylo provedeno v Laboratoři charakterizace molekulární struktury v MBÚ AVČR, kam byl předán roztok PGA po důkladné dialýze proti 1% kyselině octové (dialyzační roztok byl 5× vyměněn). Hmotnostní spektrometr byl předem kalibrován na $[M+H]^+$, $[M+2H]^{2+}$ a $[2M+H]^+$ ionty proteinu lysozymu (Sigma).

3.2.13 Stanovení interní aminokyselinové sekvence

Interní aminokyselinové sekvence z podjednotky α i β byly získány hmotnostním spektrometrem s iontovou pastí LCQ^{DECA} (Termo-Quest, USA) vybaveným nanoelektrosprayovým zdrojem iontů. Veškeré měření a interpretace dat byla prováděna v Laboratoři charakterizace molekulární struktury v MBÚ AVČR. Proteinové vzorky byly získány vyříznutím malého kousku gelu po rozdělení podjednotek SDS-PAGE elektroforézou. Gel obsahující analyzovaný protein byl rozpuštěn a protein byl štípan trypsinem (sequencing grade, Sigma). Vzorky trypsinových štěpů byly analyzovány a získaná data byla interpretována manuálně.

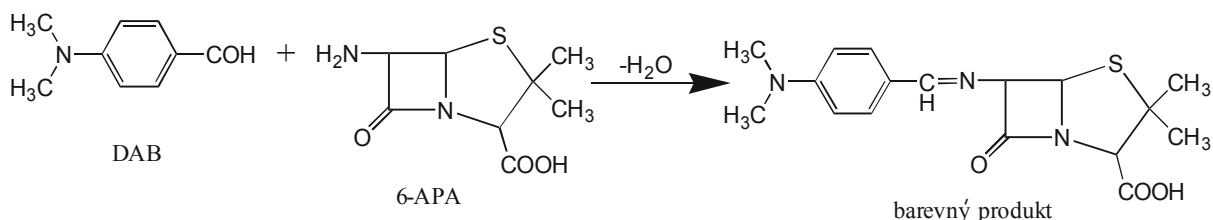
3.2.14 Stanovení N-koncové aminokyselinové sekvence Edmanovým štěpením

K určení N-koncových aminokyselinových sekvencí bylo nejprve potřeba rozdělit molekuly PGA na podjednotky α a β za denaturačních podmínek. K roztoku purifikované PGA byla přidána močovina na výslednou koncentraci $8,8 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a roztok byl inkubován přes noc za laboratorní teploty. Roztok byl následně zahuštěn ultrafiltrací (Amicon, membrána YM10, cut-off 10 kDa) na objem přibližně 1 ml. Zahuštěný roztok denaturované PGA byl nanesen na kolonu Superdex 200 (16×700 mm), která byla ekvilibrována 300 ml mobilní fáze ($50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfátový pufr, $8,8 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ močovina, pH 7,0). Průtok mobilní fáze kolonou byl nastaven na $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, přičemž byly jímány 2ml frakce. Vybrané frakce obsahující α a β podjednotky byly odděleně spojeny, zahuštěny pomocí ultrafiltrace, dialyzovány proti 1% kyselině octové a lyofilizovány. Takto připravené vzorky α a β -podjednotek byly předány

do Laboratoře architektury proteinů v MBÚ AVČR, kde probíhalo sekvenování. Vzorčky byly rozpuštěny pomocí roztoku 0,1% (w/v) trifluoroctové kyseliny v 10% (v/v) acetonitrilu a byly naneseny na membránu Protein Support (Beckman). Membrána s analyzovaným proteinem byla umístěna do reakčního zásobníku přístroje Protein Sequencer LF3600D (Beckman) a protein byl podroben automatické Edmanově degradaci.

3.2.15 Stanovení substrátové specifity enzymu

Hydrolytická aktivita enzymu PGA byla testována s použitím vybraných přírodních a semisyntetických substrátů: penicilin G, penicilin V, cefalosporin C, deacetoxycefalosporin G, deacetoxycefalosporin V, ampicilin, amoxicilin a cefalexin. Princip stanovení spočívá v kolorimetrické detekci produktů: 6-aminopenicilanové kyseliny (6-APA), 7-aminocefalosporanové kyseliny (7-ACA), 7-aminodeacetoxycefalosporanové kyseliny (7-ADCA), které vznikají enzymovou hydrolyzou substrátů pomocí PGA (Balasingham et al. 1972). Tyto hydrolytické produkty substrátů reagují s *p*-dimethylaminobenzaldehydem (DAB) za vzniku žlutého produktu, jehož absorbance je přímo úměrná množství rozštěpeného substrátu (obr. 3.1).



Obr. 3.1: Schéma reakce 6-APA s *p*-dimethylaminobenzaldehydem

Enzymová hydrolyza různých substrátů o koncentraci 0,5 % (w/v) v 0,1 mol·l⁻¹ fosfátovém pufru (pH 7,5) probíhala při teplotě 37 °C. Hydrolytická reakce byla zahájena přidávkem PGA (výsledná aktivita PGA v reakční směsi byla cca 0,5 U·ml⁻¹, měřeno se substrátem penicilin G). V pravidelných časových intervalech byly z reakční směsi odebírány vzorky (25 μl) do jamek mikrotitrační destičky se 150 μl stopovací směsi (2 díly 20% kyseliny octové + 1 díl 50 mmol·l⁻¹ NaOH). Po skončení všech odběrů byla chromogenní reakce vyvolána přidávkem 25 μl roztoku DAB (0,5 g *p*-dimethylaminobenzaldehydu ve 100 ml methanolu) do každé jamky. Po 15 min. inkubace za laboratorní teploty byla odečtena absorbance jamek pomocí ELISA readeru při λ=415 nm. Kolorimetrická metoda byla

kalibrována na β -laktamové produkty enzymové hydrolýzy testovaných substrátů (6-APA, 7-ACA, 7-ADCA).

3.2.16 Stanovení koncentrace penicilinů a cefalosporinů na HPLC

Stanovení koncentrace penicilinů, cefalosporinů, prekurzorů a jejich hydrolytických produktů v reakčních směsích bylo prováděno pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) na reverzní fázi. Touto metodou byly sledovány průběhy hydrolytických nebo syntetických enzymových reakcí. Naměřené koncentrace sloužily taktéž k výpočtu enzymové aktivity.

Konfigurace přístroje

Kapalinový chromatograf Dionex Summit byl vybaven pumpou s kvarterním nízkotlakým gradientem, temperovaným bezztrátovým autosamplerem, temperovaným boxem pro kolony, diode-array detektorem a jímačem frakcí. Chromatografická data byla zpracována softwarem Chromeleon 6, který současně sloužil k ovládání přístroje. Dělení směsí bylo prováděno na koloně s reverzní fází LiChrospher[®] 100 RP-18 (Merck) s velikostí částic 5 μm . Velikost použité kolony byla 4 \times 125 mm. Před kolonou byla napojena malá ochranná předkolonka obsahující shodnou náplň. Příprava vzorku spočívala v jeho vhodném naředění do mobilní fáze a odstředění nerozpustných nečistot při 15000 \times g. HPLC analýzy probíhaly za těchto podmínek:

průtok mobilní fáze	$F = 0,75 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$
teplota kolony	$T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$
detekce při vlnové délce	$\lambda = 225 \text{ nm}$
objem nástřiku	$V = 10 \text{ } \mu\text{l}$

Složení mobilní fáze:

KH_2PO_4	0,26 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0,80 g
H_2O	500 ml
methanol	300 ml

Po rozpuštění solí byl pufr (pH 7,2 bez úpravy) přefiltrován přes celulosovou membránu (Millipore, 0.45 μm) a krátce odvzdušněn pomocí vodní vývěvy. Poté byl přidán methanol (HPLC grade). Důsledné odvzdušnění mobilní fáze nebylo nutné, neboť přístroj byl vybaven zabudovaným odvzdušňovačem.

Koncentrace jednotlivých složek reakční směsi byly počítány z ploch odpovídajících píků podle vzorce č. 3.3,

$$c = S \cdot d / k \quad (3.3)$$

kde c je koncentrace látky, S je plocha píku, d je zředovací faktor a k je přepočítávací koeficient. Přepočítávací koeficient k byl stanoven experimentálně pro každou sledovanou látku. Kalibrace byla provedena přístrojem automaticky tak, že do autosampleru byl umístěn standard o známé koncentraci, autosampler nanesl přesně různá množství vzorku a z velikosti píků byl automaticky spočítán přepočítávací koeficient.

3.2.17 Titrační stanovení počtu aktivních center enzymu

Stanovení počtu aktivních center purifikovaného enzymu bylo prováděno titrací inhibitorem fenylmethylsulfonyl fluoridem (PMSF), který je znám jako účinný inhibitor serinových proteas. Na základě podobnosti aktivních center serinových proteas a penicilin-G-acylas byla vypracována a publikována titrační metoda stanovení (Švedas et al. 1977). Princip metody spočívá v ireverzibilní vazbě PMSF na hydroxylovou skupinu serinu číslo 1 β -podjednotky, který se přímo účastní katalytické reakce. Pro titraci PGA byl připraven zásobní 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztok PMSF v 2-propanolu, který byl skladován při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu maximálně 1 týdne. Před titrací byl zásobní roztok PMSF 10000 \times naředěn do H_2O ($2\times$ stonásobné ředění) na 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ koncentraci. Roztok PGA o známé aktivitě (kolem 1 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$) ve fosfátovém pufru (50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfát, 150 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl, pH 7,0) byl rozpipetován po 100 μl do polypropylenových mikrozkupek. Následně bylo do každé mikrozkupekvy za intenzivního míchání přidáno 0-50 μl 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ titračního roztoku PMSF a výsledný objem v mikrozkupekve byl doplněn fosfátovým pufrem na objem 200 μl . Vzorky byly inkubovány za laboratorní teploty po dobu 20 min. a poté byla změřena zbytková aktivita PGA. Zbytková aktivita PGA byla vynesena do grafu v závislosti na přidaném látkovém množství PMSF. Proložení naměřených bodů bylo stanoveno látkové množství PMSF, při kterém zbytková

aktivita PGA právě klesla na nulovou hodnotu. Toto látkové množství PMSF se rovnalo množství aktivních center enzymu v mikrozkuhavce. Z hodnoty koncentrace aktivních center enzymu a známé aktivity enzymu byla počítána katalytická konstanta enzymu k_{cat} [s^{-1}] pro různé substráty, která vyjadřovala, kolik molekul substrátu rozštěpila jedna molekula enzymu za sekundu.

3.2.18 Stanovení kinetických parametrů hydrolytických reakcí

Měření kinetických parametrů PGA pro hydrolyzu různých substátů (penicilin G, penicilin V, deacetoxycefalosporin G, deacetoxycefalosporin V, ampicilin, amoxicilin a cefalexin) bylo kvůli možnosti srovnání s jinými publikovanými enzymy prováděno při teplotě 25 °C a v 0,1 mol·l⁻¹ fosfátovém pufru pH 7,5. Konstanty Michaelise-Mentenové (K_m) a limitní rychlosti (V_{lim}) hydrolytických reakcí pro jednotlivé substráty byly spočítány z počátečních enzymových rychlostí, měřených za různých koncentrací substrátu, pomocí počítačového programu Enzfitter a zároveň i pomocí dvojnásobného reciprokého výnosu podle Lineweaver-Burka. Program Enzfitter pracoval na principu postupných numerických aproximací kinetických parametrů (K_m , V_{lim}) tak, aby rovnice Michaelise-Mentenové (3.4) procházela naměřenými body s co nejmenší odchylkou. V rovnici č. 3.4 parametr $[S]$ představoval koncentraci substrátu a v představoval počáteční rychlost reakce.

$$v = \frac{V_{lim} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (3.4)$$

Dvojnásobný reciproký výnos podle Lineweaver-Burka (L-B výnos) byl také použit pro získání kinetických parametrů z naměřených dat bez použití programu Enzfitter. L-B výnos umožňoval získat kinetické parametry pomocí linearizované formy rovnice Michaelise-Mentenové (3.5).

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{lim}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{lim}} \quad (3.5)$$

Měření počátečních enzymových reakcí pomocí HPLC bylo prováděno následovně: 1 ml substrátu o koncentraci 1 μmol·l⁻¹ až 15 mmol·l⁻¹ v 0,1 mol·l⁻¹ fosfátovém pufru pH 7,5

v mikrozkuhavce byl vytemperován ve vodní lázni na 25 °C. Poté byl k substrátu připipetován enzym PGA (10 µl roztoku PGA o aktivitě přibližně 0,5 U·ml⁻¹). V pravidelných časových intervalech byly z reakční směsi odebírány 100µl vzorky do 100 µl stopovací směsi (0,5% roztok SDS v methanolu). Nakonec byly vzorky odstředěny a analyzovány pomocí HPLC na obsah reakčních složek (kap. 3.2.16). Z časové závislosti úbytku substrátu či přírůstku produktu byla spočítána rychlost enzymové reakce (U·ml⁻¹). Jedna jednotka (1 U) enzymové aktivity PGA byla definována jako množství enzymu, které hydrolyticky rozštěpilo 1 µmol substrátu za minutu za uvedených reakčních podmínek.

3.2.19 Modelové syntézy semisyntetických β-laktamových antibiotik

Modelové syntézy byly prováděny v malém bioreaktoru, který byl sestaven z dvouplášťové skleněné cely o objemu 10 ml, která byla temperována na požadovanou teplotu pomocí externí vodní lázně. pH směsi bylo automaticky korigováno pomocí automatického titrátoru Radiometer. Míchání reakční směsi bylo zajištěno svrchu pomocí stojanové míchačky s upnutým míchadlem. Před spuštěním syntézy byly reakční komponenty rozpuštěny v 5 ml 10 mmol·l⁻¹ fosfátového pufru přímo v bioreaktoru. Po vytemperování směsi na požadovanou teplotu a úpravě pH byla reakce zahájena přidáním enzymu. Množství přidaného enzymu se pohybovalo v rozmezí 0,1-12 U·ml⁻¹ reakční směsi a záleželo na vstupní koncentraci reaktantů. V pravidelných časových intervalech byly odebírány z reakční směsi 5µl vzorky, které byly rozpouštěny a naředěny do stopovací směsi (0,5% roztok SDS v methanolu). Vzorky byly odstředěny a průběžně analyzovány pomocí HPLC na obsah reakčních složek (kap. 3.2.16). Syntetická reakce byla ukončena poté, co koncentrace produktu dosáhla maxima a začala opět klesat.

4. Výsledky

4.1 Kultivace bakteriálního kmene *Achromobacter* sp. CCM 4824

Potřebné množství biomasy bakteriálního kmene *Achromobacter* sp. CCM 4824 bylo připraveno kultivací v 10litrovém bioreaktoru Biostat MD. Celkem bylo uskutečněno 5 kultivací. Následující údaje reprezentují ukázkovou kultivaci bakteriálního kmene *Achromobacter* sp. CCM 4824, jejímž cílem bylo získat maximum biomasy s vysokou specifickou aktivitou PGA. Tato metoda kultivace byla optimalizována v Laboratoři enzymových technologií v MBÚ AVČR a osvědčila se i pro jiné bakteriální kmeny produkující PGA (kap. 3.2.1)

Ze zmražené konzervy bakteriálního kmene *Achromobacter* sp. CCM 4824 byl zaočkován šikmý agar (pevná půda LB), ze kterého byly poté zaočkovány 4 inokulační baňky obsahující po 50 ml kompletního média (LB médium doplněné FOK). Baňky byly 12 hodin kultivovány na orbitální třepače při teplotě 28 °C. Bioreaktor, který obsahoval 8 l sterilního produkčního kultivačního média (PM), byl zaočkován 200 ml narostlého inokula ze 4 baněk. Během kultivace, která zpravidla trvala 24 hodin, byly udržovány tyto podmínky:

- teplota 28 °C
- pH 7,6
- pO₂ 15 %
- počáteční rychlost míchání 300 rpm
- průtok vzduchu 4 l·min⁻¹

Během kultivace byly každou hodinu odebrány vzorky na stanovení optické density suspenze, stanovení sušiny, stanovení aktivity PGA a koncentrace fenylactové kyseliny.

Na obr. 4.1 je znázorněn průběh koncentrace rozpuštěného kyslíku (pO₂), pH a otáček míchadla (rpm). Z průběhu kultivace je patrné, že saturační koncentrace rozpuštěného kyslíku klesala až na hodnotu 10 %. Poté byla hodnota pO₂ v médiu udržována na 15 % postupným zvyšováním rychlosti míchání (300 až 580 rpm). Hodnota pH byla automaticky udržována na hodnotě 7,6.

Na obr. 4.2 je uveden graf průběhu hodnot optické density suspenze buněk (OD) a zbytkové koncentrace fenyloctové kyseliny (FOK), která sloužila jako induktor exprese enzymu PGA. Koncentrace biomasy postupně stoupala až do 24. hodiny kultivace, kdy dosáhla maxima (OD = 16,5). Koncentrace induktoru (FOK), průběžně monitorovaná stanovením na HPLC, postupně klesala, neboť byla buňkami využívána také jako zdroj uhlíku a energie. V 17. a 21. hodině kultivace, kdy koncentrace FOK klesla na nulu, byla FOK opakovaně přidána do bioreaktoru (2×160 ml 20% roztoku FOK).

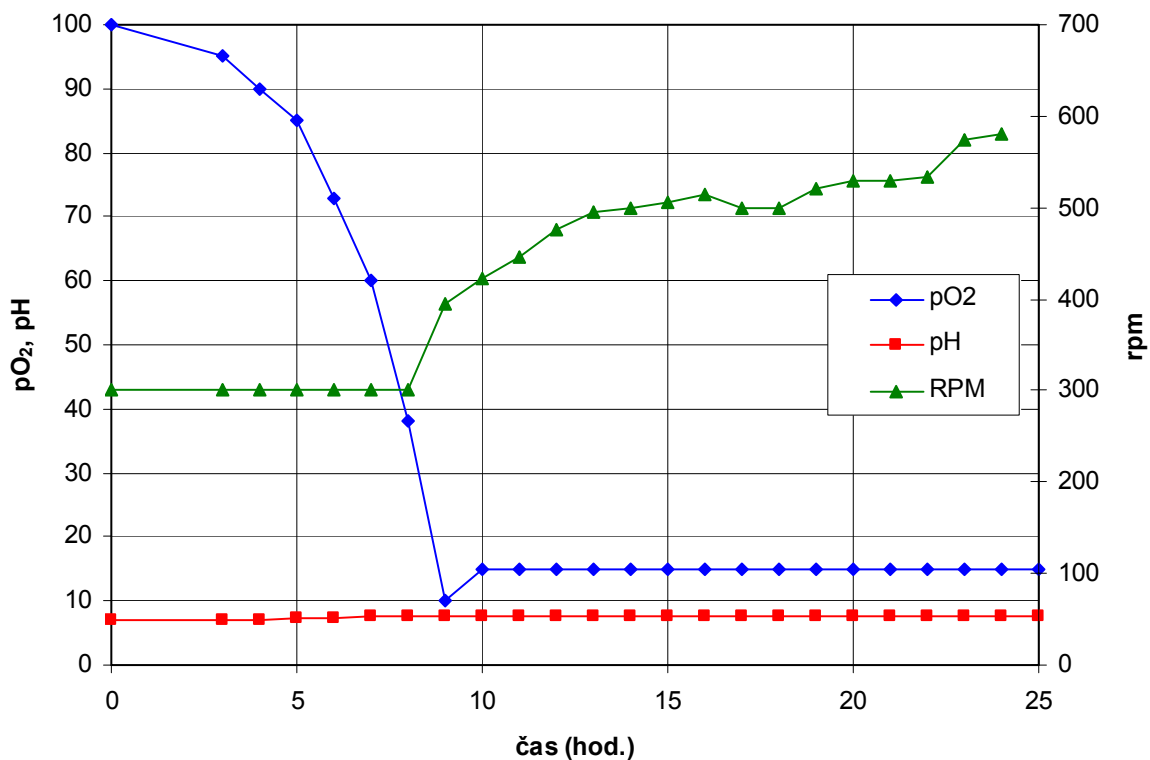
Na obr. 4.3 jsou uvedeny hodnoty naměřené sušiny a specifické aktivity PGA. Nejvyšší hodnoty sušiny bylo dosaženo v 25. hodině kultivace, kdy byla v odebraném vzorku stanovena hodnota sušiny 8,66 g·l⁻¹. Specifická aktivita PGA byla měřena se substrátem penicilin G po dezintegraci buněk ve vzorku. Naměřené hodnoty specifické aktivity jsou pouze orientační, neboť měření aktivity PGA v odebraných vzorcích bylo zatíženo velkou chybou způsobenou měřením nízkých aktivit v dezintegrované biomase.

Specifická růstová rychlost buněk (μ) byla vypočtena z průběhu exponenciální fáze růstu kultury. Na obr. 4.4 jsou vyneseny logaritmické hodnoty optické density suspenze buněk (lnOD) v čase. Hodnoty pro časový interval 3. – 11. hodina kultivace byly proloženy přímkou, přičemž byla spočítána její směrnice. Směrnice přímky je v tomto případě rovna specifické růstové rychlosti (μ), neboť platí vzorec 4.1.

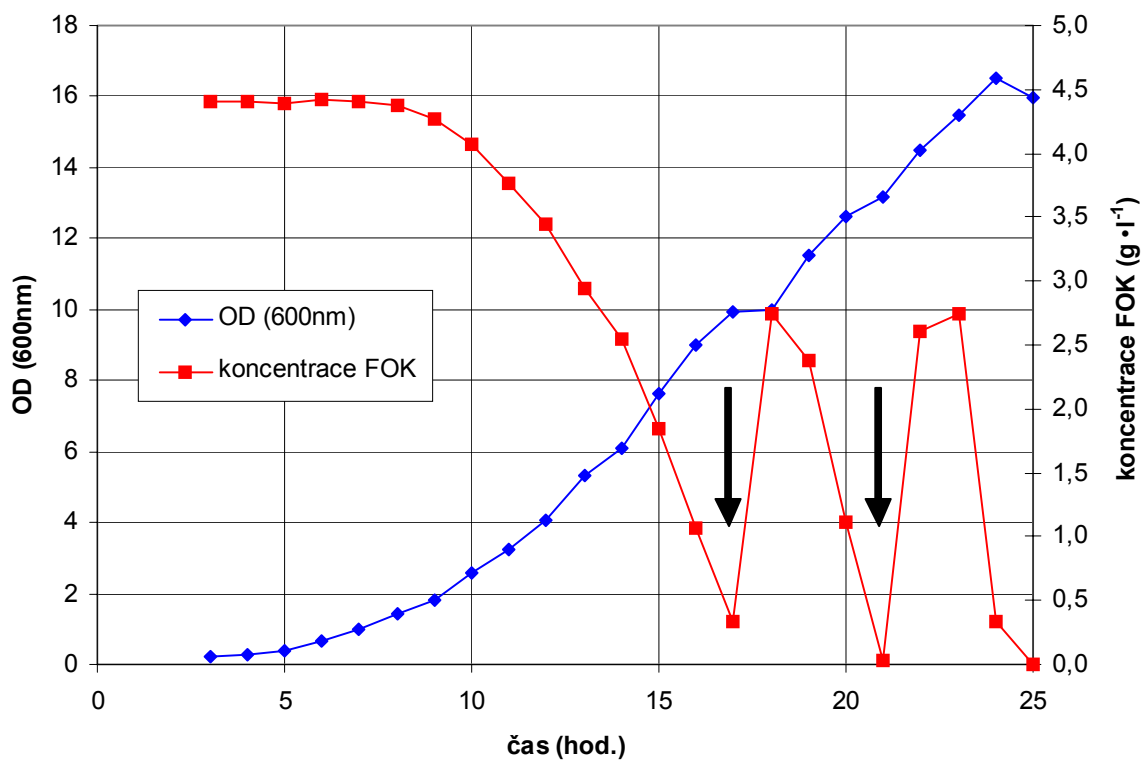
$$\mu = (\ln OD_n - \ln OD_0) / t_n \quad (4.1)$$

Specifická růstová rychlost kultury mikroorganismu *Achromobacter* sp. CCM 4824 v průběhu exponenciální fáze růstu byla: $\mu = 0,355 \text{ hod}^{-1}$.

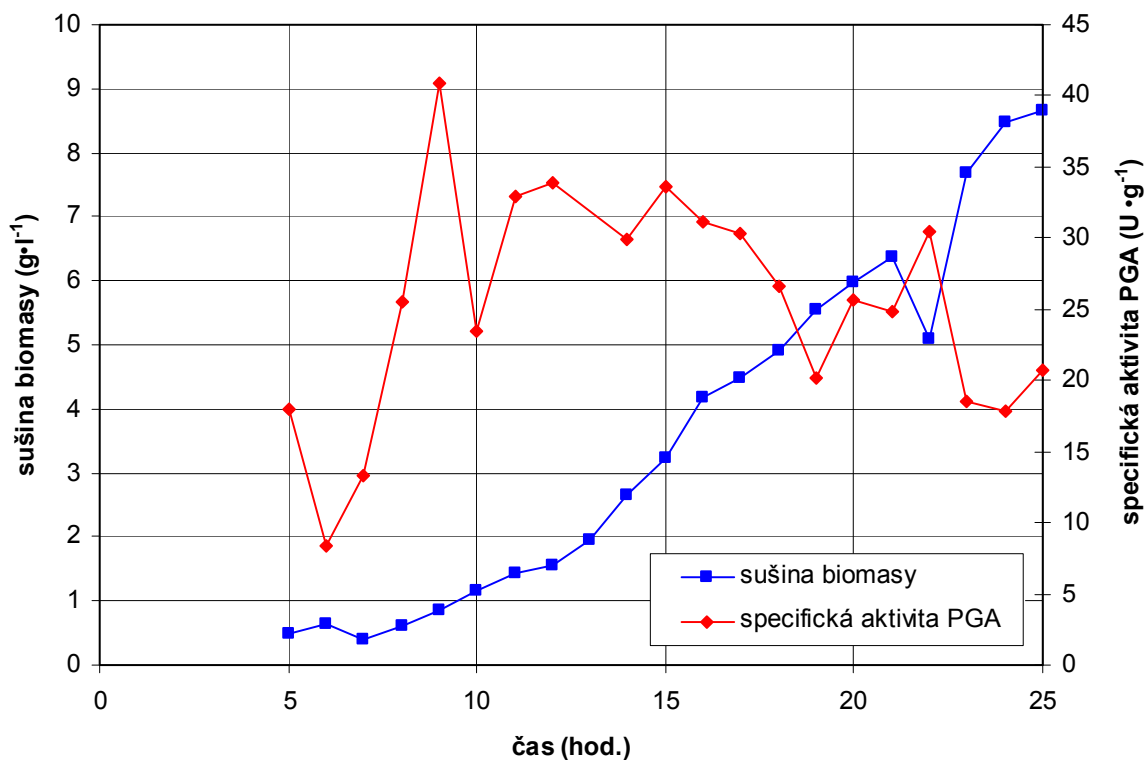
Z typické kultivace bylo celkem získáno 65 g suché hmoty biomasy o specifické aktivitě PGA 19 U·g⁻¹ sušiny. Odstředěná biomasa (sušina = 21 %) byla zamrazena a uchovávána při teplotě -20 °C pro další zpracování.



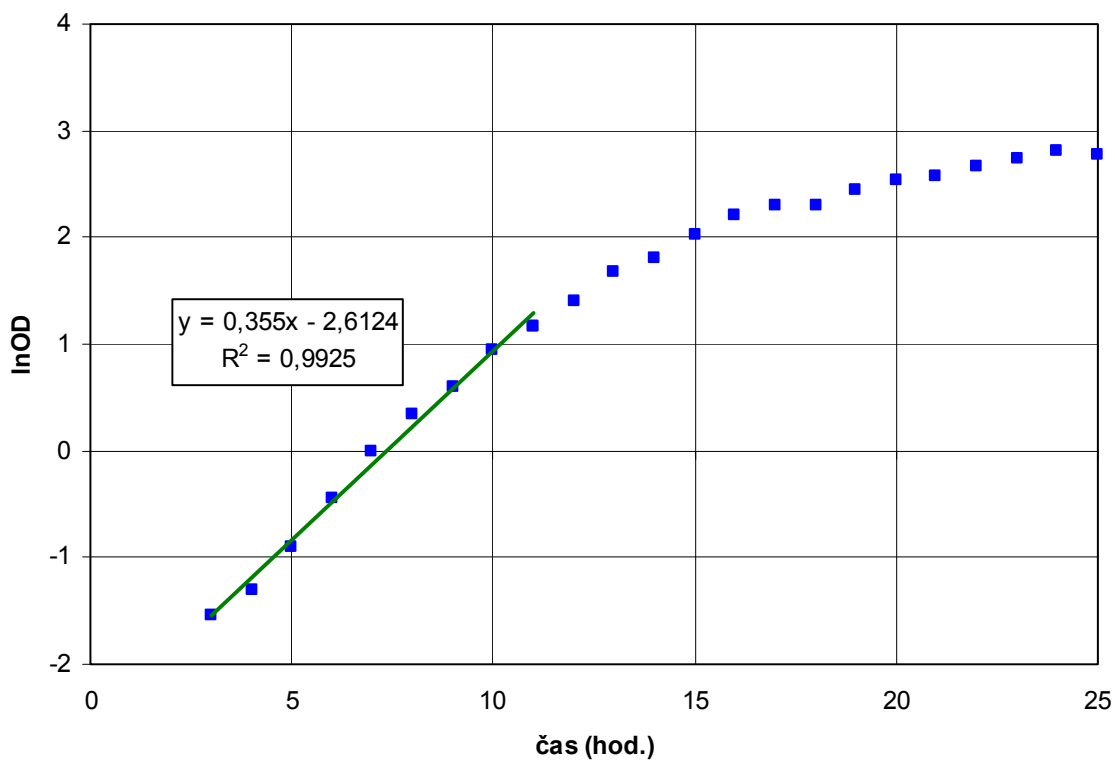
Obr. 4.1: Průběh hodnot pO₂, pH a rpm při kultivaci kmene *Achromobacter* sp. CCM 4824 v bioreaktoru.



Obr. 4.2: Průběh optické density buněk (OD) a koncentrace FOK při kultivaci kmene *Achromobacter* sp. CCM 4824 v bioreaktoru. Šipky označují dávku FOK.



Obr. 4.3: Průběh hodnot sušiny biomasy a specifické aktivity PGA při kultivaci kmene *Achromobacter* sp. CCM 4824 v bioreaktoru.



Obr. 4.4: Stanovení růstové rychlosti buněk v exponenciální fázi růstu semilogaritmičným vynesemím hodnot OD.

4.2 Izolace PGA z biomasy kmene *Achromobacter* sp. CCM 4824

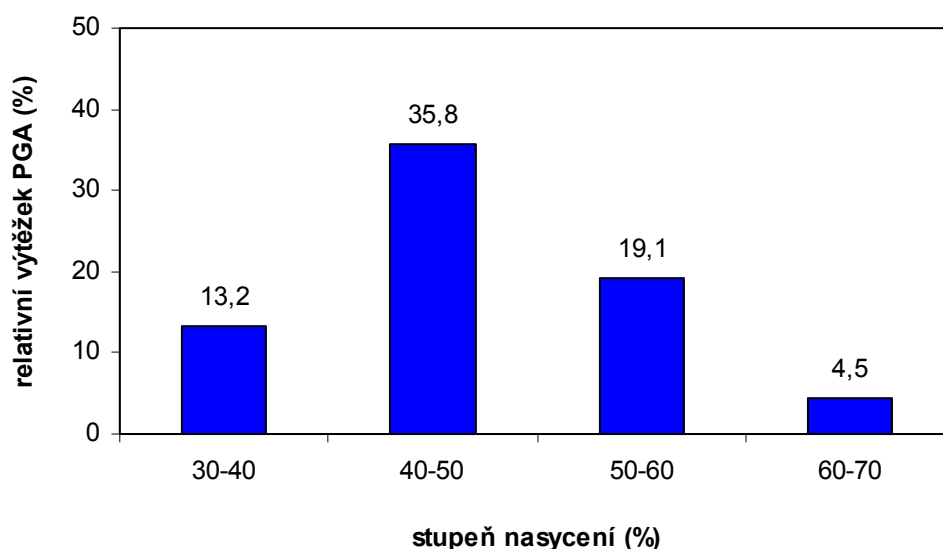
V průběhu doktorského studia byla postupně optimalizována metoda izolace periplasmatické penicilin G acylasy produkované kmenem *Achromobacter* sp. CCM 4824. Metoda se skládala z pěti hlavních purifikačních kroků. Následující výsledky reprezentují typickou izolaci PGA.

4.2.1 Desintegrace buněk (krok 1)

34 g zmražené buněčné biomasy (sušina 21 %) bylo rozmraženo a naředěno na obsah sušiny cca 5 %. Naředěná biomasa byla podrobena opakované desintegraci. Buněčný detrit byl odstraněn centrifugací a získaný extrakt (celkový objem 91,5 ml) byl okamžitě dále zpracováván. Tato a všechny následující operace byly prováděny za chladu a co nejrychleji, ve snaze co nejvíce eliminovat potenciální účinek proteolytických enzymů.

4.2.2 Srážení PGA pomocí síranu amonného (krok 2)

Z obr. 4.5 je patrné, že největší podíl PGA se srážel při relativním nasycení síranem amonným 40 – 50 %. Kvůli vyššímu výtěžku PGA byla standardně zpracovávána proteinová frakce v rozmezí 35 – 55 % relativního nasycení.



Obr. 4.5: Srážení PGA pomocí síranu amonného. Hodnota aktivity po desintegraci v bezbuněčném extraktu je rovna 100 %.

Postup byl takový, že chlazený enzymový extrakt byl nejprve nasycen síranem amonným na koncentraci 35% relativního nasycení. Na nasycení 91,5 ml extraktu bylo postupně přidáno (po kapkách) 49,3 ml nasyceného roztoku síranu amonného.

Sražené proteiny byly odstraněny centrifugací a v enzymovém extraktu byla dále zvýšena relativní koncentrace nasycení na 55 %. Na nasycení 139 ml extraktu o relativní koncentraci 35 % na koncentraci 55 % bylo postupně přidáno (po kapkách) 61,7 ml roztoku nasyceného síranu amonného.

Sraženina vzniklá při nasycení z 35 % na 55 % byla odstředěna, peleta byla rozpuštěna v 10 ml fosfátového pufru a byla přes noc dialyzována proti 20 mmol·l⁻¹ fosfátovému pufru (pH 6,0).

4.2.3 První ionexová chromatografie na katexu Fractogel COO⁻ (krok 3)

Dialyzovaná proteinová frakce (10 ml) získaná vysrážením enzymového extraktu pomocí síranu amonného v předchozím kroku byla rozdělena pomocí ionexové chromatografie (20ml chromatografická kolona obsahující Fractogel COO⁻). Startovní i eluční pufr měl hodnotu pH 6,0. Tato hodnota se ukázala jako ideální pro první ionexovou chromatografií, neboť pI izolovaného enzymu bylo 8,0-8,2, a tudíž bylo zajištěno účinné vyčytání enzymu ze směsi balastních bílkovin. Frakce, které byly eluovány z kolony pomocí gradientu koncentrace soli, byly otestovány na přítomnost aktivity PGA. V aktivních frakcích byla změřena aktivita PGA pomocí substrátu NIPAB a stanovena koncentrace proteinů. Záznam chromatografie je uveden na obr. 4.6 a bilance výtěžku aktivity je uvedena v tab. 4.1.

4.2.4 Druhá ionexová chromatografie na katexu Fractogel COO⁻ (krok 4)

Druhá ionexová chromatografie byla provedena na stejné koloně jako první ionexová chromatografie, ale změnou pH použitých pufrů z 6,0 na 7,0, tj. blíže k pI izolovaného enzymu, došlo k jemnějšímu dělení jednotlivých složek. Vybrané aktivní frakce (14 a 15) z první ionexové chromatografie (viz obr. 4.6) byly spojeny, naředěny 4× pomocí H₂O a pH bylo upraveno na 7,0. Upravená směs frakcí byla nanášena na kolonu. Po promytí kolony byly jednotlivé složky eluovány pomocí gradientu koncentrace soli. Všechny frakce byly otestovány na přítomnost aktivity PGA. V aktivních frakcích byla změřena aktivita PGA

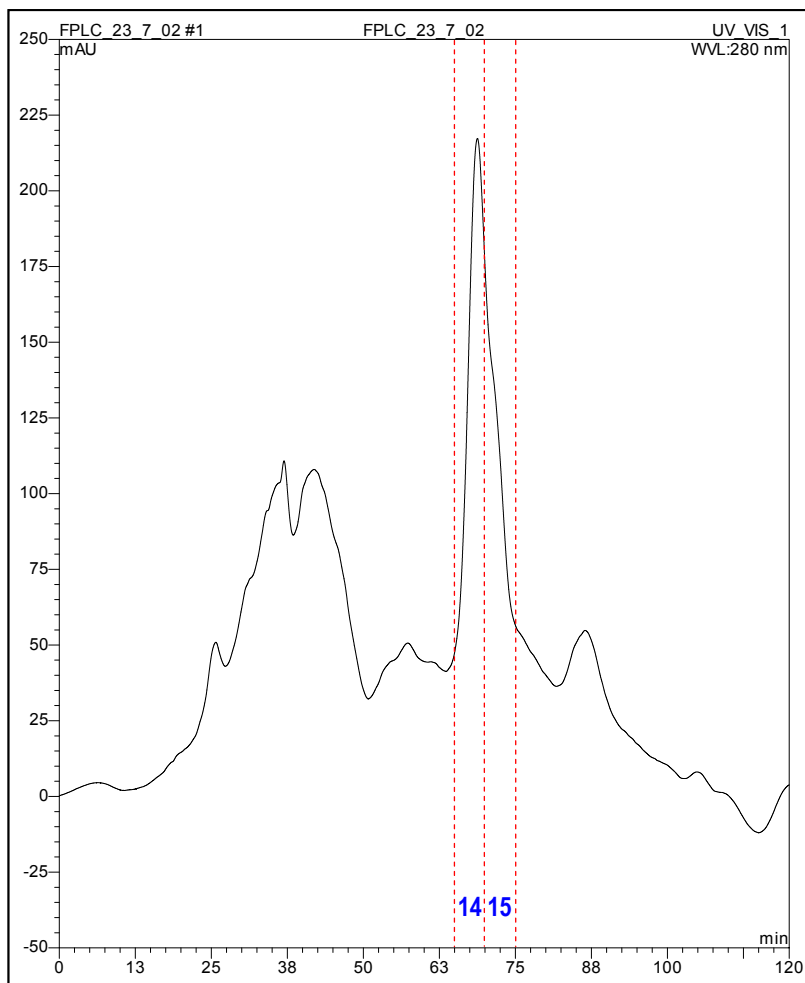
pomocí substrátu NIPAB a stanovena koncentrace proteinů. Záznam chromatografie je uveden na obr. 4.7 a bilance výtěžku aktivity je uvedena v tab. 4.2.

4.2.5 Gelová filtrace (krok 5)

Vybrané aktivní frakce (28-33) z druhé ionexové chromatografie (viz obr. 4.7) byly slity a zahuštěny pomocí ultrafiltračního zařízení na objem přibližně 1 ml. Zahuštěný roztok PGA byl nanesen na gelovou kolonu naplněnou nosičem Superdex 200, která byla předem ekvilibrována mobilní fází. Po skončení chromatografie byly všechny frakce otestovány na přítomnost aktivity PGA. V aktivních frakcích byla změřena aktivita PGA (substrát NIPAB) a koncentrace proteinů. Průběh gelové filtrace je uveden na obr. 4.8 a bilance aktivity je uvedena v tab. 4.3.

4.2.6 Uchování purifikované PGA

Vybrané frakce z gelové filtrace (49-52, viz obr. 4.8) obsahující purifikovanou PGA byly slity a zahuštěny na finální objem 1,2 ml (akt. $7,9 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$). Zahuštěný roztok PGA byl rozdělen na malé podíly, které byly zamraženy při teplotě $-70 \text{ }^{\circ}\text{C}$ pro další použití.



1. ionexová chromatografie

Kolona: Fractogel COO⁻ (16×100 mm)

Pufr A: 20 mmol·l⁻¹ fosfát (pH 6,0)

Pufr B: pufr A + 1 mol·l⁻¹ KCl (pH 6,0)

Průtok: 2 ml·min⁻¹

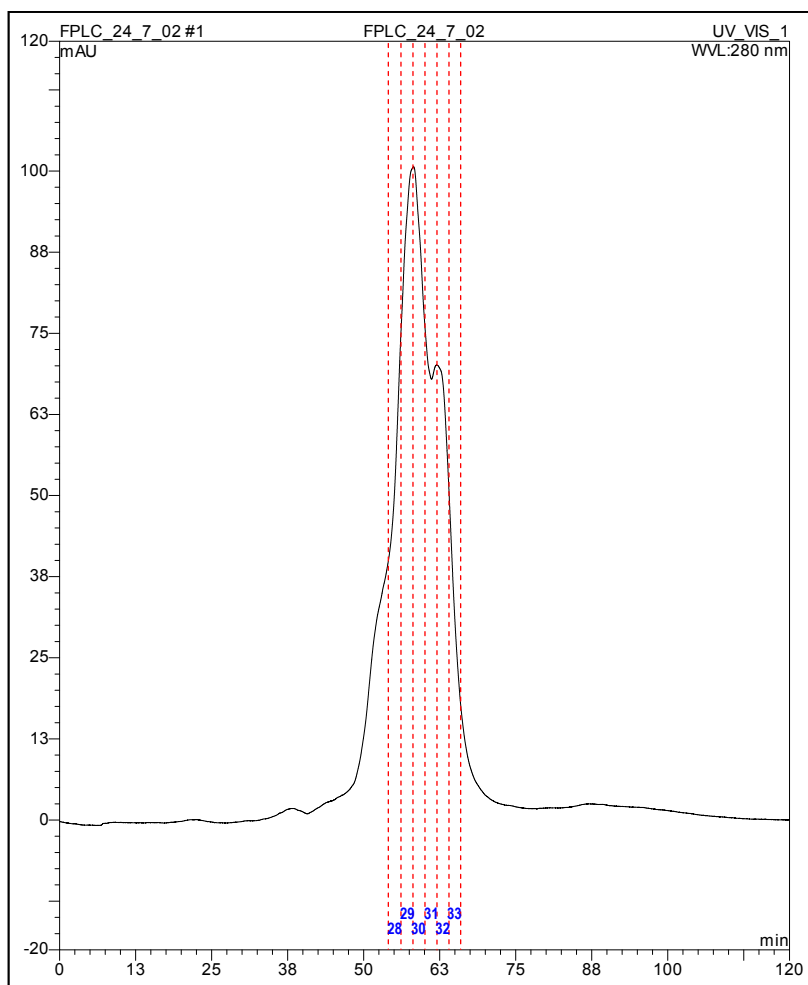
Gradient: A → 25 % B (ve 120 min.)

Frakce: 10 ml

Obr. 4.6: Záznam 1. ionexové chromatografie na katexu Fractogel COO⁻. Podmínky chromatografie jsou uvedeny v pravém horním rámečku. Frakce použité v dalším purifikačním kroku jsou vyznačené přerušovanými čarami.

Tabulka 4.1: Naměřené hodnoty aktivit PGA (A), koncentrace proteinů (c_{prot}) a specifických aktivit PGA (SA) v jednotlivých frakcích 1. ionexové chromatografie.

frakce	ret. čas (min.)	A (U·ml ⁻¹)	c_{prot} (mg·ml ⁻¹)	SA (U·mg ⁻¹ prot.)	objem (ml)	celk. prot. (mg)	celková A (U)	bilance A (%)
nástřik	-	3,70	3,733	0,99	11,5	42,93	42,55	100,0
propad	-	0,028	-	-	80	-	2,24	5,3
13	65	0,085	0,050	1,69	10	0,50	0,85	2,0
14	70	1,116	0,092	12,14	10	0,92	11,16	26,2
15	75	1,003	0,077	12,97	10	0,77	10,03	23,6
16	80	0,134	0,039	3,42	10	0,39	1,34	3,2
suma:						1,69	21,19	49,8



2. ionexová chromatografie

Kolona: Fractogel COO⁻ (16×100 mm)

Pufr A: 20 mmol·l⁻¹ fosfát (pH 7,0)

Pufr B: pufr A + 1 mol·l⁻¹ KCl (pH 7,0)

Průtok: 2 ml·min⁻¹

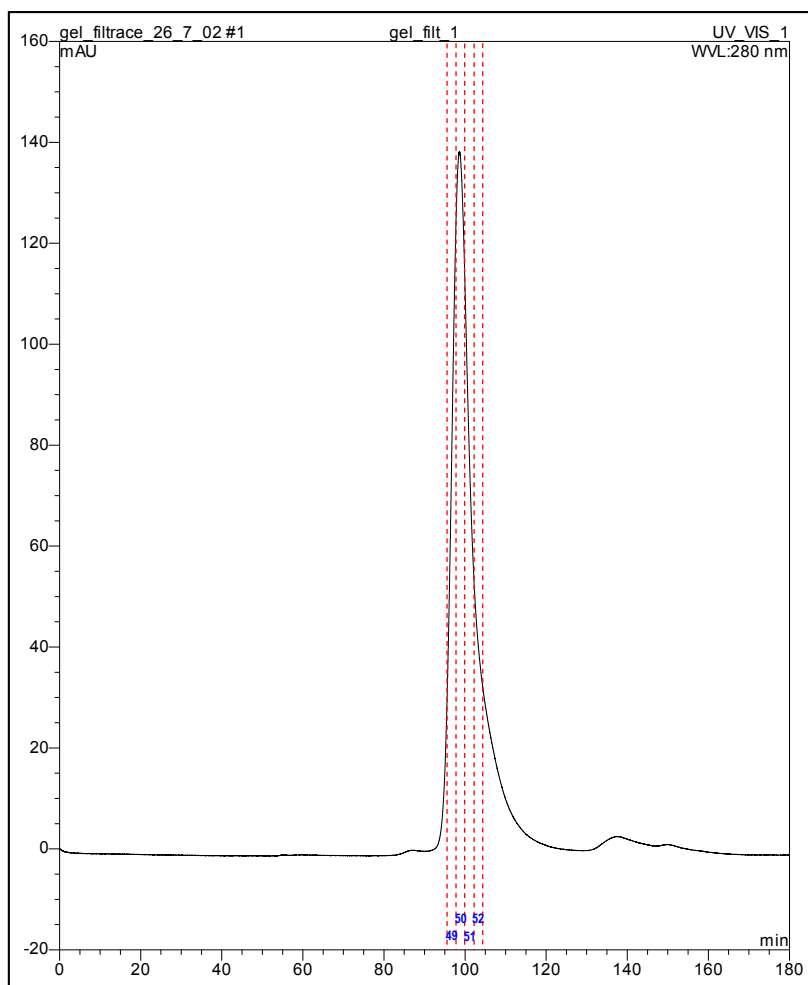
Gradient: A → 14.% B (ve 120 min.)

Frakce: 4 ml

Obr. 4.7: Záznam 2. ionexové chromatografie na katexu Fractogel COO⁻. Podmínky chromatografie jsou uvedeny v pravém horním rámečku. Frakce použité v dalším purifikačním kroku jsou vyznačené přerušovanými čarami.

Tabulka 4.2: Naměřené hodnoty aktivit PGA (A), koncentrace proteinů (c_{prot}) a specifických aktivit PGA (SA) v jednotlivých frakcích 2. ionexové chromatografie.

frakce	ret. čas (min.)	A (U·ml ⁻¹)	c_{prot} (mg·ml ⁻¹)	SA (U·mg ⁻¹ prot.)	objem (ml)	celk. prot. (mg)	celková A (U)	balance A (%)
nástřik	-	0,249	0,021	11,86	80	1,68	19,92	100,0
propad	-	0,000	-	-	135	-	-	-
27	54	0,162	0,030	5,33	4	0,12	0,65	3,3
28	56	0,572	0,025	23,15	4	0,10	2,29	11,5
29	58	1,127	0,036	31,57	4	0,14	4,51	22,6
30	60	1,169	0,036	32,63	4	0,14	4,68	23,5
31	62	0,822	0,027	30,65	4	0,11	3,29	16,5
32	64	0,735	0,027	27,28	4	0,11	2,94	14,8
33	66	0,319	0,010	31,57	4	0,04	1,28	6,4
34	68	0,144	0,026	5,65	4	0,10	0,58	2,9
suma:						0,64	18,98	95,3



Gelová filtrace

Kolona: Superdex 200 (16×780 mm)

Mobilní fáze: 50 mmol·l⁻¹ fosfát (pH 7,0)
+ 150 mmol·l⁻¹ KCl

Průtok: 1 ml·min⁻¹

Frakce: 2 ml

Obr. 4.8: Záznam gelové filtrace. Podmínky chromatografie jsou uvedeny v pravém horním rámečku. Frakce eluátu, které byly spojeny, jsou vyznačeny přerušovanými čarami.

Tabulka 4.3: Naměřené hodnoty aktivit PGA (A), koncentrace proteinů (c_{prot}) a specifických aktivit PGA (SA) v jednotlivých frakcích gelové filtrace.

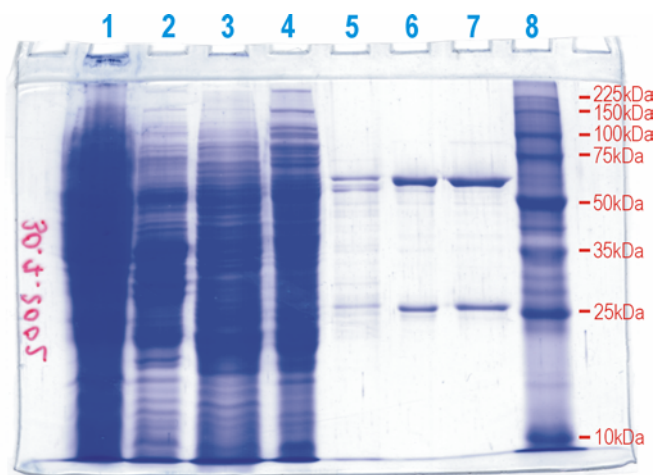
frakce	ret. čas (min.)	A (U·ml ⁻¹)	c_{prot} (mg·ml ⁻¹)	SA (U·mg ⁻¹ prot.)	objem (ml)	celk. prot. (mg)	celková A (U)	bilance A (%)
nástřík	-	21,51	0,738	29,15	0,8	0,59	17,20	100,0
48	96	0,091	0,005	18,55	2	0,01	0,18	1,1
49	98	0,962	0,033	29,20	2	0,07	1,92	11,2
50	100	1,941	0,062	31,06	2	0,12	3,88	22,6
51	102	1,610	0,051	31,42	2	0,10	3,22	18,7
52	104	0,993	0,033	29,96	2	0,07	1,99	11,5
53	106	0,353	0,020	17,63	2	0,04	0,71	4,1
54	108	0,155	0,011	14,57	2	0,02	0,31	1,8
55	110	0,108	0,008	14,37	2	0,02	0,22	1,3
suma:						0,36	11,01	64,0

Shrnutí výsledků purifikace

Ze 34 g zamražené bakteriální biomasy kmene *Achromobacter* sp. CCM 4824 bylo do zdánlivé homogenity vyčištěno celkem 9,5 mg PGA. Výsledná bilance všech purifikačních kroků je uvedena v purifikační tabulce (tab. 4.4). Průběh purifikace byl dokumentován analýzou jednotlivých kroků pomocí SDS-PAGE elektroforézy. (obr. 4.9).

Tabulka 4.4: Purifikační tabulka – celková bilance purifikace

purifikační krok	celková aktivita PGA (U)	celkové množ. proteinů (mg)	specifická aktivita PGA ($U \cdot mg^{-1}$ prot.)	výtěžek aktivity PGA (%)	stupeň přečištění
dezintegrovaná biomasa	105,3	1028	0,10	100	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitát	50,0	49,2	1,02	47	10
dialýza	42,6	42,9	0,99	40	10
1. ionex. chromatografie	21,2	1,69	12,5	20	125
2. ionex. chromatografie	19,0	0,64	29,7	18	297
gelová filtrace	11,0	0,36	30,6	10	306
finální zahuštění PGA	9,5	0,32	29,7	9	297



Obr. 4.9: SDS-PAGE elektroforéza jednotlivých purifikačních kroků. Popis drah je následující:

- 1 - hrubý buněčný extrakt po desintegraci a odstředění (neředěný)
- 2 - hrubý buněčný extrakt po desintegraci a odstředění (10x naředěný)
- 3 - po srážení síranem amonným
- 4 - proteinový extrakt po dialýze
- 5 - spojené aktivní frakce po první ionexové chromatografii
- 6 - spojené aktivní frakce po druhé ionexové chromatografii
- 7 - spojené aktivní frakce po gelové filtraci
- 8 - standard molekulových hmotností

4.3 Charakterizace PGA izolované z kmene *Achromobacter* sp. CCM 4824

4.3.1 Stanovení přibližné molekulové hmotnosti nativní PGA pomocí gelové filtrace

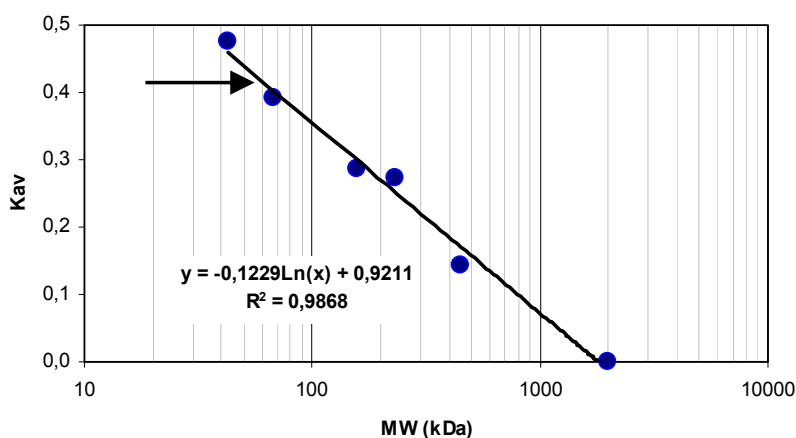
Gelová kolona, která byla používána pro závěrečný purifikační krok PGA, byla kalibrována pomocí standardů molekulových hmotností (tab. 4.5). Z elučních objemů (V_e) jednotlivých standardů (tab. 4.5) byly vypočteny distribuční koeficienty (K_{av}) dle rovnice 4.2, kde V_o je objem mobilní fáze mezi částicemi gelu a je roven elučnímu objemu pro blue dextran, V_t je celkový objem kolony.

$$K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o) \quad (4.2)$$

Vynesením K_{av} a MW do grafu (obr. 4.10) a proložením bodů byla získána logaritmická rovnice, ze které byla vypočtena přibližná molekulová hmotnost $MW = 61,4$ kDa nativního enzymu PGA. Vypočtená hodnota je pouze orientační, neboť eluční objem nezávisí jen na MW , ale i na tvaru molekuly a případně i na nežádoucí afinitě ke gelovému nosiči v koloně.

Tabulka 4.5: Eluční objemy (V_e) a vypočtené distribuční koeficienty (K_{av}) jednotlivých standardů a PGA.

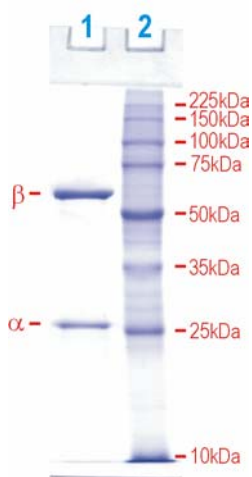
vzorek	MW (kDa)	V_e (ml)	K_{av}
ovalbumin	43	107,2	0,476
hovězí sérový albumin	67	99,2	0,393
aldolasa	158	88,9	0,287
katalasa	232	87,6	0,273
ferritin	450	75,0	0,143
blue dextran	2000	61,2	0,000
PGA	?	101,3	0,415



Obr. 4.10: Stanovení molekulové hmotnosti (MW) pomocí gelové filtrace, kde K_{av} je distribuční koeficient. Šipkou je vyznačen K_{av} odpovídající PGA.

4.3.2 Stanovení podjednotkového složení PGA pomocí SDS elektroforézy

Elektroforetickou analýzou purifikované PGA pomocí SDS-PAGE bylo zjištěno, že nativní enzym se skládá z nekovalentně vázaných podjednotek α a β o molekulových hmotnostech přibližně 26 a 60 kDa (obr. 4.11). Odhad hmotností podjednotek byl proveden vizuálně srovnáním se standardy. Jelikož přibližná molekulová hmotnost byla gelovou filtrací stanovena na 61 kDa, nativní enzym se s vysokou pravděpodobností skládá pouze ze dvou odlišných podjednotek α a β v poměru 1:1. Enzym je tedy heterodimerem.



Obr. 4.11: SDS-PAGE elektroforetická analýza purifikované PGA.

Popis drah je následující:

1 – PGA purifikovaná z kmene *Achromobacter sp. CCM 4824*

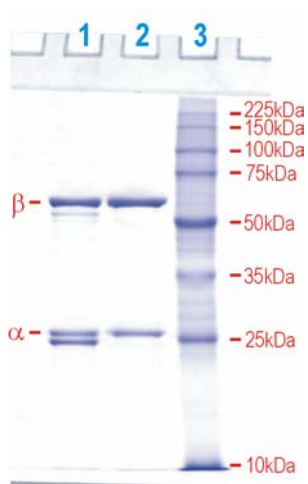
2 – standardy molekulových hmotností

4.3.3 Stanovení přesné hmotnosti podjednotek α a β pomocí MALDI-TOF

Vzorek purifikované PGA byl podroben hmotnostní spektrometrické analýze MALDI-TOF. Roztok PGA, který však byl použit pro analýzu, obsahoval příměs nečistoty (obr. 4.12). Analýzou bylo získáno spektrum obsahující tři hlavní složky M_1 , M_2 , M_3 ve dvou ionizovaných formách H^+ a $2H^{2+}$ (obr. 4.13).

$[M_1+H]^+$	25006 m.u.	$[M_1+2H]^{2+}$	12510 m.u.
$[M_2+H]^+$	27019 m.u.	$[M_2+2H]^{2+}$	13512 m.u.
$[M_3+H]^+$	62448 m.u.	$[M_3+2H]^{2+}$	31235 m.u.

Složka M_1 byla dle SDS-PAGE považována za nečistotu, její molekulová hmotnost byla 25005 Da. Složky M_2 a M_3 byly dle SDS-PAGE ztotožněny s podjednotkami enzymu PGA, α a β , o molekulových hmotnostech **27018 Da** a **62447 Da**. Celková molekulová hmotnost nativního enzymu PGA ($\alpha+\beta$) je tedy přibližně 89,5 kDa.



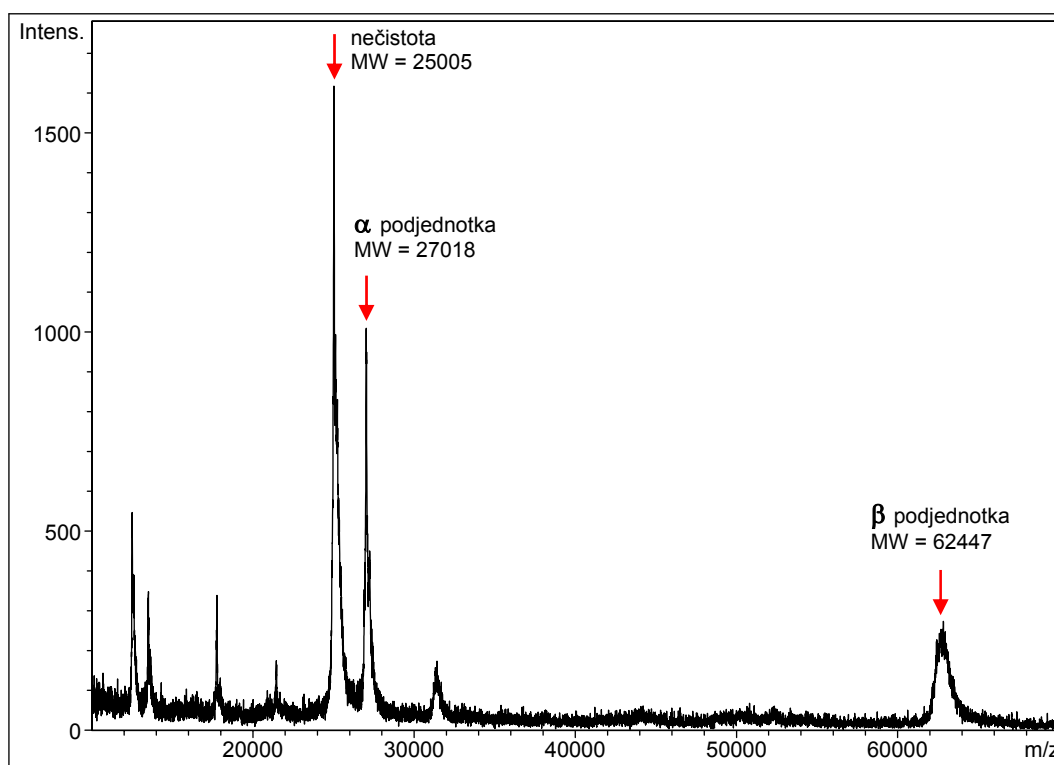
Obr. 4.12: SDS-PAGE elektroforetická analýza PGA.

Popis drah je následující:

1 – PGA použitá pro MALDI-TOF

2 – PGA purifikovaná do zdánlivé homogenity

3 – standardy molekulových hmotností

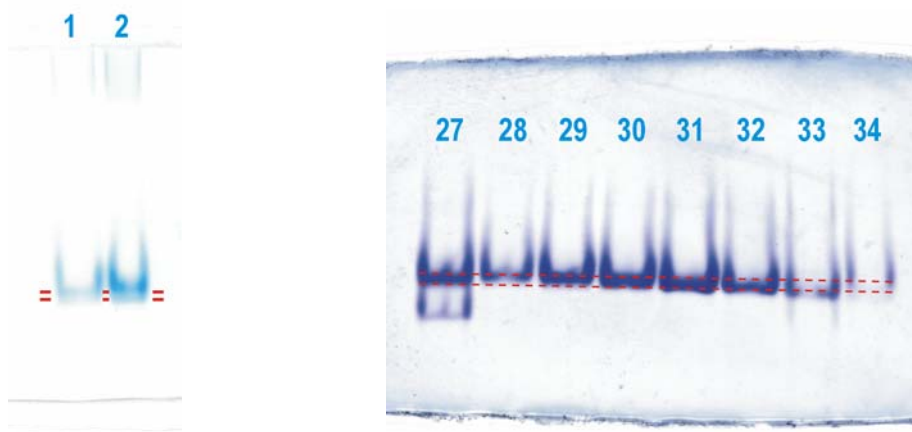


Obr. 4.13: Hmotnostní spektrum PGA analyzované pomocí MALDI-TOF

4.3.4 Nativní elektroforéza purifikované PGA

Elektroforetickou analýzou nativního purifikovaného enzymu PGA (viz kap. 4.2) byla ověřena jeho homogenita. Jelikož purifikovaný enzym byl bazický, pro separaci byl zvolen kyselý acetátový pufr o pH 4,3. Z obrázku nativní elektroforézy (obr. 4.14) bylo patrné, že

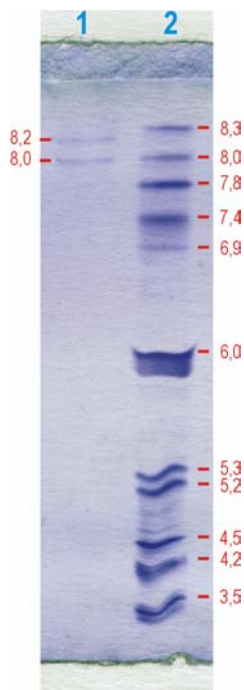
enzym nebyl zřejmě úplně homogenní, ale obsahoval přinejmenším dvě izoformy. Jistý náznak existence izoform byl shledán již v průběhu ionexové chromatografie, kde pík patřící PGA nebyl symetrický, ale evidentně obsahoval dvě složky (obr. 4.7), které nešly dále separovat gelovou filtrací ani SDS-PAGE. Byla proto provedena i nativní elektroforéza jednotlivých frakcí (27-34) z druhé ionexové chromatografie (viz kap. 4.2). Z obrázku nativní elektroforézy frakcí je patrné, že v hlavním píku přechází jedna izoforma PGA ve druhou.



Obr. 4.14: Nativní elektroforetická analýza PGA. Popis drah je následující:
 1 a 2 – purifikovaná PGA (dvě různá množství)
 27-34 – frakce 27 až 34 z druhé ionexové chromatografie na katexu Fractogel COO⁻

4.3.5 Izoelektrická fokusace purifikovaného enzymu PGA

Důkaz o existenci více izoform purifikovaného enzymu PGA byl proveden izoelektrickou fokusací. Zároveň byly stanoveny izoelektrické body (pI) izoform. Fokusace probíhala v gradientu pH v rozmezí přibližně 3-10, který se vytvořil v elektrickém poli za použití amfolytů Pharmalyte 3-10. Vzorek purifikovaného enzymu byl na gel nanesen spolu se standardy pI (IEF Markers 3-10). Po proběhnutí fokusace byl gel obarven a usušen (obr. 4.15). Hodnoty pI jednotlivých standardů byly identifikovány dle návodu ke standardům. Standardy s pI 9,5 a 10,7 nebyly na gelu rozpoznány, neboť zřejmě vlivem změny strmosti gradientu na alkalické straně gelu v průběhu dělení složky alkaličtější než pI 8,3 migrovaly z gelu do katodového roztoku. Tento jev je u neimobilizovaných pH gradientů, vytvořených pomocí komerčních amfolytů, dobře znám (Låås 1998). Purifikovaný enzym PGA utvořil na gelu dva proužky odpovídající izoelektrickým bodům přibližně 8,0 a 8,2.



Obr. 4.15: Izoelektrická fokusace purifikovaného enzymu PGA.

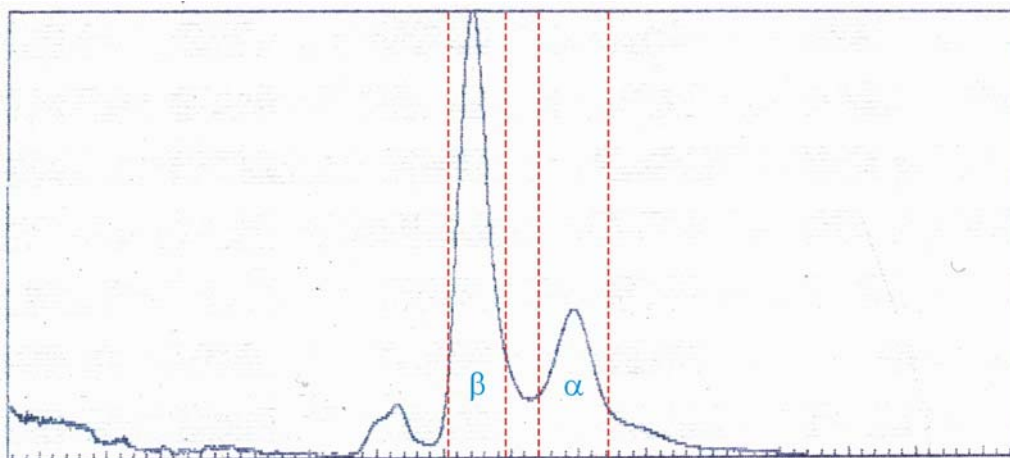
Popis drah je následující:

1 – purifikovaná PGA

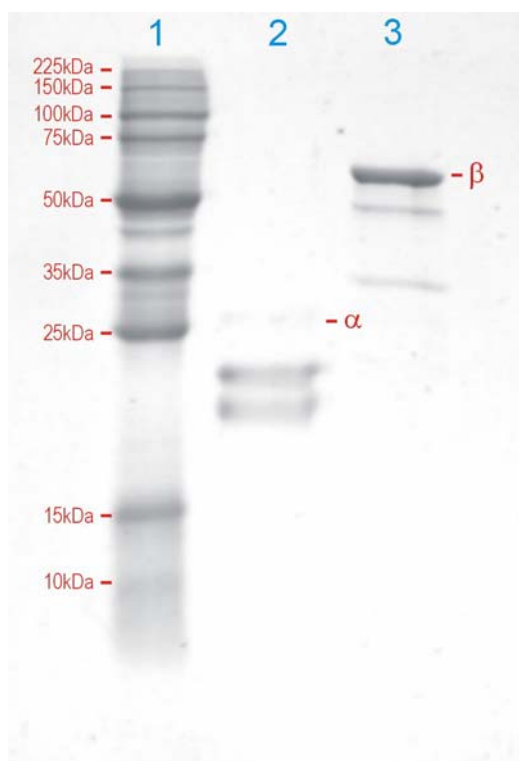
2 – standardy pI

4.3.6 Stanovení N-koncové aminokyselinové sekvence Edmanovým štěpením

Purifikovaný enzym PGA byl denaturován přidáním močoviny na výslednou koncentraci $8,8 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Podjednotky enzymu byly poté separovány gelovou filtrací (Superdex 200) v mobilní fázi, která obsahovala také $8,8 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ koncentraci močoviny (obr. 4.16). Vybrané frakce byly spojeny, zahuštěny, dialyzovány a analyzovány pomocí SDS-PAGE (obr. 4.17).



Obr. 4.16: Separace podjednotek enzymu PGA gelovou filtrací v přítomnosti $8,8 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ koncentrace močoviny.



Obr. 4.17: SDS-PAGE elektroforetická analýza separovaných podjednotek PGA.

Popis drah je následující:

1 – standardy molekulových hmotností

2 – spojené frakce odpovídající α -podjednotce

3 – spojené frakce odpovídající β -podjednotce

SDS-PAGE analýzou po denaturačním dělení bylo zjištěno, že spojené frakce, které měly obsahovat α -podjednotku, obsahují pouze dva fragmenty o nižší molekulové hmotnosti, než odpovídá α -podjednotce (27 kDa, vyznačeno na obr. 4.17). Tyto fragmenty nebyly podrobeny stanovení N-koncové sekvence. Naopak spojené frakce, které měly obsahovat β -podjednotku, kromě dvou minoritních nečistot žádanou podjednotku obsahovaly. Tento vzorek β -podjednotky byl sekvenován Edmanovým štěpením a byla získána N-koncová aminokyselinová sekvence o délce 20 aminokyselin (obr. 4.18).

4.3.7 Stanovení interní aminokyselinové sekvence hmotnostní spektrometrií

Interní aminokyselinové sekvence byly získány hmotnostní spektrometrií provedenou v Laboratoři charakterizace molekulární struktury v MBÚ AVČR. Proteinové vzorky byly získány vyříznutím malého kousku gelu z SDS-PAGE. Interpretací naměřených dat byla získána interní sekvence α -podjednotky o délce 20 aminokyselin (obr. 4.18), která vykazovala vysokou podobnost s dosud známými sekvencemi PGA.

	Interní sekvence α podjednotky		N-koncová sekvence β podjednotky	
CCM 4824	YGYGYAVAQDRLFQMEMAR		SNMWIVGRDHAKDARSILLN	
<i>A. faecalis</i>	53 YGYGYAVAQDRLFQMDMAR	71	266 SNLWSTRPERVQEGSTVLIN	285
<i>A. viscosus</i>	54 EAYGYVMAKDRLFQLEMFR	72	266 SNAAIVGSEKSATGNALLFS	285
<i>B. megaterium</i>	54 EAYGYVMAKDRLFQLEMFR	72	266 SNAAIVGSEKSATGNALLFS	285
<i>E. coli</i>	55 YGYGYVVAQDRLFQMEMAR	73	290 SNMWVIGKSKAQDAKAIMVN	309
<i>K. citrophila</i>	55 YGYGYVVAQDRLFQMEMAR	73	290 SNMWVIGKNKAQDAKAIMVN	309
<i>P. rettgeri</i>	50 YGYGYAVAQDRLFQMEMAK	69	285 SNVWLVGKTKASGAKAILLN	304

Obr. 4.18: Interní aminokyselinová sekvence α -podjednotky a N-koncová aminokyselinová sekvence β -podjednotky PGA z bakteriálního kmene *Achromobacter* sp. CCM 4824 a její porovnání se známými sekvencemi ostatních PGA. Přístupová čísla sekvencí známých PGA v databázi NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gquery/gquery.fcgi>) jsou následující: *A. faecalis*, AAD11517; *A. viscosus*, AAA22077; *B. megaterium*, AAD45609; *E. coli*, P06875; *K. citrophila*, P07941; *P. rettgeri*, A56681.

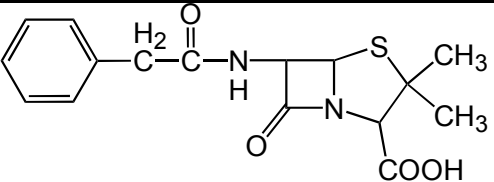
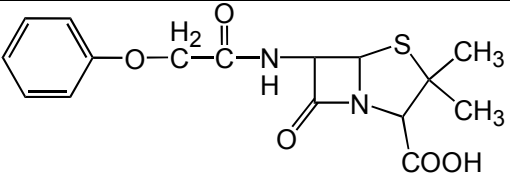
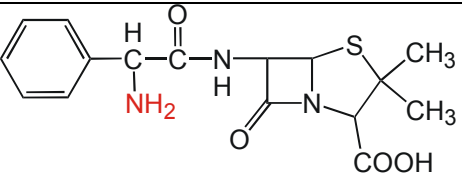
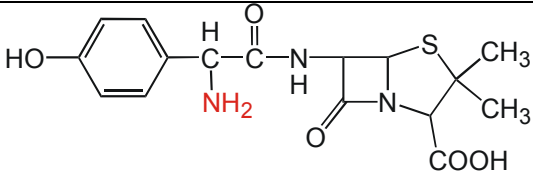
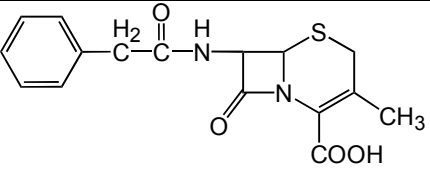
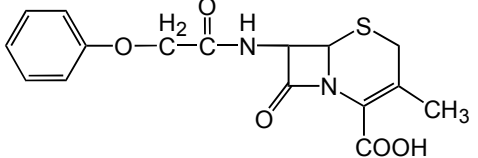
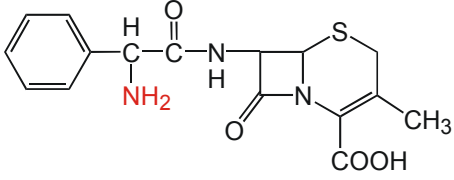
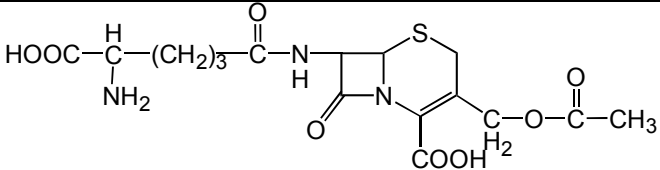
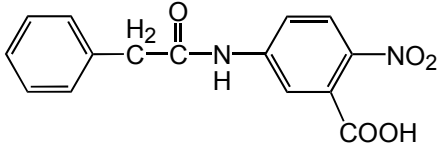
4.3.8 Stanovení substrátové specifity PGA z kmene *Achromobacter* sp. CCM 4824

Substrátová specifita je vyjádřena jako soubor relativních aktivit enzymových hydrolyz vybraných substrátů vztažených na aktivitu hydrolyzy přírodního penicilinu G (100 %). Měření probíhalo kolorimetrickým stanovením produktů enzymové hydrolyzy vybraných přírodních a semisyntetických penicilinových a cefalosporinových substrátů (tab. 4.6).

V průběhu purifikace a charakterizace PGA bylo zjištěno, že tento enzym se vyskytuje ve dvou izoformách (pI 8,0 a 8,2). Byla proto stanovena substrátová specifita obou izoform. Pro stanovení byly použity dvě frakce z 2. ionexové chromatografie purifikačního procesu (viz obr. 4.7). Frakce č. 28 reprezentovala izoformu s pI 8,0 a frakce č. 32 reprezentovala izoformu s pI 8,2. Měření substrátové specifity obou izoform proběhlo paralelně vždy ve dvou nezávislých měřeních pro každý substrát. Z naměřených hodnot (tab. 4.7) je zřejmé, že mezi oběma izoformami není žádný významný rozdíl. Drobné odchylky jsou způsobeny chybou měření.

Substrátová specifita směsi obou izoform PGA byla opakovaně testována v průběhu projektu. Průměry z hodnot relativních aktivit vypočtených ze všech měření jsou uvedeny v tab. 4.6. Substrátová specifita PGA byla nakonec ověřena i měřením kinetických parametrů pro enzymovou hydrolyzu substrátů pomocí HPLC (viz kap. 4.4).

Tabulka 4.6: Hydrolytická aktivita PGA z *Achromobacter* sp. CCM 4824 s různými substráty

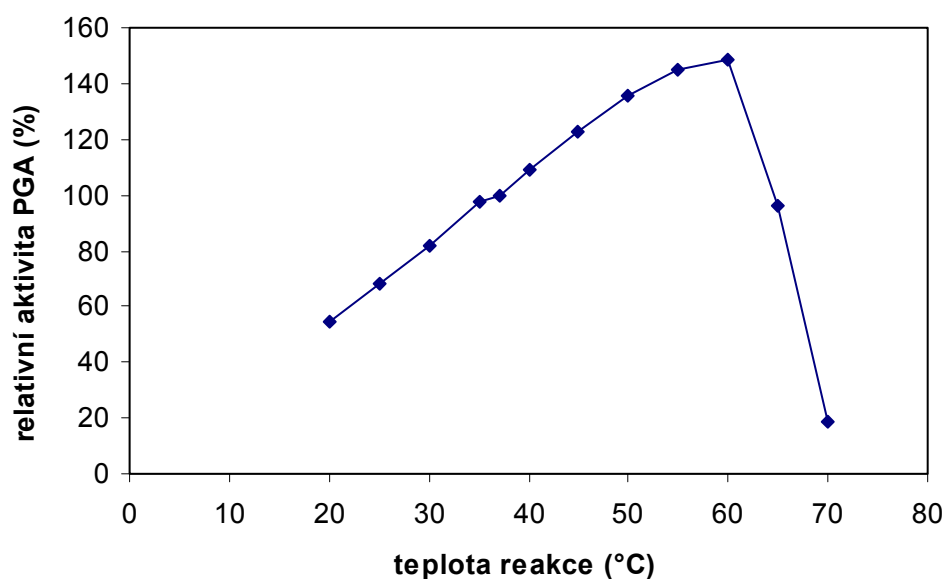
substrát	vzorec	relativní aktivita (%)
penicilin G		100
penicilin V		23 ± 2
ampicilin		180 ± 17
amoxicilin		176 ± 30
deacetoxycefalospo- sporin G		104 ± 13
deacetoxycefalospo- sporin V		15 ± 4
cefalexin		184 ± 29
cefalosporin C		0
NIPAB		188 ± 14

Tabulka 4.7: Hydrolytická aktivita obou izoform PGA s různými substráty

substrát	relativní aktivita izoformy PGA (%)	
	pI 8,0	pI 8,2
penicilin G	100	100
penicilin V	22	23
ampicilin	168	164
amoxicilin	146	151
deacetoxycefalosporin G	97	91
deacetoxycefalosporin V	14	12
cefalexin	155	169
cefalosporin C	0	0

4.3.9 Stanovení teplotního profilu hydrolytické aktivity PGA

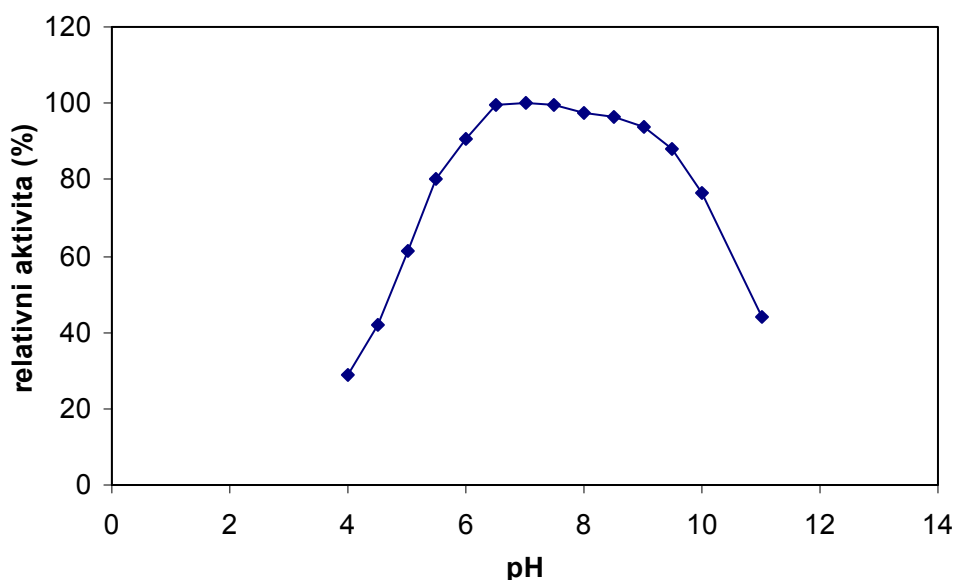
Teplotní profil hydrolytické aktivity purifikované PGA byl stanoven pomocí substrátu NIPAB. Měření probíhalo v temperované kyvetě umístěné ve spektrofotometru, ale skutečná teplota byla před měřením ověřována pomocí digitálního teploměru přímo v kyvetě. Z grafu na obr. 4.19 je patrné, že relativní hodnota hydrolytické aktivity rostla se vzrůstající teplotou reakce až do hodnoty 60 °C, kdy aktivita prudce klesla pravděpodobně vlivem denaturace enzymu. Maximální hydrolytická aktivita naměřená při 60 °C byla téměř o polovinu vyšší (149 %) než za standardních podmínek měření (37 °C).



Obr. 4.19: Teplotní profil hydrolytické aktivity PGA. Jednotlivé body grafu jsou průměrem ze dvou nezávislých měření.

4.3.10 Stanovení pH profilu hydrolytické aktivity PGA

Profil hydrolytické aktivity purifikované PGA v závislosti na pH byl stanoven pomocí substrátu NIPAB při 37 °C. Měření probíhalo v sadě pufrů v rozmezí hodnot pH od 4 do 11, které byly připraveny úpravou pH univerzálního Britton-Robinsonova pufru, který dokáže pufrovat v rozmezí pH 2-12. Pufr byl složen ze tří složek: H_3PO_4 , CH_3COOH a H_3BO_4 , z nichž každá byla o koncentraci $0,04 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Požadované pH bylo připraveno úpravou pomocí 10% NaOH. Z pH profilu na obr. 4.20 je patrné, že hydrolyza substrátu probíhala téměř stejnou rychlostí v rozmezí hodnot pH 6,5-9,0. Na obě strany od tohoto intervalu hydrolytická aktivita PGA klesala.



Obr. 4.20: Profil hydrolytické aktivity PGA v závislosti na pH. Jednotlivé body grafu jsou průměrem ze dvou nezávislých měření.

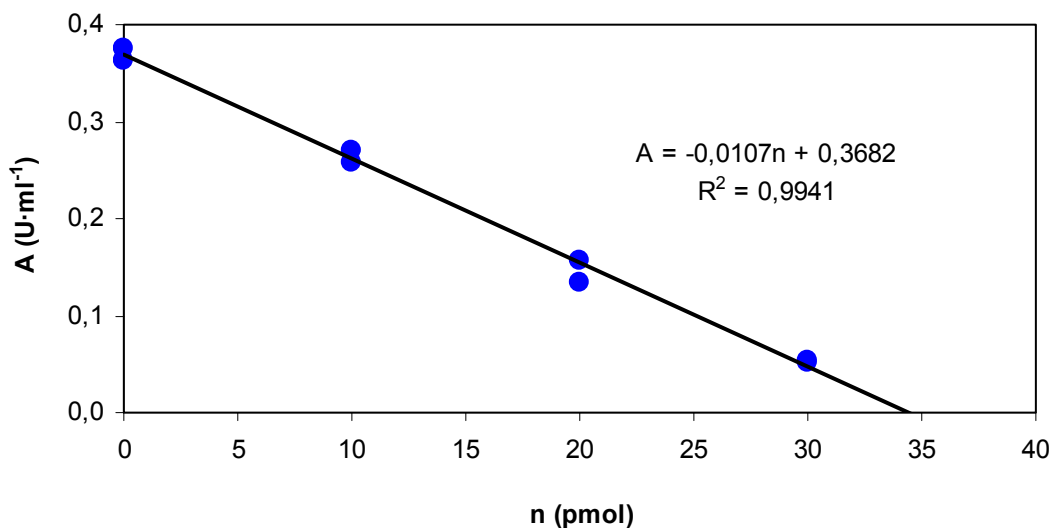
4.4 Stanovení kinetických parametrů PGA pro hydrolyzu vybraných substrátů

Veškerá měření kinetických parametrů hydrolytických reakcí byla prováděna při teplotě 25 °C a pH 7,5, aby výsledná data byla srovnatelná s publikovanými parametry jiných penicilinacylas. Měření počátečních rychlostí hydrolyzy substrátů bylo prováděno pomocí HPLC. Pro měření byla použita jedna šarže purifikovaného enzymu, která byla zamrazena v malých podílech na teplotu -70 °C. Pro každé měření byl použit vždy čerstvě rozmražený enzym.

4.4.1 Titrační stanovení počtu aktivních center enzymu ve vzorku PGA

Před samotným měřením kinetických parametrů bylo stanoveno množství aktivních center v roztoku purifikovaného enzymu PGA ($c^{\text{akt. center}}$) pomocí titrace inhibítorem fenylmethylsulfonfyl fluoridem (PMSF). Hodnota $c^{\text{akt. center}}$ byla použita k přepočtu naměřených limitních rychlostí enzymových reakcí (V_{lim}) na katalytické konstanty (k_{cat}). K sérii 100 μl vzorků roztoku purifikovaného enzymu bylo přidáno PMSF v množství 0-30 pmol a po inkubaci byla změřena aktivita PGA pomocí HPLC (substrát penicilin G). Stanovení probíhalo při teplotě 25 °C ve fosfátovém pufru o koncentraci 0,1 mol $\cdot\text{l}^{-1}$ a pH 7,5. Vynesení naměřených aktivit PGA (dva body pro každou koncentraci PMSF) v závislosti na množství přidaného inhibítoru byla získána přímkou (obr. 4.21). Z rovnice přímky bylo spočítáno látkové množství PMSF potřebného k inhibici 100 μl roztoku enzymu, při kterém zbytková aktivita PGA právě klesla na nulovou hodnotu. Toto látkové množství PMSF bylo rovno látkovému množství aktivních center enzymu. Z rovnice přímky uvedené na obr. 4.21 tedy vyplynulo:

$$c^{\text{akt. center}} = 344 \text{ pmol}\cdot\text{ml}^{-1}$$



Obr. 4.21: Graf závislosti zbytkové aktivity PGA (A) na množství přidaného inhibítoru PMSF (n).

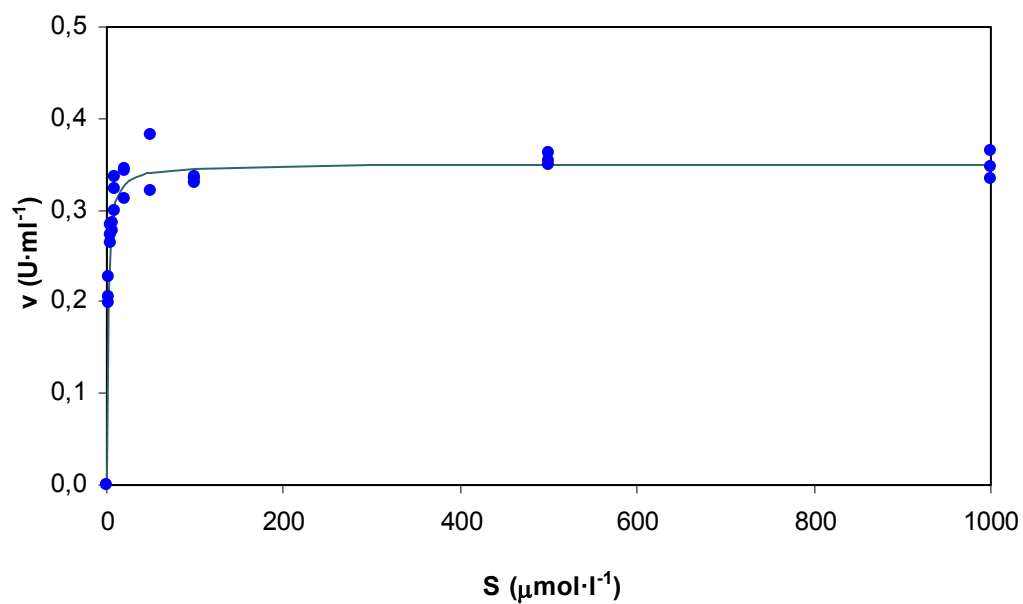
4.4.2 Stanovení kinetických parametrů purifikované PGA pro hydrolyzu vybraných substrátů

Konstanty Michaelise-Mentenové (K_m), limitní rychlosti (V_{lim}) a katalytické konstanty (k_{cat}) byly spočítány z počátečních rychlostí hydrolytických reakcí naměřených v širokém rozmezí koncentrací substrátů. Rychlosti enzymových hydrolyz pro substráty: penicilin G, penicilin V, deacetoxycefalosporin G, ampicilin, amoxicilin a cefalexin byly stanovovány pomocí HPLC. Vyhodnocení naměřených dat bylo provedeno pomocí počítačového programu Enzfitter a paralelně také pomocí dvojnásobně reciprokého výnosu podle Lineweaver-Burka. Kompletní naměřená data v grafické podobě jsou uvedena pouze pro dva komerčně důležité substráty: penicilin G a ampicilin.

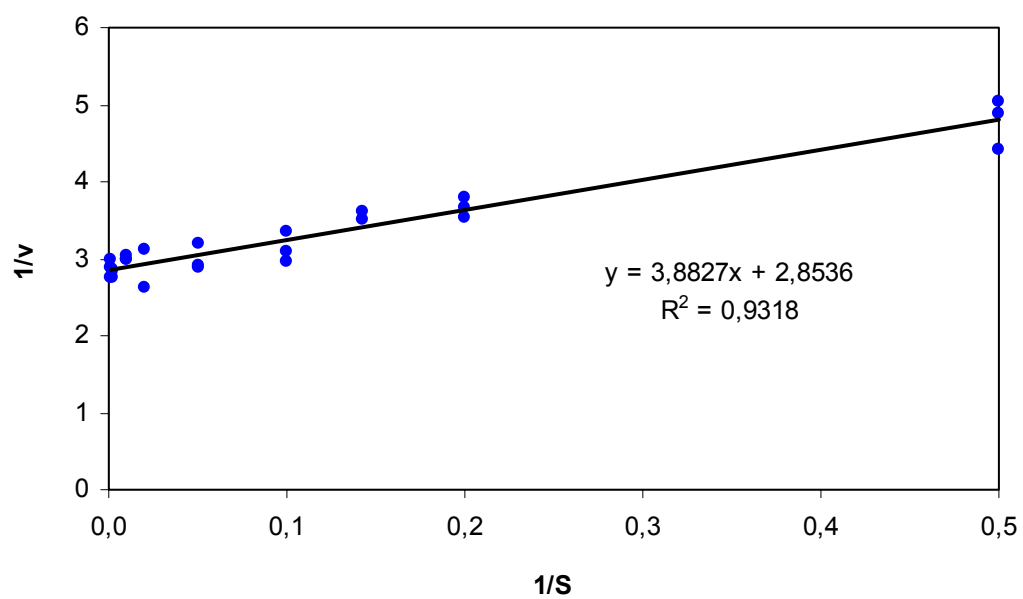
Měření počátečních rychlostí hydrolyzy **penicilinu G** pomocí enzymu PGA bylo provedeno při koncentracích substrátu **2-1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$** . Na obr. 4.22 jsou vyneseny počáteční rychlosti hydrolyzy (v) v závislosti na koncentraci substrátu (S). Na obr. 4.23 je dvojnásobně reciprokový výnos naměřených dat ($1/v$ versus $1/S$). Měření počátečních rychlostí hydrolyzy **ampicilinu** pomocí enzymu PGA bylo provedeno při koncentracích substrátu **0,1-15 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$** . Na obr. 4.24 jsou vyneseny počáteční rychlosti hydrolyzy v závislosti na koncentraci substrátu. Na obr. 4.25 je dvojnásobně reciprokový výnos naměřených dat.

Vypočtené hodnoty K_m , k_{cat} a k_{cat}/K_m pro jednotlivé substráty jsou uvedeny v tab. 4.8. Poměr k_{cat}/K_m představuje parametr účinnosti enzymu pro jednotlivé substráty. Z tabulky je patrné, že kinetické parametry souvisí se strukturou postranního řetězce molekuly substrátu (vzorce molekul substrátů jsou uvedeny v tab. 4.6). Substráty, které nemají na α -uhlíku postranního řetězce navázanou aminoskupinu (penicilin G, penicilin V, deacetoxycefalosporin G), vykazují podstatně vyšší afinitu k enzymu (o tři řády nižší K_m) než substráty s aminoskupinou na α -uhlíku (ampicilin, amoxicilin, cefalexin). Na druhou stranu substráty s aminoskupinou na α -uhlíku vykazují vyšší limitní rychlost hydrolytické reakce v porovnání s penicilinem G a deacetoxycefalosporinem G.

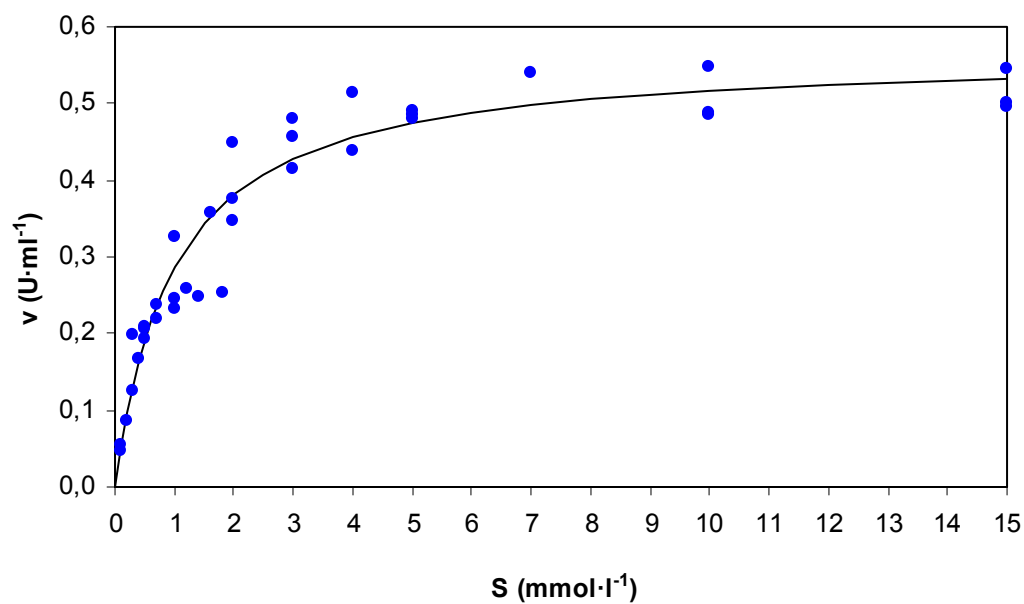
V tab. 4.9 jsou porovnány kinetické parametry jiných penicilin-G-acylas, které byly publikovány v literatuře pro hydrolytické štěpení penicilinu G.



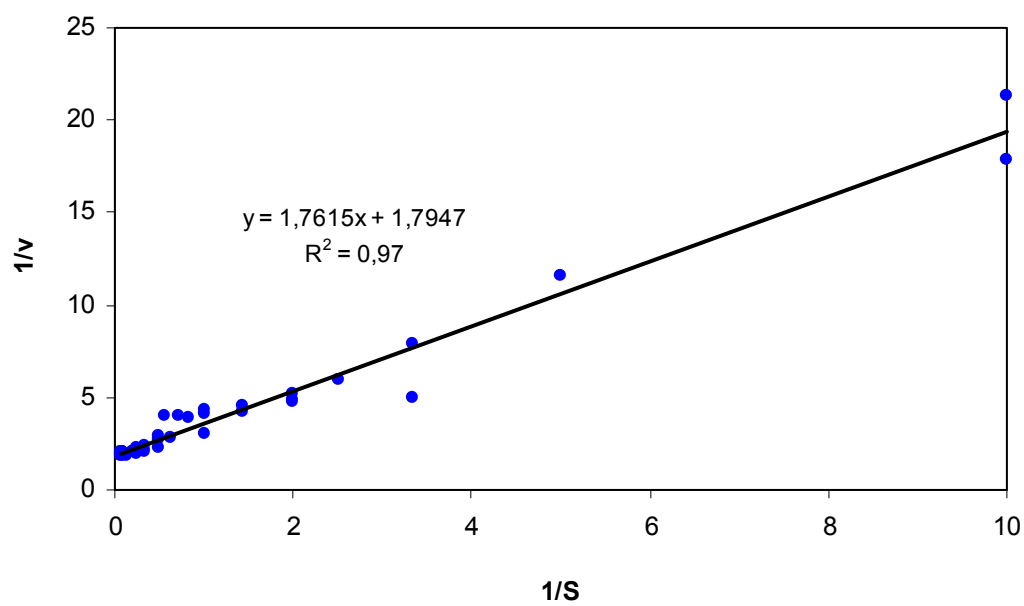
Obr. 4.22: Počáteční rychlosti hydrolýzy penicilinu G (v) v závislosti na koncentraci penicilinu G (S).



Obr. 4.23: Dvojnásobně reciproké vynesení počátečních rychlostí hydrolýzy penicilinu G (v) v závislosti na koncentraci penicilinu G (S).



Obr. 4.24: Počáteční rychlosti hydrolýzy ampicilinu (v) v závislosti na koncentraci ampicilinu (S).



Obr. 4.25: Dvojnásobně reciproké vynesení počátečních rychlostí hydrolýzy ampicilinu (v) v závislosti na koncentraci ampicilinu (S).

Tabulka 4.8: Stanovení kinetických parametrů PGA z kmene *Achromobacter* sp. CCM 4824 pro hydrolytické reakce vybraných substrátů. Výpočet byl proveden programem Enzfitter a paralelně i dvojnásobně reciprokým vynesím podle Lineweaver-Burka.

substrát	Enzfitter				Lineweaver-Burk			
	K_m (μM)	V_{lim} ($\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	K_m (μM)	V_{lim} ($\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
penicilin G	1,4	0,351	17,0	$1,25\times 10^7$	1,4	0,350	17,0	$1,25\times 10^7$
penicilin V	1,1	0,077	3,7	$3,46\times 10^6$	1,3	0,077	3,7	$2,76\times 10^6$
DAOC-G*	3,1	0,355	17,2	$5,57\times 10^6$	3,5	0,369	17,9	$5,11\times 10^6$
ampicilin	1040	0,570	27,6	$2,65\times 10^4$	980	0,568	27,5	$2,81\times 10^4$
amoxicilin	733	0,534	25,9	$3,53\times 10^4$	563	0,499	24,2	$4,30\times 10^4$
cefalexin	3390	0,731	35,4	$1,04\times 10^4$	3030	0,684	33,1	$1,09\times 10^4$

Veškeré měření bylo prováděno při teplotě 25 °C a pH 7,5.

* deacetoxycefalosporin G

Tabulka 4.9: Srovnání kinetických parametrů hydrolyzy substrátu penicilinu G publikovaných pro různé PGA.

zdroj PGA	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	reference
<i>Achromobacter</i> sp. CCM 4824	1,4	17	$1,25\times 10^7$	tato práce
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	8,9	73	$8,20\times 10^6$	Cai et al. (2004)
PAS2	12	25	$2,08\times 10^6$	Gabor et al. (2005)
<i>Alcaligenes faecalis</i>	4,2	54	$1,29\times 10^7$	Švedas et al. (1997)
<i>Escherichia coli</i>	4,6	48	$1,04\times 10^7$	Margolin et al. (1980)
<i>Kluyvera citrophila</i>	18	56	$3,11\times 10^6$	Roa et al. (1995)

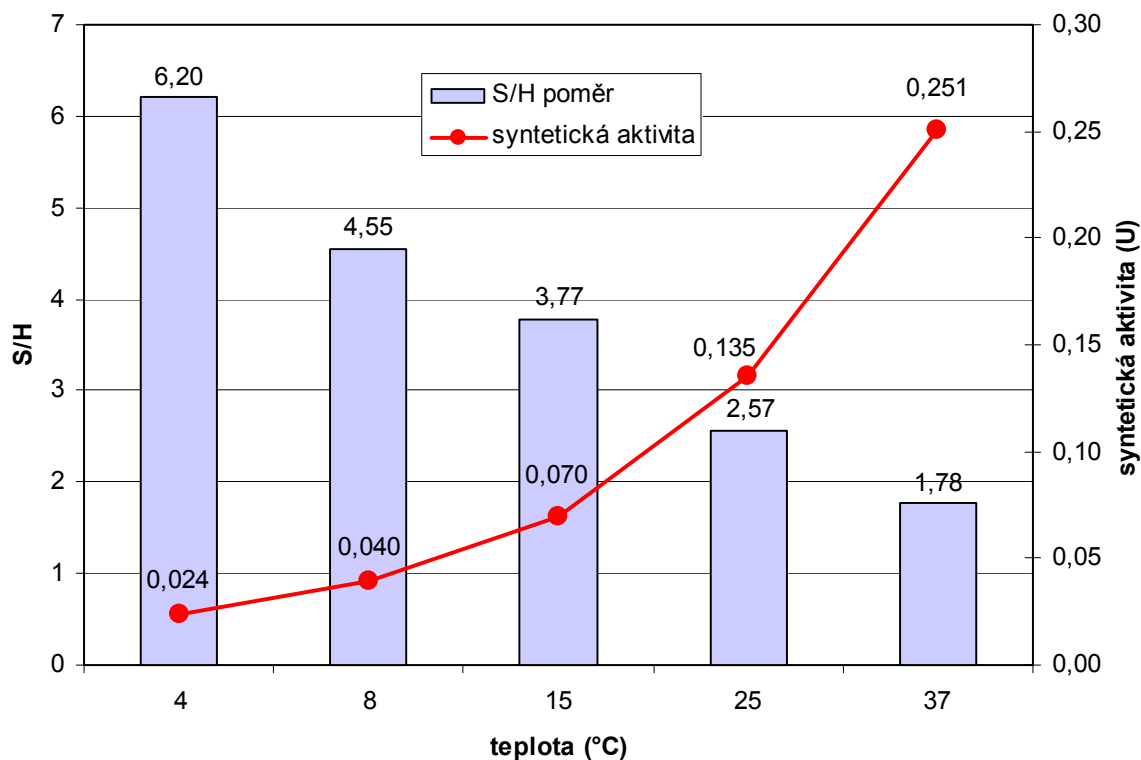
Data měřena při teplotě 25 °C a pH 7,5.

4.5 Modelové syntézy semisyntetického antibiotika ampicilinu

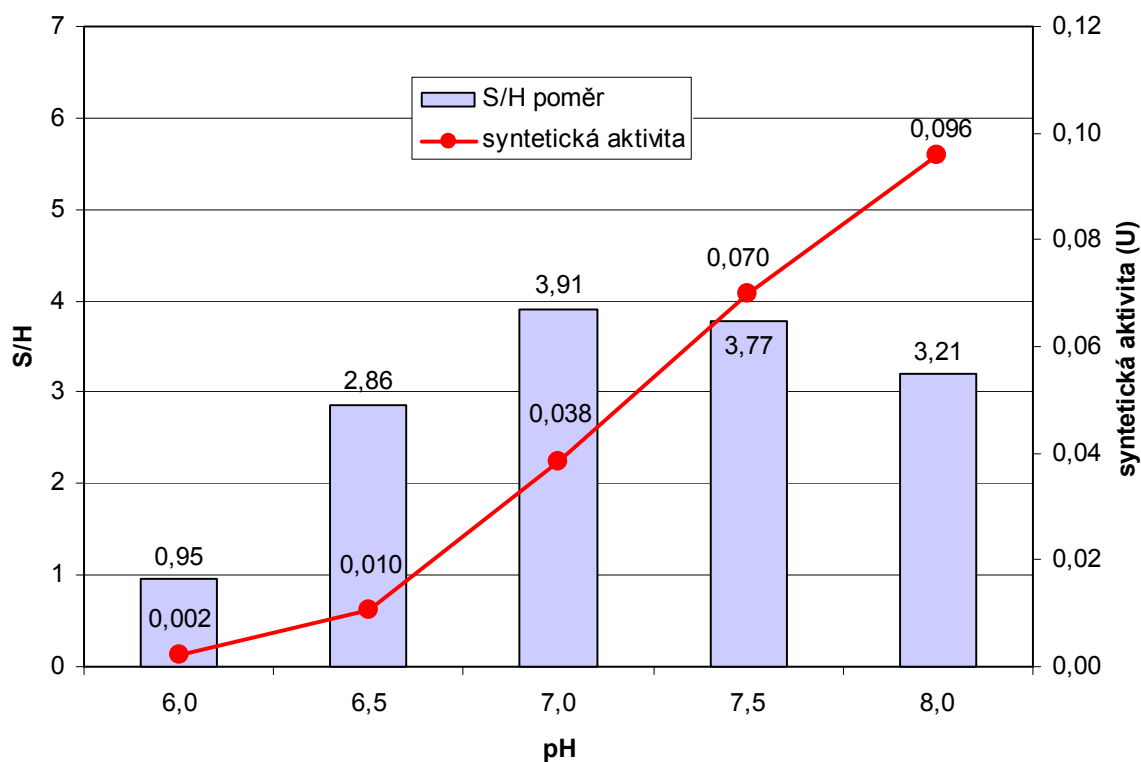
Protože identifikace nových penicilinacylas má především aplikační význam, byla PGA z *Achromobacter* sp. CCM 4824 použita při syntéze β -laktamových antibiotik. Syntéza ampicilinu byla vybrána jako modelový systém pro ověření syntetických schopností. Cílem bylo získat maximální výtěžek ampicilinu a porovnat syntetické schopnosti nové PGA z *Achromobacter* sp. s průmyslově používaným rekombinantním enzymem PGA z *E. coli* RE3(pKA18), jehož vysoce expresní systém byl vyvinut v Laboratoři enzymových technologií MBÚ AVČR. Jelikož syntéza ampicilinu probíhala ve vodném prostředí, reakční rovnováha byla výrazně posunuta ve prospěch hydrolýzy. Proto bylo třeba reakční podmínky optimalizovat tak, aby v určitém okamžiku v reakční směsi vzniklo kinetické maximum koncentrace ampicilinu, jež by bylo výrazně vyšší, než je koncentrace ampicilinu v rovnovážném stavu. Jako aktivovaný donor acylu byl použit D-fenylglycin methylester (PGME).

4.5.1 Optimalizace reakčních podmínek pro syntézu ampicilinu

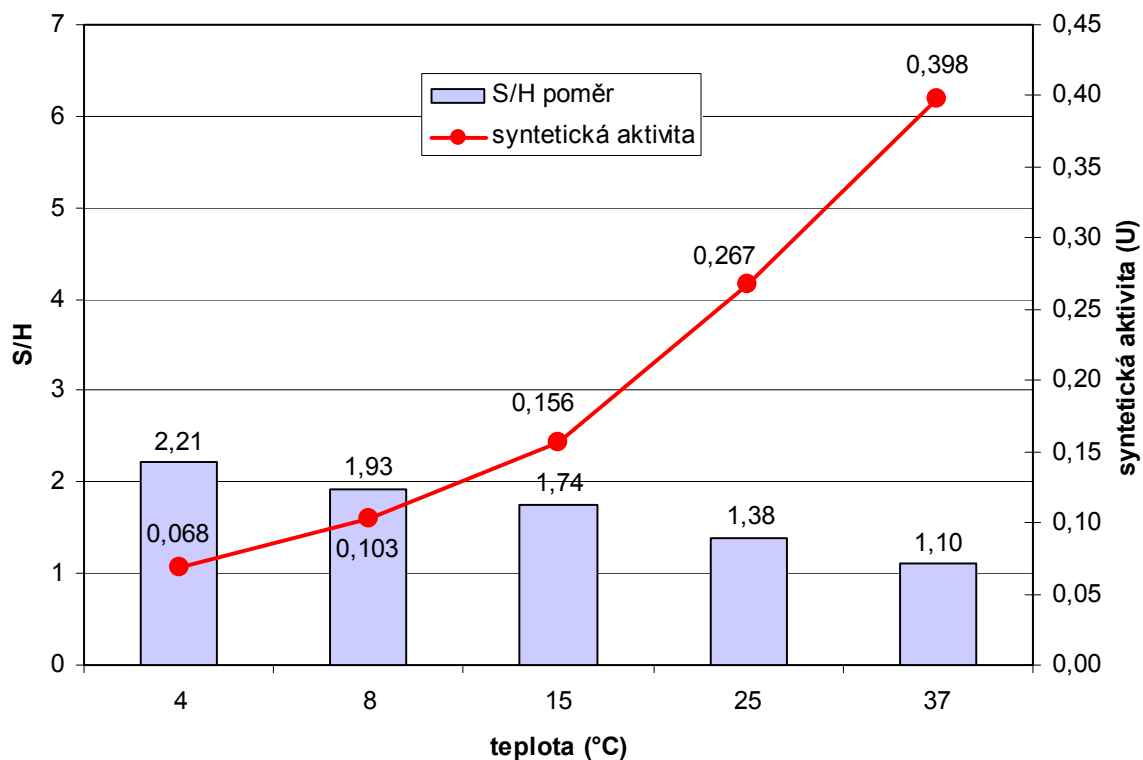
V rámci optimalizace reakčních podmínek byla hledána vhodná teplota a pH, za kterých by reakční systém vykazoval maximální poměr počáteční rychlosti syntézy ampicilinu ku rychlosti hydrolýzy ampicilinu a fenylglycin methylesteru (S/H poměr). Podmínky optimalizace S/H poměrů byly následující: reakční směs (5 ml) obsahovala $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztok PGME, $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztok 6-aminopenicilanové kyseliny (6-APA) a $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfátový pufr (pH 7,5). Po vytemperování směsi a úpravě pH byla reakce zahájena přidavkem roztoku purifikované PGA o celkové aktivitě 0,5 U (měřeno pro hydrolýzu ampicilinu při 25 °C). Ze směsi byly odebírány vzorky, v nichž byla pomocí HPLC stanovena koncentrace ampicilinu a fenylglycinu. Směrnice počátečního přírůstku ampicilinu odpovídala rychlosti syntetické reakce, zatímco směrnice počátečního přírůstku fenylglycinu odpovídala souhrnné rychlosti hydrolýzy vzniklého ampicilinu a substrátu PGME. Poměr obou směrnic odpovídal S/H poměru. Z grafů na obr. 4.26 až 4.29 vyplývá, že se snižující se reakční teplotou S/H poměr výrazně roste, zatímco syntetická aktivita klesá. Optimální pH, kdy S/H poměr je nejvyšší, leží v rozmezí 7,0-7,5. Porovnáním enzymů PGA z *Achromobacter* sp. a *E. coli* bylo zjištěno, že PGA z *Achromobacter* sp. poskytuje výrazně vyšší S/H poměry, což dává předpoklad vyššího výtěžku ampicilinu při jeho enzymové syntéze.



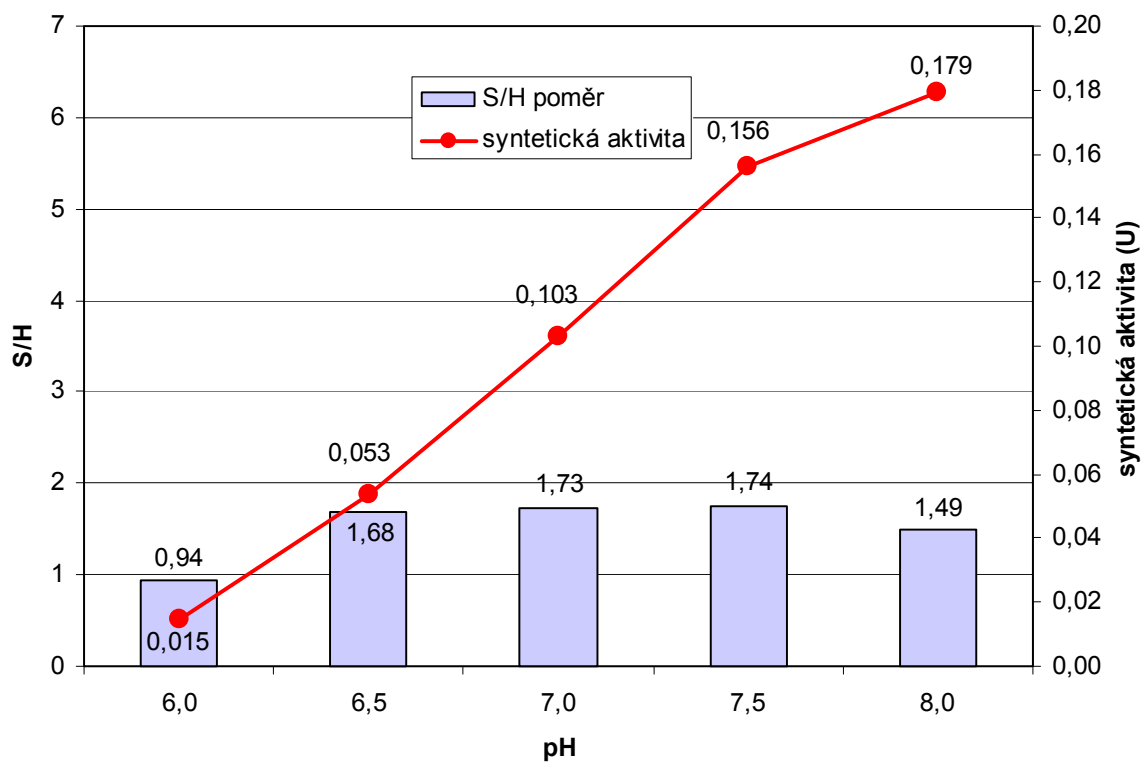
Obr. 4.26: Graf závislosti S/H poměru a syntetické aktivity PGA z *Achromobacter sp.* na reakční teplotě při konstantním pH 7,5.



Obr. 4.37: Graf závislosti S/H poměru a syntetické aktivity PGA z *Achromobacter sp.* na pH reakční směsi při konstantní teplotě 15 °C.



Obr. 4.28: Graf závislosti S/H poměru a syntetické aktivity PGA z *E. coli* na reakční teplotě při konstantním pH 7,5.



Obr. 4.29: Graf závislosti S/H poměru a syntetické aktivity PGA z *E. coli* na pH reakční směsi při konstantní teplotě 15 °C.

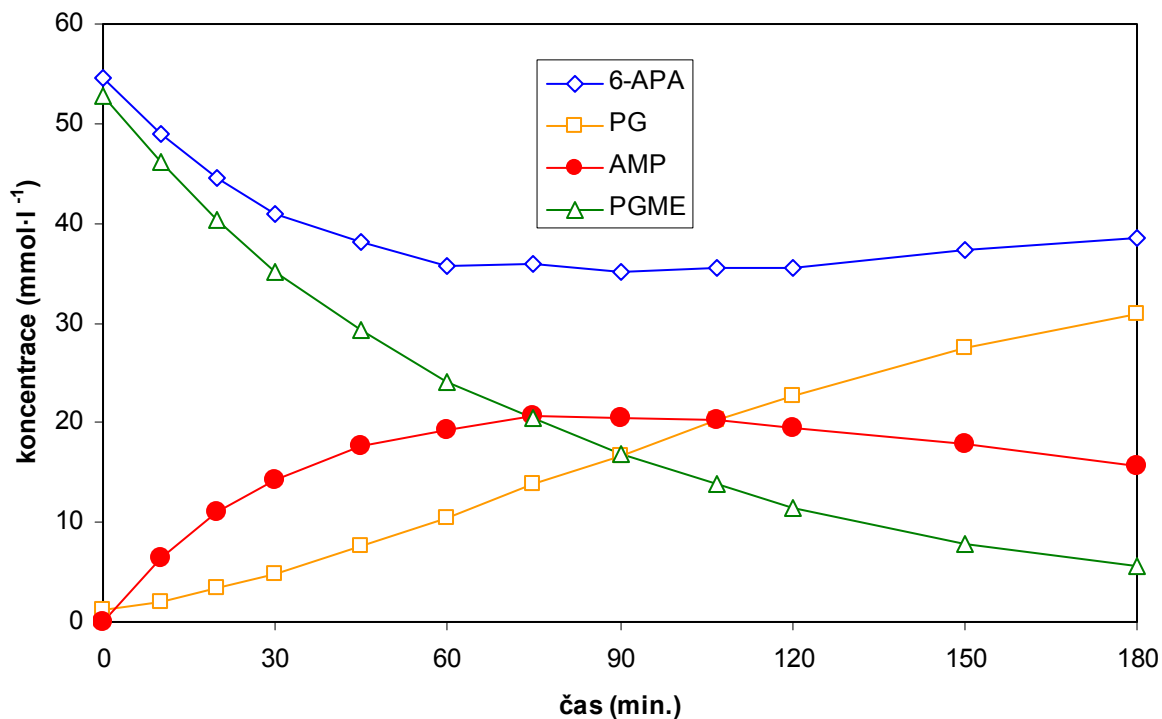
4.5.2 Enzymová syntéza ampicilinu pomocí PGA

Na základě výsledků optimalizace syntézy pomocí PGA z *Achromobacter* sp. byly zvoleny tyto reakční podmínky: pH 7,0 a teplota 15 °C jako kompromis mezi poklesem syntetické aktivity a S/H poměrem.

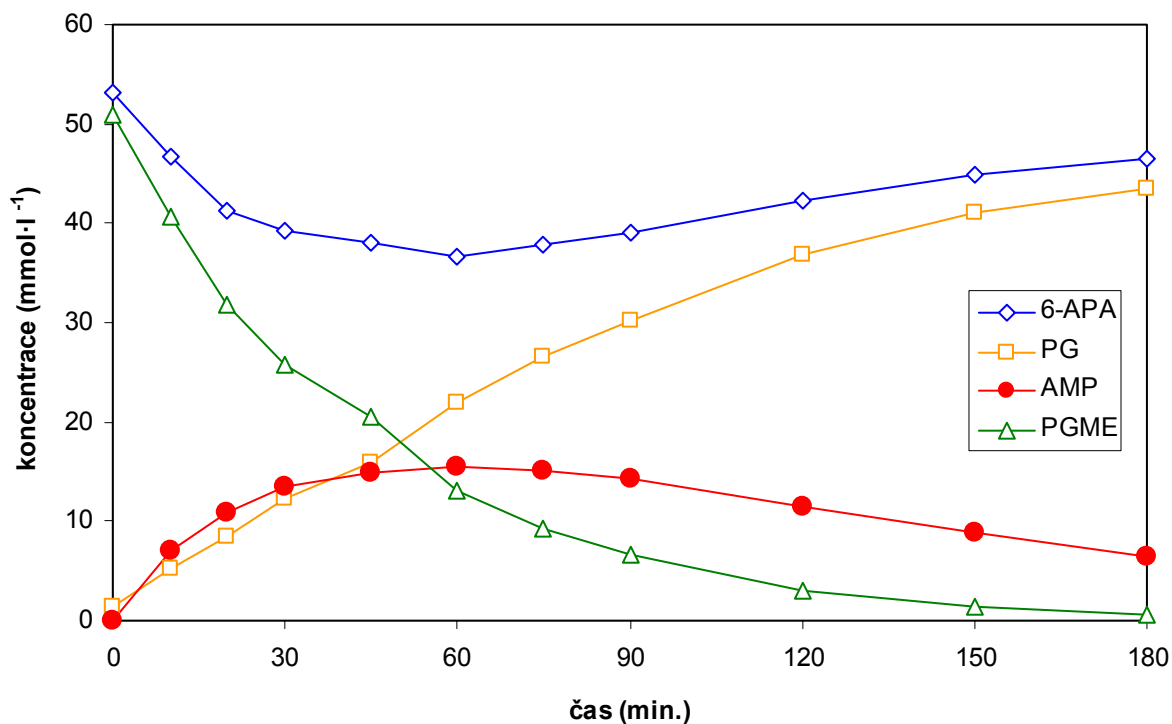
Syntézy ampicilinu pomocí PGA z *Achromobacter* sp. i z *E. coli* byly prováděny paralelně a za stejných podmínek. Výchozí koncentrace reaktantů (6-APA, PGME) byla 50 mmol·l⁻¹. Na obr. 4.30 a 4.31 jsou uvedeny průběhy syntéz katalyzovaných oběma enzymy. Při použití PGA z *Achromobacter* sp. (1,6 U·ml⁻¹ reakční směsi) bylo dosaženo v 75. min. kinetické maximum koncentrace ampicilinu (20,7 mmol·l⁻¹), jež odpovídalo výtěžku 37,9 % (přepočteno na počáteční množství 6-APA). Při použití PGA z *E. coli* (1,1 U·ml⁻¹ reakční směsi) bylo dosaženo v 60. min. kinetické maximum koncentrace ampicilinu (15,5 mmol·l⁻¹), jež odpovídalo výtěžku 29,2 %. Kromě rozdílu ve výtěžku ampicilinu bylo možné pozorovat i rozdíl v rychlosti poklesu koncentrace ampicilinu po dosažení kinetického maxima. Rychlejší úbytek ampicilinu, který byl pozorován v případě použití PGA z *E. coli*, byl způsoben rychlejší enzymovou hydrolyzou aktivovaného acylu PGME a ampicilinu na úkor syntézy ampicilinu, což koresponduje s nižším S/H poměrem PGA z *E. coli*.

Další syntézy byly provedeny s postupně se zvyšujícími koncentracemi reaktantů až na hodnoty 750 mmol·l⁻¹ 6-APA a 1050 mmol·l⁻¹ PGME (obr. 4.32 a 4.33). Zvýšení vstupních koncentrací reaktantů až k těmto extrémním hodnotám přineslo výrazné zvýšení výtěžku ampicilinu. Důvodem zvýšení výtěžku byl posun chemické rovnováhy ve směru syntézy vlivem precipitace ampicilinu, který má nižší rozpustnost než reaktanty vstupující do reakce. Při použití PGA z *Achromobacter* sp. (11 U·ml⁻¹ reakční směsi) bylo dosaženo ve 450. min. kinetické maximum koncentrace ampicilinu (589 mmol·l⁻¹), jež odpovídalo výtěžku 78,5 %. Naopak při použití PGA z *E. coli* (12 U·ml⁻¹ reakční směsi) nebylo dosaženo kinetického maxima koncentrace ampicilinu, ale přibližně po 60 min. byl veškerý enzym PGA denaturován a syntéza ampicilinu byla zastavena. V tomto případě maximální výtěžek ampicilinu byl pouze 12,5 %.

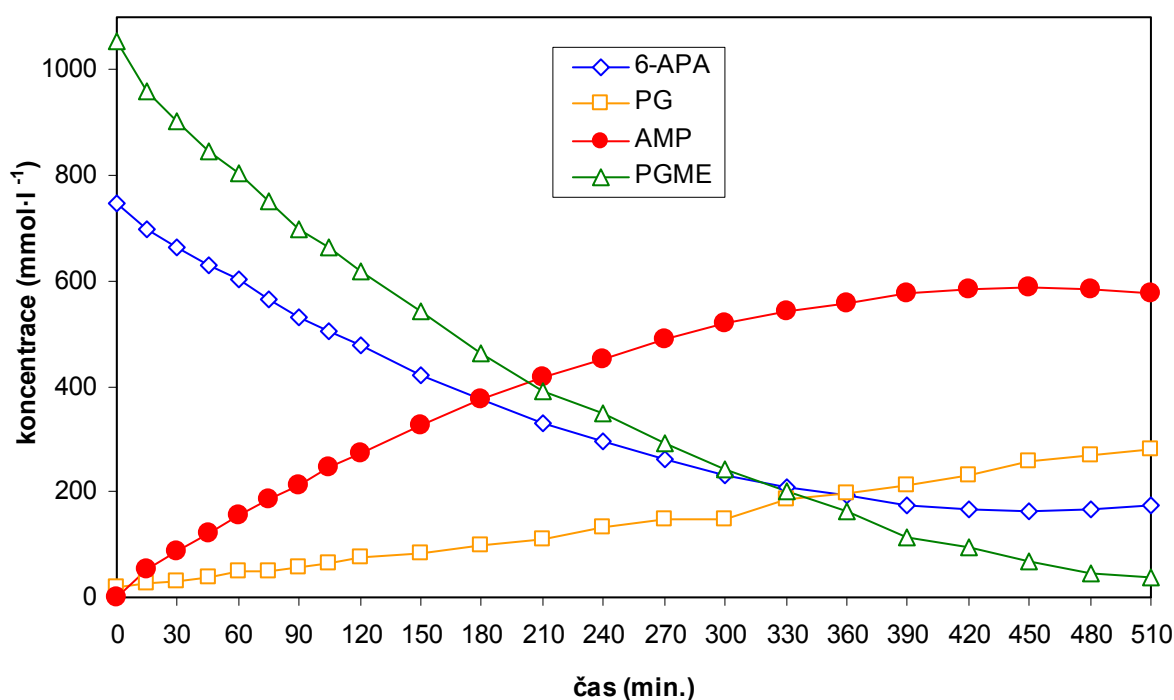
Kvůli větší citlivosti PGA z *E. coli* k denaturaci bylo srovnání výtěžku ampicilinu provedeno při následujících vstupních koncentracích reaktantů: 500 mmol·l⁻¹ 6-APA a 700 mmol·l⁻¹ PGME. Za těchto podmínek byl získán maximální výtěžek ampicilinu 79,4 % při použití PGA z *Achromobacter* sp. a 68,9 % při použití PGA z *E. coli* (výsledky nejsou uvedeny).



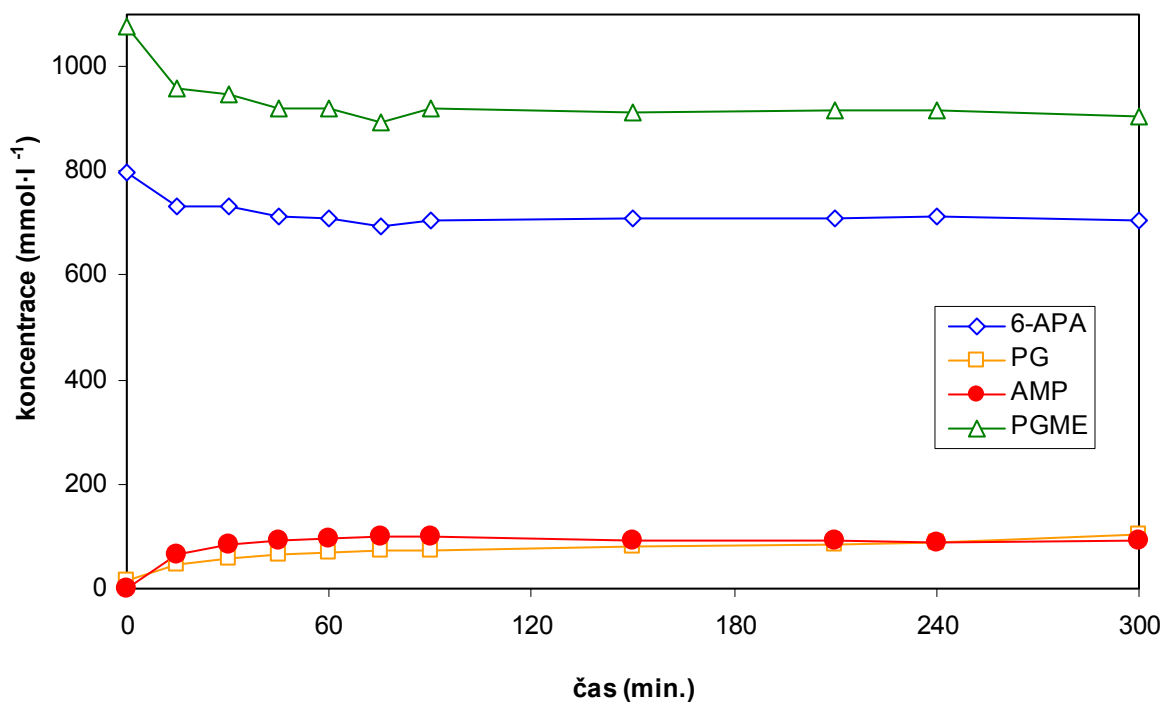
Obr. 4.30: Časový průběh koncentrací reaktantů během syntézy ampicilinu pomocí PGA z *Achromobacter sp.* Počáteční koncentrace 6-APA a PGME byly 50 mmol·l⁻¹. Maximální výtěžek ampicilinu v 75. min. byl 37,9 %.



Obr. 4.31: Časový průběh koncentrací reaktantů během syntézy ampicilinu pomocí PGA z *E. coli.* Počáteční koncentrace 6-APA a PGME byly 50 mmol·l⁻¹. Maximální výtěžek ampicilinu v 60. min. byl 29,2 %.



Obr. 4.32: Časový průběh koncentrací reaktantů během syntézy ampicilinu pomocí PGA z *Achromobacter sp.* Počáteční koncentrace 6-APA byla $750 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a PGME byla $1050 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Maximální výtěžek ampicilinu ve 450. min. byl 78,5 %.



Obr. 4.33: Časový průběh koncentrací reaktantů během syntézy ampicilinu pomocí PGA z *E. coli.* Počáteční koncentrace 6-APA byla $750 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a PGME byla $1050 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Maximální výtěžek ampicilinu ve 90. min. byl 12,5 %.

5. Diskuse

V této práci byl studován nový enzym patřící do skupiny penicilinacylas (PA) izolovaný z přírodního bakteriálního izolátu, který byl v průběhu projektu, na základě dříve popsané charakterizace, identifikován jako nová penicilin-G-acylasa (PGA). Bakteriální kmen, taxonomicky zařazený jako *Achromobacter* sp. CCM 4824 (Plháčková et al. 2003), byl nalezen v Laboratoři enzymových technologií v Mikrobiologickém ústavu AVČR v rámci rozsáhlého screeningu, při kterém byl hledán mikroorganismus produkující enzym účinně štěpící ampicilin na 6-aminopenicilanovou kyselinu a fenylglycin. Předpokládalo se, že pokud enzym dokáže účinně štěpit ampicilin, mohl by být vhodný i pro jeho zpětnou enzymovou syntézu. PGA produkovaná nalezeným kmenem vykazovala unikátní, doposud nepopsanou substrátovou specifitu: enzym dokázal téměř dvojnásobnou rychlostí štěpit semisyntetická β -laktamová antibiotika ampicilin, amoxicilin a cefalexin než přírodní penicilin G, což je netypické pro penicilin-G-acylasy (PGA) a zároveň i pro α -aminoacidesterhydrolasy (AEH), které neštěpí přírodní penicilin G vůbec.

Pro účely studia nové PGA bylo třeba získat značné množství bakteriální biomasy kmene *Achromobacter* sp. CCM 4824. Proto byl kmen vsádkově kultivován v laboratorním bioreaktoru Biostat MD. Kultivace byly prováděny za podmínek optimalizovaných pro produkci rekombinantní PGA z *E. coli* kmenem, který byl v laboratoři připraven a kultivován dříve. Vsádkovou kultivací o pracovním objemu 8 l bylo celkem získáno 65 g suché hmoty biomasy o specifické aktivitě PGA $19 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ sušiny. Kultivace byla ukončena v 25. hodině, kdy byl stanoven nejvyšší obsah sušiny. Naměřené hodnoty specifické aktivity PGA značně kolísaly kvůli větší nepřesnosti měření aktivity v desintegrovaných buňkách, nicméně lze z obr. 4.3 vyzorovat, že nejvyšší specifická aktivita byla dosažena kolem 10. hodiny kultivace. Poté, z důvodu dosažení vyšší koncentrace biomasy, byla do bioreaktoru během kultivace dvakrát doplněna kyselina fenylactová, která sloužila jako zdroj C a energie a současně indukovala syntézu enzymu. V této fázi kultivace se specifická aktivita PGA mírně snížila, avšak celková aktivita dosáhla ke konci kultivace hodnoty $180 \text{ U} \cdot \text{l}^{-1}$.

Z bakteriální biomasy získané kultivací v bioreaktoru byla izolována penicilin-G-acylasa. Postup izolace, který byl vyvinut a optimalizován v průběhu studia, se skládal z 5 purifikačních kroků. Prvním krokem byla desintegrace suspenze biomasy o dané sušině

pomocí ultrazvuku. Ve druhém kroku byl supernatant po odstředění zbytků buněk podroben frakcionaci vysolováním pomocí síranu amonného. Bylo zjištěno, že PGA se nejvíce srážela v rozmezí relativního nasycení síranem amonným 40-50 %. Kvůli vyššímu výtěžku PGA byla izolována frakce proteinů v rozmezí relativního nasycení síranem amonným 35-55 %, která byla opětovně rozpuštěna a dialyzována. Třetím purifikačním krokem byla zvolena ionexová chromatografie na koloně s nosičem Fractogel COO⁻ za použití pufrů o pH 6,0. Toto pH bylo dostatečně nízké, aby se na koloně zachytilo maximum PGA z dialyzované proteinové frakce po srážení síranem amonným. Aktivní frakce byly spojeny a ve čtvrtém purifikačním kroku byly znovu nanášeny na kolonu s nosičem Fractogel COO⁻. Rozdíl oproti předchozí chromatografii byl v hodnotě pH pufrů. U druhé chromatografie bylo pH zvýšeno na 7,0, což umožnilo jemnější dělení směsi díky přiblížení pH k izoelektrickému bodu PGA. Aktivní frakce z druhé ionexové chromatografie byly slity a zahuštěny. Zahuštěný roztok PGA byl v pátém purifikačním kroku dočištěn pomocí gelové filtrace na koloně naplněné gelem Superdex 200. Tímto purifikačním procesem byla získávána penicilinacylasy o specifické hydrolytické aktivitě kolem 30 U·mg⁻¹ proteinu s celkovým výtěžkem kolem 10 % a stupněm přečištění kolem 300. Bilance všech purifikačních kroků pro uvedenou purifikaci je shrnuta v tab. 4.4.

Purifikovaná penicilinacylasy byla podrobena charakterizaci. Nejprve byl gelovou filtrací proveden odhad molekulové hmotnosti nativního enzymu. Z elučních objemů bylo spočítáno, že molekulová hmotnost nativní penicilinacylasy je přibližně 60 kDa. Vypočtená hodnota byla pouze orientační, neboť eluční objem nezávisí jen na molekulové hmotnosti, ale i na tvaru molekuly a případně i na nežádoucí afinitě enzymu ke gelovému nosiči v koloně. Elektroforetickou analýzou PA pomocí SDS-PAGE bylo zjištěno, že enzym se skládá ze dvou nesterjně velkých a nekovalentně spojených podjednotek o přibližných hmotnostech 26 a 60 kDa. Toto podjednotkové složení enzymu je charakteristické pro všechny známé penicilin-G-acylasy, kde se podjednotky označují jako α (menší) a β (větší). Hmotnosti podjednotek známých penicilin-G-acylas jsou uvedeny v tab. 2.1. Přesné hmotnosti podjednotek penicilinacylasy byly stanoveny pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrické analýzy. Analýzou bylo zjištěno, že molekulová hmotnost menší α -podjednotky byla 27,02 kDa a větší β -podjednotky byla 62,45 kDa. S přihlédnutím k odhadu molekulové hmotnosti nativního enzymu (60 kDa) bylo dedukováno, že izolovaná PGA měla složení $1\alpha+1\beta$ o celkové molekulové hmotnosti 89,47 kDa. Porovnáním zjištěných hmotností

s publikovanými hodnotami hmotností penicilin-G-acylas, které jsou uvedené v tab. 2.1, je vidět, že izolovaný enzym má β -podjednotku přibližně stejně velkou jako známé PGA, naopak menší α -podjednotka svou molekulovou hmotností známé PGA převyšuje přibližně o 3 kDa.

Kromě SDS elektroforézy byla homogenita purifikované PGA ještě ověřena pomocí nativní elektroforézy v polyakrylamidovém gelu. Jelikož bylo zjištěno, že izolovaný enzym je bazický, byla elektroforéza provedena v kyselém separačním pufru o pH 4,3. Z obr. 4.14 je patrný náznak, že purifikovaný enzym obsahoval pravděpodobně dvě izoformy. Tuto domněnku podpořil i fakt, že PGA během purifikace při druhé ionexové chromatografii netvořila symetrický pík, ale vytvořila zřetelný dvojpík (viz obr. 4.7), který nebylo možné dále separovat pomocí gelové filtrace. Vzorky frakcí z druhé ionexové chromatografie odpovídající PGA byly dodatečně analyzovány vedle sebe nativní elektroforézou. Z obrázku nativní elektroforézy je patrné, že ve frakcích dvojpíku postupně nahrazovala jedna izoforma PGA druhou izoformu. Pravděpodobně se izoformy liší pouze nábojem, neboť je nebylo možné pomocí SDS-PAGE separovat.

Jelikož nativní elektroforéza neposkytla v tomto případě dostatečné rozlišení izoform, byl finální důkaz o existenci izoform PGA proveden pomocí izoelektrické fokusace. Současně byly stanoveny také jejich izoelektrické body. Analýza byla provedena v gradientu pH v rozmezí přibližně 3-10. Na obr. 4.15 je vidět, že purifikovaný enzym vytvořil při fokusaci dva zřetelné proužky. Podle standardů pI bylo odhadnuto, že izoelektrický bod dvou izoform PGA byl přibližně 8,0 a 8,2. Výskyt více izoform enzymu je poměrně častý jev. U PGA z *E. coli* ATCC 11105 byl popsán výskyt dvou izoform s izoelektrickými body 6,3-6,4 a 6,7-6,8 (Kutzbach et al. 1974) a u PGA z *Alcaligenes faecalis*, jehož gen byl klonován do *E. coli* byly izolovány dvě aktivní izoformy s izoelektrickými body 5,3 a 5,5 (Ignatova et al. 1998). Obě izoformy izolované PGA byly porovnány z hlediska substrátové specifity pro hydrolýzu vybraných substrátů (tab. 4.7). Srovnáním bylo zjištěno, že jejich substrátová specifita se neliší, a tak byly obě izoformy PGA dále považovány za jeden enzym.

V rámci projektu byla opakovaně testována substrátová specifita enzymu. Pro tato stanovení byla použita směs obou izoform PGA. Průměrné hodnoty relativních aktivit vypočtených ze všech měření jsou uvedeny v tab. 4.6. Substrátová specifita nové PGA je parametrem, kterým se izolovaný enzym zcela zásadně lišil od publikovaných penicilinacylas. Díky této vlastnosti

se enzym nachází na pomezí skupin enzymů penicilin-G-acylas a α -aminoacidesterhydrolas. Nový enzym vykazoval téměř dvojnásobnou relativní rychlost (tab. 4.6) i k_{cat} (tab. 4.9) hydrolyzy semisyntetických β -laktamových antibiotik, které měly na α -uhlíku postranního acylu aminoskupinu (ampicilin 180 %, amoxicilin 176 %, cefalexin 184 %), než byla rychlost hydrolyzy přírodního penicilinu G (100 %), který nemá aminoskupinu na α -uhlíku acylu. Tato vlastnost je zcela unikátní a nebyla zatím popsána u žádné jiné penicilin-G-acylasy. Známé PGA vykazují pouze nízkou relativní aktivitu hydrolyzy ampicilinu v porovnání s hydrolyzou penicilinu G: 19 % (PGA z *E. coli*, Kutzbach et al. 1974), 25 % (PGA z *Proteus rettgeri*, Robak et al. 1981), 64 % (PGA PAS2 z přírodního kmene izolovaného z půdy, Gabor et al. 2005). Naopak enzymy ze skupiny α -aminoacidester-hydrolas, které se dříve také nazývaly ampicilinacylasy, dokáží hydrolyzovat pouze substráty, které mají na α -uhlíku postranního acylu aminoskupinu, a substráty, které tuto aminoskupinu postrádají, rozštěpit nedokáží vůbec (kap. 2.3.1, Kim et al. 1990, Polderman-Tijmes et al. 2002).

Srovnání krátkých aminokyselinových sekvencí nové PGA bylo provedeno se sekvencemi šesti známých PGA. Edmanovým štěpením byla získána pouze N-koncová aminokyselinová sekvence β -podjednotky o délce 20 aminokyselin. N-koncová sekvence α -podjednotky nebyla získána, neboť se nepodařilo připravit izolovanou α -podjednotku gelovou filtrací za denaturačních podmínek. Místo N-koncové sekvence α -podjednotky byla získána interní sekvence o délce 19 aminokyselin hmotnostní spektrometrií. Srovnání získaných aminokyselinových sekvencí se známými PGA je uvedeno na obr. 4.18. Interní aminokyselinová sekvence α -podjednotky je téměř identická (95% identita) se sekvencemi PGA z *A. faecalis*, *E. coli*, *K. citrophila* a *P. rettgeri*. Získaná interní sekvence odpovídala 55. až 73. aminokyselině sekvence α -podjednotky PGA z *E. coli*. Tato sekvence je shodou okolností vysoce konzervativní pro všechny PGA (Verhaert et al. 1997). Naopak získaná N-koncová sekvence β -podjednotky vykazovala pouze 55% identitu se sekvencí PGA z *P. rettgeri* a 50% identitu s PGA z *E. coli* a *K. citrophila* (290. až 309. aminokyselina). Nejdůležitější aminokyselina této krátké sekvence je serin, který je umístěn jako první v pořadí N-konce. Tato aminokyselina má zcela zásadní význam v aktivním místě všech PGA (kap. 2.5), neboť umožňuje vznik acyl-enzym intermediátu během hydrolyzy i syntézy β -laktamových antibiotik. Podobnost obou získaných sekvencí s jinými proteiny než s penicilin-G-acylasami nebyla nalezena.

V březnu 2002 byla do databáze NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) vložena kompletní nukleotidová sekvence prekurzoru penicilin-G-acylasy z bakterie *Achromobacter xylosoxidans* (přístupové číslo sekvence: AF490005; Zhu et al.). V této nukleotidové sekvenci, přeložené do aminokyselinové sekvence, byly nalezeny úseky, které byly na rozdíl od ostatních známých PGA 100% identické se získanými sekvencemi izolované PGA z *Achromobacter* sp. CCM 4824. Tato kompletní nukleotidová sekvence byla použita kolegy v Laboratoři enzymových technologií při lokalizování a následném klonování strukturního genu PGA z *Achromobacter* sp. CCM 4824. Strukturní gen PGA z *Achromobacter* sp. CCM 4824 byl nakonec klonován, sekvenován a uložen do databáze NCBI pod přístupovým kódem AAY25991 (Štěpánek V, Kyslík P 2005). Jelikož hledání a klonování strukturního genu nebylo součástí mé práce, jsou aminokyselinové sekvence PGA z obou kmenů *Achromobacter* uvedeny pouze ve formě přílohy k této dizertační práci. Porovnáním aminokyselinových sekvencí prekurzorů PGA bylo zjištěno, že PGA z *Achromobacter* sp. CCM 4824 vykazuje nejvyšší podobnost se sekvencí PGA z *Achromobacter xylosoxidans* (AF490005, 95% identita) a se sekvencí PGA označené jako PAS2 získané analýzou metagenomu půdního vzorku (Gabor et al. 2005, AAS87335, 82% identita). Podobnost s ostatními známými PGA byla následující: *Kluyvera citrophila* (P07941, 53% identita), *Escherichia coli* (P06875, 52% identita), *Providencia rettgeri* (A56681, 52% identita), *Alcaligenes faecalis* (AAD11517, 42% identita), *Arthrobacter viscosus* (AAA22077, 28% identita) a *Bacillus megaterium* (AAD45609, 28% identita).

O rok později po publikaci o vlastnostech nové PGA z *Achromobacter* sp. CCM 4824 (Škrob et al. 2003) byla publikována první práce zabývající se klonováním a charakterizací penicilin-G-acylasy z *Achromobacter xylosoxidans* (Cai et al. 2004). Strukturní gen PGA z bakterie *Achromobacter xylosoxidans* byl klonován do hostitele *Escherichia coli*. V publikaci autoři především poukázali na termostabilitu této nové PGA, kdy teplotní profil vykazoval nejvyšší aktivitu enzymu kolem 60 °C. Publikované molekulové hmotnosti podjednotek enzymu α a β (27,0 a 62,4 kDa) byly identické s hmotnostmi stanovenými hmotnostní spektrometrií podjednotek izolované PGA z *Achromobacter* sp. CCM 4824. Autoři se však v publikaci nezabývali substrátovou specifitou, která by byla pro srovnání obou PGA z bakterií rodu *Achromobacter* nejzajímavější.

V rámci charakterizace PGA z *Achromobacter* sp. CCM 4824 byl stanoven teplotní a pH profil hydrolytické aktivity enzymu. Použitým substrátem byl v obou případech NIPAB.

Teplotní profil byl stanoven v rozmezí teplot 20-70 °C. Z výsledků uvedených na obr. 4.19 vyplynulo, že maximální hydrolytickou aktivitu enzym vykazoval při 60 °C. Stejného výsledku dosáhli Cai et al. (2004) s PGA z *Achromobacter xylosoxidans*, kteří tvrdí, že tento enzym je termostabilnější než známé PGA: naměřili poločas degradace 55 min. při 55 °C a 8 min. při 60 °C. Za dosud nejvíce termostabilní PGA byl považován enzym z *Alcaligenes faecalis*, u něhož byl publikován poločas degradace 15 min. při 55 °C (Verhaert et al. 1997). Profil hydrolytické aktivity PGA z *Achromobacter* sp. CCM 4824 v závislosti na pH (rozsah hodnot pH 4-11) dokládá, že enzym vykazuje nejvyšší hydrolytickou aktivitu v širokém rozsahu pH 6,5-9,0 (obr. 4.20).

Kinetické parametry PGA z *Achromobacter* sp. CCM 4824 pro hydrolýzu vybraných přírodních a semisyntetických β -laktamových antibiotik byly stanoveny pomocí HPLC. Z naměřených dat byly spočítány konstanty Michaelise-Mentenové (K_m), limitní rychlosti (V_{lim}) a katalytické konstanty (k_{cat}). Pro výpočet katalytických konstant bylo využito známé hodnoty koncentrace aktivních center enzymu ($c^{akt. center}$) v roztoku enzymu, který byl použit pro stanovení kinetických parametrů. Koncentrace aktivních center byla stanovena titrační metodou pomocí inhibitoru PMSF. V tab. 4.8 jsou uvedeny hodnoty naměřených kinetických parametrů, které byly spočítány jak programem Enzfitter, tak pomocí dvojnásobně reciprokého výnosu podle Lineweaver-Burka. Z naměřených dat vyplývá, že přestože PGA dokázala rychleji štěpit semisyntetické substráty, které měly na α -uhlíku postranního acylu aminoskupinu (ampicilin, amoxicilin, cefalexin), vyšší afinitu enzym PGA (nižší K_m) vykazoval k substrátům bez aminoskupiny na α -uhlíku postranního acylu (penicilin G, penicilin V, deacetoxycefalosporin G). Naměřené limitní rychlosti korespondují se substrátovou specifitou PGA, která byla pro tyto substráty stanovena kolorimetrickou metodou (viz kap. 4.3.8). V tab. 4.9 je uvedeno srovnání kinetických parametrů hydrolýzy penicilinu G pro jednotlivé publikované PGA. Z tabulky je zřejmé, že nejvyšší afinitu (nejnižší K_m) k substrátu penicilinu G vykazoval enzym PGA z *Achromobacter* sp. CCM 4824. Strukturálně nejbližší enzym PGA z *Achromobacter xylosoxidans* měl nižší afinitu k substrátu, ale podstatně vyšší k_{cat} . Srovnání kinetických parametrů enzymů PGA pro další substráty nebylo provedeno, neboť v literatuře k tomu nebylo nalezeno dostatečné množství relevantních údajů.

V závěru této práce byly provedeny experimenty, které měly zjistit, zda nový enzym PGA z *Achromobacter* sp. CCM 4824 bude vhodný pro syntézu β -laktamových antibiotik typu ampicilin, amoxicilin, cefalexin. Pro účely modelové syntézy byla vybrána enzymová syntéza ampicilinu, jako zástupce řady semisyntetických β -laktamových antibiotik, který se vyrábí v celosvětově největším měřítku (tab. 2.2). Syntézy byly prováděny paralelně s enzymem PGA z *E. coli* RE3(pKA18), který již je průmyslově používán pro biotransformace β -laktamových antibiotik. V první řadě byla provedena optimalizace podmínek syntézy ampicilinu z 6-aminopenicilanové kyseliny (6-APA, nukleofil) a D-fenylglycin methylesteru (PGME, donor acylu) s cílem zajistit maximální S/H poměr (poměr rychlosti syntézy ampicilinu k souhrnné rychlosti hydrolyzy ampicilinu a D-fenylglycin methylesteru, kap. 2.6.2). V rámci optimalizace podmínek syntézy ampicilinu bylo zjištěno, že pro oba enzymy byl dosažen nejvyšší S/H poměr při pH 7,0 a 7,5. Dále bylo zjištěno, že S/H poměr vzrůstá se snižující se teplotou při reakci. Bohužel se snižující se teplotou se značně snižovala i aktivita enzymu. Vhodné podmínky pro syntézu ampicilinu byly proto zvoleny na základě kompromisu takto: pH 7,0 a $t = 15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Za těchto podmínek byl naměřen S/H = 3,9 pro PGA z *Achromobacter* sp. CCM 4824 a S/H = 1,7 pro PGA z *E. coli* RE3(pKA18). V tab. 2.3 jsou uvedeny pro srovnání S/H poměry pro syntézu ampicilinu čtyř významných PGA, které byly publikovány (Hernandez-Jústiz et al. 1999). Hodnoty parametru však byly měřeny za odlišných podmínek. Srovnáním publikovaných hodnot v tabulce s výsledky uvedenými na obr. 4.26 – 4.29 lze vyčíst, že PGA z *Achromobacter* sp. CCM 4824 svou hodnotou parametru S/H = 6,2 (při pH 7,5 a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) převyšuje ostatní PGA. S/H poměr je základním parametrem pro efektivitu syntézy ampicilinu katalyzovanou PGA. Optimální podmínky byly následně ověřeny při enzymových syntézách ampicilinu, které byly vedeny až za koncentrační maximum ampicilinu v reakční směsi. Syntézy byly provedeny opět s oběma enzymy (PGA z *Achromobacter* sp. CCM 4824 a *E. coli* RE3(pKA18)) ve dvou odlišných experimentálních přístupech lišících se koncentrací vstupních reaktantů. První experimentální uspořádání bylo provedeno s nízkou výchozí koncentrací reaktantů ($c^{\text{PGME}} = 50\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $c^{6\text{-APA}} = 50\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), aby nedocházelo k precipitaci vznikajícího produktu (ampicilinu) a tím i k posunu chemické rovnováhy. Na obr. 4.30 a 4.31 jsou uvedeny průběhy syntéz. Z obrázků je patrné, že bez jakéhokoliv posuvu chemické rovnováhy PGA z *Achromobacter* sp. CCM 4824 vyprodukovala vyšší koncentraci ampicilinu v maximu ($20,7\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, výtěžek 37,9 %) než PGA z *E. coli* RE3(pKA18) ($15,5\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, výtěžek 29,2 %). Navíc bylo pozorováno, že PGA z *Achromobacter* sp. CCM 4824 zřetelně pomaleji katalyzuje zpětnou hydrolyzu (po dosažení

koncentračního maxima) ampicilinu na 6-APA a fenylglycin. Důvodem je vyšší S/H poměr enzymu, který vyjadřuje poměr rychlosti syntézy ampicilinu k rychlosti hydrolyzy aktivovaného acylu PGME a ampicilinu. Další syntézy byly provedeny v reakční směsi s podstatně vyššími koncentracemi reaktantů než v předchozím případě ($c^{\text{PGME}} = 1050 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $c^{6\text{-APA}} = 750 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), kdy při reakci koncentrace ampicilinu rychle přesáhla hranici rozpustnosti ($c^{\text{AMP}} \sim 20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) a precipitující ampicilin posunul chemickou rovnováhu ve směru syntézy. Při syntéze ampicilinu pomocí rozpustného enzymu PGA z *Achromobacter* sp. CCM 4824 bylo dosaženo kinetické maximum koncentrace ampicilinu $589 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, jež odpovídalo výtěžku 78,5 %. Při syntéze s rozpustným enzymem PGA z *E. coli* RE3(pKA18) došlo v takto extrémních koncentracích reaktantů k rychlé denaturaci enzymu a reakce se brzy po spuštění sama zastavila. Kvůli zvýšené denaturaci PGA z *E. coli* RE3(pKA18) byly počáteční koncentrace reaktantů sníženy ($c^{\text{PGME}} = 700 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $c^{6\text{-APA}} = 500 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), aby mohlo být provedeno srovnání obou enzymů. Za těchto podmínek byl naměřen maximální výtěžek ampicilinu 79,4 % při použití PGA z *Achromobacter* sp. CCM 4824 a 68,9 % při použití PGA z *E. coli* RE3(pKA18). Youshko et al. (2000, 2001, 2002), podle kterých byly tyto syntézy navrženy, udávají, že dosáhli celkového výtěžku ampicilinu více než 90 % (vztaženo na vstupní množství 6-APA). Ze srovnání obou enzymů PGA při syntézách ampicilinu lze říci, že nový enzym PGA z *Achromobacter* sp. CCM 4824 při katalýze dosahoval vyšších výtěžků ampicilinu a vykazoval vyšší odolnost vůči denaturaci oproti průmyslově používanému enzymu PGA z *E. coli*.

V této fázi moje účast na řešení projektu studia nových enzymů pro biotransformace β -laktamových antibiotik skončila. Kvůli velice slibným vlastnostem nové penicilin-G-acylasy z *Achromobacter* sp. CCM 4824 projekt pokračuje: byl připraven vysoko produkční bakteriální expresní systém produkující novou penicilin-G-acylasu a navržen proces enzymové syntézy β -laktamových antibiotik. Nová penicilin-G-acylasa je v imobilizované formě testována pro použití v průmyslovém měřítku farmaceutickou firmou v Indii pro přípravu antibiotik typu ampicilin, amoxicilin a cefalexin.

6. Závěr

1. Kultivací bakteriálního kmene *Achromobacter* sp. CCM 4824 v bioreaktoru byla získána biomasa s penicilinacylasovou aktivitou jako výchozí materiál pro purifikaci enzymu. Specifická aktivita biomasy měřená se substrátem penicilin G byla $19 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny.
2. Byla vyvinuta metoda purifikace nové PGA. Specifická aktivita purifikovaného enzymu byla kolem $30 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteinu s celkovým výtěžkem kolem 10 % a stupněm přečištění kolem 300.
3. Bylo zjištěno, že purifikovaný enzym se skládá ze dvou nekovalentně spojených, nestejně velkých podjednotek α a β . Přesné molekulové hmotnosti obou podjednotek byly stanoveny pomocí hmotnostní spektrometrické analýzy: $\alpha = 27,02 \text{ kDa}$ a $\beta = 62,45 \text{ kDa}$. Molekulová hmotnost β -podjednotky přibližně odpovídá hmotnostem β -podjednotek známých PGA, naopak menší α -podjednotka svou molekulovou hmotností α -podjednotky známých PGA převyšuje přibližně o 3 kDa.
4. Pomocí nativní elektroforézy a izoelektrické fokusace bylo zjištěno, že purifikovaná PGA obsahovala dvě izoformy o izoelektrických bodech pI 8,0 a 8,2. Substrátová specifita obou izoform byla stejná, proto byla směs izoform považována za jeden enzym.
5. Nový enzym se od známých PGA odlišuje svojí substrátovou specifitou: hydrolyzuje téměř dvojnásobnou rychlostí semisyntetická β -laktamová antibiotika, která mají na α -uhlíku postranního acylu aminoskupinu (ampicilin 180 %, amoxicilin 176 %, cefalexin 184 %) než přírodní penicilin G (100 %). Známé PGA hydrolyzují nejvyšší rychlostí penicilin G.
6. Porovnáním aminokyselinových sekvencí preproproteinů (prekurzorů) PGA bylo zjištěno, že PGA z *Achromobacter* sp. CCM 4824 byla nejvíce podobná sekvenci PGA z *Achromobacter xylosoxidans* (95% identita) a sekvenci PGA označené jako PAS2, která byla detekována v metagenomu půdního vzorku (82% identita).

Podobnost s ostatními známými PGA je následující: *Kluyvera citrophila* (53% identita), *Escherichia coli* (52% identita), *Providencia rettgeri* (52% identita), *Alcaligenes faecalis* (42% identita), *Arthrobacter viscosus* (28% identita) a *Bacillus megaterium* (28% identita).

7. PGA z *Achromobacter* sp. CCM 4824 vykazovala nejvyšší hydrolytickou aktivitu při 60 °C shodně jako strukturně nejbližší enzym PGA z *Achromobacter xylosoxidans*. Ten považovali autoři Cai et al. za nejvíce termostabilní PGA.
8. Kinetické parametry PGA purifikované z *Achromobacter* sp. CCM 4824 byly stanoveny pro hydrolýzu vybraných přírodních a semisyntetických β -laktamových antibiotik. Z naměřených dat vyplynulo, že přestože nová PGA dokáže rychleji štěpit semisyntetické substráty, které mají na α -uhlíku postranního acylu aminoskupinu (ampicilin, amoxicilin, cefalexin), enzym PGA má vyšší afinitu k substrátům bez této aminoskupiny (penicilin G, penicilin V, deacetoxycefalosporin G).
9. Nová PGA z *Achromobacter* sp. CCM 4824 vykazovala výhodné vlastnosti pro enzymovou syntézu ampicilinu z 6-aminopenicilanové kyseliny a D-fenylglycin metylesteru. Purifikovaný enzym PGA z *Achromobacter* sp. CCM 4824 byl stabilní během syntézy i při extrémní koncentraci reaktantů. Za stejných podmínek syntézy ampicilinu pomocí enzymů PGA z *Achromobacter* sp. a *E. coli* vykazoval enzym z *Achromobacter* sp. přibližně o 10 % vyšší výtěžek antibiotika.
10. Díky novým vlastnostem PGA z *Achromobacter* sp. CCM 4824 projevil o tento enzym zájem farmaceutický průmysl. Rekombinantní PGA je v současnosti testována pro průmyslové využití.

7. Seznam použité literatury

- Aguirre C, Toledo M, Medina V, Illanes A (2002) Effect of cosolvent and pH on the kinetically controlled synthesis of cephalixin with immobilised penicillin acylase. *Process Biochem* 38: 351-360
- Alkema WBL, Floris R, Janssen DB (1999) The Use of Chromogenic Reference Substrates for the Kinetic Analysis of Penicillin Acylase. *Anal Biochem* 275:47-53
- Alvaro G, Fernández-Lafuente R, Rosell CM, Blanco RM, García-López JL, Guisan JM (1992) Penicillin G acylase from *Kluyvera citrophila* new choice as industrial enzyme. *Biotechnol Lett* 14:285-290
- Balasingham K, Warburton D, Dunnill P, Lilly MD (1972) The isolation and kinetics of penicillin amidase from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 276:250-256
- Bečka S, Škrob F, Plháčková K, Kujan P, Holler P, Kyslík P (2003) Cross-linked cell aggregates of *Trigonopsis variabilis*: D-amino acid oxidase catalyst for oxidation of cephalosporin C. *Biotechnol Lett* 25:227-233
- Böck A, Wirth R, Schmid G, Schumecher G, Lang G, Buckel P (1983) The two subunits of penicillin acylase are processed from a common precursor. *FEMS Microbiol Lett* 20:141-144
- Bruggink A, Ross EC, de Vroom E (1998) Penicillin Acylase in the Industrial Production of β -Lactam Antibiotics. *Org Process Res Dev* 2:128-133
- Bruggink A, Roy PD (2001) Industrial Synthesis of Semisynthetic Antibiotics. In: Bruggink A (ed) *Synthesis of β -lactam antibiotics. Chemistry, Biocatalysis & Process Integration*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 13-27

- Cai G, Zhu S, Yang S, Zhao G, Jiang W (2004) Cloning, Overexpression, and Characterization of a Novel Thermostable Penicillin G Acylase from *Achromobacter xylosoxidans*: Probing the Molecular Basis for Its High Thermostability. *Appl Environ Microbiol* 70:2764-2770
- Duggleby HJ, Tolley SP, Hill CP, Dodson EJ, Dodson G, Moody PC (1995) Penicillin acylase has a single-amino-acid catalytic centre. *Nature* 373:264-268
- Erarslan A, Dağaçan L, Güray A, Terzi I, Bermek E (1989) Purification and kinetic properties of penicillin acylase from *Escherichia coli* ATCC 11105. *DOĞA TU J Biol* 8-13
- Faarup P (1977) Method of preparing a sparingly soluble complex of cephalixin. Novo Industri A/S (DK). US Patent No. 4,003,896
- Fernández-Lafuente R, Hernández-Jústiz O, Mateo C, Terreni M, Fernández-Lorente G, Moreno MA, Alonso J, García-López JL, Guisán JM (2001) Biotransformations Catalyzed by Multimeric Enzymes: Stabilization of Tetrameric Ampicillin Acylase Permits the Optimization of Ampicillin Synthesis under Dissociation Conditions. *Biomacromolecules* 2:95-104
- Gabor EM, Janssen DB, de Vries EJ (2004) Penicillin Acylase. World Patent No. 111241
- Gabor EM, de Vries EJ, Janssen DB (2005) A novel penicillin acylase from the environmental gene pool with improved synthetic properties. *Enzyme Microb Technol* 36:182-190
- Hernández-Jústiz O, Terreni M, Pagani G, García JL, Guisán JM, Fernández-Lafuente R (1999) Evaluation of different enzymes as catalysts for the production of β -lactam antibiotics following a kinetically controlled strategy. *Enzyme Microb Technol* 25:336-343
- Ignatova Z, Stoeva S, Galunsky B, Hörnle C, Nurk A, Piotraschke E, Voelter W, Kasche V (1998) Proteolytic processing of penicillin amidase from *Alcaligenes faecalis* cloned in *E. coli* yields several active forms. *Biotechnol Lett* 20:977-982

- Illanes A, Fajardo A (2001) Kinetically controlled synthesis of ampicillin with immobilized penicillin acylase in the presence of organic cosolvents. *J Mol Catal B Enzym* 11:587-595
- Kasche V, Lummer K, Nurk A, Piotraschke E, Rieks A, Stoeva S, Voelter W (1999) Intramolecular autoproteolysis initiates the maturation of penicillin amidase from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 1433:76-86
- Kim DJ, Byun SM (1990) Purification and properties of ampicillin acylase from *Pseudomonas melanogenum*. *Biochim Biophys Acta* 1040:12-18
- Kim MG, Lee SB (1996) Effect of organic solvents on penicillin acylase-catalyzed reactions: interaction of organic solvents with enzymes. *J Mol Catal B Enzym* 1:181-190
- Kim MG, Lee SB (1996) Penicillin acylase-catalyzed synthesis of β -lactam antibiotics in water-methanol mixtures: effect of cosolvent content and chemical nature of substrate on reaction rates and yields. *J Mol Catal B Enzym* 1:201-211
- Konstantinović M, Marjanović N, Ljubijankić G, Glišin V (1994) The penicillin amidase of *Arthrobacter viscosus* (ATCC 15294). *Gene* 143:79-83
- Kutzbach C, Rauenbusch E (1974) Preparation and General Properties of Crystalline Penicillin Acylase from *Escherichia coli* ATCC 11105. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 354:45-53
- Låås T (1998) Isoelectric Focusing. In: Janson JCh, Rydén L (eds) *Protein Purification: Principles, High-Resolution Methods, and Applications*. Wiley-VCH, New York, pp 495-528
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- van Langen LM, de Vroom E, van Rantwijk F, Sheldon R (1999) Enzymatic synthesis of β -lactam antibiotics using penicillin-G acylase in frozen media. *FEBS Lett* 456:89-92

- Margolin AL, Švedas VK, Berezin IV (1980) Substrate specificity of penicillin amidase from *E. coli*. *Biochim Biophys Acta* 616:283-289
- Matsuda A, Matsuyama K, Yamamoto K, Ichikawa S, Komatsu KI (1987) Cloning and characterization of the genes for two distinct cephalosporin acylases from a *Pseudomonas* strain. *J Bacteriol* 169:5815-5820
- McDonough MA, Klei HE, Kelly JA (1999) Crystal structure of penicillin G acylase from the Bro1 mutant strain of *Providencia rettgeri*. *Protein Sci* 8:1971-1981
- Parmar A, Kumar H, Marwaha SS, Kennedy JF (2000) Advances in enzymatic transformation of penicillins to 6-aminopenicillanic acid (6-APA). *Biotechnol Adv* 18:289-301
- Plháčková K, Bečka S, Škrob F, Kyslík P (2003) Isolation and characterization of a new strain of *Achromobacter* sp. with β -lactam antibiotic acylase activity. *Appl Microbiol Biotechnol* 62:507-516
- Plháčková K, Kyslík P, Bečka S, Sobotková I (2002) The strain of microorganism *Comamonas testosteroni* CCM 4824. Český patent č. 291 154
- Polderman-Tijmes JJ, Jekel PA, de Vries EJ, van Merode AEJ, Floris R, van der Laan JM, Sonke T, Janssen DB (2002) Cloning, Sequence Analysis, and Expression in *Escherichia coli* of the Gene Encoding an α -Amino Acid Ester Hydrolase from *Acetobacter turbidans*. *Appl Environ Microbiol* 68:211-218
- Pundle A, SivaRaman H (1997) *Bacillus sphaericus* Penicillin V Acylase: Purification, Substrate Specificity, and Active-Site Characterization. *Current Microbiol* 34:144-148
- Reisfeld RA, Lewis UJ, Williams DE (1962) Disk Electrophoresis of Basic Proteins and Peptides on Polyacrylamide Gels. *Nature* 195: 281-283
- Roa A, Castillon MP, Goble ML, Virden R, Garcia JL (1995) New insight on the specificity of penicillin acylase. *Biochem Biophys Res Commun* 206:629-636

- Robak M, Szewczuk A (1981) Penicillin amidase from *Proteus rettgeri*. *Acta Biochim Pol* 28:275-284
- Senthilvel SG, Pai JS (1996) Purification of penicillin acylase of *Bacillus megaterium*. *Biotechnol Tech* 10:611-614
- Sheldon RA, van Rantwijk F, van Langen LM, Wegman MA, Cao L, Janssen MHA (2001) Biocatalysts and Biocatalysis in the Synthesis of β -Lactam Antibiotics. In: Bruggink A (ed) *Synthesis of β -lactam antibiotics. Chemistry, Biocatalysis & Process Integration*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 103-149
- Shewale JG, Sudhakaran VK (1997) Penicillin V acylase: its potential in the production of 6-aminopenicillanic acid. *Enzyme Microb Technol* 20:402-410
- Sizmann D, Keilmann C, Böck A (1990) Primary structure requirements for the maturation *in vivo* of penicillin acylase from *Escherichia coli* ATCC 11105. *Eur J Biochem* 192:143-151
- Schroën CGPH, Fretz CB, DeBruin VH, Berendsen W, Moody HM, Roos EC, VanRoon JL, Kroon PJ, Strubel M, Janssen AEM, Tramper J (2002) Modeling of the Enzymatic Kinetically Controlled Synthesis of Cephalexin. *Biotechnol Bioeng* 80:331-340
- Sio CF, Quax WJ (2004) Improved β -lactam acylases and their use as industrial biocatalysts. *Curr Op Biorechnol* 15:349-355
- Sobotková L, Štěpánek V, Plháčková K, Kyslík P (1996) Development of a high-expression system for penicillin G acylase based on the recombinant *Escherichia coli* strain RE3(pKA18). *Enzyme Microb Technol* 19:389-397
- Sudhakaran VK, Deshpande BS, Ambedkar SS, Shewale JG (1992) Molecular Aspects of Penicillin and Cephalosporin Acylases. *Process Biochem* 27:131-143

- Škrob F, Bečka S, Plháčková K, Fotopulosová V, Kyslík P (2003) Novel penicillin G acylase from *Achromobacter* sp. CCM 4824. *Enzyme Microb Technol* 32:738-744
- Štěpánek V, Hollerová L, Jáňová H, Plháčková K (2004) Cloning and characterization of a novel penicillin G acylase gene from *Achromobacter* sp. and its expression in *Escherichia coli*. (in) 23rd Congress of Czechoslovak Society for Microbiology
- Švedas VK, Margolin AL, Sherstiuk SF, Klyosov AA, Berezin IV (1977) Inactivation of soluble and immobilized penicillin amidase from *E. coli* by phenylmethylsulphonylfluoride: kinetic analysis and titration of the active sites. *Bioorg Khim* 3:546-553
- Švedas VK, Savchenko MV, Beltser AI, Guranda DF (1996) Enantioselective penicillin acylase-catalyzed reactions. Factors governing substrate and stereospecificity of the enzyme. *Ann NY Acad Sci* 799:659-669
- Švedas V, Guranda D, van Langen L, van Rantwijk F, Sheldon R (1997) Kinetic study of penicillin acylase from *Alcaligenes faecalis*. *FEBS Lett* 417:414-418
- Torres-Guzmán R, de la Mata I, Torres-Bacete J, Arroyo M, Castellón MP, Acebal C (2002) Substrate Specificity of Penicillin Acylase from *Streptomyces lavendulae*. *Biochem Biophys Res Commun* 291:593-597
- Valle F, Balbás P, Merino E, Bolivar F (1991) The role of penicillin amidases in nature and in industry. *Trends Biochem* 16:36-40
- Verhaert RMD, Riemens AM, van der Laan JM, van Duin Jan, Quax WJ (1997) Molecular Cloning and Analysis of the Gene Encoding the Thermostable Penicillin G Acylase from *Alcaligenes faecalis*. *Appl Environ Microbiol.* 63:3412-3418
- van der Wielen LAM, Ottens M, Straathof AJJ (2001) Process Technology and Process Integration in the Preparation of Penicillins. In: Bruggink A (ed) *Synthesis of β -lactam antibiotics. Chemistry, Biocatalysis & Process Integration*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 153-205

Youshko MI, van Langen LM, de Vroom E, Moody HM, van Rantwijk F, Sheldon RA, Švedas VK (2000) Penicillin acylase-catalysed synthesis of ampicillin in “aqueous solution-precipitate” systems. High substrate concentration and supersaturation effect. *J Mol Catal B Enzym* 10:509-515

Youshko MI, van Langen LM, de Vroom E, van Rantwijk F, Sheldon RA, Švedas VK (2001) Highly Efficient Synthesis of Ampicillin in an “Aqueous Solution-Precipitate” System: Repetitive Addition of Substrates in Semicontinuous Process. *Biotechnol Bioeng* 73:426-430

Youshko MI, van Langen LM, de Vroom E, van Rantwijk F, Sheldon RA, Švedas VK (2002) Penicillin Acylase-Catalyzed Ampicillin Synthesis Using a pH Gradient: A New Approach to Optimization. *Biotechnol Bioeng* 78:589-593

Zwanenburg B, Kemperman GJ, Zhu J, de Gelder R, Dommerholt FJ, Titulaer GTM, Keltjens R, Klunder AJH (2001) Molecular Precision in the Chemistry of Cephalosporin type Antibiotics. In: Bruggink A (ed) *Synthesis of β -lactam antibiotics. Chemistry, Biocatalysis & Process Integration*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 57-101

8. Seznam použitých zkratek

6-APA	6-aminopenicilanová kyselina
7-ACA	7-aminocefalosporanová kyselina
7-ADCA	7-aminodeacetoxycefalosporanová kyselina
16S rRNA	ribonukleová kyselina ribozomální podjednotky 16S
A	aktivita
AEH	α -aminoacidesterhydrolasa
CCM	Czech Collection of Microorganisms
DAB	<i>p</i> -dimethylaminobenzaldehyd
DAO	oxidasa-D-aminokyselin
FOK	fenyloctová kyselina
GAC	glutaryl-7-ACA-acylasa
HPLC	vysoko účinný (tlaký) kapalinový chromatograf
IEF	izoelektrická fokusace
kDa	kilodalton
MALDI-TOF	matrix-assisted laser desorption/ionisation reflectron time-of-flight
mAU	miliabsorpční jednotka
MW	molekulová hmotnost
NIPAB	6-nitro-3-fenylacetylamidobenzoová kyselina
OD	optická densita suspenze buněk
PA	penicilinacylasa
PGA	penicilin-G-acylasa
pI	izoelektrický bod
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid
PVA	penicilin-V-acylasa
rpm	otáčky za minutu (revolutions per minute)
SA	specifická aktivita
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	dodecylsulfátová elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
S/H	poměr syntetické a hydrolytické aktivity
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamin
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	jednotka enzymové aktivity (1U = 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$)
v/v	znamená, že procenta jsou vyjádřena jako objem v objemu
w/v	znamená, že procenta jsou vyjádřena jako hmotnost v objemu

9. Příloha

Srovnání aminokyselinových sekvencí penicilin-G-acylas

Tučně vyznačené aminokyseliny jsou identické se sekvencemi získanými při charakterizaci PGA z *Achromobacter* sp. CCM 4824.

Achromobacter sp. CCM 4824 (AAY25991)

1	MKQQWLSAAL	LAASSCLPAM	AAQPVAPAAG	QTSEAVAARP	QTADGKVITIR	RDAYGMPHVY	60
61	ADTVYGIIFYG	YGYAVAQDRL	FQMEMARRST	QGRVAEVLGA	SMVGFDKSIR	ANFSPERIQR	120
121	QLAALPAADR	QVLDGYAAGM	NAWLARVRAQ	PGQLMPKEFN	DLGFAPADWT	AYDVAMIFVG	180
181	TMANRFS DAN	SEIDNLALLT	ALKDRHGAAD	AMRIFNQLRW	LTDSRAPTTV	PAEAGSYQPP	240
241	VFQPDGADPL	AYALPRYDGT	PPMLERVVDR	PATRGVVDGA	PATLRAQLAA	QYAQSGQPGI	300
301	AGFPPT SNMW	IVGRDHAKDA	RSILLNGPQF	GWWNPAYTYG	IGLHGAGFDV	VGNTPFAYPS	360
361	ILFGHNAHVT	WGSTAGFGDD	VDIFAEKLDP	ADRTRYFHGD	QWKTLEKRTD	LILVKDAAAPV	420
421	TLDVYRSVHG	LIVKFDDAQH	VAYAKARAWE	GYELQSLMAW	TRKTQSANWE	QWKAQAARHA	480
481	LTINWYYADD	RGNIGYAHTG	FYPRRRPGHD	PRLPVPGTGE	MDWLGLLPFS	TNPQVYNPRQ	540
541	GFIANWNNQP	MRGYPSTDLF	AIVWGQADRY	AEIETRLKAM	TANGGKVSAQ	QMWDLIRTTT	600
601	YADVNRHFL	PFLQRAVQGL	PADDPVRVRLV	AGLAAWDGMM	TSERQPGYFD	NAGPAVMDAW	660
661	LRAMLRRTLA	DEMPADFFKW	YSATGYPTPQ	APATGSLNLT	TGVKVLFNAL	AGPEAGVPQR	720
721	YDFFNARAD	DVILAALDDA	LAALRQAYGQ	DPAAWKIPAP	PMVFAPKNFL	GVPQADAKAV	780
781	LCYRATQNRG	TENNMTVFDG	KSVRAVDVVA	PGQSGFVAPD	GTPSPHTRDQ	FDLYNTFGSK	840
841	RVWFTADEV R	RNATSEETLR	YPR				

Achromobacter xylosoxidans (AF490005)

1	MAQPVAQAAG	QESAAVAAPA	QGAAGKVITIR	RDAHGMHVY	ADTVYGIIFYG	YGYAVAQDRL	60
61	FQMEMARRST	QGRVAEVLGA	SMVAFDKSIR	GNFSPERIQR	QLAALPAADR	QVLDGYAAGM	120
121	NAWLARIRAQ	PGQLMPKEFN	DLGFAPADWT	AYDVAMIFIG	TMANRFS DAN	SEIDNLALLT	180
181	ALKDRHGEAE	AMRIFNQLRW	LTDSRAPTTV	PPQEGSYQPA	VFQPEGAEQL	AYALPRYDGT	240
241	PPMLERVVDR	PATRGVVDGA	PATLRARLAE	QYAQSGQPGI	AGFPPT SNMW	IVGRDHAKDA	300
301	RSILLNGPQF	GWWNPAYTYG	IGLHGAGFDV	VGNTPFAYPS	ILFGHNAHVA	WGSTAGFGDD	360
361	VDIYAEKLDP	ADRTRYFHGD	QWKTLEKRTD	LILVKDAAAPV	TLDVYRSVHG	LIVKFDDAQH	420
421	VAYAKARAWE	GFELQSLMAW	TRKTQSANWE	QWKTQAARHA	LTINWYYADD	RGNIGYAHTG	480
481	FYPRRRPGHD	PRLPVPGTGE	MDWLGLLPFS	TNPQVYNPGQ	GFIANWNNQP	MRGYPSTDLF	540
541	AIVWGQADRY	AEIETRLKAM	TANGGKVSPQ	QMWDLIRTTT	YADVNRHFL	PFLQRAVQGL	600
601	PADDPVRVRLV	AGLGGWDGMM	TSEREPGYD	NAGPAVMDAW	LRAMLKRTLA	DEMPADFFKW	660
661	YSATGYPTPQ	APATGSLNLT	TGVKVLFNAL	AGPAAGVPQR	YDFFNARAD	DVILAALDDA	720
721	LAALRQAYGK	DPAAWKIPAP	PMVFAPKNFL	GVPQADAKAV	LSYPATQNRG	TENNMTVFDG	780
781	KSVRAVDVVA	PGQSGFVAPD	GTPSPHTRDQ	FDLYNSFGSK	RVWFTADEV R	RNATSEETLR	840
841	YRR						

Escherichia coli (P06875)

1	MKNRNRMIVN	CVTASLMYYW	SIPALAEQSS	SEIKIVRDEY	GMPHIYANDT	WHLFYGYGYV	60
61	VAQDRLFQME	MARRSTQGTV	AEVLGKDFVK	FDKDIRRNYW	PDAIRAQIAA	LSPEDMSILQ	120
121	GYADGMNAWI	DKVNTNPETL	LPKQFNTFGF	TPKRWEFPDV	AMIFVGTMAN	RFSDDSTSEID	180
181	NLALLTALKD	KYGVSQGMAV	FNQLKWLVP	SAPTTIAVQE	SNYPLKFNQQ	NSQTAALLPR	240
241	YDLPAPMLDR	PAKGADGALL	ALTAGKNRET	IAAQFAQGGG	NGLAGYPTTS	NMWVIGSKA	300
301	QDAKAIMVNG	PQFGWYAPAY	TYGIGLHGAG	YDVTGNTPPA	YPGLVFGHNG	VISWGSTAGF	360
361	GDDVDIFAER	LSAEKPGYYL	HNGKWKMLL	REETITVKNQ	QAETFTVWRT	VHGNIQTQDQ	420
421	TTQTAYAKSR	AWDGKEVASL	LAWTHQMKAK	NWQEWTTQAA	KQALTNWYY	ADVNGNIGYV	480
481	HTGAYPDRQS	GHDPRLPVPG	TGKWDWKGLL	PFEMNPKVYN	PQSGYIANWN	NSPQKDY PAS	540
541	DLFAFLWGGA	DRVTEIDRLL	EQKPRLTADQ	AWDVIRQTSR	QDLNLRFLFLP	TLQAATSGLT	600
601	QSDPRRQLVE	TLTRWDGINL	LNDDGKTWQQ	PGSAILNVWL	TSMLKRTVVA	AVPMPFDK WY	660
661	SASGYETTQD	GPTGSLNISV	GAKILYEAVQ	GDKSPIPQAV	DLFAGKPPQE	VVLAAL EDTW	720
721	ETLSKRYGNN	VSNWKT PAMA	LTFRANFFG	VPQAAAEEETR	HQAEYQNRGT	ENDMIVFSPT	780
781	TSDRPVLAWD	VVAPGQSGFI	APDGTVDKHY	EDQLKMYENF	GRKSLWLTQ	DVEAHKESQE	840
841	VLHVQR						