

Aminokyseliny produkované mikroorganismy a možnosti jejich stanovení

Eva Lorencová

Bakalářská práce



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

ABSTRAKT

V bakalářské práci byla sledována metabolická činnost u vybraných kmenů *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, který je významnou složkou mléčných kultur využívaných při výrobě kysaných výrobků a vysokodohříváných sýrů. Pozornost byla věnována využití a produkci aminokyselin. Byla provedena analýza složení supernatantu prostřednictvím automatického aminokyselinového analyzátoru, který je založen na metodě HPLC iontovýmnohou. Hodnocení bylo doplněno o shlukovou analýzu (Euklidovské vzdálenosti, průměr mezi skupinami).

Klíčová slova:

aminokyseliny, disimilace aminokyselin aerobní a anaerobní, biosyntéza aminokyselin, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*

ABSTRACT

In the bachelor thesis there was monitored a metabolism activity of chosen strains *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* which is the significant component of dairy cultures used for the manufacturing of fermented products and hard „cooked“ cheeses. The attention was devoted to the exploitation and production amino acids. There was effected the analysis of supernatants composition via automatic amino acid analyzer unit which is based on method HPLC by an ion exchanger. The evaluation was completed with the cluster analysis (Euclidean distance, the average between groups of microorganisms).

Keywords:

amino acid, dissimilation amino acids aerobic and anaerobic, biosynthesis amino acids, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav potravinářského inženýrství

akademický rok: 2007/2008

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Eva LORENCOVÁ**

Studijní program: **B 2901 Chemie a technologie potravin**

Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**

Téma práce: **Aminokyseliny produkované mikroorganismy
a možnosti jejich stanovení**

Zásady pro vypracování:

Teoretická část:

- 1. Zpracujte literární rešerši týkající se vlastností, chemické struktury a přirozeného výskytu aminokyselin.**
- 2. Charakterizujte mikroorganismy z hlediska využívání aminokyselin, zaměřte se na mikroorganismy vyžadující aminokyseliny v prostředí.**
- 3. Popište metody stanovení přítomnosti, popř. identifikace aminokyselin.**

Praktická část:

- 1. Provedte stanovení aminokyselin u vybraných kmenů bakterií.**
- 2. Na základě teoretické části a výsledků praktické části formulujte závěry o profilu aminokyselin u vybraných bakterií.**

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

- (1) Chemie potravin (1-3), Jan Velíšek, OSIS Tábor 2002
- (2) Potravinářská biochemie I., prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.; Ing. Daniela Kramářová, PhD.; FT, UTB Zlín 2005
- (3) Wikipedia: <http://cs.wikipedia.org/wiki>
- (4) Identifikace bakterií metodami instrumentální chemické analýzy, Jaroslav Julák, Nakladatelství UK, Praha 1998
- (5) Fyziologie bakterií, František Kaprálek, SPN Praha 1987
- (6) Obecná mikrobiologie, Mgr. Leona Čechová, PhD.; Mgr. Magda Janalíková, skripta FT UTB Zlín 2007
- (7) www.science.siu.edu/mikrobiology
- (8) Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie, Dana Göpfertová, Daniela Janovská, Jan Šejda, TRITON 2001
- (9) Fyziologie a biochemie bakterií, Karel Hodák, Univerzita Jana Evangelisty Purkyně, Fakulta přírodovědecká, Brno 1979.
- (10) Laboratorní techniky biochemie, Káš J., Kodíček M., Valentová O., VŠCHT Praha 2006

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Leona Buňková, Ph.D.

Ústav potravinářského inženýrství

Datum zadání bakalářské práce:

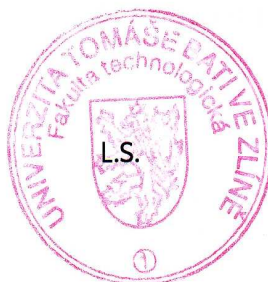
20. listopadu 2007

Termín odevzdání bakalářské práce:

31. května 2008

Ve Zlíně dne 12. května 2008


prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
děkan





prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
vedoucí katedry

Děkuji Mgr. Leoně Buňkové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky při realizaci mé bakalářské práce a za její pomoc při vyhodnocování výsledků praktické části mé práce.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem na bakalářské práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků, je-li to uvolněno na základě licenční smlouvy, budu uvedena jako spoluautorka.

Ve Zlíně



.....

Podpis diplomanta

OBSAH

ÚVOD	8
I TEORETICKÁ ČÁST	9
1 AMINOKYSELINY	10
1.1 CHEMICKÁ STRUKTURA ZÁKLADNÍCH AMINOKYSELIN A JEJICH VLASTNOSTI.....	10
1.1.1. Chemická struktura.....	10
1.1.2 Vlastnosti aminokyselin	14
1.2 PŘIROZENÝ VÝSKYT AMINOKYSELIN V PROSTŘEDÍ	14
2 VYUŽÍVÁNÍ AMINOKYSELIN MIKROORGANIZMY	16
2.1 VÝSKYT AMINOKYSELIN V BUŇKÁCH MIKROORGANIZMŮ.....	16
2.1.1 Strukturní proteiny jako zdroj aminokyselin.....	16
2.1.1.1 Struktura peptidoglykanu.....	16
2.1.1.2 Biosyntéza peptidoglykanu	17
2.1.2 Enzymy produkované mikroorganizmy jako zdroj aminokyselin.....	20
2.2 METABOLIZMUS AMINOKYSELIN	21
2.2.1 Disimilace bílkovin mikroorganizmy.....	21
2.2.1.1 Anaerobní disimilace (kvašení aminokyselin).....	21
2.2.1.2 Aerobní disimilace (oxidativní katabolizmus) aminokyselin	24
2.2.2 Biosyntéza aminokyselin.....	25
3 METODY STANOVENÍ AMINOKYSELIN	28
3.1 ZÁKLADNÍ OPERACE PŘI STANOVENÍ AMINOKYSELIN.....	28
3.2 IDENTIFIKACE AMINOKYSELIN	30
3.3 CHARAKTERISTIKA BAKTERIE <i>STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS</i>	33
II PRAKTICKÁ ČÁST	36
4 KULTIVAČNÍ PŮDY	37
4.1 M17 BROTH	37
4.1.1 Složení.....	37
4.1.2 Postup.....	37
5 ROZTOKY A OSTATNÍ CHEMIKÁLIE	38
6 POUŽITÉ METODY STANOVENÍ	39
6.1 PŘÍPRAVA VZORKŮ BAKTERIÍ <i>STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS</i>	39
6.2 CELKOVÉ STANOVENÍ DUSÍKU PODLE KJELDAHLA.....	39
6.3 KYSELÁ A OXIDATIVNÍ HYDROLÝZA	40
6.3.1 Kyselá hydrolýza	40
6.3.2 Oxidativní hydrolýza.....	40
6.4 STANOVENÍ AMINOKYSELIN POMOCÍ AAA 400	40
7 VÝSLEDKY	41
8 ZÁVĚR	50

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	51
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	53
SEZNAM OBRÁZKŮ	55
SEZNAM TABULEK.....	56

ÚVOD

Všudypřítomnost mikroorganismů a variabilita jejich životních projevů nám dává podněty pro bližší zkoumání metabolických procesů této nezastupitelné součásti okolního světa.

Biologické a biochemické pochody probíhající v mikroorganismech, jež vedou k výrobě organických látek, jsou častým středem zájmu odborné i laické veřejnosti.

Na mysli máme látky, které se vyznačují fyziologickými a technologickými funkcemi (např. aminokyseliny, sacharidy, lipidy a deriváty těchto biomolekul). V poslední době byly získány důležité poznatky právě při studiu aminokyselin, jichž se týká literární rešerše i praktická část této bakalářské práce.

Pozornost si zasluhují zvláště metabolické produkty, které mohou mít negativní vliv na zdraví člověka (např. biogenní aminy) a látky vynikající pozitivním účinkem, jež jsou využívány průmyslově (tvorba chuťových látek vznikající při fermentačních procesech).

V následujícím textu se budu věnovat aminokyselinám produkovaným mikroorganismy a možnostem, jak tyto výsledky biosyntetické či degradační činnosti identifikovat.

Cílem této bakalářské práce bylo zjistit preference využívání a produkce aminokyselin u vybraných kmenů *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (dále jen *Streptococcus thermophilus*).

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 AMINOKYSELINY

V přírodě se vyskytuje mnoho aminokyselin a vysokomolekulárních sloučenin, jejichž stavebními jednotkami jsou aminokyseliny. Ty jsou navzájem propojeny amidovou vazbou -CO-NH-, která je nazývána peptidovou. Podle velikosti molekul resp. počtu vázaných aminokyselin, se tyto sloučeniny dělí na dvě velké základní skupiny, kterými jsou:

- peptidy obsahující obvykle 2-100 monomerů,
- bílkoviny neboli proteiny, které obsahují více než 100, běžně několik set až několik tisíc, aminokyselin.

Rostliny a některé mikroorganismy jsou schopné syntetizovat bílkoviny ze základních substrátů jako je např. oxid uhličitý, voda a anorganické sloučeniny dusíku. Živočiškové jsou však odkázáni na příjem rostlinných nebo živočišných bílkovin potravou. V procesu trávení potravy se přijaté bílkoviny hydrolyzují na základní složky (aminokyseliny, případně další sloučeniny), ze kterých živočiškové syntetizují své vlastní specifické bílkoviny, nebo je stejně jako sacharidy a lipidy využívají jako zdroj energie. Ve výživě člověka jsou aminokyseliny nezastupitelné, neboť je není možné dlouhodobě nahrazovat jinými živinami. V přírodních materiálech bylo prokázáno asi 700 různých aminokyselin. Některé z nich jsou rozšířeny zcela obecně, jiné se vyskytují jen v určitých druzích rostlin, živočichů či v jiných organizmech [1].

1.1 Chemická struktura základních aminokyselin a jejich vlastnosti

1.1.1. Chemická struktura

Aminokyseliny jsou sloučeniny, v jejichž molekule je přítomna alespoň jedna primární aminoskupina -NH₂ a současně karboxylová skupina -COOH. Jsou tedy substituovanými karboxylovými kyselinami. Podle vzdálenosti aminoskupiny od karboxylové skupiny se obecně rozlišují:

- α -aminokyseliny (2-aminokyseliny), ϵ -aminokyseliny (6-aminokyseliny).
- β -aminokyseliny (3-aminokyseliny),
- γ -aminokyseliny (4-aminokyseliny),
- δ -aminokyseliny (5-aminokyseliny),

K aminokyselinám se řadí také karboxylové kyseliny obsahující v molekule sekundární aminoskupinu -NH-, která je součástí tří-, čtyř-, pěti- či šestičlenného cyklu. Jsou to vlastně deriváty nasycených dusíkatých heterocyklů aziridinu, azetidinu, azolidinu (pyrrolidinu) a azinanu (piperidinu), případně dalších dusíkatých i jiných heterocyklických sloučenin.

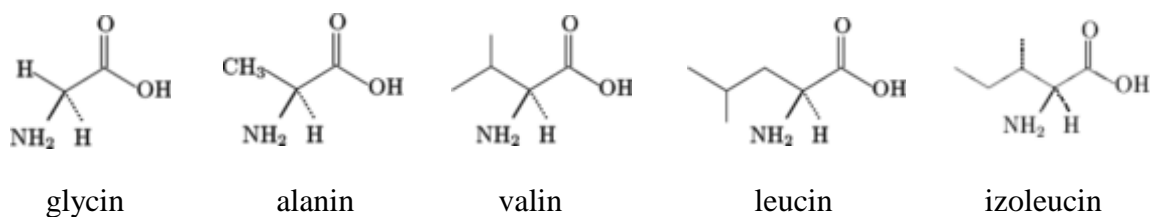
Základní aminokyseliny vázané ve všech bílkovinách jsou výhradně α -aminokyseliny, které mají primární, případně sekundární aminoskupinu na uhlíku sousedícím s karboxylovou skupinou. Tento uhlík v poloze 2 se běžně označuje jako uhlík C_{α} .

V bílkovinách většiny organismů se vyskytuje jen 21 základních aminokyselin, resp. 20 aminokyselin s primární aminoskupinou a jedna aminokyselina se sekundární skupinou. Tento počet byl dříve uváděn menší o jednu z aminokyselin, a to o selenocystein (derivát cysteinu). Všechny aminokyseliny s výjimkou glycinu jsou opticky aktivní (chirální) sloučeniny řady L [1], [2].

V biochemii se zmíněných 21 standardních L- α -aminokyselin označuje názvem kódované aminokyseliny. Pro jednotlivé kódované aminokyseliny existují specifické molekuly transferových RNA a bílkoviny každého organismu z nich vznikají jako produkty proteosyntézy řízené genetickým kódem. Základní aminokyseliny se nejčastěji označují triviálními názvy, které jsou odvozeny z jejich vlastnosti nebo z názvu zdroje, z něhož byly prvně izolovány. Každá klasifikace aminokyselin je do jisté míry nepřesná a vyhovuje jen určitým účelům. Nejrozšířenějším způsobem třídění 21 základních bílkovinných aminokyselin je klasifikace podle struktury postranního řetězce a v něm přítomných funkčních skupin [1], [2].

Takto se rozlišují následující skupiny aminokyselin (Obr. 1-8):

Alifatické aminokyseliny s nesubstituovaným postranním řetězcem, kam se řadí nejjednodušší aminokyselina glycin (Gly), alanin (Ala), dále valin (Val), leucin (Leu) a izoleucin (Ile).



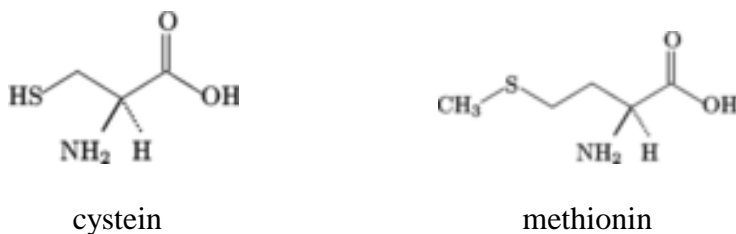
Obr. 1. Alifatické aminokyseliny nesubstituované

Alifatické hydroxyaminokyseliny, kam patří serin (Ser) a threonin (Thr).



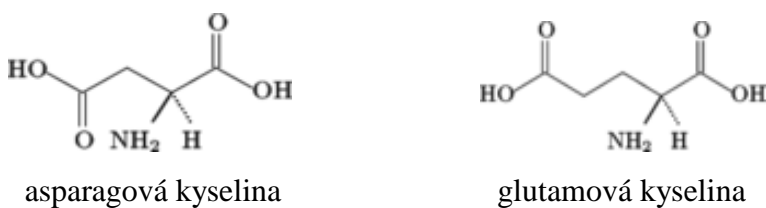
Obr. 2. Alifatické hydroxyaminokyseliny

Alifatické sírné aminokyseliny cystein (Cys), methionin (Met).



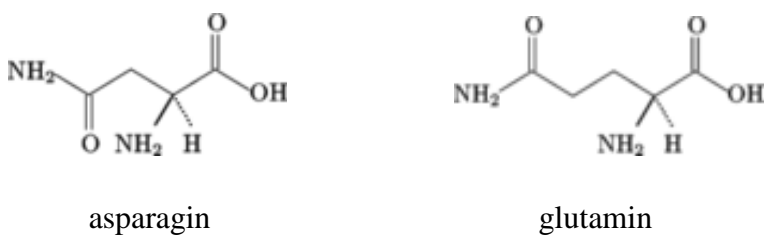
Obr. 3. Sírné aminokyseliny

Aminokyseliny s karboxylovou skupinou v postranním řetězci: asparagová kyselina (Asp) a glutamová kyselina (Glu).



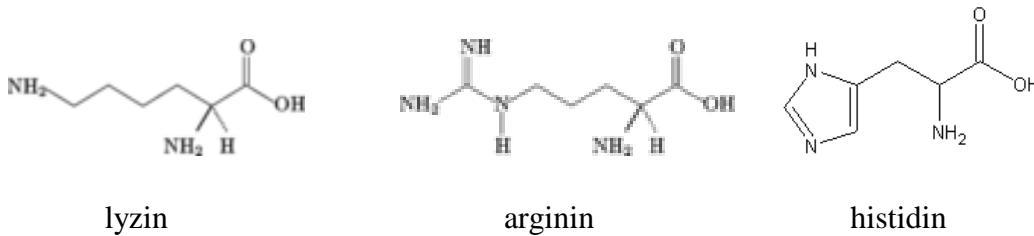
Obr. 4. Monoaminodikarboxylové aminokyseliny

Monoamidy aminokyselin s postranní karboxylovou: asparagin (Asn) a glutamin (Gln).



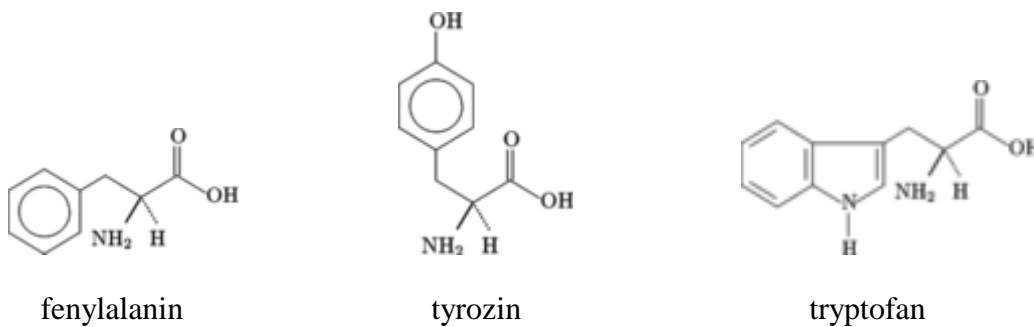
Obr. 5. Diaminomonokarboxylové kyseliny

Aminokyseliny s bazickými funkčními skupinami v postranním řetězci: diaminokarboxylová kyselina lyzin (Lys), dále arginin s guanidylovou skupinou v postranním řetězci (Arg) a derivát imidazolu histidin (His).



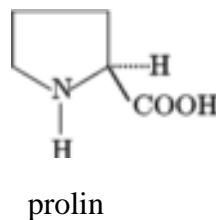
Obr. 6. Bazické aminokyseliny

Aminokyseliny s aromatickým heterocyklickým postranním řetězcem: fenylalanin (Phe), tyrozin (Tyr), tryptofan (Trp).



Obr. 7. Aromatické aminokyseliny

Prolin (Pro) je aminokyselinou, u které se funkční skupina účastní tvorby cyklu.



Obr. 8. Heterocyklická aminokyselina

Jako 21. aminokyselina se v poslední době uvádí selenocystein, ve kterém je atom síry nahrazen atomem selenu [1].

1.1.2 Vlastnosti aminokyselin

Ve fyziologickém rozmezí hodnot pH jsou α -karboxylové skupiny aminokyselin zpravidla plně disociovány a α -aminoskupiny protonizovány. Sloučeniny s těmito vlastnostmi se nazývají amfoterní nebo amfolyty. Tvoří tzv. vnitřní sůl. Jedná se o bipolární obojetný ion neboli amfion. Ten nese současně kladný i záporný elektrický náboj, takže je výsledný elektrický náboj molekuly nulový. Aminokyseliny jsou proto velmi polární, poměrně dobře rozpustné ve vodě a polárních rozpouštědlech (např. ethanol) a mají vysoké hodnoty dipólového momentu. Body tání aminokyselin jsou rovněž vysoké (200°C a více). Mírou kyselosti a bazicity funkčních skupin aminokyselin jsou příslušné disociační konstanty. Hodnota pH prostředí, v němž se vyskytuje maximální koncentrace amfiontu se nazývá izoelektrický bod (pI). Hodnotu pI lze vypočítat jako aritmetický průměr pK_1 a pK_2 ($pK_i = -\log K_i$) [1], [2].

1.2 Přirozený výskyt aminokyselin v prostředí

Některé kódované aminokyseliny mohou být v organismu člověka syntetizovány z jiných aminokyselin, z glukózy, případně z mastných kyselin a jiných sloučenin. Určité aminokyseliny však není člověk schopen syntetizovat vůbec a musí je získávat výhradně z potravy. Tyto aminokyseliny se nazývají esenciálními. U rychle rostoucích organismů (malých dětí) se stávají esenciálními aminokyselinami i některé neesenciální aminokyseliny, které mladý organismus není schopen v dostatečném množství syntetizovat. Tyto aminokyseliny se někdy nazývají semiesenciální (poloesenciální) aminokyseliny [1].

Podle významu ve výživě se kódované aminokyseliny dělí na:

- esenciální: valin, leucin, izoleucin, threonin, methionin, lyzin, fenylalanin a tryptofan,
- semiesenciální: arginin a histidin,
- neesenciální: ostatní aminokyseliny [1].

Kromě aminokyselin, které jsou složkami bílkovin, se v potravinách nacházejí mnohé další méně obvyklé přirozené aminokyseliny. Jsou často vázány v peptidech nebo přítomny jako volné aminokyseliny. Tyto nebílkovinné kyseliny biochemici řadí mezi tzv. sekundární metabolity, neboť se často jedná o produkty různých metabolických pochodů a prekurzory biosyntézy nebílkovinných a dusíkatých sloučenin. Některé z těchto aminokyselin mají

v organizmech také specifické funkce, působí kupříkladu jako nervové mediátory a hormony, jiné jsou toxickými látkami, které živočichové uplatňují před různými predátory, či slouží jako zásobní a transportní forma dusíku. Některé neobvyklé aminokyseliny rovněž vznikají sekundárně činností mikroorganismů a jako produkty chemické transformace bílkovin, nebo volných aminokyselin při skladování a zpracování potravin [1].

Nadbytečné aminokyseliny, které nejsou hned zabudovány do proteinů, nejsou skladovány, ale jsou zbaveny dusíku a rozloženy. Při svém katabolizmu poskytují uhlíkové kostry, které jsou dále zužitkovávány. Podle toho, do které metabolické dráhy vstupují a jaký může být jejich konečný produkt, se aminokyseliny dělí na aminokyseliny glukogenní, ketogenní a takové, které jsou glukogenní i ketogenní. Glukogenní aminokyseliny mohou být přeměněny na glykogen, ketogenní pak na tuk. V organismu neustále probíhá obnova proteinů a tedy i obměna jednotlivých aminokyselin. Vyšší živočichové ztratili schopnost tvořit některé aminokyseliny. Rostliny a bakterie mají stále schopnost tvořit tyto aminokyseliny, protože u nich nacházíme metabolické dráhy, které živočichům chybějí - například šikimátová cesta k syntéze rozvětvených aminokyselin [3], [4].

2 VYUŽÍVÁNÍ AMINOKYSELIN MIKROORGANIZMŮ

2.1 Výskyt aminokyselin v buňkách mikroorganismů

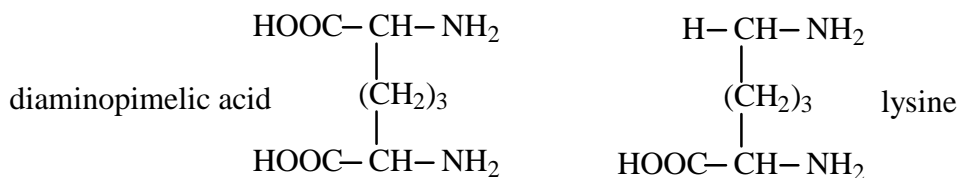
Složení, tj. výskyt a zastoupení běžných aminokyselin v bakteriálních proteinech, má jen omezený klasifikační význam. Naproti tomu velmi důležitým chemotoxonomickým znakem bakterií je složení aminokyselin ve stěnách. Bílkoviny tvořící podstatnou část bakteriální buňky zahrnují vedle strukturálních proteinů enzymy, cytochromy a další biologicky a imunologicky aktivní látky [4].

2.1.1 Strukturální proteiny jako zdroj aminokyselin

Buněčná stěna bakterií je struktura rozmanité stavby a různého stupně složitosti u různých bakterií. Vždy je základní složkou buněčné stěny lineární polysacharid s peptidickými postranními řetězci zvaný peptidoglykan. Mureinová síť plní funkci opěrné kostry buněčné stěny a podmiňuje její rigiditu [6].

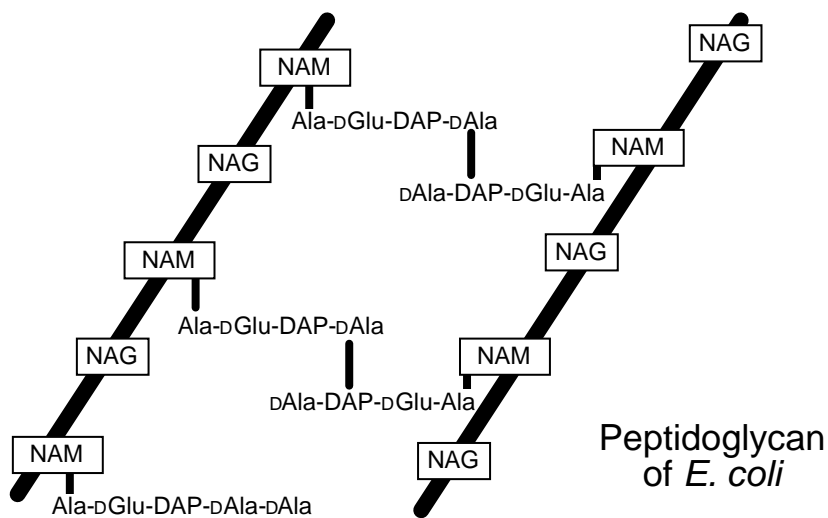
2.1.1.1 Struktura peptidoglykanu

Peptidoglykan je lineární polymer dvou střídajících se aminocukrů N-acetylglukózáminu a N-acetyl-muramové kyseliny. Paralelně položené řetězce polysacharidů jsou spojeny tetrapeptidy peptidovou vazbou přes karboxylovou skupinu kyseliny muramové. Typickou kombinací aminokyselin jsou v tetrapeptidu tyto aminokyseliny: L-alanin-D-glutamová kyselina-R-D-alanin, kde R je proměnná aminokyselina, nejčastěji L-lyzin, L,L-diaminopimelová kyselina (DAP, Obr. 9) nebo L-ornitin.



Obr. 9. Struktura kyseliny diaminopimelové a lyzinu

DAP se specificky vyskytuje jen v peptidoglykanu bakterií. Jednotlivé tetrapeptidové řetězky jsou mezi sebou propojeny (Obr. 10). Propojením lineárních řetězců se vytváří pevná několikavrstevnatá síťovitá struktura, která je pevnější u grampozitivních bakterií, kde jsou četnější propojení [7].



Obr. 10. Struktura peptidoglykanu bakterie *Escherichia coli* [8]

Podle typu vzájemného propojení řetězců se pak rozlišují dva základní typy peptidoglykanu: peptidoglykan A a B. U typu A je jeden řetězec spojen přes aminokyselinu na 3. pozici, nejčastěji přes DAP, L-lyzin a 8 dalších aminokyselin s terminálním D-alaninem druhého řetězce. Méně často se vyskytuje typ B, ve kterém je D-glutamová kyselina na 2. pozici jednoho řetězce propojena s D-alaninem druhého řetězce a to vždy přes můstek obsahující diaminokyselinu. Přítomnost D-aminokyselin je považována za charakteristický znak bakterií, využívaný při jejich stopové detekci [6].

2.1.1.2 Biosyntéza peptidoglykanu

Biosyntézu peptidoglykanu lze rozdělit na 3 hlavní etapy. Nejprve jsou v cytoplazmě přítomnými rozpuštěnými enzymy syntetizovány prekurzory. Prekurzory jsou pak přeneseny skrze membránu v tucích rozpustným přenašečem a posléze připojeny k peptidoglykanu tam, kde růst buněčné stěny probíhá [6]. Tento přenašeč lze označit jako baktoprenolfosfát (baktoprenol-P) [8].

Kroky biosyntézy peptidoglykanu:

- 1) Tvorba N-acetyl-glukózáminu (NAG) a N-acetyl-muramové kyseliny (NAM).
- 2) Aktivace cukerných podjednotek s uridintrifosfátem (UTP).
- 3) Vložení pentapeptidového řetězce do UDP-NAM.
- 4) Přenos UDP-NAM-pentapeptidu na baktoprenol-P.

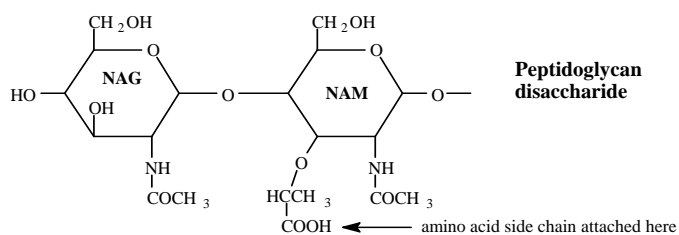
5) Vložení NAG.

6) Přenos disacharidické jednotky přes cytoplazmatickou membránu.

7) Propojování pentapeptidických řetězců.

Rozebereme-li si podrobněji začátek biosyntézy peptidoglykanu, je třeba konstatovat tyto skutečnosti: Prvotně dojde k působení nukleozidtrifosfátu a k aktivaci cukrů (k tzv. fosforylaci), čímž vznikají NDP-cukry (cukr + dusíkatá báze tj. adenin, tymin, guanin, uracil, cytozin), které fugují jako aktivační prekurzory biosyntézy.

Reakce obecně probíhá touto cestou : $\text{cukr-1-P} + \text{NTP} \rightarrow \text{NDP-cukr} + \text{PPi}$ [8]. Konkrétně N-acetylglukózamin-1-fosfát je aktivován UTP za vzniku UDP-N-acetylglukózáminu. Tím je připraven jeden ze dvou prekurzorů. Syntéza druhého prekurzoru pokračuje odtud dále tak, že molekula UDP-N-acetylglukózáminu reaguje s fosfoenolpyruvát, posléze redukován na laktyl, pomocí v biosyntézách obvyklého redukujícího agens NADPH_2 , za vzniku druhého stavebního kamene UDP-N-acetylmuramové kyseliny (Obr. 11). V dalším kroku jsou postupně přidávány aminokyseliny [6]. Adice pěti aminokyselin probíhá na karboxylovou skupinu třetího uhlíku strany řetězce, kde je navázána NAM. Každé napojení je řízeno vlastním enzymem a je při něm spotřebováváno ATP. DAP je vázána přes skupinu $\alpha\text{-NH}_2$ na $\gamma\text{-COOH}$ glutamátu. $\alpha\text{-COOH}$ této D-Glu je amidována v pozdějších krocích. Poslední probíhá konečná adice terminálního dipeptidu D-Ala-D-Ala, který je přidán na jednu [8].

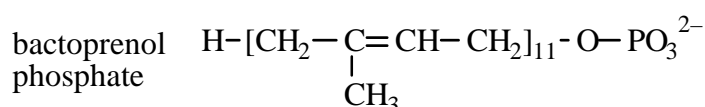


Obr. 11. Struktura UDP-N-acetylmuramové kyseliny [8]

Způsob tvorby peptidoglykanu je tedy principiálně odlišný od tvorby polypeptidů probíhající na ribozomech. Na ribozomech jsou bílkoviny syntetizovány podle informace v mRNA za spoluúčasti GTP (guanozintrifosfát) a tRNA molekul. Tento proces je také, na rozdíl od tvorby peptidoglykanu, necitlivý na specifické inhibitory proteosyntézy, jako je například chloramfenikol. Molekula UDP-N-acetylmuramové kyseliny s navázaným pentapeptidem tak reaguje s fosforylovaným polyizoprenoidním přenašečem [6]. Působením polyizopreno-

idního lipidového přenašeče (baktopenol-P, Obr. 12) dojde k přenosu ve vodě rozpustných prekurzorů přes lipidovou vrstvu cytoplazmatické membrány [8].

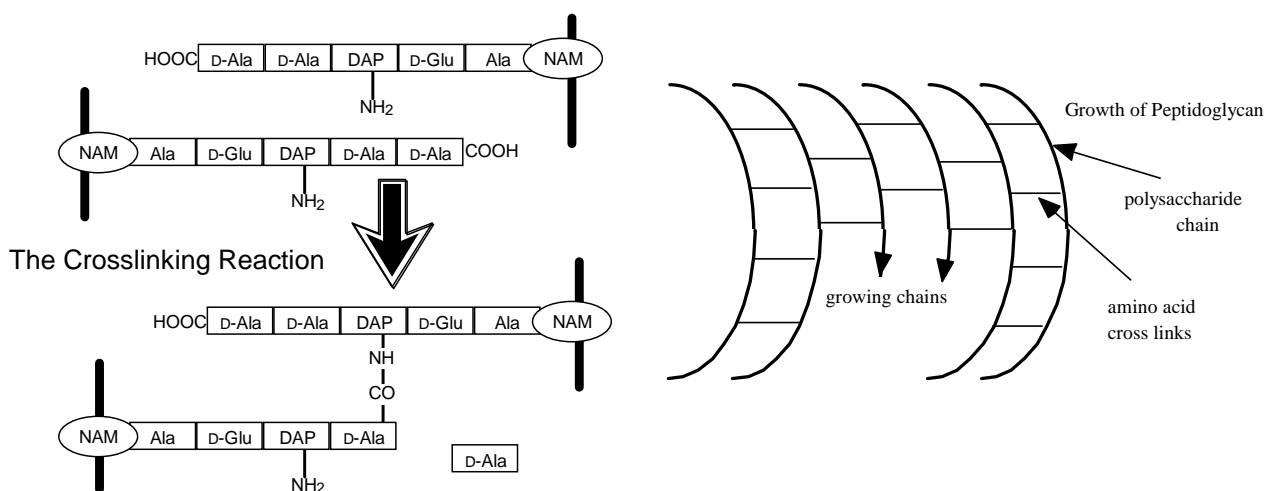
Na reakci je spotřebovávána energie ve formě UDP. Uvolněný UMP je fosforylován na UTP a může být znovu použit v novém cyklu. Na membráně dochází transglykozylační reakcí ke vzniku disacharidpentapeptidového derivátu difosfátu polyizoprenoidního alkoholu a ten je membránovým enzymem zapojen na volné místo v peptidoglykanové struktuře za uvolnění fosforylovaného přenašeče, který je k dispozici pro další cykly tohoto děje [6].



Obr. 12. Struktura baktopenolfosfátu

Tvorba peptidové vazby příčného propojení (Obr. 13) je posledním krokem v syntéze peptidoglykanu. Musí probíhat mimo membránu, v prostoru, kde není ATP. Enzym využívá energie uvolněné odštěpením posledního D-alaninu (hydrolyzou vazby v dipeptidu D-Ala-D-Ala) [8].

U rodu *Staphylococcus* je vnitřní D-alanin spojen pentaglycinovým můstkem aminokyselinovou stranou řetězce přes lyzin s druhou stranou řetězce. Tato propojení jsou velmi četná. V *Escherichia coli* je jen 50% pentapeptidových řetězců, které jsou propojeny [8]. Peptidoglykan roste difúzně po celém povrchu buňky. U grampozitivních bakterií bylo prokázáno, že se peptidoglykan rozrůstá především v ekvatoriální oblasti buňky, tj. tam, kde se bude při příštím dělení tvořit příčné septum [6].



Obr. 13. Poslední krok syntézy peptidoglykanu [8]

2.1.2 Enzymy produkované mikroorganismy jako zdroj aminokyselin

Metabolická činnost mikroorganismů ovlivňuje velkou měrou kvalitu (organoleptické vlastnosti, vzhled) a zdravotní nezávadnost potravin.

Mikrobiální rozklad potravin je enzymatickým procesem, jenž je založen na činnosti enzymů mikroorganismů a nikoli na enzymech přítomných ve tkáni. Při mikrobiologických rozkladných procesech vznikají nežádoucí, nepříjemně chutnající, páchnoucí a zdraví škodlivé zplodiny látkového metabolismu bakterií, plísní a kvasinek [9].

Mikrobiální rozklad se navenek projevuje různými způsoby (plesnivění, kvašení, hnití, tlení). Na rostliny a jejich plody, které slouží k lidské spotřebě, se již během růstu dostane mnoho mikroorganismů. Ty jsou přenášeny hmyzem, částicemi prachu, stykem se zemským povrchem či kontaktem s člověkem. U většiny z nich, dochází v kyselých potravinách k inhibici jejich růstu. Některé mikroorganismy, obzvláště bakterie mléčného kvašení, jsou ale proti nižšímu pH odolnější a mohou se množit i v kyselých potravinách. Na rozkladné činnosti se podílí celá řada mikrobiálních enzymů jako jsou proteázy, lipázy a sacharolytické enzymy. Další enzymy, např. reduktázy nebo dekarboxylázy, se mohou podílet na vzniku toxických látek. Mezi tyto látky patří např. biogenní aminy, které mohou indikovat procesy kažení potravin. Jmenovat lze histamin, který při špatném skladování dosahuje toxických hodnot a představuje zdravotní riziko. Tato skutečnost bude opět zmíněna v další části této práce, a to konkrétně v problematice metabolismů aminokyselin anaerobní disimilací [10].

Většina mikroorganismů rozkládá intracelulárními enzymy nízkomolekulární látky, které jsou transportovány do buňky různými mechanismy. Mnoho mikrobiálních buněk však produkuje také extracelulární enzymy, které jsou vylučovány do potravin a hydrolyzují velké molekuly na malé. Ty jsou pak transportovány do buňky. Extracelulární enzymy jsou většinou termostabilní a zachovávají si svou aktivitu i po tepelném ošetření potravin a představují potenciální nebezpečí jejich kažení [10].

Na druhou stranu se metabolismu činnosti mikroorganismů využívá k výrobě širokého sortimentu potravinových produktů, jako jsou kysané mléčné výrobky, sýry, fermentované uzeniny, nakládaná zelenina a kysané zelí. Identické mikroorganismy se uplatňují také v zemědělství při výrobě siláží. Jsou charakteristické tím, že rychle rozkládají cukry na organické kyseliny, především kyselinu mléčnou, a produkují nízkomolekulární látky jako dia-

cetyl a další, které po podílejí na vůni a chuti fermentovaných výrobků. Označují se jako startovací kultury [11].

Základní požadavky na startovací kultury jsou: produkce kyseliny mléčné, vznik senzoric-ky významných složek (diacetyl, acetaldehyd, volné těkavé mastné kyseliny), hydrolýza bílkovin a tuků, produkce biologicky významných složek (bakteriociny), potlačování pato-genních a technologicky nežádoucích mikroorganismů [11].

2.2 Metabolismus aminokyselin

2.2.1 Disimilace bílkovin mikroorganismy

Proces disimilace aminokyselin je uskutečňován bakteriemi, které mohou vytvářet proteo-lytické enzymy štěpící bílkovinnou molekulu až na monomerní podjednotky, aminokyseli-ny. Tvorba těchto enzymů je příznačná zejména pro bakteriální druhy rodu *Bacillus*, *Clostridium* a *Proteus*, mohou se však vyskytovat i u jiných bakterií. Proteolytické enzymy se podle způsobu účinku na polypeptidový řetězec dělí na exopeptidázy, atakující koncové články a endopeptidázy, které působí v místech podél peptidového řetězce. Účinkem obou enzymů je molekula bílkoviny štěpena přes oligopeptidy na volné aminokyseliny, které mohou být přijímány buňkou a jsou pak dále metabolizovány. V průběhu štěpení bílkovin je uvolňována energie, která může být zčásti kumulována v makroergických vazbách slou-čenin typu ATP a využívána k zajištění pochodu biosyntézy.

Původci procesů katabolizmu aminokyselin jsou různé anaerobní nebo fakultativně anaer-obní, sporulující i nesporulující bakterie. Základním rysem těchto procesů jsou deaminač-ní a dekarboxylační reakce, které mohou mít buďto reduktivní (anaerobní) nebo oxidativní (aerobní) charakter [12].

2.2.1.1 Anaerobní disimilace (kvašení aminokyselin)

Jako původci kvašení aminokyselin jsou označovány hlavně klostridia a anaerobní pepto-koky. Procesy deaminace zahrnují reduktivní reakce probíhající působením hydrogenáz za tvorby nasycených mastných kyselin a uvolňováním amoniaku. U některých aminokyselin může proběhnout tzv. denaturační deaminace, poskytující vedle amoniaku nenasycenou mastnou kyselinu. Do procesů anaerobní disimilace mohou vstupovat buďto jednotlivé aminokyseliny nebo dvojice aminokyselin, příp. mohou vzájemně reagovat aminokyseliny

s ketokyselinami [12]. S anaerobní disimilací aminokyselin se můžeme setkat i v pozitivním případě při produkci žádoucích látek bakteriemi mléčného kvašení. Ovšem i v tomto případě to není jednoznačné. Existují výjimky, kdy mohou dekarboxylačními reakcemi vznikat stejně nebezpečné a nechtěné látky, jako u klostridií. V následujícím textu bude u některých aminokyselin uváděn metabolismus bakterií mléčného kvašení vedle metabolismu nežádoucích mikroorganismů.

Z jednotlivých aminokyselin podléhá anaerobnímu rozkladu kyselina aspargová, arginin, histidin, kyselina glutamová, glycin, serin, methionin, threonin, tryptofan a lyzin.

Kyselina aspargová podléhá denaturační deaminaci na kyselinu fumarovou a amoniak. Reakce katalyzuje enzym aspartáza, vytvářená např. *Clostridium cadaveris* [12]. S totožnými produkty se lze setkat právě u bakterií mléčného kvašení. Fumarát může být následně přeměněn na sukcinát pomocí sukcinátdehydrogenázy nebo převeden na malát pomocí reakce katalyzované fumarázou. Redukce fumarázy na sukcinát může být u některých bakterií mléčného kvašení spojena s regenerací intracelulárního NAD^+ , který je pak využit pro degradaci sacharidů [13].

Arginin je v procesech reduktivní deaminace přeměňován druhy rodu *Mycoplasma* na citrulin, ornitin, karbamoylfosfát a amoniak. Karbamoylfosfát je dále štěpen na amoniak a oxid uhličitý za vzniku ATP. Až do vzniku ornitinu je arginin stejným způsobem přeměňován kmeny *Clostridium botulinum*, které jej pak dále rozkládají přes kyselinu valerovou na těkavé kyseliny (octovou, propionovou, máselnou) [12].

Existují dvě katabolické cesty metabolismu histidinu, které jsou popsány u bakterií mléčného kvašení a jsou katabolizovány amoniumlyázou a histidindekarboxylázou. Histidin amoniumlyáza katalyzuje první krok degradace, která vede ke glutamové kyselině. Histidindekarboxyláza katalyzuje přeměnu histidinu na histamin a CO_2 , proto se tomuto enzymu dostalo značné pozornosti. *Streptococcus thermophilus* využívá dva kroky katalyzované amoniumlyázou a urokanáthydratázou [13]. Histidin zkvašují kmeny *Clostridium tetanomorphum* přes kyselinu urokanovou a mezakonovou na formamid a kyselinu glutamovou, která je dále disimilována na kyselinu pyrohroznovou, octovou a amoniak. Kyselina pyrohroznová může být dále přeměňována na kyselinu máselnou [12].

Katabolismus glycinu u bakterií mléčného kvašení není doposud příliš prozkoumán. Užití glycinu za přítomnosti α -ketoglutarátu je uskutečňována kmeny *Lactococcus lactis* a *Lactobacillus casei* subsp. *paracasei*, kdy je na α -ketoglutarát pomocí enzymů amino-

transferáz přenášena aminoskupina glycinu [13]. Glycin slouží jako substrát pro anaerobní bakterie *Peptostreptococcus anaerobicus*, kterými je přeměňován na kyselinu octovou, amoniak a oxid uhličitý. Kvašení probíhá za účasti kyseliny tetrahydrolistové a pyridoxinu přes serin a kyselinu pyrohroznovou.

Methionin hraje hlavní roli ve vzájemné přeměně sirných aminokyselin. Bakterie mléčného kvašení jej přeměňují pomocí různých cest. Může být přeměněn na cystathion přes S-adenozylmethionin, čili spojováním methioninu a cysteinu, nebo se může jednat o deaminaci na α -oxo- γ -methylthiobutyrát a následovnou dethiomethylaci na methanthiol. Degradace methioninu na methanthiol je sledován kvůli chuťové složce, která je častá zvláště u sýrů [13]. Methionin zkvašuje také *Clostridium sporogenes*. Produkty kvašení jsou kyselina α -keto-máselná, methylmerkaptan a amoniak [12].

Anaerobní rozklad threoninu se může uskutečňovat za tvorby různých produktů [12]. Pomocí bakterií mléčného kvašení může být katabolizován na acetaldehyd, jako hlavní chuťovou komponentu jogurtů, nebo být deaminován na 2-oxobutanoát, který slouží jako prekurzor pro biosyntézu větvených aminokyselin [13]. Kmeny *Clostridium tetanomorphum* provádějí deaminaci threoninu účinkem dehydratázy na kyselinu α -ketomáselnou a amoniak. Za přítomnosti *Clostridium propionicum* je α -ketomáselná kyselina dále přeměňována na kyselinu propionovou, CO₂ a vodík [12].

Katabolismus tryptofanu probíhá za přítomnosti α -oxoglutarátu dehydrogenací, dekarboxylací a oxidativní dekarboxylací. Tryptofan, jako ostatní aromatické aminokyseliny, je degradován bakteriemi mléčného kvašené prostřednictvím transaminace nebo dekarboxylace. Transaminace vede k indolpyruvátu, fenylpyruvátu a p-hydroxyfenylpyruvátu. Tyto reakce katalyzují aromatické aminotransferázy. Oxidační dekarboxylací pak vznikají aldehydy, které mohou být redukovány na alkoholy pomocí dekarboxyláz [13]. Aminokyselina tryptofan je bakteriemi *Clostridium sporogenes* reduktivně deaminována na kyselinu indolylpropionovou a amoniak. Naproti tomu fakultativně anaerobní bakterie, jako například *Escherichia coli*, vytvářejí při deaminaci tryptofanu indol, kyselinu pyrohroznovou a amoniak. Tvorby indolu je využíváno v diagnostice bakterií. Přítomnost této látky se prokazuje pomocí dimethylbenzaldehydu, s nímž dává indol červené zbarvení vodík [12].

Mezi procesy anaerobní disimilace aminokyselin, jak jsem již uváděla v předešlém textu, patří též procesy dekarboxylace vedoucí k tvorbě aminů. Tyto reakce jsou příznačné zejména pro diaminokyseliny a jsou katalyzovány substrátově specifickými dekarboxylázami

vytvářenými zástupci rodů *Clostridium*, *Pseudomonas* a některými dalšími bakteriemi. Jako příklad lze uvést případ dekarboxylace lyzinu, ornitinu a agmatinu, které poskytují kadaverin, putrescin a agmatin [12]. Bakterie mléčného kvašení rovněž přeměňují arginin a ornitin na agmatin a konečnými produkty jsou putrescin, amoniak a CO₂ [13]. Obdobně vzniká histamin při dekarboxylaci histidinu [12], [13]. Dekarboxylázám, které se účastní metabolismu aromatických aminokyselin, se dostalo pozornosti zvláště kvůli tyraminu, který vzniká z tyrozinu. Tyramin je jedním z nejhojněji se vyskytujícím biogenním aminem ve fermentovaných výrobcích. S přijímáním potravin obsahující vyšší hladiny tyraminu a histaminu jsou spojovány toxikologické problémy [13].

2.2.1.2 Aerobní disimilace (oxidativní katabolizmus) aminokyselin

Mnohé aerobní a fakultativně anaerobní bakterie, zejména enterobakterie a druhy rodu *Pseudomonas*, mají schopnost využívat aminokyseliny jako zdroje uhlíku, dusíku a energie. Některé z nich disponují oxidázovými systémy s flavinovými koenzymy, které katalyzují oxidaci aminokyselin za tvorby peroxidu (např. rody druhu *Proteus*). Tento proces probíhá především u D-izomerů aminokyselin. L-izomery jsou většinou oxidovány v procesech oxidativní deaminace, která probíhá za vzniku ketokyselin a amoniaku. Vše je často spojeno s dekarboxylací a podléhá jí většina aminokyselin [12].

Cystein přechází účinkem cysteinsulhydratázy na kyselinu pyrohroznovou, amoniak a sirovodík. Zmíněný enzym byl nalezen u bakterií *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* a jiných [12].

L-lyzin je oxidativně přeměňován kmeny *Pseudomonas putida* až na CO₂ a vodu. Proces oxidace katalyzovaný oxygenázou probíhá přes aminoalderamid na kyselinu 5-aminovalerovou vznikající účinkem amidázy. Působením transaminázy je vytvořený semialdehyd kyseliny glutarové dehydrogenázou převáděn na kyselinu glutarovou, která je oxidována přes acyl-CoA na CO₂ a H₂O.

Valin, leucin a izoleucin podléhají aerobní oxidaci uskutečňované především druhy *Pseudomonas*, které přeměňují L-formy aminokyselin nejdříve působením transaminace na α -ketokyseliny, které přecházejí dekarboxylací za přítomnosti CoA na acyl-CoA. U D-formy probíhá v prvním stupni oxidativní deaminace účinkem dehydrogenáz na příslušné ketokyseliny. Acyl-CoA je dále postupně metabolizován, přičemž vzniká u valinu kyselina propi-

onová, u leucinu kyselina octová a acetoctová a u izoleucinu kyselina octová a propionová. Propionová může dále poskytovat kyselinu jantarovou [12].

Prolin je kmeny *Bacillus subtilis* přeměňován nejdříve na kyselinu pyrrolin-2-karbonovou, která přechází dále účinkem NAD-dehydrogenázy na kyselinu glutamovou. Hydroxyprolin slouží jako substrát pro *Pseudomonas fluorescens*. V průběhu katabolizmu je přeměňován přes pyrrolin-4-hydroxy-2-karbonovou kyselinu na 2-ketoglutarovou kyselinu.

Tryptofan oxidují různé druhy rodu *Pseudomonas* na kynurenin, poskytující alanin a kyselinu antranilovou, která je dále metabolizována sledem reakcí přes katechol [12].

2.2.2 Biosyntéza aminokyselin

Biosyntéza aminokyselin se uskutečňuje buďto přímou aminací nebo transaminací poměrně malého počtu výchozích sloučenin. Zdrojem dusíku pro amino- a iminoskupiny je u autotrofních bakterií dusík dodáván do prostředí v podobě amonných solí, případně vznikající při denitrifikaci nitrátů [12].

K výchozím substrátům patří:

- a) Kyselina α -ketoglutarová, z níž je odvozena kyselina glutamová, která pak dále poskytuje glutamin, arginin a prolin.
- b) Kyselina oxaloctová poskytující kyselinu asparagovou a z ní aspargin, methionin, threonin, lyzin a izoleucin.
- c) Kyselina pyrohroznová, která je přeměňována na alanin, valin a leucin.
- d) Kyselina fosfoglycerová, z níž vzniká serin, glycin, cystein.
- e) Kyselina fosfoenolpyrohroznová a erytrózofosfát, které jsou prekurzory biosyntézy fenyloalaninu, tyrozinu a tryptofanu.
- f) Imidazolylglycerofosfát z něhož vzniká histidin.

Kyselina glutamová vzniká přímou aminací α -ketoglutarové. Reakce probíhá pomocí glutamátdehydrogenázy, která se nalézá např. u *Escherichia coli* a *Enterobacter aerogenes*. Aminací glutamové kyseliny za přítomnosti ATP vzniká glutamin.

Arginin je vytvářen z kyseliny glutamové přes ornitin a citrulin. V první fázi procesu uskutečňované kmeny *Corynebacterium glutamicum* a *Escherichia coli* vzniká v přítomnosti acetyl-CoA a ATP nejdříve N-acetylglutamová kyselina, která je převáděna dehydrogená-

zou na semialdehyd. Přemění se transaminací na arginin. Tyto přeměny využívají také kmeny *Bacillus subtilis* [12].

Prolin je syntetizován z kyseliny glutamové přes její semialdehyd. Tvorba semialdehydu je spojena s fosforylací glutamové kyseliny za účasti ATP. Spontánní reakcí vzniká pak ze semialdehydu kyselina pyrolinkarbonová, která je dehydrogenázou převáděna na prolin. Reakce byla popsána u *Escherichia coli* a *Enterobacter aerogenes*.

Threonin, izoleucin a methionin jsou syntetizovány ze semialdehydu kyseliny asparagové přes homoserin. Po jeho vytvoření se proces rozděluje na dvě větve. Jedna z nich vede k tvorbě threoninu a dále izoleucinu. Ve druhé větvi kondenzuje homoserin s cysteinem na cystathion, který je disimilován na homocystein, kyselinu pyrohroznovou a amoniak.

Lyzin vzniká ze semialdehydu kyseliny asparagové přes kyselinu dihydropikolinovou a diaminopimelovou.

Alanin je vytvářen zástupci rodu *Bacillus* z kyseliny pyrohroznové za účasti alanindehydrogenázy [12].

Leucin a valin vznikají z kyseliny pyrohroznové přes kyselinu α -ketoizovalerovou. Valin vzniká transaminací kyseliny α -ketoizovalerové prostřednictvím kyseliny glutamové. Při biosyntéze leucinu dochází nejdříve ke kondenzaci kyseliny α -ketoizovalerové a octové na β -karboxy- β -hydroxyizokapronovou, která odnětím vody poskytuje izokaproylmaleinovou kyselinu.

Fenylalanin, tyrozin a tryptofan vznikají z aromatických sloučenin, jejichž prekurzorem je kyselina šikimová. Fosforylací kyseliny šikimové za účasti ATP a kondenzací s kyselinou fosfoenolpyrohroznovou je přes kyselinu chorizmovou vytvářena kyselina preferonová nebo kyselina antranilová. Z preferonové vzniká kyselina fenylpyrohroznová nebo hydroxyfenylhroznová. První z nich poskytuje transaminací za přítomnosti glutamové kyseliny fenylalanin, druhá tyrozin. Antranilová kyselina reaguje s fosforibozylpyrofosfátem za vzniku fosforibozylantranilové kyseliny. Její aminací za účasti serinu vzniká tryptofan. Přítomnost enzymů katalyzujících biosyntézu aromatických aminokyselin byla zjištěna u buněk *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella Thyphimurium*.

Histidin je vytvářen z imidazolglycerolfosfátu, který je meziproduktem přeměny fosforibozyl-ATP, vytvářeného kondenzační reakcí ATP a fosforibozylpyrofosfátem. U fosforibozyl-AMP dochází při další reakci k otevření purinového kruhu za vzniku substituovaného

ribonukleotidu. Rozštěpení kruhu katalyzuje cyklohydroláza. Po transaminaci glutaminem je ribonukleotid uvolněn a vzniká imidazolylglycerofosfát. Průběh této biosyntézy byl sledován u zástupců rodů *Salmonella* a *Neurospora* [12].

3 METODY STANOVENÍ AMINOKYSELIN

Obecně je problematika stanovení aminokyselin v peptidoglykanu velmi rozsáhlá a používá se v různých oborech biochemie (včetně klinické). Hlavní metodou je iontově výměnná chromatografie.

Peptidoglykan se izoluje odlišně u grampozitivních a gramnegativních bakterií. Postupy se liší též podle stupně čistoty preparátu. Izolace stěn z bakteriální biomasy zahrnuje nejprve inaktivaci enzymů zahřátím na 100 °C, delipidaci organickými rozpouštědly, disrupci buněk. Zbytky nukleových kyselin, membrán a cytoplazmatických membrán, se ze sedimentu odstraňují působením nukleáz a trypsinu. Při přípravě čistého peptidoglykanu se ze stěn dále extrahují polysacharidy (např. formamidem za horka, fenolem). V případě gramnegativních bakterií se po disrupci ještě fenolem extrahuje lipopolysacharid a působením pepsinu či trypsinu odstraňuje lipoprotein. Způsob hydrolýzy peptidů ovlivňuje výrazně výsledky stanovení. Jako standardní metoda je doporučována kyselá hydrolýza. Může však proběhnout i alkalická. Kyselou hydrolýzou dochází k totální destrukci tryptofanu a částečné destrukci threoninu, serinu a tyrozinu. Alkalická hydrolýza vede též k degradaci některých aminokyselin. Enzymatická hydrolýza je většinou neúplná a používá se k přípravě oligopeptidů při určování struktury [4].

3.1 Základní operace při stanovení aminokyselin

Postup stanovení aminokyselin

1) Nejprve je provedena homogenizace vzorku a rozrušení buněk. Při izolaci z buněk mikroorganismů nastává problém s buněčnou stěnou, která je velmi rezistentní a její narušení vyžaduje zvláštní úkony. K narušení buněčné stěny a membrány se u mikroorganismů používá např. působení chemických činidel (detergenty), působení enzymů, které štěpí polysacharidy buněčných stěn (lyzozym, celuláza), krátké působení ultrazvuku, opakované zmrazování a rozmrazování apod.. Přehled nejužívanějších technik je uveden v následující tabulce I [14].

Tabulka 1 Některé techniky používané pro dezintegraci mikrobiálních buněk. Metody jsou rozděleny do skupin podle intenzity působení [14].

Metoda	Příklad použití	Princip
Šetrné		
Působení enzymů	Bakterie	Štěpení buněčné stěny specifickými enzymy.
Působení chemikálií + autolýza	Extrakce kvasinek toluenem	Částečná solubilizace buněčné stěny + lytické enzymy.
Střední		
Mletí s abrazivy	Bakterie	Mechanické porušení buněk.
Intenzivní		
French press	Bakterie	Střížné síly, náhlá změna tlaku.
Ultrazvuk	Buněčné suspenze	Náhlé změny tlaku a teploty při zániku vznikajících mikrobublin.
Kulový mlýn	Buněčné suspenze	Mechanické porušení buněk rychlou vibrací skleněných kuliček.

2) Další možností je příprava acetonové sušiny, která probíhá homogenizací v desetinásobném objemu acetonu vychlazeném na -15 až -20 °C, pak se odstředí v chlazené odstředivce (případně se odsaje na Büchnerově nálevce v chladničce). Sedlina se promyje vychlazeným acetonem, znovu odstředí a rozprostře se na filtrační papír. Suší se za laboratorní teploty buď volně nebo v exsikátoru.

3) Extrakce buněk probíhá suspendací v hypotonickém roztoku. Buněčné membrány prasknou a proteiny se dostanou z cytoplazmy do roztoku [14].

4) V poslední fázi je nutné provést hydrolyzu proteinů ve vzorku. Rozeznáváme hydrolyzu kyselou, alkalickou či enzymatickou. Doporučována je hydrolyza kyselá. Uskutečníme ji zahříváním vzorku s 6M HCl při 110 °C po dobu 18 až 24 hodin [4].

Během hydrolyzy dochází k rozkladu tryptofanu a sirných aminokyselin. Asparagin se hydrolyzuje na asparagovou kyselinu a glutamin na glutamovou kyselinu za uvolnění amoniaku ve formě amonné soli. Rychlost rozkladu peptidických vazeb se liší podle struktury a druhu jednotlivých aminokyselin. Aminokyseliny uvolněné z peptidických vazeb mohou dále podléhat různým rozkladným reakcím. Pro stanovení přesných obsahů izoleucinu a valinu, které jsou obtížně uvolňovány ze svých peptidických vazeb, se musí použít hydrolyza po dobu 70 hodin, u threoninu a serinu podle různých autorů dochází ke ztrátám ve výši 3-16 %, u tyrozinu jsou uváděny ztráty kolem 1-14 %. Tyrozin může ještě být v přítomnosti oxidačních činidel oxidován nebo může přecházet na chloroderiváty [15].

3.2 Identifikace aminokyselin

Detekce aminokyselin se uskutečňuje pomocí chromatografie papírové, tenkovrstvé nebo chromatografie na iontoměniči.

Pro kvantitativní detekci aminokyselin v peptidoglykanu resp. stěnách buněk jsou výhodné rychlé a jednoduché metody jako je papírová chromatografie (PC) a tenkovrstvá chromatografie (TLC). PC je realizovaná na listu filtračního papíru s definovanými vlastnostmi. TLC by se dala popsat jako zvláštní uspořádání kapalinové chromatografie. Při TLC je sorbent rozprostřen na podložce do tenké vrstvy.

V současnosti je ovšem nejčastější analytickou metodou ve stanovení aminokyselin metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) na měničích iontů s postkolonovou derivatizací, která je používána v analyzátoch aminokyselin.

Příprava derivátů pro rychlejší a citlivější HPLC na obrácených fázích se provádí předkolonovými reakcemi. Vznikající deriváty mohou být stanoveny fluorimetricky respektive pomocí UV nebo elektrometrickým detektorem [14].

K separaci aminokyselin se používá především ionexů, kterých bylo využito již před 40 lety a v různých modifikacích se v automatických analyzátoch aminokyselin používají dodnes. Vlastní kvantifikace aminokyselin není možná bez derivatizace.

a) Derivatizace

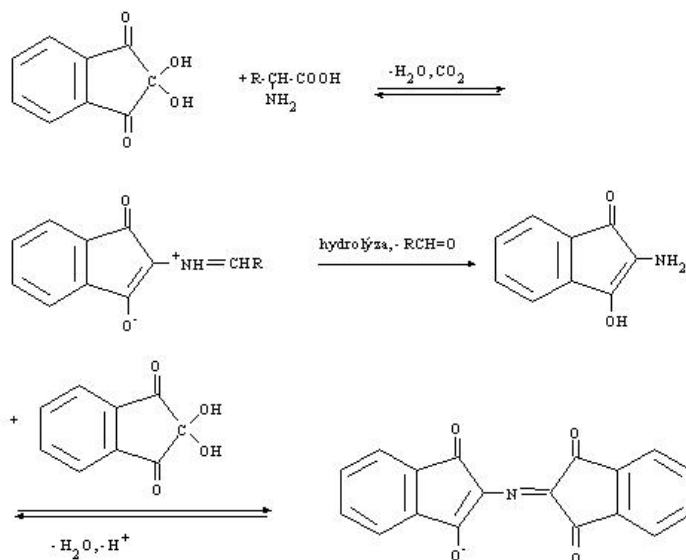
Předkolonová derivatizace aminokyselin je nejčastějším případem. Postkolonová derivatizace se uplatnila pouze u o-ftaldialdehydu a fluoreskaminu, ale vlivem zařazení reaktoru za analytickou kolonou dochází k rozšiřování chromatografické zóny a snížení účinnosti sepa-

race. Derivatizační činidla jsou: o-ftaldialdehyd (OPA), 9-fluorenylmethyloxykarbonylchlorid (FMOC-Cl), ninhydrin, danzylchlorid, 6-aminoquinolyl-N-hydroxysukcinimidyl karbamát (AQC), fenylizothiokyanát (PITC).

Reakce s OPA je poměrně rychlá a probíhá za laboratorní teploty. Uplatňuje se častěji při derivatizaci za kolonou. Výhodou OPA je, že sám nefluoreskuje, ale samotné deriváty s aminokyselinami mají vynikající fluorescenční výtěžky. Nevýhodou je, že reaguje pouze s primárními aminokyselinami a sekundární aminokyseliny jako prolin a hydroxyprolin tuto reakci neposkytují [15].

FMOC-Cl reaguje jak s primárními tak sekundárními aminokyselinami. Nevýhodou FMOC-Cl je, že se používá ve velkém nadbytku, který musí být odstraněn v následném extrakčním kroku pentanem nebo reakcí s hydrofobními aminy jako např. adamantamin nebo oktylamin.

Nejvhodnějším derivatizačním činidlem pro metodu HPLC při stanovení aminokyselin je ninhydrin, který jsme použili při našem stanovení aminokyselin u kmenů *Streptococcus thermophilus*. Reakční mechanismus ninhydrinu s aminokyselinami je poměrně složitý a je znázorněn na schématu (Obr. 14) [15].



Obr. 14. Reakční mechanismus ninhydrinu

Molekula aminokyseliny reaguje se dvěma molekulami ninhydrinu za vzniku tzv. Ruhemannova purpuru jehož maximum absorpance je při 570 nm. Sekundární aminokyseliny

jako prolin a hydroxyprolin poskytují poněkud odlišný komplex s maximem absorpance při 440 nm.

Použití danzylchloridu je jedna z nejstarších předkolonových derivatizačních technik. Danzylchlorid reaguje jak s primárními, tak sekundárními aminokyselinami. Má ovšem mnoho nedostatků mezi něž patří dlouhý reakční čas (2 až 60 minut), vysoká reakční teplota (60 až 100 °C) a tvorba multiderivátů u bazických aminokyselin [15].

AQC je jedno z nejnovějších derivatizačních činidel. AQC reaguje jak s primárními tak sekundárními aminokyselinami. Reakce obvykle probíhá pro aminy a aminokyseliny za laboratorní teploty. Tyrozin však poskytuje málo zastoupené pobočné deriváty, které za laboratorní teploty pomalu přesmykují na hlavní monoderivát. Nadbytek činidla se likviduje hydrolyzou samotného činidla za vzniku hlavního, málo interferujícího 6-aminochinolinu a N-hydroxysukcinimidu, který neinterferuje vůbec [15].

PITC se používá výhradně pro předkolonovou derivatizaci a následnou separaci derivátu aminokyselin na reverzní fázi s gradientovou elucí a detekcí UV při 254 nm. Nevýhodou je, že samotné činidlo reaguje s interferujícími látkami (reziduální kyseliny) ve vzorku a ty dávají interferující píky na chromatogramu (matrix effect). Proto se musí vzorek dvakrát odpařovat (před přidávkem činidla a po reakci se jeho nadbytkem). Odstraňuje se za vysokého vakua vysušením nad pevným NaOH [15].

b) Samotné HPLC

Pomocí této techniky (high performance, high pressure, ale i „high price“ liquid chromatography) může být analyzováno více než 80 % všech doposud popsanych chemických individuí, včetně biologicky významných molekul a látek [4].

Chromatografický systém zahrnuje tři základní prvky- mobilní fázi, složky vzorku a stacionární fázi. Mobilní fáze unáší složky vzorku ložiskem stacionární fáze. Pojmeme stacionární fáze se rozumí ta část chromatografického systému, která splňuje alespoň jednu z těchto vlastností:

- fyzikálně-chemicky adsorbuje (adsorpční chromatografie) nebo absorbuje (sorpční chromatografie) složky vzorku z mobilní fáze,
- na jejím povrchu může probíhat proces iontové výměny (chromatografie na iontoměničích),

- nebo má pórovitou strukturu, která umožňuje separaci složek vzorku na základě efektivních rozměrů jeho molekul (gelová chromatografie).

Kapalinový chromatograf se skládá z těchto částí:

- zařízení pro uchovávání a transport mobilní fáze (vysokotlaké čerpadlo),
- zařízení pro dávkování vzorku,
- zařízení pro separaci látek (chromatografická kolona, termostat kolony),
- zařízení pro detekci látek popř. sběrač frakcí [16].

Kapalinový chromatograf může mít samozřejmě řadu obměn, některé komponenty lze vyřadit nebo naopak přidat. Při izokratické eluci je mobilní fáze vedena ze zásobníku mobilní fáze do vysokotlakého čerpadla nebo při gradientové eluci se přiváděné proudy ze dvou, nebo více zásobníků mísí podle programu ve směšovači, který je zařazený před nebo za vysokotlakým čerpadlem. Odplynění mobilní fáze se provádí v odplyňovači. Dále je mobilní fáze vedena přes zařízení pro dávkování vzorku do chromatografické kolony, která je přímo spojena s detektorem, za něhož může být na výstupu zařazen ještě sběrač jednotlivých frakcí. Z detektoru je signál veden buď do integrátoru a zapisovače nebo dnes častěji do datové stanice s tiskárnou [16].

Rychlé metody stanovení aminokyselin v hydrolyzátech celých bakterií nebo stěn se obvykle kombinuje se stanovení cukrů, lipidů a dalších složek [5].

Stanovení aminokyselin bylo v praxi provedeno pomocí aminokyselinového analyzátoru. Postupy izolace jsou zvoleny tak, aby nedošlo k eliminaci jednotlivých aminokyselin a naopak došlo k jejich identifikaci ve vzorku *Streptococcus thermophilus*.

3.3 Charakteristika bakterie *Streptococcus thermophilus*

Čeleď *Streptococcaceae*

Čeleď *Streptococcaceae* zahrnuje rody *Lactococcus*, *Lactovum* a *Streptococcus*.

Buňky jsou kulovité nebo oválné, zřídka prodloužené do tyčinkovitého tvaru. Jsou sdružené v párech, krátkých nebo dlouhých řetězcích a tvoří tetrády. Jedná se o grampozitivní nepohyblivé, fakultativně anaerobní, kataláza negativní bakterie [17]. Neredukují dusičnany na dusitany. Vzhled kolonií jednoho druhu může být ovlivněn teplotou, zdrojem dusíku i jinými látkami. Přečází od formy drsné až po mukoidní. Hlubkové kolonie mají disko-

vitý tvar s různě utvářenými okraji. Růst v bujónu je rovněž vzhledově proměnlivý, nikdy však netvoří na povrchu blanku. Jedná se o mikroorganismy chemoorganotrofní, jejichž metabolismus je fermentatorní, z cukrů tvoří kyselinu mléčnou, octovou, mravenčí, etanol a CO₂. Všechny rody této čeledi mohou být nutričně náročné a proto vyžadují komplexní médium. Při rozlišování se posuzuje vztah ke krevnímu barvivu [18], [19].

Dále bude definován rod *Streptococcus* a konkrétně druh *Streptococcus thermophilus*, u jehož některých vybraných kmenů bylo v praktické části provedeno stanovení aminokyselin.

Rod *Streptococcus*

Buňky jsou sférické nebo ovoidní, vyskytující se ve dvojicích nebo v řetězcích, pokud rostou v tekutém médiu [17]. Většinou jsou nepohyblivé a tvoří spóry. Ve vztahu ke kyslíku fakultativně anaerobní. Některé druhy tvoří pouzdra. K růstu vyžadují nutričně bohatá média a někdy i 5% CO₂. Metabolismus je fermentatorní, produkují převážně laktát, ale ne plyn. Jedná se o kataláza negativní bakterie, které běžně rozkládají krvinky v krevním agaru, což má za následek nazelenalé zbarvení kolem kolonií na agaru (α -hemolýza), nebo úplné projasnění média (β -hemolýza). Velmi často jsou streptokoky děleny do čtyř skupin na pyogenní (β -hemolytické), orální, ostatní a anaerobní streptokoky. Druhově nejpočetnější je skupina orálních streptokoků [18], [19].

Tento rod zahrnuje jednak druhy, které působí negativně- jsou patogenní, saprofytické (vyskytující se na sliznicích dýchacího, zažívacího a pohlavního traktu a také na kůži, vyvolávající hnisavé infekce a septické onemocnění lidí i zvířat), a také druhy které jsou využívány v potravinářském průmyslu a mají jednoznačně pozitivní účinek. V mlékařském průmyslu jsou využívány streptokoky a koky, které byly ze skupiny streptokoků vyčleněny do samostatných rodů: *Streptococcus thermophilus* subsp. *salivarius*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (biovar diacetylactis), *Lactococcus lactis* subsp. *cremoisi*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* [19], [20].

Streptococcus thermophilus

Streptococcus thermophilus je hlavní mlékařská startovací kultura používaná při výrobě jogurtů a vysokodohříváných sýrů (eidam, ementál). Využívá se také jako součást smeta-

nového zákysu. Jedná se o termofilní bakterii mléčného kvašení a tradičně je kombinována s *Lactobacillus delbruneckii* subsp. *bulgaricus* nebo *Lactobacillus helveticus* [21].

Streptococcus thermophilus (dále *S. thermophilus*) zkvašuje glukózu, fruktózu, laktózu, sacharózu, zřídka rafinózu a arabinózu. Netvoří kyseliny z maltózy ani salicinu. Na syrovátkovém agaru s kvasničným autolyzátem a čínskou modří vytváří při 37°C za 2-3 dny drobné sytě modré kolonie se světlým mechovým okrajem. Kultivace tedy probíhá při optimální teplotě 37°C, po dobu minimálně 16 hodin, přičemž doporučená kultivační média jsou obnovené mléko a syrovátkový agar [20]. Nejvhodnější prostředí je mléko, kde tvoří pravotočivou kyselinu mléčnou [18].

Hlavní roli hraje tato bakterie právě v kysaných výrobcích, kde je důležitý moment konverze laktózy na laktát. Samozřejmě dochází k produkci dalších složek, které přispívají k chuti a typické textuře. *S. thermophilus* je vysoce adaptovatelný na laktózu jako zdroj uhlíku. Vedle kyseliny mléčné, hlavního produktu fermentace, se můžeme setkat s dalšími látkami nižší úrovně, které vznikly jejím odbouráváním a mají formu acetoinu, diacetylu, acetaldehydu a acetátu. *S. thermophilus*, podobně jako většina bakterií mléčného kvašení, vyžaduje pro růst exogenně dodávané aminokyseliny. Avšak se zdá, že je méně náročný než-li většina ostatních laktobacilů. Většinou vyžadují nejméně čtyři esenciální aminokyseliny. Více-násobné testy prokázaly, že u *S. thermophilus* může nedostatek glutamové kyseliny současně s glutaminem, či obou sirných aminokyselin cysteinu a methioninu kompletně narušit růst tím, že nejsou plně funkční biosyntetické cykly [21].

Katabolizmus aminokyselin hraje rovněž důležitou roli, a to nejen pro samotný metabolismus daného mikroorganismu (poskytování prekurzorů biosyntézy aminokyselin, nukleotidů, vitamínů, energie), ale i tvorbu rozličných aromasložek v kysaných mléčných produktech. Katabolizmus aminokyselin je většinou iniciován transaminačním krokem, který vyžaduje přítomnost α -ketokyseliny jako akceptoru aminoskupiny nutné k produkci α -ketokyselin. Katalýza je prováděna aminotransferázami (3 aspartátaminotransferázy, 1 aromatická aminotransferáza, 1 BCAA branch-chain-amino-acid aminotransferáza- pro aminokyseliny s rozvětveným řetězcem). *S. thermophilus* produkuje leucin, fenylalanin a deriváty methioninu. Obsahuje proteolytický systém, stejně jako ostatní bakterie mléčného kvašení a je složen z proteázy kotvené v buňce schopné hydrolýzy kaseinu, sestavu aminokyselin a peptidů transportujících systémů a konečně sestavu intracelulárních peptidáz dovolujících hydrolýzu peptidických derivátů kaseinu [21].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 KULTIVAČNÍ PŮDY

4.1 M17 Broth

Tento bujón je používán především pro izolaci a zjištění celkového počtu mikroorganismů mléčných streptokoků z jogurtů, startovacích kultur, nebo jiných mléčných výrobků.

4.1.1 Složení

Látky	[g/l]
Trypton	5.0 g
Sojový pepton	5.0 g
Beef Extract	5.0 g
Kvasničný Extrakt.....	2.5 g
Sulfid hořečnatý	0.25 g
Glycerolfosfát disodný.....	19.0 g

4.1.2 Postup

Do 950 ml destilované vody bylo naváženo a rozpuštěno 37,25 g přípravku. Po té proběhla sterilace v autoklávu po dobu 15 min. při 121°C. V závěru bylo přidáno 50ml 10% roztok laktózy. Bujón byl rozlit do zkumavek, kde probíhala kultivace mikroorganismů. Bakterie byly kultivovány při 37°C po dobu dvou dní.

5 ROZTOKY A OSTATNÍ CHEMIKÁLIE

fyziologický roztok

koncentrovaná kyselina sírová 96%

30% peroxid vodíku

30% roztok hydroxidu sodného

2% roztok kyseliny trihydrogenborité

pufr sodnocitrátový pH 2,2

85% kyselina mravenčí

kyselina chlorovodíková 6M

indikátor Tashiro

Příprava fyziologického roztoku

8,5 g chloridu sodného bylo rozpuštěno v 1000 ml destilované vody a sterilováno při 121°C po dobu 15 minut.

Příprava roztoku hydroxidu sodného

30 g granulovaného hydroxidu sodného bylo rozpuštěno ve 100 ml destilované vody za intenzivního míchání. Kádinka byla umístěna v lázni studené vody, aby byla snížena teplota uvolněná při této exotermní reakci.

Příprava roztoku kyseliny trihydrogenborité

Navážka 2 g kyseliny trihydrogenborité byla rozpuštěna ve 100 ml destilované vody.

6 POUŽITÉ METODY STANOVENÍ

6.1 Příprava vzorků bakterií *Streptococcus thermophilus*

V bujónu M17 byl kultivován mikroorganismus v termostatu při 37°C po dobu dvou dní.

Vzorek byl promyt fyziologickým roztokem, a to celkem dvakrát. Po centrifugaci byly získány tyto složky: supernatant (bujón) a buňky daného mikroorganismu. Buňky byly vysoušeny acetonem.

Dále bude pozornost zaměřena na aminokyselinové složení supernatantů u vybraných kmenů *Streptococcus thermophilus*.

6.2 Celkové stanovení dusíku podle Kjeldahla

Princip metody

Vzorek byl mineralizován varem v kyselině sírové. Dusíkaté látky v něm obsažené byly převedeny na amonné ionty (síran amonný), z nichž je po zalkalizování mineralizátu pomocí hydroxidu sodného uvolněn amoniak, který je po vydestilování v Parnas-Wagnerově přístroji s vodní parou jímán do kyseliny trihydrogenborité. Navázaný amoniak je pak stanoven titračně odměrným roztokem kyseliny sírové na indikátor Tashiro a přepočten na dusík.

Pracovní postup:

Vzorek byl navážen do mineralizační baňky. Ke vzorku byla v digestoři přidána koncentrovaná kyselina sírová (5 ml) a varné kamínky. Obsah baňky byl zahříván při 430 °C. Po 15 minutách bylo přidáno 5 ml 30% peroxidu vodíku a vzorek byl zahříván až do vyčerení roztoku. Po ochlazení byl obsah baňky kvantitativně převeden do odměrné baňky a po ochladnutí byl doplněn destilovanou vodou po rysku. Po temperaci a přesném doplnění byl mineralizát destilován na Parnas-Wagnerově přístroji. Do destilační baňky přístroje bylo odpipetováno 10 ml vzorku a bylo přidáno 20 ml 30% NaOH (čerstvě připraveného). Pod ústí chladiče byla postavena titrační baňka s 50 ml 2% H₃BO₃. Po opláchnutí nálevky vodou a po uzavření kohoutů byl uvolněný amoniak predestilován vodní parou (asi 15 minut od počátku varu v destilační baňce). Po skončení destilace byly do titrační baňky přidány 3-4 kapky indikátoru Tashiro. Obsah byl titrován 0,025 M H₂SO₄ do stálého červenofialového zbarvení.

6.3 Kyselá a oxidativní hydrolýza

Princip metody:

Vzorky supernatantů byly podrobeny kyselé a oxidativní hydrolýze. Byla provedena filtrace a následné odpaření na rotační odparce do husté sirupovité konzistence. Několikrát byly odparky promývány destilovanou vodou. Po odpaření byly kvantitativně převedeny do 10 ml odměrné baňky vymýváním pufrům (sodnocitrátový, pH 2,2). Pro sirné aminokyseliny byla provedena oxidativní hydrolýza, a to tak, že této kyselé hydrolýze předcházela oxidace vzorků pomocí oxidační směsi.

6.3.1 Kyselá hydrolýza

Do vialek byl navážen vzorek. K navážce supernatantu byl přidán 6M roztok kyseliny chlorovodíkové. Kyselá hydrolýza byla provedena při teplotě 115 °C po dobu 23 hodin.

6.3.2 Oxidativní hydrolýza

Vzorek byl navážen do baněk pro oxidativní hydrolýzu. K vzorku bylo přidáno 15 ml oxidativní směsi. Složení oxidativní směsi: 85% kyselina mravenčí a 30% peroxid vodíku v poměru 9:1. Oxidativní hydrolýza byla prováděna při teplotě 2 °C po dobu 16 hodin.

Po hydrolýze bylo provedeno stanovení aminokyselin na automatickém aminokyselinovém analyzátoru.

6.4 Stanovení aminokyselin pomocí AAA 400

Ke stanovení přítomnosti a obsahu aminokyselin byl použit automatický aminokyselinový analyzátor AAA 400 (Ingos, Praha). Analýza byla provedena iontovýměnnou chromatografií pomocí sodnocitrátových pufrů a ninhydrinové detekce.

7 VÝSLEDKY

Byl stanoven profil aminokyselin v bujónu po kultivaci u vybraných kmenů *Streptococcus thermophilus*. Výsledky jsou uváděny v následujících tabulkách (Tab. 2-5). Tyto kmeny byly získány z České sbírky mlékárenských mikroorganismů Lactoflora (CCDM). Zároveň byl sledován i obsah aminokyselin v kmenu získaném z České sbírky mikroorganismů (CCM).

Tabulka 2 Průměrný obsah aminokyseliny v g/16gN u vybraných kmenů bakterie *Streptococcus thermophilus* v supernatantu

Kmeny	CCDM7	CCDM33	CCDM45	CCDM55	CCDM69	CCDM70	CCDM126	CCDM128
Aminokyselina								
Cystein	0,83±0,120	0,80±0,070	0,76±0,077	0,95±0,142	1,10±0,095	0,76±0,058	0,89±0,096	0,88±0,089
Methionin	2,18±0,260	2,02±0,089	2,00±0,222	2,14±0,223	2,54±0,253	1,59±0,147	2,46±0,244	2,05±0,229
Asparagová kys.	7,08±0,310	6,61±0,156	6,87±0,886	6,72±0,405	6,96±0,297	6,68±0,306	6,97±0,227	7,01±0,234
Threonin	2,82±0,264	2,54±0,107	2,76±0,548	2,82±0,122	2,69±0,104	2,67±0,183	3,01±0,183	2,72±0,108
Serin	2,68±0,217	2,65±0,082	2,74±0,176	3,26±0,154	2,98±0,174	3,26±0,185	3,44±0,178	2,84±0,087
Glutamová kys.	14,17±0,640	12,92±0,365	13,80±1,934	12,13±0,610	14,07±0,622	12,98±0,596	12,73±0,552	14,03±0,589
Prolin	8,17±0,339	7,98±0,308	7,97±0,828	8,35±0,444	8,37±0,445	7,82±0,374	8,54±0,351	8,27±0,330
Glycin	6,15±0,244	6,24±0,252	5,73±0,508	6,63±0,345	6,13±0,248	6,41±0,214	6,74±0,254	6,02±0,201
Alanin	4,51±0,234	4,27±0,152	4,34±0,350	4,53±0,234	4,69±0,338	4,35±0,134	4,59±0,171	4,37±0,231
Valin	4,18±0,144	3,98±0,121	3,99±0,379	4,32±0,249	4,32±0,223	4,03±0,202	4,34±0,161	4,20±0,108
Izoleucin	3,09±0,158	2,93±0,102	2,87±0,249	3,31±0,202	3,16±0,186	3,08±0,143	3,28±0,119	3,11±0,070
Leucin	5,30±0,261	4,96±0,142	5,04±0,369	5,54±0,315	5,51±0,267	5,02±0,230	5,56±0,214	5,39±0,156
Tyrozin	1,60±0,221	1,15±0,066	1,56±0,115	1,54±0,188	1,63±0,151	1,38±0,101	1,56±0,173	1,53±0,215
Fenylalanin	3,07±0,154	3,08±0,117	2,92±0,224	3,15±0,169	3,23±0,185	2,97±0,108	3,19±0,137	3,09±0,120
Histidin	1,85±0,072	1,82±0,099	1,82±0,143	1,97±0,142	1,93±0,119	1,87±0,096	2,02±0,075	1,91±0,076
Lyzin	4,60±0,231	4,73±0,139	4,72±0,469	4,92±0,278	4,97±0,338	4,78±0,241	5,04±0,195	4,87±0,134
Arginin	4,38±0,128	2,11±0,118	2,21±0,164	4,27±0,238	2,33±0,165	4,66±0,427	4,72±0,230	4,69±0,238
Ornitin	0,00±0,000	2,49±0,086	2,29±0,100	0,19±0,017	2,66±0,210	0,17±0,014	0,17±0,011	0,18±0,034

Vyhodnocení obsahu aminokyselin v g/16gN (zastoupení aminokyselin)

Pozornost byla zaměřena na tři nejčastěji a tři nejméně zastoupené aminokyseliny (výsledky hodnoceny z Tab. 2 a Tab. 3). Vyjádření množství aminokyselin na 16gN je nutné pro srovnání zastoupení jednotlivých aminokyselin v proteinu resp. v dusíkatých látkách. Hodnota obsahuje korekci na rozdílné množství dusíkatých látek v materiálu.

Jako tři nejčastěji zastoupené aminokyseliny byly shledány: kyselina glutamová, prolin a kyselina asparagová.

1. Kyselina glutamová, jejíž hodnoty byly zjištěny v rozmezí 12,79-14,75 g/16gN. Největší zastoupení bylo sledováno u kmene CCDM130 a to v množství 15,02±1,324 g/16gN.

2. U prolinu byly zjištěny hodnoty od 7,82 do 8,97 g/16gN. Hodnotou $9,39 \pm 0,707$ g/16gN se vymykal kmen CCMD133.

Tabulka 3 Průměrný obsah aminokyseliny v g/16gN u vybraných kmenů bakterie *Streptococcus thermophilus* v supernatantu

Kmeny	CCDM129	CCDM130	CCDM131	CCDM133	CCDM224	CCDM437	CCDM438	CCM4757
Aminokyselina								
Cystein	0,79±0,097	1,02±0,098	0,84±0,037	0,90±0,066	0,88±0,051	0,92±0,059	1,10±0,066	1,00±0,061
Methionin	2,00±0,276	2,66±0,292	1,82±0,152	1,72±0,158	1,80±0,226	1,54±0,085	1,94±0,212	1,82±0,110
Asparagová kys.	6,47±0,396	7,47±0,565	6,98±0,403	7,38±0,506	6,96±0,486	7,03±0,412	7,45±0,538	7,64±0,418
Threonin	2,78±0,175	2,88±0,357	3,09±0,155	2,89±0,161	2,62±0,163	2,74±0,187	3,02±0,266	2,41±0,145
Serin	3,33±0,274	3,15±0,308	3,29±0,199	2,56±0,131	2,66±0,074	2,70±0,118	2,99±0,180	2,57±0,097
Glutamová kys.	13,30±0,999	15,02±1,324	12,77±0,772	14,75±0,774	14,03±0,661	14,37±0,518	14,55±0,797	14,59±0,985
Prolin	8,07±0,503	8,78±0,648	9,08±0,747	9,39±0,707	8,64±0,910	8,63±0,849	8,89±0,707	8,97±0,339
Glycin	6,44±0,304	6,46±0,394	6,61±0,367	5,75±0,329	5,74±0,218	5,89±0,128	6,97±0,487	6,04±0,156
Alanin	4,48±0,176	4,90±0,303	4,41±0,242	4,12±0,271	4,29±0,117	4,46±0,207	4,63±0,310	4,67±0,134
Valin	4,04±0,148	4,51±0,250	4,22±0,189	4,22±0,178	4,05±0,175	4,11±0,157	4,38±0,398	4,21±0,119
Izoleucin	3,05±0,120	3,34±0,171	3,14±0,162	3,02±0,141	2,92±0,098	2,96±0,073	3,14±0,238	3,06±0,101
Leucin	5,24±0,198	5,83±0,288	5,33±0,266	5,27±0,245	5,12±0,139	5,15±0,105	5,44±0,394	5,36±0,148
Tyrozín	1,61±0,076	1,83±0,146	1,59±0,151	1,59±0,134	1,61±0,044	1,60±0,078	1,01±0,092	1,61±0,058
Fenylalanin	3,10±0,133	3,46±0,139	3,08±0,180	2,51±0,175	3,03±0,117	3,01±0,108	2,82±0,137	3,26±0,102
Histidin	1,97±0,066	2,15±0,106	1,96±0,082	1,95±0,129	1,86±0,085	1,84±0,052	2,04±0,126	2,03±0,078
Lyzin	4,65±0,201	5,25±0,320	4,69±0,353	4,55±0,345	4,57±0,166	4,62±0,139	4,94±0,289	4,63±0,128
Arginin	4,19±0,243	2,52±0,248	4,25±0,296	2,19±0,156	2,15±0,087	2,17±0,047	2,26±0,169	2,31±0,170
Ornitin	0,24±0,046	2,90±0,151	0,22±0,031	2,44±0,142	2,55±0,150	2,55±0,100	2,75±0,298	0,22±0,052

3. Zastoupení asparagové kyseliny bylo zjištěno v rozmezí 6,61-7,08 g/16gN. Vyšší hodnoty zastoupení byly zaznamenány u tří kmenů: CCDM130 $7,47 \pm 0,565$ g/16gN, CCDM 133 $7,38 \pm 0,506$ g/16gN a CCDM438 $7,45 \pm 0,538$ g/16gN.

Naopak nejméně zastoupeny byly aminokyseliny cystein, tyrozín a methionin.

1. Výskyt cysteinu byl v rozmezí hodnot 0,76-0,92 g/16gN. Vyšší výsledky byly získány u kmenů: CCDM69 $1,10 \pm 0,095$ g/16gN, CCDM130 $1,02 \pm 0,098$ g/16gN a CCDM438 $1,10 \pm 0,066$ g/16gN.

2. Pro tyrozín byly zjištěny hodnoty v rozmezí hodnot 1,38-1,61 g/16gN. V tomto intervalu byly sledovány odchylky. Vyšší výsledky byly vyhodnoceny u CCDM130 $1,83 \pm 0,146$ g/16gN. Naopak nižší údaje byly zjištěny u kmenů: CCDM438 $1,01 \pm 0,092$ g/16gN a CCDM33 $1,15 \pm 0,066$ g/16gN.

3. Výskyt methioninu byl vyhodnocen v rozmezí 1,72-2,54 g/16gN. Opět byly zjištěny odchylky od tohoto rozmezí hodnot zastoupení, a to značné. Na základě zjištění, byly rozdě-

leny vybrané kmeny do dvou intervalů: a/ 1,54-1,94 g/16gN (CCDM131, CCDM133, CCDM224, CCDM437, CCDM438 a CCM4757), b/ 2,0-2,54 g/16gN (CCDM7, CCDM33, CCDM45, CCDM55, CCDM69, CCDM126, CCDM128 a CCDM129). Přičemž úplně odlišné hodnoty byly dosaženy kmenem CCDM130, nadměrně vysoké $2,66 \pm 0,292$ g/16gN.

Zastoupení ornitinu u jednotlivých kmenů velmi kolísá v rozmezí 0-2,9 g/16gN. U kmene CCDM7 nebyla v supernatantu zjištěna přítomnost ornitinu. Podobně jako tomu bylo i u dalších kmenů (CCDM55, CCDM70, CCDM126, CCDM128, CCDM131, CCM4757), kde byly zjištěny velmi nízké hodnoty. U kmene CCDM130 naopak dosahuje hodnot $2,90 \pm 0,151$ g/16gN. Pro arginin nastala podobná situace, jelikož se jeho hodnoty v g/16gN ve většině případů odlišovaly. Údaje se obecně pohybovaly okolo 2 a 4 g/16gN (velmi zaokrouhleně).

Obsah aminokyselin v supernatantu byl rovněž přepočten na g/kg supernatantu. Tyto výsledky uvádějí tabulky Tab. 4 a Tab. 5. Jedná se o přepočet hodnot zastoupení aminokyselin na množství hydrolyzovaného materiálu (hmotnost stanovené látky v hmotnosti supernatantu).

Tabulka 4 Průměrný obsah aminokyseliny v g/kg supernatantu u vybraných kmenů bakterie *Streptococcus thermophilus*

Kmeny	CCDM7	CCDM33	CCDM45	CCDM55	CCDM69	CCDM70	CCDM126	CCDM128
Aminokyselina								
Cystein	0,06±0,009	0,08±0,006	0,07±0,007	0,07±0,009	0,08±0,006	0,06±0,005	0,07±0,007	0,07±0,008
Methionin	0,16±0,019	0,19±0,007	0,18±0,018	0,16±0,012	0,18±0,016	0,13±0,016	0,20±0,018	0,17±0,020
Kys. Asparagová	0,49±0,018	0,63±0,016	0,54±0,053	0,52±0,030	0,53±0,076	0,57±0,062	0,59±0,024	0,59±0,014
Threonin	0,19±0,013	0,24±0,011	0,21±0,014	0,22±0,016	0,21±0,031	0,23±0,028	0,25±0,009	0,23±0,008
Serin	0,19±0,022	0,25±0,008	0,22±0,032	0,25±0,016	0,23±0,035	0,28±0,032	0,29±0,007	0,24±0,008
Kys. Glutamová	0,98±0,045	1,22±0,030	1,08±0,102	0,93±0,051	1,08±0,160	1,11±0,120	1,07±0,025	1,19±0,043
Prolin	0,56±0,031	0,76±0,031	0,63±0,069	0,64±0,036	0,64±0,103	0,67±0,073	0,72±0,014	0,70±0,021
Glycin	0,42±0,033	0,59±0,023	0,45±0,055	0,51±0,024	0,47±0,063	0,55±0,050	0,57±0,016	0,51±0,012
Alanin	0,31±0,029	0,40±0,016	0,34±0,044	0,35±0,017	0,36±0,053	0,37±0,030	0,39±0,012	0,37±0,014
Valin	0,29±0,020	0,38±0,012	0,31±0,036	0,33±0,017	0,33±0,050	0,34±0,038	0,37±0,011	0,36±0,007
Izoleucin	0,21±0,019	0,28±0,011	0,23±0,029	0,25±0,012	0,24±0,035	0,26±0,028	0,28±0,008	0,26±0,006
Leucin	0,37±0,033	0,47±0,015	0,40±0,056	0,43±0,021	0,42±0,059	0,43±0,046	0,47±0,011	0,46±0,010
Tyrozin	0,11±0,020	0,11±0,007	0,12±0,028	0,12±0,013	0,12±0,013	0,12±0,005	0,13±0,011	0,13±0,016
Fenylalanin	0,21±0,019	0,29±0,0012	0,23±0,033	0,24±0,010	0,25±0,040	0,25±0,024	0,27±0,006	0,26±0,008
Histidin	0,13±0,009	0,17±0,010	0,14±0,020	0,15±0,009	0,15±0,022	0,16±0,018	0,17±0,006	0,16±0,005
Lyzin	0,32±0,028	0,45±0,014	0,37±0,042	0,38±0,019	0,38±0,062	0,41±0,046	0,42±0,015	0,41±0,009
Arginin	0,30±0,019	0,20±0,010	0,17±0,028	0,33±0,019	0,18±0,026	0,40±0,061	0,40±0,018	0,40±0,022
Ornitin	0,00±0,000	0,24±0,007	0,21±0,01	0,01±0,001	0,20±0,040	0,01±0,001	0,01±0,001	0,02±0,003

Tabulka 5 Průměrný obsah aminokyseliny v g/kg supernatantu u vybraných kmenů bakterie *Streptococcus thermophilus*

Kmeny	CCDM129	CCDM130	CCDM131	CCDM133	CCDM224	CCDM437	CCDM438	CCM4757
Aminokyselina								
Cystein	0,07±0,001	0,07±0,001	0,07±0,003	0,08±0,006	0,07±0,001	0,07±0,003	0,07±0,003	0,07±0,002
Methionin	0,20±0,007	0,20±0,007	0,18±0,012	0,20±0,015	0,18±0,001	0,20±0,007	0,20±0,007	0,19±0,006
Kys. Asparagová	0,55±0,098	0,56±0,091	0,63±0,045	0,63±0,045	0,56±0,035	0,56±0,035	0,53±0,030	0,53±0,030
Threonin	0,21±0,035	0,21±0,030	0,25±0,021	0,25±0,021	0,23±0,007	0,23±0,006	0,21±0,030	0,21±0,017
Serin	0,25±0,041	0,26±0,036	0,27±0,019	0,27±0,019	0,24±0,025	0,24±0,018	0,22±0,009	0,22±0,009
Kys. Glutamová	1,06±0,182	1,08±0,164	1,23±0,115	1,23±0,115	1,14±0,071	1,14±0,071	1,03±0,073	1,03±0,073
Prolin	0,60±0,077	0,61±0,066	0,73±0,059	0,73±0,059	0,65±0,022	0,66±0,027	0,58±0,019	0,58±0,019
Glycin	0,49±0,068	0,50±0,062	0,54±0,040	0,54±0,059	0,49±0,026	0,49±0,027	0,46±0,016	0,46±0,016
Alanin	0,34±0,044	0,35±0,040	0,37±0,026	0,37±0,026	0,34±0,027	0,34±0,027	0,31±0,009	0,31±0,009
Valin	0,32±0,043	0,32±0,039	0,35±0,019	0,35±0,019	0,32±0,013	0,32±0,013	0,29±0,009	0,29±0,009
Izoleucin	0,25±0,034	0,25±0,032	0,27±0,017	0,27±0,017	0,24±0,012	0,24±0,012	0,22±0,009	0,22±0,009
Leucin	0,42±0,054	0,42±0,050	0,44±0,028	0,44±0,028	0,40±0,020	0,40±0,020	0,38±0,009	0,38±0,009
Tyrozín	0,13±0,015	0,13±0,013	0,14±0,015	0,14±0,015	0,13±0,009	0,13±0,009	0,12±0,001	0,12±0,001
Fenylalanin	0,25±0,020	0,25±0,022	0,25±0,020	0,25±0,020	0,24±0,019	0,24±0,019	0,22±0,010	0,22±0,010
Histidin	0,15±0,020	0,15±0,019	0,15±0,010	0,15±0,010	0,14±0,008	0,14±0,008	0,13±0,007	0,13±0,007
Lyzin	0,37±0,051	0,38±0,047	0,39±0,040	0,39±0,040	0,36±0,027	0,36±0,027	0,33±0,014	0,33±0,014
Arginin	0,34±0,060	0,34±0,055	0,36±0,027	0,36±0,027	0,33±0,023	0,33±0,023	0,30±0,010	0,30±0,010
Ornitin	0,02±0,002	0,01±0,002	0,02±0,002	0,02±0,002	0,01±0,001	0,01±0,001	0,02±0,001	0,02±0,001

Nejvyšší obsah aminokyselin v g/kg supernatantu byl pozorován:

1. U kyseliny glutamové v rozmezí hodnot 0,97-1,11 g/kg supernatantu. Údaj, který se to-
muto intervalu vymykal byl zaznamenán u kmene CCDM33 (1,22±0,030 g/kg).

2. Prolin, jehož hodnoty byly sledovány v rozmezí 0,59-0,72 g/kg supernatantu, vykazoval
odchyly u kmenů: vyšší hodnotu CCDM33 0,76±0,031g/kg, nižší hodnotu CCDM7
0,56±0,031 g/kg.

3. Pro asparagovou kyselinu byly získány výsledky obsahu této aminokyseliny v rozmezí
0,5-0,63 g/kg supernatantu. Kmeny CCDM7 a CCDM129 vykazovaly rozdíly. Obsah aspa-
ragové kyseliny byl u nich nižší (CCDM7 0,49±0,018 g/kg, CCDM129 0,47±0,040 g/kg).

Nejnižší obsah byl zjištěn u těchto tří aminokyselin:

1. Pro cystein byly zjištěny výsledky v rozsahu hodnot od 0,06-0,08 g/kg supernatantu.
Hodnoty, které by se vymykalý tomuto rozmezí nebyly sledovány.

2. U tyrozinu byly vyhodnoceny výsledky, které zahrnovaly hodnoty obsahu aminokyseliny
od 0,11 do 0,13 g/kg supernatantu. Jediný výrazně se odlišující údaj byl zjištěn u kmene
CCDM438, jehož hodnota byla o mnoho nižší, a to 0,07±0,0053 g/kg.

3. Pro methionin byly získány výsledky obsahu v rozmezí 0,11-0,22 g/kg supernatantu.

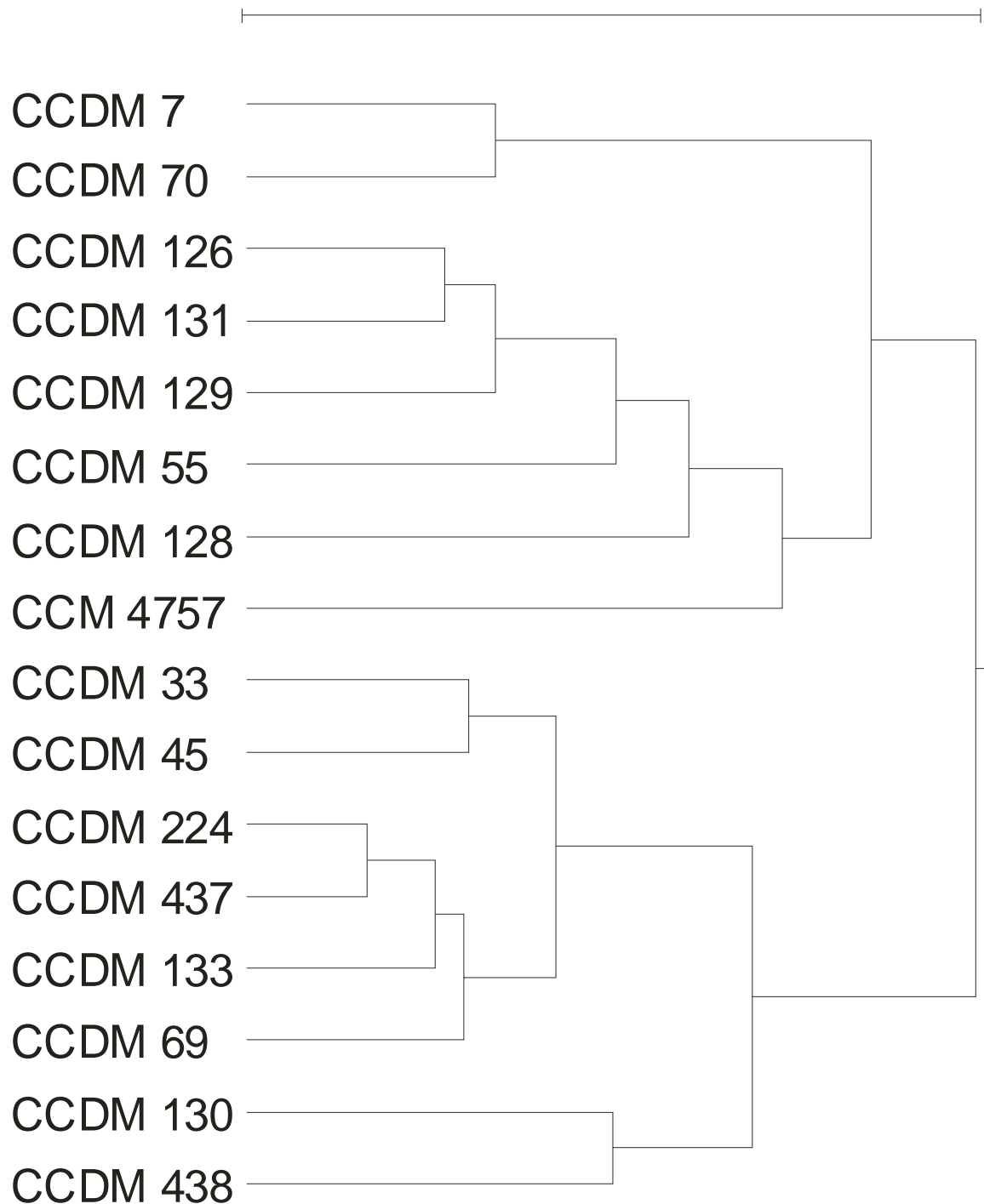
Největší výkyvy v naměřených hodnotách byly pozorovány u aminokyselin argininu a ornitinu. Arginin vykazoval hodnoty v rozmezí 0,15-0,40 g/kg. Opět lze provést rozdělení do užších intervalů: a/ 0,15-0,20 g/kg, který byl zastoupen osmi kmeny (CCDM33, CCDM45, CCDM69, CCDM130, CCDM133, CCDM224, CCDM437, CCDM438),

b/ 0,30-0,33 g/kg, v jehož rozsahu hodnot byly zahrnuty hodnoty čtyř kmenů (CCDM7, CCDM55, CCDM129, CCDM131), c/ 0,40 g/kg - tato skupina byla představována třemi kmeny (CCDM70, CCDM126 a CCDM128).

U ornitinu nastala podobná situace. Pro kmen CCDM7 byly hodnoty ornitinu opět nulové. Nejvyšší produkce ornitinu byla sledována u kmene CCDM33, a to 0,24 g/kg. Rozmezí, ve kterém byl ornitin obsažen, se tedy pohybovalo od 0 do 0,24 g/kg supernatantu. Stejně jako u argininu, lze obsah této aminokyseliny rozdělit do menších intervalů. Pro ornitin stačí tyto dvě rozmezí hodnot (rozdíly jsou větší): a/ 0,01–0,02 g/kg, v jehož rozsahu hodnot bylo zahrnuto sedm kmenů (CCDM55, CCDM70, CCDM126, CCDM128, CCDM129, CCDM131, CCM4757), b/ 0,18-0,21 g/kg, tento interval byl reprezentován sedmi kmeny (CCDM45, CCDM69, CCDM130, CCDM133, CCDM224, CCDM437, CCDM438).

Shluková analýza

Vzdálenost



Obr. 15. Dendrogram shlukové analýzy (Euklidovské vzdálenosti, průměr mezi skupinami)

Vyhodnocení dendrogramu shlukové analýzy

Byla provedena shluková analýza (Euklidovské vzdálenosti, průměr mezi skupinami), a to prostřednictvím programu Unistat, v. 5.5. Prvním kritériem, které bylo při shlukové analýze zohledňováno, byla přítomnost určité aminokyseliny. Druhým kritériem pak bylo množství jednotlivých aminokyselin. Nejvýraznější odlišnosti v hodnotách byly pozorovány v množství ornitinu. Shluková analýza byla provedena u kmenů CCDM (Sbírka kultur mlékařských mikroorganismů Lactoflora) a u jednoho kmene z CCM (Česká sbírka mikroorganismů), který plní srovnávací funkci.

Z obrázku Obr. 15 je patrné, že se vytvořily dvě velké skupiny. Vybrané kmeny byly rozděleny na ty, které:

1. produkují ornitin (CCDM33, CCDM45, CCDM224, CCDM437, CCDM133, CCDM69, CCDM130, CCDM438),
2. neprodukují ornitin a nebo ho produkují, ale jen ve velmi malé míře (CCDM7, CCDM70, CCDM126, CCDM131, CCDM129, CCDM55, CCDM128, CCM4757).

Kmeny produkující ornitin byly dále rozděleny do dvou podskupin. Jedna podskupina byla tvořena kmeny CCDM224, CCDM437, u nichž byly zaznamenány téměř stejné a zároveň nejvyšší hodnoty ornitinu. Druhá nejproduktivnější skupina první podskupiny byla představována kmeny CCDM33 a CCDM45, u nichž byla shledána téměř stejná produkce ornitinu. Poslední kmeny reprezentující tuto podskupinu byly CCDM133 a CCDM69. Další podskupina byla tvořena kmeny CCDM130 a CCDM438, u kterých byly konstatovány opět téměř shodné hodnoty v produkci ornitinu.

Skupina neprodukující nebo téměř neprodukující ornitin je představována dvěmi podskupinami. Kmeny CCDM7 a CCDM70 formují první podskupinu, u které se setkáváme se situací, že CCDM7 netvoří ornitin vůbec a CCDM70 jen v zanedbatelném množství- jejich hodnoty jsou přibližně stejné. Druhá nejrozsaáhlejší a nejroznorodější skupina je reprezentována kmeny CCDM126 a CCDM131, vzájemně podobnými. U CCDM129, CCDM55 a CCDM128 je shoda s předešlými kmeny malá. U jediného kmene z České sbírky mikroorganismů CCM4757 bylo z dendrogramu patrné, že se odlišoval od ostatních kmenů streptokoků. Tato skupina je různorodá a příbuznost jednotlivých kmenů na základě podobnosti shody produkce ornitinu není taková jako v první skupině. Jsou zde zřetelnější rozdíly. Nejpodobnější jsou si kmeny CCDM7, CCDM70 a CCDM129.

DISKUZE

Pokud porovnáme zastoupení těchto aminokyselin (g/16gN) s obsahem aminokyselin (g/kg) v supernatantu, je zřejmé, že nastala shoda ve výčtu aminokyselin, které vykazovaly jak nejvyšší, tak i ty nejnižší hodnoty. Nejvíce zastoupenými aminokyselinami a zároveň těmi, které byly v největším množství obsaženy v supernatantu jsou kyselina glutamová, prolin a kyselina asparagová. Důvodem vyšších hodnot obsahů kyseliny glutamové je pravděpodobně ten, že má kyselina glutamová základní význam pro transaminace, tedy pro biosyntézu aminokyselin. Glutamová kyselina vzniká z amoniaku a α -ketoglutarové kyseliny působením enzymů glutamátdehydrogenázy. Je důležitým donorem aminoskupin. Vzájemná souvislost těchto nejvíce zastoupených kyselin zřejmě spočívá v tom, že z glutamové může být syntetizován prolin. Reakcí kyseliny glutamové s oxalacetátem zase vzniká kyselina asparagová [23]. Zároveň, jak už bylo jednou konstatováno, kyselou hydrolyzou dochází ke konverzi asparginu a glutaminu na kyselinu asparagovou a glutamovou, čímž se zvýší zastoupení těchto aminokyselin. Je tedy nutno přistupovat k tomuto hodnocení tak, že zahrnuje jistou korekci.

Nejméně zastoupenými a obsaženými aminokyselinami byly pak cystein, tyrozin a methionin. Cystein vzniká z methioninu reakcí se serinem. Hodnoty zastoupení aminokyselin methioninu a serinu, patřily k těm nižším, tudíž se nedalo očekávat vyšší zastoupení cysteinu. Zároveň může být methionin syntetizován z kyseliny asparagové složitým mechanismem, který zřejmě není vybranými kmeny *Streptococcus thermophilus* preferován, protože hodnoty zastoupení a obsahu kyseliny asparagové v supernatantu patřily k těm vyšším, a přesto jsme došli k nižším výsledkům zastoupení methioninu. Tyrozin vzniká z fenylalaninu hydroxylací [23]. Fenylalanin patří k průměrně zastoupeným aminokyselinám ve zkoumaném supernatantu (bujónu po kultivaci) u všech kmenů *Streptococcus thermophilus*.

Rozdíly v produkci argininu a ornitinu byly pravděpodobně způsobeny jejich stále se měnícím poměrem, a to díky metabolické dráze ornitinového cyklu. V závěru tohoto biosyntetického děje se totiž z argininu odštěpí pomocí enzymu arginázy močovina a ornitin. Obecně ornitin vzniká z kyseliny glutamové postupnou acetylací. Ornitin se přemění na arginin reakcemi, které jsou součástí ornitinového cyklu.

Shluková analýza, která byla provedena na základě produkce ornitinu, jako hlavního rozlišovacího kritéria, poukázala na vzájemnou příbuznost některých kmenů. Hodnoty argininu jsou také vyhodnoceny jako kolísavé, ale v menší míře nežli ornitin.

Je možno konstatovat, že výsledky praktické části jsou v souladu s teoretickými poznatky o metabolizmech aminokyselin, které jsou uváděny v této práci, avšak některé hodnoty mají kolísavý charakter způsobený odlišnostmi metabolických drah. Rozdíl v zastoupení jednotlivých aminokyselin mohl být dán jednak výše uvedeným důvodem, nebo také nepřesností v dodržení optimálních teplot kultivace a synchronizace ontogenezí buněk vybraného mikroorganismu.

8 ZÁVĚR

Aminokyseliny se v buňkách bakterií vyskytují převážně jako součást jejich struktury (peptidoglykan). V úvahu je brána mikrobiální činnost mikroorganismů, která je enzymatickým procesem. Aminokyseliny přítomné v prostředí jsou jimi využívány a přeměňovány, katabolizovány aerobní nebo anaerobní cestou na dané produkty. Některých mikroorganismů, schopných tvořit žádoucí látky, je využíváno v průmyslu potravin, a to zvláště ve fermentačních procesech mléčných kysaných výrobků, pro produkci chuťových látek. K těmto účelům je právě využíván *Streptococcus salivarius* subsp. *termophilus*, kterému je věnována teoretická i praktická část této bakalářské práce.

V praktické části byla provedena analýza aminokyselin, respektive bujónu M17, po kultivaci bakterií *Streptococcus salivarius* subsp. *termophilus*.

Analýza aminokyselin byla provedena metodami instrumentální chemické analýzy. Byla uskutečněna hydrolýza vzorků supernatantů od vybraných kmenů *Streptococcus salivarius* subsp. *termophilus*. Následně bylo identifikováno a stanoveno množství aminokyselin ve vzorku přítomných pomocí aminokyselinového analyzátoru AAA 400. Současně byla u vzorků supernatantů provedena mineralizace a stanovení celkového dusíku Kjeldahlovou metodou. Tím bylo umožněno stanovit zastoupení jednotlivých aminokyselin v porovnání ku celkovému dusíku a objektivně zhodnotit metabolickou aktivitu vybraných kmenů streptokoků ve vztahu k aminokyselinám.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] VELÍŠEK, J.: Chemie potravin, 1. díl. OSIS, Tábor, 2002.
- [2] HOZA, I., KRAMÁŘOVÁ, D.: Potravinářská biochemie I. Zlín, Univerzita Tomáše Bati, Fakulta technologická, Zlín, 2005.
- [3] Aminokyseliny - *Wikipedie, otevřená encyklopedie* [online]. 2008, [cit. 2007-10-12].
<http://cs.wikipedia.org/wiki/Aminokyseliny>
- [4] ELLIOT W.H. a ELLIOT D.C.: Biochemistry and Molecular Biology. Oxford University Press Inc., New York, 2005.
- [5] JULÁK, J.: Identifikace bakterií metodami instrumentální chemické analýzy. Nakladatelství Univerzity Karlovy, Praha, 1998.
- [6] KAPRÁLEK, F.: Fyziologie bakterií. SPN, Praha, 1986.
- [7] ČECHOVÁ, L., JANALÍKOVÁ, M.: Obecná mikrobiologie. Univerzita Tomáše Bati, Fakulta technologická 2007
- [8] SIU COLLEGE OF SCIENCE-PHYSIOLOGY & BIOCHEMISTRY of MICROORGANISMS - THE CELL ENVELOPE [online]. 1999, [cit. 2007-14-12].
<http://www.science.siu.edu/microbiology/micr425/425Notes/02-CellEnv.html>
- [9] KIM, S., FIELD, K. G., CHANG, D. S., WEI, C. I., AN, H.: Identification of bacteria crucial to histamine accumulation in pacific mackerel during storage, *Journal of Food Protection*, 2001, vol. 64, pp. 1556-1564
- [10] BIBEK, R.: Food spoilage by microbial enzymes. *Fundamental Food Mikrobiology*, 2001, pp. 261-268
- [11] FRANK, J. H., HASSAN, A. N.: Starter cultures and their use, Marth E. A., Steele J. L. *Applied Dairy Microbiology*, 1998, pp. 131-172
- [12] HOĐÁK, K.: Fyziologie a biochemie bakterií. Univerzita Jana Evangelisty Purkyně, Fakulta přírodovědecká, Brno, 1979.
- [13] FERNÁNDEZ, M., ZÚÑIGA, M.: Amino Acid Catabolic Pathways of Lactic Acid Bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 2006, vol. 32, pp. 155-183

- [14] KÁŠ, J., KONDIČEK, M., VALENTOVÁ O.: Laboratorní techniky biochemie. Vysoká škola chemicko technologická, Praha, 2006.
- [15] Stanovení aminokyselin v krmivech – News from HPLC analysis [online]. 1999, [cit. 2008-15-01].
<http://www.sveb.cz/HPLC1/Amk/amk.htm>
- [16] Chromatografie- *Wikipedie, otevřená encyklopedie* [online]. 2008, [cit. 2008-15-01].
<http://cs.wikipedia.org/wiki/Chromatografie>
- [17] TEPLÝ, M.: Čisté mlékařské kultury: Výroba, kontrola, použití. SNTL, Praha, 1984.
- [18] SEDLÁČEK, I.: Taxonomie prokaryot. Masarykova univerzita, Brno, 2007.
- [19] List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature – LBSN [online]. 2008, [cit. 2008-15-05].
<http://www.bacterio.cict.fr/index.html>
- [20] KNĚZ, M., MAŠEK, J., MAXA, V., TEPLÝ, M., VEDLICH, M.: Čisté mlékařské kultury a jejich použití v mlékařském průmyslu. SNTL, Praha, 1960.
- [21] HOLS, P., HANCY, F., FONTAINE, L., GROSSIORD, B., PROZZI, D., LEBLOND-BOURGET, N., DECARIS, B., BOLOTIN, A., DELORME, CH., ERLICH, D., GUÉDON, E., MONNET, V., RENAULT, P., KLEEREBEZEM M.: New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus*. FEMS Microbiology Reviews, 2005, vol. 29, pp. 435-436
- [22] Mlékařské kultury – Galerie mikroorganismů, *Streptococcus thermophilus* [online]. 2003, [cit. 2008-14-02].
<http://vscht.cz/kch/galerie/mleko.htm>.Strept
- [23] HOZA, I., KRAMÁŘOVÁ, D., BUDÍNSKÝ, P.: Potravinářská biochemie III. Univerzita Tomáše Bati, Zlín, 2006.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

Gly	glycin
Ala	alanin
Val	valin
Leu	leucin
Ile	izoleucin
Ser	serin
Thr	threonin
Met	methionin
Cys	cystein
Asp	asparagová kyselina
Glu	glutamová kyselina
Asn	asparagin
Gln	glutamin
Lys	lyzin
Arg	arginin
His	histidin
Phe	fenylalanin
Tyr	tyrozin
Trp	tryptofan
Pro	prolin
DAP	diaminopimelová kyselina
NAG	N-acetylglukózamin
NAM	N-acetylmuramová kyselina
ATP	adenozintrifosfát

mRNA	mediátorová ribonukleová aminokyselina
tRNA	transferová ribonukleová aminokyselina
UMP	uridinmonofosfát
UTP	uridindifosfát
UTP	uridintrifosfát
PC	papírová chromatografie
TLC	tenkovrstvá chromatografie
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
OPA	o-ftaldialdehyd
FMOC-Cl	9-fluorenylmethoxy-karbonyl chlorid
AQC	6-aminoquinolyl-N-hydroxysukci-nimidyl karbamát
PITC	fenyliothiokyanát
BCAA	větvené aminokyseliny

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Alifatické aminokyseliny nesubstituované	11
Obr. 2. Alifatické hydroxyaminokyseliny	12
Obr. 3. Sirné aminokyseliny	12
Obr. 4. Monoaminodikarboxylové aminokyseliny	12
Obr. 5. Diaminomonoalkarboxylové kyseliny	12
Obr. 6. Bazické aminokyseliny	13
Obr. 7. Aromatické aminokyseliny	13
Obr. 8. Heterocyklická aminokyselina.....	13
Obr. 9. Struktura kyseliny diaminopimelové a lyzinu	16
Obr. 10. Struktura peptidoglykanu bakterie <i>Escherichia coli</i>	17
Obr. 11. Struktura UDP-N-acetylmuramové kyseliny	18
Obr. 12. Struktura baktoprenolfosfátu	19
Obr. 13. Poslední krok syntézy peptidoglykanu	19
Obr. 14. Reakční mechanismus ninhydrinu.....	31
Obr. 15. Dendrogram shlukové analýzy	46

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Některé techniky používané pro dezintegraci mikrobiálních buněk. Metody jsou rozděleny do skupin podle intenzity působení .	29
Tabulka 2 Průměrný obsah aminokyseliny v g/16gN u vybraných kmenů bakterie <i>Streptococcus thermophilus</i> v supernatantu	41
Tabulka 3 Průměrný obsah aminokyseliny v g/16gN u vybraných kmenů bakterie <i>Streptococcus thermophilus</i> v supernatantu	42
Tabulka 4 Průměrný obsah aminokyseliny v g/kg supernatantu u vybraných kmenů bakterie <i>Streptococcus thermophilus</i>	43
Tabulka 5 Průměrný obsah aminokyseliny v g/kg supernatantu u vybraných kmenů bakterie <i>Streptococcus thermophilus</i>	44