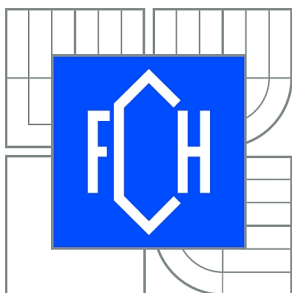




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

VYBRANÉ MIKROBIÁLNÍ PROCESY V BIOREAKTORU

SELECTED MICROBIAL PROCESSES IN A BIOREACTOR

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. LUCIE KLINKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc.Ing.Martin Mandl, CSc.

BRNO 2014



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0827/2013	Akademický rok: 2013/2014
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Lucie Klinková	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	doc.Ing.Martin Mandl, CSc.	
Konzultanti:		

Název diplomové práce:

Vybrané mikrobiální procesy v bioreaktoru

Zadání diplomové práce:

Práce ověřuje dlouhodobé metabolické studie s bakteriemi a kvasinkami a bude zaměřena na dva typy bioprocusů:

1. Produkce mutantního proteinu kvasinkou *Pichia pastoris*.
2. Oxidace síry bakterií *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Ad 1: Bude studován výtěžek procesu heterologní exprese genu pro mutantní formy kryptogeinu v závislosti na aeraci a teplotě. Kromě kvantitativního hodnocení bude sledována i kvalita proteinu (3-D struktura).

Ad. 2: Aerobní a anaerobní oxidace síry v bioreaktoru, sledování buněčného obsahu ATP v kultuře a tvorby produktu jako indikátorů růstu biomasy a oxidace substrátu.

Metodicky se uplatní: studium bioprocusu v bioreaktoru, exprese vybraného mutantního proteinu a jeho purifikace pomocí FPLC, bioluminiscenční stanovení buněčného obsahu ATP, monitorování hladiny rozpuštěného kyslíku a zákalu buněk, izotachoforetická analýza síranů, fotometrické stanovení iontů Fe(II).

Po zpracování naměřených výsledků bude následovat jejich diskuse.

Termín odevzdání diplomové práce: 9.5.2014

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Lucie Klinková
Student(ka)

doc.Ing.Martin Mandl, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2014

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

Tato práce vznikla za podpory projektu BiochemNet - Vytvoření sítě pro podporu spolupráce biomedicínských pracovišť a zvýšení uplatnitelnosti absolventů biochemických oborů v praxi (registrační číslo CZ.1.07/2.4.00/31.0133). Projekt je realizován v rámci Operačního programu vzdělávání pro konkurenceschopnost, který je spolufinancovaný z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu ČR.

BiochemNet 



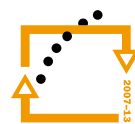
evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

ABSTRAKT

Tato diplomová práce je zaměřena na monitorování průběhu mikrobiálních kultur v bioreaktoru a hodnocení bioprocessu. Je rozdělena do dvou částí.

První část se zabývá produkcí mutantní formy proteinu cryptogeinu kvasinkou *Pichia pastoris*. Teoretická část shrnuje poznatky o kvasince *P. pastoris* a její expresi. Dále se zabývá cryptogeinem, který vyvolává obranné reakce u rostlin. V Experimentální části byla vyprodukována mutantní forma cryptogeinu X24, u které byla stanovena koncentrace jednotlivých frakcí a schopnost přenosu sterolů.

Druhá část této práce je zaměřena na aerobní a anaerobní oxidaci síry bakterií *Acidithiobacillus ferrooxidans*. V teoretické části jsou shrnuty poznatky o bakterii *A. ferrooxidans*, jejím metabolismu a významu ATP pro metabolismus. V experimentální části byl tento bioprocess monitorován pomocí pH, koncentrace biomasy, rychlosti oxidace síry a buněčného obsahu ATP.

ABSTRACT

This thesis focuses on the study of the influence of selected parameters on the course of microbial cultivation and evaluation of bioprocess. It is divided into two parts.

The first part deals with the production of mutant forms of the protein cryptogein yeast *Pichia pastoris*. The theoretical part summarizes the findings of the yeast *P. pastoris* and its expression. It also deals with cryptogein that induces defense reactions in plants. In the experimental part was produced mutant cryptogein X24, in which the concentration of each fraction and the ability to transfer sterols.

The second part of this thesis is focused on aerobic and anaerobic oxidation of elemental sulfur by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. In the theoretical section, our knowledge on *A. ferrooxidans*, its metabolism and the importance of ATP in cell metabolism was summarized. In the experimental part, the above bioprocess was monitored using pH, biomass concentration, the rate of oxidation of elemental sulfur the cellular ATP content.

KLÍČOVÁ SLOVA

Pichia pastoris, mutantní protein, cryptogein, fermentace, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, chemiluminiscence, ATP

KEYWORDS

Pichia pastoris, mutant protein, cryptogein, fermentation, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, chemiluminiscence, ATP

KLINKOVÁ, L. *Vybrané mikrobiální procesy v bioreaktoru*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 63 s. Vedoucí diplomové práce doc.Ing.Martin Mandl, CSc..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:

Chtěla bych tímto poděkovat vedoucímu mé diplomové práce doc. Ing. Martinu Mandlovi, CSc. dále Mgr. Evě Pakostové, Mgr. Michalu Obořilovi a Mgr. Jířímu Kučerovi, Ph.D. za odborné vedení, vstřícnost, cenné rady a připomínky při zpracování výsledků a tvorbě této diplomové práce.

OBSAH

1 ÚVOD	11
2 TEORETICKÁ ČÁST	12
2.1 Produkce mutantního proteinu kvasinkou <i>Pichia pastoris</i>	12
2.1.1 Kvasinka <i>Pichia pastoris</i>	12
2.1.2 Metabolismus kvasinky.....	13
2.1.3 Extracelulární exprese	13
2.1.4 Expresní vektor pPIC9	13
2.1.5 Elicitory	15
2.1.6 Elicitiny	15
2.1.7 Cryptogein.....	15
2.1.7.1 Mutantní formy cryptogeinu	16
2.1.8 Obranné reakce.....	17
2.1.8.1 Fytoalexiny.....	17
2.1.8.2 PR proteiny.....	17
2.1.8.3 Systémově získaná rezistence (SAR).....	18
2.1.9 Interakce mezi rostlinou a patogenem.....	18
2.2 Oxidace síry bakterií <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	19
2.2.1 Bakterie <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	19
2.2.2 Taxonomické zařazení.....	20
2.2.3 Výskyt	20
2.3 Metabolismus bakterie	21
2.3.1 Zdroj uhlíku a dusíku	21
2.3.2 Aerobní metabolismus.....	21
2.3.2.1 Oxidace železa.....	21
2.3.2.2 Oxidace síry a sirných sloučenin.....	22
2.3.3 Anaerobní metabolismus.....	23
2.3.4 ATP u <i>A. ferrooxidans</i>	24
2.3.5 Chemiluminiscence	25
2.3.5.1 Reakční systém luciferin – luciferasa.....	26
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
3.1 Produkce mutantního proteinu kvasinkou <i>Pichia pastoris</i>	27
3.1.1 Mikroorganismus	27
3.1.2 Media.....	27
3.1.3 Kultivace kvasinky.....	28
3.1.4 Fermentace	28
3.1.5 Purifikace cryptogeinu	29
3.1.6 Stanovení koncentrace jednotlivých frakcí proteinu	30
3.1.7 Přenos sterolů	30
3.2 Oxidace síry bakterií <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	31
3.2.1 Mikroorganismus	31

3.2.2	Media a kultivace bakterií	31
3.2.2.1	Kultivace bakterií na 9K mediu	33
3.2.2.2	Kultivace bakterií na speciálním mediu	34
3.2.3	Analytické metody – aerobní kultivace.....	35
3.2.4	Analytické metody – anaerobní kultivace	36
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	38
4.1	Produkce mutantního proteinu kvasinkou <i>Pichia pastoris</i>	38
4.1.1	Růstová fáze na glycerolu	38
4.1.2	Expresní fáze na metanolu	38
4.1.3	Celkový průběh fermentace v bioreaktoru	39
4.1.4	Purifikace mutantního cryptogeinu	40
4.1.5	Stanovení koncentrace jednotlivých frakcí proteinu	41
4.1.6	Přenos sterolů	42
4.2	Oxidace síry bakterií <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	43
4.2.1	Aerobní.....	43
4.2.1.1	Vliv úpravy (zvýšení) pH a přídavku substrátu ve stacionární fázi růstu bakteriální kultury	43
4.2.1.2	Vlivu úpravy (zvýšení) pH v lineární fázi růstu bakteriální kultury	48
4.2.2	Anaerobní	51
4.2.2.1	První experiment	51
4.2.2.2	Druhý experiment.....	53
5	ZÁVĚR	55
5.1	Produkce mutantního proteinu kvasinkou <i>Pichia pastoris</i>	55
5.2	Oxidace síry bakterií <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	55
5.2.1	Aerobní proces	55
5.2.2	Anaerobní proces.....	55
6	ZDROJE	56
7	SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK.....	60
	<i>Obrázky:</i>	60
	<i>Tabulky:</i>	61
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	62

1 ÚVOD

Tato práce se zabývá studiem vlivu vybraných parametrů mikrobiální kultivace na průběh a hodnocení bioproduktu. První část se zaměřuje na produkci mutantního proteinu kvasinkou *Pichia pastoris* a druhá část je zaměřena na oxidaci síry bakterií *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

Kvasinka *P. pastoris* je eukaryotní organismus, který se pro své vhodné vlastnosti využívá k produkci mutantních proteinů.

Dříve se k těmto účelům používala bakterie *Escherichia coli*. Tato bakterie byla používána zejména pro svoji snadnou kultivovatelnost, nízkou cenu a snadnou manipulovatelnost. Ovšem tento organismus postrádá endoplasmatické retikulum a Golgiho systém a tím pádem jí i chybí možnost postranslačních modifikací [1].

Jako první eukaryotní organismus pro produkci expresních systémů byla používána kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*. Tato kvasinka ovšem díky svým nízkým výtěžkům rekombinantních proteinů nebyla vhodná, proto se začala používat methylotrófní kvasinka *P. pastoris*. Nízké výtěžky jsou způsobeny tím, že kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* produkuje etanol, který při dosažení určité hladiny působí jako inhibitor růstu [1].

Vyšší výtěžky u *P. pastoris* nejsou ovšem jediným důvodem, proč byla *S. cerevisiae* nahrazena právě touto kvasinkou. Dalšími výhodami je i malá sekrece nativních proteinů a silně indukční promotor, který umožňuje oddělit růstovou a produkční fázi [1].

Mutantní formy cryptogeinu jsou tedy produkovány pomocí kvasinky *P. pastoris*. Cryptogein je protein, který patří do skupiny elicitinů. Je spouštěčem obranných reakcí, které vedou až k nekróze tkání a je schopen přenášet celou řadu lipidních látek jako jsou například steroly a mastné kyseliny. Díky počítačovému modelování bylo navrženo několik mutantů tohoto proteinu. Tyto mutantní formy mají omezenou schopnost vázat steroly a mastné kyseliny [2].

Jak již bylo zmíněno, druhá část této práce je zaměřena na oxidaci síry bakterií *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

A. ferrooxidans je acidofilní, chemolitotrofní, fakultativně anaerobní bakterie, která vykazuje toleranci k relativně vysokým koncentracím (více než 300 mM) těžkých kovů jako je Ni, Cu, Zn, Cd, Cr Ni [3].

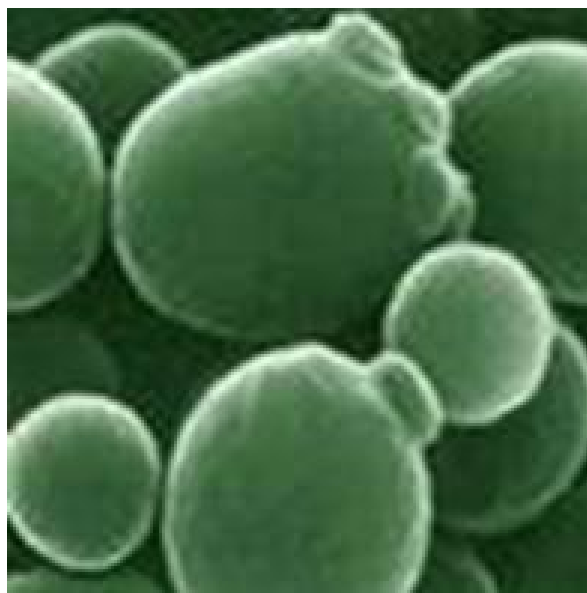
Oxidace síry na kyselinu sírovou pomocí bakterie *A. ferrooxidans* je důležitý proces v biooxidaci sulfidových minerálů. Tento proces je využívána v biohydrometalurgii při loužení kovů z chudých sulfidických rud, u nichž by klasický způsob těžby nebyl výhodný po ekonomické stránce [4].

Bakterie *A. ferrooxidans* díky svému oxidačnímu metabolismu přispívá ke zrychlení některých chemických procesů vedoucích k okyselení prostředí, což má za následek migraci těžkých kovů [4].

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Produkce mutantního proteinu kvasinkou *Pichia pastoris*

2.1.1 Kvasinka *Pichia pastoris*



Obr. 1: Kvasinka *Pichia pastoris*

Kvasinka *P. pastoris* (Obr. 1) patří mezi eukaryotické buňky, které lze zařadit do skupiny metylotrofů. Ve své vnitrobuněčné struktuře obsahuje endoplazmatické retikulum a Golgiho aparát, díky těmto organelám je schopna provádět skládání proteinů tzv. folding a posttranslační modifikace. Oproti jiným eukaryotám je však jednodušší a efektivnější. Velkou výhodou této kvasinky je její schopnost rychlost množení, růstu do vysokých koncentrací, možnost regulace exprese a schopnost sekretovat proteiny do vnějšího media. *Pichia pastoris* je jednou z kvasinek, které se využívají k produkci mutantních proteinů [5].

Taxonomické zařazení této kvasinky je uvedeno v Tab. 1.

Tab. 1: Taxonomické zařazení kvasinky

Doména	Houby
Kmen	Ascomycota
Třída	Saccharomycetes
Řád	Saccharomycetales
Čeleď	Sacchaomycetaceae
Rod	<i>Pichia</i>
Druh	<i>Pichia pastoris</i>

2.1.2 Metabolismus kvasinky

P. pastoris je jednou z kvasinek, která je schopna metabolizovat metanol jako jediný zdroj uhlíku. Další známé kvasinky s touto schopností jsou *Candida*, *Hansenula* a *Torulopsis*.

Metabolismus metanolu probíhá v několika krocích za přítomnosti jedinečných enzymů.

Prvním krokem je oxidace metanolu na formaldehyd a peroxid vodíku. Tento krok je katalyzován enzymem alkoholoxidázou (AOX), který je homo-oktamer, každá jeho podjednotka váže nekovalentně kofaktor FAD. Tento enzym je v *P. pastoris* kódován dvěma geny, a to AOX1 a AOX2. Produkt genu AOX1 tvoří většinu alkoholoxidázové aktivity v buňce. Buňky obsahující tento gen jsou označovány jako Mut⁺ (metanol utilization plus) naopak buňky obsahující gen AOX2, který má z 97 % shodnou strukturu jako AOX1, mají daleko pomalejší růst na metanolu a jsou označovány jako Mut^S (metanol utilization slow) [5].

Vzniklý peroxid vodíku se dále rozkládá na vodu a molekulární kyslík. Aby nedocházelo k hromadění toxického peroxidu vodíku v buňkách, probíhá tento děj ve speciálních organelách – peroxizomech [5].

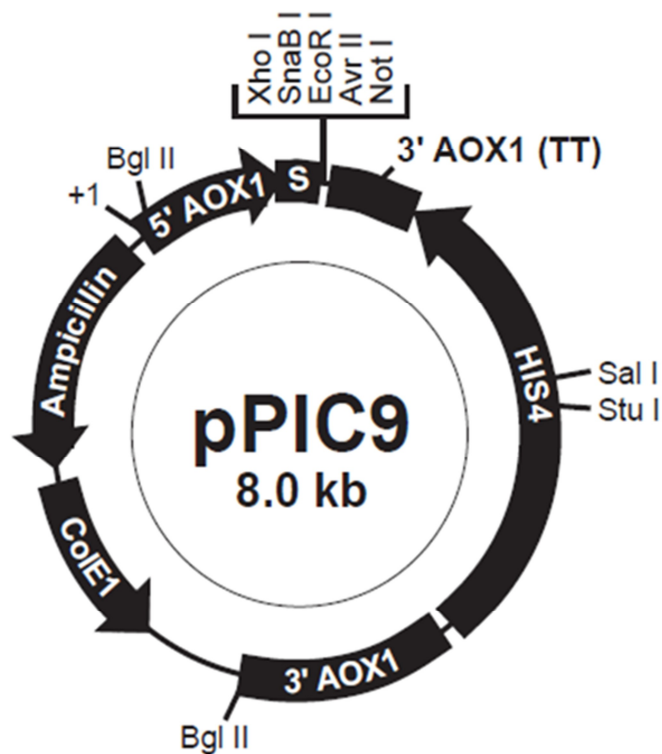
2.1.3 Extracelulární exprese

Expres v kvasince *P. pastoris* může být jak intracelulární, tak i extracelulární. *P. pastoris* je schopna sekretovat produkované proteiny do vnějšího media. Velkou výhodou je to, že kvasinka sekretuje pouze malé množství vlastních proteinů, to nám umožňuje získat medium, které obsahuje vysoké množství exprimovaného proteinu. K extracelulární expresi je nejčastěji využíván vektor pPIC9 [6, 7].

2.1.4 Expresní vektor pPIC9

Expresní vektory jsou používány pro včlenění rekombinantního genu do genomu hostitele. Expresní vektor pPIC9 je využíván pro extracelulární expresi a fenotyp Mut⁺ za použití α -faktor sekrečního signálu kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*.

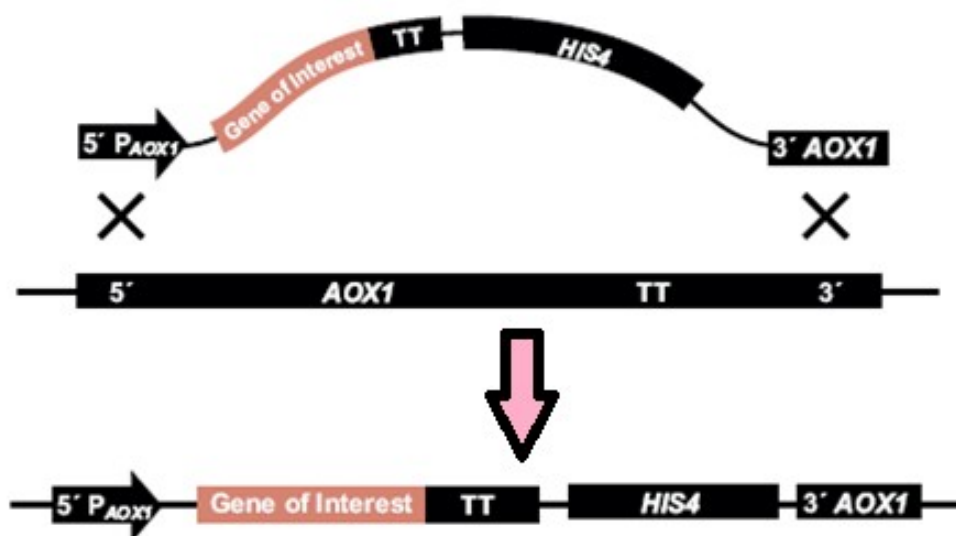
Vektor pPIC9 obsahuje promotor AOX1, gen AOX1 a gen HIS4 a gen rezistence na ampicilin. Kmen kvasinky *P. pastoris* GS115 neobsahuje gen pro HIS4, umožňující syntézu histidinu. Pokud jsou buňky pěstovány na histidin deficitním mediu, přežijí jen ty buňky, u kterých byla transformace provedena úspěšně [5, 6].



Obr.2: Expresní vektor pPIC9[6]

Klonovací vektor je nutné před transformací do kvasinky linearizovat. Linearizace se provádí pomocí restričních endonukleáz SacI, která štěpí vektor jen na jednom místě. Po linearizaci dojde k začlenění vektoru do genomu kvasinky.

Linearizovaný plazmid se může do genomu začlenit dvěma způsoby. Buď genovou inzercí, tento způsob vede k tandemové několikanásobné inzerci, nebo nahrazením stávajícího genu, což vede většinou jen k jednomu včlenění [6, 7].



Obr.3: Integrace vektoru do genomu [6]

2.1.5 Elicitory

Elicitory jsou monomerní, oligomerní nebo polymerní látky, které produkují patogenní organismy do prostředí. Jsou schopny vyvolávat obranné reakce u rostlin. Mohou být lipidické látky, proteiny, oligosacharidy, glykoproteiny nebo i oligochitosacharidy. Elicitory můžeme rozdělit na exogenní, nebo endogenní. Exogenní elicitory jsou metabolity, které jsou vylučovány patogenem, jsou to zejména polysacharidy, specifické enzymy a peptidy. Můžeme je zařadit jak mezi specifické – produkty genu a virulence, tak i nespecifické – části buněčné stěny. Mezi endogenní elicitory patří látky uvolňované při narušení buněčné stěny rostliny nebo patogenu. Tyto elicitory se řadí mezi nespecifické [9, 8].

2.1.6 Elicitiny

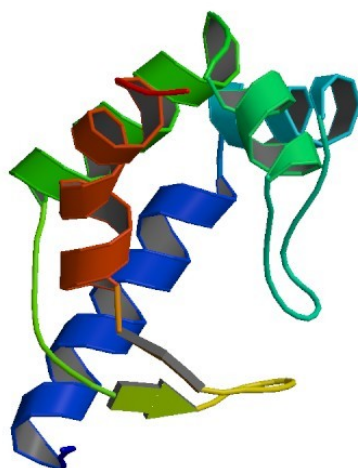
Elicitiny jsou malé proteinové elicitory, které jsou tvořeny 98 aminokyselinami a obsahují jen malé množství tryptofanu, histidinu, argininu, naopak serinu a threoninu obsahují hodně. Tyto proteiny obsahují tři disulfidické můstky a jejich molekulová hmotnost je 10 kDa. Jsou syntetizovány oomycetami rodů *Phytophthora* a *Pythium*. Elicitiny produkuje asi 30 druhů rodu *Phytophthora*. Elicitiny lze rozdělit do dvou skupin, toto dělení je prováděno na základě pI a to na kyselé α -elicitiny (pI<5) a bazické β -elicitiny (pI>7,5). β -elicitiny jsou obecně méně rozšířené, ale zato mají vyšší schopnost nekrotických účinků než α -elicitiny [10].

2.1.7 Cryptogein

Cryptogein je v přírodě produkován houbou *Phytophthora cryptogea*. Jedná se o β -elicitin jehož pI=9,8. Cryptogein slouží jako přenašeč sterolů a mastných kyselin mezi fosfolipidovými membránami. Tento elicitor nevykazuje žádnou proteasovou, β -glukanasovou, fosfolipasovou ani jinou enzymovou aktivitu [2].

Pomocí Rentgenové difrakce krystalu a NMR spektroskopie byla určena struktura cryptogeinu. Cryptogein je složen z pěti α -helixů, β -skládaného listu a ω -smyčky. Tyto struktury jsou spojeny vodíkovými vazbami a třemi disulfidickými můstky. Uvnitř struktury je hydrofobní dutina propojená s povrchem proteinu tunelem. Tato hydrofobní dutina slouží k vazbě sterolu a je tvořena tyrosinovými a fenylalaninovými zbytky [2].

Cryptogein je vázán na vysoce afinitní místo, které se nachází v malém počtu na plasmatické membráně. Toto místo je tvořeno komplexem, který se skládá ze dvou N-glykoproteinů o různé molekulové hmotnosti. Cryptogein je vázán N-glykosidovou vazbou na cukernou složku proteinu [2].



Obr.4: Struktura cryptogeinu[11]

2.1.7.1 Mutantní formy cryptogeinu

Pomocí molekulového modelování byly, pro objasnění vlivu vazby lipidů na biologickou aktivitu, navrženy mutantní formy proteinů se změněnou schopností vázat mastné kyseliny a steroly. Molekulovým modelováním bylo zjištěno, že pokud se v místě Ω -smyčky zamění zbytky aminokyselin za objemová rezuidá, dojde k vyvolání podobných konformačních změn jako při vazbě sterolu do kavity. Jelikož jsou zřejmě tyto změny propojeny se spuštěním brzkých ochranných mechanismů rostliny, byly všechny mutace navrženy mimo oblast Ω -smyčky [2].

Na základě molekulového modelování byly navrženy tyto mutantní formy:

K13V

Jedná se o mutantní formu cryptogeinu, ve které je na 13 pozici vyměněn polární leucin za nepolární valin. Tato výměna způsobuje změnu pI proteinu [2].

V84F

Tento mutant má na pozici 84 valin nahrazen fenylalaninem. Této mutace má za následek to, že takto pozměněný protein upřednostňuje vazbu mastné kyseliny před sterolem [2].

L41F

U tohoto mutantního proteinu byl na pozici 41 vyměněn nepolární leucin za hydrofobní fenylalanin. Tento druh mutace způsobuje to, že dochází ke snížení schopnosti vázat mastné kyseliny, ale schopnost vázat steroly se nemění [2].

V84L41F

Tato mutantní forma proteinu je kombinací mutantů V84F a L41F. Tato pozměněná forma proteinu by neměla vázat ani sterol, ani mastné kyseliny [2].

2.1.8 Obranné reakce

Po navázání elicitoru na receptory v plazmatické membráně dochází k rané obranné fázi.

Raná obranná fáze je zahájena do několika minut po napadení. V této fázi dochází k depolarizaci plazmatické membrány a otevírání iontových kanálů. Ionty Ca^{2+} a H^+ přecházejí ven z buňky a ionty K^+ a Cl^- dovnitř. V cytoplazmě se mění pH, fosfolipázy a proteinokinázy jsou aktivizovány, Aktivizované fosfolipázy a proteinokinázy spolu s Ca^{2+} ionty aktivují NADPH-oxidázu a dochází k produkci aktivních forem kyslíku (AOS) [9, 12].

AOS jsou velmi reaktivní sloučeniny vznikající po rozeznání patogenního organismu a zahájení obranné reakce. Při jejich reakci vznikají jak neradikálové molekuly obsahující kovalentní vazbu, tak i jiné radikálové produkty. AOS se účastní elektronových přenosů a enzymových reakcí v redoxním systému. Tyto sloučeniny jsou produkovány pouze v nízkých koncentracích, které jsou regulovány antioxidačními mechanismy. Mezi AOS řadíme superoxidový anion O_2^- a peroxid vodíku H_2O_2 , které jsou škodlivé jak pro patogen, tak i pro rostlinu, protože při peroxidaci lipidů jsou rozrušovány biologické membrány a tím dochází k buněčné smrti [12].

Produkcí AOS v místě vstupu patogenu do rostliny je způsobena hypersenzitivní buněčná reakce (HR). Výsledkem HR po navázání elicitoru na receptory je nekróza buněk v místě průniku patogenu a jsou aktivovány další obranné mechanismy. Tato řízená nekróza infikovaných buněk zabraňuje dalšímu šíření infekce a může dojít i k úplné likvidaci patogenu [12].

Několik hodin po napadení patogenem následuje pozdní obranná fáze. V této fázi dochází ke zvýšené tvorbě signálních molekul, kterými jsou ethylen, kyselina salicylová a kyselina benzoová, expresi fytoalexinů a PR proteinů (Pathogenesis-related proteins) [12, 13].

2.1.8.1 *Fytoalexiny*

Fytoalexiny jsou lipofilní látky, patřící do skupin izoflavonoidů, seskviterpenů, diterpenů, kumarinů a derivátů etylenu, které mají antimikrobiální účinek. Tyto látky jsou v buňkách tvořeny pouze v okolí napadení buňky. V některých rostlinách jsou fytoalexiny kumulovány v neaktivní formě ve vakuolách, ze kterých se při napadení patogenem uvolňují. Fytoalexiny jsou pro patogen toxické již při velmi nízkých koncentracích [9, 14].

2.1.8.2 *PR proteiny*

PR proteiny byly objeveny v sedmdesátých letech 20. století v listech tabáku. Jedná se o různorodou skupinu proteinů, které se ve zdravých rostlinách nevyskytují. Po kontaktu s patogenem dochází k expresi PR proteinů. PR proteiny se nenacházejí pouze v místě napadení patogenem, ale v celé rostlině. Hromadění PR proteinů je zodpovědné za vznik SAR. Obranná funkce PR proteinů je především v omezení množení a šíření patogena [14].

Podle sekvence aminokyselin a biologické funkce byly PR proteiny rozděleny do 14 tříd (Tab. 2). Některé PR proteiny můžeme zařadit mezi chitinázy nebo β -glukanázy. Pomocí těchto proteinů jsou rozrušovány buněčné stěny hub, dochází k inhibici růstu a zamezení šíření patogenu. Produkují fragmenty buněčné stěny, které působí jako nespecifické elicitory [15].

PR proteiny se v buňce vyskytují buď ve vakuolách, nebo v appoplastu, ten je hlavním místem jejich hromadění. Kromě těchto dvou míst lze také tyto proteiny najít v primární a sekundární buněčné stěně napadených buněk a také na vnitřní straně buněčné stěny. PR proteiny se vyskytují v kořenech, stoncích, listech, květech i semenech rostlin, ovšem nejhojnější zastoupení těchto látek je v listech, kde mohou obsahovat až 10 % z celkového množství proteinů [15].

Tab.2: Rozdělení PR proteinů do jednotlivých tříd [15]

Třída PR proteinu	Výskyt	Aktivita PR proteinu
PR-1	Tabák	Neznámá
PR-2	Tabák	Glukanázová
PR-3	Tabák	Chitinázová
PR-4	Tabák	Chitinázová
PR-5	Tabák	Thaumatín
PR-6	Rajče	Inhibice proteáz
PR-7	Rajče	Endoproteázová
PR-8	Okurka	Chitinázová
PR-9	Tabák	Peroxidázová
PR-10	Petržel	Ribonukleázová
PR-11	Tabák	Chitinázová
PR-12	Ředkev	Defensin
PR-13	<i>Arabidopsis</i>	Thionin
PR-14	Ječmen	Protein přenášející lipidy

2.1.8.3 Systémově získaná rezistence (SAR)

Systémově získaná rezistence je fyziologický stav organismu. Jedná se o zvýšenou obranyschopnost proti širokému spektru patogenů, která je vyvolaná pouze jedním patogenem. SAR nemusí být zahájena jen rozpoznáním genu antivirulence, ale také pomocí endogenních elicitorů, abiotickým stresem a některými chemikáliemi. Tato obranyschopnost je lokalizována v celé rostlině. Signální molekulou spojenou se vznikem SAR je kyselina salicylová, u které bylo prokázáno několik funkcí, které jsou přímo spojeny se vznikem SAR. Maximální hladina PR proteinů je v rostlině asi druhý den po napadení patogenem. Zvýšené množství těchto proteinů zůstává v rostlině i několik měsíců, během této doby má rostlina zvýšenou odolnost vůči patogenům. Nevýhodou SAR je, že rostlina nebývá až do prvního styku s patogenem chráněna. To je z důvodu, že rostlina raději upřednostňuje růst před energeticky a látkově náročným udržováním funkčního obranného aparátu [9, 16].

2.1.9 Interakce mezi rostlinou a patogenem

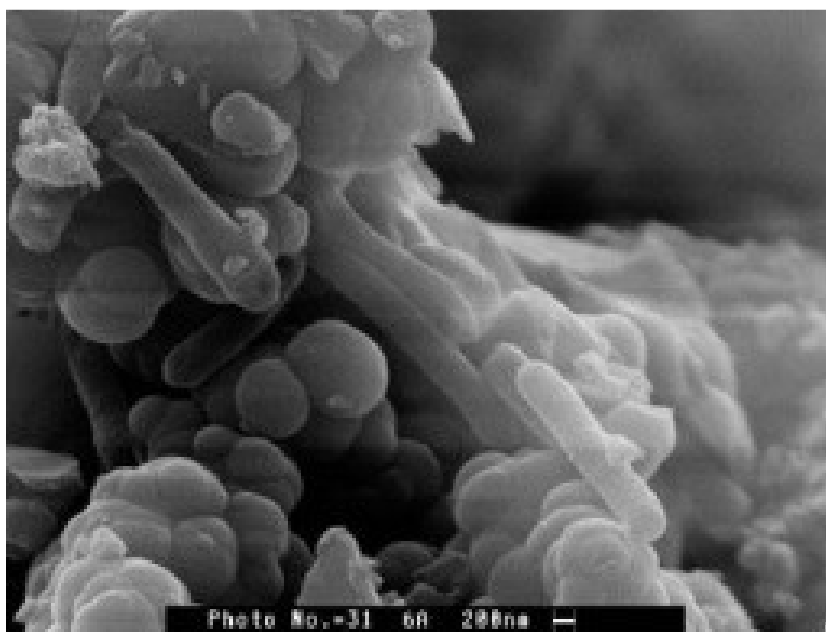
Rostliny jsou napadány okolními patogeny. Proti těmto organismům se rostliny brání různými obrannými mechanismy, kterými daný patogen rozpoznají a zvolí vhodnou obranou reakci. Jedním z obranných mechanismů je tzv. pasivní ochrana. Tento mechanismus se snaží

zabránit vniknutí patogenů do buněk. K tomu mu pomáhá vnější bariéra, kterou není organismus schopný překonat, a antimikrobiální látky na povrchu. Dalším obranným mechanismem je aktivní obrana. Tato obrana je založena na rozpoznání elicitorů rostlinnou buňkou. Elicitor po navázání na membránový receptor spustí celou řadu obranných reakcí [2].

Model „gene-for-gene“ určuje, že rostlina je rezistentní, pokud obsahuje gen rezistence a patogen má daný gen antivirulence (elicitor). Mezi rostlinou a patogenem tedy existuje inkompatibilita. Rostlina rozpozná, že ji napadl patogen a může zahájit obranné reakce. Pokud ale patogen obsahuje gen virulence, rostlina jej není schopna rozpoznat a rostlina je tím patogenem napadena. V tomto případě je mezi patogenem a rostlinou kompatibilita [2].

2.2 Oxidace síry bakterií *Acidithiobacillus ferrooxidans*

2.2.1 Bakterie *Acidithiobacillus ferrooxidans*



Obr. 5: Bakterie *Acidithiobacillus ferrooxidans* [17]

Acidithiobacillus ferrooxidans (Obr.5) je Gram negativní, nesporulující bakterie, která má tvar tyčinky, o průměru 0,3 – 0,5 μm a délce 1,0 – 1,7 μm , s polárně umístěným bičíkem a slizovitým pouzdrém [18].

A. ferrooxidans lze zařadit mezi acidofilní – roste při pH 1,0 – 6,0 (pH optimum 1,5 – 2,5), mezofilní – teplotní optimum 28 – 35°C, obligátně autotrofní – jako zdroj uhlíku využívá vzdušný CO₂. Energii získává oxidací Fe²⁺ a redukovaných anorganických sírných sloučenin (sulfidů, síry, tetrathionanu, thiosíranu a dalších). Tato bakterie může také oxidovat Cu⁺ a Se²⁻, molekulární vodík a kyselinu mravenčí. *A. ferrooxidans* dokáže růst kromě aerobního

prostředí, kterému dává přednost, i v anaerobním prostředí, v tomto případě jsou jako akceptor elektronů využívány nejčastěji Fe^{3+} ionty [18].

Bakterie *Acidithiobacillus ferrooxidans* je právě díky svým schopnostem oxidovat železo a sloučeniny síry využívána v biohydrometalurgii při loužení kovů z chudých sulfidických rud, u nichž by klasický způsob těžby nebyl výhodný po ekonomické stránce [4].

2.2.2 Taxonomické zařazení

V roce 1947 byla poprvé z kyselých důlních vod izolována bakterie, která oxidovala železo. Tento kmen byl roku 1951 pojmenován jako *Thiobacillus ferrooxidans*, až později se zjistilo, že je tento kmen schopný oxidovat i síru. V roce 2000 byly vyčleněny z rodu *Thiobacillus* nové skupiny, kterými byly *Acidithiobacillus*, *Halothiobacillus* a *Thermithiobacillus*. Toto vyčlenění bylo uskutečněno na základě analýzy 16S rRNA. Do nově vytvořeného rodu *Acidithiobacillus* byl zařazen mimo jiné i kmen *Thiobacillus ferrooxidans* [19]. V roce 2013 byla na základě multiproteinové fylogenetické analýzy třída *Gammaproteobacteria* přejmenována na *Acidithiobacillia* jak je uvedeno v Tab. 3 [20].

Tab. 3: Taxonomické zařazení *A. ferrooxidans* [20]

Říše	Bacteria
Kmen	Proteobacteria
Třída	Acidithiobacillia
Řád	Acidithiobacillales
Čeď	Acidithiobacillaceae
Rod	<i>Acidithiobacillus</i>
Druh	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>

2.2.3 Výskyt

Bakterie *A. ferrooxidans* se vyskytuje v prostředí sopečných a geotermálních oblastí a také v důlních drenážních vodách AMD – acid mine drainage a v kyselých skalních vodách ARD [21].

AMD jsou vypouštěny z nevyužívaných rudných a uhelných dolů a minerálních hlušín. Tyto vody mají často vysokou koncentraci rozpuštěného železa a síranů. To je způsobeno oxidativním rozpuštěním sulfidických minerálů, zejména pyritu [21].

V České republice nenalezneme přirozené lokality sopečné a geotermální činnosti, ale je tu mnoho oblastí, které jsou zdrojem okyselování prostředí a to díky mnoholeté těžbě a industrializaci krajiny. Místa, kde se bakterie *A. ferrooxidans* vyskytuje, jsou například uranové doly v Českomoravské vrchovině, doly ve Zlatých Horách na Jesenicku, okolí Kutné Hory, Horního Benešova a Horního Města [21].

2.3 Metabolismus bakterie

A. ferrooxidans je chemolitotrofní organismus, který je schopen získávat energii uvolněnou při oxidaci anorganických sloučenin, molekulárního vodíku nebo kyseliny mravenčí. Energie získaná touto oxidací, spolu s NADH a NADPH, která je vázána ve formě ATP a kterou bakterie získala aerobní nebo anaerobní respirací, je mikroorganismy využívána k asimilaci uhlíku a dusíku a následných anabolických reakcí [22].

2.3.1 Zdroj uhlíku a dusíku

Jako zdroj uhlíku využívá *A. ferrooxidans* CO₂, který je asimilován v Calvinově cyklu. Limitujícím faktorem pro růst bakterií je koncentrace CO₂. Bakterie na nedostatek CO₂ reaguje tím, že zvýší celulární koncentraci enzymu RUBISCO [4].

U *A. ferrooxidans* byla zjištěna schopnost vázat kromě amonných iontů i vzdušný N₂. U této bakterie byla roku 1977 prokázána přítomnost enzymu nitrogenasa (*nif*HDK), který slouží jako katalyzátor při asimilaci dusíku. Aktivita nitrogenasy je však inhibována kyslíkem. Nitrogenasu je tedy třeba chránit a k tomu se využívá respirační ochrana. Její princip spočívá v tom, že je udržována hladina kyslíku na tolerovatelné úrovni a to pomocí jeho odstraňování cytochromoxidasou, u *A. ferrooxidans* je to cytochrom *bd*, který slouží k redukci O₂ na H₂O [4].

2.3.2 Aerobní metabolismus

Jako aerobní oxidace u *A. ferrooxidans* je brán především metabolismu Fe²⁺, síry a sirmých sloučenin. Ovšem byla pozorována i oxidace jiných kovů – Zn²⁺, Pb²⁺, As³⁺, Cu¹⁺ a dalších.

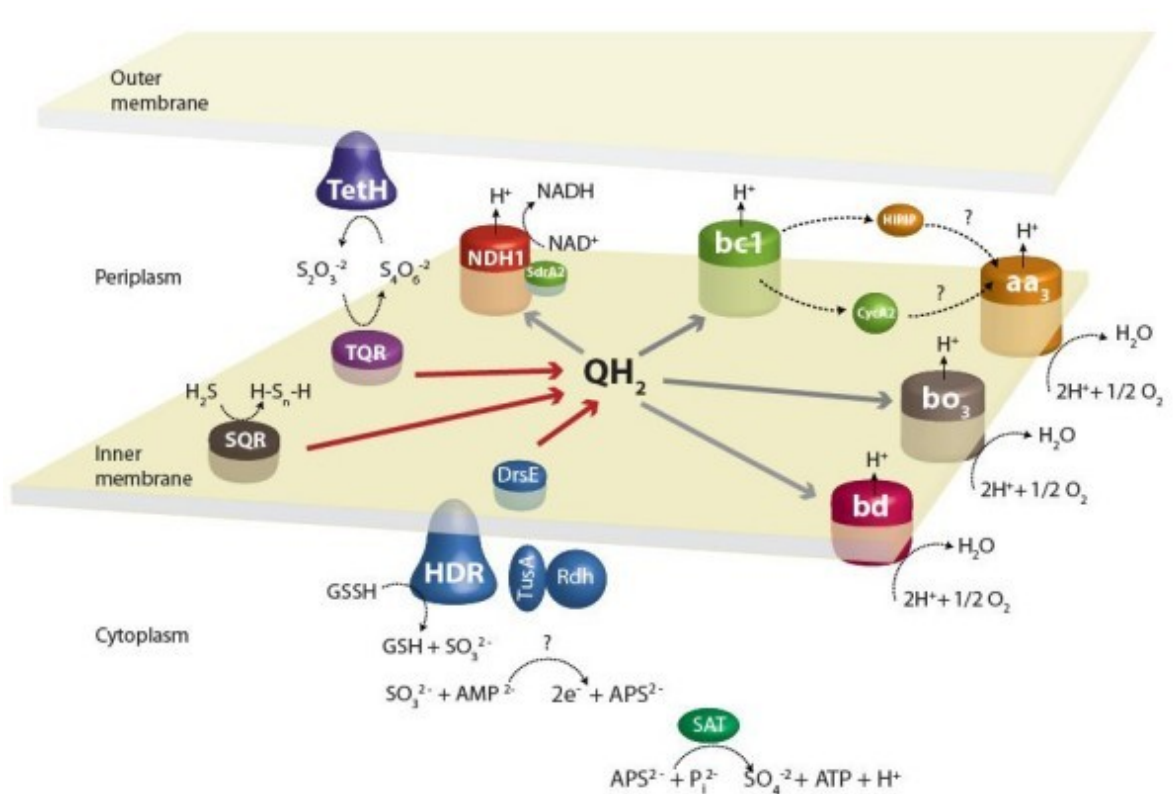
2.3.2.1 Oxidace železa

Oxidace Fe²⁺ na Fe³⁺ je u bakterií *A. ferrooxidans* důležitý proces k získávání NADH a energie, která je ve formě ATP. Oxidace železa probíhá podle rovnice:



Inhibiční účinek může mít vznik sraženin železitých iontů nebo vyčerpání koncentrace protonů. Energetický výtěžek oxidace Fe²⁺ iontů je malý a to z důvodu nízkého rozdílu rovnovážných redoxních potenciálů mezi Fe³⁺/Fe²⁺ (+770mV, pH=2) a O₂/H₂O (+890 mV, pH=6). Navíc je rovnovážný potenciál Fe³⁺/Fe²⁺ pozitivnější než potenciál NAD⁺/NADH a redukce NAD⁺ vyžaduje dodání energie. K produkci relativně malého množství biomasy je potřeba oxidovat velké množství Fe²⁺, protože na jeden mol oxidovaného železa je uvolněn pouze jeden mol elektronů. Železnaté ionty nejsou transportovány přes buněčnou membránu, ale zůstávají vně buňky a každý atom doručí svůj elektron pomocí přenašečů umístěných na buněčném povrchu [4, 23].

Oxidační proces založený na reakci Fe²⁺ iontu s molekulovým kyslíkem je uskutečňován pomocí respiračního řetězce složeného z Fe²⁺ cytochrom *c* oxidoreduktasy, rusticyaninu, několika dalších typů cytochromů *c* (cytochrom *c*₄ a cytochrom *c*₂) a cytochrom *c* oxidasy. Přenos elektronů je uskutečňován přes redukovaný cytochrom *c*₅₅₂, odtud exergonickou



Obr. 7: Model oxidace síry u *A. ferrooxidans* [24]

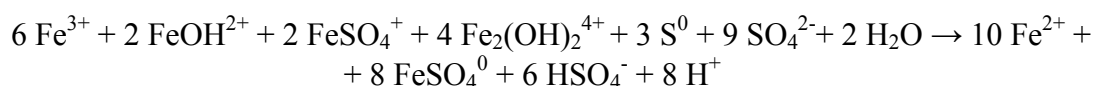
Nejprve musí v extracelulárním prostoru dojít k modifikaci elementární síry na polysulfidglutathion (GS_nH), ten dále putuje do cytoplasmatického prostoru, ve kterém se dostává přes kaskádu transferas (DrsE, TusA, Rhd) přímo k heterodisulfid reduktase (HDR), kde dochází k oxidaci za současné tvorby siřičitanů. Dále se předpokládá, že dochází k biologické oxidaci na adenosin-5'-fosfosulfát (ASP), který se dále rozkládá na ATP a SO_4^{2-} . Geny, které jsou zodpovědné za tuto přeměnu, ovšem nebyly u *A. ferrooxidans* izolovány a popsány. Sulfid:ubichinonoxidoreduktasa kódovaná genem *SQR* se účastní oxidace S^{2-} na S^0 a tetrathionáthydrolasa kódovaná v operonu *tetH* se účastní oxidace tetrathionanu [25, 26].

Elektrony z H_2S , S^{2-} , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, nebo GS_nH jsou převedeny na ubichinon. Z ubichinonu jsou převedeny dvěma způsoby. Buď přímo na terminální oxidasy (*bd*, *bo*₃), nebo nepřímo přes *bc*₁ komplex I a cytochrom *c* (CycA2) popřípadě HiPIP a na *aa*₃ oxidasu, kde probíhá redukce kyslíku na vodu, nebo na NADH komplex I, který slouží k výrobě NAD(P)H [26].

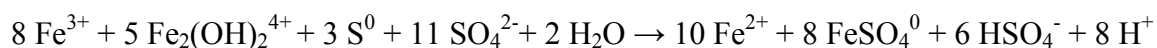
2.3.3 Anaerobní metabolismus

Roku 1976 byla u bakterie *A. ferrooxidans* kromě aerobní oxidace pozorována i schopnost oxidace S^0 za současné redukce Fe^{3+} . V roce 1992 pak byla prokázána schopnost růstu. Tento poznatek vedl k systematickému přeřazení z aerobních na fakultativně anaerobní bakterie [22, 27].

Anaerobní oxidace probíhá podle rovnice [28]:



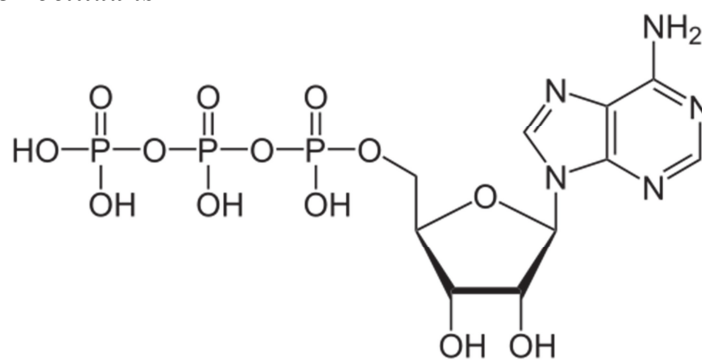
Výše uvedenou rovnici lze zjednodušit zanedbáním dvou nejméně zastoupených složek (FeOH^{2+} a FeSO_4^+) při zachování stejného poměru $\text{H}^+/\text{Fe}^{2+}$ [28]:



U anaerobní oxidace je uplatňován bc_1 komplex, který slouží k přenosu elektronů. U kultivace za anaerobních podmínek v případě dráhy $\text{S}^0/\text{Fe}^{3+}$ je produkován cytochrom c , který se liší svojí molekulovou hmotností, redoxním potenciálem, stabilitou za nízkého pH a určitými N-terminálními aminokyselinami od ostatních cytochromů c izolovaných z *A. ferrooxidans* za aerobních podmínek [22, 27].

Ovšem přesná dráha této oxidace nebyla doposud přesně popsána. Corbetten a Ingledewen došli však k závěru, že elektrony ze síry vstupují do respiračního řetězce právě díky komplexu bc_1 , ze kterého jsou přes periplasmatické přenašeče účastníci se oxidace Fe^{2+} přenášeny ke konečnému akceptoru elektronů, kterým je Fe^{3+} [27].

2.3.4 ATP u *A. ferrooxidans*



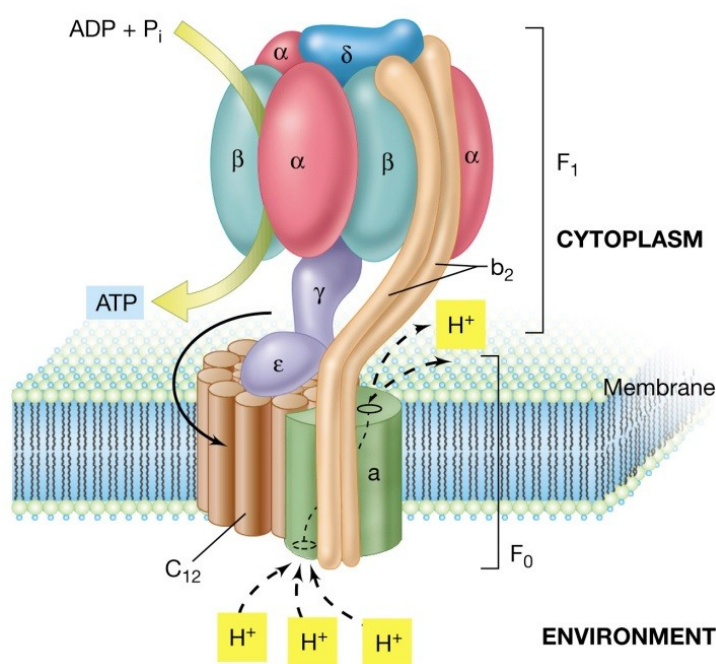
Obr.8: Strukturální vzorec ATP

Adenosin-5'-trifosfát (ATP) slouží jako centrální energetický spřahovač katabolických a anabolických dějů. V závislosti na různých podmínkách se koncentrace ATP v buňce může lišit jak mezi různými druhy bakterií, tak i mezi bakteriemi stejného druhu.

Bakterie *A. ferrooxidans* dokáže ATP vytvářet dvěma způsoby. Jedním z nich je tvorba ATP na úrovni substrátu při metabolismu siřičitanů a druhým je tvorba ATP pomocí enzymu ATPasy a dýchacího řetězce [29].

ATPasu, která je přítomna u *A. ferrooxidans* řadíme k F-ATPasám (Obrázek 9), které mají podjednotkové složení F_0 a F_1 . Část F_0 tvoří protonový kanál a část F_1 , která je na F_0 zachycena tak, že se její aktivní místo nachází v cytosolu, obsahuje katalytické místo pro syntézu ATP [29].

Aktivita ATPasy je optimální při pH 8,5. Tato hodnota naznačuje, že ATPasa slouží k syntéze ATP, při využití protonového gradientu vytvořeného během oxidace síry nebo Fe^{2+} , nikoliv k hydrolýze, protože intracelulární pH se pohybuje v rozmezí hodnot pH 6 – 7 a aktivita enzymu by byla velmi nízká. K udržení transmembránového gradientu je potřeba udržovat spotřebu protonů k redukci kyslíku na vodu, ATP je syntetizováno pomocí protonů přicházejících do buňky přes ATPasu [30].



Obr.9: Schéma F-ATPasy [31]

2.3.5 Chemiluminescence

Chemiluminescence patří mezi luminiscenční metody. Je definována jako emise fotonů vyvolaná exergonickou chemickou reakcí. Vzniká tak, že molekuly látky přejdou do vyšších elektronových hladin a při návratu do základních hladin vyzařují luminiscenční záření. Bioluminescence, které se také někdy říká světélkování je schopnost některých živých organismů vyzařovat viditelné záření chemického původu.

Chemiluminescence je velmi citlivá a rychlá analytická metoda, která je aplikována v biochemii, mikrobiologii, farmacii, lékařství, v chemii životního prostředí nebo i v ropném průmyslu. Využívá se pro stanovení enzymů a metabolitů, které jsou zodpovědné za různé metabolické poruchy, pro studium rezistence bakterií vůči antibiotikům, pro mikrobiální kontrolu kvality vody, detekci toxinů a mnoho další [32].

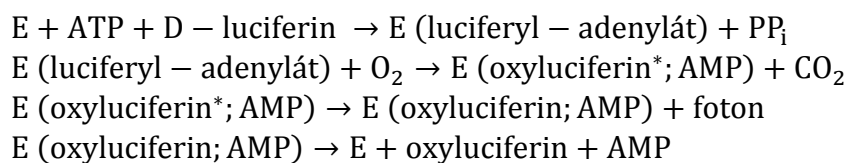
2.3.5.1 Reakční systém luciferin – luciferasa

Velmi významnou analytickou metodou se stala bioluminiscenční metoda, která je založena na chemiluminiscenčním reakčním systému luciferin – luciferasa. Tento systém se stal jedním z nástrojů pro měření ATP bioluminiscence [32].

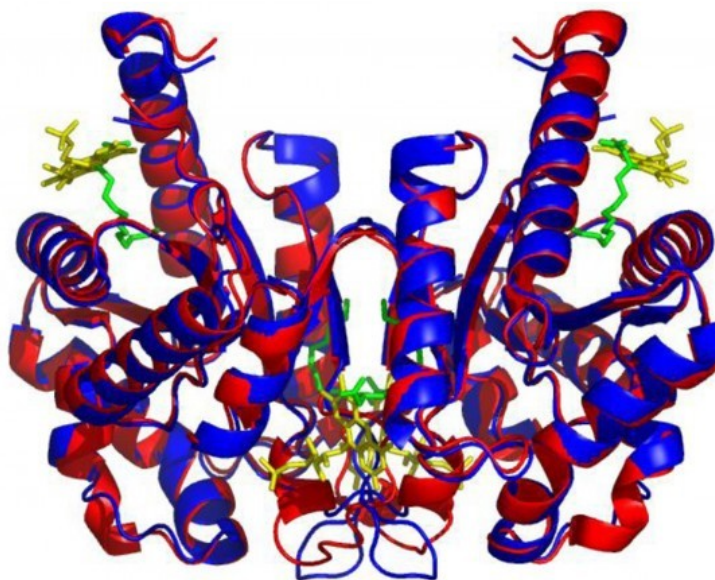
Enzym luciferasa (Obrázek 6), který pochází ze světlušky, katalyzuje reakci mezi ATP, D-luciferinem a kyslíkem za získání AMP, anorganického fosfátu (PP_i), oxyluciferinu, CO₂ a světla. Tato reakce lze vyjádřit rovnicí:



Tato reakce však probíhá v několika krocích a to:



Aktivita luciferázy je závislá na řadě aspektů, kterými jsou například D-luciferin, Mg²⁺ ionty, koncentrace, typ a pH pufru, aktivátory, inhibitor a sloučeniny podílející se na lyofilizaci nebo stabilizaci reagentů [32].



Obr.10: Struktura luciferasy ze světlušky [33]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Produkce mutantního proteinu kvasinkou *Pichia pastoris*

3.1.1 Mikroorganismus

Pro práci byla použita kvasinka *Pichia pastoris* GS 115 s mutantní formou cryptogeinu X24.

3.1.2 Media

BMGY medium

Bylo připraveno 100 ml BMGY media, jehož složení je uvedeno v *Tab. 4*.

Tab. 4: Složení BMGY media

Složky	Množství na 100 ml media
Fosfátový pufr o pH=6	10 ml
Bakteriologický pepton	2 g
Kvasničný extrakt	1 g
Glycerol	1 ml
YNB (dusíkatý základ pro kvasinky)	1,34 g
Biotin 4 mg/100 ml	0,2 ml
Voda	Doplnit do 100 ml

Po postupném rozpuštění všech složek v deionizované vodě bylo medium vysterilizováno a následně schlazeno.

Bazální fermentační medium

Byl připraven 1 l bazálního fermentačního media. Složení tohoto media je uvedeno v *Tab. 5*.

Tab. 5: Složení Bazálního fermentačního media

Složky	Množství na 1000 ml media
85% H ₃ PO ₄	26,6 ml
CaCl ₂	1,06 g
K ₂ SO ₄	18,2 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	14,9 g
KOH	4,13 g
Glycerol	40 g
Voda	Doplnit do 1000 ml

3.1.3 Kultivace kvasinky

Do vysterilizovaného BMGY media byla zaočkována kvasinka *P. pastoris*. Kultivace probíhala na laboratorní třepače při 37°C po dobu 16 hodin.

3.1.4 Fermentace

Pro fermentační procesy byl použit bioreaktor Biostat B-DCU, B. Braun Biotech International. Nejprve byla připravena fermentační nádoba, k víku fermentoru byla připojena kyslíková elektroda, pH elektroda a hadičky, zajišťující dávkování jednotlivých složek. Do dvouplášťové nádoby o objemu 2 l byl nalit 1 l bazálního fermentačního media. Nádoba byla uzavřena a vše bylo sterilizováno v autoklávu při 125°C.

Po sterilizaci fermentační nádoby byl spuštěn software a fermentor byl oživen – byl zapojen přívod vzduchu, živin, roztok pro úpravu pH a bylo zapojeno míchadlo. Následně byla fermentační nádoba ochlazená na 30°C a pomocí automatického dávkování NH₃ bylo upraveno pH z původní hodnoty pH=1 na pH=5. Na věži fermentoru byly nastaveny podmínky kultivace uvedené v Tab. 6.

Dále bylo k mediu přidáno 4,35 ml roztoku stopových solí (Tab. 7), předem nakultivované kvasinky a 50 µl odpěňovačla Antifoam A. U kultury byl změřen počáteční zákal.

Tab.6: Kultivační podmínky ve fermentoru - *P.pastoris*

Teplota	30°C
Aerace	2 l·min ⁻¹
Míchání	800 min ⁻¹
pH	5

Tab.7: Složení roztoků stopových solí

Složky	Množství na 1 l
CuS·5H ₂ O	6 g
NaI	0,08 g
MgS·H ₂ O	3 g
Na ₂ MoO ₄ ·5H ₂ O	0,2 g
H ₃ BO ₃	0,02 g
CoCl ₂	0,5 g
ZnCl ₂	20 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	65 g
Biotin	0,2 g
H ₂ SO ₄	5 ml
H ₂ O	Doplnit do 1 l

Růstová fáze na glycerolu

Růstová fáze kvasinky na glycerolu trvá přibližně 12 hodin. Indikátorem toho, že tato fáze je u konce, je změna hodnoty okysličení media. Tato hodnota se při ukončení této fáze pohybuje kolem 100 %, což znamená, že kvasinka spotřebovala veškerý glycerol z media. Byl tedy připraven roztok glycerolu 50% w/v, do kterého bylo přidáno 1,2 ml roztoku stopových solí na 100 ml roztoku. Takto připravený roztok glycerolu byl do media dávkován pomocí peristaltické pumpy rychlostí 20 ml za hodinu. Během této fáze byly průběžně odebrány vzorky kultury a byla sledována buněčná hustota.

Sledování buněčné hustoty

Byl odebrán 1 ml vzorku, který byl zcentrifugován. Po centrifugaci, která probíhala při otáčkách 14 100 x g po dobu 3 minut byl odstraněn supernatant a pelet byl zvážen na analytických vahách.

Expresní fáze na metanolu

Po ukončení růstové fáze na glycerolu přichází na řadu expresní fáze na metanolu. V této fázi je glycerol vyměněn za roztok metanolu s roztokem stopových solí. Na 100 ml metanolu bylo přidáno 1,2 ml roztoku stopových solí. Takto připravený roztok byl do fermentační nádoby přiváděn opět pomocí peristaltické pumpy. V prvních hodinách byl metanol do fermentoru dávkován pomaleji – 5 ml za hodinu, aby se kvasinka na metanol adaptovala a nedocházelo k nahromadění metanolu v mediu (již 3 % w/v jsou pro kvasinku toxická). Asi po 3 až 4 hodinách bylo možno průtok metanolu zvýšit a to až na 12 ml za hodinu. Během této fáze kultura produkuje vyšší množství tepla a má i vyšší nároky na kyslík.

Tato exprese probíhala 3 dny. Po ukončení fermentace bylo medium odstředěno při 4°C a otáčkách 6 000 x g.

3.1.5 Purifikace cryptogeinu

Ultrafiltrace

Medium po centrifugaci bylo přibližně desetkrát zakoncentrováno pomocí ultrafiltrace na ultrafiltrační cele Model 202 (Amicon) s celulóvou membránou (cut-off 3 kDA Millipore).

Dialýza

Pro odstranění nízkomolekulárních látek byla provedena dialýza na membráně Cellu Sep T1.

Iontově výměnná chromatografie FPLC

Nejdříve byly připraveny roztoky 5mM roztok octanu sodného a 5mM roztok sodného s NaCl. Tyto roztoky byly přefiltrovány vakuovou filtrací a byly z nich odstraněny bubliny pomocí ultrazvukové lázně.

Kolona SOURCE 15S, používaná pro iontově výměnnou chromatografii, byla stabilizována roztokem 5 mM AcNa a bylo zahájeno nanášení vzorku. Po nanášení vzorku byly odstraněny nenavázané proteiny promytím pomocí 5 mM AcNa. Poté byly proteiny vymyty 1M NaCl. Jednotlivé frakce byly jímány do jednorázových zkumavek.

3.1.6 Stanovení koncentrace jednotlivých frakcí proteinu

Ke stanovení koncentrace proteinů byla použita Bicinchinonová metoda. Ke 2 ml reagentu BCA bylo přidáno 0,1 ml roztoku obsahující protein. Tato směs byla dobře promíchána na vortexu a následně byla ponechána 30 minut v termostatu při 37°C. Dále byla pomocí spektrofotometru Specronic 200 (Thermo Scientific) změřena absorbance při 562 nm.

3.1.7 Přenos sterolů

K měření byl využíván fluorescenční sterol DHE. Po přidání DHE do pufru byly vytvořeny dehydroergosterolové donorní micely. Po jejich vzniku byl do pufru přidán stigmasterol o vyšší koncentraci než DHE a došlo tak k utvoření stigmasterolových akceptorních micel. Přídavek proteinu vedl k indukci přenosu mezi micelami. Zvýšená fluorescence, která po indukci přenosu nastala, byla způsobena tím, že se do přebytku stigmasterolových micel vyřadil DHE.

Do skleněné pipety byl napipetován 1 ml MES pufru, k němu bylo přidáno 10 µl DHE. Kyveta byla uzavřena zátkou a otočením byl roztok promíchán. Po 10 minutách bylo přidáno 10 µl stigmasterolu a roztok byl opět promíchán. Kyveta byla vložena fluorimetru a bylo spuštěno měření za podmínek uvedených v *Tab. 8*. Po 200 s bylo přidáno 20 µl měřeného proteinu. Měření bylo ukončeno po 400 s.

Tab.8: Parametry měření

Ex/em	325/370 nm
Velikost štěrbin	2 nm

3.2 Oxidace síry bakterií *Acidithiobacillus ferrooxidans*

3.2.1 Mikroorganismus

V experimentální části byla použita bakterie *Acidithiobacillus ferrooxidans* (CCM 4253), která byla izolována z rudných ložisek ve Zlatých Horách. Bakterie, které rostou na Fe^{2+} byly kultivovány v 9K mediu a bakterie rostoucí na síře v sírném mediu.

3.2.2 Media a kultivace bakterií

S medium

Byl připraven 1 litr základního média pro kultivaci buněk na síře (S media). Složení je uvedeno v Tab. 9.

Tab.9: Složení S media – uvedené množství je na 1 l deionizované vody

Složky	Množství
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,2 g
K_2HPO_4	3,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
CaCl_2	0,13 g

V deionizované vodě byly postupně rozpuštěny všechny uvedené složky a médium bylo sterilizováno varem a následně ochlazen.

9K medium

Byl připraven 1 litr 9K média. Složení tohoto media je uvedeno v Tab. 10.

Tab.10: Složení 9K media

	Složky	Množství
Roztok A ₁	H_2O	600 ml
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3,0 g
	KCl	0,1 g
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
Roztok A ₂	H_2O	100 ml
	K_2HPO_4	0,5 g
Roztok B	H_2O	300 ml
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	44,2 g
Roztok C	H_2O	100 ml
	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,71 g

Nejprve byly připraveny složky A₁, A₂ a C, které byly vysterilizovány varem. Při přípravě složky B, bylo u deionizované vody upraveno pH pomocí kyseliny sírové na pH 1,7 a poté byla voda sterilizovaná varem, po přidavku $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ bylo pH upraveno na hodnotu pH 1,3. Složky A₁, A₂ a B byly po vychladnutí smíchány a za stálého míchání k nim byly přidány 2 ml roztoku C.

Speciální medium pro anaerobní oxidaci síry

Tab.11: Složení speciálního media pro anaerobní oxidaci síry

Složky	Množství na 1000 ml media
(NH ₄) ₂ SO ₄	133 mg
K ₂ HPO ₄	41 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	490 mg
CaCl ₂	6,8 mg
KCl	52 mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1,0 mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	2,0 mg
MnSO ₄ ·H ₂ O	1,0 mg
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,50 mg
CoSO ₄ ·7H ₂ O	0,50 mg
K ₂ SeO ₄	0,56 mg
NiSO ₄ ·7H ₂ O	1,2 mg
Voda	Doplnit do 1000 ml

Jednotlivé chemikálie byly postupně rozpuštěny v deionizované vodě a vzniklý roztok byl sterilizován varem a následně ochlazen.

Kultivace bakterií na S mediu

Kultivace na třepačce

Kultivace probíhala v 500 ml baňkách. K 100 ml sirného media bylo přidáno 1,5 g síry a takto upravené medium bylo vysterilizováno varem. Do zchladnutého media bylo napipetováno 10,00 ml kultury *A. ferrooxidans* (10% inokulum) a výsledné pH bylo upraveno na hodnotu pH 3 – 4.

Kultivace probíhala na rotační třepačce při 28°C.

Kultivace v biorektoru

K fermentaci byl použit bioreaktor Biostat B-DCU, (Obr. 11). Fermentace probíhala ve fermentační nádobě o objemu 5 l. Množství kyslíku bylo sledováno kyslíkovou elektrodou a pH pH elektrodou. Nádoba fermentoru byla společně se 4 l sirného media vysterilizována v autoklávu. Po vychladnutí bylo k mediu přidáno 60 g vysterilizované síry, což odpovídá 1,5 % w/v, a 400 ml kultury *A. ferrooxidans*, vyrostlé v baňkách a pH bylo upraveno na

hodnotu pH 3 – 4. Na fermentoru byly nastaveny podmínky kultivace, uvedené v *Tab.12*, a fermentor byl uveden do chodu.



Obr.11: Biostat B-DCU, B. Braun Biotech International

Tab.12: Kultivační podmínky ve fermentoru

Teplota	28°C
Aerace	1,5 l·min ⁻¹
Míchání	300 min ⁻¹

3.2.2.1 Kultivace bakterií na 9K mediu

K 100 ml připraveného 9K media bylo napipetováno 10,0 ml bakterie *A. ferrooxidans* (10% inokulace) a pomocí kyseliny sírové a amoniaku bylo pH upraveno na hodnotu pH 1,6 – 1,8.

Bakterie byly kultivovány 5 dní při 28°C na rotační třepačce. U takto připravených kultur bylo průběžně kontrolováno pH, které bylo udržováno v hodnotách pH 1,6 – 1,8 pomocí H₂SO₄ aby nedocházelo k tvorbě sraženiny Fe³⁺.

Takto předočkované bakterie byly přeneseny do baňky o objemu 1 000 ml s 900 ml 9K media a pH bylo opět pomocí H₂SO₄ upraveno na hodnotu pH 1,6. Kultivace probíhala na magnetické míchačce při otáčkách 300 rpm při teplotě 28°C 4 dny.

3.2.2.2 Kultivace bakterií na speciálním mediu

Prekultivace (aerobní)

Pro prekultivaci bylo použito 100 ml Fe buněk kultivovaných na 9K mediu po dobu 4 dny. Buňky byly zcentrifugovány při 1 4942 x g po 10 minut a při teplotě 4°C. Supernatant byl odstraněn a pelet byl promyt 1 ml speciálního media. Obsah byl zcentrifugován při 13000 x g po 10 minut. Supernatant byl opět odstraněn a pelet byl rozsuspendován v 1 ml speciálního media.

Anaerobní kultivace

K 100 ml speciálního media byly přidány 2,0 g síry a vše bylo vysterilizováno varem. Poté bylo do media přidáno 4,55 g $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – to odpovídá $5\text{g}\cdot\text{l}^{-1} \text{Fe}^{3+}$ a objem byl doplněn do 200 ml speciálním mediem. K mediu byly přidány rozsuspendované buňky v 1 ml speciálního media, bylo přidáno magnetické míchadlo a pH bylo pomocí amoniaku a kyseliny sírové upraveno na hodnotu 1,9. Po sestavení kultivační aparatury (Obrázek 12) byla na přívod nasazena hadička z tlakové lahve a kultura byla probublávána po dobu 5 minut směsí Ar/ CO₂ (90:10). Plyn unikal druhou vývodovou hadičkou. Obě hadičky byly uzavřeny a kultivace probíhala při teplotě 30°C za stálého míchání na rotační míchačce při rychlosti míchání 300 rpm. Kultura byla denně probublávána po dobu 5 minut směsí plynu Ar/ CO₂ (90:10). Rychlost průtoku plynu byla $1\text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$.



Obr. 12: Anaerobní kultivační aparatura

3.2.3 Analytické metody – aerobní kultivace

Odběr vzorku

Odběr vzorku byl prováděn pomocí injekční stříkačky. Byly odebrány 3,0 ml kultury – 1 ml kultury byl po odebrání zmražen pro pozdější stanovení síranů. U zbylého vzorku bylo změřeno pH, stanoven počet buněk a ATP.

Měření pH

pH bylo měřeno při laboratorní teplotě pomocí kombinované skleněné elektrody a pH metru PHM 93 (Radiometer, Copenhagen)

Stanovení počtu buněk

Koncentrace buněk v kultuře byla stanovena turbidimetricky při 570 nm proti destilované vodě pomocí spektrofotometru Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech) a na základě kalibrační závislosti absorbance na počtu buněk (získaného počítáním buněk v Cyrusově komůrce)

Koncentrace bakterií v 1 ml byla vypočítána z kalibrační křivky:

$$(\text{počet buněk} \times 10^8) \cdot \text{ml}^{-1} = A_{570}/0,034$$

Stanovení ATP

Princip:

Stanovení množství ATP v kultuře bylo provedeno chemiluminiscenční metodou na luminometru Junior LB 9509 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany)



Obr.13: Luminometr Junior LB 9509

Byl použit komerční kit ATP Biomass kit HS (No.266-311)

Sada komerčního kitu obsahuje:

- ATP Reagent HS – lyofilizovaný reagent obsahující luciferasu a luciferin
- Diluent B – pufr k rozpouštění ATP reagentu
- Extraktant B/S – extraktant uvolňující ATP z buněk
- Standard ATP (100 nmol · l⁻¹)

Měření bylo prováděno za laboratorní teploty. Reakční směs, jejíž složení je uvedeno v tabulce, byla dobře promíchána. Nejprve byl ATP uvolněn z buněk extraktantem B/S a následně analyzován reagentem HS. Emise světla byla měřena před a po přidavku známého množství standardu ATP, to umožňuje spočítat množství ATP ve vzorku podle vztahu:

$$ATP_{smp} = \frac{I_{smp}}{I_{smp+std} - I_{smp}}$$

Tento vztah platí pro přidavek 10 µl ATP.

Tab.13: Složení reakční směsi

Složka	Množství [µl]
Vzorek 50 x ředěný sirným médiem	20
Extraktant B/S	20
ATP reagent HS	160
Standart ATP (10 ⁻⁷ mol·l ⁻¹)	1 (10)

Stanovení koncentrace síranů

Koncentrace síranů jako produktu oxidace síry byla stanovena isotachoforeticky [34].

3.2.4 Analytické metody – anaerobní kultivace

Odběr vzorku

Odběr vzorku byl prováděn pomocí injekční stříkačky. Byly odebírány 2,0 ml kultury – 1,0 ml byl použit pro stanovení koncentrace buněk a 1,0 ml bylo centrifugováno a dále byla stanovena koncentrace Fe²⁺, pH a hodnota RLU.

Stanovení koncentrace Fe^{2+} iontů

Koncentrace Fe^{2+} iontů byla stanovena spektrofotometricky fenantrolinovou metodou modifikovanou pro použití pro vysoké koncentrace Fe^{3+} . Ionty Fe^{3+} jsou při této metodě maskovány pomocí fluoridu amonného [35].

Každý vzorek byl před vlastním stanovením zcentrifugován (10 000 x g/ 5 min), aby byly odstraněny buňky a síra. Vzorek byl dle potřeby naředěn. Do kyvety byly postupně přidávány jednotlivé složky reakční směsi uvedené v *Tab. 14*, po každém přidavku byla směs dobře promíchána. Vzorek byl měřen paralelně ve dvou vzorcích. Absorbance byla měřena spektrofotometricky při vlnové délce 510 nm pomocí Spektrofotometru Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech)

Tab.14: Složení reakční směsi pro stanovení koncentrace Fe^{2+}

Složka	Množství [μl]
Vzorek	10
H ₂ O	490
H ₂ SO ₄ (4+1)	33
2M NH ₄ F	66
1% 1,10-fenantrolin	66
3M hexamethylentetramin	100

Stanovení počtu buněk

K 1,0 ml kultury bylo přidáno 0,04 ml H₃PO₄ pro odbarvení Fe^{3+} iontů, které by rušily stanovení. Absorbance byla měřena při vlnové délce 450 nm. Měření bylo prováděno oproti destilované vodě.

Koncentrace bakterií byla vypočítána z kalibrační křivky:

$$(\text{počet buněk} \times 10^8) \cdot \text{ml}^{-1} = A_{450}/0,086$$

Stanovení ATP

Stanovení množství ATP v kultuře bylo stanoveno pomocí chemiluminiscenční metody. Složení reakční směsi je uvedeno v *Tab. 15*.

Tab.15: Složení reakční směsi

Složka	Množství [μl]
Vzorek 300 x ředěný kyselou vodou (pH 2)	50
Extraktant B/S	50
ATP reagent HS	400
Standart ATP ($10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$)	1 (10)

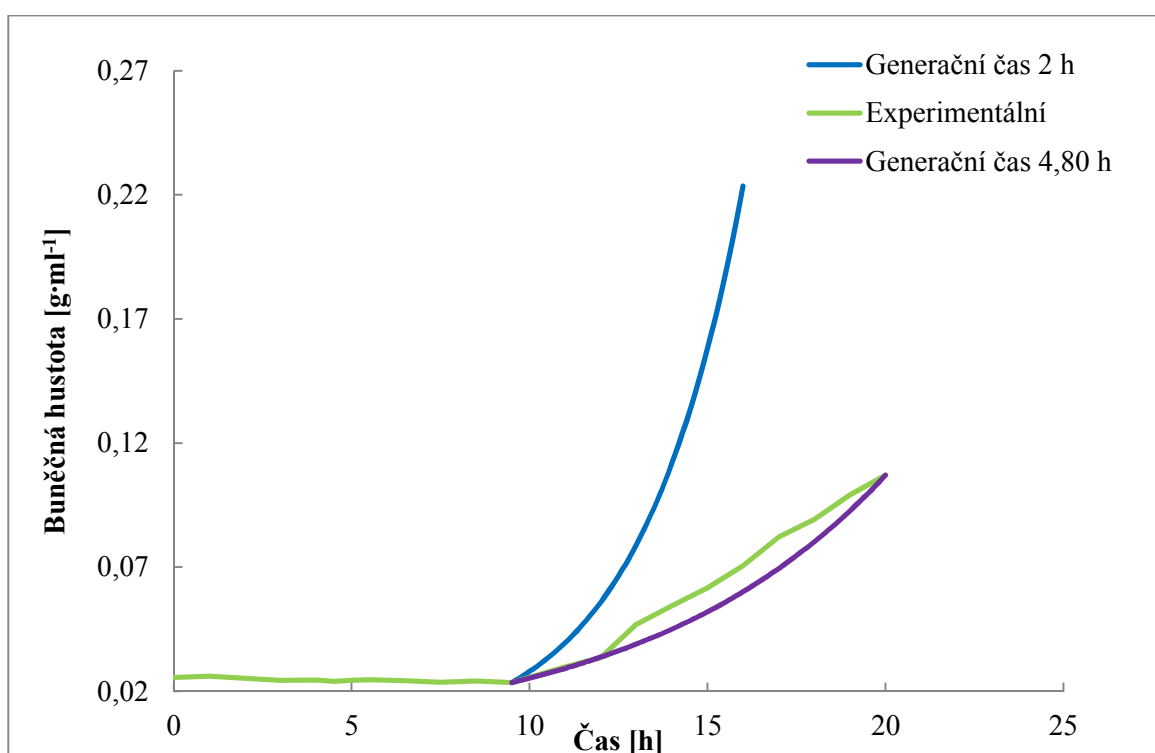
4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Produkce mutantního proteinu kvasinkou *Pichia pastoris*

4.1.1 Růstová fáze na glycerolu

Před zahájením expresní fáze na metanolu byla kvasinka *P. pastoris* nejdříve namnožena za přítomnosti 50 w/v roztoku glycerolu. Buněčná hustota byla získávána vážením vlhkého peletu. Z Obr. 14 je patrné, že nástup lag fáze nastal v čase $t = 10$ hodin.

Za optimálních podmínek je generační doba kvasinky *P. pastoris* přibližně 2 hodiny [36]. Ze získaných experimentálních dat byl vypočítán generační čas této kvasinky 4,80 hodiny. Odchylka získaného generačního času od generačního času teoretického byla způsobena nedodržením optimálních podmínek, pravděpodobně se jednalo o nedostatečné míchání popřípadě nedostatečnou aeraci media.



Obr. 14: Růstová křivka *P. pastoris* na glycerolu (růstová křivka experimentální, sestavená z dopočítaných hodnot a z teoretického generačního doby)

4.1.2 Expresní fáze na metanolu

Po nárůstu kultury na požadovanou buněčnou hustotu byl roztok glycerolu nahrazen roztokem metanolu. Metanol byl nejdříve do kultury dávkován pomalu, aby se kvasinka adaptovala a postupně byly dávky zvyšovány.

Jakmile byl do fermentoru přiváděn metanol, kultura už rostla pomaleji. Oproti růstové křivce na glycerolu, která má exponenciální trend, průběh růstu v této fázi byl lineárního charakteru. To je způsobeno tím, že kvasinka v této fázi produkuje protein a metanol, který byl použit jako jediný zdroj uhlíku a energie je chudší než glycerol. Také se produkcí proteinu zvýšily požadavky kvasinky na přístup kyslíku, který byl dodáván v pulzech.

4.1.3 Celkový průběh fermentace v bioreaktoru

Celkový průběh fermentace byl sledován pomocí softwaru na počítači. Byly zaznamenávány data o průběhu okysličování, teplotě a pH ve fermentoru. Průběh této fermentace je uveden v *Obr. 15*.

Průběh fermentace lze rozdělit na několik fází:

Fáze I

Tato fáze znázorňuje růst kultury na Bazálním fermentačním mediu, která obsahuje 40 g glycerolu. Z *Grafu 2* lze říci, že se vzrůstající buněčnou hustotou ve fermentoru klesá okysličení media. Teplota je během této fáze v podstatě konstantní.

Po spotřebování glycerolu došlo k velkému nárůstu kultury. Tímto nárůstem kleslo okysličení fermentoru pod 20 %, a proto byl do fermentoru dávkován čistý kyslík.

Fáze II

Během této fáze spotřebovává kultura přidaný 50 w/v roztok glycerolu. Ve fermentoru docházelo k poklesu prokysličování a to důsledkem nárůstu kultury. Stejně jako v předešlé fázi byla teplota konstantní.

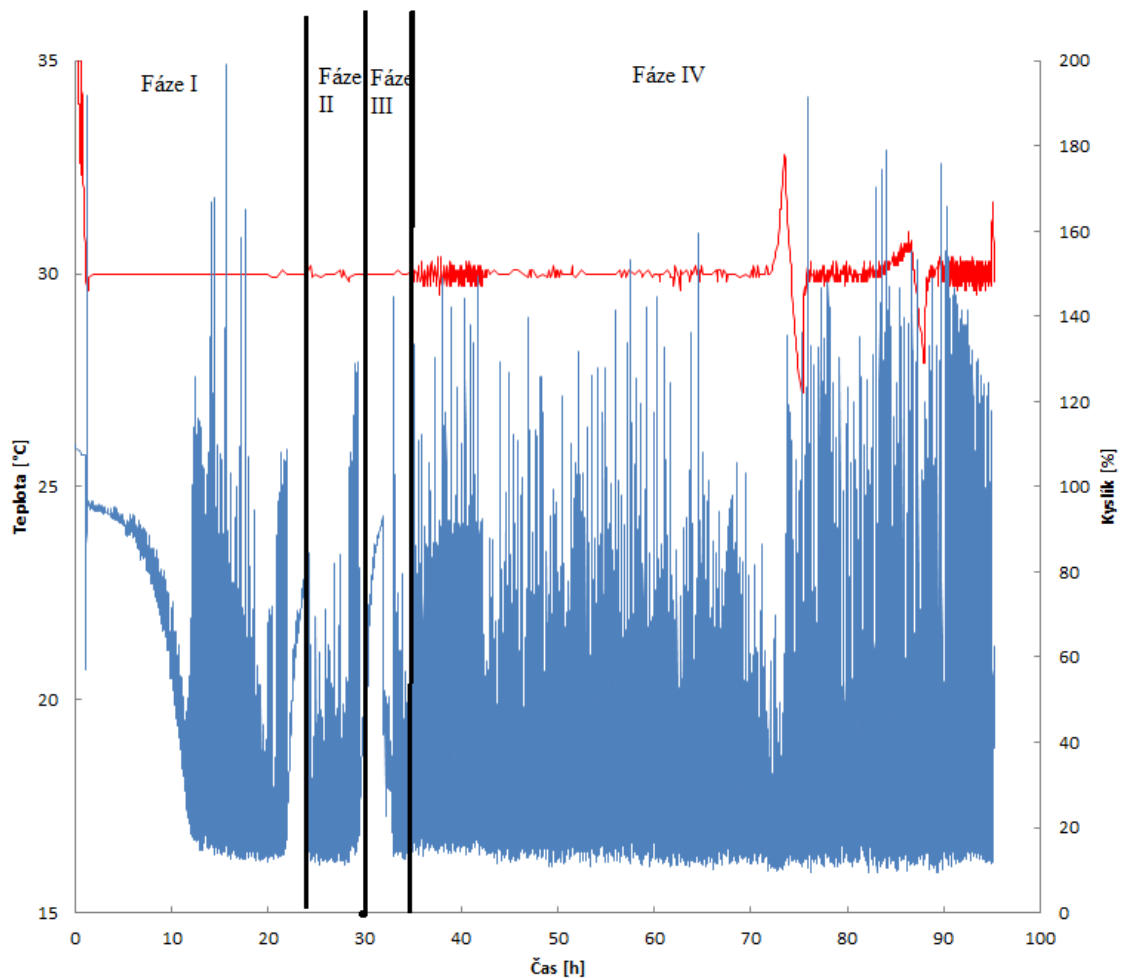
Fáze III

V této fázi se kultura adaptuje na indukci metanolem. Metanol musí být dodáván v této fázi ze začátku pomalu, zvýšení rychlosti přidavku je možné až tehdy, kdy zahájí kvasinka expresi genů AXO1 a AXO2. Nízkou metabolickou aktivitu kvasinky lze vyčíst z grafu díky zvýšenému prokysličení kultury.

Během adaptace kultury na metanol, která trvala přibližně 4 hodiny, docházelo k velmi nestabilnímu prokysličování kultury a hromadění metanolu v mediu. U konce této fáze se kvasinka již adaptuje, začne spotřebovávat nahromaděný metanol. Tento jev nám znázorňuje zřetelný pokles prokysličení. Během této fáze začne kultura vydávat zvýšené množství tepla.

Fáze IV

Během této fáze docházelo k expresi proteinu na metanolu. Okysličení je v této fázi vcelku stabilní, neboť již kultura rostla velmi pomalu. Ovšem během této fáze kultura vydává nejvíce tepla – to je způsobeno produkcí proteinu.

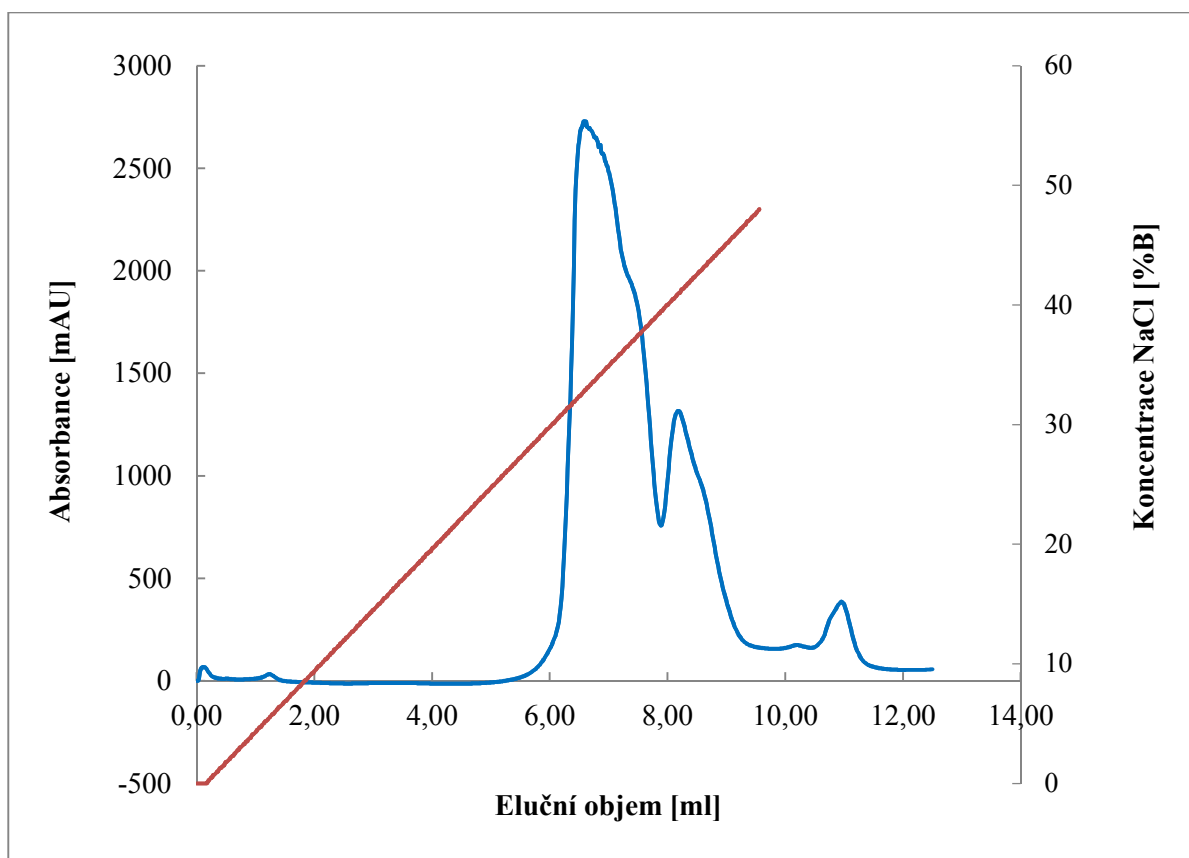


Obr.15: Záznam průběhu fermentace

4.1.4 Purifikace mutantního cryptogeinu

Po ukončení fermentace bylo medium centrifugováno, supernatant byl zakoncentrován pomocí ultrafiltrace na objem 50 ml a nízkomolekulární látky byly odstraněny pomocí dialýzy v membráně CelluSep (cut off 3,5 kDa).

Protein, obsažený v mediu, byl purifikován pomocí ionto-výměnné FPLC chromatografie na matici SOURCE S15. Protein byl vymýván pomocí gradientu NaCl. Chromatogram purifikovaného proteinu je uveden na Obr 16.



Obr. 16: FPLC chromatogram mutantního proteinu X24 v koloně TriCorn 10 x 50 mm

Na chromatogramu byly detekovány dva zřetelné píky. Předpokládá se, že tyto píky detekují stejný protein (X24), který nese pouze odlišný náboj. Jednotlivé frakce byly odeslány na detekci pomocí MALDI-MS analýze.

4.1.5 Stanovení koncentrace jednotlivých frakcí proteinu

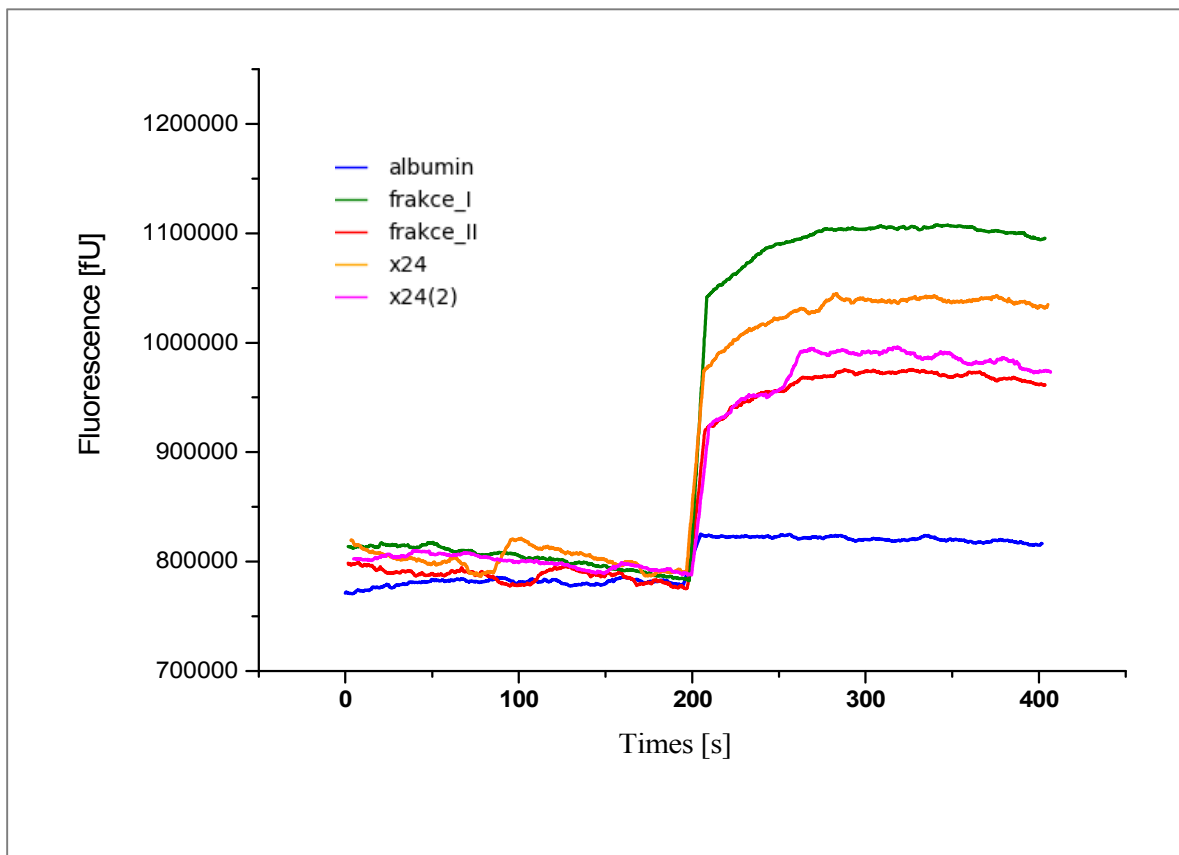
Pomocí Bicinchinonové metody byla stanovena koncentrace jednotlivých frakcí proteinu. Tyto hodnoty jsou uvedeny v Tab. 16.

Tab. 16: Koncentrace jednotlivých frakcí vyprodukovaného proteinu

Frakce	Koncentrace [mg·ml ⁻¹]
Frakce I	18,17
Frakce II	4,50

4.1.6 Přenos sterolů

Na začátku experimentu byla fluorescence směsi MES, DHE a stigmasterolu nízká, to je způsobeno tím, že jsou DHE molekuly v donorových micelách. Přídavek proteinu vedl ke zvýšení fluorescence. Za zvýšení fluorescence je zodpovědné promíchání DHE a stigmasterolových micel.



Obr. 17: Fluorescence micel po přidavku cryptogeinu

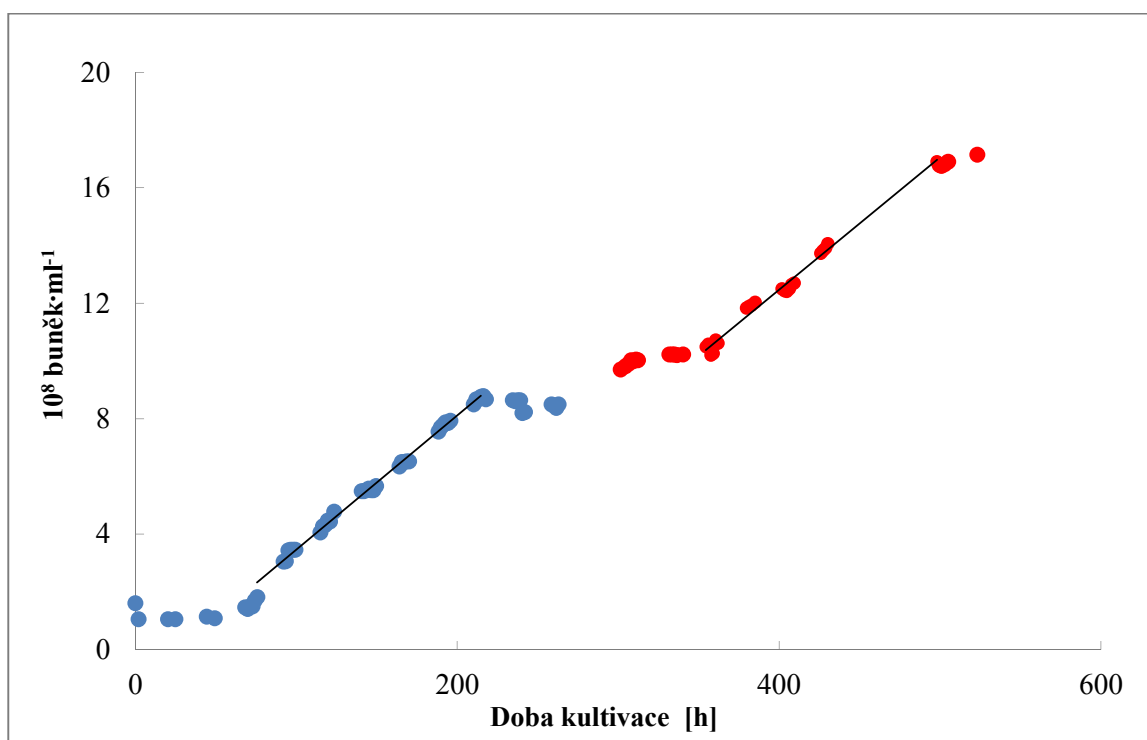
Z Obr. 17 lze vyčíst, že po přidavku cryptogeinu k micelám došlo k rychlé výměně sterolů mezi micelami. To bylo způsobeno tím, že vyprodukovaný protein má schopnost přenášet steroly mezi membránami.

4.2 Oxidace síry bakterií *Acidithiobacillus ferrooxidans*

4.2.1 Aerobní

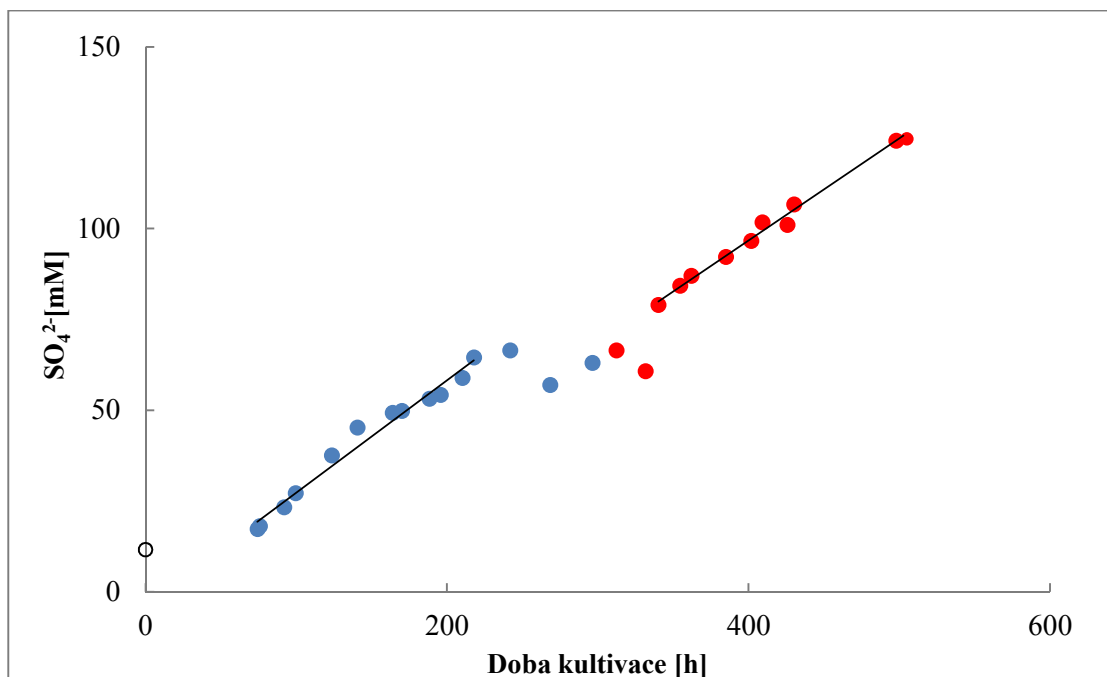
4.2.1.1 Vliv úpravy (zvýšení) pH a přidavku substrátu ve stacionární fázi růstu bakteriální kultury

Sledování růstu buněk (Obr. 18), oxidace S^0 (Obr. 19) a intenzity luminiscence (Obr. 20) bylo provedeno, aby se ověřily dřívější výsledky buněčného obsahu ATP a především vliv úpravy pH a přidavku substrátu ve stacionární fázi růstu bakteriální kultury na hodnoty intenzity luminiscence a hodnoty buněčného obsahu ATP [37].



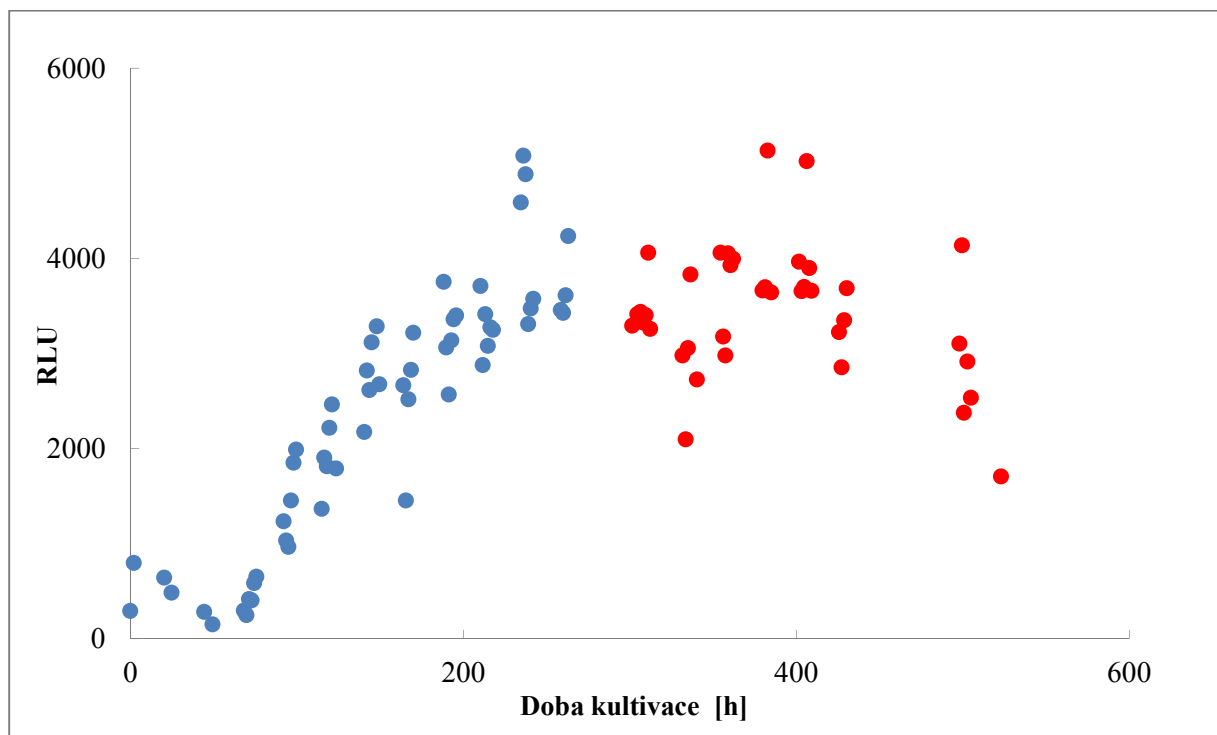
Obr.18: Průběh růstu kultury *A. ferrooxidans* oxidující síru.

Podmínky kultury ve fermentoru: 28°C, míchání 300 ot./min., aerace 1,5 l/min. Úpravy v 297. h: přidavek 20 g S^0 a pH upraveno z 1,18 na 3,51. (●) Směrnice lineární části grafu $(4,65 \pm 0,12) \cdot 10^6$ buněk·ml⁻¹·h⁻¹ (95% interval spolehlivosti, $r = 0,998$) udává rychlost růstu kultury před úpravami. (●) Směrnice lineární části grafu $(4,59 \pm 0,29) \cdot 10^6$ buněk·ml⁻¹·h⁻¹ (95% interval spolehlivosti, $r = 0,992$) udává rychlost růstu kultury po úpravách pH z 1,18 na pH 3,51 a přidavku siřného substrátu.

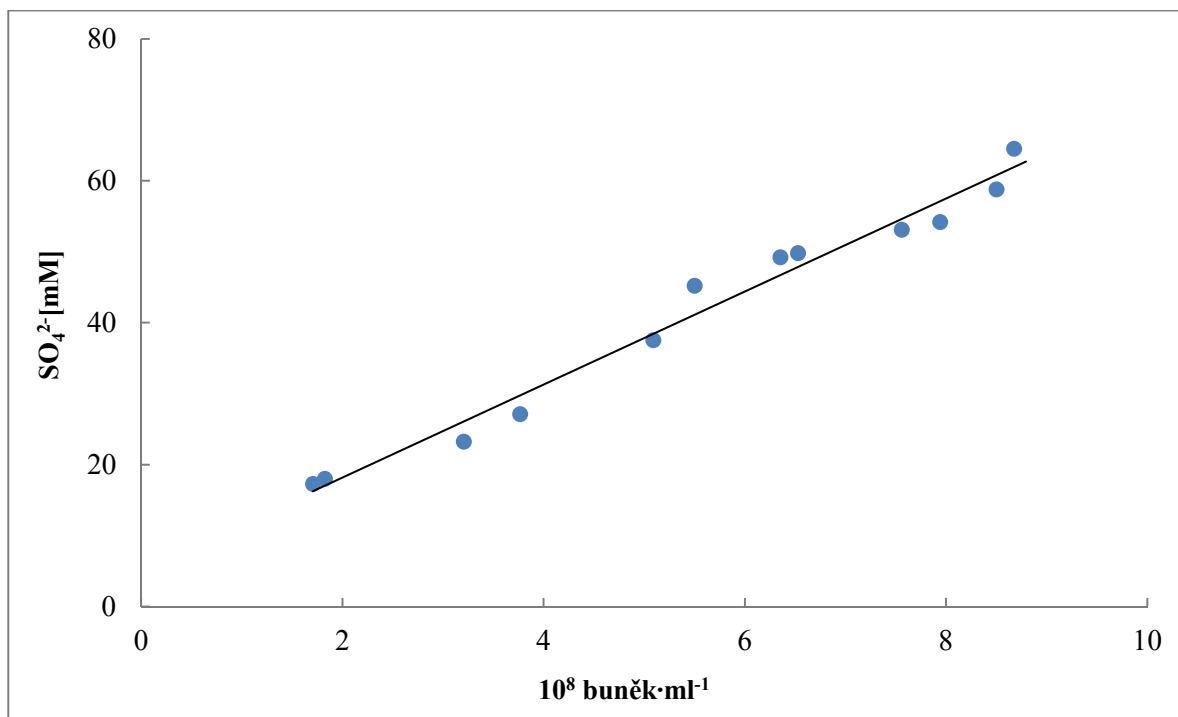


Obr.19: Průběh koncentrace SO_4^{2-} .

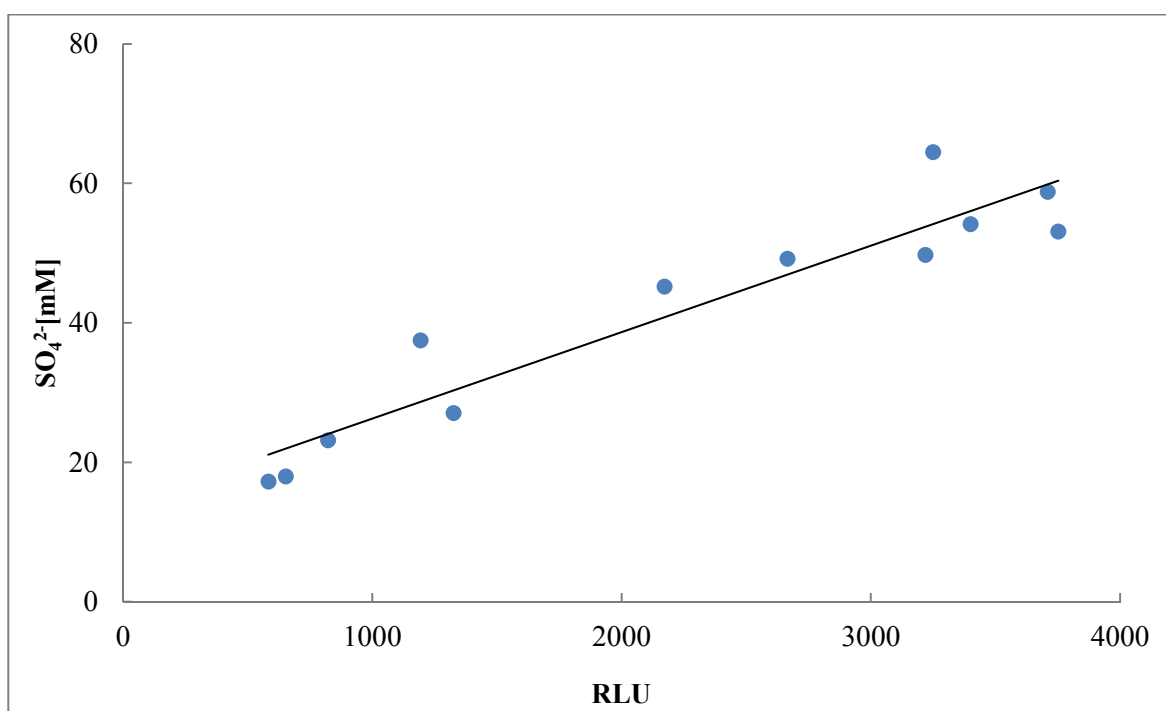
Podmínky kultury viz. Obr. 18. (●) Směrnice lineární části grafu $0,31 \pm 0,03 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ (95% interval spolehlivosti, $r = 0,988$) udává rychlost oxidace S^0 bakteriální kulturou před úpravami. (●) Směrnice lineární části grafu $0,28 \pm 0,03 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ (95% interval spolehlivosti, $r = 0,994$) udává rychlost oxidace S^0 bakteriální kulturou po úpravách.



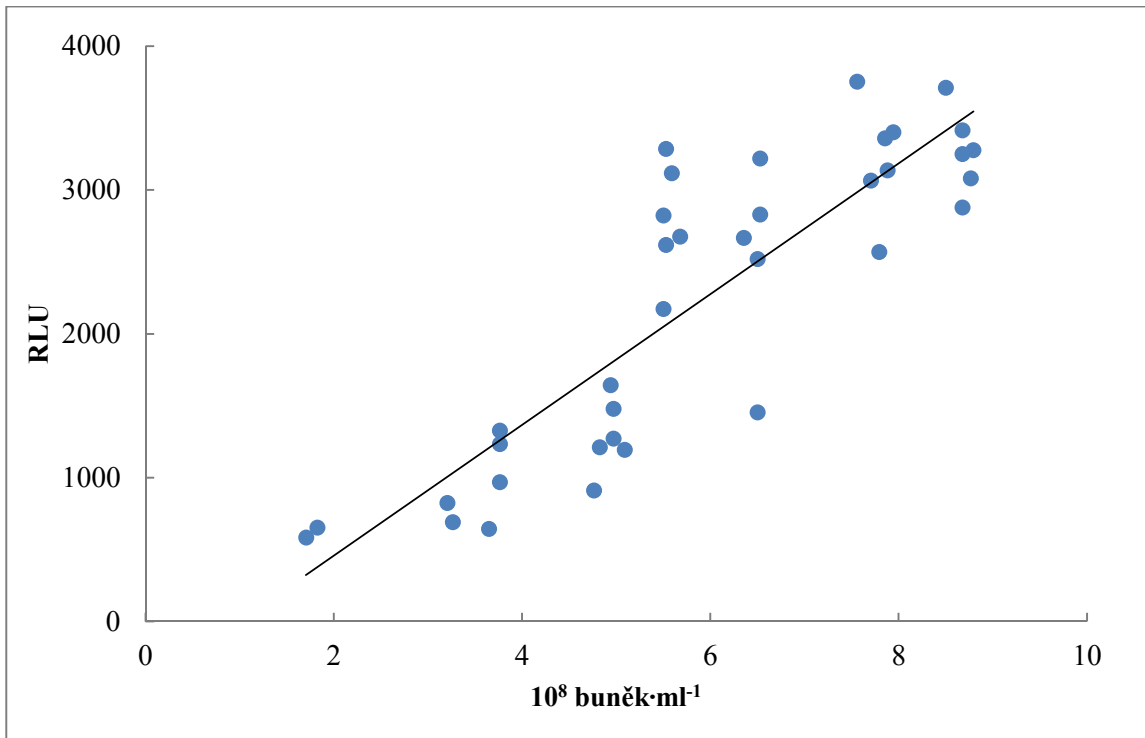
Obr. 20: Průběh intenzity luminiscence (●) před úpravami, (●) po úpravách. Podmínky kultury viz. Obr. 18.



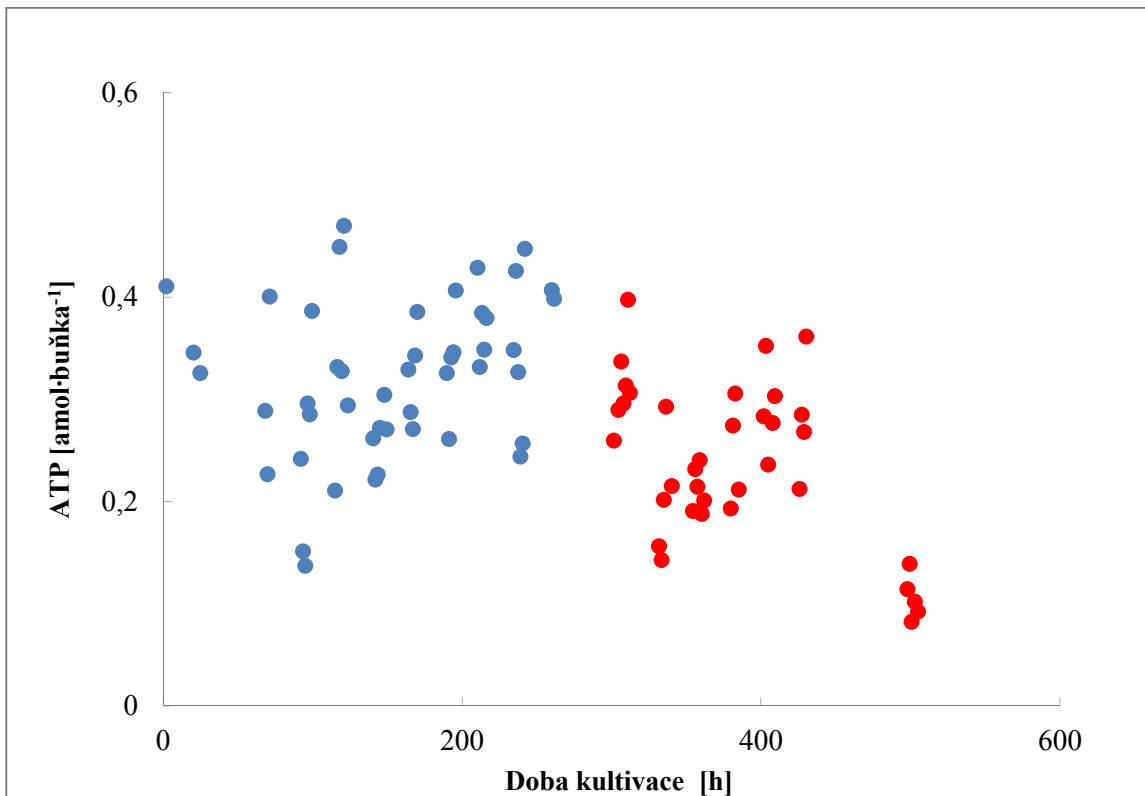
Obr. 21: Závislost koncentrace SO_4^{2-} na biomase v lineární fázi růstu (75. – 218. h). Podmínky kultury viz. Obr. 18.



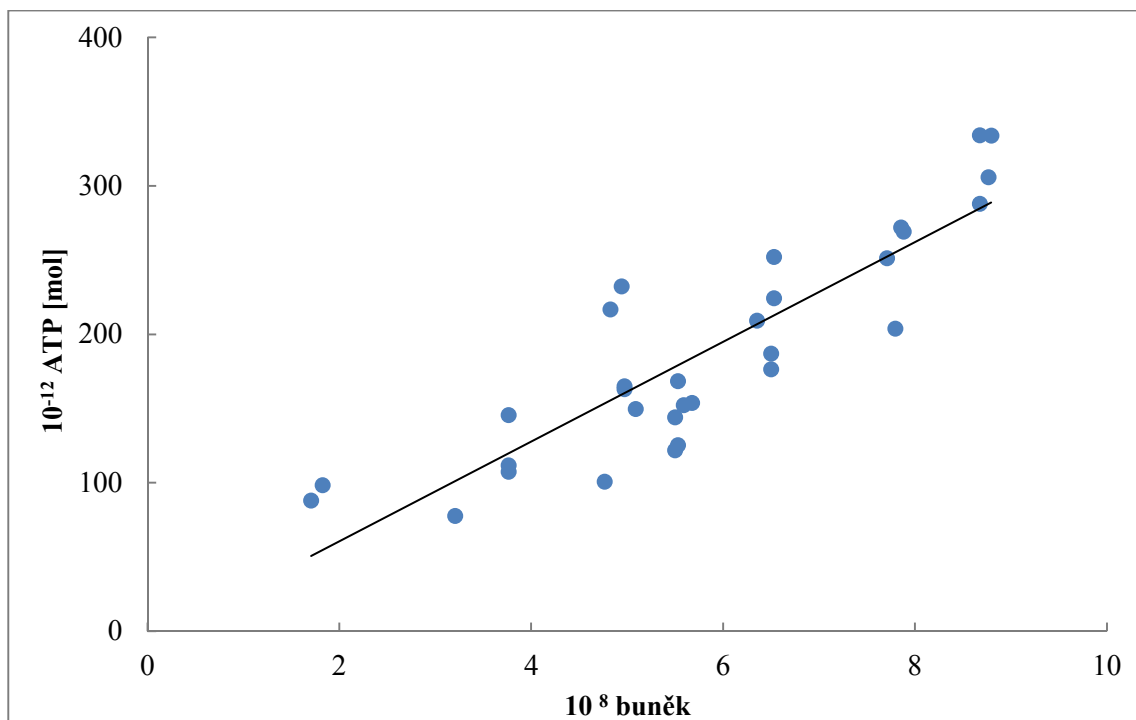
Ob.22: Závislost koncentrace SO_4^{2-} na průběhu intenzity bioluminescence v lineární fázi růstu (75. – 218. h). Podmínky kultury viz. Obr. 18.



Obr.23: Závislost průběhu intenzity bioluminescence na biomase v lineární fázi růstu (75.–218. h). Podmínky kultury viz. Obr. 18.



Obr.24: Průběh buněčného obsahu ATP (●) před úpravami, (●) po úpravách. Podmínky kultury viz. Obr. 18.



Obr.25: Závislost celkového obsahu ATP v lineární fázi růstu (75. – 218. h) na celkovém počtu buněk v 1 ml. Směrnice $0,33 \pm 0,07$ amol ATP·buňka⁻¹ (95% interval spolehlivosti, $r = 0,877$) odpovídá střední hodnotě obsahu ATP v buňce.

Lineárnímu růstu biomasy odpovídá lineární oxidace substrátu a lineární nárůst intenzity luminiscence (Obr. 18 – 20). Sekundární grafy závislosti produktu oxidace elementární síry na biomase (Obr. 21), závislosti koncentrace SO_4^{2-} na průběhu intenzity bioluminescence (Obr. 22) a závislosti průběhu intenzity bioluminescence na biomase (Obr. 23) v aktivní fázi růstu linearitu potvrzují.

Závislost celkového obsahu ATP v lineární fázi růstu (75. – 218. h) na celkovém počtu buněk v 1 ml (Obr. 25) jsme stanovili na $0,33 \pm 0,07$ amol ATP·buňka⁻¹.

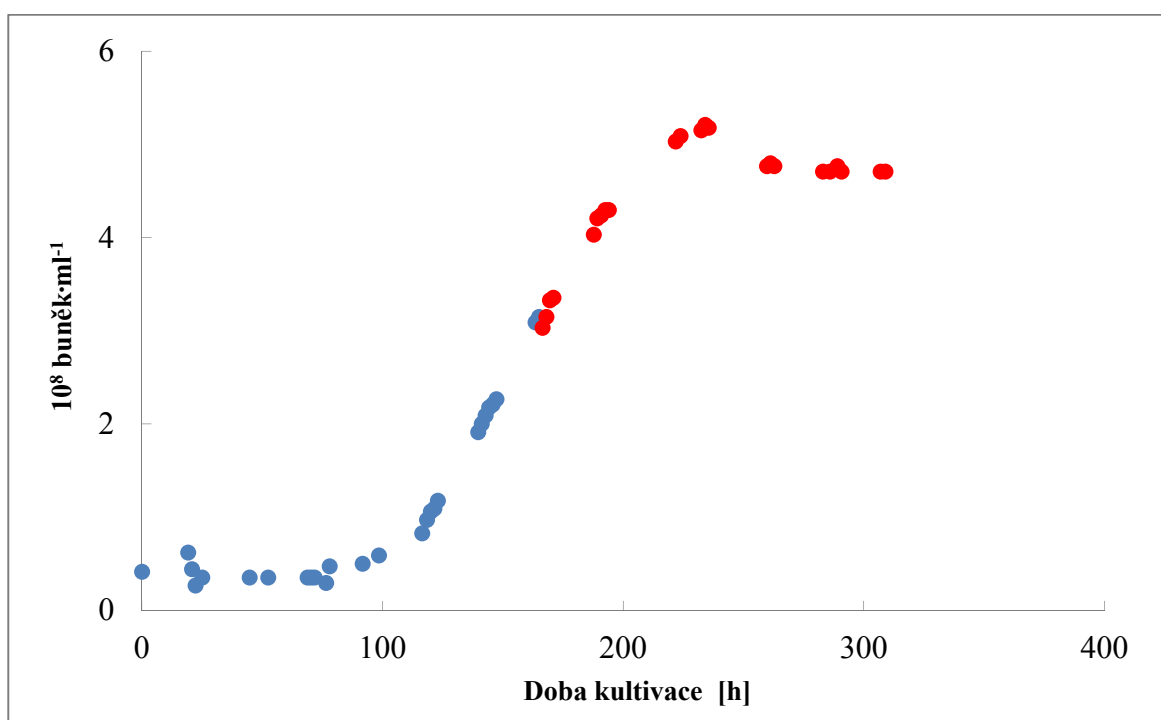
Po přechodu kultury do stacionární fáze byly v 297. h provedeny následující úpravy – byl přidán nový substrát a pH bylo zvednuto z 1,18 na 3,51. Došlo k obnovení rychlosti růstu biomasy (Obr. 18) a rychlosti oxidace síry (Obr. 19). Nedošlo ale k obnovení lineárního růstu průběhu bioluminiscence (Obr. 20) a tím pádem také došlo k poklesu buněčného obsahu ATP (Obr. 23). Je pozoruhodné, že je buňka schopna dosahovat stejných rychlostí růstu a oxidace substrátu s výrazně nižším buněčným obsahem ATP.

Byly ověřeny informace z dřívějších pokusů, že lineárnímu růstu odpovídá lineární oxidace substrátu a lineární nárůst intenzity luminiscence (Obr. 18 – 23). Hodnota buněčného obsahu ATP byla stanovena na $0,33 \pm 0,07$ amol ATP·buňka⁻¹ (Obr. 25). V literatuře existuje nemnoho údajů buněčného obsahu ATP v acidofilních chemolithotrofních bakteriích srovnatelných s měřenými hodnotami. Bioluminiscenční kit byl použit k monitorování tvorby ATP ve vesikulech *A. ferrooxidans* [37], Efemerenco et al. [38] stanovili buněčný obsah ATP

bez specifikace substrátu a Tsaplina et al. [29] stanovili hodnotu buněčného obsahu ATP při růstu *A. ferrooxidans* na Fe(II). Hodnota získaná v této práci je ve shodě s publikovanou hodnotou pro oxidaci elementární síry $0,327 \pm 0,028$ amol ATP·buňka⁻¹ [39]. Lineární fáze růstu trvala od 75. do 218. h, poté přešla kultura do stacionární fáze způsobené buď vyčerpáním elementární síry nebo inhibicí produktem H₂SO₄. Úpravami provedenými ve stacionární fázi, ve 297. h, došlo k obnovení rychlosti růstu a oxidace, nedošlo však k obnovení růstu intenzity bioluminescence. Bakteriální kultura přešla do jiného metabolického módu s nižším buněčným obsahem ATP (Obr. 24). Snížení obsahu buněčného ATP na zhruba 1/3 své původní hodnoty byl již pozorován dříve [39] a tyto výsledky ho potvrzují.

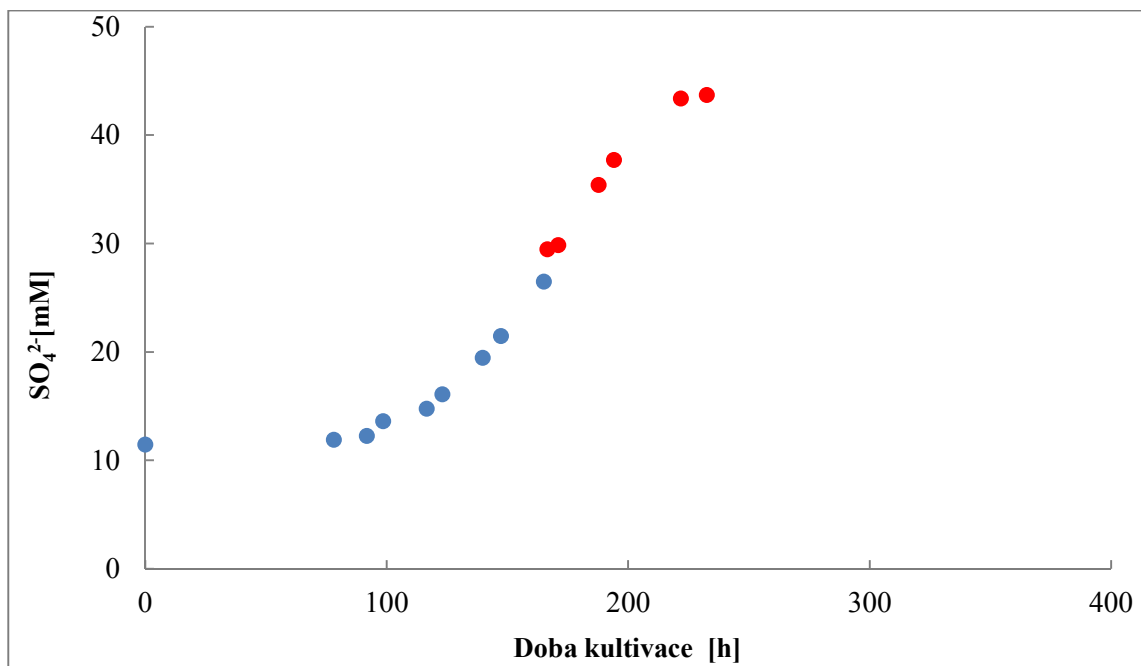
4.2.1.2 Vlivu úpravy (zvýšení) pH v lineární fázi růstu bakteriální kultury

V předešlém pokusu byl zjištěn vliv úpravy pH a přidavku substrátu ve stacionární fázi růstu bakteriální kultury na rychlost růstu, rychlost oxidace elementární síry, na hodnoty intenzity luminescence a hodnoty buněčného obsahu ATP. V následujícím pokusu byl sledován vliv pouhé úpravy pH v lineární fázi růstu kultury především na hodnoty intenzity luminescence.



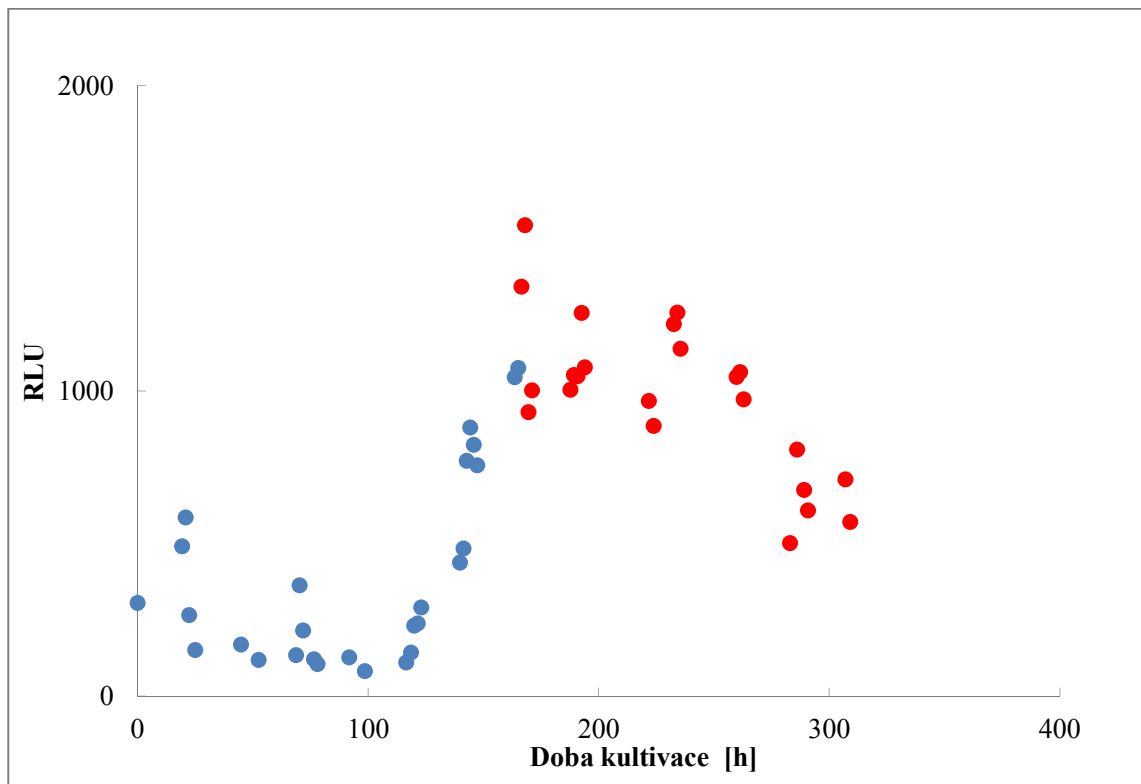
Obr. 26: Průběh růstu kultury *A. ferrooxidans* oxidující síru.

Podmínky kultury ve fermentoru: 28°C, míchání 300 ot./min., aerace 1,5 l/min. Úpravy ve 165. h: pH upraveno z 1,78 na 3,00. (●) Směrnice lineární části grafu $(4,69 \pm 0,10) \cdot 10^6$ buněk·ml⁻¹·h⁻¹ (95% interval spolehlivosti, $r = 0,999$) udává rychlost růstu kultury před úpravami. (●) Směrnice lineární části grafu $(4,54 \pm 0,43) \cdot 10^6$ buněk·ml⁻¹·h⁻¹ (95% interval spolehlivosti, $r = 0,994$) udává rychlost růstu kultury po úpravách.



Obr.27: Průběh koncentrace SO_4^{2-} .

Podmínky kultury viz. Obr. 26. (●) Směrnice lineární části grafu $0,28 \pm 0,04 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ (95% interval spolehlivosti, $r = 0,999$) udává rychlost oxidace S^0 bakteriální kulturou před úpravou pH. (●) Směrnice lineární části grafu $0,31 \pm 0,10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ (95% interval spolehlivosti, $r = 0,994$) udává rychlost oxidace S^0 bakteriální kulturou po úpravě pH.



Obr.28: Průběh intenzity luminiscence (●) před úpravou pH, (●) po úpravě pH. Podmínky kultury viz. Obr. 26.

V lineární fázi růstu bakteriální kultury bylo ve 165. h upraveno pH z 1,78 na 3,00. Úpravou pH nebyla změněna rychlost růstu bakteriální kultury (*Obr. 26*) ani rychlost oxidace substrátu (*Obr. 27*), ale došlo k zastavení nárůstu hodnot RLU (*Obr.28*).

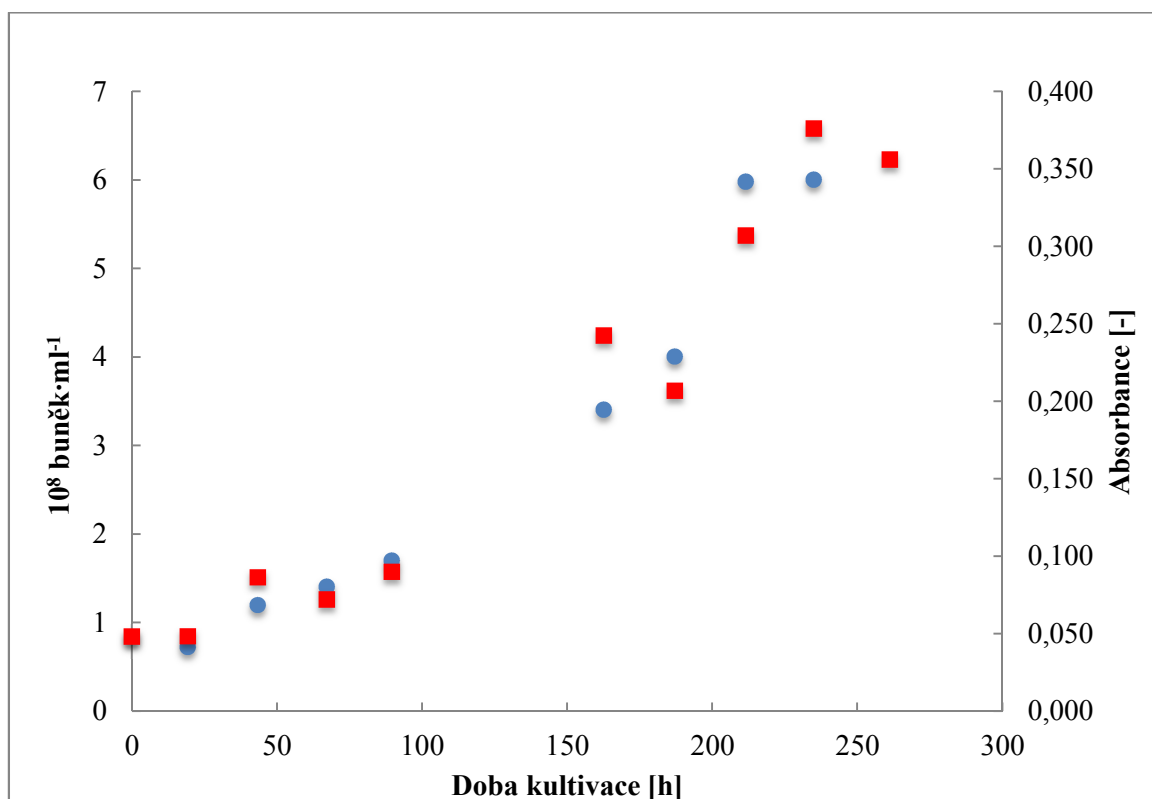
V tomto experimentu byl testován vliv pouze úpravy pH, bez přidavku substrátu, v lineární fázi růstu bakteriální kultury na rychlost růstu (*Obr. 26*), rychlost oxidace elementární síry (*Obr. 27*), na hodnoty intenzity luminescence (*Obr. 26*) a tedy i na hodnoty buněčného obsahu ATP (neuveďeno). Úpravou pH došlo k přechodu kultury do módu s nižším buněčným obsahem ATP zmiňovaným výše, což se projevilo zastavením lineárního nárůstu intenzity bioluminiscence (*Obr. 27*), přestože rychlost růstu a oxidace zůstala nezměněna.

Dalším cílem druhého experimentu bylo doplnit dříve prováděné experimenty, které byly prováděny za účelem zjistit, co je příčinou přechodu bakteriální kultury do stacionární fáze (zda inhibice produktem H_2SO_4 a/nebo limitace substrátem S^0) a co způsobuje přechod kultury do jiného metabolického módu. Vliv samotného zvýšení pH ve stacionární fázi a vlivy samotného přidavku substrátu v lineární i stacionární fázi růstu byly testovány dříve (nepublikovaná data). Na základě srovnání výsledků získaných v obou experimentech této práce s daty získanými dříve [Pakostova et al. 2013, nepublikovaná data] lze učinit závěr, že přechod kultury do metabolického módu s nižší energií je způsoben zvýšením pH, nikoliv novým přidavkem substrátu. Získané výsledky také pomohly potvrdit hypotézu, že pokles buněčného ATP je způsoben úpravou pH a že přechod bakteriální kultury do stacionární fáze, za výše definovaných podmínek, je způsoben inhibicí H_2SO_4 . Kromě těchto metabolických dopadů a odchylek také platí, že na rozdíl od kultury oxidující Fe (II), po úpravě (zvýšení) pH kultury oxidující síru nastává fáze procesu, kde intenzita bioluminiscence již není přímo úměrná růstu a oxidaci substrátu a nemůže zde sloužit jako indikátor růstu.

4.2.2 Anaerobní

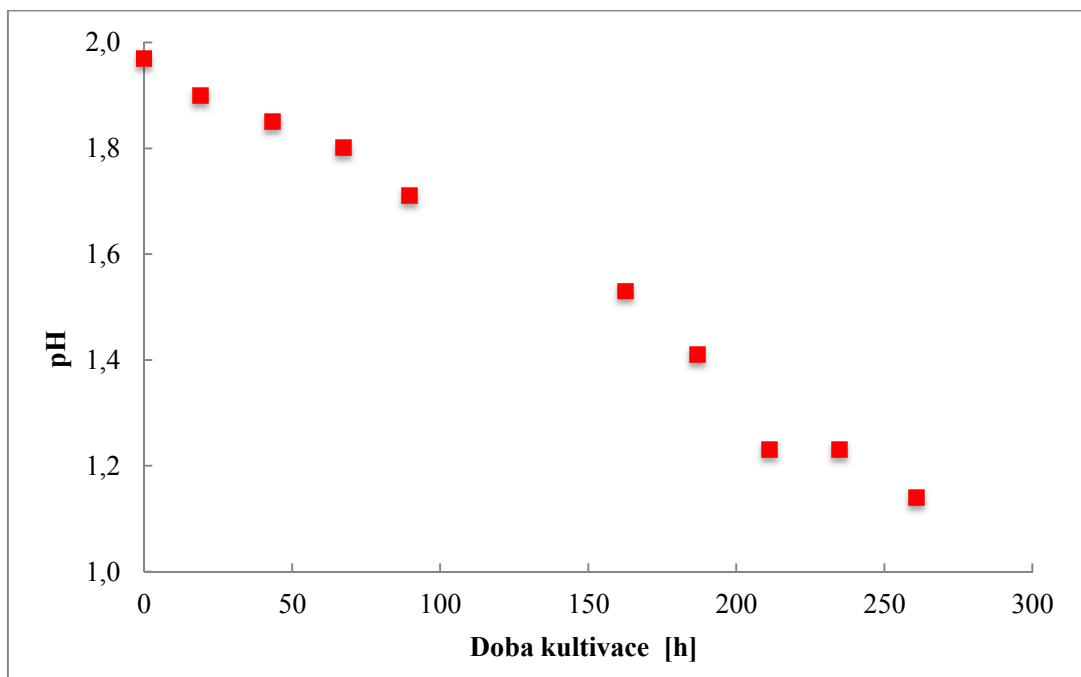
4.2.2.1 První experiment

Během prvního experimentu bylo použito 50% inokulum bakterie *A. ferrooxidans*. Kultivace probíhala při teplotě 30 °C na rotační míchačce s rychlostí míchání 300 rpm.



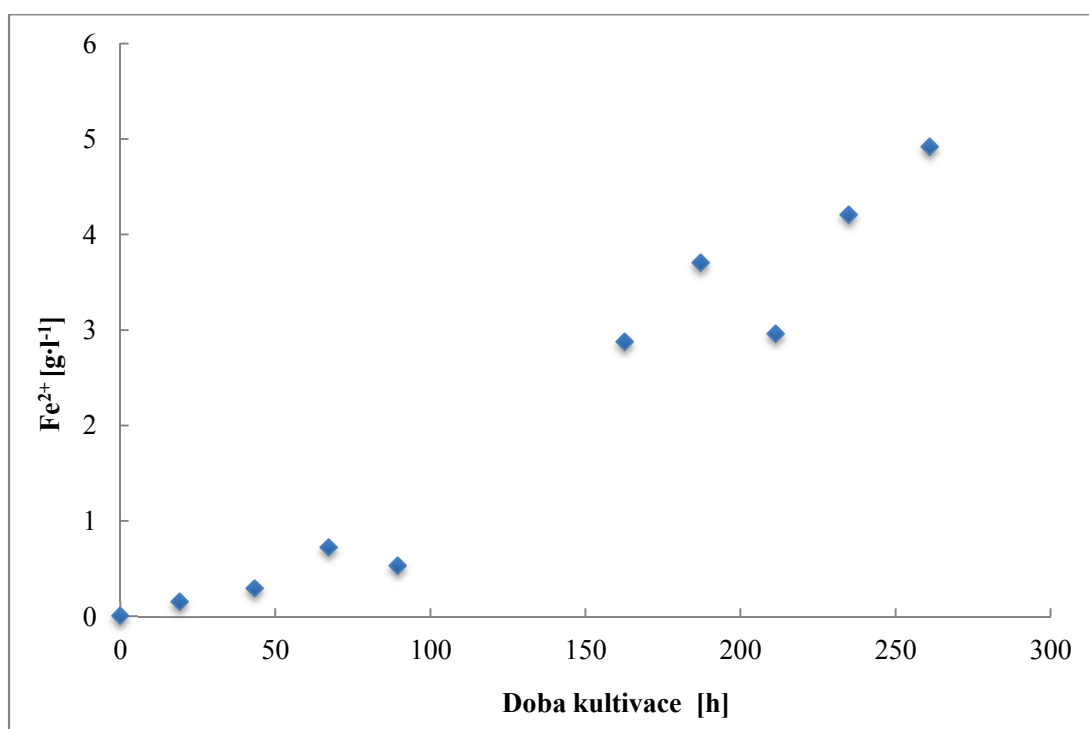
Obr.29: Stanovení počtu buněk pomocí turbidimetrie a mikroskopické metody (● mikroskopické stanovení, ■ turbidimetrické stanovení)

Pomocí mikroskopické metody bylo ověřeno, že pro stanovení počtu buněk rostoucích na Fe^{+2} lze použít i turbidimetrickou metodu měření zákalu při vlnové délce 450 nm (Obr. 29). Před vlastním měřením bylo ovšem nejdříve potřeba odbarvit interferující Fe^{3+} ionty, k tomu byla použita H_3PO_4 .



Obr. 30: Změny pH během kultivace *A. ferrooxidans*

Z Obr. 30 je patrné, že růst je provázen tvorbou kyseliny sírové.

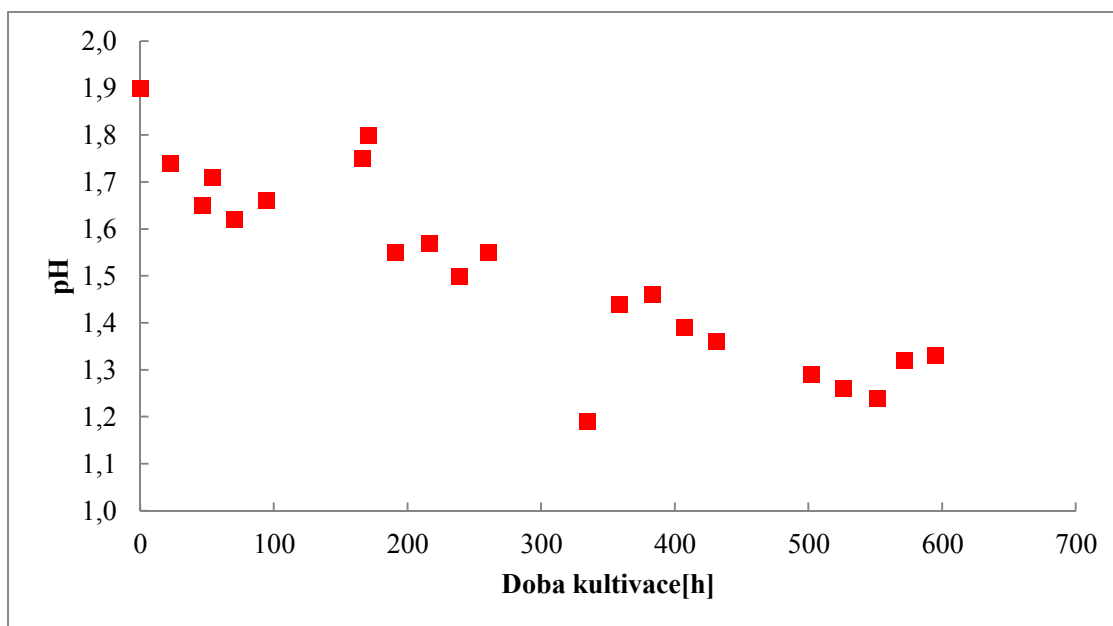


Obr. 31: Průběh koncentrace Fe^{2+}

Obr. 31 demonstruje tvorbu Fe^{2+} při redukci Fe^{3+} .

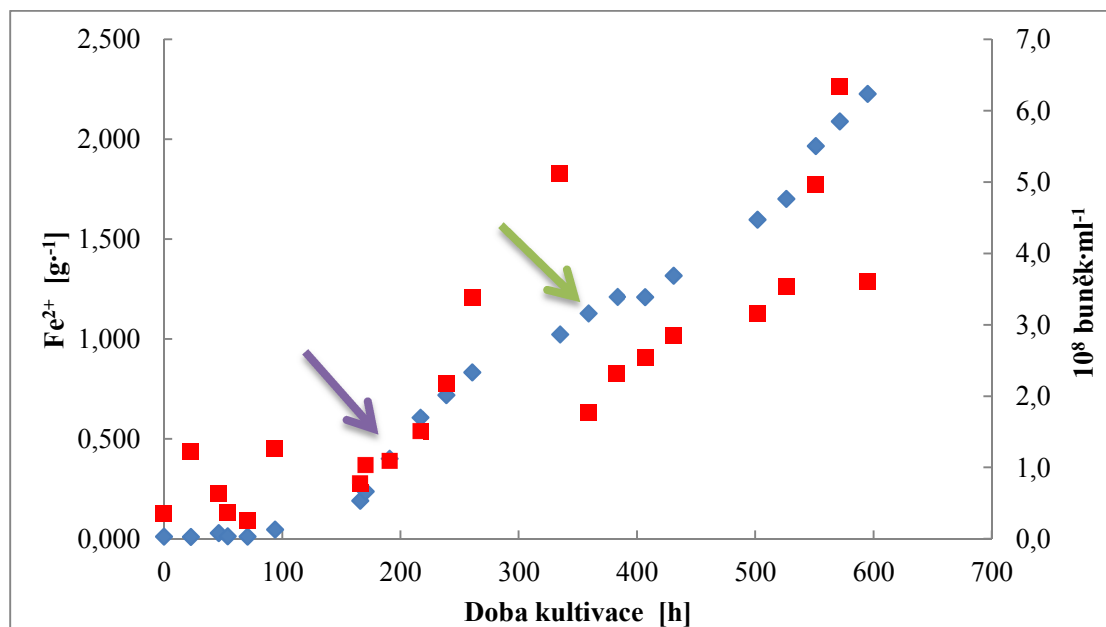
4.2.2.2 Druhý experiment

K druhému experimentu bylo použito 10% inokulum bakterie *A. ferrooxidans*.



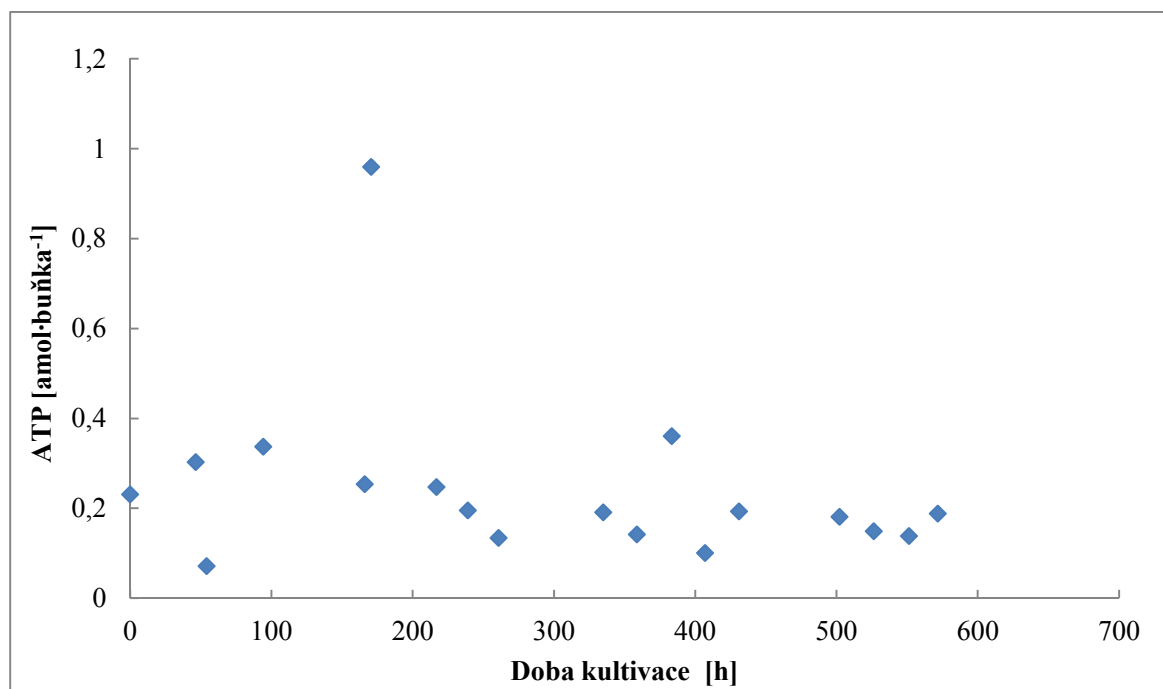
Obr.32: Změny pH během kultivace

Obr. 32 nám potvrzuje, že pH během kultivace klesá. Ovšem k poklesu pH dochází mnohem pomaleji než u 50% inokulace.



Obr. 33: Koncentrace Fe^{2+} (→ kultura nebyla probublávána směsí Ar/CO_2 , → kultura opět probublávána směsí Ar/CO_2 , ♦ koncentrace Fe^{2+} ■ počet buněk stanovený turbidimetricky)

Z Obr. 33 je patrné, že asi 2 body u počtu buněk před a po 300. hodině jsou chybné. Proto nebylo možné spolehlivě doložit účinek dodávky CO₂.



Obr.34: Průběh koncentrace ATP v buňce

Obsah ATP na buňku se během celého experimentu pohybovala kolem 0,2 - 0,3 amol. Hodnota je téměř totožná s výsledkem u aerobní kultury oxidující síru. Je proto zjevné, že dříve vyslovený předpoklad o limitaci sírou při její aerobní oxidaci je pravděpodobný i v anaerobním procesu. Bez ohledu na oxidační mechanismus je solubilizace siřného substrátu úzkým místem ovlivňujícím kinetiku (linearita růstu i oxidace substrátu) i snížený obsah ATP v buňce.

5 ZÁVĚR

5.1 Produkce mutantního proteinu kvasinkou *Pichia pastoris*

Během této práce byl ve fermentoru pomocí kvasinky *P. pastoris* vyprodukován a vypurifikován protein X24. Výtěžek tohoto proteinu činil 80 mg na litr bazálního fermentačního media. Během purifikace byly získány dvě frakce, u kterých byla stanovena koncentrace. U vyprodukováného mutantního proteinu byla pomocí fluorimetrie stanovena schopnost přenosu sterolů.

5.2 Oxidace síry bakterií *Acidithiobacillus ferrooxidans*

5.2.1 Aerobní proces

Přestože je stanovení obsahu ATP v kultuře rychlým nástrojem k monitorování růstu biomasy, výsledky pokusů potvrzují dříve zjištěná omezení použití luminiscenční metody ke sledování nárůstu biomasy [36]. Metoda je bez omezení použitelná pro sírné kultury v aktivní fázi růstu a oxidace, které nejsou ovlivněny vnějšími zásahy, jako například zvýšení pH. Po úpravě pH dochází k narušení korelace mezi intenzitou bioluminiscence a rychlostí růstu a oxidace substrátu. Tento zásah však odhalil odlišný „metabolický mód“ buněk oxidujících aerobně síru.

5.2.2 Anaerobní proces

U anaerobní oxidace síry byly provedeny dva experimenty. V prvním experimentu bylo použito 50% inokulum a v druhém experimentu 10% inokulum bakterie *A. ferrooxidans*. Byla prokázána shoda turbidimetrického a mikroskopického stanovení počtu buněk.

Bylo zjištěno, že lag fáze u 10% inokulace je mnohem delší a celkově se získá i mnohem méně buněk než kdyby byla použita 50% inokulace. Hodnoty ATP na buňku se během celého experimentu pohybovaly kolem hodnoty $0,2 - 0,3 \text{ amol} \cdot \text{buňka}^{-1}$, což je v souladu s výsledky aerobních kultur a s předpokladem limitace sírou.

6 ZDROJE

- [1] CEREGHINO G. P.L., CEREGHINO J.L., CREGG J.M.: Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Current Opinion in Biotechnology*. 2002, 13, 329–332.
- [2] DOBEŠ P., KUMNÍČEK J., MIKEŠ V., DAMBORSKÝ J.: Binding of Fatty Acid to β -Cryptogein: Quantitative structure-Activity Relationship and Design of Selective Protein Mutants. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2004, 44, 2126-2132.
- [3] CABRERA G., GÓMEZ J.M., CANTERO, D.: Kinetic study of ferrous sulphate oxidation of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in the presence of heavy metal ions. *Enzyme and Microbial Technology*. 2005, 36, 301 – 306.
- [4] RAWLINGS, D. E.: Characteristics and adaptability of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates. *Microbial Cell Factories*. 2005, 4, 4-13.
- [5] ROMANOS M.: Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. *Current Opinion in Biotechnology*. 1995, 6, 527-533.
- [6] *Pichia* Expression Kit, Manual of Methods for Expression of Recombinant proteins in *Pichia pastoris*. Invitrogen. 2002
- [7] MACAULEY-PATRIK S., FAZENDA M. L., MCNEIL B., HARVEY L. M.: Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*. 2005, 22, 249 - 270.
- [8] ZHAO J., DAVIS L. C., VERPOORTE R.: Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*. 2005, 23, 283-333.
- [9] *Plant pathology* [online]. [cit. 2014-04-01]. Dostupné z: http://bugs.bio.usyd.edu.au/learning/resources/PlantPathology/infection/plant_defenses/active_def.html
- [10] BOIRQUE S., PONCHET M., BINET M.N., RICCI P., PUGIN A., LABRUNGARCIA A.: Comparison of Binding Properties and Early Biological Effects of Elicitins in Tobacco Cells. *Plant Physiology*. 1998, 118, 1317 - 1326
- [11] BOISSY G., de La FORTELLE E., KAHN R., HUET J.C., BRICOGNE G., PERNOLLET J.C., BRUNIE S.: Crystal structure of a fungal elicitor secreted by *Phytophthora cryptogea*, a member of a novel class of plant necrotic proteins. *Structure*. 1996, 12, 1429-1439.
- [12] HAMMOND-KOSACEK K.E., JONES J.D.: Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell*. 1996, 8, 1773-1791.

- [13] BUCHANAN B., GRUISSEM W., JONES RL.: Biochemistry & Molecular Biology of Plants, *American Society of Plant Physiologists, Rockville*, 2000, 1102-1156.
- [14] MERT-TÜRK F.: Phytoalexins: Defence or just a response to stress?. *Journal of Cell & Molecular Biology*. 2002, 1, 1-6.
- [15] EDREVA A.: Pathogenesis-related proteins: Research progress in the last 15years. *General and Applied Plant Physiology*. 2005, 31: 105-124
- [16] VALLADGE., GOODMAN RM.: Systemic Acquired Resistance and Induced Systemic Resistance in Conventional Agriculture. *Crop Science*. 2004, 44, 1920 - 1934.
- [17] *Bacmap*. [online]. [cit. 2014-04-03]. Dostupné z: <http://bacmap.wishartlab.com/organisms/750>
- [18] LEDUC LG., FERRONI GD.: The chemolithotrophic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiology Reviews*. 1994, 14, 103-119.
- [19] KELLY DP., WOOD AP.: Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2000, 50, 511-516
- [20] WILLIAMS K. P., KELLY D. P. Proposal for a new Class within the *Proteobacteria*, the *Acidithiobacillia*, with the *Acidithiobacillales* as the type Order. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2013, 63, 3547–3548.
- [21] KUČERA J.: *Fyziologické a genetické aspekty aktivity acidofilních bakterií oxidujících sírné látky*. Brno, 2013. 1 sv. Disertační práce. Masarykova univerzita.
- [22] PRONK J.T., MEIJER W.M., HAZEU W., van DIJKEN J.P., BOS P., KUENEN JG.: Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* on Formic Acid. *Applied and environmental microbiology*. 1991, 57, 2057-2062.
- [23] ELBETHI A., BRASSEUR G., LEMESLE-MEUNIER D.: First Evidence for Existence of an Uphill Electron Transfer through the bc1 and NADH-Q Oxidoreductase Complexes of the Acidophilic Obligate Chemolithotrophic Ferrous Ion-Oxidizing Bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Bacteriology*. 2000, 182, 3602-3606.
- [24] QUATRINI R., APPIA-AYME C., DENIS Y., JEDLICKI E., HOLMES D, BONNEFOY V.: Extending the models for iron and sulfur oxidation in the extreme Acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *BMC Genomics*. 2009, 10, 394.

- [25] BRASSEUR G., LEVICAN G., BONNEFOY V., HOLMES D, JEDLICKI E., LEMESLE-MEUNIER D.: Apparent redundancy of electron transfer pathways via bc1 complexes and terminal oxidases in the extremophilic chemolithoautotrophic *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2004, 2-3, 114-126.
- [26] VALDES J., PEDROSO I., QATRINI R., DONSON RJ., HETTELIN H., BLAKE R., EISEN JA., HOLMES DS.: *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome sequence to industrial applications. *Biomedcentral Genomics*. 2008, 9, 597
- [27] OHMURA N., SASAKI K., MATSUMOTO N., SAIKI H.: Anaerobic Respiration Using Fe³⁺, S₀, and H₂ in the Chemolithoautotrophic Bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Bacteriology*. 2002, 184, 2081-2087
- [28] KUCERA J., ZEMAN J., MANDL M., CERNA H.: Stoichiometry of bacterial anaerobic oxidation of elemental sulfur by ferric iron. *Antonie van Leeuwenhoek. International Journal of General and Molecular Microbiology*. 2012, 101, 919-922
- [29] TSAPLINA, I. A., ZHURAVLEVA E.A., ISMAILOV A. D., ZAKHARCHUK L. M., KRASIL'NIKOVA E. N., BOGDANOVA T.I., KARAVAIKO G. I.: The dependence of intracellular ATP level on the nutrition mode of the acidophilic bacteria *Sulfobacillus thermotolerans* and *Alicyclobacillus tolerans*. *Microbiology*. 2007, 76, 6, 654-662
- [30] WAKAIS., OHMORI A., KANAO T., SUGIO T., KAMIMURA K.: Purification and Biochemical Characterization of the F1-ATPase from *Acidithiobacillus ferrooxidans* NASF-1 and Analysis of the atp Operon. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2005, 69, 1884-1891
- [31] UGR. [online]. [cit. 2014-04-04]. Dostupné z: <http://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/images/10atpasa.JPG>
- [32] LUNDIN A.: Use of firefly luciferase in ATP related assay of biomass, enzymes and metabolites. *Methods in Enzymology*. 2000, 305, 346-370.
- [33] Institut Für Biochemie. [online]. [cit. 2014-04-04]. Dostupné z: <http://www.biochemistry.tugraz.at/index.php/wbPage/wbShow/USER614>
- [34] JANICZEK O., MANDL M., ČEŠKOVÁ P.: Metabolic activity of *Thiobacillus ferrooxidans* on reduced sulfur compounds detected by capillary isotachopheresis. *Journal of Biotechnology*. 1998, 61, 225-229
- [35] TAMURA H., GOTO K.: Spektrophotometric determination of iron (II) with 1,10-phenanthroline in the presence of large amounts of iron (III). *Talanta*. 1974. 21, 314-318
- [36] *Tools life technologies* [online]. [cit. 2014-04-07]. Dostupné z: http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/pich_man.pdf

- [37] APEL WA, PR DUGAN, TUTTLE JH.: Adenosine 5'-triphosphate formation in *Thiobacillus ferrooxidans* vesicles by H⁺ ion gradients comparable to those of environmental conditions. *Journal of Bacteriol* 1980, 142, 295–301.
- [38] EFREMENKO EN, AZIZOV RE, MAKHLIS TA, ABBASOV VM, VARFOLOMEEV SD.: Determination of minimal concentrations of biocorrosion inhibitors by a bioluminescence method. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2005, 41, 377–381.
- [39] PAKOSTOVÁ E., MANDL M., POKORNÁ B., DIVÍŠKOVÁ E., LOJEK A.: Cellular ATP changes in *Acidithiobacillus ferrooxidans* cultures oxidizing ferrous iron and elemental sulfur. *Geomicrobiology Journal*. 2013, 1-7.

7 SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obrázky:

<i>Obr. 1: Kvasinka Pichia pastoris</i>	12
<i>Obr. 2: Expresní vektor pPIC9[6]</i>	14
<i>Obr. 3: Integrace vektoru do genomu [6]</i>	14
<i>Obr. 4: Struktura cryptogeinu[11]</i>	16
<i>Obr. 5: Bakterie Acidithiobacillus ferrooxidans [17]</i>	19
<i>Obr. 6: Model oxidace Fe²⁺ u A. ferrooxidans [24]</i>	22
<i>Obr. 7: Model oxidace síry u A. ferrooxidans [24]</i>	23
<i>Obr. 8: Strukturální vzorec ATP</i>	24
<i>Obr. 9: Schéma F-ATPasy [31]</i>	25
<i>Obr. 10: Struktura luciferasy ze světlušky [33]</i>	26
<i>Obr. 11: Biostat B-DCU, B. Braun Biotech International</i>	33
<i>Obr. 12: Anaerobní kultivační aparatura</i>	34
<i>Obr. 13: Luminometr Junior LB 9509</i>	35
<i>Obr. 14: Růstová křivka P. pastoris na glycerolu</i>	38
<i>Obr. 15: Záznam průběhu fermentace</i>	40
<i>Obr. 16: FPLC chromatogram mutantního proteinu X24 v koloně TriCorn 10 x 50 mm</i> ...	41
<i>Obr. 17: Fluorescence micel po přidavku cryptogeinu</i>	42
<i>Obr. 18: Průběh růstu kultury A. ferrooxidans oxidující síru.</i>	43
<i>Obr. 19: Průběh koncentrace SO₄²⁻</i>	44
<i>Obr. 20: Průběh intenzity luminiscence</i>	44
<i>Obr. 21: Závislost koncentrace SO₄²⁻ na biomase v lineární fázi růstu (75. – 218. h)</i>	45
<i>Ob. 22: Závislost koncentrace SO₄²⁻ na průběhu intenzity bioluminescence v lineární fázi růstu</i>	45
<i>Obr. 23: Závislost průběhu intenzity bioluminescence na biomase v lineární fázi růstu</i>	46
<i>Obr. 24: Průběh buněčného obsahu ATP</i>	46
<i>Obr. 25: Závislost celkového obsahu ATP</i>	47
<i>Obr. 26: Průběh růstu kultury A. ferrooxidans oxidující síru.</i>	48
<i>Obr. 27: Průběh koncentrace SO₄²⁻</i>	49
<i>Obr. 28: Průběh intenzity luminiscence.</i>	49
<i>Obr. 29: Stanovení počtu buněk pomocí turbidimetrie a mikroskopické metody</i>	51
<i>Obr. 30: Změny pH během kultivace A. ferrooxidans</i>	52
<i>Obr. 31: Průběh koncentrace Fe²⁺</i>	52
<i>Obr. 32: Změny pH během kultivace</i>	53
<i>Obr. 33: Koncentrace Fe²⁺</i>	53
<i>Obr. 34: Průběh koncentrace ATP v buňce</i>	54

Tabulky:

<i>Tab. 1: Taxonomické zařazení kvasinky</i>	12
<i>Tab.2: Rozdělení PR proteinů do jednotlivých tříd [15]</i>	18
<i>Tab. 3: Taxonomické zařazení A. ferrooxidans [20]</i>	20
<i>Tab. 4: Složení BMGY media</i>	27
<i>Tab. 5: Složení Bazálního fermentačního media</i>	27
<i>Tab.6: Kultivační podmínky ve fermentoru - P.pastoris</i>	28
<i>Tab.7: Složení roztoků stopových solí</i>	28
<i>Tab.8: Parametry měření</i>	30
<i>Tab.9: Složení S media – uvedené množství je na 1 l deionizované vody</i>	31
<i>Tab.10: Složení 9K media</i>	31
<i>Tab.11: Složení speciálního media pro anaerobní oxidaci síry</i>	32
<i>Tab.12: Kultivační podmínky ve fermentoru</i>	33
<i>Tab.13: Složení reakční směsi</i>	36
<i>Tab.14: Složení reakční směsi pro stanovení koncentrace Fe²⁺</i>	37
<i>Tab.15: Složení reakční směsi</i>	37
<i>Tab.16: Koncentrace jednotlivých frakcí vyprodukovaného proteinu</i>	41

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

<i>A.</i>	<i>Acidithiobacillus</i>
AMD	kyselá důlní voda
AMP	adenosin-5'-monofosfát
AOS	aktivní forma kyslíku
AOX	alkoholoxidáza
ARD	kyselá skalní voda
ASP	adenosin-5'-fosfosulfát
ATP	adenosin-5'-trifosfát
BCA	bicinchinonová kyselina
FPLC	fast protein liquid chromatography
HDR	heterodisulfidreduktasa
HIS4	histidinyldehydrogenasa
HR	hypersensitivní buněčná reakce
NADH	nikotinamidadeninidinukleosid
NADPH	nikotinamidadeninidinukleotidfosfát
NMR	nukleární magnetická resonance
<i>P.</i>	<i>Pichia</i>
pI	izoelektrický bod
PPi	anorganický fosfát
PR-protein	Pathogenesis-related protein
RISC	Reduced Inorganic Sulfur Compounds
rRNA	ribozomální ribonukleová kyselina
RUBISCO	ribulosa bisfosfát karboxylasa/oxygemasa
<i>S.</i>	<i>Saccharomyces</i>
SAR	systemově řízená rezistence
SAT	ATP sulfurylasa

SDS PAGE	polyakrylamidová elektroforéza v přítomnosti dodecylsíranu sodného
SQR	sulfid:ubichinonoxidoreduktasa
TeTH	tetrathionátreduktasa
TQR	thiosulfát:ubichinonoxidoreduktasa