SLEDOVANIE AKTIVITY PROTEOLYTICKÝCH ENZÝMOV U MIKROORGANIZMOV IZOLOVANÝCH Z MRAZENÉHO MÄSA (I) MIMOBUNKOVÉ A VNÚTROBUNKOVÉ DIPEPTIDÁZY. KINETIKA PRI 40, 30 A 20 °C

JÁN ARPAI

Mikrobiologické oddelenie Výskumného ústavu mraziarenského v Bratislave

Úvod a problematika

V predchádzajúcich prácach [1, 2] sme sa venovali pokusným rozborom kvantitatívnych a kvalitatívnych pomerov normálnej mikroflóry mrazeného mäsa. Vyznačili sme dominujúce zložky tejto mikroflóry a izolované kultúry sme podrobili podrobnejšiemu štúdiu ich biochemických schopností. Predovšetkým nás zaujímali enzymatické komplexy so špecifickým vzťahom k mäsu, t. j. proteázy a lipázy, resp. lipoxydázy.

V prvej etape sledovania sme sa venovali mikróbnym proteázam, ktoré sa nám zdali pomerne lepšie objasnené než enzýmy mikroorganizmov napádajúcich tukové pletivá. O proteolytických enzýmoch mikroorganizmov sme totiž začínajúc od prvého oznámenia R. P. Bruntona a P. E. Macfadyena [4] až do súčasnosti našli v literatúre toľko údajov, že sme sa pomerne dobre orientovaní mohli pustiť do sledovania našej špeciálnej problematiky, ktorá rieši otázku zvláštností enzymatickej aktivity mrazuvzdorných mikroorganizmov, resp. takých, ktoré prežili účinky nízkych teplôt.

Ako je známe, medzi proteázy sa zaraďujú mnohé hydrolyzujúce transpeptidačné i syntetizujúce enzýmy [10], a preto je potrebné pri ich sledovaní vychádzať zo spresnenej diferenciácie. Vychádzajúc z najjednoduchšej systematiky, rozoznávame proteázy, ktoré pôsobia na takých peptidových väzbách, v ktorých terminálna aminoskupina alebo karboxylová skupina, alebo obidve skupiny sú voľné, resp. v ktorých namiesto voľnej aminoskupiny je prítomná imínová skupina, a zasa také, ktorých aktivita nie je uvedeným spôsobom podmienená, ale si vyžaduje aspoň dve peptidické väzby v substráte, aby z nich jednu rozložila. Tým, že sme si zvolili pre účely našich pokusov sledovanie dipeptidázy, aminopolypeptidázy a proteinázy, chceli sme dosiahnuť to, aby sme zachytili proteázový komplex sledovaných mikroorganizmov v čo možno najväčšej šírke. Pokusy sme postavili tak, aby sme jednotlivé enzymatické substráty mohli sledovať v závislosti od kardinálnych teplotných bodov skúšaných mikroorganizmov a pri rozlišovaní účinnosti extracelulárnych a intracelulárnych enzymatických preparátov. To nás nútilo k tomu, aby sme so zreteľom na celkový rozsah práce rozdelili si pokusy, ako aj publikáciu ich výsledkov na viac častí. Z nich prvú, ktorá sa zapodieva sledovaním dipeptidáz, predkladáme.

Experimentálna časť

Materiál a metódy

Mikroorganizmy, ktoré v predchádzajúcich a už spomínaných prácach sa určili ako dominujúce zložky mikroflóry mrazeného mäsa, selektovali sme z hľadiska ich proteolytickej aktivity. Robili sme to vo dvoch stupňoch. Najprv sme len izolovali kultúry, ktoré najviac stekucovali mäsopeptónovú želatínu. Takto sme vybrali po päť izolátov s rozličnými kardinálnymi teplotnými bodmi, a to kultúry *Bacillus mesentericus*, *Clostridium sporogenes*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas carnea* a *Achromobacter liquefaciens*, ktorých rastové optimum teploty klesá tak, ako sú za sebou uvedené, ale napriek tomu sa vyznačujú — s výnimkou *Proteus vulgaris* — mrazuvzdornosťou. Pri druhom stupni selekcie sme už semikvantitatívnou metódou vybrali u každého druhu z piatich kultúr tú najaktívnejšiu. Postupovali sme takto: Z 24 hodinovej kultúry skúšaného izolátu sme za jednu kľučku inokula preniesli do 500 ml mäsopeptónového bujónu o pH 7,4, nechali inkubovať za občasného pretrepania pri teplote 20, 30 a 40 °C, t. j. každú kultúru sme nasadili trikrát, aby sme zistili, pri ktorej teplote bude mať svoj relatívne najrýchlejší rast. Rýchlosť rastu sme sledovali na základe nefelometrického merania. Za tým účelom sme z každej banky odobrali denne po 10 ml bujónu. Keď kultúra dosiahla maximálnu svetelnú absorpciu, odobrali sme z nej 10 ml, ktoré sme pridali do skúmavky s rovnakým množstvom želatínového substrátu. Ďalších 10 ml sme zmiešali s rovnakým množstvom kazeínového substrátu.

Želatínový substrát sme pripravili podľa E. D. Wilsona [12], t. j. rozpustením 5 g zlatofarebnej želatíny v 100 ml fosfátového tlmivého roztoku na vodnom kúpeli pri teplote 60 °C za pridania 0,5 % fenolu, pričom sme upravili konečné pH na 7,4. Kazeínový substrát sme pripravili rozmiešaním 1 % kazeínu vo fosfátovom tlmivom roztoku, do ktorého sme pridali 0,9 % NaCl. Po dôkladnom pretrepaní sme roztok filtrovali a pridali 1 % tymolu. Konečné pH sme opäť upravili na 7,4.

Stekucovanie želatíny sme stanovovali tak, že sme skúmavky priamo z termostatu, kde sa zmes kultúry a substrátu inkubovala pri 40 °C, preniesli do ľadovej vody. Potom sme uviedli do vzťahu dobu inkubácie a doby potrebné na to, aby stuhli želatínové substráty, do ktorých sme pridali jednak účinný, jednak inaktivovaný proteolytický agens. Inaktiváciu sme robili 10 minútovou sterilizáciou v autokláve pri 1,4 atp. Kvantitatívne stanovenie sme robili na základe merania aktivity postupne stúpajúcich riedení kultivačnej tekutiny. Hydrolýzu kazeínu sme sledovali na základe vymiznutia zákalu, ku ktorému došlo alebo malo dôjsť po pridaní 0,4 ml alkoholického roztoku kyseliny octovej podľa návodu R. B. Hainesa [5].

Po týchto predbežných pokusoch, ktorými sme získali proteolyticky veľmi aktívne kmene s rôznymi kardinálnymi teplotnými bodmi, prikročili sme k príprave extracelulárneho a intracelulárneho enzymatického materiálu. Pritom nám slúžili kmene izolované z nemrazeného mäsa, t. j. také, ktoré neprekonali nízkoteplotnú expozíciu, ako porovnávací materiál. Tak sa pripravil z proteolyticky aktívnych kmeňov, izolovaných z nemrazeného mäsa, identifikovaných ako *Bacillus subtilis* a *Proteus vulgaris*, enzymatický materiál obdobným spôsobom ako z izolátov získaných z mrazeného mäsa.

Mimobunkový enzymatický materiál sme získali tak, že sme zvyšok kultivačnej tekutiny 30 minútovým odstredením pri 4000 ot./min. oddelili od mikróbnych buniek. Polovicu takto získanej tekutiny sme ešte sterilizovali filtráciou cez filter G-5 Jena, kým druhú polovicu sme skúšali na enzymatickú aktivitu v nesterilnom stave.

Vnútrobunkový enzymatický materiál sme pripravili z väčšieho množstva mikrób-

nej biomasy. Pre tento účel sme inokulovali, resp. kultivovali 10 baniek s 1000 ml obsahom bujónu za podmienok už uvedených, čím sme z jednotlivých druhov v závislosti od ich fyziologických vlastností získali od 2 g do 5 g biomasy, ktorú sme po oddelení od kultivačnej tekutiny opatrnou dekantáciou rozmiešali so skleným pieskom v malej trecej miske pri zachovaní asepsie, tak ako sme to robili v predchádzajúcich prácach [3]. Váhový pomer biomasy k piesku bol asi 1 : 3. Suspenziu enzymatického materiálu sme pripravili vo fosfátovom tlmivom roztoku o pH 7,4.

Enzymatický materiál získaný z jednotlivých druhov mikroorganizmov pochádzajúcich z mrazeného mäsa a zbierkových kmeňov sme sledovali na aktivitu *dipeptidázy*, *aminopolypeptidázy* a *proteinázy*, a to v intracelulárnej, ako aj extracelulárnej frakcii pri 40, 30 a 20 °C.

Aktivitu dipeptidázy sme stanovili podľa metódy H. Willstättera a K. Grassmanna [11]. Podľa tejto metódy sme použili *dl*-leucylglycín ako dipeptidický substrát. Za porovnávaciu, resp. štandardnú jednotku sme brali to množstvo enzýmu, ktoré bolo schopné hydrolyzovať za 1 hodinu pri pH 7,8 a pri teplote 40 °C polovicu z 225 mg *dl*-leucylglycínu v 10 ml M/30 fosfátového tlmivého roztoku. Pracovný postup bol takýto: Do 2,5 ml odmernej banky sme si pripravili roztok *dl*-leucylglycínu. To sme robili tak, že sme 56 mg látky rozpustili v 0,25 ml M/3 fosfátového tlmivého roztoku o pH 7,8 a mierne sme zahrievali, aby sa urýchlilo rozpúšťanie. Potom sme pridali 1 ml studenej vody, čím sa roztok ochladil, načo sme asi 2 kvapkami čpavku upravili pH na 7,8. Teraz sme pridali do odmernej banky roztok enzymatického materiálu, resp. jednotlivé riedenia tohto enzymatického materiálu v množstve 0,5 ml a doplnili odmernú banku fosfátovým tlmivým roztokom až po značku. Z takto pripraveného roztoku sme ihneď odobrali 1 ml a preniesli do banky s 9 ml absolútneho alkoholu, do ktorého sme pridali asi 4 kvapky 0,5 % alkoholického roztoku tymolftaleínu a pomocou N/20 KOH, ktorý sme si pripravovali v 90 % alkoholickom roztoku, titrovali sme do slabomodrého sfarbenia indikátora. Odmernú banku s ostávajúcim množstvom roztoku sme dali v prípade kontroly, resp. štandardného pokusu do termostatu pri 40 °C a po 1 hodine sme znovu odobrali 1 ml na titráciu, ktorú sme robili takým istým spôsobom ako v prvom prípade. Pri ostatných pokusoch sa menila teplota a doba inkubačného intervalu. Údaje o tom sú uvedené pri príslušných výsledkoch. Rozdiel medzi výsledkami prvej a druhej titrácie sme vyhodnotili ako stupeň hydrolýzy, opierajúc sa o metódu, ktorú vypracoval T. F. Macrae [8]. Podľa tejto metódy vzostup acidity na taký stupeň, ktorý sa dá neutralizovať pomocou 0,60 ml N/20 KOH, odpovedá 50 % hydrolýze *l*-peptidov prítomných v substráte a hodnotí sa ako 0,25 štandardnej jednotky dipeptidázy. Na stanovenie sme použili vhodne riedený enzymatický roztok, t. j. v takom riedení, pri ktorom 0,5 ml roztoku obsahovalo toľko enzymaticky aktívnej látky, koľko bolo potrebné na hydrolýzu 25—75 % množstva *l*-peptidov prítomných v substráte. Enzymatické prípravky sa uchovávali v chladničke po dobu pokusov, resp. medzi pracovnými operáciami, ktoré sa robili vždy tesne po sebe. Tieto, ako aj ostatné pracovné podmienky odpovedali bežným požiadavkám pre preparáciu a analytiku baktériových enzýmov [6].

Kinetiku enzymatickej reakcie sme vypočítali podľa rovnice pre reakcie prvého rádu, pretože druhý reakčný činiteľ — voda — je prítomný v reakčnom prostredí v takom nadbytku, že zmeny v jeho koncentrácii reakciu prakticky neovplyvňujú. Z rovnice $K = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{(a - x)}$ sme mohli vypočítať koeficienty reakčnej rýchlosti (K), lebo boli známe veličiny; doba trvania reakcie (t), množstvo reakčných produktov (x) vzniknutých za čas t, takže $a - x$ je koncentrácia substrátu na konci času t, pričom počiatočnú koncentráciu sme označili a.

Tabuľka 1

Druh	Číslo kultúry	Vzťah k teplote (relatívne optimum rastu)	Pokus: želatínový substrát + bujónová kultúra		Kontrola: želatínový substrát + inaktivovaná bujónová kultúra		Pokus: kazeínový substrát + bujónová kultúra		Kontrola: kazeínový substrát + inaktivovaná bujónová kultúra	
			minim. doba inkubácie v dňoch	maxim. doba tuhnutia substrátu	minim. doba inkubácie v dňoch	maxim. doba tuhnutia substrátu	minim. doba inkubácie v dňoch	zákal	minim. doba inkubácie v dňoch	zákal
Bacillus mesentericus	*I*	mezofilný (40 °C)	1	netuhne	5	10 minút	2	po pridaní indikátora nevzniká	5	hustý
	II		2				2			
	III		2				2			
	IV		3				2			
	V		5				3			
Clostridium sporogenes	*I*	mezofilný (40 °C)	1				½			
	II		2				1			
	III		4				1			
	IV		4				1			
	V		4				1			
Proteus vulgaris	*I*	mezofilný (30 °C)	1				3			
	II		1				3			
	III		2				3			
	IV		3				3			
	V		4				4			
Pseudomonas carnea	*I*	psychrofilný (20 °C)	1				2			
	II		1				3			
	III		1				3			
	IV		1				4			
	V		1				4			
Achromobacter liquefaciens	*I*	psychrofilný (20 °C)	2				3			
	II		2				3			
	III		3				4			
	IV		5				5			
	V		5				5			

Výsledky

V tab. 1 sú zostavené výsledky prvého stupňa *predbežných pokusov*, z ktorých vidieť, ako sme u každého baktériového druhu spomedzi piatich sledovaných kultúr vyznačili jednu až dve kultúry, ktoré najintenzívnejšie, resp. najrýchlejšie hydrolyzovali bielkovinové substráty. Pri tomto orientačnom pokuse sme si súčasne aj preverili, pri ktorej zo skúšaných teplôt javí kultúra najlepší rast. Druhý stupeň predbežných pokusov, ktorý už mal kvantitatívny charakter, umožnil nám výber najaktívnejšieho izolátu, čím sme dospeli u každého sledovaného druhu ku kultúre, ktorá dávala materiál pre ďalšie pokusy na bezbunkových enzýmoch. Výsledky tejto časti práce sú uvedené v tab. 2.

Tabuľka 2

Druh a číslo kultúry	Minimálne množstvo bujónovej kultúry (v ml) hydrolyzujúce úplne	
	10 ml želatínového substrátu	10 ml kazeínového substrátu
B. mesentericus (I)	0,50	0,10
Cl. sporogenes (I)	1,0	0,05
Pr. vulgaris (I)	0,01	0,50
Pr. vulgaris (II)	0,01	1,0
Ps. carnea (I)	0,01	1,0
Achr. liquefaciens (I)	0,50	10,0
Achr. liquefaciens (II)	0,10	8,0

Výsledky stanovení špecifickej *aktivity dipeptidázy* za použitia bezbunkových enzymatických preparátov získaných jednak z biomasy (intracelulárne), jednak z filtrátu kultivačnej tekutiny (extracelulárne) sú zostavené v tab. 3. Tu uvádzame na spodných riadkoch na porovnanie už aj príslušné hodnoty aktivity dipeptidázy získanej z kultúr kmeňov izolovaných z nemrazeného mäsa, t. j. takých mikróbov, ktoré neboli vystavené účinkom nízkych teplôt.

Výsledky možno vyhodnotiť v tomto smere:

1. Enzymatické preparáty získané pomocou kultúr izolovaných z mrazeného mäsa mali vyššiu aktivitu než obdobné preparáty získané pomocou kultúr, ktoré neboli vystavené nízkym teplotám.

2. Enzymatické extrakty z biomasy, t. j. intracelulárne prípravky mali za metodicky podmienených okolností v každom prípade väčší obsah dipeptidázy než extracelulárne preparáty.

3. Poradie skúšaných baktériových druhov je pri izolátoch z mäsa podľa aktivity produkovanej dipeptidázy také isté, aké bolo z hľadiska ich schopnosti rozkladať želatínu.

Tabuľka 3

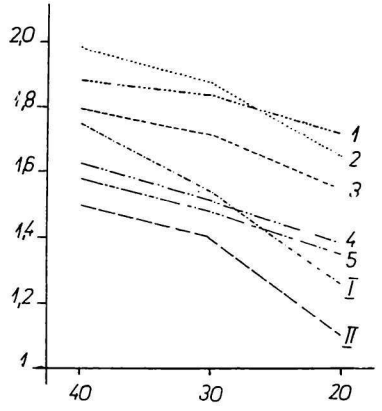
	Mikroorganizmus	Enzým	Aktivita dipeptidázy (štand. jed./ml)		
			I. prep.	*II.* prep.	*III.* prep.
izolované z mrazeného mäsa	*B. mesentericus*	intracel.	3,5	2,8	2,4
		extracel.	0,8	1,2	1,0
	Cl. sporogenes	intracel.	3,0	1,7	2,0
		extracel.	0,1	0,5	0,4
	Pr. vulgaris	intracel.	6,3	6,2	8,7
		extracel.	1,8	3,2	3,3
	Ps. carnea	intracel.	6,2	5,3	8,5
		extracel.	3,1	2,6	4,5
	Achr. liquefaciens	intracel.	4,2	3,5	4,9
		extracel.	1,6	1,3	2,1
z nemrazeného mäsa	*B. mesentericus*	intracel.	1,4	1,8	1,8
		extracel.	0,5	0,6	0,5
	Pr. vulgaris	intracel.	3,3	4,8	5,0
		extracel.	0,8	1,5	2,5

zistenej predbežnými pokusmi. Rozdiel, a to priamo podstatný sa však javí v porovnaní dipeptidázovej aktivity so schopnosťou hydrolyzovať kazeín, lebo tento substrát najintenzívnejšie atakovali práve tie druhy baktérií, ktoré najpomalšie stekucovali želatínu, resp. ktoré produkovali najmenej dipeptidázy.

V spojitosti s pomerne malou aktivitou dipeptidázy mimobunkových preparátov sme robili aj niekoľko pokusov za účelom preskúmania vplyvu filtrácie kultivačnej tekutiny na jeho enzymatickú aktivitu. Zistili sme, že rýchlo za sebou opakovaná filtrácia neznížila významne účinnosť dipeptidázy, resp. spozorovaný pokles sa pohyboval v tých medziach, s ktorými počítame alebo sa stretávame aj pri enzymatickom materiáli, ktorý sa ponecháva po dobu filtrácie pri rovnakej teplote. Tento pokles bol u peptidázy za našich pokusov napr. pri 0 °C za 24 hodín približne 50 % pôvodnej aktivity, takže pokles za prvé 2—3 hodiny, t. j. po dobu, kým sa najneskoršie začalo s inkubáciou, pohyboval sa v metodicky únosných hraniciach. Naproti tomu kontaminácia filtrátu živými baktériovými bunkami príslušnej kultúry v koncentrácii približne 10^7 buniek/ml mala za následok, že za daných pracovných podmienok došlo k podstatnému zvýšeniu dipeptidázovej akti-

vity. Z toho sme usudzovali, že prípadné straty na aktivite dipeptidázy spôsobené filtráciou sú nepomerne menej významné než chyby, ku ktorým by došlo v prípade kontaminácie kultivačnej tekutiny živými mikroorganizmami.

Ťažisko pokusov spočívalo v porovnávaní kinetiky dipeptidázovej účinnosti vnútrobunkových enzymatických extraktov, pripravených z biomasy jednotlivých druhov baktérií, v sledovaných teplotných bodoch, t. j. pri 40, 30 a 20 °C. Výsledky tejto časti práce, resp. ich matematické vyhodnotenie je graficky znázornené na obr. 1. Závery zhrnujeme v tomto zmysle:



Obr. 1. Vplyv teploty na kinetiku intracelulárnej dipeptidázy získanej z biomasy rozličných baktériových kultúr.

Izoláty z mrazeného mäsa: *Ps. carnea* (krivka *1*), *Pr. vulgaris* (krivka *2*), *Achr. liquefaciens* (krivka *3*), *Bac. mesentericus* (krivka *4*), *Cl. sporogenes* (krivka *5*).
Izoláty z nemrazeného mäsa: *Pr. vulgaris* (krivka *I*), *Bac. mesentericus* (krivka *II*).
Na osi úsečiek = teplota v °C, na osi poradníc = reakčná rýchlosť $K = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{(a - x)}$.

1. Pri poklese teploty zo 40 °C na 30 °C klesá hodnota teplotného koeficienta (Q_{10}) u kmeňov neexponovaných mrazu až dvakrát tak rýchlo než u tých istých druhov izolovaných z mrazeného substrátu.

2. Medzi 40 °C a 30 °C je Q_{10} v každom prípade menší než Q_{10} medzi 30 °C a 20 °C. Tento rozdiel má však u dipeptidáz baktérií z mrazeného mäsa vždy menšiu hodnotu než u preparátov pripravovaných pomocou kmeňov z nemrazeného mäsa. Najmenší rozdiel medzi hodnotami Q_{40-30} a Q_{30-20} javili preparáty zo psychrofilných baktérií.

O výsledkoch treba záverom uviesť, že variačná analýza ukázala vo väčšine prípadov na hranice náhodnosti okolo 95 %, t. j. na faktor 0,6533, ktorý podľa S. Kollera [7] ešte umožňuje vyhodnotenie biologických pokusov. Pri úplne nepriaznivých štatistických údajoch mali však hodnoty reakčnej konštanty strednú chybu priemeru až 14,9 %, t. j. na 3 preparátoch, resp. pokusoch s 12 meraniami získaná hodnota mala $K = 1{,}92$, pričom $\sigma = \pm 0{,}074$, z čoho vyplýva rozsah chýb $\pm 0{,}29$.

Diskusia

Na mnohostranné ťažkosti, s ktorými sa stretávame pri stanovení a najmä izolácii baktériových proteáz, obšírne poukázal vo svojej monografii E. Maschmann [9]. Hovorí, že všetky baktérie tvoria proteázy, a to peptidázy, ako aj

proteinázy, lebo nevie si predstaviť existenciu bielkovín bez príslušných enzýmov. To však neznamená, že sa bežnými metódami tieto enzýmy v každom prípade môžu sledovať. Každý mikróbny druh, kmeň alebo aj variant má svoje fyziologické zvláštnosti a závislosti od prostredia, t. j. kvantitatívne a kvalitatívne špecifickú konšteláciu svojich konštitutívnych a adaptívnych enzýmov. Z toho vyplýva, že pri paralelnom sledovaní určitej enzymatickej aktivity u rozličných druhov baktérií ťažko robiť signifikantné závery, lebo aktivita enzymatických zložiek môže byť podmienená genetickými faktormi, ako aj vplyvmi rozličných činiteľov prostredia, akými sú napr. aktuálna acidita, teplota, vzduch, svetlo, kovy, komplexotvorné zlúčeniny a iné synergeticky alebo antagonisticky pôsobiace látky.

Pri špeciálne sledovanej enzymatickej látke, t. j. baktériových dipeptizádach treba si uvedomiť, že tu nejde o homogénnu látku a že zložky tohto enzýmu môžu mať prevažne aeróbny alebo anaeróbny charakter, ako aj veľmi rozličné optimum pH, ktoré podľa Maschmanna môže ležať v rozpätí od 9,0 do 4,8. Tieto rozdiely vznikli zrejme v dôsledku adaptívnych procesov, ktoré podľa našej mienky dominujú nad konštitutívnou zložkou, pričom neexistuje kvalitatívny rozdiel medzi obidvoma zložkami, čím je umožnené ich ustavičné vzájomné prelievanie. Zdá sa nám, že uvedené výsledky podporujú tento názor, takže z nich vyvodzujeme záver, že intenzívny vonkajší vplyv, t. j. zmrazovanie a dlhodobé pôsobenie nízkej teploty na mikroorganizmy spôsobovali výrazné zmeny nielen v produkcii enzýmov, t. j. menovite dipeptidáz, ale pôsobili aj na ich kinetiku a teplotnú závislosť.

Práci možno okrem iného vytýkať určité zjednodušenie problematiky vo vzťahu enzýmu k substrátu. Je známe, že dipeptidázová aktivita špecificky závisí od chemizmu, resp. od priestorovej konfigurácie substrátu. Z toho vyplýva, že pri použití iného dipeptidického substrátu, napr. *dl*-alanylglycínu, glycyl-*d*,*l*-leucínu, glycyl-*d*,*l*-alanínu a i., vytvoria sa iné pomery enzymatickej aktivity, resp. aktivácie a inhibície. A tak nie je možné vylúčiť, ba možno očakávať, že za daných pokusných podmienok by sa pri použití iných substrátov získali iné výsledky, najmä po stránke kvantitatívnej. To isté možno povedať aj o vplyve metodiky stanovenia množstva hydrolytických produktov ako miery peptidázovej aktivity, lebo napr. titráciou získané výsledky sa nikdy presne nezhodujú s výsledkami manometrickej metódy. To uvádzame na ozrejmenie toho, že nám rozsah problematiky nie je neznámy, avšak závery predloženej časti práce sa zakladajú na vzájomnom vzťahu výsledkov dvoch skupín a je pravdepodobné, že zmeny resp. presuny v týchto vzťahoch sú len v malej miere podmienené pracovným postupom a substrátom. Skôr sa zdá, že významný rozdiel medzi sledovanými skupinkami je prejavom biologickej reakcie na vplyvy prostredia, ktorý má širšiu platnosť. Do tejto otázky prispejú ešte výsledky z ďalšej časti tejto práce.

Súhrn

Spomedzi baktérií izolovaných z mrazeného mäsa sa vyselektovali izoláty z druhov: *Bacillus mesentericus*, *Clostridium sporogenes*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas carnea*, *Achromobacter liquefaciens*, ktoré sa vyznačovali najväčšou schopnosťou rozkladať želatínový a kazeínový substrát. Z biomasy a filtrátu kultivačnej tekutiny týchto izolátov sa pripravili vnútrobunkové a mimobunkové enzymatické preparáty, ktoré sa v prvej časti práce sledovali na obsah dipeptidázy. Stanovovala sa aj kinetika dipeptidázovej aktivity uvedených preparátov pri 40, 30 a 20 °C. Tieto hodnoty sa porovnávali s výsledkami paralelných skúšok za použitia enzymatických preparátov pripravených z kultúr kmeňov *Bacillus mesentericus* a *Proteus vulgaris*, ktoré boli izolované z nemrazeného mäsa.

Výsledky nasvedčovali tomu, že enzymatická aktivita preparátov získaných pomocou kultúr izolovaných z mrazeného mäsa je vyššia než paralelne pripravených preparátov z kmeňov, ktoré neboli vystavené vplyvom nízkych teplôt. Pritom intracelulárne prípravky mali väčší obsah dipeptidázy než extracelulárne preparáty. Prejavila sa aj určitá diferenciácia proteolytickej aktivity na želatínovom a kazeínovom substráte.

Hodnota teplotného koeficienta (Q_{10}) je v rozmedzí 40—30 °C u kmeňov izolovaných z obyčajného mäsa až dvakrát taká vysoká než u tých istých druhov izolovaných z mrazeného mäsa. Rovnako aj rozdiel medzi hodnotami Q_{40-30} a Q_{30-20} bol u izolátov z mrazeného mäsa, menovite u psychrofilných mikroorganizmov, signifikantne menší než u kmeňov, ktoré predtým neboli vystavené nízkym teplotám.

ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ЭНЗИМОВ У МИКРООРГАНИЗМОВ, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ ЗАМОРОЖЕННОГО МЯСА (I) ВНЕШНЕ И ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ ДИПЕПТИДАЗЫ. КИНЕТИКА ПРИ 40, 30 И 20 °C

ЯН АРПАЙ

Микробиологический отдел исследовательского института замораживания в Братислав

Выводы

Из бактерий, изолированных из замороженного мяса, были выселектированы изоляты из вида: *Bacillus mesentericus*, *Clostridium sporogenes*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas carnea*, *Achromobacter liquefaciens*, которые характеризовались наибольшей способностью разкладывать желатиновый и казеиновый субстрат. Из биомассы и фильтрата культивационной жидкости этих изолятов были приготовлены внешне и внутриклеточные энзиматические препараты, которые в первой части работы исследовались на содержание в них дипептидазы. Определялась также и кинетика дипептидазной активности этих препаратов при 40, 30 и 20 °C. Эти значения сравни-

вались с результатами параллельных опытов с применением энзиматических препаратов, приготовленных из культур штаммов *Bacillus mesentericus* и *Proteus vulgaris*, которые были изолированы из незамороженного мяса.

Результаты свидетельствуют о том, что энзиматическая активность препаратов, полученных при помощи культур изолированных из замороженного мяса, является высшей, чем параллельно приготовленных препаратов из штаммов, которые не были выставлены влиянию низких температур. При том внутриклеточные препараты имели высшее содержание дипептидазы, чем препараты внеклеточные. Проявилась и разница в протеолитической активности на желатиновом и казеиновом субстрате.

Величина температурного коэфициента (Q_{10}) в границах 40—30 °C является у штаммов изолированных из обыкновенного мяса в два раза большей, чем у тех же самых выдов, изолированных из замороженного мяса. Также разница между значениями Q_{40-30} и Q_{30-20} у изолятов из замороженного мяса, особенно у психрофильных микроорганизмов, является менее выразительной, чем у штаммов, которые небыли перед этим выставлены действию низких температур.

Поступило в редакцию 4. 7. 1959 г.

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE AKTIVITÄT PROTEOLYTISCHER ENZYME VON GEFRIERFLEISCHMIKROBEN (I) EXTRACELLULÄRE UND INTRACELLULÄRE DIPEPTIDASEN. KINETIK BEI 40, 30 UND 20 °C

JÁN ARPAI

Mikrobiologische Abteilung des Forschungsinstituts für Gefriertechnik in Bratislava

Zusammenfassung

Unter den Bakterien, welche aus Gefrierfleisch isoliert wurden, selektierte der Autor Isolate aus folgenden Arten: *Bacillus mesentericus, Clostridium sporogenes, Proteus vulgaris, Pseudomonas carnea, Achromobacter liquefaciens,* welche sich durch die grösste Fähigkeit auszeichneten Gelatine- und Kaseinsubstrate zu zersetzen. Aus der Biomasse und dem Filtrate der Kultivationsflüssigkeit dieser Isolate wurden intracelluläre und extracelluläre enzymatische Präparate hergestellt, welche im ersten Teil dieser Arbeit auf ihren Gehalt an Dipeptidase untersucht wurden. Ebenso wurde die Kinetik der Dipeptidase-Aktivität dieser Präparate bei 40, 30 und 20 °C bestimmt. Diese Werte wurden mit den Ergebnissen von Parallelversuchen unter Verwendung enzymatischer Präparate verglichen, die aus den Kulturen der aus nicht gefrorenem Fleisch isolierten Stämme *Bacillus mesentericus* und *Proteus vulgaris* hergestellt wurden.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeiten war zu erkennen, dass die enzymatische Aktivität der mittels aus Gefrierfleisch isolierten Kulturen erhaltenen Präparate grösser ist, als jene der parallel zubereiteten Präparate aus Stämmen, welche nicht dem Einfluss von niedrigen Temperaturen ausgesetzt wurden. Dabei wiesen intracelluläre Präparate einen höheren Gehalt an Dipeptidase auf, als extracelluläre Präparate. Es zeigte sich auch eine gewisse Differenzierung der proteolytischen Aktivität auf Gelatine- und Kaseinsubstrat.

Der Wert des Temperaturkoeffizienten (Q_{10}) liegt im Intervall 40—30 °C bei aus gewöhnlichem Fleisch isolierten Stämmen bis zu zweimal so hoch, wie bei denselben

Arten, die aus Gefrierfleisch isoliert wurden. Ebenso war der Unterschied zwischen den Werten Q_{40-30} und Q_{30-20} bei Isolaten aus Gefrierfleisch, namentlich bei psychrophilen Mikroorganismen, signifikant kleiner, als bei Stämmen, welche nicht vorhergehend niedrigen Temperaturen ausgesetzt waren.

In die Redaktion eingelangt den 4. 7. 1959

LITERATÚRA

1. Arpai J. a spolupracovníci, *Výskum vplyvu nízkych teplôt na fyziologické a morfologické vlastnosti mikroorganizmov nachádzajúcich sa na potravinách.* Záverečná zpráva výskumnej úlohy 12,04, VÚM, Bratislava 1958. — 2. Arpai J., Bánhegyi M., Průmysl potravin *10*, 493 (1959). — 3. Arpai J., Nature (London) *182*, 661 (1958). — 4. Brunton R. P., Macfadyen P. E., Proc. Roy. Soc. (London) *46*, 542 (1889). — 5. Haines R. B., Biochem. J. *25*, 1851 (1931). — 6. Kalmitsky G., Utter M. F., Werkman C. H., J. Bact. *49*, 595 (1945). — 7. Koller S., *Graphische Tafeln zur Beurteilung statistischer Zahlen*, Dresden 1943. — 8. Macrae T. F., Biochem. J. *27*, 1229 (1933). — 9. Maschmann E., Ergeb. Enzymforschung *9*, 155 (1943). — 10. Stein J., *Chémia a technológia enzýmov I*, Bratislava 1956. — 11. Willstätter H., Grassmann K., Z. physiol. Chem. *153*, 250 (1926). — 12. Wilson E. D., J. Bact. *20*, 41 (1930).

Do redakcie došlo 4. 7. 1959

Adresa autora:

Ján Arpai, kandidát biologických vied, Bratislava, Trenčianska 11, Výskumný ústav mraziarenský.