

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy

Katedra biochemie

Chitinolytický systém anaerobní houby rodu *Orpinomyces*

Diplomová práce

Školitelka: RNDr. Kateřina Fliegerová, CSc.

Garant: Doc. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Praha 2006

Zuzana Bialková

Diplomová práce byla vypracována na Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd ČR v laboratoři anaerobní mikrobiologie. Prohlašuji, že jsem pracovala samostatně pod vedením školitelky RNDr. Kateřiny Fliegerové, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne:

4 5. 2006

Podpis:

Blažková

Děkuji Ing. Janu Kopečnému, DrSc. za zadání zajímavého tématu a umožnění vypracování této diplomové práce na Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd ČR v laboratoři anaerobní mikrobiologie.

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Kateřině Fliegerové, CSc. za odborné vedení, cenné rady a laskavý a profesionální přístup při vypracovávání této diplomové práce.

Dále velice děkuji Ing. Lence Štrosové za spolupráci na této diplomové práci, za ochotu a všestrannou pomoc a samozřejmě děkuji i celému kolektivu laboratoře za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

A v neposlední řadě velice děkuji svým rodičům za podporu během celého mého studia.

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	7
ABSTRACT.....	9
ABSTRAKT	10
1. TEORETICKÁ ČÁST	11
1.1 Úvod	11
1.2 Bachorové prostředí přežvýkavců	11
1.2.1 Mikroorganismy v bachoru přežvýkavců.....	12
1.2.2 Anaerobní bachorové houby	12
1.2.3 Přenos mikroorganismů mezi býložravci.....	13
1.3 Bachorové anaerobní houby.....	13
1.3.1 Taxonomické zařazení anaerobních bachorových hub	13
1.3.2 Životní cyklus anaerobních bachorových hub	15
1.3.3 Kvašení a metabolismus	16
1.3.4 Metabolismus hexosy	17
1.3.5 Enzymy degradující rostlinnou biomasu.....	18
1.3.6 Genom anaerobních hub	19
1.4 Chytilolytické enzymy	20
1.4.1 Úvod	20
1.4.2 Chitin	20
1.4.3 Buněčná stěna hub	21
1.4.4 Chitinasy	22
1.5 Závěr	25
2. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	26
3. MATERIÁL A METODY	27
3.1 Použitý materiál	27
3.2 Použité přístroje.....	28
3.3 Zvířata.....	28
3.3.1 Transport tráveniny pro izolaci bachorových hub	29
3.3.2 Izolace a uchovávání čistých kultur hub	29
3.3.3 Kultivační techniky a živná média	29
3.3.4 Studované kmeny anaerobních hub	32
3.3.5 Příprava buněčných frakcí anaerobní houby KF2	33

4.7.3 Stanovení teplotního optima	60
4.7.4 Stanovení teplotní stability	61
4.7.5 Substrátová specifita	63
4.7.6 Vliv iontů a chemikálií na aktivitu endochitinasy	64
4.7.7 Určení K_m	66
4.4.8 Stanovení molekulové hmotnosti enzymu	69
5. DISKUSE.....	72
6. ZÁVĚR	78
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	79

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A.....	aktivita enzymu
a.....	koncentrace substrátu
a ₁	směrnice přímky kalibrace
Asp.....	aspartát
ATP.....	adenosintrifosfát
Bisakryl.....	N,N'-methylenbisakrylamid
BSA.....	hovězí sérový albumin
CM-chitin.....	karboxymethylovaný chitin
CoA.....	Koenzym A
DDD chitin.....	demineralizovaný, deproteinovaný, depigmentovaný a delipidovaný chitin
D-GLU.....	D-glukosamin
DNA.....	deoxyribonukleová kyselina
DTT.....	dithiothreitol
EDTA.....	ethylendiamintetraoctová kyselina
Endo.....	endochitinasová aktivita
fNAG.....	faktor přepočítaný z kalibrace pro N-acetyl-D- glukosaminové zbytky
fPNP.....	faktor přepočítaný z kalibrace pro P-nitrophenylové zbytky
G+C-pár.....	párování cytosinu a guaninu v DNA
GLcNAc.....	N-acetylglukosaminové jednotky
Glu.....	glutamát
K _m	Michaelisova konstanta
M10.....	označení média používaného pro pěstování anaerobních bachelorových hub
MBH.....	3-methyl-2-benzothiazolinone-hydrazon
MW.....	molární hmotnost
N-ac.....	N-acetylglukosaminidasová aktivita
NAD ⁺	oxidovaná forma nikotinamidadenindinukleotidu
NADP ⁺	oxidovaná forma nikotinamidadenindinukleotidfosfátu
NADH.....	redukováná forma nikotinamidadenindinukleotidu
NADPH.....	redukováná forma nikotinamidadenindinukleotidfosfátu

PAHBAH	čínidlo z hydrazidu 4-hydroxybenzoové kyseliny, HCl a NaOH
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
PNP	P-nitrophenylovaný cukerný zbytek
POHBAH	čínidlo z hydrazidu 4-hydroxybenzoové kyseliny a HCl
rRNA.....	ribozómová ribonukleová kyselina
SDS	dodecylsíran sodný
SDS PAGE elektroforéza.....	dělení proteinů dle molekulové hmotnosti
Temen	N,N,N',N'-tetramethylethylendiimin
Thimerosal	Merkury-[(o-carboxyphenyl)thio]-ethyl sodium salt
TMK.....	těkavé mastné kyseliny
Trizma.....	trizma báze, tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UDP	uridindifosfát
V.....	maximální rychlost
v	počáteční rychlost

Abstract

The anaerobic rumen fungus, *Orpinomyces joyonii* KF2, was isolated from cow's rumen fluid. Its chitinolytic system was studied in 3 fractions, in medium, in cytosol and in cell wall. The fungus grew in medium M10 [27] with 20 % cell-free rumen fluid and 3 g/l glucose as energy source. Activities of exochitinase, N-acetylglucosaminidase and deacetylase were very low. The most important chitinolytic enzyme is endochitinase. The greatest endochitinase activity was found in cytosolic and cell wall fraction. Endochitinase produced extracellularly did not achieved activity comparable with enzyme activities detected in two intracellular fractions. Concentration of medium by ammonium sulfate precipitation and ultrafiltration through polyethersulfon membranes (10- 300 kDa) did not bring increasing of endochitinase activity. Ultrafiltration of enzymes of cytosolic fraction was not successful as well, only the fraction containing the biggest proteins was active.

Endochitinase of three cell fractions of fungus KF2 was further characterized. The optimal pH of extracellular endochitinase was 5, while cytosolic and cell wall fraction had optimal pH 6. The optimal temperature of extracellular endochitinase was 30°C, cytosolic endochitinase was 50°C and cell wall endochitinase was 40°C. The endochitinase was stable from pH 4 to 7 and lost the function at 50°C in medium and at 60°C in others cell fractions. The intracellular chitinases hydrolyzed fungal chitin and CM-chitin more rapidly than other tested substrates. The enzyme activity was inhibited by Mn^{2+} , thimerosal, SDS and EDTA. Mg^{2+} , on the other hand iodoacetamid and iodoacetic acid stimulated enzyme activity. Zymograms demonstrated that endochitinase exist in several isoenzyme forms; their molecular weights range from 43 to 134 kDa.

Abstrakt

Anaerobní bachorová houba *Orpinomyces joyonii* KF2 byla izolována z bachorové tekutiny krávy. Byl studován její chitinolytický systém ve třech frakcích, a to v médiu, v cytosolu a v buněčných stěnách. Houba byla kultivována v médiu M10 [26] s 20 % bachorové tekutiny a 3 g/l glukosy jako zdroji uhlíku. Byly zjištěny jen velmi nízké aktivity exochitinasy, N-acetylglucosaminidasy a deacetylasy. Jako nejvýznamnější chitinolytický enzym byla prokázána endochitinasa. Nejvyšších endochitinasových aktivit dosahovala cytosolová frakce a frakce z buněčných stěn. Endochitinasa produkovaná extracelulárně nedosahovala takových aktivit jako ve dvou ostatních frakcích a ani zakoncentrování média srážením síranem amonným a dělením přes polyethersulfonové filtry (10 - 300 kDa) nevedlo ke zvýšení její aktivity. Také enzymy cytosolové frakce byly děleny ultrafiltrací, avšak veškerá endochitinasová aktivita zůstala ve frakci obsahující proteiny o velikosti nad 300 kDa.

Endochitinasa ze všech buněčných frakcí houby KF2 byla charakterizována. Optimální pH endochitinasy v médiu bylo 5 a v cytosolové frakci a frakci z buněčných stěn 6. Optimální teplota působení enzymu byla 30°C pro endochitinasu v médiu, 50°C pro cytosolovou endochitinasu a 40°C pro endochitinasu buněčných stěn. Endochitinasy byly stabilní v rozmezí pH 4-7 a ztratily funkci při 50°C v médiu a 60°C v ostatních buněčných frakcích. Endochitinasy rozkládaly všechny námi studované substráty. Nejvhodnější substrát pro cytosolovou chitinasu byl houbový chitin a pro chitinasu buněčných stěn CM-chitin. Enzymová aktivita byla inhibována ionty Mn^{2+} , thimerosalem, SDS a EDTA. Naopak ionty Mg^{2+} , iodoacetamid a iodoctová kyselina měly aktivační účinek. Zymografy prokázaly, že endochitinasy se nacházejí ve všech buněčných frakcích ve formě několika izoenzymů, jejichž molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí 43 až 134 kDa.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Úvod

Hospodářská zvířata chovaná ve velkochovech i doma jsou cenným zdrojem potravy pro člověka. Kvalita těchto zvířat, tedy i kvalita stravy pro člověka, závisí především na jejich výživě. Býložraví přežvýkavci jsou skupinou, pro kterou je složení krmiv velice důležité, neboť nejsou schopni pomocí vlastních enzymů štěpit polysacharidy rostlin^[49]. K rozkladu krmiva využívají symbiotického vztahu s mikroorganismy, bakteriemi, prvoky a houbami, které osidlují předžaludek. Bachorový ekosystém je proto předmětem intenzivního studia již více než sto let. Zájem o něj neklesá ani v současnosti vzhledem ke snaze, o co nejlepší využití a regulaci jedinečné schopnosti přežvýkavců produkovat živočišnou bílkovinu z rostlinné biomasy.

1.2 Bachorové prostředí přežvýkavců

Býložravci vyřešili konkurenční boj o potravu s ostatními zvířaty konzumací rostlinné biomasy s vysokým obsahem strukturálních polysacharidů (hlavně celulosy, hemicelulosy a pektinu), které jsou pro ostatní živočichy málo stravitelné nebo nestravitelné. Tyto polysacharidy jsou štěpeny mikroorganismy obývajícími trávicí trakt svého hostitele a získává se tak energie využitelná oběma organismy. Na vrcholu evolučního stromu býložravců stojí přežvýkavci, u kterých se v trávicím traktu vytvořil segmentovaný předžaludek složený z bachoru, knihy a čepce. Bachor je největší ze tří částí předžaludku. Jeho objem je u dospělého dobytka 100-120 litrů. Nachází se v levé polovině břišní dutiny a leží mezi bránicí a páňvovým vchodem. Je tvořen dvěma nad sebou uloženými vaky, které jsou oddělené podélnými brázdami^[49].

Komory předžaludku mají charakter fermentorů s diskontinuálním dávkováním krmiva a vytvářejí tak ideální prostředí pro fermentující mikroorganismy. Pro bachor je typická teplota 39-40°C. Při intenzivní fermentaci může vystoupit až na 41°C, naopak po požití většího množství vody poklesne o 5-10°C. Hodnota pH je 6-7 a redoxní potenciál je výrazně záporný (-150 až -300 mV), což je způsobeno hlavně fermentační činností mikroorganismů. Bachorový plyn obsahuje hlavně CO₂ (40-80 %), metan (20-40 %), dusík (3-15 %) a vodík (1-5%)^[73].

1.2.1 Mikroorganismy v bachoru přežvýkavců

Symbiosa zvířete s bachorovými mikroorganismy přináší hostiteli nutriční výhody, které staví přežvýkavce na výjimečné místo mezi hospodářskými zvířaty. V běžné bachorové populaci se vyskytují hlavně bakterie, protozoa a houby. Tyto mikroorganismy se v trávicím traktu vyskytují přichycené na částech potravy, adherované na epitel stěny žaludku nebo volně pohyblivé v bachorové tekutině ^[29]. Nejpočetněji jsou zastoupeny bakterie ^[73]. Díky svému počtu (10^9 až 10^{11} /ml) nejvíce ovlivňují bachorové prostředí. V bachoru se mohou vyskytovat i kvasinky a plísňe, které se tam dostaly s kontaminovaným krmivem ^[73].

1.2.2 Anaerobní bachorové houby

Bachorové houby jsou jediné dosud popsané striktně anaerobní nižší houby, jejichž existence byla mikrobiologům dlouho utajena. Motilní zoospory hub byly v bachorovém obsahu pozorovány již dávno ^[120], ale vědci je mylně považovali za zástupce protozoí ^[73]. Také názor J.W. Fostera formulovaný v roce 1949, který tvrdil, že nemohou existovat anaerobní houby a nemohou metabolizovat karbohydráty anaerobním kvašením ^[73], byl jednou z příčin pozdního objevu anaerobních hub. Až v roce 1974 vyslovil Orpin ^[83] pochybnosti o tom, zda se skutečně jedná o prvoka. Své úvahy opíral o pozorování prudkého nárůstu hmoty domnělého bičíkovce během 20-ti minut po nakrmení zvířete. Hustota biomasy poté zvolna klesala a zhruba po 10-ti hodinách dosáhla minimální hodnoty, na které setrvala až do dalšího krmení. V dalších studiích Orpin ^[84] odhalil, že domnělý prvok je ve skutečnosti pohyblivé generativní stadium (tj. zoospora) nižších hub. Pokles koncentrace zoospor vysvětlil jejich přeměnou na nemotilní vegetativní stadium. Výzkum buněčné stěny těchto organismů prokázal přítomnost chitinu ^[88] a chitinsyntetasy ^[22], což byl konečný důkaz toho, že tyto mikroorganismy patří mezi nižší houby ^[73]. První izoláty byly provedeny ve Velké Británii z ovce ^[84], u nás poprvé izolovala anaerobní houby Novozámská z Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR v roce 1987. Jakmile se zjistilo, že lze houby izolovat i z trusu zvířat ^[63,69], byly popsány houby u celé řady přežvýkavců i jednožaludkových býložravců jako je např. slon ^[112]. Anaerobní houby nebyly izolovány ze zažívacího traktu býložravců s rychlým obratem jako je např. králík nebo vačice ^[10]. To naznačuje, že anaerobní houby jsou přítomny skoro ve všech savcích býložravcích ať už domácích či divoce žijících ^[112].

1.2.3. Přenos mikroorganismů mezi býložravci

Novorozený přežvýkavec postrádá celulolytickou mikroflóru, která je přítomna u dospělých jedinců. Mláďata získávají energii z mléčného cukru stejně jako malí savci [112]. Houby se objevují v bachoru první týden po narození. Ve třetím týdnu, kdy mládě začíná přijímat pevnou stravu, dochází ke snížení množství hub [54]. Po odstavu se zvětší obsah bachoru a zvíře získává celou mikroflóru bachoru. O přenosu mikroflóry z matky na mládě se toho zatím ví velice málo. Ke kolonizaci dochází během odstavení přes sliny přímo mezi dvěma zvířaty nebo nepřímo přes aerosoly, krmivem a pitím společné vody [30, 44]. Přenos z trusu není pravděpodobný. I když přežívající struktury anaerobních hub se mohou šířit na rostlinstvo a být postupně požrány býložravci [112].

1.3 Bachorové anaerobní houby

1.3.1 Taxonomické zařazení anaerobních bachorových hub

Současný taxonomický systém anaerobních hub byl vytvořen na základě morfologických kritérií. Jednotlivé rody jsou definovány na základě monocentrické či polycentrické stélky, bulbózních či vláknitých kořínek mycelia a počtu bičíků u zoospor. Určení druhů anaerobních hub se opírá o ultrastrukturu zoospor. Takto vytvořený systém však nepočítá s morfologickou variabilitou jednotlivých kmenů hub způsobenou biotopem, v němž se hostitelské zvíře vyskytuje. Tento taxonomický systém se stále ještě dotváří. Nedávný rozvoj molekulárně genetických metod však nabízí řadu způsobů ke zkoumání taxonomie a fylogenetické příbuznosti izolovaných kmenů na základě analýzy DNA, která není morfologickými změnami ovlivněna [73].

Všechny dosud popsané druhy anaerobních hub tvoří během svého vývoje zoospory/ a proto byly zařazeny do kmene *Eumycotina*, podkmene *Mastigomycotina* a třídy *Chytridiomycetes*. Barr [3] zavedl nový řád *Spizellomycetales*, který v sobě obsahoval všechny anaerobní houby. Avšak další zkoumání ultrastruktury, fyziologie a rRNA sekvencí [59, 60, 75, 76] ukázalo výrazné rozdíly mezi anaerobními houbami a ostatními aerobními houbami řádu *Spizeollomycetales*. Proto byl později vytvořen [60] nový řád

Neocallimastigales (dříve *Neocallimasticales*). Tento řád obsahuje jedinou čeleď *Neocallimasticaceae* ^[3, 37], do které byly zařazeny jen anaerobní houby ^[73]. Dnes je popsáno 16 druhů patřících do 6 rodů ^[112], které jsou shrnuty v tabulce 1.

Nynější klasifikace anaerobních hub ^[4, 5]:

Kmen: *Eucomycota*

Podkmen: *Mastigomycotina*

Třída: *Chitridiomycety*

Řád: *Spizellomycetales*

Čeleď: *Neocallimastica*

Podle typu stélky rozeznáváme dvě hlavní skupiny anaerobních bachorových hub: monocentrické (mají jedno centrum reprodukce) a polycentrické (mají mnoho center rozmnožování) ^[5].

Tab. 1. Rozdělení rodů anaerobních hub a jejich stručná charakteristika ^[113, 94]

Caecomyces monocentrická nebo polycentrická stélka, jednobičikáté zoospory	Caecomyces communis	ovce	[33]
	Caecomyces equi	kůň	[33]
Piromyces monocentrická stélka, jednobičikáté zoospory, vláknité rhizomycelium	Piromyces communis	ovce	[33]
	Piromyces mae	kůň	[58]
	Piromyces dumbonica	slon	[58]
	Piromyces rhizinflata	slon	[58]
	Piromyces minutus	jelen	[40]
	Piromyces spiralis	koza	[41]

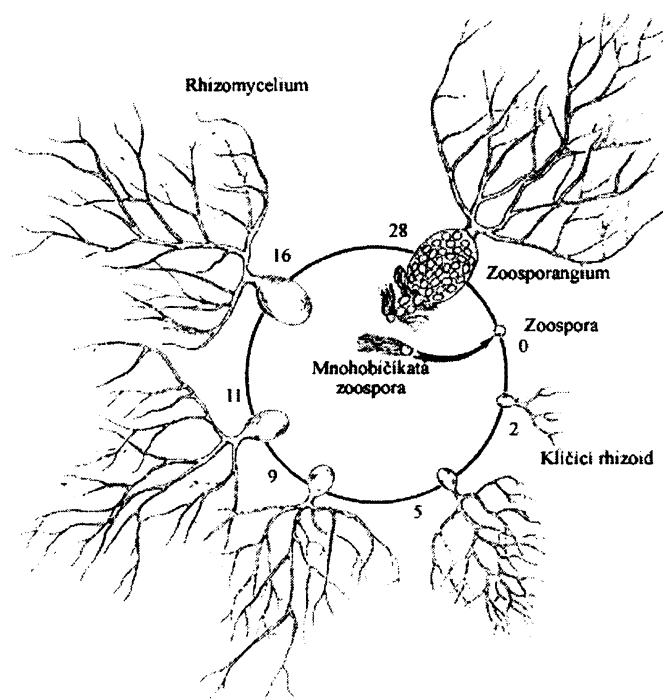
Neocallimastix monocentrická stélka, polybičíkaté zoospory, vláknité rhizomycelium	Neocallimastix frontalis	ovce	[37]
	Neocallimastix	ovce	[92]
	patriciarum	ovce	[122]
	Neocallimastix hurleyensis Neocallimastix variabilis	kráva	[42]
Cyllamyces polycentrická stélka, jednobičíkaté zoospory	Cyllamyces aberensis	ovce	[94]
Anaeromyces polycentrická stélka, jednobičíkaté zoospory, vláknité rhizomycelium	Anaeromyces mucronatus	ovce	[20]
	Anaeromyces elegans	kráva	[43]
Orpinomyces polycentrická stélka, polybičíkaté zoospory, vláknité rhizomycelium	Orpinomyces joyonii	ovce	[19]

1.3.2 Životní cyklus anaerobních bachorových hub

Životní cykly anaerobních hub jsou si velmi podobné a je pro ně typické střídání motilní fáze zoospor s nemotilní vegetativní fází stélky^[93]. Stélka nese sporangium, ze kterého se uvolňují zralé zoospory (viz obr.1, str. 16). Prázdné sporangium je stráveno hostitelským zvířetem. Zoospory se aktivně pohybují pomocí bičíkatého aparátu. Díky chemoreceptorům lokalizují rostlinné pletivo a zachytí se na pevném xylemu. Dále nastává encystace, penetrace rostlinných vláken rhizoidy a vytvoření nového sporangia. K uvolnění spor dochází 0,5-1 hodinu po nakrmení zvířete^[83,84, 85, 86]. Zoosporogenezise je indukována sacharidy rozpustnými ve vodě, které jsou přítomny v krmivu, a také hemem, jehož deriváty jsou prostatickými skupinami některých rostlinných enzymů^[83, 120, 91, 87]. Byly identifikovány^[89] čtyři chemoreceptory pro glukosu, fruktosu, mannitol a mannosu nebo pro jejich směs se sacharosou. Chemotaxe zoospor se projevila už při koncentraci 1 μM sacharosy. U zoospor byl také pozorován améboidní pohyb po povrchu rostlinné hmoty. Je-li hostitelské zvíře krmeno jednou denně, trvá životní cyklus druhů rodu *Neocallimastix* asi 24-35 hodin^[47, 64]. Pokud má zvíře kontinuální přísun potravy, může se životní cyklus

urychlit až na 8 hodin ^[87]. Invaze hub je tedy poměrně rychlá. Zoospory obsazují poškozené části rostlin jako konce stonků, kde dozrávají do vegetativního stadia. Rhizoidy poté pronikají hluboko do pletiv, kde tráví polymery buněčných stěn ^[54].

Spekulace o tom, že životní cyklus anaerobních hub může také obsahovat fázi pohlavního rozmnožování, jsou zcela teoretické a dosud žádná pozorování *in vitro* tuto domněnku nepotvrdila ^[73].



Obr. 1. Životní cyklus anaerobních bachorových hub ^[112]

1.3.3 Kvašení a metabolismus

Bachorové houby se přizpůsobily anaerobnímu prostředí ztrátou mitochondrií ^[126, 82]. Nejsou schopny tvořit energii aerobním nebo anaerobním dýcháním a nemohou hromadit redukující ekvivalenty v transportním řetězci elektronů, kde by byl kyslík akceptorem ^[105]. Zvláštním energetickým centrem anaerobních hub jsou hydrogenosomy, orgány schopné vazby metabolismu glukosy na vznik energie s produkcí H_2 ^[77, 126]. Houby získávají energii anaerobním kvašením uhlovodíků. V tomto procesu vystupují uhlovodíky jako akceptory i donory elektronů. Anaerobní kvašení vykazuje menší energetický zisk oproti aerobnímu dýchání, protože část energie zůstává vázána v produktech ^[105]. Při aerobním dýchání se

kompletní oxidací 1 molu glukosy za vzniku H_2O a CO_2 získá 36 molekul ATP, zatímco při anaerobní fermentaci jen 2 molekuly ATP.

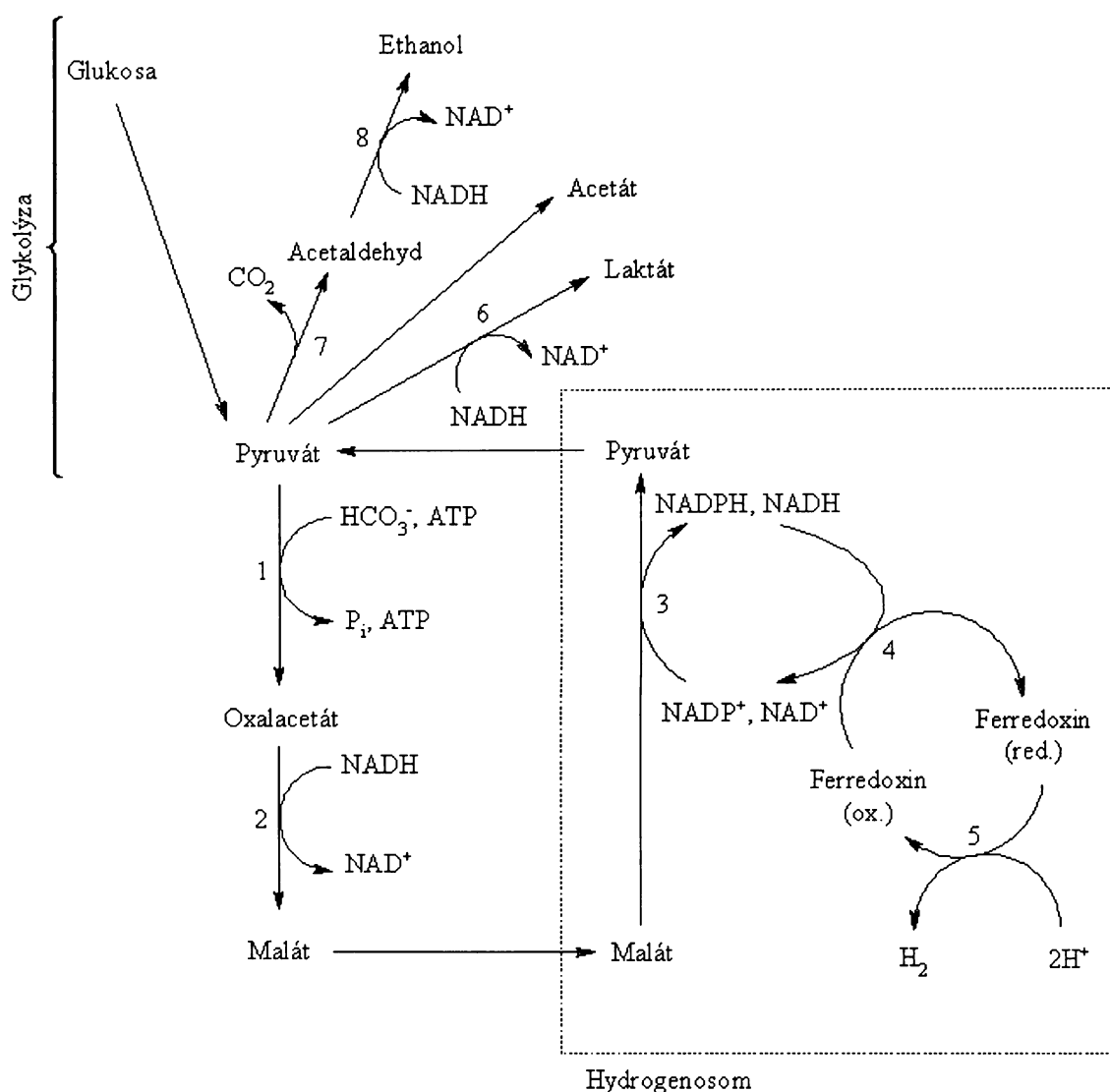
V zoosporách anaerobních hub jsou hydrogenosomy umístěny v blízkosti bičíku [76, 74, 121]. Toto umístění obdobné poloze mitochondrií v aerobních zoosporách vede k předpokladu, že velká část energie vyrobené v hydrogenosomech je použita na pohyb bičíku [112].

1.3.4 Metabolismus hexosy

Metabolismus glukosy byl zkoumán na dvou houbách: *N. patriciarum* a *N. frontalis* [126, 82].

U obou organismů se projevuje spojení několika anaerobních metabolických cest. U *N. frontalis* je pyruvát, který vzniká glykolysou z glukosy, přeměněn pomocí enzymu pyruvákarboxylasy na oxalacetát, který je redukován maláthydrogenasou na malát. Malát je transportován do hydrogenosomů, kde hydrogenosomální enzymy vytvářejí energii oxidací pomocí NADH:ferredoxin oxidoreduktasy. Protonová redukce probíhá přes ferredoxin a hydrogenasu na H_2 (viz obr. 2, str. 18). Pyruvát vytvořený oxidací je přenesen zpět do cytoplazmy, kde je přeměněn na oxalacetát nebo redukován laktátdehydrogenasou na laktát. Ten je metabolizován na acetát nebo dekarboxylován pyruvátdekarboxylasou na acetaldehyd s následnou přeměnou na ethanol [126, 82].

U houby *N. patriciarum* je i přes podobnost základních cest rozdíl v metabolismu hexos. Glukosa je prvotně přeměněna na fosfoenolpyruvát. Fosfoenolpyruvát je následně karboxylován na oxalacetát, před redukcí na malát. Pyruvát produkovaný v hydrogenosomech je přeměněn na fosfoenolpyruvát pyruvátkinasou a dochází k přeměně na konečné produkty kvašení. U mnohých anaerobních hub ale vznikají i jiné produkty [111]. Přítomnost pyruvát-formát lyasy naznačuje, že pyruvát je štěpen na mravenčan a acetyl CoA, který je dále metabolizován na ethanol a acetát [36]. Závěrem tedy lze shrnout, že anaerobní houby přeměňují hexosu na mravenčan, acetát, laktát, ethanol, CO_2 a H_2 [9, 65, 96, 13]. Mnohem méně je známo o konečných produktech kvašení na jiných substrátech než je glukosa [112].



Obr. 2. Metabolismus glukosy u *Neocallimastix frontalis* [82]

Enzymy účastníci se metabolismu: 1- pyruvát karboxylasa, 2- malát dehydrogenasa, 3- jablečný enzym, 4- NADH(NADPH): ferredoxin oxidoreduktasa, 5- hydrogenasa, 6- laktát dehydrogenasa, 7- pyruvát dekarboxylasa, 8- alkohol dehydrogenasa

1.3.5 Enzymy degradující rostlinnou biomasu

Bachorové houby mají mimořádnou schopnost účinně degradovat rostlinná pletiva tvořená celulosou, xylanem a ligninem, glykogenem, škrobem či inulinem [96, 64]. Anaerobní houby dokáží úspěšně rozkládat i velmi odolný vaskulární systém či sklerenchymální pletivo, obecně považované za nedegradovatelné. Houby v bachoru jsou prvotními kolonizátory rostlinné biomasy, otvírají a zpřístupňují tak rostlinné stěny buněk dalším bachorovým mikroorganismům [73]. Anaerobní houby mají totiž k dispozici velkou škálu

hydrolytických enzymů, které umožňují rozkládat rostlinné pletivo. Ty zahrnují celulasy [66, 2, 108], hemicelulasy [66, 72], xylanasy [108], glukosidasy a xylosidasy [38], disacharidasy [38], pektinlyasy [35], feruloyl a p-coumaroyl esterasy [14, 15, 16], amylasy, amyloglykosidasy [71, 95] a v neposlední řadě proteasy [119, 1, 67]. Většina informací o těchto enzymech byla získána ze surových extraktů z kultur. Jak stélka tak i zoospory vykazovaly produkci hydrolytických enzymů [123, 124]. Některé hlavně extracelulární enzymy jako β -xylosidasa [39], xylanasa [108], β -glukosidasa [39, 28] a p-coumaroyl a feruloyl esterasa byly vyčištěny a charakterizovány.

1.3.6 Genom anaerobních hub

Jednou z neměnných charakteristik mikroorganismů je zastoupení G+C párů v genomu (vyjádřený v molárních procentech). Jaderný obsah G+C párů anaerobních hub je zcela výjimečný, neboť se značně liší od hodnot naměřených u všech ostatních hub. Obsah G+C párů anaerobních hub je dokonce vůbec nejnižší mezi všemi dosud zkoumanými mikroorganismy. Při výzkumu izolované monocentrické houby *Neocallimastix* (kmen LM-2) byl zjištěn v DNA obsah G+C párů jen 18 %. Tato hodnota zahrnuje často se opakující geny kódující rRNA. Pokud by nebyly brány do výpočtu, klesne číslo na 12-13 % [23]. U dalších rodů anaerobních hub se obsah G+C párů pohybuje v rozmezí od 14 do 22 %, zatímco pro ostatní houby z třídy *Chytridiomycetes* lze v literatuře nalézt hodnoty v rozsahu 44-66 % [24]. Toto výrazně nižší procentuální zastoupení G+C párů u anaerobních hub je pravděpodobně zapříčiněno unikátností prostředí, který tyto houby osidlují, tedy trávicího traktu přežvýkavců [73].

1.4 Chytnolytické enzymy

1.4.1 Úvod

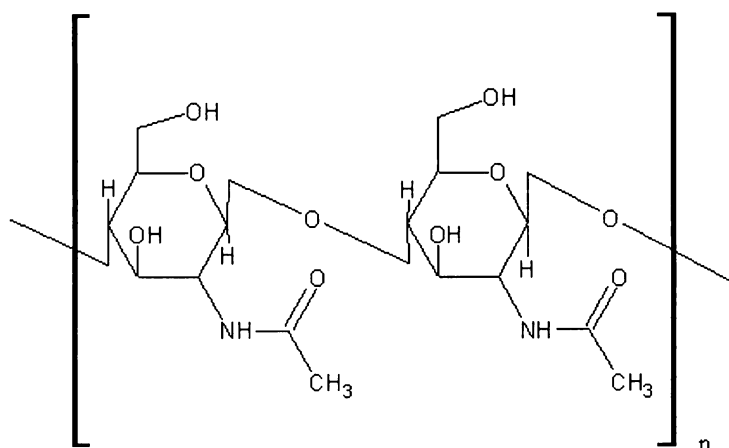
Obecný pojem chitinasy v sobě zahrnuje enzymy, které se podílejí na degradaci chitinu. Patří sem endochitinasy a exochitinasy {[poly (1,4- β -(2-acetamido-2-deoxy-D-glukosid)] glykanohydrolasy}}, které jsou, i přes rozdílný mechanismus štěpení, zařazeny v nomenklatuře pod stejné číslo EC 3.2.1.14. Dále se při štěpení chitinu uplatňuje N-acetylglukosaminidasa (2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukosidacetamidodeoxyglukohydrolasa, EC 3.2.1.30) a N-acetylhexosaminidasa (EC 3.2.1.52) ^[99].

Chitinasy jsou produkovány celou řadou organismů, přičemž fyziologické role chitinas se značně liší. Patogenní funkci mají chitinasy produkované houbami, protozoi či bakteriemi, které napadají členovce a hmyz. Naopak obranná funkce je typická pro chitinasy, které produkují rostliny v případě zranění nebo napadení patogenními houbami. Chitinasy byly objeveny i u zvířat, a to jako obranný mechanismus v krvi přežvýkavců ^[53]. Pro mnohé bakterie, které jsou schopny využít chitin jako zdroj uhlíku a dusíku, mají chitinasy roli nutriční. Také masožravé rostliny používají chitinasy při trávení. U hub, které nevyužívají chitin jako substrát, nýbrž je pro ně strukturálním polysacharidem jejich buněčné stěny, hrají chitinasy roli morfo-genetickou a autolytickou, tak jak je popsáno v samostatné kapitole 1.4.4 ^[34].

1.4.2 Chitin

Chitin je nerozvětvený homopolymer N-acetylglukosaminových (GlcNAc) jednotek v β -1,4 spojení, které tvoří terciální strukturu složenou z α helixů stabilizovaných intramolekulárními vodíkovými můstky do forem mikrovláken (viz. obr. 3, str. 21). Nejběžnější α chitin tvoří antiparalelní uspořádání řetězců, které jsou kovalentně nebo nekovalentně spojeny s mnoha proteiny a polysacharidy. Chitin je strukturální složka buněčných stěn hub a některých řas, jeho přítomnost v myceliu bývá užívána jako kritérium pro určování hub ^[99]. Rigidní struktura chitinu chrání formou skořápek a kutikul řadu členovců, měkkýšů, červů a jiných typů organismů. Odhadnutá roční produkce chitinu je 10^{10} až 10^{11} tun ^[53].

Syntézy chitinu se účastní membránový protein chitin syntetasa (EC 2.4.1.16), která katalyzuje přenos N-acetylglukosaminu z UDP-N-acetylglukosaminu (uridin 5'-difosfo-N-acetylglukosamin) do chitinového řetězce. Houby mají k dispozici dva druhy chitin syntetasy- chitin syntetasu 1 a 2, což bylo prokázáno při pokusu s kvasinkou *S.cerevisiae*, která produkovala chitin i po narušení genu pro Chs1 [25].



Obr. 3. Základní stavební jednotka chitinu

1.4.3 Buněčná stěna hub

Hlavními komponenty buněčné stěny hub jsou uhlovodíky ve formách polysacharidů nebo glykoproteinů. Nejvýznamnějším strukturálním polysacharidem stěny je chitin, dalšími složkami pak jsou glukany, β(1→3)-β(1→6)glukan a β(1→4)glukan(celulosa). Složky buněčné stěny se mohou rozdělit do dvou skupin: strukturální složky a intersticiální složky, které plní prostor v buněčných stěnách [25].

Strukturální složky : chitin,

Intersticiální složky : mannoprotein, galakto-mannoprotein, xylo-mannoprotein, glukuronomannoprotein, α(1→3)glukan

Základní zásada Bartnicki-Garcia pro apikální růst hub [6] je, že při růstu existuje rovnováha mezi enzymy katalyzující syntézu a lyzi buňky. Nový materiál se začlení do

stěny vchlípením. Lytické enzymy stále uvolňují části buněčné stěny ve vrcholu a tím vytváří mezeru pro vložení nových součástí buněčné stěny. Lytické enzymy jako chitinasa je zapojena do degradace stěnových polymerů během smrti, degradace přepážek při migraci jader, do fúze hyf, sporulace, klíčení a autolysi^[99]. Tato zásada vyžaduje, aby každá houba obsahovala enzymy metabolizující chitin. Na metabolismu chitinu se podílejí 3 enzymy: chitinasy, β -GlcNAcasa a chitin syntetasa^[97].

1.4.4 Chitinasy

Chitinasy štěpí chitin (viz. obr. 4, str. 24) tak, že hydrolyzují β -glykosidické vazby mezi N-acetylglukosaminovými jednotkami (GlcNAc)^[99]. Endochitinasa štěpí náhodně uvnitř molekuly po celé délce vlákna chitinu a jejím konečným produktem jsou rozpustné nízkomolekulární multimery GlcNAc jako jsou chitotriosy nebo chitotetrosy^[99]. Exochitinasa na rozdíl od toho postupně odštěpuje acetylchitobiosy z neredukovaného konce. Tento enzym je proto někdy nazýván jako chitobiosidasa. Finálním enzymem je β -1,4 N-acetylglukosaminidasa^[99], která štěpí diacetylchitobiosy stejně jako chitotriosy a chitotetrosy na GlcNAc monomery. Hydrolyza terminálního neredukovaného konce N-acetylhexosaminového zbytku je provedena N-acetylhexosaminidasou^[99].

Enzym deacetylasa (chitin deacetylasa, EC 3.5.1.41) také patří do komplexu chitinasových enzymů, neboť jeho působením dochází k odštěpení N-acetamidolových skupin z N-acetylglukosaminových jednotek, což vede ke konverzi chitinu na chitosan. Výhodou chitosanu je, že není již tak rigidní jako chitin^[48].

Chitinasy byly objeveny samozřejmě i v jiných organismech, proto pro srovnání uvádím vlastnosti chitinas u několika z nich (viz. tab. 2, str. 23)^[99].

Tab. 2. Vlastnosti vybraných chitinas u některých organismů [99]

<i>Aspergillus nidulans</i> extracelární	5,00	–	27	Hg ²⁺ , Cu ²⁺ , Ca ²⁺ , Ag ²⁺	endo
<i>Mucor mucedo</i> cytosolická	5,65	–	–	Cu ²⁺	endo
mikrosomální	5,55	–	–	Cu ²⁺ , PMSF	endo
<i>Mucor rouxi</i> cytosolická A	–	–	53	–	exo
4 hod kultivace B	–	–	28	–	exo
cytosolická C	6,50	30°C	30,70	–	exo
10 hod kultivace D	6,50	30°C	24,20	–	exo
<i>Neurospora crassa</i> cytosolická	6,70	–	20,60	Hg ²⁺ , Cu ²⁺	endo
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> cytosolická	2,50	–	130	–	endo

Houbové chitinasy byly nalezeny v extracelulárním a periplasmatickém prostoru a také v plasmatické membráně. U mikrosomálních frakcí zatím nebyla nalezena možnost jak chitinasy purifikovat a většinou mikrosomální frakce vykazují vznik diacetylchitobiosy namísto chitinu při inkubaci s UDP-N-acetylglukosaminem, což je substrát pro chitin syntetasu. Chitinasová aktivita byla objevena i v různých subcelulárních frakcích kromě mikrosomální. U *N. crassy* byla chitinasová aktivita objevena hlavně v membránových frakcích, ale nejvíce aktivity-kolem 30 % a 50 %- bylo objeveno ve frakcích buněčných stěn a v cytosolických frakcích [99].

Všeobecné vlastnosti vycházejí i z předešlé tabulky [99]:

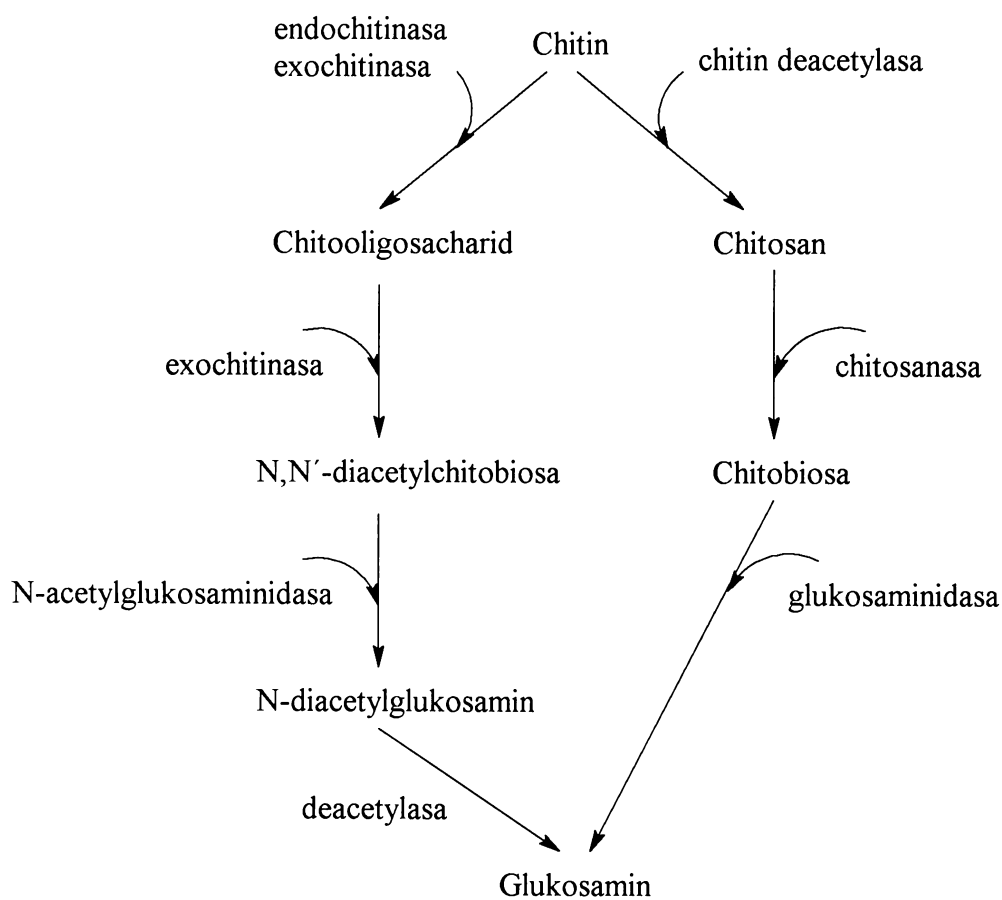
1. mírně kyselé optimální pH
2. vysoká optimální teplota
3. vysoký stupeň stability dán asi glykosilací
4. přítomny jak exo tak endo aktivity

5. molekulární hmotnost značně rozdílná
6. největšími inhibitory: měď a rtuť
7. postrádání iontových kofaktorů

Chitinasy byly rozděleny do dvou skupin [99]:

Typ A: kyselé, částečně skryté, s neobvyklou afinitou k dextran gelu a působící slabě na koloidní chitin

Typ B: bazické nebo neutrální, s obvyklým chováním při gelové filtraci a s možností degradovat připravený chitin.



Obr. 4. Cesty degradace chitinu [53]

1.5 Závěr

Anaerobní houby jsou zajímavé nejen svou jedinečností mezi houbami, ale i svou rolí v degradaci rostlinné biomasy. Jako fibrolytičtí parazité na travách se vyvinuly před několika miliony let. Zabírají jedinečné místo v zažívacím traktu přežvýkavých savců, kde se účastní kolonizace rostlinné buněčné stěny. Jejich objev a popis vyvrátil do té doby uznávané dogma o tom, že houby potřebují ke svému životu kyslík. Houby jsou distribuovány po celém světě mezi divoce žijícími i domestikovanými přežvýkavci. Je také možné vyprodukovat mutantní formy hub se zvětšenou aktivitou některých enzymů. Také stojí za zmínku, že houby rostou v bachoru vedle mnohem rychleji rostoucích mikroorganismů. Z toho byl vyvozen názor, že houby přežívají díky svému útočnému způsobu růstu a kvůli množství biomasu degradujících enzymů. Také je možné, že přežívají oproti jiným mikroorganismům díky svému chemickému obrannému mechanismu ^[112].

U anaerobních hub se studuje velmi intenzivně zejména jejich celulasový systém. Chitinasy, které se u těchto hub podílejí na výstavbě buněčné stěny, byly u anaerobních bachorových hub dosud zběžně popsány pouze u monocentrické anaerobní houby rodu *Piromyces*. Chitinolytický systém anaerobních hub je tedy nové dosud neprobádané téma. Zájem o chitinolytické enzymy v posledních letech stoupá z několika důvodů. Jednak proto, že chitin je na Zemi, hned po celulóse, nejrozšířenější polysacharid. Jeho největším producentem jsou mořské organismy a vzniká problém s likvidací tohoto odpadu, který je velice rigidní a těžce degradovatelný. Dalším důvodem zvýšeného zájmu o chitinasy je jejich potenciální využití jako antifungální a insekticidní látky. V neposlední řadě se chitinasy studují jako významné enzymy buněčné stěny s cílem regulovat buněčný růst ať už v supresivním, či aktivačním smyslu.

2. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Předkládaná diplomová práce se zabývá chitinolytickým systémem anaerobních polycentrických hub. Cílem práce bylo zjistit, které enzymy s chitinasovou aktivitou jsou v tomto systému zastoupeny, které z enzymů jsou dominantní, kde jsou lokalizovány a jaké jsou jejich kinetické parametry a fyzikálně-chemické vlastnosti.

3. MATERIÁL A METODY

3.1 Použitý materiál

☐ Oxoid: tryptone, yeast extract (kvasničný autolyzát)

☐ Lachema: D-glukosa, mikrokrystalická celulóza, hydroxid barnatý, síran zinečnatý, o-fenantrolin, chlorid kobaltnatý, chlorid barnatý, chlorid hořečnatý, kyselina chlorovodíková, bromfenolová modř, glycerol, thiosíran sodný, dusičnan stříbrný, trichloroctová kyselina, hydroxysíran sodný, síran amonný, chlorid železitý

☐ Imuna: enzymový kaseinový hydrolyzát

☐ Difco: agar

☐ Sigma: L- Cysteine, CM-chitin, phenylmethylsulfonyl fluorid, EDTA, thimerosal (Merkury-[(o-carboxyphenyl)thio]-ethyl sodium salt, SDS, N,N'-methylelbisakrylamid, trizma (Tris), persíran amonný, izobutanol, P-nitrophenyl- β -D-N,N'-diacetylchitobiosa, azokasein, 3-methyl-2-benzothiazolinone-hydrazon, D-glukosamin, sulfamát amonný

☐ Lach-Ner: uhličitan sodný, dihydroxyfosforečnan sodný, hydroxid sodný, k. chlorovodíková, kyselina octová, formaldehyd, chlorid sodný

☐ Serva: azid sodný, dithiothreitol (DTT)

☐ Fluka: EDTA, N,N,N',N'-tetramethyl-ethylendiamin, merkaptoethanol, DL-dithiothreitol, kongo červeň

☐ Acros Organics: hydrazid 4-hydroxybenzoové kyseliny

☐ Chemapol: chlorid manganatý, chlorid draselný

☐ Amresco: akrylamid

☐ Pharmacia: standard pro elektroforézu (94 000-14 400 kDa)

☐ Koch-Light Laboratoriem Ltd.: triton

3.2 Použité přístroje

spektrometr: Thermo spectronic Biomate

vodní lázeň: Y 28 Grant

TW 12 Julabo

MLW W 10

pH metr: pH meter 3310 Jenway

centrifuga: MLW K 23D

MLW K 23

MLW K 24

autokláv: PS20A Chirana

sonikátor: Vibra cell Sonics & Materials Inc.

analytické váhy: L420 D Sartorius laboratory

termostat: TCH 100 Laboratorní přístroje Praha

mikropipety: Nichipet EX Nichiryo

špičky: Neptune

ultrafiltrační cely model 8400, model 8010 Amicon, Millipore

aparatura pro elektroforesu: BIO-RAD

chlazení elektroforesy: Haake K20, DC 10

3.3 Zvířata

Anaerobní houby byly izolovány z bachorové tekutiny nebo z trusu přežvýkavců chovaných v různých lokalitách. Bachorovou tekutinu se podařilo získat z pěstělované dojnice ustájené ve stáji VÚŽV v Praze Uhříněvsi, anebo z bachoru krav na jatkách. Dojnice byla krmena kukuřičnou siláží, senem a doplňkovou krmnou směsí.

Ve většině případů však byly houby izolovány z trusu býložravců chovaných v pražské ZOO, a to konkrétně z trusu bizona, zebra, lamy a dále z trusu jelena žijícího v experimentální oboře VÚŽV v Praze-Uhříněvsi. Býložravci byly krmeni kombinovanými krmivy pokrývající jejich specifické nutriční požadavky. Krmná dávka se lišila především vzájemným poměrem jednotlivých složek. Hlavním komponentem bylo vojtěškové seno a jaderné krmivo (ovesný šrot, mačkaný oves nebo speciální granulát pro býložravce). Některým zvířatům byla přidávána do krmné dávky ovoce a zelenina.

3.3.1 *Transport tráveniny pro izolaci bachorových hub*

Vzorky pro izolace hub byly přepravovány z terénu do laboratoře v termoboxu buď přímo v anaerobním médiu nebo v Petriho miskách při teplotě okolo 30°- 35°C. Během dvou hodin byly vzorky resuspendovány v anaerobním dilučním roztoku (viz 3.3.3). Takto zředěná suspenze, i s částí nestrávené potravy, byla inokulována do růstového media M10^[27] s glukosou a antibiotiky a poté byly kultury umístěny do termostatu a při 40°C kultivovány po dobu 2-5 dní.

3.3.2 *Izolace a uchovávání čistých kultur hub*

Anaerobní bachorové houby byly z trusu či bachorové tekutiny přežvýkavců izolovány metodou Joblina^[47]. K získání čistých kultur bachorových hub bylo třeba odstranit bakteriální kontaminaci. K tomuto účelu se používá směs antibiotik penicilinu, streptomycinu a chloramfenikolu, tak jak je uvedeno v kapitole 3.3.3. Opakovanými subkultivacemi na médiu s antibiotiky se houby zbavují bakterií a poté se mechanicky dělí na agarových plotnách (1,5 % agar s médiem M10^[69, 110]). Kultivace probíhala ve speciálních anaerobních nádobách po dobu tří až pěti dnů, poté byly pod mikroskopem vytipovány kolonie hub vhodné k izolaci, které byly inokulovány do 20-ti ml penicilinek obsahujících stejné medium bez agaru. Izolace a identifikace byla prováděna RNDr. Kateřinou Fliegerovou, CSc., já jsem se podílela průběžně na přípravě kultivačních médií. Izoláty byly dále uchovávány pravidelným pasážováním v tekutém mediu stejného složení s glukosou nebo celobiosou, avšak bez agaru. Vždy po čtyřech dnech byly izolované kultury přeočkovány.

Pro dlouhodobé uskladnění životaschopných hub se houby zmrazují při -80°C v 5 % roztoku dimethyl sulfátu nebo ethylenglykolu. Uchování při -80°C je časově omezeno pouze na několik měsíců, anaerobní houby nejsou příliš tolerantní ke kryogenním technikám, životnost kultur po zamražení je asi 50%. Zmrazení nemá vliv na morfologický vzhled ani metabolickou aktivitu kultur^[79].

3.3.3 *Kultivační techniky a živná média*

Mnoho metod a médií užívaných při studiu bachorových hub pochází od Hungatea, který studoval anaerobní bachorové bakterie^[45, 46]. Všechny tyto techniky a složení médií bylo upraveno pro práci s houbami. Všechna naše média používaná u hub obsahují bachorovou

tekutinu. Jsou upraveny na pH 6,5 až 6,8 a mohou být ztuženy 0,8- 1,5 % agarem. Kultivační média obsahují resazurin jako redoxní indikátor, mikro a makro minerály, organický nebo anorganický zdroj dusíku a L-cystein ^[109]. Anaerobní houby rostou na médiích s přidavkem zdroje uhlíku (glukosa, xylosa, celobiosa) ve skleněných lahvičkách s gumovou zátkou a hliníkovou pečetí. Inkubační teplota je 39°C, což odpovídá teplotě v batoru. Média jsou většinou očkována kousky mycelia.

Bachorová tekutina pro živná média byla připravena centrifugací 20 min při 10000 ot/min a zautoklávována. Růstovým substrátem byla glukosa. Medium bylo připraveno anaerobně, po úpravě pH na 7,2 - 7,5 byl přidán hemin a po povaření bylo medium chlazeno a probubláváno plynou fází o složení N₂ - 70 %, CO₂ - 25 % a H₂ - 5 %. Po ochlazení na přibližně 30°C byl přidán NaHCO₃, po jeho rozpuštění pak cystein a růstový substrát. Následovala úprava pH na 6,8 - 7,0. Poté bylo médium za stálého probublávání plynou fází (cca 15 minut) rozplňováno po 15 ml pro účely subkultivační a po 250 ml do 500 ml baněk pro účely experimentální. Médium bylo sterilováno autoklávováním při 120°C po dobu 45 minut.

Podrobné složení kultivačního média je uvedeno v následujících odstavcích.

Složení kultivačního média M10 ^[27]: na 1000 ml

čištěná bachorová tekutina	200 ml
kvasničný autolyzát	0,5 g
Bacto-Casiton	2 g
roztok heminu	10 ml
minerální roztok A	38 ml
minerální roztok B	38 ml
směs TMK	3,1 ml
resazurin (0,1 %)	0,5 ml
roztok vitamínů	2 ml
roztok mikroprvků	0,5 ml
cystein	0,5 g
NaHCO ₃	4 g
substrát	4 g
voda	708 ml

Minerální roztok A (na 100 ml)

NaCl	1,2 g
(NH ₄)SO ₄	1,2 g
KH ₂ SO ₄	0,6 g
CaCl ₂	0,12 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25 g

Minerální roztok B (rozpis na 100 ml)

KH ₂ PO ₄	0,6 g
---------------------------------	-------

Roztok vitamínů (na 100 ml, pH 7)

B1 thiamin	100 mg
B2 riboflavin	100 mg
K1	10 ml
Biotin	100 mg
k. pantotenová	100 mg
PAB k. aminobenzoové	100 mg
nikotinamid	100 mg
B6 pyridoxin	100 mg

Roztok mikroprvků (na 100 ml, pH 7)

NiCl ₂	38 mg
H ₃ BO ₄	50 mg
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	1,65 mg
FeSO ₄ ·7H ₂ O	75 mg
MnSO ₄ ·4H ₂ O	75 mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	75 mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	38 mg
CoCl ₂ ·6H ₂ O	38 mg
Kal(SO ₄) ₂ ·12H ₂ O	15 mg

Chelaton 1	15 mg
NaOH	38 mg

Směs TMK kyselin

k. octová	170 ml
k. propionová	60 ml
k. máselná	40 ml
k. isomáselná	10 ml
k. valerová	10 ml
k. isovalerová	10 ml
k. metylmáselná	10 ml
k. fenylpropionová	100 mg

Roztok antibiotik

streptomycin	1 mg/ml
chloramphenicol (poly)	1 mg/ml
penicilin	10000 U/ml
(používá se 0,1-0,5 ml na 10 ml media)	

Diluční roztok

NaH ₂ PO ₄	15,6 g/l
cystein.HCl	0,6 g/l
NaHCO ₃	6 g/l
Resazurin	1 ml/l

3.3.4 Studované kmeny anaerobních hub

V předkládané práci jsme studovali 10 kmenů anaerobních polycentrických hub rodu *Orpinomyces* a *Anaeromyces*. Tabulka 3 (str. 33) shrnuje jejich seznam, v němž je u každé houby uvedeno označení, rod, hostitelské zvíře a původ hostitele.

Tab. 3. Seznam studovaných kmenů polycentrických bachorových hub

Orpinomyces		
KF1	kráva	stáj VÚŽV v Praze- Uhříněvsi
KF2	kráva	stáj VÚŽV v Praze- Uhříněvsi
KF3	kráva	stáj VÚŽV v Praze- Uhříněvsi
KF5	kráva	stáj VÚŽV v Praze- Uhříněvsi
KF6	kráva	stáj VÚŽV v Praze- Uhříněvsi
Anaeromyces		
LF1	lama	ZOO Praha
ZF1	zubr	ZOO Praha
JF1	jelen	obora VÚŽV v Praze- Uhříněvsi
KF4	kráva	stáj VÚŽV v Praze- Uhříněvsi
BF1	bizon	ZOO Praha

Podrobněji jsme studovali chitinolytické enzymy u houby *Orpinomyces joyonii* KF2 , a proto jsme se zaměřili i na morfologii tohoto kmene. Nativní preparát této houby jsme pozorovali pomocí světelného mikroskopu v různých světelných režimech. Viditelné záření bylo použito pro pozorování tvaru mycelia, ultrafialové záření bylo použito při pozorování typu sporangiálního vývoje, kdy byla jádra obarvena fluorescenčním činidlem bismenzimidem.

Pro účely studia a charakterizace chitinolytického systému anaerobních hub, byly houby kultivovány 96 h na médiu M10 a jako zdroj energie byla vždy použita glukosa v navážce 3g/l.

3.3.5 Příprava buněčných frakcí anaerobní houby KF2

Chitinasy anaerobní houby *O. joyonii* KF2 byly studovány ve třech různých buněčných frakcích – extracelulární, cytosolové a v buněčných stěnách.

Extracelulární frakcí je přímo růstové médium separované od mycelia po 96 h kultivace. S touto frakcí jsme pracovali buď přímo nebo jsme ji zpracovali ve dvou krocích. Nejprve bylo médium 10x zahuštěno pomocí ultrafiltrační cely 8400 (Amicon) pod tlakem helia

300 kPa. Po celou dobu zahušťování byla cela chlazena ledem. Pro zahušťování byla použita ultrafiltrační membrána, která propouští bílkoviny menší než 10 kDa.

Parametry použité cely:

- ultrafiltrační cela model 8400 firmy Amicon
- kapacita 400 ml
- minimální použitý objem 10 ml
- průměr membrány 76 mm
- plocha membrány 41,8 cm²
- hmotnost 710 g
- maximální použitelný tlak 530 kPa
- maximální diafiltrační tlak 390 kPa

Parametry použité membrány:

- ultrafiltrační membrána firmy Amicon
- materiál polyethersulfon
- průměr 76 mm
- velikost: 10 kDa
- membrána byla uchovávána v 0,02 % roztoku azidu sodném. Při použití nové membrány bylo potřeba membránu opláchnout v destilované vodě a nechat 1 hodinu namočenou v několikrát vyměněné destilované vodě, neboť membrána je konzervována glycerinem a azidem sodným.

V druhém kroce byl do zahuštěného media za stálého míchání přisypáván síran amonný (59,2 g na 100 ml media), což představuje 80 % saturaci síranu amonného. Při této saturaci bylo průběžně kontrolováno pH a udržováno na hodnotě pH 6 pomocí 8 % Na₂CO₃. Tím se zabránilo denaturaci bílkovin, ke které dochází v kyselém prostředí. Tento roztok byl inkubován přes noc při 4°C, aby došlo k vysrážení bílkovin. Druhý den byla sraženina ve vychlazených kyvetách zcentrifugována na vychlazené centrifuze 30 min při 5000 ot/min. Sediment byl rozpuštěn v co nejmenším množství 50 mM fosfátového pufru (pH 6) s obsahem 1 mM EDTA. Roztok byl dialyzován 2 dny proti stejnému pufru za stálého míchání v lednici a pufr byl během dialýzy několikrát vyměněn. Vzniklý roztok byl pro další experimenty zamražen při -30°C.

Cytosolová frakce

Cytosolová frakce byla připravena z mycelia houby. 1 g mycelia byl homogenizován v 5 ml fosfátového pufru pH 6 a poté 5 min sonikován (amplituda 60, puls 1 s). Směs byla stočena 10 min při 4000 ot/min při 4°C. Supernatant byl nazván cytosolová frakce. Sediment byl použit pro přípravu další frakce.

Frakce buněčných stěn

Sediment z předešlého kroku byl rozmíchán v 5 ml fosfátového pufru pH 6 a sonikován 5 min při amplitudě 60 a pulsu 1 s. Suspenze byla stočena 10 min při 4000 ot/min při 4°C a supernatant byl nazván frakcí buněčných stěn.

3.4 Metody stanovení enzymatických aktivit

3.4.1 Stanovení endochitinasové aktivity ^[57]

Princip:

Metoda je založena na měření přírůstku koncentrace redukujících skupin hydrolyzátu polysacharidu (chitinu), který se projeví barevnou reakcí s POHBAHEM. Aktivita enzymu je odvozena od absorbance roztoku při vlnové délce $\lambda = 410 \text{ nm}$.

Chemikálie:

fosfátový pufr 100 mM (pH 6)

0,5 % substrát (CM- chitin)

PAHBAH činidlo: 5 g hydrazidu 4-hydroxybenzoové kyseliny bylo rozpuštěno ve 100 ml 0,5 N HCl a skladováno při 4°C v tmavé láhvi (POHBAH). Vždy před pokusem byl připraven čerstvý pracovní roztok smícháním 1 objem POHBAH a 4 objemy 0,5 N NaOH (PAHBAH).

0,3 M ZnSO₄

0,3 M Ba(OH)₂

Postup:

Do zkumavky bylo napipetováno 0,1 ml vhodně zředěného vzorku, 0,2 ml pufru a 0,1 ml

substrátu. Suspenze byla promíchána a inkubována 60 min při 40°C. Slepé vzorky, které obsahovaly stejnou směs, jen nebyly inkubovány, byly ihned po smíchání zastaveny přidáním 0,4 ml ZnSO₄ a 0,4 ml Ba(OH)₂. Směs byla promíchána a stočena 10 min při 4000 ot/min. Po ukončení inkubace bylo do zkumavek napipetováno 0,4 ml ZnSO₄ a 0,4 ml Ba(OH)₂. Směs byla promíchána a stočena stejně jako slepé vzorky 10 min při 4000 ot/min. V supernatantu byly stanoveny redukující cukry. Do zkumavky bylo napipetováno 0,1 ml supernatantu, 0,2 ml dH₂O a 0,9 ml PAHBAH (pracovní roztok). Roztok byl promíchán a inkubován 10 min při 100°C. Extinkce roztoku byla proměřena při vlnové délce $\lambda = 410 \text{ nm}$ v 1 cm kyvetách na spektrometru Thermo Spectronic. Pro vyloučení nepřesností byly všechny reakce provedeny v tripletu pro vzorek a dabletu pro slepý vzorek a pro výpočet použit průměr.

Kalibrace:

Jako kalibrace byla použita ředící řada roztoku N-acetyl-D-glukosaminu ve vodě v koncentracích 0, 20, 40, 60, 80 a 100 $\mu\text{g NAG/ml}$.

Aktivita:

Aktivita endochitinas byla vypočtena podle rovnice:

$$A = f \text{ NAG} \times \text{průměrná extinkce} \times \text{doba inkubace (hod.)} \times \text{ředění vzorku} \times \text{šířka kyvety (cm)}$$

$$[A] = \mu\text{g (NAG)} / \text{hod} / \text{ml}$$

$$f \text{ NAG} = 1/a_1 \quad a_1 = \text{směrnice přímky vypočítaná pomocí lineární regrese z kalibrační křivky}$$

3.4.2 Stanovení N-acetylglukosaminidasové aktivity

Princip:

Metoda je založena na měření přírůstku uvolněného žlutého p-nitrofenolu proměřením absorbance při vlnové délce $\lambda = 410 \text{ nm}$ a přepočítání na aktivitu enzymu.

Chemikálie:

fosfátový pufr 100 mM (pH 6)

0,2 % substrát (PNP-acetyl- β -D-glukosaminid)

2 % Na₂CO₃

Postup:

Do zkumavky bylo napipetováno 0,1 ml vhodně zředěného vzorku, 0,2 ml pufru a 0,1 ml substrátu PNP. Suspenze byla promíchána a inkubována 60 min při 40°C. Slepý vzorek, který obsahoval stejnou směs, jen nebyl inkubován, byl ihned po smíchání zastaven přidáním 0,8 ml 2 % Na₂CO₃. Směs byla promíchána a ponechána v lednici do proměření absorbance. Po ukončení inkubace bylo do zkumavek napipetováno 0,8 ml 2 % Na₂CO₃ a směs byla promíchána. Extinkce roztoku byla proměřena při vlnové délce $\lambda = 410$ nm v 1 cm kyvetách na spektrometru Thermo Spectronic. Pro vyloučení nepřesností byly všechny reakce provedeny v tripletu pro vzorek a dabletu pro slepý vzorek a pro výpočet použit průměr.

Kalibrace:

Jako kalibrace byla použita ředící řada roztoku p-nitrofenolu ve vodě v koncentracích 0, 6, 12, 18, 24 a 30 μ g PNP/ ml.

Aktivita:

Aktivita N-acetylglukosaminidas byla vypočtena podle rovnice:

$$A = f \text{ NAG} \times \text{průměrná extinkce} \times \text{doba inkubace (hod.)} \times \text{ředění vzorku} \times \text{šířka kyvety (cm)}$$

$$[A] = \mu\text{g (NAG)} / \text{hod} / \text{ml}$$

Při kalibraci byl použit PNP, ale při enzymatické reakci se uvolňuje NAG, proto bylo nutno přepočítat vzniklý faktor z kalibrace (fPNP) na fNAG podle rovnice:

$$f \text{ NAG} = [f \text{ PNP} \times \text{MW (NAG)}] / \text{MW (PNP)}$$

$$f \text{ PNP} = 1/a_1 \quad a_1 = \text{směrnice přímky vypočítaná pomocí lineární regrese z kalibrační křivky}$$

$$\text{MW (PNP)} = 139 \quad \text{MW (NAG)} = 221$$

3.4.3 Stanovení exochitinasové aktivity

Princip:

Metoda je založena na měření přírůstku uvolněného žlutého p-nitrofenolu. Změna absorbance byla proměřena při vlnové délce $\lambda = 410$ nm a přepočítána na aktivitu enzymu. Jako substráty pro enzymovou reakci je použit PNP- β -D-N,N'-diacetylchitobiosa a PNP-acetyl- β -D-glukosaminid a rozdíl v enzymových aktivitách u těchto dvou substrátů je sledovaná aktivita exochitinasy.

Chemikálie:

fosfátový pufr 100 mM (pH 6)

0,2 % substrát (PNP-acetyl- β -D-glukosaminid)

0,2 % substrát (PNP- β -D-N,N'-diacetylchitobiosa)

2 % Na₂CO₃

Postup:

Do zkumavky bylo napipetováno 0,1 ml vhodně zředěného vzorku, 0,2 ml pufru a 0,1 ml substrátu (glukosaminid nebo diacetylchitobiosa). Suspenze byla promíchána a inkubována 60 min při 40°C. Slepý vzorek, který obsahoval stejnou směs, jen nebyl inkubován, byl ihned po smíchání zastaven přidáním 0,8 ml 2 % Na₂CO₃. Směs byla promíchána a ponechána v lednici do proměny absorbance. Po ukončení inkubace bylo do zkumavek napipetováno 0,8 ml 2 % Na₂CO₃ a směs byla promíchána. Extinkce roztoku byla proměřena při vlnové délce $\lambda = 410$ nm v 1 cm kyvetách na spektrometru Thermo Spectronic. Pro vyloučení nepřesností byly všechny reakce provedeny v tripletu pro vzorek a dabletu pro slepý vzorek a pro výpočet byl použit průměr.

Kalibrace a aktivita:

Postup při sestavení kalibrační křivky i pro výpočet aktivity enzymu odpovídá postupu popsaného v kapitole 3.4.2.

3.4.4 Stanovení deacetylasové aktivity ^[50]

Princip:

Metoda je založena na měření přírůstku koncentrace N-acetylglukosaminových jednotek proměřením absorpance při vlnové délce $\lambda = 650$ nm a na přepočítání na aktivitu enzymu.

Chemikálie:

fosfátový pufr 100 mM (pH 6)

0,05 % substrát (kolooidní chitin)

5 % KHSO₄

5 % NaNO₂

12,5 % (NH₄)₂SO₄

0,5 % 3-methyl-2-benzothiazolinone-hydrazon

0,5 % FeCl₃

Postup:

Do zkumavky bylo napipetováno 50 μ l vhodně zředěného vzorku, 0,1 ml pufru a 0,1 ml substrátu. Suspenze byla promíchána a inkubována 2 hod. při 40°C. Slepý vzorek, který obsahoval stejnou směs, jen nebyl inkubován, byl ihned po smíchání zastaven přidáním 250 μ l 5 % KHSO₄. Směs byla promíchána a ponechána v lednici do dalšího zpracování. Po ukončení inkubace bylo do zkumavek napipetováno 250 μ l 5 % KHSO₄ a směs byla promíchána. Poté už bylo vše prováděno v digestoři. Po přidání 250 μ l 5 % NaNO₂ a za občasného promíchání byla směs ponechána 15 min stát při pokojové teplotě. Dále bylo k roztoku přidáno 250 μ l 12,5 % (NH₄)₂SO₄ a po 5 min bylo připipetováno 250 μ l 0,5 % 3-methyl-2-benzothiazolinone-hydrazon- MBH. Vše bylo 3 min povařeno v digestoři. Po zchlazení bylo ke směsi přidáno 250 μ l 0,5 % FeCl₃. Po 30 minutách stání, pokud se vytvořila sraženina, byla směs centrifugována 10 min při 4000 ot./min. Extinkce byla měřena při vlnové délce $\lambda = 650$ nm v 1 cm kyvetách na spektrometru Thermo Spectronic. Pro vyloučení nepřesností byly všechny reakce provedeny v tripletu pro vzorek a dabletu pro slepý vzorek a pro výpočet použit průměr.

Kalibrace:

Postup viz výše s rozdílem, že místo vzorku byla použita destilovaná voda a jako substrát různě zředěný D-glukosamin 100 mg/100 ml dH₂O, který byl naředěn 10 x dH₂O. Potom byla ředěna do zkumavek řada obsahující 0, 20, 40, 60, 80 a 100 µg D-GLU/ml.

Aktivita:

Aktivita deacetylas byla vypočtena podle rovnice:

$$A = f \text{ D-GLU} \times \text{průměrná extinkce} \times \text{doba inkubace (hod.)} \times \text{ředění vzorku} \times \text{šířka květy} \\ \text{(cm)}$$

$$[A] = \mu\text{g (D-GLU)} / \text{hod} / \text{ml}$$

$f \text{ D-GLU} = 1/a_1$ $a_1 =$ směrnice přímky vypočítaná pomocí lineární regrese z kalibrační křivky

3.4.5 Stanovení aktivity proteas ^[52]

Princip:

Aktivita proteas je úměrná množství uvolněných barevně značených aminokyselin z azokaseinu. Aktivita enzymu je odvozena od absorbance roztoku pro vlnové délce $\lambda = 440 \text{ nm}$.

Chemikálie:

fosfátový pufr 100 mM (pH 6)

0,5 % azokasein

25 % kyselina trichloroctová

0,5 N NaOH

Postup:

Do zkumavky bylo napipetováno 0,2 ml vhodně zředěného vzorku, 0,4 ml pufru a 0,2 ml 0,5 % azokaseinu. Suspenze byla promíchána a inkubována 60 min při 40°C. Slepý vzorek, který obsahoval stejnou směs, jen nebyl inkubován, byl ihned po smíchání zastaven přidáním 0,2 ml 25 % kyseliny trichloroctové. Směs byla promíchána a ponechána v lednici do dalšího zpracování. Po ukončení inkubace bylo do zkumavek napipetováno 0,2 ml 25 % kyseliny trichloroctové a směs byla promíchána. Extinkce byla

proměřena při vlnové délce $\lambda = 440 \text{ nm}$ v 1 cm kyvetách na spektrometru Thermo Spectronic. Pro vyloučení nepřesností byly všechny reakce provedeny v tripletu pro vzorek a dabletu pro slepý vzorek a pro výpočet použit průměr.

Kalibrace:

Pro kalibraci byla proměřena absorbance při vlnové délce $\lambda = 440 \text{ nm}$ v 1 cm kyvetách 0,01 % azokaseinu v 0,25 N NaOH.

Aktivita:

Aktivita je vyjádřena jako množství uvolněného azokaseinu do NaOH v $\mu\text{g} / \text{hod} / \text{ml}$. Zjištěná absorbance u vzorků je přepočítána na množství azokaseinu dle kalibrace a vyjádřena na dobu inkubace a množství použitého enzymu.

3.4.6 Stanovení bílkovin metodou Bradforda

Princip:

Tato metoda je založena na změně absorpčního maxima Coomassie Brilliant Blue G-250 z 465 nm na 595 nm. Tento indikátor existuje ve dvou barevných formách, červené a modré. V kyselém prostředí dochází k interakci mezi Coomassie Brilliant Blue G-250 a bílkovinou a díky tomu je pomocí hydrofobních a iontových interakcí stabilizována aniontová forma Coomassie Brilliant Blue G-250.

Chemikálie:

roztok A: 100 ml Coomassie Brilliant Blue G-250 bylo rozpuštěno v 50 ml ethanolu (v případě zákalu se upravilo 100 mg Noritu a zfiltrovalo), bylo přidáno 100 ml 85 % H_3PO_4 a doplněno do 200 ml vodou. Výsledná barva byla červená a roztok byl uchováván v tmavé láhvi při 4°C.

pracovní roztok: 1 objem roztoku A byl naředěn 4 objemy destilované vody, výsledná barva byla hnědá.

Kalibrace:

Ke kalibraci byl použit standart BSA o koncentraci 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Kalibrační řada obsahovala 0, 250, 500, 1000, 1500 a 2000 μg BSA/ml.

Postup:

0,04 ml vhodně zředěného vzorku bylo řádně promícháno s 2 ml pracovního roztoku Coomassie Brilliant Blue G-250 a po 5 min inkubace při pokojové teplotě byla proměřena intenzita vzniklého modrého zabarvení při vlnové délce $\lambda = 595 \text{ nm}$ v 1 cm kyvetách na spektrometru Thermo spectronic dle daného programu.

3.4.7 *Separace bílkovin podle molekulové hmotnosti*

Pro dělení bílkovin na frakce podle molekulových hmotností byla použita ultrafiltrační cela 8010 firmy Millipore pod tlakem helia 300 kPa. Po celou dobu zahušťování byla cela chlazena ledem a i jednotlivé frakce uchovávány v ledové lázni nebo zamrazeny. Pro dělení byly použity ultrafiltrační membrány různých velikostí (viz. níže). Po skončení dělení byl koncentrát promyt fosfátovým pufrem pH 6 a zamražen. Filtrát byl použit na další dělení.

Specifika použité cely:

ultrafiltrační cela model 8010 firmy Millipore

kapacita 10 ml

minimální použitý objem 1 ml

průměr membrány 25 mm

plocha membrány 4,1 cm²

hmotnost 130 g

maximální použitelný tlak 530 kPa

maximální diafiltrační tlak 390 kPa

Specifika použitých membrán:

ultrafiltrační membrána firmy Amicon

materiál polyethersulfon

průměr 25 mm

velikosti: 300 kDa, 100 kDa, 50 kDa, 30 kDa

membrána byla uchovávána v 0,02 % roztoku azidu sodném. Při použití nové membrány bylo potřeba membránu opláchnout v destilované vodě a nechat 1 hodinu namočenou v destilované vodě a několikrát vodu vyměnit z důvodu, že membrána je konzervována glycerinem a azidem sodným

3.4.8 Charakterizace enzymu

3.4.8.1 Stanovení optimální pH

Optimální pH, tedy hodnota pH, při níž fungální endochitinasa vykazuje nejvyšší enzymatickou aktivitu, bylo stanovováno v rozmezí pH 3 až pH 8. V reakční směsi pro stanovení aktivity enzymu byl 100 mM fosfátový pufr (pH 6) nahrazen směsí 0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 0,1 M kyseliny citrónové o různém pH (delta pH= 1), přičemž ostatní reakční podmínky zůstaly nezměněny.

3.4.8.2 Stanovení stability enzymu při různém pH

Stabilita fungální endochitinasy v prostředích o různém pH byla stanovována obdobně jako v kapitole 3.4.8.1. s tím rozdílem, že reakční směs byla navíc inkubována po dobu 3 hod. při 40°C v pufrech, jejichž pH se pohybovalo v rozmezí pH 3 až pH 8. Poté byla enzymová aktivita stanovena běžným způsobem.

3.4.8.3 Stanovení teplotního optima

Optimální teplota, při níž fungální endochitinasa vykazuje nejvyšší enzymatickou aktivitu, byla stanovována v rozmezí 10 až 80°C. Při těchto teplotách byla reakční směs inkubována 60 min a poté byla aktivita enzymu stanovena běžným způsobem.

3.4.8.4 Stanovení teplotní stability enzymu

Stabilita fungální endochitinasy při různých teplotách byla stanovována obdobně jako v kapitole 3.4.8.3. s tím rozdílem, že endochitinasa byla před stanovením inkubována v rozmezí teplot 10 až 80°C po dobu 1 hod. Poté byla enzymová aktivita stanovena běžným způsobem.

3.4.8.5 Vliv iontů a chemikálií na aktivitu enzymu

Vliv 14 chemikálií na aktivitu fungální endochitinasy byl studován za standartních reakčních podmínek poté, co byl studovaný vzorek vystaven působení vybraných chemikálií ve dvou různých koncentracích (1mM a 10 mM roztoky) po dobu 60 min při 40°C ve 100 mM fosfátovém pufru pH 6. K experimentu jsme použily tyto chemikálie:

1 mM CoCl_2 , 1 mM MnCl_2 , 1 mM BaCl_2 , 1 mM a 10 mM KCl , 1 mM a 10 mM MgCl_2 ,

1 mM a 10 mM L-cystein, 1 mM a 10 mM dithiothreitol, 1 mM a 10 mM o-fenantrolin, 1 mM a 10 mM thimerosal, 1 mM a 10 mM iodoacetamid, 1 mM a 10 mM SDS, 1 mM phenylmethyl, 1 mM a 10 mM kyselina iodoctová, 1 mM a 10 mM EDTA.

3.4.8.6 Substrátová specifika

Pro studium substrátové specifity fungální endochitinasy byla měřena enzymová aktivita za standartních reakčních podmínek, avšak působení enzymu byl vystaven chitin pocházející z rozdílných přírodních zdrojů nebo různé formy chitosanu. Všechny sledované substráty - koloidní chitin, , DDD chitin ze sepie, DDD chitin z houby, chitosan aspartát, chitosan glutamát, chitosan a chitosan peros – byly připraveny jako 0,5 % roztoky ve vodě.

3.4.8.7 Stanovení K_m

Michaelisova konstanta K_m odpovídá takové koncentraci substrátu, při níž je dosaženo počáteční reakční rychlosti, rovnající se polovině maximální rychlosti V (počáteční rychlost reakce za podmínek nasycení enzymu substrátem). Charakterizuje katalytické vlastnosti enzymu vzhledem k příslušnému substrátu - je mírou afinity enzymu k substrátu. Pro výpočet Michaelisovy konstanty K_m byla stanovena enzymová aktivita endochitinasy s různými koncentracemi substrátu. Byl použit 0,005% až 5% chitosan aspartát. Konstanty byly zjištěny vynesemím závislosti $1/A$ proti $1/a$ dle Lineweavera a Burka na základě rovnice:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} + \frac{K_m}{V} \cdot \frac{1}{a}$$

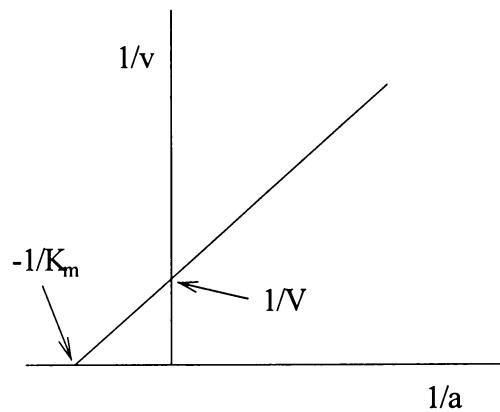
Místo vynesení $1/v$ lze použít vynesení $1/A$

V - maximální rychlost

K_m -Michaelisova konstanta

a - koncentrace substrátu

v - počáteční rychlost



Obr. 6. Vynesení závislosti $1/v$ proti $1/a$ dle Lineweavera a Burka

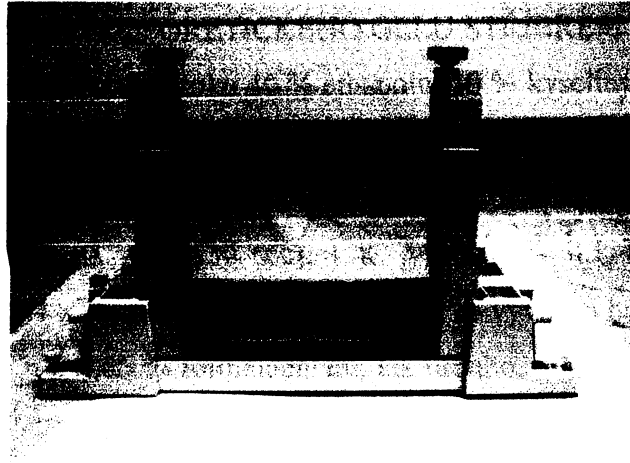
3.4.8.8 Stanovení molekulové hmotnosti enzymu

Pro stanovení molekulové hmotnosti enzymu byla provedena SDS PAGE elektroforéza a zymogramy. Bílkoviny obecně byly stanoveny SDS PAGE elektroforézou metodou dle Laemmli^[56] v 10 % a 7,5 % gelu se síťováním s 0,8 g a 0,6 g N,N-methylenbisakrylamidu. Bílkoviny byly barveny stříbrem podle Bluma^[12]. Byla zkoušena různá délka varu vzorků (2-5 min), použití redukujícího i neredukujícího vzorkového pufru a stabilizace vzorku přidáním dithiotreitolu či merkaptoethanolu. Jako standard molekulových vah byly použity bílkoviny o velikosti 94, 67, 43, 30, 20,1 a 14,4 kDa.

Ze všech bílkovin byly endochitinasy vybrány pomocí zymogramů^[32] dle Flinta. Taktéž byla zkoušena různá délka varu vzorků a různá koncentrace zabudovaného substrátu.

3.4.8.8.1 SDS PAGE ELEKTROFORÉZA

Separční gel se nalije do sestavených desek po vyznačenou rysku (viz obr.7, str. 46), převrství se izobutanolem nasyceným roztokem C a nechá se zpolymerovat ve vodorovné poloze alespoň 1 hodinu. Roztok z povrchu se odsaje a gel se ekvilibruje roztokem L 30 minut. Roztok L se odsaje, prázdný prostor se zalije zaostřovacím gelem, do desek se zasunou hřebínky a gel se nechá minimálně 30 min polymerovat. Desky se připevní k chlazenému korpusu a horní anodová nádobka se zalije čerstvým elektrodoým pufrem M. Spodní katodový prostor je naplněn elektrodoým pufrem několikrát použitým. Vzorky se nanesou podvrstvením do jamek po hřebínku. Vzorky se před nanesením vaří 5 minut na vroucí lázni. Po spuštění elektroforézy se nastaví napětí 30-35 V/cm délky gelu (viz obr. 8, str. 46).



Obr. 7. Sestavené skleněné desky pro elektroforézu

Roztoky pro SDS PAGE elektroforézu

A (100ml) : 30 g akrylamid, 0,8 g N,N-methylenbisakrylamid

B (100ml) : 10 g SDS

C (100ml) : 9,1 g TRIS rozpustit v 50 ml H₂O, konc HCl upravit pH na 8,8

D (100ml) : 3 g TRIS rozpustit v 50 ml H₂O, konc HCl upravit pH na 6,8

E (1000ml) : 30,3 g TRIS, 144 g glycin, 10 g SDS

F (1 ml) : 10 mg bromfenolová modř rozpustit v roztoku D

G (10ml) : 1 g persíran amonný

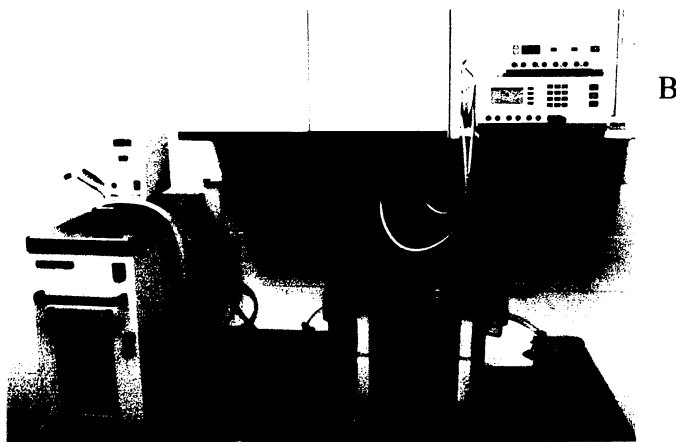
H (separační gel): 10 ml A, 0,3 ml B, 15 ml C, 4,4 ml H₂O, 20 µl TEMED, 0,3 ml G

I (zaostřovací gel): 1 ml A, 5 ml D, 0,1 ml B, 3,8 ml H₂O, 5 µl TEMED, 0,15 ml G

J (vzorkový pufr - neredukující): 2,4 ml D, 2 ml B, 1 ml glycerolu, 4,4 ml H₂O, 0,1 ml F

L (ekvilibrační roztok): 25 ml C, 24,5 ml H₂O, 0,5 ml B

M (elektrodotový pufr): 100 ml E, 900 ml H₂O



Obr. 8. Aparatura pro elektroforézu B- zdroj napětí pro gelovou elektroforézu

3.4.8.8.2 BARVENÍ ELEKTROFORETICKÉHO GELU STRĚBREM

Gel se fixuje nejméně hodinu v roztoku 40 % ethanolu, 10 % kyseliny octové a 50 % H₂O za mírného třepání. Poté je gel promýván řadou roztoků v následujícím režimu:

2 x 30 % ethanol (20 minut), 1 x destilovaná voda (20 minut), 1 x 0,02 % Na₂S₂O₃ (1 minuta), 3 x destilovaná voda (30 sec), 1 x vychlazený 0,1 % AgNO₃ a 0,02 % formaldehyd (20 min), 4 x destilovaná voda (30 sec). Pro vyvinutí barvy je gel inkubován v roztoku 3 % Na₂CO₃ a 0,05 % formaldehydu, tak dlouho, dokud se bílkoviny nezbarví do žluta. Poté se opět promyje vodou (30 s). Barevný vývoj je ukončen inkubací gelu v roztoku 5 % kyseliny octové. Gel se ještě třikrát promyje vodou (10 min) a uchovává se v roztoku 1 % kyseliny octové.

3.4.8.8.3 ZYMOGRAM

Do běžného gelu pro SDS PAGE elektroforézu byl zabudován 0,2 % substrát (CM-chitin)- místo 4,4 ml destilované vody byl použit 0,2 nebo 0,4 % CM-chitin . Vzorke byly připraveny obvyklým způsobem (viz 3.4.8.9.1), ale délka varu vzorku byla prodloužena ze 2 minut na 5. Po skončení elektroforézy byl gel promýván 3-6 x 15 min 1 % tritonem a 3-6 x 15 min 50 mM fosfátovým pufrem pH 6. Poté byl inkubován ve 50 mM fosfátovém pufru pH 6 (4 nebo 24 hod). Nakonec byl 30 min barven v 0,1 % roztoku Kongo červeně a odbarvován 3 x 15 min 1M NaCl.

4. VÝSLEDKY

4.1 Výběr kmenu s největší chitinasovou aktivitou

V úvodním experimentu jsme provedli „screening“ anaerobních polycentrických hub na endochitinasovou a N-acetylglukosaminidasovou aktivitu. Do pokusu bylo zařazeno 5 kmenů bachorových hub rodu *Anaeromyces* - BF1, JF1, LF1, ZF1, KF4 a 5 kmenů hub rodu *Orpinomyces* – KF1, KF2, KF3, KF5, KF6. Houby byly kultivovány po dobu 72h při teplotě 37° C v anaerobním mediu M10 ^[27] s glukosou (4g/l) jako zdrojem uhlíku. Endochitinasové i N-acetylglukosaminidasové aktivity byly stanoveny v kultivačním médiu a jejich hodnoty jsou uvedeny v tabulce 4.

U všech uvedených vzorků byla naměřena jen velmi nízká hodnota N-acetylglukosaminidasy a neprojeví se žádné významné rozdíly mezi rody *Anaeromyces* a *Orpinomyces*.

Hodnoty extracelulárně produkované endochitinasy se pohybují v rozmezí 54–110 µg N – acetylglukosaminu/ ml/ h pro houby rodu *Anaeromyces* (LF1, JF1, ZF1, B1, KF4). Pro houby rodu *Orpinomyces* (KF1, KF2, KF3, KF5, KF6) jsme naměřili poněkud vyšší hodnoty v rozmezí 70-199 µg N – acetylglukosaminu/ml/h. Nejvyšší endochitinasová aktivita byla zjištěna u kmene KF2, který jsme si proto zvolili jako modelový mikroorganismus pro studium chitinasového systému u anaerobních polycentrických hub.

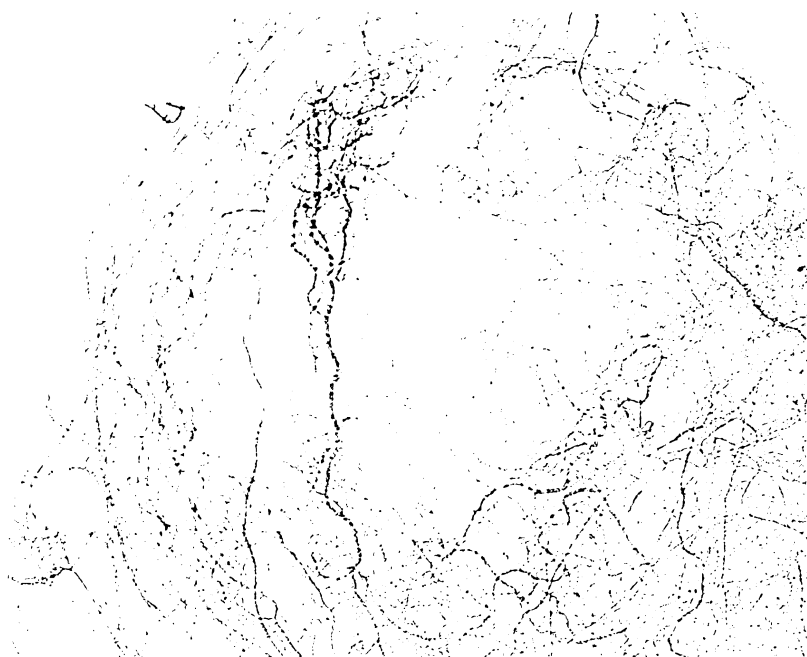
Tab. 4. Chitinasová aktivita u 10 anaerobních polycentrických bachorových hub

Rod		
<i>Anaeromyces</i>		
LF1	63,54	4,15
JF1	54,16	2,79
ZF1	74,45	1,52
KF4	106,46	1,80
BF1	110,83	2,23

Rod		
Orpinomyces		
KF1	77,31	1,39
KF2	199,06	2,59
KF3	69,67	0,47
KF5	115,61	2,36
KF6	125,53	2,85

4.1.1 Popis anaerobní houby *Orpinomyces joyonii* KF2

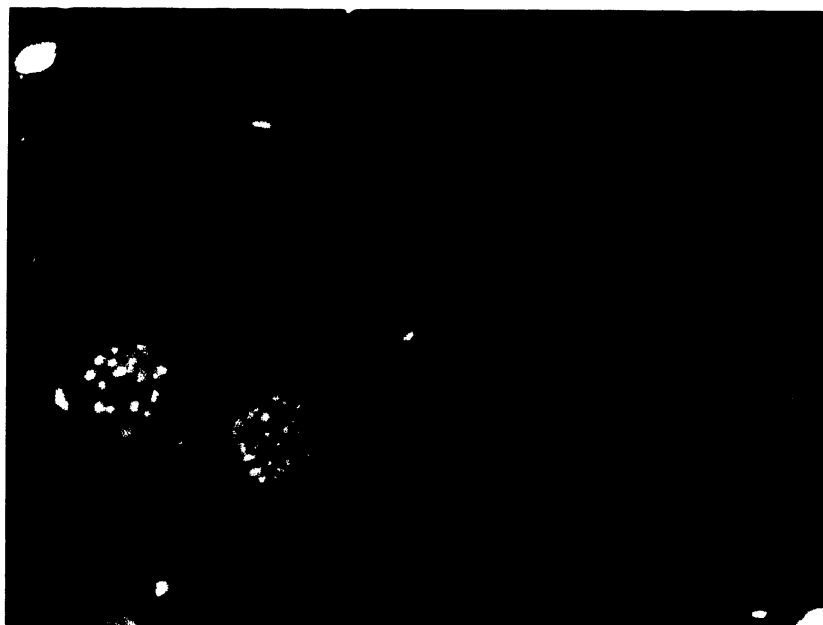
Anaerobní houba KF2 byla izolována z bachorové tekutiny tura domácího. Izolát byl na základě morfologických vlastností klasifikován jako polycentrická houba druhu *Orpinomyces joyonii*. Izolát KF2 tvořil na agarových plotnách velké rozpínavé kolonie. Ve světelném mikroskopu lze pozorovat, že tato houba tvoří rhizomycelium s extensivně členěnými stélkami velmi nepravidelného tvaru s častým zaškrcením (viz obr. 9, str. 50). Houba KF2 vytváří jen vzácně sporangia a zoospory, což je jev typický pro všechny polycentrické anaerobní houby. Exogenní sporangiální vývoj, což je základní morfologické kritérium polycentrických anaerobních hub, byl pozorován mikroskopicky ve fluorescenčním světle po obarvení jader a je zdokumentován na obrázku 10 (str. 50). Pro zvýraznění rozdílu mezi dvěma typy sporangiálního vývoje uvádíme na obrázku 11 (str. 51) monocentrickou houbu *Neocallimastix frontalis* s endogenním vývojem sporangií. Taxonomické zařazení anaerobní houby KF2 bylo podpořeno i molekulárně- genetikou analýzou 18S rDNA ^[31].



Obr. 9. Mycelium polycentrické anaerobní houby *Orpinomyces joyonii* KF2 (zvětšeno 400x)



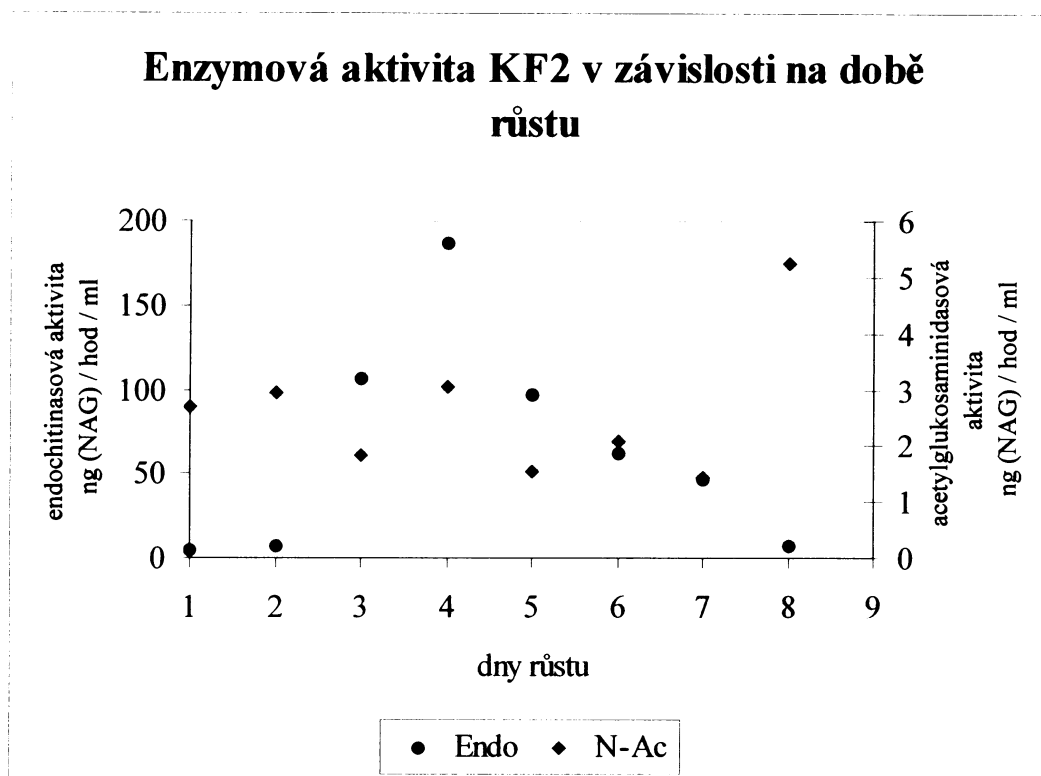
Obr. 10. Mycelium polycentrické anaerobní houby *Orpinomyces joyonii* KF2 po obarvení jader bisbenzimidem (zvětšeno 200x)



Obr.11. Mycelium monocentrické anaerobní houby *Neocallimastix frontalis* po obarvení jader bisbenzimidem (zvětšeno 1000x)

4.1.2 Dynamika chitinas kmene KF2

U kmene KF2, který vykazoval v předchozím experimentu nejvyšší aktivitu endochitinasy, jsme studovali produkci endochitinasy i N-acetylglukosaminidasy v průběhu kultivace, s cílem zjistit, v jakém časovém úseku po inokulaci houby dosahují tyto enzymy maximálních hodnot. Kmen KF2 byl kultivován po dobu 9 dnů na mediu M10 s glukosou (4 g/l) při 37°C. Každý den ve stejnou dobu byly 3 vzorky houby odebrány a zamraženy. V médiu byla poté stanovena endochitinasová a N-acetylglukosaminidasová aktivita podle postupu uvedeného výše. Na obrázku 12 (str. 52) je znázorněna dynamika obou sledovaných enzymů. Z grafu vyplývá, že aktivita endochitinasy dosahuje nejvyšších hodnot čtvrtý den růstu, proto jsme ve všech dalších pokusech používali kulturu houby KF2 po 96 hodinách kultivace. Aktivita N-acetylglukosaminidasy je po celou dobu pokusu nízká, k nárůstu dochází až osmý den kultivace, což je pravděpodobně zapříčiněno lytickým procesem, který nastává po smrti buněk.



Obr. 12. Dynamika endochitinasy a N-acetylglukosaminidasy kmene KF2

4.2 Endochitinasová aktivita v buněčných frakcích kmene KF2

Chitinolytické enzymy se u anaerobních hub podílejí na procesu regulace růstu buněčné stěny, proto jsme kromě extracelulárních aktivit přistoupili také k měření intracelulárních aktivit. Z mycelia narostlého na kultivačním médiu jsme připravili buněčné frakce. Extracelulární frakce, což je vlastní růstové médium, které jsme použili buď přímo nebo desetkrát koncentrované, cytosolová frakce, což je vnitřní obsah buněk mycelia a frakce buněčných stěn. Bílkoviny obsažené v médiu a cytosolu jsme dále ultrafiltrací separovali a získali jsme tak další frakce podle molekulové hmotnosti bílkovin. Aktivity endochitinas naměřené ve všech frakcích jsou uvedeny v tabulce 5 (str. 53). Z výsledků vyplývá, že endochitinas je lokalizována uvnitř mycelia, kde její aktivita šestinásobně přesahuje hodnoty naměřené v médiu. Poměrně vysoké aktivity naměřené ve frakci buněčných stěn svědčí o tom, že endochitinas zůstává i po homogenizaci, sonikaci a centrifugaci částečně vázána na stěny buněk. Po separaci bílkovin cytosolu zůstala enzymaticky aktivní pouze frakce s bílkoviny s největší molekulovou hmotností a aktivita tohoto koncentráту vzrostla dvakrát ve srovnání s původní cytosolovou frakcí. Aktivita extracelulární

endochitinasy je ve srovnání s intracelulárními aktivitami nízká a ani zahuštěním média (10 x) jsme nedocílili jejího výraznějšího zvýšení. Při dělení bílkovin na membránách aktivita endochitinasy v zahuštěném i nezahuštěném médiu značně klesla.

Tab. 5. Endochitinasová aktivita v různých buněčných frakcích kmene KF2

NM	64,20
cytosol	357,24
buněčná stěna	170,91
ZM	98,92
ZM frakce nad 100 kDa	0,98
ZM frakce 100-50 kDa	18,87
ZM frakce 50-30 kDa	12,69
ZM frakce 30-10 kDa	10,74
NM frakce nad 100 kDa	23,42
NM frakce 100-50 kDa	22,34
NM frakce 50-30 kDa	35,57
NM frakce 30-10 kDa	12,58
cytosol frakce nad 100 kDa	658,25
cytosol frakce 100-50 kDa	0,00
cytosol frakce 50-30 kDa	0,00
cytosol frakce 30-10 kDa	0,00

ZM- zahuštěné médium

NM- nezahuštěné médium

4.3 N-acetylglukosaminidasová aktivita v buněčných frakcích kmene KF2

Z předchozích experimentů vyplývá, že N-acetylglukosaminidasa nedosahuje výrazných aktivit, přesto však z důvodu komplexního popisu chitinolytického systému anaerobní houby, jsme přistoupili k měření tohoto enzymu v různých buněčných frakcích houby KF2

stejně jako v předchozí kapitole. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 6. N-acetylglukosaminidasová aktivita je nízká ve všech studovaných frakcích, ale přesto z naměřených hodnot vyplývá, že aktivita tohoto enzymu v médiu je třikrát vyšší než v buněčných stěnách a šestkrát vyšší než v cytosolu. Po rozdělení bílkovin kultivačního média zůstává aktivita vázána ve dvou frakcích, které obsahují proteiny o molekulové hmotnosti vyšší než 50 kDa. Aktivity naměřené v cytosolových frakcích jsou tak nízké, že z nich nelze, podle mého soudu, vyvozovat závěry.

Tab. 6. N-acetylglukosaminidasová aktivita v různých buněčných frakcích kmene KF2

NM	5,95
cytosol	1,01
buněčná stěna	1,97
ZM	0,85
ZM frakce nad 100 kDa	1,56
ZM frakce 100-50 kDa	5,38
ZM frakce 50-30 kDa	0,53
ZM frakce 30-10 kDa	1,79
NM frakce nad 100 kDa	5,25
NM frakce 100-50 kDa	3,33
NM frakce 50-30 kDa	0,00
NM frakce 30-10 kDa	0,00
cytosol frakce nad 100 kDa	2,17
cytosol frakce 100-50 kDa	0,91
cytosol frakce 50-30 kDa	2,17
cytosol frakce 30-10 kDa	0,30

ZM- zahuštěné médium

NM- nezahuštěné médium

4.4 Exochitinasová aktivita u kmene KF2

Na základě prostudované literatury nelze předpokládat, že by exochitinasy hrály významnou roli v chitinolytickém systému anaerobních hub, avšak pro úplnost popisu chitinas jsme přistoupili k měření tohoto enzymu v různých buněčných frakcích houby KF2 stejně jako v předchozí kapitole. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 7. Z naměřených hodnot vyplývá, že exochitinasy jsou produkovány hlavně intracelulárně. Z nezahuštěných frakcí je nejaktivnější frakce buněčných stěn, po zakoncentrování média i cytosolu se zvýšila aktivita v těchto frakcích desetkrát. Exochitinasy z média i cytosolu jsou nejaktivnější ve frakcích, které obsahují proteiny větší než 50 kDa. Při manipulaci s frakcemi nedochází k deaktivaci proteinu tak jako u endochitinasy, což svědčí o stabilitě exochitinasového enzymu.

Tab. 7. Exochitinasová aktivita v různých buněčných frakcích

NM	2,88
cytosol	3,76
buněčná stěna	8,00
ZM	21,10
ZM frakce nad 100 kDa	18,00
ZM frakce 100-50 kDa	1,16
ZM frakce 50-30 kDa	0,00
ZM frakce 30-10 kDa	0,00
NM frakce nad 100 kDa	5,98
NM frakce 100-50 kDa	22,34
NM frakce 50-30 kDa	2,65
NM frakce 30-10 kDa	0,61
cytosol frakce nad 100 kDa	37,35
cytosol frakce 100-50 kDa	15,14
cytosol frakce 50-30 kDa	3,79
cytosol frakce 30-10 kDa	0,00

ZM- zahuštěné médium, NM- nezahuštěné médium

4.5 Deacetylasová aktivita v buněčných frakcích kmene KF2

Chitin deacetylasa je součástí systému, který hydrolyzuje chitin. Přeměňuje chitin na chitosan tím, že odštěpuje N-acetamidolovou skupinu z N-acetylglukosaminových jednotek. O aktivitě tohoto enzymu u anaerobních hub není nic známo, proto jsme zahrnuli měření deacetylasové aktivity v různých buněčných frakcích kmene KF2 do této práce. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 8. Vzhledem k velmi nízkým enzymatickým aktivitám je těžké výsledky interpretovat. Vyšší deacetylasová aktivita byla zaznamenána pouze ve dvou frakcích obsahujících bílkoviny o molekulové hmotnosti v rozmezí 10- 30 kDa, a to v nezahuštěné extracelulární frakci a v cytosolové frakci.

Tab. 8. Deacetylasová aktivita v různých buněčných frakcích

NM	0,75
cytosol	1,58
buněčná stěna	1,76
ZM	0,79
ZM frakce nad 100 kDa	3,60
ZM frakce 100-50 kDa	2,25
ZM frakce 50-30 kDa	0,34
ZM frakce 30-10 kDa	2,18
NM frakce nad 100 kDa	1,24
NM frakce 100-50 kDa	2,03
NM frakce 50-30 kDa	1,80
NM frakce 30-10 kDa	11,07
cytosol frakce nad 100 kDa	1,91
cytosol frakce 100-50 kDa	0,90
cytosol frakce 50-30 kDa	0,68
cytosol frakce 30-10 kDa	6,87

ZM- zahuštěné médium

NM- nezahuštěné médium

4.6 Proteasová aktivita v buněčných frakcích kmene KF2

Při manipulaci a skladování experimentálních vzorků určených k charakterizaci chitinasového systému anaerobní houby KF2 jsme měli velké problémy se stabilitou enzymů, zvláště pak endochitinasy. Jednou z příčin poklesu či úplné ztráty enzymových aktivit může být přítomnost proteas. Proto jsme zjišťovali aktivity těchto enzymů ve všech buněčných frakcích anaerobní houby kmene KF2. Naměřené hodnoty jsou shrnuty v tabulce 9 a je z nich zřejmé, že přesto, že jsme používali inhibiční EDTA, proteasy byly aktivní. Zejména vysoká aktivita proteas v zahuštěném médiu může být příčinou nízkých aktivit endochitinasy naměřených v zakoncentrované extracelulární frakci.

Tab. 9. Proteasová aktivita v různých buněčných frakcích kmene KF2

NM	2,40
cytosol	20,00
buněčná stěna	21,84
ZM	52,98
ZM frakce nad 100 kDa	121,88
ZM frakce 100-50 kDa	0,00
ZM frakce 50-30 kDa	2,10
ZM frakce 30-10 kDa	2,03
NM frakce nad 100 kDa	0,22
NM frakce 100-50 kDa	0,11
NM frakce 50-30 kDa	7,19
NM frakce 30-10 kDa	0,00
cytosol frakce nad 100 kDa	5,53
cytosol frakce 100-50 kDa	22,12
cytosol frakce 50-30 kDa	2,21
cytosol frakce 30-10 kDa	0,00

ZM- zahuštěné médium

NM- nezahuštěné médium

4.7 Charakterizace enzymu-endochitinasy

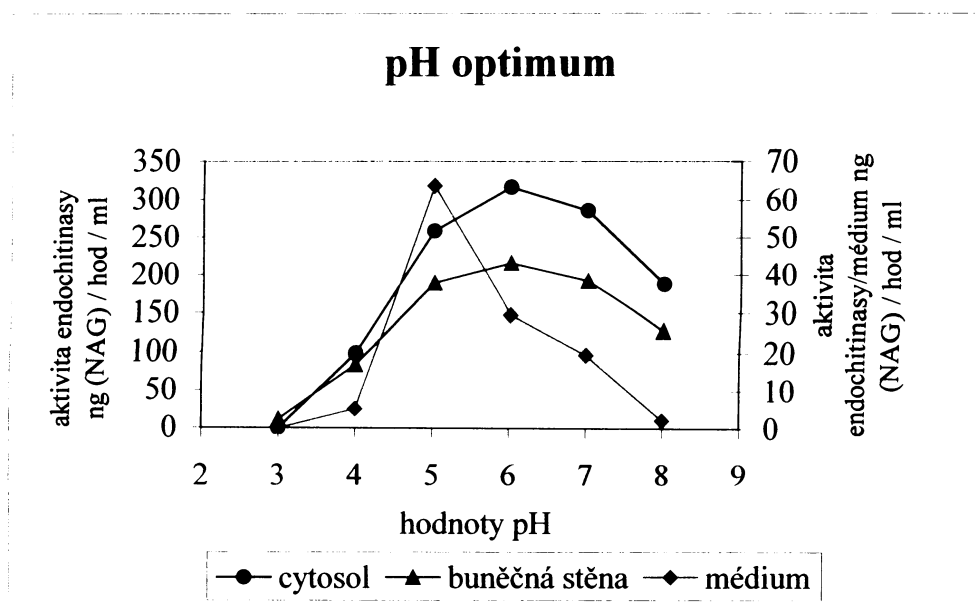
4.7.1 Stanovení pH optima

Každý enzym vyžaduje pro dosažení optimální účinnosti specifickou koncentraci vodíkových iontů H^+ , nejen proto, že reakční mechanismus vyžaduje kyselé či zásadité prostředí, ale také proto, že konformace proteinu závisí na náboji vazebných skupin. Stanovovali jsme proto optimální pH pro endochitinasu, která je, jak vyplývá z našich výsledků, nejvýznamnějším enzymem chitinolytického systému anaerobních hub. Měření jsme provedli ve třech nezahuštěných, nedělených buněčných frakcích kmene KF2.

Výsledky jsou shrnuty v tabulce 10 a názorně vykresleny v obrázku 13 (str. 59). Z naměřených hodnot vyplývá, že optimální pH se liší pro extracelulárně a intracelulárně produkovaný enzym. Endochitinasu uvolňovanou do média je nejaktivnější při pH 5, zatímco endochitinasu v cytosolu a buněčných stěnách má optimální pH 6. Aktivity endochitinas ve všech třech frakcích výrazně klesají při pH 8 na jedné straně, pH 4 na druhé straně a při pH 3 dochází k denaturaci.

Tab. 10. Endochitinasová aktivita v různých buněčných frakcích v závislosti na pH inkubace

	médium	cytosol	buněčná stěna
pH 3	0,00	0,00	12,15
pH 4	5,21	99,29	84,59
pH 5	63,76	258,86	189,56
pH 6	29,50	317,40	215,93
pH 7	19,52	286,18	192,16
pH 8	2,17	187,75	127,96



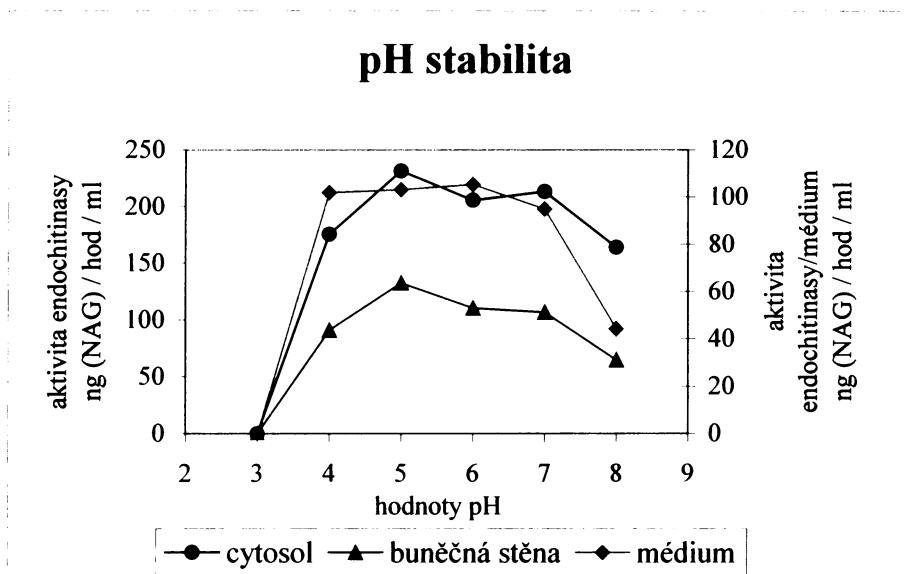
Obr. 13. Endochitinasová aktivita v různých buněčných frakcích v závislosti na pH inkubace

4.7.2 Stanovení pH stability

Stabilita enzymu za různých reakčních podmínek je také jednou z charakteristik enzymu. Měřili jsme aktivitu endochitinasy ve třech buněčných frakcích houby KF2 opět při různém pH, v tomto experimentu však byla inkubační doba prodloužena na tři hodiny. Zjištěné enzymové aktivity jsou uvedeny v tabulce 11 a graficky znázorněny na obrázku 14 (str. 60). Z výsledků lze vyčíst, že extracelulární i intracelulární endochitinasy jsou stabilní v rozmezí pH 4-7, při pH 8 se projevuje výrazný poklesu aktivit a při pH 3 dochází k denaturaci enzymu.

Tab. 11. Endochitinasová aktivita v různých buněčných frakcích dle stability v různém pH

	médium	cytosol	buněčná stěna
pH 3	0,00	0,00	0,00
pH 4	101,94	175,61	91,06
pH 5	103,24	231,54	132,68
pH 6	105,41	205,53	110,57
pH 7	95,00	213,33	106,67
pH 8	44,24	163,90	65,04



Obr. 14. Stabilita endochitinasové aktivity v různých buněčných frakcích kmene KF2 v závislosti na pH inkubačního roztoku

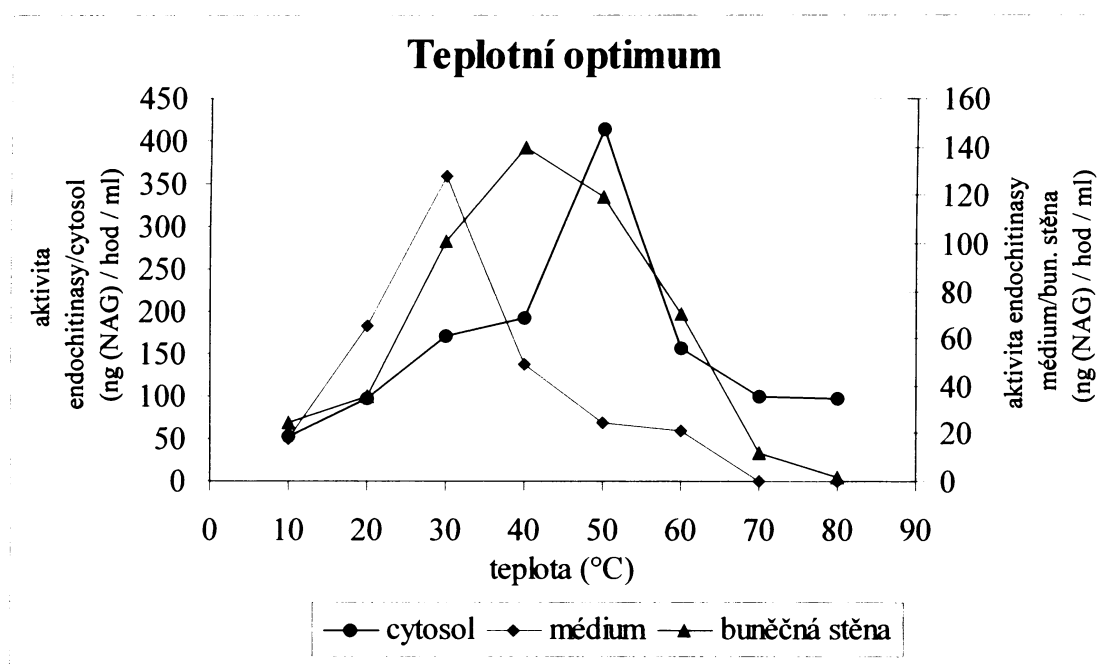
4.7.3 Stanovení teplotního optima

Aktivita enzymu narůstá se vzrůstající teplotou až do bodu, kdy termální energie začne narušovat proteinové vazby, až se nakonec zhroutí celá konformace a dojde k denuraci enzymu. Optimální reakční teplota je proto významnou charakteristikou enzymu. Stanovovali jsme optimální teplotu pro endochitinasu, a to opět ve třech nezahuštěných, nedělených buněčných frakcích kmene KF2.

Výsledky jsou shrnuty v tabulce 12 (str. 61) a graficky znázorněny na obrázku 15 (str. 61). Z naměřených hodnot vyplývá, že optimální reakční teplota se liší pro každou studovanou frakci. Endochitinasa extracelulární dosahuje nejvyšších aktivit při teplotě 30°C, což je teplota neobvykle nízká. Endochitinasa v cytosolové frakci je nejúčinnější při teplotě 50°C, v buněčných stěnách je nejaktivnější při teplotě 40°C, což jsou hodnoty obvyklé pro celou řadu enzymů. V těchto zjištěných optimálních teplotách dochází k poměrně razantnímu nárůstu endochitinasové aktivity, což svědčí o důležitosti této fyzikální charakteristiky.

Tab. 12. Endochitinasová aktivita v různých buněčných frakcích kmene KF2 v závislosti na teplotě inkubace

	médium	cytosol	buněčná stěna
T 10°C	17,78	52,90	24,28
T 20°C	65,07	98,43	35,56
T 30°C	127,53	170,40	101,03
T 40°C	49,02	192,95	140,05
T 50°C	24,73	413,22	119,24
T 60°C	21,25	156,10	70,68
T 70°C	0,00	101,03	11,71
T 80°C	0,00	97,99	1,73



Obr. 15. Endochitinasová aktivita v různých buněčných frakcích v závislosti na teplotě inkubace

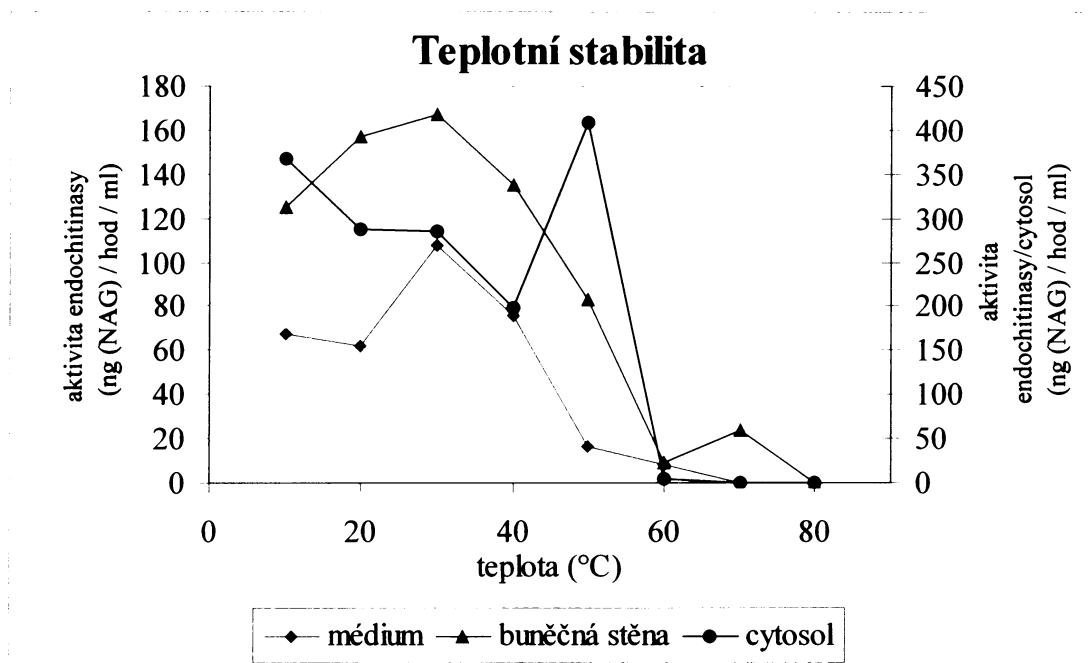
4.7.4 Stanovení teplotní stability

Teplotní stabilita endochitinas byla měřena ve třech buněčných frakcích houby KF2. Tyto vzorky byly vystaveny působení různých inkubačních teplot po dobu 1 hodiny. Z výsledků, které shrnuje tabulka 13 (str. 62) a obrázek 16 (str. 62), vyplývá, že cytosolová

endochitinas je stabilní při své optimální teplotě 50°C a také při teplotě 10°C a 30°C. Při teplotě 30°C jsou stabilní také endochitinasy z ostatních dvou frakcí, kde dochází po 1 hodině inkubace jen k mírnému poklesu aktivity ve srovnání s normální inkubační dobou.

Tab. 13. Teplotní stabilita endochitinas v různých buněčných frakcích kmene KF2

	médium	cytosol	buněčná stěna
T 10°C	67,67	367,69	124,88
T 20°C	62,46	288,78	157,40
T 30°C	108,01	284,44	166,94
T 40°C	75,91	199,02	135,28
T 50°C	16,48	409,75	83,25
T 60°C	8,24	3,90	9,11
T 70°C	0,00	0,00	23,41
T 80°C	0,00	0,00	0,00



Obr. 16. Teplotní stabilita endochitinas v různých buněčných frakcích kmene KF2

4.7.5 Substrátová specifita

Substrátová specifita vyjadřuje afinitu enzymu k různým substrátům, v našem případě schopnost fungální endochitinasy hydrolyzovat chitin pocházející z jiných přírodních zdrojů. Zjišťovali jsme aktivitu endochitinasy ve třech buněčných frakcích houby KF2, ale aktivita endochitinasy v médiu byla téměř neměřitelná, proto uvádíme pouze hodnoty získané z cytosolu a buněčných stěn. Výsledky jsou shrnuty v tabulkách 14 a 15 (str. 64). Z nich vyplývá, že pro endochitinasy v cytosolu je nejstravitelnější houbový chitin, ze kterého dokáží odštěpit o 0,89 μg NAG více než z běžně používaného CM-chitinu. Naopak je pro tento enzym nejhůře degradovatelný ve vodě rozpustný chitosan glutamát, u kterého endochitinasy vyprodukovala jen 1,16 μg NAG. U endochitinasy buněčných stěn se ukázal jako nejvhodnější substrát CM-chitin, avšak houbový chitin zaostával jen o 0,16 μg produkovaného NAG, tedy i pro tuto endochitinasu je houbový chitin velice vhodný substrát. Jako nejméně vhodný substrát se opět ukázal být chitosan glutamát. Připojení glutamátových zbytků na chitosan vede k výraznému snížení možnosti tento substrát rozložit, a to u cytosolových endochitinas o 2,23 μg NAG a u endochitinas buněčných stěn o 1,22 μg NAG na dané množství enzymu. Připojení aspartátových zbytků k chitosanu vede taktéž ke snížení aktivity enzymu, ale již ne tak výraznému.

Tab. 14. Endochitinasová aktivita v buněčných frakcích kmene KF2 při použití různých druhů chitinu

	cytosol	buněčná stěna
CM-chitin	282,82	329,10
Koloidní chitin	205,17	317,83
Chitosan	185,65	253,22
Chitosan peros	144,88	195,99
DDD chitin sepie	289,33	277,50
DDD chitin houba	331,84	320,00
Chitosan aspartát	137,07	226,77
Chitosan glutamát	63,33	186,45

Tab. 15. Množství produkovaného N-acetylglukosaminu (μg) při použití různých substrátů

	cytosol	buněčná stěna
CM-chitin	5,17	6,01
Koloidní chitin	3,75	5,81
Chitosan	3,39	4,63
Chitosan peros	2,65	3,58
DDD chitin sepie	5,28	5,07
DDD chitin houba	6,06	5,85
Chitosan aspartát	2,50	4,14
Chitosan glutamát	1,16	3,41

4.7.6 Vliv iontů a chemikálií na aktivitu endochitinasy

Aktivitu enzymu mohou ovlivnit látky, které blokují aktivní místo nebo mění konformaci enzymu, která vede ke změně katalytické aktivity. Studovali jsme proto aktivační či inhibiční účinek 14 chemikálií na aktivitu endochitinasy ve dvou buněčných frakcích houby KF2. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 16 (str. 65), která popisuje vliv kovových iontů na aktivitu endochitinasy a tabulce 17 (str. 65), která shrnuje vliv různých chemických látek na tentýž enzym. Hodnoty jsou vyjádřeny v procentech. 100 % aktivita je přitom aktivita endochitinasy, která byla hodinu inkubována při 40°C jen v čistém 100 mM fosfátovém pufru pH 6 bez přídavku jakéhokoliv iontu nebo chemikálie. Z výsledků, které jsou znázorněny také graficky na obrázku 17 (str. 66), vyplývají tyto závěry. Inkubace s draslíkem a hořčíkem vedlo k mírnému zvýšení aktivity enzymu, naopak inkubace s kobaltem vedla k inhibici enzymu v průměru o 20 % a s manganem až o 65 %. Inkubace s baryem měla mírný aktivační vliv na cytosolovou endochitinasu, na rozdíl od endochitinasy buněčných stěn, kde došlo k 57 % inhibici. Většina sledovaných chemikálií měla inhibiční vliv na enzymatickou aktivitu. Jako největší inhibitory se projevíly dvě látky, SDS a thimerosal, které při vyšší koncentraci (10mM) výrazně potlačily či zcela deaktivovaly endochitinasy obou buněčných frakcí. Výrazným inhibitorem se ukázala být i EDTA, která při běžně používané 1mM koncentraci vyvolala pokles endochitinasové aktivity buněčných stěn o 30 % a při vyšší molaritě došlo k 50 % snížení aktivity. Naopak

mírný aktivační účinek prokázal iodoacetamid a 1 mM kyselina iodooctová (při vyšší koncentraci již došlo k inhibici). Vyšší koncentrace chemikálií vedly většinou k inhibici endochitinas v průměru o 20-30 %, přičemž enzymy buněčných stěn byly citlivější než enzymy cytosolové frakce.

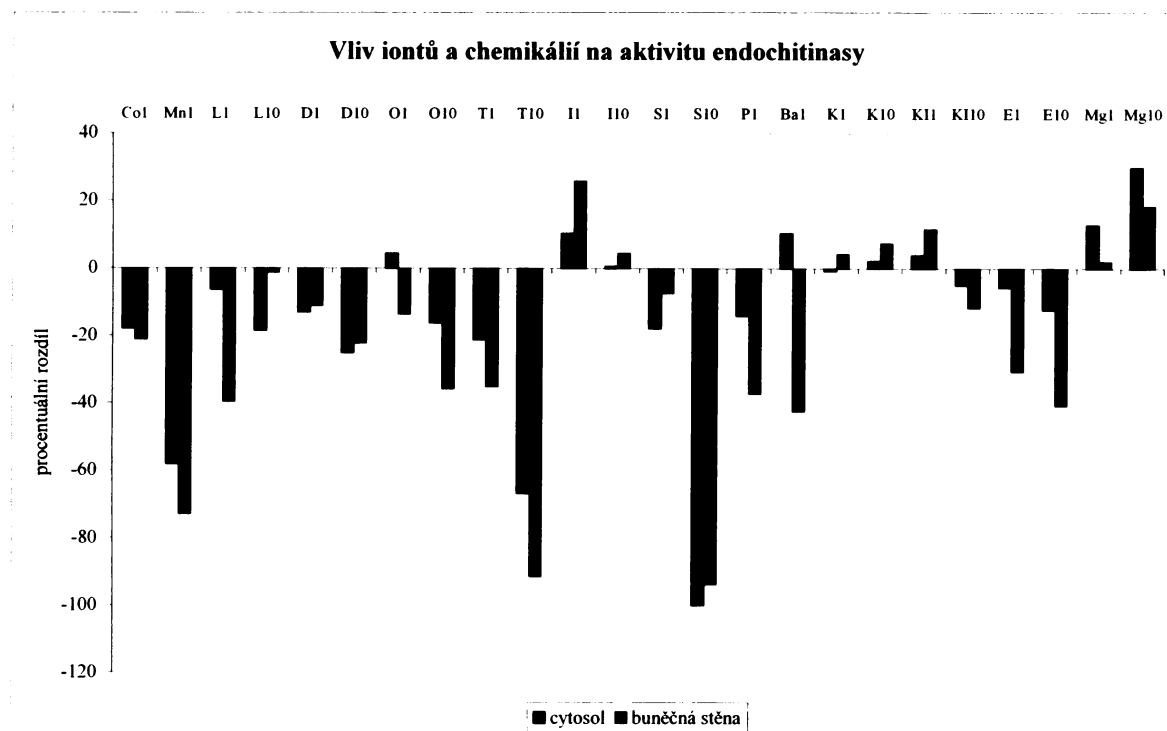
Tab. 16. Vliv iontů na aktivitu endochitinasy u kmene KF2 vztažený procentuelně k aktivitě neovlivněného enzymu

	cytosol	buněčná stěna
1 mM CoCl ₂	82,17	78,95
1 mM MnCl ₂	41,92	27,07
1 mM BaCl ₂	110,39	57,52
1 mM KCl	99,23	104,25
10 mM KCl	102,20	107,44
1 mM MgCl ₂	112,90	102,12
10 mM MgCl ₂	129,93	118,44

Tab. 17. Vliv chemikálií na aktivitu endochitinasy u kmene KF2 vztažený procentuelně k aktivitě neovlivněného enzymu

	cytosol	buněčná stěna
1 mM L-cystein	93,64	60,34
10 mM L-cystein	81,54	98,68
1 mM dithiothreitol	86,96	88,89
10 mM dithiothreitol	74,87	77,78
1 mM o-fenantrolin	104,48	86,42
10 mM o-fenantrolin	83,84	64,20
1 mM thimerosal	78,83	64,89
10 mM thimerosal	33,17	8,51
1 mM iodoacetamid	110,39	125,93
10 mM iodoacetamid	100,72	104,53
1 mM SDS	82,19	92,60

10 mM SDS	0,00	6,17
1 mM phenylmethyl	85,95	62,78
1 mM kyselina iodoctová	103,99	111,70
10 mM kyselina iodoctová	95,07	88,29
1 mM EDTA	94,28	69,36
10 mM EDTA	87,75	59,21



Obr. 17. Vliv chemikálií a iontů na aktivitu endochitinasy v buněčných frakcích kmene KF2 (0 = aktivita neovlivněného enzymu)

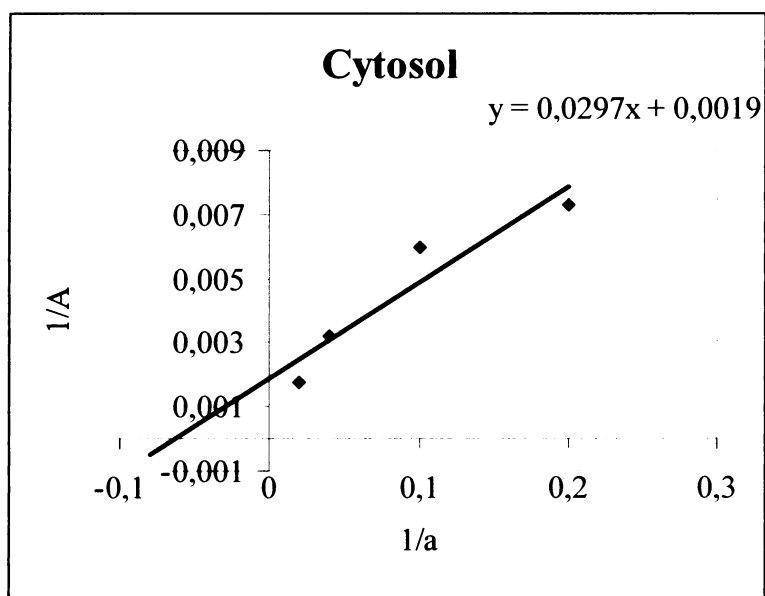
4.7.7 Určení K_m

Pro charakterizaci kinetiky enzymatické reakce se běžně užívají dva parametry, a to maximální rychlost V , což je rychlost reakce, při níž je enzym saturován substrátem, a Michaelisova konstanta K_m , která je definována jako taková koncentrace substrátu, při níž se reakční rychlost rovná polovině maximální rychlosti. Spočítali jsme tedy kinetické parametry endochitinasy houby KF2 v cytosolu a ve frakci buněčných stěn. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách 18 (str. 67) a 19 (str. 68) a na obrázcích 18 (str. 67) a 19 (str. 68). Zjištěná hodnota K_m pro endochitinasu v cytosolu je 15,63 g/l a pro endochitinasu vázanou na buněčnou stěnu 11,23 g/l při použití chitosanu aspartátu jako substrátu enzymové

reakce. Tento substrát byl vybrán z důvodu nejlepší rozpustnosti ve vodě, která zaručovala přípravu co nejpřesnější koncentrace substrátu, i přes to, že tento substrát není pro tuto reakci nejspecifičtější. Hodnoty Michaelisovy konstanty jsou vysoce individuální pro určenou dvojici substrát-enzym.

Tab. 18. Endochitinasová aktivita kmene KF2 v cytosolové frakci v závislosti na koncentraci substrátu

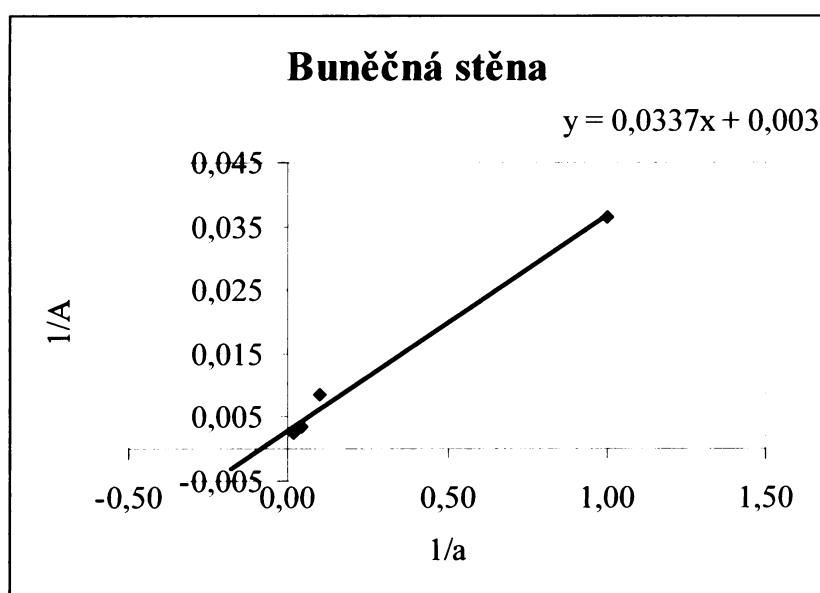
50,00	572,35
25,00	312,19
10,00	166,94
5,00	136,58
1,00	137,88



Obr. 18. Vynesení závislosti $1/A$ proti $1/a$ dle Lineweavera a Burka v cytosolové frakci

Tab. 19. Endochitinasová aktivita kmene KF2 ve frakci z buněčných stěn v závislosti na koncentraci substrátu

50,00	373,33
25,00	287,91
10,00	117,07
1,00	27,32
0,10	15,61



Obr. 19. Vynesení závislosti $1/A$ proti $1/a$ dle Lineweavera a Burka ve frakci z buněčných stěn

4.7.8 Stanovení molekulové hmotnosti enzymu

Enzymy s endochitinasovou aktivitou mohou být identifikovány pomocí zymogramů. Proteiny se rozdělí standartní denaturační SDS-PAGE elektroforézou v gelu, který obsahuje substrát pro danou enzymatickou reakci. Úspěšnost přípravy zymogramu pak spočívá ve schopnosti renaturace sledovaného enzymu, v našem případě endochitinasy.

Připravili jsme zymogramy pro detekci endochitinas ve třech frakcích houby KF2, a to v médiu, v cytosolu a v buněčných stěnách. Fragmenty bílkovin korespondující s endochitinasami jsou znázorněny na obrázcích 20 (str. 70), 21 (str. 70) a 22 (str. 71). Z těchto zymogramů lze odhadnout molekulové hmotnosti enzymaticky aktivních proužků. Extracelulárně produkované endochitinasy z média tvoří v gelu fragmenty o molekulové hmotnosti 134 000, 127 500, 121 000, 100 750, 87 250, 80 000, 45 000 a 43 000 Da. Pro endochitinasy v cytosolové frakci jsme odhadli molekulové hmotnosti na 134 000, 127 500, 121 000, 100 750, 94 000, 80 000, 73 750 a 66 000 Da. Endochitinasy buněčných stěn se projevují jako fragmenty v horní části gelu s přibližnými molekulovými hmotnostmi 134 000, 127 500, 121 000, 94 000 Da.

Tyto výsledky naznačují, že se endochitinasy vyskytují ve formě čtyř až osmi izoenzymů. Ve všech buněčných frakcích houby KF2 jsme detekovali aktivní proteiny o hmotnosti 134, 127 a 121 kDa. Ostatní detekované fragmenty se pak v jednotlivých frakcích liší. Zatímco v extracelulární a cytosolové frakci se objevují i enzymy s nižší molekulovou hmotností (43-80 kDa), ve frakci buněčných stěn jsme zaznamenali pouze větší enzymy.

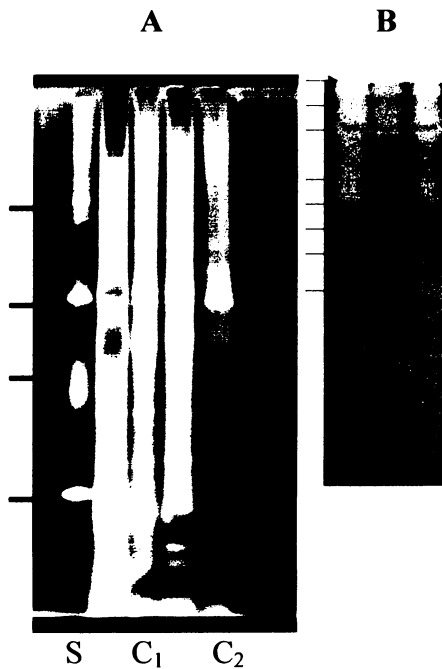


Obr. 20. SDS elektroforéza bílkovin obsažených v médiu

M- médium, S- standard

A- SDS-PAGE elektroforéza bílkovin

B - zymogram pro rozeznání chitinas

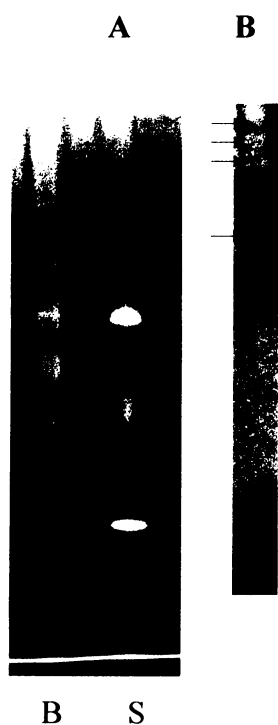


Obr. 21. SDS elektroforéza bílkovin cytosolové frakce

S- standard, C₁, C₂- cytosolová frakce

A - SDS-PAGE elektroforéza bílkovin

B - zymogram pro rozeznání chitinas



Obr. 22. SDS elektroforéza bílkovin buněčné stěny

B- frakce z buněčné stěny, S-standard

A - SDS-PAGE elektroforéza bílkovin

B - zymogram pro rozeznání chitinas

5. Diskuze

Vzhledem ke snaze co nejlépe využít jedinečnou schopnost přežvýkavců produkovat živočišnou bílkovinu s malou spotřebou jadrných krmiv, stoupá v posledních letech zájem o výzkum bachorové fermentace. Jsou studovány všechny mikroorganismy obývající bachor přežvýkavců a možnosti jejich manipulace s cílem pozitivně ovlivnit bachorovou fermentaci. Největší pozornost je věnována anaerobním bachorovým bakteriím a houbám.

Enzymová výbava bachorových anaerobních hub je velice pestrá a účinná. Anaerobní houby produkují celulasy, které při interakci s metanogenními bakteriemi, patří mezi neaktivnější celulolytické enzymy vůbec ^[112]. Tyto enzymy byly a stále jsou podrobně studovány. Chitinolytické enzymy se dostávají do popředí zájmu až v poslední době. Buněčná stěna anaerobních bachorových hub se skládá z chitinu jako základního stavebního polysacharidu. Výstavba buněčné stěny však vyžaduje kromě chitinsyntetasy také chitinolytické enzymy, které regulují syntézu chitinu ve stélkových zakončeních. Na tomto procesu se podílí celý komplex chitinolytických enzymů, mezi něž patří endochitinasy, exochitinasy a N-acetylglukosaminidasy. Každý z těchto enzymů štěpí chitin jiným způsobem až na konečný produkt, kerým je N-acetylglukosamin.

Citinolytické enzymy byly dosud sledovány pouze u monocentrických bachorových hub ^[100, 101, 102, 103] a dosud žádné výsledky nebyly publikovány o chitinasách hub polycentrických.

Ve své diplomové práci jsem se proto věnovala studiu chitinolytického enzymového komplexu u polycentrických anaerobních hub a charakterizaci endochitinasy, která se projevila jako dominantní chitinolytický enzym. Vycházela jsem z práce Masaru Sakurady ^[102], který se se svým týmem pokusil purifikovat a charakterizovat endochitinasu z média monocentrické anaerobní bachorové houby *Piromyces communis*.

Výběr kmenu s největší endochitinasovou aktivitou

Nejdříve jsem se zaměřila na vytypování kmene s nejvyšší endochitinasovou aktivitou. Srovnávala jsem přitom dva rody anaerobních polycentrických hub *Anaeromyces* a *Orpinomyces*. I přesto, že jsme u kmenů hub z rodu *Anaeromyces* naměřili nižší enzymatické aktivity, nelze z těchto výsledků vyvodit obecný závěr, že houby rodu *Anaeromyces* vykazují nižší aktivity endochitinas než houby rodu *Orpinomyces*. Je nutno uvážit, že každá houba má svou individuální růstovou křivku a fáze růstu, kdy rod *Orpinomyces* produkuje do média největší množství endochitinas nemusí odpovídat stejné

růstové fázi u rodu *Anaeromyces*. Dle mých zkušeností některé kmeny rodu *Anaeromyces* mohou růst pomaleji. Pro další experimenty jsem na základě tohoto „screeningu“ vybrala houbu *Orpinomyces joyonii* KF2, u které byly naměřeny nejvyšší endochitinasové aktivity v médiu.

Aktivity v závislosti na době kultivace

Na základě sledování dynamiky produkce endochitinasy do média bylo rozhodnuto, že pro další experimenty bude nejvhodnější čtyřdenní kultura houby KF2, neboť právě po 96 hodinách kultivace endochitinasy dosahuje maximálních aktivit. Tento výsledek potvrzuje i studie R. F. Souzy^[104], která popisuje endochitinasu u patogenní houby *Colletotrichum gloeosporioides*. Tento výsledek odpovídá tomu, že mezi třetím až pátým dnem kultivace se nachází houba v nejvyšší růstové fázi, a proto pro stavbu a přestavbu buněčné stěny potřebuje velké množství chitinasových enzymů^[104]. Tyto polycentrické houby potřebují chitinasové enzymy jen pro stavbu své vlastní buněčné stěny a není znám důvod, proč tyto houby transportují chitinasové enzymy i do média, kde jsou většinou stanovovány. K nárůstu endochitinasových aktivit dochází také osmý až devátý den kultivace, což je zřejmě dáno tím, že v této době již nastává smrt buněk a dochází k autolýze buněčné stěny.

Endochitinasové aktivity v různých buněčných frakcích

Pro orientaci jsme v úvodních experimentech stanovovali endochitinasové aktivity v kultivačním médiu, avšak enzymy chitinolytického systému by měly být vázány především na buněčnou stěnu. Tyto předpoklady se potvrdily v dalším experimentu, kde jsme pro intracelulární endochitinasové aktivity naměřili až šestkrát vyšší hodnoty. Lokalizace chitinas souvisí s jejich funkcí. Houby, které používají tyto enzymy ke stavbě buněčné stěny, produkují chitinasy hlavně intracelulárně, organismy, které jsou schopny degradovat chitin jako substrát, produkují chitinasy extracelulárně.

„Zakoncentrování“ enzymu

I přesto, že cytosolová frakce a frakce buněčných stěn houby KF2 vykazovaly vyšší endochitinasové aktivity, z důvodu komplexního přístupu jsme do dalších experimentů zařadili i endochitinasu extracelulární. Ve snaze „zakoncentrovat“ tuto endochitinasu, jsme přistoupili k zahuštění média. Bohužel i přes neustálé chlazení však došlo k téměř úplné

ztrátě endochitinasové aktivity, což bylo s největší pravděpodobností způsobeno proteolytickými enzymy, jejichž aktivita narůstala s hustotou média.

Separace enzymů podle molekulové hmotnosti

Bílkoviny ze tří frakcí houby KF2 jsme se pokusili separovat podle molekulové hmotnosti ultrafiltrací přes polyethersulfonové membrány. Tato metodika se však neosvědčila, neboť aktivní zůstávaly pouze frakce obsahující bílkoviny s největší molekulovou hmotností. Bílkoviny nebyly schopny projít membránou, což může mít celou řadu příčin. Proteiny se mohou například nacházet ve velkých komplexech svázaných sulfidickými vazbami. Jiným důvodem může být spojení bílkovin s nějakým zásobním polysacharidem nebo mohou bílkoviny zůstat navázány na nějakou membránovou složku.

Aktivity enzymů u houby *Orpinomyces joyonii*

U anaerobní houby KF2 jsme prověřili všechny známé složky chitinolytického systému, tedy endochitinasy, exochitinasy, N-acetylglukosaminidasy a chitin deacetylasy. Všechna měření jsme prováděli ve třech frakcích a můžeme vyvodit jednoznačný závěr, že hlavní složkou chitinolytického systému anaerobní polycentrické houby je endochitinasa. Tyto zjištěné výsledky potvrzují i studie provedené na anaerobní monocentrické houbě *Piromyces* ^[100, 101, 102, 103].

Charakterizace endochitinasy v různých buněčných frakcích a médiu

Stanovení pH optima

Optimální pH pro funkci extracelulární endochitinasy houby KF2 je pH 5, což je nižší hodnota než u *Piromyces communis* OTS1, která dosahuje hodnoty pH 6 ^[102] a 5,5 ^[100] a *Colletotrichum gloeosporioides*, jejíž optimální pH je 7 ^[104]. Endochitinasy obsažené v cytosolu a na buněčné stěně mají optimální pH 6, které je srovnatelné s optimálním pH u *Piromyces communis* OTS1 ^[102, 103].

pH stabilita

Aktivita enzymu je zachována v rozmezí pH 4 až 7. Při pH 3 došlo k úplné ztrátě aktivity a při pH 8 ke snížení aktivity na 50 % nejvyšší dosažené aktivity. Tato pH stabilita je dána

prostředím, ve kterém organismus žije. V bacheru přežvýkavců je pH 5-7 ^[73], proto při tomto pH je stabilita enzymu největší. Toto rozmezí je podobné jako u endochitinasy z média u *Piromyces communis* OTS1 s hodnotami pH 6-8 ^[102] nebo z cytosolu u stejného organismu s hodnotou pH 5-8 ^[101].

Teplotní optimum enzymu

Endochitinasy v médiu vykazují nejvyšší aktivitu při 30°C. Je to nejnižší zjištěná optimální teplota endochitinas, neboť u *Piromyces communis* OTS1 dosahuje hodnoty 50°C ^[102] stejně jako u *Colletotrichum gloeosporioides* ^[104]. Naopak endochitinasy v cytosolu jsou neaktivnější při 50°C, což je o 10°C nižší hodnota než u *Piromyces communis* OTS1 ^[101]. Endochitinasu buněčných stěn našeho organismu měla stejné teplotní optimum jako obdobný enzym u *Piromyces communis* OTS1 ^[103], a to 40°C.

Teplotní stabilita enzymu

Endochitinasy v médiu jsou aktivní do 40°C, při 50°C dochází k velké ztrátě aktivity, poté již k úplné inaktivaci enzymu. Tato stabilita je nižší než u *Piromyces communis* OTS1, kde došlo k inaktivaci endochitinasy v médiu až při 70°C ^[102], ale shoduje se s hodnotami zjištěnými pro houbu *Colletotrichum gloeosporioides* ^[104]. Endochitinasy v cytosolu naší houby jsou stabilní až do 50°C, poté dochází k inaktivaci enzymu. Cytosolová endochitinasu u *Piromyces communis* je přitom stabilní až do teploty 60°C ^[101]. Nejvyšší stabilitu vykazují endochitinasy na buněčné stěně, které jsou aktivní i při 70°C. Možná jsou tyto enzymy vázány na nějakou membránovou strukturu, která jim poskytuje ochranu před denaturací.

Substrátová specifika

Sledovali jsme afinitu enzymu k různým chitinovým substrátům, avšak jen na endochitinasach v cytosolu a na buněčné stěně, neboť aktivita endochitinas v médiu byla velice nízká. Podobná studie substrátové specifiky byla provedena také u extracelulární endochitinasy houby *Piromyces communis* OTS1. Jako nejvhodnější substrát se zde ukázal být chitinový prášek a až poté houbový chitin. Naopak koloidní chitin a chitosan nebyly monocentrickou houbou skoro vůbec hydrolyzovány ^[102]. Námi studované endochitinasy byly schopny hydrolyzovat i koloidní chitin a chitosan, což ukazuje na jejich širší substrátovou specifitu.

Vliv iontů a chemikálií na aktivitu endochitinázy

Ovlivnění aktivity endochitinas různými ionty a chemikáliemi byly studovány na cytosolových endochitinasách a endochitinasách buněčných stěn. Naše výsledky odpovídají údajům publikovaným pro endochitinasu v médiu houby *Piromyces communis* OTS1^[101, 102, 103] a *Colletotrichum gloeosporioides*^[104].

Vzhledem k tomu, že kyselina iodoctová a iodoacetamidem stimulovali aktivitu endochitinázy, můžeme usuzovat, že se nejedná o cysteinový protein. Inhibice aktivity o-fenantrolinem, EDTA (zároveň se stimulací aktivity iontem Mg^{+2}), L-cysteinem a dithiothreitem (oxidací SH skupin) naznačuje, že by studovaný enzym mohl patřit mezi metaloproteiny. Phenylmethyl působí jako serinový inhibitor, a proto lze předpokládat, že endochitinas patří k serinovým proteinům. Inhibice aktivity zapříčiněná SDS dokazuje, že enzym musí zaujímat určitou konformaci a náboj, aby byl aktivní. Ionty Co^{+2} , Mn^{+2} reagují s SH skupinami a způsobují inhibici aktivity. Ionty Ba^{+2} a K^{+} destabilizují protein snížením množství vodných klastrů kolem enzymu, což vede ke zvýšení energie systému. Naopak ionty Mg^{+2} a Cl^{-} daný systém stabilizují zvýšením množství vodných klastrů kolem molekuly, což vede ke snížení energie systému^[21, 118].

Michaelisova konstanta

Zjištěná hodnota K_m pro endochitinasu v cytosolu je 15,63 g/l a pro endochitinasu vázanou na buněčnou stěnu je 11,23 g/l při použití chitosanu aspartátu jako substrátu enzymové reakce. Konstanta K_m se běžně uvádí v jednotkách mol/l, ale protože neznáme molekulovou hmotnost námi použitého substrátu, uvádíme hodnotu Michaelisovy konstanty v jednotkách g/l.

Molekulová hmotnost

Po překonání značných metodických obtíží se nám podařilo zhotovit zymogramy pro enzymy ze všech tří frakcí houby KF2. Zymogramy ukázaly, že endochitinasy se vyskytují ve formě několika izoenzymů, které se mohou mírně lišit svým účinkem. Několik forem chitinas v jedné frakci popisuje i Sakurada^[102] pro chitinasy z různých buněčných frakcí houby *Piromyces communis*. V její cytosolové frakci se na zymogramu objevily 4 bandy, ve frakci z média a buněčných stěn se zobrazily 3 stejné bandy. V našem případě jsme však v zymogramech detekovali až 8 aktivních bandů. Bohužel v Sakuradově^[102] práci

není uvedena velikost proteinů. Přesto, že elektroforeticky rozdělené bílkoviny netvoří ostře ohraničené proužky, pokusili jsme se odhadnout molekulové hmotnosti bílkovin, které se renaturovaly. Z výsledků plyne, že velikost endochitinas se liší pro jednotlivé buněčné frakce a pohybuje se v dosti velkém rozmezí 43 až 134 kDa. Je však třeba brát v úvahu, že jsme museli prodloužit dobu varu vzorku za přítomnosti SDS, což může mít vliv na navázání SDS na enzym, které se projeví změnou náboje a tudíž i změnou rychlosti, s jakou bílkovina putuje gelem. Extracelulární endochitinas z *Piromyces communis* ^[102] má molekulovou hmotnost 44,9 kDa a z *Colletotrichum gloeosporioides* 43 kDa ^[104]. Obdobné výsledky jsme mezi námi separovanými endochitinasami detekovali pouze v médiu, a to bandy o velikosti 43 a 45 kDa.

6. Závěr

Výsledky získané při řešení diplomové práce dokazují, že cíle byly splněny. Předkládaná práce významně přispívá k objasnění enzymové chitinolytické výbavy anaerobní polycentrické houby rodu *Orpinomyces*. Pro zadanou práci bylo nejprve třeba vybrat nejaktivnější kmen z izolovaných polycentrických anaerobních hub a poté charakterizovat složky chitinolytického enzymového systému.

Výsledky diplomové práce lze shrnout následujícím způsobem:

- 1, Jako nejaktivnější anaerobní polycentrická houba se ukázal být rod *Orpinomyces*, konkrétně *Orpinomyces joyonii* KF2 a to po 4 dnech kultivace.
- 2, Měřitelnou aktivitu vykazovala z celého chitinolytického systému pouze endochitinas, ostatní složky měly mizivé hodnoty aktivit.
- 3, Pokus o purifikaci enzymu pomocí dělení na frakce dle velikosti bílkovin se nezdařil. Došlo k úplné inaktivaci enzymu. Můžeme se jen domnívat, zda to bylo použitím EDTA, která vykazovala inhibující účinky, přítomnými proteasami, koncentrováním bílkovin nebo jen teplotou.
- 4, Vyšší endochitinasová aktivita byla zjištěna v buněčných frakcích z cytosolu a buněčných stěn, což je v souladu se skutečností, že tyto houby využívají enzymy pracující s chitinem jen pro stavbu své vlastní buněčné stěny.
- 5, Byla charakterizována endochitinas v různých buněčných frakcích a v médiu a stanoveny její fyzikálně-chemické vlastnosti, a to optimální pH a teplota, vliv pH a teploty na stabilitu enzymu, substrátová specifita, vliv chemikálií a iontů na funkci enzymu, Michaelisova konstanta a molekulová hmotnost. Námi zjištěné vlastnosti enzymu jsou podobné vlastnostem endochitinas jiných anaerobních bacherových hub.

7. Seznam použité literatury

- [1] Asoa, N., Ushida, K., Kojima, Y.: Proteolytic activity of rumen fungi belonging to the genera *Neocallimastix* and *Piromyces*. *Lett. Appl. Microbiol.* 16, 247-250 (1993)
- [2] Barichievich, E. M., Calza, R. E.: Supernatant protein and cellulase activities of the anaerobic ruminal fungus *Neocallimastix frontalis* EB 188. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 43-48 (1990)
- [3] Barr, D. J. S.: An outline for the reclassification of the Chytridiales, and for new order, the Spizellomycetales. *Can. J. Bot.* 58, 2380-2394 (1980)
- [4] Barr, D. J. S.: How modern systematics relates to the rumen fungi. *BioSystems* 21, 351-356 (1988)
- [5] Barr, D. J. S., Kudo, H., Jakober, K. D., Cheng, K. J.: Morphology and development of rumen fungi: *Neocallimastix* sp., *Piromyces communis* and *Orpinomyces bovis* gen. nov., sp. nov. *Can. J. Bot.* 67, 2815-2824 (1989)
- [6] Bartnicki-Garcia, S.: Fundamental aspects of hyphal morphogenesis, v knize *Microbial Differentiation*, (Ashworth, J. M., Smith, J. E. eds.). Cambridge University Press, London, 245-267 (1973)
- [7] Bauchop, T.: Rumen anaerobic fungi of cattle and sheep. *Appl. Environ. Microbiol.* 38, 148-158 (1979)
- [8] Bauchop, T.: The rumen anaerobic fungi: colonizers of plant fibre. *Ann. Vet.* 10, 246-248 (1979)
- [9] Bauchop, T., Mountfort, D. O.: Cellulose fermentation by a rumen anaerobic fungus in both the absence and presence of rumen methanogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 42, 1103-1110 (1981)
- [10] Bauchop, T.: The gut anaerobic fungi: colonizers of dietary fibre, v knize *Fibre in human and animal nutrition*, (Wallace, G., Bell, L. eds.) Royal. Soc. N. Zealand Wellington, 143-148 (1982)
- [11] Blaiseau, P. L., Kunz, C., Grison, R., Bertheau, Y., Brygoo, Y.: Cloning and expression of a chitinase gene from the hyperparasitic fungus *Aphanocladium album*. *Curr. Genet.* 21, 61-66 (1992)
- [12] Blum, H., Beier, H., Gross, H. J.: Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93-99 (1987)
- [13] Borneman, W. S., Akin, D. E., Ljungdahl, L. G.: Fermentation products and plant cell wall degrading enzymes produced by monocentric and polycentric anaerobic ruminal fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1066-1073 (1989)

- [14] Borneman, W. S., Hartley, R. D., Morrison, W. H., Akin, D. E., Ljungdahl, L. G.: Feruloyl and p-coumaroyl esterase from anaerobic fungi in relation to plant cell wall degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33, 345-351 (1990)
- [15] Borneman, W. S., Ljungdahl, L. G., Hartley, R. D., Morrison, W. H., Akin, D. E.: Isolation and characterization of p-coumaroyl esterase from the anaerobic *Neocallimastix* strain MC-2. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2337-2344 (1991)
- [16] Borneman, W. S., Ljungdahl, L. G., Hartley, R. D., Morrison, W. H., Akin, D. E.: Purification and partial characterization of 2 feruloyl esterases from the anaerobic fungus *Neocallimastix* strain MC-2. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3762-3766 (1992)
- [17] Bradford, M.: A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72, 247-254 (1976)
- [18] Braune, R.: Untersuchungen über die in Wiederkäuermägen vorkommenden Protozoen. *Arch Protistenk* 32, 111-170 (1913)
- [19] Breton, A., Bernalier, A., Bonnemoy, F., Fonty, G., Gaillard, B., Gouet, Ph.: Morphological and metabolic characterisation of new species of strictly anaerobic rumen fungus: *Neocallimastix joyonii*. *FEMS Microbiol. Lett.* 58, 309-314 (1989)
- [20] Breton, A., Bernalier, A., Dusser, M., Fonty, G., Gaillard-Martinie, B., Guillot, J.: *Anaeromyces mucronatus* nov. gen., nov. sp., A new strictly anaerobic rumen fungus with polycentric thallus. *FEMS Microbiol. Lett.* 70, 177-182 (1990)
- [21] Brock, F. M., Forsberg, C. W., Buchanan-Smith, J. G.: Proteolytic Activity of Rumen Microorganism and Effects of Proteinase Inhibitors. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 561-569 (1982)
- [22] Brownlee, A. G.: Properties of chitin synthetase from a rumen anaerobic fungus. Abstract of XIV International Congress of Microbiology, 1-19 (1986)
- [23] Brownlee, A. G.: Remarkably AT-rich genomic DNA from the anaerobic fungus *Neocallimastix*. *Nucl. Acids Res.* 17, 1327-1335 (1989)
- [24] Brownlee, A. G.: The nucleic acids of anaerobic fungi, v knize *Anaerobic Fungi: Biology, Ecology and Function*, (Mountford, D. O., Orpin, C. G. eds.) Marcel Dekker, New York, 241-252 (1994)

- [25] Cabib, E., Bowers, B.: Fungal cell wall synthetis: the construction of a biological structure. *Microbiological Sciences* Vol. 5, No. 12, 370-375 (1988)
- [26] Calagno, A., Larrondo, J.: Chitinase activity of filamentous fungi. *Microbios* 92, 59-61 (1997)
- [27] Caldwell, D. R., Bryant, M. P.: Medium without rumen fluid for nonselective enumeration and isolation of rumen bacteria. *Appl. Microbiol.* 14, 794-801 (1966)
- [28] Calza, R. E.: Nascent synthetis and secretion of cellobiase in *Neocallimastix frontalis* EB188. *Curr. Microbiol.* 23, 175-180 (1991a)
- [29] Coscerton, J.W., Greese, G.G., Vheng, K.J.: How bacteria stick. *Sci. Am.* 238, 86-95 (1978)
- [30] Eadie, J. M.: The development of the rumen microbial populations in lambs and calves under various conditions of management. *J. Gen. Microbiol.* 29, 263-278 (1962)
- [31] Fliegerová, K., Hodrová, B., Voigt, K.: Classical and Molecular Approaches as a Powerful Tool for the Characterization of Rumen Polycentric Fungi. *Folia Microbiol.* 49, 157-164 (2004)
- [32] Flint, H.J., Zhang, J.X., Martin, J.: Multiplicity and expression of xylanases in the rumen cellulolytic bacterium *Ruminococcus flavefaciens*. *Curr. Microbiol.* 29, 139-143 (1994)
- [33] Gold, J. J., Heath, I. B., Bauchop, T.: Ultrastructural description of a new chytrid genus of caecum anaerobe, *Caecomycetes equi* gen. nov., sp. nov., assigned to the Neocallimasticaceae. *Mol. Microbiol.* 6, 403-415 (1988)
- [34] Gooday, G. W.: Physiology of microbial degradation of chitin and chitosan. *Biodegradation* 1, 177-190 (1990)
- [35] Gordon, G. L. R., Phillips, M. W.: Extracellular pectin lyase produced by *Neocallimastix* sp. LM1: a rumen anaerobic fungus. *Lett Appl. Microbiol.* 15, 113-115 (1992)
- [36] Gottschalk, G.: *Bacterial metabolism*. 2nd edn. Springer Berlin Heidelberg New York (1985)
- [37] Heath, B., Bauchop, T., Skipp, R. A.: Assignment of the rumen anaerobe *Neocallimastix frontalis* to the Spizellomycetales (Chytridiomycetes) on the basis of its polyflagellate zoospore ultrastructure. *Can. J. Bot.* 61, 295-307 (1983)

- [38] Hébraud, M., Fèvre, M.: Characterization of glycoside and polysaccharide hydrolases secreted by the rumen anaerobic fungi *Neocallimastix frontalis*, *Sphaeromonas communis* and *Piromonas communis*. *J. Gen. Microbiol.* 134, 1123-1129 (1988)
- [39] Hébraud, M., Fèvre, M.: Purification and characterization of a specific glycoside hydrolase from the anaerobic ruminal fungus *Neocallimastix frontalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 3164-3169 (1990)
- [40] Ho, Y. W., Barr, D. J. S., Abdullah, N., Jalaludin, S., Kudo, H.: A new species of *Piromyces* from the rumen of deer in Malaysia. *Mycotaxon* 47, 285-293 (1993)
- [41] Ho, Y. W., Barr, D. J. S., Abdullah, N., Jalaludin, S., Kudo, H.: *Piromyces spiralis*, a new species of anaerobic fungus from the rumen of goat. *Mycotaxon* 48, 59-68 (1993)
- [42] Ho, Y. W., Barr, D. J. S., Abdullah, N., Jalaludin, S., Kudo, H.: *Neocallimastix variabilis*, a new species of anaerobic fungus from the rumen of cattle. *Mycotaxon* 46, 241-258 (1993)
- [43] Ho, Y. W., Barr, D. J. S., Abdullah, N., Jalaludin, S., Kudo, H.: *Anaeromyces*, an earlier name for *Ruminomyces*. *Mycotaxon* 47, 283-284 (1993)
- [44] Hobson, P. N.: Rumen microorganisms. *Prog. Ind. Microbiol.* 9, 42-77 (1971)
- [45] Hungate, R. E.: The rumen and its microbes. Academic Press, London (1966)
- [46] Hungate, R. E.: A roll tube method for the cultivation of strict anaerobes, v knize *Methods in microbiology 3B*, (Norris, J. R., Ribbons, D. W. eds) Academic Press, London, 117-132 (1969)
- [47] Joblin, K. N.: Isolation enumeration and maintenance of rumen anaerobic fungi in roll tubes. *Appl. Environ. Microbiol.* 42, 1119-1122 (1981)
- [48] Kafetzopoulos, D., Martinou, A.: Bioconversion of chitin to chitosan: Purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Applied Biological Sciences* 90, 2564-2568 (1993)
- [49] Kalendová, A., Kovářová, N.: Výskyt anaerobních hub v trávicím traktu býložravců, Masarykova střední škola chemická
- [50] Kauss, H., Bauch, B.: Chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. *Methods in Enzymology* 161, 518-523 (1988)

- [51] Knowles, J., Lehtovaara, P., Tuula, T.: Cellulase families and their genes. *Trends Biotechnol.* 5, 255-261 (1987)
- [52] Kopečný, J., Wallace, R. J.: Cellular location and some properties of proteolytic enzyme of rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 1026-1033 (1982)
- [53] Kopečný, J., Hodrová, B.: Chitinolytic enzymes in the rumen microbial ecosystem. *Scientific Symp. „Animal Microbiology“ Domžale, Slovenia, 85-93 (1998)*
- [54] Krátký, J.: Studium anaerobních bacherových hub. *Vysoká škola zemědělská v Praze, Fakulta agronomická, Obor zootechnický, Katedra veterinárních disciplín (1991)*
- [55] Kuranda, M. J., Robbins, P. W.: Chitinase is required for cell separation during the growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 266, 19758-19767 (1991)
- [56] Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685 (1970)
- [57] Lever, M.: Carbohydrate Determination with 4-Hydroxybenzoic Acid Hydrazide (PAHBAH): Effect of Bismuth on the reaction. *Analytical Biochemistry* 81, 21-27 (1977)
- [58] Li, J., Heath, I. B., Bauchop, T.: *Piromyces mae* and *Piromyces dumbonica*, two new species of uniflagellate anaerobic chytridiomycetes fungi from the hind-gut of the horse and elephant. *Can. J. Bot.* 68, 1021-1033 (1990)
- [59] Li, J., Heath, I. B.: The phylogenetic relationship of the anaerobic chytridiomycetous gut fungi (Neocallimasticaceae) and the Chytridiomycota. I. Cladistic analysis of rRNA sequences. *Can. J. Bot.* 70, 1738-1746 (1992)
- [60] Li, J., Heath, I. B., Packer, L.: The phylogenetic relationship of the anaerobic chytridiomycete gut fungi (Neocallimasticaceae) and the Chytridiomycota. II. Cladistic analysis of structural data and description of Neocallimasticalea ord. Nov.. *Can. J. Bot.* 71, 393-407 (1993)
- [61] Liebetanz, E.: Die parasitischen Protozoen des Wiederkäuermagens. *Arch Protistenk* 19, 19-80 (1910)
- [62] Lowe, S. E., Theodorou, M. K., Trinci, A. P. J., Hespell, R. B.: Growth of anaerobic rumen fungi on defined and semidefined media lacking rumen fluid. *K. Gen. Microbiol* 131, 2225-2229 (1985)
- [63] Lowe, S. E., Theodorou, M. K., Trinci, A. P. J.: Isolation of anaerobic fungi from saliva and faeces of sheep. *J. Gen. Microbiol.* 133, 1829-1834 (1987)

- [64] Lowe, S. E., Griffith, G. G., Milne, A., Theodorou, M. K., Trinci, A. P. J.: The life-cycle and growth kinetics of an anaerobic rumen fungus. *J. Gen. Microbiol.* 133, 1751-1758 (1987)
- [65] Lowe, S. E., Theodorou, M.K., Trinci, A. P. J.: Growth and fermentation of an anaerobic rumen fungus on various carbon sources and effect of temperature on development. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 1210-1215 (1987b)
- [66] Lowe, S. E., Theodorou, M. K., Trinci, A. P. J.: Cellulases and xylanase of an anaerobic rumen fungus grown on wheat straw, wheat straw holocellulose, cellulose and xylan. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 1216-1223 (1987c)
- [67] Michel, V., Fonty, G., Millet, L., Bonnemoy, F., Gouet, P.: In vitro study of the proteolytic activity of rumen anaerobic fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* 110, 5-10 (1993)
- [68] Milewski, S., O'Donnell, R. W., Gooday, G. W.: Chemical modification studies of the active centre of *Candida albicans* chitinase and its inhibition by allosamidin. *J. Gen. Microbiol.* 138, 2545-2550 (1992)
- [69] Milne, A., Theodorou, M. K., Jordan, M. G. C., King-Spooner, C., Trinci, A. P. J.: Survival of anaerobic fungi in faeces, in saliva, and in pure culture. *Exp. Mycol.* 13, 27-37 (1989)
- [70] Morrissey, R. F., Dugan, E. P., Koths, J. S.: Chitinase production by an *Artrobacter* sp. lysing cells of *Fusarium roseum*. *Soil Biol. Biochem.* 8, 23-28 (1976)
- [71] Mountfort, D. O., Asher, R. A.: Production of α -amylase by the ruminal anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2293-2299 (1988)
- [72] Mountfort, D. O., Asher, R. A.: Production of xylanase by the ruminal anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1016-1022 (1989)
- [73] Mrázek, J.: Charakterizace anaerobních hub pomocí klasických a molekulárně genetických metod: Diplomová práce FPBT VŠCHT, ústav biochemie a mikrobiologie, 3-30 (2000)
- [74] Munn, E. A., Orpin, C. G., Greenwood, C. A.: The ultrastructure and possible relationships of four obligate anaerobic chytridiomycete fungi from the rumen of sheep. *BioSystems* 21, 67-82 (1988)
- [75] Munn, E. A., Orpin, C. G., Greenwood, C. A.: The relationship of the obligate anaerobic fungi of the rumen. *Biosystems* 22, 67-81 (1988)

- [76] Munn, E. A.: The ultrastructure of anaerobic fungi, v knize *Anaerobic fungi: Biology, Ecology and Function*, (Mountford, D. E., Orpin, C. G. eds.) Marcel Dekker, New York, 47-106 (1994)
- [77] Müller, M.: The hydrogenosome, v knize *The eukaryotic microbial cell*, (Gooday, G. W., Lloyd, D., Trinci, A. P. J. eds.) Cambridge University Press, Cambridge, 127-142 (1980)
- [78] Novozámská, K.: Isolation of an anaerobic cellulolytic fungus from the sheep rumen. *Folia Microbiol.* 32, 519 (1987)
- [79] Novozámská, K. MVDr.: Úvod do studia bachorových hub: Práce kandidátského minima, Československá akademie věd, Ústav fyziologie a genetiky hospodářských zvířat (1988)
- [80] Novozámská, K. MVDr.: Studium bachorových hub: Kandidátská disertační práce, Československá akademie věd, 1-18 (1989)
- [81] Nuero, O. M.: Production of Chitinase by *Fusarium* Species. *Current Microbiology* 30, 287-289 (1995)
- [82] O'Fallon, J. V., Wright, R. W., Calza, R. E.: Glucose metabolic pathway in the anaerobic rumen fungus *Neocallimastix frontalis* EB 188. *Biochem J.* 274, 595-599 (1991)
- [83] Orpin, C.G.: The rumen flagellate *Callimastix frontalis*: does sequestration occur?. *J. Gen. Microbiol.* 84, 395-398 (1974)
- [84] Orpin, C. G.: Studies on the rumen flagellate *Neocallimastix frontalis*. *J. Gen. Microbiol.* 91, 249-262 (1975)
- [85] Orpin, C. G.: Studies on the rumen flagellate *Sphaeromonas communis*. *J. Gen. Microbiol.* 94, 270-280 (1976)
- [86] Orpin, C. G.: The rumen flagellate *Piromonas communis*: its life-history and invasion of plant material in the rumen. *J. Gen. Microbiol.* 99, 107-117 (1977)
- [87] Orpin, C. G.: On the induction of zoosporogenesis in the rumen phycomycetes *Neocallimastix frontalis*, *Piromonas communis* and *Sphaeromonas communis*. *J. Gen. Microbiol.* 101, 181-189 (1977)
- [88] Orpin, C. G.: The occurrence of chitin in the cell walls of the rumen organism *Neocallimastix frontalis*, *Piromonas communis* and *Sphaeromonas communis*. *J. Gen. Microbiol.* 99, 215-218 (1977)
- [89] Orpin, C. G., Bountiff, L.: Zoospore chemotaxis in the rumen phycomycete *Neocallimastix frontalis*. *J. Gen. Microbiol.* 101, 113-122 (1978)

- [90] Orpin, C. G.: The role of ciliate protozoa and fungi in the rumen digestion of plant cell walls. *Ani. Feed. Sci. Technol.* 10, 121-143 (1983/84)
- [91] Orpin, C. G., Greenwood, Y.: Effects of haems and related compounds on growth and zoosporogenesis of the rumen phycomycete *Neocallimastix frontalis* H8. *J. Gen. Microbiol.* 132, 2179-2185 (1986)
- [92] Orpin, C. G., Munn, E. A.: *Neocallimastix patriciarum* sp. nov., a new member of the Neocallimasticaceae inhabiting the rumen of sheep. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 86, 178-181 (1986)
- [93] Orpin, C. G., Joblin, K. N.: The rumen anaerobic fungi. In *The Rumen Microbial Ecosystem*, ed. P. N. Hobson. Elsevier Applied Science, London, 129-150 (1988)
- [94] Ozkose, E., Thomas, B. J., Davies, D.R., Griffith, G. W., Theodorou, M. K.: *Cyllamyces aberensis* gen.nov. sp.nov., a new anaerobic gut fungus with branched sporangiophores isolated from cattle. *Can. J. Bot.* 79, 666-673 (2001)
- [95] Pearce, P. D., Bauchop, T.: Glycosidases of the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* grown on cellulosic substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 1265-1269 (1985)
- [96] Phillips, M. W., Gordon, G. L. R.: Sugar and polysaccharide fermentation by anaerobic fungi from Australia, Britain and New Zealand. *BioSystems* 21, 377-383 (1988)
- [97] Rast, D. M., Horsch, M.: A complex chitinolytic system in exponentially growing mycelium of *Mucor rouxi*: properties and function. *Journal of General Microbiology* 137, 2797-2810 (1991)
- [98] Robertus, J. D., Monzingo, A. F.: The structure and action of chitinases, v knize *Chitin and chitinases*, (Jollès, P., Muzzarelli, R. A. A.). Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland, 125-135 (1999)
- [99] Sahai, A. S., Manocha, M. S.: Chitinas of fungi and plants: their involment in morphogenesis and hostparasite interaction. *FEMS Mikrobiology Reviews* 11, 317-338 (1993)
- [100] Sakurada, M., Morgavi, D. P.: Chinolytic activity of the anaerobic rumen fungus *P. communis* OTS1. *Current Microbiology* 31, 206-209 (1995)
- [101] Sakurada, M., Morgavim D. P.: Purification and characteristics of cytosolic chitinase from *Piromyces communis* OTS. *FEMS Microbiology Letters* 137, 75-78 (1996)
- [102] Sakurada, M., Morgavim D. P.: Purification and characteristic of an Autolytic chitinase of *P.communis* OTS1 from culture medium. *Current Microbiology* 35, 48-51 (1997)

- [103] Sakurada, M., Morgavi, D. P.: Purification and characteristics of membrane bound chitinase of anaerobic ruminal fungus *P. communis* OTS1. *Current microbiology* 37, 60-63 (1998)
- [104] Souza, R. F., Gomes, R. C.: Purification and characterization of an endochitinase produced by *Colletotrichum gloeosporioides*. *FEMS Microbiology Letters* 222, 45-50 (2003)
- [105] Stanier, R. Y., Ingraham, J. L., Wheelis, M. L., Painter, P. R.: *General microbiology*, 5th edn. Macmillan Education, London (1987)
- [106] Steward, C. S., Flint, H. J., Bryant, M. P.: The rumen bacteria, v knize *The Rumen Microbial Ecosystem*, (Hobson, P. N., Steward, C. S. eds.) Blackie Academic & Professional, London, 17-30 (1997)
- [107] St. Leger, R., Cooper, R. M., Charnley, A. K.: Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: regulation of production of chitinolytic enzymes. *J. Gen. Microbiol.* 132, 1509-1517 (1986)
- [108] Teunissen, M. J., De Kort, G. V. M., Op Den Camp, H. J. M., Vogels, G. D.: Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes during growth of anaerobic fungi from ruminant and nonruminant herbivores on different substrates. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 39/40, 177-189 (1993)
- [109] Theodorou, M. K., Trinci, A. P. J.: Procedures for the isolation and culture of anaerobic fungi, v knize *The roles of protozoa and fungi in ruminant digestion*, (Nolan, J. V., Leng, R. A., Demeyer, D. I., eds) Penambul books, Armidale, New South Wales, 145-152 (1989)
- [110] Theodorou, M. K., Gill, M. K., King, Spooner, C., Beaver, D. E.: Enumeration of anaerobic chytridiomycetes as thallus forming units: a novel method for the quantification of fibrolytic fungal populations from the digestive tract ecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1073-1078 (1990)
- [111] Theodorou, M. K., Lowe, S. E., Trinci, A. P. J.: Anaerobic fungi and the rumen ecosystem, v knize *The fungal community: its organization and role in the ecosystem*, 2nd edn., (Carroll, G. C., Wicklow, D. T. eds.) Marcel Dekker, New York, 43-72 (1992)
- [112] Theodorou, M. K.: Biochemistry and Ecology of Anaerobic Fungi. *The Mycota VI*, 265-295 (1996)
- [113] Trinci, A. P. J., Davies, D. R., Gull, K., Lawrence, M. I., Nielsen, B. B., Rickers, A., Theodorou, M. K.: Anaerobic fungi in herbivorous animals. *Mycol. Res.* 98, 129-152 (1994)
- [114] Ulhoa, C. J., Peberdy, J. F.: Regulation of chitinase synthesis in *Trichoderma harzianum*. *J. Gen. Microbiol.* 137, 2163-2169 (1991)

- [115] Ulhoa, C. J., Peberdy, J. F.: Purification and some properties of the extracellular chitinase produced by *Trichoderma harzianum*. *Enzyme Microb. Technol.* 14, 236-240 (1992)
- [116] Ulhoa, C. J., Peberdy, J. F.: Effect of carbon sources on chitobiase production by *Trichoderma harzianum*. *Mycol. Res.* 97, 45-48 (1993)
- [117] Vasseur, V., Arigoni, F., Andersen, H., Defago, G., Bompeix, G., Seng, J.: Isolation and characterization of *Aphanocladium album* chitinase-overproducing mutants. *J. Gen. Microbiol.* 136, 2561-2567 (1990)
- [118] Volkin, D. B., Klivanov, A. M.: Minimizing protein inactivation, v knize *Protein function a practical approach*, (Creighton, T. E.) IRL Press, Oxford University Press, 1-24 (1989)
- [119] Wallace, R. J., Joblin, N. J.: Proteolytic activity of a rumen anaerobic fungus. *FEMS Microbiol. Lett.* 29, 19-25 (1985)
- [120] Warner, A. C. I.: Diurnal changes in the concentrations of microorganisms in the rumen of sheep fed limited diets once day. *J. Gen. Microbiol.* 45, 213-235 (1966)
- [121] Webb, J., Theodorou, M. K.: A rumen anaerobic fungus of the genus *Neocallimastix*: ultrastructure of the polyflagellate zoospore and young thallus. *BioSystems* 21, 393-401 (1988)
- [122] Webb, J., Theodorou, M. K.: *Neocallimastix hurleyensis* sp. nov., an anaerobic fungus from the ovine rumen. *Can. J. Bot.* 69, 1220-1224 (1991)
- [123] Williams, A. G., Orpin, C. G.: Polysaccharide-degrading enzymes formed by three species of anaerobic rumen fungi grown on a range of carbohydrate substrates. *Can. J. Microbiol.* 33, 418-426 (1987a)
- [124] Williams, A. G., Orpin, C. G.: Glycoside hydrolase enzymes present in the zoospore and vegetative growth stages of the rumen fungi *Neocallimastix patriciarum*, *Piromonas communis*, and an unidentified isolate grown on a range of carbohydrates. *Can. J. Microbiol.* 33, 427-434 (1987b)
- [125] Yanai, K., Takaya, N., Kojima, N., Horuchi, H., Ohta, A., Takagi, M.: Purification of two chitinases from *Rhizopus oligosporus* and isolation and sequencing of the encoding genes. *J. Bacteriol.* 174, 7398-7406 (1992)
- [126] Yarlett, N., Orpin, C. G., Munn, E. A., Yarlett N. C., Greenwood, C. A.: Hydrogenosomes in the rumen fungus *Neocallimastix patriciarum*. *Biochem. J.* 236, 359-364 (1986b)

Svoluji k zapůjčení této diplomové práce pro studijní účely a žádám, aby byla vedena řádně evidence vypůjčovatelů a ti byli upozorněni na to, že musí pramen převzatých údajů řádně citovat.