

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Obecná biologie  
katedra ekologie



# Mechanismy chladové adaptace u mikroorganismů

Cold adaptation mechanisms in microorganisms

Bakalářská práce

Marie Dřížhalová

Vedoucí práce: RNDr. Linda Nedbalová, Ph.D.

Praha, 2011

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 18. 8. 2011

Podpis:

**Poděkování:**

Na této stránce bych chtěla poděkovat své školitelce RNDr. Lindě Nedbalové Ph.D., za pomoc při shromažďování literatury, cenné rady a trpělivost při tvoření této práce. Můj dík patří i mým rodičům a všem, kteří mě ve studiu podporují.

## Abstrakt

Na naší planetě jsou rozsáhlé oblasti, kde průměrná teplota nepřesahuje 5 °C. Na mnoha místech teplota často klesá pod bod mrazu. Ne každý organismus je schopen žít v těchto podmínkách. Schopnost přežít v chladných oblastech a úspěšně obydlet zdánlivě nepříznivé prostředí vyžaduje určité evoluční přizpůsobení. Adaptace na chladné prostředí se vyvinula nezávisle u různých fylogenetických skupin. Organismy se v prostředí nízkých teplot musí komplexně přizpůsobit, aby mohly tyto habitaty trvale obydlet.

Protože rozbor chladové adaptace u všech organismů je velmi rozsáhlé téma, je má bakalářská práce zúžena na mikroorganismy. V rámci této skupiny se dají nalézt určité principy, které se opakují i u nepříbuzných taxonů. Obecné mechanismy zahrnují změny složení membrán, posun teplotního optima enzymů, tvorbu látek, které zabraňují negativnímu vlivu nízkých teplot nebo tvorbu klidových stádií.

Tato bakalářská práce shrnuje mechanismy chladové adaptace, které se vyvinuly u mikroorganismů v nutnosti trvale nebo přechodně přežít v prostředí nízkých teplot, a také naznačuje potenciál jejich biotechnologického využití.

*klíčová slova:* psychrofilní, psychrotolerantní, chladová adaptace, enzymy, odpověď na chladový šok, nenasycené mastné kyseliny, trvalá stadia

## **Abstract**

On our planet there are vast areas, where the average temperature does not exceed 5 °C. They are also many places, where the temperature often drops below zero. Not every living organism is able to live in these conditions. The ability to survive in cold region and successfully colonize, such presumably adverse environment requires particular evolutionary adaptation. Adaptation to cold environments has evolved independently in different phylogenetic groups. In low temperature environments, organisms had to adapt in a complex way to be able to permanently inhabit these habitats.

Since the analysis of cold adaptation in all organisms is a very complex topic, this thesis is focused on microorganisms. Within this group, it is possible to find certain principles, which are repeated also in unrelated taxa. The general mechanisms include changes in membrane composition, shifts of enzyme temperature optima, production of compounds that prevent the negative effects of low temperature or the formation of resting stages.

This thesis summarizes the mechanisms of cold adaptation which have evolved in microorganisms as response to a long-term or temporary survival at low temperatures. Their potential biotechnological applications are also mentioned.

*keywords:* psychrophilic, psychrotolerant, cold adaptation, enzymes, cold-shock response, unsaturated fatty acids, resting stages

# Obsah

ABSTRAKT.....	4
ABSTRACT.....	5
1. ÚVOD.....	7
2. PSYCHROFILNÍ A PSYCHROTROFNÍ ORGANISMY.....	9
2.1 Prokaryota.....	10
2.2 Eukaryota.....	11
3. MEMBRÁNOVÉ LIPIDY.....	12
3.1 Obecné vlastnosti membrán.....	12
3.1.1 Složení membrán.....	12
3.1.2 Fluidita membrán.....	13
3.2 Změny mastných kyselin v závislosti na teplotě.....	13
3.2.1 Vznik dvojných vazeb mastných kyselin.....	14
3.2.2 Konfigurace dvojné vazby.....	16
3.2.3 Délka mastných kyselin.....	17
3.2.4 Další mechanismy.....	17
3.3 Význam PUFA pro zdraví.....	18
4. PRODUKCE LÁTEK, KTERÉ TLUMÍ NEGATIVNÍ ÚČINKY NÍZKÝCH TEPLOT.....	20
4.1 „Cold shock“ odpověď organismu.....	20
4.2 „Cold-shock“ proteiny (Csps).....	20
4.3 „Cold acclimation“ proteiny (Caps).....	21
4.4 „Antifreeze“ proteiny (AFPs).....	21
4.5 Led vázající proteiny (Ice binding).....	22
4.6 Karotenoidy.....	22
4.7 Cukry.....	23
5. PSYCHROFILNÍ ENZYMY.....	24
5.1. Obecné vlastnosti enzymů.....	24
5.1.1 Kinetika enzymů.....	25
5.2 Psychrofilní enzymy.....	26
5.2.1 Flexibilita.....	27
5.2.2 Stabilita.....	28
5.2.3 Aktivita.....	29
6. BIOTECHNOLOGICKÝ POTENCIÁL.....	30
7. KLIDOVÁ STADIA.....	31
8. ZÁVĚR.....	33
9. SEZNAM LITERATURY.....	34

# 1. Úvod

Jako extremofilové jsou označovány takové organismy, které prospívají v prostředí, které je z hlediska chemicko-fyzikálních podmínek považováno za nepříznivé pro život. Díky výzkumu, který je v současnosti této problematice věnován jsou objeveny stále další extremofilní organismy na stanovištích, která pokládáme za nehostinná, příliš tvrdá a nevhodná pro život (Gerday & Glandsdorff, 2007). Extremofilové prospívají v nízkých nebo vysokých teplotách, krajních hodnotách pH, vysoké salinitě, suchu, vysokém tlaku a dalších extrémních podmínkách (Seckbach, 2000). Do prostředí obývaných extremofily tak patří například sladkovodní alkalické horké prameny, anaerobní geotermální bahna a půdy, uhličitánové prameny, kyselé a alkalické půdy nebo voda ve velmi slaných jezerech (Kristjansson, 1995). Jednou z významných skupin extremofilů jsou psychrofilové a psychrotrofové, organismy, které jsou schopny přežít v extrémně nízkých teplotách.

Je mnoho míst a oblastí na naší planetě, kde převládají nízké teploty. Teplota téměř tři čtvrtin zemského povrchu nepřesahuje 5 °C. To jsou velmi chladná prostředí, která vyžadují od organismů adaptivní přizpůsobení. U většiny oceánských vod (až 90 %) se teplota pohybuje v rozpětí 2,5 – 5 °C. Polární oblasti zahrnují Antarktidu a části Severní Ameriky, Evropy i Asie tak až, zaujímají až 20 % pevniny (Gerday & Glandsdorff). Mimo to se sem řadí i regiony s vysokou nadmořskou výškou, která také snižuje průměrnou teplotu. Například pohoří jako Alpy, Himaláje, Andy a další, zaujímají nezanedbatelně velké území (Gerday & Glandsdorff, 2007). Tyto habitaty se vyznačují například trvalým sněhem, zamrzlou půdou, ledovci nebo horskými jezery. Neměli bychom opomenout také vešteré podzemní přírodní prostory jako jsou jeskyně, pukliny, výdutě a podzemní vody (Schulze & Makuch, 2005).

Všude tam, kde se živé organismy musí vypořádat s nepříznivými nízkými teplotami často blízkými nule, se musí patřičně přizpůsobit, aby mohly takovéto prostředí obýdlet.

Tato práce se zabývá adaptačními mechanismy, které umožňují přežití v chladu. Účinnou adaptací na chlad vykazují jak mikroorganismy (Prokaryota i Eukaryota) tak i organismy. Mechanismy pro ochranu před nízkou teplotou vznikly u mnoha různých skupin organismů nezávisle na sobě, tj. nejedná se o znak příbuznosti.

Mezi široce rozšířené adaptační strategie patří například zachování tekutosti membrán, pokračování metabolické aktivity organismů díky zachování syntézy bílkovin při poklesu teplot. Dále mohou být syntetizovány proteiny chladového šoku, jejichž počet se zvyšuje se závažností šoku. Proteiny chladové aklimace, jsou syntetizovány neustále během růstu v nízkých teplotách (Hebraud & Poitier, 2000).

Důležitým faktorem ovlivňujícím roční průběh teplot řady chladných lokalit je sezonalita,

a to především v mírném pásu, která zřejmě zapříčinila vznik strategie klidových stádií a dlouhodobé přečkání dočasně nepříznivých podmínek v neaktivní formě.

Bakalářská práce je stručným souhrnem a představením těchto adaptačních mechanismů bez kterých by byl život v chladných a ledových oblastech mikroorganismům znemožněn nebo značně omezen.

## 2. Psychrofilní a psychrotrofní organismy

Organismy adaptované na chlad jsou rozdělovány do dvou skupin dle teplotního optima růstu a rozsahu teplot, ve kterých přežijí. Psychrofilové mají obecně teplotní optima růstu 15 °C a nižší, maximální teplota růstu však nepřesahuje 20 °C (Bowman et al., 1997a). Organismy (označované někdy jako psychrotolerantní) dokáží žít i v teplotách pod –15 °C, avšak nejlépe se jim daří v teplotách nad 18 °C (Morgan-Kiss et al., 2006).

Hodnoty teplotních optim a tedy přesná hranice určování, zda je daný organismus psychrofilní nebo psychrotolerantní, je relativní a definice dvou strategií se proto často liší dle zkoumaného organismu a autora.

Pro výzkum sinic a řas byly navrženy dva typy extrémního prostředí. Prvním typem je extrémní, ale stabilní prostředí, kde nedochází k fluktuaci ekologických podmínek. V případě, že by zde k fluktuacím docházelo, fyziologický stres by se zvýšil nad únosnou mez a mikroorganismy by uhynuly. Organismy, které žijí v prostředí nízkých, ale stálých teplot, označujeme jako psychrofilní. U některých mořských antarktických rozsivek je rozmezí teplot, ve kterých jsou schopny růst, –3 °C až +3 °C. Stabilní extrémní prostředí v Antarktidě nacházíme především v mořských biotopech, v ledovcích, v tajícím sněhu a ve stále zamrzlých a subglaciálních jezerech. Do podobné kategorie patří i termofilní sinice, žijící trvale ve stabilně vysoké teplotě termálních pramenů.

Druhým typem extrémních stanovišť je ekologicky nestabilní prostředí, charakteristické velkými výkyvy v rámci denních i sezónních změn. K velmi drastickým změnám v průběhu roku dochází např. v prostředí osídleném endolitickými sinicemi a řasami, které žijí pod povrchem skalního substrátu, půdními řasami nebo řasami mělkých mokřadů. Toto prostředí se v letním období přehřívá na teploty kolem +10 až +20 °C, v zimě naopak promrzá na –30 až –50 °C. Roční kolísání teplot tak dosahuje až 70 °C a organismy zde žijící se musí na tyto výkyvy dobře adaptovat. Podobně i v rámci letních denních výkyvů klesá často teplota v noci pod bod mrazu a přes den vystupuje k relativně vysokým hodnotám. Mikroorganismy, které jsou schopny žít v širokém rozmezí teplot, označujeme jako psychrotrofní. Například některé druhy sinic a řas žijící v antarktických mokřadech rostou nejrychleji v teplotách kolem 15 °C, ale dokážou růst v teplotách kolem bodu mrazu i v teplotách vyšších než 20 °C (Elster, 2002).

## 2.1 Prokaryota

V antarktických oblastech převládají planktonická a bentická mikrobiální společenstva. Biodiverzita těchto společenstev je poměrně nízká (Vincent & James, 1996). I v mořském ledu Antarktidy se nacházejí bakterie, z nichž je 45 % kmenů psychrofilních. Ty pak podle analýzy sekvencí 16rDNA patří hlavně rodům *Colwellia*, *Shewanella*, *Marinobacter*, *Planococcus* či *Alteromonas*. K psychrotrofním kmenům patří *Pseudoalteromonas*, *Psychrobacter*, *Halomonas*, *Pseudomonas*, *Hyphomonas*, *Sphingomonas*, *Arthrobacter* *Planococcus* a *Halobacillus* (Bowman et al., 1997a).

Pro psychrofilní bakterii *Deinococcus radiodurans* je optimální teplota asi 5 °C při měření je rychlost syntézy u této bakterie srovnatelná s mezofilními organismy při pokojové teplotě (Nandakumar & Mattiasson, 1999).

Psychrotrofní bakterie žijí v širokém rozsahu teplot a mohou tedy růst při teplotách blízkých 0 °C nebo dokonce pod bodem mrazu. Syntéza bílkovin není příliš potlačena při poklesu teploty a množství vyprodukovaných proteinů je téměř shodné v obou rozdílných teplotách (Hebraud & Poitier, 2000).

V Antarktidě se vyskytují psychrofilní i psychrotolerantní druhy cyanobacterií (sinic). Dle molekulárních analýz jsou však psychrotolerantní druhy příbuznější mesofilním než psychrofilům (Nadeau et al., 2001). Psychrofilní sinice nalezené v mělkých sladkovodních ekosystémech se vyznačují ve srovnání s psychrotolerantními kmeny kvůli své adaptaci pomalým růstem a nejsou schopny využít příležitostné výkyvy do vyšších teplot. To by se mohlo vysvětlit tím, že psychrofilní kmeny mají společného předka, který ztratil schopnost růst při vyšších teplotách při zachování široké tolerance k výkyvům jiných fyzikálních a chemických parametrů (Nadeau et al., 2000). Důležitou ekologickou skupinou bakterií v polárních oblastech jsou vláknité sinice rodu *Oscillatoriaceae* vyskytující se v širokém spektru podmínek prostředí v celém regionu (Vincent & James, 1996).

Lišejníky na Antarktidě nejsou ještě dobře probádány. Lišejníky vytváří dlouhožijící, stabilní mikroprostředí pro bakteriální kolonizaci. U čtyř z pěti lišejníků (*Lecanora fusco-brunnea*, *Umbilicaria decussata*, *Usnea Antartica*, *Xanthoria elegans*) se podařilo izolovat 30 bakteriálních kmenů, z nichž hlavní linie jsou Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria a *Deinococcus thermus*. Většina z testovaných kmenů je schopna růst i při nízkých teplotách, ale toleruje širší rozsah teplot. Některé jsou symbiotické bakterie jsou psychrofilní jiné z mírného podnebí. Ekologické a evoluční důsledky těchto bakterií souvisejícími s lišejníky jsou diskutovány (Selbmann et al., 2010).

## 2.2 Eukaryota

Typickými představiteli psychrofilních a psychrotrofních organismů jsou sněžné řasy. V případě, že jejich koncentrace dosáhne vysokých hodnot, lze je pozorovat jako tzv. barevný sníh, různých odstínů (červený, zelený, hnědý). V pohořích České republiky nalezneme různé druhy autotrofních mikroorganismů od sinic (Cyanobacteria), obrněnek (Dinophyta) skrytěnek (Cryptophyta), zlativek (Chrysophyceae), rozsivek (Bacillariophyceae), různobrvků (Xanthophyceae) až po nejčastější zelené řasy (Chlorophyceae). Celosvětově nejrozšířenějším druhem je *Chlamydomonas nivalis* (Komárek & Nedbalová, 2007). Řasy jsou častým členem mikroskopického společenství ve sněhu ve všech chladných oblastech světa (Antarktida a další) (Fujii et al., 2010).

V mořském ledu bylo v roce 2003 objeveno 102 druhů řas, jednalo se o penátní rozsivky. Velké množství spor bylo obsaženo v každé vrstvě ledu, spodní, vnitřní a okolí povrchu kry (Zheng et al., 2011).

Některé druhy řas žijících v mořském ledu jsou přizpůsobeny také k nízkému osvětlení, které je v prostředí pod vrstvou ledu, například *Fragilariopsis sublineata*. Jiné druhy upřednostňují vyšší hodnoty ozáření, což jim usnadňuje přežití v zimních měsících, kdy je v těchto oblastech více světla, např. *Thalassiosira antarctica* (McMinn et al., 2010). Množství biomasy mořských řas záleží také na množství dostupných živin u pobřeží nebo v blízkosti ledu je větší koncentrace živin, a tudíž i řas, než na volném moři (Lee et al., 2010a).

Sněžné plísně jsou psychrofilní nebo psychrotolerantní patogeny píce, zimních obilovin nebo semenáčků jehličnanů. Mohou napadat rostliny v dormanci v nízkých teplotách pod sněhovou pokrývkou. Různé taxonomické skupiny hub mají různé strategie jak se adaptují ve sněhové pokrývce. Basidiomyceta produkují extracelulární antifreeze proteiny, udrží tak své okolí nezamrzlé. Psychrofilní Ascomyceta *Sclerotia borealis* jsou dokonce schopny růst rychleji v mrazových podmínkách než v jejich růstovém optimu. Tyto houby neprodukují extracelulární „antifreeze“ proteiny, ale mohou žít v teplotách nižších 0 °C díky toleranci na osmotický stres (Hoshito et al., 2009).

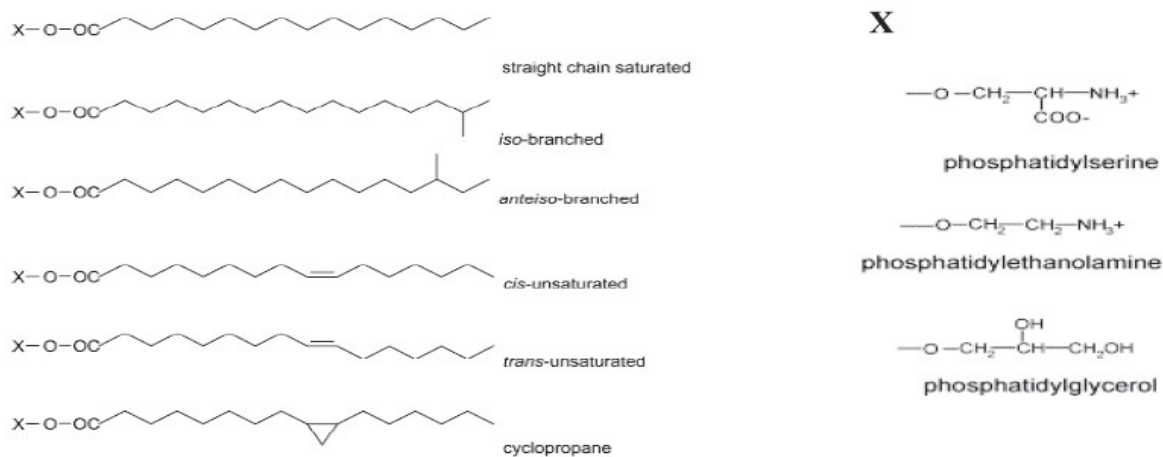
### 3. Membránové lipidy

#### 3.1 Obecné vlastnosti membrán

Membrány jsou nepostradatelnou součástí každé živé buňky. Jejich hlavní funkcí je selektivně oddělovat dvě různá prostředí. Ať už jde o oddělení vnitřního prostředí od vnějšího okolí u bakterií nebo i rozdílných kompartmentů uvnitř buňky eukaryot. Základem těchto membrán jsou především molekuly lipidů, jejichž hydrofobní části (řetězce mastných kyselin) k sobě přiléhají pomocí hydrofobních sil a do okolí vystavují jen své hydrofilní části („hlavičky“). Tímto vzniká relativně odolná univerzální struktura - lipidická dvojvrstva (Alberts et al., 2004).

##### 3.1.1 Složení membrán

Oproti ostatním organismům obsahují membrány mikroorganismů větší poměr fosfolipidů než jiné typy lipidů, v některých případech až 97 % nejčastěji (glyko)fosfolipidů. Lipidy s navázanou fosfátovou skupinou se dělí na fosfatidylglycerol (PG), fosfatidylethanolamin (PE) a fosfatidyserin (PS). Vzorce obou částí fosfolipidů jsou znázorněny na Obr. ( 1 ).



Obr. 1: Způsoby uspořádání acylových řetězců v mastných kyselinách (vlevo): a typy skupiny na něž se tyto řetězce pomocí fosfodiesterové vazby v jednotlivých fosfolipidech napojují (vpravo), (Chintalapati et al., 2004).

V buňkách eukaryot hrají důležitou roli v regulaci gelovitosti membrány během měnících se teplot steroly. Membrány prokaryotních organismů obsahují hopanoidy, což jsou triterpenoidní satureované ekvivalenty sterolů. Vyskytují se v malém množství u většiny druhů prokaryot. (Ourisson et al., 1987). K vyztužení membrán mohou sloužit i další přítomné

molekuly, které však primárně zastávají jinou úlohu, takovým příkladem mohou být karotenoidy (deriváty tetraterpenů), které fungují jako pigmenty.

Membránové proteiny plní většinu specifických funkcí membrány, jsou větší než lipidové molekuly a obvykle je jich méně. Mimo jiné se podílí se na transportu živin, metabolitů, či iontů skrz membránu. Mohou kotvit membránu k makromolekulám, fungovat jako receptory a vnější signály přenášet na vnitřní. Další pracují jako enzymy katalyzující specifické reakce. Proteiny se v membráně udrží díky hydrofobním silám, lipidickým kotvám nebo interagují s jinými membránovými proteiny (Alberts et al., 2004).

### 3.1.2 Fluidita (tekutost) membrán

U psychrofilních a psychrotolerantních mikroorganismů se vyvinuly různé strategie přizpůsobení se nízkým teplotám. Jedna z klíčových strategií pro přežití buňky je obecně schopnost regulovat tekutost membrány tím, že se mění složení mastných kyselin v lipidech. U bakterií také byla zjištěna dvousložková signální cesta skládající se z membránových a rozpustných cytoplazmatických senzorů reakce. Ty se podílí na vnímání a přenosu signálů nízké teploty (Chintalapati et al., 2004).

Fluidita nebo-li tekutost membrány je jednou z hlavních podmínek ovlivňující kompletní funkčnost celého systému. Jde o fyzikální vlastnost, viskozitu (tekutost, gelovitost) která předurčuje mj. propustnost (permeabilitu) membrány pro látky relativně volně procházející skrz membránu (např. malé molekuly, hydrofobní molekuly a pod.), ale také pro látky využívající k transportu přes membránu kanály či přenašeče, jelikož fluidita má také přímý vliv na účinnost těchto transportních proteinů.

Sama fluidita membrán může být ovlivněna několika faktory. Například celkovým složením, poměrem zastoupení lipidů a proteinů a jejich vlastnostmi (velikostí, vazbami atd.). To ovlivňuje prostorovou uspořádanost molekul i celé struktury. Pro zvýšení fluidity je potřeba více neuspořádaných molekul, výskyt nenasycených vazeb, které způsobují zalomení uhlíkatých řetězců. Především jsou pak upřednostňovány *cis*- konformace na dvojné vazbě před *trans*- konformací (Gerday & Gladsdorff, 2007).

### 3.2 Změny mastných kyselin v závislosti na teplotě

Aby byly organismy schopny přežít v chladném prostředí, musí být schopny řešit nejen následky nízké teploty, ale často i následky výrazných teplotních výkyvů, které mohou být

v mnoha případech i velmi rychlé. V důsledku těchto výkyvů dochází k významným strukturálním a dynamickým změnám, které mohou mít dopad na funkci membránových proteinů a tím i na celý metabolismus. Proto se všeobecně u mikroorganismů vyvinula schopnost přizpůsobit a upravovat fluiditu membrán na základě skladby mastných kyselin. Tato adaptace však není univerzální. Změny v lipidech jsou ovlivněny tím, jestli jsou pro organismus žádané. Také záleží na genotypových a fenotypových rozdílnostech jednotlivých organismů. Prokaryota i Eukaryota si v závislosti na taxonomickém zařazení vytvořily strategie, jako jsou například změna lipidové hlavičky, změny proteinů integrovaných v membránách, druhy syntetizovaných karotenoidů, změna délky řetězců mastných kyselin nebo podíl *cis*- a *trans*- izomerů nenasycených mastných kyselin. (Chintalapati et al., 2004).

### 3.2.1 Vznik dvojných vazeb mastných kyselin

Desaturace mastných kyselin (MK) lipidů v membránách, tj. zvýšený výskyt nenasycených dvojných vazeb je obecným mechanismem psychrofilů a psychrotrofů jak se vyrovnat s klesající teplotou v prostředí. Děje se tak pomocí enzymů obecně zvaných desaturázy, které odejmou (např. pomocí  $Fe^{III+}$  centra) dva atomy vodíků z MK a naváží je na akceptor. Produktem této reakce je molekula vázající odejmuté vodíky (např. vody v případě, že akceptor je kyslík) a řetězec MK, ve kterém se vyskytuje dvojná vazba (Bowman et al., 1997b).

Nově vzniklá nenasycená vazba změní prostorové vlastnosti molekuly. Vazebné úhly dvojných vazby jsou odlišné než u jednoduché vazby, mají jiný úhel a vzdálenost mezi atomy ve vazbě se zkrátí. Sníží se počet interakcí s ostatními řetězci, tím i pevnost celé struktury. Rozvolněné molekuly jsou méně omezeny v pohybu, tímto způsobem se kompenzují následky zapříčiněné nízkou teplotou. Celkově se snižuje teplotní bod označovaný jako  $T_m$  (transition temperature-přechodná teplota), kdy dochází k zastavení pohybu na membráně, což znemožní transportní funkci membrány (Kannenberg & Poralla, 1999).

U většiny bakterií se v nenasyceném řetězci MK vyskytuje pouze jedna dvojná vazba, která má v řetězci specifické umístění, nejčastěji mezi devátým a desátým uhlíkem.

U mikroorganismů se může vyskytovat více než jedna dvojná vazba v řetězci mastných kyselin membránových lipidů. Takové MK se nazývají polynenasycené („polyunsaturated fatty acid“, zkráceně PUFA) (Nichols et al., 1997).

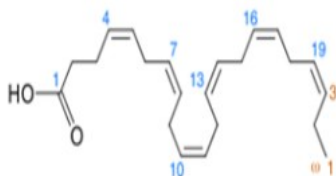
U chladnomilných organismů je to například eikosapentaenová kyselina zkráceně EPA

(C20:5) nebo dokosahexanová kyselina, DHA (C22:6). (Nichols et al., 1997) zkoumal obsah PUFA psychrofilních rodů bakterií -*Colwellia* a *Shewanella*. PUFA vznikají pomocí enzymatického komplexu polyketidové syntázy (PKS). EPA je u těchto bakterií obsažena ve fosfolipidech, fosfatidylglycerolu (PG) a fosfatidylethanolaminu (PE). Tyto polynenasycené mastné kyseliny neobsahují jen chladnomilné a mořské řasy a bakterie, ale přítomné jsou například i v rybách, což se ukázalo být spíše závislé na fylogenezi a charakteru potravy než že by to byl důsledek adaptace na chlad (Phillips et al., 2002).

U obrněnek (Dinophyta) byla objevena oktadekapentaenová kyselina (C18:5:ω3). Její výskyt zřejmě souvisí s nízkou teplotou, byla nalezena také u skupiny Haptophyta. Tato MK vzniká zřejmě zkrácením acylového řetězce z (C20:5) MK nebo desaturací (C18:4) kyseliny (Volkman et al., 1981).

Sulfoquinovosyl diacylglyceroly (zkráceně SQDGs) jsou membránové lipidy především řas a vyšších rostlin (Keusgen & Curtis, 1997). Většinou obsahují nasycené kyseliny (C16:0), ale také jsou v nich obsaženy polynenasycené MK, nejčastěji řetězec (C18:4). Ten je přítomen dvakrát C18:4 nebo jen jeden řetězec v lipidu) v 80 % celkového počtu SQDG. Důvodem, proč je udržován tak vysoký stupeň nenasycenosti, je nezbytnost udržet membránu dostatečně fluidní a tedy funkční za nízkých teplot. Tyto membránové lipidy byly detailně zkoumáno na druhu *Tetretreptia pomquetensis* (Euglenophyta) (McLachlan et al., 1999). Například v buňkách bakterií rodu *Octadecabacter* z mořského ledu a vody je více než 70% celkového obsahu MK tvořeno kyselinou olejovou (18:1) (Gosink et al., 1997).

Při srovnání psychrofilních a mezofilních kvasinek bylo zjištěno, že psychrofilní kmeny obsahují α-linoleovou mastnou kyselinu (C18:3, D9,12,15) a linoleovou kyselinou (C18:2, D9,12). Označení D9, 12, 15 říká, na kolikátém uhlíku řetězce působila desaturáza a vytvořila dvojnou vazbu. Při teplotě 4 °C α-linoleová MK tvoří více než 37 % všech MK v psychrofilních kmenech, mezofilní kmeny ji prakticky neobsahovaly (Rossi et al., 2009).



Obr. 2: Vzorec dokohexaenové kyseliny (wikipedie.org)

Přestože sněžné řasy jsou výborným modelem pro studium membránové adaptace na nízké teploty, existuje pouze malé množství údajů, dokládajících změny ve složení mastných kyselin jako faktorů regulujících fluiditu membrán. Byla zkoumána role desaturace MK při chladovém stresu u sněžné řasy *Chlamydomonas nivalis* (Morris et al., 1979). Složení

mastných kyselin v buňkách *Chlamydomonas* sp. sesbíraných na ostrově Hermit v Antarktidě popsali Bidigare et al., (1993). Autoři uvádějí vyšší poměr nenasycených MK u sněžných druhů v porovnání s temperátními druhy z rodu *Chlamydomonas*. V zelených řasách byly nalezeny MK od (14:0) do (24:1) včetně PUFA C16, C18:2n-3, C22:6n-3. Velký rozdíl byl nalezen mezi zelenými a červenými buňkami. Neobvyklé krátké a středně dlouhé řetězce polynenasycených MK potenciálně zvyšujících fluiditu membrány byly izolovány ze sněžných řas *Chloromonas brevispina* sesbíraných na Šumavě (Řezanka et al., 2008). Všechny ze 43 PUFA byly identifikovány, byly to převážně krátké a středně dlouhé řetězce polynenasycených MK a jediná nenasycená MK byla kyselina palmitová. Navíc vysoký obsah PUFA s řetězci kratšími než C16 je mimořádný. Vysoký podíl PUFA (více než 75 % všech MK) poukazuje na to, jak důležité jsou to elementy pro zajištění přežití buňky tohoto druhu. (Russel, 1984).

### 3.2.2 Konfigurace dvojně vazby

Geometrické izomery *cis*- a *trans*- vazby mají stejný molekulový vzorec, ale liší se polohou atomů vodíku na dvojných vazbách. Obsah těchto izomerů má nezanedbatelný vliv na celkovou tekutost membrány. Nejnižší fluidita je v přítomnosti pouze nasycených vazeb. *Trans*-konfigurace nenasycených vazeb zvyšují fluiditu, avšak větší vliv mají *cis*- konfigurace nenasycených vazeb v MK. Proto jsou u bakterií obecně častější *cis*- nenasycené vazby. *Trans* izomerů je v lipidech obsaženo méně (Gerday & Glandsdorff, 2007).

Odpovědí bakterií (jejichž membrána obsahuje *cis*- vazby) na zvýšení teploty je snížení množství *cis*- izomerů a naopak zvýšením počtu *trans*- izomerů ve snaze udržet fluiditu/rigiditu membrány na podobných hodnotách. To se děje pomocí enzymu *cis-trans* izomerázy, která tak efektivně membránu stabilizuje (Okuyama et al., 1997).

Výskyt *trans*- nenasycených vazeb se zvýší také při jiných stresech než zvýšením růstové teploty, například hladověním, přítomností toxických látek jako jsou fenoly, rozpouštědla a další. Poté bakterie zvýší počet *trans* vazeb, které jsou proti těmto nežádoucím vlivům odolnější (Heipieper et al., 2003).

Konverze z *cis*- na *trans*- nenasycené vazby pomocí *cis-trans* izomerázy je nevratným dějem u druhu *Pseudomonas putida*. Upravování poměru izomerů *cis*- na *trans*- je obecným mechanismem přizpůsobení se psychofilů a psychrotolerantů vyšším teplotám. Nelze však z *trans*- vazeb vytvořit zpětně *cis*- a tato přeměna se tedy nedá považovat za adaptivní mechanismus na chladné prostředí (Hartig et al., 2005).

### 3.2.3 Délka mastných kyselin

Obecně se tekutost membrány zvyšuje, nejsou-li všechny řetězce MK stejně dlouhé. Toho organismy dosahují zkracováním délky mastných kyselin, často v kombinaci s desaturací a tvorbou postranních methylových řetězců. Mastné kyseliny s kratším řetězcem mají nižší teplotní bod tuhnutí (Quinn, 1981). Výjimkou je psychrofilní bakterie *Psychrobacter oleovorans*, která využívá zkracování řetězců jako jediný mechanismus k udržení fluidity membrán (Russel, 1984).

U eukaryotních buněk máme o tomto mechanismu zatím málo údajů. U kvasinek je trend zkracování řetězců MK znám pouze u mezofilních kmenů, které jsou vystaveny nízké teplotě (psychrofilní kvasinky upřednostňují zdvojování vazeb). Při teplotě 4 °C se zvýšila koncentrace kyseliny palmitové (C16:1) na úkor 18-uhlíkatých MK (Rossi et al., 2009). Neobvykle vysoký podíl MK s kratšími řetězci byl zjištěn u sněžné řasy *Chloromonas brevispina* (Řezanka et al., 2008).

### 3.2.4 Další mechanismy

Do této kapitoly můžeme řadit postranní methylové skupiny, cyklické mastné kyseliny nebo prostorově velké lipidické „hlavičky“ (viz Obr. 1). Vedlejší methylová skupina může být navázána na předposledním uhlíku v řetězci (tzv. *iso*-methylová skupina) nebo na třetím uhlíku od konce (*anteiso*-methylová skupina). Oba typy zlepšují funkci membrány za nízkých teplot. Neuspořádanost molekul a následně i fluiditu membrán v porovnání s *iso*-postranními větvemi více zvyšuje *anteiso*- uspořádání (Macdonald, 1985). Přítomnost *anteiso*- postranních skupin se zdá být spojena s růstem v chladných podmínkách. To bylo sledováno u druhů *Bacillus subtilis*, *Flavobacterium thermophilum*, *Bacillus T1* a dalších (Chintalapi et al., 2004). Psychrotolerantní bakterie *Listeria monocytogenes* je těmito postranními řetězci MK vybavena, ale její mutant citlivý na chlad syntézu *-anteiso-* skupinu postrádá (Annous et al., 1997).

Stavba mastných kyselin se mění dle teploty, v níž se mikroorganismus vyskytuje, viz Tabulka 1.

Tabulka 1: Teplotní rozmezí, ve kterých dochází ke změnám ve stavbě mastných kyselin u vybraných bakterií (Sutari & Laakso, 1994).

Sl.No	Mode of Change	Temperature Shift	Bacterium	Reference
1.	Increase in unsaturation and increase in the chain length	40°C - 20°C	<i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas E-3</i>	44,100
2.	Increase in unsaturation and decrease in chain length	20°C - 10°C 22°C-15°C	<i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>	14,44
3.	Decrease in cyclic fatty acids	40°C-20°C	<i>Escherichia coli</i>	1
4.	Increase in <i>anteiso</i> -branched and decrease in <i>iso</i> -branched fatty acids	40°C-15°C	<i>Bacillus subtilis</i>	88
5.	Decrease in straight chain and increase in branched chain fatty acids	65°C-42°C	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	51
6.	Increase in unsaturation due to the increase in monounsaturated straight chain, even or odd-carbon <i>iso</i> -branched and <i>anteiso</i> -branched fatty acids	40°C-15°C 37°C-21°C 35°C-20°C	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Streptomyces griseus</i>	88,35
7.	Increase in the chain length of branched-chain fatty acids especially <i>iso</i> and <i>anteiso</i> fatty acids		<i>Thermus sp.</i>	59

### 3.3. Význam PUFA pro zdraví

Polynenasycené omega-3 mastné kyseliny jsou nezbytné esenciální živiny pro normální růst a vývoj člověka. Především jsou to kyseliny eikosapentaenová (EPA) a dokoheptaenová (DHA). Označení „omega-x“ informuje, na kolikátém uhlíku od volného konce řetězce MK se dvojná vazba nachází (např. omega-3 MK má poslední dvojnou vazbu mezi 3. a 4. uhlíkem od volného konce). Lidské tělo si tyto látky nedokáže vytvořit a musí být přijaty s potravou. Mají mnoho prospěšných účinků na lidské zdraví, např. činnost mozku, růst a vývoj. Naše strava obsahuje nadbytek omega-6 mastných kyselin, z nichž některé podněcují vznik zánětů, naopak omega-3 mastné kyseliny mají protizánětlivý účinek (Kang, 2011). Poměr omega-6/omega-3 mastných kyselin je v naší stravě přibližně 20:1, optimální poměr je asi 2:1 (Decker et al., 2005). Snížení dostupnosti omega-3 PUFA v naší stravě a nerovnováha poměru omega-6/omega-3 PUFA v tkáních je spojeno se zvýšeným rizikem kardiovaskulárních onemocnění, rakoviny, diabetu a neurodegenerativních a dalších zánětlivých onemocnění. Hlavním producentem omega-3 PUFA je mořský fytoplankton (Kang, 2011).

Mořské mikroorganismy jsou významným zdrojem nenasycených mastných kyselin. Některé mořské jednobuněčné řasy např. *Nannochloropsis* mohou být použity jako potravinový zdroj omega 3 nenasycených mastných kyselin, zvyšují podíl důležitých kyselin, jako jsou kyseliny eikosapentaenová (EPA) a dokosaheptaenová (DHA) (Sukenic et al., 1994).

Výsledky výzkumu potenciálu druhu *Schewanella frigidimarina* pro výrobu PUFA ukazují, že upravené složení růstového média pro tuto kultivaci těchto bakterií může mít kladný vliv na jejich praktické využití při výrobě nenasycených mastných kyselin

(Sani, 2010).

Pro lidský organismus je dobré přijímat vyšší podíl nenasycených MK než nasycených, to splňují margaríny. Měly by ale převládat *cis*-izomery MK. Bylo prokázáno, že zvýšený příjem *trans*-izomerů MK (TFAs) může mít škodlivé účinky na lidské zdraví, zejména na kardiovaskulární systém (Filip et al., 2011). Trans-izomery MK vznikají často během ztužování (hydrogenaci) tuků. Moderní postupy výroby zabraňují vzniku těchto škodlivých MK. (wikipedie.cz).

## 4. Produkce látek, které tlumí negativní účinky nízkých teplot

### 4.1 „Cold shock“ odpověď organismu

Odpověď chladového šoku, tzv. cold shock response zahrnuje změny a reakce, které se v buňce indukují během náhlého snížení teploty. Zkoumány byly především u mezofilních organismů, tuto schopnost však mají i psychrotrofní, psychrofilní a termofilní bakterie (Inouye & Phadtare, 2007). Studie průběhu odpovědi organismů na teplotní šok byly detailně provedeny na dvou modelových organismech, druhích mezofilních bakterií *Escherichia coli* a *Bacillus subtilis*. *E. coli* žije ve střevech teplokrevných živočichů, tedy v optimální teplotě cca 37 °C. Může však dojít k náhlému teplotnímu šoku, pokud je vyloučena z těla hostitele s exkrementy. To pak vyžaduje rychlou adaptaci na nové chladnější podmínky prostředí tzv. cold shock response, odpověď na chladový šok. (Phadtare et al., 1999; Ermolenko & Makhatadze, 2002).

Odpověď na chladový šok je u většiny bakterií včetně *E. coli* charakterizována přechodným zastavením růstu během snižování teploty a přísné inhibice sekretorické dráhy běžných proteinů. Naopak podporována je syntéza speciálních proteinů chladového šoku, kterým je věnována další část práce. Další změny probíhají na úrovni membrán a nukleových kyselin (Inouye & Phadtare 2007).

### 4.2 „Cold-shock“ proteiny (Csps)

Důležitým proteinem syntetizovaným *E. coli* jako chladovou odpověď na snížení teploty je CspA (cold-shock protein A), který pochází z rodiny proteinů obsahující devět homologů (označovaných velkými tiskacími písmeny). „Cold shock“ proteiny z této rodiny jsou rozšířené v rámci skupiny *Bacteria*, byly objeveny i u termofilních bakterií nebo v rostlinách, například v pšenici (Karlson et al., 2002). Tento protein nebyl naopak nikdy identifikován v skupině *Archaea* a v kvasinkách (Kondo & Inouye, 1991).

Syntéza proteinu CspA a jeho homologů během chladového šoku je nejspíš regulována pouze na úrovni transkripce, stability mRNA a translace. Není potřeba dalších regulačních faktorů (Gerday & Glansdorff, 2007).

Protein *E. coli*, cspA je složen z pěti antiparalelních  $\beta$  řetězců a vytváří tak soudkovitou strukturu. Na rozhraní jsou aromatické zbytky aminokyselin tryptofanu, fenylyalaninu a histidinu, které zajišťují hydrofobní interakce molekul proteinu

(Gerday & Glandsdorff, 2006).

Některé Csp geny jsou schopné vyvolat klidovou fázi bakterie. Například protein cspD zjištěný u *E. coli*, cspB a cspC u *Bacillus subtilis* a cspC a cspD u *Caulobacter crescentus* (Balhesteros et al., 2010).

Cold shock proteiny jsou složeny z domén vázajících RNA a cold-shock domény, zkratkou (CSD). Tyto domény jsou vyžadovány v regulaci transkripce a translace v mnoha prokaryotech i eukaryotech a proteiny obsahující tyto CSD domény se chovají v bakteriálních buňkách jako RNA chaperony ( Balhesteros et al., 2010).

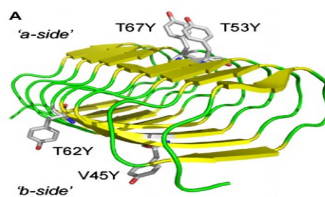
### 4.3 „Cold acclimation“ proteiny (Caps)

Proteiny chladové aklimace (Caps) jsou produkovány pouze při nízkých teplotách a mají zřejmě pro organismus velký význam. Ještě se toho o nich moc neví. Rozlišují psychrotrofy od mezofilních organismů, které tyto proteiny postrádají. Jsou pravděpodobně jednou z klíčových determinant, které umožňují život při velmi nízkých teplotách (Hebraud et al., 2000). Zřejmě mají napomáhat pokračování buněčného cyklu a přechodu jednotlivých stádií.

### 4.4 „Antifreeze“ proteiny (AFPs)

Pod pojmem „antifreeze“ proteiny si lze představit něco jako protimrznoucí, zabraňující vzniku krystalů ledu a udržující vnitřní hydratované prostředí buňky s co nejméně strukturálními změnami v teplotě často nižší než 0 °C. Tyto proteiny se vyvinuly nezávisle v různých organismech jako ochrana před poškozením způsobeným zamrznutím v teplotách pod 0 °C. Absorbují zamrzlé molekuly vody a fungují jako kinetické inhibitory růstu ledových krystalů (Ohno et al., 2010).

Přestože jsou „antifreeze“ proteiny strukturálně odlišné, můžeme je rozdělit podle schopnosti absorpce na povrchu ledu. AFPs mají vazebné relativně ploché a hydrofobní místo pro led, které zabírá velkou plochu. Vytváří se tak „roviny“ ledu, které strukturálně zabraňují růstu krystalů ledu v buňce (Yu et al., 2010). Snižují bod tuhnutí, ale mají i malý vliv na teplotu tání - rozdíl mezi těmito důležitými teplotními body bývá nazýván termální hysteréze (TH). Proteiny s TH nižší než 1 °C jsou přítomny v mrazuodolných rostlinách (například *Lolium perenne*) viz Obr. 3.



Obr. 3.: Strukturální model AFP z druhu *Lolium perenne* s vazebným místem pro led „a side“ (Yu et al., 2010).

Protein s  $T_H \sim 1^\circ\text{C}$  byl poprvé objeven u chladnomilných ryb, které žijí v zamrzajících vodách oceánu, také byl objeven v hmyzu (*Anatolica polita*) (Ohno et al., 2010). V bakteriálních buňkách pak např. u druhu *Marinomonas primoryensis*. (Yu et al., 2010).

#### 4.5 Led vázající proteiny („ice binding proteins“)

Led vázající proteiny pomáhají snížit bod mrznutí vody téměř až o  $1^\circ\text{C}$ . Na rozdíl od AFPs působí extracelulárně (Lee et al., 2010b).

Kvasinky rodu *Leucosporidium* sekretují protein vázající led o velikosti cca 26kD do extracelulárního prostoru, pravděpodobně tím kontrolují růst velkých ledových center v těsném okolí buňky a zřejmě tím zabraňují poškození buněčné membrány, tato funkce se nazývá rekrystalizační inhibice. Rekrystalizační inhibiční aktivita zabraňuje růstu větších krystalů ledu, tím může zvýšit šanci přežití buňky (Lee et al., 2010b).

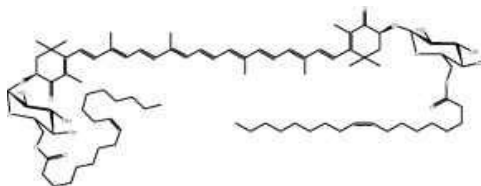
U jednobuněčných řas z rodu *Chlamydomonas* izolovaných z antarktického jezera byly popsány čtyři izoformy extracelulárního proteinu vázajícího led, které mají silnou inhibiční rekrystalizační aktivitu, udržují okolní prostředí tekuté a napomáhají přežití buňky v mrazu (Raymond et al., 2009).

#### 4.6 Karotenoidy

Nenasycené vazby v řetězcích mastných kyselin jsou více vystaveny atakům volných radikálů a oxidativnímu stresu, proto musí být přítomny mechanismy, které umí účinně ochránit membránu a udržovat tak „příznivé bezpečné prostředí“. K tomuto účelu slouží především karotenoidy (tetraterpenoidní). Jsou produkovány bakteriemi, řasami, houbami (kvasinky) i rostlinami. Zvýšený výskyt polárních karotenoidů (např. dihydroxykarotenoidy, zeaxantin, violaxantin) v membráně má za následek vyšší fluiditu membrány. Náhlými

pohyby a rotacemi v membráně fluiditu regulují. (Subczynski et al., 1992).

Nápadnou skupinou, která využívá akumulaci karotenoidů v buňkách jako účinnou ochranu v extrémních podmínkách jsou sněžné řasy. Nejznámějším z nich je astaxantin (Obr. 4). Jeho vysoká koncentrace zvyšuje odolnost buněk vůči mrazu (Hoham, 1992). Astaxantin zbarvuje řasy červeně, zároveň jako pasivní filtr účinně brání buňky následkům nadměrné intenzity krátkovlnného viditelného záření. Astaxantin je znám také antioxidačními účinky a aktivní ochranou buňky před volnými radikály, které vznikají jako důsledek nadměrného ozáření. (Komárek & Nedbalová, 2007).

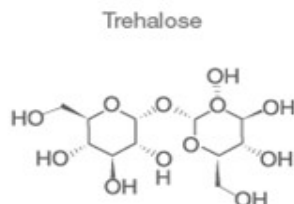


Obr. 4: Asthaxantin diglucosid diester ze sněžné řasy -*Chlamydomonas nivalis*, grafický model (Řezanka et al., 2007)

Některé druhy řas vytvářejí jiné karotenoidy, jejichž složení je však dosud málo prozkoumáno. Kromě karotenoidů byly v buňkách sněžných řas nalezeny také zvýšené koncentrace jiných látek s antioxidačními účinky, jako např. fenolických sloučenin nebo  $\alpha$ -tokoferolu (vitamin E) (Komárek & Nedbalová, 2007).

## 4.7 Cukry

Cukr trehalóza, (Obr. 5.) se uplatňuje při ochraně buněk při vysoké teplotě, osmotickém stresu a chladovém šoku. U mutantů, kteří mají deficit tohoto cukru, se životaschopnost snižuje už při poklesu teploty na 4 °C. Přestože mechanismus působení této látky není zcela znám, předchází denaturaci a agregaci proteinů. Chrání buňky před oxidativním stresem a podílí se částečně na stabilizaci buněčné membrány (Kandror et al., 2002).



Obr. 5: Vzorec disacharidu trehalózy

## 5. Psychrofilní enzymy

### 5.1 Obecné vlastnosti enzymů

Jako enzymy označujeme takové biologické struktury, které mají schopnost katalýzy. Nejčastěji se jedná o proteiny, ale mezi enzymy mohou být řazeny i struktury sestavené z RNA například ribosomy (Kikuchi, 1984). Enzymů je nepřeberné množství, liší se dle výběru substrátu, afinity, specifity, velikosti, teplotního optima. Dle typů reakcí a typu substrátu bylo uceleno systematické názvosloví enzymů a rozdělení do šesti základních skupin a to, oxidoreduktázy, transferázy, hydrolázy, lyázy, izomerázy a ligázy. Všechny známé enzymy se řadí do jedné z těchto šesti skupin enzymů (Alberts, 2006).

Obecně se enzym dělí na dvě základní části. První částí je protein nebo proteinový komplex – apoenzym. Určuje velikost a tvar celého enzymu i katalytického centra, ve kterém daná reakce probíhá. Teplota, v níž se enzym vyskytuje má vliv na utváření nebo naopak rozvolňování vazeb a interakcí uvnitř struktury a je přímo zodpovědná za jeho funkčnost. Každý enzym má svou individuální teplotní hranici, v tomto rozmezí je schopen účastnit se chemických reakcí a metabolických dějů. Teplota, ve které je enzym nejúčinnější (tj. proběhne díky němu nejvíce reakcí za jednotku času) nazýváme teplotní optimum. Druhou součástí enzymatického komplexu jsou koenzymy, tyto molekuly nebo atomy na sebe během reakce váží meziprodukty a tím snižují aktivační energii reakce. Jsou menší než proteinová část a vyskytují se poblíž nebo v reakčním centru enzymu. Koenzymem jsou často ionty a anorganické molekuly, které slouží jako donory nebo akceptory elektronů ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  a další) nebo molekuly organického původu – kofaktory (koenzymA, FAD-flavinadenin dinucleotid, NAD-nicotinamidadenin, atd.) (Voet & Voet, 2006).

Substrátová specifita enzymu určuje, jaký typ substrátu bude katalyzován, rozpoznání probíhá na základě struktury, umístění vodíkových můstků, elektrostatických sil tak, že „pasují“ na aminokyselinové zbytky ve vazebném (reakčním) místě enzymu a úspěšně interagují. Specifita může být široká pro více typů molekul nebo pouze pro jediný substrát (Voet & Voet, 2006).

Enzymy jsou jako látky bílkovinné povahy citlivé na teplotu. Počet srážek molekul se zvyšující se teplotou roste a dochází k více reakcím v jednotce času. Obecně pro enzymy v rozmezí 10 – 40 °C platí van't Hoffovo pravidlo, tj. při vzrůstu teplot o 10 °C reakční rychlost vzrůstá dvakrát až čtyřikrát (Projektalfa, 2011).

### 5.1.1 Kinetika enzymů

Obecně mají lidé potřebu vyjádřit číselně, jak účinně enzymy fungují. Bylo mnoho snah najít určitou rovnici, která by vzájemné vztahy veličin ovlivňující rychlost katalyzovaných reakcí uvedla. První takovouto rovnici popsal Arrhenius,

$$k_{\text{cat}} = A e^{(-E_a/RT)}$$

kde  $k_{\text{cat}}$  je reakční rychlost enzymu,  $A$  – součin preexponenciálního faktoru a dynamického transmisního koeficientu (vyjadřuje frekvenci kolizí),  $T$  – teplota [Kelvin],  $E_a$  – aktivační energie a  $R$  – univerzální plynová konstanta. Arrheniova rovnice předpokládá, že se zvyšováním teploty enzymatická činnost také stoupá a zároveň, že rychlost katalyzovaných reakcí je ovlivněna pouze rychlostí srážek částic substrátů, tj. tepelnou energií, která je vyjádřena teplotou v Kelvinech (Siddiqui & Cavicchioli, 2006).

Poněvadž ne vždy platí, že rostoucí teplota má kladný vliv na rychlost katalyzované reakce, zjišťuje se pro každý konkrétní enzym teplota, při níž je jeho funkce nejefektivnější, tj. optimální teplota  $T_{\text{opt}}$ .  $T_{\text{opt}}$  je taková teplota, při níž je třeba nejnížší aktivační energie, také zvaná Gibbsova energie ( $G$ ), tj. energie potřebná pro překonání energetické bariéry pro vznik aktivovaného komplexu substrátu a příslušného enzymu.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Změna Gibbsovy energie ( $\Delta G$ ) [kJ/mol] je tedy výsledkem rozdílu dvou složek, a to změny entalpie  $\Delta H$  [kJ.mol<sup>-1</sup>], tj. tepelné energie reakce a  $T\Delta$ , což je změna entropie  $\Delta S$  [J.K<sup>-1</sup>] (tj. neuspořádanosti systému) lineárně rostoucí s teplotou (v Kelvinech) (Low et al., 1973).

Také platí vztah:

$$E_a = \Delta H + RT$$

kde aktivační energie ( $E_a$ ) je výsledkem součtu změny entalpie  $\Delta H$  a  $RT$ , součinu teploty a plynové konstanty (Lonhienne et al., 2000). Z těchto vztahů se upřesňuje původní Arrheniova rovnice a výsledná rovnice vypadá takto:

$$k_{\text{cat}} = k_B(T/h)^{(-\Delta G/RT)},$$

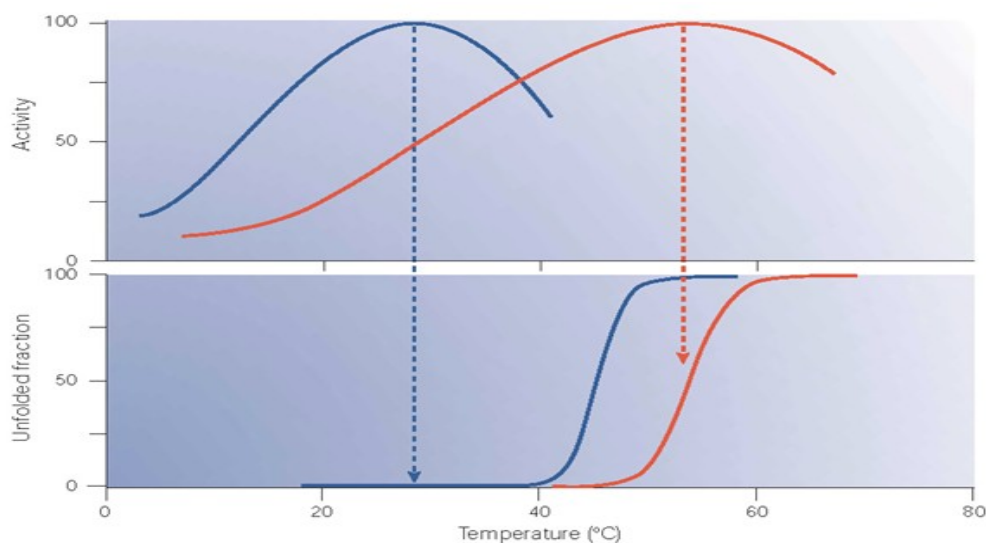
což je někdy upravováno na:

$$k_{\text{cat}} = \gamma k_B(T/h)^{(-\Delta H/RT) + (+\Delta S/R)}.$$

V některých případech se do rovnice katalytické účinnosti enzymu přidává transmisní koeficient  $\gamma$ , který je však odlišný od transmisního koeficientu v původní Arrheniově rovnici (Lonhienne et al., 2000).

## 5.2 Psychrofilní enzymy

Jedním z předpokladů pro život organismů v chladných prostředích je funkčnost enzymů. Schopnost přežít, rozmnožovat se a šířit se v teplotně nepříznivém prostředí vyžaduje syntézu enzymů, jejichž aktivita je v nízkých teplotách relativně vysoká (Obr. 6). U těchto adaptovaných enzymů se vyvinula široká škála strukturálních vlastností, které umožňují zvýšit enzymatickou účinnost a být vysoce flexibilní oproti jejich homologům izolovaných u mikroorganismů, které na chlad adaptovaní nejsou (Siddiqui & Cavicchioli, 2006). Vysoká flexibilita je však naopak evolučně jako „trade-off“ vyvážena nízkou tepelnou stabilitou (Obr. 6) (Feller & Gerday, 2003, Siddiqui & Cavicchioli, 2005).



Obr. 6: Enzymatická aktivita (horní graf) a změny konformace (dolní graf) psychrofilních a mezofilních enzymů v závislosti na teplotě. Modrá křivka představuje psychrofilní enzymy. Jejich teplotní optimum je zhruba 20 – 30 °C. Je zřejmé, že v této oblasti teplot jsou daleko aktivnější než mezofilní enzymy znázorněné červenou křivkou. Také v teplotách pod 20 °C jsou daleko úspěšnější než mezofilní formy enzymů. Avšak ve vysokých teplotách jsou méně stabilní než mezofilní enzymy, deformují se a ztrácejí svou katalytickou schopnost (40 °C a výše). Na dolním grafu můžeme pozorovat, jak teplotní změny aktivity enzymů korespondují se změnami jejich konformace (Feller & Gerday, 2003).

Flexibilita psychrofilních enzymů se vyznačuje lepšími interakcemi se substrátem, snížením aktivační energie v porovnání s mezofilními či termofilními enzymy. Terciální struktura na chlad adaptovaných enzymů obsahuje méně interakcí, které ji stabilizují. Je přítomno více a delších hydrofobních smyček, což vyžaduje přítomnost většího počtu hydrofobních a méně hydrofilních aminokyselin. Hydrofobní molekuly nedovolují vytvořit takové množství vodíkových interakcí mezi proteinem a okolní vodou, které by podléhaly teplotě, a tím i snadněji měnily konformaci enzymu (Wigley et al , 1987, podle Russel 1998). Malá změna ve složení aminokyselin, tedy jejich zbytků zajistí snížení počtu interakcí

s vodou. Tím se snižuje citlivost ke změnám teploty (Bin-Bin & Fei, 2006).

Adaptace proteinů na odlišné teploty spočívá v drobných změnách ve složení aminokyselin, aniž by se změnila celková struktura makromolekuly (Vendittis et al., 2007). Je redukováno množství argininu, jehož zbytky omezují rotaci v proteinovém řetězci a umožňují vytvářet vodíkové a iontové vazby. Ubývá také množství prolinu, naopak se zvyšuje obsah glycinu. Oblasti bohaté na glycin zajistí lokální mobilitu řetězce. Všechny slabé interakce jako jsou iontové páry, aromatické interakce, vodíkové můstky či helixové dipóly, nejsou tak hojné a nepolární vnitřek proteinu vykazuje slabě hydrofobní charakter, který činí protein uvnitř nekompaktní (Tronelli et al., 2007).

### 5.2.1 Flexibilita

Nízká stabilita a vysoká aktivita enzymů adaptovaných na chlad v nízkých teplotách úzce souvisí s flexibilní strukturou enzymů.

Statická flexibilita je množství strukturálních variací všech možných konformací enzymu, sleduje průměrnou pohyblivost aminokyselinových postranních řetězců. Odhaduje se změna průměrných elektronových hustotních map na populaci za daný čas. Flexibilita stoupá při větším množství tryptofanu a menším množství threoninu (Smith et al., 2003). U termolysinů z antarktické bakterie 643 (VAB) je 3D-struktura tohoto adaptovaného enzymu pružnější, zejména v oblastech smyček v porovnání s jeho mezofilními a termofilními protějšky (Adekoya et al., 2006). Zvýšenou flexibilitu mají strukturální části zapojení do katalytického cyklu, zatímco části neúčastníci se katalýzy mohou být naopak tužší než u mezofilních homologů (Georlette et al., 2003).

Dynamická flexibilita je rychlost, s jakou dokáží enzymy měnit své konformace a je měřitelná dynamickou zhasací fluorescencí. U flexibilních enzymů je zhasadlo (např. akrylamid) infiltrováno do vnitřní části struktury a poklesne fluorescence tryptofanu, tímto je zajištěn vysoký index permeability (D'Amico et al., 2003). Nejvyšší permeabilita byla zjištěna právě u psychofilních enzymů. Flexibilita těchto enzymů byla zkoumána pouze nepřímými prostředky a tyto studie předpokládají, že zlepšení přístupnosti substrátu poskytuje zvýšená flexibilita, která by neměla pouze redukovat energii požadovanou pro přístup, ale také by měla způsobit pokles substrátové specifity (Siddiqui & Cavicchioli, 2006).

## 5.2.2 Stabilita

Konformační stabilita se týká nejvíce malých proteinů o jedné doméně, kde se střídá sbalený a nesbalený stav enzymu. Změna Gibbsovy energie je měřítkem pro termodynamickou stabilitu a z rovnovážné konstanty  $K$  těchto dvou stavů (sbalený /nesbalený) je v dané teplotě a koncentraci snadno počitatelná podle rovnice:

$$\Delta G = -R \ln K$$

Pro většinu monomerních enzymů je hodnota  $\Delta G$  nízká cca (20 – 60 kJmol<sup>-1</sup>) (Siddiqui & Cavicchioli, 2006).

Dalšími významnými rozdíly mezi psychrofilními a mezo/termofilními enzymy jsou iontové páry nebo více hydrofobních aminokyselin na rozhraní podjednotek enzymu (Tronelli et al., 2007). Nejvyšší hydrofobicitu mají však termofilní až hypertermofilní enzymy. Působení hydrofobních sil umožňuje žít v horkých prostředích (Vendittis et al., 2007).

V sekundární struktuře psychrofilních enzymů je zřetelný pokles množství vodíkových vazeb mezi dvěma hlavními řetězci. Slabý trend byl také pozorován v poklesu vodíkových interakcí mezi  $\beta$ -listy (Gianese et al., 2002).

Psychrofilní enzymy kompenzují vlastní nízkou účinnost v chladu pomocí vysoké účinnosti katalyzátorů. Ve vyšších teplotách jsou však tyto enzymy nestabilní (Georlette et al., 2003).

Najdou se však i výjimky, prvním objeveným enzymem, který odolá a je funkční i ve vysokých teplotách je NAD<sup>+</sup> dependentní alkohol dehydrogenáza psychrotolerantní bakterie *Flavobacterium frigidimarum* žijící v chladných antarktických vodách. Tento enzym je aktivní v teplotním rozpětí 0 – 80 °C. Přestože vykazuje vysokou katalytickou účinnost mezi 0 – 20 °C, což je srovnatelné s psychrofilními enzymy, nejvyšší aktivitu má při 70 °C. Genová sekvence kódující tuto dehydrogenázu byla objevena i u dalších druhů bakterií např. u *Moraxella* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Geobacillus starothermophilus* (Kazuoka et al., 2007).

Kinetická stabilita vyjadřuje, nakolik rychlé je nevratné rozvolnění enzymu v dané teplotě. Většina enzymů adaptovaných na chlad, například DNA ligáza má poločas rozpadu v teplotě 50 °C kratší než 12 minut. Teplota, ve které většina těchto enzymů denaturuje, je nižší než 35 °C (Georlette et al., 2003). Pro kinetickou stabilitu je důležité, jak veliký je rozsah volné energie  $\Delta G$  mezi aktivním (sbaleným) a přechodovým stavem enzymu dle schéma rovnice:



kde F představuje aktivní enzym (folded), TS přechodový stav (transition state) a D denaturovaný enzym.  $K$  je rovnovážná konstanta a  $k$  rychlostní konstanta prvního řádu. (Siddiqui & Cavichioli, 2006).

### 5.2.3 Aktivita

Psychrofilní enzymy se vyznačují nižší aktivační energií  $\Delta G$  než jejich termofilní homology. Toho mohou dosáhnout poklesem změny aktivační entalpie  $\Delta H$  nebo zvýšením změny entropie  $\Delta S$  podle vztahu zmíněného v kapitole kinetika enzymů 5.1.1. Menší rozdíl entalpie ( $\Delta H$ ) na počátku a na konci katalyzované reakce je pravděpodobně důvodem, proč jsou na chlad adaptované enzymy daleko méně citlivé ke změnám teploty (Low et al., 1973). V Tabulce 2 jsou znázorněny katalytické vlastnosti a aktivační parametry různých psychrofilních enzymů ve srovnání s jejich mezofilními homology. Pro porovnání jsou důležité hodnoty  $\Delta H$  a  $T\Delta S$  (Collins et al., 2007).

Tab. 2: Katalytické vlastnosti a aktivační parametry variabilních psychrofilních enzymů v porovnání s odpovídajícími mesofilními enzymy (Gerday & Glandsdorf, 2006).

Enzyme	Source	$T$ (°C)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$T_{opt}$ (°C)	$\Delta G^*$ (kJ/mole)	$\Delta H^*$ (kJ/mole)	$T\Delta S^*$ (kJ/mole)	$\Delta\Delta H^*$ (p-m) (kJ/mole)	$T\Delta\Delta S^*$ (p-m) (kJ/mole)	References
Amylase	Psychro	10	294	28	57.68	34.7	-23.0	-11.7	-10.9	D'Amico et al., 2003
	Meso		97	54	58.52	46.4	-12.1			
Chitinase	Psychro	15	1.7	-	69.2	60.2	-9.0	-14.1	-16.1	Lonhienne et al., 2001a
	Meso		3.9	-	67.2	74.3	+7.1			
Chitobiase	Psychro	15	3.8	-	59.5	44.7	-14.8	-26.8	-22.8	Lonhienne et al., 2001b
	Meso		0.9	-	63.5	71.5	+8.0			
Cellulase	Psychro	4	0.18	37	71.6	46.2	-25.4	-19.6	-13.0	Garsoux et al., 2004
	Meso		00.1	56	78.2	65.8	-12.4			
Subtilisin	Psychro	15	25.4	40	62.0	36.0	-26.5	-10.0	-6.3	Davail et al., 1994
	Meso		5.4	60	66.0	46.0	-20.2			
Xylanase (bacterium)	Psychro	10	515.5	35	54.0	21.0	-3.3	-37.0	-3.1	Collins et al., 2003
	Meso		59.5	62	60.0	58.0	-2.0			
Xylanase (yeast)	Psychro	5	14.8		52.3	45.4	-7.0	-4.5	-2.3	Petrescu et al., 2000
	Meso		4.9		54.6	49.9	-4.7			

Vzhledem ke svým atraktivním vlastnostem, tj. vysoké specifické aktivitě a nízké tepelné stabilitě, představují psychrofilní enzymy obrovský potenciál pro základní výzkum a biotechnologické aplikace (Georlette et al., 2004).

## 6. Biotechnologický potenciál

Vysoká aktivita psychrofilních enzymů za nízkých a mírných teplot nabízí potenciální ekonomické výhody, například díky podstatné energii uspořené ve velkém měřítku, by nebyl vyžadován drahý ohřev. Mezofilní proteázy vyžadují tepotu 37 °C, používání psychrofilních enzymů tuto relativně vysokou teplotu nevyžaduje. Psychrofilní enzymy mohou být také použity k pomoci v domácnostech, praní oděvů v nízkých teplotách nejen redukuje spotřebu energie, ale i lépe chrání barvy tkanin. Enzymy, které jsou přidávány do pracích prášků, aby hydrolyzovaly skvrny například subtilisin, lipázy, glykosidázy, nejsou tak účinné ve vodě o teplotě nižší než 37 °C, mohou být nahrazeny psychrofilními enzymy (Gerday et al., 2000).

V potravinářství jejich vlastnosti umožňují transformaci nebo zlepšení trvanlivosti produktů citlivých na teplotu. Netolerance laktózy je problém u přibližně dvou třetin světové populace. Psychrofilní  $\beta$ -galaktosidáza v mléce nahrazuje laktózu během zpracování a skladování v nízké teplotě (Nakagawa et al., 2003). Dalším příkladem jsou pektinázy aktivní v chladu, které mohou pomoci redukovat viskozitu a jasnost ovocných džusů (Croak & Corredig, 2006).

Tepelná labilita těchto enzymů zajišťuje jejich rychlou, efektivní a selektivní inaktivaci v složitých směsích. Použití tepelně labilní alkalín-fosfatázy v molekulární biologii bylo pravděpodobně první biotechnologickou aplikací navrženou pro psychrofilní enzymy (Kobori et al., 1984). Glykosidázy jsou často používány v pekařství, ale mohou udržet zbytkovou aktivitu po pečení a tím měnit strukturu finálního produktu během uskladnění, toto se může obejít použitím psychrofilní glykosidázy. Avšak i přesto, jak je silný biotechnologický potenciál, psychrofilní enzymy zůstávají nevyužité. Částečně proto, že cena produkce v nízké teplotě je vyšší, než u komerčních enzymů, které jsou v současnosti využívány.

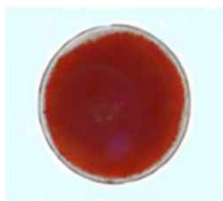
Psychrofilní mikroorganismy jsou také navrhovány pro biodegradační znečištění půd a odpadních vod během zimy v temperátních oblastech, když je degradativní kapacita endogenní mikrobioty snížena nízkou teplotou. Důležitým úspěchem na cestě k možnému praktickému využití psychrofilů je zkonstruování hostitel-vektorového systému umožňujícího nadměrnou expresi genů v psychrofilních bakteriích (Tutino et al., 2001).

## 7. Klidová stádia

Anabióza je metabolický životní stav, trvalé stadium, do něhož vstupují některé jednodušší organismy, jako odpověď na nepříznivé podmínky okolního prostředí, jako jsou vyschnutí, nedostatek kyslíku a také nízká teplota. V tomto stavu ustávají veškeré metabolické pochody a neprobíhá ani rozmnožování, vývoj či oprava tkání (wikipedie.cz).

Všechny mikroorganismy mají svůj vlastní životní cyklus se specifickými energetickými a nutričními požadavky a citlivostí na prostředí. Vytvořily se u nich různé strategie, to ovlivňuje nejen čas, velikost buňky, umístění, ozáření, teplota, ale také dominance a sezonní sukcese druhů. Důležitým faktorem je koncentrace živin v buňce i v okolním prostředí (Hense, 2010).

Příkladem skupiny s komplikovanými životními cykly jsou sněžné řasy z řádu Chlamydomonadales (Chlorophyta). Důležitou charakteristikou těchto organismů, které se vyskytují ve sněhu polárních a vysokohorských oblastí, je tvorba odolných nepohyblivých buněk, která se v rámci životního cyklu značí jako trvalá stadia nebo-li cysty. Trvalá stadia nejrozšířenějšího druhu *Chlamydomonas nivalis* mají hladký povrch, zesílenou buněčnou stěnu a obsah buňky je zcela překryt sekundárním karotenoidem astaxanthinem (Obr. 7). Cysty jsou schopny přežít nepříznivé podmínky prostředí, včetně nízkých teplot v zimním období. Za příznivých podmínek se opět mění v bičíkaté buňky, které představují aktivně rostoucí vegetativní stadium, mohou migrovat a růst v prostředí mokrého jarního sněhu. Trvalá stadia vznikají pohlavně a označují se jako zygospory, u některých druhů mohou vznikat i nepohlavní cestou (Komárek & Nedbalová, 2007).



Obr. 7: Cysta sněžné řasy *Chlamydomonas nivalis*, akumulace astaxantinu poskytuje buňce ochranu před nadměrným ozářením a před následky zmrznutí ( díky maximální dehydrataci) (Řezanka & Nedbalová, 2007)

Gram-negativní bakterie *Caulobacter crescentus* žije ve vodním prostředí. Její buněčný cyklus je nepravidelný, střídají se přisedlá stopkovitá stadia a pohyblivé hemžící se shluky bakterií. *C. crescentus* je schopen kryotolerance, tj odolnosti vůči zamrznutí během inkubace v nízkých teplotách díky čtyřem genomům kódujícím proteiny obsahující „cold shock“ domény. Exprese proteinů cspA a cspB funguje během chladového šoku, cspC a cspD pouze

během klidového stadia, (viz kapitola 3) (Balhesteros et al., 2010).

Bakterie z rodů *Micrococcus* a *Arthrobacter*, které nevytváří výtrusy jsou schopny za zvláštních podmínek tvořit stadia podobné cystám. Tato dlouhověká stadia nevykazují respirační činnost a díky zvláštní jemné struktuře a morfologii mají zvýšenou odolnost vůči nepříznivým podmínkám. Pravděpodobně tyto cystám podobná stadia zajišťují přežití v chladném prostředí (Mulyukin et al., 2002).

Mikrobiologické studie z nejhlubších, a tedy nejstarších vrstev ledového příkrovu Antarktidy prokázaly přítomnost životaschopných mikrobiálních buněk (prokaryot i eukaryot) v tomto prostředí. To je důkazem pro přirozený jev, dlouhodobou anabiózu, tj. zachování životaschopnosti a vitality jednoduchých organismů po tisíciletí (Abyzov et al., 2006).

## 8. Závěr

Cílem této práce bylo shrnout dosavadní znalosti a poznatky o způsobech, jakými dokáží mikroorganismy minimalizovat negativní následky způsobené nízkými teplotami v prostředí a adaptovat se. Tyto adaptační mechanismy umožňují obydlit zdánlivě nehostinná prostředí, trvale zaledněné plochy, chladné vodní habitaty, horské oblasti a jiné.

Mezi hlavní principy chladové adaptace patří změny ve složení membrán ve snaze zlepšit její elastické vlastnosti a zvýšit její fluiditu, což se děje zejména zvýšením množství nenasycených vazeb v řetězcích mastných kyselin nebo celkovým zkrácením a metylací konců řetězců mastných kyselin. Vyšší fluiditě napomáhá také obsah dalších látek, například membránových proteinů nebo karotenoidů. Důležitou adaptací také je pokles teplotních optim enzymů, a tedy jejich lepší účinnost při nižších teplotách. Děje se tak díky vysoké flexibilitě enzymatických struktur, vyšší hydrofobicitě, snížením množství polárních vazeb s okolní vodou, které rychleji podléhají teplotním změnám, klesají teplotní optima enzymů. Účinnost v nízkých teplotách je proto vysoká. Snižuje se aktivační energie katalyzovaných reakcí. Nepostradatelná je také ochrana struktur před negativními následky chladu. Buňky proto produkují ochranné proteiny a další látky, minimalizují množství vody v buňce. Velkým nebezpečím pro buňky je zamrznutí. Proteiny chladového šoku (Csps) chrání buněčné struktury před degradací, „antifreeze“ proteiny dokáží snížit teplotní bod tvorby ledu a proteiny vázající led působí na povrchu buňek a regulují tvorbu ledových jader. Dalšími látkami, které chrání buňky před poškozením v nízkých teplotách patří karotenoidy nebo některé cukry. Mikroorganismy adaptované na chlad si také často vytvořily složitý životní cyklus. Trvalá stádia jsou maximálně dehydrovaná, umožní přečkání nepříznivých podmínek prostředí v neaktivní formě po dlouhou dobu.

Tato práce poslouží jako teoretická příprava pro mojí budoucí magisterskou práci, ve které se chci věnovat porovnávání ekofyziologických vlastností, zejména změnám ve složení membrán, u psychrofilních, psychrotolerantních a mezofilních řas skupiny *Chlamydomonadales*.

## 9. Seznam použité literatury

- Abyzov S, Duxbury N, Bobin N, Fukuchi M**, (2006): Super-long anabiosis of ancient microorganisms in ice and terrestrial models for development of methods to search for life on Mars, Europa and other planetary bodies, *Advances in Space Research*, 38:1191 – 1197
- Adekoya O, Hellard R, Willassen W, Sylte I**, (2006): Comparative sequence and structure analysis reveal features of cold adaption of an enzyme in the thermolysin family, *Proteins-structure Function and Bioinformatics*, 62:435 – 449
- Alberts B, Bray D, Johnson A**, (2004): Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky, český překlad, Esparo publishing, 348 – 356, 134 – 154
- American society for Biochemistry and Molecular Biology** (2003), Dostupné z: <http://www.murad.nl/clinical-abstracts.html>, vyhledáno 15.8. 2011
- Annou B, Becker L, Bayles D, Labeda D**, (1997): Critical role of anteiso-C15:0 fatty acid in the growth of the deep-sea bacterium *Photobacterium profundum* SS9 at high pressure and low temperature, *Applied and Environmental Microbiology*, 63:3887 – 3894
- Balhesteros H, Mazzon R, da Silva C**, (2010): CspC and CspD are essential for *Caulobacter crescentus*, *Archives of Microbiology*, 192:747 – 758
- Bidigare R, Ondrusek M, Kennicutt M, Iturriaga R**, (1993): Evidence for a photoprotective function for secondary carotenoids of snow algae, *Journal of Phycology* 29:427 – 434
- Bin-Bin X, Fei B**, (2006): Cold adaptation of zinc metalloproteases in the thermolysin family from deep sea and arctic sea ice bacteria revealed by catalytic and structural properties and molecular dynamics new insights into relationship between conformational flexibility and hydrogen bonding, *Journal of Biological Chemistry*, 284:9257 – 9269
- Bowman JP, McCammon S, Brown M**, (1997a): Diversity and association of psychrophilic bacteria in Antarctic sea ice, *Applied and Environmental Microbiology*, 63:3068 – 3078
- Bowman JP, McCammon S, Nichols D**, (1997b): *Shewanella gelidimarina* sp. nov. and *Schewanellafrigidimarina* sp. nov. , novel Antarctic species with the ability to produce eikosapentaenoic acid (C20:5w3) and grow anaerobically by dissimilatory Fe (III) reduction. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47:1040 – 1047
- Chintalapati S, Kiran MD, Shivaji S**, (2004): Role of membrane lipid fatty acids in cold adaptation, *Cellular and Molecular Biology*, 50:631 – 642
- Collins T, D'Amico S, Marx J, Feller G, Gerday C**, (2007): Cold-adapted enzymes, In: Gerday C, Glandsdorff N, (eds), *Physiology and biochemistry of extremophiles*, Asm Press Washington: 165 – 179
- Croak S, Corredig M**, (2006): The role of pectin in orange juice stabilization: Effect of pectin methylesterase and pectinase activity on the size of cloud particles, *Food Hydrocolloids*, 20:961 – 965
- D'Amico S, Marx JC, Gerday C**, (2003): Activity-stability in extremophilic enzymes, *Journal of Biological Chemistry*, 278:7891 – 7896
- \*Decker E, Warner K, Richards M, Shahidi F**, (2005): Measuring antioxidant effectiveness in food, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53:4303 – 4310
- Elster J**, (2002): Algae and extreme environments – Ecology and physiology, *Proceedings of the Second European Workshop on Exo-Astrology*, 518:227 – 230
- Ermolenko DN, Makhatadze G**, (2002): Bacterial cold shock proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59:1902 – 1913
- Filip S, Hribar J, Vidrih R**, (2011): Influence of natural antioxidants on the formation of trans-fatty-acids isomers during heat treatment of sunflower oil, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113:224 – 230
- Feller G, Gerday Ch**, (2003): Psychrophilic enzymes: Hot topic in cold adaptation, *Nature Reviews Microbiology*, 1:200 – 208

- Fujii M, Takano Y, Kojima H, Hoshino T**, (2010): Microbial community structure, pigment composition, and nitrogen source of red snow in Antarctica, *Microbial Ecology*, 59:466 – 475
- Georlette D, Blaise V, Collins T**, (2004): Some like it cold: biocatalysis at low temperatures, *FEMS Microbiology Letters*, 28:25 – 42
- Georlette D, Damien B, Blaise V, Depiereux E**, (2003): Structural and functional adaptations to extreme temperatures in psychrophilic, mesophilic, and thermophilic DNA ligases, *Journal of Biological Chemistry*, 278:37015 – 23
- Gerday C, Aittaleb M, Bentahir M, Chessa J**, (2000): Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology, *Trends in Biotechnology*, 18:103 – 107
- Gerday C, Glandsdorff N**, (2007): *Physiology and biochemistry of extremophiles*, Asm Press, Washington, 429 p.
- Gianese G, Bossa F, Pascarella S**, (2002): Comparative structural analysis of psychrophilic and meso- and thermophilic enzymes, *Proteins-structure Function and Bioinformatics*, 47:236 – 249
- Gosink J, Herwig RP, Staley J**, (1997): *Octadecabacter arcticus* gen nov, sp nov, and *O.-antarcticus*, sp nov, nonpigmented, psychrophilic gas vacuolate bacteria from polar sea ice and water, *Systematic and Applied Microbiology*, 20:356 – 365
- Hartig C, Loffhagen N, Harms H**, (2005): Formation of trans fatty acids is not involved in growth-linked membrane adaptation of *Pseudomonas putida*, *Applied and Environmental Microbiology*, 71:1915 – 1922
- Hebraud M, Poitier P**, (2000): Cold acclimation and cold shock response in psychrotrophic bacteria, In: Ynouye M, *Cold shock response and adaptation*, Horizont Sci Press, 41 – 60
- Heipieper HJ, Meinhardt F, Segura A**, (2003): The cis-trans isomerase of unsaturated fatty acid in *Pseudomonas* and *Vibrio*: biochemistry, molecular biology and physiological function of a uniqueness adaptive mechanism, *FEMS Microbiology Letters*, 229:1 – 7
- Hense I**, (2010): Approaches to model the life cycle of harmful algae, *Journal of Marine Systems* 83:108 – 114
- Hoham RW**, (1992), Environmental influences on snow algal microbes, *Proceedings of the 60<sup>th</sup> Annual Western Snow Conference*, pp. 78 - 83
- Hoshito T, Xiao N, Tkachenko O**, (2009): Cold adaptation in the phytopathogenic fungi causing snow molds, *Mycoscience*, 50:26 – 38
- Kandror O, DeLeon A, Goldberg A**, (2002): Trehalose synthesis is induced upon exposure of *Escherichia coli* to cold and is essential for viability at low temperature, *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 99:9727 – 9732
- Inouye M, Phadtare S**, (2007): The cold shock Response, In: Gerday C, Glandsdorff N, (eds), *Physiology and biochemistry of extremophiles*, Asm Press, Washington: 120 – 220
- Kang J**, (2011): Omega-3: A link between global climate change and human health, *Biotechnology Advances* 29:388 – 390
- Kannenber E, Poralla K**, (1999): Hopanoid biosynthesis and function, *Naturwissenschaften*, 86:168 – 176
- Karlson D, Nakaminami K, Toyomasu T, Imai R**, (2002): A cold-regulated nucleic acids-binding protein of winter wheat shares a domain with bacterial cold shock proteins, *Journal of Biological Chemistry*, 277:35248 – 35256.
- Kazuoka T, Oikawa T, Muraoka I**, (2007): A cold-activation and thermostable alcohol dehydrogenase of a psychrotolerant from Antarctic seawater, *Flavobacterium frigidimaris* KUC-1, *Extremophiles* 11:257 – 267
- Keusgen M, Curtis J**, (1997): Sulfoquinovosyl diacylglycerols from the alga *Heterosigma carterae*, *Lipids*, 32:1101 – 1112
- Kikuchi Y**, (1984): RNA enzymes, *Biochemistry & Molecular Biology*, 57:1629 – 1636
- Kobori H, Sullivan C, Shizuya H**, (1984): Heat-labile alkaline phosphate from antarctic

- bacteria- rapid 5' end labeling of nucleic acids, *Proceedings of the National Academy of Science of United States of America-Biological Sciences*, 81:6691 – 6695
- Komárek J, Nedbalová L**, (2007): Green cryosestic algae, *In: Seckbach J (ed): Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments, Springer*; 321 – 342
- Kondo K, Inouye M**, (1991): A cold shock-inducible gene of *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Biological Chemistry*, 266: 17537 – 17544
- Kristjansson J, Hreggvidsson G**, (1995): Ecology and habitats of extremophiles, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 11:17 – 25
- Lee S, Jin N, Whitlege T**, (2010a): Comparison of bottom sea-ice algal characteristics from coastal and offshore regions in the Arctic Ocean, *Polar Biology*, 33:1331 – 1337
- Lee J, Park K, Park S, Park H, Song Y, Kang S, Kim H**, (2010b): An extracellular ice-binding glycoprotein from an Arctic psychrophilic yeast, *Cryobiology*, 60:222 – 228
- Lonhienne T, Gerday C, Feller G**, (2000): Psychrophilic enzymes: revisiting the thermodynamic parameters of activation may explain local flexibility, *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1543:1 – 10
- Low P, Jeffrey L, Somero B, Somero G**, (1973): Temperature adaptation of enzymes: Roles of the free energy, the enthalpy, and the entropy of activation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70:430 – 432
- \*Macdonald PM, Sykes B**, (1985): Fluorine-19 nuclear magnetic resonance studies of lipid fatty acyl chain order and dynamics in bacteria *Acholeplasma laidlawii* B membranes. Effects of methyl-branch substitutions and of trans unsaturation upon membrane acyl-chain orientational order. *Biochemistry*. 24:2412 – 2419
- McLachlan J, Curtis J, Boutilier K, Keusgen M**, (1999): *Tetrateptia pomquetensis* (Euglenophyta), a psychrophilic species: growth and fatty acid composition, *Journal of Phycology*, 35:280 – 286
- McMinn A, Martin A, Ryan K**, (2010): Phytoplankton and sea ice algal biomass and physiology during the transition between winter and spring (McMurdo Sound, Antarctica), *Polar Biology*, 33:1547 – 1556
- Morgan-Kiss RM, Priscu J, Pockock T, Gudinaite-Savitch L, Huner N**, (2006): Adaptation and acclimation of photosynthetic microorganisms to permanently cold environments, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 275:222 – 252
- Morris GJ, Coulson G, Clarke A**, (1981): Does growth-rate rather than temperature regulate membrane fatty-acid composition in *Tetrahymena*, *Cryo-Letters*, 2:111 – 116
- Mulyukin A, Soina V, Demkina E, Kozlova A**, (2002): Formation of resting cells by non-spore-forming microorganisms as a strategy of long-term survival in the environment, *Instruments, Methods and Missions for Astrobiology VI*, 4939:208 – 218
- Nadeau TL, Castenholz R**, (2000): Characterization of psychrophilic oscillatorians (Cyanobacteria) from Antarctic meltwater ponds, *Journal of Phycology*, 36:914 – 923
- Nadeau TL, Milbrandt E, Castenholz R**, (2001): Evolutionary relationships of cultivated Antarctic oscillatorians (Cyanobacteria), *Journal of Phycology*, 37:650 – 654
- Nakagawa T, Fujimoto Y, Uchino M, Miyaji T**, (2003): Isolation and characterization of psychrophiles producing cold-active beta-galactosidase, *Letters in Applied Microbiology*, 37:154 – 157
- Nandakumar R, Mattiasson B**, (1999): A low temperature microbial biosensor using immobilised psychrophilic bacteria, *Biotechnology Techniques*, 13:689 – 693
- Nichols DS, Nichols PD, Russel N** (1997): Polyunsaturated fatty acids in the psychrophilic bacterium *Schewanella gelidimarina* ACAM 456(T): molecular species analysis of major phospholipids and biosynthesis of eicosapentaenoic acid, *Biochimica et Biophysica Acta-Lipid and Lipid Metabolism*, 1347:164 – 176
- Ohno H, Susilo R, Gordienko R**, (2010): Interaction of antifreeze proteins with hydrocarbon hydrates, *Chemistry-A European Journal*, 16:10409 – 10417

- Okuyama H, Enari D, Kusano T**, (1997): Identification and characterization of 9-cis-hexadecenoic acid cis-trans isomerase from a psychrotolerant bacterium *Pseudomonas* sp., *Physiology, Biochemistry and Molecular Biology of Plant Lipids*, 84 – 86
- Ourisson G, Rohmer M, Poralla K**, (1987): Procaryotic hopanoids and other polyterpenoid sterol surrogates, *Microbiology*, 41:301 – 333
- Phadtare S, Alsina J, Inouye M**, (1999): Cold shock response and cold shock proteins, *Current Opinion in Microbiology*, 2:175 – 180
- Phillips R, Wiegel J, Berry C, Fliermans C, Peacock A, White D, Shimkets L**, (2002): *Kineococcus radiotolerans* sp. nov., a radiation-resistant, gram-positive bacterium, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52:933 – 938
- Projekt alfa**, Dostupné z: <http://projektaalfa.ic.cz/enzymy.htm>, vyhledáno 17.8. 2011
- \*Quinn PJ**, (1981): The fluidity of cell membranes and its regulation. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, 38:1 – 104
- Raymond JA, Janech MG, Fritsen CH**, (2009): Novel ice-binding proteins from a psychrophilic antarctic alga (Chlamydomonadaceae, Chlorophyceae), *Journal of Phycology*, 45:130 – 136
- Rossi M, Buzzini P, Cordisco L, Amaretti A, Sala M**, (2009): Growth, lipid accumulation, and fatty acid composition in obligate psychrophilic, facultative psychrophilic, and mesophilic yeast. *FEMS Microbiology Ecology*, 69:363 – 372
- Russel N**, (1998): Psychrophiles, *Extremophiles: Microbiol Life in Extreme Environments*, 25-45
- Russel N**, (1984): The regulation of membrane fluidity in bacteria by acyl chain length. In: Masson L, Kates M (ed), *Biomembranes, Humana Press, Clinton N*, 329 – 347
- Řezanka T, Nedbalová L, Sigler K**, (2008): Unusual short and medium chain polyunsaturated fatty acids from snow alga *Chloromonas brevispina*, *Microbiological Research*, 163:373 – 379
- Sani YM**, (2010): Effect of growth media modifications on cell biomass and polyunsaturated fatty acids (PUFAs) production from *Shewanella frigidimarina*, *African Journal of Biotechnology*, 9:8928 – 8933
- Schulze-Makuch D, Irwin L, Lipps J**, (2005): Scenarios for the evolution of life on Mars, *Journal of Geophysical Research-Planets*, 110:E12S23
- Seckbach J**, (2000): Extremophiles as models for extraterrestrial life, *Bioastronomy99, A new era in bioastronomy*, 213:379 – 386
- Selbman L, Zucconi L, Ruisi S, Grube M, Cardinale M**, (2010): Culturable bacteria associated with Antarctic lichens: affiliation and psychrotolerance, *Polar biology* 33:71 – 83
- Siddiqui KS, Cavicchioli R**, (2005): Improved thermal stability and activity in the cold-adapted lipase B from *Candida antarctica* following chemical modification with oxidized polysaccharides, *Extremophiles*, 9:417 – 476
- Siddiqui KS, Cavicchioli R**, (2006): Cold-adapted enzymes, School of Biotechnology and Biomolecular Sciences, *The University of New South Wales, Sydney, rev.* 403 – 423
- Smith D, Radivojac P, Obradovic Z, Dunker A, Zhu G**, (2003): Improved amino acid flexibility parameters, *Protein Science*, 12:1060 – 72
- Subczynski W, Markowska E, Gruszecki W, Sielewiesiuk J**, (1992): Effects of polar carotenoids on dimyristoylphosphatidylcholine membranes a spin-label study, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1105:97-108
- Sukenik A, Takahashi H, Mokady S**, (1994): Dietary lipids from marine unicellular algae enhance the amount of liver and blood omega-3-fatty-acids in rats, *Annals of Nutrition and Metabolism*, 38:85 – 96
- Suutari M, Laakso S**, (1994): Microbial fatty acids and thermal adaptation, *Critical Review in Microbiology*, 20:285 – 328.

- Tronelli D, Maugini E, Bossa F, Pascarella S, (2007):** Structural adaption to low temperatures – analysis of the subunits interface of oligomeric psychrophilic enzymes, *Febs Journal*, 274:4595 – 4608
- Tutino M, Duilio A, Parrilli E, (2001):** A novel replication element from an Antarctic plasmid as a tool for a expression of proteins at low temperature, *Extremophiles*, 5:256 – 264
- Vendittis E, Castellano I, Cotugno R, (2007):** Adaptation of model proteins from cold to hot environments involves continuous and small adjustments of average parameters related to amino acid composition, *Journal of Theoretical Biology*, 250:156 – 171
- Vincent WF, James MR, (1996):** Biodiversity in extreme aquatic environments: Lakes, ponds and streams of the Ross Sea Sector, Antarctica, *Biodiversity and Conservation*, 5:1451 – 1471
- Voet D, Voet JG, (2006):** *Biochemistry 3<sup>rd</sup> Edition*, John wiley a Co.
- Volkman JK, Smith DJ, Eglinton G, Forsberg T, (1981):** Sterol and fatty acid composition of 4 marine haptophycean algae, *Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom*, 61:509 – 527
- \*Wigley D, Clarke A, Dunn C, Barstow D, Atkinson T, (1987):** The engineering of a more thermally stable lactate dehydrogenase by reduction of the area of a water-accessible hydrophobic surface. *Biochimica et Biophysica Acta*, 916:145 – 148
- Wikipedia.cz** Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Anabi%C3%B3za>, vyhledáno 15.8. 2011
- Wikipedia.cz** Dostupné z: [http://en.wikipedia.org/wiki/Docosaehaenoic\\_acid](http://en.wikipedia.org/wiki/Docosaehaenoic_acid), vyhledáno 15.8. 2011
- Wikipedia.cz** Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Margar%C3%ADn>, vyhledáno 15.8. 2011
- Yu S, Brown A, Middleton AJ, Tomczak M, Walker V, Davies P, (2010):** Ice restructuring inhibition activities in antifreeze proteins with distinct differences in thermal hysteresis, *Cryobiology*, 61:327 – 334
- Zheng S, Wang W, Zhang F, (2011):** Dominant diatom species in the Canada Basin in summer 2003, a reported serious melting season, *Polar Record*, 47:244 – 261

\* sekundární citace