

Vedecká rada Fakulty biotechnológie a potravinárstva  
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

Ing. Eva Szabová

**Optimalizácia produkcie bakteriálnej peptidázy a jej purifikácia  
chromatografickými metódami**

Autoreferát dizertačnej práce na získanie vedecko-akademickej hodnosti  
*philosophiae doctor* vo vednom odbore doktorandského štúdia: 29 – 07 – 9  
Biotechnológia

Nitra 2006

Dizertačná práca bola vypracovaná v externej forme doktorandského štúdia na Katedre biochémie a biotechnológie Fakulty biotechnológie a potravinárstva Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre.

Doktorand: Ing. Eva Szabová  
Katedra biochémie a biotechnológie  
Fakulta biotechnológie a potravinárstva  
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

Vedúci dizertačnej práce: prof. Ing. Ivan Michalík, DrSc.  
Katedra biochémie a biotechnológie  
Fakulta biotechnológie a potravinárstva  
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

Oponenti: prof. Ing. Ján Šajbidor, DrSc.  
Fakulta chemickej a potravinárskej technológie  
Slovenská technická univerzita, Bratislava

prof. Ing. Ján Blahovec, CSc.  
Katedra chémie, biológie a biochémie  
Univerzita veterinárneho lekárstva, Košice

Ing. Vladimír Sitkey, PhD.  
LikoSpol, a.s., Bratislava

Autoreferát bol rozoslaný dňa.....

Stanovisko k dizertácii vypracovala Katedra biochémie a biotechnológie FBP SPU v Nitre.

Obhajoba doktorandskej práce sa koná dňa ..... o ..... hodine pred komisiou pre obhajobu dizertačných prác vedného odboru 29 – 07 – 9 Biotechnológia na Fakulte biotechnológie a potravinárstva SPU v Nitre vymenovanou predsedom odborovej komisie dňa.....

Miesto konania: Katedra biochémie a biotechnológie  
Fakulta biotechnológie a potravinárstva  
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre  
Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra  
Miestnosť: zasadačka katedry

S dizertačnou prácou sa možno oboznámiť na dekanáte Fakulty biotechnológie a potravinárstva SPU v Nitre.

prof. Ing. Jozef Augustín, DrSc.  
Predseda komisie pre obhajoby dizertačných prác vo vednom odbore  
**Biotechnológia 29 – 07 – 9**  
Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave

## 1. ÚVOD

Moderné biologické technológie predstavujú novú fázu využívania biochemického potenciálu organizmov, najmä mikroorganizmov a ich súčastí, v najrozmanitejších oblastiach ľudskej činnosti. Môžu mnohonásobne zvyšovať produktivitu výroby, inovovať priemyselné výrobky a umožňujú veľkoobjemovú produkciu látok, ktoré boli v minulosti vyrábané iba v malých množstvách na výskumné účely. Cestou k možnosti využívania biologických procesov boli predovšetkým objavy biochémie, genetiky a mikrobiológie v 60. a 70. rokoch 20. storočia.

V rámci potravinárskeho priemyslu sa biotechnologické postupy uplatňujú najmä v kvasnom, mliekárenskom, pekárskom a škrobárenskom priemysle, pri niektorých konzervárenských technológiách, pri výrobe alkoholických a nealkoholických nápojov, ale aj v textilnom a papierenskom priemysle, pri výrobe detergentov a v kŕmnych zmesiach pre hospodárske zvieratá. Základom všetkých týchto biotechnologických postupov je využitie enzýmových systémov produkčných mikroorganizmov (kvasiniek, baktérií, vláknitých húb) na požadovanú premenu východiskových surovín alebo zlepšenie kvality už jestvujúcich produktov.

## 2. PREHĽAD O SÚČASNOM STAVE RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

### 2.1 CHARAKTERISTIKA PROTEOLYTICKÝCH ENZÝMOV

Proteolytické enzýmy tvoria súčasť 3. triedy enzýmov, t.j. hydroláz, a katalyzujú štiepenie peptidových väzieb rôznych bielkovín. Rýchlosť a špecificita štiepenia peptidových väzieb závisí od aktivity enzýmu a zároveň od aktuálnej štruktúry polypeptidového substrátu (Škárka a Ferenčík, 1992).

Peptidázy sú rozdelené do dvoch hlavných skupín v závislosti od miesta ich účinku na *exopeptidázy* a *endopeptidázy* a z hľadiska štruktúry katalytického centra na serínové, cysteínové, aspartátové, metalopeptidázy a zatiaľ neklasifikované peptidázy.

Serínové peptidázy tvoria najrozšírenejšiu skupinu komerčne dostupných a v agropotravinárstve aplikovaných peptidáz. Delia sa na dve skupiny: prvú tvoria tráviace enzýmy trypsín, chymotrypsín a elastáza, druhú tvoria mikrobiálne peptidázy. Samostatnú rozsiahlu skupinu Ser-peptidáz tvoria *subtilizíny* produkované rodom baktérií *Bacillus*.

Výroba proteolytických enzýmov v celosvetovom meradle predstavuje najväčší objem biotechnologickej produkcie. Je to dané širokými možnosťami využitia peptidáz ako v zdravotníctve, v chemickom priemysle, tak aj v potravinárstve a krmovinárstve.

Mikroorganizmy sú významným zdrojom enzýmov vzhľadom na ich vysokú regeneračnú schopnosť, vysokú výťažnosť produktu, relatívne nižšiu náročnosť pri izolácii enzýmu v porovnaní s rastlinnými a živočíšnymi peptidázami, širokú biochemickú diverzitu producentov a vhodnosť ich využitia na genetické manipulácie.

## 2.2 VÝZNAM A VYUŽITIE PROTEOLYTICKÝCH ENZÝMOV V POĽNOHOSPODÁRSTVE A V POTRAVINÁRSTVE

Využitie hydrolytických, a hlavne proteolytických enzýmov v poľnohospodárstve, nachádza uplatnenie predovšetkým v krmivárskom priemysle. Na základe mnohých výživárskych pokusov vo výkrme monogastrických zvierat bolo dokázané, že prídavok proteolytických enzýmov, ale i preparátov ďalších hydroláz, ktorými sú predovšetkým amylolytické enzýmy, fosfatáza alebo xylanázy, zvyšuje stráviteľnosť bielkovinových a sacharidových substrátov krmiva, čo pozitívne vplyva na ekonomiku výroby živočíšnych produktov (Karlubík et al., 1992, Michalík et al., 1994, Paška et al., 1995, Angelovičová a Michalík 1998, Mikulski et al., 1999).

Hydrolýza bielkovín prítomných v substrátoch významne ovplyvňuje textúru, nutričné, sensorické a ďalšie vlastnosti nielen potravinárskych surovín, medziproduktov, ale aj finálnych produktov. Enzymovou modifikáciou bielkovín je možné znížiť alebo odstrániť ich alergénny účinok v potravinách určených pre dojčatá, ako aj v špeciálnych diétnych doplnkoch. Enzymaticky pripravené hydrolyzáty vykazujú dobrú nutričnú hodnotu, vhodné sensorické a dietetické vlastnosti (Šilhánková, 1995, Krkošková, 1998, Hrčková et al., 2002).

Peptidázy rastlinného, živočíšneho a mikrobiálneho pôvodu sa uplatňujú vo viacerých výrobných odvetviach potravinárskeho priemyslu ako mliekárenský a pekársky priemysel, výroba piva, mäsový priemysel, výroba sójových hydrolyzáto, odstraňovanie horkej chuti a pod. (Clemente, 2000, Hrčková et al., 2002).

## 2.3 TECHNOLOGIA PRÍPRAVY PROTEOLYTICKÝCH ENZÝMOV

Proteolytické enzýmy sa spravidla pripravujú submerznou kultiváciou produkčného kmeňa rodu *Bacillus* (*Bacillus subtilis* alebo *Bacillus licheniformis*). V tomto smere je dôležité využiť vysoko produkčný kmeň, zabezpečiť optimalizáciu kultivácie vrátane zloženia živného média, teploty, pH a aerácie prostredia a aplikovať účinný metodický postup izolácie a purifikácie enzýmového preparátu.

Bunky bakteriálnej kultúry (*Bacillus* sp.) vylučujú do kultivačného média extracelulárne peptidázy na konci exponenciálnej fázy rastu, čo má priaznivý vplyv na technologický postup izolácie enzýmu (Michalík et al., 1993, Sharipova, 2002, Al-Shehri et al., 2004, Do Nascimento a Martins, 2004).

Enzymový preparát sa z kultivačného prostredia získava centrifugáciou alebo filtráciou po separácii bakteriálnych buniek od média s následným zrážaním anorganickými soľami alebo organickými rozpúšťadlami. Získaný precipitát sa ďalej purifikuje chromatografickými metódami, ako gélová filtrácia, ionomeničová a afinitná chromatografia.

Enzým sa skoncentruje zahustením na vákuovej odparke alebo ultrafiltráciou. Jeho stabilita sa zvyšuje pridaním vápenatých solí, bielkovín alebo škrobových hydrolyzátov (Juhász et al., 1990, Lee, 2002).

## 2.4 NAJVÝZNAMNEJŠÍ SVETOVÍ VÝROBCOVIA KOMERČNÝCH ALKALICKÝCH PEPTIDÁZ

V dnešnej dobe peptidázy predstavujú približne 40% celkového predaja enzýmov. Medzi najväčšie biotechnologické spoločnosti na svete v súčasnosti patria **Novo Nordisk** (Dánsko), **Genencor International a Enzyme Development** (USA), **Nagase Biochemicals a Amano Pharmaceuticals** (Japonsko) a európski výrobcovia **Gist-Brocades** a **Solvay Enzymes** (Gupta et al., 2002, http 3).

### 3. Cieľ práce

1. experimentálne overiť variabilitu produkčnej schopnosti 5 testovaných produkčných kmeňov *Bacillus licheniformis* (L-1 – L-5) z hľadiska produkcie bakteriálnej proteázy
2. určiť optimálne podmienky submerznej kultivácie produkčného kmeňa *Bacillus licheniformis* v podmienkach laboratórneho 15 l kultivačného zariadenia firmy MBR Sulzer (Švajčiarsko) s ohľadom na komponentné zloženie živnej pôdy a pH
3. rozpracovať technologický postup izolácie a purifikácie enzýmového preparátu, vrátane využitia metód a techník gélovej filtrácie, ionomeničovej a afinitnej chromatografie, zhodnotiť čistotu a výťažnosť produktu

## 4. MATERIÁL A METÓDY

### 4.1 Výber vhodného produkčného kmeňa *Bacillus licheniformis*

V práci sme výber vhodného produkčného kmeňa uskutočnili z 5 kmeňov *Bacillus licheniformis*: L-1 (CCM 1722), L-2 (CCM 5/79), L-3 (CCM 7/79), L-4 (CCM 2145), L-5 (CCM 2216) získaných zo Státni sbírky mikroorganizmú v Brne.

### 4.2 Kultivácia produkčných kmeňov *Bacillus licheniformis* v laboratórnych podmienkach

Kultiváciu bakteriálnych kmeňov *Bacillus licheniformis* sme uskutočnili v kultivačných bankách, s objemom 1 000 cm<sup>3</sup>, na závesnej rotačnej trepačke s 280 ot.min<sup>-1</sup>, po dobu 48 hodín pri 37°C. Použili sme tri rôzne živné pôdy v objeme 100 cm<sup>3</sup>. Najvhodnejšiu živnú pôdu a bakteriálny kmeň s najvyššou aktivitou sme kultivovali v podmienkach laboratórneho 15 l bioreaktora švajčiarskej firmy MBR-Sulzer. Zloženie testovaných živných pôd:

**ŽP č. 1 (%)**: pšeničný škrob (1,0), kukuričná múka (2,0), kazeín (1,5), torula (0,2), corn-steap (20 cm<sup>3</sup>), alfa-amyláza (0,1), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,05), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,2), pH 8,0

**ŽP č. 2 (%)**: pšeničný škrob (1,0), srvátka (20 cm<sup>3</sup>), sójová múka (1,5), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,1), FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,05), KCl (0,02), CaCO<sub>3</sub> (0,002), MgSO<sub>4</sub> (0,02), alfa-amyláza (0,1), pH 8,5

**ŽP č. 3 (%)**: pšeničné otruby (1,0), kukuričný škrob (0,5), sušené mlieko (1,5), kvasničný autolyzát (0,6), sladinka (2,7), pH 7,5

#### **4.3 STANOVENIE PROTEOLYTICKEJ AKTIVITY „Q-TEST PROTEÁZA UNIVERZÁL“**

Proteolytickú aktivitu sme stanovovali tabletovým testom „Q-test proteáza univerzál“ v ktorom jednotka proteolytickej aktivity U zodpovedá aktivite, ktorá zhydrolyzuje 1 mg chromolytického bielkovinového substrátu za 1 hodinu, ako i metódou podľa Ashu (1993), v ktorej substrátom bol kazeín a jednotka proteázovej aktivity je definovaná ako množstvo enzýmu, ktoré uvoľní 1 µg tyrozínu za 1 minútu pri 37°C.

#### **4.4 STANOVENIE KONCENTRÁCIE BIELKOVÍN PODĽA WHITAKERA A GRANUMA**

Na stanovenie koncentrácie bielkovín sa využíva rozdiel absorbancií pri vlnovej dĺžke 235 nm a 280 nm (Whitaker a Granum, 1980) a koncentrácia bielkovín sa vypočítala podľa rovnice:

$$cp \text{ (mg.cm}^{-3}\text{)} = (A_{235} - A_{280}) : 2,51$$

#### **4.5 SUBMERZNÁ KULTIVÁCIA BUNIEK *BACILLUS LICHENIFORMIS* V PODMIENKACH**

##### **LABORATÓRNEHO KULTIVAČNÉHO ZARIADENIA**

Submerzná kultivácia bakteriálneho kmeňa *Bacillus licheniformis* sa uskutočnila v 15 l laboratórnom kultivačnom zariadení švajčiarskej firmy MBR-Sulzer s automatickou reguláciou otáčok miešadla, teploty a pH a ručnou reguláciou pO<sub>2</sub> a pCO<sub>2</sub>, na živnej pôde zloženej z kukuričného škrobu, sušeného mlieka, kvasničného autolyzátu, sladinky a vodovodnej vody v objeme 8 l. Pre submerznú kultiváciu v bioreaktore sme použili vegetatívne inokulum, ktoré tvorila suspenzia bakteriálnych buniek vo vhodnom kultivačnom médiu rozmnožená do exponenciálnej fázy rastu. Kultivácia trvala 23-25 hodín.

#### **4.6 IZOLÁCIA A PURIFIKÁCIA ENZÝMU**

Izolácia a purifikácia enzýmu:

- a) separácia bakteriálnej kultúry od média na laboratórnej odstredivke
- b) zrážanie bielkovín organickými rozpúšťadlami (Et-OH a acetón)
- c) gélová filtrácia na Sephadexoch G-25 a G-100
- d) zahusťovanie vo vákuovej odparke
- e) ionomeničová chromatografia na ECTEOLA-celulóze
- f) afinitná chromatografia na p-aminobenzamidín-Sepharose a bacitracín-Sepharose
- g) elektroforéza na SDS-PAGE

## 5. VÝSLEDKY PRÁCE

### 5.1 VÝBER PRODUKČNÉHO KMEŇA

Výsledky kultivácie 5 kmeňov *Bacillus licheniformis* (L-1 – L-5) na troch rôznych typoch živnej pôdy potvrdili, že najvyššiu produkciu vykazuje kmeň L-5 na živnej pôde č.3. V nadväznosti na výber produkčného kmeňa sme realizovali optimalizáciu komponentného zloženia živnej pôdy pre podmienky laboratórneho kultivačného zariadenia.

### 5.2 OPTIMALIZÁCIA KOMPONENTNÉHO ZLOŽENIA ŽIVNEJ PÔDY

V súvislosti s dosiahnutými výsledkami sme v ďalšom postupe kultivovali kmeň L-5 s využitím živnej pôdy č.3. Pre získanie čo najväčšieho výt'azku peptidázy bolo potrebné optimalizovať vzájomný pomer živín v živnej pôde a podmienky kultivácie daného produkčného kmeňa. Uskutočnili sme optimalizáciu pôvodného zloženia živnej pôdy č.3, s tým, že sme testovali obsah nasledovných zložiek: pšeničné otruby (do 3,5%), kukuričný škrob (do 1%), sušené mlieko (do 2,5%), kvasničný autolyzát (do 1%) a lyofilizát sladinky (do 5,4%).

Z analýzy získaných výsledkov a ich konfrontácie s inými autormi (Kuzmová et al., 1990, Michalík et al., 1994, 1995, Sam et al., 2001, Adinarayana et al., 2003, Al-Shehri et al., 2004) vyplýva, že rôzne kmene preferujú odlišné zdroje uhlíka ako aj dusíka. Tieto výsledky potvrdzujú opodstatnenosť testovania zdrojov živín pre konkrétne podmienky kultivácie.

Z výsledkov testovania obsahu jednotlivých komponentov a počiatočného pH živnej pôdy môžeme s ohľadom na maximalizáciu produkcie peptidázy definovať nasledné zloženie živného média: kukuričný škrob 0,5%, sušené mlieko 1,0%, kvasničný autolyzát 0,3%, lyofilizovaná sladinka 2,7% a počiatočné pH živnej pôdy 8,5.

Produkciu peptidáz na optimalizovanej živnej pôde sme realizovali v 15 l kultivačnom zariadení firmy MBR Sulzer (Švajčiarsko) s automatickou reguláciou otáčok miešadla, teploty a pH a ručnou reguláciou pO<sub>2</sub> a pCO<sub>2</sub>. Pre submerznú kultiváciu v bioreaktore sme použili vegetatívne inokulum, ktoré tvorila suspenzia bakteriálnych buniek vo vhodnom kultivačnom médiu rozmnožená do exponenciálnej fázy rastu. Kultivácia trvala 23-25 hodín. Živnú pôdu sme po separácii bakteriálnej kultúry použili na izoláciu enzýmu. Enzým sme zo supernatantu získali vyzrážaním organickým rozpúšťadlom, acetónom, schladeným na -18°C v objemovom pomere 1:2 s následnou lyofilizáciou. Lyofilizovaný preparát bol použitý pre ďalšie purifikačné postupy metódami gélovej, ionomenečovej a afinitnej chromatografie.

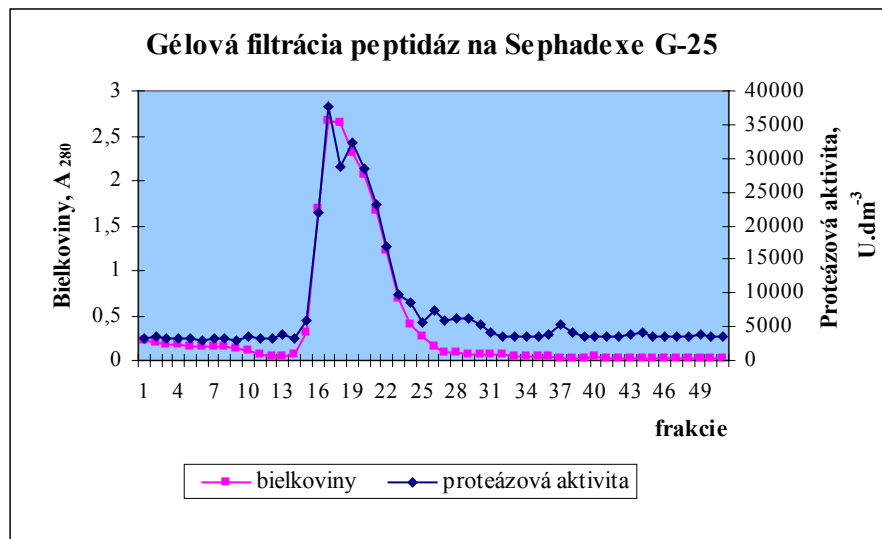
Z našich predchádzajúcich výsledkov modelových pokusov so špecifickými inhibítormi peptidáz vyplýva, že DFPF a PMSF spôsobujú úplnú inhibíciu peptidázovej aktivity analyzovaného enzýmového preparátu, z čoho usudzujeme, že extracelulárna zásaditá peptidáza patrí do skupiny Ser-peptidáz subtilizínového typu (Michalík et al., 1994, 1995).

Preparát enzýmu získaný po zrážaní acetónom sme použili na stanovenie jeho charakteristiky z hľadiska vplyvu pH na proteázovú aktivitu. Použili sme univerzálny tlmivý roztok podľa Theorella a Stenhagena v rozpätí pH 2 – 12. Zistili sme, že kultivovaný kmeň *Bacillus licheniformis* L-5 produkuje extracelulárnu alkalickú peptidázu, ktorá dosahuje maximum aktivity pri pH 9,0.

### 5.3 GÉLOVÁ FILTRÁCIA PEPTIDÁZY NA SEPHADEXE G-25 A SEPHADEXE G-100

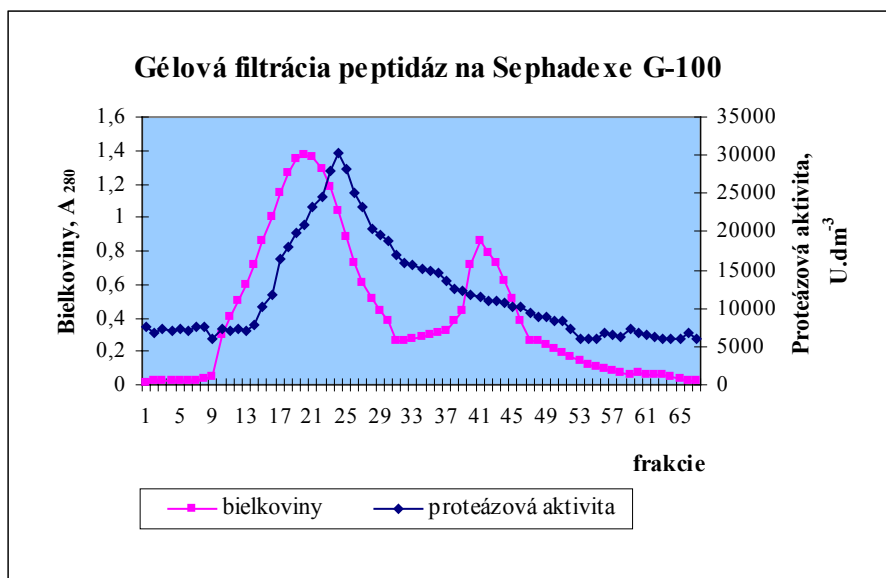
Z purifikačnej tabuľky (Tab.1) vyplýva, že purifikáciou na géli Sephadex G-25 sme dosiahli 1,55-násobné prečistenie s výtťažkom 48,30% a na kolóne s nosičom G-100 bol enzým prečistený 14,36-násobne s výtťažkom 13,33%, čo korešponduje s výsledkami našich predchádzajúcich prác, kde aktivita peptidázy bola po prečistení na G-100 približne 10-krát vyššia v porovnaní so surovým enzýmom (Michalík et al., 1994).

Obrázok 1



Obrázok 2



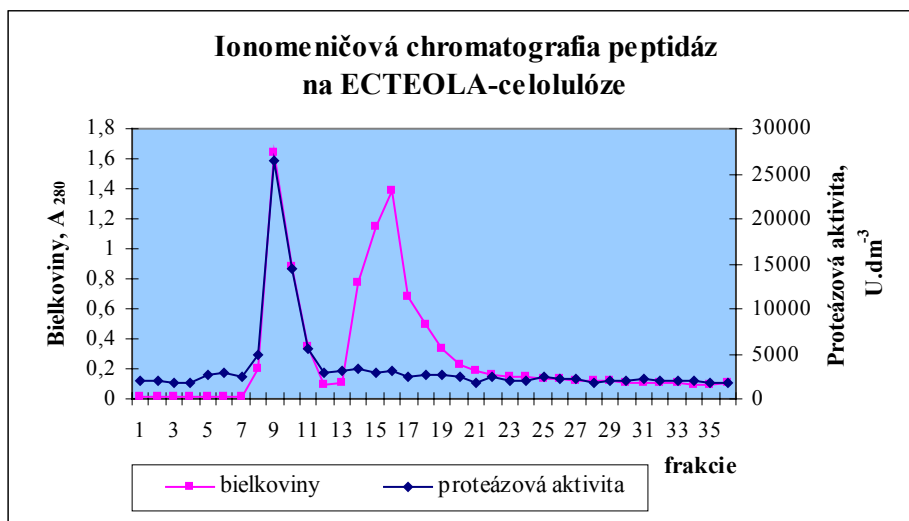


V získaných frakciách sme určili koncentráciu bielkovín a stanovili sme proteolytickú aktivitu. Na kolóne Sephadexu G-25 sa najvyššia koncentrácia bielkovín a proteolytická aktivita nachádzali vo frakciách č. 15-22 (Obr.1). Pri purifikácii enzýmu na Sephadexe G-100 sa najvyššou koncentráciou bielkovín vyznačovali frakcie č. 10-30 a nižší obsah bielkovín sa nachádzal vo frakciách č. 45-52, kým proteolytická aktivita bola sústredená do frakcií č. 15-30 (Obr.2).

#### 5.4 IONOMENIČOVÁ CHROMATOGRÁFIA PEPTIDÁZY NA ECTEOLA-CELULÓZE

Z výsledkov chromatografického spektra na ECTEOLA-celulóze (Obr.3) vyplýva, že najvyššia koncentrácia bielkovín je vo frakciách č. 8-11, avšak najvyššiu proteolytickú aktivitu vykazujú frakcie č. 14-19. Ionomeničová chromatografia na ECTEOLA-celulóze potvrdila, že enzýmový preparát purifikovaný gélovou filtráciou na kolónach G-25 a G-100 obsahuje ďalšie kontaminanty (bielkoviny a peptidy). Touto purifikáciou na slabom anexe sme dosiahli približne 18-násobné prečistenie s 10%-ným výťažkom.

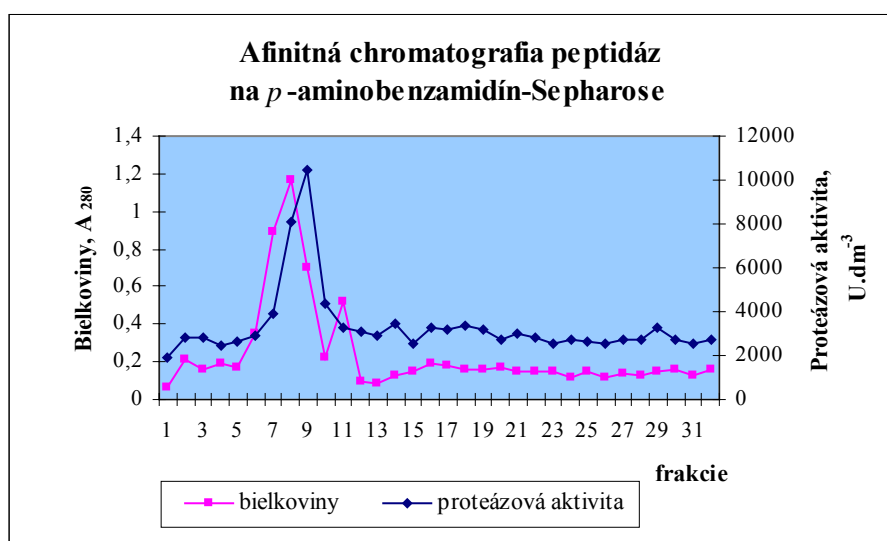
Obrázok 3



### 5.5 AFINITNÁ CHROMATOGRÁFIA PEPTIDÁZY NA *P*-AMINOENZAMIDÍN-SEPHAROSE A BACITRACÍN-SEPHAROSE

Aplikácia afinitnej chromatografie vyžadovala prípravu špecifických nosičov. V súvislosti s týmto sme uskutočnili naviazanie *p*-aminobenzamidínu na aktivovanú CH-Sepharose 4B. Pripravený nosič sme použili pre afinitnú chromatografiu peptidázy, ktorá bola prečistená gélovou filtráciou a ionomeničovou chromatografiou. Z výsledkov uvedených na obrázku 4 je viditeľný čiastočný nesúlad medzi frakciami s vysokým obsahom bielkovín a frakciami, v ktorých sme stanovili proteázovú aktivitu. Maximum enzýmovej aktivity pripadá na frakcie č.7-10. Týmto postupom sa dosiahlo približne 58-násobné zvýšenie proteázovej aktivity s výtťažkom enzýmu 4,89% (Tab.1).

Obrázok 4

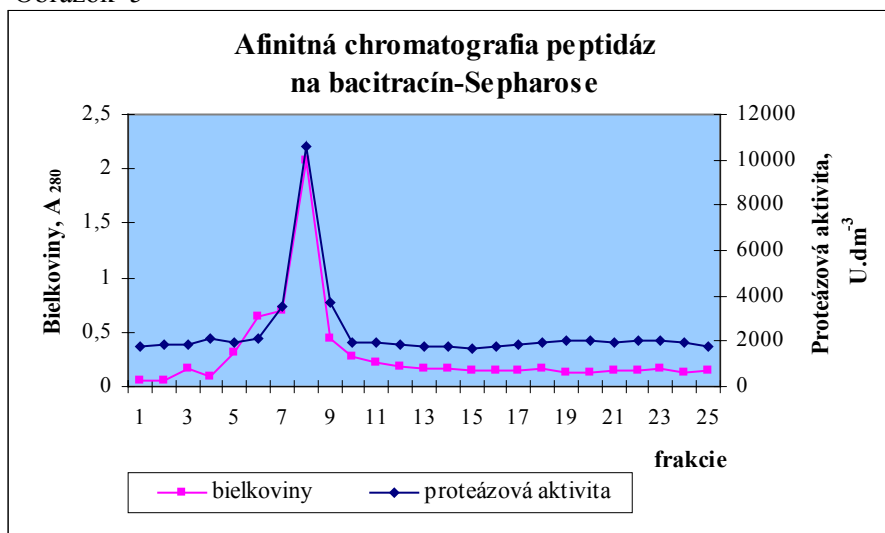


Naše výsledky sú porovnateľné s prácami iných autorov, ktorí použili pre purifikáciu peptidáz nosiče s benzamidínom (Preetha a Boopathy, 1997, Zeng a Ruckenstein, 1998, Joo et al., 2001a, 2001b, Todorova a Stoyanov, 2000, De-Simone et al., 2005).

Najčastejšie používaným nosičom pri purifikácii peptidáz metódami afinitnej chromatografie je bacitracín-Sepharose (Mignon et al., 1998, Bonants et al., 1995, Markaryan et al., 1994).

Nosič bol pripravený naviazaním bacitracínu na aktivovanú CH-Sepharose 4B (www.apbiotech.com) a následne použitý pre afinitnú chromatografiu peptidázy, ktorá bola prečistená v dvoch predchádzajúcich chromatografických purifikačných krokoch (gélovou filtráciou a ionomeničovou chromatografiou). Zistili sme, že maximum aktivity proteáz je identické s maximálnym obsahom bielkovín v eluovaných frakciách (Obr.5). Takto prečistený enzým vykazoval približne 63-násobné zvýšenie čistoty pri 5,04%-nej výťažnosti enzýmu (Tab.1).

Obrázok 5



Výsledky purifikácie enzymového preparátu kolónovou afinitnou chromatografiou na nami pripravenom nosiči bacitracín-Sepharose poukazujú na dobré deliace schopnosti príslušného nosiča. Dosiahla sa lepšia homogenita enzýmu v porovnaní s izoláciou na *p*-aminobenzamidín-Sepharose. Vhodnosť použitia bacitracínu ako ligandu pre účely purifikácie hlavne serínových peptidáz bola potvrdená viacerými autormi (Fadeev et al., 1992, Rudenskaya, 1994, Bonants et al., 1995, Mignon et al., 1998, Faisal et al., 1999, Kulakova et al., 1999, Bogacheva et al., 2001, Khan et al., 2003, Glowacka et al., 2005).

Testovaním rôznych izolačných a purifikačných technologických postupov prípravy prečisteného enzymového preparátu sme tento, po separácii supernatantu, použili na izoláciu enzýmu zrážaním acetónom schladeným na -18°C. K ďalším krokom patrila gélová filtrácia na Sephadexoch G-25 a G-100, ionomeničová chromatografia na ECTEOLA-celulóze a afinitná chromatografia na *p*-aminobenzamidín-Sepharose a bacitracín-Sepharose (Tab.1).

Tabuľka 1 Vplyv purifikačných postupov na stupeň prečistenia a výťažnosť enzýmového preparátu.

Enzýmový preparát	Objemová aktivita, U.ml <sup>-1</sup>	Bielkoviny, mg.ml <sup>-1</sup>	Špecifická aktivita, U.mg <sup>-1</sup>	Stupeň prečistenia	Výťažnosť, %
Surový enzýmový preparát	<b>50 841</b>	<b>2,63</b>	<b>19331</b>	<b>1,00</b>	<b>100</b>
Gélová filtrácia na Sephadex G-25	<b>37 684</b>	<b>1,26</b>	<b>29 908</b>	<b>1,55</b>	<b>48,30</b>
Gélová filtrácia na Sephadex G-100	<b>30 250</b>	<b>0,109</b>	<b>277 523</b>	<b>14,36</b>	<b>13,33</b>
Ionomeničová chromatografia na ECTEOLA-celulóze	<b>26 500</b>	<b>0,076</b>	<b>348 684</b>	<b>18,04</b>	<b>10,00</b>
Afinitná chromatografia na <i>p</i> -aminobenzamidín-Sepharose	<b>11 000</b>	<b>0,0098</b>	<b>1 122 449</b>	<b>58,06</b>	<b>4,89</b>
Afinitná chromatografia na bacitracín-Sepharose	<b>10 500</b>	<b>0,0086</b>	<b>1 220 930</b>	<b>63,16</b>	<b>5,04</b>

## 5.6 STANOVENIE MOLEKULOVEJ HMOTNOSTI PEPTIDÁZ METÓDOU SDS-PAGE

Enzýmový preparát získaný afinitnou chromatografiou sme použili pre stanovenie molekulovej hmotnosti metódou SDS-PAGE.

Výsledky elektroforézy SDS-PAGE s využitím štandardov potvrdili, že molekulová hmotnosť purifikovaného enzýmového preparátu je približne 29 kDa.

Analyzované výsledky korešponujú so závermi viacerých autorov, ktorí pre serínové alkalické peptidázy produkované baktériami uvádzajú hodnoty molekulovej hmotnosti v rozsahu 15 – 35 kDa (Wethmar a Kleinow, 1993, Michalík et al., 1994, Phadataré et al., 1997, Bustos et al., 1999).

## 6. NÁVRH NA VYUŽITIE POZNATKOV V PRAXI A PRE ĎALŠÍ ROZVOJ VEDY

Medzi najdôležitejšie zdroje rastlinných bielkovín, sacharidov, minerálnych látok, vitamínov a vlákniny patria zrniny (strukoviny a obilniny). Bielkoviny zrnín, okrem strukovín, sa z výživového hľadiska pokladajú za neplnohodnotné, pretože sa vyznačujú nízkou biologickou hodnotou spôsobenou nízkym obsahom esenciálnych aminokyselín a ich nevyrovnaným zastúpením, ďalej nízkou rozpustnosťou a hydrolyzovateľnosťou enzýmami tráviaceho traktu, čo spôsobuje ich nedostatočnú stráviteľnosť.

Pre výrobu premixov s obsahom proteolytických enzýmov, pre potreby aditívacie kŕmnych zmesí, sa využívajú bakteriálne Ser-peptidázy trypsínového alebo subtilizínového typu. Vo všeobecnosti je známe, že bakteriálne peptidázy prednostne hydrolyzujú peptidové väzby tvorené lyzínom alebo arginínom s inou aminokyselinou.

Zásobné bielkoviny zrna obilnín sú zastúpené prolamínmi a glutelínmi, na ktoré pripadá minimálne 70% z celkového obsahu bielkovín. Najmä prolamíny sa vyznačujú charakteristickou

skladbou aminokyselín, pre ktorú je typický nízky podiel ako lyzínu, tak aj arginínu. Z uvedeného dôvodu frekvencia prednostne štiepených peptidových väzieb, t.j. Lys – iná AA a Arg – iná AA je veľmi malá, čo je aj jednou z príčin nízkej hydrolyzovateľnosti gluténu a tým aj jeho stráviteľnosti monogastrickými zvieratami. Uvedené okolnosti by mali nasmerovať orientáciu výskumných programov na využitie proteolytického komplexu lokalizovaného v kľúčovej rastline obilnín. Počas klíčenia zrna je proteolytická aktivita schopná zabezpečiť prakticky úplnú hydrolýzu bielkovinového komplexu zrna, vrátane prolaminových bielkovín. Z uvedeného dôvodu riešenie prípravy a aplikácie účinných preparátov peptidáz vo výžive HZ vyžaduje riešiť izoláciu peptidázových génov zrnín a ich transformáciu do bakteriálneho genómu.

## 7. ZÁVERY

Z dosiahnutých výsledkov dizertačnej práce je možné formulovať nasledovné závery:

1. Z výsledkov testovania piatich bakteriálnych kmeňov *Bacillus licheniformis*, kultivovaných na troch rôznych živných pôdach, sa najvyššou produkciou alkalickéj serínovej peptidázy subtilizínového typu vyznačoval kmeň L-5 na živnej pôde č.3, ktorý bol použitý pre ďalšie riešenie prípravy enzýmového preparátu.
2. Na základe výsledkov optimalizácie živnej pôdy môžeme definovať nasledovné finálne zloženie živného média pre kultiváciu *Bacillus licheniformis* kmeň L-5 (hmotnostné %): 0,5% kukuričný škrob, 1% sušené mlieko, 0,3% kvasničný autolyzát a 2,7% lyofilizovaná sladinka. Počiatočné pH živnej pôdy bolo 8,5.
3. Testovaním rôznych izolačných a purifikačných technologických postupov prípravy prečisteného enzýmového preparátu sme tento, po separácii supernatantu, použili na izoláciu enzýmu zrážaním acetónom schladeným na -18°C. K ďalším krokom patrila gélová filtrácia na Sephadexoch G-25

a G-100, ionomeničová chromatografia na ECTEOLOA-celulóze a afinitná chromatografia na *p*-aminobenzamidín-Sepharose a bacitracín-Sepharose.

4. Pre účely využitia metódy afinitnej chromatografie sme pripravili nosiče imobilizáciu špecifických ligandov (*p*-aminobenzamidín a bacitracín) na aktivovanú CH Sepharose 4B.
5. Afinitnou chromatografiou sme na nosiči *p*-aminobenzamidín-Sepharose získali homogénnu peptidázu s 58-násobným prečistením a 4,89%-ným výtťažkom. Najvyšší stupeň prečistenia, 63,16 s výtťažkom 5,04%, sme dosiahli afinitnou chromatografiou na nosiči bacitracín-Sepharose.
6. Molekulová hmotnosť purifikovaného enzýmového preparátu stanovená metódou SDS-PAGE je približne 29 kDa.
7. Na základe doterajších skúseností nášho pracoviska, ale aj poznatkov iných autorov, pre krmne účely (aditivácia krmných zmesí pre monogastrov) je vhodné využiť surový enzýmový preparát, ktorý získame po odstránení bakteriálnej kultúry a po extrakcii organickým rozpúšťadlom acetónom.

## 8. POUŽITÁ LITERATÚRA

**ADINARAYANA, K. – ELLAIAH, P. – PRASAD, D.S. 2003.** Purification and Partial Characterization of Thermostable Serine Alkaline Protease from a Newly Isolated *Bacillus subtilis* PE-11. In: Pharm. Sci. Tech., vol. 4, 2003, no. 4, article 56.

**ANGELOVIČOVÁ, M. - MICHALÍK, I. 1998.** Výsledky testácie preparátov na báze enzýmov u výkrmových kurčiat a probiotík u nosníc. In: Biotechnológie prípravy biologicky aktívnych látok a ich využitie v pôdohospodárstve. Nitra: SPU, 1998, s. 44–55.

**AL-SHEHRI, – ABDULRAHMAN AND MOSTAFA, M. – YASSER, S. 2004.** Production and some Properties of Protease produced by *Bacillus licheniformis* Isolated from Tihamet Asser, Saudi Arabia. In: Pak. J. Biol. Sci., vol. 7, 2004, no. 9, p. 1631-1635.

**ASHA, A.K. – ANURADHA, K. – ADITI, P. 1993.** Salt tolerant and thermostable alkaline protease from *Bacillus subtilis* NCIMN64. In: Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 38, 1993, p. 83-92.

**BOGACHEVA, A.M. – RUDENSKAYA, G.N. – DUNAEVSKY, Y.E. et al. 2001.** New subtilisin-like collagenase from leaves of common plantain. In: Biochimie, vol. 83, 2001, p. 481-486.

**BONANTS, P.J.M. – FITTERS, P.F.L. – BELDER, E-DEN, et al. 1995.** A basic serine protease from *Paecilomyces lilacinus* with biological activity against Meloidogyne hapla eggs. In: Microbiology (Reading, UK), vol. 141, 1995, p. 775-784.

**BUSTOS, R.O. – ROMO, C.R. – HEALY, M.G. 1999.** Purification of trypsin-like enzymes from Antarctic krill processing wastewater. In: Process Biochem., vol. 35, 1999, no. 3-4, p. 327-333.

- DE-SIMONE, S.G. – CORREA-NETTO, C. – ANTUNES, O.A.C. et al. 2005.** Biochemical and molecular modeling analysis of the ability of two *p*-aminobenzamidine-based sorbents to selectively purify serine proteases (fibrinogenases) from snake venoms. In: *J. Chromatogr., B*: vol. 822, 2005, p. 1-9.
- DO NASCIMENTO, W.C.A. – MARTINS, M.L.L. 2004.** Production and properties of an extracellular protease from Thermophilic *Bacillus* sp. In: *Braz. J. Microbiol.*, vol. 35, 2004, p. 91-96.
- FADEEV, A.Y. – MINGALYOV, P.G. – STAROVEROV, S.M., et al. 1992.** Silica sorbents with one- and two-site attached bacitracin in affinity chromatography. In: *J. Chromatogr.*, vol. 596, 1992, p. 114-117.
- FAISAL, M. – SCHAFHAUSER, D.Y. – GARREIS, K.A., et al. 1999.** Isolation and characterization of *Perkinsus marinus* proteases using bacitracin-sepharose affinity chromatography. In: *Comp. Biochem. Physiol., B*: vol. 123, 1999, p. 417-426.
- GLOWACKA, A.E. – PODSTAWKA, E. – SZCZESNA-ANTCZAK, M.H. et al. 2005.** Kinetic and molecular properties of *Bacillus subtilis* IBTC-3 subtilisin. In: *Comp. Biochem. Physiol., C*: vol. 140, 2005, p. 321-331.
- GUPTA, R. – BEG, Q.K. – LORENZ, P. 2002.** Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 59, 2002, p. 15-32.
- HRČKOVÁ, M. – ŠTURDÍK, E. – ZEMANOVIČ, J. 2002.** Potravinárske využitie proteolytických enzýmov. In: *Bulletin potravinárskeho výskumu*, roč. 41, 2002, č. 2, s. 85-97.
- <http3://www.sigmaaldrich.com>
- JOO, H.S. – PARK, G.C. – KIM, K.T. et al. 2001a.** Novel alkaline protease from the polychatea, *Periserrula leucophryna*: Purification and characterization. In: *Process Biochem.*, vol. 36, 2001, p. 893-900.
- JOO, H.S. – PARK, G.C. – KIM, K.T. et al. 2001b.** Simple methods for alkaline protease purification from the polychatea, *Periserrula leucophryna*. In: *Process Biochem.*, vol. 37, 2001, p. 299-303.
- JUHÁSZ, O. – KNOŠKOVÁ, D. – ZEMANOVIČ, J. et al. 1990.** Extracellular proteinase from *Brevibacterium linens*. Purification and characterization. In: *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 1990, no. 5, p. 841-845.
- LEE, H. 2002.** Characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Bacillus* sp. SCB-3. In: *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 97, 2002, no. 2, p. 123-133.
- KARLUBÍK, M. – MICHALÍK, I. – PAŠKA, I. 1992.** Aplikácia proteínáz vo výžive ošípaných. In: *Biotechnologické postupy racionalizácie rastlinnej výroby. Zborník vedeckej konferencie, VŠP Nitra*, 1992, s. 73-77.
- KHAN, A. – WILLIAMS, K. – MOLLOY, M.P. et al. 2003.** Purification and characterization of a serine protease and chitinases from *Paecilomyces lilacinus* and detection of chitinase activity on 2D gels. In: *Protein Expression Purif.*, vol. 32, 2003, p. 210-220.
- KRKOŠKOVÁ, B. 1998.** Enzýmy – dôležitá súčasť potravín. In: *Liečivé rastliny*, roč. 39, 1998, č. 4, s. 116-118.
- KULAKOVA, L. – GALKIN, A. – KURIHARA, T. 1999.** Cold-Active Serine Alkaline Protease from the Psychotrophic Bacterium *Shewanella* Strain Ac 10: Gene Cloning and Enzyme Purification and Characterization. In: *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 65, 1999, p. 611-617.
- KUZMOVÁ, E. – SITKEY, V. – MAJERČÍKOVÁ, D. 1990.** Kmeň mikroorganizmu *Bacillus cereus* CCM 3993. Úrad pre vynálezy a objavy v Prahe, 1990, č. vynálezu 260378.
- MARKARYAN, A. – MOROZOVA, I. – YU, H., et al. 1994.** Purification and characterization of an elastinolytic metalloprotease from *Aspergillus fumigatus* and immunoelectron microscopic evidence of secretion of this enzyme by the fungus invading the murine lung. In: *Infect. Immun.*, vol. 62, 1994, no. 6, p. 2149-2157.
- MIGNON, B. – SWINNEN, M. – BOUCHARA, J.P. et al. 1998.** Purification and characterization of a 315 kDa keratinolytic subtilisin-like serine protease from *Microsporium canis* and evidence of its secretion in naturally infected cats. In: *Med. Mycol.*, vol. 36, 1998, no. 6, p. 395-404.
- MICHALÍK, I. – MATUŠ, T. – SAYGO, M. et al. 1993.** Produkcia a izolácia bakteriálnych zásaditých proteínáz. In: *Poľnohospodárstvo*, roč. 39, 1993, č. 10, s. 820-829.

- MICHALÍK, I. – SZABOVÁ, E. – JAŠKA, P. et al. 1994.** Biochemická charakteristika preparátu zásaditej proteázy. In: Poľnohospodárstvo, roč. 40, 1994a, č. 2, s. 95-112.
- MICHALÍK, I. – SZABOVÁ, E. – POLÁKOVÁ, A. et al. 1995.** The selection of *Bacillus licheniformis* strains for protease production: characterization of bacterial alkaline protease. In: Biologia, vol. 50, 1995, p. 249-252.
- MIKULSKI, D. – JANKOWSKI, J. – SOUD, S.B. et al. 1999.** Effects of feeding enzyme – supplemented triticale – barley diets on brojler chicken performance. In: Egypt. Poult. Sci. J., 1999, p. 607-618.
- PAŠKA, I. – MICHALÍK, I. – KARLUBÍK, M. 1995.** Využitie proteínázového preparátu Nitrazým v odchove a výkrme ošípaných. In: Poľnohospodárstvo, roč. 41, 1995, č. 2, s. 133-139.
- PHADATARE, S.U. – RAO, M.B. – DESHPANDE, V.V. 1997.** A serine alkaline protease from the fungus *Conidiobolus coronatus* with a distinctly different structure than the serine protease subtilisin Carlsberg. In: Arch. Microbiol., vol. 166, 1997, p. 414-417.
- PREETHA, S. – BOOPATHY, R. 1997.** Purification and characterization of a milk clotting protease from *Rhizomucor miehei*. In: World J. Microbiol. Biotechnol., vol. 13, 1997, no. 5, p. 573-578.
- RUDENSKAYA, G.N. 1994.** Affinity chromatography of proteolytic enzymes. In: Bioorg. Khim., vol. 20, 1994, p. 213-228.
- SAM, S.K. – YOUNG JAE, K. – IN-KOO, R. 2001.** Purification and characterization of a novel extracellular protease from *Bacillus cereus* KCTC 3674. In: Arch. Microbiol., vol. 175, 2001, p. 458-461.
- SHARIPOVA, M.R. 2002.** Late Stages of Protein Secretion in *Bacilli*. In: Biochemistry (Moscow), vol. 67, 2002, no. 11, p. 1207-1216.
- ŠILHÁNKOVÁ, L. 1995.** Mikrobiologie pro potravinaře a biotechnology. 2.vyd., Praha: Victoria publishing, 1995, 361 s. ISBN 80-85605-71-6.
- ŠKÁRKA, B. – FERENČÍK, M. 1992.** Biochémiá. Bratislava: Alfa, 1992, 846 s. ISBN 80-05-01076-1.
- TODOROVA, V.K. – STOYANOV, D.I. 2000.** Partial Characterization of Serine Proteinases Secreted by Adult *Trichinella spiralis*. In: Parasitol. Res., vol. 86, 2000, p. 684-687.
- WETHMAR, CH. – KLEINOW, W. 1993.** Characterization of a 27 kDa endopeptidase and detection of a proteinase-inhibitor in homogenates of *Brachionus plicatilis* (Rotifera). In: Comp. Biochem. Physiol., B: vol. 106, 1993, no. 2, p. 359-368.
- WHITAKER, J.R. – GRANUM, R.E. 1980.** An Absolute Method for Protein Determination Based on Difference in Absorbance at 235 and 280 nm. In: Anal. Biochem., vol. 109, 1980, p. 156-159. [www.apbiotech.com](http://www.apbiotech.com) – Affinity Chromatography. Principles and Methods.
- ZENG, X. – RUCKENSTEIN, E. 1998.** Trypsin Purification by *p*-Aminobenzamidine Immobilized on Macroporous Chitosan Membranes. In: Ind. Eng. Chem. Res., vol. 37, 1998, p. 159-165.

## 9. ZOZNAM PUBLIKOVANÝCH PRÁC

### Vedecké práce publikované v zahraničných karentovaných časopisoch:

- URMINSKÁ, D. – SZABOVÁ, E. – MICHALÍK, I. 1996. Bacterial alkaline protease from *Bacillus licheniformis*. In: Chemické listy, 90, 1996, č. 9, s. 718-719.
- MICHALÍK, I. – SZABOVÁ, E. – POLÁKOVÁ, A. - URMINSKÁ, D. 1995. The selection of *Bacillus licheniformis* strains for protease production – characterization of bacterial alkaline protease. In: Biologia, 50, 1995, č. 3, s. 249-252.

### Vedecké práce publikované v zahraničných nekarentovaných časopisoch:

- MICHALÍK, I. - SZABOVÁ, E. - POLÁKOVÁ, A. - URMINSKÁ, D. 1997. Bacterial proteases: production, isolation and utilization in animal nutrition. In: The Ukrainian Biochemical Journal, vol. 69, 1997, no. 3, p. 28-35.

### Vedecké práce publikované v domácich nekarentovaných časopisoch:



MICHALÍK, I. – SZABOVÁ, E. – URMINSKÁ, D. - POLÁKOVÁ, A. 1994. Optimalizácia podmienok kultivácie kmeňov *Bacillus subtilis* a *Bacillus licheniformis*, producentov bakteriálnych proteáz. In: Poľnohospodárstvo, 1994, roč. 40, č. 7, s. 516-525.

MICHALÍK, I. – SZABOVÁ, E. – JAŠKA, P. - URMINSKÁ, D. 1994. Biochemická charakteristika preparátu zásaditej proteázy. In: Poľnohospodárstvo, 1994, roč. 40, č. 2, s. 95-112.

#### **Zborníky z medzinárodných konferencií nerecenzované:**

SZABOVÁ, E. - URMINSKÁ, D. - MICHALÍK, I. 2000. The selection of *Bacillus licheniformis* strains for protease production. In: Applications of biotechnology in agriculture and food production. Nitra : Agroinštitút, 2000, s. 13.

URMINSKÁ, D. - SZABOVÁ, E. - MICHALÍK, I. 2000. Characterization of bacterial alkaline proteases produced by *Bacillus licheniformis*. In: Applications of biotechnology in agriculture and food production. Nitra : Agroinštitút, 2000, s. 14.

#### **Publikované príspevky na zahraničných vedeckých konferenciách:**

URMINSKÁ, D. – MICHALÍK, I. – LICHVÁR, I. – SZABOVÁ, E. 2004. Diferencovaný účinok komerčných preparátov proteolytických enzýmov na hydrolyzovateľnosť rastlinných bielkovín. In: Sborník Proteiny 2004. Brno : Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2004, s. 13-16.

#### **Publikované príspevky na domácich vedeckých konferenciách:**

SZABOVÁ, E. - URMINSKÁ, D. - MICHALÍK, I. - PETR, J. 2003. Využitie pseudocereálií na prípravu potravín pre pacientov s celiakiou. In: Rizikové faktory potravinového reťazca. Zborník vedeckých prác z 3. medzinárodnej vedeckej konferencie. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, 2003, s. 143-145.

#### **Abstrakty príspevkov z domácich konferencií:**

SZABOVÁ, E. - URMINSKÁ, D. 2002. Affinity chromatography of alkaline protease. In: Zborník. XVIII. biochemický zjazd. Bratislava : VEDA, 2002, s. 136.

URMINSKÁ, D. - SZABOVÁ, E. 2002. Preparation of enzymatic proteine hydrolysates for food and fodder production. In: Zborník. XVIII. biochemický zjazd. Bratislava : VEDA, 2002, s. 291.

SZABOVÁ, E. - URMINSKÁ, D. – SENDREJOVÁ, E. - MICHALÍK, I. 2005. Zvýšenie výživnej kvality zrnín enzymatickou transformáciou. In: Bezpečnosť a kvalita surovín a potravín I. vedecká konferencia s medzinárodnou účasťou. Zborník abstraktov. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, 2005, s. 18. ISBN 80-8069-612-8.

#### **Výskumné a vývojové správy:**

MICHALÍK, I. - SZABOVÁ, E. - KADLECOVÁ, Z. 2000. Biotechnológia výroby enzymatických preparátov a ich využitie vo výžive zvierat : Záverečná správa. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2000, s. 37.

SZABOVÁ, E. - URMINSKÁ, D. - MICHALÍK, I. - KYSELOVIČ, J. - KADLECOVÁ, Z. 2001. Afinitná chromatografia bakteriálnej proteázy za účelom jej aplikácie pri výrobe potravín : Záverečná správa. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2001, s. 8.

#### **Skriptá a učebné texty:**

MICHALÍK, I. - GÁLOVÁ, Z. - SZABOVÁ, E. 2002. Návod na laboratórne cvičenia z biochémie. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2002, s. 100. ISBN 80-7137-988-3.

#### **Iné:**

SZABOVÁ, E. 2000. Produkcia zásaditej proteázy kultúrou rodu *Bacillus* a spôsoby jej purifikácie : Písomná práca k dizertačnej skúške. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, 2000, s. 48.

## **ABSTRAKT**

Cieľom doktorandskej dizertačnej práce bolo rozpracovať technológie prípravy proteolytických enzýmov s využitím mikrobiálnych producentov. Splnenie tohto cieľa vyžadovalo riešiť technológie kultivácie produkčného kmeňa, izolácie a purifikácie enzymatického preparátu. Na overenie variability produkčnej schopnosti sme testovali 5 kmeňov *Bacillus licheniformis* kultivovaných na troch rôznych živných pôdach. Najvyššou produkciou alkalickéj peptidázy sa vyznačoval kmeň L-5 na živnej pôde č.3. V ďalších experimentoch sme určovali optimálne podmienky submerznej kultivácie produkčného kmeňa *Bacillus licheniformis* L-5 v bankách na trepačke a tiež v podmienkach laboratórneho 15 l bioreaktora firmy MBR Sulzer (Švajčiarsko), s ohľadom na komponentné zloženie

živnej pôdy a pH. Optimalizáciu pôvodného zloženia živnej pôdy č. 3 sme realizovali v šiestich optimalizačných stupňoch. Optimalizovali sme koncentráciu pšeničných otrúb, kukuričného škrobu, sušeného mlieka, kvasničného autolyzáta, lyofilizovanej sladinky a určili sme vhodné počiatočné pH živného média. Zistili sme, že zvýšenie koncentrácie sušeného mlieka a kvasničného autolyzáta nad pôvodné hodnoty, t.j. nad 1,0 a 0,6%, ako aj prídavok pšeničných otrúb malo za následok zníženie produkcie peptidáz. Optimálna živná pôda pre kultiváciu *Bacillus licheniformis* L-5 mala nasledovné zloženie (hmotnostné %): 0,5% kukuričný škrob, 1% sušené mlieko, 0,3% kvasničný autolyzáta a 2,7% lyofilizovaná sladinka. Počiatočné pH živnej pôdy bolo 8,5, pričom počas kultivácie pH nebolo upravované. Na základe našich predchádzajúcich poznatkov, boli ďalšie technologické parametre nastavené nasledovne: aerácia kyslíkom do 80% nasýtenia živnej pôdy, teplota 37°C, rýchlosť miešania 500ot.min.<sup>-1</sup> a čas kultivácie 23 – 25 hodín. Surový enzýmový preparát sme získali odstránením bakteriálnej kultúry a precipitáciou peptidázy acetónom schladeným na -18°C. Získaný enzým sme purifikovali viacerými chromatografickými metódami na rôznych nosičoch: gélovou filtráciou na Sephadex G-25 a Sephadex G-100, ionomeničovou chromatografiou na ECTEOLA-celulóze a afinitnou chromatografiou na *p*-aminobenzamidín-Sepharose a bacitracín-Sepharose. Gélovou filtráciou na Sephadex G-25 sme odstránením nízkomolekulových látok získali 1,55-násobne prečistený enzým s výťažkom 48,3% a na kolóne so Sephadexom G-100 sme dosiahli 14,36-násobné prečistenie enzýmu s výťažkom 13,33%. V prípade aplikácie chromatografie na ECTEOLA-celulóze sme dosiahli približne 18-násobné prečistenie s 10%-ným výťažkom. Použitím metódy afinitnej chromatografie pre účely purifikácie enzýmu prečisteného gélovou a ionomeničovou chromatografiou, sme na nosiči *p*-aminobenzamidín-Sepharose získali, podľa výsledkov elektroforézy v SDS-PAGE, homogénnu peptidázu s 58-násobným prečistením a 4,89%-ným výťažkom. Najvyšší stupeň prečistenia, 63,16 s výťažkom 5,04%, sme dosiahli po afinitnej chromatografii na nosiči bacitracín-Sepharose. Molekulová hmotnosť purifikovaného enzýmového preparátu určená metódou SDS-PAGE bola približne 29 kDa. Takto pripravený enzýmový preparát alkalickéj Ser-peptidázy je vhodný pre krmivárske a potravinárske aplikácie.

## ABSTRACT

The aim of the dissertation was to work out technologies of preparation of proteolytic enzymes using microbial producers. Fulfilling this aim demanded to deal with technologies of cultivation of production strain, isolation and purification of the enzymatic preparation. We tested five *Bacillus licheniformis* strains in three different mediums to verify the variability of their production ability. The strain L-5 on cultivating medium 3 showed the maximum production of alkaline peptidase. In the next experiments we determined the optimal conditions of the submerged cultivation of the production *Bacillus licheniformis* strain L-5 in flasks on the shaker and under conditions of a laboratory 15 L cultivation reactor (MBR-Sulzer, Switzerland). Our monitoring was aimed at component concentration

of broth and pH. Optimization of primary consistence of medium 3 was carried out in six optimization steps. We optimized the concentration of wheat grit, corn starch, milk powder, yeast autolysate, malt and we determined suitable initial pH of nutrient medium. We found that an increase in the concentrations of milk powder and yeast autolysate over original values, i.e. over 1.0 and 0.6%, as well as an addition of wheat grit resulted in a decrease of peptidase in the production. The optimal medium for cultivation of *Bacillus licheniformis* L-5 had the following composition (weight %): 0.5% corn starch, 1% milk powder, 0.3% yeast autolysate and 2.7% lyophilized malt. The initial pH of broth was 8.5 and it was not adjusted during cultivation. Based on our previous pieces of knowledge, the next technological parameters were adjusted as follows: aeration by oxygen to 80% saturating of medium, temperature 37°C, stirring speed 500 rpm and cultivation time 23 – 25 hours. We obtained the crude enzyme preparation by removing bacterial culture and by precipitation of enzyme by acetone cooled to -18°C. The enzyme obtained was purified by different chromatographical methods on various carriers: by gel filtration on a Sephadex G-25 and a Sephadex G-100, by ionexchange chromatography on an ECTEOLA-cellulose and by affinity chromatography on a *p*-amino-benzamidine-Sepharose and a bacitracin-Sepharose. By gel filtration on a Sephadex G-25 we removed the low-molecular substances and we obtained 1.55-fold purified peptidase with the enzyme yield of 48.3% and on a Sephadex G-100 column we achieved 14.33-fold purification of enzyme with the 48.3% yield. In case of the application of chromatography on ECTEOLA-cellulose we achieved approximately 18-fold purification and the yield was 10%. When we used the affinity chromatography method for the purposes of purification of enzyme purified by gel and ionexchange chromatography, we obtained on a *p*-aminobenzamidine-Sepharose homogeneous peptidase on the basis of the results of electrophoresis in a SDS-PAGE. This enzyme was 58-fold purified and the yield was 4.89%. We achieved the highest degree of purification, 63.16, and the yield of 5.04%, by affinity chromatography on a bacitracin-Sepharose. The molecular weight of the purified enzyme preparation determined by the SDS-PAGE method was approximately 29 kDa. The enzyme preparation of alkaline Ser-peptidase prepared like this is suitable for feed and food applications.