

SLEDOVANIE AKTIVITY PROTEOLYTICKÝCH ENZÝMOV U MIKRO-ORGANIZMOV IZOLOVANÝCH Z MRAZENÉHO MÄSA (II) MANOMETRICKÉ STANOVENIE AKTIVITY A Q_{10} PEPTIDÁZ NA DIGLYCÍNOVOM A TRIGLYCÍNOVOM SUBSTRÁTE

J. ARPAI, Z. LIFKOVÁ

Mikrobiologické oddelenie Výskumného ústavu mraziarskeho v Bratislave

Spozorovali sme, že baktérie izolované z mrazeného mäsa majú v porovnaní s mikroorganizmami rovnakého druhu, zistenými na mrazenom mäse, v mnohých prípadoch zvýšenú enzymatickú aktivitu. Tento úkaz sme kvantitatívne sledovali na základe merania aktivity baktériových dipeptidáz. Súčasne sme zistili, že u psychrofilných mikroorganizmov hodnota teplotného koeficienta (Q_{10}) dipeptidázovej aktivity klesá pomalšie než u mezofilov [3]. Predbežne sa nechceme púšťať do výkladu pozorovaných javov, ktorých mechanizmus môže spočívať jednak na fyzikálnych procesoch, najmä na kryolýze molekulových zhlukov a na zvýšení permeability bunkovej blany, jednak na biologickom princípe, najmä na selekcii fyziologicky silnejších, resp. pre podmienky prostredia lepšie adaptovaných jedincov. Predloženou prácou chceme iba preveriť, do akej miery možno aplikovať závery z predchádzajúcich pokusov. Pre tento účel sme brali na pokusy popri kmeňoch použitých za predchádzajúceho sledovania aj novoizolované baktériové kmene príslušných druhov, menili sme i chemické zloženie substrátov, použili sme odlišné metódy a teploty pri inkubácii a najmä inú metódu na stanovenie peptidázovej aktivity. Vplyv prípravy enzymatickej látky na jej aktivitu sme v predloženej práci ešte nesledovali.

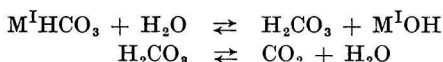
Okrem klasickej metódy alkoholovej titrácie uvoľnených aminokyselín, ktorú sme aplikovali v prvej časti práce, odporúča sa manometrické a chromatografické, prípadne elektroforetické stanovenie enzymatického štiepenia peptidov. Na tento účel sme si v tejto časti zvolili manometrickú metódu za použitia Warburgovho aparátu.

Voľba manometrickej metódy

Manometrické stanovenie peptidázovej aktivity možno podľa A. Kleinzellera a spolupracovníkov [7] vykonať metódami, ktoré na základe ich princípu možno rozdeliť do dvoch skupín. Jedna skupina zahrnuje metódy, pri ktorých sa využije špecifická schopnosť niektorých enzýmov dekarboxylovať alebo oxydatívne dezaminovať voľné *l*-aminokyseliny, kým viazané sa neatakujú. Pri použití *l*-aminodekarboxyláz sa meria proporcionálna tvorba CO_2 , a naopak stanovuje sa spotreba O_2 , ak sa použije oxydáza, a to najmä ophiooxydáza *l*-aminokyselín, ktorá sa pripravuje podľa E. A. Zellera a A.

Maritza [13]. Na základe orientačných pokusov sme zistili, že tieto metódy dávajú síce rýchle výsledky, avšak ich nevýhodou je, že príprava alebo zaobstarávanie špecifických enzýmov naráža na ťažkosti. Od použitia týchto metód sme však odhliadli predovšetkým z toho dôvodu, že sme pri pokusoch nemohli vylúčiť rušivú interferenciu s voľnými aminokyselinami, ktoré sa dostali do média nezávisle od sledovanej peptidázovej aktivity.

Druhá skupina metód sa vyznačuje tým, že sa pomocou nich merajú zmeny parciálneho tlaku CO_2 v rovnováhe so systémom vytváraným roztokom fyziologického množstva hydrokarbonátov nasýteného CO_2 , v ktorom pri štiepení peptidov dochádza k zmenám aktuálnej acidity. Podľa toho, či sa zvyšuje alebo znižuje koncentrácia iónov H^+ v roztoku, reagujú hydrokarbonáty v médiu podľa rovnice

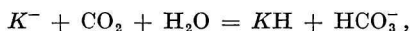


sprava na ľavú alebo zľava na pravú stranu. V prípade, že sa zvyšuje koncentrácia iónov H^+ , reagujú tieto s HCO_3^- a spôsobujú priebeh reakcie doprava, čím sa uvoľňuje množstvo CO_2 odpovedajúce prvej disociačnej konštante:

$$K_1 = \frac{[\text{H}^+] \cdot [\text{HCO}_3^-]}{[\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{CO}_3]} = 4,01 \cdot 10^{-7}$$

podľa H. Remyho [9]. V opačnom prípade, t. j. pri znížení koncentrácie iónov H^+ prebieha reakcia doľava, čo sa prejavuje absorpciou CO_2 , resp. poklesom p_{CO_2} v uzavretom systéme.

Pri štiepení peptidov dôjde vlastne k alkalizácii prostredia, lebo peptidy sú silnejšie kyseliny než aminokyseliny, z ktorých sa skladajú. Napríklad dipeptid alanylglycín je pri fyziologickej koncentrácii iónov H^+ disociovaný na 20—60 %, kým alanín a glykokol len približne na 1—4 % [8]. Znamená to, že pri štiepnej reakcii sa z média strácajú kyslé anióny. Ak reakcia prebehne vo fyziologickom, CO_2 obsahujúcom roztoku, kyslé anióny (K^-) reagujú s CO_2 podľa rovnice



takže štiepenie peptidov je spojené s poklesom p_{CO_2} . Avšak na to, aby sa z úbytku p_{CO_2} dalo vypočítať množstvo štiepených peptidov, treba prihliadať na to, že 1. časť peptidov je nedisociovaných a stráca sa bez vplyvu na p_{CO_2} ; 2. aminokyseliny, ktoré vznikajú pri štiepení, nie sú neutrálne a takisto vyvolávajú určité zmeny p_{CO_2} .

Preto treba manometrické merania robiť v dvoch nádobách, z ktorých v jednej (I) je známe množstvo peptidov a v druhej (II) je ekvivalentné množstvo štiepných produktov. V oboch nádobách sa meria p_{CO_2} . Rozdiel týchto tlakov sa rovná tlaku, ktorý prináleží štiepnej reakcii pridávaných peptidov.. Opätovnému dvojnásobnému meraniu sa však možno vyhnúť na základe

toho, že medzi reagujúcim množstvom peptidov p_{CO_2} , je za konštantných pokusných podmienok, t. j. aj pre tú istú nádobu, prakticky proporcionálny vzťah, vyjadrený tzv. proporcionálnym faktorom alebo konštantou. To znamená, že pri každej zmene pokusných podmienok treba konštantu opätovne stanoviť najmä v závislosti od zloženia a koncentrácie peptidov, hydrokarbonátu a voľného CO_2 , od objemu nádoby a teploty, pritom však prakticky nezávisle od p_{CO_2} . Pri stanovovaní, resp. výpočtoch vychádzame z rozdielov p_{CO_2} medzi nádobou I a II (t značí tlak p_{CO_2}):

$$t = t_{\text{II}} - t_{\text{I}},$$

ktoré stanovíme pre niekoľko koncentrácií peptidov (m_1, m_2, m_3) ležiacich kvantitatívne v blízkosti množstva peptidov použitých na pokusy. Potom sa jednotlivé hodnoty m delia príslušnými hodnotami t , pričom sa zistí, že pri zachovaní pokusných podmienok je podiel m/t takmer konštantný, takže pre praktické účely platí:

$$m = k \cdot t$$

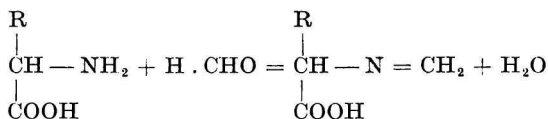
Ak sa pre podmienky, za ktorých sa pracuje, vopred pokusne stanoví konštantna k , meraním tlaku, ktorý vzniká pri štiepení, možno zistiť množstvo štiepených peptidov.

V prípadoch, keď sa pracuje s jednoduchými roztokmi, ktorých zloženie je fyzikálno-chemicky zanedbateľné, akými sú napríklad jednoduchý hydrokarbonátový alebo Ringerov roztok (NaHCO_3 0,01 %; KCl 0,075 %; CaCl_2 0,01 %; NaCl 0,60 %), stačí stanoviť jednorazové rozdiely:

disociačná konštantna peptidu: prvá disociačná konštantna CO_2 , kyslá disociačná konštantna aminokyseliny: prvá disociačná konštantna CO_2 ,

aby sa z nich vypočítala konštantna nádoby pri jej daných rozmeroch a pri nemenných pokusných podmienkach.

Reakcie pri štiepení peptidov možno však upraviť aj tak, aby pri uvoľňovaní aminokyselín došlo ku kvantitatívnemu okysleniu prostredia tým, že alkalicky reagujúce aminokyseliny sa pridaním formaldehydu — podobne ako pri formolovej titracii — prevedú na metylénové zlúčeniny, v ktorých aminogrupina už nemá bázičný charakter, a to podľa rovnice:



Týmto vyvolané zníženie pH má za následok, že v prostredí hydrokarbonátového roztoku nasýteného CO_2 vzniká reakcia opačného smeru než v predchádzajúcom prípade, keď došlo k poklesu kyslých aniónov. To znamená, že pri tomto pracovnom postupe mierou štiepenia peptidov bude uvoľňovanie CO_2 , resp. zvýšenie p_{CO_2} v uzavretom systéme. Túto metódu rozpracovali

s osobitným zreteľom na sledovanie peptidázovej aktivity mikroorganizmov R. M. Johnstone a J. H. Quastel [5, 6].

Na základe orientačných pokusov sme zistili, že medzi manometrickými metódami je posledne uvedená pre naše pokusné práce najvhodnejšia. Predovšetkým preto, že podobne ako pri titrácii karboxylového prírastku, ktorú sme použili v predchádzajúcej časti práce [3], možno aj pri tejto metóde vylúčiť rušivý vplyv aminokyselín voľne prítomných v médiu ešte pred pôsobením enzýmu na substrát. Výhodou je i to, že štiepna reakcia a jej stanovenie nemusí prebiehať súčasne, resp. za rovnakých podmienok. Táto metóda napríklad umožňuje, aby enzým pôsobil za rôznych podmienok a po ľubovoľne dlhý čas na substrát, čo si vyžadujú najmä pokusy na sledovanie enzymatickej účinnosti pri nízkych teplotách, pričom samotným manometrickým meraním proteázového účinku, resp. množstva štiepných produktov možno začať v ktoromkoľvek okamihu prídávaním formaldehydu do uzavretého systému. Okrem toho publikovali uvedení autori tohto pracovného postupu podrobné pomocné údaje, čo tiež uľahčuje prácu.

Experimentálna časť

Materiál

Mikroorganizmy, ktoré sme použili na pokusy, boli podľa svojej druhej príslušnosti opäť tie isté, s ktorými sme pracovali pri predchádzajúcich pokusoch [3], t. j. *Bacillus mesentericus*, *Clostridium sporogenes*, *Proteus vulgaris*, *Achromobacter liquefaciens* a *Pseudomonas carnea*, s výnimkou na poslednom mieste uvedeného kmeňa, ktorý sme vypustili z ďalšieho sledovania so zreteľom na to, že nemá jednoznačne vyznačenú taxonómiu. Nahradili sme ho psychrofilným kmeňom *Pseudomonas fluorescens*. U všetkých druhov testorganizmov s výnimkou posledne uvedeného kmeňa, t. j. *Pseudomonas fluorescens*, ktorý sme novopribrali do pokusu, sledovali sme starší, asi jednoročný izolát, resp. kultúru, ktorú sme použili už pri našich predtým uverejnených prácach, ako aj druhove zodpovedajúci nový izolát, zachytený na minimálnej pôde, ktorý sme v čase pokusov raz, nanajvýš dvakrát preočkovali. Ako minimálnu pôdu označujeme médium chudobné na živiny, na ktorom vyrástli iba izoláty nepoškodené vplyvom nízkych teplôt. Bližšie údaje o tom uvádzame na inom mieste [1]. Staršie izoláty sa udržiavali jednodesačným pravidelným preočkovávaním, pričom po trojdennej inkubácii pri optimálnej teplote sa kultúry uložili do chladničky (-2°C).

Príprava baktériovej suspenzie.

Mikroorganizmy sa rozmnožili v 2 l bujónu. Propagácia sa robila pri optimálnej teplote rastu, ktorú sme pre jednotlivé kmene uviedli v prvom oznámení, kde sú opísané aj ostatné podstatné metodické podmienky prípravy baktériovej suspenzie. Potom sme baktériovú biomasu odstredili a premývali fyziologickým roztokom. Ako enzymaticky účinný materiál sme použili intaktné baktériové bunky alebo z nich extrahovaný bezbunkový komplexný enzymatický preparát. Na základe výsledkov z predchádzajúcej časti našej práce sme odhliadli od ďalšieho sledovania enzymatickej aktivity supernatantnej tekutiny, t. j. enzýmov nachádzajúcich sa v médiu po odstredení buniek. Na tomto mieste treba zdôrazniť, že sa pri všetkých pokusoch — na to sa zda dostatočne nepoukázalo v predchádzajúcej časti práce — robili súbežné merania bez prídavku pepti-

dového substrátu do média. To umožnilo popri stanovení endogénnej respirácie súčasne vylúčiť rušivé vplyvy založené na prítomnosti živých mikróbov, ako aj peptidov a aminokyselín, ktoré sa do média mohli dostať z kultivačnej pôdy a autolyzovaných buniek.

Komplexný bezbunkový extrakt sme pripravili obdobne, ako sme to opisali v prvom oznámení, t. j. rozdrvením prepranej baktériovej biomasy (2—5 g) pomocou rozmiešania v sklenom piesku. Pomer biomasy k piesku bol asi 1 : 3.

Treba ešte poznamenať, že sa súbežne pripravil aj extrakt ozvučením biomasy ultrazvukom. O tejto práci podáme zprávu na inom mieste.

Metodický postup manometrického merania

Vychádzali sme z prípravy substrátov. Roztok diglycínu slúžil ako dipeptidický substrát, roztok triglycínu ako aminopolypeptid. Základné roztoky peptidov sme pripravili o koncentrácii 0,066 M. Z nich sme pipetovali 0,3 ml do hlavného priestoru Warburgovej nádoby. Tam sme pridali aj 0,2 ml roztoku kyslého uhličitanu sodného o koncentrácii 0,28 M, čím sme pH média nastavili na 7,3—7,4. Z enzymaticky účinnej látky, t. j. mikróbovej suspenzie alebo bezbunkového extraktu skúšaných mikroorganizmov vo fyziologickom roztoku sme dali 2 ml do hlavného priestoru. Do bočného ramena Warburgovej nádoby sme umiestili 0,7 ml formolového roztoku. Pripravili sme ho tým spôsobom, že sme 90 ml čistého formaldehydu alkalizovali do takej miery, aby pridaním dvoch kvapiek fenoltlaidínu vzniklo slabo červené sfarbenie. Po riedení 100 ml vody sme pridali 3 g aktívneho živočíšneho uhlia, pretrepli a filtrovali. Číry filtrát sme prefukovali plynou zmesou 7 % CO₂ a 93 % N₂. Pri príprave plynnej zmesi sme postupovali podľa návodu A. Kleinzellera [7]. Chemicky čistú, t. j. pomocou CO₂ už vopred vypláchnutú bombu sme výevou evakovali na 720 mm Hg a potom sme zaviedli z druhej bomby N₂ (chemicky čistý z ostravskej dusikárne), až ortuť opäť klesla na nulu. Túto operáciu sme opakovali. Pri prvej evakuácii zostalo v bombe 4 % pôvodne prítomného vzduchu, čo je dané rozdielom atmosferického tlaku 750 mm Hg a 720 mm Hg. Pri druhej evakuácii sa koncentrácia vzduchu opäť zmenšila 25 krát, čím klesol tlak na 0,1 % celkového množstva plynu v bombe, to znamená, že koncentrácia prítomného O₂ bola 0,02 %. Potom sa evakoval na 7 × 7,5 = 52,5 mm Hg a vpustil sa CO₂, až sa ortuť vrátila na nulu.

Preplynovaný formolový roztok sa uchovával v dobre uzavretých fľaštičkách na tmavom mieste nie dlhšie než po dobu jedného týždňa.

Pred preliatím formolového roztoku z bočného ramena do hlavného priestoru sa preplynoval aj obsah Warburgovej nádoby uvedenou plynou zmesou. Po vyrovnaní teploty na 37 °C sa zmiešal obsah nádoby a začalo sa s meraním vývoja plynu. Za opísaných metodických podmienok bola výsledná koncentrácia peptidov v substráte 0,0066 M. Vývoj plynu sa sledoval pri 37 °C. Merania sa ukončili, keď sa viac nemenil objem plynu, najskôr však po 60 minútach. Pri pokusoch na stanovenie Q₁₀ sa teplota inkubácie líšila od teploty merania, t. j. reakcia enzýmu so substrátom prebiehala v tomto prípade pri 7 °C. Takto získané výsledky uvedené do vzťahu s výsledkami meraní pri 37 °C umožnili výpočet priemernej hodnoty Q₁₀ v uvedenom rozpätí teplôt podľa rovnice

$$Q_{10} = \sqrt{\frac{x(\mu\text{M}) \text{ pri } 37^\circ\text{C}}{x(\mu\text{M}) \text{ pri } 7^\circ\text{C}}}$$

pričom $x(\mu\text{M})$ značí množstvo štiepeného substrátu vyjadrené v μM .

Súbežne s každým pokusom sme nasadili aj kontroly, ktoré neobsahovali peptidový substrát. Kontrolné hodnoty, ktoré indikovali endogénnu respiráciu a prítomnosť už uvedených rušivých činiteľov vyplývajúce z neprečistenej enzymatickej látky, odpočítali sa od výsledkov merania enzým—substrátovej reakcie.

Výpočet peptidázovej aktivity

Autori metodiky [5] už poukázali na to, že pri pokusoch nikdy nenamerali vývoj takého množstva plynu, ktorý by odpovedal kvantitatívnej reakcii medzi formolom a aminoskupinami. Zistili však reprodukovateľný rovnovážny stav, ktorý bol charakteristický pre jednotlivé substráty, t. j. peptidy alebo aminokyseliny, resp. pre ich chemické zloženie, za inak konštantných pracovných podmienok. Pre tento rovnovážny stav sa dala vypočítať konštanta tým spôsobom, že množstvo plynu, ktorého vývoj sa dal očakávať na základe teoretického výpočtu, keď jednej voľnej skupine NH_2 odpovedá vznik jedného mólu CO_2 , delí sa množstvom plynu, ktorý sa pri reakcii skutočne namerá.

Na tomto základe sa pre substráty, s ktorými sme pri našich pokusoch pracovali, t. j. pre diglycín a triglycín, vypočítali formolové rovnovážne konštanty (K_F) o priemernej hodnote 1,55 pre dipeptid a 1,81 pre tripeptid, kým pre ich štiepny produkt, t. j. glycín, vypočítala sa hodnota 1,19.

Pri samotnom výpočte miery hydrolyzy sa vychádzalo z teoretických a skutočných hodnôt vývoja plynu pri reakcii formolu s peptidom a jeho príslušným štiepnym produktom, t. j. zo vzťahu produkcie CO_2 pri formolovej reakcii diglycínu, resp. triglycínu a ich glycínovej zložky. Postupuje sa pri tom na základe matematickej úvahy, že $x \mu\text{M}$ dipeptidu, resp. tripeptidu sa hydrolyzuje za čas t ; ak sa počiatočné množstvo peptidov označí A , platí $t = (A - x) \mu\text{M}$. Ak za $A \mu\text{M}$ dosadíme pokusne nameranú hodnotu $\mu\text{l CO}_2$, ktorá nech je označená ako $n \mu\text{l CO}_2$, platí, že vývoj plynu odpovedajúci hodnote $\frac{n(A-x)}{K_{F_p}}$ prináleží príslušnému peptidovému substrátu, pričom K_{F_p} je odpovedajúca rovnovážna konštanta peptidu. Naproti tomu štiepny produkt, t. j. glycín, dáva v porovnaní s diglycínom dvojnásobné, resp. triglycínom trojnásobné množstvo μM plynu, t. j. $2nx \mu\text{l CO}_2$, resp. $3nx \mu\text{l CO}_2$. Táto hodnota sa opäť delí príslušnou rovnovážnou konštantou aminokyseliny K_{F_a} , t. j. konštantou pre glycín, ktorá udáva objem CO_2 prislúchajúci množstvu glycínu uvoľneného v dôsledku hydrolyzy. Ak celkový objem plynu uvoľneného za čas t po pridaní formolu označíme ako V_t , jeho hodnota bude:

$$V_t = \frac{n(A-x)}{K_{F_p}} + \frac{2 \text{ krát (resp. 3 krát) } nx}{K_{F_a}} \mu\text{l}$$

Rozdiel medzi objemom plynu nameraným za čas t a na začiatku pokusu, resp. reakcie bude podľa toho

$$\begin{aligned} V_t - V_0 &= \frac{n(A-x)}{K_{F_p}} + \frac{2 \text{ krát (3 krát) } nx}{K_{F_a}} - \frac{nA}{K_{F_p}} \mu\text{l} \\ &= x \left[\frac{2 \text{ krát (3 krát) } n}{K_{F_a}} - \frac{nA}{K_{F_p}} \right] \mu\text{l} \\ x &= \frac{V_t - V_0}{\frac{2 \text{ krát (3 krát) } n}{K_{F_a}} - \frac{nA}{K_{F_p}}} \mu\text{M} \end{aligned}$$

Týmto spôsobom sa vypočíta množstvo mikromólov peptidu hydrolyzovaných za čas t .

Číselné hodnoty n sa stanovili na základe množstva CO_2 , ktoré sa nameralo, resp. uvoľnilo zo zmesi peptidu a glycínu. Napríklad pre triglycín a glycín sa nameralo priemerne $342 \mu\text{l CO}_2$. Vypočítané množstvo pre triglycín je $440 \mu\text{l CO}_2$ a pre glycín $120 \mu\text{l CO}_2$, z čoho pre zmes teoreticky vyplýva celkový vývoj plynu $560 \mu\text{l}$. Po vydelení príslušnou formolovou konštantou odpovedá $244 \mu\text{l CO}_2$ pre peptid a $100 \mu\text{l CO}_2$ pre glycín, t. j. ich súčet $344 \mu\text{l CO}_2$. Pre diglycín a glycín sa nameralo v priemere $212 \mu\text{l CO}_2$, kým

výpočtom vychádza 209 $\mu\text{l CO}_2$. Týmto spôsobom sa preverili formolové rovnovážne konštanty.

Uvedené výpočty spočívajú na predpoklade, že triglycín je úplne hydrolyzovaný na glycín. Pre takýto predpoklad oprávňuje známa skutočnosť, že diglycín sa baktériovými dipeptidázami hydrolyzuje rýchlejšie než triglycín, ako aj skúsenosť, že proteolytické komplexy s aminopolypeptidázovým účinkom sú vždy schopné štiepiť dipeptidázy. Potvrdili sme si to i vlastnými pokusmi, pri ktorých sme sledovali hydrolyzu peptidov pomocou chromatografie, o čom chceme referovať v ďalšej práci.

Oddelená inkubácia

Opísaný pracovný postup sme použili za pokusných podmienok, keď uvoľnený plyn ako miera peptidázovej aktivity sa meral súčasne s priebehom enzým—substrátovej reakcie, t. j. s inkubáciou. Takto sme určili, resp. porovnávali peptidázovú aktivitu sledovaných kmeňov. V prípade, že sme túto reakciu chceli nechať prebehnúť za osobitných podmienok, napríklad za aerobiózy, za zníženej teploty a i., bolo potrebné oddeliť inkubáciu od vlastného manometrického merania. Pri tom sa ukázalo výhodným inkubáciu uskutočniť už vo Warburgových nádobách, t. j. v samotnom aparáte. V tomto sa metodikou určené teploty dosiahli a udržiavali tým spôsobom, že sa termostabilizačný kúpel napojil na ultratermostat UT 12/1 značky „Horyzont“, ktorý s náplňou mraziacej zmesi obsahujúcej tuhý CO_2 v metylalkohole je schopný zabezpečiť prostredie až po -78°C . Pri tu uvedených pokusoch sme však okrem základnej teploty 37°C aplikovali iba inkubáciu pri 7°C .

Pri aeróbnej inkubácii sa baktériové bunky suspendovali, resp. enzymatický extrakt sa pripravil v 0,02 M fosforečnane sodnom ako tlmivom roztoku (pH 7,4). Plynúnu fázu tvoril vzduch a vznikajúci CO_2 sa zachytil na KOH, ktorého 20 % roztok v množstve 0,2 ml sa nachádzal v absorpčnom kalíšku. Takýmto spôsobom sa inkubovali všetky enzymaticky účinné agensy, s výnimkou suspenzie a extraktu z kultúry *Clostridium sporogenes*, ktoré sa inkubovali za anaerobiózy, t. j. v prostredí 0,028 M roztoku NaHCO_3 a za podmienok, ktoré sa nelíšili od tých, za ktorých sa robilo vlastné manometrické meranie p_{CO_2} . Po ukončení inkubácie sa podmienky upravili pre manometrické meranie. Ak sa pracovalo s bunkovými suspenziami, baktérie sa odstránili centrifugovaním. Obsah Warburgových nádobiek sa za tým účelom preliat do kyviet a vypláchol sa 1 ml tlmivého roztoku, ktorý sa takisto priliat, resp. zmiešal s obsahom kyvety na odstredenie. V odstredenej tekutine sa merala proteolýza opäť vo Warburgovom aparáte po pridaní formolového roztoku. Množstvo materiálu na inkubáciu sme zvolili tak, aby po pridaní vyplachovacej tekutiny obsah jednej inkubačnej nádoby sa mohol rozdeliť do dvoch nádob na meranie. Táto operácia samozrejme odpadla, ak sa pracovalo s bezbunkovými extraktmi.

Štatistické hodnotenie výsledkov

Každé meranie sa robilo dvojmo; v prípade, že rozdiel bol menší než 10 %, bral sa ich aritmetický priemer. Významnosť výsledkov sa hodnotila *t*-testom podľa Studenta [10]. Ako signifikantné sa označujú výsledky pokusov, pri ktorých vypočítaná *t*-hodnota, resp. pravdepodobnosť, žeby sa zhodovali s výsledkami porovnávaných, resp. kontrolných pokusov, je menšia než 5 : 100 ($P < 0,05$).

Výsledky

Výsledky stanovenia peptidázovej aktivity sledovaných baktérií, resp. ich bezbunkových extraktov na diglycínovom a triglycínovom substráte, za metodicky podmienených pomerov, sú zostavené do tab. I.

Tabuľka 1

Peptidázová aktivita vyjadrená v μM hydrolyzovaného peptidu za 1 hod. pri inkubačnej teplote 37 °C																
Substrát	diglycín								triglycín							
Enzymatická látka	bunková suspenzia				bezbunkový preparát				bunková suspenzia				bezbunkový preparát			
Kmeň (izolát)	starší z mäsa		čerstvý z mäsa		starší z mäsa		čerstvý z mäsa		starší z mäsa		čerstvý z mäsa		starší z mäsa		čerstvý z mäsa	
	mraz.	nemraz.	mraz.	nemraz.	mraz.	nemraz.	mraz.	nemraz.	mraz.	nemraz.	mraz.	nemraz.	mraz.	nemraz.	mraz.	nemraz.
Číslo stĺpca	1	1a	2	2a	3	3a	4	4a	5	5a	6	6a	7	7a	8	8a
<i>Bacillus mesentericus</i> (I)	2,07	1,69	2,68	2,33	2,84	2,94	3,10	3,02	1,84	1,82	2,84	2,06	2,00	1,89	2,92	2,75
<i>Clostridium sporogenes</i> (II)	2,42	—	4,35	4,06	2,86	—	5,34	5,20	1,45	—	1,93	1,48	2,23	—	3,88	3,81
<i>Proteus vulgaris</i> (III)	3,23	3,11	5,14	4,35	4,08	4,15	6,18	5,86	2,64	2,50	3,92	3,42	3,62	3,74	4,82	4,70
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (IV)	—	—	4,03	3,55	—	—	4,64	4,43	—	—	3,74	3,15	—	—	4,54	4,17
<i>Achromobacter liquefaciens</i> (V)	3,03	—	3,90	—	4,02	—	5,24	—	2,72	—	3,67	—	3,00	—	5,02	—

Tabuľka 2

Číslo stĺpca	Q ₁₀															
	1	1a		2a	3	3a	4	4a	5	5a	6	6a	7	7a	8	8a
<i>Bacillus mesentericus</i> (I)	3,40	3,39	2,52	2,60	3,11	3,13	2,22	2,64	3,34	3,34	2,83	2,97	3,05	3,01	2,30	2,38
<i>Clostridium sporogenes</i> (II)	3,55	—	2,76	3,22	3,35	—	2,44	2,59	3,57	—	2,91	3,50	3,23	—	2,54	2,78
<i>Proteus vulgaris</i> (III)	3,30	3,35	2,49	3,17	2,74	2,76	2,18	2,26	3,59	3,61	2,64	3,51	3,31	3,32	2,82	3,02
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (IV)	—	—	1,53	1,87	—	—	1,65	1,70	—	—	1,66	2,09	—	—	1,64	1,61
<i>Achromobacter liquefaciens</i> (V)	1,92	—	1,68	—	1,84	—	1,49	—	2,07	—	1,55	—	1,98	—	1,57	—

Zo získaných výsledkov možno so štatisticky podloženou pravdepodobnosťou usudzovať, že peptidázová aktivita je vyššia

1. u kmeňov čerstvo izolovaných z mrazeného mäsa v porovnaní s mikróbmi súbežne izolovanými z nemrazeného mäsa. Tento rozdiel sa však už tak významne neprejavuje u starších kmeňov, t. j. takých, ktoré boli izolované z mäsa mrazeného i nemrazeného už pred rokom, ako aj u bezbunkových preparátov;

2. u čerstvo izolovaných baktérií v porovnaní so staršími kmeňmi, čo sa rovnakým spôsobom prejavuje u izolátov z mrazeného, ako aj nemrazeného mäsa;

3. u bezbunkových preparátov v porovnaní s bunkovou suspenziou; javí sa bez výnimky v rámci celého pokusného sledovania;

4. na diglycinovom substráte v porovnaní s triglycinovým substrátom; prejavuje sa ako všeobecný znak.

Poradie sledovaných mikroorganizmov z hľadiska ich peptidázovej účinnosti je rovnaké nielen pri použití diglycinu a triglycinu ako substrátu, ale zhoduje sa aj s poradím vyplývajúcim pre sledované baktérie na základe výsledkov stanovenia leucylglycín—dipeptidázovej aktivity, vykonaného metodicky odlišným spôsobom v prvej časti našej práce.

Priemerné hodnoty teplotných koeficientov Q_{10} , vypočítaných na základe výsledkov merania enzymatickej aktivity pri 37 °C a 7 °C, sú uvedené v tab. 2.

Z údajov vidieť, že hodnota Q_{10} je štatisticky významným spôsobom väčšia

1. u mezofilov než u psychrofilov,

2. u starších kmeňov než u novoizolovaných kmeňov,

3. u kmeňov izolovaných z nemrazeného mäsa než pri izolátoch z mrazeného mäsa,

4. u suspenzií baktérií než pri bezbunkových extraktoch.

Pritom však platí, že charakteristiky uvedené pod 1, 3 a 4 sa výraznejším spôsobom prejavujú u mikroorganizmov čerstvo izolovaných z mrazeného mäsa než u príslušných kmeňov dávnejšie izolovaných, t. j. uchovávaných po dobu jedného roku v zbierke. Takisto platí, že experimentálne závery uvedené pod 1, 2 a 3 sa v podstatne menšej miere prejavujú na výsledkoch dosiahnutých s použitím bezbunkových extraktov než u baktériových suspenzií, resp. u bezbunkových preparátov sú pri mnohých pokusoch až nesignifikantné.

Z hľadiska absolútnej hodnoty Q_{10} je vzájomný vzťah medzi sledovanými baktériami, resp. ich poradie také isté, ako keď sa vypočítala hodnota Q_{10} na základe výsledkov titračného stanovenia leucylglycín—dipeptidázy v teplotnom rozpätí 40—20 °C (pozri I. časť práce).

Celkove možno povedať, že tu uvedené výsledky sú vo všeobecnosti, resp. v porovnateľných bodoch v súlade s výsledkami dosiahnutými v prvej časti práce. Ako zvláštnosť vyplývajúcu z výsledkov tejto časti práce hodnotíme poznatok o strate špecifických prejavov enzymatickej aktivity izolátov z mrazeného mäsa pri ich dlhšie trvajúcej úschove, ako aj hlavne to zistenie, že medzi pokusnými výsledkami dosiahnutými pri aplikácii nepoškodených baktérií a ich bezbunkových extraktov sú významné rozdiely, ktoré nasvedčujú tomu, že sledované vplyvy, a to najmä psychrofilnosť a do určitej miery aj vplyv zmrazovania sa prejavujú na enzymatickej aktivite výrazným spôsobom len dotiaľ, kým je zachovaná intaktná štruktúra bunky.

Diskusia

Hoci ťažisko predloženej práce spočíva na poli biochemickej analytiky, t. j. v metodike manometrického stanovenia peptidázovej aktivity pri rôznych

inkubačných teplotách, treba podrobiť kritickému rozboru aj dosiahnuté výsledky, resp. z nich vyplývajúce závery. Predovšetkým je potrebné objasniť jedno z hlavných zistení, že baktérie izolované z mrazeného mäsa javili vyššiu enzymatickú aktivitu než im odpovedajúce kmene získané z nemrazeného mäsa. Zdá sa totiž, že je tu protirečenie s výsledkami našich prác, pri ktorých sme zistili, že mikroorganizmy vplyvom zmrazovania odumierajú alebo sú aspoň fyziologicky poškodzované [1]. Avšak už v metodologickej časti sme poznamenali, že nami použité kmene sa izolovali, resp. rástli na tzv. minimálnych pôdach, z čoho vyplýva, že boli fyziologicky nepoškodené. Naopak naše výsledky nasvedčujú tomu, že účinkom nízkych teplôt došlo k selekcii metabolicky aktívnejších jedincov. Enzymatická aktivita mikróbných izolátov sa pri dlhšie trvajúcom uchovávaní preočkovaním znižuje a selekčný efekt zmrazovania sa stráca.

Zistenie o zvýšenej aktivite bezbunkových preparátov v porovnaní s enzymatickou účinnosťou baktériových suspenzií je v plnom súlade s intracelulárnou povahou peptidáz; rovnako aj intenzívnejšie štiepenie dipeptidov než tripeptidov odpovedá poznatku, že aminopolypeptidázy štiepia vždy aj dipeptidázy, nie však naopak [10].

Pri vyhodnocovaní výsledkov nás upútala najmä okolnosť, že špecifické znaky sledovaných baktérií a pokusných podmienok, najmä psychrofilnosť, ako aj selekčné účinky zmrazovania sa neprejavili takým výrazným spôsobom na peptidázovej aktivite bezbunkových preparátov ako pri použití intaktných baktériových suspenzií. Vysvetľujeme si to tým, že konštitutívne vlastnosti a vplyvy prostredia, ktoré vyvolávali zmeny v aktivite a na teplotnom koeficiente peptidázovej reakcie, nezasahovali do kvality alebo kvantity enzýmov, ale do biologickej štruktúry, resp. životných procesov bunky. Podrobnejšie to vysvetľujeme na inom mieste [2].

Na základe určitej súbežnosti vo výsledkoch prvej a druhej časti našich pokusov uskutočnených rozličnou metodikou predpokladáme, že závery vyplývajúce z pokusov majú všeobecnejšiu platnosť.

Súhrn

Pokračovalo sa v sledovaní peptidázovej aktivity vybraných druhov psychrofilných a mezofilných baktérií izolovaných jednak z mrazeného, jednak z nemrazeného mäsa, pričom sa v predloženej časti práce použili ako substráty diglycín a triglycín. Ako enzymatický agens slúžili baktériové suspenzie a ich bezbunkové extrakty. Enzymatická hydrolýza sa nechala prebiehať pri 37 °C a 7 °C. Kvantitatívne meranie rozkladu peptidov sa robilo manometrickou metódou.

Výsledky potvrdili, že vplyvom zmrazovania dochádza k určitej selekcii mikróbov vyznačujúcich sa zvýšenou peptidázovou aktivitou a súčasne

zniženým teplotným koeficientom ich peptidázovej reakcie. Podľa toho, že sa odlišné reagovanie na účinky zmrazovania prejavilo na peptidázovej aktivite psychrofilov a mezofilov, iba ak sa použili intaktné bunky, nie však bezbunkové extrakty, možno usudzovať, že spozorované efekty boli z prevažnej časti vyvolané prostredníctvom účinkov nízkych teplôt na bunkovú štruktúru.

ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ
ЭНЗИМОВ У МИКРООРГАНИЗМОВ, ИЗОЛИРОВАННЫХ
ИЗ ЗАМОРОЖЕННОГО МЯСА (II)
МАНОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ
И Q_{10} ПЕПТИДАЗ У ДИ- И ТРИГЛИЦИНОВОГО
СУБСТРАТА

Я. АРПАЙ, З. ЛИФКОВА

Микробиологический отдел исследовательского института замораживания
в Bratislave

Выводы

Продолжалось исследование пептидазовой активности выбранных видов психрофильных и мезофильных бактерий, изолированных как из замороженного так и из незамороженного мяса, причем в предлежащей части работы применялись субстраты в качестве диглицина и триглицина. В качестве энзиматического агента служили бактериальные суспензии и их безклеточные экстракты. Энзиматический гидролиз проводился при 37° и 7° . Количественное определение степени разрывания пептидов проводилось манометрическим методом.

Результаты подтвердили, что под влиянием замораживания доходит к определенной селекции микробов характеризованных увеличенной пептидазовой активностью и одновременно пониженном температурного коэффициента их пептидазовой реакции. На основании того, что своеобразное или отличающееся реагирование процесса замораживания на пептидазную активность психрофилов и мезофилов выразилось только при применении интактной клетки, но не безклеточных экстрактов, можно судить, что наблюдаемые эффекты в большинстве случаев были вызваны действием низких температур на клеточную структуру.

Поступило в редакцию 14. 6. 1960 г.

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE AKTIVITÄT PROTEOLYTISCHER
ENZYME VON GEFRIERFLEISCHMIKROBEN (II)
MANOMETRISCHE BESTIMMUNG DER AKTIVITÄT UND DES Q_{10}
VON PEPTIDASEN AUF DI- UND TRIGLYCINSUBSTRAT

J. ARPAI, Z. LIFKOVÁ

Mikrobiologische Abteilung des Forschungsinstituts für Gefriertechnik in Bratislava

Zusammenfassung

Die Untersuchung der Peptidase-Aktivität ausgewählter Arten psychrophiler und mesophiler Bakterien, welche einerseits aus gefrorenem und andererseits aus nicht gefrorenem Fleische isoliert wurden, setzten die Autoren fort, wobei in der vorliegenden Arbeit als Substrate Diglycin und Triglycin benützt wurden. Als enzymatisches Agens dienten Bakteriensuspensionen und deren zellfreie Extrakte. Die enzymatische Hydro-

lyse liess man bei 37 °C und 7 °C verlaufen. Die quantitative Messung der Spaltung der Peptide wurde mittels manometrischer Methode durchgeführt.

Die erhaltenen Ergebnisse bestätigen, dass es unter dem Einfluss des Gefrierprozesses zu einer gewissen Selektion solcher Mikroben kommt, welche sich durch eine erhöhte Peptidase-Aktivität und gleichzeitig durch einen verminderten Temperaturkoeffizienten ihrer Peptidasereaktion auszeichnen. Aus dem Befund, dass sich das besondere bzw. abweichende Reagieren auf die Wirkungen des Gefrierprozesses nur dann auf die Peptidase-Aktivität der Psychrophilen und Mesophilen äusserte, wenn intakte Zellen, nicht aber zellfreie Extrakte verwendet wurden, kann geschlossen werden, dass die beobachteten Effekte zum überwiegenden Teile durch Einwirkung der niedrigen Temperaturen in die Zellstruktur hervorgerufen wurden.

In die Redaktion eingelangt den 14. 6. 1960

LITERATÚRA

1. Arpai J. a spolupracovníci, *Mikrobiológia mrazených potravín*, Záverečná zpráva VÚM, Bratislava 1959. — 2. Arpai J., *Názory na mechanizmus a kinetiku účinkov nízkych teplôt na mikroorganizmy*, *Biológia* 15, 461 (1960). — 3. Arpai J., *Sledovanie aktivity proteolytických enzýmov u mikroorganizmov izolovaných z mrazeného mäsa (I). Mimosbunkové a vnútrobunkové dipeptidázy*. *Kinetika pri 40, 30 a 20 °C*, *Chem. zvesti* 14, 148 (1960). — 4. Ingraham J. L., Bailey G. F., *Comparative Study of Effect of Temperature on Metabolism of Psychrophilic and Mesophilic Bacteria*, *J. Bact.* 77, 609 (1959). — 5. Johnstone R. M., Quastel J. H., *Manometric Estimation of Peptidase Activity*, *Biochim. Biophys. Acta* 23, 88 (1957). — 6. Johnstone R. M., Quastel J. H., *Energy Supply and Enzyme Activity in Strict Anaerobes. Studies on Peptidase Activity in Clostridium sporogenes*, *Biochim. Biophys. Acta* 23, 372 (1957a). — 7. Kleinzeller A., Malek J., Vrba R., *Manometrické metody a jejich použití v biologii a biochemii*, Praha 1954. — 8. Krebs H. A., Donegan J. F., *Manometrische Messung der Peptidspaltung*, *Biochem. Z.* 210, 7 (1928). — 9. Remy H., *Lehrbuch der anorganischen Chemie I*, Leipzig 1954. — 10. Stein J., *Chémia a technológia enzýmov I*, Bratislava 1956.

11. Weber E., *Grundriss der biologischen Statistik*, Jena 1957. — 12. Zamecnik P. C., Stephenson M. L., *A Manometric Method for Determining the Kinetics of an Enzymatic Hydrolysis of Peptides*, *J. Biol. Chem.* 169, 349 (1947). — 13. Zeller E. A., Maritz A., *Demonstration einer neuen Peptidase-Bestimmungsmethode (Fermentchemische Methoden III)*, *Helv. Physiol. Acta* 3, C6 (1945), resp. *Helv. Chim. Acta* 27, 1888 (1944) a *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta* 2, C33 (1944).

Do redakcie došlo 14. 6. 1960

Adresa autorov:

C. Sc. Ján Arpai, inž. Zdenka Lifková, Bratislava, Trenčianska 11, Výskumný ústav mraziarenský.