



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**SCREENING PRODUKCE EXTREMOZYMŮ U VYBRANÝCH
EXTRÉMOFILNÍCH PRODUCENTŮ PHA**

SCREENING OF EXTREMOZYME PRODUCTION OF SELECTED EXTREMOPHILIC PHA PRODUCERS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Dmitry Dyagilev

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Iva Pernicová, Ph.D.

BRNO 2021

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1708/2020 Akademický rok: 2020/21
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student: **Dmitry Dyagilev**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Biotechnologie
Vedoucí práce: **Ing. Iva Pernicová, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Screening produkce extremozymů u vybraných extrémofilních producentů PHA

Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše na zadané téma.
2. Testování produkce vybraných extremozymů.
3. Produkce extremozymů u slibných producentů.

Termín odevzdání bakalářské práce: 30.7.2021:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Dmitry Dyagilev
student(ka)

Ing. Iva Pernicová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá screeningem produkce extracelulárních hydrolytických enzymů u termofilních mikroorganismů rodů *Aneurinibacillus*, *Brevibacillus*, *Chelatococcus*, *Pseudomonas*, *Schlegelella*, *Tepidimonas* a *Caldimonas*. U zkoumaných mikroorganismů byla testována schopnost produkce vybraných enzymů, konkrétně proteáz, lipáz, amyláz, xylanáz, celuláz a pektináz. Takové testování dalo možnost posoudit, u kterých mikroorganismů je možné pozorovat produkci konkrétních enzymů. Na základě výsledků screeningu bylo zjištěno, že *Schlegelella aquatica* LMG 23380, *Tepidimonas fonticaldi* LMG 26746 a zkoumané mikroorganismy z rodu *Chelatococcus* neprojevily schopnost extracelulárně produkovat žádný z testovaných enzymů. U přírodních izolátů *Brevibacillus borstelensis* LK 99 a *Aneurinibacillus thermoaerophilus* LK 102 byla detekována pouze schopnost produkce lipolytických enzymů. Jako univerzální producent všech vybraných extremozymů vystupuje izolát *Brevibacillus borstelensis* Bz. U vybraných producentů bylo provedeno stanovení aktivity enzymů. Bakterie *Brevibacillus borstelensis* Bz dokázala schopnost produkce všech šesti vybraných hydrolytických enzymů a také má nejvyšší aktivitu lipáz, xylanáz, celuláz a pektináz z testovaných mikroorganismů. Nejvyšší proteolytickou aktivita byla naměřena u bakterie *Thermomonas hydrothermalis* DSM 14834 při kultivaci na odstředěném sušeném mléce.

KLÍČOVÁ SLOVA

Termofilní mikroorganismy, screening, PHA, extremozymy, proteázy, lipázy, amylázy, xylanázy, celulázy, pektinázy, aktivita enzymů

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the screening of the production of extracellular hydrolytic enzymes in thermophilic microorganisms of the genera *Aneurinibacillus*, *Brevibacillus*, *Chelatococcus*, *Pseudomonas*, *Schlegelella*, *Tepidimonas* and *Caldimonas*. The ability of selected enzymes, namely proteases, lipases, amylases, xylanases, cellulases and pectinases, was tested in the investigated microorganisms. Such testing made it possible to assess in which microorganisms the production of specific enzymes can be observed. Based on the results of the screening, it was found that *Schlegelella aquatica* LMG 23380, *Tepidimonas fonticaldi* LMG 26746 and the investigated microorganisms of the genus *Chelatococcus* did not show the ability to produce any of the tested enzymes extracellularly. In natural isolates of *Brevibacillus borstelensis* LK 99 and *Aneurinibacillus thermoaerophilus* LK 102, only the ability to produce lipolytic enzymes was detected. The isolate *Brevibacillus borstelensis* Bz acts as a universal producer of all selected extremozymes. Enzyme activity was determined for selected producers. The bacterium *Brevibacillus borstelensis* Bz proved the ability to produce all six selected hydrolytic enzymes and has the highest activity of lipases, xylanases, cellulases and pectinases from the tested microorganisms. The highest proteolytic activity was measured in *Thermomonas hydrothermalis* DSM 14834 when cultured on skimmed milk powder.

KEY WORDS

Thermophilic microorganisms, screening, PHA, extremozymes, proteases, lipases, amylases, xylanases, cellulases, pectinases, enzyme activity

Bibliografická citace

DYAGILEV, Dmitry. Screening produkce extremozymů u vybraných extrémofilních producentů PHA. Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131519>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Iva Pernicová.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování

*Rád bych poděkoval vedoucí práce Ing. Ivě Pernicové, Ph.D., za odborné vedení, neutuchající optimismus, trpělivost a ochotu ke spolupráci.
Velké poděkování patří také rodině a přátelům za morální i materiální podporu.*

OBSAH

1. ÚVOD	8
2. TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1. Extremofilní organismy.....	9
2.1.1. Základní metody adaptace mikroorganismů na extrémní podmínky	9
2.1.2. Halofilní mikroorganismy	10
2.1.3. Alkalofilní mikroorganismy	11
2.1.4. Acidofilní mikroorganismy	11
2.1.5. Termofilní mikroorganismy	12
2.2. Biotechnologický potenciál extremofilních mikroorganismů.....	12
2.3. Polyhydroxyalkanoáty.....	15
2.3.1. Biosyntéza	16
2.3.2. Využití	16
2.4. Vybraní extremofilní zástupci.....	17
2.4.1. Rod <i>Caldimonas</i>	17
2.4.2. Rod <i>Bacillus</i>	17
2.4.3. Rod <i>Schlegelella</i>	17
2.4.5. Rod <i>Tepidimonas</i>	18
2.5. Enzymy.....	18
2.5.1. Extrémní enzymy.....	19
2.5.2. Termoenzymy	20
2.6. Screening a detekce enzymů	21
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
3.1. Použité mikroorganismy, chemikálie a přístroje.....	24
3.1.1. Použité mikroorganismy.....	24
3.1.2. Použité chemikálie.....	24
3.1.2.1. Chemikálie pro kultivace	24
3.1.2.2. Chemikálie pro screening enzymů.....	25
3.1.2.3. Chemikálie pro stanovení enzymatické aktivity	25
3.2. Kultivace mikroorganismů.....	25
3.2.1. Inokulační média	25
3.2.2. Produkční média	27
3.3. Stanovení obsahu biomasy	29

3.4.	Screening produkce různých enzymů	29
3.5.	Stanovení enzymatické aktivity	30
3.5.1.	Stanovení aktivity proteáz	30
3.5.2.	Stanovení aktivity lipáz	30
3.5.3.	Stanovení aktivity amyláz, xylanáz, celuláz a pektináz	30
4.	VÝSLEDKY A DISKUZE	32
4.1.	Screening a stanovení extremozymů u vybraných producentů PHA	32
4.2.	Screening produkce vybraných extremozymů	32
4.3.	Stanovení amylolytické aktivity	40
4.4.	Stanovení pektinolytické aktivity	41
4.5.	Stanovení celulolytické aktivity	43
4.6.	Stanovení proteolytické aktivity	44
4.7.	Stanovení xylanolytické aktivity	46
4.8.	Stanovení lipolytické aktivity	48
5.	ZÁVĚR	51
6.	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	52
7.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	57

1. ÚVOD

Extrémofilní mikroorganismy představují jednu z nejzajímavějších skupin organismů na Zemi, protože mají vysoko funkční adaptivní mechanismy, díky kterým mohou žít v extrémním prostředí, které může být charakterizováno vysokou, nebo nízkou teplotou, vysokým, nebo nízkým tlakem, obsahem soli a radiací. Takové vlastnosti prostředí jsou naprosto smrtelné pro většinu „běžných“ organismů. Extrémofily v takových podmínkách prostředí nejen žijí, ale také se rozvíjí [1].

V současnosti existuje velká rozmanitost extrémofilů podle podmínek prostředí. A jednou z takových podskupin tvoří termofilní mikroorganismy. Jejich adaptivita se projevuje na základě toho, že termofily mají optimum teploty pro růst od 50 °C a výše. A díky teplotě, růstu a adaptivním mechanismům nalézají své uplatnění v mnohých odvětvích, jako jsou mlékárenský, textilní, farmaceutický průmysl, recyklace odpadu, výroba biopaliv a jiné. A k uplatnění termofilů a jejich účinných látek, jako jsou enzymy, dochází nejen kvůli tomu, že proces výroby potřebuje vysokou termostabilitu, ale také díky tomu, že vysoká teplota zvyšuje reakční rychlost, snižuje náklady na údržbu sterility a značně zvyšuje rozpustnost mnohých látek. A na základě těchto a dalších výhod stále probíhají měření aktivity různých mikroorganismů za podmínek vysoké teploty [2, 3].

V dnešní době probíhá globální výroba různých syntetických plastů. Taková masivní produkce polymerů v kombinaci s biologickou nerozložitelností vede k celosvětovým problémům hromadění plastového odpadu, znečištění pitné vody a podobně. Jednou ze vhodných alternativ pro nahrazení petrochemických plastů je skupina polyhydroxyalkanoátů (PHA). Polyhydroxyalkanoáty jsou ve vodě nerozpustné organické biopolymery, které jsou syntezovány bakteriemi. Výhoda takových polymerů spočívá v jejich biodegradabilitě, ale současně jsou dražší než běžné petrochemické plasty. Spojením výroby dvou produktů může vést ke snížení nákladu na biotechnologický proces. Například při současné produkci polyhydroxyalkanoátů a různých extremozymů [4].

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Extremofilní organismy

Extremofilními organismy nazýváme takové organismy, které mohou přežít extrémní podmínky a vést funkční život při podmínkách, jako jsou nízká, nebo vysoká teplota, nízký, nebo vysoký tlak, přítomnost radiace, vysoký obsah soli nebo jiné faktory. Tyto organismy klasifikujeme na základě adaptace k faktoru prostředí [1].

Extremofilní organismy mohou být adaptovány na více extrémních podmínek. U ekosystémů hydrotermálních mořských průduchů musí organismy například přežít nejen vysokou teplotu, ale ještě vysoký tlak a vyšší obsah různých anorganických prvků, jako je například síra [5]. V takovém případě nazýváme tyto organismy polyextremofilní.

Následující tabulka 1 uvádí rozdělení extremofilů na základě podmínek prostředí.

Tabulka 1: Klasifikace a příklady extremofilů [1].

Parametry prostředí	Typ	Definice	Příklady
Teplota	Hypertermofily	> 80 °C	<i>Pyrolobus fumarii</i>
	Termofily	60–80 °C	<i>Synechococcus lividis</i>
	Psychrofilny	< 15 °C	<i>Psychrobacter</i>
Slanost	Halofily	2–5 M NaCl	<i>Halobacteriaceae</i> , <i>Dunaliella salina</i>
pH	Alkalofily	pH > 9	<i>Natronobacterium</i> , <i>Bacillus firmus</i> OF4, <i>Spirulina spp.</i> (pH 10,5)
	Acidofily	Nízké pH	<i>Cyanidium caldarium</i> , <i>Ferroplasma sp.</i> (pH 0)
Chemické extrémy	Plyny		<i>C. caldarium</i> (čistý CO ₂)
	Kovy	Toleruje vysoké koncentrace kovů	<i>Ferroplasma acidarmanus</i> (Cu, As, Cd, Zn); <i>Ralstonia sp.</i> CH34 (Zn, Co, Cd, Hg, Pb)

2.1.1. Základní metody adaptace mikroorganismů na extrémní podmínky

Ve světě existuje obrovské množství prostředí a podmínek, ve kterých žijí organismy. Existují však i podmínky, které jsou pro většinu typů mikroorganismů příliš extrémní. Mikroorganismy, jež v takových podmínkách žijí, musí zlepšovat metody, jak se jim přizpůsobit. Je tak mnoho různých obranných mechanismů, do nichž jsou zapojeny tři hlavní skupiny biomolekul – nukleové kyseliny, proteiny a membránové lipidy. Pro každé prostředí fungují tyto biomolekuly odlišně [1].

Při vysokých teplotách například musela buňka změnit složení membrány, konkrétně pak množství a typy lipidů. Teplota také ovlivňuje proteiny, a proto zvýšily počet iontových párů, vytvářely oligomery vyššího řádu atd. V případě nukleových kyselin musely ke své struktuře připojit monovalentní a dvojmocné soli, protože soli zvyšují stabilizaci a chrání před denaturací [1].

V případě změny osmolarity buňky používají jeden z nejúčinnějších regulačních mechanismů – produkci osmolitů. Tyto důležité rozpuštěné látky jako K^+ , glutamát, glutamin, glycin betain, sacharóza a jiné jsou umístěny vedle proteinů, vytlačují vodu a stabilizují proteiny [1]. Proto můžeme říct, že hlavní metody adaptace jsou udržení vnějšího prostředí venku, rychlé zbavení se nežádoucích látek v cytoplazmě a někdy také změna fyziologie buněk.

2.1.2. Halofilní mikroorganismy

Halofily jsou mikroorganismy, které jsou schopné růst v koncentracích solí 2,5 M a zahrnují všechny tři domény života, tj. archea, bakterie a eukaryota. Většina z halofilů patří do bakteriální čeledi *Halomonadaceae* a kmenu *Proteobacteria*. Druhy, které spadají do této skupiny mikroorganismů, jsou aerobní, anaerobní, chemoheterotrofní, fotoheterotrofní nebo fotoautotrofní, vyskytují se v jezerech a pobřežních oblastech po celém světě. Na základě takové rozmanitosti výskytu a zástupců uvádí následující tabulka 2 klasifikaci mikroorganismů podle slanosti, kterou jsou schopné přežít [6].

Tabulka 2: Klasifikace mikroorganismů podle jejich tolerance k slanosti [6].

Kategorie	Tolerance solí (M)	Příklady
Nehalofilní	< 0,2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Bacillus</i> sp.
Mírný halofil	0,2–0,5	<i>Bacillus hunanensis</i> , <i>Alkalibacterium gilvum</i>
Střední halofil	0,5–2,5	<i>Salinivibrio costicola</i> , <i>Halobacillus sediminis</i>
Hraniční extrémní halofil	2,5–4,0	<i>Halobacteroides halobius</i> , <i>Desulfovibrio retbaense</i>
Extrémní halofil	4–5,9	<i>Halococcus salifodinae</i> , <i>Limimonas halophila</i>

Mikroorganismy, které nejsou adaptovány na vysoce slané prostředí, budou ztrácet vodu, což způsobí ztrátu buněčné struktury a funkci. Z toho důvodu halofily musely vyvinout dvě základní strategie pro zvýšení osmotické aktivity jejich cytoplazmy s vnějším prostředím, a to produkci kompatibilních organických látek nebo dosažení rovnovážného stavu, ve kterém celková koncentrace solí v buňkách odpovídá koncentraci v prostředí [6].

Mechanismus zvyšující obsah soli neboli dosažení rovnovážného stavu je adaptace, která brání halofily před solným prostředím, v němž akumulují anorganické ionty intracelulárně, aby došlo k vyrovnání koncentrace solí. Tento proces zařazuje Cl^- pumpy, které transportují Cl^- z prostředí do cytoplazmy. Pro snadné vychytávání a uvolňování iontů jsou na obou koncích kanálu usazeny argininy a lysiny [6].

Taková adaptace je kompatibilní pro skupinu středních halofilů, které se nachází v prostředí kolísavé slanosti. Vzhledem k takové situaci adaptace zahrnuje ještě vývoj kompatibilních organických rozpouštěných látek (tj. osmolytů), které chrání mikrobiální proteiny před degradací ve vodě s nízkou koncentrací soli a zvyšují toleranci ke změnám vnějšího solného prostředí. Jedním z příkladů osmolytů je ektoin nebo hydroxyektoin [6].

2.1.3. Alkalofilní mikroorganismy

Alkalofily jsou mikroorganismy, které rostou optimálně při hodnotách pH 9 a více a nemohou projevit, nebo projevují jen velmi nízkou aktivitu při neutrální hodnotě pH. Tato skupina organismů zahrnuje všechny tři domény, tj. archea, bakterie a eukaryota. Alkalofily zahrnují dvě základní fyziologické skupiny, jsou to samotné alkalofily a haloalkalofily. Haloalkalofily oproti alkalofilům vyžadují nejen silně alkalické prostředí, ale i vysokou slanost, což je až 33 % roztoku soli [7].

Vzhledem k vysoce alkalickému prostředí musely alkalofily vyvinout různé mechanismy adaptace. Jeden z důležitých procesů je udržování intracelulárního pH kolem hodnoty 7,5. Takový mechanismus regulace probíhá pomocí buněčné stěny. Buněčné stěny alkalofilních druhů obsahují různé kyselé polymery, které fungují jako negativně nabitě částice a snižují hodnotu pH na povrchu buněk. Tato hodnota musí být udržována pod pH 9, protože plazmatická membrána je nestabilní při pH alkalického prostředí. Dále bylo zjištěno, že množství kyselých polymerů roste během růstu za alkalických podmínek [7].

2.1.4. Acidofilní mikroorganismy

Acidofily jsou mikroorganismy, které jsou metabolicky aktivní v extrémně kyselém prostředí, kde je pH nižší než 3. Většina acidofilních mikroorganismů se uplatňuje v doménách bakterie a archea. Kromě kyselého prostředí mají acidofily ještě jiné fyziologické a fylogenetické příznaky, s jejichž pomocí jsou kategorizovány. Podle teploty mohou být rozděleny na mezofily, mírné termofily a termofily. Podle buněčného získávání uhlíku se dělí na autotrofy, heterotrofy a mixotrofy. Také je možné provést rozdělení acidofilů podle solubilizace minerálů. V takovém případě acidofilní mikroorganismy zahrnují skupinu prokaryot, které urychlují rozpouštění minerálů oxidační cestou, a skupinu těch, které používají redukční mechanismus [8].

Acidofily stejně jako ostatní mikroorganismy vyžadují cirkumneutrální intracelulární pH. Takový rozdíl pH přes membránu těsně souvisí s buněčnou bioenergetikou, protože rozdíl pH je hlavní přispěvatel k protonové hnací síle. Tato síla podporuje pohyb protonů přes membránu, což vede k přeměně ADP na ATP. Příliv protonů ale zvyšuje buněčnou protonaci, a pokud tento proces není regulován, může dojít k rozptýlení rozdílu pH. Kromě toho přebytek protonů může porušit různé buněčné procesy, jako jsou replikace DNA, transkripce, aktivity enzymů a jiné. A proto mikroorganismy (včetně acidofilů) mají různé mechanismy homeostázy pH [9].

Jeden z takových mechanismů, který udržuje intracelulární pH, je nepropustnost buněčné membrány, jež omezuje přítok protonů do cytoplazmy. Bylo zjištěno, že membrány acidofilů, konkrétně jsou to archea obsahující tetraethery lipidů, jsou velmi tolerantní ke kyselému prostředí. Takové tetraethery lipidů mají extrémně nízkou permeabilitu protonů, což vede k udržení nutného intracelulárního pH [9].

Druhý způsob regulace je snížená velikost pórů v membránových kanálech. Vnější membrána acidofilů obsahuje vnější smyčku, která je zodpovědná za velikost pórů a také za iontovou selektivitu. Tím bylo zjištěno, že při pH 2,5 je smyčka kladně nabita a tento náboj může kontrolovat přítok protonů přes vnější membránu [9].

Další způsob mechanismu regulace je cytoplazmatické pufrování. Když dochází ke vstupu protonů do cytoplazmy, probíhá pufrování i sekvestrování a následně uvolnění protonu. Buňky obsahují molekuly pufru, které nesou bazické aminokyseliny, jako jsou lysin, histidin a arginin, ty pomáhají při sekvestraci protonů [9].

2.1.5. Termofilní mikroorganismy

Termofilní mikroorganismy jsou velmi rozmanitá skupina, protože do pojmu termofily je možné zařadit skupiny organismů: mírné termofily (optimální teplota 50–60 °C), extrémní termofily (optimální teplota 60–80 °C) a hypertermofily (optimální teplota 80–110 °C). Do všech těchto tříd patří velké množství různých rodů bakterií a archea. Do skupiny extrémních termofilů patří například rody *Aneurinibacillus*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Clostridium*, *Thermoanaerobacter*, *Thermus*, *Fervidobacterium*, *Rhodothermus*, *Thermotoga* a *Aquifex*. Většina mikroorganismů, která patří do třídy hypertermofilů, jsou archea (např. rody *Sulfolobus*, *Acidianus*, *Pyrodictium*, *Pyrolobus*, *Pyrobaculum*, *Desulfurococcus*, *Thermoproteus* a jiné) [2].

Na základě určitých podmínek pro růst a rozmnožování a na základě rozmanitosti můžeme rozlišit prostředí nacházející se vedle aktivních vulkanických oblastí, která také obsahují velké množství různých anorganických sloučenin a prvků, jako jsou síra, vodík, methan, oxid uhličitý, sirovodík atd. Kvůli takovému seznamu parametrů musí být termofily přizpůsobeny nejen vysokým teplotám, ale také dalším faktorům, jako jsou složení minerálů, plynu, slanost, pH a jiné [10-12].

Jedním ze způsobů stabilizace je odlišné složení lipidů v cytoplazmatické membráně a interakce lipid-protein. Například u termofilních archeí monovrstvu membrány tvoří tetraethery (oproti mezofilním archeím, u kterých to jsou diethery). Interakce lipid-protein tak zahrnuje elektrostatické a hydrofobní interakce, které mohou mít vliv na termostabilitu buňky. Tím pádem můžeme pozorovat, že termofily mají nízký výnos a velký požadavek na údržbu, což vede k tomu, že buňky mají zvýšenou iontovou propustnost membrány, jež zajišťuje velké množství energie a protonů pro vytvoření iontové hnací síly, jež je větší než u mezofilů [13].

2.2. Biotechnologický potenciál extremofilních mikroorganismů

Průmyslová biotechnologie má za hlavní cíl vyrábět hromadně množství chemikálií pomocí biotechnologického zpracování zemědělských produktů. Tradičně takové bioprosedy mají náročné požadavky zahrnující bioreaktory vyrobené z nerezové oceli, sterilizaci a dobře vyškolenou techniku. V současnosti však dochází k vývoji průmyslové biotechnologie nové generace (NGIB), která umožňuje provádět všechny potřebné bioprosedy za nesterilních podmínek pomocí bioreaktoru, a to z různých materiálů (keramika, cement a plast). Taková technologie šetří nejen čas, ale také energii, vodu a substráty. Základem NGIB jsou mikroorganismy, které odolávají kontaminaci jinými mikroorganismy, proto se očekává, že extrémní acidofily v kombinaci s termofilními vlastnostmi budou základem pro chemickou

výrobu z biopolymerních substrátů (škrob, celulóza a jiné), protože nízké pH a vysoká teplota umožňují rychlou degradaci substrátů pro mikrobiální spotřebu. Na základě podmínek prostředí a toho, že extremofily jsou stabilnější za měnících se podmínek, může dojít k úplné automatizaci celého biologického zpracování, které je založeno na NGIB [14].

V dnešní době hraje aplikace různých druhů extremofilních organismů (termofilních, psychrofilních, acidofilních, alkalofilních a halofilních) v biotechnologickém průmyslu důležitou roli. Každá z těchto mikrobiálních skupin má jedinečné vlastnosti, jež můžeme uplatnit v biotechnologickém průmyslu. Hlavním důvodem pro výběr enzymů z extremofilů je jejich vysoká stabilita při extrémních podmínkách. Na základě této jejich vlastnosti se očekává, že zaplní mezeru mezi biologickými a chemickými procesy. Komerční význam enzymů z hypertermofilů dokládá široké uplatnění a použití DNA polymeráz v polymerázové řetězové reakci (PCR), což je rychlá a účinná metoda namnožení specifických sekvencí DNA. Tato reakce se celosvětově používá ve forenzní vědě, pro analýzu potravin a v klinické medicíně. V poslední době tak probíhají metody, které využívají postup, kdy se provádí izolace a klonování genů extremofilních enzymů, jež jsou následně exprimovány v mezofilních hostitelích [15].

Dalším příkladem (kromě DNA polymeráz) je aplikace celulózy 103, která byla izolována z alkalofilů. Celulóza hraje významnou roli v rozkladu jemných celulózových vláken, která zachycují nečistoty na povrchu bavlněného textilu. Výhoda tohoto enzymu je v tom, že při rozkladu vláken nedochází k poškození textilu. Enzymy, které degradují polymery, jako jsou amylázy, xylanázy, proteázy, celulózy (Tabulka 3), hrají významnou roli v potravinářském, chemickém, farmaceutickém a dalších odvětvích průmyslu [16, 17].

Tabulka 3: Aplikace extremozymů a jiných aktivních látek v průmyslu [17-19].

Termoenzymy a další účinné látky používané v průmyslu	Průmyslová odvětví
Amylázy	Biotechnologický a bioprocenční průmysl
α -Amylázy	Papírenský a celulózový průmysl
	Pekařský průmysl
	Prací průmysl
	Textilní průmysl
Celulózy	Papírenský a celulózový průmysl
	Pivovarnický průmysl
	Průmysl biopaliv
	Průmysl krmení zvířat
	Textilní průmysl
	Vinařský průmysl
	Zemědělský průmysl
Chaperony	Biotechnologický a bioprocenční průmysl
Chitinázy	Potravinářský průmysl
	Zemědělský průmysl

Termoenzymy a další účinné látky používané v průmyslu	Průmyslová odvětví
DNA polymerázy	Biotechnologický a bioprocenční průmysl
Esterázy	Farmaceutický průmysl
	Papírenský a celulózový průmysl
	Potravinářský průmysl
	Prací průmysl
Feritiny	Biotechnologický a bioprocenční průmysl
β -Glukosidázy	Biotechnologický a bioprocenční průmysl
	Chemický průmysl
	Mléčný průmysl
	Pivovarnický průmysl
	Průmysl biopaliv
	Průmysl biorafinace
Inteiny	Biosenzory
	Biotechnologický a bioprocenční průmysl
Isoamylázy	Chemický průmysl
Karbamát kinázy	Biotechnologický a bioprocenční průmysl
Laktonázy	Biotechnologický a bioprocenční průmysl
Ligázy	Biotechnologický a bioprocenční průmysl
	Farmaceutický průmysl
	Kosmetický průmysl
	Kožedělný průmysl
	Mléčný průmysl
	Papírenský a celulózový průmysl
	Pekařský průmysl
	Prací průmysl
Palivové články	Bioelektřina
Proteázy	Biotechnologický a bioprocenční průmysl
	Farmaceutický průmysl
	Mléčný průmysl
	Pekařský průmysl
	Pivovarnický průmysl
	Potravinářský průmysl
	Prací průmysl
	Průmysl krmení zvířat
Superoxid reduktázy	Zemědělský průmysl
Transkripční faktory	Biotechnologický a bioprocenční průmysl
Ureázy	Automobilový průmysl
	Chemický průmysl
	Průmysl biopaliv

Termoenzymy a další účinné látky používané v průmyslu	Průmyslová odvětví
	Průmysl biorafinace
	Zemědělský průmysl
Xylanázy	Biotechnologický a bioprocenční průmysl
	Konverze biomasy
	Papírenský a celulózový průmysl
	Pekařský průmysl
	Prací průmysl
	Průmysl recyklace odpadního papíru

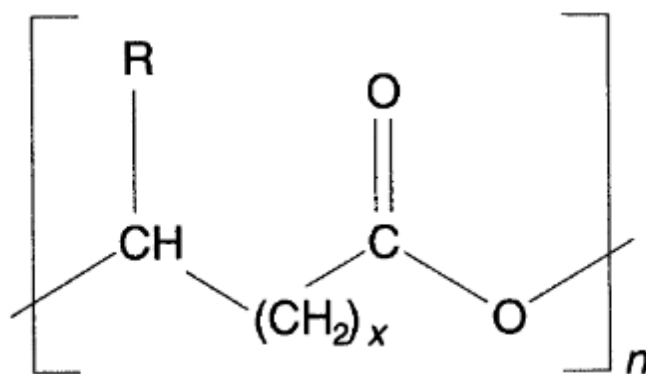
Je však třeba říct, že použití extrémních enzymů čelí poměrně velkému problému. Většinu extrémních enzymů přírodního původu (např. termozymy) vzhledem k jejich vysoké tepelné stabilitě a jejich adaptivním mechanismům nelze použít v širokém spektru různých průmyslových odvětví, jejich použití vede k dostatečně nízkému výtěžku. A proto nyní existují různé chemické a genetické modifikace, což je například řízená evoluce, poloracionální design, regulace exprese a jiné [20].

Jedním z těchto způsobů zlepšení je řízená evoluce. Tato metoda je založena na náhodné mutagenезi a nejčastěji se používá v případech, kdy chybí informace o krystalové struktuře cíleného proteinu. Tato metoda vykazuje dobré výsledky. Například Nakazawa a jeho kolektiv dokázali mutagenizovat, aby zvýšili stabilitu pH na 8 a zvýšili teplotní stabilitu endo-beta-1,4-glukanázy III, která byla aktivní při 55 °C po dobu 30 minut. Je třeba také poznamenat, že enzymatická aktivita tohoto mutanta byla 1,4krát vyšší než aktivita enzymu před modifikací [20].

2.3. Polyhydroxyalkanoáty

Vzhledem k rostoucím problémům přítomnosti petrochemického plastového odpadu v životním prostředí probíhá studium použití nových odbouratelných plastů, jako jsou polyhydroxyalkanoáty (PHA), které vykazují materiálové vlastnosti podobné polypropylenu. Jedná se o polymery ve vodě nerozpustné, jež jsou syntetizovány mnoha živými organismy a mikroorganismy. Hlavními producenty jsou bakterie, jež produkují až 90 % hmotnosti suché hmoty. Bakterií využívají PHA jako zdroje uhlíku a energie a ukládají polymery ve formě intracelulárních granulí. Takové polyestery vznikají v buňkách, kdy je růst bakterií omezen vyčerpáním dusíku, fosforu či kyslíku a také je přítomno nadměrné množství zdrojů uhlíku [4].

Bylo identifikováno více než 100 různých monomerních jednotek, jako jsou komponenty PHA (Obrázek 1). Takové rozsáhlé rozmezí dává možnost výroby různých druhů biologicky odbouratelných polymerů s odlišnými vlastnostmi. Podle počtu uhlíku v jednotce je možné rozdělit polyhydroxyalkanoáty do dvou skupin: PHA s krátkým řetězcem (scl-PHA) tvořené monomery z 3–5 uhlíků, PHA se středním řetězcem (mcl-PHA), které je složené z 6–16 uhlíků v řetězci [21, 22].



Obrázek 1: Monomerní jednotka PHA [21]

2.3.1. Biosyntéza

Struktura polyhydroxyalkanoátů je závislá na dodávaných zdrojích uhlíku a drahých syntézy, které dodávají monomerní jednotky do PHA syntézy. V dnešní době jsou popsány tři hlavní mechanismy syntézy PHA. Všechny tyto cesty jsou spojeny s jinými metabolickými cestami a umožňují tvorbu jiných látek [23].

První syntetická dráha ilustruje syntézu scl-PHA. V daném případě jsou dvě molekuly acetyl-CoA získány ze sacharidů, mastných kyselin nebo aminokyselin a převedeny do tvaru hydroxybutyryl-CoA pomocí enzymů, jako jsou beta-ketothioláza a acetoacetyl-CoA reduktáza. Nakonec hydroxybutyryl-CoA je polymerován na konečný produkt pomocí scl-PHA syntézy. Takovou cestu produkce polyhydroxyalkanoátů můžeme pozorovat například u *Cupriavidus necator* [23].

Druhá cesta je spojená s beta-oxidační cestou a využívá meziprodukty této oxidační cesty. První krok je přeměna mastných kyselin na enoyl-CoA v beta-oxidaci. Dále následuje transformace enoyl-CoA do tvaru R-3-hydroxyacyl-CoA pomocí R-3-hydroxyacyl-CoA hydratázy. A poslední krok je polymerační reakce R-3-hydroxyacyl-CoA na mcl-PHA, která je katalyzována mcl-PHA syntázou. Takovou syntetickou cestu můžeme pozorovat u mikroorganismů jako *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas oleovorans* a jiné [23].

Poslední mechanismus zahrnuje cyklus syntézy mastných kyselin *in situ*. Tento cyklus vede ke vzniku 3-hydroxyacyl-CoA pro syntézu PHA. Tehdy probíhá přeměna 3-hydroxyacyl-ACP na 3-hydroxyacyl-CoA prostřednictvím enzymu hydroxyacyl-ACP-CoA transferáza. Získaný produkt je prekurzorem pro polymerační reakce, kde se také využívá mcl-PHA syntáza [23].

2.3.2. Využití

V současné době jsou polyhydroxyalkanoáty a jiné alternativní zdroje plastů mnohem dražší než plasty petrochemického původu. A proto jsou PHA používány v aplikacích, kde není možné využít běžné plasty. Jedna z oblastí, která využívá PHA, je lékařství. Hlavní výhodou biologicky rozložitelných plastů, a především biokompatibilních látek, je v tom, že je možné je použít jako vstřebatelné chirurgické nitě, nosiva léčiv, opravné náplasti, ortopedické špendlíky či adhezivní bariéry. Lze je ale také využít jako obalové materiály či jako single-use plasty [4].

2.4. Vybraní extremofilní zástupci

2.4.1. Rod *Caldimonas*

Čeleď *Comamonadaceae* zahrnuje několik desítek různých rodů, mezi nimi je i termofilní rod *Caldimonas*. Významnost tohoto rodu spočívá v tom, že členové vykazují schopnost degradovat polyhydroxyalkanoty (PHA). Jedním z představitelů rodu je druh *Caldimonas hydrothermale* [24].

Tento kmen byl izolován ze vzorku vody odebraného z termálního pramene na jihu Tuniska (v Tozeur). Buňky jsou gramnegativní, aerobní, termofilní a přímé tyče o délce 0,5–1 μm a šířce 1,5–3 μm, které jsou uspořádány jednotlivě nebo do tvaru krátkých řetězců se třemi až pěti buňkami. Pohybují se pomocí jednopólového bičíku. Růst je umožněn v přítomnosti méně než 3 % NaCl a při teplotách v rozmezí 30–60 °C (s optimem při 55 °C a pH 7). Při udržování těchto podmínek mikroorganismus tvoří nepigmentované a kulaté kolonie s celými okraji. Během svého života a v přítomnosti příslušných sloučenin, jako jsou D-glukóza, maltóza, L-arabinóza, D-ribóza, D-galaktóza, D-fruktóza, sacharóza a jiných, *Caldimonas hydrothermale* může produkovat různé enzymy (leucin, alkalická fosfatáza, arylamidáza, chymotrypsin, glukosidáza a jiné) [24].

2.4.2. Rod *Bacillus*

V současné době rod *Bacillus* a jiné související rody, jako jsou *Aneurinibacillus* a *Brevibacillus*, představují v sobě jednu z nejrozmanitějších skupin z hlediska taxonomie. Jejich znaky jsou grampozitivní, aerobní nebo fakultativně anaerobní, tyčinkovité buňky, které tvoří endospory. Na základě této obrovské rozmanitosti rod *Bacillus* zahrnuje jak mezofilní, tak i extremofilní druhy [25].

Jeden z nejstarších izolátů a nomenklaturní druh pro rod *Bacillus* je *Bacillus subtilis*. Podle studia *B. subtilis* je mezofil rostoucí při teplotách 5–10 °C a 45–55 °C a slanosti až 7 % NaCl. Buňky jsou středně velké tyčinky o rozměrech 0,7–0,8 μm na 2–3 μm a mohou tvořit endospory, které mají tvar elipsoidu a nacházejí se blízko konce mateřské buňky [26].

2.4.3. Rod *Schlegelella*

Rod *Schlegelella* můžeme zařadit k podtřídě *Proteobakteri* a k rodině *Comamonadaceae*. Hlavním zástupcem rodu je *Schlegelella thermodepolymerans* [27].

Tento mikroorganismus byl izolován z aktivovaného kalu po obohacení na poly (3HB-co-3MP) a má gramnegativní, nesporetvorné aerobní buňky o délce 1–2,8 μm a šířce 0,5–0,6 μm. Jejich pohyb je umožněn pomocí monotrichózního bičíku. Podmínkami pro růst je teplota v rozmezí 37–60 °C (s optimem při 50 °C) a pH v rozmezí 6 až 9 (s optimem při pH 7). Kmen dobře roste na komplexních médiích a tvoří bílé a hladké kolonie s celými okraji s butyrovitou strukturou. Buňky využívají kyselinu dehydroabietovou, glukonát, laktát, 3-hydroxybutyrát, valerát a poly(3-HB) jako potravu a jsou odolné ke streptomycinu a ampicilinu [27].

2.4.5. Rod *Tepidimonas*

Bakteriální kmen nejprve označený jako I1-1^T byl izolován z horkého pramene v oblasti jižního Tchaj-wanu, v Pingtunge. Buňky tohoto mikroorganismu představují gramnegativní tyčinky o průměru 0,4–0,5 μm a délce 0,8–2,0 μm s jedním jednopólovým bičíkem. Tento kmen dobře roste v médiích s nižšími živinami, jako je 5–10% bujón Luria-Bertrani (LB médium), jeho extracelulární produkty vyjadřovaly aktivitu alkalické proteázy. Kmen I1-1^T tvoří viditelné kolonie krémově bílé, kruhového tvaru se zvlněnými okraji. Růstové podmínky jsou při teplotách v rozmezí 35–60 °C a pH mezi 6 a 8. Optimální podmínky pro růst a rozmnožování jsou při teplotě 55 °C a pH 7,0. Pomocí různých analytických metod a procesů, jako jsou analýzy sekvence genu 16S rRNA, celobuněčných proteinů, podobnosti DNA–DNA, složení mastných kyselin a jiných biochemických a fyziologických charakteristik, bylo zjištěno, že kmen I1-1^T patří do rodu *Tepidimonas*. Po ukončení všech analytických procesů bylo navrženo nové označení tohoto kmenu, a to jako *Tepidimonas taiwanensis* [28].

2.5. Enzymy

Enzymy jsou proteinové katalyzátory usnadňující přeměnu substrátů na produkty. Tabulka 4 (podle Mezinárodní unie biochemie a molekulární biologie – NC-IUBMB) ukazuje rozdělení enzymů do skupin na základě reakcí, které katalyzují: oxidoreduktázy, transferázy, hydrolázy, lyázy, izomerázy a ligázy [29].

Tabulka 4: Několik známých příkladů enzymů [30].

Systémové číslo	Doporučený triviální název	Katalyzovaná reakce
1. Oxidoreduktasy		
1.1.1.1	alkoholdehydrogenasa	ethanol + NAD ⁺ = acetaldehyd + (NADH + H ⁺)
1.1.2.27	laktátdehydrogenasa	L-laktát + NAD ⁺ = pyruvát + (NADH + H ⁺)
1.11.1.6	katalasa	H ₂ O ₂ + H ₂ O ₂ = O ₂ + 2 H ₂ O
1.11.1.7	peroxidasa	donor + H ₂ O ₂ = oxid. donor + 2 H ₂ O
2. Transferasy		
2.7.1.1	hexokinasa	D-hexosa + ATP = D-hexosa-6-fosfát + ADP
2.7.7.6	RNA-polymerasa	RNA _n + m nukleosidtrifosfát = RNA _{n+m} + m PP _i
2.7.7.7	DNA-polymerasa	DNA _n + m deoxynukleosidtrifosfát = DNA _{n+m} + m PP _i
3. Hydrolasy		
3.1.1.3	lipasa	hydrolýza esterových vazeb lipidů
3.1.27.5	ribonukleasa	hydrolýza fosfodiesterových vazeb uvnitř polyribonukleoetidových řetězců
3.2.1.1	α-amyasa	hydrolýza 1,4-α-D-glykosidových vazeb v polysacharidech
3.4.21.4	trypsin	hydrolýza peptidových vazeb uvnitř polypeptidových řetězců

Systémové číslo	Doporučený triviální název	Katalyzovaná reakce
3.4.23.1	pepsin	hydrolyza peptidových vazeb uvnitř polypeptidových řetězců
3.6.1.3	adenosin trifosfatasa (ATPasa)	$ATP + H_2O = ADP + P_i + 2 H^+$
4. Lyasy		
4.1.2.13	aldolasa	D-fruktosa-1,6-bisfosfát = dihydroxyacetonfosfát + D-glyceraldehyd-3-fosfát
4.2.1.1	karbonáthydrolyasa	$H^+ + HCO_3 = CO_2 + H_2O$
5. Isomerasy		
5.3.1.1	triosafosfátisomerasa	D-glyceraldehyd-3-fosfát = dihydroxyacetonfosfát
5.3.1.9	glukosafosfátisomerasa	D-glukosa-6-fosfát = D-fruktosa-6-fosfát
6. Ligasy		
6.4.1.1	pyruvát karboxylasa	$pyruvát + CO_2 + ATP + H_2O = oxalacetát + ADP + P_i$

2.5.1. Extrémní enzymy

Jedním z hlavních metabolických produktů mikroorganismů jsou enzymy, přičemž ani extremofilové nejsou výjimkou. Takové mikroorganismy produkují enzymy nebo extremozymy, které stejně jako samotný organismus čelí potřebě přizpůsobit se tomuto extrémnímu prostředí. Pro každý typ extremofilních mikroorganismů jsou charakteristické enzymy, jež mají určité ochranné mechanismy.

U acidofilních a acidotermofilních mikroorganismů bylo stanoveno, že hlavními skupinami enzymů jsou amylázy, proteázy, celulózy, xylanázy, alfa-glukosidázy, endonukleázy a esterázy. Tyto enzymy zůstávají stabilní při nízkém pH a při vysokých teplotách, lze je použít za drsných podmínek průmyslu. Proto musely enzymy vyvinout různé adaptační mechanismy. Většina z těchto ochranných změn nastává na molekulární úrovni, například u xylanáz je závislost na hladinách pH způsobena ionizujícím stavem dvou kyselin glutamových (konkrétně Glu102 a Glu192). Během katalýzy se Glu102 chová jako nukleofil a Glu192 jako obecná kyselina nebo báze. Také kolem těchto zbytků je síť vodíkových vazeb, jež ovlivňuje i katalytickou schopnost kyselin [9].

Tabulka 5 uvádí některé z hlavních enzymů produkovaných halofilními mikroorganismy. Velmi často jsou halofilní enzymy relativně tolerantní nejen k vysokému obsahu soli, ale také k teplotě a zásaditému prostředí, a proto se tyto enzymy velmi často používají v potravinářském a textilním průmyslu. Stejně jako samotné organismy musí mít enzymy způsoby, jak se přizpůsobit prostředí bohatému na soli. Jedním z těchto mechanismů je modulace jejich náboje. Z toho důvodu (na rozdíl od mezofilních enzymů) obsahují enzymy z halofilů na svém povrchu více aspartátu a glutamátu [6].

Tabulka 5: Některé příklady enzymů produkované halofily [6].

Enzym	Mikroorganismus	NaCl (% w/v)
Amyláza	<i>Halobacillus sp.</i>	5
Xylanáza	<i>Chromohalobacter sp.</i>	20
Dnáza	<i>Halobacillus sp.</i>	23
Celuláza	<i>Gracilibacillus sp.</i>	7,5–17,5
Esteráza	<i>Bacillus cereus</i> AGP-03	3–11
Proteáza	<i>Alkalibacillus sp.</i> NM-Fa4	6
Amylopullanáza	<i>Halorubrum sp.</i> Ha25	3–4
Alkohol dehydrogenáza	<i>Haloferax volcanii</i> H1895	12

Stejně jako ostatní skupiny mohou také alkalofilní mikroorganismy produkovat enzymy. Na rozdíl od vnějšího prostředí buňky, jež je udržováno v neutrálním pH, jsou jejich enzymy aktivní v alkalickém prostředí. Mezi tyto enzymy patří proteázy, amylázy, celulázy, pullulanázy, lipázy, pektinázy, xylanázy a chitinázy. Optimální podmínky prostředí pro chitinázy jsou například: pH 7–9 a teplota 44–55 °C. Za těchto podmínek je chitináza stabilní déle než 2 hodiny. Látky a prvky, jako jsou Ag^+ , Hg^{2+} , dithiothreitol, beta-merkptoethanol, glutathion a kyselina jodoctová, mohou inhibovat aktivitu enzymu až o 50 % [7].

2.5.2. Termoenzymy

Většina dostupných komerčních enzymů je mezofilního původu, to znamená, že enzymy jsou získány z mikroorganismů, které rostou v prostředí, kde je teplota mezi 20 °C a 45 °C, proto mají tyto enzymy optimální aktivitu v úzkém rozmezí podmínek a nízkou stabilitu při vysokých teplotách. Enzymy s takovými charakteristikami nemůžeme využívat v průmyslu, protože nemohou přejít hranice v biokatalýze. V současné době tak existuje velký požadavek na termofilní enzymy neboli termozymy. Tato skupina biokatalyzátorů je termostabilní a termoaktivní při teplotách mezi 50 °C a 80 °C. Také jsou často přizpůsobeny vysokým hodnotám tlaku a denaturujícím rozpouštědlům i jiným podmínkám, jež můžeme najít v libovolném průmyslu. Je třeba zmínit, že použití takových enzymů nese ještě ekonomickou výhodu. Pomocí termoenzymů můžeme zvýšit rozpustnost substrátu a produktu, tím tak zkrátit dobu katalýzy [31].

Termoenzymy vznikly v procesu adaptace termofilních mikroorganismů na vysoké teploty. Mezi nejrůznějšími faktory adaptace můžeme vyčlenit zvýšený počet vodíkových vazeb, optimalizované hydrofobní interakce, zvýšenou kompaktnost, zvýšení hydrofobicity jádra, vyšší počet povrchových polárních oblastí ve srovnání s nepolárními, zvýšenou stabilitu α -helixu, vazbu kovových iontů, lepší fixaci konce polypeptidového řetězce k jádru proteinu, nahrazení zbytků s energeticky nevýhodnými konformacemi glycinu, zkrácení smyček vystavených rozpouštědlu, vyšší počet molekul prolinu a β -vázaných aminokyselin ve smyčkách, spojování v oligomery a snížení obsahu teplotně

labilních aminokyselin. Na základě výše uvedených faktorů můžeme vidět, že se přizpůsobení buňky k extrémním podmínkám vyskytuje na všech úrovních [32].

Jedním ze zásadních způsobů termostabilizace proteinů je specifická skladba aminokyselin. Příkladem může být porovnání složení aminokyselin mezofilních a hypertermofilních proteinů. Během srovnání sekvence 115 proteinů z hypertermofilního *Methanococcus janaschii*, který má optimální růstovou teplotu okolo 85 °C, s homologními proteiny mezofilů bylo zjištěno, že hypertermofily oproti mezofilům mají nízký obsah nenabitých polárních zbytků, jako jsou Gln, Asn, Thr a Ser. Naproti tomu hypertermofilní proteiny vykazují zvýšený obsah nabitých aminokyselinových zbytků, konkrétně jde o Glu, Arg a Lys. Takže bylo zjištěno, že hypertermofilní protein má asi 268 aminokyselinových zbytků, což je menší než mezofilní, který má okolo 310 zbytků. Takové malé množství může ukazovat na kompaktnost termofilních proteinů a na to, že proteiny vykazují nižší změnu tepelné kapacity, což vede ke zvýšení termostability [32].

Druhý způsob stabilizace enzymů je stabilizace solemi. Anorganické soli mohou stabilizovat proteiny dvěma způsoby: specifickým účinkem, kdy kovový ion interaguje s proteinem, a prostým solným efektem, který ovlivňuje hlavně vodní aktivitu. Ze všech iontů můžeme vyčlenit K^+ , NH_4^+ , SO_4^{2-} a HPO_4^{2-} , protože mají nejefektivnější stabilizující účinky [33].

Třetí způsob stabilizace je solnými můstky. Z experimentálních dat můžeme zjistit, že běžné interakce solných můstků vedou ke stabilizaci sekundární struktury proteinu, což může vést ke zvyšování pevnosti struktury nebo rigiditě [33].

2.6. Screening a detekce enzymů

Už dávno bylo zjištěno, že termofilní mikroorganismy mají velký potenciál ve většině průmyslových aplikací. Jejich termostabilní enzymy hrají velkou roli ve výrobě potravin, krmiv, buničín, farmaceutických výrobků atd. Díky fyzikální a chemické stabilitě enzymů získaných z termofilů můžeme zvýšit provozní teplotu procesu, což má obrovský vliv na biologickou dostupnost a rozpustnost organických sloučenin, takže snižuje riziko kontaminace. V současné době proto probíhá izolace termofilů a screening jejich enzymů, to má za cíl zjistit, jaké enzymy může poskytnout mikroorganismus a které z enzymů mají nejvyšší aktivitu a stabilitu [34].

Mimo jiné má pH obrovský vliv také na hodnotu katalytické aktivity. Hodnota optimálního pH závisí na druhu tlumivého roztoku a jeho iontové síle i jiných parametrech, jako jsou teplota a koncentrace substrátu. Při různé teplotě může mít optimální pH odlišné hodnoty, tudíž různé typy tlumivých roztoků mohou vést jak k růstu katalytické aktivity, tak i ke snížení aktivity [35].

Nejčastěji jsou používány takové substráty, které mohou být přeměňovány enzymem. Substráty mohou být přirozené, ale i syntetické. Často dochází k použití syntetických substrátů, protože pro optimální stanovení katalytické aktivity musí být sloučenina levná, stabilní, dobře rozpustná a musí mít určitou molekulovou hmotnost. Příkladem takových substrátů pro proteázu jsou azoproteiny, nitroanilidy, fluorescenční substráty a jiné. Mezi přirozenými sloučeninami jsou kasein, hemoglobin, želatina, sušené mléko a tak dále [35, 36].

Poslední podmínkou pro stanovení aktivity jsou efekторы. Význam různých efektorů spočívá v tom, že přidáním aktivátorů a inhibitorů do směsi je možné dosáhnout urychlení procesu a maximální hodnoty enzymatické aktivity [35, 37].

V současné době existuje velké množství metod pro poměrně rychlé stanovení katalytické aktivity. Metody jejího stanovení lze rozdělit podle principu detekce substrátu nebo produktu na:

- optické metody (spektrofotometrie, polarometrie, fluorimetrie aj.),
- manometrické metody,
- elektrochemické metody (potenciometrie, polarografie, ampérometrie aj.),
- radiometrické metody,
- ostatní metody (titrace, viskosimetrie aj.) [35].

Do optických metod je možné zařadit různé metody jako spektrofotometrické a fluorescenční. Spektrofotometrické metody mají kupříkladu ve svém základu pozorování změn koncentrace substrátu nebo produktů za jednotku času. Tato změna je přímo úměrná změně absorbance za stejný čas. Tyto změny můžeme sledovat přímo pomocí absorbance, která se projevuje ve viditelné nebo ultrafialové části spektra, nebo pomocí chemických úprav, aby měl výsledný produkt zbarvení. Existuje několik důležitých podmínek k tomu, aby tato metoda byla vhodná. První podmínka je platnost Lambert-Beerova zákona. Druhá podmínka je správné nastavení vlnové délky. Na výběr vlnových délek má obrovský vliv zdroj světla a kyvety. Pro skleněné kyvety používají vlnovou délku od 340 do 700 nm a pro kyvety z křemenného skla vlnové délky do 340 nm [35, 38].

Manometrické metody jsou používány v následujících případech.

- Během reakce probíhá spotřeba nebo uvolnění kyslíku. To znamená, že je to reakce enzymů ze skupiny oxidoreduktáz.
- Během reakce probíhá uvolnění nebo spotřeba oxidu uhličitého nebo amoniaku. Taková situace je charakterizovaná nejčastěji pro enzymy z třídy lyáz.
- Výsledek enzymové reakce je tvorba protonu, která probíhá při odštěpení zbytku kyseliny fosforečné. Když je reakce měřena v prostředí bikarbonátového tlumivého roztoku, lze pozorovat uvolnění určitého množství oxidu uhličitého. Takový případ je vhodný pro transferázy.

Manometrické metody jsou velmi pracné a pro měření katalytické aktivity většího množství vzorků nevhodné. V dnešní době jsou proto tyto metody nahrazovány spektrofotometrickými a elektrochemickými metodami [39].

Elektrochemické metody, jako jsou potenciometrie, polarografie, konduktometrie a jiné, jsou založeny na skutečnosti, že změna koncentrace substrátu nebo produktu je přímo úměrná změně elektrické veličiny (např. elektrický proud, celkový náboj, vodivost a oxidoredukční potenciál). Takže je možné použít tyto metody pro stanovení enzymů i toho, zda jejich činnost přivádí k vývoji kyslíku, oxidu uhličitého, amoniaku, NH_4^+ , H^+ [35].

V případě radioaktivních metod se provádí měření aktivity enzymu pomocí radionuklidu. Po ukončení reakce se radioaktivní produkt od substrátu oddělí a poté se jejich koncentrace stanoví pomocí změření radioaktivity. Pro takové metody musíme použít syntetické substráty. To je důvodem, že je radioaktivní stanovení velmi citlivé a má výhodu v tom, že směs nemá do začátku reakce radioaktivní produkt, čehož u přirozených substrátů nelze dosáhnout. Ale na opačné straně těchto metod je vysoká cena substrátů, jejich relativní nedostupnost a nutnost separace produktu od substrátu. Pro tuto separaci můžeme použít několik postupů.

- Vysrážení pomocí silné kyseliny nebo organického rozpouštědla. Takový způsob je vhodný pro substrát, který je makromolekula. Nejčastější je při stanovení aktivity proteáz, polymeráz a podobných enzymů.
- Použití chromatografických nebo elektroforetických metod.
- Extrakce organickým rozpouštědlem.
- Absorbance substrátu nebo produktu na vhodný absorbent [35].

Pro každý typ enzymu existují jednotlivé metody stanovení a jsou pro něj také optimální podmínky prostředí pro provádění metod. Například stanovení aktivity amylázy probíhá podle popisu Bernfelda. Absorbance roztoků se měří při 540 nm vlnové délky. Tím získáváme hodnotu aktivity, jež je definována jako množství enzymů, které uvolnilo jeden mikromol redukujícího cukru za minutu. Za normálních testovacích podmínek amyláza vykazuje maximální aktivitu při teplotě 60 °C, při pH 5 a v 5 % i 7,5 % roztoku NaCl [40].

V současné době probíhá vývoj metod detekce za pomoci různých přístrojů (např. glukometr). Pomocí sloučenin obsahujících paracetamol nebo katechol lze detekovat různé analyty jako například enzymy, konkrétně jsou to beta-galaktosidáza a alfa-mannosidáza, ale také patogeny. Proto je možné toto stanovení provést i v prostředí glukózy a bez použití proužků s glukózooxidázami nebo dehydrogenázami, a to díky tomu, že paracetamol se oxiduje přímo na povrchu elektrody glukometru. Existuje několik výhod těchto derivátů (oproti glukóze) pro detekce enzymů, virů a bakterií. První výhoda spočívá ve snadné syntéze derivátů. Druhá se nachází v tom, že paracetamol a katechol mají vyšší citlivost než glukóza. Například limit detekce paracetomolu je 0,5 mM oproti limitu detekce glukózy, který je 2 mM (měřené glukometrem OneTouch). Třetí výhoda je snížení nákladů na výrobu proužků, protože paracetamol a katechol potřebují jen aktivní elektrody [41].

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Použité mikroorganismy, chemikálie a přístroje

3.1.1. Použité mikroorganismy

V experimentální části bakalářské práce pro screening a stanovení enzymů bylo použito 15 sbírkových kmenů a 5 izolátů bakterií, které jsou uvedené v tabulce 6.

Tabulka 6: Použité bakteriální sbírkové kmeny a izoláty

Mikroorganismus	
Sbírkové kmeny	
<i>Chelatococcus daeguensis</i>	DSM 22069
<i>Chelatococcus thermostellatus</i>	DSM 28244
<i>Chelatococcus composti</i>	DSM 101465
<i>Chelatococcus sambhunathii</i>	DSM 18167
<i>Caldimonas hydrothermale</i>	DSM 18497
<i>Caldimonas taiwanensis</i>	LMG 22827
<i>Caldimonas manganoxidans</i>	JCM 10698
<i>Caldimonas meghalayensis</i>	JCM 18786
<i>Thermomonas hydrothermalis</i>	DSM 14834
<i>Tepidimonas taiwanensis</i>	LMG 22826
<i>Tepidimonas fonticaldi</i>	LMG 26746
<i>Schlegelella aquatica</i>	LMG 23380
<i>Schlegelella thermodepolymerans</i>	DSM 15344
<i>Pseudomonas thermotolerans</i>	DSM 14292
<i>Aneurinibacillus sp.</i>	CCM 8960
Izoláty	
<i>Brevibacillus borstelensis</i>	LK 99
<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i>	LK 102
<i>Chelatococcus composti</i>	34
<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i>	LK 7
<i>Brevibacillus borstelensis</i>	Bz

3.1.2. Použité chemikálie

3.1.2.1. Chemikálie pro kultivace

- Nutrient Broth (NB) (HiMedia, Indie)
- Trypton soya (HiMedia, Indie)
- Pepton (HiMedia, Indie)
- Beef extract (HiMedia, Indie)
- Chlorid sodný (LachNer, Česká republika)

3.1.2.2. Chemikálie pro screening enzymů

- Nutrient Broth (NB) (HiMedia, Indie)
- Sušené odstředěné mléko (Bohemilk, Česká republika)
- Agar powder (HiMedia, Indie)
- Spirit Blue Agar (HiMedia, Indie)
- Slunečnicový olej
- Trypton soya (HiMedia, Indie)
- Kvasničný extrakt (HiMedia, Indie)
- Rozpustný škrob (Penta, Česká republika)
- Xylan (VWR Chemicals, Spojené státy americké)
- Karboxymethylceluláza (Sigma-Aldrich, Německo)
- Kongo červeně (LachNer, Česká republika)
- Jodid draselný (LachNer, Česká republika)
- Elementární jod (Lachema, Česká republika)
- Chlorid sodný (LachNer, Česká republika)
- Síran amonný (LachNer, Česká republika)
- Hydrogenfosforečnan sodný (LachNer, Česká republika)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (LachNer, Česká republika)
- Pektin (Sigma-Aldrich, Německo)

3.1.2.3. Chemikálie pro stanovení enzymatické aktivity

- Nutrient Broth (NB) (HiMedia, Indie)
- Sušené odstředěné mléko
- Kaseinát sodný (Sigma-Aldrich, Německo)
- Uhličitan sodný (LachNer, Česká republika)
- Kyselina trichloroctová (LachNer, Česká republika)
- Folin-Ciocalteuovo činidlo (Sigma-Aldrich, Německo)
- Azokasein (Sigma-Aldrich, Německo)
- Hydroxid sodný (LachNer, Česká republika)
- D-glukóza monohydrát, p.a. (LachNer, Česká republika)

3.2. Kultivace mikroorganismů

Bakterie byly uchovávány v kryozkumavkách v 10 % glycerolu při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Všechna připravená média byla vysterilována a mikroorganismy byly zaočkovány ve sterilním boxu za sterilních podmínek. Kultivace mikroorganismů probíhala při $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 24 hodin a následná produkce po dobu 48 až 72 hodin při $50\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.1. Inokulační média

Inokulační média byla připravována ve 100 ml Erlenmeyerových baňkách o objemu média 50 ml. Kultivace probíhala 24 hodin při $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 170 rpm. Použité médium záviselo na daném mikroorganismu (Tabulka 7).

Tabulka 7: Použité mikroorganismy a jejich inokulační média

Mikroorganismus		Inokulum
<i>Chelatococcus daeguensis</i>	DSM 22069	Trypton soya
<i>Chelatococcus thermostellatus</i>	DSM 28244	K6(B10) + 5 g/l NaCl
<i>Chelatococcus composti</i>	DSM 101465	NB
<i>Chelatococcus sambhunathii</i>	DSM 18167	NB
<i>Caldimonas hydrothermale</i>	DSM 18497	NB
<i>Caldimonas taiwanensis</i>	LMG 22827	NB
<i>Caldimonas manganoxidans</i>	JCM 10698	NB
<i>Caldimonas meghalayensis</i>	JCM 18786	NB
<i>Thermomonas hydrothermalis</i>	DSM 14834	NB
<i>Tepidimonas taiwanensis</i>	LMG 22826	NB
<i>Tepidimonas fonticaldi</i>	LMG 26746	NB
<i>Schlegelella aquatica</i>	LMG 23380	NB
<i>Schlegelella thermodepolymerans</i>	DSM 15344	NB
<i>Brevibacillus borstelensis</i>	LK 99	Trypton soya (zředěný)
<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i>	LK 102	Trypton soya (zředěný)
<i>Pseudomonas thermotolerans</i>	DSM 14292	NB
<i>Aneurinibacillus sp.</i>	CCM 8960	NB
<i>Chelatococcus composti</i>	34	NB
<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i>	LK7	NB
<i>Brevibacillus borstelensis</i>	Bz	NB

Přesná složení inokulačních médií pro kultivace mikroorganismů jsou znázorněna v následujících tabulkách.

Tabulka 8: Inokulační médium NB

Látka	Koncentrace (g/l)
Nutrient Broth	25

Tabulka 9: Inokulační médium Trypton soya

Látka	Koncentrace (g/l)
Trypton soya	30

Tabulka 10: Inokulační médium Trypton soya (zředěný)

Látka	Koncentrace (g/l)
Trypton soya	6

Tabulka 11: Inokulační médium K6(B10) + 5 g/l NaCl

Látka	Koncentrace (g/l)
Pepton	5
Beef extract	3
Chlorid sodný (NaCl)	5

3.2.2. Produkční média

Kultivace v produkčním médiu probíhala po dobu 48 až 72 hodin po inokulaci. V případě prvotního screeningu enzymů probíhala kultivace na pevném médiu. Produkce enzymů se uskutečnila ve 100 ml média v Erlenmayerových baňkách o objemu 250 ml. Produkční médium bylo pro každý enzym rozdílné. Médium pro kultivaci na miskách navíc obsahovalo vždy agar.

Tabulka 12: Složení média pro screening proteáz (pro médium NB a K6 (B10))

Látka	Koncentrace (g/l)
Nutrient Broth	8
Odstředěné mléko	10
Agar	17

Tabulka 13: Složení média pro screening proteáz (pro médium Trypton soya (zředěný))

Látka	Koncentrace (g/l)
Trypton soya	2
Odstředěné mléko	10
Agar	17

Tabulka 14: Složení média pro screening proteáz (pro médium Trypton soya)

Látka	Koncentrace (g/l)
Trypton soya	8
Odstředěné mléko	10
Agar	17

Tabulka 15: Složení média pro screening lipáz

Látka	Koncentrace (g/l)
Spirit Blue Agar	32,15
Olej	30

Tabulka 16: Složení média pro screening amyláz

Látka	Koncentrace (g/l)
Kvasničný extrakt	1
Rozpustný škrob	5
Agar	17

Tabulka 17: Složení média pro screening xylanáz

Látka	Koncentrace (g/l)
Kvasničný extrakt	1
Xylan	5
Agar	17

Tabulka 18: Složení média pro screening celuláz

Látka	Koncentrace (g/l)
Kvasničný extrakt	1
Karboxymethylceluláza	5
Agar	17

Tabulka 19: Složení média pro screening pektináz

Látka	Koncentrace (g/l)
Kvasničný extrakt	1
Síran amonný	2
Hydrogenfosforečnan sodný	6
Dihydrogenfosforečnan draselný	3
Pektin	5
Agar	17

V případě stanovení lipolytické aktivity bylo místo Spirit Blue Agar použito produkční médium, které bylo připraveno podle složení Spirit Blue Agar. Médium obsahovalo kvasničný extrakt (5 g/l) a hydrolyzát kaseinu (10 g/l) a 30 ml/l oleje.

3.3. Stanovení obsahu biomasy

Z tekutého produkčního média bylo pomocí pipety odpipetováno 10 ml do centrifugačních zkumavek, jež byly zcentrifugovány při 6000 rpm po dobu 5 minut. Získaný supernatant, který byl dále použit pro stanovení enzymatické aktivity, byl odlit a zmrazen. Zbývající biomasa byla promyta 5 ml destilované vody, zvortexována a opět zcentrifugována při 6000 rpm po dobu 5 minut. Po centrifugaci byla nadbytečná voda odlita a vzorky biomasy byly vysušeny do konstantní hmotnosti.

3.4. Screening produkce různých enzymů

Kultivace v produkčním médiu probíhala na Petriho miskách při 50 °C po dobu 48 hodin. Produkce proteáz byla analyzována na pevném médiu, jehož složení bylo uvedeno v tabulkách 12–14. Přítomnost těchto enzymů byla potvrzena vznikem dostatečně průhledných haló zón kolem kolonie bakterií.

Produkce amyláz probíhala na pevném médiu, jeho složení bylo uvedeno v tabulce 16. Pro detekci enzymů byly do misky po kultivaci napipetovány 3 ml Lugolova roztoku (100 g/l jodidu draselného a 50 g/l elementárního jodu) po dobu pár minut. Poté byl roztok slit do odpadu a obsah misky byl opatrně promyt destilovanou vodou. Vznik světlejších haló zón oproti světlu potvrdil přítomnost enzymu.

Produkce lipáz probíhala na pevném médiu, jehož složení bylo uvedeno v tabulce 15. Přítomnost těchto enzymů byla potvrzena vznikem odbarvených haló zón.

Produkce pektináz probíhala na pevném médiu, jehož složení bylo uvedeno v tabulce 19. Po kultivaci byly do misek napipetovány 3 ml Lugolova roztoku (100 g/l jodidu draselného a 50 g/l elementárního jodu), který byl ihned slit. Obsah misky byl opatrně promyt destilovanou vodou a oproti světlu byly zaznamenány světlejší haló zóny.

Produkce xylanáz probíhala na pevném médiu, jehož složení bylo uvedeno v tabulce 17. Po kultivaci byly do misek odpipetovány 3 ml vodného roztoku kongo červeň (0,1 % hm./obj.) a barvení probíhalo po dobu 30 minut. Poté bylo barvivo slito a obsah byl odbarven 3 ml 1 M NaCl po dobu 15 minut. Po uplynutí tohoto času byl chlorid sodný slit a produkce enzymu byla potvrzena vznikem jasných haló zón.

Produkce celuláz byla testována na pevném médiu, jehož složení bylo uvedeno v tabulce 18. Po kultivaci do misek byly přidány 3 ml vodného roztoku kongo červeň (0,1 % hm./obj.) po dobu 30 minut. Poté byl roztok slit a do misky byly přidány 3 ml 1 M NaCl po dobu 15 minut. Po ukončení časového intervalu byl roztok chloridu slit a produkce enzymu byla potvrzena vznikem jasných haló zón kolem kolonie bakterií.

3.5. Stanovení enzymatické aktivity

3.5.1. Stanovení aktivity proteáz

Pro stanovení proteolytické aktivity byly použity supernatanty získané z produkčního média. Celkem byly použity dvě metody: metoda podle Ladd a Butler a azokaseinová metoda.

Při stanovení aktivity metodou podle Ladd a Butler se do zkumavek pipetovaly 1 ml vzorku a 5 ml 0,65 % vodného roztoku kaseinátu sodného. Roztoky byly ponechané ve vodní lázni po dobu 30 a 60 minut při 50 °C. Po uplynutí prvního časového intervalu došlo k zastavení reakce přidáním 5 ml 110 mM roztoku kyseliny trichloroctové a poté došlo k 10minutové centrifugaci při 6000 rpm. Po centrifugaci byly ze supernatantu odpipetovány 2 ml do zkumavky, poté bylo přidáno 5 ml 0,5 M roztoku uhličitanu sodného a 1 ml Folin-Ciocalteuova činidla. Po 30 minutách stání za laboratorní teploty byly vzorky promíchány a poté probíhalo spektrofotometrické měření absorbance při 660 nm oproti blanku, který obsahoval místo vzorku stejné množství destilované vody. Stejným způsobem probíhalo měření vzorků s delší dobou inkubace.

Při stanovení proteolytické aktivity podle azokaseinové metody bylo do zkumavek odpipetováno 100 µl roztoku azokaseinu o koncentraci 5 mg/ml a 100 µl vzorku. Zkumavky byly inkubovány při 50 °C po dobu 30 a 60 minut. Po uplynutí prvního časového intervalu byla reakce zastavena přidáním 410 µl 10 % kyseliny trichloroctové. Dále následovala centrifugace vzorku po dobu 2 minut při 14000 rpm. Před samotným spektrofotometrickým měřením při 440 nm bylo do květy pipetováno 500 µl supernatantu po centrifugaci a 700 µl 1 M NaOH. Měření probíhalo proti blanku, který místo vzorku obsahoval stejné množství destilované vody. Stejným způsobem bylo provedeno měření pro vzorky druhého časového intervalu.

3.5.2. Stanovení aktivity lipáz

Pro stanovení lipolytické aktivity byly použity supernatanty získány z produkčního média. Jako substrát byl použit 4-nitrofenylacetát a 4-nitrofenylpalmitát. Byla vyzkoušena dvě rozpouštědla pro substráty, a to 96% ethanol a dodecylsírán sodný (SDS). Substrát byl připraven o koncentraci 15 mg na 10 ml rozpouštědla. Také byly testovány dva pufrů, a to PBS pufr (8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 0,24 g/l KH₂PO₄ a 1,44 g/l Na₂HPO₄ · 2H₂O) a (Tris-, H₂O a HCl, pH 7,5). Samotné měření probíhalo v 96jamkové mikrotitrační destičce a absorbance byla měřena pomocí ELISA readeru. Do jednotlivých jamek bylo napipetováno 230 µl pufru 25 µl vzorku. Poté probíhala inkubace celé destičky v readeru po dobu 5 minut při 50 °C. Po inkubaci byl do jamek přidán substrát o objemu 25 µl. Po přidání substrátu byla změřena absorbance a poté byla měřena po 2 minutách po dobu 20 minut. Výsledná hodnota absorbance byla získána odečtem hodnot absorbance v čase 0 a daného času.

3.5.3. Stanovení aktivity amyláz, xylanáz, celulóza a pektináz

Pro stanovení aktivity amyláz, xylanáz, celulóza a pektináz byly použity supernatanty jejich produkčních médií. Pro stanovení aktivity enzymů bylo využito měření redukujících cukrů. Cukry byly stanoveny pomocí metody DNS. Byla optimalizována doba inkubace enzymu a substrátu. Doba inkubace byla 1, 4 a 24 hodin. Testováno bylo také prostředí, a to rozpuštěním příslušného substrátu ve vodě či v pufru. Přehled je znázorněn v tabulce 20.

Tabulka 20: Složení roztoků substrátů pro stanovení příslušných enzymů

Enzym	Rozpouštědlo			Substrát	
	PBS pufr	Citrátový pufr	Voda		
amyláz	+		+	škrob	10 g/l
xylanáz		+	+	xylan	10 g/l
celuláz		+	+	karboxymethylcelulóza	10 g/l
pektináz		+	+	pektin	10 g/l

Pro stanovení jednotlivých enzymatických aktivit bylo nutné také stanovit zbytkové cukry v médiu. Pro každý vzorek byl změřen zbytkový cukr v supernatantu, a to takovým způsobem, že bylo napipetováno 0,5 ml supernatantu do zkumavky. Poté bylo přidáno 0,5 ml DNS a roztok byl zahříván na 70 °C po dobu 10 minut. Po ochlazení na laboratorní teplotu bylo přidáno 9 ml vody a byla změřena absorbance při 540 nm oproti blanku. Každý vzorek byl připraven ve třech provedeních. Blank obsahoval místo vzorku vodu. Při stanovení aktivity enzymu pro optimalizaci doby inkubace byl vybrán jeden vzorek supernatantu a komerční enzym. Do zkumavky bylo napipetováno 250 µl vzorku nebo komerčního enzymu a 250 µl příslušného substrátu v rozpouštědle (voda nebo daný pufr). Blank obsahoval pouze vodu a substrát. Všechny vzorky byly připraveny ve dvou provedeních. Sady vzorků byly inkubovány po dobu 1, 4 a 24 hodin při 50 °C. Poté byl ve vzorcích změřen redukující cukr pomocí metody DNS.

Po výběru vhodné doby inkubace a rozpouštědla pro substrát byly doměřeny ostatní vzorky stejným způsobem.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

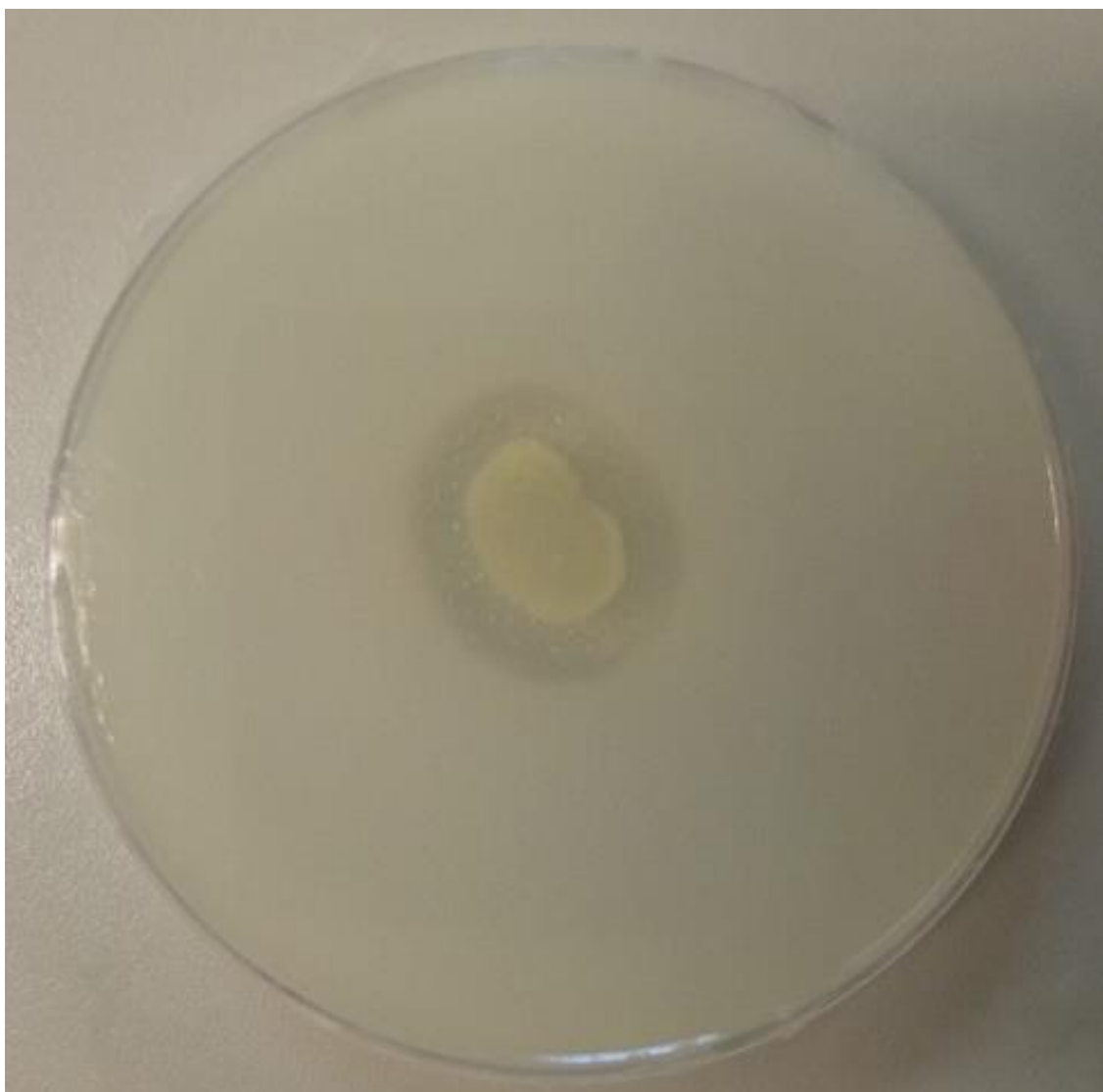
4.1. Screening a stanovení extremozymů u vybraných producentů PHA

V této práci byly stanovovány zvolené extremozymy (proteázy, lipázy, amylázy, xylanázy, celulózy, pektinázy) u vybraných mikroorganismů. Všechny testové mikroorganismy jsou také producenti polyhydroxyalkanoátů. Jedná se o ve vodě nerozpustné polyestery, které jsou plně odbouratelné v přírodě. Jejich materiálové vlastnosti jsou velmi podobné polypropylenu. U vybraných mikroorganismů byl udělán screening na agarových plotnách pro stanovení extremozymů. Pomocí vytvořených halozón je možné posoudit, které mikroorganismy produkují konkrétní enzym. U slibných producentů extremozymů byla stanovena enzymatická aktivita. Takový přehledný seznam a konečné výsledky aktivit bude možné aplikovat pro různé účely, protože v současné době využití extrémofilních bakterií a jejich enzymů v průmyslu roste a má obrovskou výhodu ve srovnání s mezofily. Výhoda extrémofilních mikroorganismů spočívá v tom, že při použití takových skupin mikroorganismů dochází ke snížení nároků na celkovou sterilitu procesu a tím i ke snížení finančních nákladů, zvýšení rozpustnosti různých chemikálií a zvýšení reakční rychlosti. Všechny tyto výhody jsou založeny na použití vyšší teploty, která je základní podmínkou pro většinu průmyslových procesů.

4.2. Screening produkce vybraných extremozymů

Screening produkce enzymů byl proveden proto, aby byla představa o tom, jaké mikroorganismy projevují schopnost produkovat konkrétní extremozymy. Samotné měření probíhalo na pevném médiu na Petriho miskách a složení tohoto média bylo závislé na požadavcích enzymu. V některých případech bylo pro vyhodnocování produkce nutné použít barvivo jako doplňující činidlo. Měření a vyhodnocování bylo provedeno podle postupů uvedených v kapitole 3.4.

Schopnost produkovat proteázy byla prokázána vytvořením halo zóny okolo narostlé kolonie (Obrázek 2). Tutu produkci projevily takové mikroorganismy, jako jsou *Thermomonas hydrothermalis* DSM 14834, *Tepidimonas taiwanensis* LMG 22826, *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15344 a *Brevibacillus borstelensis* Bz. Tato schopnost ukazuje na to, že tyto mikroorganismy mají schopnost hydrolyzovat různé proteinové substráty. Například *Thermomonas hydrothermalis* DSM 14834 podle literatury projevuje schopnost hydrolyzovat takové proteinové substráty, jako jsou kasein, fibrin a želatin [42]. A proto lze tyto mikroorganismy využít v takových průmyslových odvětvích, jako jsou mlékárenský a pekařský průmysl či krmení zvířat [17–19].



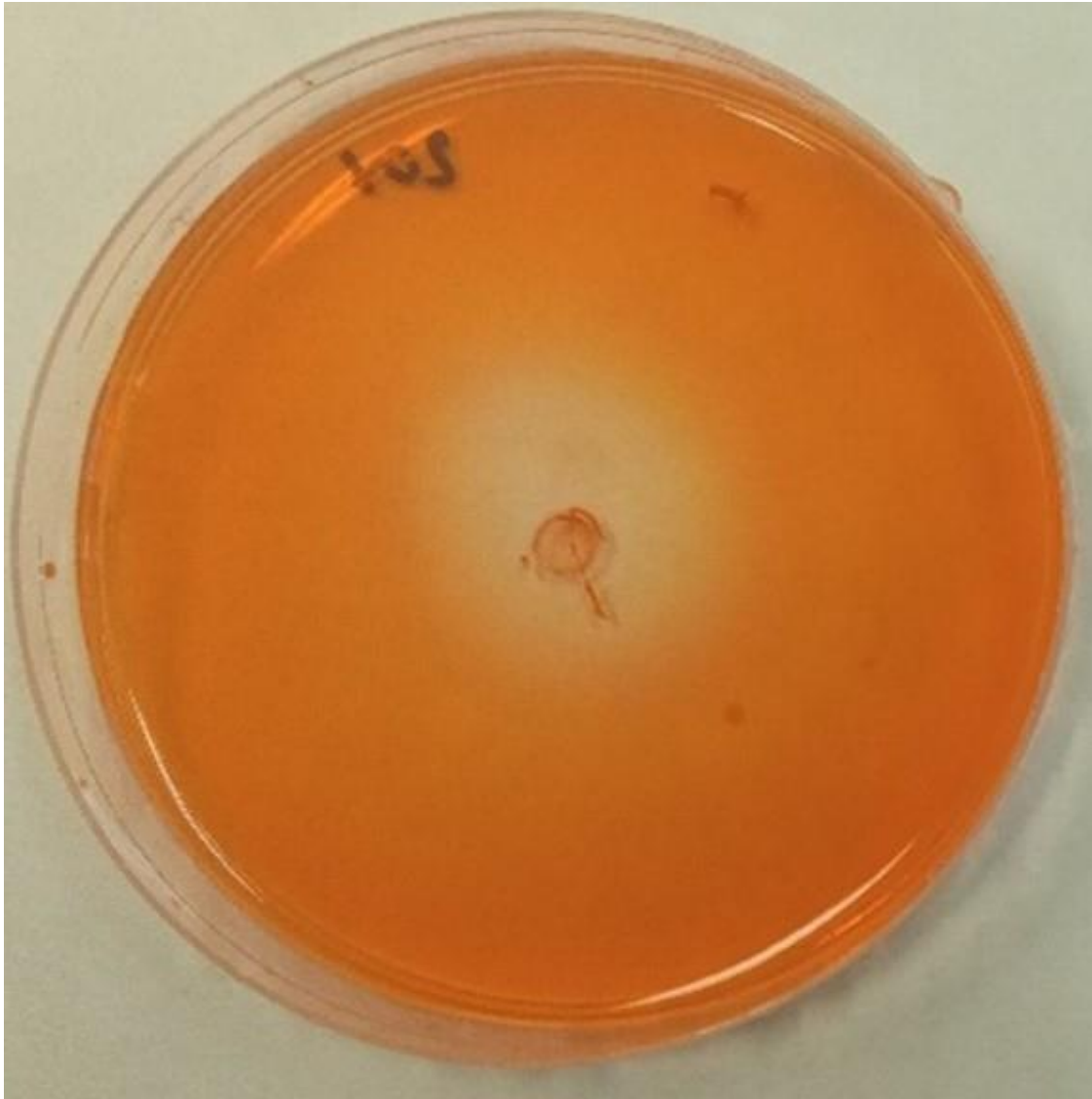
Obrázek 2: Screening produkce proteáz – *Tepidimonas taiwanensis* LMG 22826

Lipolytické enzymy byly detekovány na základě toho, že došlo k odbarvení obsahu misky u *Caldimonas meghalayensis* JCM 18786, *Brevibacillus borstelensis* LK 99, *Aneurinibacillus thermoaerophilus* LK 102, *Aneurinibacillus* sp. CCM 8960, *Aneurinibacillus thermoaerophilus* LK 7 (Obrázek 3) a *Brevibacillus borstelensis* Bz. Producenty lipolytických enzymů jsou využívány například ve farmaceutickém nebo pracím průmyslu [17–19].



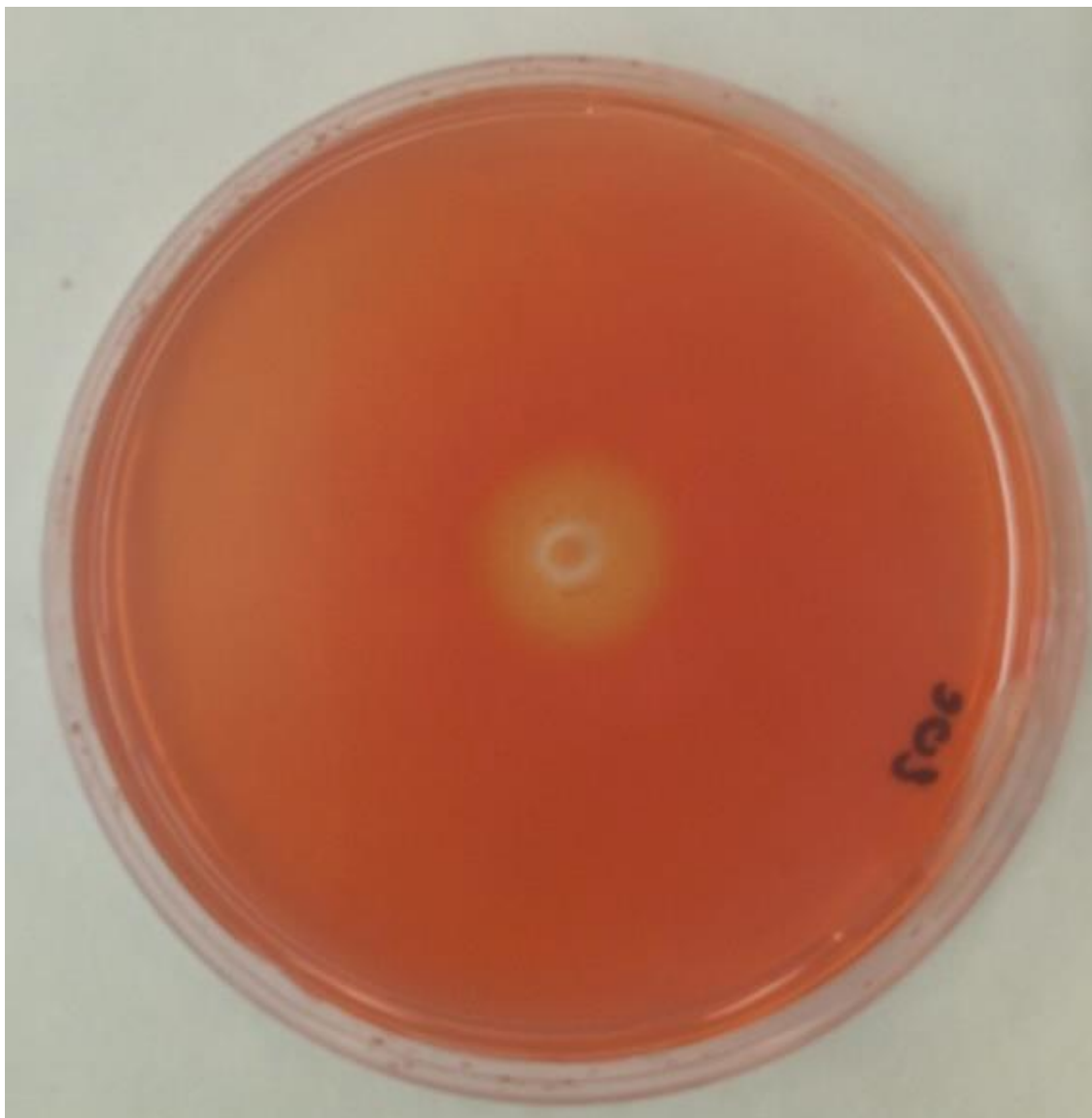
Obrázek 3: Screening produkce lipáz – *Aneurinibacillus thermoaerophilus* LK 7

Schopnost produkovat xylanázy projevily jen takové mikroorganismy, jako jsou *Aneurinibacillus* sp. CCM 8960 a *Brevibacillus borstelensis* Bz na obrázku 4. Xylanázy mají obrovskou výhodu v konverze biomasy, papírenském průmyslu a recyklaci odpadu na bázi papíru a celulózy [17–19].



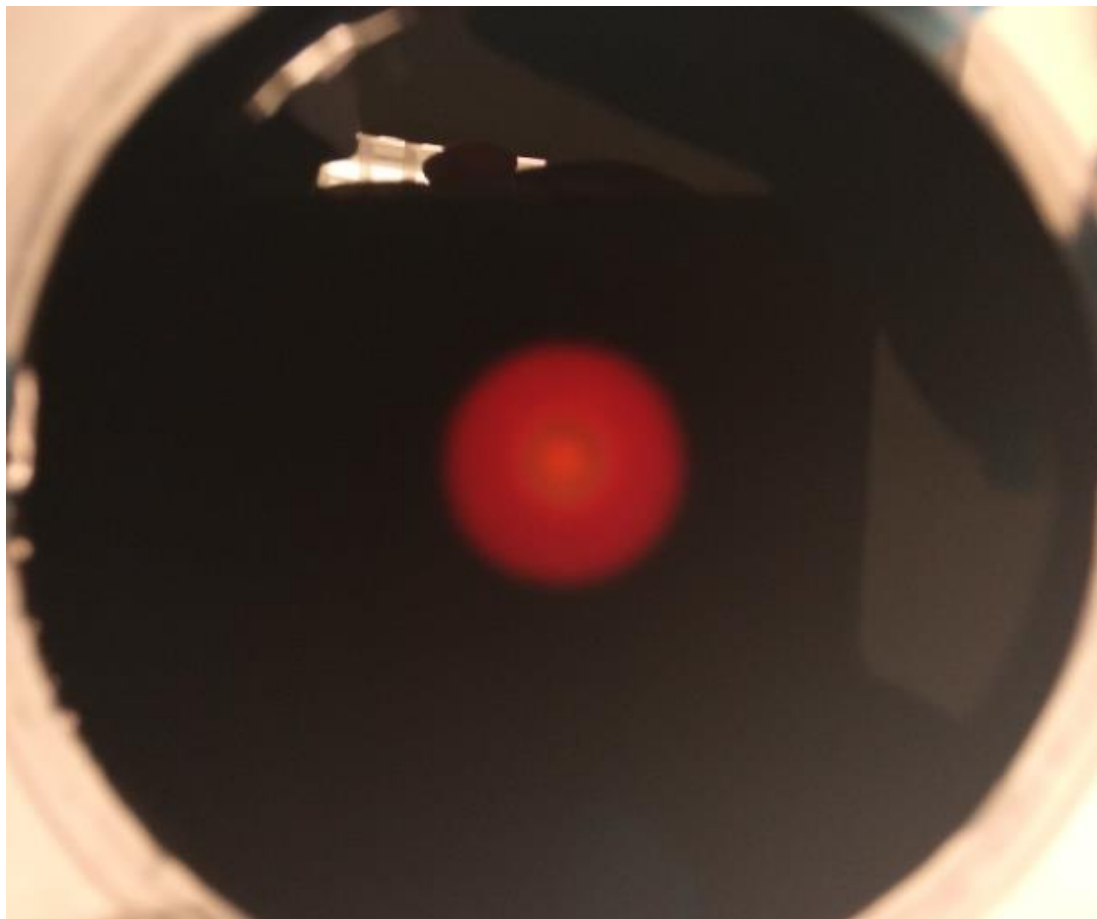
Obrázek 4: Screening produkce xylanáz – *Brevibacillus borstelensis* BŽ

Celulázy byly prokázány u *Thermomonas hydrothermalis* DSM 14834, *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15344, *Pseudomonas thermotolerans* DSM 14292, *Aneurinibacillus* sp. CCM 8960, *Aneurinibacillus thermoaerophilus* LK 7 a *Brevibacillus borstelensis* Bz na obrázku 5. Celulázy mají velmi podobné aplikace jako xylanázy, ale také mohou být ještě využity v pivovarnickém průmyslu a ve výrobě biopaliv [17–19].



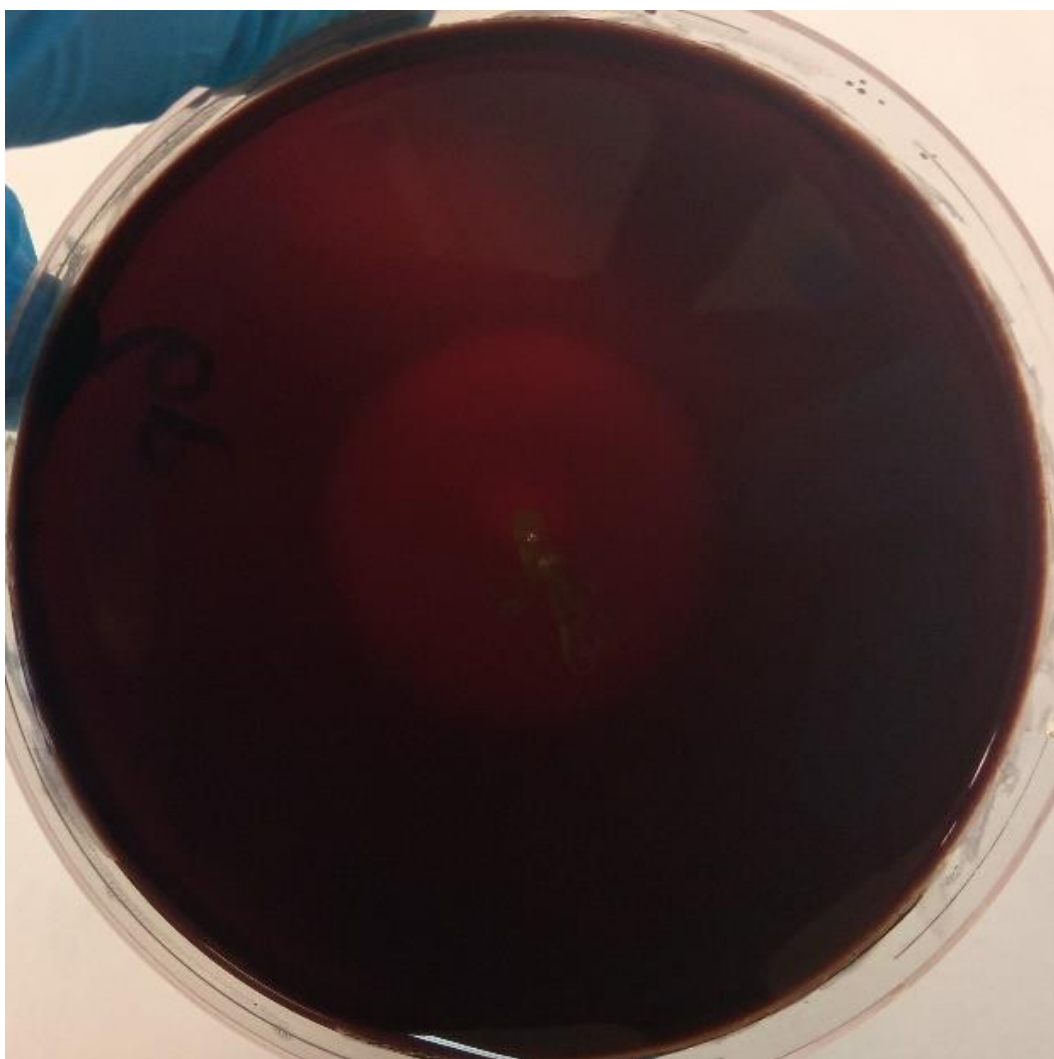
Obrázek 5: Screening produkce celuláz – *Brevibacillus borstelensis* BŽ

Schopnost produkce amyláz byla detekována u *Caldimonas hydrothermale* DSM 18497, *Caldimonas taiwanensis* LMG 22827, *Caldimonas manganoxidans* JCM 10698 na obrázku 6 a *Brevibacillus borstelensis* Bz. V případě produkce amyláz je možné říct, že mikroorganismy rodu *Caldimonas* vystupují jako příkladové, protože život těchto bakterií je závislý na přítomnosti takových látek, jako jsou D-glukóza, maltóza, D-fruktóza a podobné [24]. Mikroorganismy, které projevují schopnost produkce amyláz, mohou být použity v textilním, pekařském a jiném průmyslu [17–19].



Obrázek 6: Screening produkce amyláz – *Caldimonas manganoxidans* JCM 10698

Schopnost produkovat pektinázy projevily takové mikroorganismy, jako jsou *Caldimonas hydrothermale* DSM 18497, *Caldimonas taiwanensis* LMG 22827 na obrázku 7, *Caldimonas manganoxidans* JCM 10698, *Thermomonas hydrothermalis* DSM 14834, *Pseudomonas thermotolerans* DSM 14292 a *Brevibacillus borstelensis* Bz. Pektinázy má významnou roli ve výrobě různých ovocných šťáv. Mohou vystupovat jak samostatné enzymy, které snižují zákal a viskozitu šťáv, nebo jak složky enzymatických směsí. Například směs z pektináz a amyláz se využívá ke zvýšení extrakci a zkrácení doby filtrace šťáv z banánů, hroznů a jiných ovoce a plodů [43]



Obrázek 7: Screening produkce pektináz – *Caldimonas taiwanensis* LMG 22827

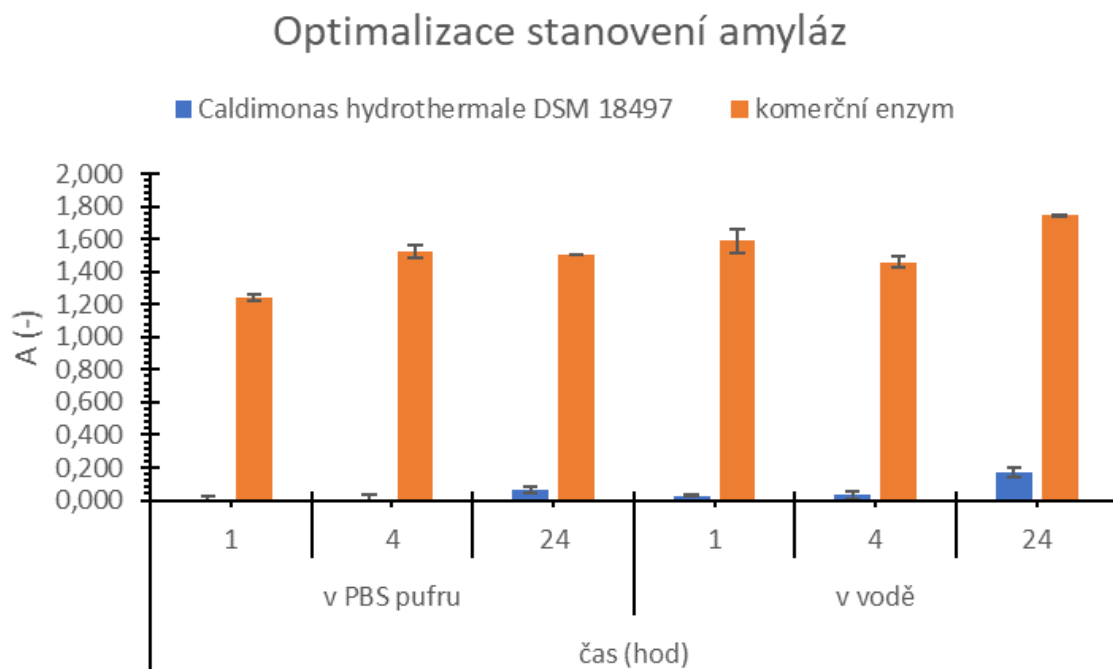
V tabulce 21 je souhrnný přehled schopnosti produkovat hydrolytické enzymy, konkrétně proteázy, lipázy, amylázy, xylanázy, celulázy a pektinázy u zkoumaných mikroorganismů. Podle dosavadních výsledků lze říct, že *Schlegelella aquatica* LMG 23380, *Tepidimonas fonticaldi* LMG 26746 a zkoumané mikroorganismy z rodu *Chelatococcus* neprojevily schopnost extracelulárně produkovat žádný zkoumaný enzym. Testované izoláty *Brevibacillus borstelensis* LK 99 a *Aneurinibacillus thermoaerophilus* LK 102 projevily schopnost produkce jen lipolytických enzymů. Jako univerzální producent všech vybraných extremozymů vystupuje *Brevibacillus borstelensis* Bz.

Tabulka 21: Screening produkce vybraných extremozymů (++ narostla kolonie a široká haló zóna, + narostla kolonie a haló zóna, - narostla kolonie, bez haló zóny, -- nenarostla kolonie, bez haló zóny)

Mikroorganismus		Proteázy	Lipázy	Xylanázy	Celulázy	Amylázy	Pektinázy
<i>Chelatococcus daeguensis</i>	DSM 22069	-	-	-/-	-/-	-/-	-/-
<i>Chelatococcus thermostellatus</i>	DSM 28244	-	-	--/--	--/--	-/-	-/-
<i>Chelatococcus composti</i>	DSM 101465	-	-	-/-	--/--	-/-	-/-
<i>Chelatococcus sambhunathii</i>	DSM 18167	-	-	-/-	--/--	-/-	-/-
<i>Caldimonas hydrothermale</i>	DSM 18497	-	-/--	-/-	-/-	+++	++
<i>Caldimonas taiwanensis</i>	LMG 22827	-	-	-/-	-/-	+++	+++
<i>Caldimonas manganoxidans</i>	JCM 10698	-	-	-/-	-/-	+++	+++
<i>Caldimonas meghalayensis</i>	JCM 18786	-	++	-/-	-/-	-/-	-/-
<i>Thermomonas hydrothermalis</i>	DSM 14834	++	-	-/-	+/+	-/-	+/+
<i>Tepidimonas taiwanensis</i>	LMG 22826	+	-	--/--	--/--	-/-	-/-
<i>Tepidimonas fonticaldi</i>	LMG 26746	-	-	-/-	-/-	-/-	-/-
<i>Schlegelella aquatica</i>	LMG 23380	-	-	--/--	-/-	-/-	--/--
<i>Schlegelella thermodepolymerans</i>	DSM 15344	+	-	-/-	+/+	-/-	-/-
<i>Brevibacillus borstelensis</i>	LK 99	-	++	-/-	--/--	-/-	-/-
<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i>	LK 102	-	++	-/-	--/--	-/-	-/-
<i>Pseudomonas thermotolerans</i>	DSM 14292	-	-	-/-	+/+	-/-	+/+
<i>Aneurinibacillus sp.</i>	CCM 8960	-	++	+/+	+++	-/-	-/-
<i>Chelatococcus composti</i>	34	-	-	-/-	--/--	-/-	-/-
<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i>	LK 7	-	++	-/-	+/+	-/-	--/--
<i>Brevibacillus borstelensis</i>	Bz	++	++	+++	+++	+/+	+/+

4.3. Stanovení amylolytické aktivity

Stanovení amylolytické aktivity vybraných mikroorganismů, které ukázaly schopnost produkovat amylázy, obsahovalo dvě etapy: optimalizace a samotné stanovení. Optimalizace byla provedena podle postupu v kapitole 3.5.3 pro vzorek supernatantu *Caldimonas hydrothermale* DSM 18497 se škrobem, který byl rozpouštěn v PBS pufru nebo ve vodě, po dobu inkubace 1, 4 a 24 hodin při 50 °C. Poté byly stanoveny zbytkové redukující cukry, které vznikly působením amyláz, ve vzorku při vlnové délce 540 nm. Spolu se vzorkem supernatantu byl změřen vzorek komerční amylázy. Na obrázku 8 je možné pozorovat absorbance testovaného vzorku po odečtu absorbance naměřené u čistého média, protože samotné médium může obsahovat cukry. Podle tohoto grafu lze posoudit, že nejvhodnější čas inkubace je 24 hodin a vyšších hodnot dosahoval substrát (škrob) rozpouštěný ve vodě. V takové kombinaci vzorek projevuje největší hodnoty absorbance, tudíž i nejvyšší enzymatické aktivity. Také komerční amyláza za těchto podmínek dosahuje nejvyšší aktivity.



Obrázek 8: Optimalizace stanovení amyláz

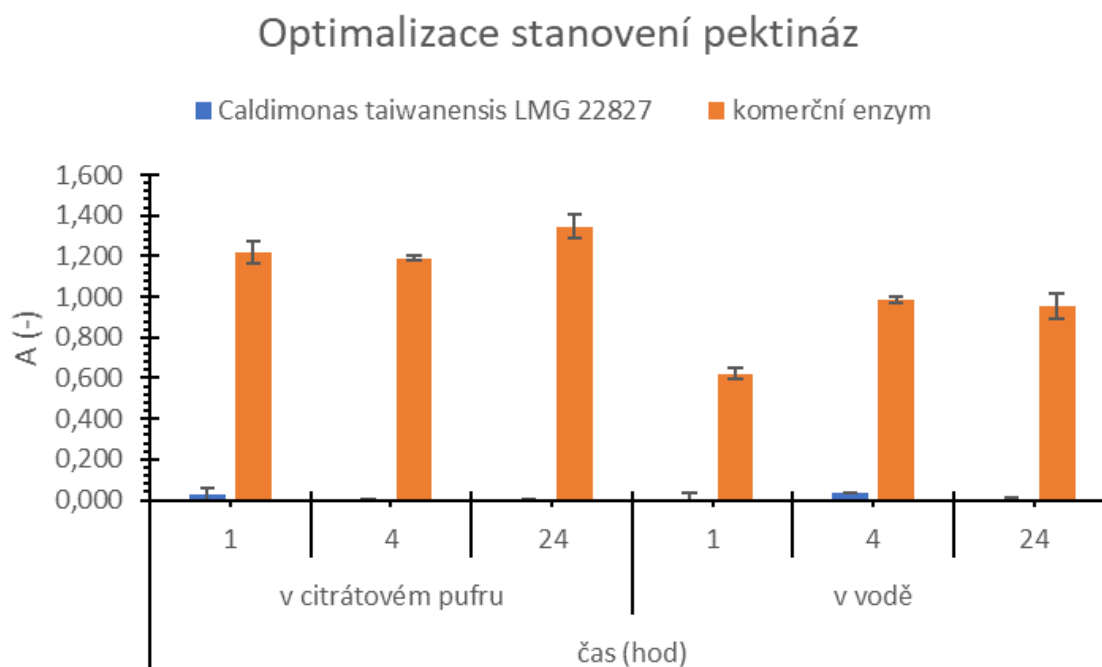
Po provedení optimalizace bylo uděláno samotné stanovení podle postupu v kapitole 3.5.3 pro vzorky supernatantu všech mikroorganismů, u kterých byla detekována produkce amyláz na plotnách, tj *Caldimonas hydrothermale* DSM 18497, *Caldimonas taiwanensis* LMG 22827, *Caldimonas manganoxidans* JCM 10698 a *Brevibacillus borstelensis* Bz. Aktivita byla změřena i pro vzorek komerční amylázy. Avšak při stanovení aktivity, nebyla naměřena téměř žádná absorbance. Tudíž i aktivita enzymu byla nulová.

Stanovení aktivity a neoptimálnějších producentů enzymů hraje obrovskou roli v současné době, protože potřeba využití extremofilů a jejich extremozymů, jako jsou amylázy, roste každý rok kvůli sníženým nákladům, zvýšené stabilitě, zvýšené reakční rychlosti a jiných aspektů, které mohou zjednodušit celý průmyslový proces. Například glukózooxidáza v posledních

letech má obrovskou škálu průmyslových odvětvích, kde je využívána. Tento enzym je používán v potravinářském průmyslu jako konzervační prostředek a antimikrobiální látka, pro farmaceutické a diagnostické účely ke stanovení hladiny glukózy v různých tělních tekutinách, jako je krev. Glukózooxidáza má natolik vysokou komerční výhodu, že představuje asi 30 % světové produkce všech enzymů [44].

4.4. Stanovení pektinolytické aktivity

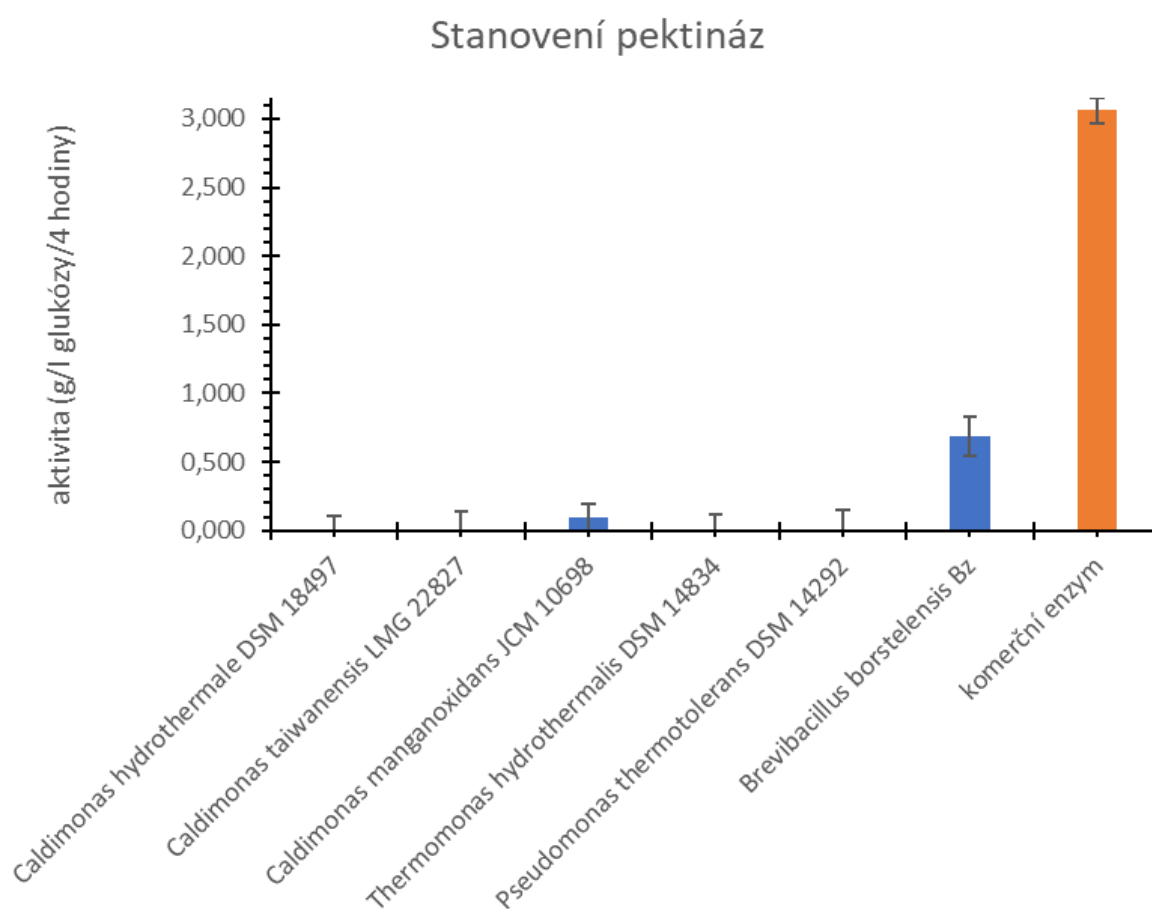
Pektinolytická aktivita byla stanovena podle postupu uvedeným v kapitole 3.5.3. Nejprve byla udělána optimalizace pro to, aby možné bylo vybrat nejvhodnější roztok pektinu a čas inkubace. Měření probíhalo pro vzorek supernatantu *Caldimonas taiwanensis* LMG 22827 v pektinu rozpouštěném v citrátovém pufru nebo ve vodě. Inkubace vzorků probíhala po dobu 1, 4 a 24 hodin při teplotě 50 °C a pro srovnání byl připraven stejným způsobem vzorek komerční pektinázy. Po provedené inkubace byly stanoveny redukující cukry pomocí DNS při vlnové délce 540 nm. Na obrázku 9 je možné pozorovat absorbanci testovaného vzorku po odečtu absorbance naměřené u čistého média. Z naměřených dat lze usuzovat, že nejvhodnější čas inkubace je 4 hodiny a roztok pektinu ve vodě.



Obrázek 9: Optimalizace stanovení pektináz

Podle průběžných výsledků optimalizace bylo provedené samotné stanovení aktivity pektináz u všech vybraných mikroorganismů (*Caldimonas hydrothermale* DSM 18497, *Caldimonas taiwanensis* LMG 22827, *Caldimonas manganoxidans* JCM 10698, *Thermomonas hydrothermalis* DSM 14834, *Pseudomonas thermotolerans* DSM 14292 a *Brevibacillus borstelensis* Bz). Pro srovnání všech aktivit byl také stanoven vzorek komerční pektinázy. Po provedení spektrofotometrického měření a po odečtu hodnot absorbance u čistého média byly získány výsledné hodnoty absorbance. Tyto hodnoty absorbance spolu s kalibrační křivkou byly použity ve výpočtech hodnot aktivit každého vzorku. Aktivita byla uvedena

v jednotkách g/l glukózy/4 hodiny kvůli tomu, že stanovení probíhalo pro vzorky po 4 hodinách inkubace. Na Obrázek 10 je možné pozorovat, který z mikroorganismů má neaktivnější pektinázy v rámci tohoto stanovení. Jen vzorky dvou mikroorganismů projeví aktivitu vyšší než nula. Aktivita pektináz bakterie *Caldimonas manganoxidans* JCM 10698 měla nízkou aktivitu a to pouze $0,094 \pm 0,097$ g/l glukózy/4 hodiny. Zato aktivita enzymu bakterie *Brevibacillus borstelensis* Bz dosahovala mnohem větší aktivity na úrovni $0,688 \pm 0,140$ g/l glukózy/4 hodiny. Ale tyto hodnoty je velmi malé ve srovnání se vzorkem komerčního enzymu, který ukázal hodnotu aktivity $3,060 \pm 0,097$ g/l glukózy/4 hodiny. Pro zvýšení aktivity by bylo vhodné enzymy purifikovat a zjistit jejich optimální podmínky.

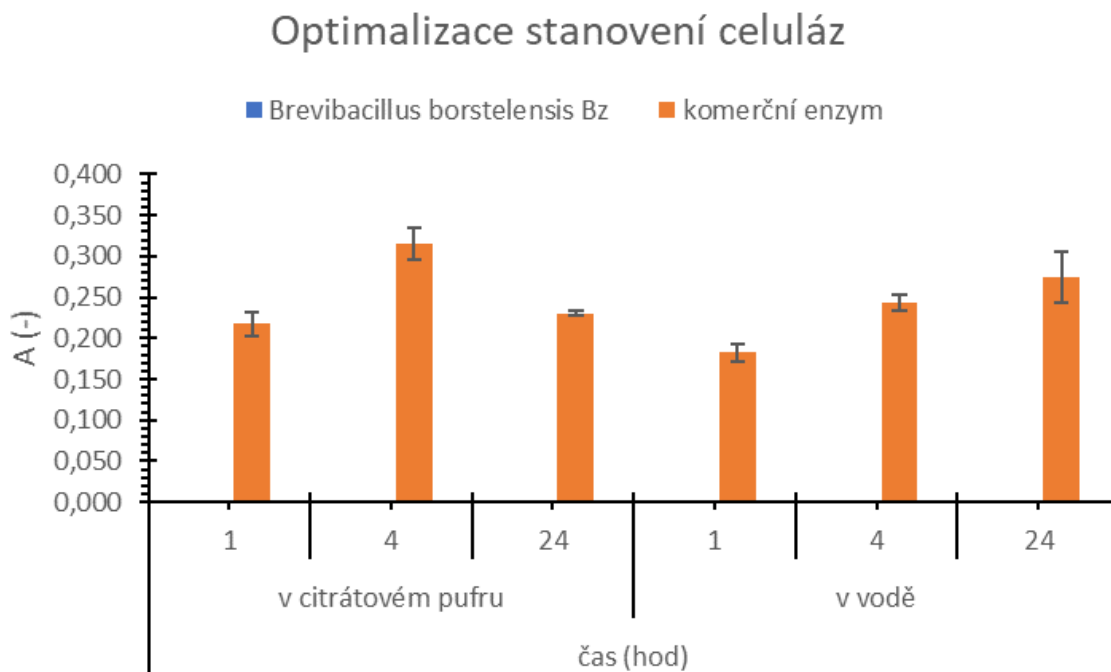


Obrázek 10: Stanovení pektináz

Stanovení aktivity a následná charakterizace producentů enzymů má významnou roli, protože pektinázy a jiné extremozymy naráží své uplatnění v mnohých odvětvích průmyslu. Například pektinázy jsou využívány nejčastěji jako enzymatické doplňky pro xylanázy a celulózy pro degradaci různých typů odpadu, které se skládají z celulózy a podobných materiálů. Takový koktejl je používán ve výrobě bioethanolu, kde proces vyžaduje, aby enzym měl několik různých vlastností jako je rychlá a dostatečně levná výroba na surovém materialu, rozmanitá škála specifity s různými optimy teploty a pH a endopůsobící způsob interakce [45].

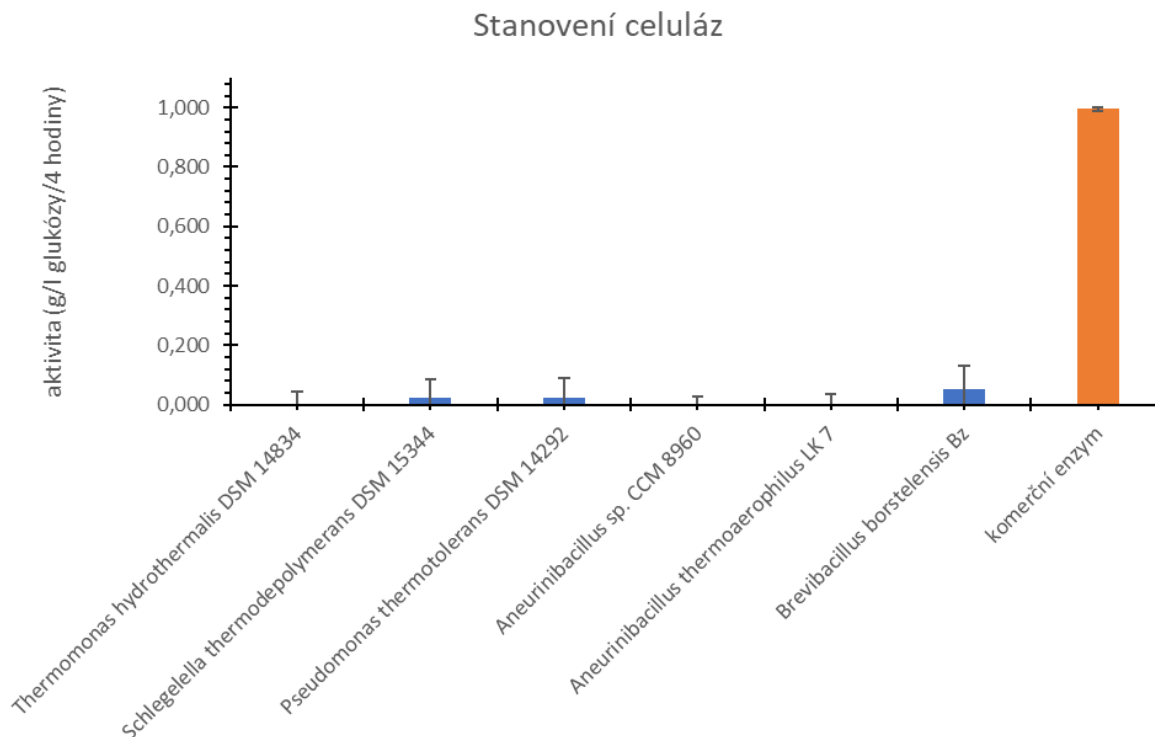
4.5. Stanovení celulytické aktivity

Stanovení celulytické aktivity probíhalo podle postupu v kapitole 3.5.3 pro vzorky supernatantů *Thermomonas hydrothermalis* DSM 14834, *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15344, *Pseudomonas thermotolerans* DSM 14292, *Aneurinibacillus sp.* CCM 8960, *Aneurinibacillus thermoaerophilus* LK 7 a *Brevibacillus borstelensis* Bz a pro vzorek komerční celulózy. Nejprve byla udělána optimalizace stanovení u vzorku supernatantu *Brevibacillus borstelensis* Bz. Inkubace vzorků probíhala po dobu 1, 4 a 24 hodin při 50 °C v roztoku karboxymethylcelulózy rozpouštěné v citratovém pufru nebo ve vodě. Na obrázku 11 je možné pozorovat, že testovaný vzorek neukázal žádnou absorbanci po odečtu absorbance naměřené u čistého média. A proto vyhodnocování vhodných podmínek pro další stanovení enzymu bylo uděláno na základě hodnot absorbance komerční celulózy. Podle tohoto grafu vzorek komerční celulózy měl největší absorbanci v čase 4 hodiny a v roztoku karboxymethylcelulózy, která byla rozpouštěna v citrátovém pufru.



Obrázek 11: Optimalizace stanovení celuláz

Podle vyhodnocovaných výsledků optimalizace bylo provedeno samotné stanovení celulytické aktivity. Konečně byly udělány výpočty aktivit u jednotlivých vzorků pomocí hodnot absorbance a kalibrační přímky na glukózu. Na obrázku 12 je možné pozorovat přehled aktivit celuláz u konkrétních mikroorganismů. Nejvyšší celulytickou aktivitu projevil vzorek bakterie *Brevibacillus borstelensis* Bz, který ukázal aktivitu $0,053 \pm 0,078$ g/l glukózy/4 hodiny, ale ve srovnání se vzorkem komerčního enzymu hodnota aktivity je přibližně 5krát nižší.



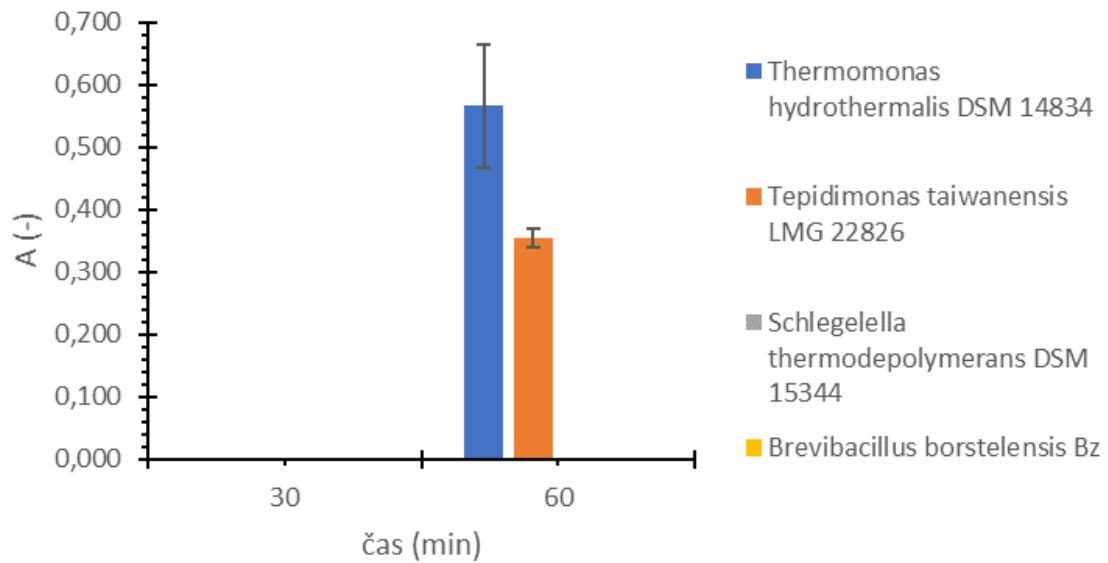
Obrázek 12: Stanovení celuláz

Posouzení o aktivitě enzymů má dostatečně vysokou významnost v průmyslu. Velké hodnoty aktivity mohou vést k tomu, že průmyslový proces bude probíhat rychleji a tím pádem bude nutné méně zdrojů pro udržbu sterility a jiných podmínek procesu. Takové výhody mohou velmi silně zjednodušit celkový proces výroby různých materiálů. Celulázy mohou být využívány jako složka enzymatické směsi ve výrobě bioethanolu [45] a také v krmivech pro zvířata pro úspěšné využití všech složek rostlinného původu. Bylo dokázáno, že enzymatická směs obsahující xylanázy, celulázy a beta-glukanázy snižuje antinutriční účinek neškrobových polysacharidů tím, že degraduje struktury polysacharidů okolo bílkovin a také snižuje viskozitu střevního obsahu dobytka [46].

4.6. Stanovení proteolytické aktivity

Stanovení proteolytické aktivity vzorků supernatantu vybraných mikroorganismů, tj. *Thermomonas hydrothermalis* DSM 14834, *Tepidimonas taiwanensis* LMG 22826, *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15344 a *Brevibacillus borstelensis* Bz, probíhalo pomocí dvou různých metod postup, kterých byl popsán v kapitole 3.5.1. Stanovení probíhalo v obou případech po dobu 30 a 60 minut při teplotě 50 °C a pak proběhlo spektrofotometrické stanovení tyrosinu při vlnové délce 660 nm (Ladd a Butler metoda) a 440 nm (azokaseinová metoda). Na obrázku 13 je znázorněna optimalizace stanovení proteolytické aktivity podle metody Ladd a Butler. Stanovená absorbance dle dané metody ve srovnání s azokaseinovou metodou je asi 3 až 6krát vyšší, co vede k tomu, že stanovení bude neoptimalnější, když bude provedeno podle postupu metody Ladd a Butler.

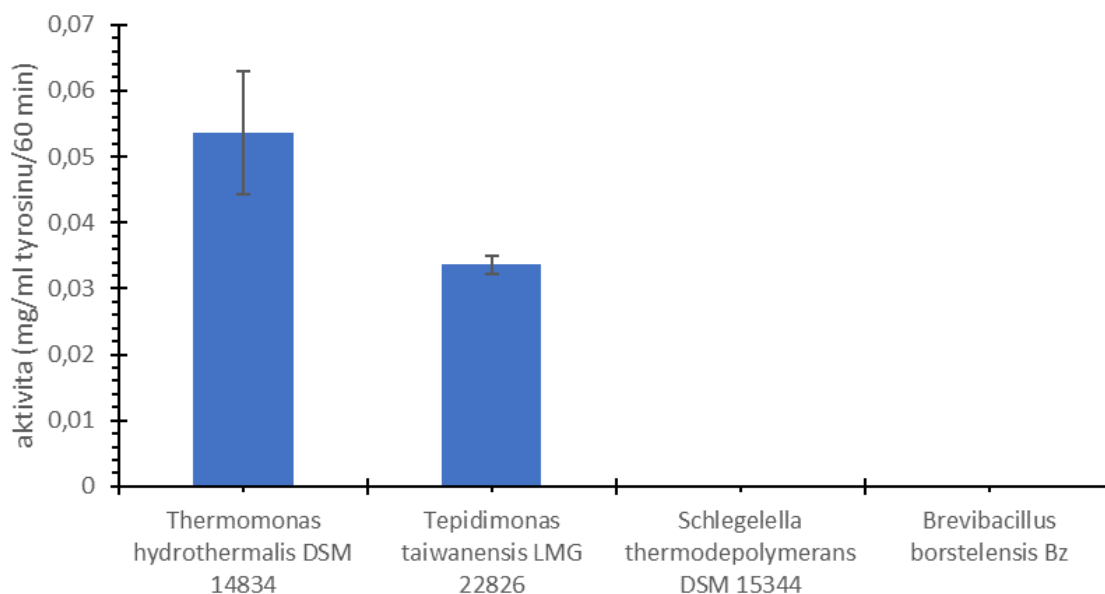
Optimalizace stanovení proteáz



Obrázek 13: Optimalizace stanovení proteáz

Podle výsledků absorbance bylo vyhodnoceno, že metoda Ladd a Butler je neoptimálnější pro stanovení aktivity proteáz. Proto byla následně udělána kalibrace na tyrosin pomocí metody Ladd a Butler. Podle výsledných hodnot absorbance a příslušné kalibrační přímky byla vypočítána aktivita pro každý vzorek, která znázorněna na obrázku 14. Tento graf ukazuje, že proteázy produkované *Thermomonas hydrothermalis* DSM 14834, které projeví aktivitu na úrovni $0,054 \pm 0,009$ mg/ml tyrosinu/60 minut, budou přibližně o půlu aktivnější než proteázy u *Tepidimonas taiwanensis* LMG 22826 o hodnotě aktivity $0,034 \pm 0,001$ mg/ml tyrosinu/60 minut.

Stanovení proteáz



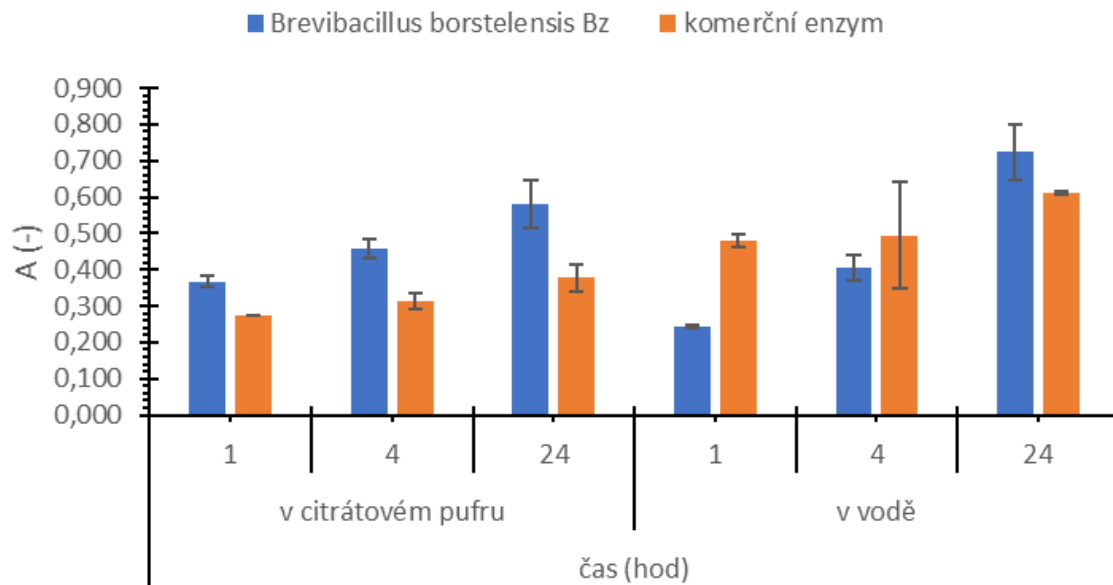
Obrázek 14: Stanovení proteáz

Dřívě už byla studována proteolytická aktivita u bakterií rodu *Thermomonas*. A bylo zjištěno, že proteázy produkované těmito bakteriemi udržují 100 % své aktivity a stability při teplotě 55 °C a při pH 8 až 10. Takové proteázy původního stavu současné s detergenty mohou být použity v průmyslovém odstranění různých skvrn z bavlněného textilu [47]. Také proteázy a jejich abnormální exprese naznačují různé nemoci od virové infekce po rakovinu a Alzheimerovu chorobu. Také pomocí působení inhibitorů na proteázy je možné využít řadu enzymů, jako jsou antivirotika, v léčbě například HIV a rakoviny [48].

4.7. Stanovení xylanolytické aktivity

Stanovení aktivity xylanáz u *Aneurinibacillus sp.* CCM 8960 a *Brevibacillus borstelensis* Bz, které projevily schopnost produkce xylanáz, a u vzorku komerční xylanázy probíhalo podle postupu uvedeném v kapitole 3.5.3 a postupně. Za prvé byla provedena optimalizace metody pro vzorek *Brevibacillus borstelensis* Bz v xylanu rozpouštěným v citrátovém pufru nebo ve vodě po dobu 1, 4 a 24 hodin inkubace při 50 °C. Na obrázku 15 je možné pozorovat, že testovaný vzorek ukázal největší absorpenci v čase 24 hodin pro substrát rozpouštěný ve vodě.

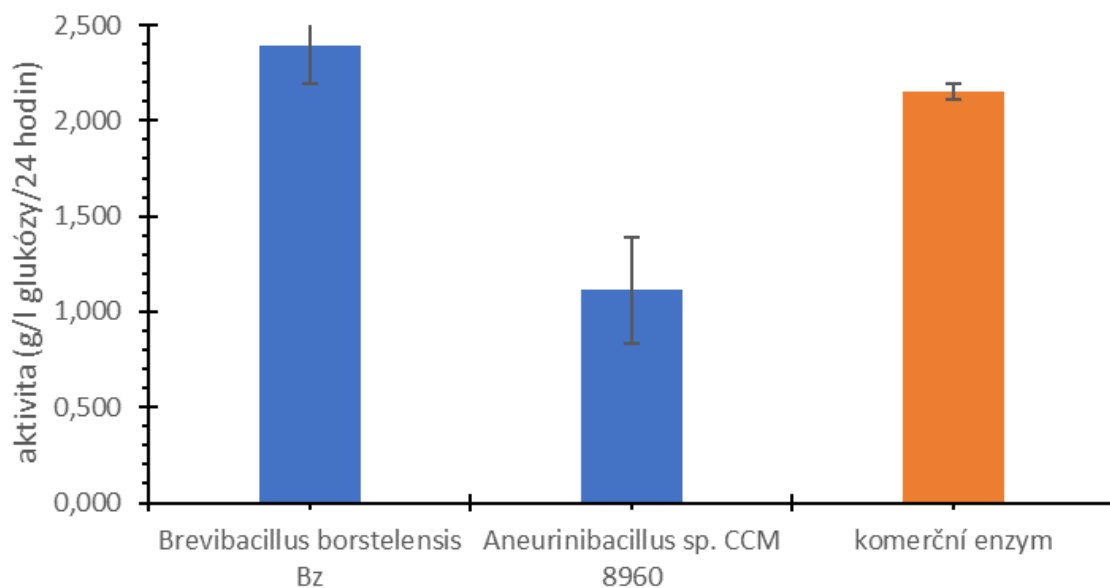
Optimalizace stanovení xylanáz



Obrázek 15: Optimalizace stanovení xylanáz

Výsledné hodnoty absorbance byly pomocí kalibrace přepočítány na množství uvolněné glukózy a byla vypočítaná aktivita xylanázy u vybraných mikroorganismů v jednotkách g/l glukózy/24 hodin. Na obrázku 16 je možné vidět přehled aktivit xylanáz ve srovnání s aktivitou komerčního enzymu. Vzorek enzymu bakterie *Brevibacillus borstelensis* Bz projevila nejvyšší xylanolytickou aktivitu o hodnotě $2,396 \pm 0,201$ g/l glukózy/24 hodin ze všech zkoumaných mikroorganismů a také byla jeho aktivita vyšší než vzorek komerčního enzymu, u kterého byla naměřena aktivita $2,151 \pm 0,042$ g/l glukózy/24 hodin. Bakterie *Brevibacillus borstelensis* Bz se jeví jako vhodný producent xylanáz. Aktivita enzymu je vysoká i při 50 °C.

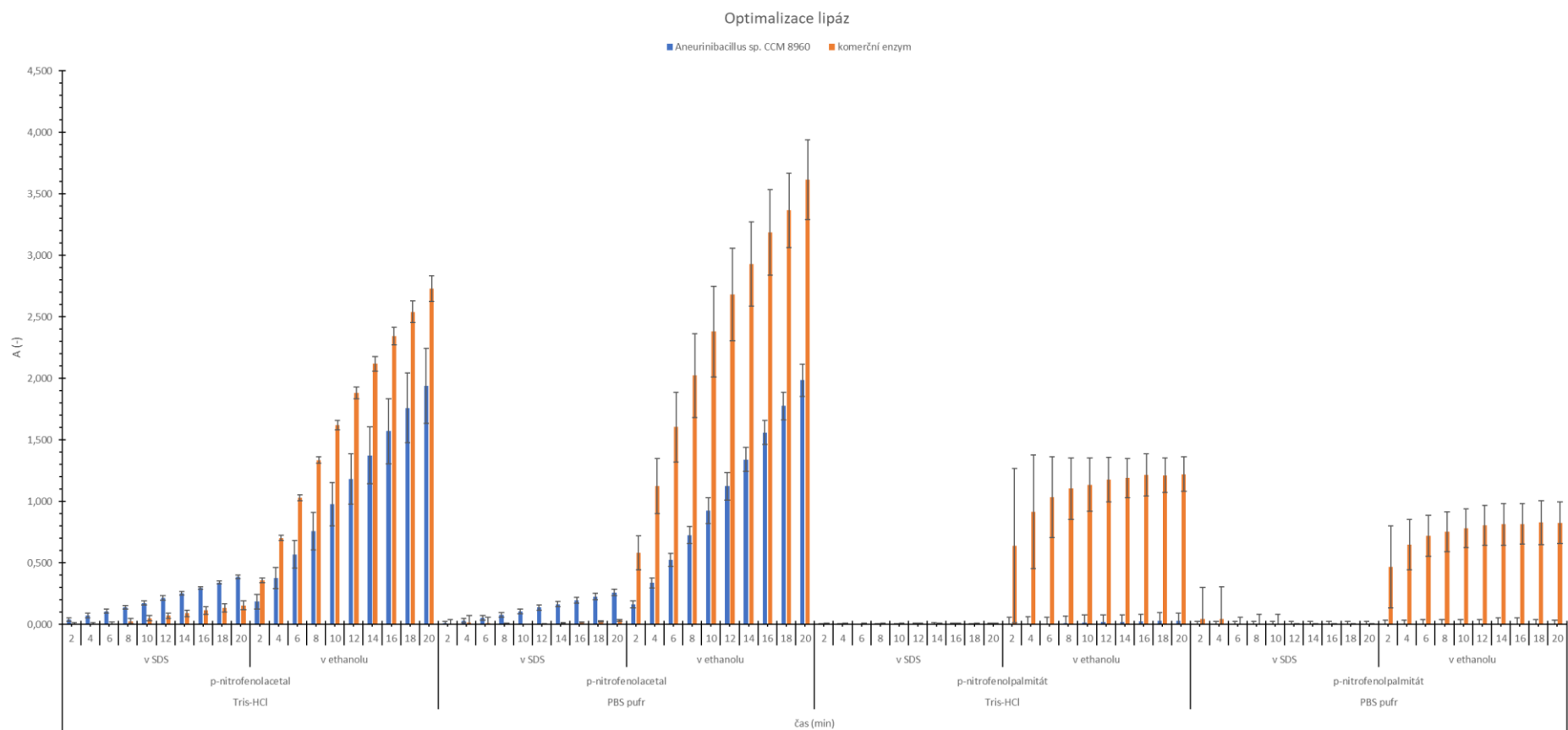
Stanovení xylanáz



Obrázek 16: Stanovení xylanáz

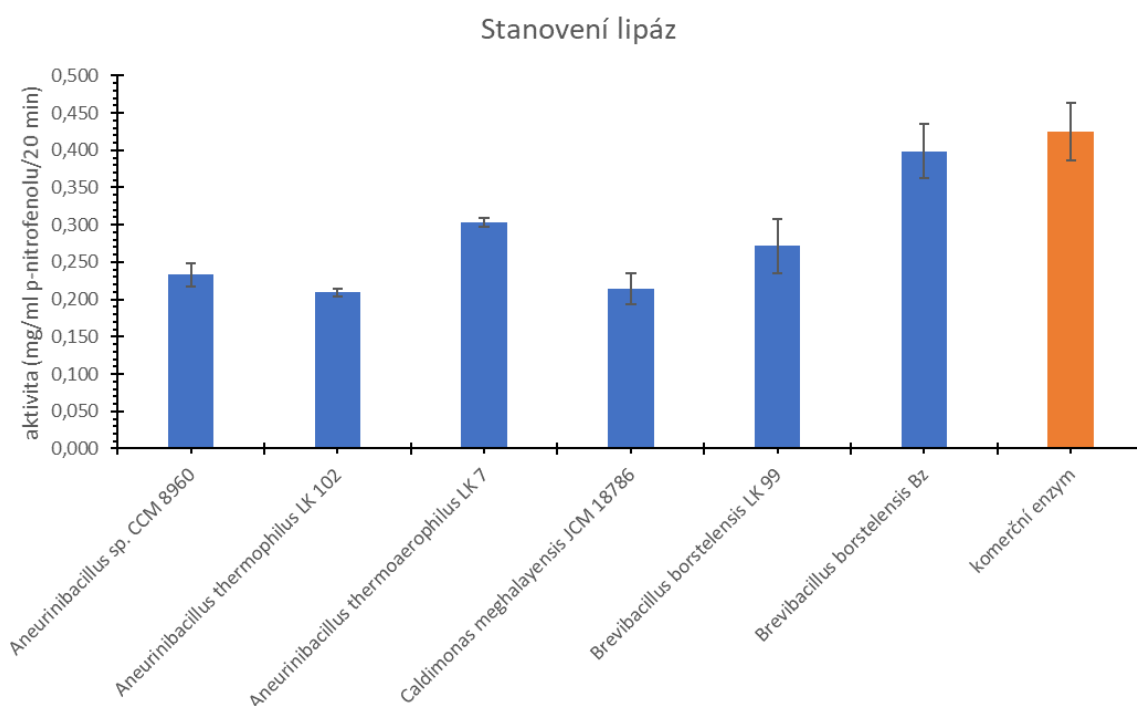
4.8. Stanovení lipolytické aktivity

Stanovení lipolytické aktivity vybraných mikroorganismů, které projevily schopnost produkce lipáz, probíhalo podle postupu uvedeným v kapitole 3.5.2. Optimalizace byla provedena pro vzorek supernatantu *Aneurinibacillus sp.* CCM 8960 po dobu 20 minut v 2minutových krocích. A spolu se vzorkem mikroorganismu byl měřen vzorek komerční lipázy. A na obrázku 17 můžeme vidět, že vybraný vzorek mikroorganismů a vzorek enzymů ukazují nejvyšší hodnoty v roztoku PBS pufru a ethanolu, kde substrát je p-nitrofenolacetát, a v čase 20 minut.



Obrázek 17: Optimalizace stanovení lipáz

Podle výsledku optimalizace, kde bylo zjištěno, že největší absorbance byla naměřena u p-nitrofenolacetátu, bylo provedeno samotné stanovení pro všechny vzorky mikroorganismů a následně byla pomocí změřené kalibrace na p-nitrofenolu a výsledných hodnot absorbance vypočítána aktivita, která znázorněna na obrázku 18. Podle grafu možná říct, že při srovnání všech hodnot bylo zjištěno, že vzorky izolátů mají vyšší aktivitu než vzorky sbírkových kmenů. Také vzorek *Brevibacillus borstelensis* Bz, který vystupuje jako universální producent a má aktivitu $0,399 \pm 0,036$ mg/ml p-nitrofenolu/20 minut, má přibližně stejnou aktivitu jako komerční enzym, u kterého aktivita o hodnotě $0,425 \pm 0,038$ mg/ml p-nitrofenolu/20 minut. Takže nutné zmínit, že stanovení se substrátem p-nitrofenolacetálem vyšlo více efektivnější než s substrátem p-nitrofenolpalmitátem díky tomu, že při lypolytickém působení na p-nitrofenolacetal bude použito méně energie díky tomu, že esterová vazba nachází mezi fenolovým zbytkem a zbytkem acetalové mastné kyseliny, který je kratší než zbytek palmitalové mastné kyseliny v případě p-nitrofenoloalmitátu [49].



Obrázek 18: Stanovení lipáz na substrátu p-nitrofenolacetal

Stanovení aktivity a výběr neoptimálnějších producentů má významnou roli, protože potřeba ve využití extremofilů a jejich extremozymů, jako jsou lipázy, roste každý rok kvůli sníženým nákladům, zvýšené stabilitě, zvýšené reakční rychlosti a jiným aspektům, které mohou zjednodušit celý průmyslový proces. Také využití takových průmyslových enzymů umožňuje vytvořit procesy, které budou trochu blíže k efektivním přírodním procesům. Obecně enzymy, konkrétně lipázy bakteriálního původu jsou stabilnější a aktivnější než stejné enzymy živočišného nebo rostlinného původu. Lipázy a jejich lipolytická aktivita jsou využívány nejčastěji v syntéze bionafty a jiných biopolymerů, ve výrobě agrochemikálií, aromatických látek a léčiv [50].

5. ZÁVĚR

Termofilní mikroorganismy mají v současné době obrovské zastoupení v různých odvětvích průmyslu od výroby papíru po farmaceutické procesy. Jejich výhoda spočívá především v tom, že produkují termostabilní enzymy. Kvůli vysokým teplotám, při nichž se kultivují takové mikroorganismy, dochází k inaktivaci různých kontaminantů, větší rozpustnosti chemikálií, zvýšení reakční rychlosti, snížení finančních nákladů a nákladů na celkovou sterilitu.

Cílem této bakalářské práce byl screening produkce extremozymů (proteáz, lipáz, amyláz, xylanáz, celuláz a pektináz) u vybraných termofilních mikroorganismů, kteří jsou schopni produkce polyhydroxyalkanoátů.

Nejprve byl udělán celkový screening produkce enzymů u všech vybraných mikroorganismů. Takové testování je nutné pro to, aby bylo možné stanovit predispozice k produkci extracelulárních enzymů u každého mikroorganismu. Screening byl proveden na produkci takových enzymů, jako jsou proteázy, lipázy, amylázy, xylanázy, celulázy a pektinázy. Podle výsledků bylo zjištěno, že *Schlegelella aquatica* LMG 23380, *Tepidimonas fonticaldi* LMG 26746 a zkoumané mikroorganismy z rodu *Chelatococcus* neprojevily schopnost extracelulárně produkovat žádný zkoumaný enzym. Zkoumané mikroorganismy, jako jsou *Brevibacillus borstelensis* LK 99 a *Aneurinibacillus thermoaerophilus* LK 102, projevily schopnost produkce jen lipolytických enzymů. Izolát *Brevibacillus borstelensis* Bz vystupuje jako univerzální producent všech testovaných extracelulárních enzymů.

Dále byly tyto enzymy produkovány a byla stanovena jejich aktivita. Aktivita enzymu u určitých mikroorganismů hraje velkou roli ve výběru vhodného producenta pro průmyslový proces. V této práci byly pro stanovení aktivity použity celkem čtyři metody: metoda podle Ladd a Butlera i azokaseinova metoda pro proteázy, metoda pomocí Elisa readeru s p-nitrofenolem pro lipázy a metoda stanovení redukujících cukru pomocí DNS pro amylázy, xylanázy, celulázy a pektinázy. V případě stanovení aktivity proteáz bylo stanoveno, že *Thermomonas hydrothermalis* DSM 14834 má větší proteolytickou aktivitu z vybraných mikroorganismů, které projevily schopnost produkce proteáz. U stanovení aktivity amyláz nebyla stanovena žádná aktivita u zkoumaných mikroorganismů. Při stanovení aktivity lipáz, xylanáz, celuláz a pektináz izolát *Brevibacillus borstelensis* Bz vykazoval nejvyšší aktivity z testovaných mikroorganismů. Izolát *Brevibacillus borstelensis* Bz se jeví jako universální producent vybraných hydrolytických enzymů. Potenciál využití izolátu *Brevibacillus borstelensis* Bz tkví především v produkci xylanáz, kdy aktivita enzymu v médiu dosahovala $2,396 \pm 0,201$ g/l glukózy/24 hodin při 50 °C a tím převýšila i aktivitu komerční xylanázy.

6. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- 1 ROTHSCHILD, L. J. a R. L. MANCINELLI. Life in extreme environments. *Nature*. 2005, 409, 1092-1101.
- 2 STEINER, Walter a Joseph GOMES. The Biocatalytic Potential of Extremophiles and Extremozymes. *Food technology and biotechnology* [online]. University of Zagreb, 2004, **42**(4), 223-225 [cit. 2021-04-10]. ISSN 1330-9862. Dostupné z: <https://doaj.org/article/a87b2353968543149ac8f6e2b6e209b8>
- 3 URBIETA, M. Sofia, Edgardo R DONATI, Kok-gan CHAN, Saleha SHAHAR, Lee Li SIN a Kian Mau GOH. Thermophiles in the genomic era: Biodiversity, science, and applications. *Biotechnology advances* [online]. Elsevier, 2015, **33**(6), 633-647 [cit. 2021-7-1]. ISSN 0734-9750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2015.04.007
- 4 VERLINDEN, R. A. J., D. J. HILL, M. A. KENWARD, C. D. WILLIAMS a I. RADECKA. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology* [online]. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2007, **102**(6), 1437-1449 [cit. 2021-5-22]. ISSN 1364-5072. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x
- 5 WIRTH, Reinhard. Colonization of Black Smokers by Hyperthermophilic Microorganisms. *Trends in Microbiology*. 2018, **2017**, 92-99. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.11.002>.
- 6 MOHAMED, Faraj Edbeib, Abdul Wahab ROSWANIRA a Fahrul HUYOP. Halophiles: biology, adaptation, and their role in decontamination of hypersaline environments. *World J Microbiol Biotechnol*. **2016**. Dostupné z: doi:10.1007/s11274-016-2081-9
- 7 HORIKOSHI, Koki. Alkaliphiles. *Proceedings of the Japan Academy*. **2004**(80), 166-177.
- 8 JOHNSON, D. Barrie a Kevin B. HALLBERG. The microbiology of acidic mine waters. *Research in Microbiology*. 2003, (154), 466-473. Dostupné z: doi:10.1016/S0923-2508(03)00114-1
- 9 MIRETE, Salvador, Verónica MORGANTE a José Eduardo GONZÁLEZ-PASTOR. Acidophiles: Diversity and Mechanisms of Adaptation to Acidic Environments. STAN-LOTTER, Helga a Sergiu FENDRIHAN. *Adaptation of Microbial Life to Environmental Extremes*. Springer International Publishing, 2017, s. 228-245. ISBN 978-3-319-48325-2. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-48327-6_9
- 10 STETTER, Karl. Extremophiles and their adaptation to hot environments. *FEBS Letters*. 1999, **1999**, 22-25.
- 11 HORIKOSHI, Koki. *Extremophiles Handbook*. Tokyo: Springer, 2011, s. 414. ISBN 978-4-431-53897-4.

- 12 MORGENSTERN, Ingo, Justin POWLOWSKI, Nadeeza ISHMAEL, Corinne DARMOND, Sandrine MARQUETEAU, Marie-Claude MOISAN, Geneviève QUENNEVILLE a Adrian TSANG. A molecular phylogeny of thermophilic fungi. *Fungal Biology*. 2012, **2012**, 489-502. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2012.01.010>
- 13 TOLNER, Berend, Bert POOLMAN a Wil N. KONINGS. Adaptation of microorganisms and their transport systems to high temperatures. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*. 1998, **1997**, 423-428. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0300-9629\(97\)00003-0](https://doi.org/10.1016/S0300-9629(97)00003-0).
- 14 CHEN, Guo-Qiang a Xiao-Ran JIANG. Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*. **2018**(50), 94-100. Dostupné z: doi:10.1016/j.copbio.2017.11.016
- 15 AGUILAR, A. Extremophile research in the European Union: From fundamental aspects to industrial expectations. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. Blackwell Publishing, 1996, **18**(2-3), 89-92 [cit. 2021-01-29]. ISSN 01686445. Dostupné z: doi:10.1016/0168-6445(96)80462-1
- 16 SCHIRALDI, C a M DE ROSA. The production of biocatalysts and biomolecules from extremophiles. *Trends In Biotechnology* [online]. ELSEVIER SCIENCE LONDON, 2002, **20**(12), 515-521 [cit. 2021-01-29]. ISSN 0167-7799. Dostupné z: doi:10.1016/S0167-7799(02)02073-5
- 17 GURUNG, Neelam, Sumanta RAY, Sutapa BOSE a Vivek RAI. A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond. *BioMed Research International* [online]. Hindawi Publishing Corporation, 2013, **2013** [cit. 2021-04-10]. ISSN 2314-6133. Dostupné z: doi:10.1155/2013/329121
- 18 KOHLI, Isha, Naveen C. JOSHI, Swati MOHAPATRA a Ajit VARMA. Extremophile – An Adaptive Strategy for Extreme Conditions and Applications. *Current Genomics* [online]. Bentham Science Publishers, 2020, **21**(2), 96-110 [cit. 2021-02-15]. ISSN 1389-2029. Dostupné z: doi:10.2174/1389202921666200401105908
- 19 STRAUB, Ct, Ja COUNTS, Dmn NGUYEN, et al. Biotechnology of extremely thermophilic archaea. *Fems Microbiology Reviews* [online]. OXFORD UNIV PRESS, 2018, **42**(5), 543-578 [cit. 2021-02-15]. ISSN 0168-6445. Dostupné z: doi:10.1093/femsre/fuy012
- 20 HAN, Huawen, Zhenmin LING, Aman KHAN, Amanpreet Kaur VIRK, Saurabh KULSHRESTHA a Xiangkai LI. Improvements of thermophilic enzymes: From genetic modifications to applications. *Bioresource technology* [online]. Elsevier, 2019, **279**, 350-361 [cit. 2021-04-11]. ISSN 0960-8524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2019.01.087

- 21 BRAUNEGG, Gerhart, Gilles LEFEBVRE a Klaus F GENSER. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. *Journal of Biotechnology* [online]. Elsevier B.V, 1998, **65**(2–3), 127-161 [cit. 2021-5-22]. ISSN 0168-1656. Dostupné z: doi:10.1016/S0168-1656(98)00126-6
- 22 REDDY, C.S.K, R GHAI a V. C KALIA. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology* [online]. Elsevier, 2003, **87**(2), 137-146 [cit. 2021-5-22]. ISSN 0960-8524. Dostupné z: doi:10.1016/S0960-8524(02)00212-2
- 23 CHEN, Guo-qiang, Ivan HAJNAL, Hong WU, Li LV a Jianwen YE. Engineering Biosynthesis Mechanisms for Diversifying Polyhydroxyalkanoates. *Trends in biotechnology (Regular ed.)* [online]. Elsevier, 2015, **33**(10), 565-574 [cit. 2021-5-22]. ISSN 0167-7799. Dostupné z: doi:10.1016/j.tibtech.2015.07.007
- 24 BOURAOUI, Hanene, Imen BOUKARI, Jean Pierre TOUZEL, Michael O'DONOHUE a Mohamed MANAI. *Caldimonas hydrothermale* sp. nov., a novel thermophilic bacterium isolated from roman hot bath in south Tunisia. *Arch Microbiol.* **2010**, 485–491. Dostupné z: doi:10.1007/s00203-010-0576-6
- 25 TANG, Jia, Guiqin YANG, Junlin WEN, Zhen YU, Shungui ZHOU a Zhi LIU. *Bacillus thermophilum* sp. nov., isolated from a microbial fuel cell. *Arch Microbiol.* **2014**, 629–634. Dostupné z: doi:10.1007/s00203-014-1001-3
- 26 ZEIGLER, D.R. a J.B. PERKINS. The genus *Bacillus*. *Practical Handbook of Microbiology, Third Edition*. CRC Press, 2015, s. 429–466. ISBN 9781466587403. Dostupné z: doi:10.1201/b17871
- 27 ELBANNA, Khaled, Stefanie VAN TRAPPEN, Joris MERGAERT a Jean SWINGS. *Schlegelella thermodepolymerans* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic bacterium that degrades poly(3-hydroxybutyrate-co-3-mercaptopropionate). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* **2003**(53), 1165–1168. Dostupné z: doi:10.1099/ijs.0.02562-0
- 28 CHEN, Tien-lai, Yi-ju CHOU, Wen-ming CHEN, Bhagwath ARUN a Chiu-chung YOUNG. *Tepidimonas taiwanensis* sp. nov., a novel alkaline-protease-producing bacterium isolated from a hot spring. *Extremophiles* [online]. Tokyo: Springer-Verlag, 2006, **10**(1), 35–40 [cit. 2021-01-29]. ISSN 1431-0651. Dostupné z: doi:10.1007/s00792-005-0469-9
- 29 ENZYMES. *British Journal of Pharmacology* [online]. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2011, **164**(supplement s1), 279–324 [cit. 2020-03-26]. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2011.01649_9.x. ISSN 0007-1188.
- 30 VODRÁŽKA. *Biochemie*. Praha: Scientia, 1995, s. 48-49.
- 31 ATALAH, Joaquín, Paulina CÁCERES-MORENOA, Giannina ESPINAA a Jenny M. Blameya M. BLAMEYA. Thermophiles and the applications of their enzymes as new biocatalysts. *Bioresource Technology.* 2019, **2019**, 478-488.
- 32 STERNER, Rein a Wolfgang LIEBL. Thermophilic adaptation of proteins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology.* 2008, **2001**, 39-106. DOI: <https://doi.org/10.1080/20014091074174>.

- 33 VIEILLE, CLAIRE a GREGORY J. ZEIKUS. Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular Mechanisms for Thermostability. *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS*. **2001**(Vol. 65), 1–43. Dostupné z: doi:10.1128/MMBR.65.1.1–43.2001
- 34 MSARAH, M., I. IBRAHIM a W. S. AQMA. Enzyme activity screening of thermophilic bacteria isolated from Dusun Tua Hot Spring, Malaysia. 2018, 1-5. DOI: 10.1063/1.5027985. Dostupné také z: <https://aip.scitation.org/doi/abs/10.1063/1.5027985>
- 35 VODRÁŽKA, Zdeněk, Jan KÁŠ a Pavel RAUCH. *Enzymologie*. 3. přeprac. vyd. Praha: VŠCHT, 1998, 119-129 s. ISBN 80-7080-330-4.
- 36 RICHARDSON, Paul. The Determination and Use of Optimized Protease Substrates In Drug Discovery and Development. *Current Pharmaceutical Design* [online]. Bentham Science Publishers, 2002, **8**(28), 2559-2581 [cit. 2021-6-8]. ISSN 1381-6128. Dostupné z: doi:10.2174/1381612023392630
- 37 ARSALAN, Abdullah a Hina YOUNUS. Enzymes and nanoparticles: Modulation of enzymatic activity via nanoparticles. *International journal of biological macromolecules* [online]. Elsevier B.V, 2018, **118**(Pt B), 1833-1847 [cit. 2021-6-8]. ISSN 0141-8130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.07.030
- 38 SUN, Chaoqun, Xia ZHANG, Menghuan TANG, Li LIU, Ying SHI, Chunhong GAO, Bing LIAO a Huzhi ZHENG. New optical method for the determination of β -galactosidase and α -fetoprotein based on oxidase-like activity of fluorescein. *Talanta (Oxford)* [online]. Elsevier B.V, 2019, **194**, 164-170 [cit. 2021-6-8]. ISSN 0039-9140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2018.08.075
- 39 TELEGDY-KOVÁTS, L. MANOMETRIC METHODS. *Periodica Polytechnica. Chemical Engineering* [online]. Budapest: Periodica Polytechnica, Budapest University of Technology and Economics, 1957, **1**(3), 187-197 [cit. 2021-6-8]. ISSN 03245853. Dostupné z: <http://search.proquest.com/docview/1629703555/>
- 40 Hasnaa R. Temsaah, Ahmed F. Azmy, Mai Raslan, Amr E. Ahmed and Walaa G. Hozayen, Isolation and Characterization of Thermophilic Enzymes Producing Microorganisms for Potential Therapeutic and Industrial Use, *J Pure Appl Microbiol.*, 2018; 12(4):1687-1702. <http://dx.doi.org/10.22207/JPAM.12.4.02>
- 41 DAS, Amrita, Xikai CUI, Vasanta CHIVUKULA, Suri S IYER a Amrita DAS. Detection of Enzymes, Viruses, and Bacteria Using Glucose Meters. *Analytical chemistry* [online]. 2018, **90**(19), 11589-11598 [cit. 2021-04-10]. ISSN 00032700. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.8b02960
- 42 ALVES, Mp, Fa RAINEY, Mf NOBRE a Ms DA COSTA. *Thermomonas hydrothermalis* sp nov., a new slightly thermophilic gamma-proteobacterium isolated from a hot spring in Central Portugal. *Systematic And Applied Microbiology* [online]. URBAN & FISCHER VERLAG, 2003, **26**(1), 70-75 [cit. 2021-7-1]. ISSN 0723-2020.
- 43 KOUHOUNDE, Sonagnon Hermann Serge, Kifouli ADEOTI, Frank DELVIGNE, Aly SAVADOGO, Alfred S. TRAORE a Philippe THONART. The use of microorganisms of cassava retting for the production of pectinolytic enzymes [online]. 2014 [cit. 2021-7-22].

- 44 VISVANATHAN, Rizliya, Chathuni JAYATHILAKE, Ruvini LIYANAGE a Ramiah SIVAKANESAN. Applicability and reliability of the glucose oxidase method in assessing α -amylase activity. *Food chemistry* [online]. Elsevier, 2019, **275**, 265–272 [cit. 2021-7-8]. ISSN 0308-8146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2018.09.114
- 45 THITE, V. S. a A. S. NERURKAR. Physicochemical characterization of pectinase activity from *Bacillus* spp. and their accessory role in synergism with crude xylanase and commercial cellulase in enzyme cocktail mediated saccharification of agrowaste biomass. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2018, **124**(5), 1147–1163 [cit. 2021-7-8]. ISSN 1364-5072. Dostupné z: doi:10.1111/jam.13718
- 46 KÖNIG, Joachim, Roland GRASSER, Heather PIKOR a Kurt VOGEL. Determination of xylanase, β -glucanase, and cellulase activity. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2002, **374**(1), 80-87 [cit. 2021-7-8]. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-002-1379-7
- 47 OZTAS GULMUS EBRU. Characterization and biotechnological application of protease from thermophilic *Thermomonas haemolytica*. *Archives of Microbiology* [online]. Berlin: Springer Nature B.V, 2020, **202**(1), 153-159 [cit. 2021-7-22]. ISSN 03028933. Dostupné z: doi:10.1007/s00203-019-01728-7
- 48 YUNYI, Zhang, Li YONGXIN, Yang NA, et al. Histone controlled aggregation of tetraphenylethene probe: A new method for the detection of protease activity. *Sensors and Actuators B: Chemical*. **2018**(257), 1143–1149. Dostupné z: doi:10.1016/j.snb.2017.10.018
- 49 FARNET, A.M, L QASEMIAN, L GOUJARD, G GIL, D GUIRAL, F RUAUDEL a E FERRE. A modified method based on p-nitrophenol assay to quantify hydrolysis activities of lipases in litters. *Soil biology & biochemistry* [online]. Elsevier, 2010, **42**(2), 386-389 [cit. 2021-7-23]. ISSN 0038-0717. Dostupné z: doi:10.1016/j.soilbio.2009.11.015
- 50 HASAN, Fariha, Aamer Ali SHAH a Abdul HAMEED. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and microbial technology* [online]. Elsevier, 2006, **39**(2), 235–251 [cit. 2021-7-8]. ISSN 0141-0229. Dostupné z: doi:10.1016/j.enzmictec.2005.10.016

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ADP	Adenosindifosfát
ATP	Adenosintrifosfát
CCM	Czech Collection of Microorganisms
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DNS	Metoda s využitím dinitrosalicylové kyseliny
DSM	Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures
HIV	Human Immunodeficiency Virus
JCM	Japan Collection of Microorganisms - RIKEN BioResource Center
LMG	Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms - Bacteria collection
NAD	Nikotinamidadeninukleotid
NAD ⁺	Oxidovaná forma NAD
NADH	Redukovaná forma NAD
NB	Nutrient Broth
NGIB	Next generation industrial biotechnology (průmyslová biotechnologie nové generace)
PCR	Polymerázová řetězová reakce
pH	Vodíkový exponent
PHA	Polyhydroxyalkanoáty
RNA	Ribonukleová kyselina
rRNA	Ribosomální RNA