

Formulár ZK - Záverečná karta projektu

Riešiteľ: prof. Ing. Ján Blahovec, CSc	Evidenčné číslo projektu: APVT-20-007404
Názov projektu: Izolácia a purifikácia proteáz a inhibítorov proteáz biomasy lariev muchy domácej	

Na ktorých pracoviskách bol projekt riešený:	Katedra chémie, biochémie a biofyziky , UVL Košice
	Katedra parazitológie , UVL Košice
Ktoré zahraničné pracoviská spolupracovali pri riešení (názov, štát):	

Udelené patenty alebo podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory vychádzajúce z výsledkov projektu:	
Publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu (uveďte i publikácie prijaté do tlače alebo pripravované): <i>Uvádzajte maximálne päť najvýznamnejších publikácií.</i>	Blahovec, J., Kostecká, Z.: Proteázy a ich inhibítory v larvách muchy. Možnosti terapeutického využitia, UVL, Košice a ÚSVZ, Prešov, 2007, ISBN: 978-80-89271-28-3, počet strán 84
	Blahovec, J., Kostecká, Z., Kočišová, A.: Peptidolytic enzymes in different larval stadium of housefly <i>Musca domestica</i> . Vet. Med.- Czech, 51, 2006 (4): 139-144.
	Kostecká, Z., Blahovec, J., Kočišová, A.: Partial purification of larval aminopeptidases and determination of some kinetic parameters. Collection Symposium Series 9, 2007, 66-68.
	Blahovec, J., Kostecká, Z., Kočišová, A.: Larvoterapia, alternatívna možnosť liečenia rán v humánnej a veterinárnej medicíne. Mechanizmy účinku. Veterinárství – prijatý článok
	Blahovec, J. -Kostecká, Z. -Kočišová, A.: Proteolytic enzymes with endo- and exo-peptidolytic activity in different larval stages of housefly <i>Musca domestica</i> . Collection Symposium Series 9, 2007, 11-13.
V čom vidíte uplatnenie výsledkov tohto projektu:	Projekt má vedecký charakter, ale má aj biotechnologické aspekty. Napríklad Sigma na svetovom trhu ponúka aminopeptidázu (50U/mg) za cca 200\$, výroba zrovnateľného preparátu z lariev muchy by bola približne desaťkrát lacnejšia.

Podpisom záverečnej karty riešiteľ vyjadruje svoj súhlas ku zverejneniu údajov v nej uvedených.

Podpis riešiteľa:

Dátum: .26.1.2008.....

Charakteristika výsledkov

Evidenčné číslo: APVT-20-007404

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu (max. 20 riadkov) - slovensky:

Larvy hmyzu obecné poskytujú relatívne ľahko získateľný zdroj biologicky zaujímavých látok, ale rôznorodosť, metabolická odlišnosť a genetická variabilita jednotlivých druhov predpokladá predchádzajúci podrobný výskum každého hmyzieho druhu. U muchy domácej *Musca domestica* sme na základe použitia enzým-špecifických substrátov identifikovali 6 typov rôznych proteinázových enzýmov s rozličnou aktivitou v jednotlivých štádiách larválneho vývoja. Na rozdiel od údajov týkajúcich sa prevažnej väčšiny lariev iného hmyzu, sme u muchy domácej nepotvrdili skutočnosť, že hlavnými peptidolytickými enzýmami sú enzýmy podobné trypsínu a chymotrypsínu. Zistili sme, že u lariev muchy zjavne prevažujú enzýmy s exopeptidázovou aktivitou povahy aminopeptidáz a karboxypeptidáz. Aktivity enzýmov aminopeptidázovej povahy porovnané na báze špecifických aktivít boli viac ako 15 násobne vyššie ako enzýmov podobných trypsínu, alebo chymotrypsínu. Prioritným výsledkom je zistenie podstatných diferencií v zastúpení proteinázových enzýmov v rôznych fázach larválneho vývoja. Enzymatická aktivita všetkých sledovaných peptidolytických enzýmov výrazne klesá a po 120 hodinách je až 10 krát nižšia ako v prvých 24 hodinách. Izolovali sme a čiastočne purifikovali leucínaminopeptidázu z lariev v prvom larválnom štádiu. Na základe inhibičných štúdií s rôznymi dvojmocnými kationmi a enzým špecifickými inhibítormi sme určili, že enzým patrí do skupiny enzýmov, označovaných ako metaloproteinázy. Stanovili sme niektoré fyzikálno-biochemické charakteristiky čiastočne purifikovaného enzýmu ako sú K_m , V_{max} , k_{cat} a C , ďalej pH optimum, teplotnú stabilitu a molekulovú hmotnosť, ktorá je vyššia ako 200 kDa. Z hľadiska možnosti ovplyvnenia indukcie enzýmov s peptidolytickou aktivitou s následným zvýšením ich produkcie, prípadne možnosti použitia prirodzených proteinázových inhibítorov pre bioinsekticídne účely, vyskúšali sme vplyv sójových proteinázových inhibítorov na rast, vývoj a produkciu peptidolytických enzýmov lariev muchy v rôznych vývojových štádiách. Prítomnosť 2% sójovej múčky v diete výrazne znižovala rast a vývoj mušíc lariev. Rovnaké, alebo len nesignifikantne väčšie účinky mala aj diéta s 4% obsahom sójovej múčky. Enzymatická aktivita ako u aminopeptidázových, tak aj u trypsínu a chymotrypsínu podobných enzýmov sa u lariev s diétou obohatenou o sójové inhibítory zvyšovala. Uvádzané výsledky na základe porovnania a prieskumu vo svetovej literatúre sú originálne a prioritné a môžu byť použité nie len pre vedecké, ale aj komerčné účely

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu (max. 20 riadkov) - anglicky:

In general insect larvae provide relatively easily obtainable source of biologically active substances, but heterogenousness, metabolic difference and genetic variability of individual species suppose previous exact research of any insect species. In housefly (*Musca domestica*) we identified 6 types of different proteinases with different enzyme activity in particular stages of larval development by using of enzyme-specific substrates. In contrast to the data about larvae of most different insect we did not confirm in housefly that the major peptidolytic enzymes are trypsin-like and chymotrypsin-like enzymes. We found mostly exopeptidase activity of aminopeptidase and carboxypeptidase nature in housefly larvae. Aminopeptidase activity compared on the base of specific activity was 15 times higher than trypsin-like and chymotrypsin-like activities. The priority result is finding of relevant differences in abundance of proteinases in different stages of larval development. Activity of all observed peptidolytic enzymes decreased and after 120 hours it was approximately 10 times lower than in first 24 hours of development. We isolated and partially purified leucine aminopeptidase of first stage larvae. We determined that this enzyme belongs to the metaloproteinases for a consideration of inhibitory study with different bivalent cations and enzyme-specific inhibitors. We determined some physical and biochemical characteristics of partially purified enzyme as K_m , V_{max} , k_{cat} and C , pH optimum, temperature stability and molecular weight higher than 200 kDa. In term of possibility of peptidolytic enzyme induction with next increasing their production or possibility of using of natural proteinase inhibitors for bioinsecticide purposes we examined the influence of soybean proteinase inhibitors on growth, development and production of peptidolytic enzymes by housefly larvae in different developmental stages. The 2% presence of soybean flour in diet significantly decreased the growth and development of housefly larvae. The diet with 4% of soybean flour had the same or non significantly higher effects. Aminopeptidase, trypsin-like and chymotrypsin-like activities were increased in larvae on diet with soybean inhibitors. These results are original and preferred in comparison to world literature and can be used not only for scientific, but also for commercial purposes.

Podpis riešiteľa: