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 $U \cdot g^{-1}$ sušiny.

2. Byla vyvinuta metoda purifikace nové PGA. Specifická aktivita purifikovaného enzymu byla kolem 30 $U \cdot mg^{-1}$ 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: α = 27,02 kDa a β = 62,45 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 izoforem byla stejná, proto byla směs izoforem 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 *Bacilus 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.