SLEDOVANIE AKTIVITY PROTEOLYTICKÝCH ENZÝMOV U MIKROORGANIZMOV IZOLOVANÝCH Z MRAZENÉHO MÄSA (III) CHROMATOGRAFICKÉ ŠTÚDIUM VPLYVU ZMRAZOVANIA NA PEPTIDÁZY

J. ARPAI, M. BEHÚŇ, Z. LIFKOVÁ
Mikrobiologické oddelenie Výskumného ústavu mraziarenského v Bratislave

Sledovali sme dipeptidázovú a aminopolypeptidázovú aktivitu baktérií izolovaných z mrazeného mäsa a im druhove odpovedajúcich kultúr, ktoré neboli vystavené účinkom nízkych teplôt. Pokusné výsledky nasvedčovali, že enzymatická aktivita izolátov z mrazeného mäsa bola relatívne vyššia. Naproti tomu pokles teplotného koeficienta (Q_{10}) bol u týchto kultúr menší než u mezofilov. Táto zvláštnosť, resp. odlišnosť sa však významne prejavila iba na intaktných bunkových suspenziách, nie však na bezbunkových extraktoch. O toto zistenie sa opierala naša domnienka, že ťažisko mechanizmu zmien spozorovaných na teplotnom koeficiente enzymatickej aktivity leží v pôsobení nízkych teplôt na živú bunku. Pri prácach sme ako substráty použili *d,l*-leucylglycín, diglycín a triglycín. Stanovenia sme robili alkoholovou titráciou [1] a manometricky [4].

Úlohou tejto časti práce bolo lepšie objasniť predtým spozorované zvláštnosti v enzymatickej aktivite mikroorganizmov, ktoré boli vystavené účinkom nízkych teplôt, a to s osobitným zreteľom na poznatky vyplývajúce zo súbežného sledovania rastu a rozmnožovania mikroorganizmov po rozmrazení. Tieto práce výrazným spôsobom ukázali, že z mikroorganizmov, ktoré prežili zmrazovanie, je časť fyziologicky oslabená, resp. má zvýšené nároky na živiny [3]. Preto sa nám zdalo potrebné sledovaný mikróbny, resp. enzymaticky účinný materiál v celom rozsahu pokusných prác diferencovať z hľadiska poznatkov o fyziologickej nerovnocennosti mikróbov čistej kultúry, ktorá bola vystavená účinkom nízkych teplôt, a na tomto základe znova študovať kvantitatívne zmeny enzymatickej aktivity po zmrazovaní.

Popri odlišnom metodickom postupe pri výbere materiálu a pri zmrazovaní sme v tejto časti práce použili aj odlišnú analytiku, t. j. metódu papierovej chromatografie, opierajúc sa vo všeobecnosti o práce I. M. Haisa, K. Macka a spolupracovníkov [7] a najmä o metodiky R. J. Haschena [8, 9].

Experimentálna časť

Materiál a metódy

Príprava enzymaticky účinného materiálu vychádzala z tých istých kultúr, s ktorými sme pracovali v predchádzajúcej práci. Boli to kultúry *Bacillus mesentericus*,

Clostridium sporogenes, *Proteus vulgaris*, *Achromobacter liquefaciens* a *Pseudomonas fluorescens*. Opäť sme súbežne vzali na pokusy jednak kmene izolované z mrazeného mäsa, jednak im druhove odpovedajúce izoláty, ktoré ešte neboli vystavené účinkom nízkych teplôt, t. j. pochádzali z nemrazeného mäsa.

Peptidázová aktivita sa stanovovala:

1. na materiáli získanom z pôvodných kultúr, ktorý sa pripravil tak, že sa do fyziologického roztoku suspendovali odstredené a premyté bunky. Z nich sa potom pripravil enzymaticky účinný materiál vo forme

a) bunkovej suspenzie, ktorej koncentrácia sa na základe kalibrovanej turbidity nastavila rádove na 10^9 buniek/ml,

b) bezbunkového extraktu, ktorý sa pripravil z bunkovej biomasy rozdrvenej zmiešaním v kremennom piesku s nasledujúcim eluovaním do fosfátového tlmivého roztoku o pH 7,4.

Prípravu týchto enzymatických agensov sme podrobnejšie opísali v prvej časti tejto práce.

2. Na materiáli pripravenom po tom, čo sa kultúry zmrazovali in vitro. Postupovalo sa tak, že sa suspenzie baktérií nechali 24 hodín pri teplote —18 °C a potom sa rozmrazili pri teplote 25 °C. Keď teplota rozmrazenej baktériovej suspenzie dosiahla 5 °C, očkovala sa do minimálnej, t. j. na živiny chudobnej pôdy a do média obohateného ľahko stráviteľnými (trypticky natrávenými) živinami. Na minimálnej pôde vyrástli iba zárodky, ktoré zmrazovaním neboli poškodené, resp. nejavili zníženú schopnosť utilizácie živín, kým na obohatenej pôde sa rozmnožili aj oslabené mikroorganizmy. Zloženie použitých médií a podrobný pracovný postup sme opísali v osobitnej práci zameranej na sledovanie germicídnosti mrazu [5]. Po nízkoteplotnom zásahu sa s kultúrami postupovalo ako pod *1*, t. j. pripravil sa z nich materiál na skúšky peptidázovej aktivity opäť vo forme bunkovej suspenzie a bezbunkového extraktu.

3. Na materiáli, ktorý sa bezprostredne pred inkubáciou ešte raz vystavil účinkom nízkych teplôt, t. j. bunkové suspenzie a bezbunkové extrakty sa pred stykom so substrátom zmrazovali takým istým spôsobom, ako sa to robilo v úprave ad *2* s východiskovou kultúrou.

Ako substrát sa pri pokusoch používal 0,05 M roztok *d,l*-leucylglycylglycínu (LGG), ktorého pH bolo 7,8.

Pri inkubácii sa substrát—enzýmová zmes nechala reagovať pri 40 °C po dobu 60 minút. Vzorky na stanovenie stupňa hydrolýzy sa odoberali v 15 minútových intervaloch. Aby mikróbna biomasa rušivo nevplývala na priebeh chromatografickej analýzy, vzorky sa pred stanovením odstredili za chladu. Na papier sa potom nanášali vzorky zo supernatantnej tekutiny.

Chromatografické stanovenie peptidázovej aktivity. Štandardné roztoky sme pripravili tak, aby ich obsah *d,l*-leucínu (L) a LGG odpovedal 10, 20 a 30 % hydrolýze *l*-zložky pri 0,05 M koncentrácii racemátu v substrátovom roztoku. Chromatografovalo sa vzostupnou metódou. Ako rozpúšťadlo sme použili *n*-butanol, kyselinu octovú a vodu v pomere 4:1:5. Škvrny sme detegovali pomocou ninhydrínu. Kvantitatívne stanovenie sa robilo eluovaním škvŕn do 24,69 mg% metanolového roztoku síranu meďnatého. Eluát sa meral fotokolorimetricky. Výsledky sa zaznačili v extinkčných hodnotách. Tieto sa uviedli do vzťahu k hodnotám kalibračnej krivky v rozmedzí 10—30 % hydrolýzy substrátu, keďže v tomto rozsahu mala krivka prísne lineárny priebeh. To si vyžadovalo, aby sa za základnú dobu inkubácie bralo 15 minút. Správnosť graficky znázornenej kalibračnej priamky, zostrojenej na základe štandardov odpovedajúcich 10, 20 a 30 %

hydrolýze substrátu, overila sa výpočtom podľa R. J. Haschena [9]. Vychádzajúc z rovnice priamky

$$y = mx + b,$$

vypočítala sa v rovnakých odstupoch x hodnôt (10, 20, 30) najpravdepodobnejšia hodnota pre rast konštanty m podľa vzorca

$$m = \frac{\overset{n}{\Sigma} y_\mu - \overset{n-1}{\Sigma} y_\nu}{n - 1} \qquad \begin{matrix} \mu = 2 \\ \nu = 1 \end{matrix}$$

Ak sa v danom prípade sleduje 10, 20 a 30 % hydrolýza, možno príslušné x hodnoty označiť 1, 2 a 3. Takto pre konštantu m vychádza rovnica

$$m = \frac{y_3 - y_1}{2}$$

Potom sa rovnica pre výpočet úseku

$$b = \frac{\Sigma y - m \Sigma x}{n}$$

mení na

$$b = \frac{\Sigma y}{n} - 2m$$

Konštanty m, resp. b sú týmto určené, takže dosadením hodnôt y, ktoré získame meraním produktov štiepenia ako extinkcie, možno stanoviť príslušné percentuálne hodnoty hydrolýzy. Pre tento účel násobíme pôvodnú rovnicu kalibračnej krivky desiatimi

$$x = \frac{y - b}{m} \cdot 10$$

a z nej vypočítame stupeň hydrolýzy (v percentách).

Na presnosť sa kladie požiadavka, aby rozdiely medzi nameranými a vypočítanými hodnotami nepresahovali mieru presnosti jednotlivých stanovení. Táto sa vypočítala ako rozptyl nameraných hodnôt podľa vzorca

$$\frac{(y_2 - y_1) - (y_3 - y_2)}{2}$$

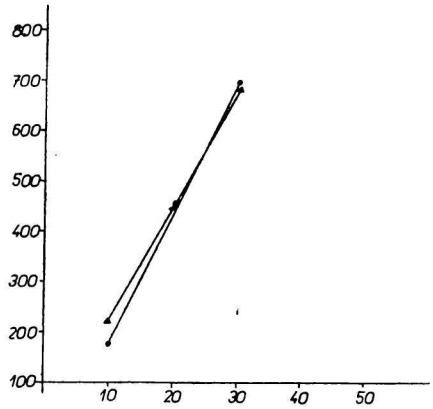
Metódy použité na štatistické vyhodnotenie a zabezpečenie záverov, ktoré vyplývali z výsledkov, boli tie isté ako v predchádzajúcich prácach. V súhlase s tým v prípadoch, kde sa hovorí o štatisticky významných výsledkoch, ide o pravdepodobnosť vyše 95 % ($P < 0{,}05$).

Výsledky a vyhodnotenie

Kvalitatívne vyhodnotenie chromatogramov ukázalo, že škvrny štiepnych produktov, najmä L boli dobre stanoviteľným spôsobom oddelené. Škvrny, ktoré pochádzali zo zvyškov buniek, resp. bunkových fragmentov znečisťujúcich enzymatický materiál, ani v jednom prípade neprekrývali hlboko položenú škvrnu GG ($R_F \doteq 0{,}17$), ba ani vysoko putujúcu škvrnu L ($R_F \doteq 0{,}80$). Škvrna LGG mala R_F hodnotu $\doteq 0{,}61$ a pod ňou sa objavili stopy sprievodných látok vo forme dvoch až troch malých fliačikov ($R_F \doteq 0{,}5$). Z nich jeden sa typickým spôsobom vždy sfarbil na červeno. Stanovením týchto škvŕn na kontrole, t. j. v enzymatickom materiáli sme sa bližšie nezapodievali. Na základe predbežných výsledkov sme z pôvodnej metodiky R. J. Haschena [9]

neprevzali spôsob vyvolávania chromatogramu. Podľa našej metodickej predlohy sa vystrihnuté prúžky papiera mali totiž preťahovať cez ninhydrín-meďnatý roztok. Aj keď sme to robili proti smeru putovania čela rozpúšťadla, objavili sa rozmazané škvrny. Preto sme dali prednosť vyvolávaniu chromatogramu postrekom. Namerané štandardné hodnoty sa dobre kryli s vypočítanými hodnotami kalibračnej krivky (obr. 1). O presnosti metodiky svedčí, že rozptyl všetkých výsledkov v rámci pokusu nepresahoval hodnotu 6. Stredná chyba jednotlivých meraní rovnako neprekročila túto hranicu.

Kvantitatívne výsledky tejto časti pokusov sme vyhodnocovali predovšetkým so zameraním spresniť a objasniť poznatky, resp. závery z predchádzajúcich pokusov vykonaných v rámci tejto práce. Vyžadovalo si to opätovné preverenie základného smeru, povedali by sme „trendu", zmrazovaním vyvolaných zmien peptidázovej aktivity baktériového materiálu pri použití odlišnej metódy a substrátu. V druhom rade sme sa zamerali na vyhodnotenie výsledkov získaných pomocou špeciálnej metódy diferenciácie nárokov na živiny v tom smere, aby bolo možné robiť závery na mechanizmus pozorovaných zmien, a to aspoň na úrovni diskusie.



Obr. 1. Štandardné hodnoty získané meraním a výpočtom.

—▲—▲— výpočet
—●—●— meranie

na osi úsečiek: stupeň hydrolýzy v %
na osi poradníc: extinkcia × 10^3

Získané výsledky vyjadrujú v závislosti od metodiky peptidázovú aktivitu baktérií

1. v pôvodnom stave,

2. po zmrazení sledovaných kultúr (u izolátov z mrazeného mäsa možno hovoriť o opätovnom zmrazovaní) pred prípravou enzymatického materiálu, t. j. pred propagáciou kultúry,

3. po zmrazovaní enzymaticky účinného materiálu, t. j. bunkových suspenzií a bezbunkových extraktov tesne pred inkubáciou.

Výsledky pokusov s pôvodným materiálom ukázali, že sa odlišnou metodikou a analytikou dospelo v podstate k takým istým vzťahom ako v predchádzajúcich pokusoch. Z číselných údajov zostavených do 1. stĺpca tab. 1 (zľava) vidieť, že peptidázová aktivita enzymatického materiálu, reprezentovaného suspenziami, ako aj extraktmi baktérií pochádzajúcich z mrazeného mäsa, je štatisticky preukazným spôsobom vyššia než súbežne sledovaného enzymatického materiálu pripraveného z príslušných kultúr izolovaných z nemrazeného mäsa. Týmto sa potvrdil predpoklad vyslovený v predchádzajúcej práci o širšom rozsahu, resp. všeobecnejšom charaktere uvedeného javu.

Na objasnenie mechanizmu zmrazovaním vyvolaných zmien na enzymatickej aktivite po zmrazovaní slúžila najmä metodická úprava, pri ktorej sa počas pokusného sledovania sústavne rozlišovali mikróby fyziologicky oslabené zmrazovaním od tej časti testorganizmov, ktorá vyšla spod vplyvu nízkych teplôt nepoškodená. Príslušné výsledky (tab. 1) jednoznačne, t. j. štatisticky vysoko preukazne ($P < 0{,}01$) nasvedčovali tomu, že spomedzi izolátov z mrazeného mäsa len kultúry schopné rastu na minimálnej pôde, označované ako fyziologicky nepoškodené, poskytovali enzymatický materiál s relatívne zvýšenou aktivitou. Naopak kultúry, ktoré vyšli z dlhodobej úschovy pri nízkych teplo-

Tabuľka 1

Druh	Pôvod	Fyziologický stav kultúry (nároky na živiny)	Aplikačná forma enzymatickej látky	Peptidážová aktivita (prepočítaná na 15 min. inkubácie) v % hydrolýzy			
				Bez zmrazovania pôvodnej kultúry	Po zmrazovaní		
					kultúry	bunkovej suspenzie	bezbunkového extraktu
Bacillus mesentericus	*N*	*A*	*S*	11,3	15,2	18,3	
			E	23,8	27,6		28,8
	M	*A*	*S*	14,1	14,8	17,2	
			E	26,5	26,8		27,9
		B	*S*	8,3	8,5	9,1	
			E	19,4	19,7		23,9
Clostridium sporogenes	*N*	*A*	*S*	10,5	12,3	13,8	
			E	12,8	26,2		24,3
	M	*A*	*S*	13,2	14,1	15,8	
			E	25,9	26,6		25,9
		B	*S*	4,3	5,6	6,8	
			E	16,6	17,2		20,2
Proteus vulgaris	*N*	*A*	*S*	19,5	27,8	30,6	
			E	34,7	43,2		21,9
	M	*A*	*S*	26,3	29,1	32,8	
			E	44,2	44,5		38,2
		B	*S*	11,4	10,5	12,9	
			E	12,0	13,1		14,0
Achromobacter liquefaciens	*N*	*A*	*S*	13,8	16,3	17,9	
			E	18,2	24,9		26,3
	M	*A*	*S*	15,8	15,7	17,6	
			E	26,1	28,2		24,5
		B	*S*	3,2	4,1	6,3	
			E	6,9	9,8		8,1
Pseudomonas fluorescens	*N*	*A*	*S*	15,6	17,1	20,5	
			E	25,8	28,6		16,8
	M	*A*	*S*	17,3	18,2	22,7	
			E	30,2	29,5		38,5
		B	*S*	7,5	6,3	7,5	
			E	10,0	8,5		9,7

N — nemrazené mäso
M — mrazené mäso

A — normálny stav (nezvýšené nároky)
B — zhoršený stav (zvýšené nároky)
S — bunková suspenzia
E — bezbunkový extrakt

tách poškodené, mali vo väčšine prípadov ešte menšiu schopnosť štiepiť peptidy než im odpovedajúce izoláty z nemrazeného mäsa.

Výsledky pokusov s pôvodným materiálom bolo možné vyhodnotiť i z hľadiska kvantitatívnej rozdielnosti enzymatickej aktivity bunkových suspenzií a bezbunkových extraktov. Podobne v súhlase s výsledkami pokusov opísaných v predchádzajúcich častiach tejto práce sme aj teraz znova zistili, že aktivita bezbunkových extraktov je vždy vyššia než bunkových suspenzií. Javí sa to aj v tom prípade, ak ide o vysoko koncentrované suspenzie, ktorých sušina sa kvantitatívne len málo líši od sušiny biomasy použitej na prípravu bezbunkového extraktu.

Poznamenávame, že peptidázovú aktivitu bezbunkového extraktu nemožno priamo porovnávať s aktivitou bunkovej suspenzie ani v prípadoch, keď boli pripravené z rovnakého množstva biomasy. Preto sledované zmeny enzymatickej aktivity sa kvantitatívne vyhodnocovali iba v rámci jednotlivých aplikačných foriem. Výsledky získané za rôznych metodických podmienok s intaktnými bunkami sa len čo do smeru — dalo by sa povedať kvalitatívne — porovnávali s výsledkami dosiahnutými pomocou bunkových extraktov.

Z údajov extinkcie, resp. z nich vypočítaných hodnôt hydrolýzy, vyčíslených v 2. stĺpci (zľava) tab. 1, vidieť, že ak sa pôvodné kultúry vystavili, resp. opäť exponovali účinkom nízkych teplôt, a to predtým, čo sa z nich pripravil enzymatický materiál, malo zmrazovanie znova za následok zvýšenie aktivity. Tento kladný efekt zmrazovania sa obzvlášť výrazným spôsobom ukázal na kultúrach, ktoré pochádzali z nemrazeného mäsa, kým u izolátov z mrazeného mäsa bolo toto zvýšenie len malé, štatisticky nepreukazné.

Výsledky pokusov, ktorými sa sledovali zmeny peptidázovej aktivity pri zmrazovaní a rozmrazovaní enzymaticky účinného agensu tesne pred inkubáciou, sú zoradené do 3. stĺpca čísiel v tab. 1. Ako vidieť, za týchto metodických podmienok sa pôsobením mrazu štatisticky významným spôsobom zvýšila hydrolytická schopnosť bunkových suspenzií, naproti tomu zmeny peptidázovej aktivity bezbunkových extraktov sa prejavili veľmi nejednotným spôsobom. Účinnosť niektorých preparátov bola mierne zvýšená, iných zasa znížená alebo ostala nezmenená, ako to vidieť z výsledkov v 4. stĺpci (na pravom okraji) tab. 1.

Diskusia

Pokusné výsledky dovolili — v mnohých prípadoch so značnou pravdepodobnosťou — robiť závery na mechanizmus, ktorým zmrazovanie vyvolalo spozorované zmeny peptidázovej aktivity. Napriek tomu sme považovali za správne tieto závery uviesť ešte len v rámci diskusie.

Zvýšenie enzymatickej aktivity materiálu pripraveného z fyziologicky nepoškodených kultúr izolovaných z mrazeného mäsa sa vo všetkých pokusoch prejavovalo jednotným spôsobom. Preto sa zdá veľmi pravdepodobným, že mechanizmus tohto javu je významným, ak nie výlučným spôsobom podmienený jednotným mechanizmom, a to procesom hypotermickej selekcie. Táto selekcia spočíva v tom, že časť kultúry mrazom zahynie. Na rozdiel od protichodných názorov predpokladáme, že mikróbna populácia nie je rovnako citlivá na účinky zmrazovania a že predovšetkým odumierajú bunky, ktoré na základe svojich fyziologických vlastností sú voči mrazu citlivejšie [5]. Už týmto by sa mal uskutočniť výber mikroorganizmov. Tento selekčný účinok sme však ešte nedokázali. Naše pokusy svedčia o tom, že časť kultúry,

ktorá prežila účinky zmrazovania, diferencuje sa na frakcie so zvýšenými a nezmenenými nárokmi na živiny. Fyziologicky nepoškodená časť kultúry, ktorú sme selektovali na základe jej schopnosti rásť na minimálnej pôde, ukázala sa za našich pokusov ako nosič zvýšenej peptidázovej schopnosti.

Na selekčný proces poukazujú aj výsledky ďalších pokusov, pri ktorých sa kultúry zmrazovali pred propagáciou, t. j. pred prípravou enzymatického materiálu. Pri takejto aplikácii zmrazovania sa výrazným spôsobom zvýšila peptidázová aktivita tých kultúr, ktoré pochádzali z nemrazeného mäsa. Na základe selekčného mechanizmu je to vysvetliteľné tým, že sa tento proces mohol výraznejšie uplatniť pri kultúrach, ktoré sa ešte nepodrobili účinkom nízkych teplôt.

Na rozdiel od mechanizmu zvýšenia enzymatickej aktivity kultúr zmrazovaných pred ich propagáciou, ktorý môžeme označiť ako biologický proces, zvýšenie peptidázovej účinnosti, ktoré sa pravidelne prejavovalo po zmrazovaní bunkových suspenzií, je vysvetliteľné fyzikálnymi, resp. mechanickými dejmi. Máme pritom na mysli najmä kladný vplyv zmrazovania na permeabilitu bunkovej blany, ako aj možnosť priamej deštrukcie bunkového obalu v dôsledku narastania ľadových kryštálov.

Zmeny v aktivite bezbunkových extraktov sú pravdepodobne zložitejšie, resp. mnohostranne podmienené. Zvýšená hydrolytická schopnosť by bola vysvetliteľná predovšetkým mrazovou dezagregáciou enzýmových molekúl, ktorou sa zvyšuje podiel plochy povrchu enzýmu, obsadenej substrátovými molekulami [6, 12]. Za určitých podmienok spôsobu zmrazovania, ako aj vlastností prostredia, ktoré podrobnejšie rozvádzame na inom mieste [2], môžu však bielkoviny opačne reagovať na vplyv nízkych teplôt, t. j. kryolytickou agregáciou až denaturáciou. Tým by sa vysvetľovalo zníženie enzymatickej účinnosti preparátov. Konečne môže nastať aj taký prípad, že sa zmrazovaním, najmä ak trvá len kratšiu dobu, nenarušuje štruktúra, resp. vlastnosti bielkoviny, včítane enzýmov. V tejto spojitosti treba poznamenať, že vplyv nízkych teplôt na enzýmy je dosiaľ len veľmi nedostatočne objasnený [10, 11, 13]. Z toho dôvodu sme pri výklade mechanizmu podrobili rozboru iba také reakcie, resp. výsledky, ktoré sa jednotným spôsobom prejavili na celom sledovanom materiáli a počas všetkých pokusov. Zanedbávali sme reakcie špecifické pre jednotlivé druhy mikroorganizmov, ku ktorým sme počítali, vychádzajúc zo skúseností z predchádzajúcich pokusov, kinetiku enzymatického procesu a jeho závislosť od teploty.

Súhrn

V tretej časti práce venovanej štúdiu vplyvu zmrazovania na enzymatickú aktivitu baktérií sa znovu súbežne sledovalo päť druhov baktérií izolovaných jednak z mrazeného, jednak z nemrazeného mäsa. Ako enzymatický materiál

sa použili bunkové suspenzie baktérií a z nich pripravené bezbunkové extrakty. Ako substrát slúžil *d,l*-leucylglycylglycín. Hydrolýza sa merala kvantitatívnou chromatografiou. Zvláštnosť metodiky spočívala v tom, že sa stanovovala aktivita enzymatického materiálu pripraveného z pôvodných kultúr i z mikróbnych kultúr zmrazovaných pred pokusom a sledovali sa aj zmeny enzymatickej aktivity na materiáli zmrazenom tesne pred inkubáciou. Pri pokusoch sa na základe nárokov na živiny sústavne diferencovala enzymatická aktivita fyziologicky silných kultúr od fyziologicky oslabených, resp. mrazom poškodených kultúr.

Výsledky ukázali, že baktérie, ktoré pri zmrazovaní neboli fyziologicky poškodené, mali vyššiu peptidázovú aktivitu, než mala pôvodná kultúra. Podľa toho je zvýšenie enzymatickej aktivity, spozorované aj v predchádzajúcich častiach práce u kultúr, ktoré boli vystavené nízkym teplotám, vysvetliteľné procesom biologickej selekcie. Zmrazovaním bunkových suspenzií sa dosahuje tiež zvýšenie hydrolytickej schopnosti. Tu sa to vysvetľuje zvýšením permeability bunkových blán, resp. ich mechanickým poškodením. Na enzymatickú aktivitu bezbunkových extraktov pôsobí zmrazovanie nejednotne. O príčinách tohto javu, ktoré možno hľadať v rozličných závislostiach kryolitických procesov, hovorí sa v rámci diskusie.

ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ЭНЗИМОВ У МИКРООРГАНИЗМОВ, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ ЗАМОРОЖЕННОГО МЯСА (III) ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ЗАМОРАЖИВАНИЯ НА ПЕПТИДАЗЫ

Я. АРПАЙ, М. БЕГУНЬ, З. ЛИФКОВА

Микробиологический отдел исследовательского института замораживания в Братиславе

Выводы

В третьей части работы, посвященной изучению влияния замораживания на энзиматическую активность бактерий, исследовались опять параллельно пять видов бактерий из замороженного а также из незамороженного мяса. В качестве энзиматического материала применялись клеточные суспензии бактерий и из них приготовленные безклеточные экстракты. В качестве субстрата служил *d,l*-лейцилглицилглицин. Гидролиз определялся количественной хроматографией. Особенность методики основывалась на том, что определялась активность энзиматического материала, приготовленного из первоначальных культур, потом из микробных культур замороженных перед опытом, кроме того исследовались и изменения энзиматической активности на материале замороженном непосредственно перед инкубацией. При опытах, на основании требований предъявляемых к питательным веществам, систематически дифференцировалась энзиматическая активность физиологически сильных культур от физиологически ослабленных или поврежденных морозом.

Результаты указали, что бактерии, которые при замораживании не были физиологически поврежденными, имеют высшую пептидазовую активность, чем малая первоначальная культура. На основании этого увеличение энзиматической активности повторнонаблюдаемой и в предыдущих частях работы у культур, которые были предоставлены действию низкиз температур, является объяснимым а то процессом биологической селекции. При замораживании клеточных суспензий получается также увеличение гидролитической способности. Это можно объяснить увеличением проницаемости клеточной ткани или же их механическим повреждением. На энзиматическую активность безклеточных экстрактов действует замораживание неодинаково. О причинах этого явления, объяснение которого можно найти в различных взаимоотношениях криолитических процессов, говориться в рамках дискуссии.

Поступило в редакцию 8. 9. 1960 г.

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE AKTIVITÄT PROTEOLYTISCHER ENZYME VON GEFRIERFLEISCHMIKROBEN (III) CHROMATOGRAPHISCHE STUDIE DES EINFLUSSES DES GEFRIERPROZESSES AUF PEPTIDASEN

J. ARPAI, M. BEHÚŇ, Z. LIFKOVÁ

Mikrobiologische Abteilung des Forschungsinstituts für Gefriertechnik in Bratislava

Zusammenfassung

Im dritten Teil dieser dem Studium des Einflusses des Gefrierprozesses auf die enzymatische Aktivität von Bakterien gewidmeten Arbeit wurden wiederum parallel fünf Arten von Bakterien untersucht, welche einerseits aus gefrorenem und andererseits aus nicht gefrorenem Fleisch isoliert wurden. Als enzymatisches Material wurden Zellensuspensionen von Bakterien und aus diesen zubereitete zellfreie Extrakte verwendet. Als Substrat diente *D,L*-Leucylglycylglycin. Die Hydrolyse wurde quantitativ mittels Chromatographie bestimmt. Die Besonderheit der Methodik beruhte darin, dass die Aktivität des aus den ursprünglichen Kulturen zubereiteten enzymatischen Materials bestimmt wurde, dann aus Mikrobenkulturen, welche vor dem Versuch einem Gefrierprozess unterworfen wurden, und schliesslich wurden auch noch die Änderungen der enzymatischen Aktivität eines Materials untersucht, welches erst kurz vor der Inkubation gefroren wurde. Bei diesen Versuchen differenzierte sich auf Grund der Nährstoffansprüche systematisch die enzymatische Aktivität der physiologisch starken Kulturen von den physiologisch geschwächten bzw. durch Frost geschädigten.

Die Ergebnisse zeigten, dass Bakterien, welche beim Gefrieren physiologisch nicht geschädigt wurden, eine höhere Peptidaseaktivität aufweisen, als bei der ursprünglichen Kultur zu beobachten war. Demgemäss kann die Erhöhung der enzymatischen Aktivität, welche auch in den vorangegangenen Teilen dieser Arbeit bei Kulturen beobachtet wurde, die niedrigen Temperaturen ausgesetzt wurden, durch den Prozess einer biologischen Selektion erklärt werden. Beim Gefrieren von Zellensuspensionen wird ebenfalls eine Erhöhung der hydrolytischen Fähigkeit erreicht. Hier kann dies durch eine Erhöhung der Permeabilität der Zellmembranen bzw. durch deren mechanische Beschädigung erklärt werden. Auf die enzymatische Aktivität der zellfreien Extrakte wirkt der Gefrierprozess uneinheitlich ein. Die möglichen Ursachen dieser Erscheinung, welche man wohl

in den vielseitigen Abhängigkeiten der kryolytischen Prozesse suchen kann, werden im Rahmen der Diskussion behandelt.

In die Redaktion eingelangt den 8. 9. 1960

LITERATÚRA

1. Arpai J., Chem. zvesti *14*, 148 (1960). — 2. Arpai J., Biológia *15*, 461 (1960). — 3. Arpai J. a spolupracovníci, *Výskum vplyvu nízkych teplôt na morfologické a fyziologické vlastnosti mikroorganizmov nachádzajúcich sa na potravinách.* Záverečná zpráva na Výskumnom ústave mraziarenskom, Bratislava 1959. — 4. Arpai J., Lifková Z., Chem. zvesti *15*, 218 (1961). — 5. Arpai J., Biológia *16*, 31 (1961). — 6. Bladergroen W., *Einführung in die Energetik und Kinetik biologischer Vorgänge*, Basel 1955. — 7. Hais I. M., Macek K. a spolupracovníci, *Papírová chromatografie*, Praha 1959. — 8. Haschen R. J., Pharmazie *9*, 824 (1954). — 9. Haschen R. J., Clinica Chimica Acta *1*, 242 (1956). — 10. Kiermeier F., Biochem. Z. *318*, 275 (1944).

11. Kiermeier F., Biochem. Z. *319*, 463 (1949). — 12. Nord F. F., Erg. Enzymforsch. *1*, 77 (1932); *2*, 23 (1933). — 13. Precht H., Christophersen J., Hensel H., *Temperatur und Leben*, Berlin 1955.

Do redakcie došlo 8. 9. 1960

Adresa autorov:

C. Sc. Ján Arpai, inž. Miroslav Behúň, inž. Zdenka Lifková, Bratislava, Trenčianska 53, Výskumný ústav mraziarenský.