

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovatelů.

Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně odcitovat.

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra genetiky a mikrobiologie

Adaptace cytoplazmatické membrány k surfaktinu
v produkčním kmeni *B. subtilis* ATCC 21332

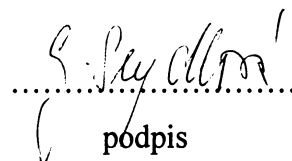
Gabriela Seydlová

Praha 2006

Vedoucí diplomové práce: **Doc. RNDr. Jaroslava Svobodová, CSc.**

Prohlašuji, že tato práce byla vypracována samostatně, jen s použitím citované literatury a pod vedením příslušného vedoucího diplomové práce.

v Praze dne 25.8.2006


.....
podpis

Tato diplomová práce by nemohla vzniknout bez neocenitelného odborného vedení a konzultací Doc. RNDr. Jaroslavy Svobodové, CSc., které si dovoluji touto cestou velice poděkovat. Za odborné i praktické rady a ochotnou pomoc patří dík také RNDr. Denise Petráčkové, Mgr. Lence Šemberové, Mgr. Janě Beranové, Mgr. Radovanu Fišerovi a všem členům mikrobiologické pracovní skupiny.

Diplomová práce vznikala v letech 2003 – 2006 za částečného přispění grantového projektu GAUK 43-303528 „Odpověď bakteriální buňky na stres – adaptace a signalizace“ a projektu ESF CZ.04.3.07/4.2.01.1/0039 „Informační a vzdělávací program pro využití biotechnologií v oblasti životního prostředí a udržitelného rozvoje“.

Adaptation of the Cytoplasmic Membrane of the producer *B. subtilis* ATCC 21332 to Surfactin

Surfactin, one of the most powerful biosurfactant is produced by various strains of *Bacillus subtilis*. This acidic lipopeptide exhibits antiviral, antibacterial, antitumoral and haemolytic activities and has the advantages of low toxicity and biodegradability over the chemically synthesised surfactants. Due to its amphiphilic nature surfactin incorporates into the phospholipid bilayer and in vitro induces its permeabilisation and perturbation. The aim of this study has been to characterise the adaptive processes occurring at the level of cytoplasmic membrane of the surfactin producer *Bacillus subtilis* ATCC 21233 in response to surfactin production. The membrane phospholipids were routinely analysed by TLC on Silicagel G plates and the chemical description of the derived fatty acids composition was performed by GC/MS analysis. In parallel to the kinetics of surfactin synthesis, the membrane phospholipids have undergone complex reconstruction. Major phospholipids were gradually replaced by the negatively charged cardiolipin (up to 28% of the total) which increases the surface repulsive force of the membrane against the anionic lipopeptide surfactin. The change of the membrane surface was accompanied with the substantial rigidisation of the membrane interior as revealed by the steady-state fluorescence anisotropy of 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene as the hydrophobic probe (rDPH). The biochemical profile of the membrane compartment has been completed with the membrane proteome separation by SDS-PAGE. The obtained data revealed an extensive modulation of the cytoplasmic membrane composition in response to surfactin, suggesting the possibility of membrane protection and cell viability.

Key words: *Bacillus subtilis*, surfactin, cytoplasmic membrane, phospholipids, adaptation

Klíčová slova: *Bacillus subtilis*, surfaktin, cytoplazmatická membrána, fosfolipidy, adaptace

1. ÚVOD	10
2. BAKTERIÁLNÍ POVRCHOVĚ AKTIVNÍ LÁTKY	12
2.1 SURFAKTIN	13
2.1.1 Struktura a vlastnosti surfaktinu	14
2.1.2 Přehled aktivit	16
2.1.3 Syntéza surfaktinu.....	18
2.1.3.1 Surfaktin syntetáza	19
2.1.4 Biosyntetické geny a regulace syntézy	21
2.1.5 Vliv kultivačních podmínek na produkci surfaktinu	24
2.1.6 Fyziologická úloha surfaktinu.....	26
2.1.7 Potenciální komerční využití	29
2.1.7.1 Využití surfaktinu v průmyslu.....	29
2.1.7.2 Využití surfaktinu v biomedicině	31
3. CYTOPLAZMATICKÁ MEMBRÁNA	34
3.1 FOSFOLIPIDY BAKTERIÁLNÍ MEMBRÁNY	34
3.1.1 Struktura fosfolipidů	35
3.1.2 Mastné kyseliny bakteriálních fosfolipidů.....	36
3.2 BIOSYNTÉZA FOSFOLIPIDŮ	37
3.2.1 Syntéza mastných kyselin	39
3.3 VLASTNOSTI A FUNKCE FOSFOLIPIDŮ.....	40
4. MATERIÁL A METODY	42
4.1 MIKROORGANIZMUS	42
4.2 ROZTOKY A PUFRY.....	42
4.3 KULTIVAČNÍ PŮDY	45
4.3.1 Komplexní médium	45
4.3.2 Landyho médium	45
4.3.3 Živný bujón Oxoid.....	46
4.3.4 Pevné půdy	46
4.4 SEZNAM POUŽITÝCH CHEMIKÁLIÍ	47
4.5 STERILIZACE	48
4.6 PŘÍPRAVA SPOROVÝCH KONZERV	49
4.7 KULTIVACE A RŮSTOVÁ KŘIVKA	49
4.7.1 Kultivace bakterií.....	49
4.7.2 Příprava inokula	50
4.7.3 Růstová křivka	50
4.7.4 Stanovení počtu (koncentrace) živých buněk výsevem na plotny	51
4.8 IZOLACE SURFAKTINU.....	52
4.9 STANOVENÍ KONCENTRACE SURFAKTINU.....	52
4.9.1 Test hemolýzy	52

4.9.2 Stanovení koncentrace surfaktinu pomocí BCA.....	53
4.9.3 Kapalinová chromatografie kombinovaná s hmotnostní spektrometrií (LC/MS)	53
4.10 IZOLACE A ANALÝZA LIPIDOVÉ FRAKCE.....	54
4.10.1 Izolace lipidové frakce	54
4.10.2 Analýza lipidových extraktů chromatografií na tenké vrstvě	55
4.10.2.1 Příprava chromatografických desek	56
4.10.2.2 Jednorozměrná chromatografie na tenké vrstvě	56
4.10.2.3 Kvantitativní stanovení lipidického fosforu	57
4.10.3 Plynová chromatografie kombinovaná s hmotnostní spektrometrií	58
4.11 IZOLACE CYTOPLAZMATICKÝCH MEMBRÁN	60
4.11.1 Metoda podle Bisschopa a Koningse – „enzymatická metoda“	60
4.12 STANOVENÍ KONCENTRACE BÍLKOVIN POMOCÍ BCA	61
4.13 POLYAKRYLAMIDOVÁ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA BÍLKOVIN.....	62
4.13.1 Jednorozměrná (1D) elektroforéza	63
4.13.2 Detekce proteinů Coomassie R – 250	63
4.14 ANISOTROPIE FLUORESCENCE SONDY DPH	64
4.14.1 Měření anisotropie fluorescence sondy DPH	64
5. VÝSLEDKY	66
5.1 RŮSTOVÁ CHARAKTERISTIKA <i>BACILLUS SUBTILIS</i> ATCC 21332	66
5.1.1 Růst <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 ve 40°C	67
5.1.2 Růst <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 ve 30°C	68
5.1.3 Růst <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 při nižší aeraci	70
5.2 STANOVENÍ POČTU ŽIVÝCH BUNĚK (COLONY FORMING UNIT) <i>BACILLUS SUBTILIS</i> ATCC 21332.....	71
5.3 PRODUKCE SURFAKTINU	73
5.3.1 Stanovení přítomnosti surfaktinu pomocí testu hemolýzy.....	73
5.3.2 Stanovení koncentrace surfaktinu pomocí BCA.....	75
5.3.3 Stanovení koncentrace surfaktinu kapalinovou chromatografií kombinovanou s hmotnostní spektrometrií (LC/MS).....	76
5.4 ADAPTACE CYTOPLAZMATICKÉ MEMBRÁNY <i>B. SUBTILIS</i> ATCC 21332 NA PRODUKCI SURFAKTINU.....	78
5.4.1 Složení fosfolipidů <i>B. subtilis</i> v závislosti na produkci surfaktinu.....	78
5.4.2 Analýza mastných kyselin cytoplazmatické membrány <i>B. subtilis</i> ATCC 21332	82
5.4.3 Analýza bílkovin cytoplazmatické membrány <i>B. subtilis</i> ATCC 21332.....	85
5.4.3.1 Dělení membránových proteinů <i>B. subtilis</i> v 7,5% polyakrylamidovém gelu	85
5.4.3.2 Dělení membránových proteinů <i>B. subtilis</i> ve 12,5% polyakrylamidovém gelu	89
5.4.4 Rovnovážná anisotropie fluorescence DPH značených membrán <i>B. subtilis</i> ATCC 21332	92
6. DISKUZE	95
7. SOUHRN	102
8. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY	104

SEZNAM ZKRATEK

1D SDS PAGE	jednorozměrná polyakrylamidová gelová elektroforéza za přítomnosti laurylsulfátu sodného
<i>a</i>	anteiso- větvení mastné kyseliny
ATCC	American Type Culture Collection
A.U.	arbitrary units
ACP	acyl-přenašející protein (Acyl Carrier Protein)
APS	amoniumpersulfát
Asp	asparagová kyselina
ATP	adenosintrifosfát
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
BCA	bicinchoninová kyselina
BSA	hovězí sérový albumin (Beef Serum Albumin)
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CDP-diglycerid	cytidin-5-fosfát-diglycerid
cfu	počet živých buněk (colony forming unit)
CL	kardiolipin
CMC	kritická micelární koncentrace (Critical Micelle Concentration)
CTP	cytidintrifosfát
D	asparagová kyselina
DAG	diacylglycerol
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNáza	deoxyribonukleáza
DPH	1,6-difenyl-1,3,5 hexatrien
DTT	Dithiothreitol
E	Glutamová kyselina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina (ethylenediamine-tetraacetic acid)
G3P	glycerol-3-fosfát
GC	plynová chromatografie (Gas Chromatography)
Glu	glutamová kyselina

HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
<i>i</i>	iso- větvení mastné kyseliny
Ile	isoleucin
L	leucin
LC	kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography)
Leu	leucin
MDO	oligosacharidy odvozené z membrány (Membrane Derived Oligosacharides)
MK	mastná kyselina
Mr	relativní molekulová hmotnost
MS	hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)
NRPS	neribosomální peptidická syntetáza (Non-Ribosomal Peptide Synthetase)
OD	optická denzita
ORF	otevřený čtecí rámec (Open Reading Frame)
PA	kyselina fosfatidová
PC	fosfatidylcholin
PE	fosfatidyletanolamin
PG	fosfatidylglycerol
PI	fosfatidylinositol
PLA2	fosfolipáza A2
PMSF	phenylmethylsulfonylfluorid
ppan	4'-fosfopantetheinový kofaktor (phosphopantethein)
pro-u-PA	pro-urokináza
PS	fosfatidylserin
PXNH₂	lysofosfolipidy
Rf	retenční faktor
RNáza	ribonukleáza
RND	rodina multidrogových efluxních pump (Resistance, Nodulation and Cell Division)
rpm	počet otáček za minutu (rounds per minute)
r_{ss}DPH	ustálená anisotropie fluorescence sondy DPH
SDS	dodecylsulfát sodný

SM	sfingomyelin
std.	standard
TE	thioesteráza
TFA	trifluoroctová kyselina
T_K	teplota kultivace
TLC	chromatografie na tenké vrstvě (Thin Layer Chromatography)
T_m	teplota měření
T_t	teplota tranzice
u-PA	plazminogenový aktivátor urokinázového typu
V	Valin
Val	Valin

1. ÚVOD

Bakterie jsou všudypřítomná a výjimečně úspěšná forma života. Jejich úspěch spočívá především ve schopnosti adaptovat se na širokou škálu podmínek prostředí. Za tímto účelem se v bakteriích vyvinul rozsáhlý arsenál strategií, pomocí kterých dovedou čelit specifickým nástrahám, které jim jejich životní prostředí předkládá. Jednotlivé adaptivní procesy nejsou regulovány samostatně. Namísto toho bakterie využívají sofistikovaně propojené sítě senzorických a regulačních drah, které řídí několik různých adaptivních procesů současně. Zářným příkladem může být spojení regulace syntézy sekundárních metabolitů, sporulace a vzniku stavu kompetence u bakterií rodu *Bacillus*.

B. subtilis je půdní mikroorganismus, který je nucený vyrovnávat se nepřetržitě s nedostatkem živin a měnícími se fyzikálně chemickými podmínkami prostředí. Tyto procesy lze v laboratorních podmínkách pozorovat při jednorázových kultivacích. Na konci exponenciální fáze, kdy nedostatek živin limituje optimální růst, *B. subtilis* začíná aktivovat systémy motility a chemotaxe, které by mu v přirozených podmínkách prostředí umožnily hledat nové zdroje živin. Pokud nutriční stres pokračuje, vstupují buňky do stacionární fáze a začínají sekretovat degradativní enzymy a indukovat další mechanismy zajišťující bakterii využití alternativních zdrojů živin. Za účelem soupeření s potenciálními konkurenty začínají buňky produkovat sekundární metabolity, antibiotika. Přetrvávající nedostatek živin vyústí ve vznik stavu kompetence a v krajním případě se aktivuje poslední alternativa - bakteriální populace se vydává cestou sporulace, která bakterii poskytuje možnost přežít i extrémně nepříznivé podmínky prostředí.

Jednou ze skupin látek, jejichž syntéza je indukována při vstupu do stacionární fáze, jsou i povrchově aktivní látky (biosurfaktanty), které se díky své fyzikálně chemické povaze podílejí na modifikaci životního prostředí i samotného povrchu bakteriální buňky a udílejí jí celou řadu selekčně výhodných vlastností. Do této skupiny látek patří i lipopeptid surfaktin, který vykazuje řadu výjimečných vlastností a biologických účinků skýtajících potenciál pro komerční využití. Ačkoli se řada světových laboratoří zabývá otázkou biosyntézy a celkové optimalizace produkce surfaktinu, informace týkající se jeho sekrece z buňky a především primárního metabolismu samotného producenta surfaktinu stále chybí.

Předmětem zájmu této diplomové práce se proto stal jeden z produkčních kmenů surfaktinu *Bacillus subtilis* ATCC 21332. Z pohledu producenta představuje rostoucí

koncentrace surfaktinu v prostředí stres, kterému musí bakteriální buňka čelit a musela stejně jako jiní producenti antibiotik vůči látce, kterou sama produkuje, vyvinout účinné mechanismy rezistence. První metabolicky aktivní a nepostradatelnou strukturou bakterie, která se s působením jakéhokoli stresu setkává, je cytoplazmatická membrána. To platí pro všechny stresové faktory vnějšího prostředí, působení surfaktinu jako stresoru je však složitější. Tato membránově aktivní látka představuje patrně jednak vnitřní stres tak, jak je uvnitř buňky syntetizována, ale poté i vnější stres jako molekula akumulovaná v prostředí.

Hlavním tématem diplomové práce byla tedy charakterizace adaptivních procesů odehrávajících se v průběhu růstu a syntézy surfaktinu v cytoplazmatické membráně producenta *B. subtilis* ATCC 21332. Pro realizaci tohoto úkolu byly výtčeny následující cíle:

1. Zpracovat literární přehled problematiky surfaktinu týkající se jeho struktury, vlastností, syntézy a užití.
2. Růstově charakterizovat kmen *B. subtilis* ATCC 21332 za různých kultivačních podmínek.
3. Stanovit počet živých buněk (vegetativních buněk a spor) v kultuře *B. subtilis* ATCC 21332.
4. Zavést metodu izolace surfaktinu z tekuté kultury.
5. Stanovit kinetiku syntézy surfaktinu v tekuté kultuře *B. subtilis* ATCC 21332.
6. Analyzovat biochemické a fyzikální změny cytoplazmatické membrány *B. subtilis* ATCC 21332 v závislosti na produkci surfaktinu:
 - složení fosfolipidů
 - mastné kyseliny fosfolipidů
 - bílkoviny cytoplazmatické membrány
 - mikroviskozita cytoplazmatické membrány měřením anisotropie fluorescenční sondy DPH.

2. BAKTERIÁLNÍ POVRCHOVĚ AKTIVNÍ LÁTKY

Povrchově aktivní látky jsou amfifilní sloučeniny s tendencí interagovat s různými povrchy. Povrch je definován jako fázové rozhraní mezi dvěma fázemi heterogenního systému. Toto rozhraní hraje zásadní úlohu v chování každého systému. Je tedy přirozené, že bakterie mající vysoký poměr povrchu k objemu produkují rozmanité povrchově aktivní sloučeniny neboli surfaktanty. Surfaktanty jsou amfipatické substance (tj. obsahují hydrofóbní i polární skupiny), které se adsorbují na povrchy a mění tím jejich vlastnosti. Do této skupiny látek se řadí mj. mýdla a detergenty.

Mikroorganismy mají schopnost syntetizovat širokou škálu povrchově aktivních látek, které se rozlišují podle různých kritérií jako je velikost molekuly (nízko- a vysokomolekulární surfaktanty, polymerní surfaktanty), biochemická povaha (mastné kyseliny, lipidy, bakteriociny, peptidy, polysacharidy), povaha hydrofilní části (karboxylová skupina, glycerol, sacharidy, aminokyseliny) nebo také podle rodu produkujícího mikroorganismu. Všeobecně se povrchově aktivní látky rozdělují do tří skupin na biosurfaktanty, amfifilní polymery a polyfilní polymery (Tab. 1).

termín	definice	příklad
Biosurfaktanty	Nízkomolekulární surfaktanty mikrobiálního původu	glykolipidy, lipopeptidy
Amfifilní polymery	Vysokomolekulární povrchově aktivní látky s jednou hydrofóbní oblastí	lipopolysacharidy, lipoteichoová kys., lipoglykany
Polyfilní polymery	Vysokomolekulární povrchově aktivní látky s hydrofóbními skupinami rozloženými po celé molekule	hydrofóbní polysacharidy, emulsan

Tab. 1 Terminologie rozdělení mikrobiálních povrchově aktivních látek (NEU 1996).

Typickými a žádoucími vlastnostmi surfaktantů je schopnost zvyšování rozpustnosti různých látek, snižování povrchového napětí a nízká kritická micelární koncentrace (Critical Micelle Concentration, CMC). Účinnost surfaktantu je určována právě jeho schopností snižovat povrchové napětí, jejíž mírou je množství volné povrchové energie na jednotku plochy ($N \cdot m^{-1}$) nutné pro přenos jedné molekuly z okolního prostředí na povrch (ROSEN 1978). Přítomnost surfaktantů potřebné množství této energie snižuje.

Účinné surfaktanty mají nízkou CMC, tzn. že pro snížení povrchového napětí je zapotřebí menšího množství surfaktantu. CMC vyjadřuje ve skutečnosti schopnost surfaktantu rozpouštět se ve vodném prostředí. Surfaktant se do určité kritické koncentrace (hodnota CMC) vyskytuje v podobě monomerů, ale nad tuto hranici jeho amfifilní molekuly začínají asociovat do supramolekulárních struktur jako jsou micely, dvojvrstvy a váčky. CMC je tedy definována jako minimální koncentrace nutná k započatí tvorby micel (BECHER 1965), tzn. že CMC vyjadřuje maximální koncentraci monomerů surfaktantu ve vodném prostředí. Tato hodnota je však také ovlivňována podmínkami prostředí jako je pH, teplota a iontová síla.

Skupina surfaktantů mikrobiálního původu vykazující výjimečnou povrchovou aktivitu je klasifikována jako **biosurfaktanty**. Biosurfaktanty jsou produkovány kvasinkami a bakteriemi rostoucími na rozličných substrátech. Chemickou povahou se může jednat o glykolipidy, lipopeptidy, fosfolipidy, mastné kyseliny, neutrální lipidy nebo různé polymerní sloučeniny. Většina těchto látek má aniontový nebo neutrální charakter. Pouze některé biosurfaktanty obsahující aminoskupiny jsou kationy. Hydrofóbní část molekuly může být tvořena sacharidem, aminokyselinou, cyklickým peptidem, fosfátem, karboxylovou kyselinou nebo alkoholem. Hodnota CMC biosurfaktantů se obecně pohybuje v rozmezí 1 – 200 mg/l, relativní molekulová hmotnost pak dosahuje 500 – 1500 Da (MULLIGAN 2005).

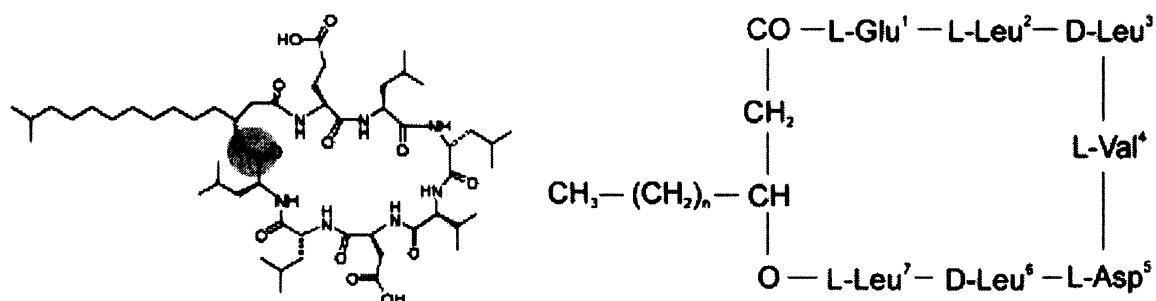
2.1 SURFAKTIN

Surfaktin je cyklický lipopetid bakteriálního původu, jehož název byl původně odvozen od jeho výjimečných vlastností jednoho z nejsilnějších surfaktantů - surfaktin snižuje povrchové napětí vody ze 72 na 27 mN.m⁻¹ již při 0,005% koncentraci. Kritická micelární koncentrace surfaktinu je 7,5 μM, což je hodnota asi o dva řády nižší než u většiny ostatních detergentů. Surfaktin vytváří micely tyčkovitého tvaru s agregačním číslem ~ 170 (HEERKLOTZ a SEELIG 2001).

Ačkoliv byl tento sekundární metabolit objeven před již téměř čtyřiceti lety, zaznamenal v posledních 15 letech velký nárůst zájmu, který byl vyvolán rostoucími požadavky po účinném biosurfaktantu využitelném pro řešení současných ekologických problémů. Historie surfaktinu se datuje od roku 1968, kdy byla zaznamenána přítomnost

nové biologicky aktivní látky v tekuté kultuře některých kmenů *Bacillus subtilis* (ARIMA *et al.* 1968). Díky svému výjimečnému postavení mezi surfaktanty byl pojmenován surfaktin a strukturně byl popsán v roce 1969 jako makrolidový lipopetid (KAKINUMA *et al.* 1969). I když od této doby byly popsány i další lipopetidy, surfaktin zůstává hlavním a nejlépe popsáním zástupcem této skupiny látek. Důvodem je celá řada jeho významných fyziologických a biochemických aktivit, o kterých bude pojednáno níže.

2.1.1 Struktura a vlastnosti surfaktinu



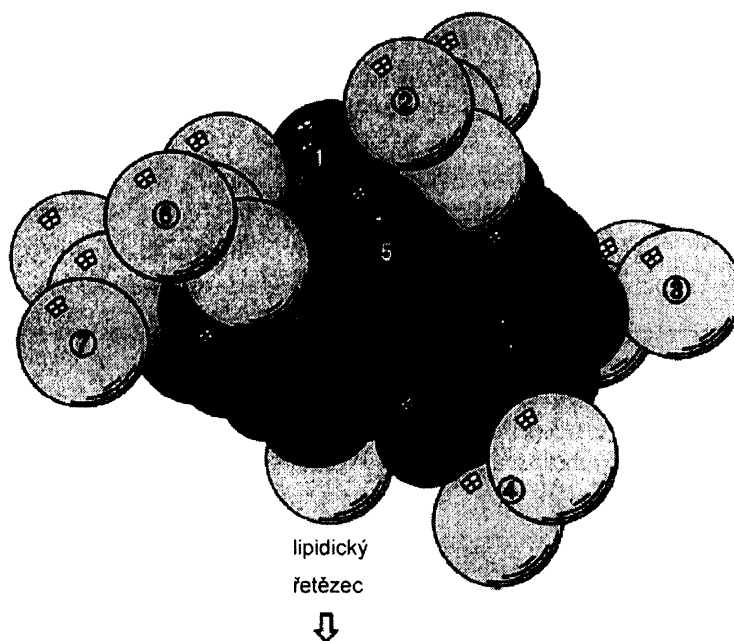
Obr. 1 Struktura surfaktinu

Šedé pole označuje místo vzniku makrolaktonu, $n = 12 - 16$ (MULLIGAN 2005, SIEBER a MARAHIEL 2003).

Surfaktin je cyklický lipopetid tvořený heptapeptidem (ELLVDLL) s chirální sekvencí LLDLLDL uzavřené v laktonovém kruhu, který je spojen s β -hydroxy mastnou kyselinou obsahující 12 – 16 atomů uhlíku v konfiguraci *n*, *iso* nebo *anteiso* (Obr. 1). Aminokyselinové zbytky 1 a 5 tvoří minoritní hydrofilní doménu nesoucí negativní náboj. Hydrofóbní aminokyselinové zbytky se nacházejí v pozici 2, 3, 4, 6 a 7. Kterýkoli izolát surfaktinu je vždy směsí jeho různých isoform, tzn. že v jednom extraktu se vyskytuje několik peptidických variant (BONMATIN *et al.* 2003, KOWALL *et al.* 1998) s různou délkou alifatického řetězce mastné kyseliny (HUE *et al.* 2001).

Díky cyklickému uspořádání peptidické části molekuly, chirální sekvenci a příznivým intramolekulárním interakcím je topologie surfaktinu kompaktní. Surfaktin jak ve vodném prostředí, tak na rozhraní voda/vzduch vytváří stabilní β -list podobající se jezdeckému sedlu (ISHIGAMI *et al.* 1995). Prostorová topologie tvořící strukturu β -listu je zřejmě zodpovědná za povrchovou aktivitu této sloučeniny.

Trojrozměrná struktura surfaktinu (Obr. 2) byla popsána technikami ^1H NMR (BONMATIN *et al.* 1995). Studium 3D struktury odhalilo, že na jedné straně jsou aminokyselinové zbytky 2 a 6 otočeny k sobě navzájem, a to v blízkosti postranních řetězců Glu-1 a Asp-5, které tvoří minoritní polární doménu. Na protější straně je zbytek 4 otočen k připojení lipidického řetězce a tvoří spolu s ním majoritní hydrofóbní doménu, která v menší míře zahrnuje i postranní řetězce zbytků 3 a 7. Lipidový řetězec je pod hranicí kritické micelární koncentrace volně rozprostřen v prostoru, ale nad touto hodnotou se účastní intermolekulárních hydrofóbních interakcí v supramolekulárních strukturách jako jsou micely nebo oligomery. Lipofilní strana představuje vhodný povrch, který se také účastní interakcí s jinými lipidy a lipopeptidy. Z tohoto modelu tedy vyplývá, že rozpustnost a povrchová aktivita surfaktinu závisí na správném rozmístění a orientaci aminokyselinových zbytků tvořících obě příslušné domény.

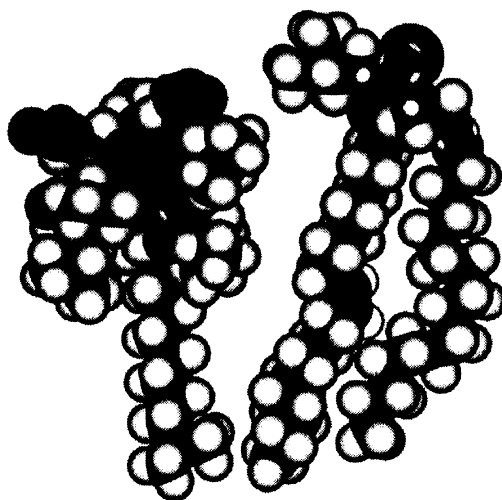


Obr. 2 Trojrozměrná struktura peptidické části surfaktinu

Aminokyselinové zbytky jsou očíslovány číslicemi 1 – 7. Světle šedá - hydrofóbní zbytky 2, 3, 4, 6 a 7 a připojení lipidického řetězce. Tmavě šedá a černá – acidické zbytky 1 a 5 (PEYPOUX *et al.* 1999).

Určení specifické trojrozměrné struktury surfaktinu představuje důležitou strategii pro objasnění strukturálních základů jeho aktivity, a tedy i nástroj, jak ji zlepšovat. Speciální prostorové uspořádání tohoto lipopeptidu souvisí s přítomností cyklického peptidu s chirální sekvencí a β -hydroxy mastné kyseliny. I když je cyklizací konformační

prostor redukován, jsou tyto molekuly flexibilní a mohou v roztoku nabývat v sebe přecházející konformace (VOLPON *et al.* 1999).



Obr. 3 Lipopeptid surfaktin a fosfolipid

Srovnání molekuly surfaktinu (vlevo) s molekulou fosfolipidu (vpravo).

2.1.2 Přehled aktivit

Surfaktin narušuje integritu membrány (BERNHEIMER a AVIGAD 1970). Silný destabilizační efekt na membránu je dán amfifilní povahou surfaktinu – nabitě postraní řetězce jsou orientovány do vodné fáze a nepolární rezidua jsou nasměrována do hydrofóbního jádra membrány. Surfaktin destabilizuje a permeabilizuje membránu v koncentracích mnohem nižších než je CMC (HEERKLOTZ a SEELIG 2001). Penetrace membrány je usnadňována přítomností kationtů (MAGET-DANA a PTAK 1995), ale je také závislá na koncentraci surfaktinu. Při nízkých koncentracích je surfaktin mísitelný s fosfolipidy, a to díky konformačním změnám peptidového cyklu při střetu s molekulou lipidu, ke které má afinitu, a tvoří s nimi směsné micely. Limitní poměr surfaktin – lipid potřebný pro iniciaci solubilizace membrány je $\approx 0,22$ mol surfaktinu/mol lipidu. Při středních hodnotách koncentrací se začínají tvořit ve fosfolipidové dvojvrstvě supramolekulární struktury nebo kanály, které jsou volně prostupné pro kationty (GRAU *et al.* 1999). Při vysokých koncentracích převáží detergentový účinek surfaktinu, což vede k disrupci membrány.

In vitro způsobuje inkorporace surfaktinu do membrány silnou dehydrataci fosfolipidových polárních hlav. Lokální dehydratace výrazně narušuje stabilitu dvojvrstvy. Surfaktin také silně interaguje s acylovými řetězci fosfolipidů, což vede k fluidizaci apolární části dvojvrstvy a tím k porušení bariérové vlastnosti membrány. Takovéto strukturální fluktuace mohou představovat primární efekt účinku surfaktinu jako antibiotika. Pro destabilizaci a permeabilizaci membrány je nutná přítomnost minimálně dimerů surfaktinu (CARRILLO *et al.* 2003).

Způsob interakce surfaktinu s uměle připravenými membránami závisí na lipidovém složení dvojvrstvy a na koncentraci lipopeptidu. Surfaktin penetruje do membrány pomocí hydrofóbních interakcí, čímž ovlivňuje uspořádání uhlovodíkových řetězců a sílu membránové dvojvrstvy. Poté, co dojde ke kolizi, nastane konformační změna peptidického cyklu, která usnadní proces interakce. Při nižších koncentracích vytváří surfaktin domény segregované v rámci fosfolipidových jedno- a dvojvrstev, což může přispívat k utváření porů prostupných pro ionty (DELEU *et al.* 1999). Při vysokých koncentracích převáží detergentový účinek. Afinita surfaktinu k lipidům a schopnost interakce s membránou obecně vysvětluje mimo jiné jeho hemolytické účinky. Surfaktin má rovněž silnou tendenci interagovat s makromolekulami, což se uplatňuje i při desintegraci virových kapsid (KIM *et al.* 1998).

Surfaktin má také schopnost vázat a přenášet jedno- a s vyšší účinností dvojmocné kationty skrz organickou bariéru (THIMON *et al.* 1993). Jak je zřejmé z Obr. 2, acidické skupiny (1 a 5) tvoří jakési klepato, do kterého se dvojmocný kationt může velmi snadno uchytit. Selektivní afinita pro dvojmocné kationty je dána tím, že způsobují úplnou neutralizaci kyselých zbytků a monovalentní kationty jako je Na^+ a K^+ pouze neutralizaci částečnou (MAGET-DANA a PTAK 1992). Fyziologickým následkem vychytávání dvojmocných kationtů je také inhibice aktivity cAMP fosfodiesterázy (HOSONO a SUZUKI 1983).

Aktivity surfaktinu jsou závislé na pH – s rostoucím pH se účinky zvyšují, naopak při pH 5,0 jsou jeho účinky i syntéza významně redukovány (COSBY *et al.* 1998). Nejvyšší aktivitu naopak vykazuje při pH 13,5 (MORIKAWA *et al.* 2000).

Ionizovaný surfaktin váže ionty Ca^{2+} v poměru 1:1 a vzniká tak jakýsi komplex, kde kationt Ca^{2+} vytváří intramolekulární můstek mezi dvěma acidickými zbytky peptidického cyklu. Tento stabilizační účinek vápníkových iontů na konformaci surfaktinu

vede k důležitým změnám v chování celého lipopeptidu, který se tak stává aktivnější (OSMAN *et al.* 1998). Lipopeptid nabývá větší povrchovou aktivitu a je insertován hlouběji do membrány (GRAU *et al.* 1999). Vytváření komplexů může také souviset s vlastností lipopeptidu jako iontového nosiče.

Z hydrofóbních postranních řetězců hraje významnou roli zbytek č. 4 – jestliže je L-Val 4 nahrazen L-Ile 4, dojde ke dvojnásobnému poklesu CMC a k podstatnému zvýšení stability na rozhraní voda/vzduch. Pokud jde o délku řetězce mastné kyseliny, vyšší povrchová aktivita byla zjištěna u isoformy surfaktinu C14, zatímco u převažující varianty C15 byly popsány silnější antivirové a hemolytické účinky. Tyto vlastnosti se navíc ještě znásobují, jestliže peptidový prstenec obsahuje pouze jeden negativní náboj a obráceně, když je karboxylová skupina nahrazena silným negativním nábojem, povrchová aktivita surfaktinu vymizí (MORIKAWA *et al.* 2000). Nárůst afinity k Ca^{2+} iontům indukovaný náhradou L-Leu 2/L-Ile 2 je připisován modifikaci stérické překážky postranních řetězců, která upřednostňuje přístup karboxylových skupin ke kationům (BONMATIN *et al.* 2003).

2.1.3 Syntéza surfaktinu

Schopnost syntetizovat lipopeptid surfaktin je vlastní nejen asi dvaceti kmenům bakterie *B. subtilis*, ale i dalším druhům tohoto rodu jako je *B. pumilus*, *B. licheniformis* a *B. amyloliquefaciens*. Syntéza se uskutečňuje stejně jako i u jiných peptidových sekundárních metabolitů bakterií neribosomální cestou. Již v 70. letech bylo zjištěno, že cyklické peptidy *Bacillus* spp. jako je gramicidin S a tyrocidin jsou produkovány bez účasti nukleové kyseliny pomocí velkých multienzymatických komplexů podobným syntetázám mastných kyselin (LIPMAN *et al.* 1971). Později byl tento způsob syntézy pomocí takovýchto enzymatických komplexů využívajících mnohonásobného templátového nosiče popsán i u jiných peptidických produktů a tyto komplexy byly pojmenovány jako neribosomální peptidické syntetázy (Non-Ribosomal Peptide Synthetases, NRPSs) (WALSH 2003). Pro tyto multienzymatické komplexy katalyzující postupnou kondenzací peptidu je typické, že se jejich substráty neomezují pouze na 20 základních aminokyselin, ale jsou schopné inkorporovat a postsynteticky modifikovat stovky stavebních jednotek. Běžnými příklady může být využívání aminokyselin nevyskytujících se v proteinech, D-izomery aminokyselin, karboxylové kyseliny, N-methylované zbytky, heterocykly a

mastné kyseliny. Časté jsou také postsyntetické modifikace jako jsou glykozylace a oxidace pomocí enzymů asociovaných s NRPS (SIEBER A MARAHIEL 2003).

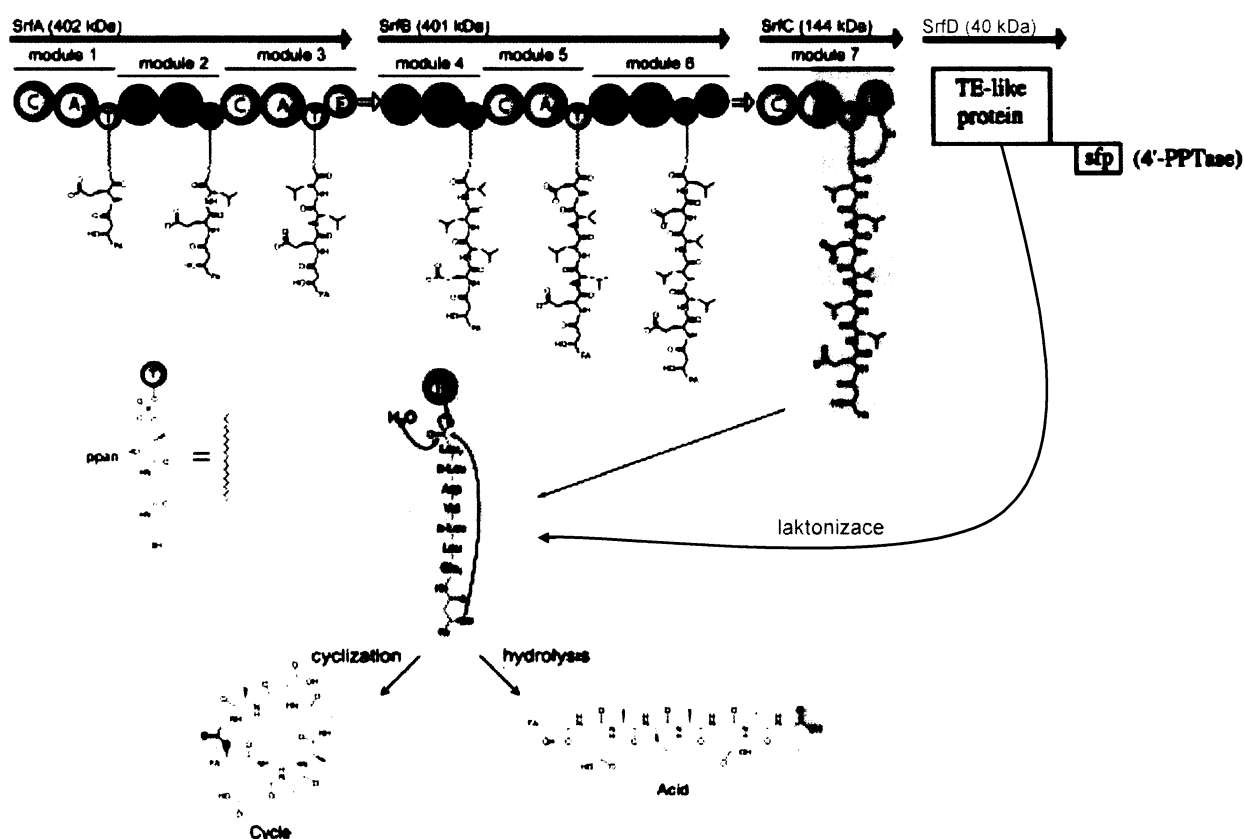
2.1.3.1 Surfaktin syntetáza

Studium biosyntézy surfaktinu bylo započato prací KLUGE *et al.* (1988), kde byla surfaktin syntetáza popsána jako komplex tvořený multienzymatickými thiotempláty katalyzujícími syntézu surfaktinu neribosomální cestou. Schéma biosyntézy je založeno na konceptu mnohonásobného nosiče představovaného 4'-fosfopantetheinovým kofaktorem (phosphopantethein, ppan), který funguje jako výkyvné rameno sloužící jako akceptor rostoucího peptidického řetězce a donor peptidu pro další aminokyselinu vázanou v templátové sekvenci thiolesterovou vazbou. Sedm aminokyselin tvořících heptapeptid je aktivováno ATP-dependentní adenylací a poté jsou kovalentně připojeny karboxylthiolesterovou vazbou k jednotlivým enzymatickým modulům (NAKANO a ZUBER 1990, VATER *et al.* 1997).

Surfaktin syntetáza je cytoplazmatický supramolekulární komplex skládající se ze čtyř enzymatických podjednotek. Tři z nich jsou enzymy SrfA (E_{1A} , 402 kDa), SrfB (E_{1B} , 401 kDa) a SrfC (E_2 , 144 kDa), které tvoří dohromady sedm modulů zahrnujících celkem 24 katalytických domén. Posledním proteinem komplexu je SrfD (E_3 , 40 kDa). Každý z modulů je zodpovědný za specifickou inkorporaci jednoho určitého substrátu do rostoucího heptapeptidového řetězce (PEYPOUX *et al.* 1999). Na N-konci se nachází iniciační modul, který specificky rozpoznává a aktivuje N-terminální aminokyselinu budoucího peptidu. Všechny chemické reakce nutné pro zabudování a úpravu každého substrátu jsou zajišťovány katalyticky nezávislými doménami daného modulu.

Prvním krokem biosyntézy (Obr. 4) je rozpoznání a aktivace substrátu adenylační doménou (doména A, asi 550 aminokyselin) (CONTI *et al.* 1997). Analogicky s aminoacyl-tRNA syntetázou katalyzuje doména A aktivaci substrátu na aminoacyladenylát za Mg^{2+} dependentní hydrolýzy ATP a uvolnění pyrofosfátu (DIECKMANN *et al.* 1995). V dalším kroku je aminoacyladenylátový intermediát přenesen na volnou thiolovou skupinu fosfopantetheinového (ppan) kofaktoru, který je připoután k thiolové doméně (doména T neboli peptidyl carrier protein, asi 80 aminokyselin) ležící po proudu od domény A (WEBER *et al.* 2000). Intermediáty navázané na flexibilní ppan kofaktor

mohou být přeneseny k dalším doménám, kde probíhají následné katalytické reakce. Vznik peptidické vazby mezi dvěma sousedními substráty je katalyzován kondenzační doménou (doména C, cca. 450 aminokyselin), která leží mezi doménami A a T dvou přilehlých modulů (KEATING *et al.* 2002). Doména C katalyzuje nukleofilní atak aminokyseliny na po proudu ležící doméně T na volnou α -amino skupinu intermediátu navázaného na doméně T předešlého modulu (BELSHAW *et al.* 1999).



Obr. 4 Syntéza surfaktinu

Komplex surfaktin syntetázy se skládá ze 24 individuálních domén katalyzujících 24 chemických reakcí – aktivace (doména A), vznik kovalentní vazby (doména T), elongace (doména C), epimerizace (doména E) a uvolnění produktu z komplexu (doména TE). Každý z modulů inkorporuje do rostoucího peptidického řetězce právě jednu určitou aminokyselinu. Peptidický řetězec je k multienzymatickému komplexu kovalentně vázán pomocí ppan kofaktoru. Syntéza se uskutečňuje směrem od N- k C-konci (PEYPOUX *et al.* 1999, SIEBER a MARAHIEL 2003).

Při iniciační reakci syntézy surfaktinu je na první aminokyselinu v řadě (glutamát) již připojen řetězec mastné kyseliny aktivované do formy koenzymu A. Tohoto kroku se účastní nízkomolekulární protein SrfD. Přenáší tedy β -hydroxy mastnou kyselinu ke startovací aminokyselině biosyntézy, aktivované L-Glu, na podjednotce SrfA. Tento

enzym mimo acyltransferázové aktivity funguje také jako samostatná externí thioesteráza označována jako SrfTE-II. Surfaktin může být syntetizován i bez činnosti tohoto enzymu, ale za přítomnosti SrfD je syntéza výrazně (dvoj- až pětinasobně) stimulována (STELLE *et al.* 2004). Externí thioesterázy jakou je SrfD se mohou účastnit i proofreadingové aktivity (SCHWARZER *et al.* 2002).

Podjednotky SrfA a SrfB zajišťují elongaci iniciačního produktu za součinnosti série štěpení thioesterových vazeb a transpeptidázových reakcí. Nakonec podjednotka SrfC katalyzuje kondenzaci sedmého aminokyselinového zbytku (leucin) a uvolnění vzniklého lipopeptidu z proteinového komplexu (PEYPOUX *et al.* 1999). Tato reakce je zajišťována thioesterázovou doménou (TE-I, asi 280 aminokyselin) fúzovanou se SrfC podjednotkou. Uvolnění lipopeptidu se uskutečňuje buď hydrolyzou za vzniku lineární formy, nebo stereospecifickou cyklizací za vzniku makrolaktonu (intramolekulární nukleofilní atak β -hydroxylové skupiny mastné kyseliny) (BRUNER *et al.* 2002, TSENG *et al.* 2002).

Vedle domén A, T a C obsahuje komplex surfaktin syntetázy navíc další epimerizační doménu E (asi 450 aminokyselin), která katalyzuje racemizaci aminokyselin navázaných na doménu T. Následující doména C inkorporuje do rostoucího peptidového řetězce pouze D-izomery (LINNE a MARAHIEL 2000). V rámci surfaktin syntetázy se nacházejí dvě epimerizační domény (v modulech 3 a 6) a jsou zodpovědné za racemizaci L-Leu. Kombinace L a D aminokyselin je nositelem unikátní konformace, která je důležitá pro specifickou interakci surfaktinu s buněčnými cíly.

Mechanismus exkrece surfaktinu není zcela znám. Jelikož zatím nebyl nalezen žádný aktivní transportér pro tento lipopeptid, předpokládá se, že surfaktin pasivně difunduje skrz cytoplazmatickou membránu (TSUGE *et al.* 2001).

2.1.4 Biosyntetické geny a regulace syntézy

Všechny geny zajišťující biosyntézu antibiotik zaujímají asi 350 kb. U *B. subtilis* činí průměrná velikost genetické informace pro produkci antibiotik asi 4-5% jeho genomu.

Uspořádání jednotlivých proteinů surfaktin syntetázy reflektuje i chromosomální uspořádání jejich genů. Oproti jiným bakteriálním peptidickým syntetázám, u kterých se uplatňuje tzv. pravidlo kolinearity (tzn. pořadí domén na chromosomu odráží jejich funkční hierarchii), však pro správnou funkci celého systému není důležité pořadí jeho genů v DNA, ale spíše proteinové interakce jednotlivých domén a podjednotek (GUENZI *et al.* 1998).

Komplex surfaktin syntetázy je kódován inducibilním operonem *srfA* (25 kb), který je mimo jiné zodpovědný i za sporulaci a vznik kompetence (HAMOEN *et al.* 1994). Obsahuje čtyři modulární čtecí rámce ORF1 (*srfA-A*), ORF2 (*srfA-B*), ORF3 (*srfA-C*) a ORF4 (*srfA-D*) kódující čtyři proteiny enzymatického komplexu. Dvě nukleotidové sekvence pro L-Leu epimerázy se nacházejí na 3' straně genů *srfA-A* a *srfA-B*. Na konci genu *srfA-C* leží oblast kódující thioesterázu, která je homologní s typem I thioesteráz mastných kyselin. Další thioesteráza kódovaná genem *srfA-D* nese větší sekvenční homologii s thioesterázami typu II vyskytujícími se v savčích buňkách.

Esenciálním genem pro produkci surfaktinu je *sfp* ležící 4 kb po proudu od *srfA* operonu (NAKANO *et al.* 1992). Kódovaný enzym tvořený polypeptidem obsahujícím 224 aminokyselin patří do nadrodiny 4'-fosfopantetheinas (fosfopantethein transferáza, ppan), které mají funkci primerů neribosomálně syntetizovaných peptidů. Další úlohou *Sfp* je, že konvertuje inaktivní apofornu surfaktin syntetázy do aktivní holoforny (LAMBALOT *et al.* 1996). Tento krok spočívá v posttranslační modifikaci proteinem *Sfp*, který naváže na domény T každého ze sedmi modulů fosfopantetein. Každý z modulů je poté schopen navázat specifickou aminokyselinu, která je posléze inkorporována do budoucího heptapeptidu (QUADRI *et al.* 1998). *Sfp* má vedle funkce v biosyntéze surfaktinu také regulační funkci – snižuje transkripci operonu *srfA* (WALSH *et al.* 1997). Nadprodukce *Sfp* vede k represí *srfA* transkripce a redukci produkce surfaktinu (NAKANO *et al.* 1992).

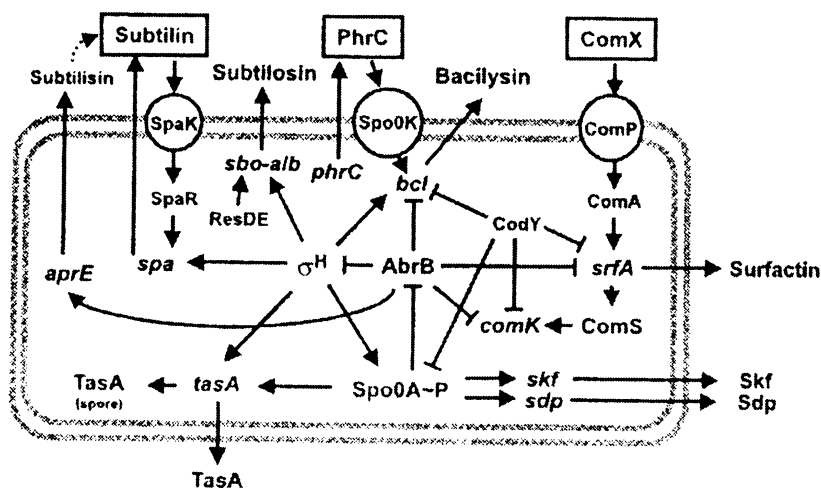
Práce o regulaci produkce surfaktinu jasně ukazují, že jeho biosyntéza je stejně jako u jiných antibiotik koregulována s dalšími fenomény indukovanými přechodem do stacionární fáze jako je vznik stavu kompetence. Oba systémy jsou součástí mechanismů zajišťujících přežívání buněk *B. subtilis* za podmínek nedostatku živin (N a C) a možná i jiných environmentálních stresů, tedy před tím, než si buňka vybere poslední možnost – začít sporulovat. Přirozená kompetence je definována jako schopnost příjmu cizorodé DNA z prostředí. Gen *comS* účastní se vzniku kompetence u *B. subtilis* leží v oblasti genu *srfA*. Exprese genu *srfA* i *comS* je regulována pomocí komplexní sítě řídicí buněčnou

diferenciaci, včetně mechanismu quorum sensing (tj. regulace závislá na hustotě buněk v prostředí) spouštěného akumulací extracelulárního proteinu (feromonu) ComX a dvoukomponentovým regulačním systémem ComPA (HAMOEN *et al.* 2003, JULKOWSKA *et al.* 2005). Pro udržení dostatečné hustoty buněk je nutný rychlý buněčný růst a dělení, ke kterému je zapotřebí vysoká intracelulární koncentrace K^+ (KINSINGER *et al.* 2005).

Exprese operonu *srfA* je indukována na konci exponenciální fáze růstu a je řízena globálními regulačními mechanismy ComP-ComA a Spo0A-AbrB, které vnímají a reagují na nutriční stres a ovlivňují expresi řady genů. Gen *comA* je jedním z časných genů nutných pro vznik stavu kompetence buňky. Mutace v genu *comA* blokuje nejen vznik kompetence, ale také činí *sfp*⁺ buňky surfaktin negativními (NAKANO a ZUBER 1989). Produkt genu *comA* je response regulátorem dvoukomponentového systému ComP-ComA. Aktivita proteinu ComA je regulována histidinovou protein kinázou ComP, která má funkci membránového sensoru (NAKANO *et al.* 1991). Kináza ComP fosforyluje protein ComA, který poté nabývá vazebnou aktivitu přímo k promotoru *srfA*, kde působí jako pozitivní regulátor transkripce v návaznosti na úroveň hladiny glukosy a glutaminu v médiu (MARAHIEL *et al.* 1993). Dalším důležitým proteinem tohoto systému je ComB, který může hrát roli v přenosu signálu od sensorového proteinu k transkripčnímu faktoru ComA. Negativní účinek *comB* mutace však může být vyrovnán, pokud jsou buňky diploidní v genu *comA* (WEINRAUCH *et al.* 1989).

Je-li do živného média přidána glukosa, uskutečňuje se exprese operonu *srfA* nezávisle na *comP*, ačkoliv je stále zapotřebí *comA*. Tento způsob řízení transkripce *srfA* vyžaduje geny *spo0* operonu *spo0A*, *spo0B*, *spo0F* a *spo0K*. Pro aktivaci *srfA* jsou tedy potřeba dva response regulátory, které buď přímo nebo nepřímo interagují se *srfA*. V případě *spo0A* je možné, že je vyžadován k aktivaci exprese genu kódujícího jinou sensorovou kinázu, která fosforyluje ComA, nebo může Spo0A nějakým způsobem interagovat s ComA a tvořit s ním heterodimer.

Také další proteiny ze skupiny response regulátorů PerR a DegU mají vliv na expresi *srfA*. PerR je represorem několika genů regulonu oxidativního (H_2O_2) stresu, ale má také schopnost vázat se přímo do promotorové oblasti operonu *srfA* a stimulovat jeho expresi. Při H_2O_2 stresu je PerR inaktivován, a tím je exprese *srfA* inhibována (HAYASHI *et al.* 2005). Hyperfosforylace DegU, který řídí produkci exoenzymů, také reprimuje *srfA* (MARAHIEL *et al.* 1993).



Obr. 5 Regulační síť biosyntézy antibiotik u *B. subtilis*

Regulační síť biosyntézy antibiotik *B. subtilis* subtilinu, subtilosinu, bacilysinu a surfaktinu. Látky mající povahu feromonu jsou orámovány, membránově vázané histidinové kinázy jsou v kroužku. Pozitivní a negativní regulace genové exprese je zobrazena šipkami → a —.

Rezistence na surfaktin se u produkčního kmene účastní gen **yerP**, který je prvním popsaným zástupcem RND (Resistance, Nodulation and Cell Division, RND) rodiny multidrogových efluxních pump u grampozitivních bakterií. Kmeny postrádající tento gen vykazují závažnou inhibici růstu již při koncentraci surfaktinu 100 µg/ml. Exprese yerP je spojena s růstovou fází buňky, maximální hladiny dosahuje na konci logaritmické fáze růstu, a naopak není závislá na vně přítomném surfaktinu. Surfactin je však produkován i v yerP deficientních buňkách a tyto buňky přežívají až koncentrace 10 000 µg/ml. Tento fakt ukazuje, že musí existovat ještě jiný mechanismus pro eflux surfaktinu z buňky (TSUGE *et al.* 2001).

2.1.5 Vliv kultivačních podmínek na produkci surfaktinu

Studie minerálních požadavků jasně ukazují, že železo a mangan mají významný stimulační vliv na produkci surfaktinu (COOPER *et al.* 1981). Přítomnost železa v mM koncentracích zvyšuje produkci surfaktinu až na 3500 mg/l (WEI a CHU 1998, WEI *et al.* 2003). Pro kontinuální kultivace stanovený kritický obsah N-Fe-Mn v molárním poměru 920 : 7,7 : 1,0 je schopen udržet produkci surfaktinu po nejméně 36 generací (SHEPPARD a COOPER 1991).

Při kultivaci v definovaném médiu s dusičnanem amonným jako zdrojem dusíku za podmínek, kdy je využíván nitrát, je produkce surfaktinu nejvyšší. K utižování nitrátu dochází za aerobních podmínek, když je vyčerpán zdroj amoniaku, nebo za růstu v anaerobiose, kdy je nitrát využíván, i když je přítomen amoniak. Zdá se, že *B. subtilis* ATCC 21332 vyžaduje organický zdroj dusíku nejen pro svůj růst, ale i pro přepnutí na sekundární metabolismus. Nízké výtěžky surfaktinu byly dosaženy v kulturách, kde nebyl využíván žádný nitrát (DAVIS *et al.* 1999).

Efektivními zdroji uhlíku mohou být glukosa, sacharosa i fruktosa, naopak v přítomnosti glycerolu je syntéza surfaktinu významně redukována. Na rozdíl od jiných biosurfaktantů nepodléhá biosyntéza surfaktinu stimulačnímu vlivu hexadekanu. Dostupnost různých aminokyselin také nijak významně neovlivňuje produkci surfaktinu (SANDRIN *et al.* 1990).

Na rozdíl od jiných sekundárních metabolitů rodu *Bacillus*, jejichž produkce je indukována při vyčerpání esenciálních zdrojů živin, produkce surfaktinu je indukována v aktivně rostoucích buňkách v postexponenční fázi. Kompetice s buněčným růstem je pravděpodobně jedním z důvodů nízkých výtěžků surfaktinu. Při limitaci kyslíkem, která přesměruje tok energie směrem k syntéze sekundárních produktů, dochází až k desetinásobnému navýšení produkce. Pomocí UV mutagenese byla připravena mutanta kmene *B. subtilis* ATCC 21332, která má 30krát nižší aktivitu isocitrát dehydrogenázy Krebsova cyklu a produkuje 4krát více surfaktinu než rodičovský kmen (de ROUBIN *et al.* 1989). Snížení aktivity tohoto enzymu může být dosaženo také právě limitací kyslíkem nebo přidáním citrátu do produkčního média. Bylo prokázáno, že když se sníží oxidativní procesy buňky, koncentrace surfaktinu vzroste. Tyto výsledky ukazují, že produkce surfaktinu může podléhat kontrolním mechanismům jako je dostupnost kyslíku, rychlost utižování zdrojů uhlíku a jiným faktorům ovlivňujícím produkci lipopeptidů (MULLIGAN a GIBBS 1993).

2.1.6 Fyziologická úloha surfaktinu

Zátěž bakteriální buňky spojená s produkcí antibiotik, jakým je i surfaktin, je obrovská. Především uvědomíme-li si, že většina biosyntézy antibiotik je regulována společně s jinými hladováním indukovanými buněčnými aktivitami jako je sporulace, vznik stavu kompetence a produkce extracelulárních degradativních enzymů (KATZ a DEMAIN 1977). Je proto tedy nemyslitelné, že by se spleť reakcí biosyntézy antibiotik v přírodě udržovaly aniž by přinášely jakoukoli výhodu pro produkující organismus. Současně je velmi nepravděpodobné, že by všechny tyto látky měly stejnou funkci. Zdá se, že tyto sloučeniny hrají roli v různých fyziologických procesech. Je však nutné podotknout, že role biosurfaktantů pro produkční organismus není dosud plně objasněna.

Zdá se, že druh *Bacillus subtilis* má v rámci rodu *Bacillus* s ohledem na potenciál produkovat tolik druhů antibiotik výjimečné postavení. Také jiné druhy tohoto rodu jako je *B. brevis* (brevistin, gramicidin, tyrocidin) nebo *B. amyloliquefaciens* produkují některá antibiotika, ale v porovnání s *B. subtilis* se jedná o počet mnohem nižší. Menší je také poměrné zastoupení těchto druhů oproti *B. subtilis* v přírodních izolátech z půdy. Tento fakt vede snadno ke spekulacím, že je to právě důsledkem výhody udílené producentům těchto sloučenin (KOUMOUTSI *et al.* 2004).

Lipopetidy jakým je i surfaktin patří k nejčastěji produkováným typům antibiotik u *B. subtilis*. Pro tuto skupinu látek byly navrženy některé možné funkce: tyto surfaktanty zvyšují dostupnost a využitelnost hydrofóbních ve vodě nerozpustných zdrojů uhlíku a také mají vliv na adhezi bakterií na různé povrchy. Bakteriální povrchově aktivní látky hrají také roli v pohybu bakterií (tzv. gliding a swarming motility) a v mezibuněčných interakcích. Důležitá je i jejich biocidní aktivita a schopnost smáčet povrchy (ROSENBERG a RON 1999). Je velmi snadné si představit, že tyto vlastnosti by mohly významně přispívat k přežití *B. subtilis* v jeho přirozeném životním prostředí v rhizosféře půdy.

Surfaktin se také uplatňuje při vytváření biofilmů. Biofilmy jsou vysoce strukturované mikrobiální komunity, které adherují na povrchy. Vytváří je většina bakterií ve většině přirozených i patogenních ekosystémech (STANLEY a LAZAZZERA 2004). Buněčná pohyblivost v rámci kolonií, swarming, zahrnuje diferenciaci vegetativních buněk v hyperflagelované hemžící se buňky, které procházejí koordinovanou populační migrací

po pevných površích. Tento způsob pohybu je však u *B. subtilis* striktně vázán na produkci surfaktinu (KINSINGER *et al.* 2003). Kmen *B. subtilis* 168, který surfaktin nesyntetizuje, vykazuje menší swarming aktivitu, a to co do vzhledu kolonie, tak i rychlosti kolonizace povrchů. Produkce surfaktinu nejenže zajišťuje vhodnou úpravu fyzikálních vlastností povrchu pro šíření kolonie bez účasti bičíku, ale také způsobuje agregaci buněk do dendritů a koordinuje jejich rychlý postup na čele kolonie. Regulace produkce surfaktinu a udržování jeho optimální hladiny hraje tedy důležitou roli u tohoto typu pohybu bakterií (JULKOWSKA *et al.* 2005).

Tvorba biofilmů je u *B. subtilis* závislá na transkripčních faktorech Spo0A, σ^H a AbrB (BRANDA *et al.* 2004). Jelikož se tyto transkripční faktory účastní i regulace biosyntetické dráhy surfaktinu, je zřejmé, že produkce antibiotik a vznik biofilmů jsou neodmyslitelně spojeny. Bylo popsáno, že kolonizace rostlinných kořenů bakterií *B. subtilis* je spojena s produkcí surfaktinu a vznikem biofilmů. Surfaktin přitom navíc rostlinu chrání proti infekci patogenní bakterií *Pseudomonas syringe* (BAIS *et al.* 2004). Úzká souvislost mezi produkcí antibiotik a formací biofilmů spolu s pozorováním, že povrchově aktivní rhamnolipidy ovlivňují utváření biofilmů *Pseudomonas aeruginosa* (DAVEY *et al.* 2003) naznačuje, že propojení biofilmů a produkce antibiotik a surfaktantů je rozšířenějším fenoménem, než se dříve předpokládalo. Surfaktin má také schopnost inhibovat tvorbu biofilmů jiných bakterií (BAIS *et al.* 2004), mezi které patří i lidský patogen *Salmonella enterica* (MIRELES *et al.* 2001). Antimikrobiální a fungicidní účinky lipopeptidů včetně surfaktinu mohou být velmi výhodnými vlastnostmi pro *B. subtilis* v rámci kompetice s jinými druhy v daném habitatu.

Spekulace, že sekundární metabolity peptidické povahy hrají zásadní roli v buněčné diferenciaci, byla podpořena pozorováním, že většina, ne-li všechna peptidická antibiotika, jsou produkována v postexponenciální fázi růstu a za podmínek, které vyvolávají iniciaci sporulace. Látky, které reprimují sporulaci také potlačují syntézu antibiotik. Mutanty s blokovanou sporulací antibiotika vůbec neprodukují (MAJUMDAR *et al.* 1986). Existuje také možnost, že malé peptidy jsou vyžadovány pro iniciaci sporulace rodu *Bacillus* (GROSSMAN a LOSSICK 1988).

Bylo také popsáno, že proces sporulace je úzce spojen se vznikem vysoce strukturovaných buněčných shluků, které asociují s povrchy. Jedná se o tzv. plodonosná tělíska (fruiting bodies), která mají charakteristickou sporově specifickou genovou expresi (BRANDA *et al.* 2001). Formace těchto tělísek se u *B. subtilis* účastní tři geny – yveQ a

yeR kódující enzymy pro biosyntézu exopolysacharidů a gen *sfp* pro ppan transferázu. *Sfp* má schopnost modifikovat surfaktin syntetázu, a tak se jeho vliv na vznik fruiting bodies uskutečňuje nejpravděpodobněji skrze produkovanou povrchově aktivní látku surfaktin (STEIN 2005).

V posledních letech se stává nezpochybnitelnou skutečností, že jednobuněčné mikroorganismy vykazují sofistikované sociální chování. Buňky *B. subtilis* žijí ve složitých komunitách, ve kterých je koordinována jejich genová exprese a chování celé skupiny pomocí různých způsobů založených na mechanismu quorum sensing (SHAPIRO 1998). Kolektivní buněčná smrt určité subpopulace může být chápána jako prostředek zajišťující přežití zbylých nepoškozených a/nebo lépe adaptovaných buněk. Tento mechanismus by mohl být jedním z možných vysvětlení, proč většinou sporulace a produkce antibiotik spolu souvisejí (KATZ a DEMAINE 1977). Ačkoliv produkce antibiotik nemusí být nutně spojena se sporulací, biosyntéza některých antibiotik je regulována faktory společnými i pro proces sporulace. Je pravděpodobné, že antibiotika pod kontrolou *AbrB* faktoru, který se indukuje ve *Spo0A* aktivních buňkách (např. subtilin, subtilosin, surfaktin), také účinkují proti nesporulujícím sesterským buňkám, které jsou *Spo0A* neaktivní. Je tedy zřejmé, že určité skupiny antibiotik a látek antibiotické povahy produkované *B. subtilis* hrají zásadní roli ve vývoji společenství a přispívají k přežití *B. subtilis* v jeho přirozeném životním prostředí v půdě (STEIN 2005).

Téměř všechny bakterie jsou ve svém přirozeném životním prostředí pokryty extracelulárními polymery. V rámci odpovědi bakterie na různé environmentální stresy nebo změny mohou být tyto sloučeniny uvolněny z povrchu bakterie, což vede ke změně hydrofilních/hydrofóbních vlastností jejich membrány. Tyto látky tedy mohou být považovány za determinanty zodpovědné za regulaci hydrofobicity bakteriálního povrchu. Bylo prokázáno, že adherované bakterie deadherují z biofilmů právě tím, že mění hydrofobicitu svého povrchu (AHIMOU *et al.* 2000). Mimo to mohou být bakteriální povrchově aktivní látky vhodnými kandidáty na prostředky chemické komunikace, které ovlivňují interakci jiných bakterií s povrchy (NEU 1996).

Jak již bylo zmíněno, produkce antibiotik zvyšuje schopnost kompetice produkujícího organismu v prostředí (ZUBER *et al.* 1993). Surfaktin inhibuje vývoj vzdušného mycelia a spor *Streptomyces coelicolor* a je naopak vyžadován pro vznik vzdušných struktur na povrchu kolonií *B. subtilis*. Tato pozorování podporují myšlenku, že surfaktanty mají specifickou funkci pro daný organismus a tím mu udílejí podstatnou

výhodu v kompetici o zdroje a při kolonizaci povrchů (STRAIGHT *et al.* 2006). Tyto speciální metabolity mohou také sloužit jako intercelulární signály, které způsobují, že se populace bakterií chová jednotně v rámci odpovědi na environmentální stimulus (WILLEY *et al.* 1991).

2.1.7 Potenciální komerční využití

2.1.7.1 Využití surfaktinu v průmyslu

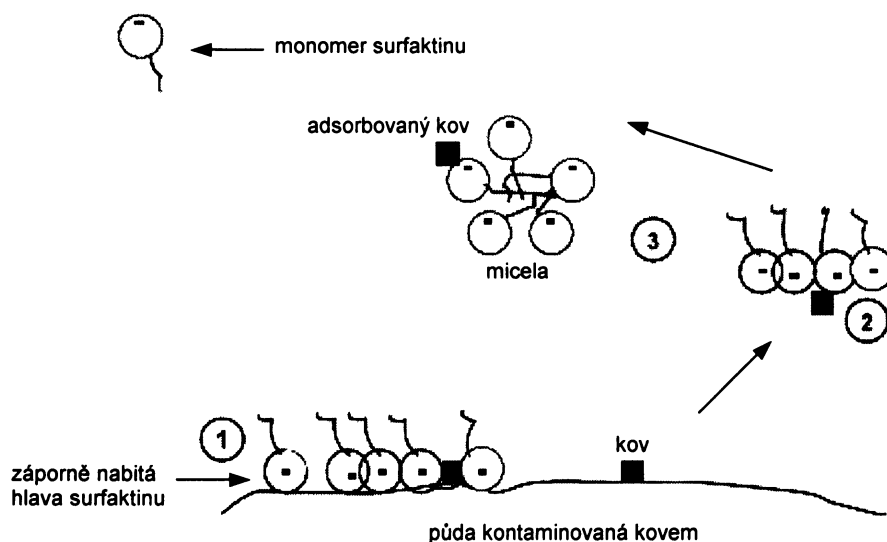
Průmysl surfaktantů je v posledních letech na velikém vzestupu a množství produkce surfaktantů velmi stoupá. V podstatě jsou ale všechny využívané surfaktanty syntetizovány chemicky. Nicméně zájem se začíná směřovat na biosurfaktanty, a to díky široké škále jejich biologických aktivit, biodegradabilitě, nízké toxicitě oproti chemickým variantám a účinnosti i za extrémních teplot a pH (CAMEOTRA a MAKKAR 1998). Komerční využití biosurfaktantů je však limitováno jejich vysokou cenou. Náklady na produkci biosurfaktantů jsou 3 – 10krát vyšší než u surfaktantů syntetizovaných chemicky (MULLIGAN a GIBBS 1993). Surfaktanty jsou průmyslově využívány pro jejich schopnost snižovat povrchové napětí, zvyšovat rozpustnost látek, detergentový účinek, smáčivou schopnost a pěnivost. Surfaktanty jsou tedy využívány jako adhesiva, flokulační, smáčecí a pěnicí agens a penetrační činidla.

Surfaktanty zvyšují rozpustnost surové ropy a jsou již tradičně nejvíce využívány v petrochemickém průmyslu pro in situ zvýšení výtěžku ropy při těžbě. Pomocí vhodného biosurfaktantu je možné získat až 90% ropy, která jinak ulpívá na vnitřních stěnách skladovacích nádrží na ropu (DESAI a BANAT 1997).

Surfaktin také patří k biosurfaktantům skýtajícím potenciál pro využití v životním prostředí. I když se jedná o výjimečně účinnou povrchově aktivní látku, nebylo s ním provedeno tolik studií jako například s rhamnolipidy. Avšak např. AWASHTI *et al.* (1999) prokázali, že surfaktin zvyšuje biodegradabilitu pesticidu endosulfanu. Surový surfaktin napomáhá rozpouštět alifatické a aromatické uhlovodíky, které tak zpřístupňuje pro snažší biologickou degradaci (MORAN *et al.* 2000, OLIVERA *et al.* 2000).

Díky přítomnosti dvou negativních nábojů (aspartát a glutamát) v molekule surfaktinu je schopen vázat kovy jako je hořčík, mangan, vápník, barium, lithium a rubidium (THIMON *et al.* 1992). MULLIGAN *et al.* (1999) provedli experiment, ve kterém použili surfaktin pro odstranění těžkých kovů z kontaminované půdy a sedimentů.

Znečištěná půda obsahovala velká množství kovů a uhlovodíků (890 mg/kg zinku, 420 mg/kg mědi a 12,6% ropy). Výsledky ukázaly, že pět sérií vymývání 0,25% roztokem surfaktinu dokázalo odstranit 70% mědi a 22% zinku. Surfaktin má schopnost odstraňovat kovy pomocí sorpce na povrch půdy a vazby kovu do komplexu micel surfaktinu. Surfaktin lze využít i pro odstranění těžkých kovů z kontaminované vody za pomoci technik membránové ultrafiltrace (MULLIGAN *et al.* 1999).



Obr. 6 Možný mechanismus odstraňování kovů pomocí surfaktinu

1. Akumulace micel surfaktinu na povrchu půdy. 2. Odstranění kovu pomocí snížení povrchového napětí a elektrostatických sil. 3. Inkorporace kovu do micely surfaktinu (MULLIGAN 2005).

Využívání biosurfaktantů do budoucna jistě poroste. Nutnou podmínkou avšak bude zlepšit ekonomičnost jejich produkce tím, že se zvýší výtěžky produkce, zefektivní se rychlost produkce a budou se využívat levné nebo odpadní substráty. Nejvíce slibnými oblastmi využití v průmyslu je odstraňování ropných skvrn a znečištění, čištění ropných tankerů, zvýšení výtěžku těžby ropy, bioremediace míst kontaminovaných uhlovodíky nebo jinými organickými polutanty a těžkými kovy. Biosurfaktanty nabízejí významnou výhodu nízkého negativního vlivu na životní prostředí a možnosti produkce *in situ* pomocí mikroorganismů. V tomto směru se také uvažuje např. o využití *B. subtilis* jakožto všudypřítomné bezpečné nepatogenní bakterie jako přirozeného fungicidu a prostředku na ochranu rostlin (NICHOLSON 2002).

2.1.7.2 Využití surfaktinu v biomedicině

Nejvíce prací o aplikacích biosurfaktantů se sice omezuje právě na oblast odstraňování polutantů z prostředí, zvyšování rozpustnosti rozličných hydrofóbních sloučenin jako jsou ropa, polyaromatické uhlovodíky a pesticidy pro následnou mikrobiální degradaci. Biosurfaktanty však skýtají celou řadu dalších možností využití, a to zejména jako antimikrobiální agens. V dnešní době, kdy stále stoupá počet rezistencí na různá léčiva, roste také potřeba hledat alternativní způsoby terapie. V této oblasti by právě biosurfaktanty mohly představovat významný potenciál (SINGH a CAMEOTRA 2004).

Role surfaktantů v lidském organismu není nikterak novým fenoménem - pulmonální surfaktant je lipoproteinový komplex syntetizovaný a sekretovaný epiteliálními buňkami plic do extracelulárních prostor, kde snižuje povrchové napětí na rozhraní vzduch-tekutina a také hraje roli v ochraně vůči infekci a zánětu. Na základě tohoto faktu by mohl být vyvinut nový zajímavý způsob terapie infekčních a zánětlivých chorob plic (WRIGHT 2003).

Surfaktin vykazuje celou řadu biologických aktivit. Vedle svých fungicidních a antibakteriálních účinků působí také jako inhibitor vzniku fibrinové zátky, indukuje tvorbu kanálů v lipidových dvojvrstvách membrán, inhibuje účinek cAMP (kapitola 2.1.2), inhibuje trombocytární a cytosolickou fosfolipázu A2 (PLA2) sleziny a vykazuje také protivirové a protinádorové účinky (KIM *et al.* 1998). Surfaktin má i antimykoplazmatické účinky – způsobuje úplnou a permanentní inaktivaci mykoplazem v kultuře savčích buněk. VOLLENBROICH *et al.* (1997a) dále prokázali, že surfaktin zlepšuje rychlost proliferace a změny morfologie buněk napadených mykoplazmaty. Navíc nízká toxicita surfaktinu k savcím buňkám dovoluje specifickou inaktivaci mykoplazmat bez významnějších škodlivých účinků na metabolismus a růstovou rychlost buněčné kultury.

Surfaktin je účinný i proti virům jako např. herpes simplex virus (HSV-1 a HSV-2), virus vesikulární stomatitidy, virus opičí imunodeficience, kočičí kalicivirus a virus myší encefalomyokarditidy. Inaktivace obalených virů, především herpesvirů a retrovirů, je významně účinnější, než virů neobalených. Tento fakt ukazuje, že antivirový účinek surfaktinu je primárně způsoben fyzikálně chemickou interakcí membránově aktivního surfaktinu s lipidovou membránou viru (VOLLENBROICH *et al.* 1997b). Pro inaktivaci virů je jedním z důležitých faktorů počet uhlíkových atomů řetězce mastné kyseliny surfaktinu. S rostoucí hydrofobicitou mastné kyseliny se inaktivační účinek na

viry zvyšuje. Surfaktin se inkorporuje do lipidové dvojvrstvy a desintegruje obal viru, který obsahuje virové proteiny účastníci se adsorpce a penetrace viru do hostitelských buněk. Jejich ztráta je zodpovědná za ztrátu infekčnosti viru (KRACHT *et al.* 1999).

Rovněž velký význam má i trombolytický účinek surfaktinu. Procesu rozpouštění krevních sraženin se účastní systém plazminogen-plazmin. Plazminogen je proteolyticky aktivován pomocí plazminogenového aktivátoru urokinázového typu (u-PA), který je primárně sekretován jako zymogen pro-urokináza (pro-u-PA). Spolu s aktivací u-PA prochází samotný plazminogen konformační změnou. Reciproká aktivace plazminogenu a pro-urokinázy představuje důležitý mechanismus v iniciaci a propagaci lokální fibrinolytické aktivity. Surfaktin v koncentracích 3 – 20 μM zvyšuje aktivaci pro-urokinázy a konformační změnu plazminogenu, což vede ke zvýšené fibrinolýze *in vitro* i *in vivo* (KIKUCHI a HASUMI 2002, LIM *et al.* 2005). Tyto výsledky naznačují možné využití surfaktinu v terapii náhlé thromboembolie do pulmonálních, srdečních a mozkových cév. Surfaktin má navíc oproti jiným dostupným trombolitikům výhodu v tom, že vykazuje méně vedlejších účinků a byl by tedy vhodný pro dlouhodobé užívání.

Využití metod genového inženýrství skýtá možnost konstrukce modifikovaných surfaktin syntetáz produkujících nové formy surfaktinu se změněnými biologickými aktivitami. Jedním z takových derivátů surfaktinu je varianta postrádající hemolytickou aktivitu, která má zvýšenou schopnost inhibovat růst bakteriálních buněk. Tyto výsledky poskytují první důkaz, že různé deriváty surfaktinu mohou vykazovat redukovanou toxicitu vůči eukaryotním buňkám, což může zlepšit jejich terapeutické aplikace (SYMMANK *et al.* 2002).

Swarming motilita a vznik biofilmů jsou klíčovými schopnostmi bakterií pro kolonizaci různých povrchů, ale představují tak současně významné determinanty vzniku a přenosu nosokomiálních nákaz. Bylo prokázáno, že biosurfaktanty inhibují adhesi patogenních organismů na pevné povrchy nebo místa infekce. Surfaktin snižuje množství vzniklého biofilmu tvořeného bakterií *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* a *Proteus mirabilis* na polyvinylchloridu stejně jako na vinylových uretrálních katetech (MIRELES *et al.* 2001). S ohledem na velký význam oportunních infekcí způsobovaných druhy rodu *Salmonella* postihujícími např. urinární trakt pacientů s AIDS mají tyto výsledky potenciál pro praktické aplikace.

Surfaktin rovněž inhibuje účinky lipopolysacharidů (LPS) na eukaryotní buňky. Bylo prokázáno, že surfaktin reverzibilně interaguje s lipidem A a inhibuje jeho interakci s LPS-vazebným proteinem, který zajišťuje transport LPS k jeho receptorům. Látky, které inaktivují účinek LPS, jsou využitelná jako nová protizánětlivá agens (TAKAHASHI *et al.* 2006).

Bakteriální lipopeptidy také spolu s konvenčními antigeny představují silná netoxická imunologická adjuvans (MITTENBUHLER *et al.* 1997) a dokonce skýtají možnost využití jako součást potravinových doplňků. V současné době se upřednostňuje nepoužívat minerální látky a vitaminy v čisté formě, nýbrž jako součást vyvážených nutričních komplexů vytvořených probiotickými mikroorganismy a jejich produkty. To zvyšuje biologickou dostupnost, adsorpci, využitelnost a účinnost daných minerálů a vitaminů a navíc ostatní probiotické složky představují další důležité nutriční sloučeniny.

Navzdory nemalým možnostem využití biosurfaktantů v oblasti biomedicíny, je jejich používání stále omezené. Důvodem může být jejich vysoká cena, ale také poněkud skrovné informace o jejich toxicitě k lidskému organismu. Je pouze otázkou času, kdy budou tyto látky plně využity a v medicíně aplikovány. Biosurfaktanty představují vhodnou alternativu k syntetickým léčivům a antimikrobiálním agens a představovat účinné terapeutické prostředky nebo probiotika především v současné situaci, kdy rezistence patogenů způsobujících život ohrožující onemocnění je na stálém vzestupu. Spekuluje se o tom, že právě látky působící na úrovni integrity cytoplazmatické membrány by mohly představovat další generaci antibiotik (SINGH A CAMEOTRA 2004).

3. CYTOPLAZMATICKÁ MEMBRÁNA

Cytoplazmatická membrána je strukturou nacházející se na povrchu bakteriální cytoplazmy. Tvoří semipermeabilní osmotickou bariéru, která zajišťuje stálost vnitřního prostředí buňky. Jako jediná struktura svého druhu v buňce zajišťuje veškeré membránově vázané funkce. V první řadě odděluje buňku od vnějšího prostředí a zároveň zajišťuje komunikaci s ním, dochází na ní k tvorbě protonového gradientu, syntéze fosfolipidů a z části i buněčné stěny. Na membránu je také vázáno asi 30% bakteriálních ribosomů a nachází se zde řada membránových bílkovin zajišťujících různé funkce. Cytoplazmatická membrána hraje ústřední roli v odpovědi organismu na environmentální stresy. Fluidita a permeabilita membrány jsou zásadními životními parametry pro udržení buněčné homeostáze a efektivního membránového transportu. Kvůli zamezení destabilizace membránové struktury v důsledku environmentálního stresu mění bakterie složení svých membrán (van den BOOM a CRONAN 1989).

Stavba bakteriální cytoplazmatické membrány se zásadně neliší od stavby jiných biologických membrán. Základ tvoří tekuté kontinuum dvojvrstvy fosfolipidů s periferními a integrálními proteiny. Podmínkou správného fungování je určitý stupeň její tekutosti, který je ovlivňován charakterem membránových lipidů (DOWHAN 1997).

3.1 FOSFOLIPIDY BAKTERIÁLNÍ MEMBRÁNY

Lipidy tvoří vedle proteinů základní stavební prvek cytoplazmatické membrány bakterií, kde zajišťují jednak její bariérovou funkci, ale hrají roli i v dalších procesech bakteriální buňky.

Fosfolipidy tvoří majoritní část lipidové složky cytoplazmatické membrány. Fosfolipidy, deriváty fosfatidové kyseliny, jsou v bakteriální buňce zastoupeny v různém množství, které je závislé na daném bakteriálním druhu, růstové fázi, ale i vnějších faktorech prostředí (ROCK *et al.* 1996).

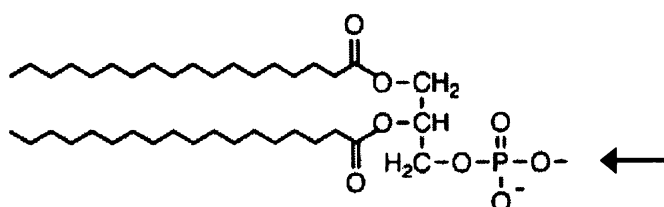
Dominantními fosfolipidy bakterií *B. subtilis* a *E. coli* jsou fosfatidylglycerol (PG), fosfatidyletanolamin (PE) a kardiolipin (CL). V menší míře jsou zastoupeny fosfatidylserin (PS), kyselina fosfatidová (PA) a lysofosfolipidy (PXNH₂). U jiných bakteriálních druhů se však mohou vyskytovat i fosfolipidy typické pro eukaryotní membrány jako je fosfatidylinositol (PI), který je majoritním fosfolipidem rodu *Mycobacterium*, nebo

fosfatidylcholin (PC), který tvoří až 73% všech membránových lipidů bakterie *Acetobacter aceti* (SOHLENKAMP *et al.* 2003).

Do nedávné doby se předpokládalo, že v bakteriální membráně jsou lipidové molekuly distribuovány homogenně. Bylo však popsáno, že jednotlivé fosfolipidy jsou v cytoplazmatické membráně bakterií rozmístěny nestejně. Domény tvořené kardiolipinem byly pozorovány nejen u *E. coli* (MILEYKOVSKAYA a DOWHAN 2000), ale i *B. subtilis*. Zde se nacházejí v membráně středového septa a pólech vegetativních buněk a ve fázi sporulace pak v membráně zanořující se budoucí spory dovnitř mateřské buňky a v membráně prespory (KAWAI *et al.* 2004). Podobná lokalizace byla zjištěna i u PE, který se v membráně *B. subtilis* vyskytuje v oblasti septa vegetativních buněk a na pólech a v membráně zanořující se budoucí spory dovnitř mateřské buňky během sporulace. Obdobné domény tvořené PE byly nalezeny i u jiných druhů rodu *Bacillus*, ale nikoli u *E. coli* (NISHIBORI *et al.* 2005).

3.1.1 Struktura fosfolipidů

Fosfolipidy jsou fosfátové diestery glycerolu (fosfoglyceridy). Základ struktury (Obr. 7) tvoří kyselina fosfatidová, tj. glycerol esterifikovaný v pozici 1 a 2 mastnou kyselinou a s fosfátovou skupinou v pozici 3. Na té je estericky navázána polární hlavička příslušného alkoholu. Podle navázaného polárního alkoholu se fosfolipidy dělí do charakteristických tříd – serin u PS, glycerol u PG, fosfatidylglycerol u CL, etanolamin u PE, inositol u PI a cholin u PC. Je pravidlem, že první pozice sn-glycerol-3-P kostry je esterifikována nasycenou mastnou kyselinou, zatímco druhá kyselinou nenasycenou (CRONAN a VAGELOS 1972).



Obr. 7 Obecný vzorec fosfolipidu

Fosfatidová kyselina - šipka značí místo, kam se váže polární hlavička lipidu (SOHLENKAMP *et al.* 2003).

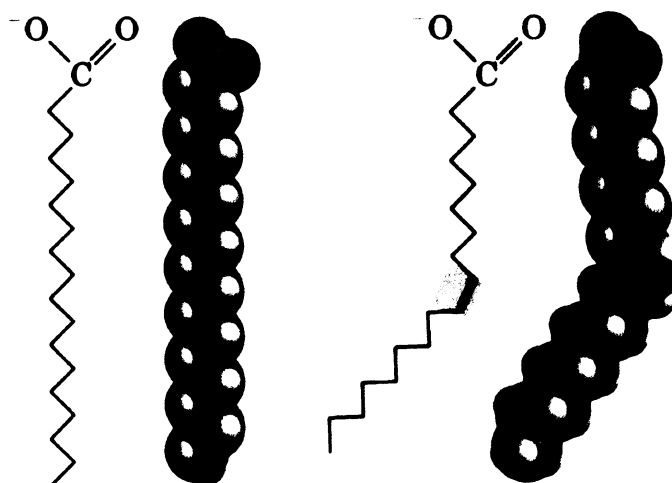
3.1.2 Mastné kyseliny bakteriálních fosfolipidů

Mastné kyseliny jsou nezbytnou komponentou fosfolipidů, kde vytváří nepolární část jejich molekuly. Přítomností polární skupiny na opačném konci sn-glycerol-3-P získává molekula fosfolipidu amfipatický charakter, který je důležitý pro její funkci.

Majoritní složkou membránových lipidů *B. subtilis* jsou mastné kyseliny s větveným řetězcem, a to v konformaci iso- a anteiso-, které se liší pozicí methylové skupiny substituující vodík vázaný na uhlíkovém atomu alifatického řetězce.

Nejhojněji jsou u *B. subtilis* zastoupeny kyseliny anteiso-C15:0 a iso-C17:0. Mastné kyseliny s větveným řetězcem hrají důležitou roli v udržování vhodného fyzikálního stavu membrány – na uspořádanost membrány mají podobný vliv jako nenasycené a cyklické mastné kyseliny (KLEIN *et al.* 1999).

Zastoupení mastných kyselin však značně závisí na mnoha různých faktorech jako je teplota kultivace a fáze růstu. Za vyšších teplot vzrůstá podíl nasycených mastných kyselin s přímými dlouhými řetězci s vysokým bodem tání. Při nižších teplotách naopak přibývají mastné kyseliny s nízkým bodem tání, tedy nenasycené větvené mastné kyseliny. Ve stacionární fázi nebo při pomalém růstu se hromadí mastné kyseliny s cyklopropanovým kruhem (de MENDOZA *et al.* 1993).



Obr. 8 Nasycené a nenasycené mastné kyseliny
Molekula nasycené (vlevo) a nenasycené (vpravo) mastné kyseliny.

3.2 BIOSYNTÉZA FOSFOLIPIDŮ

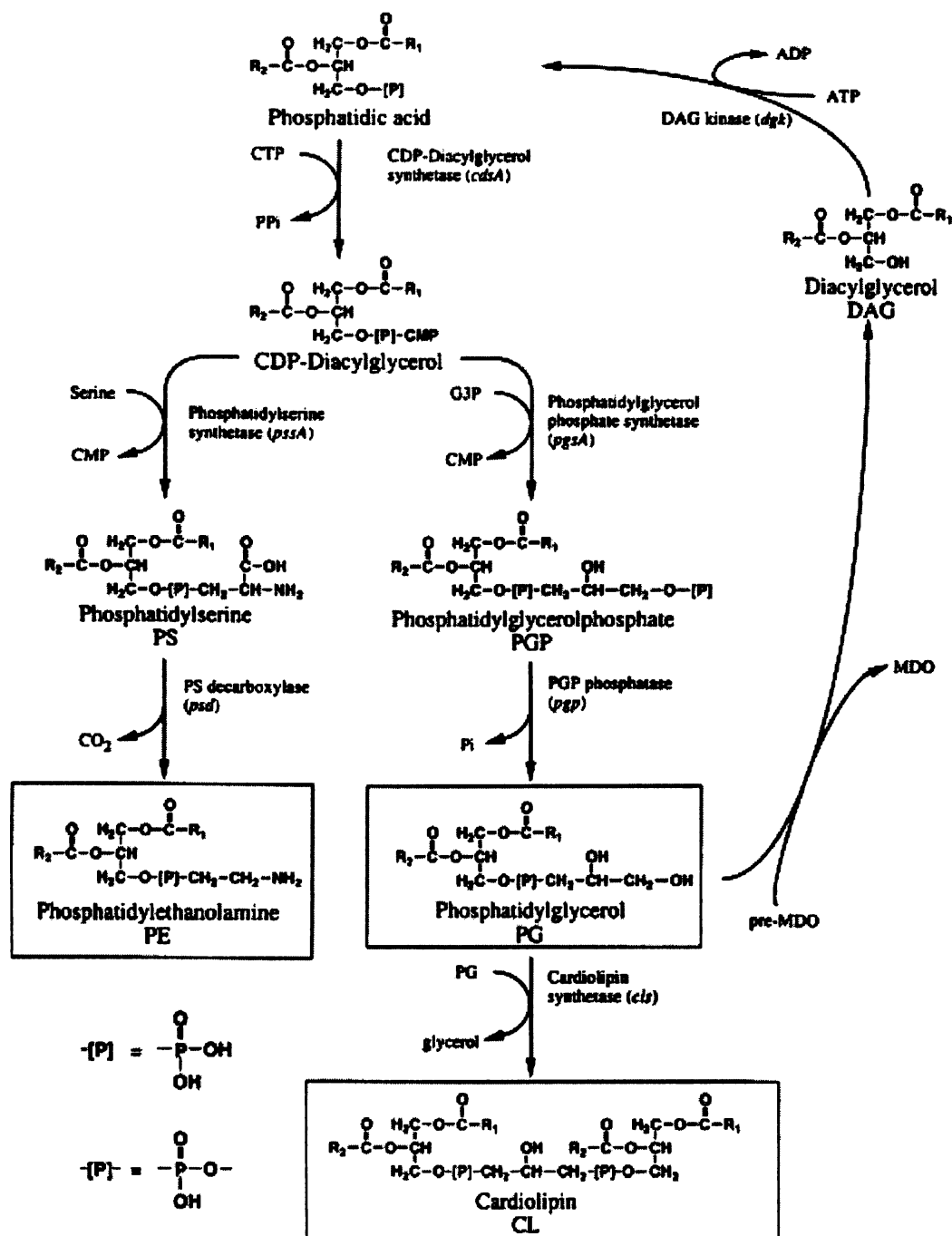
Syntéza fosfolipidů probíhá na vnitřní straně cytoplazmatické membrány za pomoci enzymů, které jsou většinou integrálními membránovými proteiny s katalytickou doménou orientovanou do cytoplazmy. Může se jednat i o proteiny vázané na vnitřní povrch cytoplazmatické membrány (CRONAN *et al.* 1996). Syntéza mastných kyselin probíhá v cytozolu. Biosyntéza fosfolipidů (Obr. 9) je lokalizovaná především v oblasti membrány septa (NISHIBORI *et al.* 2005).

Hlavními prekursory biosyntézy fosfolipidů jsou mastné kyseliny, sn-glycerol-3-P, L-serin a CTP (cytidintrifosfát, CTP). Prekursor sn-glycerol-3-P může vznikat ve dvou odlišných drahách, a to buď z glycerolu nebo, rostou-li buňky na glukose jako zdroji uhlíku, z dihydroxyacetonfosfátu. CTP je nezbytnou látkou pro syntézu CDP-diglyceridu (cytidin-5-fosfát-diglycerid).

Kyselina fosfatidová (PA) slouží jako prekursor pro vznik dalších fosfolipidů bakterií. PA se u *E. coli* i *B. subtilis* vyskytuje pouze ve stopovém množství, protože enzym CDP-diglycerid syntetáza za účasti CTP účinně přeměňuje PA na CDP-diglycerid (SPARROW a RAETZ 1985). CDP-diglycerid je následně využíván dvěma biosyntetickými drahami vedoucími k dominantním membránovým fosfolipidům PG, PE a CL. Za fyziologického pH nese PE obojakoý náboj, PG a CL nesou náboj negativní.

Prvním krokem biosyntézy PE je vznik fosfatidylserinu z CDP-diglyceridu a serinu pomocí enzymu fosfatidylserin syntetázy (KANFER a KENNEDY 1964), který ve svém aktivním stavu musí být vázán na membránu (SAHA *et al.* 1996). U grampozitivních bakterií je PS syntetáza pevně vázána k cytoplazmatické membráně, aminokyselinová sekvence dokonce poukazuje na možnou přítomnost několika transmembránových úseků (MATSUMOTO 1997). Fosfatidylserin je však rychle dekarboxylován enzymem PS dekarboxylázou na PE (KANFER a KENNEDY 1963).

Syntéza acidických fosfolipidů začíná vznikem fosfatidylglycerol-P z CDP-diglyceridu a glycerol-3-P (HIRABAYASHI *et al.* 1976). Produkt této reakce je rychle defosforylován na PG. Kardiolipin pak vzniká kondenzací dvou molekul PG enzymem CL syntetázou (TUNAITIS a CRONAN 1973). U eukaryot CL vzniká přenosem fosfatidové kyseliny z CDP-diglyceridu na molekulu PG.



Obr. 9 Biosyntetické dráhy vedoucí k hlavním fosfolipidovým třídám *E. coli*

G3P – glycerol-3-fosfát, DAG – diacylglycerol, MDO – membrane derived oligosaccharides (HUIJBREGTS *et al.* 2000)

Co se týče metabolického obratu fosfolipidů, relativně dlouhý poločas života má PE (za jednu generaci se obmění 5% PE). PG je obměňován poměrně rychle (25% za jednu generaci) (DOWHAN 1997). PG totiž vedle toho, že představuje prekursor CL, slouží také

jako substrát pro syntézu jiných makromolekul. Fosfatidylglycerol je u *E. coli* využíván pro syntézu oligosacharidů odvozených z membrány (MDO) v dráze vedoucí k diacylglycerolu, který je recyklován na PA. Diacylglycerolová část je využívána na syntézu lipoproteinů (SANKARAN a WU 1994).

3.2.1 Syntéza mastných kyselin

Syntézu mastných kyselin katalyzují enzymy souhrnně nazývané syntetázy mastných kyselin. Bakteriální syntetázy mastných kyselin se dají rozdělit do dvou skupin podle typu hlavního produktu na syntetázy mastných kyselin nevětvených a větvených. Liší se svou afinitou k molekulám, které představují substráty pro zahájení syntézy. První skupina enzymů používá jako primer acetyl-CoA, druhá pak krátké větvené CoA-estery jako je isobutyryl-, isovaleryl- a 2-methylbutyryl-CoA (KANEDA 1977). Zásadním rozdílem mezi syntézou obou typů mastných kyselin je tedy pouze výchozí sloučenina, následující procesy probíhají již shodným mechanismem.

Syntetázy mastných kyselin bakterií vyžadují pro svou aktivitu přítomnost tzv. acyl-přenašejících proteinů (acyl carrier proteins, ACPs), které slouží jako přenašeče intermediátů syntézy. ACPs jsou malé velmi kyselé proteiny, které ve své prostetické skupině obsahují kyselinu pantotheinovou vázanou fosfodiesterovou vazbou na jeden ze serinových zbytků (van den BOOM a CRONAN 1989). Acyl-CoA estery jsou na počátku převedeny na estery ACP. Tuto reakci katalyzuje acyl-CoA ACP transacyláza. Právě substrátová specifita tohoto enzymu ovlivňuje výběr primeru a tím i charakter následně vznikajícího produktu (KANEDA 1991).

Syntéza mastných kyselin u *B. subtilis* využívá přednostně krátké větvené CoA-estery, které vznikají z větvených ketokyselin odvozených od aminokyselin s větveným postraním řetězcem jako je valin, leucin a isoleucin (KANEDA 1991). Isoleucin je prekursorem kyselin anteiso-C15:0 a anteiso-C17:0, leucin je konvertován na kyseliny iso-C15:0 a iso-C17:0. Valin je prekursorem kyselin iso-C14:0 a iso-C16:0 (KLEIN *et al.* 1999).

Nevětvené mastné kyseliny mají v membráně *B. subtilis* pouze minoritní zastoupení. Je to dáno tím, že syntetázy mastných kyselin této bakterie nejsou příliš schopny efektivně konvertovat acyl-CoA na acyl-ACP. Vhodnějším primerem pro syntézu

nevětvených mastných kyselin u *B. subtilis* je acetyl-ACP, který je tvořen dekarboxylací malonyl-ACP (KANEDA a SMITH 1980).

Nenasycené mastné kyseliny jsou u rodu *Bacillus* tvořeny desaturací již hotového acylového řetězce. Desaturace je inducibilním procesem probíhajícím u *B. subtilis* aerobně (GRAU a de MENDOZA 1993). Zavádění nenasycené dvojně vazby katalyzují enzymy desaturázy. *B. subtilis* vlastní desaturázu, která zavádí do acylových řetězců mastných kyselin vázaných ve fosfolipidech dvojnou vazbu do pozice delta 5 (AGUILAR *et al.* 1999).

3.3 VLASTNOSTI A FUNKCE FOSFOLIPIDŮ

V důsledku amfipatického charakteru zaujímají membránové fosfolipidy ve vodném prostředí podobu charakteristické dvojvrstvy. V uspořádání dvojvrstvy mohou lipidy existovat ve dvou základních stavech (fázích), a to ve vysoce uspořádané fázi gelu nebo ve fluidní fázi tekutého krystalu. Fyzikální stav lipidové dvojvrstvy závisí na teplotě – fosfolipidy v kritické teplotě označované T_t (teplota tranzice) reverzibilně procházejí endotermním fázovým přechodem ze stavu pevného do stavu tekutého krystalu. Na molekulární úrovni je fázový přechod vysvětlován kooperativní změnou konformace alifatických řetězců mastných kyselin při teplotě T_t . Podstatou této změny je rotační izomerizace alifatických řetězců kolem jednoduchých C-C vazeb (SEELING a NIEBERGER 1974).

Energeticky nejchudší je konformace trans, kdy tři za sebou jdoucí uhlíkové atomy leží v jedné rovině. Je-li třetí atom v řadě pootočen o $+60^\circ$, resp. -60° vzhledem k ose, kterou tvoří předcházející C-C vazba, hovoříme o konformaci gauche+, resp. gauche-. Pod teplotou fázového přechodu se řetězce mastných kyselin nacházejí převážně v konformaci trans (fáze gelu), zaujímají tak minimální prostor a veškeré pohyby jsou v této rigidní struktuře omezeny. Zvýšení teploty nad T_t způsobí kooperativní rotaci trans-gauche, která je doprovázena zkrácením řetězců a pohybovým uvolněním celé struktury (fáze tekutého krystalu). Za teploty T_t obě fáze koexistují v rovnováze (RAUDINO a SARPIETRO 2001). Pro teplotu fázového přechodu platí, že je vyšší u lipidů, které obsahují rigidní nasycené mastné kyseliny a také je vyšší u isomerů v konformaci trans než cis (CRONAN 2002).

Přítomnost nenasycené vazby v řetězci mastné kyseliny omezuje v daném místě rotaci a zavádí ohyb do molekuly, čímž se narušuje uspořádanost molekul v jejím okolí.

Podobným mechanismem působí na vlastnosti membrány i kyseliny větvené či alicyklické (RUSTAN a DREVON 2001). Teplota fázového přechodu T_t je také úměrná délce řetězce mastné kyseliny (čím delší řetězec, tím vyšší teplota přechodu) a ovlivňuje ji i polární část fosfolipidové molekuly (LANDBROOKE a CHAPMAN 1969).

Fosfolipidy však neovlivňují jen fyzikální stav membrány, ale jejich jednotlivé třídy mají svou specifickou úlohu. Některé enzymy např. vyžadují pro svou aktivitu přítomnost specifických fosfolipidů (FRY a GREEN 1981). Známý je také vliv bazických fosfolipidů některých druhů rodu *Bacillus* na udržení pH membrány (KANEDA 1977). Jeden z majoritních fosfolipidů bakterií PE zase ovlivňuje osmotickou pevnost membrány (BEEBE 1971). Zdá se, že u *E. coli* je přítomnost PE nutná pro správný vznik a konstrikci prstenců tvořených proteinem FtsZ během buněčného dělení (MILEYKOVSKAYA *et al.* 1998). Fosfolipidy aniontové povahy (PI, PG a CL) mají navíc vliv na topologii vnitřní membrány *E. coli*, protože na sebe váží pozitivně nabitě membránové proteiny (van KLOMPENBURG *et al.* 1997, MATSUMOTO 2001). Mohou také přispívat k udržování jejich optimální aktivity. Mezi takové proteiny patří MinD účastníci se vzniku buněčné přepážky a proteiny sporulace (KAWAI *et al.* 2004). Recentní studie také ukazují, že kardiolipin by mohl hrát specifickou roli v životních procesech jako je replikace DNA a buněčné dělení (MILEYOVSKAYA a DOWHAN 2005) a je také nutný pro rané fáze germinace spor (KAWAI *et al.* 2006).

4. MATERIÁL A METODY

4.1 MIKROORGANIZMUS

Diplomová práce byla provedena na bakterii *Bacillus subtilis* ATCC 21332 a pro srovnávací studie byl použit kmen *B. subtilis* 168 trp₂. Rod *Bacillus* je řazen do 18. skupiny Bergeyova systému (1984 – 89), tj. mezi tyčinky a koky tvořící endospory. Jedná se o grampozitivní, aerobní a nepatogenní půdní bakterii (HENSYL 1994). S ohledem na kultivační teplotu patří druh *Bacillus subtilis* mezi mezofilní bakterie, teplotní optimum používaného kmene ATCC 21332 je 30 °C a kmene 168 trp₂ 45 °C.

Do tohoto rodu je kromě bakterie *Bacillus subtilis* zařazeno dalších 47 druhů. Bakterie rodu *Bacillus* mají tvar rovných tyček o velikosti cca 0,5 – 2,5 x 1,2 – 10 μm. Buňky jsou obvykle motilní. Charakteristická je tvorba nejčastěji oválných endospor, které jsou světlolomné, špatně barvitelné a rezistentní vůči různým nepříznivým podmínkám (vysoká teplota, dehydratace, ozáření) (HARWOOD a ARCHIBALD 1990).

Bakteriální kmen byl přechováván v podobě sporových konzerv (15% glycerol) při teplotě -20 °C nebo na živném agaru č. 2 při teplotě 6 °C a chráněn před vyschnutím parafilmem. Jednou za 30 dnů byl přeočkován. Před každým pokusem byl zaočkován do tekutého nočního inokula a kultivován 16 hodin na vodní třepačce ve 30, resp. 40 °C, a frekvenci rotace 175, popř. 120 rpm (rounds per minute, rpm).

4.2 ROZTOKY A PUFRY

❖ Stanovení koncentrace bílkovin a surfaktinu pomocí BCA

- roztok A (Pierce): 1% BCA (bicinchoninic acid) (w/v); 2% Na₂CO₃ · H₂O (w/v); 0,16% Na₂C₄H₄O₆ · 2H₂O (w/v); 0,4% NaOH (w/v); 0,95% NaHCO₃ (w/v) optimální pH 11,25 (lze podle potřeby upravit 50% NaOH nebo pevným NaHCO₃)
- roztok B: 4% CuSO₄ · 5H₂O (w/v)
- pracovní roztok: 50 objemů A + 1 objem B
- roztok surfaktinu (Sigma) v metanolu

- BSA (Beef Serum Albumin, hovězí sérový albumin): 2 mg/1 ml (srovnávací standard proteinů)

❖ **Izolace lipidové frakce**

- hexan-isopropanol 3 : 2

❖ **Kvantitativní stanovení lipidického fosforu**

- koncentrovaná kyselina chloristá
- 2,5% (w/v) molybdenan amonný
- 10% (w/v) kyselina askorbová
- zásobní roztok fosfátu ($\text{KH}_2\text{-K}_2\text{H}$) – 0,2 $\mu\text{mol}/1\text{ ml}$

❖ **Plynová chromatografie**

- methoxid sodný: 2,3 g kovového sodíku rozpustit ve 100 ml směsi bezvodého methanolu (60 ml) a bezvodého benzenu (40 ml); uchovat v lednici v uzavřené nádobě, stálost roztoku 1 měsíc
- 10% roztok BCl_3 (w/v)
- nasycený roztok NaCl

❖ **Izolace cytoplazmatických membrán – enzymatická metoda**

- Zásobní roztoky: A) 0,2 M K_2HPO_4
B) 0,2 M KH_2PO_4
- 50 mM fosfátový pufr; pH 8,0 ($\text{KH}_2\text{PO}_4 - \text{K}_2\text{HPO}_4$)
- 94,7 ml A + 5,3 ml B, doplnit do 400 ml destilovanou vodou
- 100 mM fosfátový pufr; pH 6,6 ($\text{KH}_2\text{PO}_4 - \text{K}_2\text{HPO}_4$)
- 37,5 ml A + 62,5 ml B, doplnit do 200 ml destilovanou vodou

- 150 mM K⁺ - EDTA
- 500 mM MgSO₄
- 100 mM roztok phenylmethylsulfonylfluoridu (PMSF) v isopropanolu
- Roztok DNázy I: 1 mg DNázy I rozpustit (nevortexovat) v 1 ml 50% glycerolu (w/v) obsahující 20 mM Tris-HCl (pH 7,5)/1 mM MgCl₂, zamrazit v -20 °C
- Roztok TRN: 1% RNáza (w/v), 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 15 mM NaCl (w/v), povařit 15 minut při 100 °C a zamrazit v -20 °C

❖ **Jednorozměrná (1D) elektroforéza bílkovin**

- akrylamid (zásobní roztok): 30% akrylamid (w/v); 0,8% bis-akrylamid (w/v)
přefiltrovat a uchovat ve 4 °C ve tmě maximálně 30 dní
 - pufr Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8): 27,23 g Tris base rozpustit v 80 ml deionizované H₂O, upravit pH na 8,8 1 M HCl, doplnit do 150 ml a uchovat ve 4 °C maximálně 30 dní
 - pufr Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8): 6 g Tris base rozpustit v 60 ml deionizované H₂O, upravit na pH 6,8 1 M HCl, doplnit do 100 ml a uchovat ve 4 °C maximálně 30 dní
 - roztok SDS 10% (w/v): k 10 g SDS přidat deionizovanou H₂O do konečného objemu 100 ml, uchovat při pokojové teplotě
 - 5x koncentrovaný elektrodový pufr, pH 8,3 (zásobní roztok): 1,5% Tris base (w/v), 7,2% glycin (w/v) a 0,5% SDS (w/v); uchovat ve 4 °C
- Před každou elektroforézou je namíchán čerstvý pufr (200 ml 5x koncentrovaného elektrodového pufru doplnit do 1000 ml destilovanou H₂O).
- vzorkový pufr (zásobní roztok): 500 µl 100% glycerolu; 2,5 g močoviny, 500 mg SDS; 500 mg dithiothreitolu (DTT); 5 mg bromfenolové modři; 500 µl 1M Tris-HCl (pH 8,0) a doplnit do 10 ml destilovanou H₂O, uchovat v -20 °C

- barvicí roztok (zásobní roztok): 0,1% Coomassie blue R – 250 (w/v),
40% methanol (v/v), 10% kyselina octová (v/v)
- odbarvovací roztok: 40% methanol (v/v), 10% kyselina octová (v/v)
- sušící roztok (zásobní roztok): 10% ethanol (v/v), 4% glycerol (v/v)
- 10% amonium persulfát (APS) - připravit vždy čerstvý před elektroforézou

4.3 KULTIVAČNÍ PŮDY

4.3.1 Komplexní médium

A: Bacto beef extract.....	1,50 g
Bacto yeast extract.....	1,50 g
NaCl	3,50 g
KH ₂ PO ₄	1,32 g
K ₂ HPO ₄	3,50 g
B: Bactopepton	5,00 g
C: Glukosa	5,00 g

Složky A, B a C byly odděleně rozpuštěny ve 200 ml destilované vody a sterilizovány. Po vychladnutí byly asepticky slity a doplněny do 1000 ml sterilní destilovanou vodou. Úprava na pH 7,0 ve složce A byla provedena 1 M KOH nebo 1 M HCl před sterilizací.

4.3.2 Landyho médium

A: Bacto yeast extract	1,0 g
KCl	0,5 g
KH ₂ PO ₄	1,0 g
B: Glukosa	20,0 g
C: Glutamát	5,0g
D: MgSO ₄	0,5 g
E: MnCl ₂	0,005 g
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,16 g
F: FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,15 g

Složky A, B, C, D a E byly odděleně rozpuštěny v přiměřeném množství destilované vody a sterilizovány v autoklávu. Složka F byla po rozpuštění sterilizována filtrací. Po vychladnutí byly jednotlivé složky asepticky slity a doplněny do 1000 ml sterilní destilovanou vodou. Úprava na pH 7,0 ve složce A byla provedena 1 M KOH nebo 1 M HCl před sterilizací.

4.3.3 Živný bujón Oxoid

Lab-Lemco powder	1,0 g
Bacto yeast extract	2,0 g
Bactopepton	5,0 g
NaCl	5,0 g

Všechny složky byly společně rozpuštěny v 500 ml destilované vody a sterilizovány. Po vychladnutí byl koncentrát asepticky doplněn sterilní vodou do konečného objemu 1000 ml. Úprava na pH 7,0 byla provedena 1 M KOH nebo 1 M HCl před sterilizací.

4.3.4 Pevné půdy

Živný agar byl připraven rozpuštěním 4 g živného agaru č. 2 (IMUNA n. p.) do 100 ml destilované vody na konečnou koncentraci 4% (w/v). Úprava na pH 7,0 byla provedena 1 M KOH. Agar byl rozplněn po 8 ml do zkumavek, sterilizován a poté uložen do šikmé polohy, v níž ztuhnul (**šikmý agar**) nebo byl sterilizován a poté sterilně rozlit do Petriho misek.

živný agar č. 2	40 g
destilovaná voda	do 1000 ml
pH 7,0	

Krevní agar byl připraven rozpuštěním všech složek v 1000 ml destilované vody. Po sterilizaci a ochlazení na 45 – 50 °C byla přidána defibrinovaná ovčí krev na konečnou koncentraci 5 – 8% (v/v). Krevní agary byly skladovány v chladničce po maximální dobu 3 měsíců.

Nutrient extract (heart extract + pepton) 20 g
 NaCl 5 g
 Agar 15 g
 pH 6,9 ± 0,1

Sporulační agar byl připraven rozpuštěním všech složek základu A v 1000 ml destilované vody. Po sterilizaci a ochlazení na 45 – 50 °C byl přidán 1 ml sterilního základu B o stejné teplotě. Po důkladném zamíchání byl agar sterilně rozlit do Petriho misek.

základ	<i>B. subtilis</i> 168 trp ₂	<i>B. subtilis</i> ATCC 21332
A	Živný agar (Difco)..... 23 g	Živný agar (Difco)..... 23 g
		1M NaOH.....0,6 ml
	NaCl..... 1 g	KCl..... 1 g
	MgSO ₄ · 7H ₂ O..... 0,25 g	MgSO ₄ · 7H ₂ O.....0,12 g
B	FeSO ₄ · 7H ₂ O..... 10 ⁻³ M	FeSO ₄ · 7H ₂ O..... 10 ⁻³ M
	MnCl ₂ · 4H ₂ O..... 10 ⁻² M	MnCl ₂ · 4H ₂ O..... 10 ⁻² M
	CaCl ₂ · 2H ₂ O..... 1 M	Ca(NO ₃) ₂ 1 M

4.4 SEZNAM POUŽITÝCH CHEMIKÁLIÍ

Chemikálie	Výrobce
Amonium persulfát	Sigma
Akrylamid	Serva
Bactopepton	Oxoid
Bacto beef extract	Difco
Bacto yeast extract	Oxoid
Bis-akrylamid	Serva
Coomassie blue R-250	Sigma

Deoxyribonukleasa I	Sigma
Dihydrogenfosforečnan draselný	Fluka
Diphenylhexatrien	Sigma
Dithiothreitol	Serva
Dodecylsulfát sodný	Serva
Ethylenediamine-tetraacetic acid	Sigma
Glukosa	Serva
Glycin	Renal (Hungary)
Hovězí sérový albumin	Sigma
Hydrogenfosforečnan draselný	Fluka
Chlorid boritý	Serva
Lab-Lemco Powder	Oxoid
Lysosym	Sigma
N'N'-methylen-bisakrylamid	Serva
NNN'N'-tetramethylethylendiamin	Serva
Phenylmethylsulfonylfluorid	Serva
Ribonukleasa A	Sigma
Silikagel G	Merck
Surfaktin	Sigma
Tris base	Sigma
Trifluoroctová kyselina	Sigma
Urea	Merck
Živný agar	Difco
Živný agar č. 2	IMUNA n. p.

Ostatní používané látky byly běžné chemikálie čistoty p. a. převážně od výrobce Lachema Brno a Lach-Ner Neratovice.

4.5 STERILIZACE

Kultivační média a živné půdy byly sterilizovány v autoklávu 20 minut při 121 °C a přetlaku vodní páry 0,15 MPa. Roztok $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ byl sterilizován filtrací přes membránové filtry Pragopor č. 5 (průměr 24 mm, velikost pórů 0,6 μm). Laboratorní sklo bylo sterilizováno v horkovzdušné sušárně 1 h při 180 °C, popř. 2 h při 160 °C.

4.6 PŘÍPRAVA SPOROVÝCH KONZERV

Z tekuté kultury narostlé v komplexním médiu (*B. subtilis* 168 trp₂), resp. živném bujónu (*B. subtilis* ATCC 21332), na OD₄₂₀ \cong 0,500 bylo zaočkováno 20 Petriho misek se sporulačním agarem (kapitola 4.3.4) – 0,1 ml tekuté kultury bylo napipetováno na jednu misku a rozetřeno sterilní skleněnou tyčinkou. Misky byly inkubovány v termostatu dnem vzhůru následujícím způsobem: kmen 168 trp₂. 4 dny ve 40 °C a kmen ATCC 21332 7 dní ve 30 °C.

Po vzniku světlolomných spor pozorovatelných v optickém mikroskopu byly na každou misku nanесeny 3 ml sterilní destilované vody a biomasa byla resuspendována sterilní skleněnou tyčinkou. Vzniklá suspenze byla přenesena do sterilních plastových centrifugačních zkumavek Falcon (50 ml) a 3krát promyta 30 ml sterilní destilované vody (centrifuga Rotina 24R, 10 min, 5000 rpm). Supernatant byl odstraněn, sediment resuspendován v malém množství sterilní destilované vody, převeden do jedné centrifugační zkumavky a centrifugován 15 min při 5000 rpm. Pelet byl resuspendován v 15 ml 15% glycerolu, rozplněn po 100 a 150 μ l do sterilních plastových mikrozkuavek Eppendorf a uchován při -20 °C.

Před použitím byla sporová konzerva rozmrazena a zahřána na 70 °C po dobu 15 min, čímž došlo k aktivaci klíčení spor a zároveň k likvidaci případné kontaminace či nežádoucích vegetativních buněk.

4.7 KULTIVACE A RŮSTOVÁ KŘIVKA

4.7.1 Kultivace bakterií

Bakterie *Bacillus subtilis* byly kultivovány aerobně v Erlenmayerových baňkách v třepačkách vytemperovaných na požadovanou teplotu (30, resp. 40 °C). Objem kultury byl volen tak, aby dosahoval maximálně 2/10 objemu kultivační nádoby pro zajištění dostatečného vzdušnění, rychlost třepání 175 rpm. U nižšího stupně aerace (120 rpm) maximální množství kultury v kultivační Erlenmayerově baňce činilo nanejvýš 10% jejího celkového objemu. Pro kultivaci objemů do 30 ml byly používány rotační třepačky (Elpan) s vytemperovanou vodní lázní. Kultivace objemů větších než 30 ml probíhala v horkovzdušné třepačce (Gallenkamp, Schoeller Instruments).

4.7.2 Příprava inokula

Sporová konzerva (15% glycerol, -20 °C) byla po aktivaci při 70 °C po dobu 15 min zaočkována do 25 ml tekutého média a byla kultivována v příslušné teplotě (30, resp. 40 °C) na vodní třepačce přes noc 16 hodin. Ráno byla bakteriální kultura přeočkována do další tekuté pasáže, jejíž růst byl ukončen při optické denzitě $OD_{420\text{ nm}} \cong 0,500$. Takto narostlá kultura byla použita k zaočkování 3 - 4 paralelních baněk pro vlastní pokus. Optická denzita bakteriální suspenze byla měřena na spektrofotometru Helios γ (10 mm kyvety) při vlnové délce 420 nm. Jako slepý vzorek byla použita destilovaná voda.

4.7.3 Růstová křivka

Inokulum bylo použito k zaočkování vytemperovaného kultivačního média na $OD_{420\text{ nm}} 0,045 - 0,015$ a dále probíhala kultivace za daných podmínek. Optická denzita bakteriální suspenze byla sledována, jak je uvedeno v kapitole 4.7.2. Odběry byly do dosažení stacionární fáze prováděny v časových intervalech 15–40 min podle typu pokusu. Bakteriální suspenze byla za účelem měření optické denzity podle potřeby ředěna destilovanou vodou. Celková doba kultivace trvala 72 hodin.

Do grafu byly vynášeny hodnoty $\log_2(OD_{420\text{ nm}} \cdot 1000)$ v závislosti na čase t (min). Doba zdvojení bakterií (T) byla stanovena pomocí funkce lineární regrese. V exponenciální fázi růstu bakterií je závislost hodnoty $\log_2(OD_{420\text{ nm}} \cdot 1000)$ na čase lineární. Směrnice přímky proložené experimentálními body v lineární oblasti růstové křivky udává rychlostní růstovou konstantu c (min^{-1}), tj. počet generací za časovou jednotku, a její převrácená hodnota ($1/c$) dobu zdvojení T (min), což je doba, za níž se počet buněk zdvojnásobí.



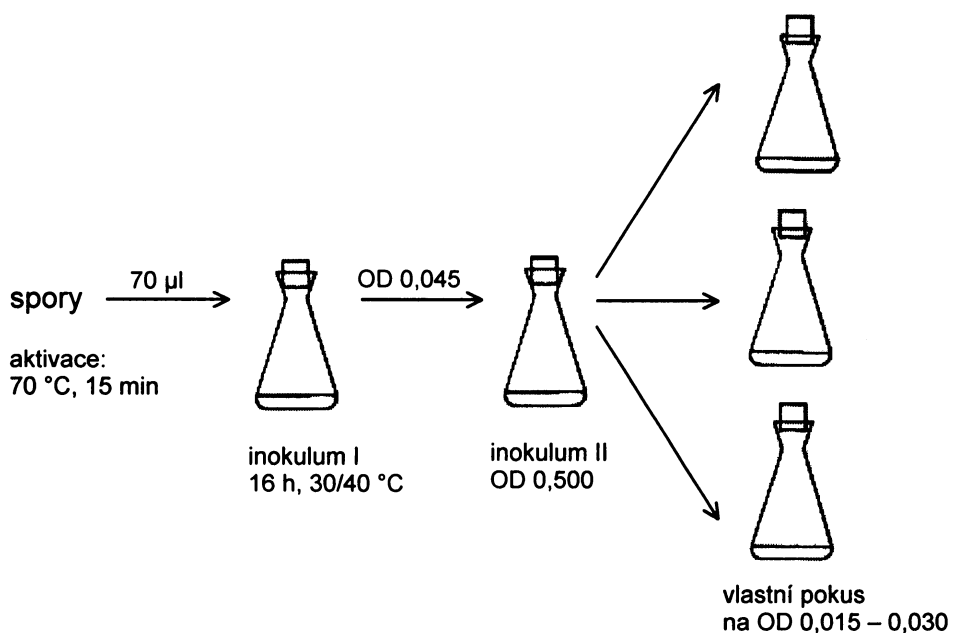


Schéma č. 1 Kultivace *B. subtilis* – schéma pokusu

4.7.4 Stanovení počtu (koncentrace) živých buněk výsevem na plotny

Počet živých buněk v analyzovaném vzorku (kultuře) se stanovuje vysetím známého objemu suspenze bakterií na agarovou plotnu a spočítáním vyrostlých kolonií po inkubaci v termostatu (za živou bakteriální buňku je považována zpravidla taková buňka, která je schopná růstu a množení). Tato metoda vychází z předpokladu, že jedna kolonie pochází z jedné buňky, přesněji je tato metoda tedy nazývána stanovením tzv. colony forming unit (cfu).

Bakteriální kultura odebíraná v průběhu růstové křivky v daných časových intervalech byla ředěna sterilní destilovanou vodou a vyseta po 0,1 ml v suspenzi o koncentraci 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} na živné agary v Petriho miskách, a to vždy ve třech paralelách. Plotny byly inkubovány dnem vzhůru v termostatu při 30 °C. Po 24 hodinách byly spočítány vyrostlé kolonie na všech třech paralelních miskách daného ředění a byl vypočítán jejich průměr. Tato hodnota byla přepočítána na počet vegetativních buněk (cfu), popř. vegetativních buněk a spor dohromady, v 1 ml původní kultury.

Každý časový vzorek kultury byl současně inkubován při 70 °C po dobu 15 min, což představuje takové podmínky, které jsou schopné přežít pouze termostabilní spory. Dále byl již vzorek zpracován výše popsaným způsobem. Výsledky těchto výsevů podaly informaci o tom, kolik bylo v 1 ml původní bakteriální kultury přítomno termostabilních spor.

4.8 IZOLACE SURFAKTINU

Surfaktin byl izolován podle metody popsané SYMMANK *et al.* (2002). Tekutá bakteriální kultura o objemu 100 ml byla inkubována ve 30 °C a 120, resp. 175 rpm, po dobu 72 hodin. Po ukončení kultivace bylo pomocí koncentrované HCl upraveno pH kultury na pH 2. Následovala precipitace 1h ve 4 °C. Precipitát byl zcentrifugován (centrifuga K24 Janetzki, 12000 rpm, 20 min, 4 °C) a pelet resuspendován ve 25 ml redestilovaného metanolu chemické čistoty p.a. Extrakce probíhala 2 h při laboratorní teplotě a třepání při 250 rpm. Extrakt byl centrifugován 15 min při 14000 rpm (centrifuga K24 Janetzki) a supernatant byl dále přefiltrován přes filtrační aparaturu Whattman (filtry GF/C o průměru 25 mm). Materiál zachycený na filtru byl ještě promyt 5 ml metanolu a oba filtráty byly spojeny. Spojený filtrát byl odpařen na rotační vakuové odparce na vodní lázni při 30 °C. Na stěnách odpařovací srdcové baňky bylo možné pozorovat mléčný zákal čistého surfaktinu.

4.9 STANOVENÍ KONCENTRACE SURFAKTINU

4.9.1 Test hemolýzy

Jedním z účinků surfaktinu vyplývajících z jeho schopnosti interagovat s cytoplazmatickou membránou a působit její permeabilizaci a perturbaci je i účinek hemolytický. Tento fenomén byl testován na krevních agarech (kapitola 4.3.4).

V daných časových intervalech kultivace byly odebírány vzorky bakteriální suspenze, které byly inkubovány s lysosymem při teplotě, ve které probíhala kultivace, dokud neproběhla lyze buněk. Kapka lyzátu daného vzorku o objemu 10 µl byla poté nanesena na povrch krevního agaru. Po zaschnutí následovala inkubace v termostatu

v teplotě shodné s teplotou kultivační. Kvalitativní výsledek hemolýzy byl odečítán po 24 hodinách.

4.9.2 Stanovení koncentrace surfaktinu pomocí BCA

Stanovení je založeno na reakci aminokyselin a peptidických vazeb mezi nimi s měďnatými ionty, které jsou redukovány na ionty měďné, které dále reagují s BCA (bicinchoninic acid, BCA) za vzniku barevného komplexu s vysokým molárním extinkčním koeficientem při 562 nm. Použité reakční činidlo (kapitola 4.2) je připraveno z produktů firmy Pierce. Koncentrace surfaktinu byla odečítána z kalibrační křivky standardu surfaktinu (Sigma) rozpuštěném v metanolu.

Zkumavky s 5 μ l metanolového izolátu surfaktinu byly doplněny na 50 μ l destilovanou vodou. Ke každému vzorku byl přidán 1 ml pracovního roztoku a reakční směs byla inkubována 30 min při 37 °C. Po ochlazení na pokojovou teplotu byla měřena absorbance při 562 nm na spektrofotometru Beckman (10 mm kyvety). Slepý vzorek (blank) byl zpracován jako ostatní vzorky, pouze místo surfaktinového izolátu byl použit čistý metanol. Koncentrace surfaktinu byla stanovena pomocí rovnice kalibrační přímky, která byla zpracována analogickým způsobem jako vzorky. Namísto surfaktinového izolátu byl použit metanolový roztok standardu surfaktinu (Sigma) o koncentracích 3,75; 7,5; 15; 30; 45; 62,5; 80 a 125 μ g/5 μ l.

4.9.3 Kapalinová chromatografie kombinovaná s hmotnostní spektrometrií (LC/MS)

Pro detekci surfaktinu v bezbuněčném filtrátu kultury byla použita metoda vysokoučinné kapalinové chromatografie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), ve které je dosahováno vysoké účinnosti separačního procesu použitím kolon naplněných stacionární fází o malé a dobře definované velikosti částic. Separační kolony pro HPLC se vyznačují vysokou hustotou a homogenitou náplně stacionární fáze a tedy i velkým hydrodynamickým odporem. Pro dosažení dostatečného průtoku mobilní fáze (řádově ml/min) je nutno aplikovat přetlak jednotek až desítek MPa.

Tok mobilní fáze je zajišťován vysokotlakým čerpadlem. Přesně definovaný objem vzorku musí být nastříknut do proudu mobilní fáze protlačované kolonou pod velkým tlakem.

Pro detekci byla použita metoda hmotnostní spektrometrie. Hmotnostní spektrometr umožňuje přímou identifikaci látky vycházející z kolony na základě získaných hmotnostních spekter. Hmotnostní spektrum je závislostí množství vzniklých fragmentů na hodnotě m/z (hmotnost/náboj, m/z). Molekuly látky jsou převedeny do plynné fáze a ionizovány nejčastěji nárazem elektronů. Vzniklé ionizované fragmenty jsou urychleny elektrickým polem a rozštěpeny na soubor fragmentů lišících se poměrem hmotnosti vzniklého iontu a počtem elementárních nábojů, které nese. Rychlost, kterou fragmenty získají, závisí na jejich hmotnosti, přesněji na poměru m/z . Druhy vzniklých fragmentů jsou pro danou látku charakteristické a umožňují její identifikaci. K dělení iontů dochází v kvadrupolovém analyzátoru, a to podle poměru m/z . Součástí přístroje je zesilovač signálu, který umožňuje počítačové vyhodnocení.

K měření byl použit systém HPLC Agilent 1100 s kolonou Watrex WRP-18 (délka 250 mm, vnitřní průměr 4 mm, velikost částic 7 μm) spojený s hmotnostním spektrometrem Finnigan INCOS 50. Pro izokratickou eluci byla použita mobilní fáze: voda + 3,8 mM trifluoroctová kyselina (TFA) v poměru 85%:15% (v/v), průtoková rychlost 0,6 ml/min. Velikost vzorku 20 μl . Detegovány byly ionty s m/z 1008, m/z 1022 a m/z 1036 (izoformy surfaktinu C-13, C-14 a C-15). Jako standard byl použit čistý surfaktin (Sigma) rozpuštěný v metanolu. Záznamy byly zpracovány počítačovým programem Bruker Daltonics Data Analyses 3.0.

4.10 IZOLACE A ANALÝZA LIPIDOVÉ FRAKCE

Z bakterií v daných časových intervalech kultivace ve 30 °C byla izolována lipidová frakce metodou popsanou RADINEM (1981). V některých krocích byly použity modifikace potřebné pro izolaci z bakteriálních buněk.

4.10.1 Izolace lipidové frakce

Růst bakterií byl ukončen v dané fázi růstu filtrací (3. h) s použitím vodní vývěvy (filtry Synpor č. 5, velikost pórů 0,6 μm) nebo centrifugací (7., 12., 24. a 72. h) v teflonových centrifugačních zkumavkách Oak Ridge (30 ml) 20 min při 4300 rpm (centrifuga CL3R). Objemy kultur činily pro izolaci ze 3. h 400 ml (analýza mastných

kyselin pomocí GC/MS), resp. 300 ml (analýza fosfolipidů pomocí TLC), a 100 ml pro izolaci z časů 7, 12, 24 a 72 hodin. Biomasa bakterií zachycená na filtru byla pomocí podložního skla a skleněné tyčinky přenesena do 50 ml ledového extrakčního roztoku hexan-isopropanolu 3:2 (v/v) umístěného v kádince v ledové lázni (18 ml/g suché biomasy). Biomasa byla poté resuspendována skleněnou tyčinkou na jemně dispergovanou suspenzi. Pelet biomasy po centrifugaci byl resuspendován přímo v centrifugační zkumavce a převeden do kádinky. Směs byla míchána 2h na magnetické míchače ve 4 °C a poté přes noc extrahována v -20 °C.

Lipidový extrakt byl od sedimentu oddělen centrifugací (5 min, 3000 g, 0 °C, centrifuga CL3R) a přenesen do srdcové odpařovací baňky. Supernatant byl odpařován na rotační vakuové odparce na vodní lázni při 40 °C. Po odpaření směsi hexan-isopropanolu byla lipidová frakce rozpuštěna v 10 ml chloroformu a přefiltrována přes filtrační aparaturu Whattman (filtry GF/C o průměru 25 mm). Materiál zachycený na filtru byl ještě promyt 5 ml chloroformu a oba filtráty spojeny. Takto byly odstraněny nelipidové komponenty nerozpustné v chloroformu.

Chloroform byl opět odpařen na rotační vakuové odparce při 40 °C. Lipidová frakce byla rozpuštěna v 1 ml chloroformu a roztok byl převeden do zkumavky. Srdcová baňka byla ještě jednou promyta 0,5 ml chloroformu a roztok byl opět převeden do zkumavky, která byla před použitím vypláchnuta chloroformem a zvážena. Odpařením chloroformu proudem dusíku byla získána čistá lipidová frakce. Po zvážení na analytických vahách byla uchována do doby použití v exsikátoru při -20 °C. Čistá lipidová frakce měla barvu a konzistenci světlého medu.

Veškerá organická rozpouštědla (hexan, isopropanol, chloroform) byla chemické čistoty p.a. a před použitím redestilována. Nádobí potřebné během izolace bylo před použitím omyto extrakčním roztokem, resp. chloroformem.

4.10.2 Analýza lipidových extraktů chromatografií na tenké vrstvě

Chromatografie na tenké vrstvě (Thin Layer Chromatography, TLC) je separační metoda, kde k dělení látek dochází na styku dvou fází – stacionární a mobilní. Stacionární fáze byla realizována tenkou vrstvou silikagelu (0,25 mm), mobilní fáze směsí rozpouštědel o různé polaritě (chloroform-metanol-voda, 65:25:4, v/v/v). Směs rozpouštědel vzlíná po vrstvě silikagelu, který je velmi hydrofilní. Na styku stacionární a

mobilní fáze dochází ke vzniku další, tzv. kotvené fáze. Tato fáze je obohacena o polární složky ze vzlínající směsi (vodu a metanol). Pokud směs dosáhne místa, kde je směs fosfolipidů, fosfolipidy se okamžitě rozpustí do mobilní fáze a putují se vzlínající směsí. Všechny však neputují stejně rychle – nejméně polární mají tendenci zůstat v mobilní fázi a putují s čelem směsi. Ty nejvíce polární naopak mají tendenci rozpouštět se i v kotvené fázi a zaostávají. Dělení probíhá na základě rozdílů mezi rozdělovacími koeficienty fosfolipidů v systému mobilní/kotvená fáze. Rovněž sama pevná fáze může mít afinitu k fosfolipidům a při dělení se uplatní i druhý princip – fosfolipidy se budou dělit na základě rozdílných adsorpčních koeficientů. Při TLC se většinou uplatňují principy oba.

Analýza lipidové frakce chromatografií na tenké vrstvě probíhala v laboratoři Doc. RNDr. Olgy Novákové, CSc. na Katedře fyziologie živočichů Přírodovědecké fakulty UK Praha.

4.10.2.1 Příprava chromatografických desek

Pro analýzu lipidových extraktů bylo použito Silikagelu G (Merck) naneseného na skleněné desky o rozměrech 20 x 20 x 0,4 cm. Desky byly před nanesením omyty saponátem, opláchnuty destilovanou vodou a etanolem. Vždy na pět desek najednou bylo nanášelem naneseo 30 g Silikagelu G rozpuštěného v 62 ml destilované vody. Síla nanesené vrstvy byla 0,25 mm. Po oschnutí byly desky do doby použití uschovány ve stojanu.

4.10.2.2 Jednorozměrná chromatografie na tenké vrstvě

Deska s tenkou vrstvou Silikagelu G byla 30 min aktivována při 110 °C. Poté byla vyjmuta a ihned vložena do exsikátoru, dokud nevychladla. Mezitím byly rozpuštěny lipidové extrakty v 80 µl chloroformu a byla připravena dělicí směs (chloroform-metanol-voda, 65:25:4, v/v/v), která byla nalita do chromatografické komory umístěné v digestoři, aby komoru svými parami do začátku pokusu prosytila. Po vychladnutí byl na desku nanášen lipidový extrakt. Na stopu byl nanášen veškerý lipidový extrakt v případě vzorku ze 3. h kultivace a $\frac{3}{4}$ vzorku z ostatních časových intervalů. Rozdělení lipidového extraktu na dráze o délce 16 cm probíhalo 60 – 70 min. Poté, co dělicí směs dosáhla čela, byla deska z komory vyjmuta a ponechána oschnout v digestoři.

Jednotlivé třídy fosfolipidů byly detegovány parami jodu (STAHL 1969) reagujícími v místě výskytu mastných kyselin vznikem žlutohnědého zbarvení různé intenzity. Lokalizace fosfolipidů obsahujících aminoskupiny v polárních hlavičkách byla zjištěna nastříkáním desky 0,2% roztokem ninhidrinu (0,2 g ninhidrinu + 95 ml butanolu + 5 ml kyseliny octové). Následnou aktivací 30 min při 105 °C došlo v místě výskytu $-NH_2$ skupin k vytvoření růžového zbarvení.

Identifikace hlavních fosfolipidových tříd byla provedena na základě výsledků popsaných v literatuře (LINDGREN *et al.* 1977), na základě výsledků s ninhidrinem a stanovením anorganického fosfátu. Pro upřesnění identifikace fosfolipidových tříd bakterií bylo užito lipidového extraktu ze svalových buněk srdce krys linie BK2. Pořadí jednotlivých tříd fosfolipidů po rozdělení je pro tento materiál známa. Extrakt ze svalových buněk byl nanášen s lipidovou frakcí z bakterií současně.

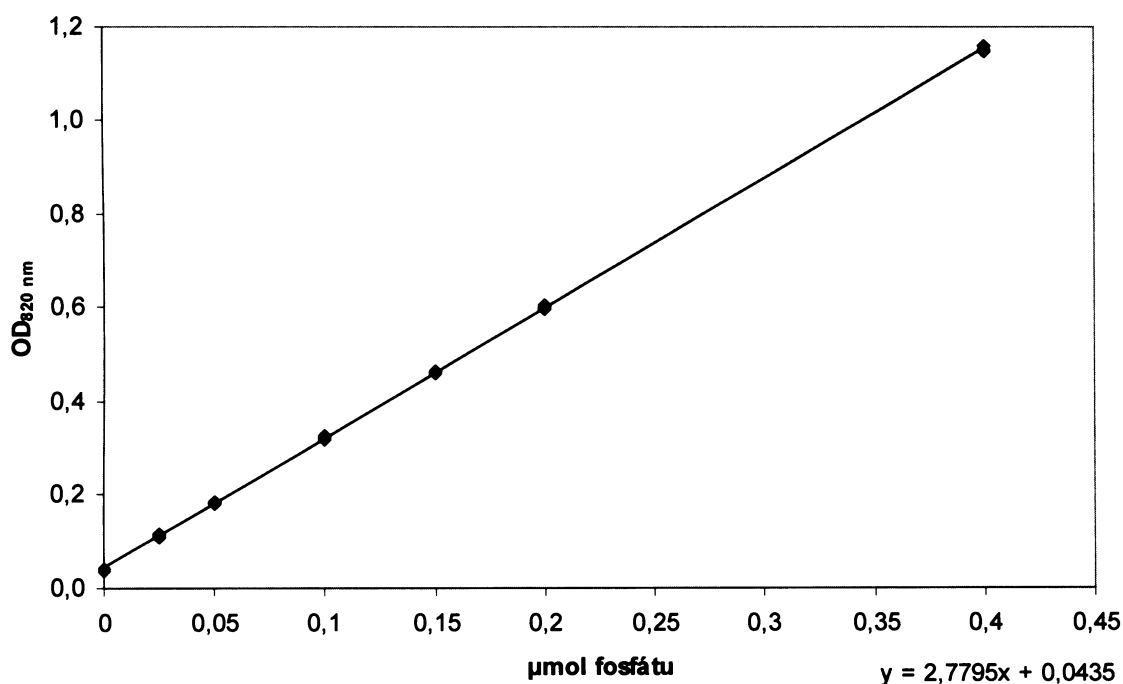
4.10.2.3 Kvantitativní stanovení lipidického fosforu

Stanovení lipidického fosforu bylo provedeno metodou, kterou popsali ROUSER a YAMAMOTO (1970). Silikagel obsahující detegované fosfolipidy byl kvantitativně převeden do čistých skleněných zkumavek, které byly navíc předem postupně pětkrát vypláchnuty tekoucí a destilovanou vodou a vysušeny. Vzorky byly poté mineralizovány přidáním 0,5 ml koncentrované (70%) $HClO_4$ a zahřáním na 180 °C po dobu 20 minut. Ke vzorkům byly dále přidány 3,5 ml destilované vody a 0,5 ml 2,5% (w/v) molybdenanu amonného. Po důkladném promíchání bylo přidáno 0,5 ml 10% roztoku (w/v) kyseliny askorbové, který byl připraven těsně před pokusem, a směs byla opět důkladně promíchána. Reakční směs byla zahřívána 5 min při 100 °C na vodní lázni a po ochlazení na laboratorní teplotu byla ponechána stát do druhého dne, aby silikagel sedimentoval.

Extinkce barevné reakce (fosfomolybdenová modř) byla měřena při 820 nm na spektrofotometru Spekol 11 (10 mm kyvety). Jako slepý vzorek byla použita reakční směs s čistým silikagelem. Skutečný obsah anorganického fosfátu v jednotlivých skvrnách byl stanoven přepočtem pomocí rovnice kalibrační přímky standardu 0,2 μM zásobního roztoku fosfátu ($KH_2PO_4 - K_2HPO_4$). Při výpočtu procentuálního zastoupení bylo jako 100% vzato celkové množství fosforu přítomné ve všech skvrnách vzniklých dělením příslušného vzorku.

Kalibrační přímka:

μmol fosfátu	roztok fosfátu (ml)	voda (ml)
0	0	7,0
0,025	0,125	6,875
0,050	0,250	6,750
0,100	0,500	6,500
0,150	0,750	6,250
0,200	1,0	6,0
0,400	2,0	5,0

**Obr. 10 Kalibrační přímka závislosti optické denzity na koncentraci P (μmol)**

Každý bod přímky byl stanovován v tripletu. Postup zpracování byl shodný jako u ostatních vzorků pouze bez mineralizačního kroku. Slepý vzorek – reakční směs bez fosfátu.

4.10.3 Plynová chromatografie kombinovaná s hmotnostní spektrometrií

Analýza lipidové frakce izolované metodou popsanou v kap. 4.10.1 byla prováděna pomocí plynové chromatografie (Gas Chromatography, GC) kombinované s hmotnostní spektrometrií (Mass Spectrometry, MS). Kombinací GC s MS je dosaženo vysoké separační schopnosti i složitějších směsí biologického materiálu a citlivé identifikace jednotlivých látek hmotnostním spektrometrem, který vyžaduje čisté chemické individuum.

Plynová chromatografie je jednou z neúčinnějších separačních metod malých množství organických látek. Lze ji využít jak pro kvalitativní, tak i pro kvantitativní stanovení látek. Analyzovaná látka musí splňovat podmínku těkavosti a dostatečné tepelné stability. Molekuly s velkou relativní hmotností a polárními skupinami nejsou pro svou nízkou těkavost pro GC vhodné a je nutné je nejprve převést na těkavé produkty procesem derivatizace - mastné kyseliny se derivatizací převádějí na jejich methylestery. Při derivatizaci se používají různá methylační činidla např. 2% H₂SO₄ v methanolu, methoxid sodný s HCl v methanolu nebo tetramethylamoniumhydroxid.

Metoda hmotnostní spektrometrie byla popsána v kapitole 4.9.3. K měření byl použit plynový chromatograf Varian 3400 (kapilární kolona DB5, 30 m x 0,25 mm, tloušťka filmu 0,12 μl; nosný plyn He 70 kPa) spojený s hmotnostním spektrometrem Finnigan INCOS 50. Teplotní program - počáteční isoterma 80 °C 2 minuty, programovaný nárůst teploty (12 °C/min), konečná izoterma 250 °C 20 minut. Záznamy byly zpracovány počítačovými programy ProLab Resources (verze 3.10.00).

Derivatizace (příprava methylesterů):

1. Derivatizační aparaturu promýt methanolem, vysušit pistolí.
2. Lázeň zahřát na konstantních 70 °C.
3. Vzorek rozpustit v 1 ml methanolu, přelit do varné baňky a přidat činidla: 0,5 ml methoxidu sodného + 0,5 ml 10% BCl₃ (přidat míchadélko).
4. Reakční směs zahřívat pod efluxem 30 minut.
5. Ochladit a přidat 1 ml nasyceného roztoku NaCl.
6. Převést do dělicí zkumavky vymyté hexanem, extrahovat do 1,5 ml hexanu.
7. Odebrat 2krát 0,1 ml vzorku do vzorkovnice (na jejím dně je několik zrnek bezvodého MgSO₄ – vysušení vody).

Vlastní analýza:

1. Objem vzorku (0,3 – 0,4 μl) nasát stříkačkou Hamilton.
2. Provést nástřik do injektoru, odstartovat analýzu (všechny látky míjí kolonu do třiceti minut, mastné kyseliny v rozmezí 13 – 18 minut).

3. Určení mastných kyselin srovnáním se standardy (směs mastných kyselin od firmy Supelko) – podle retenčních časů a hmotnostních spekter.

4.11 IZOLACE CYTOPLAZMATICKÝCH MEMBRÁN

Pro izolaci membránové frakce z bakterií rostoucích v živném bujónu ve 30 °C byla použita enzymatická metoda (BISSCHOP a KONINGS 1976). Při tomto izolačním postupu vznikají membránové váčky s proteiny orientovanými stejným směrem jako v buňce, tedy dovnitř těchto váčků (orientace right side – in).

4.11.1 Metoda podle BISSCHOPA a KONINGSE – „enzymatická metoda“

1. Růst buněk v dané fázi růstu byl ukončen filtrací (3. h) s použitím vodní vývěvy (filtry Synpor č. 5, velikost pórů 0,6 µm) nebo centrifugací (7., 12., 24. a 72. h) v plastových centrifugačních zkumavkách Falkon (50 ml) 20 min při 4300 rpm (centrifuga CL3R). Objemy kultur činily pro izolaci ze 3. h 400 ml a 200 ml pro izolaci z časů 7, 12, 24 a 72 hodin. Biomasa buněk byla 2x promyta 50 mM fosfátovým pufrům (pH 8,0) o stejné teplotě, v jaké probíhala kultivace (30 °C); buňky nesmí na filtru vyschnout. Biomasa byla ihned zamrazena v tekutém dusíku a do doby zpracování byla uchována v -78 °C.
2. Biomasa byla rozmrazena mnutím v dlaních, průběžně byla odkládána na led. Rozmražená biomasa byla resuspendována v 5 ml 50 mM fosfátového pufru (pH 8,0) na koncentraci 4 mg vlhké váhy na 1 ml, převedena do kádinky a bylo přidáno 50 µl (3 h), resp. 150 µl (7, 12, 24 a 72 h) PMSF/10 ml suspenze (100 mM roztok phenylmethylsulfonylfluoridu (PMSF, Serva) v isopropanolu).
3. Přidán lysosym (Sigma), deoxyribonukleáza I (roztok DNAsy I; Sigma) a ribonukleáza (roztok TRN; Sigma) na konečné koncentrace 300, 10 a 10 µg/ml (3 h), resp. 600, 25 a 25 µg/ml (vzorky ze 7., 12., 24. a 72. h); obsah kádinky intenzivně promíchán.
4. Přidáno 500 mM MgSO₄ na konečnou koncentraci 10 mM a 5 ml 50 mM fosfátového pufru pH 8,0.
5. Inkubace 60 - 90 minut ve 30 °C.
6. Přidána K⁺ - EDTA na konečnou koncentraci 15 mM.

7. Inkubace 1 minutu ve 30 °C.
8. Přidáno 500 mM MgSO₄ na konečnou koncentraci 10 mM.
9. Centrifugace při 12 000 rpm po dobu 60 min na centrifuze Beckman (4 °C, vakuum, rotor SW 41).
10. Získaný sediment byl resuspendován v membránovém 100 mM fosfátovém pufru o pH 6,6 na koncentraci 10 mg membránových proteinů/ml a rozplněn do plastických mikrozkušavek Eppendorf po 50 a 100 µl.
11. Vzorky byly uchovány při -78 °C v hlubokomrazícím boxu značky Heraeus.

Ve vzorcích byla stanovena koncentrace bílkovin pomocí BCA (viz 4.12). Vzorky byly použity k analýze spektra proteinů polyakrylamidovou gelovou elektroforézou (kapitola 4.13) a měření rovnovážné anisotropie fluorescenční sondy DPH (kapitola 4.14).

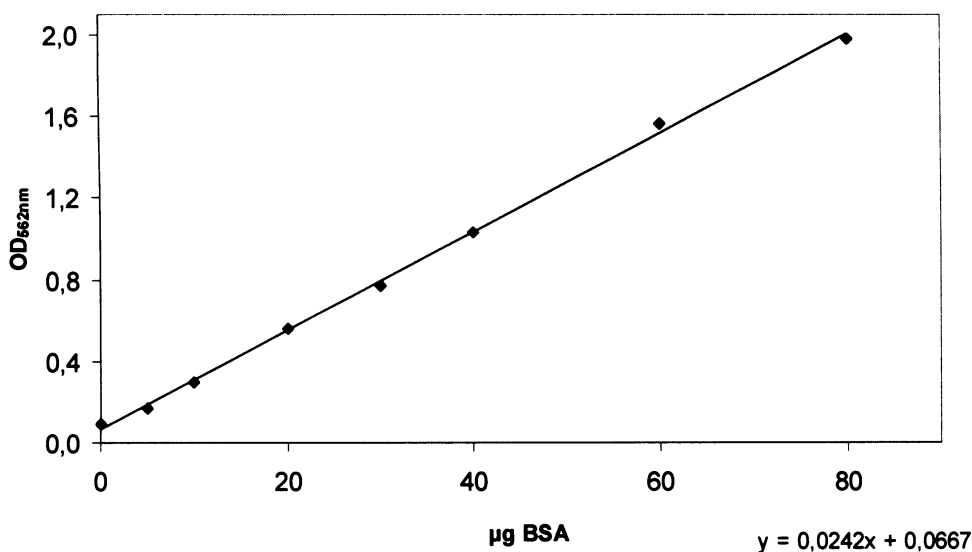
4.12 STANOVENÍ KONCENTRACE BÍLKOVIN POMOCÍ BCA

Stanovení je založeno na reakci proteinů s měďnatými ionty, při které vznikají ionty měďné, které dále reagují s BCA (bichoninic acid, BCA) za vzniku barevného komplexu s vysokým molárním extinkčním koeficientem při 562 nm. Reakce je vysoce citlivá, specifická a toleruje přítomnost mnoha komponent různých pufrů, složek kultivačních médií nebo detergentů. Použité reakční činidlo je připraveno z produktů firmy Pierce. Koncentrace proteinů je odečítána ze standardní kalibrační křivky s BSA.

Postup zpracování vzorků byl analogický jako v kapitole 4.9.2. Koncentrace bílkovin byla stanovena pomocí kalibrační přímky, která byla zpracována jako vzorky. Místo proteinů byl použit vodný roztok BSA o různých koncentracích.

Kalibrační přímka:

µg BSA	µl BSA	µl vody
0	0	50
5	2,5	47,5
10	5	45
20	10	40
30	15	35
40	20	30
60	30	20
80	40	10



Obr. 11 Kalibrační přímka stanovení koncentrace bílkovin pomocí BSA
Závislost optické denzity na koncentraci BSA.

4.13 POLYAKRYLAMIDOVÁ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA BÍLKOVIN

K analýze spektra bílkovin, které se exprimují za daných kultivačních podmínek v membráně *B. subtilis*, se používá polyakrylamidová gelová elektroforéza. V jednorozměrných polyakrylamidových gelech dochází k rozdělení proteinů podle relativní molekulové hmotnosti (M_r) v přítomnosti laurylsulfátu sodného (SDS).

4.13.1 Jednorozměrná (1D) elektroforéza

Pro analýzu spektra proteinů cytoplazmatické membrány izolovaných z buněk ve 3., 7., 12., 24. a 72. h kultivace byla používána polyakrylamidová gelová elektroforéza za přítomnosti laurylsulfátu sodného (SDS–PAGE) podle Laemmliho (LAEMMLI 1970).

Ve vzorkovém pufru byl solubilizován vzorek bakteriálních membrán o známé koncentraci bílkovin (k jednomu objemu vzorku byl přidán jeden objem vzorkového pufru). Solubilizace probíhala při 100 °C po dobu 5 min. Solubilizovaný vzorek byl poté nanesen na gel v takovém množství, aby v jedné dráze bylo 75 µg proteinů. Zbytky proteinových vzorků byly uchovány v mikrozkušavkách Eppendorf při -78 °C v hlubokomrazicím boxu značky Heraeus.

Pro rozlišení spektra stresových bílkovin *B. subtilis* byly použity gely obsahující akrylamid v koncentraci 7,5 a 12,5%, koncentrace zaostřovacího gelu byla ve všech případech 4%. Gel 7,5% byl použit pro lepší rozlišení a zaostření proteinů v oblasti vysokých molekulových hmotností.

Paralelně s neznámými vzorky byla na gely (7,5% a 12,5%) nanesena směs proteinových standardů molekulových hmotností Mr 97 000, 66 000, 45 000, 30 000, 20 100 a 14 400. Tyto proteinové standardy byly připraveny stejným postupem jako vzorky membrán *B. subtilis*.

Vlastní elektroforéza na aparatuře Gibco (gel 12 x 16 cm) probíhala za konstantního napětí 170 V po dobu asi 4 hodin při pokojové teplotě (proud na startu 80 mA a 20 mA na konci elektroforézy; 0,75 mm tlustý gel). Po rozdělení proteinů (čelo obarvené bromfenolovou modří vyputovalo z gelu) byly gely obarveny barvicím roztokem.

4.13.2 Detekce proteinů Coomassie R – 250

Jednorozměrné gely byly barveny Coomassie R-250 (barvicí roztok), což dovoluje detekci řádově µg proteinů. Barvení probíhalo přes noc (16 hodin) při pokojové teplotě za mírného třepání na orbitální třepače. Odbarvení pozadí odbarvovacím roztokem trvalo 5 – 7 hodin v závislosti na koncentraci gelu.

Před sušením byly gely ponechány v sušícím roztoku po dobu 45 min, aby se zabránilo jejich popraskání. Vlastní sušení probíhalo na sušičce gelů Bio-Rad 2 hodiny při 72 °C.

Vyhodnocení získaných gelů bylo prováděno pomocí stolního scanneru HP ScanJet 4400 C a počítačového programu Quantity One. Získané relativní hodnoty intenzity proteinových pruhů byly z programu Quantity One převedeny do programu Microsoft Excel 6.0, kde bylo provedeno grafické srovnání spekter proteinů v daných vzorcích.

4.14 ANISOTROPIE FLUORESCENCE SONDY DPH

Pro stanovení změn v mikroviskozitě membrán, které byly izolovány v daných časových intervalech z bakterií kultivovaných v živném bujónu ve 30 °C, byla použita metoda SHINITZKÉHO a BARENHOLZE (1974, 1978), kteří odvodili vztah mezi mikroviskozitou a polarizací fluorescence sondy. V tomto případě byla použita hydrofóbní fluorescenční sonda 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien (DPH), která se při styku s membránou lokalizuje v oblasti řetězců mastných kyselin fosfolipidů. Metoda byla popsána v práci LAKOWICZE (1983) a KONOPÁSKA (1992).

4.14.1 Měření anisotropie fluorescence sondy DPH

Získaná membránová frakce byla naředěna 25 mM Tris-HCl (pH 7,0) na koncentraci 75 µg proteinů/ml, poté značena DPH (finální koncentrace 10^{-6} M) při laboratorní teplotě. Inkubace s DPH trvala 30 minut při 37 °C.

Měření bylo prováděno na spektrofluorometru Fluoromax 3 v křemenných kyvetách o rozměrech 1 x 1 cm. Vzorky byly před vlastním měřením temperovány na požadovanou teplotu 30, resp. 40 °C. Kyvetový prostor byl temperován pomocí průtokového termostatu. Teplota byla měřena termistorovým teploměrem. Vlnová délka excitačního světla byla 360 nm a emitovaného záření 450 nm. Excitované světlo bylo polarizováno horizontálně nebo vertikálně, emitované světlo bylo snímáno ve směru kolmém ke směru excitace.

Na prvním kanálu byla měřena intenzita emitovaného světla polarizovaného vertikálně (I_{\parallel}) a na druhém kanálu intenzita světla polarizovaného horizontálně (I_{\perp}). K výpočtu anisotropie fluorescence bylo použito následujících vztahů mezi intenzitami I_{\parallel} a I_{\perp} – polarizace fluorescence P a anisotropie fluorescence r :

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} \quad r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}$$

Častěji používanou veličinou je anisotropie fluorescence. Pokud je měřena při kontinuálním osvětlení, označuje se jako r_{SS} (steady state anisotropy, ustálená anisotropie). Anisotropie r_{SS} je dnes nejčastěji používanou veličinou charakterizující dynamiku membránových komponent. V případě poměrového měření anisotropie platí:

$$r = \frac{I_{\parallel} / I_{\perp} - 1}{I_{\parallel} / I_{\perp} + 2}$$

5. VÝSLEDKY

Diplomová práce je zaměřena na studium adaptivních procesů odehrávajících se na úrovni cytoplazmatické membrány *Bacillus subtilis* ATCC 21332 v přítomnosti lipopeptidu surfaktinu, který tento kmen produkuje. S ohledem na kinetiku produkce surfaktinu byla odpověď *B. subtilis* na přítomnost této látky sledována v průběhu růstu počínaje 3. h kultivace, která odpovídá exponenciální fázi, kdy ještě surfaktin produkován není, a dále v časně (7 h) i pozdní fázi stacionární (12 h, 24 h, 72 h), kdy se koncentrace surfaktinu v médiu postupně zvyšuje.

Současně s kinetikou syntézy surfaktinu byly zkoumány změny relativního zastoupení jednotlivých fosfolipidových tříd cytoplazmatické membrány pomocí jednorozměrné chromatografie na tenké vrstvě (TLC). Spektrum jejich mastných kyselin bylo stanoveno metodou plynové chromatografie kombinované s hmotnostní spektrometrií. Izolované cytoplazmatické membrány byly dále podrobeny analýze membránových bílkovin jednorozměrnou polyakrylamidovou gelovou elektroforézou (1D SDS-PAGE). V neposlední řadě byly sledovány změny mikroviskozity membrány rovnovážnou fluorescenční spektroskopií.

5.1 RŮSTOVÁ CHARAKTERISTIKA *Bacillus subtilis* ATCC 21332

Diplomová práce byla provedena na kmeni *B. subtilis* produkujícím surfaktin, jehož obecná fyziologická charakteristika nebyla doposud popsána. Růstové parametry této bakterie byly sledovány v závislosti na třech proměnných: kultivační médium, teplota kultivace a míra aerace kultury.

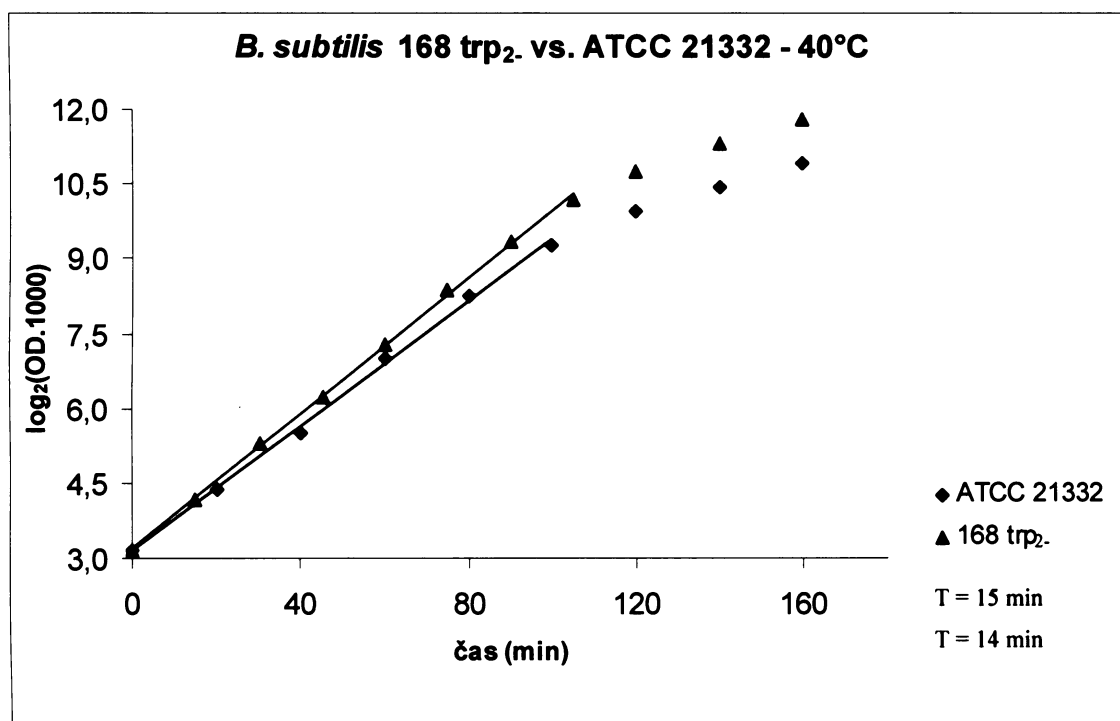
Všechny růstové experimenty byly prováděny podle stejného kultivačního protokolu. Tekutým nočním inokulem (16 h) zaočkovaným sporovou konzervou bylo očkováno ranní inokulum, a to použito po dosažení exponenciální fáze růstu k inokulaci vlastního pokusu.

B. subtilis ATCC 21332 byl kultivován jednak v živném médiu (Oxoid), které bakterii zajišťuje optimální podmínky pro růst, ale také v semisyntetickém Landyho médiu, které je naopak doporučováno jako vhodný kompromis mezi relativně vysokou růstovou rychlostí na jedné straně a vhodným prvkovým složením pro produkci lipopeptidů na straně druhé.

5.1.1 Růst *B. subtilis* ATCC 21332 ve 40 °C

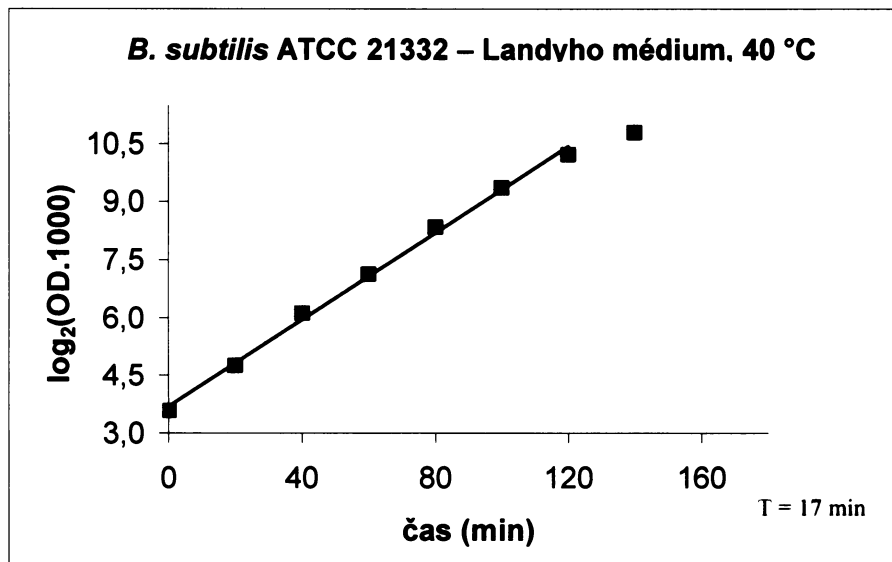
Cílem těchto pokusů bylo získat růstovou charakteristiku kmene *B. subtilis* ATCC 21332 za kultivační teploty 40 °C, ve které byla doposud v naší laboratoři standardně kultivována modelová bakterie *B. subtilis* 168 trp₂.

Růst obou kmenů (Obr. 12) byl sledován za aerobních podmínek s frekvencí třepání na orbitální třepačce 175 rpm v komplexním médiu (168 trp₂), resp. živném bujónu Oxoid (ATCC 21332). Růst kmene ATCC 21332 byl v této teplotě dále sledován také v Landyho médiu (Obr. 13).



Obr. 12 Srovnání růstu kmene *B. subtilis* 168 trp₂ (v komplexním médiu) a ATCC 21332 (v živném bujónu) ve 40 °C

Bakterie kmene *B. subtilis* 168 trp₂ rostly v inokulu s dobou zdvojení $T = 19$ min, ve vlastním růstu dále s $T = 14$ min. Bakterie kmene *B. subtilis* ATCC 21332 rostly v inokulu s dobou zdvojení $T = 24$ min, ve vlastním růstu dále s $T = 15$ min. Dané údaje jsou průměrem výsledků ze třech nezávislých růstových pokusů.



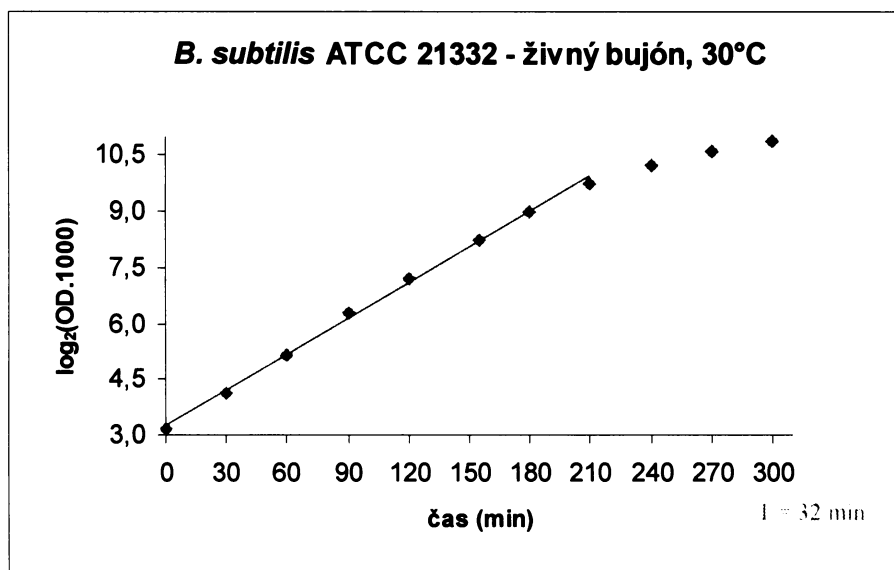
Obr. 13 Růst *B. subtilis* ATCC 21332 v Landyho médiu při 40 °C

Bakterie rostly v inokulu s dobou zdvojení $T = 42$ min, ve vlastním růstu dále s $T = 17$ min. Dané údaje jsou průměrem výsledků ze třech nezávislých pokusů.

Z uvedených růstových křivek je zřejmé, že oba kmeny *B. subtilis* rostou v komplexním médiu ve 40°C srovnatelnou růstovou rychlostí ($T = 15$ vs. 14 min) a do stacionární fáze přecházejí při cca. $OD_{420\text{ nm}} = 1,5$. V semisyntetickém Landyho médiu (minerální médium s 0,1% přidavkem kvasničného autolyzátu) je růstová rychlost opět poměrně vysoká ($T = 17$ min), nižších hodnot dosahuje pouze kultura inokula ($T = 42$ min).

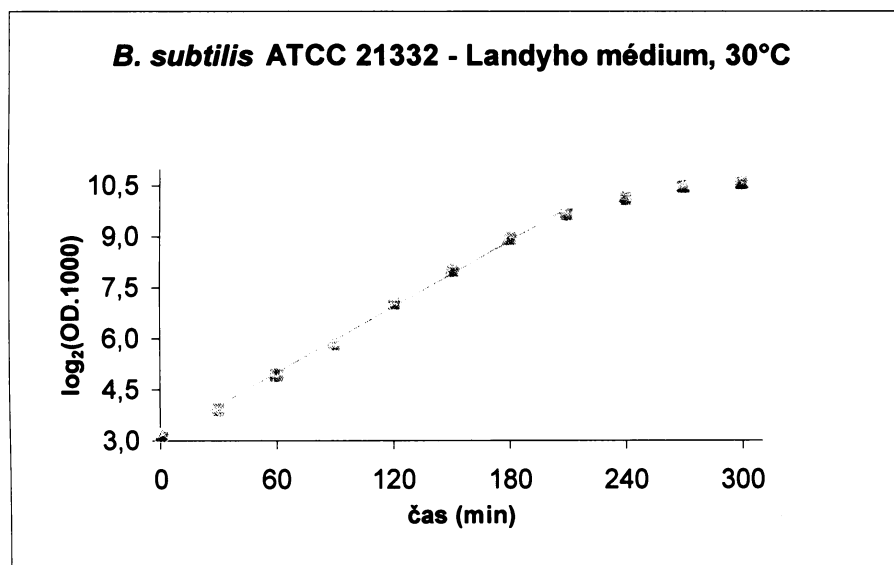
5.1.2 Růst *B. subtilis* ATCC 21332 ve 30 °C

Bakterie *B. subtilis* ATCC 21332 patří stejně jako kmen 168 trp₂ mezi mesofilní mikroorganismy, tento kmen má však, jak uvádí sbírka kultur American Type Culture Collection (ATCC), optimum posunuto do nižších hodnot teplotního rozmezí charakteristického pro tuto skupinu bakterií, a to na 30 °C. Tato teplota je i optimální pro syntézu lipopeptidů. Z uvedeného důvodu byly všechny následující experimenty prováděny při teplotě 30 °C.



Obr. 14 Růst *B. subtilis* ATCC 21332 v živném bujónu (Oxoid) ve 30 °C

Bakterie rostly v inokulu s dobou zdvojení T = 52 min, ve vlastním růstu dále s T = 32 min. Dané údaje jsou průměrem výsledků z pěti nezávislých kultivací.



Obr. 15 Růst *B. subtilis* ATCC 21332 v Landyho médiu ve 30 °C

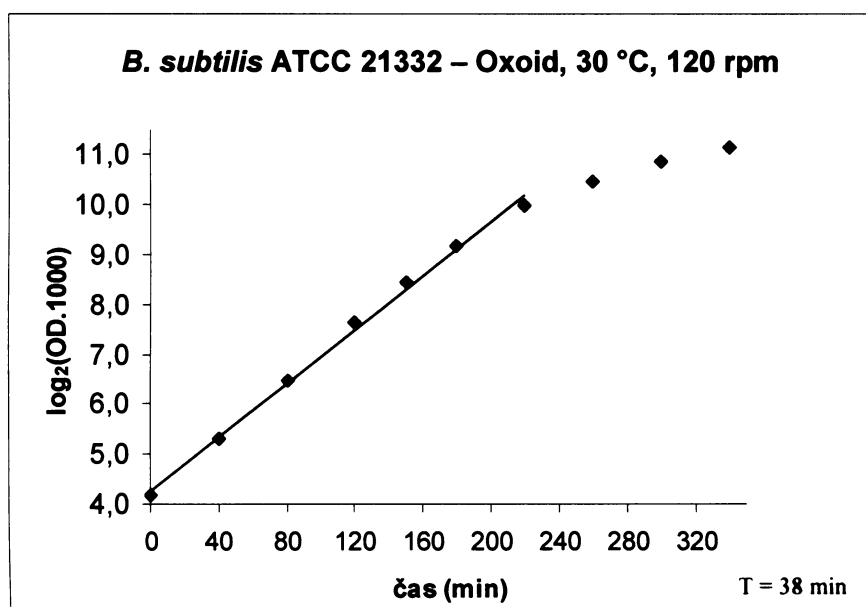
Bakterie rostly v inokulu s dobou zdvojení T = 64 min, ve vlastním růstu dále s T = 31 min. Dané údaje jsou průměrem výsledků ze třech nezávislých kultivací.

Růstová rychlost *B. subtilis* ATCC 21332 v živném bujónu ve 30 °C (Obr. 14) je shodná s kmenem 168 trp₂- kultivovaným v komplexním médiu - doba zdvojení je v obou případech T = 32 min (není ukázáno). Ani při kultivaci na Landyho médiu (Obr. 15) se růstová rychlost prakticky nemění - T = 31 min, v obou případech přecházely kultury do

stacionární fáze při $OD = 1,4 - 1,5$. Shodná růstová rychlost kmene ATCC 21332 na obou médiích naznačuje, že ani jedno z médií nelimituje růst. Menší výživnost Landyho média se projevuje pouze na vyšší době zdvojení kultury v inokulu ($T = 64$ min).

5.1.3 Růst *B. subtilis* ATCC 21332 při nižší aeraci

Doposud získané růstové výsledky byly dosaženy při aeraci tekutých kultur na orbitální třepače při 175 rpm. V rámci optimalizace kultivačního protokolu za účelem zvýšení výtěžku surfaktinu byla míra aerace snížena na 120 rpm. Odborná literatura v této souvislosti uvádí, že limitace kyslíkem, která vede ke snížení oxidativních procesů buňky (především snížená aktivita enzymů Krebsova cyklu), způsobuje nárůst koncentrace surfaktinu (JENNY *et al.* 1993, SYMMANK *et al.* 2002).



Obr. 16 Růst *B. subtilis* ATCC 21332 v živném bujónu ve 30 °C při 120 rpm

Bakterie rostly v inokulu s dobou zdvojení $T = 50$ min, ve vlastním růstu dále s $T = 38$ min. Dané údaje jsou průměrem výsledků z pěti nezávislých kultivací.

Jak uvádí Obr. 16, bakteriální kultura inokula roste při snížené aeraci (120 rpm) téměř shodnou růstovou rychlostí jako při 175 rpm ($T_{120 \text{ rpm}} = 50$ min vs. $T_{175 \text{ rpm}} = 52$ min). Limitace kyslíkem se do růstové rychlosti promítá až v dalším růstu, kdy se doba zdvojení prodlužuje z $T = 32$ min při 175 rpm na $T = 38$ min při 120 rpm. Při tomto schématu kultivace bylo dbáno na to, aby maximální množství kultury v kultivační Erlenmayerově baňce činilo nanejvýš 10% jejího celkového objemu.

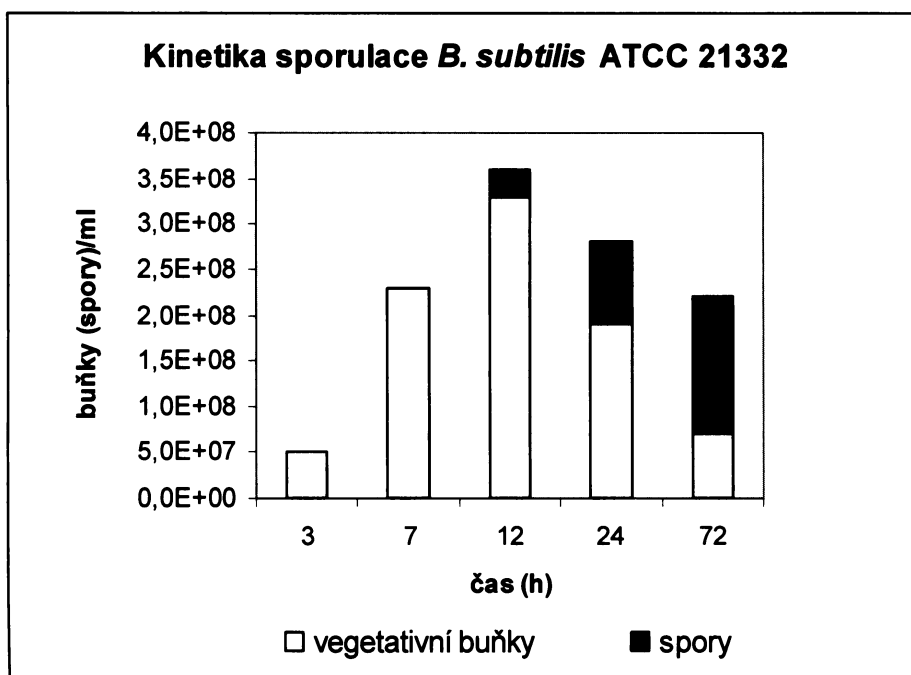
5.2 STANOVENÍ POČTU ŽIVÝCH BUNĚK (COLONY FORMING UNIT) *Bacillus subtilis* ATCC 21332

Bacillus subtilis jako sporující bakterie zahajuje za nepříznivých podmínek (stacionární fáze) proces sporulace, který trvá asi 8 -10 hodin. Tato fáze růstu je však také fází, kdy vegetativní buňky syntetizují sekundární metabolity, a tedy i surfaktin. Cílem této experimentální kapitoly bylo tedy sledování časového průběhu sporulace po celou dobu dlouhodobé kultivace trvající celkem 72 h, kdy je bakteriální kultura složená ze směsi spor a vegetativních buněk.

Pro realizaci tohoto cíle byla použita metoda stanovení tzv. colony forming unit (cfu) založená na principu, že z každé jednotlivé buňky, resp. spory, vyroste na pevném médiu právě jedna kolonie. Tímto způsobem byl zjištěn celkový počet vegetativních buněk a spor dohromady. Termostabilita spor dovoluje dále tepelnou inkubaci vzorku za podmínek, které mohou přežít pouze tepelně odolné spory (75 °C, 15 min). Vyšetření takového vzorku na pevnou půdu pak podává informaci o počtu spor v původní směsné bakteriální kultuře. Výsledky stanovení ukazuje Tab. 2 a Obr. 17.

čas (h)	3	7	12	24	72
OD	0,462	2,729	3,804	3,342	2,370
Σ buněk + spor/ml	$5,0 \cdot 10^7$	$2,3 \cdot 10^8$	$3,6 \cdot 10^8$	$2,8 \cdot 10^8$	$2,1 \cdot 10^8$
spory/ml	0	0	$3,0 \cdot 10^7$	$9,1 \cdot 10^7$	$1,4 \cdot 10^8$
% spor	0	0	8	33	67

Tab. 2 Počet vegetativních buněk a spor *B. subtilis* ATCC 21332 v 1 ml kultury v průběhu dlouhodobé kultivace.



Obr. 17 Kinetika sporulace *B. subtilis* ATCC 21332

Kultivace v živném bujónu (Oxoid) ve 30 °C při 120 rpm probíhala 72 hodin. Hodnoty v histogramu jsou průměrem získaným z výsevů ve třech ředěních po třech paralelách přepočítané na 1 ml kultury. Osa y - $1,0E+08 = 1 \cdot 10^8$

Vývoj počtu spor v čase ukazuje, že v živném bujónu se termostabilní spory objevují od 12. h kultivace, kdy tvoří přibližně 8% celkového počtu bakterií. Ve 24. h je přítomno 33% spor a v 72. hodině 67% spor. Po třech dnech kultivace přežívá tedy v kultuře pouze 1/3 vegetativních (přesněji termosensitivních) buněk neboli producentů surfaktinu.

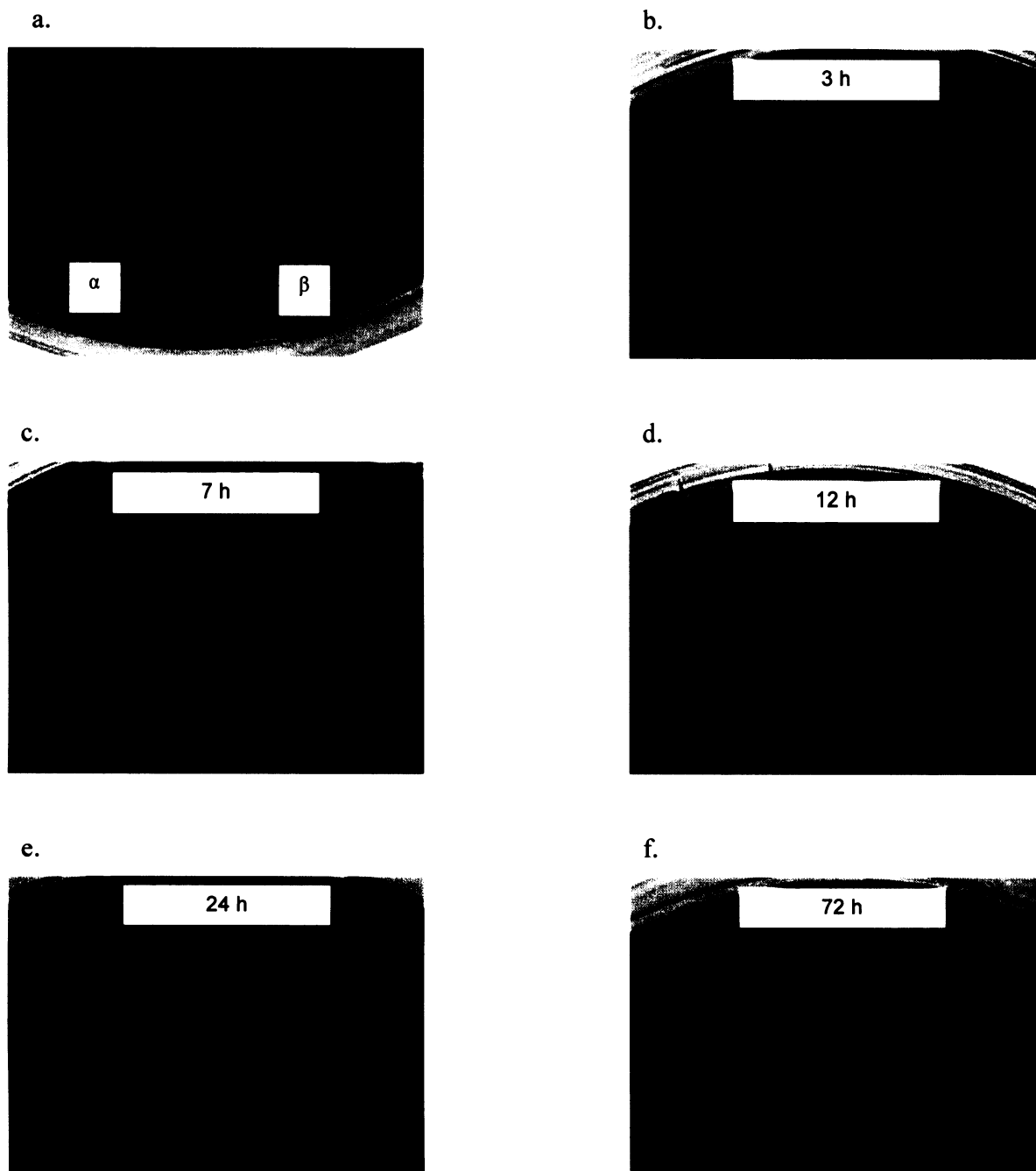
5.3 PRODUKCE SURFAKTINU

Produkce surfaktinu bakteriální kulturou *B. subtilis* ATCC 21332 byla sledována v kultivačním médiu, které díky použitému médiu poskytují poměrně nízké výtěžky, ale na druhou stranu představují optimální podmínky pro růst a množení bakterie, jejíž fyziologie je v této práci studována. Komplexní médium je navíc oproti Landyho médiu, ve kterém se díky přítomnosti železa vytváří precipitát, metodicky schůdnější. Kultivace tedy probíhala v živném bujónu (Oxoid) ve 30 °C při 175, resp. 120 rpm.

Metodických přístupů pro stanovení koncentrace surfaktinu v produkčním médiu je několik. Pro přesná analytická stanovení slouží metoda kapalinové chromatografie, pro rutinní účely jsou využívány metody kvalitativního stanovení surfaktinu pomocí testu hemolýzy. Z kvantitativních metod je to pak stanovení koncentrace surfaktinu s využitím kyseliny bicinchoninové a tzv. drop-collapse metoda (BODOUR a MILLER-MAIER 1998). Každá z nich má však svá omezení.

5.3.1 Stanovení přítomnosti surfaktinu pomocí testu hemolýzy

Tato metoda je založena na schopnosti molekuly surfaktinu interagovat s membránovou dvojrůstvou a způsobovat její permeabilizaci a narušení. Přítomnost surfaktinu v rostoucí bakteriální kultuře v čase odběru vzorku (živný bujón, 30 °C, 175 rpm, resp. 120 rpm) byla zjišťována po opracování lysosysemem, který zamezil dalšímu růstu bakterií na krevním agaru a zkrvení výsledku hemolýzy. Na krevní agar bylo nanášeno 10 µl vzniklého lyzátu a Petriho misky byly inkubovány v termostatu ve 37 °C po dobu 24 hodin. Jako referenční pozitivní vzorky byly nanášeny kultury *Streptococcus pneumoniae* (α -hemolýza) a *Streptococcus pyogenes* (β -hemolýza). Výsledky testu hemolýzy uvádí Obr. 18.



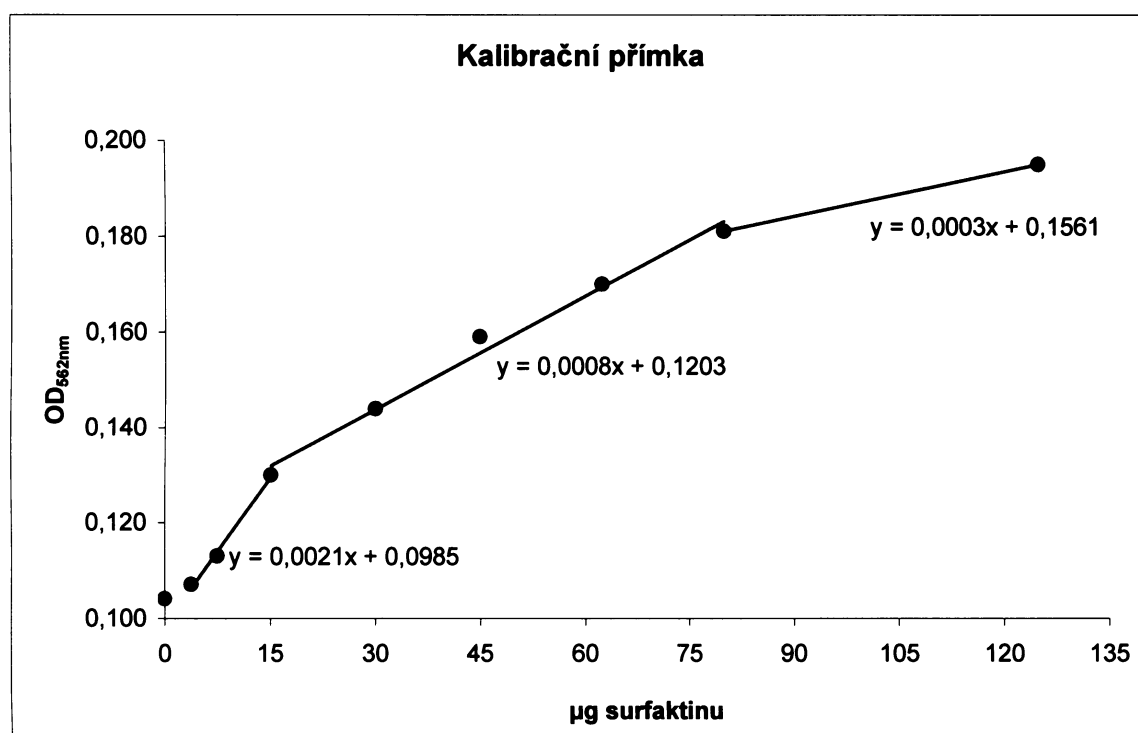
Obr. 18 Test hemolýzy

a. α -hemolýza *Streptococcus pneumoniae* a β -hemolýza *Streptococcus pyogenes*
 b., c. negativní výsledek hemolýzy ve 3. a 7. h kultivace
 d., e., f. pozitivní hemolýza ve 12., 24. a 72. h kultivace

Test hemolýzy ve 3. h potvrdil očekávaný negativní výsledek, tedy že surfaktin v exponenciální fázi růstu produkován není. Stejný nález byl touto metodou pozorován i v 7. h kultivace. První pozitivní výsledek se objevil až ve vzorku ze 12. hodiny. V dalších časech stacionární fáze (24 a 72 h), kdy koncentrace surfaktinu v médiu stoupá, tento fenomén pokračoval. Průběh je patrný z velikosti a projasnění zóny hemolýzy.

5.3.2 Stanovení koncentrace surfaktinu pomocí BCA

Stanovení koncentrace surfaktinu pomocí kyseliny bicinchoninové (bicinchoninic acid, BCA) je technicky nenáročnou metodou standardně používanou pro stanovení koncentrace bílkovin. Koncentrace surfaktinu v kultivačním médiu byla stanovována po jeho izolaci kyselou precipitací (HCl) a extrakcí metanolem (kapitola 4.8). Metoda byla standardizována kalibrací komerčního surfaktinu (Sigma), který byl použit ve formě methanolového roztoku v uvedeném koncentračním rozmezí (Obr. 19).



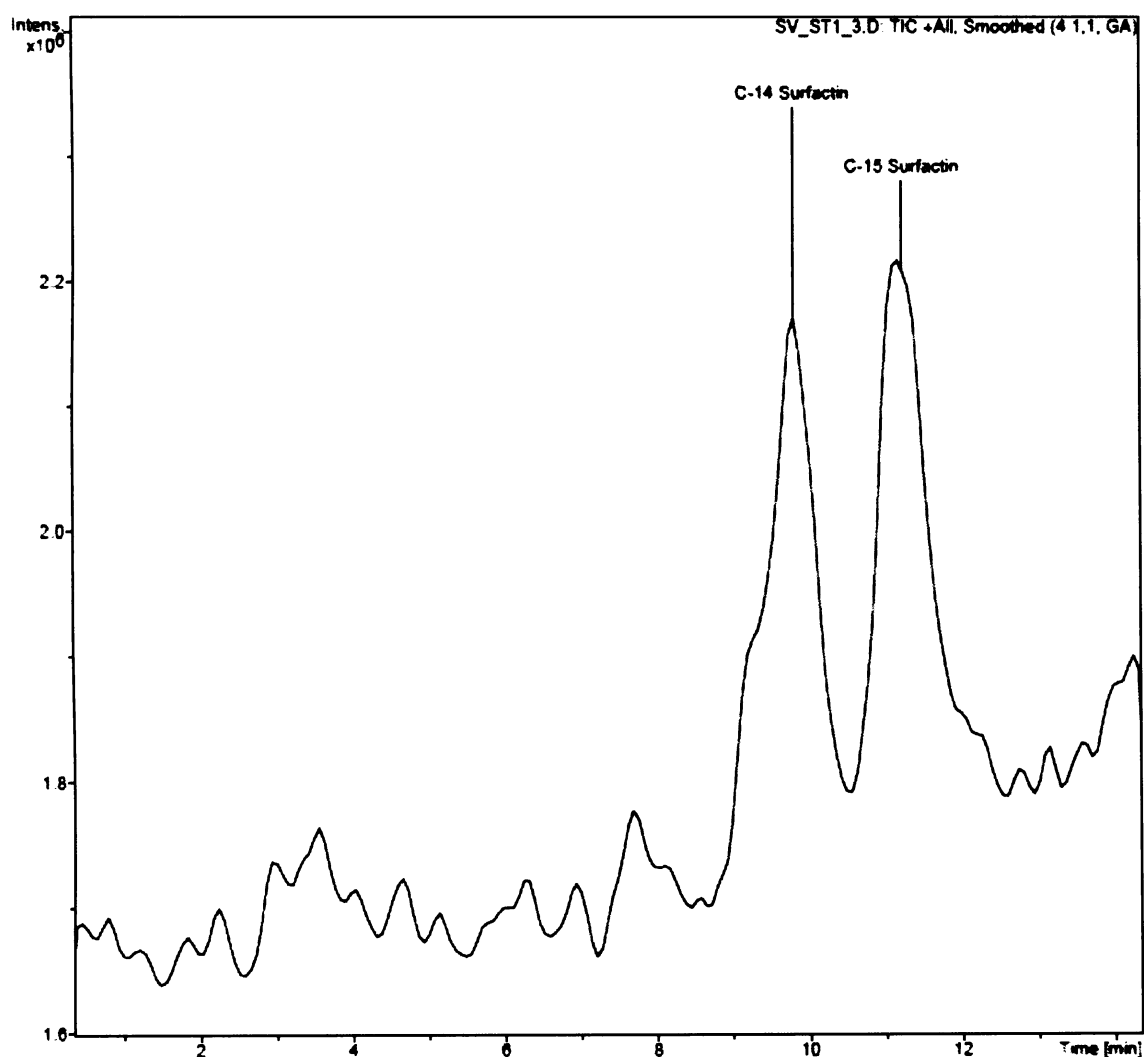
Obr. 19 Stanovení koncentrace surfaktinu pomocí BCA – kalibrační přímka

Standard - surfaktin (Sigma) rozpuštěný v metanolu. Objem stanovovaného vzorku činil 5 µl v celkovém objemu 1 ml reakční směsi. Každý bod přímky byl stanovován v tripletu, do grafu byly zaneseny průměry těchto hodnot.

Kalibrační přímka surfaktinu je třífázová (0 – 15 µg, 15 – 80 µg a 80 - 125 µg), nejlepší spolehlivost měření je přitom v rozmezí koncentrací 15 – 80 µg. Dvě nezávislá stanovení metanolových izolátů z kultur pěstovaných v živném bujónu (Oxoid), 30 °C, 120 rpm, 72 h dala dvě velmi reprodukovatelné hodnoty koncentrace surfaktinu, a to 84 mg/l, resp. 86 mg/l. Měření izolátů z Landyho média dává nereálné výsledky, které mohou být způsobeny přechodem glutamátu obsaženého v médiu do kyselého precipitátu.

5.3.3 Stanovení koncentrace surfaktinu kapalinovou chromatografií kombinovanou s hmotnostní spektrometrií (LC/MS)

Jako objektivní reference stanovení koncentrace surfaktinu výše zmíněnými metodami bylo v této práci použito kapalinové chromatografie kombinovaná s hmotnostní spektrometrií (Liquid Chromatography/Mass Spectrometry, LC/MS). Jako standard byl použit čistý surfaktin (Sigma) rozpuštěný v metanolu (Obr. 20). Analyzovány byly bezbuněčné filtráty kultur kultivovaných v živném bujónu v daných časových intervalech kultivace. Výsledky stanovení v Tab. 3 uvádějí i vliv intenzity aerace.



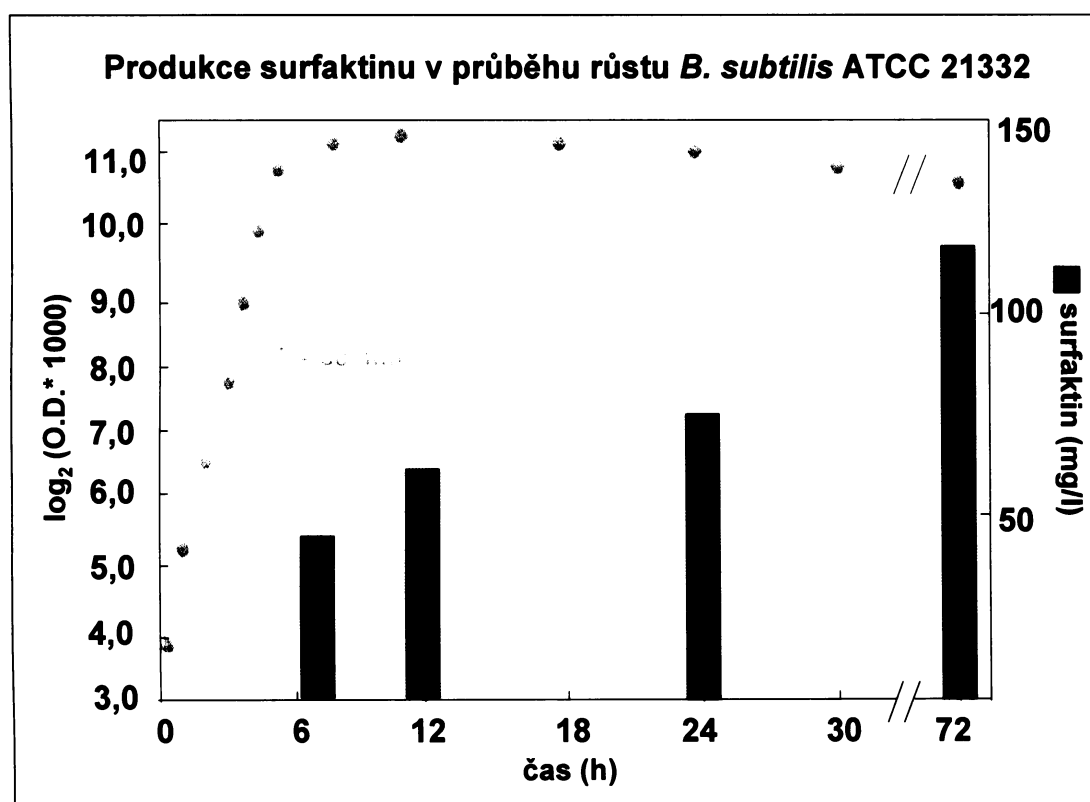
Obr. 20 Densitogram standardu surfaktinu (Sigma) obsahujícího dvě isoformy surfaktinu C-14 a C-15.

Isoformy surfaktinu jsou znázorněny jako vrcholy intenzity (osa y) v závislosti na čase eluce (osa x).

aerace	120 rpm		175 rpm		120 rpm
vzorek	7 h	12 h	24 h	72 h	72 h
C-13 (mg/l)	9	12	0	0	20
C-14 (mg/l)	1,5	6,5	4	6	10
C-15 (mg/l)	34	45	73	89	90
Σ surfaktinu	44,5	63,5	77	95	120

Tab. 3 Koncentrace surfaktinu (mg/l) stanovené ve filtrátech kultur pomocí LC/MS

Detekce iontů: m/z 1008, m/z 1022 a m/z 1036. Udávané množství 0 znamená méně než 0,5 mg/l. C-13, C-14 a C-15 – isoformy surfaktinu s řetězcem mastné kyseliny o délce 13, 14, resp. 15 atomů uhlíku. Σ surfaktinu – součet koncentrací jednotlivých isoform surfaktinu (mg/l).



Obr. 21 Kinetika syntézy surfaktinu během růstové křivky *B. subtilis* ATCC 21332

B. subtilis ATCC 21332 roste v exponenciální fázi (živný bujón, 30 °C, 120 rpm) s dobou zdvojení $T = 38$ min. Syntéza surfaktinu nastupuje s přechodem do stacionární fáze okolo OD = 1,5.

Produkce surfaktinu vzrůstá v čase během stacionární fáze (Tab. 3, Obr. 21) – jeho koncentrace stoupá mezi 7. a 72. h trojnásobně. Snížená aerace zvyšuje produkci surfaktinu o cca. 20% a indukuje syntézu další isoformy surfaktinu s délkou řetězce mastné kyseliny 13 atomů uhlíku. Nejhojněji zastoupenou isoformou ve všech časových vorech je C-15 surfaktin. Oproti kvalitativnímu stanovení testem hemolýzy je surfaktin přítomen již v 7. h kultivace, kdy jeho celková koncentrace činí 44,5 mg/l.

5.4 ADAPTACE CYTOPLAZMATICKÉ MEMBRÁNY *B. subtilis* ATCC 21332 NA PRODUKCI SURFAKTINU

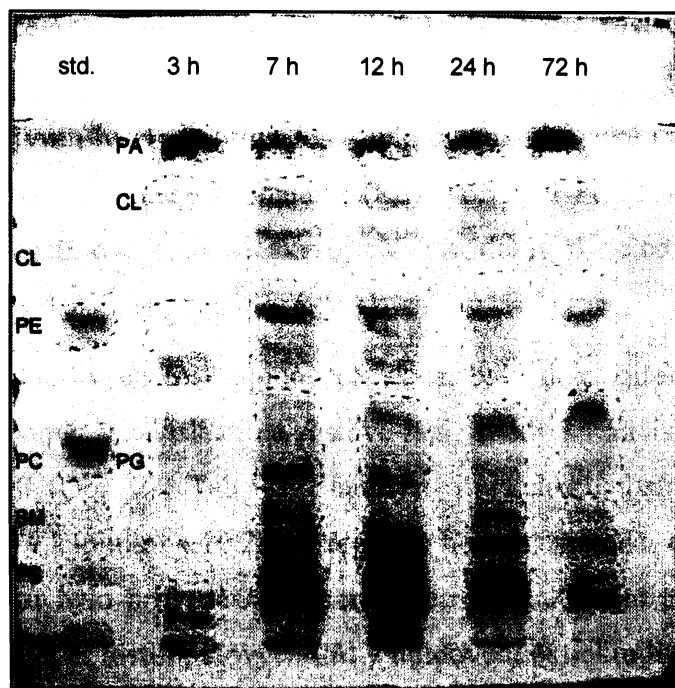
Ačkoliv se řada světových laboratoří zabývá otázkou maximalizace a ekonomické dostupnosti produkce surfaktinu jakožto látky s velkým potenciálem komerčního využití, informace o primárním metabolismu samotného producenta, který čelí vysokým koncentracím surfaktinu ve svém životním prostředí, stále chybí. Cílem této části diplomové práce bylo charakterizovat adaptivní mechanismy producenta surfaktinu *B. subtilis* ATCC 21332 na úrovni cytoplazmatické membrány, jakožto struktury, která zajišťuje komunikaci bakterie s vnějším prostředím a se kterou molekula surfaktinu významným způsobem interaguje (kapitola 2.1.2).

5.4.1 Složení fosfolipidů *B. subtilis* v závislosti na produkci surfaktinu

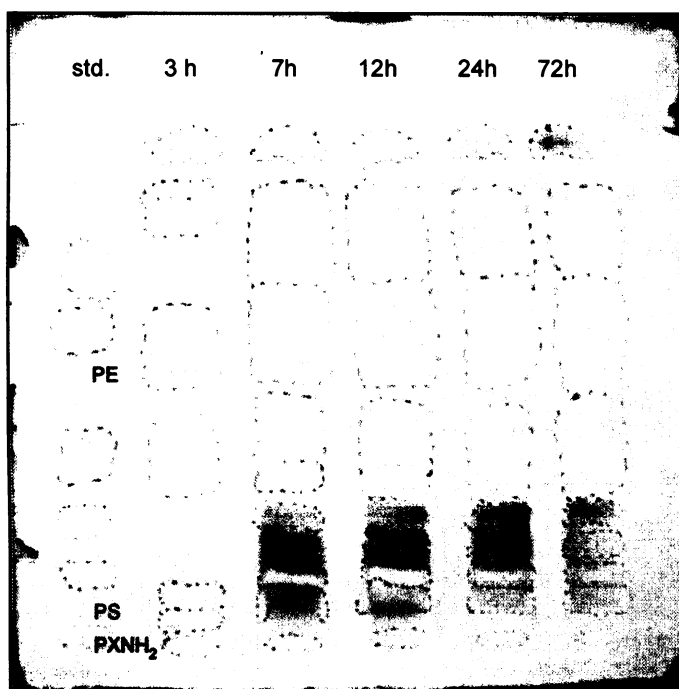
Provedena byla kvalitativní i kvantitativní analýza lipidových frakcí buněk kmene *B. subtilis* ATCC 21332 získaných ze 3., 7., 12., 24. a 72. h kultivace ve 30 °C (Obr. 22 a 23, Tab. 4). Lipidová frakce bakteriálních kultur byla získána extrakcí hexan-isopropanolem metodou popsanou v kapitole 4.10.1 a dělena tenkovrstevnou chromatografií. Pro kontrolní detekci pozice bakteriálních fosfolipidů byl použit extrakt izolovaný ze svalových buněk srdeční svaloviny krys linie BK2, jehož pořadí fosfolipidových skvrn na chromatografické desce je známo. Spolehlivost a reprodukovatelnost zavedené metody byla ověřena na kmenu *B. subtilis* 168 trp₂-, jehož kvalitativní i kvantitativní složení fosfolipidů bylo v naší laboratoři stanoveno již dříve.

Jednorozměrné chromatografické dělení lipidových extraktů bylo provedeno na skleněných chromatografických deskách s ručně nanášeným silikagelem. Po rozdělení lipidů na tenké vrstvě silikagelu (0,25 mm) směsí chloroform-metanol-voda (65 : 25 : 4, v/v/v) byly jednotlivé skvrny detegovány parami jódu. Přítomnost fosfolipidů obsahujících -NH₂ skupinu ve své molekule byla zjištěna obarvením roztokem ninhidrinu. Určení skvrn bylo provedeno podle reakce na jód a ninhidrin a podle polohy skvrn rozděleného lipidového extraktu srdeční svaloviny krys jako standardu. Kvantitativní zastoupení fosfolipidových tříd založené na stanovení anorganického fosfátu současně eliminovalo i nefosfolipidové komponenty extraktu.

a.



b.



Obr. 22 Jednorozměrná chromatografie na tenké vrstvě Silikagelu G - analýza fosfolipidů *B. subtilis* ATCC 21332

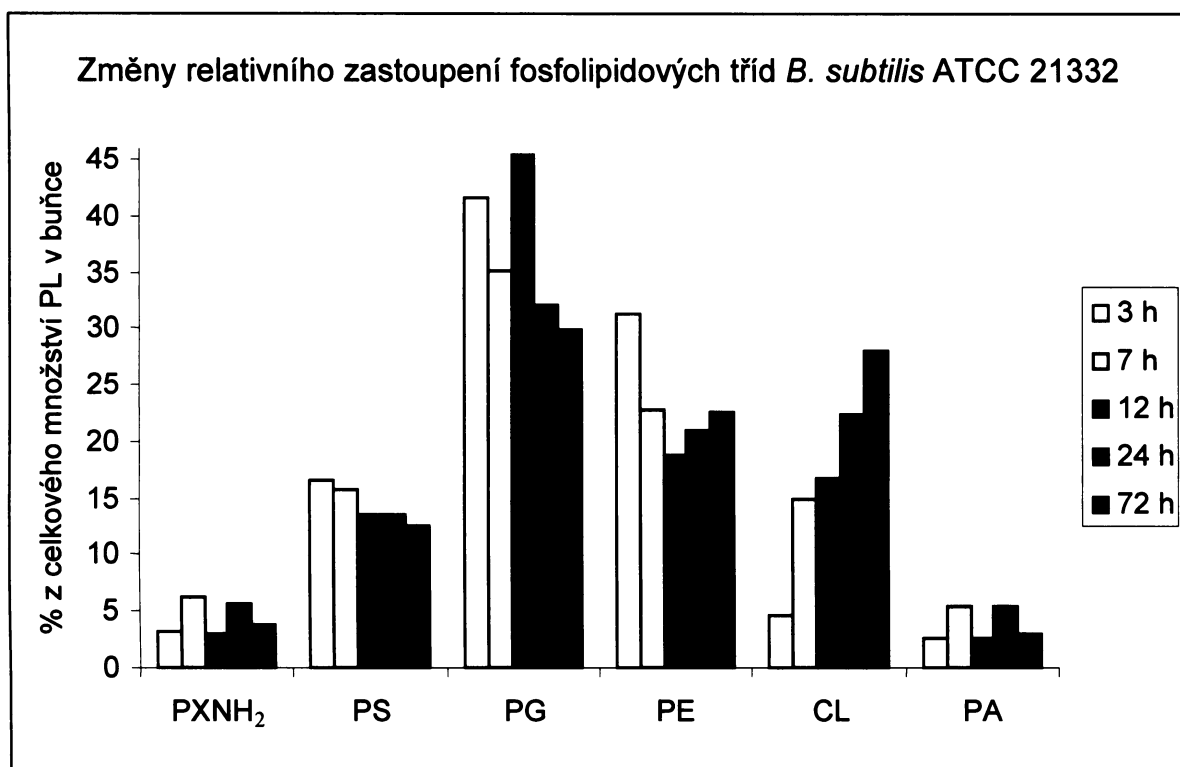
Lipidové extrakty ze 3., 7., 12., 24. a 72. h kultivace v živném bujónu ve 30 °C, 120 rpm. Nanáška na dráhu o hmotnosti 1,5 – 2 mg celkového lipidového extraktu. Reprezentativní výsledek ze dvou nezávislých stanovení.

a. Barvení jódem – pozitivní reakce v podobě žlutohnědého zbarvení v místě výskytu lipidové skvrny. **b.** Barvení ninhidrinem – pozitivní reakce v místě výskytu –NH₂ skupiny.

std. – standard, PNH₂ – lysofosfolipidy, PS – fosfatidylserin, SM – sfingomyelin, PC – fosfatidylcholin, PG – fosfatidylglycerol, PE – fosfatidyletanolamin, CL – kardiolipin, PA – kyselina fosfatidová

Fosfolipidy izolované z bakterií v jednotlivých časových intervalech růstu ve 30 °C jsou kvalitativně zcela shodné (Obr. 22). Téměř u startu zůstávají lysofosfolipidy (PXNH₂). Druhý v pořadí je fosfatidylserin (PS) rozdělený do 4 – 6 těsně naléhajících skvrn. Následující skvrnu tvoří majoritní fosfolipid cytoplazmatické membrány *B. subtilis* fosfatidylglycerol (PG). Fosfatidyletanolamin (PE) tvoří nad PG 2 – 3 spojené skvrny, kardiolipin (CL) vytváří dvě spojené skvrny. V čele dráhy o délce 16 cm se nachází v podobě jedné skvrny kyselina fosfatidová (PA).

Po určení jednotlivých fosfolipidových skvrn bylo dále zjišťováno, jak se mění jejich kvantitativní poměr v závislosti na růstové fázi, a tedy i v závislosti na koncentraci surfaktinu v prostředí (Obr. 23, Tab. 4). Stanovení lipidického fosforu bylo provedeno metodou popsanou v kapitole 4.10.2.3. Přepočtení hodnot měřené extinkce na μ moly anorganického fosfátu bylo provedeno pomocí směrnice kalibrační přímky. Při výpočtu procentuálního zastoupení fosfolipidových tříd v lipidovém extraktu bylo jako 100% vzato celkové množství anorganického fosfátu přítomné ve všech skvrnách vzniklých dělením daného vzorku. Obsah anorganického fosfátu v jednotlivých skvrnách (v μ molech) odpovídá obsahu fosfolipidů v μ molech. Výjimku tvoří CL (difosfatidylglycerol neboli kardiolipin), který ve své molekule obsahuje dva atomy P, a proto se obsah tohoto fosfolipidu rovná polovičnímu množství anorganického fosfátu stanoveného ve skvrně.



Obr. 23 Změny v relativním zastoupení fosfolipidových tříd (v %) *B. subtilis* ATCC 21332. Lipidové extrakty ze 3., 7., 12., 24. a 72. h kultivace ve 30 °C, 120 rpm. Součet obsahů fosfátu fosfolipidových tříd v jednotlivých vzorcích je roven 100%. Reprezentativní výsledek ze dvou nezávislých stanovení.

	3 h	7 h	12 h	24 h	72 h
PXNH ₂	3,2	6,2	2,9	5,6	3,9
PS	16,6	15,7	13,6	13,5	12,5
PG	41,5	35,1	45,4	32,1	29,9
PE	31,3	22,7	18,7	20,9	22,7
CL	4,7	14,9	16,7	22,4	28,0
PA	2,7	5,4	2,7	5,4	3,0

Tab. 4 Kvantitativní analýza fosfolipidů (v %) *B. subtilis* ATCC 21332. Lipidové extrakty ze 3., 7., 12., 24. a 72. h kultivace ve 30 °C, 120 rpm. Součet obsahů fosfolipidů v jednotlivých vzorcích (sloupcích tabulky) dává 100%.

Přehled výsledků kvantitativní analýzy fosfolipidů (v %) *B. subtilis* ATCC 21332 ukazuje (Tab. 4), že během dlouhodobé kultivace o celkovém trvání 72 h zůstává zastoupení PXNH₂ a PA velmi nízké. U obsahu PS byl zaznamenán pouze nevýznamný pokles ze 17% ve 3. h na 13% v 72. h. U ostatních fosfolipidových tříd však nastávají

výrazné změny. Množství PE se mění nejvíce mezi 3. a 7. h, kdy klesá ze 31% na 23%, dále se pak až do konce kultivace drží na srovnatelné úrovni. PG zaznamenává mezi 3. a 7. h přechodný pokles (ze 42% na 35%), který je ve 12. h opět vyrovnán (45%), ale jeho sestupná tendence pokračuje ve 24. (32%) i 72. h (30%). Obsah CL se zvyšuje po celou dobu kultivace – z necelých 5% v exponenciální fázi se průběžně zvyšuje až na téměř šestinásobek v 72. h kultivace. Kvantitativním složením fosfolipidů se nejvíce liší buňky ve 3. a 7. h kultivace (stacionární fáze, ale i produkce surfaktinu). Nejméně rozdílné je ve vzorcích ze 24. a 72. h s výjimkou CL, který až do 72. h stoupá na konečných 28%.

Bez zajímavosti není ani časový vývoj celkového negativního náboje neseného molekulami fosfolipidů. K této hodnotě přispívá jedním záporným nábojem PS, PG, PA a dvěma zápornými náboji CL. Tento parametr dosahuje v exponenciální fázi hodnoty 66, do 7. h vzroste na 94 a bez poklesu se stabilně drží až do 72. h, kdy dosáhne hodnoty 101. Časový souběh produkce surfaktinu s dvěma negativními náboji s nárůstem záporného náboje povrchu cytoplazmatické membrány přispívá patrně ke zvýšení odpudivých sil membrány k surfaktinu.

5.4.2 Analýza mastných kyselin cytoplazmatické membrány *B. subtilis* ATCC 21332

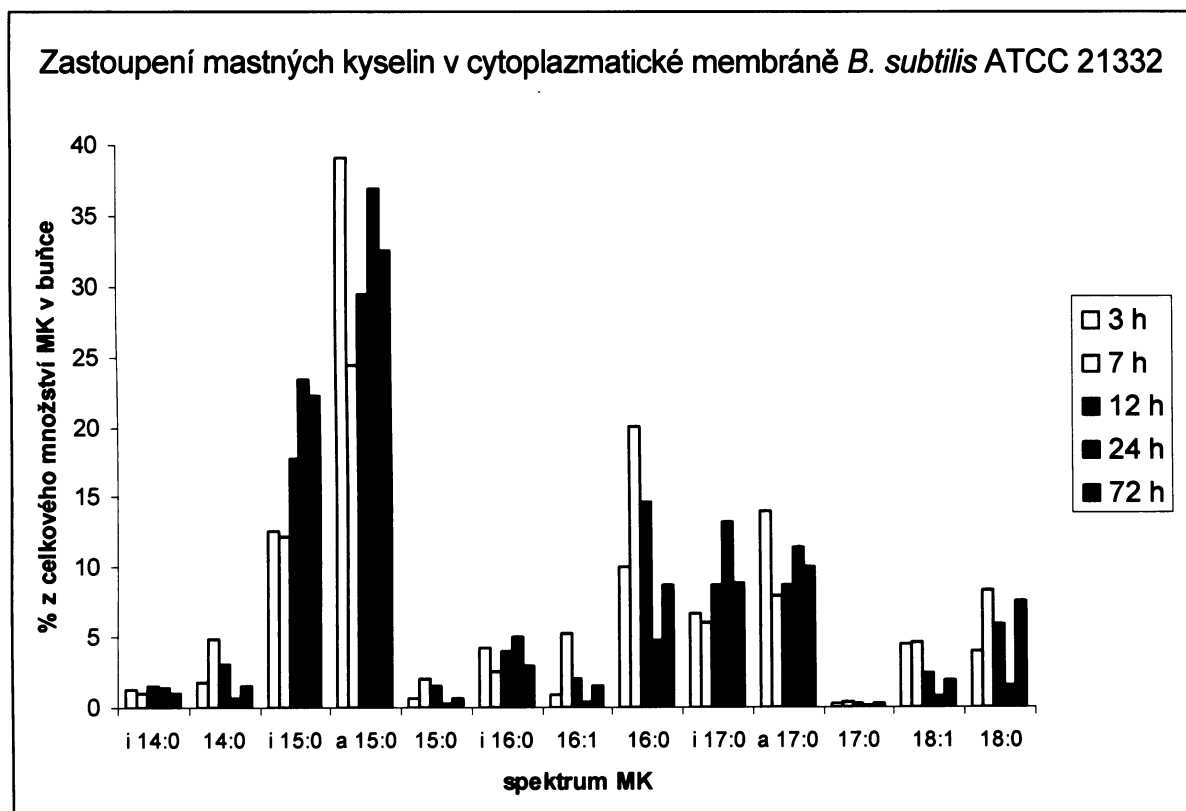
Výrazné změny v zastoupení fosfolipidových tříd cytoplazmatické membrány *B. subtilis* během dlouhodobé kultivace a syntézy surfaktinu vedly k otázce, zda se analogicky mění i mastné kyseliny fosfolipidů. Rozdíly ve složení mastných kyselin naznačovalo již rozdělení některých fosfolipidových tříd do několika k sobě přiléhajících skvrn.

Mastné kyseliny fosfolipidů izolovaných z bakterií ve 3., 7., 12., 24. a 72. h kultivace byly převedeny na methylestery a analyzovány metodou plynové chromatografie (GC) kombinované s hmotnostní spektrometrií (MS). Výsledky analýzy jsou uvedeny v Tab. 5 a 6 a Obr. 24.

T _m (°C)	zkratka	název MK	3 h	7 h	12 h	24 h	72 h
53	i 14:0	Me 12-Me- tridecanoate	1,3	1	1,5	1,4	1
54	14:0	Me tetradecanoate	1,8	4,9	3,1	0,7	1,5
52	i 15:0	Me 13-Me- tetradecanoate	12,6	12,2	17,7	23,4	22,2
23	a 15:0	Me 12-Me-tetradecanoate	39,1	24,5	29,5	36,9	32,6
53	15:0	Me pentadecanoate	0,6	2	1,5	0,3	0,7
62	i 16:0	Me 14-Me- pentadecanoate	4,3	2,6	4	5	2,9
-0,5	16:1	Me cis-9-hexadecenoate	0,9	5,3	2	0,4	1,6
63	16:0	Me hexadecanoate	10	20,1	14,6	4,7	8,8
60	i 17:0	Me 15-Me- hexadecanoate	6,7	6	8,7	13,2	8,9
37	a 17:0	Me 14-Me- hexadecanoate	14	8	8,8	11,5	10
61	17:0	Me heptadecanoate	0,2	0,4	0,2	0,1	0,3
5	18:1	Me trans-9-octadecenoate	4,5	4,6	2,5	0,8	1,9
71	18:0	Me octadecanoate	4	8,4	5,9	1,6	7,6

Tab. 5 Výsledky analýzy esterů mastných kyselin cytoplazmatické membrány *B. subtilis*

Proporce jednotlivých typů mastných kyselin jsou uvedeny jako procenta celkového obsahu mastných kyselin. Součet v každém sloupci dává 100%. T_m – teplota tání (°C), MK – mastná kyselina, i/a – iso-, resp. anteiso- série větvení MK. Čísla ve sloupci označeném „zkratka“ udávají počet atomů uhlíku a dvojných vazeb v alifatickém řetězci.



Obr. 24 Zastoupení jednotlivých mastných kyselin v cytoplazmatické membráně *B. subtilis* ATCC 21332 v průběhu růstu a produkce surfaktinu

Lipidové extrakty ze 3., 7., 12., 24. a 72. h kultivace ve 30 °C, 120 rpm. Součet obsahu mastných kyselin v každém vzorku dává 100%. Legenda na ose y je shodná s Tab. 5. MK – mastná kyselina, i – iso, a – anteiso.

	3 h	7 h	12 h	24 h	72 h
nevětvené MK	22,0	45,7	29,8	8,6	22,4
větvené MK	78,0	54,3	70,2	91,4	77,6
iso-	24,9	21,8	31,9	43,0	35,0
anteiso-	53,1	32,5	38,3	48,4	42,6
nasyčené MK	94,6	90,1	95,5	98,8	96,5
nenasyčené MK	5,4	9,9	4,5	1,2	3,5

Tab. 6 Procentuální zastoupení větvených a nevětvených, resp. nasyčených a nenasyčených, mastných kyselin cytoplazmatické membrány *B. subtilis* ATCC 21332

Součet procentuálního zastoupení nevětvených a větvených, resp. nasyčených a nenasyčených, mastných kyselin dává dohromady 100% všech mastných kyselin v buňce.

Z Tab. 6 je patrné, že i mastné kyseliny procházejí v průběhu růstu kultury značnými změnami. Typické složení mastných kyselin *B. subtilis* ilustruje vzorek ze 3. h kultivace odpovídající exponenciální fázi s převahou (78%) větvených mastných kyselin. Asi největšími změnami procházejí bakterie při přechodu z exponenciální (3 h) do časné fáze stacionární (7 h). Všechny změny oproti složení mastných kyselin v exponenciální fázi vypovídají o rigidizaci cytoplazmatické membrány, jak naznačují hodnoty T_m jednotlivých typů mastných kyselin.

V časné fázi růstu a adaptace na nově přítomný surfaktin (7 h) nastávají dynamické změny v biosyntéze mastných kyselin – poměr obsahu větvených a nevětvených kyselin se obrací (z 22:78 ve 3. h na 46:54). Nárůstá obsah nasyčených nevětvených mastných kyselin (především 16:0 a 18:0), a to na dvojnásobek původní hodnoty v exponenciální fázi (vzestup z 22% na 45,7%). Zároveň dochází k dramatickému poklesu obsahu mastných kyselin a15:0 a a17:0, což vede také k rigidizaci membrány. V tomto vzorku dosahuje také obsah nenasyčených mastných kyselin svého maxima (9,9%).

Ve 12. h opět stoupají větvené mastné kyseliny, z nich posiluje především iso-série. Tento trend pokračuje dále až do 24. h, kdy podíl větvených (91,4%, z toho iso-43%) a současně také nasyčených mastných kyselin (98,8%) je největší. V 72. h opět stoupá obsah nevětvených mastných kyselin (z 8,6% na 22,4%), a to nasyčených, které tvoří 96,5% mastných kyselin cytoplazmatické membrány.

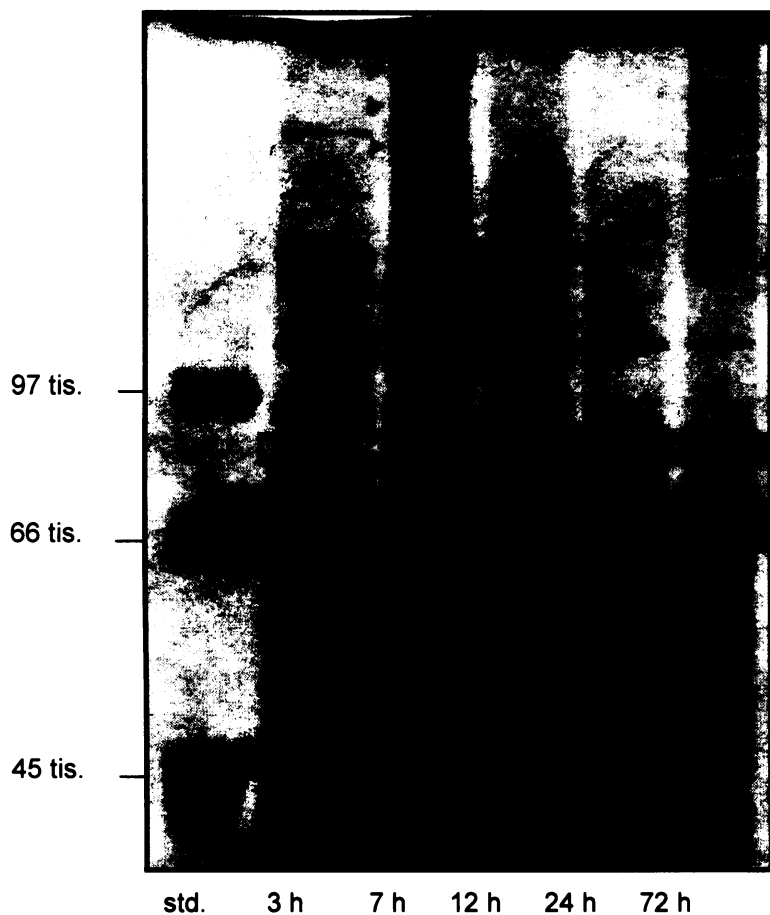
5.4.3 Analýza bílkovin cytoplazmatické membrány *B. subtilis* ATCC 21332

Cílem analýzy proteinů cytoplazmatické membrány *B. subtilis* ATCC 21332 bylo orientační zmapování změn membránového proteomu během růstu a adaptace bakterie na stoupající koncentraci surfaktinu v médiu. Cytoplazmatické membrány byly izolovány z bakterií ve 3., 7., 12., 24. a 72. h růstu ve 30 °C, 120 rpm. Kultivace byla ukončena ve 3. h filtrací a v 7., 12., 24. a 72. h centrifugací. Cytoplazmatické membrány byly izolovány enzymatickou metodou (BISSCHOP a KONINGS 1976).

Jednorozměrná polyakrylamidová gelová elektroforéza (1D SDS-PAGE) použitá v této práci dělí proteiny podle relativní molekulové hmotnosti (M_r). Detailní rozdělení bílkovin cytoplazmatické membrány *B. subtilis* v daném intervalu relativních molekulových hmotností bylo docíleno použitím gelů se 7,5% (Obr. 25 a 26) a 12,5% (Obr. 27 a 28) koncentrací polyakrylamidu. Vizualizace bílkovin v gelu po separaci elektroforézou byla provedena roztokem barviva Coomassie blue R-250. Na dráhu bylo nanášeno 75 μ g membránových proteinů.

5.4.3.1 Dělení membránových proteinů *B. subtilis* v 7,5% polyakrylamidovém gelu

Analyzovány byly proteiny cytoplazmatických membrán bakterií ve 3., 7., 12., 24. a 72. h růstu. Pro vyšší rozlišení v oblasti vysokomolekulárních proteinů byly vzorky děleny v 7,5% gelu. Výsledek dělení je patrný z Obr. 25 a odpovídajících densitogramů jednotlivých vzorků separovaných v gelu (Obr. 26a-e).



Obr. 25 Dělení membránových proteinů v 7,5% gelu

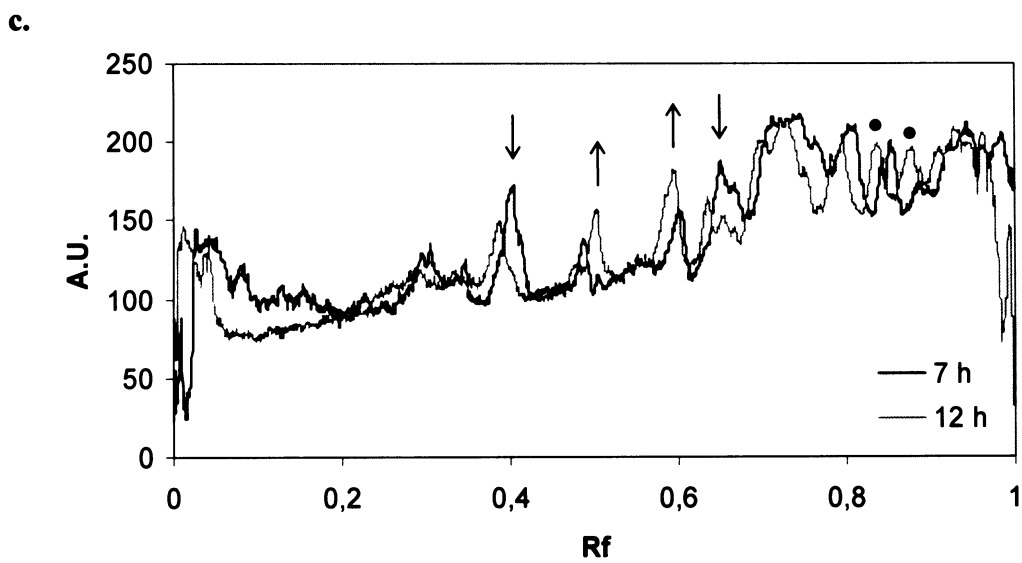
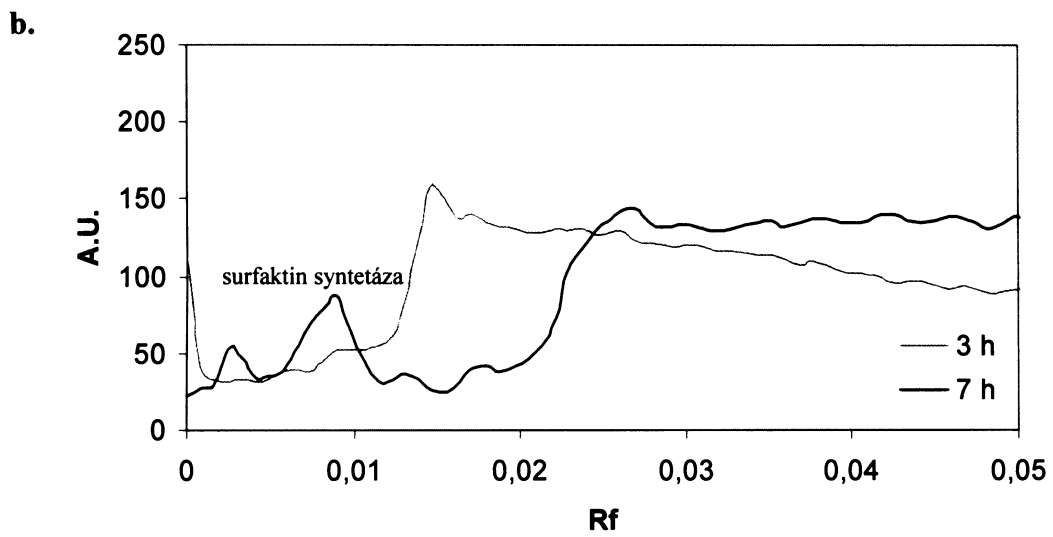
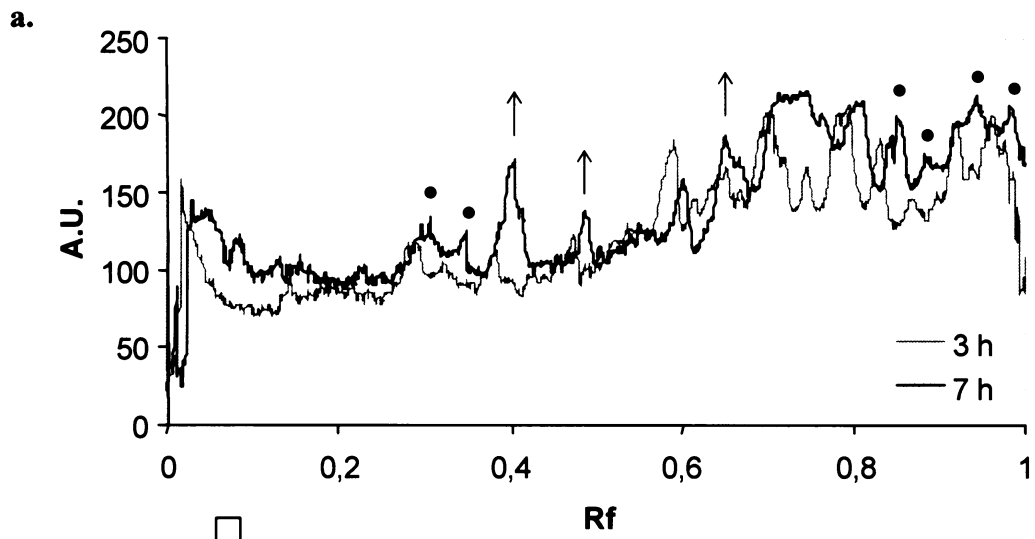
Membránové bílkoviny ze 3., 7., 12., 24. a 72. h kultivace.

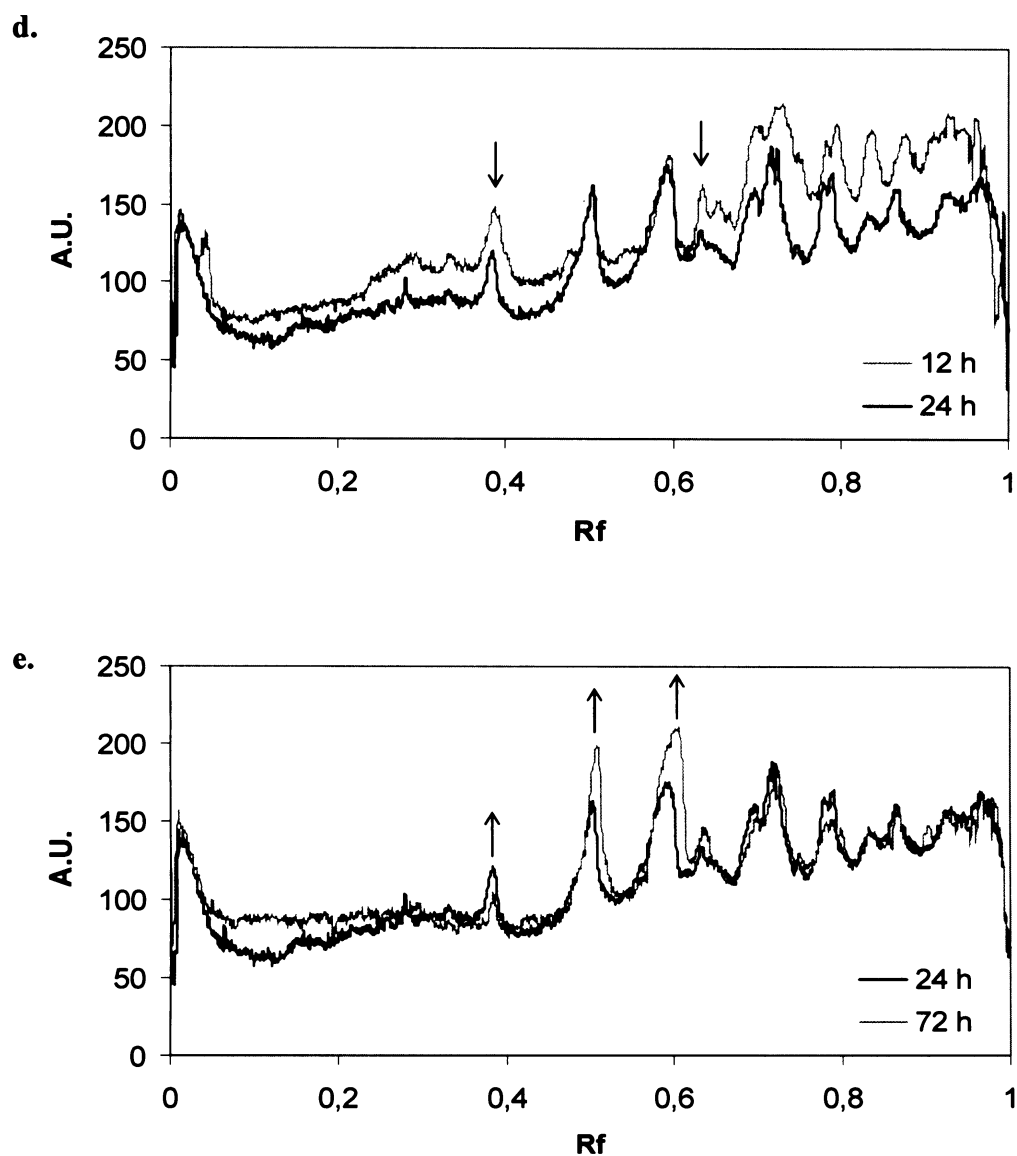
std. – směs proteinových standardů molekulových hmotností, jejichž velikosti jsou uvedeny na levé straně gelu

▶ - syntéza proteinů de novo

▶ - syntéza proteinů de novo – surfaktin syntetáza

-- zvýšená syntéza proteinů





Obr. 26 Densitogram 7,5% polyakrylamidového gelu

Srovnání spektra membránových bílkovin bakterií izolovaných ze 3., 7., 12., 24. a 72. h kultivace. Hodnoty Rf standardů: Mr 97 000– Rf 0,45; Mr 66 000 – Rf 0,62; Mr 45 000 – 0,89. Šipka nahoru – zvýšená syntéza proteinu; šipka dolů – snížená syntéza proteinu/degradace; ● – syntéza proteinu de novo; Rf – retenční faktor; A.U. – arbitrary units (intenzita)

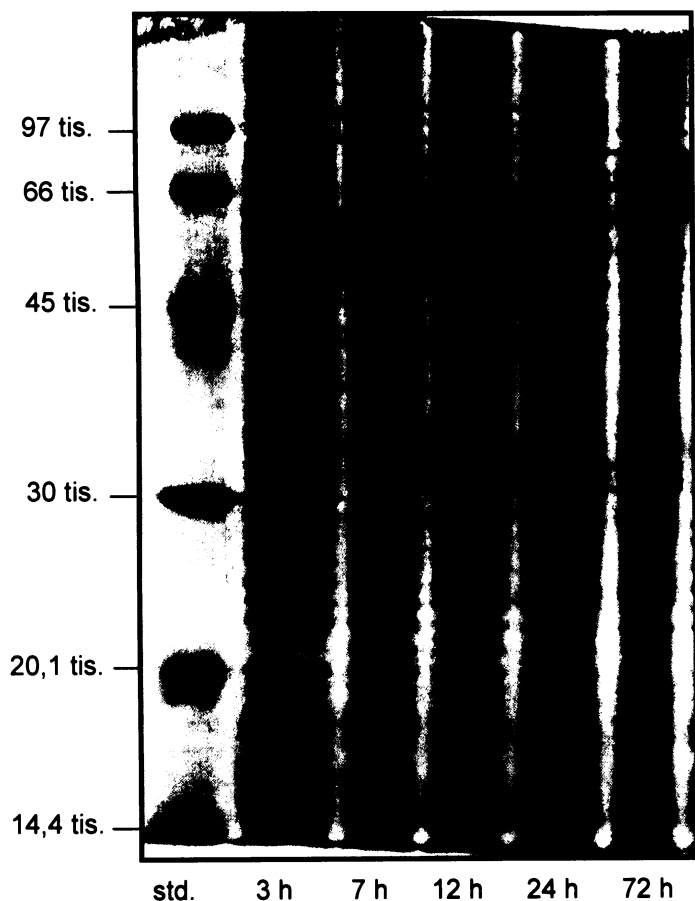
a. – Srovnání spekter proteinů ve 3. a 7. h kultivace. b. – Zvětšený výřez grafu a. v oblasti surfaktin syntetázy. c. – Srovnání spekter proteinů v 7. a 12. h kultivace. d. – Srovnání spekter proteinů ve 12. a 24. h kultivace. e. – Srovnání spekter proteinů ve 24. a 72. h kultivace.

Z elektroforetogramu (Obr. 25) i jednotlivých densitogramů (Obr. 26) vzorků je zřejmé, že proteinů s postupujícím časem kultivace obecně ubývá a jejich složení se liší. Proteinové pruhy se zvýšenou, resp. sníženou, syntézou jsou graficky znázorněni tak, jak uvádí legenda k Obr. 25 a 26. Výraznými změnami prochází proteom cytoplazmatické membrány bakterií při přechodu z exponenciální (3 h) do časné stacionární (7 h) fáze. Srovnáním

dělení těchto vzorků v 7,5% gelu bylo objeveno asi devět proteinů zesílených nebo nových v 7. hodině. Na tomto gelu se také v 7. h v oblasti $M_r > 97\ 000$ objevují tři jemné ale zřetelné pruhy odpovídající pozicím solubilního enzymu surfaktin syntetázy identifikovaných Myslivcovou (Diplomová práce 2004). Podjednotky tohoto proteinového komplexu zachycuje i zvětšený úsek densitogramu 7. h na Obr. 26b jako dva proteinové vrcholy. Přítomnost těchto proteinových pruhů byla potvrzena i při dvojnásobné nanáše (150 μg) vzorku na dráhu (není ukázáno).

Kromě snižování syntézy nebo úplné degradace některých proteinů dochází také k zesílené syntéze několika bílkovin (M_r 85, 70 a 55 000) během stacionární fáze. Syntéza proteinu s M_r 85 000 nastupuje ve 12. h a svého maxima dosahuje na konci kultivace v 72. h. Obsah proteinu s M_r 70 000 průkazně stoupá od exponenciální (3 h) až do pozdní stacionární fáze (72 h). Výrazné je rovněž přechodné zesílení syntézy proteinu s M_r 60 000 v 7. a částečně i ve 12. h, dále ale postupně jeho obsah v membráně klesá.

5.4.3.2 Dělení membránových proteinů *B. subtilis* ve 12,5% polyakrylamidovém gelu

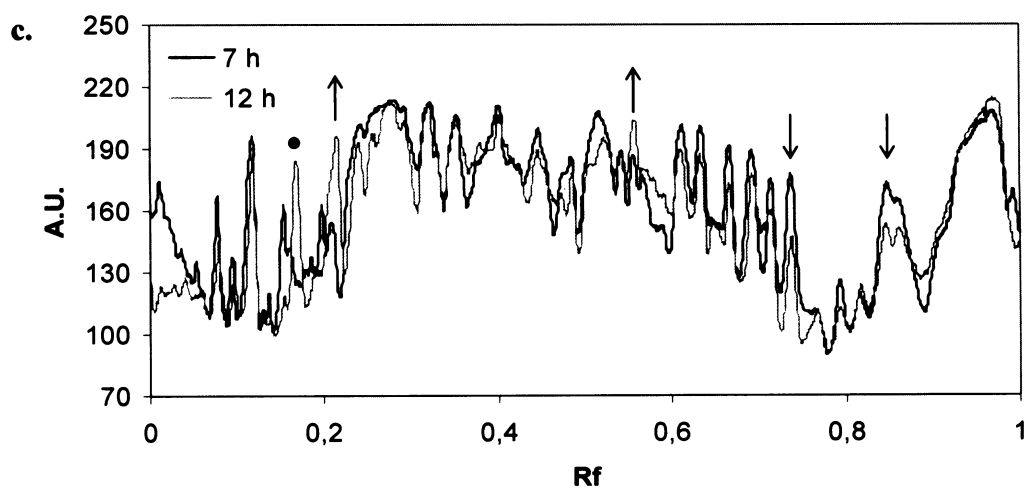
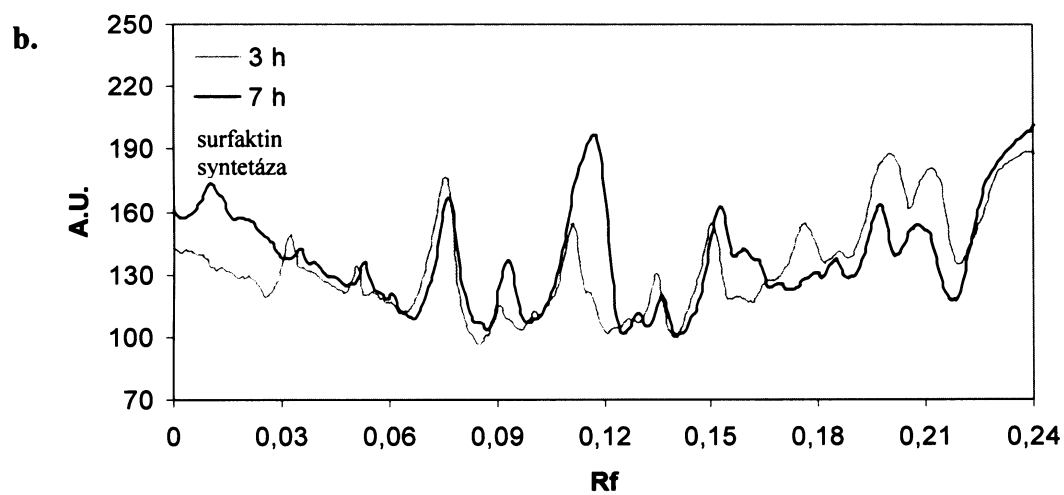
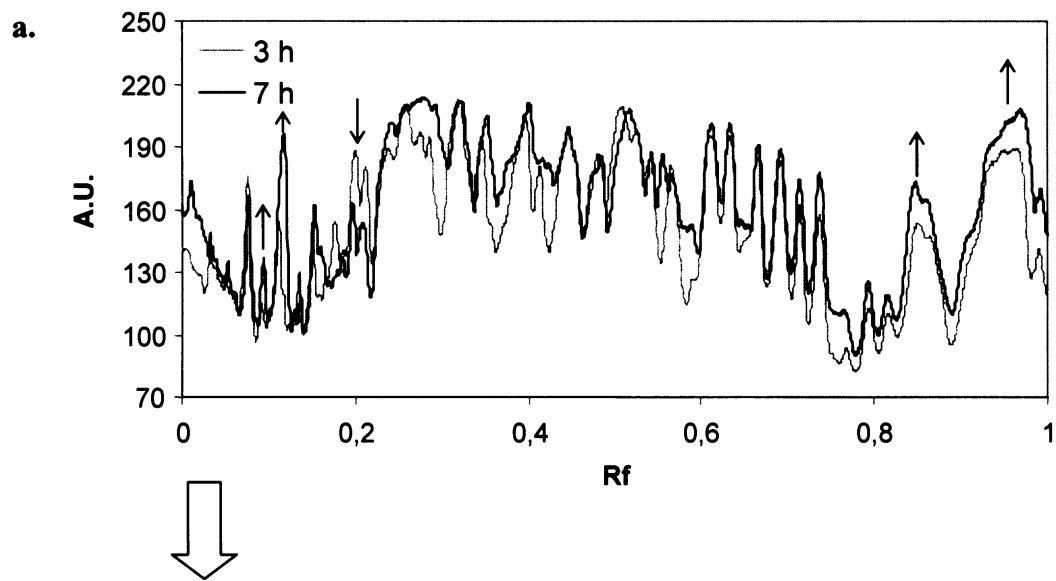


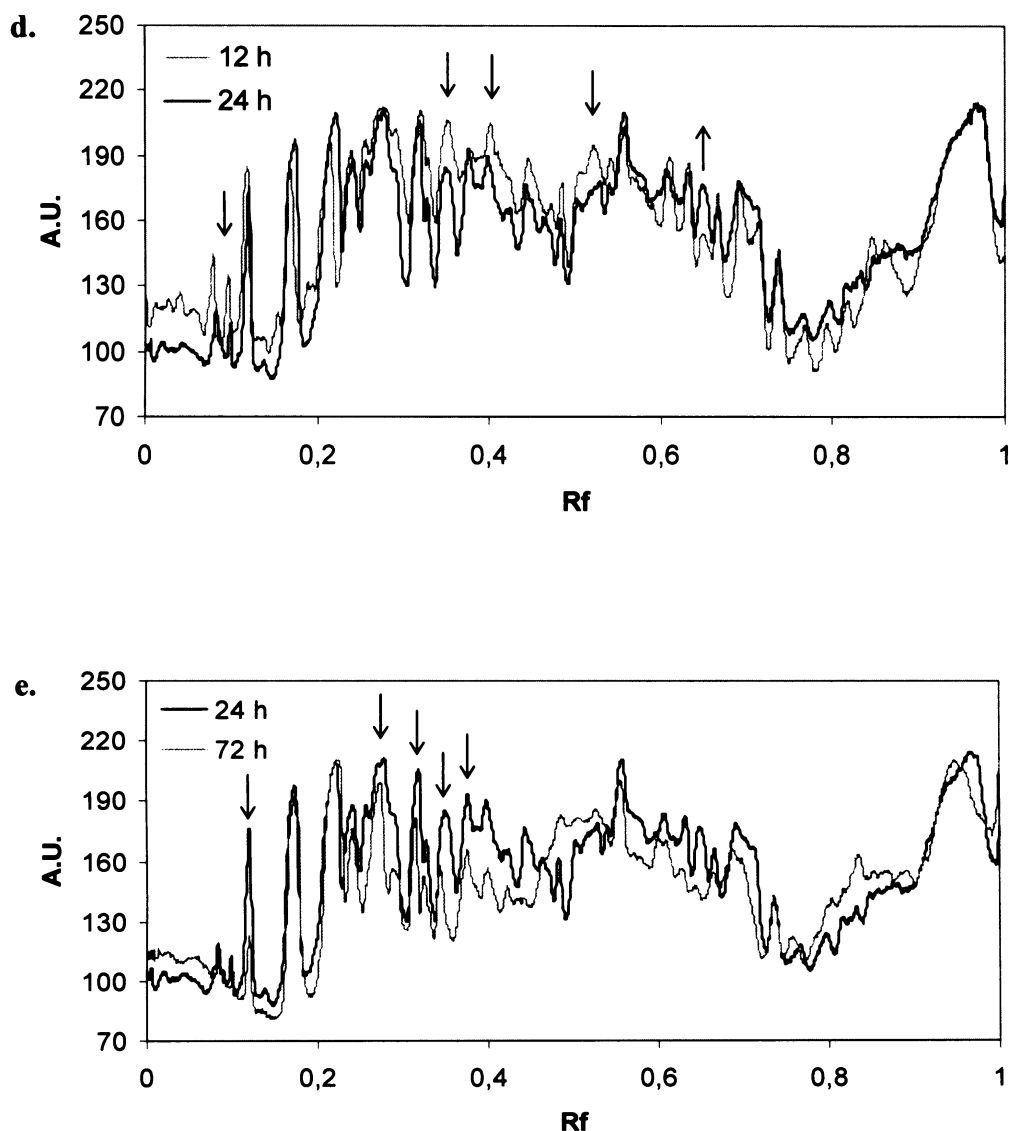
Obr. 27 Dělení membránových proteinů ve 12,5% gelu

Membránové bílkoviny ze 3., 7., 12., 24. a 72. h kultivace.

std. – směs proteinových standardů molekulových hmotností, jejichž velikosti jsou uvedeny na levé straně gelu

- ▶ - syntéza proteinů de novo
- ▶ - syntéza proteinů de novo – surfaktin syntetáza
- - zvýšená syntéza proteinů





Obr. 28 Densitogram 12,5% polyakrylamidového gelu

Srovnání spektra membránových bílkovin bakterií izolovaných ze 3., 7., 12., 24. a 72. h kultivace. Hodnoty Rf standardů: Mr 97 tis. – Rf 0,11; Mr 66 tis. – Rf 0,19; Mr 45 tis. – 0,34; Mr 30 tis. – 0,57; Mr 20,1 tis. – 0,79; Mr 14,4 tis. – 0,99. Šipka nahoru – zvýšená syntéza proteinu, šipka dolů – snížená syntéza proteinu/degradace; • – syntéza proteinů de novo; Rf – retenční faktor; A.U. – arbitrary units (intenzita)

a. – Srovnání spekter proteinů ve 3. a 7. h kultivace. b. – Zvětšený výřez grafu a. v oblasti surfaktin syntetázy. c. – Srovnání spekter proteinů v 7. a 12. h kultivace. d. – Srovnání spekter proteinů ve 12. a 24. h kultivace. e. – Srovnání spekter proteinů ve 24. a 72. h kultivace.

Dělení membránových proteinů ve 12,5% polyakrylamidovém gelu (Obr. 27) je dostatečně ostré a vypovídá o stejném fenoménu sledovaném již v 7,5% gelu, a to odlišnosti a redukce počtu proteinů s postupujícím časem kultivace (Obr. 28d,e). Také zde se potvrdila zvýšená syntéza bílkovin s Mr 85, 70 a 55 000 během stacionární fáze. Díky

vyšší koncentraci polyakrylamidového gelu je možné od 12. h pozorovat i zvýšenou expresi proteinu s Mr 60 000 a v 7. h nástup syntézy bílkoviny s Mr 32 000, která se poté od 12. h ještě zvyšuje. Zřetelná je i de novo syntéza proteinů s Mr 30 000 v 7. hodině a Mr 27 000 ve 12. hodině kultivace.

Ve vzorku cytoplazmatických membrán v 7. h se v oblasti Mr > 97 000 opět objevuje proteinový komplex odpovídající pozicím solubilního enzymu surfaktin syntetázy, tentokrát však splývá do jednoho proteinového pruhu, který je možné na odpovídajícím densitogramu (Obr. 28b) pozorovat jako jeden proteinový vrchol. V dalších vzorcích nebyla stejně jako v 7,5% gelu surfaktin syntetáza prokázána.

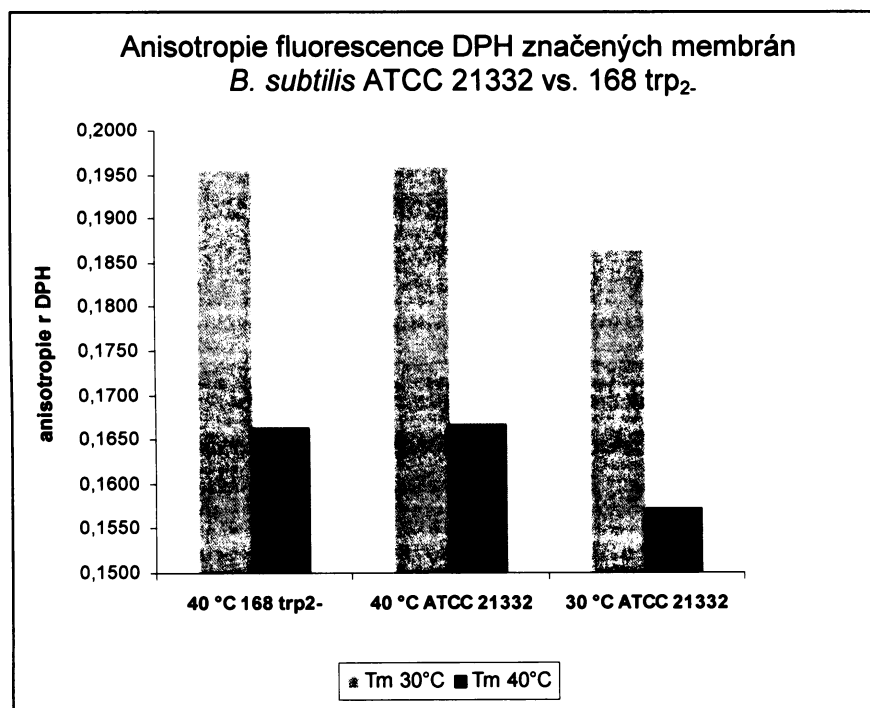
5.4.4 Rovnovážná anisotropie fluorescence DPH značených membrán *B. subtilis* ATCC 21332

Metoda fluorescenční spektroskopie – rovnovážná anisotropie fluorescence hydrofóbní sondy 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien (DPH) vypovídá o mikroviskozitě cytoplazmatické membrány. Výrazné změny v syntéze mastných kyselin naznačující výraznou rigidizaci vnitřní oblasti membrány vedly k otázce, zda stejný fenomén bude potvrzen také touto metodou, která popisuje fyzikální stav cytoplazmatické membrány pomocí anisotropie fluorescenční sondy inkorporované do membrány.

Analyzovány byly opět membrány bakterií ze 3., 7., 12., 24. a 72. h kultivace ve 30 °C (Tab. 7, Obr. 30). Dále bylo také provedeno srovnání fyzikálního stavu membrán z exponenciální fáze růstu obou kmenů *B. subtilis* ATCC 21332 a 168 trp₂-kultivovaných ve 40 °C (Obr. 29). Izolace cytoplazmatických membrán probíhala standardně enzymatickou metodou (BISSCHOP a KONINGS 1976). Získaná membránová frakce byla resuspendována ve 25 mM fosfátovém pufru (pH 7,0) na koncentraci 75 mg proteinů/ml a poté byla značena sondou DPH na finální koncentraci 10⁻⁶ M. Inkubace s DPH trvala 30 min při 37 °C. Anisotropie fluorescence sondy DPH ($r_{ss,DPH}$) byla sledována při teplotě měření (T_m) 30 °C, resp. 40 °C. Každé měření bylo provedeno ve čtyřech paralelách, každá paralela byla změřena třikrát.

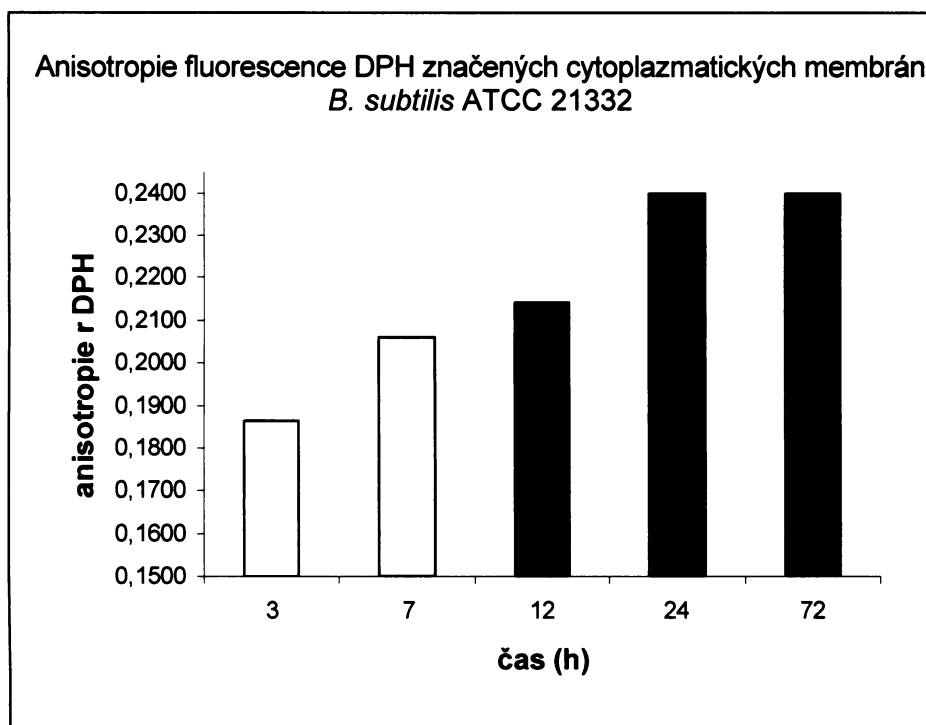
<i>B. subtilis</i>	kultivace	T_K (°C)	T_m (°C)	r_{ss} DPH
168 trp ₂	exp. f.	40	40	0,1663
			30	0,1954
ATCC 21332	exp. f.	40	40	0,1667
			30	0,1958
	3 h	30	40	0,1572
			30	0,1864
	7 h	30	30	0,2059
	12 h			0,2144
	24 h			0,2340
	72 h			0,2398

Tab. 7 Hodnoty anisotropie DPH membránových vzorků *B. subtilis* 168 trp₂ a ATCC 21332 exp. f. – exponenciální fáze růstu, T_K – teplota kultivace, T_m – teplota měření, r_{ss} DPH – ustálená anisotropie fluorescence sondy 1,6-difeny-1,3,5-hexatrien



Obr. 29 Rovnovážná anisotropie fluorescence sondy DPH (r_{ss} DPH) značených membrán *B. subtilis* ATCC 21332 a *B. subtilis* 168 trp₂.

Rovnovážná anisotropie fluorescence sondy DPH byla měřena v membránách izolovaných z buněk v exponenciální fázi kultivace ve 40, resp. 30 °C. T_m – teplota měření



Obr. 30 Rovnovážná anisotropie fluorescence sondy DPH (r_{ss} DPH) značených membrán *B. subtilis* ATCC 21332

Rovnovážná anisotropie fluorescence sondy DPH byla měřena u membrán izolovaných ze 3., 7., 12., 24. a 72. h kultivace ve 30 °C.

Ze srovnání výsledků fluorescenčního měření vzorků *B. subtilis* ATCC 21332 a 168 trp₂ je zřejmé, že cytoplazmatické membrány obou kmenů vykazují v daných kultivačních podmínkách stejné thermotropní chování (Obr. 29). Při $T_m = 30$ °C je mikroviskozita cytoplazmatické membrány vyšší, což se projevuje na nárůstu hodnoty r_{ss} DPH.

V rámci dlouhodobé kultivace ve 30 °C dochází od 3. do 24. h k postupnému nárůstu anisotropie fluorescence rDPH, tedy rigidity cytoplazmatické membrány (Obr. 30). V 72. h, kdy se v kultuře *B. subtilis* ATCC 21332 vyskytuje 2/3 spor, se již hodnota rDPH nezvyšuje. Ve 24. h kultivace, kdy je 1/3 všech bakterií přítomna ve formě endospor, je tedy zřejmě dosaženo maxima r_{ss} DPH.

6. DISKUZE

Bakterie disponují bohatým arsenálem strategií, pomocí nichž se vyrovnávají se specifickými problémy svého životního prostředí a které jim zajišťují přežití v něm. Jednou z těchto strategií je i produkce povrchově aktivních látek antibiotické povahy, které svým producentům na jedné straně udílejí řadu selekčních výhod v daném habitatu, ale na druhé straně musejí být zároveň díky své široké škále biologických účinků chápány ve vztahu ke svým producentům také jako stres. Producenti takovýchto látek si tedy museli vyvinout adaptační mechanismy, které jim zajišťují rezistenci vůči těmto sloučeninám. Adaptační děje odehrávající se na úrovni cytoplazmatické membrány producenta povrchově aktivní látky surfaktinu *B. subtilis* ATCC 21332 byly hlavním předmětem studia v této diplomové práci. Dodnes není zcela jasné, zda je surfaktin z buňky exportován vysoce účinnými transportéry. Bez ohledu na to nelze vyloučit již jeho interakci s vnitřní stranou cytoplazmatické membrány. Poté, co je z buňky uvolněn (prostupem cytoplazmatickou membránou nebo efluxní pumpou), kumuluje se v prostředí a působí opět z vnějšku. Důraz byl tedy kladen především na lipidovou složku a změny v mikroviskozitě cytoplazmatické membrány. Celkový obraz adaptace byl doplněn o analýzu spektra membránového proteomu.

Pozornost byla zaměřena na časový průběh adaptace na přítomnost surfaktinu během růstu producenta *B. subtilis* ATCC 21332 ve 30 °C v živném médiu, které sice neposkytuje příliš vysoké výtěžky surfaktinu (řádově 100 mg/l), ale na druhou stranu poskytuje příznivé podmínky pro růst této bakterie, jejíž primární metabolismus za těchto podmínek nebyl dosud plně charakterizován. Na počátku růstových pokusů bylo navíc provedeno srovnání růstových vlastností tohoto kmene s *B. subtilis* 168 trp₂ za standardní kultivační teploty této modelové bakterie - 40°C (Obr. 10). Doby zdvojení obou kmenů jsou v této kultivační teplotě prakticky shodné (168 trp₂ - T = 14 min, ATCC 21332 - T = 15 min), což svědčí o podobné fyziologii obou příbuzných kmenů.

V rámci optimalizace podmínek kultivace kmene *B. subtilis* ATCC 21332 byla snížena míra aerace tekutých kultur ze 175 na 120 rpm. Tato proměnná stejně jako kultivační teplota 30 °C by měla pozitivně ovlivňovat produkci lipopeptidů, a tedy i surfaktinu (JENNY *et al.* 1993, SYMMANK *et al.* 2002). Růstová rychlost bakteriální kultury inokula za těchto kultivačních podmínek (120 rpm) je shodná s růstovou rychlostí dosahovanou při kultivaci při frekvenci třepání 175 rpm (T = 50 vs. T = 52 min). Určitá redukce růstové rychlosti se objevuje až v další pasáži, kdy doba zdvojení činí T = 38 min

oproti $T = 32$ min při aeraci 175 rpm. Tato skutečnost je připisována právě limitaci kyslíkem.

Růstová charakteristika *B. subtilis* ATCC 21332 byla rovněž sledována v semisyntetickém Landyho médiu, které je tvořeno minerálními složkami s 0,1% přídatkem kvasničného autolyzátu a je v odborné literatuře doporučováno pro produkci surfaktinu (PEYPOUX *et al.* 1999). Na tomto médiu je dosahováno poměrně slibných výtěžků surfaktinu (výsledky nebyly prezentovány) i poměrně vysokých růstových rychlostí ($T = 31$ min ve $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T = 17$ min ve $40\text{ }^{\circ}\text{C}$), avšak obsah železnaté soli, která vytváří v médiu sraženinu, práci s ním velice znesnadňuje a komplikuje zejména izolační postupy. Tento problém se v rámci diplomové práce nepodařilo dostatečně vyřešit, a tak pro další experimenty této práce používáno nebylo. Skýtá však potenciál použití v rámci dalších studií.

Buňky *B. subtilis* ATCC 21332 přecházejí při kultivaci v živném médiu ve $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 120 rpm do stacionární fáze asi při $OD = 1,5$, které bakteriální kultura dosáhne asi po 4,5 h kultivace. V této fázi se začíná indukovat syntéza sekundárních metabolitů včetně surfaktinu, ale také proces sporulace. Z těchto důvodů bylo tedy nutné sledovat kinetiku počtu vegetativních buněk a spor v produkční kultuře po celý čas dlouhodobé kultivace trvající 72 hodin. Termostabilní spory se objevují od 12. h, kdy činí asi 8% celkového počtu bakterií. Ve 24. h je přítomno 33% spor a v 72. hodině 67% spor. To tedy také znamená, že při vstupu do stacionární fáze se pro sporulaci rozhodne jen minimální počet buněk. Z tohoto pohledu je velice zajímavý vzorek ze 7. h kultivace, kdy jsou buňky ve stacionární fázi růstu, ale nejsou mezi nimi přítomny žádné spory, a koncentrace surfaktinu činí již $44,5\text{ mg/l}$, což je hodnota mnohonásobně převyšující CMC surfaktinu i koncentraci nutnou pro jeho interakci s membránou (HEERKLOTZ a SEELIG 2001).

Po třech dnech kultivace přežívá v kultuře už jen 1/3 původních vegetativních buněk neboli producentů surfaktinu, 2/3 kultury jsou tvořeny klidovými stádii, které surfaktin neprodukují (VATER 1986). Tento fakt může vysvětlovat nižší produkci surfaktinu na bohatých médiích obecně. Je pravděpodobné, že na minerálních typech médií, kde všechny buněčné procesy probíhají nižší rychlostí, bude i proces sporulace opožděnější a buněčná aktivita se bude moci déle soustředit na produkci sekundárních metabolitů.

Kinetika produkce surfaktinu v rámci dlouhodobé kultivace *B. subtilis* ATCC 21332 byla sledována pomocí třech metodických přístupů – testu hemolýzy, stanovení koncentrace pomocí BCA a HPLC. Test hemolýzy je testem kvalitativním, který poskytuje odpověď pouze na otázku, zda hemolytické agens (surfaktin) v daném vzorku přítomné je a nebo není. Na druhou stranu představuje jednoduchý a technologicky nenáročný způsob provedení pilotního screeningu přítomnosti surfaktinu. Pro svou nespecifičnost však někdy bývá validita výsledků testu hemolýzy zpochybňována (HSIEH *et al.* 2004). V rámci této diplomové práce byla zaznamenána jedna diskrepance, a to u výsledku ze 7. h kultivace. Zde byl test hemolýzy negativní, ale LC/MS analýzou byla zjištěna koncentrace surfaktinu 44,5 mg/l. Důvod této nesrovnalosti může být v jediném rozdílu mezi oběma vzorky - pro test hemolýzy byla bakteriální kultura vzdušněna při 175 rpm, ale pro LC/MS stanovení při 120 rpm. Nelze tedy vyloučit, že míra aerace má vliv nejen na množství produkovaného surfaktinu, ale i na nástup jeho syntézy.

Metodou stanovení koncentrace surfaktinu pomocí BCA bylo ze dvou nezávislých izolací ze 72. h kultivace dosaženo velmi srovnatelných výsledků (84, resp. 86 mg/l), to vypovídá o reprodukovatelnosti této metody. Ve stejném vzorku bylo pomocí LC/MS analýzy detegováno 120 mg/l surfaktinu, což tedy představuje asi 30% chybu, která může být způsobena určitými rezervami v izolačním postupu surfaktinu z tekuté kultury. V úvahu přicházejí především ztráty při centrifugaci a při odpařování metanolového extraktu, ale také při samotném rozpouštění čistého surfaktinu. V případě izolátů surfaktinu z Landyho média bylo dosahováno nereálně vysokých hodnot. Tyto výsledky mohou být způsobeny přítomností glutamátu, který přechází do kyselého precipitátu a interferuje se stanovením pomocí BCA, které je založeno na interakci aminokyselin a peptidových vazeb mezi nimi s ionty Cu^{2+} a BCA.

Jako vysoce objektivní je možné hodnotit výsledky LC/MS analýz, které podle očekávání ukazují postupný nárůst koncentrace surfaktinu v tekuté kultuře *B. subtilis* ATCC 21332. Koncentrace surfaktinu mezi 7. a 72. h stoupá trojnásobně. Lze navíc říci, že byly potvrzeny literární údaje o stimulaci syntézy surfaktinu limitací kyslíkem (JENNY *et al.* 1993, SYMMANK *et al.* 2002) – mezi aerací 175 a 120 rpm byl u vzorku ze 72. h zaznamenán 20% nárůst koncentrace surfaktinu. I když u jiných časových vzorků nebyla provedena srovnávací analýza vlivu aerace na produkci surfaktinu, z Tab. 3 je patrné, že mezi stanovením ve 12. h při 120 rpm a ve 24. h při 175 rpm existuje jistá rezerva – koncentrace surfaktinu za časový úsek dvanácti hodin stoupá jen o 13,5 mg/l (tj. asi o

17%), přičemž za pětihodinový interval mezi 7. a 12. h při 120 rpm činí nárůst 19 mg/l (tj. 30%). Snížená aerace indukuje syntézu další isoformy surfaktinu s délkou řetězce mastné kyseliny o 13 atomech uhlíku, což potvrzuje fakt, že surfaktin se vyskytuje v jednom izolátu vždy v několika variantách, které jsou odvislé od konkrétních kultivačních podmínek (BONMATIN *et al.* 2003).

Analýza fosfolipidů cytoplazmatické membrány *B. subtilis* ATCC 21332 potvrdila stálost kvalitativního zastoupení jednotlivých fosfolipidových tříd během exponenciální i po celou dobu stacionární fáze, kdy koncentrace surfaktinu v médiu postupně narůstá. Tento fakt svědčí o esenciálním významu každého z fosfolipidů pro funkci cytoplazmatické membrány.

Významné změny však nastávají v kvantitativním zastoupení fosfolipidových tříd v závislosti na časovém průběhu kultivace a produkce surfaktinu. Relativně stálá setrvávají pouze zastoupení PXNH₂ a PA, které se přirozeně drží v nízkých hladinách (SPARROW a RAETZ 1985). Také obsah PS se v průběhu kultivace mnoho nemění. Stejných výsledků s PS bylo dosaženo i v práci LINDGREN (1980) za jiných stresových kultivačních podmínek, a to teplotního šoku *B. subtilis* 168.

U ostatních fosfolipidových tříd však v kvantitativním zastoupení nastávají výrazné změny, které se týkají významného poklesu PG a PE a naopak podstatného vzestupu obsahu kardiolipinu až na konečných 28% v 72. hodině, což oproti 3. h představuje šestinásobný nárůst. Tyto dramatické změny se projevují již od 7. h, kdy dochází k trojnásobnému nárůstu CL a tím pádem přirozeně i k poklesu PG. Metabolismus CL je obecně citlivý k fyziologickým změnám (RIGOMIER *et al.* 1978) a stres vyvolaný rostoucí koncentrací surfaktinu v médiu by mohl vyvolávat stejně jako u příbuzné bakterie *Bacillus halodurans* indukci stresové kardiolipin syntetázy, jejíž gen je u této bakterie exprimován v rámci všeobecné odpovědi na stres (PETERSOHN *et al.* 2001). Bylo také popsáno, že za relativně nepříznivých podmínek se kardiolipin hromadí v membránách (LILLICH a WHITE 1971, SHORT a WHITE 1971), kde může zvyšovat uspořádanost membránové dvojvrstvy (HOCH *et al.* 1992). Akumulace kardiolipinu až na 22% doprovázená poklesem PE se objevuje i při stresové odpovědi gramnegativní bakterie *Pseudomonas putida*, kde díky rigidizaci membrány se CL spolupodílí na zajištění tolerance přítomnosti rozpouštědel v médiu (RAMOS *et al.* 1997). Podobné změny v kvantitativním složení fosfolipidů byly pozorovány také u *E. coli* vystavené etanolovému

(INGRAM 1976) a teplotnímu stresu (SINENSKY 1974). U této bakterie je kardiolipin esenciální pro přežití vůbec (HIRAOKA *et al.* 1993).

Stejně tendence ve změnách relativního zastoupení fosfolipidů jako v této diplomové práci (pokles obsahu PG a nárůst CL) byly zjištěny i v rámci odpovědi *B. subtilis* na osmotický stres. Za těchto podmínek se dokonce kardiolipin se 46% stává majoritním fosfolipidem cytoplazmatické membrány (LÓPEZ *et al.* 2000). Takové změny v lipidovém složení mohou být projevem adaptace *B. subtilis* na hyperosmotické prostředí nebo se může jednat i o obecný jev modifikace membrány v rámci odpovědi na působení rozličných stresů.

Lze usuzovat, že v případě adaptace *B. subtilis* ATCC 21332 na přítomnost surfaktinu by mohl kardiolipin mít ještě další funkci – vysoká koncentrace CL, který nese dva negativní náboje, velmi zvyšuje celkový negativní náboj povrchu membrány (KAWAI *et al.* 2006) a může sloužit jako bariéra proti surfaktinu, který stejně jako kardiolipin na své molekule nese dva negativní náboje. Odpudivé elektrostatické síly zamezují přiblížení peptidického cyklu k polárním hlavičkám fosfolipidů (MAGET-DANA a PTAK 1995). Obdobný princip se uplatňuje i u antimikrobiálních peptidů kationtové povahy, které preferenčně interagují a permeabilizují membrány obsahující negativně nabitě fosfolipidy (PAPO a SHAI 2003, PIETIÄINEN *et al.* 2005).

Další význam vzestupu obsahu kardiolipinu pro producenta surfaktinu by mohl spočívat i v samotném tvaru molekul fosfolipidů. PG, který má cylindrický tvar, i CL vytvářejí lamelární fázi a stabilizují tak membránové dvojvrstvy. Přítomnost dvojmocných kationů (např. Ca^{2+}) však vede k tomu, že CL nabývá tvar kónický a přechází do hexagonální fáze, která je přirozeně vlastní molekule PE (GOLDFINE 1984). Bylo prokázáno, že přítomnost PE v membránových váčcích významným způsobem stabilizuje membránu vůči účinkům surfaktinu. Tento fakt je vysvětlován právě kónickým tvarem molekuly PE, která působí proti invertovanému kónusu molekul surfaktinu (CARRILLO *et al.* 2003). Na základě stejného principu by mohla působit i molekula CL nabývající rovněž tvaru kónusu.

Nelze opomenout známou skutečnost, že během stacionární fáze a především během sporulace také dochází v cytoplazmatické membráně k akumulaci CL (CARD 1973), což by mohlo zkreslovat výsledky dosažené v této diplomové práci. Je nutno zdůraznit, že zde popsané významné změny v zastoupení jednotlivých fosfolipidových tříd

se objevují již od 7. h (obsah CL stoupá trojnásobně), kdy v bakteriální kultuře nejsou přítomny žádné spory a cestou sporulace jde jen minimální počet buněk (8%), které lze dále detegovat ve 12. h kultivace. Navíc takové analýzy fosfolipidů v průběhu dlouhodobé kultivace dosud publikovány nebyly.

Během dlouhodobé kultivace a syntézy surfaktinu kmenem *B. subtilis* ATCC 21332 nedochází pouze ke změnám v relativním složení fosfolipidů cytoplazmatické membrány, ale také k výrazným změnám ve složení jejich mastných kyselin (Tab. 5 a 6, Obr. 23), které na první ohled svědčí o její rigidizaci. Velmi dynamické změny v biosyntéze mastných kyselin nastávají již v 7. h kultivace, kdy je v kultivačním médiu přítomen surfaktin v koncentraci 44,5 mg/l a nejsou přítomny žádné spory. V této době dochází k dvojnásobnému nárůstu obsahu nasycených nevětvených mastných kyselin (vzestup z 22% na 45,7%), na kterém se podílejí především mastné kyseliny 16:0 a 18:0. Zároveň dochází k dramatickému poklesu obsahu mastných kyselin a15:0 a a17:0, což vede také k rigidizaci membrány. Tento vzorek (7 h) představuje časový bod kultivace, ve kterém kulminují změny syntézy mastných kyselin. Z dalších časových izolátů lipidové frakce je zřejmé, že bakteriální kultura se vrací k ustálenému stavu a nabývá novou rovnováhu. Ustálená fáze rigidizace je tentokrát realizována opět převažujícími větvenými mastnými kyselinami, a to především vysokotajícími mastnými kyselinami iso- série.

Účinek surfaktinu na membránovou dvojvrstvu závisí na jejím lipidovém složení. Interakce je při tom optimální, když délka řetězců mastných kyselin fosfolipidů je podobná délce acylového řetězce surfaktinu (GRAU *et al.* 1999). Schopnost surfaktinu penetrovat membránu je naopak snižena, při délce řetězců mastných kyselin vyšší než C > 14 nebo 15 (MAGET-DANA a PTAK 1995). Vzestup obsahu mastných kyselin 16:0 a 18:0 v 7. h by tedy mohl představovat adaptační strategii na přítomnost surfaktinu v médiu. Díky počtu atomů uhlíku tyto mastné kyseliny jednak znesnadňují interakci surfaktinu s cytoplazmatickou membránou, ale také se podílejí spolu s poklesem větvených mastných kyselin na celkovém snížení fluidity membránové dvojvrstvy. Stejnou adaptační strategii (především vzestup mastné kyseliny C18:0) uplatňuje i *Pseudomonas putida* v rámci odpovědi na přítomnost rozpouštědel v kultivačním médiu. Zvýšení rigidity cytoplazmatické membrány je považováno za fyzikální mechanismus, díky kterému je tato bakterie schopna tolerovat přítomnost rozpouštědel, které způsobují penetraci membrány (RAMOS *et al.* 1997). Významný nárůst obsahu nasycených mastných kyselin vykazuje i *B. subtilis* rostoucí za podmínek hyperosmotického stresu (LÓPEZ *et al.* 2000).

Analýzy složení fosfolipidů i mastných kyselin cytoplazmatické membrány *B. subtilis* ATCC 21332 v průběhu růstu a produkce surfaktinu vypovídají o společném fenoménu, a to snižování fluidity membrány. Změny v mikroviskozitě cytoplazmatické membrány byly sledovány a potvrzeny i měřením anisotropie fluorescence hydrofóbní sondy difenylhexatrienu (rDPH). Významný nárůst rigidity membrány nastává již od 7. h kultivace a svého maxima dosahuje ve 24. hodině. V 72. h se již hodnota rDPH drží na stejné úrovni. Změny hodnoty rDPH tedy korelují se změnami fosfolipidů i mastných kyselin. Tyto údaje je nutné konfrontovat s výsledky stanovení počtu spor v jednotlivých časových vzorcích kultivace. Lze říci, že výsledky analýz 7. h jsou opět odrazem adaptace producenta *B. subtilis* ATCC 21332 na peptidické antibiotikum surfaktin – hodnota rDPH stoupne výraznou měrou, i když v této době nejsou v bakteriální kultuře přítomny žádné spory. Tato tendence pokračuje i ve 12. h, kdy je přítomno pouze zanedbatelné množství spor (8%). Mezi 24. a 72. h není rozdíl v hodnotě rDPH žádný, i když v 72. h je přítomné dvojnásobné množství spor než ve 24. h (33% vs. 67%). Navíc není ani známo, zda se spory fluorescenční sondou DPH značí. Perspektivně bude po zavedení metody na separaci spor a vegetativních buněk měření rDPH zopakováno.

Celkový obraz změn cytoplazmatické membrány byl doplněn analýzou membránového proteomu pomocí 1D polyakrylamidové gelové elektroforézy. Obecně lze říci, že spektrum proteinů cytoplazmatické membrány se v čase velmi mění a přetrvává tendence jejich celkové redukce. Pozornost byla zaměřena především na detekci přítomnosti proteinových pruhů surfaktin syntetázy, které se podařilo zachytit ve vzorku ze 7. h kultivace v polyakrylamidových gelech o koncentraci 12,5%, kde se vyskytuje v podobě jednoho pruhu, i 7,5%, kde tvoří tři proteinové pruhy. V dalších časových vzorcích se sice nepodařilo již tento komplex zachytit, ale je zapotřebí vyzdvihnout zjištění, že i když surfaktin syntetáza je solubilním proteinovým komplexem, minimálně přechodně interaguje s cytoplazmatickou membránou. Z časových důvodů nebylo možné provést dělení cytoplazmatické frakce proteinů, ale tento úkol bude jedním z cílů navazujícího studia.

7. SOUHRN

- *B. subtilis* ATCC 21332 roste při kultivaci ve 40 °C v živném médiu téměř shodnou rychlostí s kmenem 168 trp₂. (T = 15 min vs. T = 14 min). Optimální kultivační teplotě 30 °C odpovídá při frekvenci aerace 175 rpm doba zdvojení T = 32 min a při aeraci 120 rpm s T = 38 min. Míra aerace nemá prakticky žádný vliv na růstovou rychlost kultury inokula (T = 50 vs. 52 min).
- Při růstu *B. subtilis* ATCC 21332 v živném bujónu se termostabilní spory objevují od 12. h kultivace, kdy tvoří přibližně 8% celkového počtu bakterií. Ve 24. h je přítomno 33% spor a v 72. h 67% spor.
- Produkce surfaktinu vzrůstá v čase během stacionární fáze. V 7. h činí koncentrace surfaktinu za daných kultivačních podmínek 44,5 mg/l, ve 12. h 63,5 mg/l, ve 24. h 77 mg/l a v 72. h kultivace 95 mg/l (aerace 175 rpm), resp. 120 mg/l (aerace 120 rpm). Snížená aerace zvyšuje produkci surfaktinu o cca. 20% a indukuje syntézu další isoformy surfaktinu s délkou řetězce mastné kyseliny 13 atomů uhlíku.
- Fosfolipidy izolované z bakterií v jednotlivých časových intervalech růstu ve 30 °C jsou kvalitativně zcela shodné.
- Kvantitativní zastoupení jednotlivých fosfolipidových tříd zůstává relativně neměnné pouze u PXNH₂ a PA. U obsahu PS byl zaznamenán pouze nevýznamný pokles. U ostatních fosfolipidových tříd však nastávají výrazné změny. Během syntézy surfaktinu se postupně redukuje obsah majoritních fosfolipidů (PE a PG) a zároveň po celou dobu kultivace významně stoupá obsah CL, který konečně v 72. h tvoří 28% všech membránových fosfolipidů. Celkový negativní náboj nesený molekulami fosfolipidů stoupá s rostoucí koncentrací surfaktinu v médiu.
- Všechny výsledky analýz mastných kyselin počínaje 7. h kultivace vypovídají o rigidizaci cytoplazmatické membrány – nárůst obsahu mastných kyselin s vysokým bodem tání. V časně fázi (7 a 12 h) se tak děje nahrazováním větvených mastných kyselin (poklesu obsahu mastných kyselin a15:0 a a17:0) za nevětvené mastné kyseliny s rovným řetězcem (především 16:0 a 18:0). Ve 24. a 72. h zpátky převažují větvené mastné kyseliny a rigidizace se docíluje vzestupem větvených mastných kyselin iso- série.

- Proteinů cytoplazmatické membrány s postupujícím časem kultivace obecně ubývá a jsou odlišné. Kromě snižování syntézy nebo úplné degradace některých proteinů dochází během stacionární fáze také k zesílené syntéze několika bílkovin (Mr 85, 70, 55 a 32 000). Srovnáním dělení vzorků ze 3. (exponenciální fáze) a 7. h (stacionární fáze) ve 7,5% gelu bylo objeveno asi devět proteinů zesílených nebo nových v 7. hodině.
- V 7,5% polyakrylamidovém gelu se v 7. h v oblasti Mr > 97 tis. objevují tři jemné ale zřetelné proteinové pruhy odpovídající pozicím solubilního enzymu surfaktin syntetázy. Tento protein je možné pozorovat i v dělení ve 12,5% gelu, kde se vyskytuje v podobě jednoho pruhu. V dalších vzorcích nebyla surfaktin syntetáza zachycena.
- Cytoplazmatické membrány kmenů *B. subtilis* ATCC 21332 a 168 trp₂ vykazují v daných podmínkách kultivace a měření stejné thermotropické chování.
- V rámci dlouhodobé kultivace *B. subtilis* ATCC 21332 dochází od 3. do 24. h k postupnému nárůstu anisotropie fluorescence rDPH, tedy rigidity cytoplazmatické membrány. V 72. h se hodnota rDPH drží na stejně vysoké úrovni jako ve 24. h kultivace.
- Výsledky diplomové práce vypovídají o adaptivní rekonstrukci cytoplazmatické membrány producenta surfaktinu, která se může významným způsobem podílet na jeho životaschopnosti a toleranci přítomnosti surfaktinu v jeho životním prostředí.
- Lze říci, že se v rámci diplomové práce podařilo splnit vytčené cíle. Získané výsledky zároveň poskytují podněty pro další studie v této oblasti. Snaha by se měla soustředit především na optimalizaci kultivačních podmínek za účelem zvýšení výtěžku surfaktinu, separaci spor z analyzovaných vzorků bakteriální kultury a doplnění analýzy proteomu o spektrum cytoplazmatických proteinů.
- Výsledky diplomové práce byly prezentovány v posterové sekci kongresu 10th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms (24. – 28.6.2006, Book of Abstracts pg. 77).

8. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

Aguilar, P.S., López, P., de Mendoza, D. (1999): Transcriptional control of the low-temperature-inducible *des* gene, encoding the delta5 desaturase of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 181: 7028-7033.

Ahimou, F., Jacques, P., Deleu., M. (2000): Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. *Enzyme and Microbial Technology* 27: 749 – 754.

Arima, K., Kakinuma, A., Tamura, G. (1968): Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 31: 488 – 494.

Awashti, N., Kumar, A., Makkar, R., Cameotra, S. (1999): Enhanced biodegradation of endosulfan, a chlorinated pesticide in presence of a biosurfactant. *J. Environ. Sci. and Health B* 34: 793 – 803.

Bais, H.P., Fall, R., Vivanco, J.M. (2004): Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringe* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *J. Plant Physiol.* 134: 307 – 319.

Beebe, J.L. (1971): Isolation and characterization of a phosphatidyletanolamin-deficient mutant of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 107: 704 – 711.

Becher, P. (1965): Emulsions, theory and practice, 2nd edition. Reinhold Publishing, New York.

Belshaw, P.J., Walsh, C.T., Stachelhaus, T. (1999): Aminoacyl-CoAs as probes of condensation domain selectivity in nonribosomal peptide synthesis. *Science* 284: 486 - 489.

Bernheimer, A.W., Avigad, L.S. (1970): Nature and properties of a cytolytic agent produced by *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* 6: 361 – 366.

Bisschop, A., Konings, W.N. (1976): Reconstitution of reduced nicotinamide adenine dinucleotide oxidase activity with manadione in membrane vesicles from the menaquinone-deficient *Bacillus subtilis* AroD. Relation between electron transfer and active transport. *Eur. J. Biochem.* 67: 357-365.

Bodour, A.A., Miller-Maier, R.M. (1998): Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantification and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *J. Microbiol. Methods* 32: 273 – 280.

Bonmatin, J.M., Genest, M., Labbé, H., Grangemard, I., Peypoux, F., Maget-Dana, R., Ptak, M., Michel, G., (1995): Production, isolation and characterization of [Leu4]- and [Ile4] surfactins from *Bacillus subtilis*. *Lett. Peptide Sci.* 2: 41 – 47.

- Bonmatin, J.M., Laprévotte, O., Peypoux, F. (2003): Diversity among microbial cyclic lipopeptides: iturins and surfactins. Activity-structure relationship to design new bioactive agents. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening* 6: 541 – 556.
- Branda, S.S., Gonzales-Pastor, J.E., Ben-Yehuda, S., Losick, R., Kolter, R. (2001): Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 11621 – 11626.
- Branda, S.S., Gonzales-Pastor, J.E., Dervyn, E., Ehrlich, S.D., Losick, R., Kolter, R. (2004): Genes involved in formation of structured multicellular communities by *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 186: 3970 – 3979.
- Bruner, S.D., Weber, T., Kohli, R.M., Schwarzer, D., Marahiel, M.A., Walsh, C.T., Stubbs, M.T. (2002): Structural basis for the cyclization of the lipopeptide antibiotic surfactin by the thioesterase domain SrfTE. *Structure* 10: 301 – 310.
- Cameotra, S.S., Makkar, R.S. (1998): Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50 (5): 520 – 529.
- Card, G.L. (1973): Metabolism of phosphatidylglycerol, phosphatidylethanolamine and cardiolipin of *Bacillus stearothermophilus*. *J. Bacteriol.* 114: 1125 – 1137.
- Carrillo, C., Teruel, J.A., Aranda, F.A., Ortiz, A. (2003): Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. *Biochem. Biophys. Acta* 1611: 91 – 97.
- Conti, E., Stachelhaus, T., Marahiel, M. A., Brick, P. (1997): Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S. *EMBO J.* 16: 4174 – 4183.
- Cooper, D.G., MacDonald, C.R., Duff, S.J.B., Kosaric, N. (1981): Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *Appl. Environ. Microbiol.* 42: 408 – 412.
- Cosby, W.M., Vollenbroich, D., Lee, O.H., Zuber, P. (1998): Altered srf expression in *Bacillus subtilis* resulting from changes in culture pH is dependent on the Spo0K oligopeptide permease and the ComQX system of extracellular kontrol. *J. Bacteriol.* 180 (6): 1438 – 1445.
- Cronan, J.E., Jr. (2002): Phospholipid modifications in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 5: 202 – 205.
- Cronan, J.E., Jr., Rock, C.O., Niedhart, F.C. (1996): *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and molecular biology. ASM Press, Washington DC, 612 – 636.
- Cronan, J.E. Jr., Vagelos, P.R. (1972): Metabolism and function of the membrane phospholipids of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 265: 25 – 60.

- Davey, M.E., Caiazza, N.C., O'Tole, G.A. (2003): Rhamnolipid surfactant production affects biofilm formation architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *J. Bacteriol.* 185: 1027 – 1036.
- Davis, D.A., Lynch, H.C., Varley, J. (1999): The production of surfactin in batch cultures by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism. *Enzyme and Microbial Technology* 25: 322 – 329.
- de Mendoza, D., Grau, R., Cronan, J.E., Jr. (1993): Biosynthesis and function of membrane lipids In *Bacillus subtilis* and other Gram positive bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular genetics. A. L. Sonstein, J. A. Hoch, R. Losick (eds): American Society for Microbiology Washington D. C., 411-421.
- de Roubin, M.R., Mulligan, C.N., Gibbs, B.F. (1989): Correlation of enhanced surfactin production with decreased isocitrate dehydrogenase. *Can. J. Microbiol.* 35: 854 – 859.
- Deleu, M., Paquot, M., Jacques, P., Thonart, P., Adriansen, Y., Dufrene, YF. (1999): Nanometer scale organization of mixed surfactin/phosphatidylcholine monolayers. *Biophys. J.* 77: 2304 – 2310.
- Desai, J.D., Banat, I.M. (1997): Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61 (1): 47 – 64.
- Dieckmann, R., Lee, Y.O., van Liempt, H., von Dohren, H., Kleinkauf, H. (1995): Expression of an active adenylate-forming domain of peptide synthetases corresponding to acyl-CoA-synthetases. *FEBS Lett.* 357: 212 – 216.
- Dowhan, W. (1997): Molecular basis for membrane phospholipid diversity: why are there so many lipids? *Annu. Rev. Biochem.* 66: 199 – 232.
- Fry, M., Green, D.A. (1981): Cardiolipin requirement for electron transfer in komplex I. a II. of the mitochondrial respiratory chain. *J. Biol. Chem.* 256: 1874 – 1878.
- Goldfine, H. (1984): Bacterial membranes and lipid packing theory. *J. Lipid Res.* 25: 1501 – 1507.
- Grau, A., Gomez Fernandez, J.C., Peypoux, F., Odtiž, A. (1999): A study on the interactions of surfactin with phospholipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 1418: 307 – 319.
- Grau, R., de Mendoza, D. (1993): Regulation of the synthesis of unsaturated fatty acids by growth temperature in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 8 (3): 535 – 542.
- Grossmann, A.D., Losick, R. (1988): Extracellular control of spore formation in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 4369 – 4377.

Guenzi, E., Galli, G., Grgurina, I., Pace, E., Farrenti, P., Grandi, G. (1998): Coordinate transcription and physical linkage of domains in surfactin synthetase are not essential for proper assembly and activity of the multienzyme complex. *J. Biol. Chem.* 273 (23): 14403 – 14410.

Hamoen, L.W., Vemena, G., Kuipers, O.P. (2003): Controlling competence in *Bacillus subtilis*: shared use of regulators. *Mikrobiology* 149: 9 – 17.

Harwood, C.R., and Archibald, A.R. (1990): Growth, maintenance and general techniques, 1 - 26. In Harwood C. R., Cutting S. M. (eds), *Molecular biological methods for Bacillus*. J. Wiley and Sons Ltd., England.

Hayashi, K., Ohsawa, T., Kobayashi, K., Ogasawara, N., Obuta, M. (2005): The H₂O₂ stress-responsive regulator PerR positively regulates *srfA* expression in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 187 (19): 6659 – 6667.

Heerklotz, H., Seelig, J. (2001): Detergent-like action of the antibiotic peptide surfactin on lipid membranes. *Biophys. J.* 81: 1547 – 1554.

Hensyl, W. R. (1994): *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Ninth edition, Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland, USA.

Hiraoka, S., Matsuzaki, H., Shibuya, I. (1993): Active increase in cardiolipin synthesis in the stationary growth phase and its physiological significance in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 336: 221 – 224.

Hoch, F.L. (1992): Cardiolipins and biomembrane function. *Biochem. Biophys. Acta* 1113: 71 – 133.

Hosono, K., Suzuki, H. (1983): Acylpeptides, the inhibition of cyclic adenosine 3',5' monophosphate phosphodiesterase. III. Inhibition of cyclic AMP phosphodiesterase. *J. Antibiot.* 36: 679 – 683.

Hsieh, F.C., Li, M.C., Lin, T.C., Kao, S.S. (2004): Rapid detection and characterization of surfactin-producing *Bacillus subtilis* and closely related species based on PCR. *Curr. Microbiol.* 49: 186 – 191.

Hue, N., Serani, L., Laprévotte, O. (2001): Structural investigation of cyclic peptidolipids from *Bacillus subtilis* by high energy tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 15: 203 – 209.

Huijbregts, R.P.H., de Kroon, A.I.P.M., de Kruijff, B. (2000): Topology and transport of membrane lipids in bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1469: 43 – 61.

Ingram, L.O. (1976): Adaptation of membrane lipids to alcohols. *J. Bacteriol.* 125: 670 – 678.

- Ishigami, Y., Osman, M., Nakahara, H., Sano, Y., Ishiguro, R., Matusumoto, M. (1995): Significance of β -sheet formation for micellization and surface adsorption on surfactin. *Colloids and Surfaces B* 4: 341 – 348.
- Jenny, K., Deltrieu, V., Käppeli, O. (1993): Lipopeptide production by *Bacillus licheniformis*. In Kosaric N (ed) *Biosurfactants: production, properties, application*, vol 48. Dekker, New York. 135 – 156.
- Julkowska, D., Obuchowski, M., Holland, I.B., Séror, S.J. (2005): Comparative analysis of the development of swarming communities of *Bacillus subtilis* 168 and the natural wild type: critical effects of surfactin and composition of the medium. *J. Bacteriol.* 187 (1): 65 – 76.
- Kakinuma, A., Hori, M., Isono, M., Tamura, G., Arima, K. (1969): Determination of amino acid sequence in surfactin, a crystalline peptidolipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*. *Agric. Biol. Chem.* 33: 971 – 970.
- Kaneda, T. (1977): Fatty acids of the genus *Bacillus*: an example of branched-chain preference. *Bacteriol. Rev.* 41: 391 – 418.
- Kaneda, T. (1991): Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance. *Microbiol. Rev.* 55: 288 – 302.
- Kaneda, T., Smith, E.J. (1980): Relationship of primer specificity of fatty acid de novo synthetase to fatty acid composition in ten species of bacteria and yeast. *Can. J. Microbiol.* 26: 893 – 898.
- Kanfer, J., Kennedy, E.P. (1963): Metabolism and function of bacterial lipids I. Biosynthesis of phospholipids in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 238: 2919 – 2922.
- Kanfer, J., Kennedy, E.P. (1964): Metabolism and function of bacterial lipids II. Biosynthesis of phospholipids in *Escherichia coli*. *Biol. Chem.* 239: 1720 - 1726.
- Katz, E., Demain, A.L. (1977): The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biosynthesis, and possible functions. *Bacteriol. Rev.* 41: 449 – 474
- Kawai, F., Hara, H., Takamatsu, H., Watabe, K., Matsumoto, K. (2006): Cardiolipin enrichment in spore membranes and its involvement in germination of *Bacillus subtilis* Marburg. *Genes. Genet. Syst.* 81: 69 – 76.
- Kawai, F., Shoda, M., Harashima, R., Sadaře, Y., Hara, H., Matsumoto, K. (2004): Cardiolipin domains in *Bacillus subtilis* Marburg membranes. *J. Bacteriol.* 186 (5): 1475 – 1483.
- Keating, T.A., Marshall, C.G., Walsh, C.T., Keating, A.E. (2002): The structure of VibH represents nonribosomal peptide synthetase condensation, cyclization and epimerization domains. *Nat. Struct. Biol.* 9: 522 – 526.

- Kikuchi, T., Hasumi, K. (2002): Enhancement of plasminogen activation by surfactin C: augmentation of fibrinolysis in vitro and in vivo. *Biochem. Biophys. Acta* 1596: 234 – 245.
- Kim, K., Jung, S.Y., Lee, D.K., Jung, J.K., Park, J.K., Kim, D.K., Lee, C.H. (1998): Suppression of inflammatory responses by surfactin, a selective inhibitor of platelet cytosolic phospholipase A2. *Biochem. Pharmacol.* 55: 975 – 985.
- Kinsinger, R.F., Kearns, D.B., Hale, M., Fall, R. (2005): Genetic requirements for potassium ion-dependent colony spreading in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 187 (24): 8462 – 8469.
- Kinsinger, R.F., Shirk, M.C., Fall, R. (2003): Rapid surface motility in *Bacillus subtilis* is dependent on extracellular surfactin and potassium ion. *J. Bacteriol.* 185: 5627 – 5631.
- Klein, W., Weber, M.H., Marahiel, M.A. (1999): Cold shock response of *Bacillus subtilis*: isoleucine-dependent switch in the fatty acid branching pattern for membrane adaptation to low temperatures. *J. Bacteriol.* 181 (17): 5341 – 5349.
- Kluge, B., Vater, J., Salnikow, J., Eckart, K. (1988): Studies on the biosynthesis of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *FEBS Lett.* 231: 107 – 110.
- Konopásek, I. (1992): Kandidátská disertační práce. PřF UK Praha.
- Koumoutsis, A., Chen, X.H., Henne, A., Liesegang, H., Hitzeroth, G., Franke, P. (2004): Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloqueliciens* strain FZB42. *J. Bacteriol.* 186: 1084 – 1096.
- Kowall, M., Vater, J., Kluge, B., Stein, T., Franke, P., Ziessow, D. (1998): Separation and characterization of surfactin isoforms produced by *Bacillus subtilis* OKB 105. *J. Colloid. Interface Sci.* 204: 1 – 11.
- Kracht, M., Rokos, H., Özel, M., Kowall, M., Pauli, G., Vater, J. (1999): Antiviral and hemolytic activities of surfactin isoforms and their methyl ester derivatives. *J. Antibiot.* 52 (7): 613 – 619.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680 – 685.
- Lakowicz, J. R. (1983): Principles of fluorescence spectroscopy. Plenum Press, New York.
- Lambalot, R.H., Gehring, A.M., Flugel, R.S., Zuber, P., LaCelle, M., Marahiel, M.A. (1996): A new enzyme superfamily – the phosphopantetheinyl transferases. *Chem. Biol.* 3: 923 – 936.

- Landbrooke, B.D., Chapman, D. (1969): Thermal analysis of lipids proteins and biological membranes. A review and summary of some recent studies. *Chem. Phys. Lipids* 3: 304 – 367.
- Lillich, T.T., White, D.C. (1971): Phospholipid metabolism in the absence of net phospholipid synthesis in a glycerol requireingmutant of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 107: 790 – 797.
- Lim, J., Park, B., Kim, M., Hwang, M.H., Rhee, M.H., Park, S.C., Yun, H. (2005): The anti-thrombotic activity of surfactins. *J. Vet. Sci.* 6 (4): 353 – 355.
- Lindgren, V. (1980): A cardiolipin-defficient mutant of *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 10: 123 – 126.
- Lindgren, V., Holmgren, E., Rutberg, L. (1977): *Bacillus subtilis* mutant with temperature-sensitive net synthesis of phosphatidyletanolamine. *J. Bacteriol.* 132: 473 – 484.
- Linne, U., Marahiel, M.A. (2000): Control of directionality in nonribosomal peptide synthesis: role of the condensation domain in preventing misinitiation and timing of epimerization. *Biochemistry* 39: 10439 – 10447.
- López, C.S., Heras, H., Garda, H., Ruzal, S., Sánchez-Rivas, C., Rivas, E. (2000): Biochemical and biophysical studies of *Bacillus subtilis* envelopes under hyperosmotic stress. *Int. J. Food Microbiol.* 55: 137 – 142.
- Maget-Dana, R., Ptak, M. (1992): Interfacial properties of surfactin. *J. Colloid Interface Sci.* 153: 285 – 291.
- Maget-Dana, R., Ptak, M. (1995): Interactions of surfactin with membrane models. *Biophys. J.* 68: 1937 – 1943.
- Maget-Dana, R., Thimon, L., Peypoux, F., Ptak, M. (1992): Surfactin/iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. *Biochimie* 74: 1047 – 1051.
- Majumdar, S., Basu, S., Das, S.K., Bose, S.K. (1986): Relationship between sporulation and synthesis of mycobacillin and dipicolinic acid under condition of katabolite repression in *Bacillus subtilis*, *Folia Microbiol.* 31: 196 – 202.
- Matsumoto, K. (1997): Phosphatidylserin synthetase from bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1348: 214 – 227.
- Matsumoto, K. (2001): Dispensable nature of phosphatidylglycerol in *Escherichia coli*: dual roles of anionic phospholipids. *Mol. Microbiol.* 39 (6): 1427 – 1433.

- Menkhaus, M., Ullrich, C., Kluge, B., Vater, J., Vollenbroich, D., Kamp, R.M. (1993): Structural and functional organization of the surfactin synthetase multienzyme system. *J. Biol. Chem.* 268 (11): 7678 – 7684.
- Mileykovskaya, E., Dowhan, W. (2000): Visualization of phospholipid domains in *Escherichia coli* by using the cardiolipin-specific fluorescent dye 10-*N*-nonyl acridine orange. *J. Bacteriol.* 182: 1172 – 1175.
- Mileykovskaya, E., Dowhan, W. (2005): Role of membrane lipids in bacterial division-site selection. *Curr. Opin. Microbiol.* 8: 135 – 142.
- Mileykovskaya, E., Sun, Q., Margolin, W., Dowhan, W. (1998): Localization and function of early cell division proteins in filamentous *Escherichia coli* cells lacking phosphatidyletanolamine. *J. Bacteriol.* 180: 4252 – 4257.
- Mireles, J.R., 2nd, Toguschi, A., Harshey, R.M. (2001): *Salmonella enterica* serovar typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. *J. Bacteriol.* 183: 5848 – 5854.
- Mittenbuhler, K., Loleit, M., Baier, W., Fischer, B., Sedelmeier, E., Jung, G., Winkelmann, G., Jakobi, C., Weckesser, J., Eduard, M.H., Hofmann, A., Bessler, W., Hoffman, P. (1997): Drug specific antibodies: T-cell epitopelipopeptide conjugates are potent adjuvants for small antigens in vivo and in vitro. *Int. J. Immunopharmacol.* 19: 277 – 287.
- Moran, A., Olivera, N., Commedatore, M., Esteves, J., Sineriz, P. (2000): Enhancement of hydrocarbon waste biodegradation by addition of a biosurfactant from *Bacillus subtilis* O9. *Biodegradation* 11: 65 – 71.
- Morikawa, M., Hirata, Y., Imanaka, T. (2000): A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochim. Biophys. Acta.* 1488: 211 – 218.
- Mulligan, C.N. (2005): Environmental applications for biosurfactants. *Environmental pollution* 133: 183 – 198.
- Mulligan, C.N., Gibbs, B.F. (1993): Factors influencing the economics of biosurfactants. Kosaric N (ed), Dekker, New York. *Biosurfactants. Production properties applications* 48: 329 – 371.
- Mulligan, C.N., Yong, R.N., Gibbs, B.F. (1999): Metal removal from contaminated soil and sediments by the biosurfactant surfactin. *Environmental Science and Technology* 33: 3812 – 3820.
- Myslivcová, D. (2004): Diplomová práce. PŘF UK Praha.
- Nakano, M.M., Corbell, N., Besson, J., Zuber., P (1992): Isolation and characterization of *sfp*: a gene that functions in the production of the lipopeptide biosurfactant, surfactin, in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 182: 3274 – 3277.

- Nakano, M.M., Magnusson, R., Myers, A., Curry, J., Grossamn, A.D., Zuber, P. (1991) SrfA is an operon required for surfactin production, competence development and efficient sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 173: 1770 – 1778.
- Nakano, M.M., Zuber, P. (1989): Cloning and characterization of srfB, a regulatory gene involved in surfactin production and competence in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 171: 5347 – 5353.
- Nakano, M.M., Zuber, P. (1990): Molecular biology of antibiotic production in *Bacillus*. *Biotechnology* 10 (3): 223 – 240.
- Neu, T.R. (1996): Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiol. Rev.* 60 (1): 151 – 166.
- Nicholson, W.L. (2002): Roles of *Bacillus* endospores in the environment. *Cell Mol. Life Sci.* 59: 410 – 416.
- Nishibori, A., Kusaka, J., Hara, H., Umeda, M., Matsumoto, K. (2005): Phosphatidylethanolamine domains and localization of phospholipid synthases in *Bacillus subtilis* membranes. *J. Bacteriol.* 187 (6): 2163 – 2174.
- Olivera, N.L., Commendatore, M.G., Moran, A.C., Esteves, J.L. (2000): Biosurfactant-enhanced degradation of residual hydrocarbons from ship bilge wastes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 25: 70 – 73.
- Osman, M., Holand, H., Holmsen, H., Ishigami, Y. (1998): Tuning micelles of a bioactive heptapeptide biosurfactant via extrinsically induced conformational transition of surfactin assembly. *J. Pept. Sci.* 4: 449 – 458.
- Papo, N., Shai, Y. (2003): Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model phospholipid membranes?. *Peptides* 24: 1693 – 1703.
- Petersohn, A., Brigulla, M., Haas, S., Hoheisel, J.D., Völker, U., Hecker, M. (2001): Global analysis of the general stress response of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 183 (19): 5617 – 5631.
- Peypoux, F., Bonmatin, J.M., Wallach, J. (1999): Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51: 553 – 563.
- Pietiäinen, M., Gardemeister, M., Mecklin, M., Leskelä, S., Sarvas, M., Kontinent, V.P. (2005): Cationic antimicrobial peptides elicit a complex stress response in *Bacillus subtilis* that involves ECF-type sigma factors and two-component signal transduction systems. *Microbiology* 151: 1577 – 1592.
- Quadri, L.E.N., Weinreb, P.H., Nakano, M.M., Zuber, P., Walsh, C.T. (1998): Characterization of Sfp, a *Bacillus subtilis* phosphopantetheinyl transferase for peptidyl carrier protein domains in peptide synthetases. *Biochemistry* 37: 1585 – 1595.

- Radin, N. S. (1981): Extraction of tissue with a solvent of low toxicity. *Methods in enzymology*, Academic preses 72: 5-7.
- Ramos, J. L., Duque, E., Rodríguez-Hervas, J.J., Godoy, P., Haïdour, A., Reyes, F., Fernández-Barrero, A. (1997): Mechanisms for solvent tolerance in bacteria. *J. Biol. Chem.* 272 (7): 3887 – 3890.
- Raudino, A., Sarpietro, M.G. (2001): Lipid bilayers. *Encyclopedia of Life Science*. Nature Publishing Group, London.
- Reuter, K., Mofid, M.R., Marahiel, M.A., Ficner, R. (1999): Crystal structure of the surfactin synthetase-activating enzyme Sfp: a prototype of the 4'-phosphopantetheinyl transferase superfamily. *The EMBO Journal* 18 (23): 6823 – 6831.
- Rigomier, D., Lacombe, C., Lubochinsky, B. (1978): Cardiolipin metabolism in growing and sporulating *Bacillus subtilis*. *FEBS Lett.* 89: 131 – 135.
- Rock, C.O., Tesy, J.T., Heath, R., Jackowski, S. (1996): Increased unsaturated fatty acid production associated with a supressor of the fabA6 mutation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 178 (18): 5382 – 5387.
- Rosen, M.J. (1978): Surfactants and interfacial phenomena. John Wiley and Sons, New York.
- Rosenberg, E., Ron, E.Z. (1999): High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52: 154 – 162.
- Rouser, G., Yamamoto, A. (1970): Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phodphorus analysis of spots. *Lipids* 5: 495 – 496.
- Rustan, A.C., Drevon, C.A. (2001): Fatty acids: Structures and Properties. *Encyclopedia of Life Science*. Nature Publishing Group, London.
- Saha, S.K., Nishijima, S., Matsuzaki, H., Shibuya, I., Matsumoto, K. (1996): A regulatory mechanism for the balanced synrhesis of membrane phospholipid species in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60: 111 – 116.
- Sandrin, C., Peypoux, F., Michel, G. (1990): Coproduction of surfactin and iturin A, lipopeptides with surfactant and antifungal properties, by *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 12: 370 – 375.
- Sankaran, K., Wu, H.C. (1994): Lipid modification of bacterial prolipoprotein. Transfer of diacylglyceryl moiety from phosphatidylglycerol. *J. Biol. Chem.* 269: 19701 – 19706.

- Seeling, J., Nieberger, W., (1974): Two pictures of a lipid bilayer. A comparison between deuterium label and spin label experiments. *Biochemistry* 13: 1585 – 1588.
- Shapiro, J.A. (1998): Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. *Annu. Rev. Microbiol.* 52: 81 – 104.
- Sheppard, J.D., Cooper, D.G. (1991): The response of *Bacillus subtilis* ATCC 21332 to manganese during continuous-phased growth. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35: 72 – 76.
- Shinitzki, M., Barenholz, Y. (1974): Dynamic of the hydrocarbon layer in liposomes of lecithin and sphingomyelin containing diacetylphosphate. *J. Biol. Chem.* 249: 2652 -2657.
- Shinitzki, M., Barenholz, Y. (1978): Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarization. *Biochem. Biophys. Acta* 515: 367 – 394.
- Short, S.A., White, D.C. (1971): Metabolism of phosphatidylglycerol, lysylphosphatidylglycerol and cardiolipin of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 108: 219 – 226.
- Schwarzer, D., Mootz, H.D., Linne, U., Marahiel, M.A. (2002): Regeneration of misprimed nonribosomal peptide synthetases by type II thioesterases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 14083 – 14088.
- Sieber, S.A., Marahiel, M.A. (2003): Learning from nature's drug factories: Nonribosomal synthesis of macrocyclic peptides. *J. Bacteriol.* 185 (24): 7036 – 7043.
- Sinensky, M. (1974): Homeoviscous adaptation – a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71 (2): 522 – 525.
- Singh, P., Singh Cameotra, S. (2004): Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *Trends in Biotechnol.* 22 (3): 142 – 146.
- Sohlenkamp, C., López-Lara, I.M., Geiger, O. (2003): Biosynthesis of phosphatidylcholine in bacteria. *Prog. Lipid. Res.* 42: 115 – 162.
- Sparrow, C.P., Raetz, C.R. (1985): Purification and properties of the membrane-bound CDP-diglyceride synthetase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 260: 12084 – 12091.
- Stahl, E. (1969): Thin layer chromatography. Springer Verlag, Berlin. 882 – 906.
- Stanley, N.R., Lazazzera, B.A. (2004): Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Mol. Microbiol.* 52: 917 – 924.
- Stein, T. (2005): *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol. Microbiol.* 56(4): 845 – 857.

- Stelle, S., Sokoll, A., Wilde, C., Bernhard, F., Franke, P., Vater, J. (2004): Initiation of surfactin biosynthesis and the role of the SrfD-thioesterase protein. *Biochemistry* 43: 11331 – 11343.
- Straight, P.D., Willey, J.M., Kolter, R. (2006): Interactions between *Streptomyces coelicolor* and *Bacillus subtilis*: role of surfactants in raising aerial structures. *J. Bacteriol.* 188 (13): 4918 – 4925.
- Symmank, H., Franke, P., Saenger, W., Bernhard, F. (2002): Modification of biologically active peptides: production of a novel lipohexapeptide after engineering of *Bacillus subtilis* surfactin synthetase. *Protein Engineering* 15 (11): 913 – 921.
- Takahashi, T., Ohno, O., Ikeda, Y., Sawa, R., Homma, Y., Igarashi, M., Umezawa, K. (2006): Inhibition of lipopolysaccharide activity by a bacterial cyclic lipopeptide surfactin. *J. Antibiot.* 59 (1): 35 – 43.
- Thimon, L., Peypoux, F., Maget-Dana, R., Roux, B., Michel, G. (1992): Interactions of bioactive lipopeptides, iturin and surfactin from *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 16: 144 – 151.
- Thimon, L., Peypoux, F., Wallach, J., Michel, G. (1993): Ionophorous and sequestering properties of surfactin, a biosurfactant from *Bacillus subtilis*. *Colloids Surf. B* 1: 57 – 62.
- Tseng, C.C., Bruner, S.D., Kohli, R.M., Marahiel, M.A., Walsh, C.T., Siber, S.A. (2002): Characterization of the surfactin synthetase C-terminal thioesterase domain as a cyclic depsipeptide synthase. *Biochemistry* 41: 13350 – 13359.
- Tsuge, K., Ohata, Y., Shoda, M. (2001): Gene yerP, involved in surfactin self-resistance in *Bacillus subtilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45 (12): 3566 – 3573.
- Tunaitis, E., Cronan Jr., J.E. (1973): Characterization of the cardiolipin synthetase activity of *Escherichia coli* envelopes. *Arch. Biochem. Biophys.* 155: 420 – 427.
- van den Boom, T., Cronan, J.E. Jr. (1989): Genetics and regulation of bacterial lipid metabolism. *Annu Rev. Microbiol.* 43: 317 – 343.
- van Klompenburg, W., Nilsson, I., von Heijne, G., de Kruijff, B. (1997): Anionic phospholipids are determinants of membrane protein topology. *EMBO J.* 16: 4261 – 4266.
- Vater, J. (1986): Lipopeptides, an attractive class of microbial surfactants. *Prog. Colloid Polymer Sci.* 72: 12 – 18.
- Vater, J., Stein, T., Vollenbroich, D., Kruft, V., Wittmann-Liebold, B., Franke, P., Liu, L., Zuber, P. (1997): The modular organization of multifunctional peptide synthetases. *J. Protein Chem.* 16: 557 – 564.

Vollenbroich, D., Ozel, M., Vater, J., Kamp, R.M., Pauli, G. (1997b): Mechanism of inactivation of enveloped viruses, by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*. *Biologicals* 25: 289 – 297.

Vollenbroich, D., Pauli, G., Ozel, M., Vater, J. (1997a): Antimycoplasma properties and applications in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 44 – 49.

Volpon, L., Besson, F., Lancelin, J.M. (1999): NMR structure of active and inactive forms of the sterol-dependent antifungal antibiotic bacillomycin L. *Eur. J. Biochem.* 264: 200 – 210.

Walsh, C.T., Gehring, A.M., Weinreb, P.H., Quadri, L.E., Flugel, R.S. (1997): Post-translational modification of polyketide and non-ribosomal peptide synthetases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1: 309 – 315.

Wei, Y.H., Chu, I.M. (1998): Enhancement of surfactin production in iron-enriched media by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *Enzyme and Microbial Technology* 22: 724 – 728.

Wei, Y.H., Wang, L.F., Chang, J.S., Kung, S.S. (2003): Identification of induced acidification in iron-enriched cultures of *Bacillus subtilis* during biosurfactant fermentation. *J. Biosci. Bioengineering* 96 (2): 174 – 178.

Weinrauch, Y., Guillen, N., Dubnau, D.A. (1989): Sequence and transcription mapping of *Bacillus subtilis* competence genes *comB* a *comA*, one of which is related to family of bacterial regulatory determinants. *J. Bacteriol.* 171: 5362 – 5368.

Willey, J. Santamaria, R., Guijarro, J., Geistlich, M., Losick, R. (1991): Extracellular complementation of a developmental mutation implicates a small sporulation protein in aerial mycelium formation by *S.coelicolor*. *Cell* 65 (4): 641 – 650.

Wright, J.R. (2003): Pulmonary surfactant: a front line of lung host defense. *J. Clin. Invest.* 111: 1453 – 1455.

Zuber, P., Nakano, M.M., Marahiel, M.A. (1993): *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria: physiology, biochemistry and molecular biology. Sonenshein, A.L., Hoch, J.A., Losick, R. (eds.). Washington D.C., ASM, 897 – 916.

