

**SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA
V NITRE
FAKULTA BIOTECHNOLÓGIE A POTRAVINÁRSTVA**

**Vplyv iónovej sily na produkciu peptidáz baktériami rodu
Bacillus.
(Diplomová práca)**

Študijný program: biotechnológie

Študijný odbor: 2908800 biotechnológie

Školiace pracovisko: Katedra biochémie a biotechnológie

Školiteľ: doc.RNDr. Urminská Dana, CSc.

Nitra, 2011

Ivana Kupčeková, Bc.

ČESTNÉ PREHLÁSENIE

Podpísaná Ivana Kupčeková vyhlasujem, že som diplomovú prácu na tému “Vplyv iónovej sily na produkciu peptidáz baktériami rodu *Bacillus*, vypracovala samostatne s použitím uvedenej literatúry.

Som si vedomá zákonných dôsledkov v prípade, ak uvedené údaje nie sú pravdivé.

V Nitre, 10. apríla 2011

.....

POĎAKOVANIE

Touto cestou chcem poďakovať mojej školiteľke doc. RNDr. Dane Urminskej, CSc., za odborné usmernenie, pripomienky a pomoc pri vypracovaní diplomovej práce.

ABSTRAKT

Rod *Bacillus* patrí medzi grampozitívne aeróbne paličky, najviac rozšírené v pôde, kde sa veľmi rýchlo rozmnožujú, produkujú rôzne metabolity a ich charakteristickým znakom je tvorba endospór. Jeho druhy majú bohaté enzýmové vybavenie, preto môžu rozkladať rôzne druhy organických zlúčenín.

Súčasnú klimatickú zmenu majú vplyv na zmenu koncentrácie látok v rôznych zložkách environmentu. Baktérie patria medzi mikroorganizmy, ktoré sa prirodzene vyskytujú v pôde, vo vodách a ako spóry aj v ovzduší. Zmenou iónovej sily pôd a vôd sa mení aj prirodzené prostredie pre ich rast.

Aj vplyvom ľudskej činnosti sa do pôdy dostáva množstvo kontaminantov, ktoré pôsobia na vývoj a aktivitu pôdnej mikroflóry. Je to predovšetkým aplikáciou agrochemikálií a zavlažovaním nevhodnou závlahovou vodou, pričom následkom odparovania tejto vlhkosti zostávajú v pôdnom profile rezíduá rôznych solí. Mikroorganizmy sa tak musia prispôbovať týmto zmeneným podmienkam.

Baktérie *Bacillus* sp. majú významné využitie v biotechnológiách ako producenti biologicky aktívnych látok, predovšetkým enzýmov a antibiotík. Sú zdrojom veľkého množstva rôznych extracelulárnych enzýmov, najmä amyláz, neutrálnych a alkalických peptidáz, ktoré majú rozsiahle priemyselné využitie, a to v potravinárstve, vo farmaceutickom a textilnom priemysle, v chemickom priemysle pri výrobe detergentov a v moderných technológiách kontroly a dekontaminácie životného prostredia.

Kľúčové slová: *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, iónová sila

ABSTRACT

The genus *Bacillus* belongs to the gram-positive aerobic rods, the most widespread in soil, where they reproduce rapidly, producing different metabolites and their main feature is the formation of endospores. Its species are equipped with high number of enzymes, which allows them to degrade various types of organic compounds.

The current climate changes are affecting the change of concentration agents in the different components of environment. Bacteria belong to the kind of microorganisms naturally occurring in soil, waters, as well as spores in the air. Changes in the ionic strength of soil and water are affecting their natural environment.

Human activity increases the amount of contaminants in the soil, which affects the development and activity of the soil microflora. It is mainly caused by application of agrochemicals and by irrigation of improper irrigation water and due to evaporation of moisture, residue profiles of different salts remain in the soil. Then microorganisms have to adapt to these changed conditions.

Bacillus sp. have important uses in biotechnology as the producers of biologically active substances, especially enzymes and antibiotics. They provide a large variety of extracellular enzymes, particularly amylases, neutral and alkaline peptidases, which have an extensive industrial use in food, pharmaceutical and textile industry, chemical industry in production of detergents, as well as in advanced control technologies and environmental decontamination.

Key words: *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, ionic strength

OBSAH

Úvod.....	7
1 PREHLAD O SÚČASNOM STAVE RIEŠENEJ PROBLEMATIKY.....	8
1.1 Mikrobiologická charakteristika baktérií.....	8
1.2 Taxonomické zatriedenie rodu <i>Bacillus</i>	9
1.3 Kultivácia bakteriálnych kmeňov rodu <i>Bacillus</i>	11
1.4 Charakteristika enzýmov.....	12
1.4.1 Charakteristika proteolytických enzýmov.....	14
1.5 Produkcia enzýmov rodom <i>Bacillus</i>	20
1.5.1 Stabilita proteolytických enzýmov.....	22
1.6 Faktory a prvky ovplyvňujúce rast a rozmnožovanie baktérií.....	23
1.7 Iónová sila.....	24
1.7.1 Koncentrácia solí v prostredí.....	25
2 CIEĽ PRÁCE.....	28
3 MATERIÁL A METODIKA.....	29
3.1 Kultivácia baktérií rodu <i>Bacillus</i>	29
3.2 Stanovenie výťažnostibiomasy.....	29
3.3 Stanovenie aktivity peptidáz.....	30
4 VÝSLEDKY A DISKUSIA.....	31
5 NÁVRH NA VYUŽITIE VÝSLEDKOV.....	38
6 ZÁVERY.....	39
7 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY.....	40

ÚVOD

Medzi komerčne najvyužívanejšie mikroorganizmy patria baktérie rodu *Bacillus*. Sú to významní producenti antibiotík bacitracín a polymyxín, ale aj ďalších biologicky aktívnych látok, predovšetkým extracelulárnych hydrolytických enzýmov. Preto sú tieto baktérie neustále predmetom záujmu mikrobiológov, biotechnológov a v poslednej dobe aj vedcov, ktorí sa zaoberajú ochranou životného prostredia.

Výroba a využitie enzýmov patrí k najrozšírenejším oblastiam aplikácie biotechnológií v poľnohospodárstve, potravinárstve, chemickom priemysle a v zdravotníctve. Najvýznamnejšími producentmi komerčne využívaných enzýmov sú baktérie rodu *Bacillus*. Enzýmy sú prirodzene sa vyskytujúce bielkoviny, ktoré umožňujú priebeh životných biochemických procesov a nachádzajú sa vo všetkých potravinárskych surovinách. Niektoré enzýmy vo forme potravinárskych vysoko purifikovaných prípravkov upravujú vlastnosti a kvalitu potravinárskych surovín napr. lepšiu chuť a vôňu, textúru a stráviteľnosť. Väčšina enzýmov sa používa v potravinárstve pri výrobe piva, vína, octu, sacharidov a v mliekárenstve, ďalej sa enzýmy využívajú pri výrobe pracích práškov, v garbiarstve a v textilnom priemysle a ako súčasť liečiv vo farmaceutickom priemysle.

Intenzívna priemyselná výroba a poľnohospodárstvo sú zdrojom kontaminantov a odpadov v pôdach, vodách a v ovzduší. V súčasnosti sa vytvárajúce klimatické zmeny môžu postupne viesť aj k zmene koncentrácií solí v prostredí a mikroorganizmy sa tak musia prispôsobovať týmto zmeneným podmienkam.

Detailné poznanie metabolizmu a životného cyklu *Bacillus* sp. však dovoľuje rozvíjať aj ďalšie využívanie týchto baktérií, a to v procese bioremediácie.

Remediačné technológie využívajú biologické postupy degradácie anorganických a organických látok, metabolickú aktivitu mikroorganizmov na odstraňovanie kontaminantov zo životného prostredia. Baktérie *Bacillus* sp. sú schopné transformovať kontaminanty na menej škodlivé alebo neškodné látky a produkcia extracelulárnych enzýmov môže byť indikátorom tolerancie týchto látok v prostredí.

1 PREHLAD O SÚČASNOM STAVE RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

1.1 Mikrobiologická charakteristika baktérií

V prírode sú veľmi rozšírené baktérie a nachádzame ich v rozličných prostrediach, ako je: pôda, voda, vzduch, organizmy. Patria sem rozmanité prokaryotické mikroorganizmy, z hľadiska tvaru a veľkosti, ktoré sú v Bergeyho systéme charakterizované ako jednobunkové prokaryotické organizmy alebo jednoduché spojenia podobných buniek založené na spôsobe rozmnožovania, rovinách delenia a separácii buniek (Števlíková et al., 2002).

Bunky baktérií sú obalené bunkovou stenou, ktorá je zložená z bielkovín, sacharidov, tukov a peptidov. Pevnú poréznu sieť vytvárajú polymérne sacharidy, na ktorú sú kovalentne napojené bielkoviny a peptidy, čím vytvárajú peptidylglykánovú štruktúru. 40-90 % sušiny bunkovej steny tvorí táto štruktúra. Bunková stena dodáva bunke tvar a umožňuje jej vydržať vysoký osmotický tlak. Okrem peptidglykánovej kostry sú v stene prítomné aj iné polymérne látky (polysacharidy, kyselina teichová, polypeptidy a bielkoviny), ktorých obsah tvorí 50 % v prepočte na sušinu (Števlíková – Kačániová, 2005).

U baktérií sa vytvára slizový obal (kapsula) polypeptidovej alebo polysacharidovej povahy, na povrchu buniek, ktorý ochraňuje bunky pred nepriaznivými vplyvmi.

Jadrový materiál je umiestnený v cytoplazmatickom priestore, zložený z DNA, ktorý je obklopený asi 20 až 30 tisícami ribozómov. Okrem veľkej molekuly chromozómovej DNA taktiež bakteriálne bunky obsahujú omnoho menšie, v cytoplazme rozptýlené kruhové molekuly DNA, nazývané plazmidy. Cytoplazmatický priestor je zložený z rôznych inklúzií ako rezervných látok (amylopektín, polyhydroxybutyrát, škrobové granule, polyfosfáty, vosky CaCO_3 , glykogén, n-alkány a iné). Okrem toho tiež obsahujú aj látky sekundárneho látkového metabolizmu, ktoré sú zastúpené hlavne antibiotikami. Kvalita mikrobiálnej biomasy vyplýva aj z látkového a prvkového zloženia mikrobiálnej bunky (Tab. 1) a takisto aj požiadavky na minerálne látky, ale i rozsah metabolickej aktivity. (Michalík et al., 1999).

Prehľad prvkového a látkového zloženia v bakteriálnej bunke

(Michalík et al., 1999)

Tabuľka 1

Organické zlúčeniny	% v prepočte na sušinu	Prvkové zloženie	% v prepočte na sušinu
bielkoviny	60	C	50
nukleové kyseliny	19	O	20
- DNA	3	N	15
- RNA	6	H	8
tuky	15	P	3
polysacharidy	3	S	1

1.2 Taxonomické zatriedenie rodu *Bacillus*

RÍŠA (REGNUM): Monera

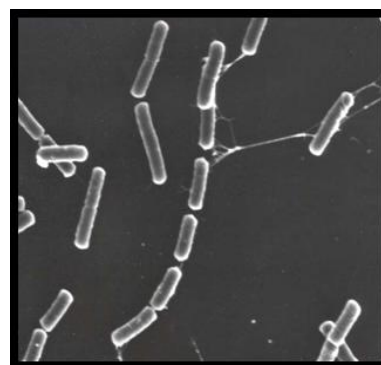
ODDELENIE (DIVISIO): Firmicutes

TRIEDA (CLASSIC): Firmibacteria

SKUPINA (GROUP): 18. skupina grampozitívne paličky a koky tvoriace spóry

ROD (GENUS): *Bacillus*

Druhy *Bacillus* väčšinou tvoria grampozitívne spórotvorné aeróbne paličky (Obr. 1). Sú to najviac rozšírené pôdne mikroorganizmy, ktoré sa rozmnožujú veľmi rýchlo, intenzívne produkujú rôzne metabolity, najmä rôzne organické kyseliny. Ich izolácia a kultivácia nie je zložitá, sú flexibilné a prístupné umelým zásahom, ktoré môžu meniť ich vlastnosti.



Obrázok 1
Bacillus subtilis (<http> 1)

Zúčastňujú roznych procesov, ako transformácie silikátových minerálov, anorganických aj organických materiálov a tvorby nových sekundárnych ložísk, čo dáva predpoklady pre ich praktické využitie v predpríprave nerastných surovín a spracovaní odpadov v priemysle (Štyriaková, 2000).

Tvorba endospór je spoločným znakom baktérií rodu *Bacillus*, ktorá je ľahko mikroskopicky viditeľná a poskytuje jednoduchú identifikáciu pre čeľaď *Bacillaceae*. V rámci tejto čeľade bol zavedený rod *Bacillus*. Tento rod zahŕňa druhy, ktoré sú pre človeka a zvieratá patogénne, ale aj druhy, ktoré sú v aplikovanej mikrobiológii veľmi významné. Niektoré baktérie, ako sú *Bacillus licheniformis* alebo *Bacillus cereus*, sú fakultatívne anaeróby (Števlíková – Kačániová, 2005). Väčšina druhov tohto rodu je nepatogénnych, *Bacillus anthracis* tvorí výnimku, čiastočne *Bacillus cereus* a skupina druhov patogénnych pre hmyz, ako sú *Bacillus pupillae* a *Bacillus thuringiensis*.

Vďaka neprítomnosti vonkajšej membrány u Gram-pozitívnych baktérií dokážu zástupcovia tohto druhu vylučovať veľké množstvo extracelulárnych proteínov priamo do živného média (Humphery-Smith, Hecker, 2006).

Bacillus subtilis je pôdny mikroorganizmus, často izolovaný aj z vody, vzduchu a z rozkladajúcich sa zvyškov rastlín. Uvedené prostredie obsahuje široké spektrum rôznych uhlíkatých substrátov, vrátane veľkého množstva polysacharidov pochádzajúcich z rastlín, zvierat a mikroorganizmov. *Bacillus subtilis* produkuje veľké množstvo glykolytických enzýmov, napr. α -amylázy, pullulázy, endo- β -1,4-manázu, levanózu, glukán-1,4- α -maltohydrolázu, pektátlyázy a endo-1,4- β -xylanázy, ktoré sú vylučované do bezprostredného okolia buniek (Sonenshein et al., 2002). Okrem týchto enzýmov *Bacillus subtilis* produkuje aj proteolytické enzýmy, a je tak vhodným organizmom pre výrobu čistých biochemikálií, nukleotidov, vitamínov a aminokyselín (Waites et al., 2005).

Väčšina druhov má veľmi aktívne amylolytické enzýmy, ktoré rozkladajú škrob, mnoho druhov má pektolytické enzýmy, ktoré štiepia rastlinné pektíny a väčšina druhov má veľmi aktívne proteolytické enzýmy, takže sa uplatňuje pri aeróbnom a anaeróbnom rozklade bielkovín. Množstvo druhov produkuje antibiotiká peptidovej povahy, z ktorých niektoré sa pomocou týchto baktérií vyrábajú priemyselne (Števlíková – Kačániová, 2005).

Bacillus licheniformis je možné aplikovať aj ako expresný systém pre markérové gény, pretože výsledné rekombinované druhy môžu byť využívané napr. pri rýchlej a efektívnej detekcii rastových podmienok vhodných pre veľkopriemyslovú výrobu, alebo pri *in situ* detekcii druhov v prírode (Tamagnini et al., 2008).

1.3 Kultivácia bakteriálnych kmeňov rodu *Bacillus*

Pri jednorázovej aj kontinuálnej hĺbkovej submerznej kultivácii bunky baktérií rastú v kvapalnom médiu. Väčšina druhov *Bacillus* je schopná rásť na/v relatívne jednoduchom živnom médiu (Todar, 2009). Pri jednorázovej kultivácii sa bakteriálne kmene naočkujú do sterilnej živnej pôdy, v ktorej bunky rastú, rozmnožujú sa a súčasne sa spotrebávajú živiny z média. Sacharidy sú všeobecne výborným zdrojom uhlíka a energie, najmä glukóza, ktorá je významným substrátom väčšiny mikroorganizmov (Waites et al., 2005).

V procese rastu bakteriálnej kultúry sa podmienky kultivácie postupne s časom menia. Homogenita prostredia a dostatok kyslíka v celom objeme živnej pôdy sa zabezpečí nepretržitým premiešavaním. V dôsledku intenzívneho rastu a rozmnožovania baktérií dochádza ku akumulácii metabolitov a mikrobiálnej biomasy. Proces rastu ovplyvňujú kultivačné podmienky ako zloženie živnej pôdy, aerácia, teplota, pH a sterilita prostredia (Michalík, 1999).

Základným, limitujúcim faktorom kultivácie aeróbnych mikroorganizmov je kyslík. Rast buniek závisí od množstva kyslíka rozpusteného v médiu, ale jeho rozpustnosť klesá so zvyšujúcou sa teplotou a zvyšujúcou sa koncentráciou média. V bioreaktore sa potrebná koncentrácia kyslíka v médiu zabezpečí intenzívnou aeráciou za zvýšeného tlaku. Pri kultivácii mikroorganizmov v malom objeme živnej pôdy je pridávanie vzduchu formou aerácie hladiny pri intenzívnom premiešavaní dostatočné pre zabezpečenie potrebnej koncentrácie kyslíka v celom objeme živnej pôdy. Mikrobiálne bunky si čerpajú kyslík zo vzduchu, ktorý prechádza cez bakteriologickú zátku a je rozmiešaný v médiu (Michalík, 1999).

Dôležitou podmienkou kultivácie mikroorganizmov je zabezpečenie teploty optimálnej pre rast daných buniek a pH živnej pôdy. Koncentrácia H^+ ovplyvňuje aktivitu enzýmov, funkciu cytoplazmatickej membrány a transport látok. Každý mikroorganizmus si pre svoju existenciu vyžaduje určité pH prostredia. Bunky svojím metabolizmom a produkciou extracelulárnych metabolitov často menia pH živnej pôdy.

Táto zmena môže limitovať ich rast, a preto sa počas kultivácie pH média kontroluje a reguluje.

V priemyselnej výrobe sa ako zdroje uhlíka často používajú glukóza, hydrolyzovaný škrob, laktóza, sušená srvátka, škrob (jačmenný, arašidová múka, ovsená múka, ražná múka, sójová múka), sacharóza alebo melasa (Smith, 2004). Zdrojmi dusíka môžu byť anorganické amónne soli a dusičnany, močovina alebo komplexné suroviny ako jačmenná múka, repná melasa, kukuričný výluh, arašidová múka, ovsená múka, bavlníková múka, ražná múka, sójová múka, sušená srvátka (Smith, 2004). Vodík a kyslík môžu byť zabezpečené z vody a organických zlúčenín. Fosfor je prístupný v anorganickej forme a síra je pridávaná vo forme sulfidových a síranových solí, alebo ako súčasť komplexných surovín obsahujúcich sírne aminokyseliny (Waites et al., 2005).

1.4 Charakteristika enzýmov

Enzýmy sú látky, ktoré pôsobia ako katalyzátory, teda urýchľujú biochemické reakcie. Pracujú ako ostatné katalyzátory, lišia sa len v niektorých aspektoch, ako je napr. ich vysoká účinnosť, umožnenie reakcie i za miernych podmienok (nízka teplota, neutrálne pH, apod.) a ľahká regulovateľnosť, čo je pre život za meniacich sa podmienok okolia dôležité. Medzi enzýmom a premieňajúcou sa látkou (substrátom) dôjde k vytvoreniu jedného alebo niekoľkých prechodných stavov. Jedna reakcia sa tak rozdelí na niekoľko postupne menších, s nižšou hodnotou aktivačnej energie, čo je pre organizmus uskutočniteľné (Ledvina et al., 2005).

Z chemického hľadiska enzýmy patria medzi jednoduché alebo zložité bielkoviny. Enzýmy jednozložkové dvojkomponentné sú zložené z bielkoviny (apoenzým) a nebielkovinovej zložky (koenzým alebo prostetická skupina). Apoenzým spolu s koenzýmom vytvára holoenzým (Michalík et al., 1999). Koenzým zodpovedá za účinkovú špecifitu - navedenie enzýmového systému na príslušný substrát. Substrát sa viaže len na určité miesto na povrchu molekuly enzýmu. Toto miesto sa nazýva aktívne alebo katalytické centrum.

Enzýmy sa nachádzajú vo všetkých živých systémoch. Najjednoduchšie bunky obsahujú okolo 3000 enzýmov, ktoré riadia rýchlosť prakticky všetkých reakcií, ktoré v nich prebiehajú. Počet enzýmov sa odhaduje na miliardy. Enzýmy popri urýchľovaní reakcií neovplyvňujú zloženie rovnovážnej zmesi, rýchlosť reakcie sa zvyšuje oboma

smermi. Smer priebehu reakcie nie je ovplyvňovaný katalyzátorom, ale je daný energetickými a koncentračnými pomermi v reagujúcom systéme (Elliott – Elliott, 2009).

Enzýmové reakcie sa uskutočňujú v určitom reakčnom prostredí, preto ich budú ovplyvňovať najmä fyzikálno - chemické parametre tohto prostredia. Určité faktory pôsobia aktivačne a iné inhibične. Medzi najdôležitejšie faktory ovplyvňujúce rýchlosť enzýmovej reakcie patria: koncentrácia substrátu, množstvo enzýmu, pH, teplota, koncentrácia iónov, redox potenciál, aktivátory a inhibítory.

Ťažké kovy sú v nízkych koncentráciách esenciálnymi prvkami a sú aktivátormi enzýmových reakcií, ale pri vyšších koncentráciách pôsobia ako inhibítory, ktoré vyvolávajú neodstrániteľné, ireverzibilné zmeny v molekule enzýmu.

Podľa typu katalyzovanej reakcie zaradila Komisia pre enzýmy Medzinárodnej biochemickej spoločnosti enzýmy do nasledovných tried a podtried:

Trieda 1. Oxidoreduktázy – katalyzujú oxidoredukčné reakcie a úlohu akceptora vodíka a elektrónov vykonáva NAD^+ , NADP^+ , FAD , FMN , O_2 , cytochrómy a pod. Enzýmy 1. triedy sa delia na 17 podtried.

Trieda 2. Transferázy – enzýmy, ktoré katalyzujú prenos atómov a molekúl. V závislosti od toho akú látku prenášajú sa delia na 8 podtried.

Trieda 3. Hydrolázy – katalyzujú reakcie hydrolýzy (ale i syntézy) zložitých organických zlúčenín za priamej účasti vody. Delia sa na 11 podtried.

Trieda 4. Lyázy – katalyzujú nehydrolytické štiepenie látok alebo ich syntézu. Tieto enzýmy sa delia na 7 podtried.

Trieda 5. Izomerázy – katalyzujú vnútromolekulárne premeny substrátových molekúl. Do tejto triedy enzýmov patrí 6 podtried.

Trieda 6. Ligázy – katalyzujú syntézu zložitých organických zlúčenín z jednoduchých zlúčenín za spotreby energie vo forme ATP alebo iných makroergických zlúčenín. Delia sa na 5 podtried.

1.4.1 Charakteristika proteolytických enzýmov

Proteolytické enzýmy - peptidázy tvoria súčasť 3. triedy enzýmov, t. j. hydroláz a katalyzujú štiepenie peptidových väzieb rôznych bielkovín. Rýchlosť a špecifita štiepenia peptidových väzieb závisí od aktivity enzýmu a zároveň od aktuálnej štruktúry polypeptidového substrátu (Škárka – Ferenčík, 1992).

Tieto enzýmy majú významnú úlohu vo fyziologických procesoch organizmov a v súčasnosti patria do jednej z troch najrozšírenejších komerčne využívaných skupín enzýmov. Predstavujú 60 % svetového predaja enzýmov. Enzýmy môžu byť získavané viacerými spôsobmi, napríklad extrakciou z rastlinných či živočíšnych zdrojov, alebo produkciou mikroorganizmami (Sondergaard et al., 2005), pričom každá skupina enzýmov vykazuje určité špecifiká.

Peptidázy sa klasifikujú na základe rôznych kritérií:

1. podľa pôvodu (rastlinné, živočíšne, mikrobiálne),
2. podľa ich lokalizácie (intracelulárne, extracelulárne),
3. podľa optimálneho pH (kyslé, neutrálné, alkalické) (Hrčková et al., 2004).

Peptidázy sú prítomné prakticky vo všetkých živých bunkách a navyše sú vylučované aj do vonkajšieho prostredia, resp. do tráviaceho systému vyšších organizmov. Všeobecne sú známe ich rôzne regulačné funkcie v intermediárnom metabolizme (limitovaná proteolýza, účasť pri zrážaní krvi, aktivácia tráviacich enzýmov, aktivity pri rôznych obranných mechanizmoch atď.). Okrem toho sú známe aj ich rozsiahle praktické aplikácie vo forme enzýmových preparátov v priemyselnej praxi (biodetergenty, produkcia syrov, spracovanie kože, produkcia hydrolyzátovej bielkovín, stabilizácia piva a i.), v medicíne a farmácii (preparáty zlepšujúce trávenie, čistenie kontaktných šošoviek, využívanie pre terapeutický zásah), v kozmetike (keratolytické zmäkčujúce prípravky, pleťové peelingové masky), v bežnej laboratórnej praxi a v rámci experimentálnej vedecko-výskumnej činnosti. Proteolytické enzýmy významne ovplyvňujú nutričné, sensorické, textúrové a iné vlastnosti potravinárskych surovín a výrobkov. Množstvo a typ peptidových väzieb, ktoré môže peptidáza štiepiť je závislé na tom, z ktorých aminokyselín sa proteín skladá a ktoré sú navzájom priláhlé (Hrčková et al., 2004). Špecifita peptidáz nezávisí na dĺžke reťazca, ale na povahe

aminokyselín a na prítomnosti alebo neprítomnosti blízkyh nabitých skupín (Beyon - Bond, 2001).

Exopeptidázy (EC 3.4.11 – 19) štiepia bielkoviny od koncov polypeptidového reťazca. Podľa toho na ktorý koniec pôsobia sa rozdeľujú na:

1. aminopeptidázy (EC 3.4.11) - odštiepujú N-koncovú aminokyselinu,
2. karboxypeptidázy (EC 3.4.16 - 18) a peptidyl-dipeptidázy (EC 3.4.15) - odštiepujú koncovú aminokyselinu z C-konca,
3. dipeptidylpeptidázy a tripeptidylpeptidázy (EC 3.4.14) - odštiepujú koncové dipeptidy a tripeptidy,
4. dipeptidázy (EC 3.4.13) - hydrolyzujú dipeptidy,
5. omegapeptidázy (EC 3.4.19) - odštiepuje substituované, cyklizované alebo izopeptidovými väzbami spájané zvyšky (Hrčková et al., 2004; Urminská et al., 2006).

Aminopeptidázy (EC 3.4.11.) sa nachádzajú v prokaryotických aj eukaryotických bunkách v mnohých subcelulárnych organelách, sú zložkami proteínov membrán a cytosólu. Väčšina aminopeptidáz sú metaloproteíny zinku (Stano - Fiordemondo, 2007). V metabolizme bielkovín majú okrem pôsobenia na N-konce peptidov, aj viaceré špecifické funkcie, ako napríklad aktiváciu a inaktiváciu biologicky aktívnych bielkovín alebo odstránenie N-koncového metionínu z novosyntetizovaných proteínov. Metionyl aminopeptidáza 1, Aminopeptidáza Y a Aminopeptidáza I sú aminopeptidázy izolované zo *Saccharomyces cerevisiae*. Aminopeptidáza Y vyžaduje pre svoju aktivitu prítomnosť iónov Co^{2+} a je inhibovaná prítomnosťou iónov Zn^{2+} a Mn^{2+} . PepA aminopeptidáza izolovaná z *Escherichia coli* vykazuje preferenciu pre leucín alebo metionín a potrebuje pre svoju aktivitu prítomnosť zinku (Minh et al., 2009). Arima et al. (2008) purifikovali aminopeptidázu P z *Streptomyces costaricanus*. Enzým vykazoval širokú substrátovú špecifitu a preferenciu pre ióny Zn^{2+} . Dipeptid-peptidázy (EC 3.4.13.) a tripeptidyl-peptidázy (EC 3.4.14.) hydrolyzujú dipeptidy a tripeptidy na príslušné aminokyseliny.

Karboxypeptidázy (EC 3.4.16.-18.) a peptidyl-dipeptidázy (EC 3.4.15.) odštiepujú koncovú aminokyselinu z C-konca polypeptidového reťazca (Polaina et al., 2007). Na základe charakteru aminokyselinových zvyškov v aktívnom mieste enzýmu sa delia do troch skupín: karboxypeptidázy serínového typu (EC 3.4.16.) sú izolované z *Penicillium*

spp., *Saccharomyces* spp. a *Aspergillus* spp. Majú podobnú substrátovú špecifitu, ale vykazujú rôznorodosť v oblasti pH optima, stability, molekulárnej hmotnosti a efektu inhibítorov. Metalokarboxypeptidázy (EC 3.4.17.) sú izolované z rodov *Saccharomyces* a *Pseudomonas* a vyžadujú pre svoju aktivitu ióny Zn^{2+} a Co^{2+} . Omegapeptidázy (EC 3.4.19.) katalyzujú hydrolýzu koncových zvyškov substituovaných, cyklizovaných alebo izopeptidovými väzbami spájaných aminokyselín (Rao et al., 1998). Galvao et al. (2009) využili karboxypeptidázu A na odstránenie fenylalanínu z hydrolyzáta srvátkového proteínu, čím dosiahli možné využitie srvátkového hydrolyzáta pre ľudí trpiacich fenylketonúriou.

Endopeptidázy (EC 3.4.21 - 24 a EC 3.4.99) hydrolyzujú peptidové väzby vo vnútri polypeptidového reťazca. Podľa štruktúry katalytického miesta sa rozdeľujú na:

1. serínové peptidázy (EC 3.4.21),
2. cysteínové (tiolové) peptidázy (EC 3.4.22),
3. aspartátové (karboxylové) peptidázy (EC 3.4.23),
4. metalopeptidázy (EC 3.4.24),
5. treonínové peptidázy (EC 3.4.25),
6. zatiaľ neklasifikované peptidázy (EC 3.4.99) (Škárka - Ferenčík, 1987; Hřčková et al., 2004; Urmínská et al., 2006).

Serínové peptidázy tvoria veľmi významnú skupinu enzýmov, či už z hľadiska potravinárskeho alebo farmakologického. Zúčastňujú sa širokej škály fyziologických procesov organizmu, vrátane trávenia, hemostázy a imunitnej odpovede (Zakharova et al., 2009). Majú širokú substrátovú špecifitu a ich katalytické centrum je tvorené serínovým zvyškom s voľnou hydroxylovou skupinou. Sú najrozšírenejšou skupinou proteolytických enzýmov mikroorganizmov a živočíchov (Cera, 2009). Serínové peptidázy sú aktívne pri neutrálnom a alkalickom pH s optimom medzi hodnotami 7 - 11. Majú širokú substrátovú špecifitu a vyznačujú sa aj esterolytickou aktivitou. Sú to enzýmy s molekulovou hmotnosťou 18,5 - 35 kDa (Vodrážka et al., 1998).

Najviac preštudovanými *Ser-peptidázami* sú tráviace enzýmy trypsín a chymotrypsín. Trypsín (EC 3.4.21.4) je peptidáza živočíšneho pôvodu, produkovaná v pankrease. Štiepi polypeptidový reťazec len v miestach, kde sa v peptidovej väzbe viaže karboxylová skupina arginínu alebo lyzínu, pri optimálnom pH 7 - 9 (Ferenčík et al., 2000). Trypsín sa spolu s chymotrypsínom využívajú na úpravu špeciálnych

bielkovín pre prípravu hypoalergénnych diét (Bonomi et al., 2000), napr. na prípravu hydrolyzátov srvátkových proteínov (Mota et al., 2006). Kyung-Koh et al. (2008) sledovali hydrolytické účinky trypsínu na pšeničný lepok a zistili, že produkt obsahoval zvýšené množstva nízkomolekulárnych peptidových frakcií.

Chymotrypsín (EC 3.4.21.1) vzniká v tenkom čreve živočíchov a štiepi substrát na miestach, kde sa na tvorbe peptidovej väzby zúčastňuje karboxylová skupina aromatických aminokyselín (tyrozín, fenylalanín) alebo aminokyselín s veľkým nepolárnym reťazcom (metionín, leucín, tryptofán) (Lieberman – Marks, 2009).

Chymotrypsín je inaktivovaný pankreatickým trypsínovým inhibítorom, ale za účinku Ca^{2+} katiónov je tento proces spomaľovaný (Fioretti et al., 1994). Chymotrypsín sa používa ako súčasť liekov pri liečení podliatin, zlomenín a rán. Castillo-Yáñez et al. (2006) izolovali chymotrypsín z tráviacej sústavy sardiniek, ktorý sa môže využiť ako biotechnologický preparát pre využitie odpadu v priemysle spracovania rýb, ako materiálu pre produkciu kvalitného bielkovinového hydrolyzátu.

Mikrobiálne serínové peptidázy môžu byť rozdelené na:

a) Trypsínu podobné peptidázy, ktoré prednostne štiepia peptidové väzby tvorené zásaditými aminokyselinami a ich optimálne pH je 8. Na ich získavanie sa prevažne využíva produkcia baktériami rodu *Streptomyces* (Fuhong et al., 2010).

b) Alkalické peptidázy, ktoré majú najvyššiu aktivitu pri pH 10 a ich producentmi sú baktérie rodu *Bacillus*, mikroskopické huby *Aspergillus* sp., *Neurospora crassa* a kvasinky *Sacharomyces cerevisiae*. Veľmi často využívanou alkalickou proteázou je „Subtilizín“ produkovaný baktériou *Bacillus licheniformis* (Potumarthi et al., 2007).

c) Myxobacter alfa-lytické Ser-peptidázy sú produkované rodom *Sorangium* a vykazujú silnú lytickú aktivitu voči mnohým pôdnym baktériám. Sú špecifické na štiepenie väzieb obsahujúcich karboxylové skupiny neutrálnych alifatických aminokyselín. Do tejto podtriedy patrí aj enzým elastáza (Hrčková et al., 2004).

d) Stafylokokové peptidázy, ktoré produkuje napr. *Staphylococcus aureus* (Popowicz et al., 2006). Pôsobia špecificky na väzby kyslých aminokyselín pri pomerne širokom pH optime 4,0 – 7,8 (Urminská et al., 2006).

Cysteínové peptidázy majú aktívne centrum tvorené trojicou aminokyselín cysteín, histidín a glutamín (Wagstaff et al., 2002). Obsahujú tiolovú skupinu –SH v katalytickom centre a ich aktivitu inhibujú látky, ktoré sa viažu s touto skupinou.

Aktívne centrum musí obsahovať aj zvyšok histidínu (Urminská et al., 2006). Patria se rastlinné enzýmy papaín, ficín, bromelaín, kaspázy a rôzne iné enzýmy mikrobiálneho pôvodu.

V potrvinárstve má významné využitie papaín (EC 3.4.22.2), ktorý získava sa zo zelených, nezrelých plodov papáje *Carica papaya*. Okrem peptidových väzieb hydrolyzuje aj esterové a amidové väzby a účinkom pripomína chymotrypsín, ale pôsobí v neutrálnom pH. V potravinárstve sa používa pri tenderizácii mäsa a mäsových produktov a na prípravu proteínových hydrolyzátov, ďalej sa využíva pri čírení piva, v menšej miere v cukrovinkárstve a v mliekarenstve pri výrobe syrov (James – Simpson, 1996). V praxi sa papaín aplikuje aj v pečivárňach, a to pri výrobe pečív z cicerovej múky pre potrebu bezlepkovej diéty.

Ficín (EC 3.4.22.3) sa získava z latexu stromu *Ficus glabatra* a *Ficus carica*. Tieto zelené figy o hmotnosti 10 až 15 g obsahujú 100 – 150 mg enzýmu. Ficín sa používa na stabilizáciu piva a hydrolýzu rôznych bielkovín (Vodrážka et al., 1998).

Bromelaín je to pomenovanie skupiny enzýmov, objavených v rôznych druhoch čeľade *Bromeliaceae*, najviac je využívaný ananás. Gautam et al. (2010) porovnávali množstvo a aktivitu bromelaínu prítomného v stonke a v plode ananásu (*Ananas Comosus*). Zistili, že bromelaín v stonke vykazuje lepšiu enzymatickú aktivitu ako bromelaín v plode. Bromelaín má široké využitie pri hydrolýze väčšiny rozpustných proteínov, napr. pri výrobe napolitánok a oblátiek. Významné využitie má aj vo farmácií, kde bol dokázaný jeho protizápalový, protizrážací a fibrinolytický účinok (Maurer, 2001).

Mikrobiálne cysteínové peptidázy sa podľa ich producenta delia na dve skupiny:

- a) clostripaínové peptidázy – ich producentom je *Clostridium histolyticum*. Tieto enzýmy štiepia peptidové väzby bázických aminokyselín (Urminská, 1997).
- b) streptokokové peptidázy – sú produkované baktériami *Streptococcus sp.* ako zymogény, ktoré sa autokatalyticky premieňajú na aktívne enzýmy. Tieto enzýmy majú širokú substrátovú špecifitu (Hrčková et al., 2004).

Aspartátové peptidázy sa označujú aj ako karboxylové endopeptidázy, pretože majú v katalytickom mieste dve karboxylové skupiny, ktoré sú súčasťou kyseliny asparágovej. Medzi živočíšne aspartátové peptidázy patrí hlavne pepsín, gastrín a chymozín.

Pepsín sa nachádza v žalúdočnej šťave stavovcov a vytvára sa z pepsinogénu A. Hydrolyzuje peptidové väzby, ktoré tvoria hydrofóbne, predovšetkým aromatické zvyšky aminokyselín (Kageyama et al., 2009). K aspartátovým peptidázam ďalej patria extracelulárne peptidázy rastlín a mikroorganizmov, katepsíny D a E, ktoré patria medzi intracelulárne peptidázy a renín. Renín má optimálne pH v neutrálnej oblasti, a tým sa odlišuje od ostatných karboxylových peptidáz (Urminská et al., 2006).

Mikrobiálne aspartátové peptidázy sa rozdeľujú na:

- a) aspartátové peptidázy pepsínového typu, ktoré produkujú mikroorganizmy rodov *Aspergillus* (Wang et al., 2008), *Penicillium*, *Rhizopus* (Kumar et al., 2005), *Trametes* a *Neurospora crassa*.
- b) aspartátové peptidázy renínového typu – produkujú ich rôzne mikroorganizmy, *Endothia parasitica*, *Mucor sp.* a *Aspergillus candidus* (Rao et al., 1998). V humánnej medicíne sa skúmajú aspartátové peptidázy, ktoré sú produkované kvasinkami *Candida albicans* a *Candida tropicalis*, a považujú sa za vážny faktor virulencie vírusu HIV (Hidalgo – Vazques, 2010).

Metalopeptidázy majú v prostetickej skupine prítomný ión kovu, zvyčajne zinku, ktorý môže byť v niektorých prípadoch nahradený aj iným prechodným kovom. Metalopeptidázy prednostne katalyzujú hydrolýzu peptidov s hydrofóbnymi postrannými reťazcami, obsahujúcimi napr. fenylalanín a leucín. Vykazujú veľmi slabú esterázovú aktivitu (Urminská et al., 2006).

Z potravinárskeho hľadiska sú najznámejšie metalopeptidázy produkované baktériami a mikroskopickými hubami, obsahujúce vo svojej molekule zinok, ktorý je nevyhnutný pre ich aktivitu. Vápnik je potrebný najmä na stabilizáciu ich proteínovej štruktúry (Hrčková et al., 2004).

Mikrobiálne metalopeptidázy sa delia na:

- a) kyslé metalopeptidázy,
- b) neutrálne metalopeptidázy,
- c) alkalické metalopeptidázy,
- d) Myxobacter peptidáza I,
- e) Myxobacter peptidáza II.

Medzi kyslé metalopeptidázy sa zaraďujú najmä peptidázy *Penicillium caseicolum*, *P. roqueforti*, *Aspergillus sojae* a *A. oryzae*. Neutrálne metalopeptidázy sú špecifické voči hydrofóbnym a objemným aminokyselinovým zvyškom. Neutrálne proteázy typu *Aspergillus sp.* sa v potravinárstve používajú na odstraňovanie horkej chuti hydrolyzáto (Hrčková et al., 2004). Najznámejšou neutrálnou metalopeptidázou je termolizín produkovaný baktériou *Bacillus thermoproteolyticus* (Grandi et al., 2009). Je stabilný do 80 °C. Jeho molekula obsahuje zinok, ktorý je viazaný dvoma zvyškami histidínu a jedným glutamátovým zvyškom. V štruktúre sa nachádzajú aj 4 atómy vápnika, ktoré sú zodpovedné za termostabilitu enzýmu (Hrčková et al., 2004). Alkalické peptidázy sú produkované baktériami *Pseudomonas aeruginosa* a *Serratia marcescens*. Myxobacter peptidáza I špecificky pôsobí na malé aminokyselinové zvyšky na oboch koncoch štiepeného polypeptidového reťazca. Táto peptidáza je schopná lyzovať bunkové steny *Arthrobacter crystallopoites* a iných grampozitívnych baktérií. Myxobacter-peptidáza II je enzým špecifický pre hydrolýzu lyzínových zvyškov na N-konci štiepeného reťazca. Nemá schopnosť lyzovať bakteriálne bunky (Kalitz, 1988; Hrčková et al., 2004).

Všeobecne sú najrozšírenejším zdrojom industriálnych enzýmov mikroorganizmy (Ibrahim, 2008). Výhodou ich využívania je rýchly rast, široké spektrum produkovaných enzýmov a možnosti génových manipulácií s cieľom zvýšenia, alebo urýchlenia produkcie. Väčšina priemyselných enzýmov je produkovaných relatívne malým počtom rodov mikroorganizmov, z húb sú najviac využívané rody *Aspergillus*, *Trichoderma* a *Streptomyces* a z baktérií rody *Bacillus* (Leisola et al., 2010).

1.5 Produkcia enzýmov rodom *Bacillus*

Rod *Bacillus* je veľmi rozsiahly a v prírode je veľmi rozšírený. Jeho druhy majú bohaté enzýmové vybavenie, takže môžu rozkladať rôzne druhy organických zlúčenín. Väčšina druhov má veľmi aktívne amylolytické enzýmy a pektolytické enzýmy (*B. subtilis*, *B. macerans*) a väčšina druhov má veľmi aktívne proteolytické enzýmy, ktoré sa uplatňujú pri aeróbnom i anaeróbnom rozklade bielkovín (*B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. mycoides*, *B. putrificus*, *B. sporogenes* a i.). Iné druhy tvoria slizové puzdra polysacharidovej povahy (z levanov a dextranov), ktoré spôsobujú

nežiadúcu nitkovitosť pečiva a pšeničného chleba (*B. subtilis* var. *niger*) (Števlíková – Kačániová, 2005).

Peptidázy, ktoré sú aktívne v alkalickom prostredí sú produkované rôznymi druhmi rodu *Bacillus* sa označujú ako subtilizíny (Kumar - Takagi, 1999; Maurer, 2004). Prirodzenými substrátmi pre tieto enzýmy sú natívne polypeptidy a peptidy, ale pôsobia aj na syntetické peptidy, amidy a estery peptidov. Subtilizíny (EC 3.4.21.62) sú tvorené peptidovými reťazcami, ktoré v aktívnom centre obsahujú aminokyselinu serín, a preto sa zaraďujú medzi tzv. serínové peptidázy (Hsino et al., 1993). Najrozšírenejšie využitie majú subtilizín Calsberg, produkuje ho *Bacillus licheniformis*, subtilizín Novo a subtilizín BPN, ktoré produkuje *Bacillus subtilis*, var. *amyloliquefaciens* (Hrčková et al., 2004; Sumantha et al., 2006). Enzýmy sú využívané v detergentoch, najmä v pracích práškoch (Kalisz, 1988; Beg - Gupta, 2003). Okrem toho sa subtilizín Carlsberg používa na úpravu funkčných vlastností bielkovín, ktoré sa hydrolýzou výrazne zlepšujú čo do textúry, ale aj chuťových vlastností (Kristinsson - Rasco, 2000), pri získavaní aróm a chutí do polievok a mäsových konzerv (Hrčková et al., 2004). Peptidázy subtilizínovej skupiny sa využívajú aj vo farmaceutickom priemysle ako súčasť preparátov pre liečenie popálenín a rán (Rao et al., 1998).

Sharipova (2002) sledovala u baktérií rodu *Bacillus* tvorbu hydroláz a z nich hlavne peptidáz, ktoré tento mikroorganizmus sekretuje v neskoršom štádiu tvorby spór.

Bakteriálne amylázy získané z *Bacillus subtilis* sa uplatňujú v pivovarníctve a v textilnom priemysle. *Bacillus polymyxa* sa používa pre kvasnú výrobu 2,3-butandiolu a *Bacillus macerans* má silné pektolytické účinky, a preto sa využíva v textilnom priemysle (Šilhánková, 1995). V živočíšnej výrobe sa využívajú hlavne *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans* a *Bacillus subtilis* na zvyšovanie prírastkov, pretože ako probiotiká zlepšujú konverziu krmiva a zdravie zvierat (Link et al., 2003). Baktérie produkujú peptidázy, amylázy, katalázy, čím sa dajú vysvetliť lepšie hmotnostné prírastky živočíchov. Tieto enzýmy napomáhajú tráveniu krmiva a peptidázy produkované rodom *Bacillus*, stimulujú rast laktobacilov (Hosoi, 2000).

Prehľad niektorých enzýmov produkovaných rodom *Bacillus* je uvedený v tabuľke 2.

Prehľad produktov získavaných činnosťou baktérií rodu *Bacillus*
(Hudecová – Šimkovič, 2009)

Tabuľka 2

Rod <i>Bacillus</i>	Produkty
Farmaceutické preparáty	
<i>Bacillus brevis</i>	gramicidín S
<i>Bacillus subtilis</i>	bacitracín
<i>Bacillus polymyxa</i>	polymyxín B
Enzýmy	
<i>Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus licheniformis</i>	alfa-amyláza
<i>Bacillus cereus, Bacillus megaterium, Bacillus polymyxa</i>	beta-amyláza
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	beta-glukanáza
<i>Bacillus sp.</i>	glukózaizomeráza
<i>Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus thermoproteolyticus</i>	neutrálna peptidáza
<i>Bacillus sp.</i>	alkalická peptidáza
<i>Bacillus sp.</i>	renín
Vitamíny	
<i>Bacillus megatherium</i>	B 12

1.5.1 Stabilita proteolytických enzýmov

Pod pojmom stabilita enzýmu sa rozumie schopnosť zachovať si aktivitu pri rôznych podmienkach vonkajšieho prostredia. Medzi základné faktory, ktoré môžu najviac ovplyvniť stabilitu enzýmu patrí pH prostredia a koncentrácia solí, vrátane rizikových prvkov (Shroomburg - Salzman, 1991).

Podľa mechanizmu katalýzy sa proteolytické enzýmy klasifikujú do 4 skupín, zahrňujúcich serínové, cysteínové, aspartátové a metalopeptidázy.

Najväčšiu skupinu proteolytických enzýmov mikrobiálneho pôvodu tvoria serínové peptidázy. Aminokyselina serín, ktorá sa nachádza v ich aktívnom centre je inhibovaná fluoridovými reagentami, komerčne sa využívajú napr. dizopropylfluorofosfát alebo fenylmetylsulfonylfluorid (Urminská, 1997), ktoré majú významné využitie ako súčasť organofosfátových insekticídov. Prítomnosť týchto látok v prostredí, či už pri raste produkčnej baktérie alebo pri využívaní enzýmu vyvolá neodstrániteľnú inhibíciu (Vodrážka, 1992).

Metalopeptidázy obsahujú v aktívnom centre katión kovu, ktorý je nevyhnutný pre ich katalytické pôsobenie. Týmto kovom je najčastejšie zinok (Graycar, 1999). Kovový ión je významným pri hydrolytickom štiepení peptidovej väzby v bielkovinách preto, lebo má silný elektrofilný efekt. Molekula vody potrebná pre pôsobenie peptidáz je naviazaná na enzým vodíkovou väzbou, konkrétne na zvyšok kyseliny glutámovej neďaleko aktívneho centra enzýmu. Karboxylová skupina kyseliny glutámovej odoberá protón a hydroxyl atakuje karbonyl peptidovej väzby. Aktivitu metaloendopeptidáz inhibujú chelatačné látky, ako je EDTA (Hrčková et al., 2004). Ku strate aktivity enzýmu dochádza aj výmenou esenciálneho prvku za iný katión, napr. ťažký kov. Väzbou na peptidové reťazce biologicky aktívnych bielkovín sa vyznačujú predovšetkým kadmium, kobalt a selén.

Medzi komerčne využívané metalopeptidázy patria kolagenázy a želatinázy produkované baktériami (Neutráza, Termolyzín) (Hrčková et al., 2004).

1.6 Faktory a prvky ovplyvňujúce rast a rozmnožovanie baktérií

Životná činnosť mikroorganizmov a ich vývoj, sú závislé na vnútornom prostredí. Aby sa mohli rozmnožovať, musí byť v prostredí dostatočné množstvo surovín pre syntézu bunkovej hmoty a dostatočné množstvo zdroja využiteľnej energie.

Rozmnožovanie organizmov podmieňuje rast a následné delenie buniek. V priaznivých podmienkach prostredia sa rastúca jednobunková populácia zdvojnásobuje v pravidelných intervaloch. Priebeh rastu, pri ktorom logaritmus biomasy alebo počtu buniek narastá v priamej úmernosti s časom, sa nazýva logaritmický alebo exponenciálny. Rast bakteriálnej populácie však neprebíha stále exponenciálne. Jeho spomalenie môže byť spôsobené spotrebou živín, tvorbou toxických produktov, kombináciou oboch týchto faktorov, ale aj fyzikálno-chemickými a fyzikálnymi vplyvmi, ktoré spôsobia zmeny v prostredí. Okrem dostupnosti živín, voda, hoci i vo forme dostatočnej vlhkosti a určitý teplotný interval, patria k najdôležitejším faktorom prostredia ovplyvňujúcich mnohé fyziologické funkcie mikroorganizmov (Ferianc – Pangallo, 2005).

Okrem zdroja energie musí živné prostredie obsahovať využiteľné, t. j. asimilovateľné zdroje prvkov, ktoré sú súčasťou bunkovej hmoty. Najväčšie požiadavky

sú kladené na C, H, O, N, P a S a z katiónov je to K^+ , Mg^{2+} , Na^+ , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} , Co^{3+} , Cu^{2+} a Zn^{2+} .

Katióny Co^{3+} , Cu^{2+} a Zn^{2+} a niektoré anióny sú potrebné len vo veľmi nízkych koncentráciách, preto sa dostávajú do živnej pôdy už ako kontaminanty použitých chemikálií, vody a pod.

Živné prostredie musí obsahovať aj dostatočné množstvo vody. Zvýšená koncentrácia rozpustených anorganických aj organických zlúčenín pod určitú hranicu vodnej aktivity vedie k zastaveniu rozmnožovania. Vodná aktivita umožňujúca rozmnožovanie sa pohybuje v rozmedzí 0,99 až 0,93. Ak celková koncentrácia solí v roztoku presahuje 6 %, zastavuje sa rozmnožovanie, a tiež vysoká koncentrácia asimilovateľných organických zlúčenín zastavuje metabolizmus aj rozmnožovanie.

V živných pôdach musia byť zachované určité pomery jednotlivých katiónov a aniónov, lebo veľký nadbytok jedného iónu môže inhibovať transport iného cez cytoplazmatickú membránu alebo môže mať inhibičný účinok na niektoré enzýmy (Šilhánková, 1995). Táto skutočnosť dáva do súvisu obsah prvkov, vrátane ťažkých kovov v prostredí, v ktorom bacili rastú s aktivitou extracelulárnych enzýmov, ktoré produkujú.

Vhodným zdrojom uhlíka sú zlúčeniny využívané tiež ako zdroj energie, t. j. cukry, alkoholy, organické kyseliny a pod. Najvhodnejšia koncentrácia základných zdrojov uhlíka a energie je 1 až 2 % za aeróbných podmienok. Fosfor mikroorganizmy asimilujú väčšinou vo forme anorganických fosfátov. K umelým pôdam sú fosfáty pridávané v podobe amónnych solí, čím je čiastočne zaistený aj požadovaný dusík. Ako zdroj síry sa využívajú väčšinou sírany, pridávané hlavne ako síran amónny (Šilhánková, 1995).

1.7 Iónová sila roztokov

Iónová sila je miera koncentrácie iónov v roztoku. Je dôležitým faktorom v biochemických reakciách a preto má dôležitú úlohu pre všetky živé organizmy. Enzýmy, bielkovinové molekuly, ktoré katalyzujú a regulujú dôležité reakcie pre život, môžu byť tiež veľmi citlivé na príliš vysokú alebo nízku iónovú silu v roztoku, dôsledkom čoho môže byť ich nefunkčnosť.

Väčšina baktérií sa rozmnožuje v prostredí s vodnou aktivitou 0,99 až 0,93. Niektoré sú schopné rozmnožovania aj pri nízkych hodnotách 0,65 až 0,63, napr. v prítomnosti 20 až 30 % NaCl. Tieto baktérie sa nazývajú halofilné (Pace, 2006).

Rozmnožovanie väčšiny baktérií sa však zastavuje, ak sa v prostredí nachádza 6 až 10 % NaCl (Baker et al., 2010).

1.7.1 Koncentrácia solí v prostredí

Morská voda je neuveriteľne zložitý a komplexný systém prvkov a mikroorganizmov, ktorý obsahuje 96,5 % vody a 3,5 % iných látok. Ide o organické zložky, plyny (64 % dusík, 34 % kyslík) a zmes solí. Typickou vlastnosťou morskej vody je jej slanosť (salinita). Salinita je celkové množstvo rozpustených minerálnych látok v 1 kilograme morskej vody. Priemerná salinita je asi 3,5%, pričom najväčší podiel rozpustených látok má chlorid sodný, ktorý tvorí 78%. Obsah soli je v každom mori iný, prevažne sa pohybuje v rozmedzí 3,3 až 3,7%. Atypické moria sú napr. Mŕtve more, ktoré jej obsahuje takmer desaťkrát toľko a jeho slanosť je 30 - 35% alebo Červené more, taktiež známe svojim extrémne vysokým obsahom soli 4,1%. Rozdiely v koncentráciách solí spôsobuje niekoľko procesov. Keď morská voda zamrzne, v ľade je obsiahnutá iba čistá voda a pôvodná soľ prispieva k zvýšeniu koncentrácie solí v okolitej morskej vode. Táto nová vzniknutá solanka potom zabraňuje zamrznutiu ďalšej vody. Naopak topenie ľadovcov spôsobuje nariadenie morskej vody a koncentrácia solí klesá. Vyššia teplota morskej vody má za následok väčší výpar, čím sa vyparuje „čistá“ voda a koncentrácia solí v povrchovej morskej vode sa tým zvyšuje (Kutílek, 2008).

Aj v pôde sú akumulované sodné soli, predovšetkým chloridu sodného (NaCl) a síranu sodného (Na_2SO_4). Hlavným zdrojom solí v pôde, a tým aj vzniku a vývoja soľných pôd, sú mineralizované podzemné vody. V oblastiach s výparným vodným režimom pôdy vynášajú vzliňaním rozpustné soli do pôdneho profilu. Po transpirácii vody sa soli vyzrážajú na povrchu pôdnych častíc a voľné ióny sodíka sa viažu na pôdny koloidný komplex. Tieto podmienky pre postupné rozširovanie soľných pôd, čiže suchá a teplá klíma, výparný vodný režim pôd a mineralizované podzemné vody, sa na Slovensku vyskytujú v južných častiach Podunajskej a Východoslovenskej nížiny, ktoré sú pravidelne monitorované (Kobza, 2009). Najčastejšími aniónmi vystupujúcimi v asociácii so zasolenými pôdami sú chloridy, sírany, uhličitaný a dusičnaný, z kationov sú najbežnejšie sodík, vápnik horčík a draslík. Pre zasolené pôdy je charakteristická kumulácia ľahko rozpustných solí (napr. $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$, Na_2SO_4 , NaCl, MgSO_4 , $\text{Ca}_2\text{SO}_4 \cdot x \text{SrO}_4$, $\text{Ca}_2\text{SO}_4 \cdot x \text{H}_2\text{O}$, MgCl_2 , NaNO_3) a ich aktívna účasť v

biologickom a geologickom cykle a migrácií (Milička et al., 2005). S touto problematikou úzko súvisia aj antropogénne zásahy do chemizmu pôd, predovšetkým aplikáciou agrochemikálií a zavlažovaním nevhodnou závlahovou vodou. Následkom odparovania tejto vlhkosti v kapilárnej zóne pri povrchu terénu zostávajú v pôdnom profile rezíduá rôznych solí (Milička et al., 2005).

V čase topenia snehu sa do pôdy dostáva chemickým zložením zmenená voda, vplyvom posypu ciest chloridom sodným, čo má negatívny vplyv na mikroorganizmy, ktoré sa tu nachádzajú. Vplyvom NaCl sa v roztoku zvyšuje vnútrobunkový tlak, v bunkách baktérií často dochádza k chemickému šoku a následnej možnej lýze buniek (Horniaková - Búgel', 2007).

Nahromadenie solí (najmä sodných solí) je jednou z hlavných fyziologických hrozieb pre ekosystémy. Soľ ovplyvňuje metabolizmus pôdnych mikroorganizmov, čo vedie k vážnemu zníženiu úrodnosti pôdy. Vysoká úroveň salinity v pôde spôsobuje vädnutie rastlín v dôsledku zvýšeného osmotického tlaku a toxického účinku solí. Faktory vedúce k nadmernému nahromadeniu solí v pôde môžu byť prírodné alebo antropogénne.

Environmentálne (prírodné) faktory:

- geologické javy, vplyvom ktorých sa môže zvýšiť koncentrácia solí v podzemnej vode a v dôsledku toho aj v pôde,
- prírodné faktory, ktoré môžu priviesť podzemnú vodu s vysokým obsahom solí na povrch, blízko k povrchu alebo k vrstvám nad hladinou spodnej vody,
- presakovanie podzemnej vody do oblastí ležiacich pod úrovňou mora, ako sú mikrodepresie s malým alebo žiadnym odvodnením,
- vody pritekajúce z území s geologickým podložím, ktoré uvoľňuje veľké množstvá solí,
- činnosť vetra, ktorý môže v pobrežných oblastiach do vnútrozemia priviať menšie množstvá solí.

K prírodným faktorom ovplyvňujúcim salinitu pôd patria klíma, materský pôdny substrát, pôdny kryt, vegetačný typ a topografia (Kobza, 2009).

Faktory vyvolané ľudskou činnosťou:

- zavlažovanie vodou s vysokým obsahom solí,

- zvýšenie vodnej hladiny spôsobené ľudskými aktivitami (presakovanie z neutesnených kanálov a nádrží, nerovnomerná distribúcia vody na zavlažovanie, nedokonalé zavlažovacie postupy, nevhodné odvodnenie),
- používanie hnojív a iných vstupov, najmä tam, kde má zem vplyvom intenzívneho poľnohospodárstva nízku priepustnosť a obmedzené možnosti presakovania,
- využívanie odpadových vôd s vysokým obsahom solí na zavlažovanie,
- vypúšťanie odpadovej vody s vysokým obsahom solí do pôdy (Kobza, 2009).

V súčasnosti sa vytvárajúce klimatické zmeny môžu postupne viesť aj k zmene koncentrácií solí v prostredí. Čím ďalej, tým sú častejšie prudké a dlhorvajúce dažde, ktorými sa vyplavujú minerálne látky z pôd, následne vysoké teploty spôsobia vyparenie vody z roztokov a zasolenie prostredia. Mikroorganizmy sa tak musia prispôbovať týmto zmeneným podmienkam.

2 CIEĽ PRÁCE

Cieľom diplomovej práce bolo sledovať zmeny v produkčnej schopnosti baktérií *Bacillus subtilis* a *Bacillus licheniformis* vo vzťahu k proteolytickým enzýmom vyvolané zmenou iónovej sily kultivačného prostredia.

Pre splnenie cieľa bolo potrebné:

- spracovať literárny prehľad o význame baktérií rodu *Bacillus* v oblasti produkcie enzýmov, o charakteristike baktériálnych proteolytických enzýmov, o vplyve iónovej sily na kultiváciu baktérií a produkciu extracelulárnych enzýmov,
- kultivovať vybrané baktérie v optimalizovanej živnej pôde a v živnej pôde s prídavkom NaCl,
- stanoviť aktivitu extracelulárnych peptidáz,
- popísať vplyv zvýšenej iónovej sily na rast biomasy a produkčnú schopnosť baktérií.

3 MATERIÁL A METODIKA

3.1 Kultivácia baktérií rodu *Bacillus*

Tekutá živná pôda pre kultiváciu kmeňov baktérií *Bacillus* sa pripraví zo substrátov škrob, sušené mlieko, sladinka a kvasničný autolyzát v koncentrácií na 200 cm³: 1 g škrobu; 2 g sušeného mlieka; 5,4 g lyofilizovanej sladinky a 0,6 g kvasničného autolyzáta.

Tieto substráty sa rozpustia v 150 cm³ destilovanej vody a pomocou NH₄OH sa upraví hodnota pH na 8,5. Po úprave pH sa roztok živnej pôdy doplní destilovanou vodou na objem 200 cm³. Tento objem živnej pôdy sa rozleje po 25 cm³ do ôsmich kultivačných baniek, do ktorých sa následne pridajú navážené koncentrácie NaCl: 0 %; 0,1 %; 0,25 %; 0,50 %; 0,75 %; 1 %; 1,25 %; 1,50 %; 1,75 %; 2 %, 2,25 %; 2,50 %.

Jednotlivé koncentrácie sa sledujú v dvoch opakovaníach. Kultivačná banka sa následne uzatvorí bakteriologickou zátkou a prikryje sa alobalom. Takto pripravené kultivačné banky so živnou pôdou sa sterilizujú počas 30 minút pri teplote 120 °C.

Po vychladnutí na teplotu asi 30 °C sa živné pôdy naočkujú kmeňmi *Bacillus licheniformis* L₇ a *Bacillus subtilis* S₂₂₆₈. Kmene sa získali zo zbierok mikroorganizmov z Brna, Prahy a Bratislavy a uchovávajú sa na KBB FBP SPU v Nitre na šikmých sladinkových agaroch.

Kultivácia mikroorganizmov sa uskutočnila v aeróbnom prostredí v laboratórnej pretrepávačke pri teplote 37 °C počas 48 hodín.

3.2 Stanovenie výťažnosti biomasy

Po kultivácií baktérií sa obsah kultivačných baniek odstredovaním po dobu 15 minút pri 4000 ot.min⁻¹ oddelí na sediment a supernatant. Supernatant sa použije na stanovenie aktivity extracelulárnych peptidáz a sediment pre stanovenie hmotnosti biomasy. Sediment sa preniesie do hliníkových vysúšačiek a za štandardných podmienok pri teplote 105 °C je sušený do konštantnej hmotnosti. Následne sa hliníkové vysúšačky nechajú vychladnúť, a potom sa odvážia.

3. 3 Stanovenie aktivity peptidáz

Pripraví sa 0,6 % roztok substrátu – 0,6 g azoalbumínu sa rozpustí v 10 cm³ 50 % močoviny, pridá sa 20 cm³ tlmivého roztoku Tris/HCl pH 8,5 a doplní sa na objem 100 cm³ deionizovanou vodou.

Stanovenie:

K 1,0 ml roztoku enzýmu (supernatant) sa pridá 1,0 ml 0,6 % azoalbumínu a reakčná zmes sa inkubuje 2 hodiny pri 37 °C. Reakcia sa zastaví pridaním 2,0 ml 0,3 mol.dm⁻³ (alebo 5 %) TCA (kyselina trichlóroctová). Vzorka sa dá chladiť na 5 minút do mrazničky. Precipitované bielkoviny sa odstredia pri 3000 ot.min⁻¹ počas 5 minút. Ku zdekantovanému supernatantu sa pridajú 2,0 ml 0,3 mol.dm⁻³ Na₂CO₃ a meria sa absorbancia pri 440 nm.

Jedna jednotka proteolytickej aktivity (1 U) zodpovedá množstvu peptidáz, ktoré spôsobia zvýšenie absorbancie pri 440 nm o 0,001 A₄₄₀/min. za daných podmienok.

Slepý pokus sa pripravuje rovnakým spôsobom, ale namiesto 1,0 ml enzýmu (vzorky) sa do reakčnej zmesi pipetuje 1,0 destilovanej vody.

Výpočet: $\{(A_{440 \text{ vz.}} - A_{440 \text{ blank}}) : 120\} \cdot 10^3 \cdot R = \text{objemová aktivita [U.cm}^{-3}\text{]}$

4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

Výroba a využitie enzýmov patrí k najrozšírenejším oblastiam aplikácie biotechnológií v poľnohospodárstve, potravinárstve, chemickom priemysle a v zdravotníctve.

Produkcia enzýmov baktériami *Bacillus* sp. sa zdokonaľuje nielen neustálymi optimalizáciami kultivačných médií, ale aj využívaním cielených úprav genetického materiálu. Cieľom je rýchlejšia výroba kvalitnejších a stabilnejších enzýmov (Fu et al., 2007, Harwood – Cranenburg, 2008).

Detailné poznanie metabolizmu a životného cyklu *Bacillus* sp. však dovoľuje rozvíjať aj ďalšie využívanie týchto baktérií.

Základnou fyzikálnou podmienkou pre kultiváciu mikroorganizmov je kyslík. Baktérie rodu *Bacillus* sú aeróbne, až fakultatívne anaeróbne, preto boli kultivované za prístupu vzduchu. Sterilita bola zabezpečená uzatvorením kultivačnej banky tzv. bakteriologickou zátkou. Kultivácia sa uskutočnila za kontinuálneho premiešavania, čím bola dosiahnutá dobrá aerácia živnej pôdy. Ďalšou dôležitou fyzikálnou podmienkou je pH živnej pôdy. Pomocou roztoku NH_4OH bolo pH média upravené na hodnotu 8,5. Do živnej pôdy boli následne pridané rôzne koncentrácie NaCl od 0,0 % do 2,50 % NaCl a pôdy boli sterilizované. V takto pripravenej živnej pôde prebiehala 48 hodinová kultivácia baktérií.

V práci bola pozornosť sústredená na sledovanie vplyvu iónovej sily na produkciu peptidáz baktérií rodu *Bacillus*. Aplikované boli dva kmene, a to *Bacillus licheniformis* L₇ a *Bacillus subtilis* S₂₂₆₈.

Keďže *Bacillus* sp. produkuje extracelulárne enzýmy, po skončení kultivácie boli bakteriálne bunky odstredené a následne vysušené ako bakteriálna biomasa, a supernatante bola stanovená aktivita peptidáz.

Zo získaných výsledkov vyplýva, že *Bacillus licheniformis* L₇ sa vyznačuje vyššou produkciou peptidáz ako *Bacillus subtilis* S₂₂₆₈. Najvyššia aktivita bola získaná kultiváciou *Bacillus licheniformis* v živnej pôde, ktorá obsahovala 0,1 % NaCl, a to 10400,0 U.dm⁻³ (Tabuľka 3).

Vplyv NaCl na produkciu peptidáz kmeňom *Bacillus licheniformis* L₇

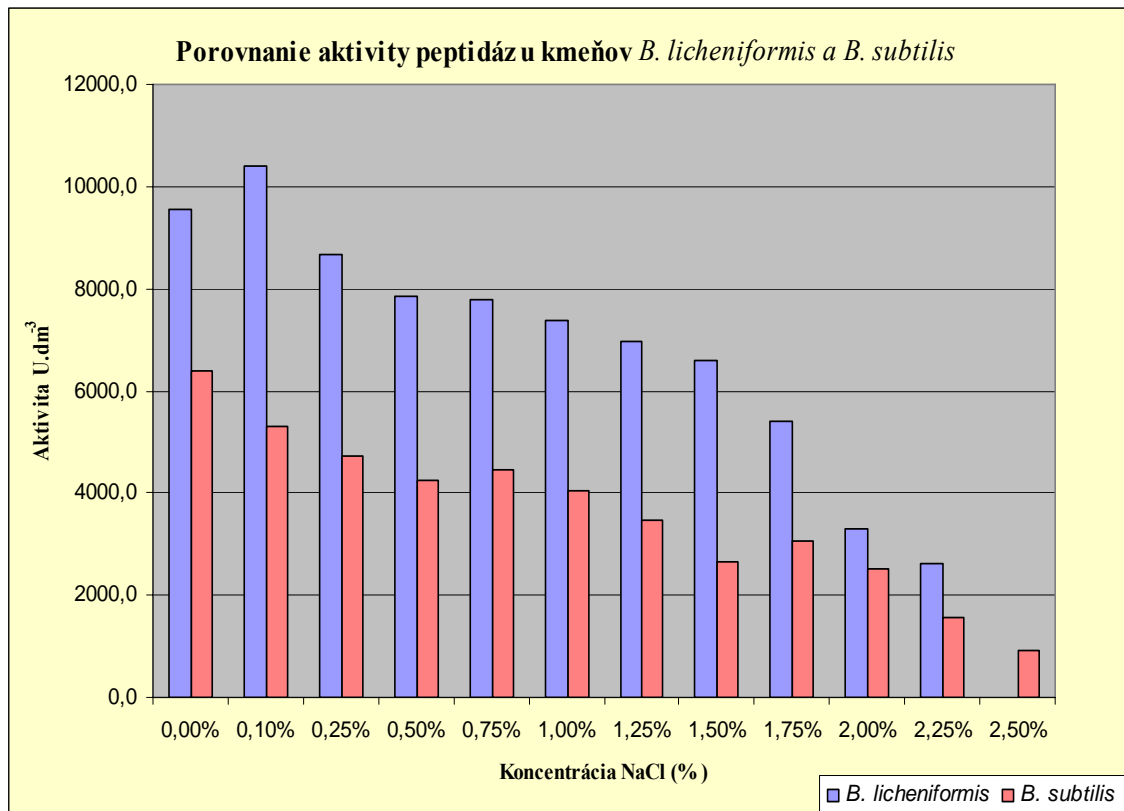
Tabuľka 3

<i>Bacillus licheniformis</i> L ₇	
Koncentrácia NaCl	Aktivita peptidáz, U.dm ⁻³
0,00 %	9541,7
0,10 %	10400,0
0,25 %	8672,5
0,50 %	7845,8
0,75 %	7787,5
1,00 %	7362,5
1,25 %	6979,2
1,50 %	6591,7
1,75 %	5395,8
2,00 %	3300,0
2,25 %	2625,0

V porovnaní s kultiváciou v živnej pôde bez prídavku NaCl bol zaznamenaný 8,9 % nárast aktivity, čo znamená, že NaCl pôsobilo stimulačne na produkciu peptidáz. Halotolerantný kmeň *Bacillus licheniformis* popisali aj Folmsbee et al. (2006) a Mark et al. (2006). Zvyšovaním koncentrácie soli v živnej pôde do množstva 2,25 % NaCl však produkcia enzýmov postupne klesala až na 25 % (Obrázok 2).

Pre kultiváciu *Bacillus licheniformis* bola táto koncentrácia najvyššou, pretože ďalším zvyšovaním množstva NaCl dochádzalo po sterilizácii k ireverzibilnému vyzrážaniu bielkovín zo zložiek živnej pôdy. Takáto pôda bola nehomogénna a nepoužiteľná pre aeróbnú kultiváciu.

Obrázok 2



Zaujímavé výsledky boli získané sledovaním vplyvu NaCl na množstvo biomasy. Zistili sa, že hmotnosť biomasy *Bacillus licheniformis* L₇ sa postupne zvyšovala s narastaním koncentrácie NaCl v živnej pôde (Tabuľka 4).

V prostredí 2,25 % NaCl bol rast a rozmnožovanie baktérií 2,44 – krát intenzívnejšie ako v optimalizovanej živnej pôde. *Bacillus licheniformis* L₇ je schopný pomerne dobre tolerovať zvýšené koncentrácie solí v prostredí, ale zmenia sa jeho schopnosti produkovať extracelulárne enzýmy. Tieto poznatky sú v súlade so závermi Weyens et al. (2009), ktorí popisujú možnosti využitia interakčných vzťahov medzi pôdnymi mikroorganizmami, vrátane *Bacillus* sp., a rastlinami na bioremediáciu pôdy.

Vplyv NaCl na hmotnosť biomasy *Bacillus licheniformis* L₇

Tabuľka 4

<i>Bacillus licheniformis</i> L ₇	
Koncentrácia NaCl	Hmotnosť biomasy získanej z 1 dm ³ živnej pôdy, g
0,00%	6,7
0,10%	7,2
0,25%	7,2
0,50%	6,8
0,75%	9,0
1,00%	9,9
1,25%	11,0
1,50%	11,4
1,75%	13,0
2,00%	15,6
2,25%	16,4

Bacillus subtilis S₂₂₆₈ produkoval nižšie aktivity extracelulárnych peptidáz, v živnej pôde bez prídavku soli bolo stanovených 6391,7 U.dm⁻³ (Tabuľka 5), čo je iba 66,98 % produkcie peptidáz baktériou *Bacillus licheniformis* L₇. Aj Urminská et al. (2010) vo svojej práci poukázali na skutočnosť, že kmene *Bacillus licheniformis*, sú lepšími producentmi peptidáz, ako kmene *Bacillus subtilis*.

Vplyv NaCl na produkciu peptidáz kmeňom *Bacillus subtilis* S₂₂₆₈

Tabuľka 5

<i>Bacillus subtilis</i> S ₂₂₆₈	
Koncentrácia NaCl	Aktivita peptidáz, U.dm ⁻³
0,00 %	6391,7
0,10 %	5312,5
0,25 %	4733,3
0,50 %	4245,8
0,75 %	4445,8
1,00 %	4029,2
1,25 %	3479,2
1,50 %	2666,7
1,75 %	3050,0
2,00 %	2512,5
2,25 %	1550,0
2,50 %	920,8

Postupným zvyšovaním koncentrácie NaCl v médiu, ktoré bolo až do množstva 2,50 % aktivita peptidáz klesala. V prostredí s 2,50 % NaCl (vyššie koncentrácie denaturovali bielkoviny zložiek živnej pôdy) bola produkcia peptidáz na úrovni 14,4 % oproti kultivácii v optimalizovanej živnej pôde.

Aj v prípade *Bacillus subtilis* S₂₂₆₈ bol pozorovaný nárast biomasy v prostredí s NaCl, ale iba do koncentrácie 2,00 % (Tabuľka 6). Stimulačný vplyv NaCl bol v prípade kultivácie *Bacillus subtilis* podstatne výraznejší ako pri kultivácii *Bacillus licheniformis* (Obrázok 3). V prostredí s 2,00 % NaCl sa získalo takmer 30 g bakteriálnej masy z 1 litra živnej pôdy.

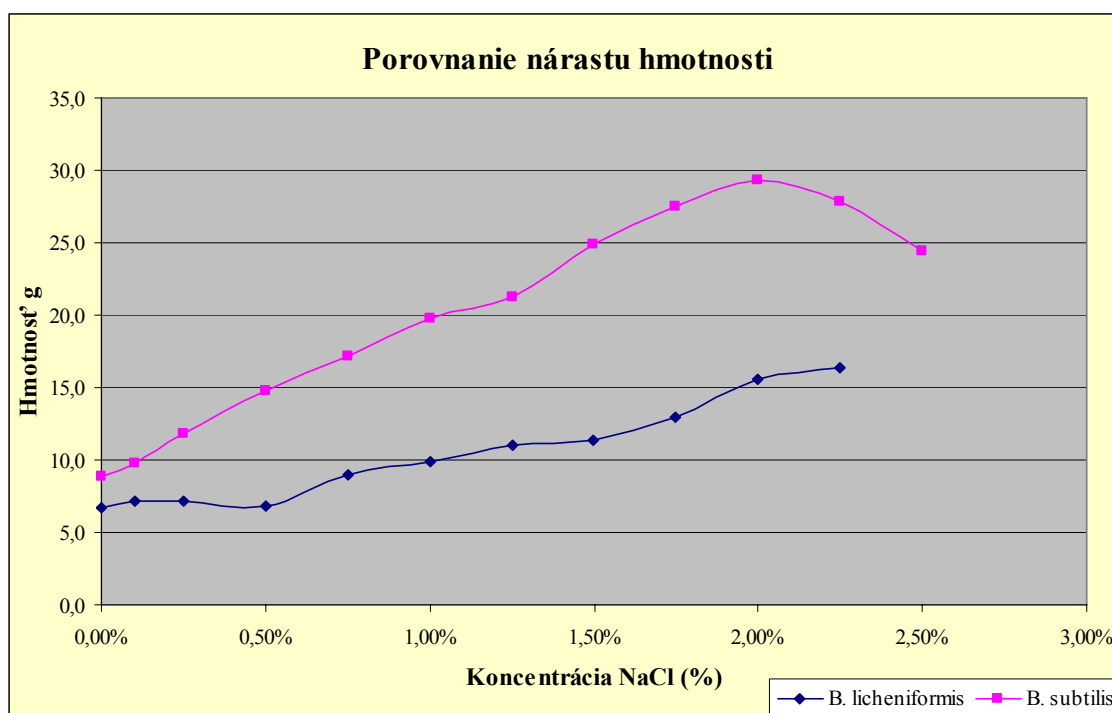
Ďalším zvyšovaním množstva soli v prostredí klesala aj hmotnosť biomasy.

Vplyv NaCl na hmotnosť biomasy *Bacillus subtilis* S₂₂₆₈

Tabuľka 6

<i>Bacillus subtilis</i> S ₂₂₆₈	
Koncentrácia NaCl	Hmotnosť biomasy získanej z 1 dm ³ živnej pôdy, g
0,00%	8,9
0,10%	9,7
0,25%	11,8
0,50%	14,8
0,75%	17,1
1,00%	19,8
1,25%	21,3
1,50%	24,9
1,75%	27,5
2,00%	29,4
2,25%	27,9
2,50%	24,5

Obrázok 3



Tieto zistenia sú prekvapujúce, pretože práve *Bacillus subtilis* je popisovaný ako vhodný bioremediačný organizmus. Napríklad Gorman – Lewis et al. (2005) aplikovali tento mikroorganizmus ako absorbenta uránových solí, a zistili, že je schopný viazať tieto zlúčeniny do stabilných komplexov v bunkovej stene. Iné využitie naznačili Zang et al. (2010), ktorí aplikovali vláknitú hubu *Aspergillus niger* a baktériu *Bacillus subtilis* na odstránenie α -naftolu z prostredia.

Liu et al. (2010) študovali mechanizmu remediácie benzénu pomocou *Bacillus licheniformis* a *Bacillus subtilis*. Benzén predstavoval v živnej pôde zdroj uhlíka a z nameraných hodnôt enzýmovej kinetiky (K_m) zistili, že čím nižšia je K_m (teda čím pomalšie prebiehajú enzymatické reakcie), tým je lepší remediačný efekt.

Hahne et al. (2010) využili molekulárno – biologické metódy pre analýzy transkripcie mRNA a proteosyntézy v skúmaní fyziológie a genetiky hyperosmotický stres – tolerantných kmeňov *Bacillus subtilis*. Výsledky poukazujú na expresiu SigB, SigW, SigM, and SigX regulónov, zodpovedných za syntézu stres – proteínov.

5 NÁVRH NA VYUŽITIE VÝSLEDKOV

Riešením diplomovej práce boli získané originálne výsledky, ktoré prispievajú k prehĺbeniu vedomostí v oblasti vplyvu environmentálnej záťaže na rast a produkčnú schopnosť *Bacillus licheniformis* a *Bacillus subtilis*.

Získané informácie prispievajú k poznaniu metabolizmu baktérií, ktorý je významnou mierou ovplyvňovaný zložením prostredia, v ktorom rastú; k určeniu limitov koncentrácií solí v prostredí, ktoré ešte nezasahujú do syntézy extracelulárnych enzýmov, resp. nárastu hmotnosti biomasy *Bacillus* sp.

6 ZÁVERY

Cieľom diplomovej práce bolo sledovať zmeny v produkčnej schopnosti baktérií *Bacillus subtilis* a *Bacillus licheniformis* vo vzťahu k proteolytickým enzýmom vyvolané zmenou iónovej sily kultivačného prostredia.

Na základe získaných výsledkov je možné konštatovať, že:

1. najvyššia aktivita peptidáz bola získaná kultiváciou *Bacillus licheniformis* L₇ v živnej pôde s 0,1 % NaCl,
2. zvyšovanie koncentrácie soli do 2,25 % sa prejavilo znižovaním produkcie extracelulárnych peptidáz,
3. prídavok NaCl do kultivačného média mal stimulačný efekt na rast a rozmnožovanie *Bacillus licheniformis* L₇, pretože stúpalo množstvo biomasy,
4. *Bacillus licheniformis* L₇ sa vyznačuje vyššou produkciou peptidáz ako *Bacillus subtilis* S₂₂₆₈,
5. Stimulačný efekt na nárast biomasy bol výraznejší pri kultivácii *Bacillus subtilis* S₂₂₆₈,

Zo získaných výsledkov vyplýva, že baktérie *Bacillus licheniformis* L₇ a *Bacillus subtilis* S₂₂₆₈ sú schopné tolerovať koncentrácie NaCl v prostredí do množstva 2,25 %, resp. 2,50 %, avšak postupne strácajú schopnosť produkovať extracelulárne enzýmy. Na druhej strane, prítomnosť solí pozitívne vplýva na syntézu biomasy.

7 Zoznam použitej literatúry:

ARIMA, J. – UESUGI, Y. – IWABUCHI, M. – HATANAKA, T. 2008. *Streptomyces* aminopeptidase P: biochemical characterization and insight into the roles of its N-terminal domain. In *Protein Engineering Design and Selection*, vol. 21, 2008, no. 1, p. 45-53.

BAKER, B. J. – COMOLI, L. R. – DICK, G. J. – HAUSER, L. J. – HYATT, D. – DILL, B. D. – LAND, M. L. – VERBERKMOES, N. C. – HETTICH, R. L. – BANFIELD, J. F. 2010. Enigmatic, ultrasmall, uncultivated Archaea. In *The Proceedings of the National Academy of Sciences USA* [online]. 2010, vol. 107, no. 19 [cit. 2011-4-3]. Dostupné na internete: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2889320/?tool=pmcentrez> >

BEG, O. K. – GUPTA, R. 2003. Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis*. In *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 32, 2003, p. 294-304.

BEYON, R. – BOND, J. S. 2001. *Proteolytic Enzymes*. New York: Oxford University Press, 2001.

BONOMI, F. – IAMETTI, S. – RASMUSSEN, P. – RESTANI, P. – ROVERE, P. 2000. Advances in the combined application of enzymatic and physical treatments for reducing food allergenicity. In *High Pressure Research*, vol. 19, 2000, p. 175-181.

CASTILLO-YÁNEZ, F. J. – PACHECO-AGUILAR, R. – GARCIA-CARRENO, L. F. – NAVARRETE-DEL TORO, M. Á. – FÉLIX LÓPEZ, M. 2006. Purification and biochemical characterization of chymotrypsin from the viscera of Monterey sardine (*Sardinops sagax caeruleus*). In *Food Chemistry*, vol. 99, 2006, no. 2, p. 252-259.

CERA, D. C. 2009. Serine proteases. In *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life* [online]. 2009, vol. 61, no. 5 [cit. 2011-3-16] p. 510-515. Dostupné na internete: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2675663/>>

ELLIOTT, W. H. – ELLIOTT, D.C. 2009. *Biochemistry and Molecular Biology*. Oxford: Oxford University Press, 2009, 608 p. ISBN 978-0-19-922671-9.

FERENČÍK, M. – ŠKÁRKA, B. – NOVÁK, M. – TURECKÝ, L. 2000. *Biochémiá*. Bratislava: Slovak Academic Press, 2000, 924 s. ISBN 80-88908-58-2.

FERIANC, P. – PANGALLO, D. 2005. Faktory ovplyvňujúce rast a rozmnožovanie mikroorganizmov v uzatvorených priestoroch. In *Knižnica*, roč. 6, 2005, č.3, s. 10-13.

FIORETTI, E. – ANGELETTI, M. – LUPIDI, G. – COLETTA, M. 1994. Heterotrophic modulation of the protease-inhibitor-recognition process. Cations effect the binding properties of alpha-chymotrypsin. In *European Journal of Biochemistry*, vol. 225, 1994, no. 1, p. 459-465. doi:10.1111/j.1432-1033.1994.00459.x

FOLMSBEE, M. – DUNCAN, K. – HAN, S. O. – NAGLE, D. – JENNINGS, E. – MCINERNEY, M. 2006. Re-identification of the halotolerant, biosurfactant-producing *Bacillus licheniformis* strain JF-2 as *Bacillus mojavensis* strain JF-2. In *Systematic and Applied Microbiology* [online]. 2006, vol. 29, no. 8 [cit. 2011-3-26] p. 645-649. Dostupné na internete: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B7GVX-4J9MSVF-1&_user=3838281&_coverDate=12%2F04%2F2006&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=gateway&_origin=gateway&_sort=d&_docanchor=&view=c&_searchStrId=1707921946&_rerunOrigin=scholar.google&_acct=C000061504&_version=1&_urlVersion=0&_userid=3838281&md5=319220bcfee754d864ea1ef319ffe5a3&searchtype=a>

FU, L. L. – XU, Z.R. – LI, W. F. – SHUAI, J. B. – LU, P. – HU, CH. X. 2007. Protein secretion pathways in *Bacillus subtilis*: Implication for optimization of heterologous protein secretion. In *Biotechnology Advances* [online]. 2007, vol. 25, no. 1 [cit. 2011-3-28] p. 1-12. Dostupné na internete: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T4X-4KN5JTN-1&_user=10&_coverDate=02%2F28%2F2007&_rdoc=2&_fmt=high&_orig=browse&_origin=browse&_zone=rslt_list_item&_srch=docinfo%28%23toc%234986%232007%23999749998%23640838%23FLA%23display%23Volume%29&_cdi=4986&_sort=d&>

_docanchor=&view=c&_ct=9&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_use
rid=10&md5=bd2304d58f9dc72f86052628c1343ba8&searchtype=a>

FUHONG, X. – YAPENG, CH. – XIUQING, Y – JING, Y. – ZHIQUAN, X. – YUANMING, L. – SHIJUN, Q. 2010. Purification and characterization of four keratinases produced by *Streptomyces* sp. Strain 16 in native human foot skin medium. In *Bioresource Technology* [online]. 2010, vol. 101 [cit. 2011-2-26] p. 344-350. Dostupné na internete: <<http://www.im.ac.cn/UserFiles/File/2009/200910/bioresource%20technology.pdf>>

GALVAO, C. M. A. – PINTO, G. A. – JESUS, CH. D. F. – GIORDANO, R. C. – GIORDANO, R. L. C. 2009. Producing a phenylalanine-free pool of peptides after tailored enzymatic hydrolyses of cheese whey. In *Journal of Food Engineering*, vol. 91, 2009, no. 1, p. 109-117. ISSN 0260-8774.

GAUTAM, S. S. – MISHRA, S. K. – DASH, V. – GOYAL, A. K. – RATH, G. 2010. Comparative study of extraction, purification and estimation of bromelain from stem and fruit of pineapple plant. In *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 34, 2010, p. 67-76.

GORMAN-LEWIS, D. - ELIAS, P. E. – FEIN, J. B. 2005. Adsorption of Aqueous Uranyl Complexes onto *Bacillus subtilis* Cells. In *Environmental Science and Technology*, vol. 39, 2005, no. 13, p. 4906-4912. ISSN 0013-936X.

GRANDI, C. – VITA, C. – DALZOPPO, D. – FONTANA, A. 2009. Thermolysin and *Bacillus subtilis* neutral protease. In *International Journal of Peptide and Protein Research*, vol.16, 2009, no.4, p. 327 – 338.

GRAYCAR, T. P. 1999. Proteolytic cleavage, reaction mechanisms. In Flickiner, M. C. – Drew, S. W. (eds) *Encyclopedia of Bioprocess Technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation*. Wiley, New York, p. 2214-2222.

HAHNE, H. – MÄDER, U. – OTTO, A. – BONN, F. – STEIL, L. – BREMER, E. – HECKER, M. – BECHER, D. 2010. A Comprehensive Proteomics and

Transcriptomics Analysis of *Bacillus subtilis* Salt Stress Adaptation. In *Journal of Bacteriology*, vol. 192, 2010, no. 3, p. 870-882. ISSN 1098-5530.

HARWOOD, C. R. – CRANENBURGH, R. 2008. *Bacillus* protein secretion: an unfolding story. In *Trends in Microbiology* [online]. 2008, vol. 16, no. 2 [cit. 2011-3-21] p. 73-79. Dostupné na internete: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TD0-4RHXTC4-1&_user=3838281&_coverDate=02%2F29%2F2008&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=gateway&_origin=gateway&_sort=d&_docanchor=&view=c&_searchStrId=1707856904&_rerunOrigin=scholar.google&_acct=C000061504&_version=1&_urlVersion=0&_userid=3838281&md5=bcf08effc628aacb8738c2ebc7ef9760&searchtype=a>

HIDALGO, J. A. – VAZQUES, J. A. 2010 [online]. Candidiasis. Updated 2010. [cit. 2011-2-11]. Dostupné na internete: <<http://emedicine.medscape.com/article/213853-overview>>.

HORNIKOVÁ, E. – BÚGEL, M. 2007. Vplyv posypu ciest na biologické odstraňovanie dusíka. In *Acta Montanistica Slovaca*, roč. 12, 2007, č. 3, s. 217-222.

HOSOI et al. 2000. Improved growth and viability of Lactobacilli in the presence of *Bacillus subtilis* (natto), catalase, or subtilisin. In *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 45, 2000, p. 892-897.

HRČKOVÁ, M. – ŠTURDÍK, E. – MALIAR, T. – ZEMANOVIČ, J. 2004. Biochemické vlastnosti proteolytických enzýmov. In *Chemické listy*, roč. 98, č. 9, 2004, s. 842-850.

HSINO, H. Y. – FODGE, D. W. – LALONDE, J. J. 1993. A novel alkaline protease produced by *Bacillus* and its use in washing compositions. PCT International Application WO 9307, 276, 1993.

HUDECOVÁ, D. – ŠIMKOVIČ, M. 2009. *Mikrobiológia*. Bratislava: STU, 2009, 293 s. ISBN 978-80-227-3194-2.

HUMPREY-SMITH, I. – HECKER, M. 2006. *Microbial proteomics: Functional biology of whole organisms*. Malden: John Wiley and Sons, 2006, 512 p. ISBN 978-0-471-69975-0.

IBRAHIM, C. O. 2008. Development of applications of industrial enzymes from Malaysian indigenous microbial sources. In *Bioresource Technology* [online]. 2008, vol. 99, no. 11 [cit. 2011-3-6] p. 4572-4582. Dostupné na internete: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2007.07.040>>.

JAMES, J. – SIMPSON, B.K. 1996. Application of enzymes in food processing. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 36, no. 5, 1996, p. 437-463.

KAGEYAMA, H. – UEDA, H. - TEZUKA, T. – OGASAWARA, A. – NARITA, Y. – KAYEGAMA, T. – ICHINOSE, M. 2009. Differences in the P1' substrate specificities of pepsin A and chymosin. In *Journal of Biochemistry*, vol. 147, 2010, no. 2, p. 167-174. ISSN 1756-2651.

KALITZ, H. M. 1988. Microbial Proteinases. In *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 36. Enzyme Studies. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1988, p. 3-65. ISBN 3-540-18997-1.

KOBZA, J. 2009. Poľnohospodárske pôdy Slovenska na začiatku 21. storočia. In *Enviromagazín*, roč. 14, 2009, č. 1, s. 18-19.

KRISTINSSON, H. G. – RASCO, B. A. 2000. Fish protein hydrolysates: production, biochemical and functional properties. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 40, 2000, no. 1, p. 43-81.

KUMAR, C. G. – TAKAGI, H. 1999. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. In *Biotechnology Advances*, vol. 17, 1999, p. 561-594.

KUMAR, A. – SHARMA, J. – SAHARAN, M.R. – SINGH, R. 2005. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. In *Process Biochemistry*, vol. 40, 2005, p. 1701-1705.

KUTÍLEK, M. 2008. *Racionálně o globálním oteplování*. Praha: Dokořán, 2008, 185 s. ISBN 978-80-7363-183-3.

KYUNG-KOH, B. – AH-SONG, K. 2008. Effects of trypsin-hydrolyzed wheat gluten peptide on wheat flour dough 2008. In *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. 2008, vol. 88, no. 14 [cit. 2011-3-14] p. 2445-2450. Dostupné na internete: <<http://www.ingentaconnect.com/content/jws/jsfa/2008/00000088/00000014/art00006>>

LEDVINA, M. - STOKLASOVÁ, A. - CERMAN, J. 2005. *Biochemie pro studující medicíny I. díl*. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2005. 274 s.

LEISOLA, M. – JOKELA, J. – PASTINEN, O. – TURUNEN, O. 2010 [online]. Industrial use of enzymes [cit. 1.3.2011]. Dostupné na internete: <http://66.102.9.104/search?q=cache:QiF10yb0330J:www.tkk.fi/Units/BioprocessEngineering/Kem-70.415/INDUSTRIAL_USE_OF_ENZYMES.DOC+way+,producing,+enzyme,proteolytic,Bacillus,submerged+fermentation,+proces&hl=sk&ct=clnk&cd=21&gl=sk&client=firefox-a>.

LIEBERMAN, M. – MARKS, A. D. 2009. *Marks basic medical biochemistry a clinical approach*. Lippincot: William&Wilkins, 2009, 997 p. ISBN 13:978-0-7817-7022-4.

LINK, R. et al. 2003. Mechanizmus pôsobenia probiotík na báze rodu *Bacillus*. In *Rizikové faktory potravinového reťazca III*. Nitra: SPU, 2003, s. 78-83.

LIU, J. H. - MAITY, J. P. – JEAN, J. S. – CHEN, CH. Y. – CHEN, CH. CH. – HO, S. Y. 2010. Biodegradation of benzene by pure and mixed cultures of *Bacillus* spp. In *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 26, 2010, no. 9, p. 1557-1567.

MARK, S. S. - CRUSBERG, T. C. - DACUNHA, CH. M. - DI IORIO, A. A. 2006. A Heavy Metal Biotrap for Wastewater Remediation Using Poly- γ -Glutamic Acid. In *Biotechnology Progress*, vol. 22, 2006, no. 2, p. 523–531. ISSN 1520-6033.

MAURER, HR. 2001. Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. In *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 58, no. 9, 2001, p. 1234-1245.

MAURER, K. H. 2004. Detergent proteases. In *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 15, 2004, p. 330-334.

MICHALÍK, I. et al. 1999. *Biochemické technológie*. Nitra: SPU, 1999, 254 s., ISBN 80-7137-618-3.

MILIČKA, J. – JURKOVIČ, E. – KOPAL, L. 2005. Vplyv prírodných anorganických solí na pasívnu ochranu kovových líniových zariadení. In *Slovgas*, roč. 5, 2005, s. 12-13.

MINH, P. N. – DEVROEDE, N. – MASSANT, J. – MAES, D. – CHARLIER, D. 2009. Insights into the architecture and stoichiometry of *Escherichia coli* Pep A DNA complexes involved in transcriptional control and site-specific DNA recombination by atomic force microscopy. In *Nucleic Acids Research* [online]. 2009, vol. 37, no. 5 [cit. 2011-3-11] p. 1463-1476. Dostupné na internete: <<http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/full/gkn1078>>.

MOTA, M. V. T. – FERREIRA, I. M. P. L. V. O. – OLIVEIRA, M. B. P. – ROCHA, C. - TEIXEIRA J. A. - TORRES D. - GONCALVES M. P. 2006. Trypsin hydrolysis of whey protein concentrates: Characterization using multivariate data analysis. In *Food Chemistry*, vol. 94, 2006, no. 2, p. 278-286. ISSN 0308-8146.

PACE, N. R. 2006. Concept Time for a change. In *Nature*, vol. 441, 2006, p. 289. ISSN 0028-0836.

POLAINA, J. – MAC CABE, A. P. 2007. *Industrial enzymes: structure, function and applications*. Springer publishing, 2007, 641 p. ISBN 978-1-4020-5376-4.

POTUMARTHI, R. – SUBHAKAR, CH. – JETTY, A. 2007. Alkaline protease production by submerged fermentation in stirred tank reactor using *Bacillus licheniformis* NCIM-2042. In *Biochemical Engineering Journal*, vol. 34, no. 2, 2007, p. 185-192.

RAO, M. B. – TANKSALE, A.M. – GHATGE, M. S. – DESHPANDE, V. V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. In *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 62, 1998, no. 3, p. 597-635.

SHARIPOVA, M.R. 2002. Late Stages of Protein Secretion in *Bacilli*. In: *Biochemistry (Moscow)*, vol. 67, 2002, no. 11, p. 1207-1209.

SHROOMBURG, D. – SALZMAN, M. 1991. *Enzyme Handbook 5. Class 3: Hydrolases*. Berlín: Springer-Verlag, 1991.

SMITH, J. E. 2004. *Biotechnology*. Cambridge: Cambridge University Press, 2004, 271 p. ISBN 9780521540773.

SONDERGAARD, H. A. – GRUNERT, K. G. – SCHOLDERER, J. 2005. Consumer attitudes to enzymes in food production. In *Trends in Food Science and Technology*, vol. 16, 2005, no. 10, p. 466-474. ISSN 0921-2244.

SONENSHEIN, A. L. – HOCH, J. A. – LOSICK, R. 2002. *Bacillus Subtilis and Its Closest Relatives: From Genes to Cells*. ASM Press, 2002, 629 p. ISBN 978-1-55581-205-8.

STANO, P. – FIORDEMONDO, D. 2007. Lecithin Based Water-in-Oil compartments as Diving Bioreactors. In *European Journal of Chemical Biology* [online]. 2007, vol. 8, no. 16 [cit. 2011-3-29] p. 1965-1973. Dostupné na internete: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbic.200700112/full>>.

SUMANTHA, A. – LARROCHE, CH. – PANDEY, A. 2006. Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. In *Food Technology and Biotechnology*, vol. 44, 2006, no. 2, p. 211-220. ISSN 1330-9862.

ŠILHÁNKOVÁ, L. 1995. *Mikrobiologie pro potravinaře a biotechnology*. 2.vyd, Praha: Victoria publishing. 1995, 361 s. ISBN 80-8560-71-6.

ŠKÁRKA, B. – FERENČÍK, M. 1987. *Biochémia*. 2 prepracované vydanie Bratislava: Alfa, 1987, 744 s.

ŠKÁRKA, B. – FERENČÍK, M. 1992. *Biochémia*. Bratislava: Alfa, 1992, 846 s. ISBN 80-05-01076-1.

ŠTEVLÍKOVÁ, T. et al. 2002. *Mikrobiológia 1.časť*. 3.vyd., Nitra: SPU, 2002, 130 s. ISBN 80-8069-113-4.

ŠTEVLÍKOVÁ, T. – KAČÁNIOVÁ, M. 2005. *Základy taxonómie baktérií*. Nitra: SPU, 2005, 60 s. ISBN 80-8069-461-3.

ŠTYRIAKOVÁ, I. 2000. Využívanie baktérií rodu *Bacillus* v úprave silikátových surovín. In *Acta Montanistica Slovaca*, roč. 5, 2000, č. 3, s. 297-300.

TAMAGNINI, I. et al. 2008. Generation and Comparison of Bioluminescent and Fluorescent *Bacillus licheniformis*. In *Current Microbiology*, vol. 57, 2008, no. 3, p. 245-250. ISSN 0343-8651.

TODAR, K. 2009 [online]. *Todar's Online Textbook of Bacteriology* [cit. 2011-2-15]. Dostupné na internete: <<http://www.textbookofbacteriology.net/Bacillus.html>>.

URMINSKÁ, D. 1997. *Biotechnológia prípravy bakteriálnych Ser-proteáz a ich biochemická charakteristika: Habilitačná práca*. Nitra: SPU, 1997. 70 s.

URMINSKÁ, D. – SENDREJOVÁ, E. – SZABOVÁ, E. – MICHALÍK, I. 2006. Zvýšenie výživnej kvality zrnín enzymatickou transformáciou In: *Výživná a technologická kvalita rastlinných produktov a ich potravinárske využitie*. Kolektív autorov. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2006. s. 104 – 136. ISBN 80-8069-780-9.

URMINSKÁ, D. – AMBRÓŠ, J. – SZABOVÁ, E. 2010. Minimalizácia zdrojov uhlíka vo vzťahu ku produkcii hydroláz baktériami *Bacillus subtilis* a *Bacillus licheniformis*. In *Potravinárstvo*, roč. 4, 2010, s. 523-536.

VODRÁŽKA, Z. 1992. *Biotechnologie*. Praha: Academia, 1992.

VODRÁŽKA, Z. – RAUCH, P. – KÁŠ, J. 1998. *Enzymologie*. Praha: VSCHT, 1998, 171 s. ISBN 80-7080-330-4.

WAGSTAFF, C. – LEVERENTZ, M. K. – GRIFFITHS, G. – THOMAS, B. - CHANASUT, U. - STEAD, A. D. – ROGERS, H. J. 2002. Cysteine protease gene expression and proteolytic activity during senescence of *Alstroemeria* petals. In *Journal of Experimental Botany*, vol. 53, 2002, no. 367, p. 233-240. ISSN 1460-2431.

WAITES, M. J. – MORGAN, N. J. – ROCKEY, J. S. – HIGTON, G. 2005. *Industrial Microbiology: An Introduction*. Malden: Wiley-Blackwell, 2005, 304 p. ISBN 978-0-632-05307-0.

WANG, J. – XUE, W. – SIMS, A.H. – ZHAO, CH. – WANG, A. – TANG, G. – QIN, J. – WANG, H. 2008. Isolation of four pepsin-like protease genes from *Aspergillus niger* and analysis of the effect of disruptions on heterologous laccase expression. In *Fungal Genetics Biology*, vol. 45, no. 1, 2008, p. 17 – 27.

WEYENS, N. - LELIE, D. - TAGHAVI, S. - NEWMAN, L. - VANGRONSVELD, J. 2009. Exploiting plant-microbe partnerships to improve biomass production and remediation. In *Trends in Biotechnology* [online]. 2009, vol. 27, no. 10 [cit. 2011-4-5] p. 591-598. Dostupné na internete: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TCW-4X0M17X-1&_user=3838281&_coverDate=10%2F31%2F2009&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=gateway&_origin=gateway&_sort=d&_docanchor=&view=c&_searchStrId=1707949904&_rerunOrigin=scholar.google&_acct=C000061504&_version=1&_urlVersion=0&_userid=3838281&md5=eeb80de9a5333a8cca00b8f7839c500b&searchtype=a>.

ZAKHAROVA, E. – HORVATH, M. P. – GOLDENBERG, D. P. 2009. Structure of a serine protease poised to resynthesize a peptide bond. In *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2009, vol. 106, no. 27 [cit. 2011-3-24] p. 11034-11039. Dostupné na internete: <<http://www.pnas.org/content/106/27/11034.full#abstract-1>>.

ZANG, S. – LIAN, B. – WANG, J. – YANG, Y. 2010. Biodegradation of 2-naphthol and its metabolites by coupling *Aspergillus niger* with *Bacillus subtilis*. In *Journal of Environmental Sciences*, vol. 22, 2010, no. 5, p. 669-674. ISSN 1001-0742.

URL zdroj:

URL 1: <[http:// lamda.uio.no/lamda.html](http://lamda.uio.no/lamda.html)> [cit. 2011-2-16].