



Wydział Chemiczny

Katedra Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności

Politechnika Gdańska

ROZPRAWA DOKTORSKA

**„PRZYDATNOŚĆ ENZYMÓW Z NIEKTÓRYCH EKSTREMOFILNYCH BAKTERII
TYPU DEINOCOCCUS-THERMUS”**

mgr inż. Olga Pietrow

Promotor:

Prof. dr hab. Józef Synowiecki

Gdańsk 2013

Składam serdeczne podziękowania

*Mojemu Promotorowi Panu Prof. Józefowi Synowieckiemu
za opiekę merytoryczną, przekazaną wiedzę, życzliwość,
wsparcie i wszelką pomoc w trakcie wykonywania badań
i redagowania niniejszej pracy,*

*Koleżankom i Kolegom z Katedry Chemii, Technologii
i Biotechnologii Żywności za życzliwość i miłą atmosferę pracy,*

*Rodzicom,
za trud włożony w moje wychowanie i wykształcenie,*

Najbliższym za wsparcie, dobre słowo i wiarę we mnie.

SPIS TREŚCI

1.	Streszczenie	5
2.	Wprowadzenie	6
3.	Charakterystyka bakterii stosowanych do badań	8
3.1	<i>Meiothermus ruber</i>	10
3.2	<i>Deinococcus radiodurans</i>	12
3.3	<i>Deinococcus geothermalis</i>	15
4.	Właściwości, źródła i zastosowanie trehalozy	16
4.1	Ogólna charakterystyka trehalozy	16
4.2	Produkcja trehalozy.....	20
4.3	Biosynteza trehalozy	20
4.4	Zastosowanie trehalozy	23
4.5	Charakterystyka α -D-glukozylotransferazy maltozy	24
5.	Różnorodność i występowanie enzymów proteolitycznych	26
5.1	Klasyfikacja enzymów proteolitycznych	26
5.2	Zastosowanie enzymów proteolitycznych	28
5.3	Mechanizm działania.....	31
6.	Cel pracy	35
7.	Materiały	36
7.1	Szczepy mikroorganizmów	36
7.2	Składniki podłoża mikrobiologicznych	36
7.3	Odczynniki chemiczne	36
7.4	Aparatura	38
8.	Metody badań	39
8.1	Badanie α -D-glukozylotransferazy maltozy	39
8.1.1	Szczep i warunki hodowli	39
8.1.2	Biosyntaza i oczyszczanie białka.....	41
8.1.3	Oznaczanie aktywności α -D-glukozylotransferazy maltozy	41
8.1.4	Wyznaczenie optymalnej temperatury i pH.....	42
8.1.5	Określenie wpływu temperatury i pH na stabilność enzymu	42
8.1.6	Wyznaczenie stałych kinetycznych	42
8.1.7	Oddziaływanie kationów.....	42
8.1.8	Wpływ związków chemicznych na aktywację lub inhibicję	43
8.1.9	Wpływ czasu konwersji maltozy.....	43
8.1.10	Oznaczanie zawartości białek.....	43
8.1.11	Wyznaczenie masy cząsteczkowej metodą filtracji żelowej	43
8.1.12	Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE).....	44
8.2	Badanie proteaz.....	45
8.2.1	Przygotowanie inokulum <i>Deinococcus geothermalis</i> i <i>Meiothermus ruber</i>	45
8.2.2	Warunki hodowli <i>Deinococcus geothermalis</i> i <i>Meiothermus ruber</i>	45
8.2.3	Wyznaczenie krzywej wzrostu	45
8.2.4	Określenie wpływu warunków hodowli na produkcję enzymów proteolitycznych	46
8.2.5	Badanie wpływu składu podłoża na wydajność wytwarzania proteaz	46
8.2.6	Przygotowanie ekstraktu białek komórkowych <i>Deinococcus geothermalis</i> i <i>Meiothermus ruber</i>	46
8.2.7	Wysalanie białek cieczy pohodowlanej siarczanem (VI) amonu.....	47
8.2.8	Strącanie białek cieczy pohodowlanej rozpuszczalnikami organicznymi	47
8.2.9	Oczyszczanie enzymu o aktywności proteolitycznej	47
8.2.10	Oznaczanie aktywności proteolitycznej	48
8.2.11	Wyznaczenie optymalnej temperatury i pH.....	48
8.2.12	Określenie wpływu temperatury i pH na stabilność enzymu	48
8.2.13	Wyznaczenie stałych kinetycznych	49
8.2.14	Oddziaływanie kationów.....	49
8.2.15	Wpływ związków chemicznych na aktywację lub inhibicję	49
8.2.16	Specyficzność substratowa.....	49
8.2.17	Oznaczanie zawartości białek.....	50
8.2.18	Wyznaczenie masy cząsteczkowej metodą filtracji żelowej	50
8.2.19	Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE).....	51
8.2.20	Oznaczanie aktywności metodą zymografii żelowej	51
8.2.21	Zmiany aktywności enzymu podczas przechowywania	51
8.3	Analiza statystyczna wyników.....	52
9.	Omówienie wyników	53
9.1	Charakterystyka α -D-glukozylotransferazy maltozy z <i>Deinococcus radiodurans</i>	53
9.1.1	Oczyszczanie α -D-glukozylotransferazy maltozy z <i>Deinococcus radiodurans</i>	53
9.1.2	Właściwości α -D-glukozylotransferazy maltozy z <i>Deinococcus radiodurans</i>	55
9.1.3	Wpływ kationów	56
9.1.4	Oddziaływanie niektórych substancji.....	57
9.1.5	Specyficzność działania	60

9.1.6	Stopień konwersji w czasie	62
9.1.7	Masa cząsteczkowa	63
9.2	Charakterystyka proteaz z <i>Meiothermus ruber</i> i <i>Deinococcus geothermalis</i>	65
9.2.1	Hodowla bakterii <i>Deinococcus geothermalis</i> i <i>Meiothermus ruber</i>	65
9.2.2	Wpływ warunków hodowli na wydajność protez	67
9.2.3	Otrzymywanie oczyszczonego preparatu	70
9.2.4	Właściwości i warunki działania proteaz z <i>Deinococcus geothermalis</i> i <i>Meiothermus ruber</i>	74
9.2.5	Wpływ kationów	77
9.2.6	Oddziaływanie niektórych związków chemicznych	79
9.2.7	Specyficzność substratowa	82
9.2.8	Masa cząsteczkowa	85
9.2.9	Wpływ czasu na aktywność enzymatyczną	86
10.	Wnioski	88
11.	Dorobek naukowy	91
12.	Piśmiennictwo	95
13.	Skróty i oznaczenia stosowane w pracy	106

1. Streszczenie

Przedmiotem badań było określenie przydatności i charakterystyka niektórych enzymów z ekstremofilnych bakterii typu *Deinococcus-Thermus*. Obszar prowadzonych prac dotyczył analizy α -D-glukozylotransferazy maltozy z *Deinococcus radiodurans* oraz proteaz pochodzących z *Deinococcus geothermalis* i *Meiothermus ruber*.

Preparat α -D-glukozylotransferazy maltozy otrzymano z wykorzystaniem rekombinantowego szczepu *Escherichia coli* (DE3) Rosetta pLysS transformowanego plazmidem *DraSTpET3His*. Hodowlę rekombinantowego szczepu *E. coli* prowadzono w temperaturze 37°C na podłożu płynnym LB (pH 7,2), zawierającym na litr: 10 g peptonu K, 5 g ekstraktu drożdżowego, 10 g NaCl, 20 mg kanamycyny oraz 34 mg chloramfenikolu, aż do uzyskania $OD_{600}=0,5$. Następnie dodawano induktora o stężeniu końcowym 1mM IPTG w pożywce i hodowlę kontynuowano w 25°C przez 16 godzin. Uzyskaną biomasę sonifikowano i uzyskany lizat komórkowy poddawano denaturacji termicznej (56°C, 10 min). Następnie preparat dalej oczyszczano poprzez zastosowanie chromatografii metalopowinowactwa na złożu IDA (Novagen) z jonami Co^{2+} wiążącymi białka fuzyjne. Pozwoliło to na uzyskanie homogennego preparatu o czystości elektroforetycznej 92% i aktywności specyficznej 11,83 U/mg. Masa cząsteczkowa α -D-glukozylotransferazy maltozy wyznaczona z zastosowaniem filtracji żelowej wynosi 126,9 kDa, natomiast masa ustalona za pomocą elektroforezy w warunkach denaturujących wynosi w przybliżeniu 64 kDa. Świadczy to, że dany enzym przyjmuje strukturę dimeryczną. Największą aktywność α -D-glukozylotransferazy maltozy przejawia w temperaturze 30°C przy pH 7,6 i w 45°C prawie nie ulega inaktywacji w badanym okresie inkubacji wynoszącym 2 godziny. W zakresie pH od 5,5 do 9 enzym zachowuje połowę aktywności maksymalnej. Wartość stałej Michaelisa (K_m) reakcji konwersji maltozy do trehalozy wynosi 290,70 mM, a V_{max} reakcji wynosi 1,236 μ mol/min. Maksymalny stopień konwersji maltozy osiągnięty jest po 24 godzinach i wynosi 58 %. Wartość stałej Michaelisa (K_m) reakcji konwersji trehalozy do maltozy wynosi 486,14 mM, a V_{max} reakcji wynosi natomiast 0,917 μ mol/min. Wydajność katalityczna (K_{cat}/K_m) α -D-glukozylotransferazy maltozy z *Deinococcus radiodurans* jest ponad dwukrotnie wyższa dla reakcji konwersji maltozy niż konwersji trehalozy co wskazuje, że jako substrat reakcji preferowana jest maltoza. Badanie oddziaływania różnych inhibitorów wykazało całkowitą utratę aktywności enzymu pod wpływem pepstatyny, kwasu jodooctowego i fluorku fenylometylosulfonowego. Prawie całkowita utrata aktywności *DraSTHis* była odnotowana w przypadku jonów Cu^{2+} , Al^{3+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} i Fe^{3+} natomiast jony Ca^{2+} i Mg^{2+} nie wpływają znacząco na aktywność katalityczną enzymu. Brak oddziaływania w stosunku do enzymu ze strony 2-merkaptioetanolu i ditiotreitolu sugeruje, że mostki disulfidowe wpływające na IV rzędową konformację białka nie zmieniają działania centrum aktywnego i ich redukcja nie wpływa na aktywność katalityczną transferazy. Glukoza, będąca produktem ubocznym reakcji konwersji, jest produkowana w niewielkiej ilości i stanowi zaledwie 4 % mieszaniny preakcyjnej.

Hodowlę *Deinococcus geothermalis* prowadzono w temperaturze 45°C na podłożu o składzie: 0,1% pepton K, 0,1% ekstrakt drożdżowy i 0,2% sól morską. Wykazano, że *D. geothermalis* wytwarza zewnątrzkomórkową proteazę, której synteza jest skorelowana ($r=0,981$) z przyrostem ilości komórek. Największa produkcja proteaz była odnotowana podczas hodowli w temperaturze 45°C i pH 8 na podłożu standardowym (5461,1 U/L) i ekstrakcie drożdżowym (4077,8 U/L). Największą aktywność proteolityczną wykazała frakcja białek wysolona z cieczy pohodowlanej przy 90% nasyceniu siarczanu (VI) amonu (48,3 U/mg białka). Oczyszczanie przy pomocy filtracji żelowej na złożu Sephadex G-100 umożliwiło prawie 8-krotny wzrost aktywności specyficznej preparatu (301,1 U/mg białka). Masa proteazy określona przy pomocy SDS-PAGE i sączenia molekularnego wynosiła 25 kDa i 23,9 kDa odpowiednio, co wskazuje, że białko jest monomerym. Enzym z *D. geothermalis* wykazuje największą aktywność w 60°C przy pH 9. Białko cechuje się też dużą termostabilnością zachowując w 60°C prawie nie zmienioną aktywność w badanym okresie inkubacji wynoszącym 1 godzinę. Proteaza pozostaje stabilna w szerokim zakresie pH od 5,5 do 10,5 zachowując 80% aktywności początkowej. Badanie oddziaływania różnych inhibitorów sugeruje, że wytworzony przez *Deinococcus geothermalis* enzym jest proteazą serynową. Świadczy o tym znaczny spadek aktywności, do 28% początkowej wartości, pod wpływem 1 mM fluorku fenylometylosulfonowego (PMSF) przy braku oddziaływania jodoacetamidu będącego inhibitorem proteaz cysteinowych. Spadek aktywności był odnotowany w przypadku działania na enzym jonami Cu^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} i Co^{2+} natomiast jony Ca^{2+} , Na^+ i Mg^{2+} nie wpływają niekorzystnie na aktywność katalityczną enzymu. Oddziaływanie ze strony ditiotreitolu sugeruje, że mostki disulfidowe zmieniają działanie centrum aktywnego i ich redukcja wpływa na aktywność katalityczną proteazy. Wysoka stabilność proteaz względem związków chemicznych takich jak Triton X-100 czy Tween 80 sugeruje, iż enzym produkowany przez *D. geothermalis* może być używany przy produkcji detergentów. Wartość stałej Michaelisa (K_m) reakcji hydrolizy azokazeiny wynosi 1,64 mg/mL, a V_{max} reakcji 2,18 U/min. Enzym z *Deinococcus geothermalis* wykazuje szerokie i zróżnicowane powinowactwo substratowe. Najwyższą aktywność hydrolityczną odnotowano w przypadku substratów takich jak hemoglobina, kazeina czy β -globulina wołowa. Zmniejszoną aktywność proteaza wykazuje natomiast względem keratyny czy albuminy jaja kurzego. Zliofilizowany preparat przechowywany w warunkach chłodniczych (+4°C) po upływie 12 tygodni wykazywał 58,9% aktywności początkowej.

Kultywacja *Meiothermus ruber* była prowadzona w 55°C na podłożu zawierającym 0,5% peptonu K, 0,1% ekstraktu drożdżowego i 0,1% skrobi. Zewnątrzkomórkowa aktywność proteolityczna jest wysoce skorelowana ($r=0,991$) z gęstością optyczną zawiesiny komórek co wskazuje, że produkcja proteaz zależy od przyrostu biomasy. Największa produkcja enzymu była odnotowana podczas hodowli w temperaturze 55°C i pH 8 na ekstrakcie wołowym (10455,6 U/L), ekstrakcie drożdżowym (9011,1 U/L) i podłożu standardowym (8011,1 U/L). Uzyskanie homogennego preparatu enzymatycznego było możliwe przy wykorzystaniu dwuetapowego systemu oczyszczania złożonego z wysalania białek cieczy pohodowlanej $(NH_4)_2SO_4$ przy 90% wysyceniu soli i sączeniu molekularnym na złożu Sephadex G-100. Przeprowadzone etapy pozwoliły na prawie 13-krotne oczyszczenie preparatu i uzyskanie enzymu o aktywności specyficznej 351,2 U/mg. Na podstawie filtracji żelowej ustalono, że przybliżona wielkość białka wynosi 47,8 kDa natomiast szacunkowa masa określona na bazie elektroforezy w warunkach denaturujących wynosi 45 kDa, co sugeruje, że proteaza zbudowana jest z jednej podjednostki. Optymalne warunki działania enzymu z *Meiothermus ruber* to 80°C i pH 9. Godzinna inkubacja enzymu z *M. ruber* w 80°C w środowisku buforu fosforanowo-cytrynianowego o pH 8,0 powoduje spadek aktywności enzymatycznej jedynie o 39%. Natomiast w zakresie temperatur od 40 do 75°C preparat nie traci swojej aktywności. Proteaza pozostaje stabilna w szerokim zakresie pH od 7 do 11,5 zachowując 80% aktywności początkowej. Zaobserwowano silne oddziaływanie inaktywujące ze strony 1 mM fluorku fenylometylosulfonowego (PMSF) co wskazuje na przynależność enzymu z *M. ruber* do grupy proteaz serynowych. Spadek aktywności był odnotowany w przypadku działania na enzym jonami Cu^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} i Co^{2+} , natomiast jony Ca^{2+} i Mn^{2+} powodowały wzrost aktywności enzymu. W przypadku działania detergentów (Triton X-100, Tween 80) czy też 4M mocznika nie stwierdzono inaktywacji. Dodatkowo wykazano, że enzym jest wysoce stabilny w środowisku rozpuszczalników organicznych. Nie odnotowano znaczących spadków aktywności w przypadku 25% roztworów izopropanolu, etanolu, metanolu, dimetylosulfotenu czy acetonu. Wartość stałej Michaelisa (K_m) względem azokazeiny wynosi 4,76 mg/mL, a V_{max} reakcji 36,6 U/min. Enzym z *Meiothermus ruber* jest proteazą o szerokim spektrum specyficzności i wykazuje zróżnicowane powinowactwo substratowe. Najwyższą aktywność hydrolityczną odnotowano względem takich substratów jak hemoglobina, kazeina, BSA czy keratyna. Obniżoną aktywność enzym przejawiał natomiast w przypadku żelatyny i lizozymu. Zliofilizowany preparat przechowywany w warunkach chłodniczych (+4°C) po upływie 12 tygodni wykazywał 74,1 % aktywności początkowej.

2. Wprowadzenie

Enzymy działające jako biokatalizatory są wykorzystywane od wielu lat i reakcje prowadzone z ich udziałem stanowią doskonały, przyjazny dla środowiska zamiennik dla wielu obecnie stosowanych procesów przemysłowych takich jak produkcja paliw i chemikaliów czy zagospodarowanie uciążliwych dla środowiska odpadów. Właściwości używanego biokatalizatora muszą pozostawać kompatybilne z parametrami technologicznymi procesu. Jednakże znaczna część dostępnych na rynku enzymów pochodzi z organizmów mezofilnych i ich zastosowanie jest limitowane ograniczoną stabilnością pod wpływem niekorzystnych warunków takich jak temperatura, pH czy siła jonowa (Gomes i in., 2004; Hough i Danson, 1999). Praktyka wskazuje, że większość enzymów działa najlepiej w podobnych warunkach, w jakich żyje wytwarzający je organizm (Fikus, 1996). Zatem ekstremofile zasiedlające biotopy niekorzystne dla rozwoju innych organizmów oraz stanowiące bogate źródło ekstremozymów są rozwiązaniem problemu. W konsekwencji coraz więcej uwagi poświęca się tym mikroorganizmom, a biokataliza z ich użyciem powoli przekształca się z działalności naukowej w opłacalne technologie przemysłowe (Gomes i in., 2004; Vieille i Zeikus, 2001).

Wykorzystanie ekstremofili lub ich metabolitów w przemyśle jest powszechne (Tabela 1). Sztandarowym przykładem jest używana powszechnie w reakcji PCR termostabilna polimeraza z *Thermus aquaticus*. Obecnie reakcja łańcuchowa polimerazy jest podstawą w badaniach kryminalistycznych, diagnostyce klinicznej czy w badaniach genomów (Madigan i in., 1997). Z kolei kwasolubne bakterie *Leptospirillum ferrooxidans* i *Thiobacillus ferrooxidans* wykorzystywane są do odzyskiwania miedzi. Niskie pH reakcji jest konieczne, gdyż zapobiega precypitacji Fe^{3+} podczas utlenienia chalkopiryty ($CuFeS_2$). Szacuje się, że roczne odzyskiwanie miedzi metodami mikrobiologicznymi przekracza milion ton. W ostatnich latach zastosowano bioługowanie, między innymi w Afryce Południowej, Brazylii i Australii, jako podstawową metodę wydobywania złota z ubogich rud arsenopirytowych (Singleton, 2000).

Poli- β -hydroksymaślan, stanowiący materiał zapasowy bakterii jest wykorzystywany do produkcji tworzyw termoplastycznych podlegających biodegradacji („Biopol”). Biopol jest wytwarzany przez bakterie *Alcaligenes eutrophus* w procesie fermentacji glukozy i gromadzony w ich komórkach. Wyodrębniony z bakterii i oczyszczony polimer poddawany jest granulacji i w takiej formie może być stosowany w klasycznych technologiach przetwórstwa tworzyw sztucznych: wtrysk, wytłaczanie, wytłaczanie z rozdmuchem,

powlekanie, termoformowanie itp. Charakteryzuje się dużą stabilnością i wytrzymałością, a także odpornością na dużą wilgotność otoczenia w czasie użytkowania i magazynowania. Jest także materiałem barierowym dla aromatów (Singleton, 2000).

Tabela 1. Przykłady zastosowania ekstremofili w biotechnologii.

Źródło	Zastosowanie
Termofile Polimeraza DNA Ligaza DNA Fosfataza alkaliczna Proteazy i lipazy Lipazy, pullulanazy, amylopullulanazy i proteazy α -amylazy, glukoamylazy, α -glukozydazy, pullulanazy, amylopullulanazy, ksylozowa/glukozowa izomeraza Dehydrogenaza alkoholowa Ksyłanazy Antybiotyki Białka warstwy S i lipidy Mikroorganizmy degradujące olej Mikroorganizmy utleniające siarkę Konsorcja termofili	Amplifikacja DNA Łańcuchowa reakcja ligazy Diagnostyka Produkty mleczne Browarnictwo, piekarnictwo, produkcja aminokwasów Przetwórstwo skrobi, produkcja glukozy i fruktozy Synteza chemiczna Przemysł papierniczy Farmaceutyki Sita molekularne Surfaktanty Bioługowanie, odsiarczanie węgla i gazów Przerób odpadów i produkcja odpadów
Psychrofile Fosfataza alkaliczna Proteazy, lipazy, celulazy i amylazy Lipazy i proteazy Proteazy Wielonienasycone kwasy tłuszczowe Różnorodne enzymy β -galaktozydaza Białka lodotwórcze Bakterie „niełodotwórcze” Różnorodne enzymy (np. dehydrogenazy) Różnorodne enzymy (np. oksydazy) Bakterie metanowe	Biologia molekularna Detergenty Przemysł mleczarski Tenderyzacja mięsa, detergenty Dodatki do żywności, suplementy diety Modyfikatory smaku Bezlaktosowe produkty mleczne Sztuczny śnieg, lody Preparaty krioprotekcyjne do roślin Biotransformacja Bioremediacja, biosensory środowiskowe Produkcja biogazu
Halofile Bakteriorodopsyna Polihydroksyalkaniany Eukariotyczne homologi (produkty onkogenów) Lipidy Kwas γ -linolenowy, β -karoten i ekstrakty komórkowe (np. <i>Spirulina</i> i <i>Dunaliella</i>) Mikroorganizmy	Przełączniki optyczne i generatory prądu w bioelektronice Produkcja plastycznych materiałów medycznych Diagnostyka, badanie leków przeciwnowotworowych Liposomy stosowane w przemyśle kosmetycznym i farmaceutycznym Zdrowa żywność, suplementy diety, barwniki żywności, surowiec Zagospodarowanie odpadów
Alkalofile Proteazy, celulazy, ksyłanazy, lipazy i pullulanazy Elastazy, keratynazy Cyklodekstryny Ksyłanazy i proteazy Pektynazы Alkalofilne halofile Różnorodne mikroorganizmy	Detergenty Przemysł garbarski Środki spożywcze, chemiczne, farmaceutyki Przemysł papierniczy Zagospodarowanie odpadów, oczyszczanie surowców Odzyskiwanie oleju Antybiotyki
Acidofile Mikroorganizmy utleniające siarkę Mikroorganizmy	Odzysk metali i odsiarczanie węgla Produkcja kwasów i rozpuszczalników organicznych
Mikroorganizmy tolerujące rozpuszczalniki organiczne	Bioremediacja, biokonwersja związków nierozpuszczalnych w wodzie (np. steroli), biosurfaktanty
Mikroorganizmy odporne na promieniowanie	Biodegradacja radioaktywnych odpadów
Barofile	Ulepszenie procesu odzyskiwania olejów.

wg Satyanarayana i in., 2005

Stosunkowo niewielka liczba gatunków ekstremofili została wyizolowana i szczegółowo scharakteryzowana. Tak więc jasne jest, że duża liczba potencjalnie przydatnych ekstremozymów jest nadal nieodkryta (Baross i Holden, 1996; Adams i Kelly, 1994). Podczas gdy większość ekstremofili to archeony, niektóre z nich należą do bakterii, pośród których typ *Deinococcus-Thermus* stanowi dużą grupę zróżnicowanych mikroorganizmów zasiedlających ekstremalne środowiska. Z tej przyczyny bakterie te stanowią niezwykle ciekawy, wyjściowy materiał badawczy nie tylko w dziedzinie enzymologii.

3. Charakterystyka bakterii stosowanych do badań

Typ *Deinococcus-Thermus* stanowi grupę niepatogennych bakterii zróżnicowaną pod względem biochemicznym, fizjologicznym oraz fenotypowym. W jego skład wchodzi ziarniaki i pałeczki, które charakteryzują się wysoką odpornością na niekorzystne warunki środowiska i są zaliczane do ekstremofili. Typ *Deinococcus-Thermus* obejmuje dwie duże grupy bakterii (Rys. 1):

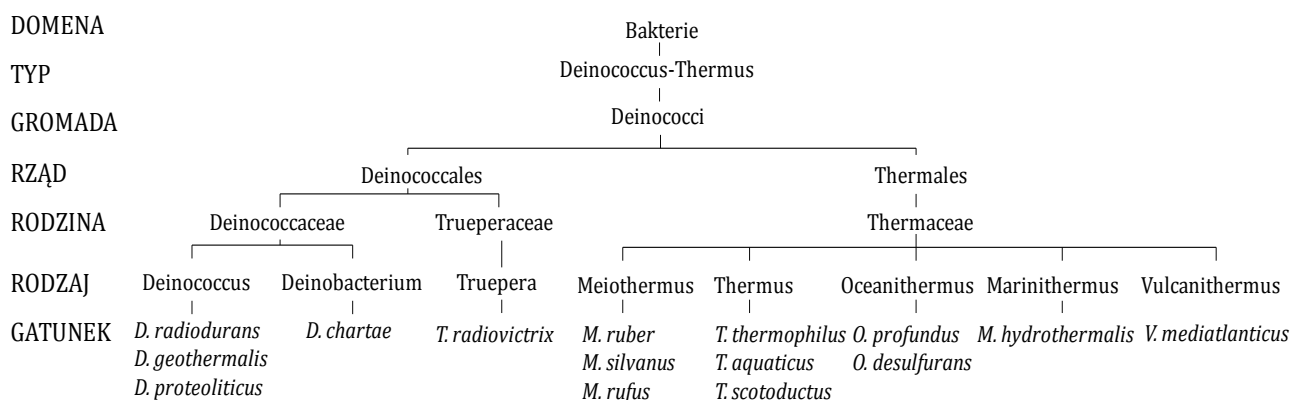
Deinococcales znane ze swojej wysokiej odporności na promieniowanie jonizujące są w stanie wytrzymać 100–krotnie większe dawki promieniowania (150 kGy) niż *E. coli*. Dodatkowo organizmy te są odporne na promieniowanie UV, czynniki utleniające i stany całkowitego odwodnienia.

Thermales obejmuje kilka rodzajów (*Meiothermus*, *Oceanithermus*, *Thermus*, *Vulcanithermus*, *Marinithermus*) termofilnych bakterii odpornych na wysokie temperatury. Podczas gdy bakterie posiadające błonę zewnętrzną, charakterystyczną dla bakterii Gram-ujemnych, i barwią się na czerwono, te które należą do rodzaju *Deinococcus* posiadają grubą warstwę peptydoglikanu, co powoduje, że w barwieniu metodą Grama dają wynik dodatni (Giffiths i in., 2004).

Analiza podjednostki 16S rRNA wskazuje, że bakterie należące do typu *Deinococcus-Thermus* mają wspólnego przodka (Weisburg i in., 1989; Rainey i in., 1997; Omelchenko i in., 2005). Potwierdzeniem tego przypuszczenia jest duża liczba sekwencji konserwatywnych występujących w materiale genetycznym, charakterystycznych wyłącznie dla tych bakterii. Badania porównawcze genomów pozwoliły zidentyfikować 65 białek, unikatowych i występujących jedynie w bakteriach typu *Deinococcus-Thermus*. Oprócz czterech protein, funkcja pozostałych nie jest jeszcze dokładnie poznana. Charakterystyczne dla grupy *Deinococcus-Thermus* jest białko warstwy S (DR102). Zarówno *Deinococcales*, jak i *Thermales* otoczone są białkową warstwą S o heksagonalnej geometrii, która pełni rolę

ochronnego płaszcza jak również sita molekularnego czy miejsca wiązania enzymów zewnątrzkomórkowych. Białko DR102 najprawdopodobniej pełni znaczącą rolę w funkcjonowaniu tej warstwy. Kolejnym specyficznym białkiem (DR1194) jest reduktaza wiążąca się z centrami Fe-S. Dwa pozostałe białka to syntaza ATP typ V (DR0697) oraz kinaza diacyloglicerolu (DR2093) (Griffiths i in., 2007).

Bakterie typu *Deinococcus-Thermus* stanowią jedyną grupę mikroorganizmów niefototroficznych wykazujących zdolność syntezy karotenoidów. Zazwyczaj rosną w postaci czerwonych, pomarańczowych lub różowych kolonii. Izolacja i zdefiniowanie struktury chemicznej karotenoidów z *Deinococcus-Thermus* pokazało, że ich cząsteczki różnią się od karotenoidów innych organizmów. Deinoksantyna [(2R)-2,1'-Dihydroksy-3',4'-didehydro-1',2'-dihydro-β,Ψ-karoteno-4-on] czyli główny karotenoid *Deinococcus radiodurans* różni się od flexiksantyny wyizolowanej z *Flexibacter* sp. tym, że posiada dodatkową grupę hydroksylową przy węglu C2 (Saito i in. 1998). Stwierdzono, że spośród karotenoidów scharakteryzowanych do tej pory, ten monocykliczny, hydroksylowany przy węglu C2 karotenoid jest specyficzny dla rodzaju *Deinococcus*. Z kolei termozeaksantyna, występująca jedynie u *Thermus* spp., stanowi rzadki przykład karotenowego estru glukozy (estrowa pochodna zeaksantyny).



Rys.1. Klasyfikacja bakterii typu *Deinococcus-Thermus*. Na podstawie <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy>

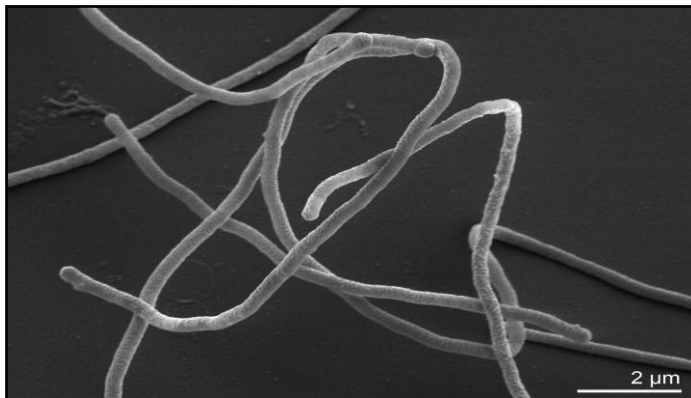
Karotenoidy działające jak antyoksydanty są elementem komórkowego mechanizmu obronnego bakterii powodując jej zwiększoną odporność na stres środowiskowy. Przykładem może być pozbawiony karotenoidu mutant wyizolowany z hodowli *D. radiodurans*, który był około 100-krotnie bardziej wrażliwy na działanie 50 mM H₂O₂ niż szczep dziki (Bing i in., 2010). Ponadto stwierdzono, że karotenoidy specyficzne dla typu *Deinococcus-Thermus* wykazują większą zdolność wygaszania reaktywnych form tlenu (ROS) w porównaniu do

klasycznych karotenoidów (Ji, 2010). Zdolność wygaszania ROS przez deinoksaninę jest wyższa o 20% niż β -karotenu, likopenu, luteiny czy zeaksantyny (Tian i in., 2007). Badania *in vitro* pokazały, że deinoksanina czterokrotnie lepiej chroni DNA przed działaniem wolnych rodników niż β -karoten. Karotenoidy z *D. radiodurans* chronią przed uszkodzeniami oksydacyjnymi również białka. Poziom utlenionych białek komórkowych pod wpływem działania H_2O_2 był wyższy o 25% w przypadku mutanta nie wytwarzającego karotenoidów. Karotenoidy syntezowane przez bakterie *Deinococcus-Thermus* stanowią jeden z czynników ochronnych, który wpływa na niebywałą wytrzymałość tych bakterii (Bing i in., 2010).

3.1 *Meiothermus ruber*

Bakterie *Meiothermus ruber* o optymalnej temperaturze wzrostu 60°C przy pH około 8,0 po raz pierwszy wyizolowano z gorących źródeł Kameczatki (Loginova i in., 1975). Drobnoustroje te często tworzą biofilmy powodujące plamy na papierze podczas jego produkcji. Bakteria *Meiothermus ruber* jest Gram-ujemną, nieruchliwą pałeczką o zaokrąglonych końcach. Poszczególne komórki mogą łączyć się w krótkie filamenty (Rys 2). Długość tej bakterii waha się od 3 do 6 μm , a średnica wynosi od 0,5 do 0,8 μm . Jest bakterią nie wytwarzającą spor. *Meiothermus ruber* jest umiarkowanym termofilem, którego minimalna temperatura wzrostu waha się w granicach 35-40°C, a maksymalna wynosi natomiast 70°C (Sharp i in., 1988). *Thermus ruber* był początkowo włączany do rodzaju *Thermus*. Na podstawie analizy podobieństw sekwencji 16S rRNA doprowadzono do podziału gatunków zaliczanych do rodzaju *Thermus* na dwie grupy. Do jednej z nich zachowującej nazwę *Thermus* zaliczono drobnoustroje o optymalnych temperaturach wzrostu wynoszących 65-80°C, a do drugiej zabarwione na czerwono i rozwijające się najlepiej w temperaturze 50-65°C bakterie *Thermus ruber*, *Thermus silvanus* i *Thermus chliarophilus*, które zaklasyfikowano do nowo utworzonego rodzaju *Meiothermus* (Nobre i in., 1996). Zakres podobieństwa jednostki 16S rRNA pomiędzy *Thermus* i *Meiothermus* jest mniejszy niż 88%.

Mikroorganizm ten wytwarza jasnoczerwony pigment, którym jest karotenoid przypominający spektralnymi właściwościami retro-dehydro- γ -karoten. Pełni on funkcję fotoprotektora oraz stabilizuje struktury błony komórkowej wskutek spinania dwuwarstwy lipidowej przez estry glikozydowe karotenoidów oraz tworzenie oddziaływań van der Waalsa (Burgess i in., 1999).



Rys. 2. Obraz filamentów *Meiothermus ruber* ze skaningowego mikroskopu elektronowego (Tindall i in., 2010).

Meiothermus ruber jest obligatoryjnym tlenowcem. Do jego hodowli można stosować podłoża minimalne zawierające 0,15% (w/v) peptonu jako źródła azotu, 0,05% (w/v) ekstraktu drożdżowego i jako źródło węgla 0,25% (w/v): roztwory D-glukozy, sacharozy, maltozy, D-galaktozy, D-mannozy, ramnozy, D-celobiozy, glicerolu, D-mannitolu, octanu, pirogronianu, bursztynianu, fumaranu czy DL-jabłczanu.

Główne kwasy tłuszczowe występujące w lipidach tej bakterii to: kwas izo-pentadekanowy, 30,6%; kwas izo-heptadekanowy, 15,8%; kwas antyizo-pentadekanowy, 8,3% i kwas antyizo-heptadekanowy 7,3% (wyrażone jako procent wszystkich kwasów tłuszczowych) (Loginova i in., 1984; Donato i in., 1991). *Meiothermus ruber* posiada zdolność hydrolizy kazeiny, fibryny i żelatyny (Sharp i in. 1988). Genom *Meiothermus ruber* składa się z kolistego chromosomu długości 3097457 pz, który zawiera 63,4% guaniny oraz cytozyny (Tindall i in., 2010).

Meiothermus ruber jest dobrym źródłem termostabilnych enzymów ze względu na satysfakcjonującą wydajność biomasy i możliwość hodowli w warunkach tlenowych na nieskomplikowanych i tanich podłożach. Wykazano, że mikroorganizm można z powodzeniem wykorzystać do otrzymywania takich biokatalizatorów jak α -glukozydaza, β -galaktozydaza czy syntaza trehalozy (Synowiecki i in., 2009; Zhu i in., 2010). Syntaza trehalozy umożliwi wytwarzanie trehalozy ze skrobi lub maltozy. Obniży to znacznie koszty produkcji tego cukru i pozwoli na poszerzenie zakresu jego zastosowań. Wyjątkowe właściwości tego disacharydu można wykorzystać w przemyśle spożywczym oraz w medycynie, biologii oraz farmacji gdzie posłuży do stabilizacji i konserwacji niektórych preparatów stosowanych w leczeniu i diagnostyce medycznej.

Zastosowanie β -galaktozydazy w przemyśle spożywczym jest bardzo szerokie. Jest ona głównie wykorzystywana do produkcji bezlaktozowego mleka, przeznaczonego dla ludzi cierpiących z powodu nietolerancji laktozy. Powodem dla którego stosuje się β -galaktozydazę

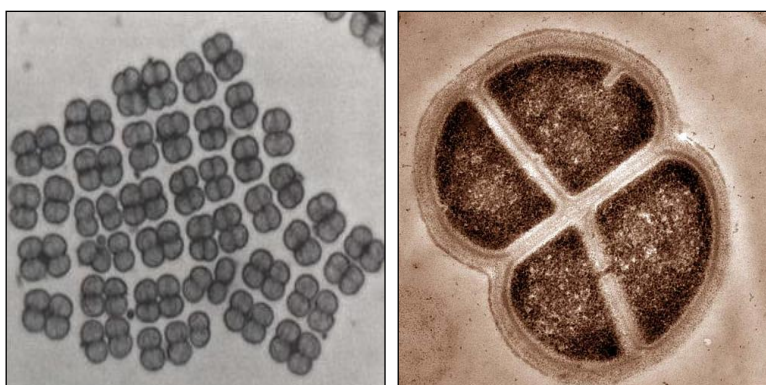
stanowi również fakt, że znajdująca się w mleku i serwatce laktoza utrudnia wiele procesów technologicznych (Synowiecki i in., 2000).

Z kolei termostabilna α -glukozydaza z *Meiothermus ruber* pozwoli na skrócenie czasu trwania procesu i obniżenie kosztów jednoetapowej hydrolizy skrobi katalizowanej układem multienzymatycznym. Enzymatyczną hydrolizę skrobi stosuje się powszechnie w browarnictwie, gorzelnictwie oraz w produkcji syropów skrobiowych (Sinkiewicz, 2008).

3.2 *Deinococcus radiodurans*

Bakterie *Deinococcus radiodurans* po raz pierwszy wyizolowano z konserw mięsnych utrwalonych uprzednio działaniem promieniowania X (Andersor i in., 1956). *Deinococcus radiodurans* jest Gram-dodatnim, nieprzetrwalnikującym ziarniakiem, którego komórki osiągają wielkość 1-2 μm i formują tetrady (Rys.3).

Odznacza się tlenowym typem oddychania i zaliczany jest do grupy bakterii mezofilnych ze względu na optymalną temperaturę wzrostu, która wynosi 30°C.



Rys. 3. Obraz mikroskopowy *Deinococcus radiodurans* (www.garciajeanolouis9051.perso.neuf.fr, www.djibnet.com).

Deinococcus radiodurans jest bakterią proteolityczną wykorzystującą jako źródło energii głównie aminokwasy i peptydy wytworzone przez hydrolizę białek znajdujących się w środowisku wzrostu. Aminokwasy są też źródłem azotu dla tej bakterii, która nie jest w stanie korzystać z jego nieorganicznych źródeł (Makarova i in., 2001; Slade i in., 2009). Mikroorganizm ten wytwarza charakterystyczny dla bakterii typu *Deinococcus-Thermus* czerwony pigment (Makarova i in., 2001). *Deinococcus radiodurans* posiada genom o wielkość 3,28 Mbp, który składa się z dwóch chromosomów (o wielkości odpowiednio 2,64 Mbp i 0,41 Mbp), megaplazmidu (0,18 Mbp) oraz plazmidu (0,045 Mbp). Zawartość guaniny oraz cytozyny w kwasie deoksyrybonukleinowym wynosi 66,6%. W zależności od fazy wzrostu komórka *Deinococcus radiodurans* zawiera od 4 do 10 kopii genomu (Cox i Batitista, 2005). *Deinococcus radiodurans* jest niezwykle odporny na działanie

promieniowania jonizującego, promieniowania UV, nadtlenu wodoru oraz innych czynników działających mutagennie, jak również na wysuszenie (Makarova i in., 2001). Może przetrwać dawkę promieniowania γ rzędu 15 kGy bez wpływu na przeżywalność populacji czy wywoływanie mutacji. Ponadto odnotowuje się dobry wzrost mikroorganizmu podczas ciągłego napromieniowywania (60 Gy/h) bez widocznego zmniejszenia szybkości wzrostu (Brim i in., 2000). Niezwykła odporność tych drobnoustrojów jest spowodowana występowaniem w ich komórkach rozmaitych, wydajnych mechanizmów naprawczych, likwidujących zmiany materiału genetycznego polegające między innymi na jedno lub dwuniciowych uszkodzeniach DNA, tworzeniu dimerów pirymidynowych i deaminacji zasad lub ich alkiowaniu z utworzeniem 7-metyloguanidyny (Sghaier i in., 2008; Omelchenko i in., 2005). Skuteczne są też sposoby zapobiegania zmianom ważnych fizjologicznie białek, inicjowanych powstaniem wolnych rodników i wywołanego promieniowaniem rozszczepienia mostków dwusiarczkowych. Działanie mechanizmów naprawczych wymaga jednak dość dużego zużycia energii, kosztem ograniczenia wzrostu tych bakterii. Odporność *D. radiodurans* na promieniowanie wynika między innymi ze zdolności komórek do szybkiej naprawy zniszczonych w wyniku radiacji cząsteczek DNA. Odbudowa cząsteczek materiału genetycznego zależy od budowy fizjologicznej komórki jak i solidnego enzymatycznego systemu naprawczego (Rajpurohit i in., 2008). Istnieje kilka mechanizmów ochronnych, które potencjalnie wpływają na wzrost odporności na promieniowanie jonizujące. Znaczącym wydaje się być fakt posiadania przez *Deinococcus radiodurans* zwiększonej liczby kopii genomu. W komórkach posiadających zapasowe kopie materiału genetycznego istnieje mniejsze prawdopodobieństwo całkowitego wyeliminowania specyficznego genu. Ponadto rezerwowa wersja matrycy może być użyta do odtworzenia dłuższych segmentów DNA (Cox i Batitista, 2005). Duże znaczenie ma również struktura ciasno upakowanego, kolistego nukleoidu, która umożliwia utrzymanie w genomie oddysocjowanego fragmentu DNA, który może być ponownie wbudowany w cząsteczkę (Makarova i in., 2001; Slade i Radman, 2011).

Daly i współpracownicy (2004) wykazali, że szkody wywołane ekspozycją na duże dawki promieniowania są lepiej tolerowane w komórkach zawierających wyższe stężenie manganu (II), tak jak ma to miejsce u *D. radiodurans*. Większość uszkodzeń wynikająca z działania promieniowania jonizującego jest wynikiem generowania reaktywnych form tlenu (ROS). Wewnątrzkomórkowy Mn (II) działa ochronnie na białka i DNA pełniąc rolę wymiatacza ROS (Cox i Batitista, 2005). Jako kofaktor niezbędny jest też do działania manganozależnej endonukleazy-beta, która specyficznym rozpoznaje indukowane promieniami UV dimery cyklobutanu pirymidyny (Makarova i in., 2001). Z drugiej strony, wysokie

stężenie jonów Mn^{2+} w komórce zwiększa upakowanie genomu *Deinococcus radiodurans*. Kation ten powoduje neutralizację siły odpychania grup fosforanowych w szkielecie DNA (Cox i Batitista, 2005). System naprawczy *Deinococcus radiodurans* obejmuje naprawę poprzez wycinanie zasad (BER – base-excision repair), naprawę niesparowanych zasad (MMR – mismatch repair) oraz naprawę rekombinacyjną (zarówno RecA-zależną jak i RecA-niezależną). Przy uszkodzeniu DNA w komórce zwiększa się synteza białek takich jak: RecA, czynnik elongacyjny Tu, katalaza czy też dysmutaza nadtlenkowa. Ponadto obserwuje się wzmożoną aktywność glikozylazy uracylowej, glikozylazy tyminowej czy polimerazy DNA I (Makarova i in., 2001). Zhang i współpracownicy (2005) wykazali, że w wyniku napromieniowania komórek *Deinococcus radiodurans* indukowana jest synteza 26 białek, które pełnią rolę w takich procesach komórkowych jak: translacja, transkrypcja, przekaz sygnałów, modyfikacja posttranslacyjna, metabolizm, transport czy konwersja (Zhang i in., 2005). Białka uczestniczące w naprawie DNA i procesach metabolicznych mogą być uszkodzone przez powstające pod wpływem promieniowania wolne rodniki, tlen singletowy oraz nadtlenki (Blasius i in., 2008). Niekorzystnym przemianom spowodowanym stresem oksydacyjnym zapobiegają rozmaite czynniki do których należą między innymi chaperony oraz katalaza i dysmutaza nadtlenkowa syntetyzowana w ilości 50-krotnie większej niż u *Escherichia coli*. Duże znaczenie ma też wytwarzanie substancji ochronnych m.in. karotenoidów, przechwytyjących wolne rodniki, oraz trehalozy (Ji, 2010; Yin i in., 2010). Genomy bakterii *Deinococcus* zawierają geny kodujące dwa szlaki biosyntezy trehalozy. Jeden z nich wykorzystuje dwa enzymy: syntazę maltooligotrehalozy, która izomeryzuje wiązania α -1,4-glikozydowe w końcowej części cząsteczki oligosacharydu oraz trehalozydazę hydrolizującą wytworzony produkt pośredni uwalniając trehalozę i cząsteczkę oligosacharydu pomniejszoną o dwie reszty glikozydowe. Drugi szlak biosyntezy polega na izomeryzacji maltozy przez α -D-glukozylotransferazę maltozy. Niezwykle wydolny system naprawczy oraz czynniki wynikające z budowy komórki stanowią główną przyczynę, dla której bakteria jest tak wyjątkowo odporna na promieniowanie.

Budowa zewnętrznych struktur powierzchniowych *Deinococcus radiodurans* jest niezwykła pod względem konstytucji i kompozycji. Pomimo, iż swoim charakterem przypomina ścianę komórkową bakterii Gram-ujemnych, podczas barwienia Metodą Grama przyjmuje zabarwienie fioletowe, co jest spowodowane występowaniem grubej warstwy peptydoglikanu (14-20 nm). Budowa ściany komórkowej jest wielowarstwowa (Thornley i in., 1965). Najgłębiej usytuowana jest błona cytoplazmatyczna, nad którą znajduje się peptydoglikan. Kolejną warstwę stanowi błona zewnętrzna, którą otacza warstwa regularnie

upakowanych heksagonalnych podjednostek białkowych tzw. warstwa S (Faraldo i in., 1992). Tworzące tą strukturę białka są połączone wiązaniami niekowalencyjnymi i mogą być rozpuszczone pod wpływem substancji rozszczepiających wiązania wodorowe. Po usunięciu tych substancji wykazują skłonność do tworzenia, monomolekularnej warstwy o uporządkowanej strukturze na stałych nośnikach (np. płytki silikonowe, polimery) oraz na powierzchni cieczy (Pum i Sleytr, 1999). Taka warstwa charakteryzuje się zależną od gatunku drobnoustrojów wielkością porów (2-6 nm) pomiędzy regularnie ułożonymi cząsteczkami białek. Właściwości i uporządkowana budowa błon utworzonych przez białka warstwy S są przyczyną ich dużej przydatności np. w bionice oraz do formowania monomolekularnej powłoki enzymów, przeciwciał i antygenów, wykorzystywanej między innymi do produkcji biosensorów. Charakteryzujące się jednakowymi rozmiarami porów błony z białek warstwy S nadają się do formowania membran ultrafiltracyjnych oraz do selektywnego pułapkowania cząsteczek we wnętrzu heksagonalnych lub czworobocznych agregatów tych białek. Powłoki z białek warstwy S wytworzone na płytkach kwarcowych są wykorzystywane w mikrolitografii. Naniesione cząsteczki białek są degradowane promieniowaniem lasera w miejscach nie osłoniętych metalową maską. Pory regularnie rozmieszczone w powłoce białek warstwy S są też stosowane jako matryca do formowania nanocząstek metali o równobocznym lub heksagonalnym przekroju.

Struktura chemiczna warstwy peptydoglikanu *Deinococcus radiodurans* została sklasyfikowana podobnie jak w przypadku *Thermus thermophilus* HB8 jako typ A3 β , co potwierdza pokrewieństwo filogenetyczne obu bakterii. Występująca w ścianie *D. radiodurans* mureina składa się z powtarzających się reszt N-acetyloglukozamina-kwas N-acetylmuraminowy-L-Ala-D-Glu-(γ)-L-Orn-[(δ)Gly-Gly]-D-Ala-D-Ala. Mureina stabilizowana jest dodatkowo mostkami utworzonymi pomiędzy resztami glicyny (Quintela i in., 1999).

3.3 *Deinococcus geothermalis*

Bakterie *Deinococcus geothermalis* po raz pierwszy wyizolowali z gorących źródeł w Agnano (Neapol, Włochy) Ferreira i wsp. (1997). *Deinococcus geothermalis* jest Gram-dodatnim, nieprzetrwalnikującym, ziarniakiem, którego komórki osiągają wielkość od 1,2 do 2 μm i rosną w postaci tetrad. Odznacza się tlenowym typem oddychania i zaliczany jest do grupy umiarkowanych termofili ze względu na optymalną temperaturę wzrostu, która wynosi 45°C-50°C. Mikroorganizm ten wytwarza charakterystyczny dla bakterii typu *Deinococcus-Thermus* pomarańczowy pigment (Wanarska i in., 2011). *Deinococcus geothermalis* posiada

genom o wielkości 3,247 Mbp, który składa się z jednego chromosomu (2,467 Mbp), oraz dwóch megaplazmidów (o wielkości odpowiednio 0,574 Mbp oraz 0,205 Mbp) (Makarova i in., 2007). Zawartość guaniny oraz cytozyny w kwasie deoksyrybonukleinowym wynosi 65,9%. *Deinococcus geothermalis* jest niezwykle odporny na działanie promieniowania jonizującego, promieniowania UV, jak również na wysuszenie. Ponadto odnotowuje się jego dobry wzrost podczas ciągłego napromieniowywania (50 Gy/h) bez widocznego zmniejszenia szybkości wzrostu. *Deinococcus geothermalis* jest w stanie rosnąć na powierzchniach metalowych oraz wykazuje zdolność tworzenia biofilmu. Podobnie jak blisko spokrewniony *D. radiodurans* wykazuje zdolność do redukcji jonów metali wliczając U(VI), Cr(VI), Hg(II), Tc(VII), Fe(III) i Mn(III,IV), w związku z czym może być wykorzystywany w bioremediacji odpadów radioaktywnych (Liedert i in., 2012). Posiada zdolność utylizacji: D-celobiozy, D-trehalozy, laktozy, maltozy, D-fruktozy, D-galaktozy, D-glukozy, D-mannozy, L-ramnozy, sacharozy, D-ksylozy, D-mannitolu, D-sorbitolu, glicerolu, L-asparaginy, L-glutaminy, L-proliny, L-seryny, jabłczanu, pirogronianu i bursztynianu. Hydrolizuje kazeinę, żelatynę, kwas hipurowy, arbutynę i skrobię. Jest oksydazo i katalazo dodatni.

Budowa zewnętrznych struktur powierzchniowych wykazała, że komórka *Deinococcus geothermalis* składa się z trzywarstwowej asymetrycznej błony cytoplazmatycznej otoczonej ścianą komórkową typu Gramm-„+”, którą pokrywa błona zewnętrzna. W skład chemiczny peptydoglikanu wchodzi: ornityna, kwas glutaminowy, alanina i glicyna w stosunku molowym 1:1:2:2. W odróżnieniu od pozostałych przedstawicieli rodzaju *Deinococcus* jego błona komórkowa nie zawiera dużej ilości nienasyconych kwasów tłuszczowych (Ferreira i in., 1997).

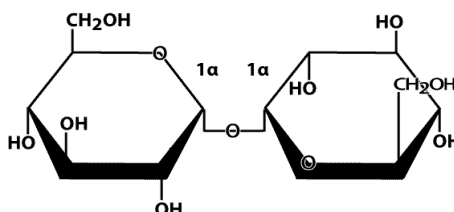
Pomimo spokrewnienia bakterii *Deinococcus geothermalis* i *Deinococcus radiodurans* różnią się one szlakami metabolicznymi. *Deinococcus geothermalis* zawiera wydajne szlaki metabolizmu cukrów, a szczególnie przyswajania ksylozy. Podobnie jak wiele innych drobnoustrojów opisane bakterie charakteryzują się zdolnością syntezy trehalozy ograniczającej wpływ stresu środowiskowego.

4. Właściwości, źródła i zastosowanie trehalozy

4.1 Ogólna charakterystyka trehalozy

Trehaloza, czyli α -D-glukopiranozylo-1- β -D-glukopiranozyd, jest dwucukrem nieredukującym zbudowanym z dwóch cząsteczek glukozy połączonych wiązaniem α -glikozydowym za pośrednictwem atomów węgla C1 (Rys. 4). Lokalizacja i energia tego

wiązania zapewnia trehalozie dużą stabilność termiczną i odporność na hydrolizę w kwaśnym środowisku. W przyrodzie występuje w postaci trzech izomerów: najbardziej rozpowszechnionego α,α - oraz α,β - i β,β -trehalozy (Singer i Lindquist, 1998; Pan i in., 2004).



Rys.4. Wzór strukturalny trehalozy.

Masa molowa bezwodnej trehalozy wynosi 342,31 g/mol, ale występuje ona najczęściej w postaci dwuwodnej. Trehaloza wykazuje 40-45% słodczy sacharozy i ma zdolność tworzenia niehigroskopijnego „szkliwa”. Cukier ten ma wysoką skręcalność optyczną, która wynosi: $[\alpha]_D +178^\circ$. Dwuwodna trehaloza topnieje w 97°C . Dostarczane ciepło powoduje odparowanie wody z cząsteczki, która ponownie ulega krystalizacji w 130°C . Następnie bezwodna trehaloza po raz kolejny topnieje w 203°C (Richards i in., 2002; Naozumi i in., 2008). Trehaloza jest najbardziej stabilnym nieredukującym naturalnym dwucukrem. Trehaloza odporna jest na degradację w granicach pH 3,5-10, w temperaturze 100°C przez 24 h. Jako cukier nieredukujący nie bierze udziału w reakcji Maillarda i nie tworzy adduktów z aminami, aminokwasami i białkami oraz w przeciwieństwie do sacharozy nie ulega karmelizacji w przetworach spożywczych. W związku z tym może być używana jako doskonały dodatek do żywności (Teramoto i in., 2008).

Trehaloza jest szeroko rozpowszechniona w przyrodzie. Występuje u większości żywych organizmów, takich jak bakterie, grzyby, owady czy bezkręgowce (Higashiyama T., 2002). Jej obecność u ssaków nie została stwierdzona (Elbein i in., 2003). W dużej ilości trehaloza występuje u anhydrobiontów, zwanych roślinami wskrzeszonymi (Richards i in., 2002). U innych roślin wyższych cukier ten występuje powszechnie choć zawsze w śladowych ilościach (Schluepmann i in., 2004; Wingler, 2002). Jest on niezbędny jako regulator metabolizmu węglowodanów, a pośrednio wzrostu. Owady wykorzystują trehalozę jako źródło energii w hemolimfie, z której generują glukozę niezbędną do lotu (Wyatt i in., 1957). Stężenie trehalozy w hemolimfie owadów wynosi zwykle od 1% do 2%, podczas gdy stężenie

glukozy u ludzi wynosi około 0,1% (Howden i in., 1956). Trehaloza w wielu organizmach pełni rolę stabilizatora i chroni komórki przed stresem środowiskowym. Jednym z najbardziej fascynujących aspektów obecności trehalozy u różnych organizmów jest jej udział w stabilizacji procesów życiowych gatunków, które mogą przetrwać zamrożenie lub odwodnienie (Paiva i in., 1996). Zdolność wielu organizmów do przetrwania niskich temperatur otoczenia opiera się na obecności glicerolu lub innych cząsteczek, które działają jak naturalne "anty zamrażacze" (Crowe i in., 1990). Wykazano, że tego typu związkami jest trehaloza. Asahina i Tanno (1964) odkryli, że larwy rośliniarki mogą przetrwać temperatury -40°C ze względu na wysoką zawartość trehalozy w komórkach przy jednoczesnym braku glicerolu. Trehaloza ma duże znaczenie fizjologiczne jako substancja syntetyzowana w przypadku niekorzystnych warunków środowiska, takich jak wzrost lub obniżenie temperatury, stres oksydacyjny lub wysuszenie. Jedną z przyczyn takiego oddziaływania trehalozy jest struktura jej cząsteczek, która łatwo dopasowuje się do kształtu biomolekuł z którymi tworzy kompleksy. Wynika to z braku wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych, które w innych cukrach stabilizują wzajemne usytuowanie reszt glukozy. Działanie trehalozy opiera się na kilku mechanizmach. Jednym z nich jest zabezpieczenie integralności błon biologicznych oraz białek przed denaturacją i agregacją (Tabela 2). Zabezpieczenie struktury białek polega między innymi na tworzeniu wiązań wodorowych pomiędzy grupami hydroksylowymi cukru a polarnymi grupami białek. Ponadto trehaloza jako cukier nieredukujący nie uczestniczy w reakcjach Maillarda przebiegających z udziałem grup aminowych białek podczas ich odwodnienia. Związane z trehalozą cząsteczki białek nie tracą natywnej struktury i nie tworzą agregatów (Xie i Timasheff, 1997). W przypadku deficytu wody trehaloza tworzy też wiązania wodorowe z fosfolipidami błonowymi. Zapobiega to utracie szczelności błon i chroni przed wyciekami elektrolitów i rozpuszczalnych składników komórkowych (Grajek i Szymanowska, 2008). Trehaloza chroni także lipidy przed utlenieniem działając przypuszczalnie jako zmiatacz wolnych rodników (Jain i Roy, 2009). Obecność trehalozy w błonach komórkowych obniża temperaturę przejść fazowych w lipidach (T_m). Spowodowane jest to osłabieniem oddziaływań van der Waalsa pomiędzy aryłowymi resztami fosfolipidów. Obniżenie T_m pozwala na zachowanie ciekłokrystalicznej struktury błony pomimo braku wody lub obniżenia temperatury (Crowe i in., 1992). Cukier ten bierze też udział w witrifikacji, czyli tworzenia stanu zeszklenia cytoplazmy, który w tym stanie ma dużą lepkość, co hamuje powstawanie centrów krystalizacji lodu (Augustynowicz i in., 2004). Wzrost kryształów lodu prowadzi do uszkodzenia komórek. Inną przyczyną oddziaływania stabilizującego jest

unikatowa zdolność trehalozy do tworzenia po odwodnieniu amorficznego, niehigroskopijnego szklawa pułapkującego makrocząsteczki bez zmian ich natywnej struktury, niszczonej w przypadku stosowania innych cukrów wskutek krystalizacji (Lins i in., 2004). Szybka synteza trehalozy jest pierwszą reakcją komórek na stres i jej działanie jest w dalszej kolejności uzupełniane syntezą chaperonów. Należąca do tzw. roślin wskrzeszonych *Selaginella lepidophylla* zawiera około 12,5% trehalozy w suchej masie i jest zdolna przetrwać długotrwały stan odwodnienia, po czym po rehydratacji wraca do pełnej aktywności życiowej (Adams i in., 1990). Embryony Solowców wchodząc w stan spoczynku gromadzą trehalozę do około 15% ich suchej masy.

Trehaloza działa jako stabilizator podczas spoczynku i źródło energii dla zarodków podczas wybudzania się z letargu (Clegg, 1965). Potwierdzeniem faktu, iż trehaloza działa jako czynnik protekcyjny, jest jej wysokie stężenie u nicieni, zdolnych dlatego przeżyć zarówno szok cieplny, jak i stres osmotyczny (Womersley i in., 1981). W różnych gatunkach drożdży, duże stężenie trehalozy jest warunkiem przetrwania szoku termicznego i stanu odwodnienia (Van Dijck i in., 1995). W tych warunkach zawartość trehalozy w komórkach *Saccharomyces cerevisiae* może stanowić aż 23% suchej masy (Hottiger i in., 1987). Trehaloza znajduje się w komórkach wegetatywnych drożdży poddanych działaniu toksycznych substancji, ciśnieniu hydrostatycznemu czy stresu tlenowego (Kane i in., 1974). Pewne ilości trehalozy pochodzącej z drożdży można znaleźć w produktach spożywczych – chlebie (1,2-1,8 g/kg s.m.), piwie (45-200 mg/l), winie (44-129 mg/l) i miodzie (0,1-2,3 g/100g). Grzyby jadalne zawierają 2-12 g trehalozy/100 g s.m (Bär, 2000).

Tabela 2. Fizjologiczne znaczenie trehalozy.

Oddziaływanie	Literatura
Źródło węgla i energii	Whatmore i Reed, 1990
Regulacja ciśnienia osmotycznego	Kempf i Bremer, 1998
Stabilizacja powłok komórkowych	Murphy i in., 2005
Zabezpieczanie przed wysuszeniem	Crowe, 2002
Przeciwdziałanie oziębianiu	Duong i in., 2006
Regulacja wzrostu roślin	Eastmol i Graham, 2003

4.2 Produkcja trehalozy

Trehaloza była początkowo produkowana w małej skali z zastosowaniem syntezy chemicznej lub metodami fermentacyjnymi z cieczy pochodzącej z *Arthrobacter paraffineus* i kilku innych drobnoustrojów (Suzuki i in., 1969). Tradycyjna metoda otrzymywania trehalozy polega na ekstrakcji cukru z komórek drożdży lub innych mikroorganizmów etanolem lub kwasem trichlorooctowym (TCA). Metoda ta jednak wymaga skomplikowanej procedury deproteinizacji i zagęszczania ekstraktu. Dodatkowo konieczny jest etap dezaktywacji endogennej trehalazy, powodującej hydrolizę disacharydu, poprzez kontrolę wartości pH, stężenia ekstrahentu czy temperatury procesu. Do odbiałczenia stosowane są siarczany rtęci, siarczany cynku lub TCA (Yoshikawa i in., 1994). Ponieważ koszty produkcji cukru tą metodą były wygórowane, użycie trehalozy było znacznie ograniczone.

Aktualnie trehalozę otrzymuje się ze skrobi z użyciem technologii enzymatycznej. Jako przykład może posłużyć koncern Hayashibara Co., Okayama w Japonii produkujący disacharyd metodami biotechnologicznymi. W pierwszym etapie procesu scukrzana jest skrobia z wykorzystaniem termostabilnej α -amylazy z *Bacillus licheniformis*. Następnie otrzymane maltooligosacharydy poddawane są jednoczesnemu działaniu syntazy maltooligozylotrehalozy (MTS) i trehalohydrolazy maltooligozylotrehalozy (MTH) z *Arthrobacter ramosus*, izoamylazy z *Pseudomonas amyloclavata* oraz glukotransferazy cyklomaltodekstryn (CGT) z *Bacillus stearothermophilus*. W końcowym etapie wykorzystywana jest glukoamylaza z *Aspergillus niger* i α -amylaza z *Bacillus subtilis* zapewniające rozłożenie pozostałości oligosacharydów i maltozy do glukozy. W dalszej kolejności następuje odbarwienie z wykorzystaniem węgla aktywnego, sączenie przez ziemię okrzemkową i perlity, dejonizowanie na żywicach jonowymiennych oraz zagęszczanie roztworu produktu przed krystalizacją trehalozy. Końcowy produkt zawiera 99,1% trehalozy, 0,5% glukozy, 0,3% glukozylorehalozy i 0,1% α -D-izomaltozylo- α -D-glukopiranozydu (Bär, 2000).

4.3 Biosynteza trehalozy

Biotechnologiczne metody otrzymywania trehalozy wiążą się z wykorzystaniem w procesie technologicznym mikroorganizmów lub ich metabolitów. W związku z czym przy poszukiwaniu nowych rozwiązań warto zwrócić uwagę na sposoby naturalnej biosyntezy tego cukru. Obecnie znanych jest kilka szlaków biosyntezy trehalozy (Avonce i in., 2006).

Pierwszy z nich stanowi przedmiot badań opisywanych w niniejszej pracy i polega na izomeryzacji wiązania α -(1,4) w maltozie do wiązania α -(1,1), w wyniku czego

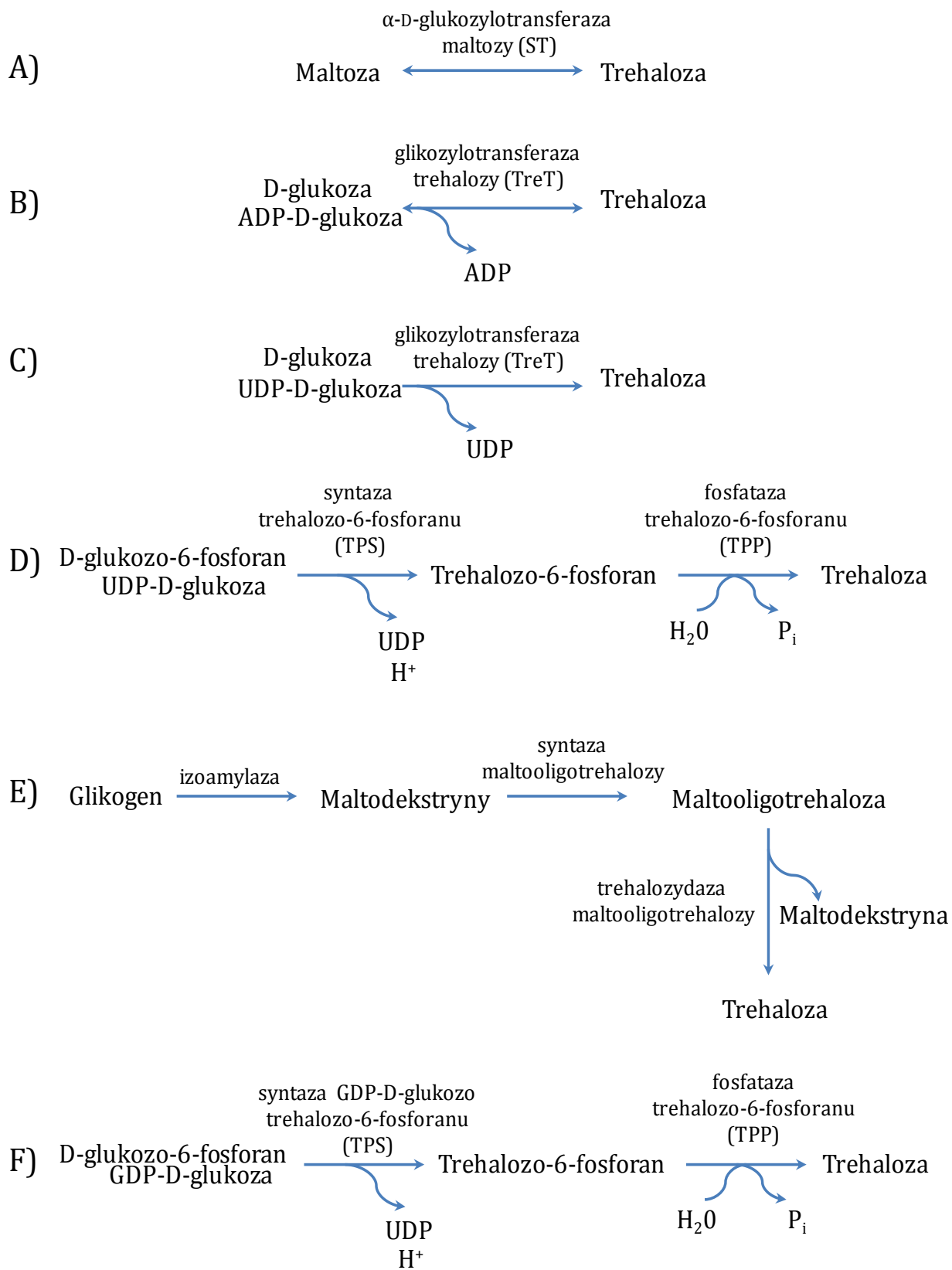
powstaje trehaloza (Rys. 5A). Enzymem odpowiedzialnym za przebieg tej reakcji jest α -D-glukozylotransferaza maltozy (ST). Jej obecność stwierdzono początkowo u *Pimelobacter sp.*, dziś wiadomo, że występuje również u innych mikroorganizmów (Nishimoto i in., 1996; Ma i in., 2006; Tae-Kyun i in., 2010; Xiuli i in., 2009; Yue i in., 2009; Pan i in., 2004).

Kolejny szlak biosyntezy trehalozy odnotowano u archeonów *Thermococcus litoralis* oraz *Pyrococcus horikoshi* (Rys. 5B). Enzymem odpowiedzialnym za jego przebieg jest glikozylotransferaza trehalozy (TreT). Przenosi ona resztę glukozy z ADP-glukozy i przyłącza ją w pozycję numer jeden drugiej cząsteczki glukozy (Qu i in., 2004; Ryu i in., 2005). Inny szlak biosyntezy trehalozy odkryto u *Thermoproteus tenar* (Rys. 5C). Jest on analogiczny do szlaku typowego dla *Thermococcus litoralis*, jednakże preferowanym substratem dla enzymu jest UDP-glukoza (a nie ADP-glukoza) oraz reakcja katalizowana jest wyłącznie jednokierunkowo (Kouril i in., 2008).

Dwustopniową katalizę enzymatyczną przy udziale syntazy trehalozo-6-fosforanu (TPS) i fosfatazy trehalozo-6-fosforanu (TPP), zaobserwowano u archea, bakterii, grzybów, owadów i niektórych roślin (Rys. 5D). TPS stanowi transferazę, katalizującą przeniesienie cząsteczki glukozy z UDP-glukozy na glukozo-6-fosforan, w wyniku czego powstaje trehalozo-6-fosforan i UDP. Drugi stopień reakcji obejmuje odczepienie grupy fosforanowej przez TPP z uwolnieniem trehalozy (Elbein i in., 2003; De Smet i in., 2000; Cabib i Lenoir, 1958).

Kolejny szlak biosyntezy trehalozy jest bardziej skomplikowany i opiera się na konwersji maltodekstryn (Rys. 5E). Proces ten polega na dwuetapowej enzymatycznej reakcji katalizowanej przez syntazę maltooligotrehalozy i trehalozydazę maltooligotrehalozy. Syntaza malooligotrehalozy przekształca wiązanie α -(1,4) do α -(1,1), dzięki czemu powstaje maltooligotrehaloza. W następnym etapie trehalozydaza maltooligotrehalozy katalizuje hydrolytyczny rozpad cząsteczki z uwolnieniem trehalozy oraz cząsteczki oligosacharydu pomniejszonego o dwie reszty glukozyłowe. Cząsteczka ta w następnym cyklu ulega ponownie działaniu syntazy maltooligotrehalozy. Reakcje konwersji maltodekstryn zaobserwowano m.in. u termofilnych archea z rodzaju *Sulfolobus* (Elbein i in., 2003; Streeter i Bhagwat, 1999; Nakada i in., 1996).

Ostatnia droga biosyntezy polega na cyklu reakcji przedstawionych na rysunku 5F. Tego typu biosynteza trehalozy dotyczy głównie grzybów (Avonce i in., 2006).



Rys 5. Szlaki biosyntezy trehalozy, opracowanie własne na podstawie Enzyme Database „BRENDA”.

4.4 Zastosowanie trehalozy

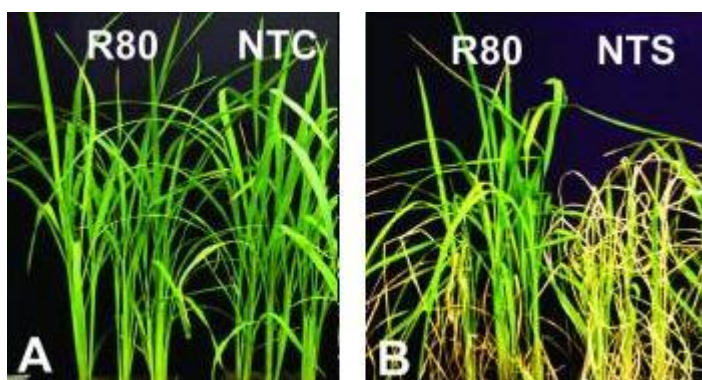
Unikatowe właściwości trehalozy spowodowały wzrost zainteresowania przemysłowym wykorzystaniem tego dwucukru. Naturalne funkcje, mechanizm działania i cechy trehalozy pozwalają na zastosowanie jej w przemyśle spożywczym, kosmetycznym czy medycynie. Do niedawna trehaloza była głównie używana w nauce, medycynie i produkcji kosmetyków jako produkt luksusowy. Czynnikiem ograniczającym powszechne użycie trehalozy w przemyśle spożywczym był wysoki koszt produkcji. Wraz z pojawieniem się nowych sposobów jej otrzymywania, znacznie obniżona została cena, co pozwoliło na szersze wykorzystanie trehalozy.

Trehaloza została oficjalnie dopuszczona do stosowania w przemyśle jako dodatek do żywności w 2000 roku w Stanach Zjednoczonych, natomiast rok później także w krajach Unii Europejskiej. Obecnie wykorzystywana jest jako zamiennik sacharozy przy produkcji wyrobów cukierniczych, napojów, mrożonek, przetworów owocowo-warzywnych czy konserw (Richards i in., 2002). Dotychczasowe badania nie wykazały żadnych zagrożeń związanych ze zwiększonym spożyciem trehalozy (Richards i in., 2002). Cukier ten podobnie jak maltoza, sacharoza lub laktoza nie przedostaje się do krwi w zmienionej formie lecz jest hydrolizowany wydzielaną w jelicie cienkim trehalazą. Bardzo rzadko występujący zupełny zanik lub zmniejszenie sekrecji tego enzymu może jednak powodować zaburzenia pokarmowe o symptomach podobnych do nietolerancji laktozy. Trehaloza w produktach spożywczych używana jest jako konserwant czy regulator (Korzeniowska-Ginter, 2009). Działa ochronnie na składniki żywności takie jak skrobia, tłuszcze czy białka i zapobiega ich degradacji pod wpływem czynników utleniających, niskiej lub wysokiej temperatury (Teramoto i in., 2008). Ponieważ trehaloza jest cukrem nieredukującym, odpornym na działanie wysokich temperatur i nie uczestniczy w reakcji Maillarda, może być stosowana jako dodatek do suszonego rozpyłowo mleka i serwatki oraz wyrobów mogących ulegać karmelizacji czy brunatnieniu podczas obróbki cieplnej. Stabilność trehalozy w szerokim zakresie pH ogranicza zmiany lepkości przetworów owocowo-warzywnych podczas ich przechowywania (Higashiyama, 2002; Zdziebło i Synowiecki, 2005; Schiraldi i in., 2002). Zdolność trehalozy do stabilizacji białek może być wykorzystana w leczeniu chorób i zaburzeń wynikających z niestabilności białek lub ich agregacji. Jedną z takich dolegliwości jest neurodegeneracyjna choroba Creutzfelda-Jakoba (CJD) oraz jej bardziej znany odpowiednik u bydła, gąbczasta encefalopatia bydła (BSE). Innym przykładem jest mukowiscydoza, powstająca wskutek destabilizującej mutacji kanałów chlorkowych

powodującą utratę funkcji białka. W obu przypadkach, podawanie roztworów małych cząsteczek np. trehalozy, zapobiega przyjmowaniu przez białka konformacji patogennych (Singer i Lindquist, 1998). Udokumentowane działanie trehalozy jako czynnika krioprotekcyjnego jest wykorzystywane w medycynie i weterynarii (Crowe i Crowe, 2000). Dodatek cukru podczas przechowywania w niskich temperaturach zwiększa przeżywalność embrionów ssaczy i kultur tkankowych chroniąc je tym samym przed skutkami zamrażania i rozmrażania (Fleming i Hubel, 2007). Analogicznie jest w przypadku organów przechowywanych chłodniczo do przeszczepu czy tkanek do transplantacji. (Synowiecki i Zdziebło, 2005; Wolska-Mitaszko, 2001).

Trehaloza jest stosowana w przemyśle kosmetycznym jak i farmaceutycznym jako czynnik ochronny substancji aktywnych leków czy kosmetyków (Matsuo, 2004). Stanowi np. dodatek do kremów ze względu na stabilizację liposomów zawartych w kosmetykach oraz lipidów i białek w skórze (Teramoto i in., 2008).

Przeprowadzono też próby wprowadzenia genów kodujących syntazę trehalozy do komórek roślinnych. Przykładem takiej modyfikacji jest ryż transgeniczny, który może być uprawiany w warunkach niedoboru wody (Rys. 6).

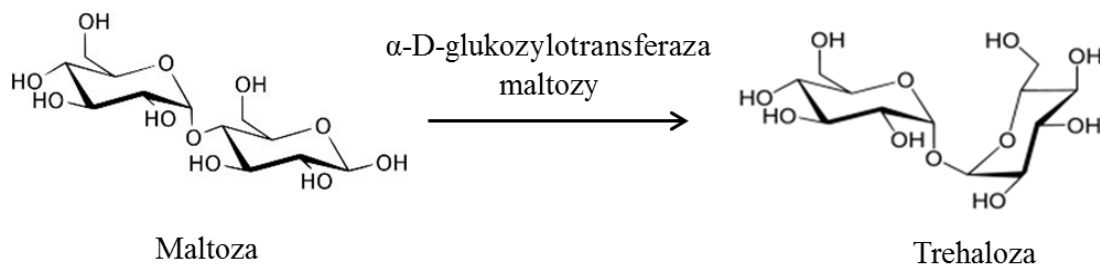


Rys. 6. Fotografia transgenicznego ryżu. (A) - Hodowla roślinna prowadzona w warunkach dobrego nawodnienia, (B) - hodowla roślinna prowadzona w warunkach niedoboru wody. NTC, NTS - roślina nietransgeniczna; R80 – odmiana rośliny transgenicznej zawierającej gen kodujący syntezę trehalozy (Garg i in., 2002).

4.5 Charakterystyka α -D-glukozylotransferazy maltozy

α -D-glukozylotransferaza maltozy [EC 5.4.99.16] (synonimy: syntaza trehalozy, α -D-glukozylomutaza maltozy) jest enzymem katalizującym konwersję wiązania α -1-4 glikozydowego, występującego w maltozie, do wiązania α -1-1-glikozydowego,

charakterystycznego dla trehalozy, w wyniku wewnątrzcząsteczkowej transglukozyzacji (Rys. 7).



Rys. 7. Schemat reakcji katalizowanej przez α -D-glukozylotransferazę maltozy.

Reakcja katalizowana przez α -D-glukozylotransferazę maltozy jest jednoetapowa, i prosta. Charakteryzuje się wysoką specyficznością oraz wydajnością uzyskanego produktu, a także niskim kosztem. Stanowi więc atrakcyjną alternatywę dla obecnych sposobów przemysłowego pozyskiwania trehalozy (Chen i in., 2006).

Zdolność do produkcji trehalozy z wykorzystaniem α -D-glukozylotransferazy maltozy zidentyfikowano u mezofilnych szczepów *Pimelobacter sp.* R48, *Pseudomonas sp.* F1 oraz *D. radiodurans* (Schiraldi i in., 2002; Koh i in., 1998; Wang i in., 2007). Wśród termofili syntazę trehalozy uzyskano z różnych szczepów *Thermus*: *T. aquaticus*, *T. thermophilus*, *T. caldophilus* oraz *M. ruber* (Koh i in., 1998; Nishimoto i in., 1997; Wang i in., 2007; Zhu i in., 2008). W zależności od pochodzenia, właściwości α -D-glukozylotransferaz maltozy różnią się. Głównym przedstawicielem mezofili produkujących syntazę trehalozy jest *Pseudomonas sp.* F1. Białko to jest tetramerem o masie cząsteczkowej 250 kDa i pI=5,8. Maksymalną aktywność enzymatyczną wykazuje w temperaturze 45°C, przy pH wynoszącym 7,0 (Ohguchi i in., 1997).

Enzym pochodzący z *T. aquaticus* ATCC 339223 cechuje się wysoką aktywnością i termostabilnością w porównaniu z enzymami mikroorganizmów mezofilnych. Masa cząsteczkowa syntazy trehalozy wynosi 105 kDa, pI równe jest 4,3. Optymalna temperatura konwersji wynosi 65°C przy pH 6,5, przy czym syntaza zachowuje aktywność przy temperaturach dochodzących do 80°C. Enzym pozostaje stabilny w zakresie pH 5,5 do 9,5. (Nishimoto i in., 1996).

5. Różnorodność i występowanie enzymów proteolitycznych

5.1 Klasyfikacja enzymów proteolitycznych

Proteazy stanowią dużą grupę enzymów stosowną do szeregu funkcji, które pełnią zarówno w organizmach żywych jak i w sektorze przemysłowym. Uważane za najważniejsze spośród enzymów hydrolitycznych są częstym przedmiotem badań enzymologów. Proteazy katalizują reakcję rozszczepienia wiązania peptydowego w białkach, poli- i oligopeptydach. Klasyfikacja proteaz zależy od źródła pochodzenia, mechanizmu katalizy, specyficzności działania lub chemicznej natury reszt aminokwasowych lub grup prostetycznych związanych z budową centrum aktywnego enzymu. W praktyce większość proteaz określa się poprzez używanie nazw zwyczajowych lub handlowych np. papaina, katepsyna, alkalaza itp. (García-Carreño, 1991; Kalisz, 1988).

Źródła, z których pozyskuje się proteazy są różne i w zależności od tego można wyróżnić enzymy proteolityczne pochodzenia roślinnego, zwierzęcego oraz pochodzące z drobnoustrojów. Przykładem zwierzęcych proteaz jest pepsyna oraz trypsyna. Do roślinnych należą z kolei papaina, bromelaina czy ficyna. Spośród enzymów produkowanych przez drobnoustroje najliczniejszą grupę stanowią proteazy produkowane przez bakterie np. subtilyzyna czy termolizyna (Kołakowski, 2005; Kumar i Talagi, 1999). Pomimo dużej różnorodności proteaz i ich rozprzestrzenienia w przyrodzie, jako najlepsze źródło ich pozyskiwana uważa się mikroorganizmy. Wpływ na to mają takie cechy jak krótki czas wzrostu, niewielka powierzchnia potrzebna do kultywacji, a także łatwa możliwość modyfikacji genetycznych, które pozwalają na polepszanie właściwości katalizatora.

Organizmy żywe wytwarzają szereg proteaz, różnorodnie zlokalizowanych w komórce. W tej grupie można wyróżnić zarówno wewnątrzkomórkowe jak i zewnątrzkomórkowe proteazy. Wewnątrzkomórkowe proteazy są niezbędne do różnorodnych procesów komórkowych i metabolicznych m.in. sporulacji, dojrzewania enzymów i hormonów oraz zachowania równowagi w puli białek komórkowych. Zewnątrzkomórkowe proteazy są potrzebne do hydrolizy białek znajdujących się w środowisku tak, aby ich przyswajanie było możliwe (Gupta i in., 2002). Jako przykład proteaz wewnątrzkomórkowych można podać występujące w lizosomach katepsyny. Enzymy obecne w soku żołądkowym (pepsyna, podpuszczka) oraz enzymy soku trzustkowego (trypsyna, chymotrypsyna, karboksypeptydaza), jako enzymy trawienne wydzielane do przewodu pokarmowego są typowym przykładem zewnątrzkomórkowych enzymów (Kołakowski, 2005).

W zależności od miejsca ataku enzymu na łańcuch peptydowy wyróżnia się: egzopeptydazy i endopeptydazy. Egzopeptydazy powodują hydrolizę wiązania peptydowego proksymalnego do C- lub N-końca substratu. Wiele egzopeptydaz działa przede wszystkim na mniejsze fragmenty, jak oligo- i polipeptydy, w związku z czym nazywa się je peptydazami. W obrębie tej grupy wyróżnia się: aminopeptydazy i karbosypeptydazy (Rao i in., 1998). Endopeptydazy rozszczepiają wiązania peptydowe w obrębie głównej struktury polipeptydowej, w określonym miejscu, z dala od terminalnych końców substratu. Głównie działają na białka i wyższe polipeptydy i dlatego też nazywa się je proteinazami lub proteazami (Kołakowski, 2005).

Pod względem budowy centrum aktywnego enzymy proteolityczne można podzielić na 4 grupy: proteazy serynowe, proteazy cysteinowe (tiolowe), proteazy aspartylowe i metaloproteazy. Krótka charakterystyka ich właściwości została przedstawiona w Tabeli 3.

Tabela 3. Cechy charakterystyczne podstawowych czterech typów proteaz.

	Numer EC	Masa cząsteczkowa [kDa]	Optymalne pH	Optymalna temperatura [°C]	Jon wymagany do zachowania aktywności	Aminokwasy w centrum aktywnym	Główne inhibitory	Źródło pochodzenia
Proteazy aspartylowe	3.4.23	30-45	3-5	40-55	Ca ²⁺	Asparagina lub cysteina	Pepstatyna	<i>Aspergillus</i> , <i>Mucor</i> , <i>Endothia</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Neurospora</i> , tkanki zwierzęce (żołądek)
Proteazy cysteinowe	3.4.22	34-35	2-3	40-55	-	Cysteina lub asparagina	Jodoacetamid, <i>p</i> -CMB	<i>Aspergillus</i> , ananas, figa, papaja, <i>Streptococcus</i> , <i>Clostridium</i> <i>Bacillus</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Streptomyces</i> <i>Bacillus</i> ,
Metaloproteazy	3.4.24	19-37	5-7	65-85	Zn ²⁺ , Ca ²⁺	Fenylalanina lub leucyna	Związki chelatujące tj.: EDTA, EGTA	<i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Streptomyces</i> <i>Bacillus</i> ,
Proteazy serynowe	3.4.21	18-35	6-11	50-70	Ca ²⁺	Seryna, histydyna i asparagina	PMSF, DIFP, EDTA, inhibitor trypsyny sojowej, fenol, indol,	<i>Aspergillus</i> , tkanki zwierzęce (jelita), <i>Engyodontium album</i>

wg Sumantha i in., 2006

5.2 Zastosowanie enzymów proteolitycznych

Proteazy jako jedne z ważniejszych enzymów hydrolitycznych znajdują zastosowanie w przemyśle, głównie produkcji detergentów i przetwórstwie żywności. Są wykorzystywane również w przemyśle garbarskim, procesach bioremediacji czy farmacji. Przykład dostępnych komercyjnie preparatów enzymatycznych oraz możliwości ich wykorzystania przedstawiono w Tabeli 4.

Tabela 4. Przykład dostępnych na rynku handlowych preparatów proteaz.

Dostawca	Nazwa handlowa	Źródło pochodzenia	Zastosowanie
Novo Nordisk, Dania	Alcalase	<i>Bacillus licheniformis</i>	Detergenty
	Savinase	<i>Bacillus sp.</i>	Detergenty, tekstylia
	Esperase	<i>B.lentus</i>	Detergenty, żywność
	Biofeed pro	<i>B.licheniformis</i>	Przemysł paszowy
	Durazym	<i>Bacillus sp.</i>	Detergenty
Genencor International, USA	Novozyme 243	<i>Bacillus licheniformis</i>	Środki czyszczące
	Nue	<i>Bacillus sp.</i>	Przemysł garbarski
Gist-Brocades, Holandia	Purakact	<i>B.lentus</i>	Detergenty
	Primatan	Bakterie	Przemysł garbarski
Solvay Enzymes, Niemcy	Subtylizyna	<i>B.alcalophilus</i>	Detergenty
	Maxacal	<i>Bacillus sp.</i>	Detergenty
	Maxataza	<i>Bacillus sp.</i>	Detergenty
	Opticlean	<i>B.alcalophilus</i>	Detergenty
	Optimase	<i>B.licheniformis</i>	Detergenty
Amano Pharmaceuticals, Japonia	Maxapem	<i>Bacillus sp.</i>	Detergenty
	HT-proteolytic	<i>B.subtilis</i>	Przemysł spirytusowy, piekarniczy, żywnościowy, paszowy, garbarski
Enzyme Development, USA	Protease	<i>B.licheniformis</i>	Zagospodarowanie odpadów
	Proleather	<i>Bacillus sp.</i>	Żywność
	Collagenase	<i>Clostridium sp.</i>	Techniczne
Nagase Biochemicals, Japonia	Amano Prostease S	<i>Bacillus sp.</i>	Żywność
	Enzeco	<i>B.licheniformis</i>	Przemysłowy
Godo Shusei, Japonia	Enzeco L FG	<i>B.licheniformis</i>	Żywność
	Biopraser	<i>B.subtilis</i>	Kosmetyki, farmaceutyki
	Ps. Protease	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Badania
	Ps. Elastase	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Badania
Rohm, Niemcy	Biopraser	<i>B.subtilis</i>	Detergenty, środki czystości
	Biopraser SP-10	<i>B.subtilis</i>	Żywność
Wuxi Synder Bioproducts, China	Godo-Bap	<i>B.licheniformis</i>	Żywność, detergenty
Advance Biochemicals, Indie	Corolase 7089	<i>B.subtilis</i>	Żywność
	Wuxi	<i>Bacillus sp.</i>	Detergenty
	Protosol	<i>Bacillus sp.</i>	Detergenty

wg Gupta i in., 2002

Wykorzystanie proteaz w produkcji detergentów stanowi w przybliżeniu 25% światowej sprzedaży enzymów. Pierwszy detergent zawierający w swoim składzie enzymy znany pod nazwą „Burnus” był produkowany już w 1913 roku i oprócz węgla wapnia zawierał surowy ekstrakt trzustkowy. Natomiast pierwszym detergentem zawierającym enzymy bakteryjne był BIO-40 wprowadzony na rynek w 1956. Kolejnymi przełomowymi

produktami był BIOTEX produkowany przez Novo Industry A/S oraz Maxatase produkowany przez Gist-Brocades. Proteazy wykorzystywane do produkcji detergentów powinny posiadać szeroką specyficzność substratową tak aby były w stanie usuwać różnorodne plamy białkowe np. jedzenie czy krew. Poza tym powinny pozostawać aktywne w podwyższonych temperaturach i alkalicznym środowisku, a ponadto być odporne na działanie czynników chelatujących i utleniających, które stanowią komponenty detergentów. Aktualnie wszystkie proteazy wykorzystywane w przemyśle środków czyszczących stanowią proteazy serynowe i są pozyskiwane z bakterii z rodzaju *Bacillus* (Rao i in., 1998; Sumantha i in., 2006).

Wykorzystanie enzymów proteolitycznych w przemyśle żywnościowym sięga już czasów antycznych. Obecnie w przemyśle spożywczym proteazy są wykorzystywane między innymi do produkcji serów. Do strącania białek mleka używana jest podpuszczka (synonim: chymozyna, rennina), którą tradycyjnie pozyskuje się z trawieńców młodych cieląt. Znacznie częściej wykorzystywany jest enzym produkowany na drodze biosyntezy mikrobiologicznej z grzybów *Mucor miehei* i *Aspergillus niger* czy drożdży *Kluyveromyces marxianus* (Sumantha i in., 2006). Przy wyrobie serów oprócz chymozyny wykorzystuje się też pepsynę wołową lub wieprzową oraz proteiny aspartylowe z *Rhizomucor pusillus*, *R. miehei* i *Cryphonectria parasitica*. Koagulacja przy ich użyciu daje jednak mniej zadowolające efekty ze względu na hydrolizę niespecyficzną białek mleka, co w długim czasie prowadzi do rozluźnienia skrzepu, oraz strat tłuszczu i niskocząsteczkowych związków cennych dla finalnego produktu. (Kosseva i Irwin, 2010). W przemyśle mleczarskim preparaty enzymów proteolitycznych wykorzystuje się ponadto do wytwarzania hydrolizatów kazeiny, „mleka sojowego” oraz stabilizacji i poprawy zwilżalności mleka w proszku (Reps, 2001).

Proteazy wykorzystuje się do poprawy właściwości funkcjonalnych, odżywczych i smakowych białek. W piekarnictwie na przykład, łagodna hydroliza ciasta skraca czas jego przygotowania, zwiększa jego sprężystość i elastyczność, poprawia strukturę i objętość pieczywa. Produkty enzymatycznej hydrolizy białka uczestniczą także w kształtowaniu smaku, zapachu, a nawet barwy pieczywa (Kołąkowski, 2005). W browarnictwie z kolei, proteoliza słodu jest niezbędna do zapewnienia wymaganej pianistości, klarowności i smaku piwa. Zdolności hydrolityczne proteaz znajdują zastosowanie ponadto przy produkcji hydrolizatów i izolatów białkowych oraz enzymatycznym odzyskiwaniu hydrolizatów białkowych z odpadów przemysłowych. Enzymatyczna hydroliza jest jedną z metod odzyskiwania wartościowych komponentów z odpadów przemysłu rybnego czy mięsnego. (Śliżyte i in., 2009). Jako przykład posłużyć mogą hydrolizaty białek ryb, które stanowiąc

do datek do żywności wpływają na podniesienie jej walorów żywieniowych, sensorycznych, a także funkcjonalnych. Z najważniejszych właściwości funkcjonalnych należy wymienić: rozpuszczalność, zdolność do tworzenia emulsji i piany, zagęszczanie i żelowanie (Kristinsson, 2007). Dodatkowo na uwagę zasługuje fakt, iż oprócz użytecznych właściwości funkcjonalnych hydrolizaty białek ryb wykazują własności związków bioaktywnych. Peptydy izolowane z hydrolizatów białek ryb wykazują działanie przeciwzakrzepowe, immunomodulujące, przeciwutleniające czy obniżają ciśnienie tętnicze krwi (Kim i Mendys, 2006). Kim i współpracownicy (2000) odnotowali, że niektóre peptydy pozyskiwane z ryb wykazują właściwości hipotensyjne, hamując aktywność konwertazy angiotensyny (ACE z ang. Angiotensin-Converting Enzyme) i jednocześnie działają silniej niż inne naturalne peptydy. Działanie tych peptydów zostało potwierdzone *in vivo* na szczurach, u których powodowały obniżenie ciśnienia tętniczego (Je i in., 2005; Fujita i Yoshikawa, 1999). Przeprowadzone badania wykazały, że peptydy pozyskiwane z hydrolizatów mięśni ryb wykazują ponadto aktywność przeciwzakrzepową, co spowodowane jest najprawdopodobniej ich inhibującym działaniem względem czynników krzepnięcia. Przeciwutleniające właściwości hydrolizatów białek ryb wynikają natomiast z ich zdolności do specyficznego wygaszania powstających podczas utleniania aktywnych form tlenu oraz zdolności chelatujących.

Gotowe preparaty enzymów proteolitycznych stosowane są do przyspieszania dojrzewania ryb solonych. W ostatnich latach coraz częściej do solenia wykorzystuje się ryby pozbawione wnętrzości, co wynika ze względów higienicznych i zwiększa trwałość surowca. Zatem naturalne dojrzewanie ryb ogranicza się jedynie do wykorzystania endogennych enzymów mięśniowych tj. katepsyn i kalpain, co jest niewystarczające w przypadku solenia surowców mrożonych o długim okresie składowania (Kołakowski, 2005). Dodatek enzymów proteolitycznych przyspiesza dojrzewanie i umożliwia dojrzewanie w solance ryb gatunków niedojrzewających, nie mających własnego aparatu enzymatycznego. Podobnie stymulowany jest proces kruszenia mięsa zwierząt lądowych, głównie mięsa wołowego. Tenderyzacja pozwala na poprawę konsystencji mięsa (delikatność, kruchość), wartości biologicznej oraz cech organoleptycznych przy 1,5-3-krotnym skróceniu czasu dojrzewania (Reps, 2001).

Chociaż proteazy należą do enzymów hydrolitycznych, w określonych warunkach reakcji mogą przeprowadzać reakcję syntezy wiązania peptydowego. Właściwość ta wykorzystywana jest m.in. w reakcji plasteinowania oraz syntezie aspartamu. Reakcja transpeptydacji pozwala na wbudowywanie egzogennych aminokwasów w strukturę białka.

Przykładem może być wzbogacanie glutenu w lizynę czy teiny w lizynę, tryptofan lub treoninę. Zastosowanie reakcji plasteinowania pozwala usunąć gorzki smak niektórych hydrolizatów białkowych. Za nieprzyjemny smak odpowiedzialne są aminokwasy hydrofobowe (walina, leucyna, izoleucyna, fenyloalanina, tryptofan) znajdujące się na końcu łańcucha peptydowego (Synowiecki i in., 1996, Synowiecki, 2010). Oczekiwany efekt uzyskuje się poprzez wyeliminowanie aminokwasów hydrofobowych lub ich ukrycie wewnątrz długich łańcuchów plastelin (Kołakowski, 2005).

Bezpieczną i skuteczną metodą usuwania alergii pokarmowych jest enzymatyczna modyfikacja białek alergicznych. Wśród alergenów pokarmowych można wymienić np. białka mleka krowiego, jaja kurzego, soi i innych roślin strączkowych, orzeszków czy skorupiaków. Metoda usuwania alergii białek opiera się na wykorzystaniu proteolizy i reakcji plastelinowej, lub rzadziej na reakcji sieciowania transglutaminazą (Brzozowski i in., 2005; Kołakowski, 2005).

Zastosowanie proteaz w przemyśle medyczno-farmaceutycznym nie ogranicza się jedynie do produkcji preparatów dla pacjentów z zaburzeniami żołądkowo-jelitowymi, podawanych w celu poprawienia zdolności trawiennych. Urokinaza jest wykorzystywana do leczenia zaburzeń krzepnięcia krwi, natomiast kolagenaza w kombinacji z antybiotykami służy do leczenia poparzeń i ran (Sumantha i in., 2006).

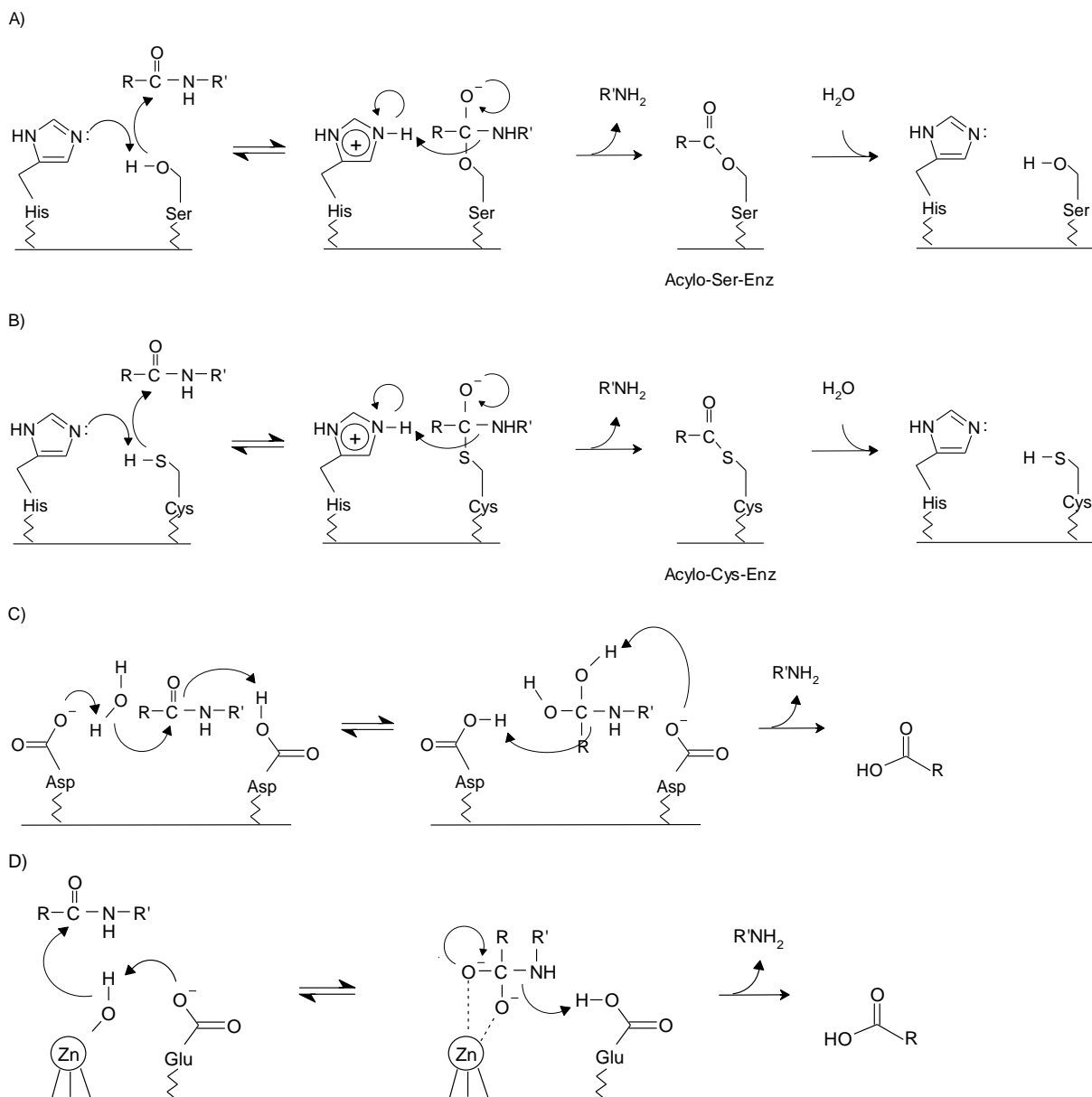
Oprócz przemysłowych i medycznych aplikacji, proteazy odgrywają ważną rolę w badaniach podstawowych. Wysoka selektywność hydrolizy wiązania peptydowego jest wykorzystywana przy wyjaśnianiu zależności strukturalno-funkcjonalnych w cząsteczkach, a także przy sekwencjonowaniu białek (Rao i in., 1988).

5.3 Mechanizm działania

Budowa centrum aktywnego proteaz wpływa na specyficzny mechanizm reakcji proteolizy. W zależności od aminokwasów biorących udział w reakcji hydrolizy mechanizm zachodzącego procesu jest inny. Proteazy serynowe oraz cysteinowe działają jak nukleofil i podczas ataku na cząsteczkę substratu tworzą kowalencyjny produkt pośredni – acyloenzym. Z kolei proteazy aspartyłowe oraz metaloproteazy powodują aktywację cząsteczki wody, która bezpośrednio atakuje wiązanie peptydowe (Rys. 8).

Reakcja katalizowana przez **proteazy serynowe** składa się z dwóch etapów (Rys. 8A). Pierwszy etap reakcji stanowi atak reszty hydroksylowej seryny na karbonyłowy atom węgla wiązania peptydowego w substracie. W wyniku tego powstaje tetraedryczny addukt, którego

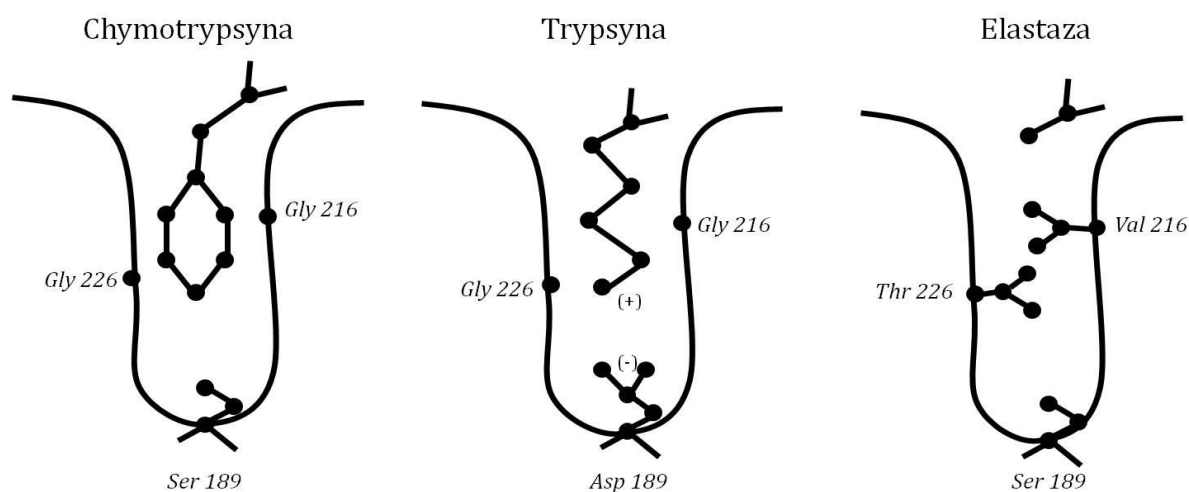
rozpad powoduje uwolnienie acyloenzymu i N-końcowego fragmentu peptydu. Drugi etap stanowi hydroliza acyloenzymu wodą (Kafarski i Lejczak, 1994).



Rys. 8. Schemat reakcji katalizowanej przez proteazy: serynowe (A), cysteinowe (B), aspartyłowe (C) i metaloproteazy (D).

Proteazy serynowe stanowią grupę enzymów, które cechuje taki sam mechanizm działania i niemal identyczna budowa miejsca katalitycznego, zawierającego serynę, histydynę i kwas asparaginowy. Jednak poszczególne enzymy należące do tej grupy charakteryzują się odmienną specyficnością substratową, która zależy od budowy i kształtu kieszeni substratowej (kieszeni S). Jest to dobrze widoczne w przypadku proteaz z rodziny chymotrypsyn, do których zaliczane są chymotrypsyna, trypsyna i elastaza. Pomimo

wysokiego stopnia podobieństwa i prawie takiej samej struktury przestrzennej, różnią się one specyficznością. Chymotrypsyna wybiórczo hydrolizuje wiązania utworzone przez grupy karboksylowe aminokwasów aromatycznych, podczas gdy trypsyna preferuje wiązania utworzone przez aminokwasy zasadowe. Elastaza z kolei tnie wiązania utworzone przez grupy karboksylowe reszt glicyny i alaniny. Porównanie budowy kieszeni S tych enzymów pozwoliło zrozumieć podstawy obserwowanych różnic w specyficzności (Rys. 9). Kluczową rolę odgrywają tu trzy reszty aminokwasowe, numer 189, 216 i 226. W trypsynie i chymotrypsynie, u wejścia do kieszeni S znajdują się reszty glicyny (Gly 216 i Gly 226) co ułatwia penetrację substratu do wnętrza kieszeni. W elastazie w tym samym miejscu znajdują się z kolei walina i treonina (Val 216 i Thr 226), co powoduje, że tylko małe reszty aminokwasowe mogą wejść do wnętrza kieszeni substratowej (Kołakowski, 2005). Wpływ na specyficzność substratową ma ponadto znajdująca się na dnie kieszeni reszta aminokwasowa w pozycji 189. W przypadku trypsyny resztę stanowi kwas asparaginowy (Asp 189), który oddziałuje z dodatnio naładowanymi resztami lizyny lub argininy w substracie. Natomiast w chymotrypsynie i elastazie miejsce to zajmuje seryna (Ser 189), która nie wpływa na wiązanie substratu (Branden i Tooze, 1999).



Rys. 9. Budowa kieszeni substratowej w chymotrypsynie, trypsynie i elastazie (Kołakowski, 2005).

Mechanizm działania **proteaz cysteinowych** jest bardzo zbliżony do mechanizmu działania członków rodziny chymotrypsyny, przy czym acyloenzym tworzy się z udziałem cysteiny (Rys. 8B). Grupa tiolowa cysteiny jest znacznie lepszym nukleofilem i lepszą grupą odchodzącą w porównaniu do reszty hydroksylowej seryny.

Trzecia klasa enzymów obejmuje **proteazy aspartyłowe**. Podstawową cechą miejsc aktywnych tych enzymów jest występowanie pary reszt kwasu asparaginowego, z których jedna (pozbawiona protonu) aktywuje atakującą cząsteczkę wody, podczas gdy druga polaryzuje grupę karbonyłową wiązania peptydowego, zwiększając jego podatność na atak (Rys. 8C).

Metaloproteazy jako ostatnia klasa enzymów proteolitycznych w swoim centrum aktywnym zawierają jony metalu, najczęściej cynk. Jon metalu powoduje aktywację cząsteczki wody, co umożliwia jej działanie jako nukleofil atakujący grupę karbonyłową wiązania peptydowego (Rys. 8D).

W przypadku każdej z wymienionych wyżej klas enzymów miejsce aktywne jest tak zbudowane, że umożliwia aktywację cząsteczki wody lub innego nukleofila oraz polaryzację grupy karbonylowej wiązania peptydowego i, będącą jej następstwem, stabilizację tetraedrycznego produktu pośredniego (Berg i in., 2005).

6. Cel pracy

Celem pracy było zbadanie przydatności niektórych gatunków ekstremofilnych bakterii typu *Deinococcus-Thermus* jako źródła enzymów użytecznych do usprawnienia istniejących lub opracowania nowych procesów przemysłowych. Uzasadnieniem wyboru wymienionych drobnoustrojów jest brak ich szczegółowej charakterystyki oraz określenia przydatności wytwarzanych enzymów. Jednym z elementów nowości naukowej wykonywanych eksperymentów jest więc poszerzenie wiedzy o enzymach pochodzących z ekstremofilnych drobnoustrojów, które są obecnie badane w wielu ośrodkach naukowych na świecie. Jednakże pomimo dużych nakładów pracy enzymy z ekstremofili znalazły do tej pory niewiele praktycznych zastosowań, między innymi ze względu na niewystarczający niekiedy postęp badań w tym zakresie.

Duże znaczenie w przemyśle spożywczym i środków piorących mają proteazy, których zużycie wynosi około 60% ogólnej produkcji enzymów. Możliwość ich stosowania i przydatność w poszczególnych procesach przemysłowych zależy w dużym stopniu od aktywności preparatów, stabilności w warunkach i środowisku katalizowanej reakcji oraz od specyficzności substratowej. Istotne praktyczne znaczenie ma więc znalezienie nowych enzymów proteolitycznych o właściwościach dostosowanych do warunków katalizowanego procesu. Badania profilu enzymatycznego bakterii *Meiothermus ruber* i *Deinococcus geothermalis* wykazały, że wymienione drobnoustroje wytwarzają pozakomórkowe proteazy aktywne w alkalicznym środowisku i dzięki temu przydatne między innymi jako komponent środków piorących.

Innym aspektem badań było sprawdzenie przydatności α -D-glukozylotransferazy maltozy z *Deinococcus radiodurans* do wytwarzania trehalozy, cukru o szerokim spektrum zastosowań. Jako źródło enzymu wykorzystano niepatogenny szczep *Escherichia coli* transformowany genem α -D-glukozylotransferazy maltozy z *Deinococcus radiodurans*. Realizacja badań w tym zakresie ma duże znaczenie aplikacyjne i zawiera elementy nowości naukowej, ponieważ do tej pory opublikowano niewiele informacji dotyczących drobnoustrojów wytwarzających syntazę trehalozy i właściwościach otrzymywanych z nich enzymów.

7. Materiały

7.1 Szczepy mikroorganizmów

- Zmodyfikowane genetycznie komórki *Escherichia coli* (DE3) Rosetta pLysS zawierające plazmid z genem kodującym wytwarzanie α -D-glukozylotransferazy maltozy z *Deinococcus radiodurans*.
- Szczep *Meiothermus ruber* (DSM 1279) pochodzący z Niemieckiej Kolekcji Mikroorganizmów i Kultur Tkankowych.
- Szczep *Deinococcus geothermalis* (DSM 11300) pochodzący z Niemieckiej Kolekcji Mikroorganizmów i Kultur Tkankowych.

7.2 Składniki podłoży mikrobiologicznych

- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (POCH, Polska)
- Chloramfenikol (A&A Biotechnology, Polska)
- Ekstrakt drożdżowy (BTL, Polska)
- Ekstrakt wołowy (Becton, Dickinson Company, USA)
- Glukoza (Fluka, Niemcy)
- Izopropyl- β -D-tiogalaktozyd (IPTG) (Fermentas, Litwa)
- Kanamycyna (A&A Biotechnology, Polska)
- Maltoza (Fluka, Niemcy)
- Mocznik (POCH, Polska)
- NaCl (POCH, Polska)
- NH_4NO_3 (POCH, Polska)
- Pepton K (BTL, Polska)
- Sacharoza (POCH, Polska)
- Skrobia (POCH, Polska)
- Sól morską (Daco-Art, Polska)
- Trehaloza (Hayashibara, Japonia)

7.3 Odczynniki chemiczne

Odczynniki stosowane do badania właściwości enzymu

- 2-merkaptoetanol (POCH, Polska)
- Aceton (POCH, Polska)
- Acetonitryl (Merck, Niemcy)

- Albumina osocza krwi wołowej (Serva, Niemcy)
- Alumina A-5 (Sigma-Aldrich, Niemcy)
- Azokazeina (Serva, Niemcy)
- Blue Dextran (Serva, Niemcy)
- Chlorki metali wymienione w tabelach nr 8, 23, 24 (POCH, Polska)
- Dimetylosulfotlenek (DMSO) (Reachim, Rosja)
- Ditiotreitrol (DTT) (Serva, Niemcy)
- Dodecylosiarczan (VI) sodu (SDS) (Sigma-Aldrich, Niemcy)
- Dwunastowodny wodorofosforan sodu ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) (POCH, Polska)
- Etanol (POCH, Polska)
- Fluorek fenylometylosulfonowy (PMSF) (Sigma-Aldrich, Niemcy)
- Hemoglobina (ICN Biomedicals Inc., USA)
- Izopropanol (POCH, Polska)
- Kazeina (Serva, Niemcy)
- Kwas borowy (H_3BO_4) (POCH, Polska)
- Kwas cytrynowy (POCH, Polska)
- Kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA) (Sigma-Aldrich, Niemcy)
- Kwas jodoctowy (Sigma-Aldrich, Niemcy)
- Kwas octowy (CH_3COOH) (POCH, Polska)
- Kwas ortofosforowy (H_3PO_4) (POCH, Polska)
- Kwas p-chlorortęciowobenzoowy (pCMB) (Sigma-Aldrich, Niemcy)
- Lizozym (Fluka, Niemcy)
- Metanol (POCH, Polska)
- Mocznik (POCH, Polska)
- NaOH (POCH, Polska)
- Ovalbumina (Sigma-Aldrich, Niemcy)
- Pepstatyna (Sigma-Aldrich, Niemcy)
- Sephadex G-100 (Pharmacia Fine Chemicals, Szwecja)
- Tris (Merck, Niemcy)
- Triton X-100 (Fluka, Niemcy)
- Tween 80 (BTL, Polska)
- Żelatyna (FoodCare Group, Polska)
- α -amylaza (Fluka, Polska)
- β -globulina wołowa (Fluka AG, Buchs SG, Szwajcaria)

Odczynniki stosowane w preparatyce białek:

- Akrylamid (Sigma-Aldrich, Niemcy)
- Aldehyd mrówkowy (POCH, Polska)
- Azotan srebra (POCH, Polska)
- Barwnik Coomassie Brillant Blue R-250 (Fluka, Niemcy)
- Błękit bromofenolowy (POCH, Polska)
- Glicerol (Chempur, Polska)
- Glicyna (POCH, Polska)
- Marker wielkości białek SM0431, SM1811 (Fermentas, Litwa)
- N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina (TEMED) (Sigma-Aldrich, Niemcy)
- Nadsiarazan amonu (Sigma-Aldrich, Niemcy)
- Odczynnik Folina Ciocalteu'a (POCH, Polska)
- Siarczan miedzi pięciowodny ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) (POCH, Polska)
- Tiosiarczan sodu (POCH, Polska)
- Węglan Sodiu (Na_2CO_3) (POCH, Polska)
- Winian sodowo-potasowy (POCH, Polska)

7.4 Aparatura

- Aparat do elektroforezy białkowej „Bluestart” (DNA Gdańsk II)
- Aparat do elektrotransferu (Fermentas, Litwa)
- Aparat fotograficzny; obiektyw stałogniskowy 60 mm, filtr UV 390 HTMC (Canon Eos 1000 D)
- Autoklaw pionowy (Systec VX-75, Niemcy)
- Filtry strzykawkowe o wielkości porów 0,45 μm (Merck, Niemcy).
- Filtry zagęszczające Amicon[®] Ultra-15-10,000 MWCO i Amicon[®] Ultra-15-30,000 MWCO (Millipore, Irlandia)
- Inkubator z chłodzeniem (KB 53, Binder, Niemcy)
- Liofilizator (Martin Christ GmbH, Germany)
- Mieszadło magnetyczne BMM21 (SRSE, Polska)
- pH-metr CP-551 (Elmetron, Polska)
- pompa perystaltyczna (ZALiMP typ PP1B-05, Polska)
- Spektrofotometr Helios α (Thermo Spectronic, Wielka Brytania)
- Termoblok Red Hot 35 Digital oraz Hot Shot 18 (DNA II Gdańsk, Polska)

- Vortex WL-1 (Bio-mix, Polska)
- Waga laboratoryjna WPS 72 (Radwag, Polska)
- Wirówka 5415R oraz 5415D (Eppendorf)
- Wirówka MPW-350R (MPW, Polska)
- Wstrząsarka powietrzna (Ecotron, Szwajcaria)
- Wysokosprawny chromatograf cieczowy (LaChrom, L-7490, Hitachi Merck, Niemcy).

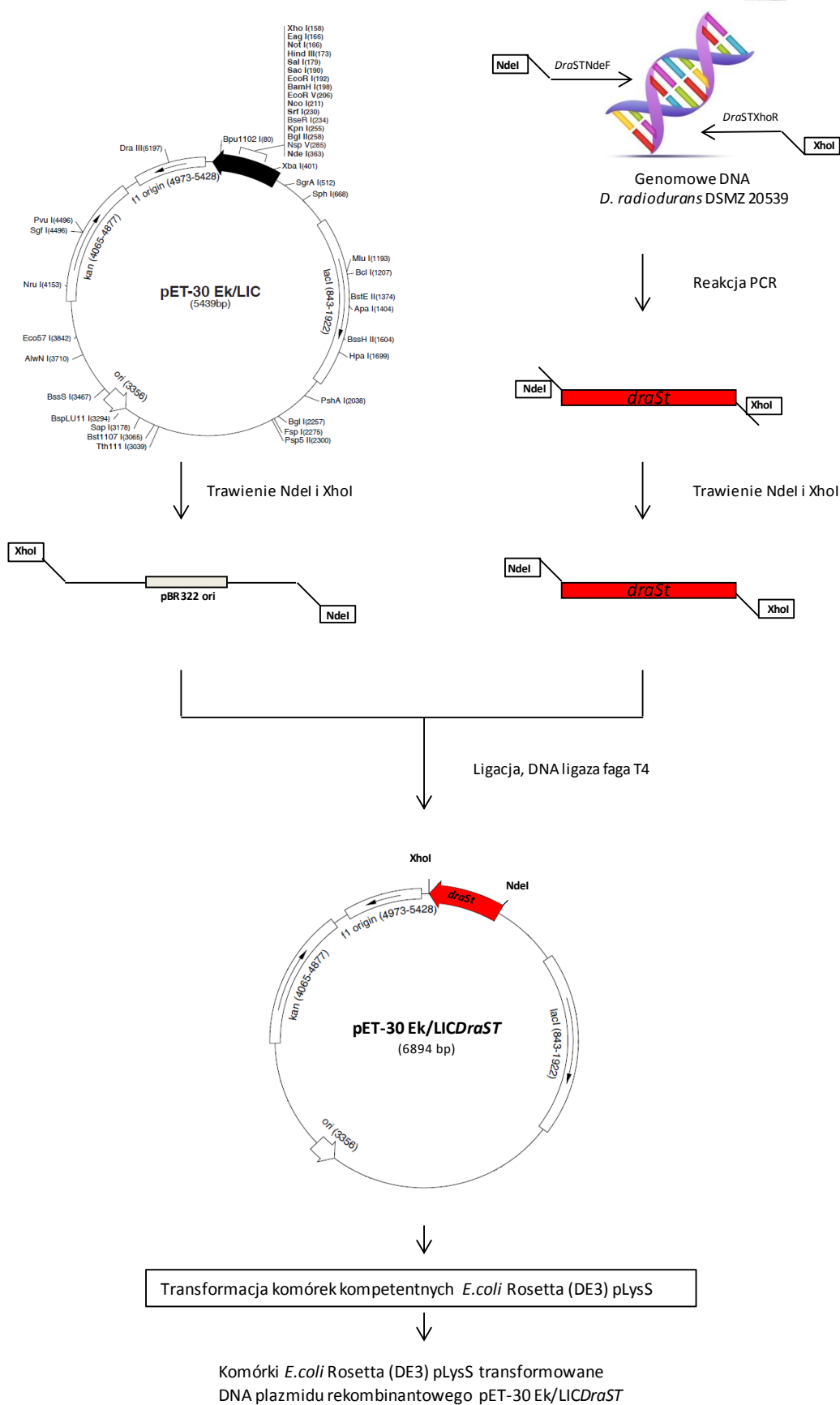
8. Metody badań

8.1 Badanie α -D-glukozylotransferazy maltozy

8.1.1 Szczep i warunki hodowli

Użyty w eksperymencie preparat α -D-glukozylotransferazy maltozy otrzymano z wykorzystaniem rekombinantowego szczepu *Escherichia coli* (DE3) Rosetta pLysS transformowanego plazmidem pET-30Ek/LICDraST skonstruowanego w Katedrze Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności przez dr inż. Pawła Filipkowskiego. Sposób konstrukcji rekombinantowego szczepu oraz wytwarzania białka rekombinantowego z metką oligohistydynową jest przedmiotem zgłoszenia patentowego numer P.392388 z dnia 14.09.2010. Schemat otrzymywania rekombinantowego szczepu *Escherichia coli* przedstawiono na rysunku nr 10.

Hodowlę rekombinantowego szczepu *E. coli* prowadzono na podłożu płynnym LB (pH 7,2) zawierającym na litr: 10 g peptonu K, 5 g ekstraktu drożdżowego, 10 g NaCl, 20 mg kanamycyny oraz 34 mg chloramfenikolu. Pożywkę LB o objętości 3 mL z dodatkiem antybiotyku zaszczipiono transformowanymi komórkami *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS. Hodowlę prowadzono w wytrząsarce powietrznej przez noc w temperaturze 37°C przy 160 rpm. Następnie z hodowli pobierano 1 mL inokulum, którym zaszczipiono 50 mL pożywki LB z dodatkiem kanamycyny i chloramfenikolu. Hodowlę prowadzono, stosując określone warunki, do uzyskania $OD_{600\text{ nm}}=0,5$. Następnie dodawano induktora o stężeniu końcowym 1mM IPTG w pożywkę i hodowlę kontynuowano w 25°C przez 16 godzin. Po zakończeniu kultury hodowlę wirowano przez 10 minut przy 5000 rpm, a uzyskaną biomasę bakterii poddawano dezintegracji.



Rys. 10. Schemat otrzymywania rekombinantowego szczepu *Escherichia coli* transformowanego plazmidem pET-30 Ek/LICDraST (Zgłoszenie patentowe nr P.392388 z dn. 14.09.2010).

8.1.2 Biosyntaza i oczyszczanie białka

Osad bakteryjny uzyskany z 500 mL hodowli zawieszano w 25 mL buforu lizującego zawierającego: 10 mM Tris-HCl o pH 8,8, 10 mM EDTA, 10 mM CaCl₂ i 1 mM PMSF. Zawiesinę poddawano działaniu ultradźwięków o amplitudzie A=30% przez 10 sekund, powtarzając procedurę czterokrotnie w 30 sekundowych odstępach czasowych. Lizat wirowano przez 40 minut przy 9000 rpm. Następnie supernatant inkubowano przez 10 minut w 56°C w celu denaturacji i częściowego usunięcia balastowych białek gospodarza. Lizat ponownie wirowano przez 40 minut przy 9000 rpm. W kolejnym etapie preparat poddawano dalszemu oczyszczaniu poprzez zastosowanie chromatografii metalopowinowactwa na złożu IDA (Novagen) z jonami Co²⁺ wiążącymi białka fuzyjne. Na przygotowaną zgodnie z zaleceniami producenta kolumnę nanoszono ekstrakt bezkomórkowy. Białka wymywano buforami o wzrastającym stężeniu imidazolu i objętości równej 2 objętościom złoża. Skład używanych buforów przedstawiono w tabeli nr 5. Elucja α -D-glukozylotransferazy maltozy następowała przy 500 mM imidazolu. Frakcje zawierające białko łączono i zagęszczono poprzez wirowanie na filtrach wirówkowych (Amicon MWCO=30,000 Da, Milipore) przy 5000 rpm przez 15 minut. Przed oznaczeniem aktywności, próbki dializowano w celu usunięcia składników buforu.

Tabela 5. Skład buforów elucyjnych stosowanych w chromatografii metalopowinowactwa.

Skład	Bufor					
	A	A'	B	C	D	E
NaCl	0,5 M					
Bufor fosforanowy, pH 7,6	50 mM					
Imidazol	5 mM	25 mM	50 mM	80 mM	100 mM	500 mM

8.1.3 Oznaczanie aktywności α -D-glukozylotransferazy maltozy

W probówkach Eppendorfa umieszczano 1 mL 10% roztworu maltozy w 0,1 M buforze fosforanowo-cytrynianowym o pH 7,6 i ogrzewano przez 2 minuty w 30°C. Następnie do probówek dodawano 0,1 mL preparatu enzymu i prowadzono reakcję przez 120 minut. Po zatrzymaniu reakcji poprzez ogrzewanie przez 10 minut w 95°C próbki wirowano (10 minut, 12000 rpm) i sączono z użyciem filtrów strzykawkowych o wielkości porów 0,45 μ m (Merck, Niemcy). Oczyszczone próbki dozowano do kolumny APS-2 Hypersil (Thermo Electron Corporation, Dreiech, Niemcy) o wymiarach 250 x 4,6 mm i ziarnie 5 μ m i eluowano w 30°C fazą ruchomą acetonitryl/metanol/woda (78:11:11 v/v/v) przy natężeniu przepływu 1,6

mL/min stosując wysokosprawny chromatograf cieczowy z autosamplerem i detektorem refraktometrycznym (LaChrom, L-7490, Hitachi Merck), i oprogramowaniem HSMD7000 ver.4.1. Znajdujące się w mieszaninie reakcyjnej cukry identyfikowano przez porównanie czasów retencji badanych próbek i roztworów wzorcowych o stężeniach 10 mg/mL. Jako jednostkę aktywności (U) przyjęto ilość enzymu katalizującą w ciągu 1 minuty wytwarzanie 1 μ mola trehalozy w przyjętych warunkach reakcji.

8.1.4 Wyznaczanie optymalnej temperatury i pH

Określenie optymalnej temperatury działania enzymu wyznaczono według punktu 8.1.3, prowadząc reakcję konwersji w zakresie temperatur 0-55°C w 0,1 M buforze fosforanowo-cytrynianowym o pH 7,6. Zależność aktywności α -D-glukozylotransferazy maltozy od pH reakcji określano według punktu 8.1.3 stosując 10% roztwór maltozy w 0,05 M buforach Brittona-Robinsona o pH od 4,0 do 11.

8.1.5 Określenie wpływu temperatury i pH na stabilność enzymu

Oznaczenie zmian aktywności preparatu wywołanych 2-godziną inkubacją w temperaturach zmienianych w zakresie 10-60°C prowadzono zgodnie z punktem 8.1.3. W przypadku określenia wpływu pH na stabilność enzymu preparat inkubowano w 0,05 M buforach Brittona-Robinsona o pH w zakresie od 4 do 11 w temperaturze 30°C przez 2 godziny. Po inkubacji próbki dializowano w celu wymiany buforu na wodę, a następnie mierzono aktywność zgodnie z punktem 8.1.3.

8.1.6 Wyznaczanie stałych kinetycznych

Stałą Michaelisa (K_m) oraz V_{max} reakcji izomeryzacji wyznaczano poprzez oznaczenie aktywności enzymu zgodnie z punktem 8.1.3, w zmiennym zakresie stężeń substratu od 146 mM do 877 mM maltozy. Wartości K_m i V_{max} zostały wyliczone metodą Lineweavera-Burka (1934). Zbadano również kinetykę reakcji odwrotnej izomeryzacji, zgodnie z punktem 8.1.3 w zakresie stężeń od 146 mM do 877 mM trehalozy.

8.1.7 Oddziaływanie kationów

Wpływ jonów na aktywność katalityczną oznaczano poprzez dodatek do substratu reakcji roztworów soli chlorkowych poszczególnych kationów do uzyskania końcowego stężenia 1, 5 i 10 mM. Aktywność badanych preparatów oznaczano zgodnie z punktem 8.1.3. Do oznaczenia użyto $AlCl_3$, $BaCl_2$, $CoCl_2$, $CuCl_2$, $FeCl_3$, $HgCl_2$, $MgCl_2$, $MnCl_2$, $ZnCl_2$, $NiCl_2$

i CaCl_2 . Zmiany aktywności określono jako procent aktywności próby kontrolnej nie zawierającej jonów.

8.1.8 Wpływ związków chemicznych na aktywację lub inhibicję

Zmiany aktywności α -D-glukozylotransferazy maltozy pod wpływem substancji chelatujących jony metali lub powodujących zmiany czwartorzędowej struktury enzymu i struktury jego podjednostek, oznaczono według punktu 8.1.3 stosując jako substrat roztwór maltozy, do którego wprowadzano substancje wymienione w tabeli 9 i 10, w ilości niezbędnej do uzyskania w środowisku reakcji zaplanowanych stężeń. Zmiany aktywności określono jako procent aktywności prób kontrolnych, do których nie wprowadzano dodatkowych substancji chemicznych.

8.1.9 Wpływ czasu konwersji maltozy

Wpływ czasu reakcji na skład produktów konwersji 10% maltozy prowadzono zgodnie z punktem 8.1.3, w zmiennych czasach reakcji przez 2, 4, 6, 8, 14, 16, 24, 26, 32 godziny.

8.1.10 Oznaczanie zawartości białek

Zawartość białek oznaczano metodą Lowry'ego (1951) i obliczano z równania regresji krzywej wzorcowej sporządzonej dla albuminy osocza krwi wołowej (Serva, Niemcy). Krzywą wzorcową określono w zakresie stężeń 0-100 $\mu\text{g/mL}$. Absorbancję mierzono przy długości fali 750 nm.

8.1.11 Wyznaczanie masy cząsteczkowej metodą filtracji żelowej

Sączenie molekularne przeprowadzono na kolumnie Superdex 200 HR 10/30 (Amersham Biosciences). Białka eluowano przy użyciu 20 mM buforu Tris-HCl o pH 8,4 zawierającego 300 mM NaCl przy natężeniu przelwywu 0,5 mL/min. Do wyznaczenia masy cząsteczkowej sporządzono krzywą wzorcową w postaci funkcji:

$$\log MW = f(V/V_0),$$

gdzie: MW –masa cząsteczkowa białek wzorcowych (Da),

V – objętość elucji białek wzorcowych (mL),

V_0 – objętość martwa kolumny (mL),

dla białek o znanej masie cząsteczkowej. Białka stosowane do przygotowania krzywej kalibracyjnej: anhidraza węglanowa (29 kDa), owoalbumina (43 kDa), BSA (66 kDa), dehydrogenaza alkoholowa (150 kDa), β -amylaza (200 kDa), apoferrytyna (443 kDa), tyreoglobulina (669 kDa).

8.1.12 Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)

Do rozdzielania elektroforetycznego białek w warunkach denaturujących przygotowano żele składające się z dwóch warstw: 6% zagęszczający żel górny i 12 % rozdzielający żel dolny. Żele przygotowano zgodnie z tabelą nr 6.

W celu przygotowania żelu odtłuszczone szybki złożono, uszczelniono gumką, spięto klipsami i włożono pomiędzy nie grzebień. Do przestrzeni wprowadzono mieszaninę żelu rozdzielającego, zalano wodą i pozostawiono do spolimeryzowania. Następnie usunięto nad żelu wodę i wprowadzono mieszaninę żelu zagęszczającego. Po spolimeryzowaniu usunięto grzebień i gumkę uszczelniającą, a żel umieszczono w aparacie do elektroforezy i wypełniono buforem 1×Tris – glicyna o pH 8,3 (25 mM Tris, 250 mM glicyna, 0,1% SDS).

Marker oraz próbki nanoszone na żel zostały uprzednio przygotowane. 5 µl roztworu buforu obciążającego (0,06 M Tris-HCl o pH 6,8, 2% SDS, 25% glicerol, 14,4 mM 2-merkaptotanol, 0,1% błękit bromofenolowy) mieszano z markerem oraz pozostałymi próbkami odpowiednio w stosunku 1:1 oraz 1:4. Następnie inkubowano je przez 10 minut w 100°C i po ochłodzeniu nanoszono na studzienki w żelu. Elektroforezę prowadzono przy napięciu 6-15 V/cm długości żelu. Po zakończeniu rozdzielania elektroforetycznego żel poliakrylamidowy umieszczano w roztworze barwiącym (0,5 g barwnika Coomassie Brilliant Blue R-250, 50 mL metanolu, 10 mL lodowatego kwasu octowego, 40 mL wody) i inkubowano, lekko mieszając w temperaturze pokojowej przez 30 minut. Następnie żel przenoszono do roztworu odbarwiającego (20 mL metanolu, 10 mL kwasu octowego, 60 mL wody). Czystość elektroforetyczną uzyskanego preparatu wyznaczono przy użyciu oprogramowania Quantity One (Bio-Rad, Kalifornia, USA).

Tabela 6. Skład roztworów do przygotowania żelu rozdzielającego i zagęszczającego.

Składniki	Objętość składników (mL)	
	Żel zagęszczający 6%	Żel rozdzielający 12%
Woda	2,7	4,9
30% roztwór akrylamidów	0,67	6,0
1 M Tris-HCl, pH=6,8	0,5	-
1,5 M Tris-HCl, pH=8,8	-	3,8
10 % SDS	0,04	0,15
10 % nadsiarazan amonu	0,04	0,15
TEMED	0,004	0,006

8.2 Badanie proteaz

8.2.1 Przygotowanie inokulum *Deinococcus geothermalis* i *Meiothermus ruber*

Kulturę ze zliofilizowanego szczepu *Deinococcus geothermalis* (DSM 11300) oraz *Meiothermus ruber* (DSM 1279) zakupionych z Niemieckiej Kolekcji Mikroorganizmów i Kultur Komórkowych przygotowano zgodnie z procedurą zalecaną przez producenta. Liofilizowane komórki drobnoustroju zawieszano w 1 mL jałowego podłoża standardowego (wg punktu 8.2.2), a następnie przenoszono do 5 mL tego samego podłoża umieszczonego w szczelnie zamykanej, jałowej probówce. Probówkę inkubowano w cieplarni bez wstrząsania w skośnej pozycji przez okres 3-5 dni w temperaturze 45°C w przypadku *Deinococcus geothermalis* i w temperaturze 55°C w przypadku *Meiothermus ruber*. Uzyskane tym sposobem inokulum wykorzystywano do zaszczepienia pożywki hodowlanej, przygotowanej według punktu 8.2.2 w okresie nie przekraczającym 1 tygodnia przechowywania chłodniczego (4°C).

8.2.2 Warunki hodowli *Deinococcus geothermalis* i *Meiothermus ruber*

Hodowlę *Deinococcus geothermalis* prowadzono na płynnym podłożu standardowym, zawierającym 0,1% peptonu K, 0,1% ekstraktu drożdżowego i 0,2% soli morskiej. Po doprowadzeniu pH do wartości 7,2, porcje podłoża o objętości 1000 mL umieszczano w kolbach Erlenmayera o pojemności 2000 mL i sterylizowano w temperaturze 121°C przez 30 min., a następnie zaszczepiano 10 mL zawiesiny bakterii ($OD_{600} > 1,2$). Hodowlę *Meiothermus ruber* prowadzono na płynnym podłożu standardowym o pH 8, zawierającym 0,5% peptonu K, 0,1% ekstraktu drożdżowego i 0,1% skrobi. Hodowlę drobnoustrojów prowadzono przez określony czas w warunkach tlenowych bez dodatkowego napowietrzania w termostatowanej wstrząsarce z szybkością wstrząsania 160 cykli/min w temperaturze 45°C (*D. geothermalis*) i 55°C (*M. ruber*). Po zakończeniu hodowli biomasę bakterii odwirowano przez 15 min ($7000 \times g$) w temp. 15°C. Ciecz pozostałą po hodowli i odwirowaniu komórek zagęszczano poprzez liofilizację. Znaną objętość roztworu zamrażano, a następnie suszono sublimacyjnie w temperaturze -83°C i przy ciśnieniu 0,370 mbar przez 96 godzin. Otrzymany liofilizat przechowywano w warunkach chłodniczych (+ 4°C).

8.2.3 Wyznaczenie krzywej wzrostu

W celu określenia szybkości przyrostu biomasy hodowlę *Deinococcus geothermalis* prowadzono przez 30 godzin na podłożu standardowym według punktu 8.2.2. Po 2 godzinach

od zaszczepienia hodowli rozpoczęto przeprowadzane w odstępach dwugodzinnych pomiary gęstości optycznej (OD_{600}) zawiesiny komórek oraz dla materiału uzyskanego po 6, 8, 12, 18, 24 godzinach zmierzono aktywność proteolityczną (wg punktu 8.2.10). Mierzac gęstość optyczną stosowano jako próbę odniesienia nie zaszczepione komórkami drobnoustroju wysterylizowane podłoże. Przyrost biomasy hodowli *Meiothermus ruber* badano w analogiczny sposób przez okres 50 godzin. Aktywność proteolityczną zmierzono (wg punktu 8.2.10) w przypadku próbek uzyskanych po 8, 10, 14, 24, 32 godzinach.

8.2.4 Określenie wpływu warunków hodowli na produkcję enzymów proteolitycznych

Hodowlę *Deinococcus geothermalis* prowadzono według punktu 8.2.2 w temperaturze 30, 35, 40, 45, 50, 55 i 60°C oraz zmiennym pH hodowli w zakresie 4-11. Po zakończeniu hodowli biomase bakterii odwirowano przez 15 min ($7000\times g$) w temp. 15°C. Ciecz pozostałą po hodowli i odwirowaniu komórek zagęszczano poprzez liofilizację. Znaną objętość roztworu zamrażano, a następnie suszono sublimacyjnie w temperaturze -83°C i przy ciśnieniu 0,370 mbar przez 96 godzin. W otrzymanym liofilizacie oznaczano aktywność proteolityczną. Analogicznie postępowano w przypadku *Meiothermus ruber*, gdzie hodowlę prowadzono zgodnie z punktem 8.2.2 w temperaturze 40, 45, 50, 55, 60 i 65°C oraz zmiennym pH hodowli w zakresie 4-11.

8.2.5 Badanie wpływu składu podłoża na wydajność wytwarzania proteaz

W celu określenia wpływu różnego rodzaju źródeł węgla i azotu na wydajność hodowli i produkcji enzymów proteolitycznych prowadzono hodowlę *Deinococcus geothermalis* i *Meiothermus ruber* według punktu 8.2.2 na podłożach, które zostały podane w tabeli nr 18. Jako źródło azotu organicznego zastosowano: ekstrakt wołowy, pepton K i ekstrakt drożdżowy. Źródłem azotu nieorganicznego był: mocznik, azotan amonu oraz siarczan amonu. Glukoza, maltoza, trehaloza, sacharoza, skrobia posłużyły jako źródło węgla. Komponenty podłoża były podawane w stężeniu końcowym wynoszącym 0,2%.

8.2.6 Przygotowanie ekstraktu białek komórkowych *Deinococcus geothermalis* i *Meiothermus ruber*

Ekstrakt białek komórkowych otrzymywano poprzez dezintegrację komórek *Deinococcus geothermalis* lub *Meiothermus ruber* z alumina (Al_2O_3). Około 5 g zamrożonej biomasy ucierano w moździerzu (15 min, 4°C) z 10 g aluminy i 25 mL dodawanego stopniowo 0,1 M buforu fosforanowo-cytrynianowego (pH 7,2 lub pH 8,0) zawierającego w 1

litrze 1 mmol DTT. Zawiesinę komórek odwirowywano przez 15 min przy $9000\times g$ ($4^{\circ}C$) i w uzyskanym supernatancie oznaczano zawartość białek i aktywność proteolityczną (wg punktu 8.2.10).

8.2.7 Wysalanie białek cieczy pochodowlanej siarczanem (VI) amonu

W celu wyodrębnienia frakcji białek różniących się aktywnością enzymatyczną zagęszczoną poprzez liofilizację ciecz pochodowlaną rozpuszczano w znanej objętości wody i poddawano frakcjonowaniu $(NH_4)_2SO_4$. Do wodnego roztworu białek stopniowo dodawano krystaliczny $(NH_4)_2SO_4$, aż do uzyskania nasycenia 30% (w/v). Po 6 godz. inkubacji w temperaturze $4^{\circ}C$ precypitat odwirowywano (15 min, $9000\times g$) i rozpuszczano w niewielkiej, znanej objętości 50 mM buforu fosforanowo – cytrynianowego o pH 7,2. W podobny sposób oddzielano z supernatantu kolejne frakcje strącane przy nasyceniu siarczanem (VI) amonu wynoszącym 45% i 90% (w/v). Otrzymane roztwory białek dializowano poprzez ultrafiltrację przy użyciu Centrifugal Filter Units (Amicon[®] Ultra-15-10,000 MWCO) o zdolności rozdzielczej 10 kDa i oznaczano w nich aktywność enzymatyczną oraz stężenie białek.

8.2.8 Strącanie białek cieczy pochodowlanej rozpuszczalnikami organicznymi

Do strącania białek używano określoną ilość cieczy pochodowlanej i dodawano co najmniej 3-krotną objętość lodowo-zimnego acetonu lub metanolu. Próbkę inkubowano przez 30 minut w temperaturze $-20^{\circ}C$ co 5 minut mieszając je. Następnie uzyskany precypitat odwirowywano (15 min, $9000\times g$) i suszono sublimacyjnie w temperaturze $-83^{\circ}C$ i przy ciśnieniu 0,370 mbar przez godzinę. W uzyskanych preparatach oznaczano aktywność enzymatyczną oraz stężenie białek.

8.2.9 Oczyszczanie enzymu o aktywności proteolitycznej

Oczyszczanie enzymu prowadzono stosując filtrację żelową na kolumnie ($2,3\times 45$ cm) ze złożem Sephadex G-100. Wszystkie operacje związane z przygotowaniem złoża chromatograficznego i jego równoważeniem prowadzono zgodnie z zaleceniami producenta.

Zagęszczoną i odsoloną frakcję białek uzyskanych poprzez strącenie przy wysyceniu 90% $(NH_4)_2SO_4$ nanoszono na kolumnę zrównoważoną 50 mM buforem fosforanowo-cytrynianowym o pH 7,0. Białka eluowano przy użyciu tego samego buforu przy natężeniu

przepływu 1 mL/min, zbierając frakcje o objętości 4 mL, w których oznaczono zawartość białek przez pomiar absorpcji przy 280 nm oraz aktywność proteolityczną (wg punktu 8.2.10).

8.2.10 Oznaczanie aktywności proteolitycznej

Aktywność proteolityczną oznaczano przy użyciu azokazeiny jako substratu zgodnie ze zmodyfikowaną procedurą Sarah i współpracownicy (2001). W przypadku preparatu pozyskanego z *D. geothermalis* w probówkach Eppendorfa umieszczano 0,250 mL 0,2% roztworu azokazeiny w 0,1 M buforze fosforanowo-cytrynianowym o pH 7,2 i ogrzewano przez 2 minuty w 60°C. Następnie do probówek dodawano 0,150 mL preparatu enzymu i prowadzono reakcję przez 15 minut. Po zatrzymaniu reakcji poprzez dodanie 1,2 mL kwasu trichlorooctowego (TCA) próbki inkubowano przez 15 min w 4°C i wirowano (10 minut, 12000 rpm). Następnie 1 mL supernatantu dodawano do 2 mL 1 M NaOH i mierzono absorpcję próbki przy długości fali $\lambda=440$ nm. W przypadku próbki kontrolnej zamiast enzymu dodawano odpowiednią ilość buforu. Próba ślepa dla enzymu była przygotowana poprzez zmieszanie enzymu, TCA oraz azokazeiny w tej kolejności. Jako jednostkę aktywności (U) przyjęto taką ilość enzymu, która powoduje zmianę absorbancji o 0,01 w danych warunkach reakcji. Analogicznie postępowano badając preparat z *M. ruber*, jednak w tym przypadku do reakcji używano 0,2% roztworu azokazeiny w 0,1 M buforze fosforanowo-cytrynianowym o pH 8,0 a reakcję prowadzono w 80°C.

8.2.11 Wyznaczanie optymalnej temperatury i pH

Określenie optymalnej temperatury działania enzymu z *Deinococcus geothermalis* wykonano według punktu 8.2.10, prowadząc reakcję hydrolizy w zakresie temperatur 30-80°C w 0,1M buforze fosforanowo-cytrynianowym o pH 7,2. Aktywność preparatu z *Meiothermus ruber* badano w zakresie temperatur 40-80°C w 0,1M buforze fosforanowo-cytrynianowym o pH 8,0. Zależność aktywności proteaz od pH reakcji określano według punktu 8.2.10, stosując 0,2% roztwór azokazeiny w 0,05 M buforach Brittona-Robinsona o pH od 4,0 do 12,5.

8.2.12 Określenie wpływu temperatury i pH na stabilność enzymu

Oznaczenie zmian aktywności preparatu wywołanych 1-godziną inkubacją w temperaturach zmienianych w zakresie 30-100°C prowadzono zgodnie z punktem 8.2.10. W przypadku określenia wpływu pH na stabilność enzymu, preparat inkubowano w 0,05 M buforach Brittona-Robinsona o pH w zakresie od 4-12,5, w temperaturze 15°C przez 1

godzinę. Po inkubacji próbki dializowano w celu wymiany buforu na wodę, a następnie mierzono aktywność zgodnie z punktem 8.2.10.

8.2.13 Wyznaczanie stałych kinetycznych

Stałą Michaelisa (K_m) oraz V_{max} reakcji hydrolizy wyznaczano poprzez oznaczenie aktywności enzymu zgodnie z punktem 8.2.10 w zmiennym zakresie stężeń substratu od 0,625 mg/mL do 40 mg/mL azokazeiny. Wartości K_m i V_{max} zostały wyliczone metodą Lineweavera-Burka (1934).

8.2.14 Oddziaływanie kationów

Wpływ jonów na aktywność katalityczną oznaczano poprzez dodatek do preparatu enzymu roztworów soli chlorkowych poszczególnych kationów do uzyskania końcowego stężenia 1, 5 lub 10 mM. Próbkę inkubowano przez godzinę w 4°C, a następnie badano aktywność preparatów zgodnie z punktem 8.2.10. Do oznaczenia użyto $AlCl_3$, $BaCl_2$, $CoCl_2$, $CuCl_2$, $FeCl_3$, $HgCl_2$, $MgCl_2$, $MnCl_2$, $NaCl$, $ZnCl_2$, $NiCl_2$ i $CaCl_2$. Zmiany aktywności określono jako procent aktywności próby kontrolnej nie zawierającej jonów.

8.2.15 Wpływ związków chemicznych na aktywację lub inhibicję

Zmiany aktywności proteaz pod wpływem substancji chelatujących jony metali lub powodujących zmiany czwartorzędowej struktury enzymu i struktury jego podjednostek oznaczono według punktu 8.2.10. Do badania użyto próbki, do których uprzednio wprowadzono substancje wymienione w tabelach 25-27, w ilości niezbędnej do uzyskania w środowisku reakcji zaplanowanych stężeń i inkubowano w 4°C. Zmiany aktywności określono jako procent aktywności prób kontrolnych, do których nie wprowadzano dodatkowych substancji chemicznych.

8.2.16 Specyficzność substratowa

Określenie specyficzności działania polegało na określeniu zdolności proteaz do hydrolizy różnego rodzaju substratów białkowych. Do oznaczenia użyto 2% roztworów: kazeiny, hemoglobiny, lizozymu, owoalbuminy, surowiczej albuminy wołowej (BSA), β -globuliny wołowej, żelatyny oraz hydrolizatu keratyny. W zakręcanych probówkach szklanych umieszczano 2,5 mL wodnego roztworu danego białka i ogrzewano przez 2 minuty w 60°C. Następnie do probówek dodawano 0,5 mL preparatu enzymu i prowadzono reakcję przez 15 minut. Po zatrzymaniu reakcji poprzez dodanie 2,5 mL kwasu trichlorooctowego (TCA)

próbki inkubowano przez 15 min w 4°C i wirowano (10 minut, 12000 rpm). Następnie 2 mL supernatantu przenoszono do 5 mL 0,5 M Na₂CO₃, dodawano 1 mL odczynnika Folina, worteksowano i mierzono absorpcję próbki przy długości fali $\lambda=660$ nm. W przypadku próbki kontrolnej zamiast enzymu dodawano odpowiednią ilość buforu. Próba ślepa dla enzymu była przygotowana poprzez zmieszanie enzymu, TCA oraz substytutu w tej kolejności. Miarą aktywności enzymu jest ilość μ moli tyrozyny (odczytana z równania regresji: $c[\mu\text{mol}]=0,2817 \cdot A - 0,0006$ krzywej wzorcowej sporządzonej w zakresie stężeń 0,025-0,25 μ moli tyrozyny) uwolniona w danych warunkach reakcji.

8.2.17 Oznaczanie zawartości białek

Zawartość białek oznaczano metodą Lowry'ego (1951) i obliczano z równania regresji krzywej wzorcowej sporządzonej dla albuminy osocza krwi wołowej (Serva, Niemcy). Krzywą wzorcową określono w zakresie stężeń 0-100 μ g/mL. Absorbancję mierzono przy długości fali 750 nm.

8.2.18 Wyznaczanie masy cząsteczkowej metodą filtracji żelowej

Sączenie molekularne przeprowadzono na kolumnie (2,3×45 cm) ze złożem Sephadex G-100, na którą naniesiono kolejno po 1 mL białek wzorcowych i roztworu Blue Dextran. Białka eluowano przy użyciu 50 mM buforu fosforanowo-cytrynianowego o pH 7,0, przy natężeniu przepływu 1 mL/min, zbierając frakcje o objętości 4 mL, w których oznaczano zawartość białek przez pomiar absorpcji przy 280 nm, a absorpcję Blue Dextranu mierzono przy 500 nm. Do wyznaczenia masy cząsteczkowej sporządzono krzywą wzorcową w postaci funkcji:

$$\log MW = f(V/V_0),$$

gdzie: MW –masa cząsteczkowa białek wzorcowych (Da),

V – objętość elucji białek wzorcowych (mL),

V₀ – objętość martwa kolumny (mL),

dla białek o znanej masie cząsteczkowej. Białka stosowane do przygotowania krzywej kalibracyjnej: lizozym jaja kurzego (14,6 kDa), owoalbumina (43 kDa), α -amylaza z *A.oryzae* (51 kDa), BSA (66 kDa) oraz Blue Dextran (2000 kDa) użyty w celu wyznaczenia objętości martwej kolumny.

8.2.19 Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)

Przygotowanie żeli oraz próbek do elektroforezy przeprowadzono zgodnie z punktem 8.1.12. Elektroforezę wykonywano przy napięciu 6-15 V/cm długości żelu. Po zakończeniu rozdziału elektroforetycznego żel poliakrylamidowy wybarwiano metodą srebrą wg Shevchenko i współpracownicy (1996). Żel inkubowano przez 45 minut w świeżo sporządzonym roztworze zawierającym 5% kwas octowy i 50% metanol, a następnie przez 15 minut w 50% metanolu. Przemity dejonizowaną wodą żel inkubowano w kolejnym etapie w 0,02% tiosiarczanie sodu. Żel ponownie płukano w wodzie, a następnie barwiono przez 40 minut w 0,15% roztworze azotanu srebra. Po przemyciu wodą żel wywoływano aż do pojawienia się pożądanego zabarwienia w roztworze zawierającym 2% węglan sodu oraz 0,04% formaldehyd. Barwienie przerywano poprzez przeniesienie żelu do 5% roztworu kwasu octowego. Tak przygotowany żel odpowiednio dokumentowano.

8.2.20 Oznaczanie aktywności metodą zymografii żelowej

W celu zidentyfikowania frakcji białek o aktywności proteolitycznej wykorzystano metodę zymografii żelowej (Pan i in., 2011; Iwai i in., 2010). Do próbek dodawano 2× stężony bufor obciążający, nie zawierający czynnika redukującego (0,5 M Tris-HCl (pH=6,8); 10% SDS; glicerol; 0,05% błękit bromofenolowy), a następnie rozdzielano elektroforetycznie analogicznie z punktem (8.2.19). Następnie rozdzielone białka były transferowane elektroforetycznie na żel poliakrylamidowy zawierający 0,1% żelatyny. Transfer elektroforetyczny prowadzono przez 60 min przy napięciu 120 V. Po zakończonym transferze żel płukano w 2,5% roztworze Triton X-100 przez 20 minut, aby usunąć SDS i zrenaturować białka, po czym żele inkubowano w buforze rozwijającym (50 mM Tris-HCl (pH=7,5); 5 mM CaCl₂) przez 12 h w temperaturze 45°C. Wizualizację powstałych prążków przeprowadzano barwiąc żele Coomassie Blue R250, rozcieńczonym w roztworze zawierającym 50% metanolu i 10% kwasu octowego. Enzymy rozkładając żelatynę znajdującą się w żelu poliakrylamidowym, pozostawiają odbarwiony prążek na tle granatowo wybarwionego żelu.

8.2.21 Zmiany aktywności enzymu podczas przechowywania

Zliofilizowane preparaty proteaz z *D. geothermalis* i *M. ruber* przechowywano w temperaturze 4°C przez okres 12 tygodni. Zmiany aktywności, według procedury przedstawionej w punkcie 8.2.10., były mierzone w odstępach 2-tygodniowych.

8.3 Analiza statystyczna wyników

Wszystkie zamieszczone w tabelach oraz na wykresach wyniki są średnią z co najmniej trzech niezależnych oznaczeń \pm odchylenie standardowe. W wybranych wariantach wyniki poddano analizie statystycznej z użyciem programu STATGRAPHICS version 2.1 (Statistical Graphics Corporation, USA). Zastosowano analizę wariancji z klasyfikacją pojedynczą.

9. Omówienie wyników

9.1 Charakterystyka α -D-glukozylotransferazy maltozy z *Deinococcus radiodurans*

9.1.1 Oczyszczanie α -D-glukozylotransferazy maltozy z *Deinococcus radiodurans*

Dzięki inżynierii genetycznej stała się możliwa poprawa właściwości funkcjonalnych enzymów, jak również znaczne obniżył się koszt ich produkcji i oczyszczania. (Rastall i Maitin, 2002). Wysoka czystość preparatu pozwala na użycie go w mniejszych ilościach podczas procesu technologicznego.

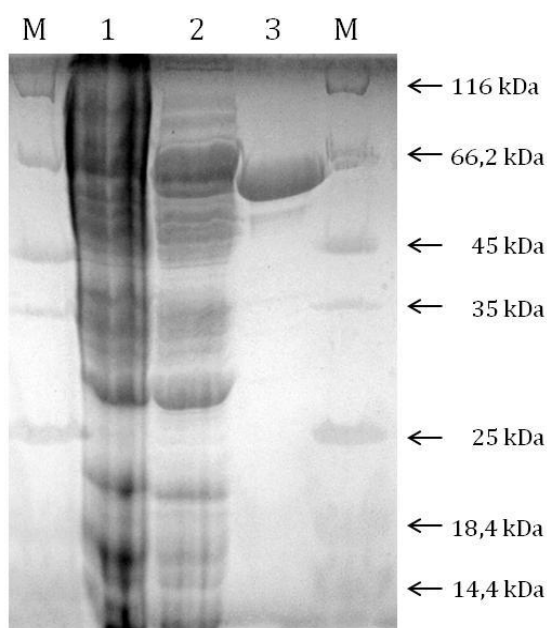
Tabela 7. Oczyszczanie α -D-glukozylotransferazy maltozy z *Deinococcus radiodurans*.

Preparat	Całkowite białko [mg]	Aktywność całkowita [U]	Aktywność specyficzna [U/mg]	Odzysk [%]	Stopień oczyszczenia
Ekstrakt komórkowy ^a	1416,7	167	0,118	100	1
Ekstrakt komórkowy po denaturacji cieplnej (56°C, 10min)	1038,7	159	0,153	95,2	1,30
Ekstrakt komórkowy po denaturacji cieplnej i chromatografii metalopowinowactwa	2,4	28,4	11,83	17	100,3

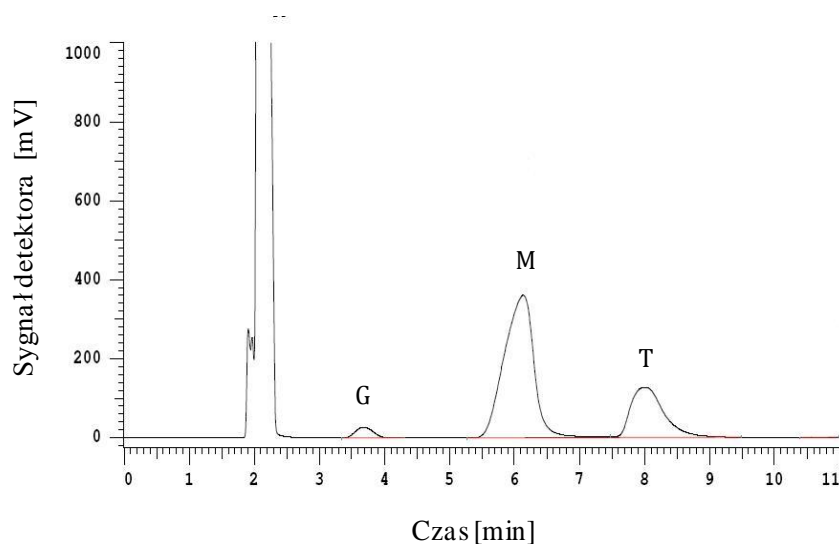
^a Preparat poddany oczyszczaniu pochodził z 1 litra hodowli.

Oczyszczanie preparatu α -D-glukozylotransferazy maltozy obejmowało denaturację cieplną białek gospodarza oraz oczyszczanie metodą chromatografii metalopowinowactwa. Zastosowanie tych dwóch etapów pozwoliło na uzyskanie prawie homogennego preparatu (Tabela 7). Efektem wstępnej inkubacji przez 10 minut w 56°C było strącenie około 27% balastowych białek bez spadku aktywności preparatu. Wykorzystanie wysoce selektywnej metody IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography) pozwoliło na stukrotne oczyszczenie i uzyskanie homogennego preparatu α -D-glukozylotransferazy maltozy (Rys.11) o aktywności wynoszącej 11,83 U/mg. Końcowy preparat wykazuje czystość elektroforetyczną wynoszącą około 92 %.

Czysty preparat syntazy trehalozy został uzyskany również w przypadku rekombinantowego białka z *Arthrobacter aurescens*, potwierdzając tym samym skuteczność oczyszczania enzymu z wykorzystaniem chromatografii metalopowinowactwa (Xiuli i in., 2009). W przypadku α -D-glukozylotransferazy maltozy z *Deinococcus radiodurans* użyta została kolumna kobaltowa ze względu na niższy stopień inhibicji enzymu tym dwuwartościowym jodem w porównaniu do niklu, który często wykorzystuje się w metodzie IMAC (rozdział 8.3). Aktywność α -D-glukozylotransferazy maltozy była oznaczana poprzez identyfikację produktów konwersji metodą HPLC. Przykład składu mieszaniny poreaakcyjnej przedstawiono na rysunku 12.



Rys. 11. Rozdział elektroforetyczny w żelu poliakrylamidowym przedstawiający wyniki oczyszczania ekstraktu bezkomórkowego z *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS + *DraSTpET30His*. M–marker, 1–ekstrakt bezkomórkowy, 2–ekstrakt komórkowy po denaturacji cieplnej, 3–ekstrakt komórkowy po denaturacji cieplnej i IMAC.

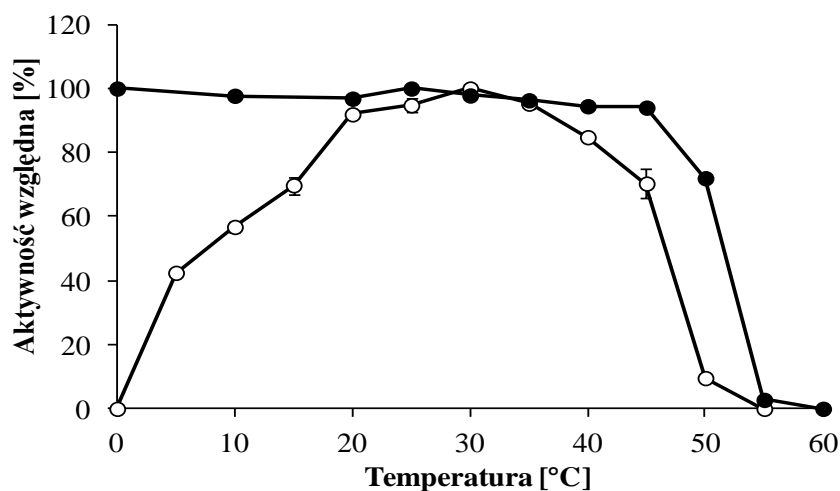


Rys. 12. Zidentyfikowane metodą HPLC produkty konwersji 10% roztworu maltozy (2h, 30°C, pH 7,6) katalizowanej α -D-glukozylotransferazą maltozy z *D. radiodurans*. Na rysunku zaznaczono cukry: glukozę (G), maltozę (M) i trehalozę (T).

9.1.2 Właściwości α -D-glukozylotransferazy maltozy z *Deinococcus radiodurans*

Badany enzym osiąga maksymalną aktywność w temperaturze 30°C (Rys.13) Jest to temperatura odpowiadająca optymalnym warunkom wzrostu mikroorganizmu, z którego pochodzi. W zakresie 25-35°C aktywność enzymu prawie się nie zmienia, jednak dalsze podwyższanie temperatury powoduje szybką inaktywację preparatu. Podobną optymalną temperaturę działania mają syntazy trehalozy pochodzące z mezofili *Pseudomonas putida* (35°C), *Corynebacterium glutamicum* (35°C) oraz *Enterobacter hormaechei* (37°C) (Ma i in., 2006; Tae-Kyun i in., 2010; Yue i in., 2009).

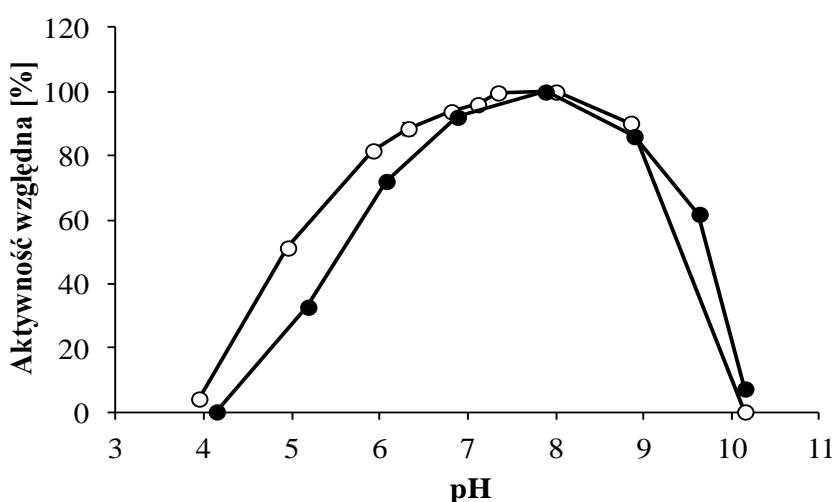
Badany preparat wykazuje dość dużą podwyższoną ciepłooporność. Dwugodzinna inkubacja w 45°C w buforze fosforanowo-cytrynianowym o pH 7,6 nie powoduje znaczącego spadku aktywności enzymu (Rys. 13). Utrata zdolności katalitycznej następowała dopiero w temperaturze 50°C i wynosiła 30 %. Inkubacja w 60°C powodowała całkowitą inaktywację preparatu. Czas połowicznej inaktywacji cieplnej w 55°C, 50°C i 40°C wynosił odpowiednio 22 minuty, 613 minut oraz 28,5 godziny (wyniki nie umieszczone w pracy).



Rys. 13. Wpływ temperatury reakcji na aktywność (○) i stabilność (●) α -D-glukozylotransferazy maltozy z *Deinococcus radiodurans* mierzony w 0,1 M buforze fosforanowo-cytrynianowym o pH 7,6. Wyniki są średnią z 3 oznaczeń \pm odchylenia standardowe.

Optymalne pH konwersji maltozy, katalizowanej przez α -D-glukozylotransferazę maltozy z *Deinococcus radiodurans* wynosi 7,6 i w zakresie pH od 5,0 do 9,5 enzym zachowuje połowę aktywności maksymalnej (Rys. 14). Pod względem optymalnych parametrów reakcji podobne właściwości wykazują wymienione wcześniej syntazy trehalozy

pochodzące z *Pseudomonas putida* oraz *Corynebacterium glutamicum*, których najaktywniejsze działanie odnotowane jest odpowiednio w pH 7,4 i 7 (Ma i in., 2006; Tae-Kyun i in., 2010). Badana α -D-glukozylotransferaza maltozy pomimo godzinnej inkubacji w buforach o zmiennym pH w zakresie pH od 5,5 do 9 zachowuje aktywność katalityczną powyżej 60% (Rys. 14).



Rys. 14. Wpływ pH reakcji na aktywność (○) i stabilność (●) α -D-glukozylotransferazy maltozy z *Deinococcus radiodurans*. Wyniki są średnią z 3 oznaczeń \pm odchylenia standardowe.

9.1.3 Wpływ kationów

W przypadku enzymów przeznaczonych do przetwarzania żywności duże znaczenie ma określenie wpływu substancji mineralnych, których źródłem może być wyjściowy surowiec. Wpływ jonów na stabilizację białek może być wynikiem interakcji chemicznej pomiędzy białkami oraz jonami pełniącymi rolę kofaktora lub inhibitora enzymu. Jednakże swoistość działania jonów jest głównie przypisywana ich zdolności do modyfikowania struktury wody (Zhao, 2005). Jony soli oddziałują specyficznie z cząsteczkami wody, powodując zmianę jej stanu fizycznego, co prowadzi do zmiany jej oddziaływań z białkami. Mogą być to oddziaływania kosmotropowe – stabilizujące quasi-krystaliczną strukturę wody, bądź dezorganizujące tę strukturę – oddziaływania chaotropowe. Bezpośrednia reakcja jonu z białkiem może z kolei powodować zmianę ładunku wypadkowego cząsteczki lub wpływać na jonizację reszt aminokwasowych w centrum aktywnym enzymu. Oddziaływanie z istotnymi grupami funkcyjnymi biokatalizatora prowadzi do zmian właściwości fizycznych

i chemicznych, czego rezultatem może być zmiana aktywności katalitycznej enzymu lub nawet mechanizmu reakcji (Yang, 2009).

Wprowadzone do środowiska reakcji jony wywierają różnorodny wpływ na aktywność preparatu badanej α -D-glukozylotransferazy maltozy (Tabela 8). Silne oddziaływanie inaktywujące na enzym wywierają jony Cu^{2+} , Al^{3+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} i Fe^{3+} . W ich przypadku odnotowano prawie całkowity spadek aktywności. Natomiast jony Ca^{2+} i Mg^{2+} nie wpływają znacząco na aktywność katalityczną biokatalizatora. Podobny wpływ jonów zaobserwowano w przypadku α -D-glukozylotransferazy maltozy z *Enterobacter hormaechei*. Jest ona silnie inhibowana pod wpływem działania Hg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} natomiast jony Ca^{2+} i Mg^{2+} nie powodują zmian aktywności enzymu (Yue i in., 2009).

Jony metali związane zazwyczaj koordynacyjnie są w przypadku niektórych enzymów niezbędne do przebiegu katalizowanej reakcji i ich usunięcie wywołuje inaktywację biokatalizatora. Wprowadzenie do środowiska reakcji kwasu etylenodiaminotetraoctowego (EDTA), posiadającego zdolność chelatowania jonów metali, wskazuje że mogą one odgrywać pewną rolę w stabilizowaniu struktury badanego enzymu (Tabela 9). Syntazy trehalozy z *Thermus aquaticus* i *Corynebacterium glutamicum* pod wpływem działania EDTA wykazują zmniejszoną aktywność odpowiednio o 12% i 31,5% (Nishimoto i in., 1996; Tae-Kyun i in., 2010).

Tabela 8. Wpływ niektórych kationów na aktywność α -D-glukozylotransferazy maltozy z *Deinococcus radiodurans*.

Kation	Aktywność względna [%] przy stężeniu jonów		
	1 mM	5 mM	10 mM
Kontrola	100 ± 0,1 ^G	100 ± 0,1	100 ± 0,1
Cu^{2+}	1,5 ± 1,2 ^{A, a}	1,5 ± 0,4 ^a	0 ^a
Al^{3+}	1,5 ± 0,3 ^{A, a}	1,5 ± 0,2 ^a	1,4 ± 0,4 ^a
Ni^{2+}	71,5 ± 0,9 ^{B, c}	64,8 ± 0,6 ^b	55,3 ± 0,2 ^a
Ca^{2+}	90,5 ± 0,6 ^{F, b}	88,8 ± 0,1 ^{ab}	86,6 ± 0,6 ^a
Co^{2+}	82,8 ± 0,4 ^{E, c}	79,5 ± 0,4 ^b	74,3 ± 0,1 ^a
Zn^{2+}	1,1 ± 0,1 ^{A, a}	0 ^a	0 ^a
Mg^{2+}	91,4 ± 0,2 ^{F, a}	91,9 ± 0,4 ^a	91,5 ± 0,3 ^a
Ba^{2+}	78,7 ± 1,0 ^{C, b}	75,1 ± 0,1 ^{ab}	73,0 ± 0,4 ^a
Hg^{2+}	0 ^{A, a}	0 ^a	0 ^a
Mn^{2+}	80,7 ± 0,7 ^{D, c}	75,7 ± 0,1 ^b	70,7 ± 0,1 ^a
Fe^{3+}	0 ^{A, a}	0 ^a	0 ^a

Różne indeksy w kolumnie (A-G) i wierszach (a-c) oznaczają różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$). Przedstawione wyniki są średnią z 3 oznaczeń ± odchylenia standardowe.

9.1.4 Oddziaływanie niektórych substancji

Inhibitorami reakcji enzymatycznej, które poprzez oddziaływanie z enzymem mogą powodować spowolnienie lub całkowite zatrzymanie katalizy, mogą być małe cząsteczki lub

jony. Istnieje wiele rodzajów inhibitorów, w tym niespecyficzne, nieodwracalne oraz odwracalne, a wśród nich kompetycyjne lub niekompetycyjne. Zdefiniowanie profilu działania specyficznych inhibitorów na enzym jest pomocne przy określaniu budowy cząsteczki m.in. do wyznaczenia reszt aminokwasowych uczestniczących w katalizowaniu reakcji. Dotychczasowe badania wykazały, że aktywność α -D-glukozylotransferazy maltozy zupełnie zanika już przy 1 mM stężeniu Hg^{2+} w środowisku reakcji. Sugeruje to, że przyczyną inaktywacji preparatu może być katalizowana przez ten jon oksydacja grup tiolowych istotnych dla aktywności enzymu. Potwierdzeniem tego wniosku jest silne oddziaływanie inhibujące, wynoszące 98,1%, wywierane przez kwas 4-chlorortęciowobenzoesowy (PCMB) (Tabela 9).

Tabela 9. Wpływ niektórych związków na aktywność α -D-glukozylotransferazy maltozy z *Deinococcus radiodurans*.

Związek	Stężenie	Aktywność względna [%]
Kontrola	-	100 ± 0,3
EDTA	1 mM	85,1 ± 0,2
	5 mM	76,1 ± 0,1
	10 mM	64,5 ± 0,7
Triton X-100	5 mM	92,5 ± 0,3
	10 mM	92,2 ± 0,4
Tween 80	5 mM	99,5 ± 0,1
	10 mM	93,4 ± 0,1
DTT	5 mM	91,1 ± 0,6
	10 mM	88,3 ± 0,2
2-merkaptoetanol	5 mM	92,3 ± 0,3
	10 mM	92,0 ± 0,1
SDS	5 mM	4,9 ± 0,6
	10 mM	3,2 ± 0,7
Mocznik	50 mM	97,1 ± 0,1
	1 M	89,7 ± 0,1
	4 M	68,21 ± 0,4
Tris	5 mM	42,2 ± 0,7
	10 mM	21,7 ± 0,9
Pepstatyna	5 mM	0
Kwas jodooctowy	5 mM	0
pCMB	5 mM	1,9 ± 1,1
PMSF	5 mM	0,2 ± 0,9

Przedstawione wyniki są średnią z 3 oznaczeń ± odchylenia standardowe.

Zaobserwowano także całkowitą dezaktywację pod wpływem inhibitora tiolowego, jakim jest kwas jodooctowy, co świadczyć może o udziale reszt cysteinowych w utrzymaniu struktury centrum katalitycznego enzymu.

Zanik aktywności spowodowany pepstatyną, która jest specyficznym inhibitorem grup aspartylowych, wskazywać może na ich istotną rolę w budowie enzymu. Można to tłumaczyć np. uczestnictwem reszt aminokwasowych w miejscu wiążącym substrat.

Minimalne oddziaływanie ditiotreitolu (DTT) oraz 2-merkaptoetanolu sugeruje, że mostki disulfidowe wpływające na IV rzędową konformację białka nie zmieniają działania centrum aktywnego i ich redukcja nie wpływa na aktywność katalityczną transferazy (Tabela 9). Brak oddziaływania ze strony DTT zaobserwowano w przypadku syntazy trehalozy z *Thermus aquaticus* oraz *Thermus thermophilus* (Nishimoto i in., 1996, Wang i in., 2007).

α -D-glukozylotransferaza maltozy wykazuje zróżnicowaną odporność na zwiększające się stężenie substancji denaturujących białka, takich jak mocznik i SDS. W niskich zakresach stężeń mocznika (50 mM – 1M) odnotowano niewielkie zmiany aktywności enzymu. Dopiero zwiększenie stężenia do 4M powodowało znaczący spadek zdolności katalitycznych, wynoszący 32%. W przypadku SDS zaobserwowano całkowity zanik aktywności. Niejonowe detergenty Triton X-100 oraz Tween 80 nie wpływają istotnie na działanie transferazy i powodują niewielkie, wynoszące kilka procent obniżenie aktywności.

Tabela 10. Wpływ niektórych rozpuszczalników na aktywność α -D-glukozylotransferazy maltozy z *Deinococcus radiodurans*.

Rozpuszczalnik organiczny	Stężenie [%]	Aktywność względna [%]
Kontrola	-	100 ± 0,3
Etanol	25	80,2 ± 0,9
Metanol	25	80,0 ± 0,6
Izopropanol	25	91,4 ± 0,1
Aceton	25	97,87 ± 1,0
DMSO	25	87,3 ± 0,8

Przedstawione wyniki są średnią z 3 oznaczeń ± odchylenia standardowe.

Odnotowano, że Tris, stanowiący składnik buforów szeroko stosowanych w biochemii i biologii molekularnej, hamuje działanie niektórych enzymów w tym syntazy trehalozy z *Thermus aquaticus* i *Thermus thermophilus* (Nishimoto i in., 1996, Wang i in., 2007). Podobnie jest w przypadku α -D-glukozylotransferazy maltozy z *Deinococcus radiodurans*. W przypadku 10 mM stężenia Trisu w środowisku reakcji spadek aktywności wynosił prawie 80%, dlatego podczas oczyszczania białka za pomocą IMAC zrezygnowano z buforu zawierającego Tris.

Zarówno syntaza trehalozy pochodząca z *T. caldophilus*, jak i transferaza z *Deinococcus radiodurans* katalizuje odwracalną reakcję konwersji maltozy do trehalozy uwalniając z obydwu substratów niewielką ilość glukozy. Związane jest to ze stosunkowo

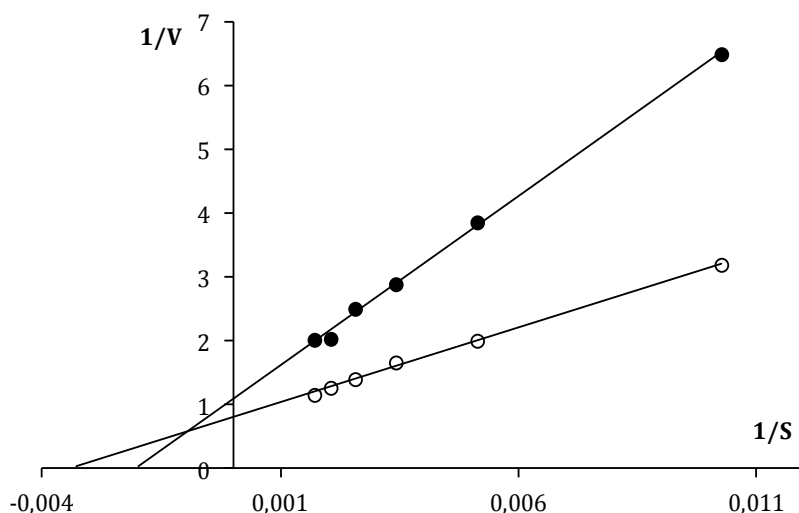
niską aktywnością hydrolityczną, która towarzyszy aktywności transglikozylacyjnej enzymu (Koh i in., 1998). Zastosowanie rozpuszczalników organicznych jako środowiska reakcji powinno zatem zniwelować powstawanie produktu ubocznego. Niestety odnotowuje się lekki spadek całkowitej aktywności enzymu, który w przypadku etanolu i metanolu wynosi 20% (Tabela 10). Dimetylosulfotlenek i izopropanol obniżają aktywność odpowiednio o 12,7% i 8,6%.

9.1.5 Specyficzność działania

Wyznaczenie wartości parametrów kinetycznych, charakteryzujących reakcję enzymatyczną, ma duże znaczenie w badaniach własności biokatalizatorów. Stopień wysycenia enzymu substratem wpływa na wydajność reakcji. Przy małych stężeniach substratu niektóre cząsteczki enzymu nie tworzą kompleksu z substratem, co powoduje, że enzym nie wykazuje swojej maksymalnej aktywności katalitycznej. Maksymalną szybkość reakcji osiąga dopiero przy wyższym stężeniu substratu, kiedy wszystkie cząsteczki enzymu będą tworzyć kompleks enzym–substrat. Całkowite wysycenie enzymu substratem powoduje, że dalsze zwiększanie stężenia substratu nie może już wpłynąć na zwiększenie szybkości biokatalizy.

Wyznaczenie zależności szybkości konwersji substratu od stężenia maltozy i trehalozy pozwoliło na obliczenie stałej Michaelisa (K_m) oraz szybkości maksymalnej (V_{max}). Oba parametry wyznaczono graficznie na podstawie wykresu Lineweavera-Burka, określającego zależność odwrotności szybkości reakcji od odwrotności stężenia substratu (Rys. 15). Stała Michaelisa określa powinowactwo enzymu do substratu i jest równa stężeniu substratu, przy którym szybkość katalizowanej reakcji odpowiada połowie szybkości maksymalnej. Niewielka stała Michaelisa, która dla większości enzymów mieści się w zakresie od 10^{-1} do 10^{-7} M świadczy o dobrym powinowactwie badanego enzymu względem danego substratu.

W przypadku reakcji konwersji maltozy katalizowanej α -D-glukozylotransferazą maltozy z *Deinococcus radiodurans* wartość V_{max} wynosi 1,236 $\mu\text{mol}/\text{min}$, a stałej Michaelisa K_m 290,70 mM. Stałe kinetyczne wyznaczone dla reakcji konwersji trehalozy wynoszą odpowiednio $V_{max}=0,917$ $\mu\text{mol}/\text{min}$ oraz $K_m=486,14$ mM. Pozostałe parametry kinetyczne reakcji przedstawiono w tabeli 11.



Rys. 15. Wyznaczenie wartości K_m (mM) oraz V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}$) dla reakcji konwersji maltozy (○) oraz trehalozy (●) katalizowanej α -D-glukozylotransferazą maltozy z *Deinococcus radiodurans*. Wynik jest średnią z 3 oznaczeń \pm odchylenie standardowe.

Wartości stałych Michaelisa dla konwersji maltozy, jak i reakcji odwrotnej są dość wysokie w porównaniu do syntaz trehalozy z innych źródeł. W przypadku natywnego enzymu z *Thermus aquaticus* wartość stałej szybkości reakcji wynosi odpowiednio dla konwersji maltozy $K_m=34,5$ mM, a dla konwersji trehalozy $K_m=158$ mM (Nishimoto i in., 1997). Tak znaczna różnica w powinowactwie enzymu do substratu może wynikać z faktu, iż charakteryzowana rekombinantowa transferaza posiada domenę polihistydynową, która może wpływać na właściwości białka.

Tabela 11. Stałe kinetyczne reakcji konwersji katalizowanej przez α -D-glukozylotransferazę maltozy z *Deinococcus radiodurans*.

Reakcja konwersji maltozy	$K_m=290,70$ mM	$V_{max}=1,236$ $\mu\text{mol}/\text{min}$	$k_{cat}=23,6$ 1/s	$k_{cat}/K_m=0,08118$ 1/s·mM	$U_{spec.}=11,348$ $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$
Reakcja konwersji trehalozy	$K_m=486,14$ mM	$V_{max}=0,917$ $\mu\text{mol}/\text{min}$	$k_{cat}=17,5$ 1/s	$k_{cat}/K_m=0,036$ 1/s·mM	$U_{spec.}=8,42$ $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$

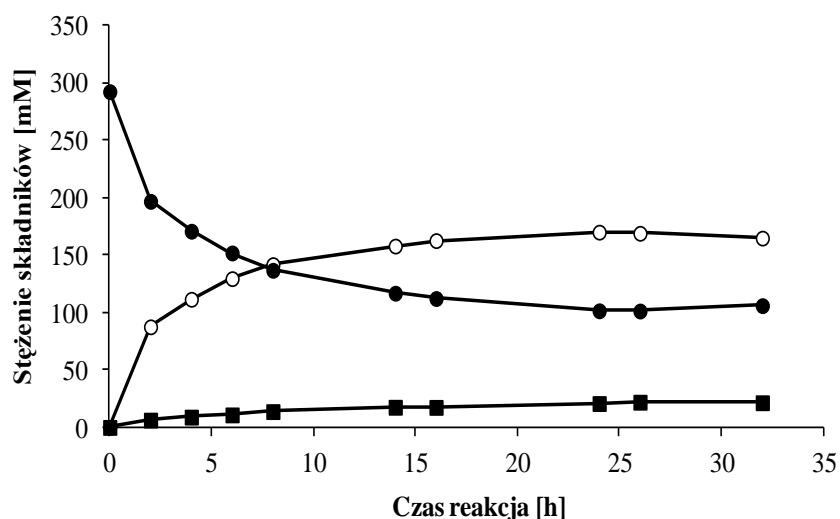
Wydajność katalityczna (k_{cat}/K_m) α -D-glukozylotransferazy maltozy z *Deinococcus radiodurans* jest ponad dwukrotnie wyższa dla reakcji konwersji maltozy niż konwersji trehalozy. Wskazuje to, że jako substrat reakcji preferowana jest maltoza.

Podczas oczyszczania enzymu jeden z etapów stanowiła inkubacja cieplna, mająca na celu częściowe usunięcie białek balastowych gospodarza. Pomiaru stałych katalitycznych reakcji dokonano również dla preparatu oczyszczonego metodą chromatografii metalopowinowactwa nie poddawanego uprzednio denaturacji termicznej. W tym przypadku

dla reakcji konwersji maltozy stała Michaelisa wynosiła 452,69 mM, natomiast dla konwersji trehalozy 848,54 mM, przy czym stosunek wydajności katalitycznej $[(k_{cat}/K_m)_{maltoza}/(k_{cat}/K_m)_{trehaloza}]$ pozostał ten sam. Inkubacja przez 10 minut w 56°C spowodowała korzystne zmiany strukturalne enzymu, które poprawiły jego wydajność katalityczną. Delikatna denaturacja spowodowała najprawdopodobniej prawidłowe zwinięcie się białka i przyjęcie konstrykcji przypominającej natywną. Zwiększenie aktywności enzymatycznej o 40% w wyniku denaturacji cieplnej (30 min., 80°C) odnotowano również w przypadku rekombinantowej islandisyny (termostabilna subtylizyna z *Fervidobacterium islandicum*). Klonowanie i ekspresję genu islandisyny prowadzono w komórkach *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS (Gödde i in., 2005).

9.1.6 Stopień konwersji w czasie

Z przemysłowego punktu widzenia, proces technologiczny musi być ekonomiczny i wydajny. Sprowadza się to w przypadku konwersji maltozy z użyciem α -D-glukozylotransferazy maltozy do określenia optymalnych parametrów i czasu reakcji konwersji. Prowadzone badania pozwoliły ustalić, że stopień konwersji maltozy rośnie w czasie i osiąga po 24 godzinach maksymalną wartość równą 58% (Rys.16). Dalsze prowadzenie reakcji nie wpływa na zwiększenie ilości powstałego produktu, ze względu na ustalenie się stanu równowagi. Zapewne ciągle odbieranie produktu reakcji zwiększyłoby wydajność konwersji maltozy.



Rys. 16. Wpływ czasu reakcji konwersji maltozy (●) katalizowanej α -D-glukozylotransferazą maltozy z *Deinococcus radiodurans* na ilość powstającej trehalozy (○) i glukozy (■). Wynik jest średnią z 3 oznaczeń \pm odchylenie standardowe.

α -D-glukozylotransferaza maltozy katalizuje odwracalną reakcję konwersji maltozy do trehalozy uwalniając z obydwu substratów niewielką ilość glukozy. Przyczyną tego jest nieznaczna aktywność hydrolityczna, którą zaobserwowano u prawie wszystkich zbadanych dotychczas syntaz trehalozy i zależy ona między innymi od pochodzenia enzymu oraz temperatury reakcji (Koh i in., 1998).

Wraz ze wzrostem temperatury reakcji ilość glukozy wzrasta (Tabela 12), a ilość otrzymywanej trehalozy maleje. Przykładowo, dla syntazy trehalozy z *T. aquaticus* w temperaturze 60°C wydajność konwersji wynosi 81%, zaś w temperaturze 80°C – 71%. Związane jest to z tym, że aktywność hydrolityczna syntaz trehalozy wzrasta wraz z temperaturą (Koh i in., 1998; Nishimoto i in., 1996). Zaletą α -D-glukozylotransferazy maltozy z *Deinococcus radiodurans* jest jej niska temperatura działania, która nie powoduje powstawania zwiększonej ilości glukozy jako produktu ubocznego.

Tabela 12 Wpływ temperatury konwersji katalizowanej przez α -D-glukozylotransferazę maltozy z *Deinococcus radiodurans* na ilość wytwarzanej glukozy.

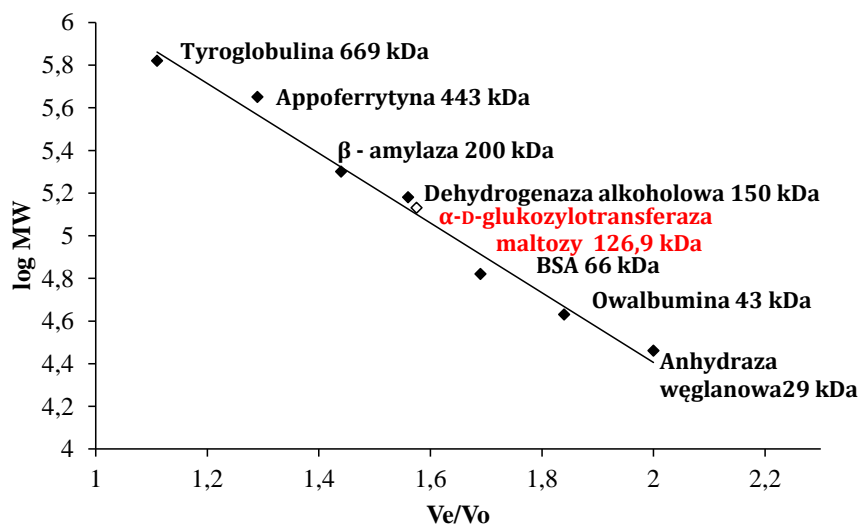
Temperatura [°C]	Stężenie glukozy [mM]
0	0
5	1,9 ± 0,1
10	2,2 ± 0,03
15	2,6 ± 0,04
20	4,2 ± 0,1
25	6,2 ± 0,2
30	6,9 ± 0,2
35	9,0 ± 0,2
40	13,0 ± 0,2
45	15,8 ± 0,9
50	8,4 ± 0,3
55	0

Przedstawione wyniki są średnią z 3 oznaczeń ± odchylenia standardowe.

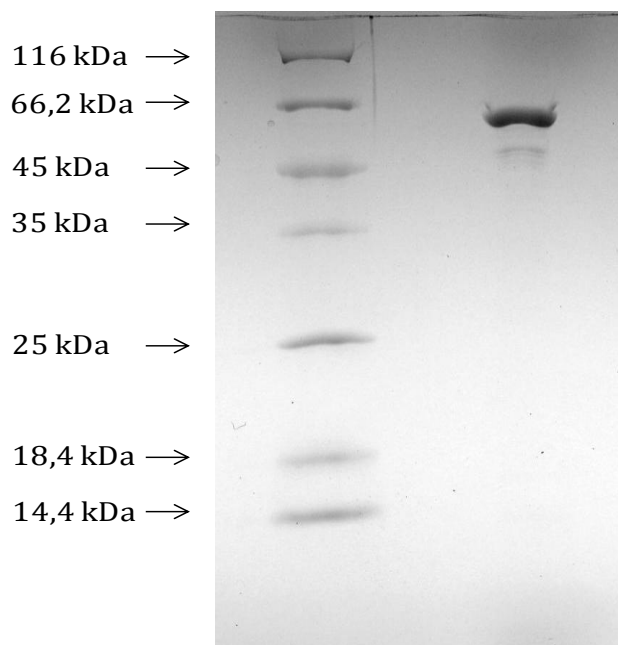
9.1.7 Masa cząsteczkowa

Stosując technikę sączenia molekularnego wyznaczono masę cząsteczkową α -D-glukozylotransferazy maltozy (126,9 kDa), na podstawie krzywej względnej objętości retencji białek (Rys.17). Natomiast wyznaczona metodą SDS-PAGE masa cząsteczkowa białka wynosi w przybliżeniu 64 kDa, co wskazuje, że enzym ma budowę homodimeru (Rys. 18). Jedyne doniesienia na temat tworzenia przez syntazy trehalozy struktur merycznych, jest informacja, że enzym pochodzący z *Pimelobacter* sp. R48 złożony jest z czterech

identycznych podjednostek (Oghuchi i in., 1997), natomiast enzym pochodzący z *Mycobacterium smegmatis* przyjmuje strukturę heksamery (Pan i in., 2004)



Rys. 17. Wyznaczenie masy cząsteczkowej α -D-glukozylotransferazy maltozy techniką sączenia molekularnego.



Rys. 18. Rozdział elektroforetyczny w żelu poliakrylamidowym przedstawiający wyniki oczyszczania ekstraktu bezkomórkowego z *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS + *DraSTpET30His*.

9.2 Charakterystyka proteaz z *Meiothermus ruber* i *Deinococcus geothermalis*

9.2.1 Hodowla bakterii *Deinococcus geothermalis* i *Meiothermus ruber*

Deinococcus geothermalis należy do umiarkowanych termofili i rozwija się w zakresie temperatur 40-55°C, przy czym najlepszy wzrost następuje w 45°C. Z kolei *Meiothermus ruber* najlepiej rośnie w przedziale 50-65°C osiągając optimum wzrostu w 55°C. W obu przypadkach jest to stosunkowo niewysoka temperatura w porównaniu z bakteriami z rodzaju *Sulfolobus* i innymi mikroorganizmami rozwijającymi się w 80-100°C, a nawet wyższych (Horneck i Baumstark-Khan, 2001). W konsekwencji obniża to znacznie nakłady inwestycyjne, które należy ponieść podczas namnażania biomasy. Dodatkową zaletą wymienionych drobnoustrojów są niezbyt duże wymagania pokarmowe. Podłoża zawierające ekstrakt drożdżowy, pepton K i/lub sól morską czy skrobię, są nieskomplikowane i tanie. Również pH pożywek dla wyżej wymienionych mikroorganizmów wynoszące odpowiednio 7,2 i 8 nie utrudnia prowadzenia hodowli tych mikroorganizmów, w przeciwieństwie do niektórych ekstremofili, takich jak *Natranaerobius thermophilus*, który rozwija się najlepiej w 53°C, przy pH 9,5 i wysokim stężeniu soli mieszczącym się w zakresie 3,3-3,9 M Na⁺ (Mesbah i in., 2007) lub *Thermoplasma acidophilus* bytujący w środowisku o pH 1-2 (Schlegel, 2000). *Deinococcus geothermalis* i *Meiothermus ruber* podczas wzrostu nie produkują szkodliwych metabolitów, które mogłyby utrudniać proces hodowli w skali przemysłowej. Przykładem drobnoustrojów produkujących tego typu metabolity są bakterie z rodzaju *Acidithiobacillus* produkujące kwas siarkowy lub *Desulfomonas* wytwarzające siarkowodór (Szałek A., 2009).

W optymalnym czasie hodowli osiągana jest zadowalająca wydajność mokrej biomasy zarówno w przypadku *Deinococcus geothermalis*, jak i *Meiothermus ruber* (Tabela 13). Przeprowadzone badania wykazały zwiększoną aktywność zewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych obu bakterii, w porównaniu z ich ekstraktami bezkomórkowymi. Podwyższona aktywność cieczy pohodowlanej wskazuje na dość duże stężenie enzymów proteolitycznych, co z perspektywy pozyskiwania nowych źródeł biokatalizatorów jest bardzo korzystne. Główną zaletą jest wyeliminowanie konieczności oddzielenia enzymów od wielu innych białek pozostających w strukturach komórki. Tym samym procedura oczyszczania jest uproszczona i sprowadza się do usunięcia niewykorzystanych składników podłoża i ewentualnie innych enzymów pozakomórkowych. Biokatalizatory pozakomórkowe są zazwyczaj bardziej stabilne od tych zatrzymywanych we wnętrzu komórki (Synowiecki i in.,

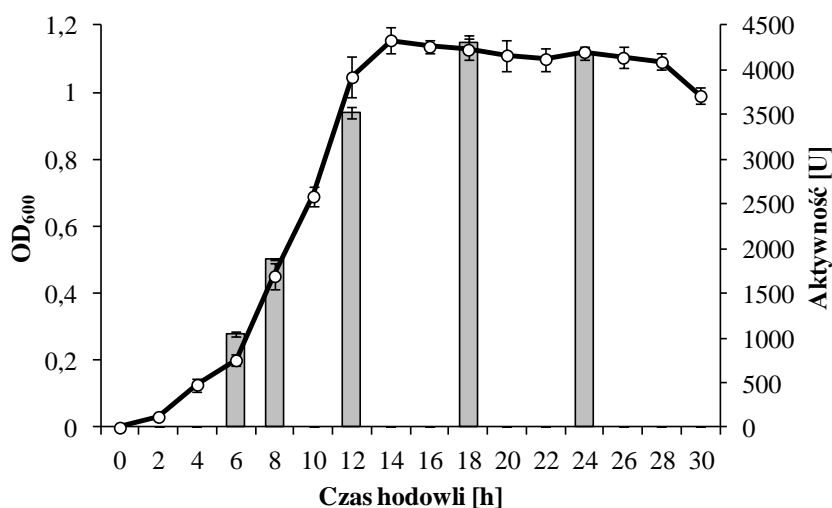
2007). Stosunkowo mało poznane bakterie *Deinococcus geothermalis* oraz *Meiothermus ruber* mogą stanowić alternatywę dla pozyskiwanych już przemysłowo enzymów proteolitycznych.

Tabela 13. Wydajność mokrej biomasy *Deinococcus geothermalis* i *Meiothermus ruber*.

Nr serii	Wydajność mokrej biomasy (g/L podłoża hodowli <i>D. geothermalis</i>)	Wartość średnia	Wydajność mokrej biomasy (g/L podłoża hodowli <i>M. ruber</i>)	Wartość średnia
1	3,389	3,249 ± 0,22	3,160	3,381 ± 0,15
	2,951		3,470	
	3,215		3,495	
	3,44		3,400	
2	2,865	3,078 ± 0,29	3,530	3,449 ± 0,07
	3,26		3,360	
	3,34		3,3485	
	2,845		3,420	
3	3,409	3,366 ± 0,16	3,480	3,250 ± 0,36
	3,501		3,230	
	3,415		2,750	
	3,14		3,540	

Wyniki są średnią 4 oznaczeń ± odchylenie standardowe.

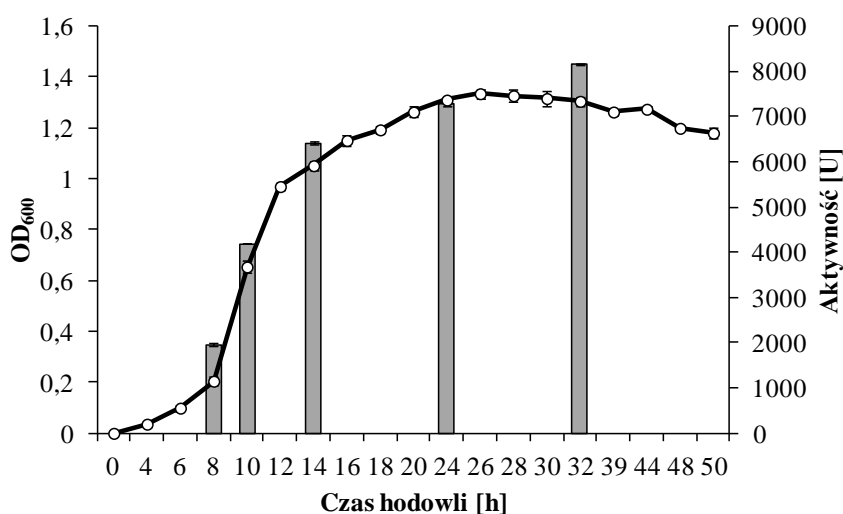
W celu intensyfikacji pozyskiwania enzymu należy określić, w której fazie wzrostu bakterii wydzielane są pożądane przez nas biokatalizatory. Ilość wytwarzanego enzymu jest często skorelowana z przyrostem biomasy komórek i pozostaje niezmienną lub maleje po zakończeniu fazy wykładniczego wzrostu.



Rys. 19. Zależność zmętnienia podłoża (OD₆₀₀) (○) i zmian aktywności zewnątrzkomórkowych proteaz od czasu hodowli *Deinococcus geothermalis*. Wyniki są średnią 3 oznaczeń ± odchylenie standardowe.

Deinococcus geothermalis charakteryzuje się dobrą szybkością rozwoju, a czas trwania fazy jego logarytmicznego wzrostu wynosi 14-16 godzin, podczas której OD_{600} wzrasta do wartości 1,2 (Rys.19). Aktywność proteolityczna jest wysoce skorelowana ($r=0,981$) z gęstością optyczną zawiesiny komórek co wskazuje, że produkcja proteaz zależy od przyrostu biomasy. Całkowita aktywność proteolityczna hodowli prowadzonej na podłożu standardowym osiągnęła wartość 4305,5 U/L po 18 godzinach, utrzymując się na podobnym poziomie, nieznacznie zmalała i wynosiła 4183,3 U/L po 24 godzinach.

Czas trwania fazy logarytmicznego wzrostu *Meiothermus ruber* jest dłuższy i wynosi 18-24 godziny. W tym okresie gęstość optyczna hodowli wzrasta do wartości $OD_{600}=1,35$. Całkowita aktywność proteolityczna hodowli *M. ruber* prowadzona na podłożu standardowym osiągnęła wartość maksymalną (8166,5 U/L) w czasie 32 godzin i podobnie jak w przypadku *D. geothermalis* jest wysoce skorelowana ($r=0,991$) z gęstością optyczną komórek (Rys. 20).



Rys. 20. Zależność zmętnienia podłoża (OD_{600}) (o) i zmian aktywności zewnątrzkomórkowych proteaz od czasu hodowli *Meiothermus ruber*. Wyniki są średnią 3 oznaczeń \pm odchylenie standardowe.

9.2.2 Wpływ warunków hodowli na wydajność protez

Podczas kultury *Deinococcus geothermalis* na podłożu standardowym największą wydajność biomasy uzyskuje się hodując mikroorganizm w 45°C i w tych warunkach odnotowuje się także najwyższą aktywność proteolityczną wynoszącą 5461,1 U/L podłoża (Tabela 14).

W temperaturach 35°C i 40°C aktywność enzymatyczna cieczy pochodzącej nie spada poniżej 75% aktywności maksymalnej co wskazuje na możliwość hodowli drobnoustroju w niższych temperaturach bez większych strat wydajności enzymu.

Tabela 14. Wpływ temperatury podłoża na wydajność hodowli i aktywność zewnątrzkomórkowych proteaz z *Deinococcus geothermalis*.

Temperatura podłoża [°C]	Ilość biomasy z 1L hodowli [g]	Aktywność ogólna [U/L]
30	1,05 ± 0,13	1656,2 ± 41,2
35	2,65 ± 0,25	4144,0 ± 66,7
40	3,20 ± 0,19	5158,4 ± 120,3
45	3,45 ± 0,09	5461,1 ± 55,1
50	2,74 ± 0,23	4219,3 ± 39,6
55	0,49 ± 0,11	915,9 ± 15,4
60	0	0

Przedstawione wyniki są średnią z 3 oznaczeń ± odchylenia standardowe.

Największą wydajność biomasy *Deinococcus geothermalis* uzyskuje się na podłożu standardowym w zakresie pH od 6 do 8 przy czym maksymalną wydajność produkcji zewnątrzkomórkowych proteaz odnotowuje się przy pH 8 (Tabela 15). Zwiększenie pH medium do około 9 powoduje gwałtowne zahamowanie wzrostu komórek.

Tabela 15. Wpływ pH podłoża na wydajność hodowli i aktywność zewnątrzkomórkowych proteaz z *Deinococcus geothermalis*.

pH podłoża	Ilość biomasy z 1L hodowli [g]	Aktywność ogólna [U/L]
4	0,44 ± 0,10	607,5 ± 11,5
5	2,39 ± 0,20	3196,1 ± 24,2
6	3,54 ± 0,08	4877,8 ± 34,7
7	3,83 ± 0,7	5084 ± 22,3
8	3,95 ± 0,13	5284,8 ± 102
9	0,35 ± 0,09	453,2 ± 9,8
10	0,21 ± 0,10	267,1 ± 4,1
11	0	0

Przedstawione wyniki są średnią z 3 oznaczeń ± odchylenia standardowe.

W temperaturze optymalnego wzrostu (55°C) odnotowano największy przyrost komórek *Meiothermus ruber*, a co za tym idzie najwyższą aktywność proteolityczną wynoszącą 8813,6 U/L podłoża (Tabela 16). Zadowolającą aktywność enzymatyczną wykazują też preparaty cieczy pochodzącej uzyskane z hodowli w temperaturze 45 i 50°C, co jest ważne z energetycznego punktu widzenia.

Tabela 16. Wpływ temperatury podłoża na wydajność hodowli i aktywność zewnątrzkomórkowych proteaz z *Meiothermus ruber*.

Temperatura podłoża [°C]	Ilość biomasy z 1L hodowli [g]	Aktywność ogólna [U/L]
40	1,72 ± 0,10	4238,2 ± 23,9
45	2,94 ± 0,07	6944,4 ± 66,3
50	3,43 ± 0,19	8423,7 ± 52,1
55	3,69 ± 0,11	8813,6 ± 35,8
60	2,48 ± 0,06	5867,3 ± 11,2
65	0,85 ± 0,28	1984,5 ± 7,2

Przedstawione wyniki są średnią z 3 oznaczeń ± odchylenia standardowe.

Satysfakcjonującą wydajność biomasy *M. ruber* uzyskuje się na podłożu standardowym w szerokim zakresie pH od 6 do 9, przy czym maksymalną wydajność produkcji zewnątrzkomórkowych proteaz odnotowuje się przy pH 8, podobnie jak w hodowli *D. geothermalis* (Tabela 17). Obniżenie lub zwiększenie pH medium poza zakres 6-9 powoduje gwałtowne zahamowanie wzrostu komórek.

Tabela 17. Wpływ pH podłoża na wydajność hodowli i aktywność zewnątrzkomórkowych proteaz z *Meiothermus ruber*.

pH podłoża	Ilość biomasy z 1L hodowli [g]	Aktywność ogólna [U/L]
4	0	0
5	0,25 ± 0,07	700,8 ± 4,5
6	2,89 ± 0,18	6885,2 ± 19,4
7	3,27 ± 0,08	8115,9 ± 56,3
8	3,52 ± 0,12	8721,2 ± 47,2
9	3,19 ± 0,02	7418,6 ± 33,8
10	0,56 ± 0,06	1557,4 ± 10,7
11	0	0

Przedstawione wyniki są średnią z 3 oznaczeń ± odchylenia standardowe

Podczas prowadzonych prac zbadano wpływ źródła węgla i azotu na produktywność enzymu uzyskiwaną z jednego litra hodowli (Tabela 18). Maksymalną wydajność produkcji proteaz z *D. geothermalis* zaobserwowano prowadząc hodowlę na podłożach zawierających kolejno ekstrakt drożdżowy (4077,8 U/L), ekstrakt wołowy (2800 U/L) oraz pepton K (2355,6 U/L). Analogiczną sytuację zauważono przy hodowli *M. ruber* gdzie odnotowane aktywności wynosiły odpowiednio 10455,6 U/L (ekstrakt wołowy), 9011,1 U/L (ekstrakt drożdżowy) oraz 3166,6 U/L (pepton K). Związki te stanowią zbilansowane źródło węgla, azotu oraz substancji mineralnych i mogą stanowić jedyny składnik podłoża zdatnego do namnażania biomasy i produkcji biokatalizatora.

Tabela 18. Wpływ podłoża na produkcję zewnątrzkomórkowych proteaz z *Deinococcus geothermalis* i *Meiothermus ruber*.

Podłoże	Ilość biomasy z 1L hodowli <i>D. geothermalis</i>	Aktywność ogólna cieczy pohodowlanej z <i>D. geothermalis</i> [U/L]	Ilość biomasy z 1L hodowli <i>M. ruber</i>	Aktywność ogólna cieczy pohodowlanej z <i>M. ruber</i> [U/L]
Standardowe	3,50 ± 0,10 ^f	3661,1 ± 38,5 ^b	3,34 ± 0,40 ^f	8011,1 ± 200,9 ^e
Ekstrakt wołowy	3,51 ± 0,20 ^f	2800,0 ± 76,4 ^g	4,85 ± 0,03 ^g	10455,6 ± 38,5 ^f
Pepton K	2,74 ± 0,09 ^d	2355,6 ± 50,9 ^f	1,64 ± 0,01 ^e	3166,6 ± 57,7 ^d
Ekstrakt drożdżowy	3,12 ± 0,04 ^e	4077,8 ± 113,4 ⁱ	4,70 ± 0,80 ^g	9011,1 ± 50,9 ^e
Mocznik	0,10 ± 0,01 ^a	55,6 ± 9,6 ^a	0,11 ± 0,02 ^a	177,8 ± 19,2 ^a
NH ₄ NO ₃	0,18 ± 0,01 ^a	88,9 ± 9,6 ^a	0,13 ± 0,01 ^a	188,9 ± 50,9 ^a
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,26 ± 0,11 ^a	50,0 ± 0,0 ^a	0,14 ± 0,13 ^a	233,3 ± 33,3 ^a
Glukoza	0,48 ± 0,03 ^b	438,9 ± 25,5 ^b	0,24 ± 0,04 ^b	255,6 ± 19,2 ^b
Maltoza	0,56 ± 0,04 ^b	550,0 ± 16,7 ^c	0,61 ± 0,08 ^c	2311,1 ± 19,5 ^c
Trehaloza	0,60 ± 0,06 ^b	527,8 ± 25,5 ^{bc}	0,67 ± 0,12 ^c	2288,9 ± 50,9 ^c
Sacharoza	0,43 ± 0,37 ^b	905,6 ± 9,6 ^d	0,35 ± 0,07 ^b	433,4 ± 33,3 ^b
Skrobia	0,88 ± 0,11 ^c	1138,9 ± 9,6 ^e	0,83 ± 0,26 ^d	3277,8 ± 69,4 ^d

Różne indeksy w kolumnach oznaczają różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$). Przedstawione wyniki są średnią z 3 oznaczeń ± odchylenia standardowe.

W przypadku obu mikroorganizmów dużo niższą aktywność cieczy pohodowlanej zaobserwowano stosując cukry jako główne źródło węgla. Prawie całkowite zahamowanie wzrostu, a tym samym zanik aktywności, odnotowano wykorzystując nieorganiczne związki azotowe jako składniki podłoża hodowlanego. Podobne preferencje pokarmowe prezentuje *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327, u którego produkcja zewnątrzkomórkowych proteaz jest najwyższa na ekstrakcie wołowym, peptonie oraz hydrolizacie sojowym (Zambare i in., 2011).

9.2.3 Otrzymywanie oczyszczonego preparatu

Enzymy proteolityczne są dostępne w handlu najczęściej w postaci surowych, podczyszczonych preparatów. Niemniej jednak oczyszczanie enzymów jest ważne z perspektywy zrozumienia ich funkcjonowania oraz poznania ich właściwości.

Strącanie jest najczęściej używaną metodą wyodrębniania białek z roztworów biologicznych i stanowi jednocześnie etap oczyszczania oraz zateżnienia próbki. Precypitacje przeprowadza się przez obniżenie rozpuszczalności białek w roztworach, zwykle stosując dodatek soli np. (NH₄)₂SO₄ lub rozpuszczalników organicznych, takich jak aceton lub metanol (Kumar i in., 1999).

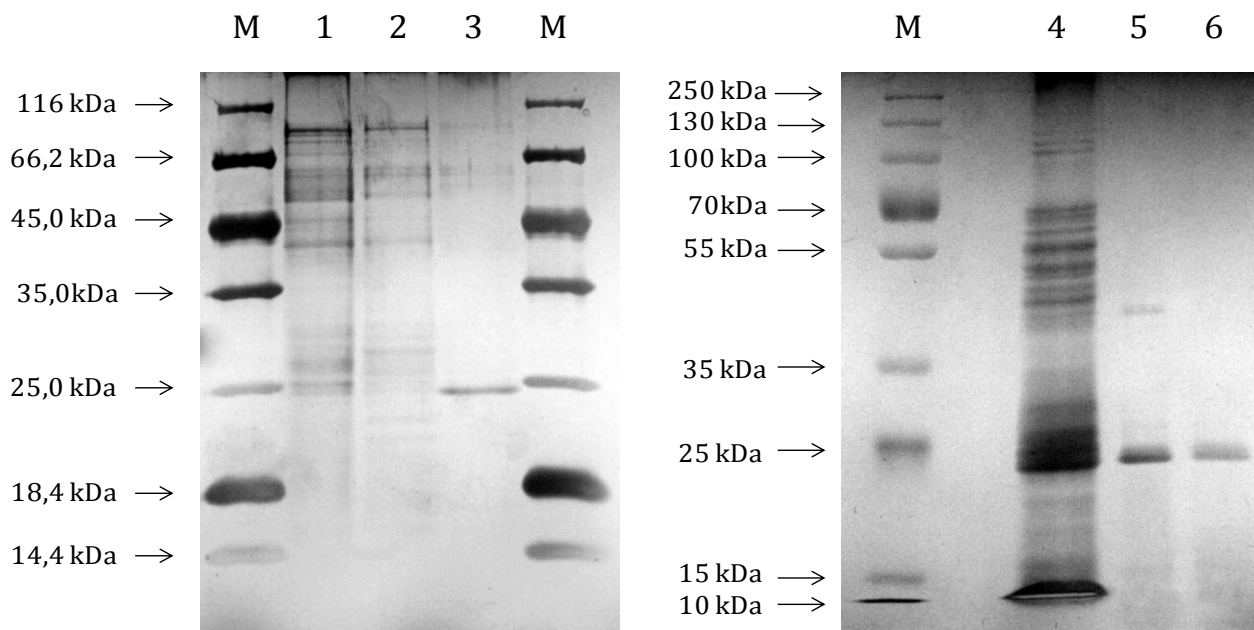
W przypadku proteaz z *Deinococcus geothermalis* strącanie rozpuszczalnikami organicznymi stanowi prosty sposób otrzymywania surowych, sproszkowanych preparatów o stosunkowo niewielkiej czystości. Metanol jako czynnik strącający jest lepszy i nie powoduje głębokiej denaturacji białek co przekłada się na wyższą aktywność enzymatyczną uzyskanego precipitatu. Aktywność specyficzna preparatów uzyskanych poprzez strącenie metanolem i acetonem wynosi odpowiednio 229,7 U/mg i 64 U/mg.

Tabela 19. Strącenie proteaz z *Deinococcus geothermalis*.

Preparat	Całkowite białko [mg]	Aktywność całkowita [U]	Aktywność specyficzna [U/mg]	Odzysk [%]
Ciecz pochodzlana ^a	98,1	4268,4	43,5	100
Aceton	22,4	1433,2	64,0	33,6
Metanol	12,1	2780	229,7	65,1
(NH ₄) ₂ SO ₄				
30 %	30,4	488,8	16,1	11,4
45 %	23,3	1164,4	50,0	27,3
90 %	42,5	2128,8	50,1	49,9

^a Preparat poddany oczyszczaniu pochodził z 1 litra hodowli.

Frakcjonowanie siarczanem amonu pozwoliło na wyodrębnienie, przy 90% nasyceniu (NH₄)₂SO₄, frakcji białek o największej aktywności proteolitycznej (Tabela 19). Aktywność specyficzna roztworu danego precipitatu wynosi 50,1 U/mg. Znaczny stopień oczyszczenia preparatu enzymatycznego został potwierdzony przy pomocy elektroforezy (SDS-PAGE), co wpłynęło na decyzję o wykorzystaniu precipitatu w kolejnym etapie oczyszczania (Rys. 21).



Rys. 21. Rozdział elektroforetyczny w żelu poliakrylamidowym przedstawiający wyniki frakcjonowania i oczyszczania białek cieczy pochodzlanej z *Deinococcus geothermalis*. Próbkki: M- marker, 1- frakcja strącona 30% (NH₄)₂SO₄, 2- frakcja strącona 45% (NH₄)₂SO₄, 3- frakcja strącona 90% (NH₄)₂SO₄, 4- ciecz pochodzlana, 5- frakcja strącona 90% (NH₄)₂SO₄, 6- frakcja strącona 90% (NH₄)₂SO₄ i poddana filtracji żelowej na złożu Sephadex G-100.

Roztwór precipitatu strąconego uprzednio przy 90% nasyceniu siarczanu (VI) amonu nanoszono na kolumnę o wymiarach 2,3 x 45 cm ze złożem Sephadex G-100, zrównoważoną 50 mM buforu fosforanowo-cytrynianowego o pH 7,0 i zbierano frakcje o objętości 4 mL. Przeprowadzona filtracja żelowa umożliwiła prawie 8-krotne oczyszczenie enzymu (Tabela 20) i uzyskanie homogennego preparatu o aktywności 301 U/mg. Skuteczność oczyszczania badanych preparatów potwierdzono elektroforetycznie (Rys. 21).

Tabela 20. Bilans oczyszczania proteaz z *Deinococcus geothermalis*.

Preparat	Całkowite białko [mg]	Aktywność całkowita [U]	Aktywność specyficzna [U/mg]	Odzysk [%]	Stopień oczyszczenia
Ciecz pochodzlana ^a	115,4	4513,8	39,11	100	1
Fracja wytrącona przy 90% nasyceniu (NH ₄) ₂ SO ₄ (w/v)	40,89	1975,0	48,3	43,75	1,23
Filtracja żelowa Sephadex G-100	0,96	289	301,1	6,40	7,7

^a Preparat poddany oczyszczaniu pochodził z 1 litra hodowli.

Proteazy z *Meiothermus ruber* podobnie do tych pozyskiwanych z *D. geothermalis* łatwo można wyodrębnić z cieczy pochodzlanej poprzez strącanie rozpuszczalnikami organicznymi. Metanol również w tej sytuacji okazuje się dużo lepszym czynnikiem strącającym niż aceton. Preparaty uzyskane przez strącenie metanolem i acetonem wykazują aktywność specyficzną równą odpowiednio 67,5 U/mg i 39,1 U/mg.

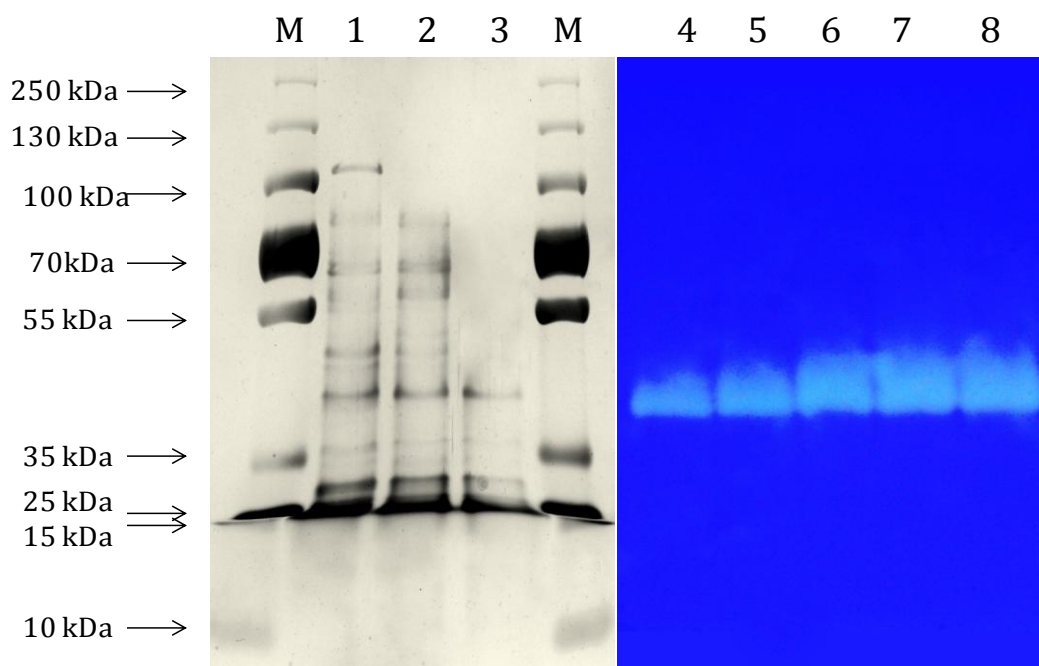
Tabela 21. Strącenie proteaz z *Meiothermus ruber*.

Preparat	Całkowite białko [mg]	Aktywność całkowita [U]	Aktywność specyficzna [U/mg]	Odzysk [%]
Ciecz pochodzlana ^a	297,2	8536,8	28,72	100
Aceton	114,8	4492,2	39,1	52,6
Metanol	62,4	4213,7	67,5	49,4
(NH ₄) ₂ SO ₄				
30 %	122,8	776,2	6,3	9,1
45 %	85,6	1064,4	12,4	12,5
90 %	32,7	1848,8	56,5	21,7

^a Preparat poddany oczyszczaniu pochodził z 1 litra hodowli.

Fracjonowanie siarczanem amonu pozwoliło na wydzielenie, przy 90% nasyceniu (NH₄)₂SO₄, frakcji białek o najwyższej aktywności proteolitycznej (Tabela 21). Niestety frakcja ta pomimo wysokiej aktywności (50,6 U/mg) nie jest preparatem o wysokiej czystości i stanowi najprawdopodobniej preparat kilku białek (Rys. 22). Zastosowanie techniki zymograficznej, polegającej na rozdziale elektroforetycznym w warunkach niedenaturujących, a następnie transferze elektroforetycznym na żel akrylamidowy

zawierający 0,1% żelatyny, pozwoliło na wykazanie, że w danej frakcji białek tylko białko o wielkości ~ 45 kDa wykazuje aktywność proteolityczną (Rys. 22).



Rys. 22. Rozdział elektroforetyczny w żelu poliakrylamidowym przedstawiający wyniki frakcjonowania białek cieczy pochodzącej z *Meiothermus rubers* (zdjęcie po lewej) oraz żelatynowy zymogram dla frakcji białek wysolonych przy 90% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (zdjęcie po prawej). Próbkę: M- marker, 1- frakcja strącona 30% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2- frakcja strącona 45% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3- frakcja strącona 90% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4-8 frakcja białek strąconych przy 90% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ nanoszonych na żel we wzrastającym stężeniu (5-20 μL).

Frakcję białek wysoloną przy 90% nasyceniu siarczanu (VI) a) poddano dalszemu oczyszczaniu poprzez filtrację żelową na złożu Sephadex G-100. Zastosowanie sączenia molekularnego pozwoliło na ponad 12-krotne oczyszczenie enzymu (Tabela 22) i uzyskanie homogenego preparatu o aktywności 351,2 U/mg. Skuteczność oczyszczania badanych preparatów potwierdzono elektroforetycznie (Rys. 23).

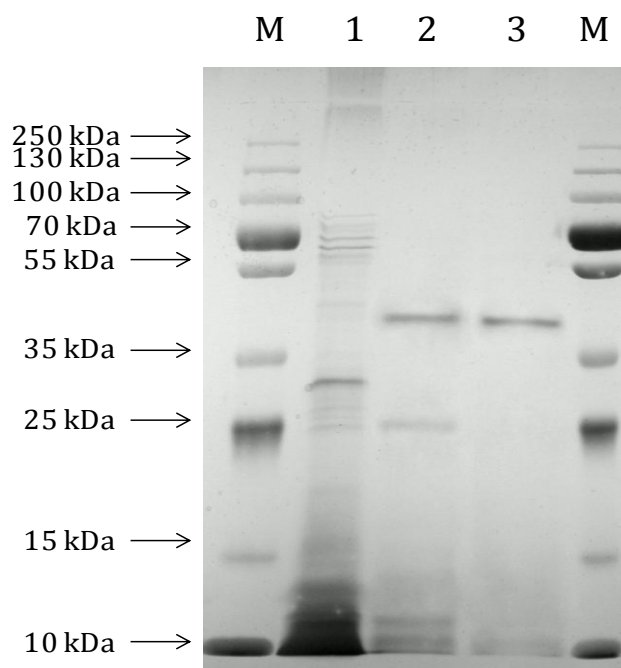
Tabela 22. Bilans oczyszczania proteaz z *Meiothermus ruber*.

Preparat	Całkowite białko [mg]	Aktywność całkowita [U]	Aktywność specyficzna [U/mg]	Odzysk [%]	Stopień oczyszczenia
Ciecz pochodząca ^a	328,7	9111,1	27,71	100	1
Frakcja wytrącona przy 90% nasyceniu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (w/v)	35,2	1783,3	50,6	19,57	1,83
Filtracja żelowa Sephadex G-100	1,2	435,5	351,2	4,78	12,67

^a Preparat poddany oczyszczaniu pochodził z 1 litra hodowli.

Analogicznie w przypadku proteaz z *Bacillus circulans* do uzyskania homogennego preparatu enzymatycznego wystarczył dwustopniowy etap oczyszczania złożony z wysolenia białek cieczy pohodowlanej $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ przy 60% wysyceniu soli i sączenie molekularne na złożu Sephadex G-100. Według Subba Rao i współpracowników (2009) przeprowadzone etapy pozwoliły na 12-krotne oczyszczenie preparatu i uzyskanie enzymu o aktywności specyficznej 9000U/mg.

Zaletą preparatów uzyskanych z *D.geothermalis* i *M. ruber* jest prostota ich pozyskiwania i oczyszczania. Na szczególną uwagę zasługuje preparat enzymatyczny otrzymany z pierwszego mikroorganizmu. W tym przypadku do uzyskania katalizatora o wysokiej czystości niezbędny jest jedynie etap wysolenia siarczanem amonu, który stanowi prostą, tanią i skuteczną metodę.

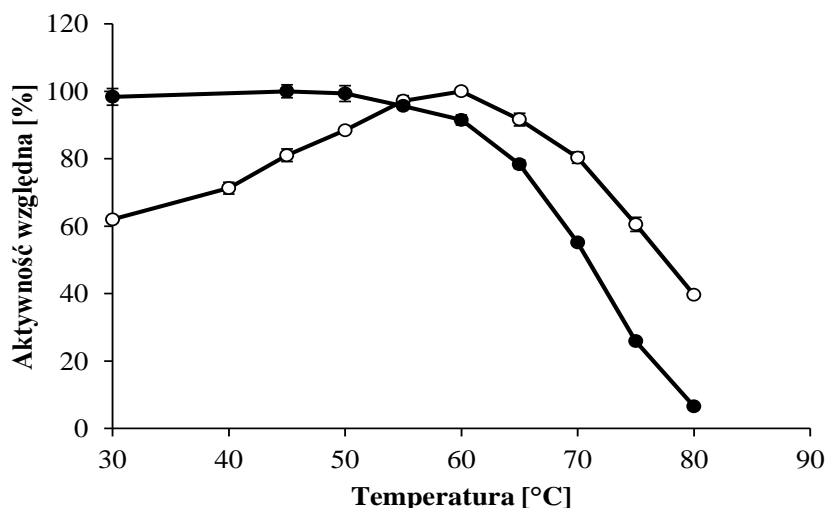


Rys. 23. Rozdział elektroforetyczny w żelu poliakrylamidowym przedstawiający wyniki frakcjonowania i oczyszczania białek cieczy pohodowlanej z *Meiothermus ruberis*. Próbkki: M- marker, 1-ciecz pohodowlana, 2-frakcja strącona 90% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3-frakcja strącona 90% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, i poddana filtracji żelowej na złożu Sephadex G-100.

9.2.4 Właściwości i warunki działania proteaz z *Deinococcus geothermalis* i *Meiothermus ruber*

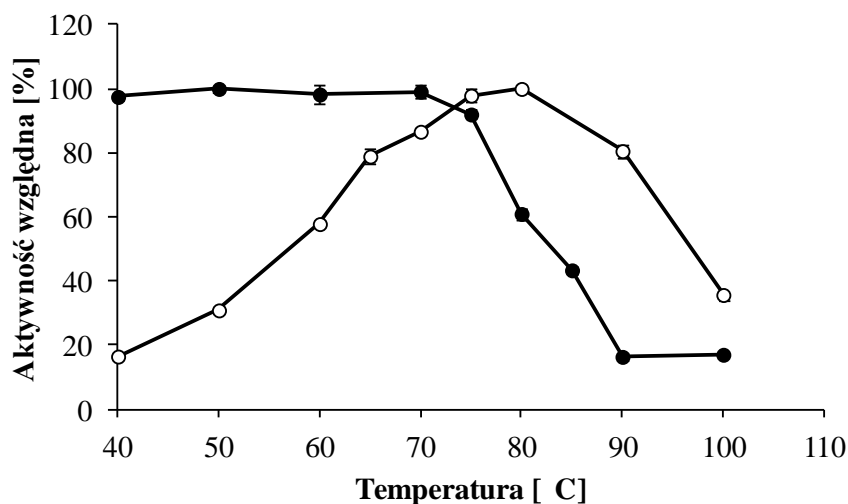
Niektóre mikroorganizmy charakteryzują się dość znacznym zróżnicowaniem optymalnych warunków działania enzymów i wzrostu komórek. W tej grupie znajdują się m. in. *Deinococcus geothermalis* i *Meiothermus ruber*. Enzym produkowany przez ziarniaka

wykazuje największą aktywność w 60°C (Rys. 24), a więc w temperaturze o 15°C większej od optymalnych warunków wzrostu macierzystego mikroorganizmu. Z kolei biokatalizator wytwarzany przez pałeczkę wykazuje optimum swojego działania w temperaturze 80°C, czyli o 25°C wyższej niż temperatura propagacji mikroorganizmu, z którego pochodzi (Rys. 25). Przekroczenie optymalnej temperatury działania w obu przypadkach powoduje dość szybki spadek aktywności enzymatycznej. Podobne zjawisko zostało potwierdzone i jako przykład mogą posłużyć enzymy proteolityczne, syntezowane m.in. przez *Geobacillus* sp. YMTC 1049 (Zhu i in., 2007) oraz *Bacillus* sp. JB-99 (Johnvesly i in., 2001). W obu sytuacjach odnotowano przesunięcie optymalnej temperatury działania proteaz (o 15°C) w kierunku temperatur wyższych w porównaniu z temperaturą propagacji mikroorganizmu produkującego enzym. Optymalne temperatury działania proteaz pochodzących z *Geobacillus* sp. YMTC 1049 i *Bacillus* sp. JB-99 wynoszą odpowiednio 85°C oraz 70°C.



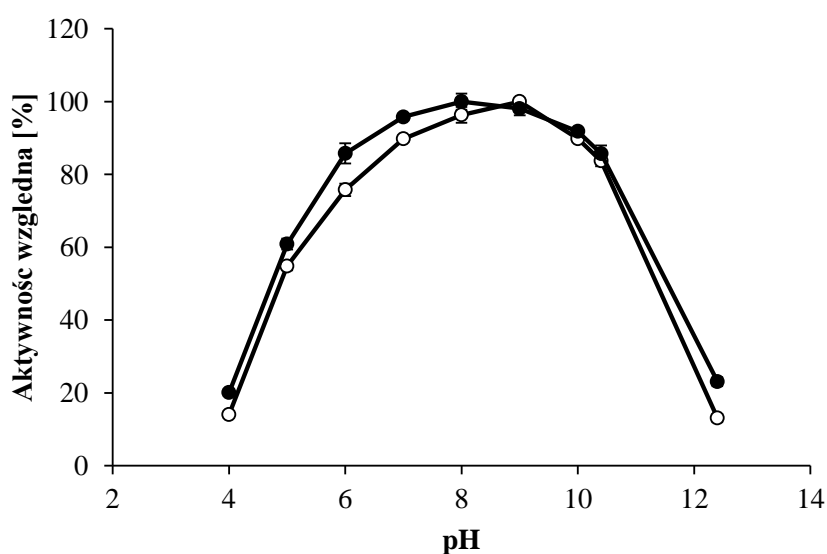
Rys. 24. Wpływ temperatury reakcji na aktywność (○) i stabilność (●) proteaz z *Deinococcus geothermalis* mierzony w 0,1 M buforze fosforanowo-cytrynianowym o pH 7,2. Wyniki są średnią z 3 oznaczeń ± odchylenia standardowe.

Badania termostabilności proteazy z *Deinococcus geothermalis* wykazały, że po 1 godzinie inkubacji w 80°C w środowisku buforu fosforanowo-cytrynianowego o pH 7,2 następowała prawie całkowita inaktywacja enzymu. Natomiast w zakresie temperatur od 30 do 65°C badany enzym zachowywał ponad 80% aktywności początkowej (Rys. 24). Godzinna inkubacja proteazy z *M. ruber* w 80°C, w środowisku buforu fosforanowo-cytrynianowego o pH 8,0 powoduje spadek aktywności enzymatycznej jedynie o 39%. W zakresie temperatur od 40 do 75°C preparat nie traci swojej aktywności (Rys. 25).

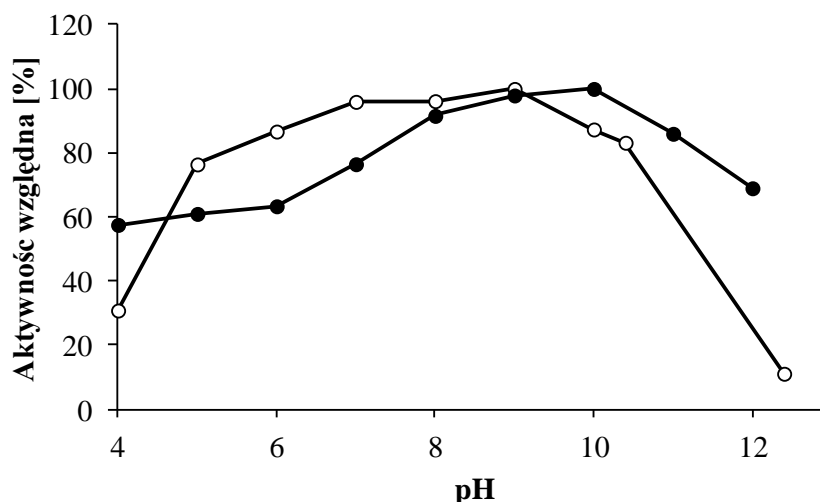


Rys. 25. Wpływ temperatury reakcji na aktywność (○) i stabilność (●) proteaz z *Meiothermus rubers* mierzony w 0,1 M buforze fosforanowo-cytrynianowym o pH 8. Wyniki są średnią z 3 oznaczeń \pm odchylenia standardowe.

Enzymy, które są przedmiotem badań przynależą do grupy proteaz alkalicznych, o czym świadczy maksymalna aktywność hydrolizy azokazeiny przy pH 9 (Rys. 26, Rys. 27). Proteazy są stabilne w szerokim zakresie pH. Pomimo godzinnej inkubacji w środowisku o pH w zakresie od 6 do 10,5 (*D. geothermalis*) czy w zakresie od 7 do 11,5 (*M. ruber*) zdolność katalityczna utrzymuje się na wysokim poziomie ponad 80%. W stosunku do proteaz z *Deinococcus geothermalis* i *Meiothermus ruber* dużą analogię wykazują subtilizyny, należące do zewnątrzkomórkowych proteaz serynowych i osiągające najwyższą aktywność przy pH około 10,0 (Rawlings i Salvesen, 2013).



Rys. 26. Wpływ pH reakcji na aktywność (○) i stabilność (●) proteaz z *Deinococcus geothermalis*. Wyniki są średnią z 3 oznaczeń \pm odchylenia standardowe.



Rys. 27. Wpływ pH reakcji na aktywność (○) i stabilność (●) proteaz z *Meiothermus ruber*. Wyniki są średnią z 3 oznaczeń \pm odchylenia standardowe.

9.2.5 Wpływ kationów

Uczestniczące w tworzeniu mostków solnych dwuwartościowe kationy i związane koordynacyjnie jony metali mogą stabilizować lub destabilizować strukturę cząsteczek białka, wiązać podjednostki enzymu oraz zmieniać ich konformację.

Tabela 23. Wpływ niektórych kationów na aktywność proteaz z *Deinococcus geothermalis*.

Kation	Aktywność względna [%] przy stężeniu		
	1 mM	5 mM	10 mM
Kontrola	100 \pm 0,9 ^F	100 \pm 0,9	100 \pm 0,9
Cu ²⁺	75,4 \pm 2,7 ^{B, c}	59,1 \pm 1,9 ^b	45,4 \pm 1,2 ^a
Al ³⁺	94,9 \pm 2,4 ^{CDE, c}	88,9 \pm 3,0 ^b	69,0 \pm 1,3 ^a
Ni ²⁺	92,3 \pm 2,2 ^{CD, c}	84,1 \pm 0,4 ^b	71,5 \pm 1,6 ^a
Ca ²⁺	101,1 \pm 2,7 ^{F, a}	100,1 \pm 1,7 ^a	97,5 \pm 1,6 ^a
Co ²⁺	92,9 \pm 1,7 ^{CD, c}	63,1 \pm 1,2 ^b	51,6 \pm 1,0 ^a
Zn ²⁺	91,4 \pm 2,1 ^{C, c}	72,1 \pm 2,1 ^b	61,8 \pm 0,6 ^a
Mg ²⁺	101,4 \pm 1,7 ^{F, a}	102 \pm 2,0 ^{ab}	107,2 \pm 3,1 ^b
Ba ²⁺	100 \pm 1,6 ^{EF, c}	81,1 \pm 1,2 ^b	70,9 \pm 1,5 ^a
Hg ²⁺	69,3 \pm 2,0 ^{A, c}	42,5 \pm 0,9 ^b	29,3 \pm 3,0 ^a
Mn ²⁺	99,2 \pm 2,0 ^{EF, b}	79,0 \pm 1,4 ^a	76,7 \pm 1,6 ^a
Fe ³⁺	97,8 \pm 4,4 ^{DEF, c}	84,1 \pm 2,1 ^b	62,2 \pm 2,0 ^a
Na ⁺	101,9 \pm 1,3 ^{F, a}	101,9 \pm 0,8 ^a	101,7 \pm 1,9 ^a

Różne indeksy w kolumnie (A-F) i wierszach (a-c) oznaczają różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$). Przedstawione wyniki są średnią z 3 oznaczeń \pm odchylenia standardowe.

Jest to jedna z przyczyn wpływu kationów na aktywność i termostabilność enzymów. Znajdujące się w środowisku reakcji kationy mogą także blokować miejsca wiążące substrat

lub reszty aminokwasowe w centrum katalitycznym. Jony metali znajdujące się w centrum katalitycznym niektórych enzymów są jednak niekiedy niezbędne do przebiegu katalizowanej reakcji i ich usunięcie, np. wskutek działania substancji chelatujących, wywołuje inaktywację biokatalizatora.

Wprowadzone do środowiska reakcji kationy wywierają różnorodny wpływ na aktywność proteaz z *Deinococcus geothermalis* i *Meiothermus ruber* inkubowanych przez okres 1 godziny w środowisku zawierającym chlorki metali (Tabela 23, Tabela 24). W obu przypadkach silne oddziaływanie inaktywujące wywierają jony metali przejściowych Hg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} i Fe^{3+} , natomiast Na^+ nie wpływa na ich aktywność. Działanie aktywujące wykazują jony Mg^{2+} oraz jony Ca^{2+} i Mn^{2+} odpowiednio w przypadku proteaz z *D. geothermalis* i *M. ruber*. Pozostałe jony działały niekorzystnie na aktywność enzymatyczną w stopniu zależnym od stężenia kationu w środowisku, co było przypuszczalnie konsekwencją wzrastającej siły jonowej cieczy reakcyjnej. Podobny wpływ jonów metali zaobserwowano w przypadku serynowych proteaz z *Bacillus circulans* i *Bacillus* sp. JB-99 (Subba Rao i in., 2009, Johnvesly i in., 2001). W obu przykładach obecność jonów wapnia, sodu i magnezu korzystnie wpływała na działanie enzymów, podczas gdy jony cynku i rtęci powodowały dezaktywację biokatalizatora. W przypadku jonów miedzi powodowały one spadek aktywności proteaz z *Bacillus circulans*, natomiast wzrost zdolności katalitycznych enzymów pochodzących z *Bacillus* sp. JB-99.

Tabela 24. Wpływ niektórych kationów na aktywność proteaz z *Meiothermus ruber*.

Kation	Aktywność względna [%] przy stężeniu		
	1 mM	5 mM	10 mM
Kontrola	100 ± 2,5 ^F	100 ± 2,5	100 ± 2,5
Cu^{2+}	80,9 ± 2,1 ^{AB, b}	74,2 ± 1,8 ^a	72,1 ± 2,9 ^a
Al^{3+}	91,8 ± 1,6 ^{E, c}	78,2 ± 0,5 ^b	70,4 ± 1,9 ^a
Ni^{2+}	89,3 ± 0,6 ^{DE, b}	95,9 ± 3,6 ^a	93,3 ± 1,1 ^{ab}
Ca^{2+}	105,2 ± 3,6 ^{G, a}	112,9 ± 1,8 ^b	124,9 ± 2,2 ^c
Co^{2+}	82,9 ± 1,6 ^{BC, c}	72,1 ± 1,3 ^a	75,7 ± 0,5 ^b
Zn^{2+}	91,2 ± 2,6 ^{E, c}	68,9 ± 2,5 ^b	55,3 ± 1,8 ^a
Mg^{2+}	100,5 ± 2,4 ^{F, c}	94,3 ± 3,0 ^b	88,8 ± 1,3 ^a
Ba^{2+}	81,6 ± 2,8 ^{AB, b}	61,5 ± 1,5 ^a	58,0 ± 2,9 ^a
Hg^{2+}	78,1 ± 0,6 ^{A, c}	43,6 ± 2,2 ^b	25,2 ± 1,7 ^a
Mn^{2+}	96,5 ± 0,6 ^{F, a}	118,9 ± 2,2 ^b	120,0 ± 6,5 ^b
Fe^{3+}	87,1 ± 2,6 ^{CD, b}	65,7 ± 0,5 ^a	65,2 ± 2,8 ^a
Na^+	99,2 ± 1,8 ^{F, a}	98,8 ± 1,2 ^a	101,4 ± 2,4 ^a

Różne indeksy w kolumnie (A-G) i wierszach (a-c) oznaczają różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$). Przedstawione wyniki są średnią z 3 oznaczeń ± odchylenia standardowe.

9.2.6 Oddziaływanie niektórych związków chemicznych

Wiele substancji wprowadzonych do środowiska reakcji działa jako kompetytywne lub niekompetytywne inhibitory enzymów. Inhibitory kompetytywne są podobne strukturalnie do cząsteczek substratu i wiążą się odwracalnie z centrum katalitycznym nie powodując trwałej inaktywacji enzymu. Natomiast inhibitory niekompetytywne nie są podobne do cząsteczek substratu i łączą się z innymi obszarami cząsteczek enzymu zmieniając ich konformację.

Tabela 25. Wpływ niektórych związków na aktywność proteaz z *Deinococcus geothermalis*.

Związek chemiczny	Stężenie	Aktywność względna [%]
Kontrola	-	100 ± 1,3
SDS	5 mM	66,6 ± 2,4
	10 mM	60,2 ± 4,3
2-merkaptoetanol	5 mM	96,6 ± 0,9
	10 mM	91,2 ± 1,4
DTT	5 mM	78,4 ± 1,6
	10 mM	64,7 ± 0,8
Tween 80	5 mM	96,8 ± 0,7
	10 mM	94,3 ± 1,2
Triton X-100	5 mM	90,3 ± 1,7
	10 mM	87,8 ± 0,9
Tris	5 mM	99,8 ± 0,7
	10 mM	101,1 ± 1,1
Mocznik	20 mM	100,8 ± 1,3
	1M	98,9 ± 1,5
	4M	93,3 ± 0,6
Pepstatyna	1 mM	95,6 ± 1,8
pCMB	1 mM	96,5 ± 1,4
Jodoacetamid	1 mM	100,3 ± 2,4
PMSF	1 mM	28,5 ± 0,5
EDTA	1 mM	99,7 ± 1,3
	10 mM	65,6 ± 0,9

Przedstawione wyniki są średnią z 3 oznaczeń ± odchylenia standardowe.

Badania wpływu wymienionych w tabeli 25 i 26 substancji na aktywność proteaz z *Deinococcus geothermalis* i *Meiothermus ruber* wykazały, że największą inaktywację wymienionych enzymów spowodował inhibitor blokujący grupy –OH, tj. fluorek fenylometrylosulfonowy (PMSF) przy jednoczesnym braku oddziaływania ze strony jodoacetamidu i kwasu p-chlorortęciowobenzoesowego (pCMB) będących inhibitorami proteaz cysteinowych. Spadek aktywności o 71% i 72% wywołany przez PMSF świadczy

o tym, że charakteryzowane enzymy należą do rodziny proteaz serynowych. Aktywność preparatów nie ulegała zmianie pod wpływem pepstatyny i 1mM kwasu etylenodiaminotetraoctowego (EDTA), będących inhibitorami proteaz aspartylowych i metaloproteaz. Zwiększenie stężenia EDTA do 10 mM w środowisku reakcji spowodowało znaczny spadek aktywności katalitycznej enzymów. Dla proteazy z *D. geothermalis* spadek ten wynosił około 35%, natomiast aktywność proteazy z *M. ruber* spadła o prawie 70%. Według danych literaturowych enzymy należące do rodziny proteaz serynowych do prawidłowego funkcjonowania potrzebują jonów wapnia (Sumantha i in., 2006). Wykazano również, że mostki solne tworzone z udziałem dwuwartościowych kationów są jednym z czynników zabezpieczających cząsteczki termostabilnych białek przed rozfałdowaniem w podwyższonej temperaturze (Vieille i in., 2001). Znaczenie tych oddziaływań w stabilizowaniu struktur omawianych proteaz zostało najprawdopodobniej zakłócone przez kwas diaminotetraoctowy (EDTA), który jest chelatorem jonów metali.

Tabela 26. Wpływ niektórych związków na aktywność proteaz z *Meiothermus ruber*.

Związek chemiczny	Stężenie	Aktywność względna [%]
Kontrola	-	100 ± 0,4
SDS	5 mM	80,5 ± 3,0
	10 mM	76,3 ± 2,8
2-merkaptoetanol	5 mM	78,3 ± 0,9
	10 mM	78,3 ± 0,9
DTT	5 mM	58,2 ± 0,3
	10 mM	48,5 ± 0,4
Tween 80	5 mM	108,1 ± 1,6
	10 mM	108,9 ± 1,8
Triton X-100	5 mM	100,4 ± 2,6
	10 mM	100,2 ± 0,3
Tris	5 mM	99,7 ± 2,8
	10 mM	98,2 ± 3,2
Mocznik	20 mM	100 ± 2,2
	1M	99,6 ± 1,5
	4M	100,1 ± 1,3
Pepstatyna	1 mM	97,3 ± 1,3
pCMB	1 mM	95,1 ± 1,2
Jodoacetamid	1 mM	94,3 ± 2,9
PMSF	1 mM	27,4 ± 1,5
EDTA	1 mM	90,1 ± 0,9
	10 mM	30,9 ± 1,4

Przedstawione wyniki są średnią z 3 oznaczeń ± odchylenia standardowe

Aktualnie na rynku dostępnych jest wiele proszków do prania, środków myjących i detergentów zawierających w swoim składzie dodatek enzymów, między innymi proteaz.

Ważne jest, aby takie enzymy były stabilne i nie ulegały denaturacji w obecności innych składników detergentów, dlatego dąży się do pozyskiwania biocząsteczek o takich właściwościach. Proteazy z *D. geothermalis* i *M. ruber* wykazuje zróżnicowaną odporność na działanie detergentów i substancji denaturujących. Niejonowe detergenty Triton X-100 i Tween 80 nie wpływają istotnie na działanie enzymu produkowanego przez ziarniaka i powodują niewielkie wynoszące kilka procent obniżenie aktywności, podczas gdy na drugi enzym działają stymulująco. W przypadku proteaz z *B. circulans* i *B. aquimaris* VITP4 wyżej wymienione detergenty nie wpływały na aktywność enzymatyczną lub powodowały minimalny spadek zdolności katalitycznych (Subba Rao i in., 2009, Shivanand i in., 2009). Z kolei sól sodowa siarczanu dodecyłu (SDS), która wiąże się z białkami i nadaje im silnie anionowy charakter, powoduje znaczne osłabienie zdolności proteolitycznych pozyskanych preparatów. Spadek aktywności wywołany SDS wynosi 40% i 24% odpowiednio dla *D. geothermalis* i *M. ruber*. Spowodowane jest to zmianą pierwotnego ładunku wypadkowego cząsteczki białka. Działanie SDS na proteazy z *B. circulans* i *B. aquimaris* VITP4 również powodowało spadek aktywności odpowiednio o 25 i 10%, a w przypadku protaz z *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327 aż o 43% (Zambare i in., 2011).

Wykorzystanie w badaniach ditiotreitolu (DTT) czy 2-merkaptioetanolu umożliwia stwierdzenie, czy mostki dwusiarczkowe biorą udział w stabilizacji struktury czwartorzędowej białka. Merkaptioetanol posiada względnie wysoką toksyczność oraz może reagować z wolnymi resztami cysteinowymi, dlatego też w analizie częściej stosowany jest ditiotreitrol (DTT), który posiada również wyższy potencjał redukcyjny. W związku z tym można tłumaczyć znaczną różnicę w działaniu obu tych reduktorów (Tabela 25, Tabela 26). Stosunkowo małe oddziaływanie ze strony 2-merkaptioetanolu jest nieadekwatne do działania DTT, który powoduje dość dużą inaktywację preparatów wynoszącą 35% i 50%. Nasuwa to sugestię, że mostki disulfidowe, determinujące IV-rzędową konformację białka, mają wpływ na działanie jego centrum aktywnego i ich redukcja powoduje zmianę aktywności katalitycznej. Literaturowym potwierdzeniem takiego przypadku są protazy z *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327, które pod wpływem 5 mM DTT są całkowicie dezaktywowane (Zambare i in., 2011). Działanie 4 M mocznikiem powoduje jedynie około 7% spadek aktywności enzymu z *D. geothermalis*, natomiast na biokatalizator pochodzący z *M. ruber* nie działa w ogóle. Wysoka odporność na działanie tego czynnika denaturującego sugeruje, że struktura obu białek jest dobrze upakowana i bardzo sztywna. Ponadto odnotowano, że Tris, stanowiący składnik buforów szeroko stosowanych w biochemii i biologii molekularnej, nie wpływa na działanie omawianych enzymów.

Tabela 27. Wpływ niektórych rozpuszczalników na aktywność proteaz z *Deinococcus geothermalis* i *Meiothermus ruber*.

Związek chemiczny	Stężenie	Aktywność względna proteazy z <i>D. geothermalis</i> [%]	Aktywność względna proteazy z <i>M. ruber</i> [%]
Kontrola	-	100 ± 0,6	100 ± 0,9
Izopropanol	25%	62,9 ± 3,0	86,9 ± 1,8
Etanol	25%	66,80 ± 0,7	96,9 ± 2,5
Metanol	25%	86,9 ± 3,9	101,8 ± 0,2
DMSO	25%	96,8 ± 4,6	114,5 ± 2,4
Aceton	25%	70,8 ± 2,3	106 ± 1,8

Przedstawione wyniki są średnią z 3 oznaczeń ± odchylenia standardowe.

Stabilność enzymów proteolitycznych w środowisku rozpuszczalników organicznych jest ważnym atrybutem w przypadku ich wykorzystania do syntezy peptydów i estrów, które należy prowadzić w warunkach bezwodnych. Proteaza z *D. geothermalis* wykazuje zróżnicowaną odporność na wykorzystywane w syntezie chemicznej rozpuszczalniki organiczne (Tabela 27). Dimetylosulfotlenek (DMSO) nie wpływa znacząco na aktywność proteolityczną preparatu, podczas gdy metanol powoduje widoczny, ale niewielki spadek aktywności o ok. 13%. Pozostałe związki organiczne wpływają znacząco na zdolność katalityczną enzymu powodując dezaktywację rzędu 30-40%. Zastosowanie rozpuszczalników organicznych jako środowiska reakcji, mające na celu przeprowadzenie reakcji transpeptydacji, zamiast oczekiwanych efektów powoduje denaturację biokatalizatora. Sugeruje to, iż proteazy z *D. geothermalis* nie nadają się do wykorzystania w syntezie chemicznej. Przeciwnie enzym syntezowany przez *M. ruber*. Odznacza się on wysoką odpornością na działanie odczynników chemicznych przedstawionych w tabeli 27. Nieznaczny spadek aktywności jest widoczny jedynie w przypadku izopropanolu, natomiast pozostałe rozpuszczalniki nie wpływają lub nieznacznie stymulują działanie proteazy.

Jako przykład enzymu niewrażliwego na działanie rozpuszczalników organicznych może posłużyć proteaza ze *Streptomyces clavuligerus*, u której 25% roztwory acetonu, etanolu, ksylenu, benzenu, jak i butanolu nie powodowały zmian aktywności enzymatycznej (Thumar i in., 2009).

9.2.7 Specyficzność substratowa

Zewnątrzkomórkową aktywność proteolityczną odnotowano u wielu przedstawicieli organizmów prokariotycznych, eukariotycznych czy archeonów. Zewnątrzkomórkowe proteazy są potrzebne do hydrolizy białek znajdujących się w środowisku tak, aby ich przyswajanie było dla organizmu możliwe. Zazwyczaj charakteryzują się one szeroką

specyficznością substratową i powodują degradację niestrukturalnych białek takich jak albumina, kazeina, insulina czy hemoglobina (Kalisz, 1988). Wysoka aktywność proteolityczna niektórych mikroorganizmów często wiąże się z ich patogennością w stosunku do człowieka lub zwierząt. Jednakże do tej pory nie odnotowano przypadku występowania patogenów wśród termofili, co sugeruje, że *Deinococcus geothermalis* i *Meiothermus ruber* mogą być bez obaw wykorzystywane do pozyskiwania enzymów proteolitycznych (Suzuki i in., 2006).

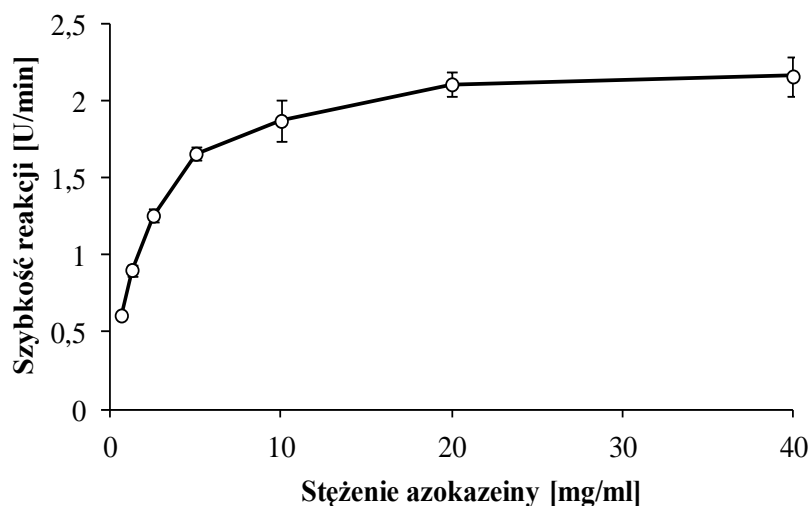
Tabela 28. Specyficzność substratowa proteaz z *Deinococcus geothermalis* i *Meiothermus ruber*.

Substraty [C=2%]	Aktywność preparatu z <i>D. geothermalis</i> [10^{-3} U]	Aktywność preparatu z <i>M. ruber</i> [10^{-3} U]
Kazeina	944,7 ± 34,1	407,9 ± 9,6
Hemoglobina	1050,1 ± 29,9	565,9 ± 44,2
Lizozym	103,9 ± 10	105,8 ± 19,7
Albumina jaja kurzego	63,6 ± 4,7	112,8 ± 7,5
Surowicza albumina wołowa	155,6 ± 11,7	543,5 ± 20,3
β-globulina wołowa	1238 ± 31,8	213,5 ± 25,8
Żelatyna	585,3 ± 14,2	60,9 ± 7,1
Hydrolizat keratyny	170 ± 8,2	332,8 ± 11,9

Przedstawione wyniki są średnią z 3 oznaczeń ± odchylenia standardowe.

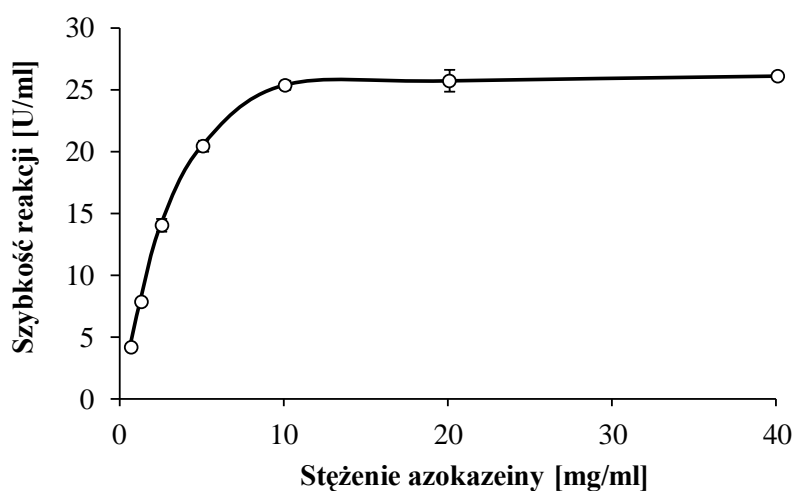
W przypadku proteaz, które były przedmiotem badań wykazują one szerokie i zróżnicowane powinowactwo substratowe (Tabela 28). Preparat pozyskany z *D. geothermalis* wykazywał najwyższą aktywność hydrolityczną w przypadku substratów takich jak hemoglobina, kazeina czy β-globulina wołowa. Zmniejszoną aktywność proteaza wykazywała natomiast względem keratyny czy albuminy jaja kurzego. W przypadku *M. ruber* największą aktywność enzymatyczną zaobserwowano w stosunku do kazeiny, hemoglobiny, BSA czy keratyny. Słabo hydrolizowana była żelatyna i lizozym. Zbliżone preferencje substratowe wykazują zewnątrzkomórkowe proteazy z *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327 (Zambare i in., 2011).

Szerokie spektrum działania oraz przynależność do rodziny proteaz serynowych sugeruje, iż enzymy produkowane przez *D. geothermalis* i *M. ruber* mają aktywność endopeptydazową (Kołąkowski, 2005).



Rys. 28. Zależność szybkości hydrolyzy katalizowanej protezą z *Deinococcus geothermalis* (60°C, pH 7,2) od stężenia azokazeiny. Wyniki są średnią z 3 oznaczeń \pm odchylenia standardowe.

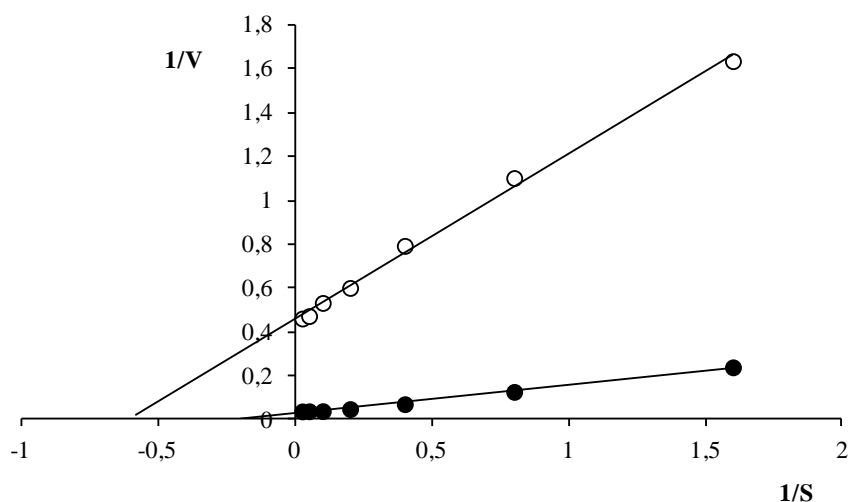
Z wykresu przedstawiającego zależność szybkości reakcji hydrolyzy katalizowanej protezą z *Deinococcus geothermalis* od stężenia azokazeiny wynika, że największa aktywność enzymu uzyskuje się przy około 20 mg/mL stężenia substratu (Rys. 28). W analogicznym przypadku enzym z *Meiothermus ruber* osiąga największą aktywność przy około 10 mg/mL azokazeiny (Rys. 29).



Rys. 29. Zależność szybkości hydrolyzy katalizowanej protezą z *Meiothermus ruber* (80°C, pH 8,0) od stężenia azokazeiny. Wyniki są średnią z 3 oznaczeń \pm odchylenia standardowe.

Maksymalną szybkość reakcji V_{\max} oraz stałą Michaelisa K_m obliczono na podstawie wykresu Lineweavera-Burka (Rys. 30). Wyznaczona w ten sposób stałe kinetyczne wynoszą

$V_{\max}=2,18$ U/min i $K_m=1,64$ mg/mL dla preparatu z *D. geothermalis* oraz $V_{\max}=36,6$ U/min i K_m 4,76 mg/mL odpowiednio dla preparatu z *M. ruber*. Niska wartość stałej K_m świadczy o dobrym powinowactwie enzymu do substratu. Bardzo podobne wartości K_m zaobserwowano podczas hydrolizy azokazeiny przez proteazy z *Streptomyces* sp. XZNUM 00004 ($K_m=0,96$ mg/mL), *Streptomyces* sp.CS684 ($K_m=4,2$ mg/mL) czy *Enterococcus faecalis* TN-9 ($K_m=0,98$ mg/mL) (Ju X i in., 2012, Simkhada i in., 2010, Yuan i in., 2009).



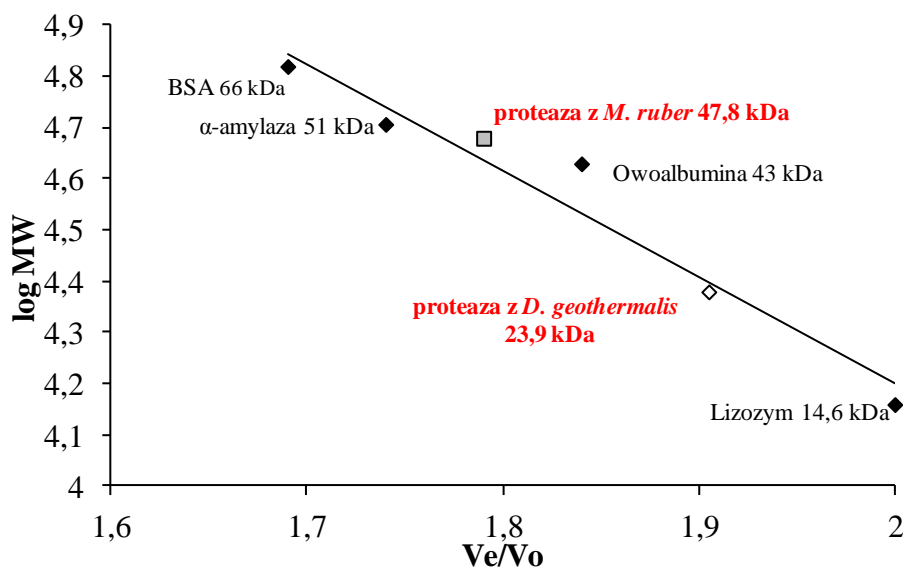
Rys. 30. Wyznaczenie wartości K_m (mg/mL) oraz V_{\max} (U/min) dla reakcji hydrolizy azokazeiny katalizowanej przez proteazy z *Deinococcus geothermalis* (○) i *Meiothermus ruber* (●). Wyniki są średnią z 3 oznaczeń \pm odchylenia standardowe.

9.2.8 Masa cząsteczkowa

Stosując technikę sączenia molekularnego, na podstawie krzywej względnej objętości retencji białek, wyznaczono masę cząsteczkową proteazy z *D. geothermalis* na 23,9 kDa (Rys. 31). Natomiast masa cząsteczkowa białka wyznaczona metodą SDS-PAGE wynosi w przybliżeniu 25 kDa, co wskazuje, że enzym ma budowę monomeru (Rys. 20). Analogicznie określono wielkość enzymu z *M. ruber*. Na podstawie filtracji żelowej ustalono, że przybliżona wielkość białka wynosi 47,8 kDa (Rys. 31). Szacunkowa masa określona na bazie elektroforezy w warunkach denaturujących wynosi 45 kDa (Rys. 22), co sugeruje, że również ta proteaza zbudowana jest z jednej podjednostki.

Doniesienia literaturowe na temat zewnątrzkomórkowych proteaz potwierdzają tendencję do występowania struktur monomerycznych w obrębie danej grupy badawczej. Jako przykład mogą posłużyć zewnątrzkomórkowe alkaliczne proteazy serynowe pozyskane z *Bacillus pumilus* A1 (34 kDa), *Geobacillus* sp. YMTC 1049 (59,2 kDa), *Bacillus circulans* (39,5 kDa),

Bacillus pumilus MS-1 (33 kDa) (Fakhafakh-Zouari i in., 2010; Zhu i in., 2007; Subba Rao i in., 2009; Miyaji i in., 2006). We wszystkich przypadkach masa była wyznaczana dwoma metodami: filtracji żelowej oraz elektroforetycznie w środowisku denaturującym (SDS-PAGE).



Rys. 31. Wyznaczenie masy cząsteczkowej proteaz z *D. geothermalis* i *M. ruber* techniką sączenia molekularnego.

9.2.9 Wpływ czasu na aktywność enzymatyczną

Stabilność enzymów z technologicznego punktu widzenia jest niesamowicie ważna. Pod pojęciem stabilności rozumie się zarówno stabilność operacyjną, jak i stabilność podczas przechowywania biokatalizatora. Podczas gdy pierwsza dotyczy zachowania aktywności w trudnych warunkach reakcji, druga obejmuje wpływ czasu i warunków przechowywania na aktywność katalizatora. Enzym może być przechowywany w postaci roztworu, wysuszonego proszku czy też immobilizowanego preparatu (Drago i Gibson, 2001). Okres przechowywania i trwałości enzymów może wynosić od kilku dni do kilku lat i zależy od charakteru białka i zastosowanych warunków przechowywania. Optymalne warunki przechowywania są specyficzne dla każdego białka. Niemniej jednak istnieją podstawowe sposoby, które pozwalają na zachowanie żywotności białka. Najczęściej jeżeli preparat jest płynny przechowuje się go w warunkach chłodniczych (+4°C) lub mrozi w obecności krioprotektantów (glicerol, glikol etylenowy) w -20°C lub ciekłym azocie. Natomiast gdy istnieje taka możliwość preparat enzymatyczny można zliofilizować i przechowywać w chłodnym, suchym miejscu.

Tabela 29. Wpływ czasu przechowywania w warunkach chłodniczych (4°C) na aktywność ogólną proteaz z *Deinococcus geothermalis* i *Meiothermus ruber*.

Czas [tydzień]	Aktywność względna preparatu z <i>D. geothermalis</i> [%]	Aktywność względna preparatu z <i>M. ruber</i> [%]
0	100 ± 1,1	100 ± 0,4
2	85,9 ± 0,6	81,2 ± 1,3
4	83,2 ± 2,4	84,3 ± 1,3
6	74,5 ± 0,9	77,7 ± 2,1
8	75,9 ± 0,8	76,3 ± 0,6
10	61,3 ± 0,5	74,2 ± 0,8
12	58,9 ± 3,6	74,1 ± 1,2

Przedstawione wyniki są średnią z 3 oznaczeń ± odchylenia standardowe.

Preparaty enzymatyczne pozyskane z *D. geothermalis* i *M. ruber* przechowywane w postaci zliofilizowanego suszu w warunkach chłodniczych (+4°C) są stabilne. Po okresie 12 tygodni oba preparaty zachowywały zadowalającą aktywność katalityczną, która wynosiła odpowiednio 58,9% oraz 74,1% aktywności początkowej (Tabela 29). W przypadku preparatów proteaz dostępnych handlowo jedynie Alcalase® 2.4 L FG (płynny preparat subtylizyny pochodzący z *Bacillus licheniformis* stabilizowanym glicerolem) ma określoną datę przydatności do użycia. Producent sugeruje, aby produkt przechowywany w zakresie temperatur od 0-10°C był wykorzystany w przeciągu 6 miesięcy. Inne dostępne komercyjnie enzymy, które stanowią preparaty suche nie posiadają określonego terminu przydatności.

10. Wnioski

- I. Bakterie typu *Deinococcus-Thermus* stanowią doskonałe źródło enzymów przydatnych w przemyśle spożywczym. Enzymy, które były przedmiotem badań, wykazują ciekawe właściwości i mogą stanowić alternatywę dla dostępnych obecnie na rynku preparatów enzymatycznych.
- II. Oczyszczanie α -D-glukozylotransferazy maltozy z zastosowaniem denaturacji cieplnej (10 minut, 56°C) oraz chromatografii metalopowinowactwa pozwoliło uzyskać homogeny preparat o aktywności specyficznej 11,83 U/mg. Badany enzym jest homodimerem o masie cząsteczkowej wynoszącej 126,9 kDa i wykazuje największą aktywność w 30°C w pH 7,6. Białko nie ulega inaktywacji w 45°C w badanym okresie inkubacji wynoszącym 2 godziny i pozostaje stabilne w zakresie pH od 5,5 do 9.
- III. α -D-glukozylotransferazy maltozy inhibowana jest przez Cu^{2+} , Al^{3+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} i Fe^{3+} natomiast jony Ca^{2+} i Mg^{2+} nie wpływają na jej działanie. Całkowity spadek aktywności odnotowano pod wpływem działania pepstatyny, kwasu jodooctowego i fluorku fenylometylosulfonowego. Biokatalizator nie jest wrażliwy na niejonowe detergenty takie jak Triton X-100 oraz Tween 80 natomiast rozpuszczalniki organiczne nieznacznie hamują jego działanie.
- IV. α -D-glukozylotransferazy maltozy z *Deinococcus radiodurans* może być wykorzystywany przemysłowo do produkcji trehalozy. W przypadku 10% substratu maltozy racjonalne jest prowadzić reakcję konwersji przez 24 godziny. Glukoza, która jest produktem ubocznym reakcji konwersji jest produkowana w niewielkiej ilości i stanowi zaledwie 4 % mieszaniny poreakcyjnej.
- V. *Deinococcus geothermalis* może być wykorzystywany jako źródło alkalicznej proteazy serynowej, która wykazuje największą aktywność w 60°C przy pH 9,0. Badania stabilności enzymu wykazały, że po godzinnej inkubacji w zakresie temperatur 30-60°C w środowisku buforu fosforanowo-cytrynianowego o pH 7,2 nie następowało istotne zmniejszenie aktywności preparatu. Proteaza pozostaje stabilna w szerokim zakresie pH od 5,5 do 10,5 zachowując 80% aktywności maksymalnej.

- VI. Uzyskanie znacznie podczyszczzonego preparatu enzymatycznego z *Deinococcus geothermalis* jest łatwe i możliwe przy wykorzystaniu dwuetapowego systemu oczyszczania złożonego z wysalania białek cieczy pochodzącej z $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ przy 90% wysyceniu soli i sączeniu molekularnym na złożu Sephadex G-100. Dwuetapowa procedura oczyszczania powoduje 8-krotny wzrost aktywności specyficznej. Zastosowanie tylko etapu wysolenia pozwala na otrzymanie preparatu o czystości technicznej.
- VII. Proteaza z *Deinococcus geothermalis* jest monomerem o masie cząsteczkowej wynoszącej w przybliżeniu 24 kDa. Wiązania disulfidowe stabilizujące budowę cząsteczki znajdują się w pobliżu centrum katalitycznego i ich redukcja wpływa na aktywność katalityczną. Struktura białka jest zwarta i sztywna. Enzym inhibowany jest przez Cu^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} i Fe^{3+} natomiast jony Mg^{2+} korzystnie wpływają na jego działanie. Biokatalizator nie jest wrażliwy na niejonowe detergenty takie jak Triton X-100 oraz Tween 80. Rozpuszczalniki organiczne hamują w znacznym stopniu jego działanie.
- VIII. Proteaza z *Deinococcus geothermalis* charakteryzuje się szeroką specyficznością substratową. Zwiększoną aktywność hydrolityczną odnotowano w przypadku substratów takich jak hemoglobina, kazeina czy β -globulina wołowa, zmniejszoną natomiast względem keratyny czy albuminy jaja kurzego. Wartość stałej Michaelisa (K_m) reakcji hydrolizy azokazeiny wynosi 1,64 mg/mL, a V_{\max} reakcji 2,18 U/min.
- IX. Badana proteaza z *Meiothermus ruber* osiąga maksymalną aktywność w temp. 80°C przy pH 9,0. Wymieniony enzym zachowuje około 80% największej aktywności w zakresie pH 7-11,5 i podczas godzinnej inkubacji w temp. 75°C nie traci aktywności enzymatycznej.
- X. Oczyszczanie enzymu z *Meiothermus ruber* poprzez wysolenie białek cieczy pochodzącej z $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ przy 90% wysyceniu soli i sączeniu molekularnym na złożu Sephadex G-100 pozwoliła na 13-krotny wzrost aktywności specyficznej preparatu. Masa cząsteczkowa proteazy wyznaczona z zastosowaniem chromatografii żelowej wynosi 47,8 kDa natomiast szacunkowa masa określona na podstawie SDS-PAGE wynosi 45 kDa, co sugeruje, że proteaza zbudowana jest z jednej podjednostki.
- XI. Białko pozyskane z *Meiothermus ruber* należy do grupy proteaz serynowych o czym świadczy zmniejszenie aktywności pod wpływem PMSF. Spadek aktywności był

odnotowany w przypadku działania na enzym jonami Cu^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} i Co^{2+} natomiast jony Ca^{2+} i Mn^{2+} powodowały wzrost aktywności enzymu. Proteaza wykazuje wysoką stabilność względem niejonowych detergentów takich jak Tween 80 czy Triton X-100 jak również względem 4 M mocznika. Ponadto odznacza się wysoką odpornością na działanie rozpuszczalników organicznych.

- XII. Proteaza z *M. ruber* wykazuje dobre powinowactwo względem azokazeiny o czym świadczy wartość stałej Michaelisa $K_m=4,76$ mg/mL. Białko charakteryzuje się szeroką specyficnością substratową. Zwiększoną aktywność hydrolityczną odnotowano w przypadku substratów takich jak hemoglobina, kazeina, BSA czy keratyna, obniżoną natomiast względem żelatyny i lizozymu.

11. Dorobek naukowy

Publikacje w czasopismach wyróżnionych w JCR:

1. Synowiecki J., Sinkiewicz I., Grubiak K., Zakrzewska A., **Pietrow O.** (2011): β -galactosidase activity of *Meiothermus ruber* cells. *J. Food Biochem.*, 35: 1468-1473.
2. Filipkowski P., Panek A., Felczykowska A., **Pietrow O.**, Synowiecki J. (2012): Expression of *Deinococcus geothermalis* trehalose synthase gene in *Escherichia coli* and some properties of obtained enzyme. *Afr. J. Biotechnol.*, 11(67):13131-13139.
3. Panek A., **Pietrow O.**, Synowiecki J. (2012): Characterization of glucoamylase immobilized on magnetic nanoparticles. *Starch-Starke*, 64:1003-1008.
4. Filipkowski P., **Pietrow O.**, Panek A., Synowiecki J. (2012): Properties of recombinant trehalose synthase from *Deinococcus radiodurans* expressed in *Escherichia coli*. *Acta Biochim. Pol.*, 59(3): 425-431.
5. Panek A., **Pietrow O.**, Filipkowski P., Synowiecki J. (2013): Effect of polyhistidine tag on kinetics and other properties of trehalose synthase from *Deinococcus geothermalis*, *Acta Biochi. Pol.*, 60(2):163-166.
6. **Pietrow O.**, Panek A., Synowiecki J. (2013): Extracellular proteolytic activity of *Deinococcus geothermalis*, *Afr. J. Biotechnol.*, 12(25):4020-4027.
7. Panek A., **Pietrow O.**, Synowiecki J., Filipkowski P. (2013): Immobilization on magnetic nanoparticles of the recombinant trehalose synthase from *Deinococcus geothermalis*. *Food Bioprod. Process., w druku*.

Publikacje w wydawnictwie zbiorowym recenzowanym:

1. **Pietrow O.**, Panek A., Synowiecki J., *Example of utilization of permeabilized microbial cells*, [w:] *PhD Interdisciplinary Journal*, M. Czubenko, Gdansk University of Technology, 2012: 35-40.
2. Panek A., **Pietrow O.**, Synowiecki J., *Immobilized biocatalysts - useful tool for industrial processes* [w:] *PhD Interdisciplinary Journal*, M. Czubenko, Gdansk University of Technology, 2012: 29-34.
3. **Pietrow O.**, Panek A. *Properties and applications of thermostable proteases sourced from Deinococcus geothermalis*, [w:] *Advances in Chemical and Mechanical Engineering*, Fijała C., Fijała P., Gdansk University of Technology, 2012: 127-130.
4. Panek A., **Pietrow O.**, *Characterization of immobilized Escherichia coli cells transformed by β -galactosidase gene from Pyrococcus woesei*, [w:] *Advances in Chemical and Mechanical Engineering*, Fijała C., Fijała P., Gdansk University of Technology, 2012: 115-118.

5. **Pietrow O.**, Panek A., Synowiecki J., *Właściwości i zastosowanie termostabilnych proteaz* [w:] *Biomeditech: Badania i Innowacje : zeszyty naukowe*, M. Czubenko, T. Merta, Politechnika Gdańska, 2011: 81-86.

6. Panek A., **Pietrow O.**, Synowiecki J., *Biotechnologiczne przetwarzanie keratyny oraz jej wykorzystanie* [w:] *Biomeditech: Badania i Innowacje : zeszyty naukowe*, M. Czubenko, T. Merty. - Politechnika Gdańska, 2011: 81-86.

7. **Pietrow O.**, Panek A., *Meiothermus ruber cells as β -galactosidase activity biocatalyst* [w:] *Advances in Chemical and Mechanical Engineering*, Fijała C., Gdansk University of Technology, 2011: 175-179.

8. Panek A., **Pietrow O.**, *The possibility of use keratin products in various branches of industry* [w:] *Advances in Chemical and Mechanical Engineering*, Fijała C., Gdansk University of Technology, 2011: 158-161.

Doniesienia konferencje - postery:

1. "Characteristic and specificity of protease activity of thermophilic bacteria *Meiothermus ruber.*, **Pietrow O.**, Synowiecki J. Central European Congress of Life Sciences: Eurobiotech 2010 : Leading Area: White Biotechnology, Kraków, September 20th-22nd 2010.

2. "Cloning, expression, purification and characterization of recombinant trehalose synthase from *Deinococcus radiodurans.*, Filipkowski P., Licznerska K., Panek A., **Pietrow O.**, Synowiecki J. Central European Congress of Life Sciences : Eurobiotech 2010 : Leading Area: White Biotechnology, Kraków, September 20th-22nd 2010.

3. "Trehaloza - cukier o szerokim spektrum zastosowań,, Panek A., **Pietrow O.**, Synowiecki J. VII Ogólnopolskie Studenckie Seminarium Naukowo-Technologiczne: Biomeditech: Badania i Innowacje, Sopot 9-13 maja 2011.

4. "Otrzymanie i właściwości proteaz z *Meiothermus ruber* przydatnych w przemyśle,, **Pietrow O.**, Panek A., Synowiecki J. VII Ogólnopolskie Studenckie Seminarium Naukowo-Technologiczne: Biomeditech: Badania i Innowacje, Sopot 9-13 maja 2011.

5. "A new method for obtaining trehalose in a single step enzymatic reaction using trehalose synthase derived from extremophilic organisms,, Filipkowski P., Panek A., **Pietrow O.**, Licznerska K., Felczykowska A., Synowiecki J. EuroFoodChem XVI - Translating food chemistry into health benefits, Gdańsk, 6th-8th July 2011.

6. "Properties and usefulness of proteases from *Meiothermus ruber.*, **Pietrow O.**, Anna P., Synowiecki J. Biotrans 2011 Italy : 10th International Symposium on Biocatalysis, Giardini Naxos (ME), Sicily, October 2-6, 2011.

7. "Characterization of trehalose synthase from *Deinococcus geothermalis* expressed in *Escherichia coli.*, Panek A., Filipkowski P., **Pietrow O.**, Synowiecki J. Biotrans 2011 Italy : 10th International Symposium on Biocatalysis, Giardini Naxos (ME), Sicily, October 2-6, 2011.

8. "Extremophile *Deinococcus geothermalis* as potential source of proteolytic enzymes,, **Pietrow O.**, Panek A., Synowiecki J. IV Congress of Polish Biotechnology and IV EUROBIOTECH "Four Colours of Biotechnology" Central European Congress of Life Sciences, Kraków, October 12th-15th 2011.
9. "Characterization of novel trehalose synthase from *Deinococcus geothermalis*,, Panek A., **Pietrow O.**, Synowiecki J. IV Congress of Polish Biotechnology and IV EUROBIOTECH "Four Colours of Biotechnology" Central European Congress of Life Sciences, Kraków, October 12th-15th 2011.
10. "Isolation and properties of recombinant trehalose synthase,, **Pietrow O.**, Panek A., Filipkowski P., Synowiecki J. 15th European Congress on Biotechnology: "Bio-crossroads", Sztambuł – Turcja, 23-26.09.2012.
11. "Enzyme immobilization on magnetic nanoparticles,, Panek A., **Pietrow O.**, Synowiecki J. 15th European Congress on Biotechnology: "Bio-crossroads", Sztambuł – Turcja, 23-26.09.2012.
12. "Production of trehalose in a single step enzymatic reaction,, Filipkowski P., Panek A., **Pietrow O.**, Wanarska M., Synowiecki J. 15th European Congress on Biotechnology: "Bio-crossroads", Sztambuł – Turcja, 23-26.09.2012.
13. "Example of utilization of permeabilized microbial cells,, **Pietrow O.**, Panek A., Synowiecki J. Bio-tech Conference 2012, Sopot 28-30.09.2012
14. "Immobilized biocatalysts – useful tool for industrial processes,, **Pietrow O.**, Panek A., Synowiecki J. Bio-tech Conference 2012, Sopot 28-30.09.2012

Doniesienia konferencyjne - wystąpienia ustne:

1. **Pietrow O.** "*Meiothermus ruber* cells as β -galactosidase activity biocatalyst,, 14th International Symposium of Students and Young Mechanical Engineers : "Advances in Chemical and Mechanical Engineering". Gdansk, 5th-7th May 2011.
2. **Pietrow O.** "Properties and applications of thermostable proteases sourced from *Deinococcus geothermalis*,, 15th International Symposium of Students and Young Mechanical Engineers : "Advances in Chemical and Mechanical Engineering". Gdansk, 16-19 May 2012.

Zgłoszenia patentowe:

1. "Sekwencja DNA, startery oligonukleotydowe, sekwencja DNA wraz z miejscami rozpoznawania dla enzymów restrykcyjnych NdeI i XhoI, wektor ekspresyjny i sposób jego otrzymywania, rekombinantowy szczep *Escherichia coli* Rosetta (DE3) pLysS i jego sposób otrzymywania oraz sposób wytwarzania białka rekombinantowego z metką oligohistydynową syntazy trehalozy (ST) *Deinococcus radiodurans* DSMZ 20539,, Filipkowski P., Synowiecki J., Licznarska K., **Pietrow O.**, Panek A. Zgłoszenie patentowe nr P.392388 z dn. 14.09.2010.
2. "Sekwencja DNA, startery oligonukleotydowe, sekwencja DNA wraz z miejscami

rozpoznawania dla enzymów restrykcyjnych NdeI i XhoI, wektor ekspresyjny i sposób jego otrzymywania, rekombinantowy szczep *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS i jego sposób otrzymywania oraz sposób wytwarzania białka rekombinantowego z metką oligohistydynową syntazy trehalozy (ST) *Deinococcus geothermalis* DSMZ 11300,., Filipkowski P., Synowiecki J., Felczykowska A., Panek A., **Pietrow O.**,. Zgłoszenie patentowe nr P.393026 z dn. 23.11.2010.

3. “Starter oligonukleotydowy, sekwencja DNA wraz z miejscami rozpoznania dla enzymów restrykcyjnych NdeI i XhoI, wektor ekspresyjny i sposób jego otrzymywania, rekombinantowy szczep *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS i jego sposób otrzymywania oraz sposób wytwarzania białka rekombinantowego syntazy trehalozy (ST) typu dzikiego *Deinococcus geothermalis* DSMZ11300,., Filipkowski P., Synowiecki J., Panek A., **Pietrow O.**,. Zgłoszenie patentowe nr P.397536 z dnia 22.12.2011.

Wyróżnienia i nagrody:

1. Beneficjent stypendium dla doktorantów ufundowane przez Pomorską Specjalną Strefę Ekonomiczną Sp. z o.o. oraz Gdański Park Naukowo-Technologiczny im. Hilarego Koprowskiego na kontynuację badań naukowych związanych z innowacyjnymi działaniami opisanymi w rozprawie doktorskiej.

2. Beneficjent stypendium dla doktorantów „INNODOKTORANT, Edycja V” współfinansowanego przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego oraz budżetu państwa i budżetu Samorządu Województwa Pomorskiego w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, Priorytetu VIII, Działania 8.2, Poddziałania 8.2.2: Regionalne Strategie Innowacji.

3. Beneficjent stypendium dla doktorantów w ramach projektu „Rozwój interdyscyplinarnych studiów doktoranckich na Politechnice Gdańskiej w zakresie nowoczesnych technologii” (POKL.04.01.01-00-368/09).

Udział w projektach badawczych:

1. Projekt badawczy nr N N312 306540 – “Otrzymywanie i właściwości immobilizowanego enzymu służącego do wytwarzania trehalozy,.,

2. Projekt badawczy nr N N312 258540 – “Wykorzystanie kolagenu i żelatyny izolowanych ze skór dorsza (*Gadus morhua*), łososia (*Salmo salar*) oraz suma afrykańskiego (*Clarias gariepinus*) do otrzymywania gąbek; mikrokapsulek i hydrożeli jako nośników enzymów,.,

3. Projekt badawczy nr N N312 1586 34 – “Rekombinowana syntaza trehalozy przydatna do wytwarzania cukru o szerokim spektrum zastosowań,.,

12. Piśmiennictwo

1. Adams M.W.W., Kelly R.M. (1994): Thermostability and thermoactivity of enzymes from hyperthermophilic archaea. *Bioorg. Med. Chem.*, 2: 659–667.
2. Adams R.P., Kendall E., Kartha K.K., (1990): Comparison of free sugars in growing and desiccated plants of *Selaginella lepidophylla*. *Biochem. Syst. Ecol.*, 18: 107–110.
3. Anderson, A., Nordan H., Cain R., Parrish G., Duggan D. (1956): Studies on a radioresistant micrococcus. I. Isolation, morphology, cultural characteristics, and resistance to gamma radiation. *Food Technol.* 10: 575–578.
4. Asahina E., Tanno K.S., (1964): A large amount of trehalose in a frost-resistant insect. *Nature* 204, 1222.
5. Augustynowicz J., Szaraniec B., Kaszycki P., Kołoczek H. (2004): Wpływ trehalozy na procesy stabilizacji biocenozy biopreparatu przeznaczonego do degradacji związków ropopochodnych. *Acta Sci. Pol.*, 3: 3-12.
6. Avonce N., Mendoza-Vargas M., Iturriaga G. (2006): Insights on the evolution of trehalose biosynthesis. *BMC Evol. Biotechnol.*, 6(109): 1-15.
7. Bär A. (2000): Trehalose produced by a novel enzymatic process. Materiały firmowe Bioresco Bioresearch Management and Consulting Ltd., Basel, UK.
8. Baross J.A., Holden J.F. (1996): Overview of hyperthermophiles and their heat-shock proteins. *Adv. Prot. Chem.*, 48: 1-34.
9. Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L. (2005): Strategie katalityczne, [w:] *Biochemia*, Warszawa, Wydawnictwo Naukowe PWN.
10. Bing T., Yuejin H., (2010): Carotenoid biosynthesis in extremophilic *Deinococcus-Thermus* bacteria. *Trends Microbiol.*, 18: 512-522.
11. Blasius M., Sommer S., Hübscher U. (2008): *Deinococcus radiodurans*: what belongs to the survival kit?. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 43(3): 221-38.
12. Branden C., Tooze J. (1999): An Example of Enzyme Catalysis: Serine Proteinases [w:] *Introduction to Protein Structure*, Garland Publishing, Inc., New York.
13. BRENDA - The Comprehensive Enzyme Information System. http://www.brenda-enzymes.org/php/result_flat.php4?ecno=5.4.99.16 (odczyt z dnia 01.05.2013)
14. Brim H., McFarlan S.C., Fredrickson J.K., Minton K.W., Zhai M., Wackett L.P., Daly M.J. (2000): Engineering *Deinococcus radiodurans* for metal remediation in radioactive mixed waste environments. *Nat. Biotechnol.* 18: 85–90.
15. Brzozowski B., Bednarkki W., Adamczak M. (2005): Biotechnologiczna modyfikacja biologicznych właściwości białek zbóż. *ZYWN.-Nauk Technol. Jakosc*, 4(45):17-26.
16. Burgess M.L., Barrow K.D., Gao C., Heard G.M., Glenn D. (1999): Carotenoid glycoside esters from the thermophilic bacterium *Meiothermus ruber.*, *J. Nat. Prod.*, 62: 859-863.
17. Cabib E., Lenoir L.F. (1958): The biosynthesis of trehalose phosphate. *J. Biol. Chem.*, 231: 259-275.

18. Chen Y.S., Lee G.C., Shaw J.F. (2006): Gene Cloning, Expression, and Biochemical Characterization of a Recombinant Trehalose Synthase from *Picrophilus torridus* in *Escherichia coli*. *J. Agric. Food Chem.*, 54: 7098-7104.
19. Clegg J.S., (1965): The origin of trehalose and its significance during the formation of encysted dormant embryos of *Artemia salina*. *Compar. Biochem. Physiol.*, 14: 135-143.
20. Cox M.M., Battista J.R. (2005): *Deinococcus radiodurans*-the consummate survivor. *Nat. Rev. Microbiol.*, 11: 882-92.
21. Crowe J.H., Hoekstra F.A., Crowe L.M. (1992): Anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.*, 54:579-599.
22. Crowe J.H., Carpenter J.F., Crowe L.M., Anchordoguy T.J., (1990): Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. *Cryobiology*, 27(3): 219-231.
23. Crowe J.H., Crowe L.M. (2000): Preservation of mammalian cells, learning of nature's tricks. *Nat. Biotechnol.*, 18: 145-147.
24. Crowe L.M. (2002): Lessons from nature: the role of sugar in anhydrobiosis. *Comp. Biochem. Phys. A*, 131: 505-513.
25. Daly M.J., Gaidamakova E.K., Matrosova Y.V. Vasilenko A., Zhai M., Venkateswaran A., Hess M., Omelchenko M.V., Kostandarithes H.M., Makarova K. S., Wackett L.P., Fredrickson J.K., Ghosal D. (2004): Accumulation of Mn(II) in *Deinococcus radiodurans* facilitates gamma-radiation resistance. *Science*, 306(5698): 1025-1028.
26. De Smet K.A., Weston A., Brown I.N., Young D.B., Robertson B.D. (2000): Three pathways for trehalose biosynthesis in mycobacteria. *Microbiol.*, 146: 199-208.
27. Donato M.E., Seleiro E.A, da Costa M.S. (1991): Polar lipid and fatty acid composition of strain of *Thermus ruber*. *Sys. Appl. Microbiol.*, 14: 234-239.
28. Drago G.A., Gibson T.D. (2001): Enzyme stability and stabilization: applications and case studies [w:] *Engineering and Manufacturing for Biotechnology*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
29. Duong T., Barrangou R., Russel W.M., Klaenhammer T.R. (2006): Characterisation of the *tre* locus and analysis of trehalose cryoprotection in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 1218-1225.
30. Eastmol P.J, Graham I.A. (2003): Is trehalose-6-phosphate a regulator of sugar metabolism in plants?. *J. Exp. Bot.*, 54: 533-537.
31. Elbein, A.D., Pan Y.T., Pastuszak I., Carroll D. (2003): New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology*, 13: 17-27.
32. Fakhafakh-Zouari N., Hmidet N., Haddar A., Kanoun S., Nasri M. (2010): A Novel Serine Metallokeratinase from a Newly Isolated *Bacillus pumilus* A1 Grown on Chicken Feather Meal: Biochemical and Molecular Characterization. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 162: 329-344.

33. Faraldo M. L., de Pedro M. A., Berenguer J. (1992): Sequence of the S-layer gene of *Thermus thermophilus* HB8 and functionality of its promoter in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 174: 7458–7462.
34. Ferreira A.C., Nobre M.F., Rainey F.A., Silva M.T., Wait R. (1997): *Deinococcus geothermalis* sp. nov. and *Deinococcus murrayi* sp. nov., two extremely radiationresistant and slightly thermophilic species from hot springs. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47: 939–947.
35. Fikus M. (1996): Ekstremofile. *Wiedza i życie*, 12: 60-62.
36. Fleming K., Hubel A. (2007): Cryopreservation of hematopoietic stem cells: emerging science, technology and issues. *Trans. Med. Hemother.*, 34: 268-275.
37. Fujita H., Yoshikawa M. (1999): LKPNM: A prodrug-type ACE-inhibitory peptide derived from fish protein. *Int. J Immunopharm.*, 44: 123–127.
38. Garcia-Carreño F.L. (1991): Proteases in food technology. *Biotechnology Education* 2(4): 150-153.
39. Garg A.K, Kim J.K., Owens T.G., Ranwala A.P., Choi Y.D., Kochian L.V., Wu R.J. (2002): Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *PNAS*, 99(25): 15898–15903.
40. Gödde C., Sahn K., Brouns J.J., Kluskens L.D., Oost J., Vos M., Antranikian D. (2005): Cloning and Expression of Islandisin, a New Thermostable Subtilisin from *Fervidobacterium islandicum*, in *Escherichia coli*. *App. Environ. Microbiol.*, 71(7): 3951-3958.
41. Gomes J., Steiner W. (2004): The Biocatalytic Potential of Extremophiles and Extremozymes. *Food Technol. Biotechnol.*, 42(4): 223–235.
42. Grajek W., Szymanowska D. (2008): Stresy środowiskowe działające na drożdże *Saccharomyces cerevisiae* w procesie fermentacji etanolowej. *Biotechnologia*, 3(82): 46-63.
43. Griffiths E., Gupta R.S. (2004): Distinctive protein signatures provide molecular markers and evidence from monohyletic nature of the *Deinococcus-Thermus* Phylum. *J.Bacteriol.*, 186: 3097-3107.
44. Griffiths E., Gupta R.S. (2007): Identification of signature proteins that are distinctive of the *Deinococcus –Thermus* phylum. *Int.Microbiol.*, 10: 201-208.
45. Gupta R., Beg Q.K., Lorenz P. (2002) Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59: 15-32.
46. Higashiyama T., (2002): Novel functions and applications of trehalose. *Pure Appl. Chem.*, 74: 1263–1269.
47. Horneck G., Baumstark-Khan C. (2001) : Hyperthermophilic Microorganisms, [w:] *Astrobiology – The Quest for the Conditions of Life*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Hong Kong, London, Milan, Paris, Tokyo.
48. Hottiger T.H., Schmutz P., Wiemken A. (1987): Heat-Induced Accumulation and Futile Cycling of Trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Bacteriol.*, 169(12): 5518-5522.

49. Hough D.W., Danson M.J. (1999): Extremozymes. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 3: 39–46.
50. Howden, G.F., Kilby B.A. (1956): Trehalose and trehalase in the locust. *Chem. Ind.(Lond.)*, 1453-1454.
51. <http://garciajeanlouis9051.perso.neuf.fr/aaBIV.html> (odczyt z dnia 29.08.2013)
52. <http://www.djibnet.com/photo/deinococcus+radiodurans/deinococcus-radiodurans-4478768633.html> (odczyt z dnia 29.08.2013)
53. Iwai S., Nakanishi-Ueda T., Armstrong D., Oguchi K. (2010): Zymographical Techniques for Detection of Matrix Metalloproteinases, [w:] *Advanced Protocols in Oxidative Stress I*, Human Press, Springer.
54. Jain N., Roy I. (2009): Effect of trehalose on protein structure. *Protein Sci.*, 18(1): 24–36.
55. Je J.Y., Park P.J., Kwon J.Y., Kim S. K. (2005): A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from Allaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. *J Agric. Food Chem.*, 52: 7842–7845.
56. Ji H.F. (2010): Insight into the Strong Antioxidant Activity of Deinoxanthin, a Unique Carotenoid in *Deinococcus Radiodurans*. *Int. J. Mol. Sci.*, 11: 4506-4510.
57. Johnvesly B., Naik G.R. (2001): Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. *Process Biochem.*, 37: 139-144.
58. Ju X., Sun Y., Wang Z., Cao C., Liu J., Jiang J. (2012): Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from *Streptomyces* sp. XZNUM 00004. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 28: 2479–2486.
59. Kafarski P., Lejczak B. (1994): Mechanizmy i stereochemia reakcji enzymatycznych [w:] *Chemia bioorganiczna*, Red. Jurkowska K., Warszawa, Wydawnictwo Naukowe PWN.
60. Kalisz H.M. (1988). Microbial proteinases. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 36: 17-55.
61. Kane M.S., Roth R. (1974): Carbohydrate metabolism during ascospore development in yeast. *J. Bacteriol.*, 118: 1-14.
62. Kempf B., Bremer E. (1998): Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolarity environments. *Arch. Microbiol.*, 170: 319–330.
63. Kim S.K., Choi Y.R., Park P.J., Choi J.H., Moon S.H. (2000): Screening of biofunctional peptides from cod processing wastes. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.*, 43: 225–227.
64. Kim S.K., Mendys E. (2006): Bioactive compounds from marine processing byproducts – A review. *Food Res. Int.*, 39: 383-393.
65. Koh S., Shin H.J., Kim J.S., Lee D.S., Lee S.Y. (1998): Trehalose synthesis from maltose by a thermostable trehalose synthase from *Thermus caldophilus*. *Biotechnol. Lett.*, 20: 757-761.

66. Kołakowski E. (2005): Enzymy i ich wykorzystanie w modyfikacji białek żywnościowych, [w:] *Enzymatyczna modyfikacja składników żywności*, Red. Kołakowski E., Bednarski W., Bielecki S., Szczecin, Wydawnictwo Akademii Rolniczej w Szczecinie.
67. Korzeniowska-Ginter R. (2009): Wpływ dodatku trehalozy na wybrane cechy jakościowe i trwałość bułek pszennych. *Nauka Przyr. Technol.* 3(4),#129.
68. Kosseva M.R., Irwin I.A. (2010): Enzyme in milk and cheese industries, [w:] *Enzymes in food processing: fundamentals and potential applications*, Red. Panesar P.S., Marwaha S.S., Chopra H.K, New Delhi, I.K. International Publishing House Pvt. Ltd.
69. Kouril T., Zaparty M., Marrero J., Brinkmann H., Siebers B. (2008): A novel trehalose synthesizing pathway in the hyperthermophilic Crenarchaeon *Thermoproteus tenax*: the unidirectional TreT pathway. *Arch. Microbiol.*, 190: 355–369.
70. Kristinsson H.G. (2007): Aquatic food protein hydrolysates, [w:] *Maximising the value of marine by-products*, Red. Shahidi F., Woodhead Publishing Ltd.
71. Kumar C.G., Talagi H. (1999). Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. *Biotechnol. Adv.*, 17: 561-594.
72. Liedert C., Peltola M., Bernhardt J., Neubauer P., Salkinoja-Salonenb M. (2012): Physiology of resistant *Deinococcus geothermalis* bacterium aerobically cultivated in low-manganese medium. *J. Bacteriol.*, 194(6): 1552–1561.
73. Lineweaver H., Burk D. (1934): The determination of enzyme dissociation constant. *J. Am. Chem. Soc.*, 56: 658-666.
74. Lins R. D., Pereira C. S., Hünenberger P.H. (2004): Trehalose–Protein Interaction in Aqueous Solution. *Proteins*, 55: 177–186.
75. Loginiva L.G., Egorova L.A., Golovacheva R.S., Seregina L.M. (1984): *Thermus ruber* sp. nov., nom. rev. , *Int. J. Syst. Bacteriol.* 498-499.
76. Loginova L.G., Egorova L.A. (1975): Obligate thermophilic bacterium *Thermus ruber* in hot springs of Kamchatka. *Mikrobiologiya*, 44:661-665.
77. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265–275.
78. Ma Y., Xue L., Sun D.W. (2006): Characteristic of trehalose synthase from permeabilized *Pseudomonas putida* cells and its application in converting maltose into trehalose. *J. Food Engineer.*, 77: 342-347.
79. Madigan M.T., Marris B. (1997): Extremophiles. *Scientific American*, 4: 82-87.
80. Makarova K.S., Aravind L., Wolf Y.I., Tatusov R.L., Minton K.W., Koonin E.V., Daly M.J. (2001): Genome of the extremely radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* viewed from the perspective of comparative genomics. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 65: 44-79.
81. Makarova K.S., Omelchenko M.V., Gaidamakova E.K., Matrosova V.Y., Vasilenko A., Zhai M., Lapidus A., Copeland A., Kim E., Land M., Mavromatis K., Pitluck S., Richardson P.M., Detter C., Brettin T., Saunders E., Lai B., Ravel B., Kemner K.M., Wolf Y.I., Sorokin A., Gerasimova A.V., Gelfand M.S., Fredrickson J.K., Koonin

- E.V., Daly M.J. (2007): *Deinococcus geothermalis*: The Pool of Extreme Radiation Resistance Genes Shrinks. *Plos one*, 9: 1-21
82. Matsuo T. (2004): Trehalose versus hyaluronan or cellulose in eyedrops for the treatment of dry eye. *Jpn. J. Ophthalmol.*, 48: 321–327.
83. Mesbah N.M., Hedrick D.B., Peacock A.D., Rohde M., Wiegel J (2007): *Natranaerobius thermophilus* gen. nov., sp. nov., a halophilic, alkalithermophilic bacterium from soda lakes of the Wadi An Natrun, Egypt, and proposal of *Natranaerobiaceae* fam. nov. and *Natranaerobiales* ord. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57: 2507–2512.
84. Miyaji T., Otta Y., Nakawa T., Watanabe T., Niimura Y., Tomizuka N. (2006): Purification and molecular characterization of subtilisin-like alkaline protease BPP-A from *Bacillus pumilus* strain MS-1. *Lett. Appl. Microbiol.*, 42: 242–247.
85. Murphy H.N., Stewart G.R., Mischenko V.V., Apt A.S., Harris R., McAlister M.S.B., Driscoll P.C., Young D.B., Robertson B.D. (2005): The OtsAB Pathway Is Essential for Trehalose Biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.*, 280(15): 14524-14529.
86. Nakada T., Ikegami S., Chaen H., Kubota M., Fukuda S., Sugimoto T., Kurimoto M., Tsujisaka Y. (1996): Purification and characterization of thermostable maltooligosyl trehalose synthase from the thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Biosci. Biotech. Biochemistry.*, 60(2): 263-266.
87. Naozumi T., Navzer D. Sachivala D., Shibata M. (2008): Trehalose and Trehalose-based Polymers for Environmentally Benign, Biocompatible and Bioactive Materials. *Molecules*, 13: 1773-1816.
88. NCBI (National Center for Biotechnology Information). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Tree&id=1297&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock> (odczyt z dnia 01.05.2013)
89. Nishimoto T., Nakada T., Chaen H., Fukuda S., Sugimoto T., Kurimoto M., Tsujisaka Y. (1996): Purification and characterization of a thermostable trehalose synthase from *Thermus aquaticus*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60: 835-839.
90. Nishimoto T., Nakada T., Chaen H., Fukuda S., Sugimoto T., Kurimoto M., Tsujisaka Y. (1997): Action of thermostable trehalose synthase from *Thermus aquaticus* on sucrose. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61(5): 898-899.
91. Nishimoto T., Nakano M., Nakada T., Chaen H., Fukuda S., Sugimoto T., Kurimoto M., Tsujisaka Y. (1996): Purification and properties of a novel enzyme, trehalose synthase, from *Pimelobacter* sp. R48. *Biosci. Biotech. Biochemistry.*, 60(4): 640-644.
92. Nobre M.F., Trüper H.G., da Costa, M.S. (1996): Transfer of *Thermus ruber* (Loginova et al. 1984), *Thermus silvanus* (Tenreiro et al. 1995), and *Thermus chliarophilus* (Tenreiro et al. 1995) to *Meiothermus* gen. nov. as *Meiothermus ruber* comb. nov., *Meiothermus silvanus* comb. nov., and *Meiothermus chliarophilus* comb. nov., respectively, and emendation of the genus *Thermus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46: 604–606.
93. Ohguchi M., Kubota N., Wada T., Yoshinaga K., Uritani M., Yagisawa M., Ohishi K., Yamagishi M., Ohta T. (1997): Purification and Properties of Trehalose-Synthesizing Enzyme from *Pseudomonas* sp. F1. *J. Ferment. and Bioeng.*, 84: 358-360.

94. Omelchenko M.V., Wolf Y.I., Gaidamakova E.K, Matrosova V.Y., Vasilenko A., Zhai M., Daly M.J., Koonin E.V., Makarova K.S. (2005): Comparative genomics of *Thermus thermophilus* and *Deinococcus radiodurans*: divergent routes of adaptation to thermophily and radiation resistance. *BMC Evolutionary Biology*, 5: 57.
95. Paiva C.L., Panek A.D. (1996): Biotechnological applications of the disaccharide trehalose. *Biotechnol. Annu. Rev.*, 2: 293–314.
96. Pan D., Hill A.P., Kashou A., Wilson K.A., Tan-Wilson A. (2011): Electrophoretic transfer protein zymography. *Anal. Biochem.*, 411: 277-283.
97. Pan Y.T., Koroth E.V., Jourdian W.J., Edmontson R., Carroll J.D., Pastuszak I., Elbein AD. (2004): Trehalose synthase of *Mycobacterium smegmatis*: purification, cloning, expression, and properties of the enzyme. *Eur. J. Biochem.*, 271(21): 4259-4269.
98. Pum D., Sleytr U.B. (1999): The application of bacterial S-layers in molecular nanotechnology. *Trends Biotechnol.* 17: 8–12.
99. Qu Q., Lee S.J., Boss W. (2004): TreT, a novel trehalose glycosyltransferase of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*. *J. Biol. Chem.*, 279: 47890-47897.
100. Quintela, J.C., Garcia-del Portillo F., Pittenauer E, Allmaier G., de Pedro M. A. (1999): Peptidoglycan fine structure of the radiotolerant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Sark. J. Bacteriol.*, 181: 334–337.
101. Rainey F.A., Nobre M.F., Schumann P., Stackebrandt E., da Costa M.S. (1997): Phylogenetic diversity of the Deinococci as determined by 16S ribosomal DNA sequence comparison. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47(2): 510-514.
102. Rajpurohit Y.S., Gopalakrishnan R., Misra H.S. (2008): Involvement of a protein kinase activity inducer in DNA double strand break repair and radioresistance of *Deinococcus radiodurans*. *J. Bacteriol.*, 190(11): 3948.
103. Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V. (1998): Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62(3): 597-635.
104. Rastall R. A., Maitin V. (2002): Genetic engineering: threat or opportunity for the dairy industry?. *Int. J. Dairy Technol.* 55: 161-165.
105. Rawlings N.D., Salvesen G.S (2013): Subtilisins, [w:] *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Academic Press, Elsevier, London, San Diego.
106. Rejs A. (2001): Biotechnologia składników żywności: Preparaty enzymów proteolitycznych, [w:] *Biotechnologia żywności*, Red. Bednarski W., Rejsa A., Warszawa, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne.
107. Richards A.B., Krakowka S., Dexter L.B., Schmid H., Wolterbeek D.H., Waalkens-Berendsen A., Shigoyuki M. (2002): Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies. *Food Chem. Toxicol.* 40: 871–898.
108. Ryu S.I., Park C.S., Cha J., Woo E.J., Lee S.B. (2005): A novel trehalose-synthesizing glycosyltransferase from *Pyrococcus horikoshii*: molecular cloning and characterization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 329: 429-436.

109. Saito T., Ohya Y., Ide H., Ohta S., Yamamoto, O. (1998): A carotenoid pigment of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Microbios*, 95: 79–90.
110. Sałek A. (2009). Biokorozja w przemysłowych systemach wodnych. Warunki powstawania korozji. *Przemysł fermentacyjny i owocowo-warzywny*, 10: 24-26.
111. Sarath G., Zeece M.G., Penheiter A.R. (2001): Protease assay methods, [w:] *Proteolytic enzymes: A practical approach*. IRL Press, Oxford, New York, Tokyo.
112. Satyanarayana T., Raghukumar C., Shivaji S. (2005): Extremophilic microbes: Diversity and perspectives. *Curr. Sci.*, 89: 78-90.
113. Schiraldi C., Di Lernia I., De Rosa M. (2002): Trehalose production: exploiting novel approaches. *Trends Biotechnol.*, 20(10): 420-425.
114. Schlegel H.G. (2000): *Mikrobiologia ogólna*. PWN, Warszawa
115. Schluempmann, H., van Dijken A., Aghdasi M., Wobbes B., Paul M., Smeekens S. (2004): Trehalose mediated growth inhibition of *Arabidopsis* seedlings is due to trehalose-6-phosphate accumulation. *Plant Physiol.*, 135: 879–890.
116. Sghaier H., Ghedira K., Benkahla A., Barkallah I. (2008): Basal DNA repair machinery is subject to positive selection in ionizing-radiation-resistant bacteria. *BMC Genomics*, 9(297): 1-7.
117. Sharp R.J., Williams R.A.D. (1988): Properties of *Thermus ruber* Strains Isolated from Icelandic Hot Springs and DNA:DNA Homology of *Thermus ruber* and *Thermus aquaticus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2049-2053.
118. Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. (1996): Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.*, 5(68): 850-858.
119. Shivanand P., Jayaraman G. (2009): Production of extracellular protease from halotolerant bacterium, *Bacillus aquimaris* strain VITP4 isolated from Kumta coast. *Process Biochem.*, 44: 1088-1094.
120. Simkhada J.R., Mander P., Cho S.S., Yoo J.C. (2010): A novel fibrinolytic protease from *Streptomyces* sp. CS684. *Process Biochem.*, 45: 88–93.
121. Singer M.A., Lindquist S. (1998): Multiple effect of trehalose on protein folding in vitro and in vivo. *Mol. Cell*, 1: 639-648.
122. Singer M.A., Lindquist S. (1998): Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. *Trends Biotechnol.*, 16: 460-468.
123. Singleton P. (2000): *Bakterie w biologii, biotechnologii i medycynie*. PWN, Warszawa.
124. Sinkiewicz I. (2008): *Użyteczność niektórych enzymów bakterii *Thermus ruber* w przetwórstwie sacharydów żywności - rozprawa doktorska wykonana w Katedrze Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności*.
125. Slade D., Lindner A.B., Paul G., Radman M. (2009): Recombination and replication in DNA repair of heavily irradiated *Deinococcus radiodurans*. *Cell*, 136: 1044–1055.
126. Slade D., Radman M. (2011): Oxidative stress resistance in *Deinococcus radiodurans*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 75(1): 133-191.

127. Šližyte R., Mozuraityte R., Martinem-Alvarez O., Falch E., Fouchereau-Peron M., Rustad T. (2009): Functional, bioactive and antioxidative properties of hydrolysates obtained from cod (*Gadus morhua*) backbones, *Process. Biochem.*, 44: 668-677.
128. Streeter J.G., Bhagwat A. (1999): Biosynthesis of trehalose from maltooligosaccharides in Rhizobia. *Can. J. Microbiol.*, 45: 716-721.
129. Subba Rao Ch., Sathish T., Ravichandra P., Prakasham R.S. (2009): Characterization of thermo- and detergent stable serine protease from isolated *Bacillus circulans* and evaluation of eco-friendly applications. *Process Biochem.*, 44: 262-268.
130. Sumantha A., Larroche C., Pandey A. (2006): Microbiology and Industrial Biotechnology of Food-Grade Proteases: A Perspective. *Food Technol. Biotechnol.* 44(2): 211-220.
131. Suzuki T., Tanaka K., Kinoshita S. (1969): The Extracellular Accumulation of Trehalose and Glucose by Bacteria Grown on n-Alkanes. *Agr. Biol. Chem.*, 33(2): 190-195.
132. Suzuki Y., Tsujimoto Y., Matsui H., Watanabe K. (2006): Decomposition of extremely hard-to-degrade animal proteins by thermophilic bacteria. *J. Biosc. Bioeng.*, 120: 73-81.
133. Synowiecki J. (2010): Some applications of thermophiles and their enzymes for protein processing. *Afr. J. Biotechnol.*, 9(42): 7020-7025.
134. Synowiecki J., Filipkowski P., Grubiak K., Sinkiewicz I., Szweda P. (2007). Technologia preparatów enzymatycznych pochodzenia mikrobiologicznego. Wydawnictwo Politechniki Gdańskiej, Gdańsk.
135. Synowiecki J., Jagielka R., Shahidi F. (1996): Preparation of hydrolysates from bovine red blood cells and their debittering following plastein reaction. *Food Chem.*, 57(3): 435-439.
136. Synowiecki J., Maciuńska J. (2000): Właściwości i przydatność β -galaktozydazy z różnych źródeł, *Biotechnologia*, 48: 117-123.
137. Synowiecki J., Sinkiewicz I. (2009): Charakterystyka bakterii rodzaju *Thermus* i ich przydatność w biotechnologii, *Biotechnologia*, 3: 148-162.
138. Synowiecki J., Zdziebło A. (2005): Funkcje fizjologiczne i możliwości zastosowań trehalozy. *Med. Wet.*, 61(1): 31-34.
139. Tae-Kyun K., Jun-Hyuck J., Hong-Yeon C., Heung-Shick L., Young-Wan K. (2010): Gene cloning and characterization of trehalose synthase from *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032. *Food Sci. Biotechnol.*, 19(2): 565-569.
140. Teramoto N., Sachinvala N.D., Shibata M. (2008): Trehalose and Trehalose-based Polymers for Environmentally Benign, Biocompatible and Bioactive Materials. *Molecules* 2008, 13: 1773-1816.
141. Thornley M.J., Horne R.W., Glauert A.M. (1965): The fine structure of *Micrococcus radiodurans*. *Arch. Mikrobiol.*, 51: 267-289.
142. Thumar J.T., Singh P.S. (2009): Organic solvent tolerance of an alkaline protease from salt-tolerant alkaliphilic *Streptomyces clavuligerus* strain Mit-1. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 36: 211-218.

143. Tian, B., Xu Z., Sun Z., Lin J., Hua Y. (2007): Evaluation of the antioxidant effects of carotenoids from *Deinococcus radiodurans* through targeted mutagenesis, chemiluminescence, and DNA damage analyses. *Biochim. Biophys. Acta*, 1770: 902–911
144. Tindall B.J., Sikorski J., Lucas S., Goltsman E., Copeland A., Del Rio T.G., Nolan M., Tice H., Cheng J., Han C., Pitluck S., Liolios K., Ivanova N., Mavromatis K., Ovchinnikova G., Pati A., Fährnich R., Goodwin L., Chen A., Palaniappan K., Land M., Hauser L., Chang J., Jeffries C.D., Rohde M., Göker M., Woyke T., Bristow J., Eisen J.A., Markowitz V., Hugenholtz P., Kyrpides N.C., Klenk H.P., Lapidus A. (2010): Complete genome sequence of *Meiothermus ruber* type strain (21T). *Stand. Genomic Sci.*, 3: 26-36.
145. Van Dijck P., Colavizza D., Smet P., Thevelein J.M. (1995): Differential importance of trehalose in stress resistance in fermenting and nonfermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells. *App. Environ. Microbiol.*, 61: 109–115.
146. Vieille C., Zeikus G. (2001): Hyperthermophilic enzymes: sources, uses and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 66: 1-43.
147. Wanarska M., Krawczyk B., Hildebrandt P., Kur J. (2011): RecA Proteins from *Deinococcus geothermalis* and *Deinococcus murrayi* - Cloning, Purification and Biochemical Characterisation. *BMC Molecular Biology*, 12(17): 1-13.
148. Wang J.H., Tsai M.Y., Chen J.J., Lee G.C., Shaw J.F. (2007): Role of the C-Terminal Domain of *Thermus thermophilus* Trehalose Synthase in the Thermophilicity, Thermostability, and Efficient Production of Trehalose. *J. Agric. Food Chem.*, 55(9): 3435-43.
149. Weisburg W.G., Giovanonni S.J., Woese C.R. (1989): The *Deinococcus-Thermus* phylum and the effect of rRNA composition on phylogenetic tree construction. *Syst. Appl. Microbiol.*, 11: 128-134.
150. Whatmore A.M., Reed R.H. (1990): Determination of turgor pressure in *Bacillus subtilis*: a possible role for K⁺ in turgor regulation. *J. Gen. Microbiol.*, 136: 2521-2526.
151. Wingler A. (2002): The function of trehalose biosynthesis in plants. *Phytochemistry*, 60: 437–440.
152. Wolska-Mitaszko B. (2001): Trehaloza – substancja przedziwna. Właściwości, występowanie, zastosowania. *Biotechnologia* 2(53): 36-50.
153. Womersley C., Smith L. (1981): Anhydrobiosis in nematodes. I. The role of glycerol, myo-inositol and trehalose during dessication. *Compar. Biochem. Physiol.*, 70: 579–586.
154. Wyatt G.R., Kalf G.F. (1957): The chemistry of insect hemolymph: II. Trehalose and other carbohydrates. *J. Gen. Physiol.*, 40: 833-847.
155. Xie G., Timasheff S.N. (1997): The thermodynamic mechanism of protein stabilization by trehalose. *Biophys Chem.*, 64(1-3): 25-43.
156. Xiuli W., Hongbiao D., Ming Y., Yu O. (2009): Gene cloning, expression, and characterization of a novel trehalose synthase from *Arthrobacter aurescens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 83: 477–482.

157. Yang Z. (2009): Hofmeister effects: an explanation for impact of ionic liquid on biocatalysis. *J. Biotechnol.*, 144: 12-22.
158. Yin L., Wang L., Lu H., Xu G., Chen H., Zhan H., Tian B., Hua Y. (2010): DRA0336, another OxyR homolog, involved in the antioxidation mechanisms in *Deinococcus radiodurans*. *J. Microbiol.*, 48: 473-479.
159. Yoshikawa Y., Matsumoto K., Nagata K., Sato T. (1994): Extraction of trehalose from thermally-treated baker's yeast. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58: 1226-1230.
160. Yuan Q., Hayashi A., Kitamura Y., Shimada T., Na R., Jin X. (2009): Purification and characterization of cold-adapted metalloprotease from deep sea water lactic acid bacteria *Enterococcus faecalis* TN-9. *Int. J. Biol.*, 1(2): 12-21.
161. Yue M., Wu X.L., Gong W.N., Ding H.B. (2009): Molecular cloning and expression of a novel trehalose synthase gene from *Enterobacter hormaechei*. *Microb. Cell. Factor.*, 8(34): 1-7.
162. Zambare V., Nilegaonkar S., Kanekar P. (2011): *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327: enzyme production and its partial characterization. *New Biotech.*, 28(2): 173-181.
163. Zdziebło A., Synowiecki J. (2005): Funkcje fizjologiczne i możliwości zastosowań trehalozy. *Medycyna Wet.*, 61(1): 31-34.
164. Zhang C., Wei J., Zheng Z., Ying N., Sheng D., Hua Y. (2005): Proteomic analysis of *Deinococcus radiodurans* recovering from gamma-irradiation. *Proteomics*, 5(1): 138-43.
165. Zhao H. (2005): Effect of ions and other compatible solutes on enzyme activity, and its implication for biocatalysis using ionic liquids. *J. Mol. Catal. B: Enz.*, 37: 16-25.
166. Zhu W., Cha D., Cheng G., Peng Q., Shen P. (2007): Purification and characterization of a thermostable protease from a newly isolated *Geobacillus* sp. YMTC 1049. *Enzyme Microb. Technol.*, 40: 1592-1597.
167. Zhu Y., Zhang J., Wei D., Wang Y., Chen X., Xing L., Li M. (2008): Isolation and identification of a thermophilic strain producing trehalose synthase from geothermal water in China. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72(8): 2019-2024.
168. Zhu Y., Wei D., Zhang J., Wang Y., Xu H., Xing L., Li M. (2010): Overexpression and characterization of a thermostable trehalose synthase from *Meiothermus ruber*. *Extremophiles*, 14(1): 1-8.

13. Skróty i oznaczenia stosowane w pracy

(v/v) - stosunek objętościowy

(w/v) - stosunek wagowo/objętościowy

ADP - adenozy-5'-difosforan

ang. - z angielskiego

BSA - (bovine serum albumin) albumina surowicy bydlęcej

Da - daltony

DMSO - dimetylosulfotlenek

DNA - kwas deoksyrybonukleinowy

DTT - ditiotreitrol

EDTA - kwas etylenodiaminotetraoctowy

HPLC - (high performance liquid chromatography) wysokosprawna chromatografia cieczowa

k_{cat} - stała katalityczna

kDa - kilodaltony

kGy - kilogrej

K_m - Stała Michaelisa

M - stężenie molowe (mol/dm^3)

Mpz - mega par zasad

OD - ang. Optical Density – gęstość optyczna

PCMB - *p*-chlorortęciobenzoesan sodu

PCR - ang. Polymerase Chain Reaction – Łańcuchowa Reakcja Polimerazy

PMSF - fluorek fenyloetylosulfonowy

ROS - (ang. reactive oxygen species) – reaktywne formy tlenu

rRNA - rybosomalny kwas rybonukleinowy

SDS - sól sodowa siarczanu (VI) dodecyłu

SDS-PAGE - (sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis) elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS

ST - α -D-glukozylotransferaza maltozy (synonim: syntaza trehalozy)

TCA - kwas trichlorooctowy

TEMED - N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina

TPP - fosfataza trehalozo-6-fosforanu

TPS - synteza trehalozo-6-fosforanu

TreT - glikozylotransferaza trehalozy

Tris - tris(hydroksymetylo)aminometan

Triton X-100 - eter glikolu polietylenowego i *p*-t-oktylofenolu o wzorze $C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$, gdzie $n=9-10$

Tween 80 - nazwa handlowa monooleinianu polioksyetylenosorbitolu

U - ang. Units - jednostka aktywności

UDP - urydono-5'-difosforan

Projekt jest współfinansowany przez Pomorską Specjalną Strefę Ekonomiczną Sp. z o. o. oraz Park Naukowo-Technologiczny im. Hilarego Koprowskiego.



Praca badawcza realizowana w ramach projektu systemowego „InnoDoktorant – stypendia dla doktorantów, V edycja”. Projekt jest współfinansowany przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Społecznego (Program Operacyjny Kapitał Ludzki, Priorytet VIII, Działanie 8.2, Poddziałanie 8.2.2: „Regionalne Strategie Innowacji”).



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY

