

PSYCHROFILNÍ A PSYCHROTROFNÍ MIKROORGANISMŮ, JEJICH ADAPTACE A VYUŽITÍ V MODERNÍCH BIOTECHNOLOGIÍCH

MICHAL STIBOR a BLANKA KRÁLOVÁ

Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6
e-mail: Michal.Stibor@vscht

Došlo dne 17.II.2000

Klíčová slova: psychrofilní a psychrotrofní mikroorganismy, biotechnologie

Obsah

1. Úvod
2. Výskyt a definice psychrofilních a psychrotrofních mikroorganismů
 - 2.1. Potraviný
 - 2.2. Pozemní a vodní ekosystémy
3. Izolace psychrotrofních a psychrofilních mikroorganismů
4. Molekulární adaptace
 - 4.1. Struktura proteinů
 - 4.2. Membránové lipidy
5. Genetika psychrofilních a psychrotolerantních mikroorganismů
6. Biotechnologické aplikace

1. Úvod

Psychrofilní a psychrotrofní mikroorganismy žijí v polárních, alpských, hlubokomořských nebo jiných oblastech, kde se teplota pohybuje pod 5 °C. Tyto chladově adaptované mikroorganismy si v průběhu evoluce vyvinuly řadu mechanismů, které jim umožnily existenci za nízkých teplot. Adaptační změny těchto mikroorganismů zahrnují jak změny ve struktuře proteinů (enzymy) tak změny ve složení lipidů tvořících buněčné membrány. Strukturální změny proteinů mají na rozdíl od lipidových, které mají genotypový i fenotypový charakter, pouze genotypový charakter. Enzymy, které jsou produkovány psychrotrofními a psychrofilními mikroorganismy jsou schopny katalyzovat reakce při teplotách blízkých 0 °C. Tyto enzymy jsou charakterizovány vysokou katalytickou aktivitou při nízkých teplotách, ale jsou teplotně labilní. Vzhledem k jejich vysoké specifické aktivitě a jejich rychlé inaktivaci při teplotách, kdy jsou enzymy z mesofilních mikroorganismů běžně aktivní, mají společně s jejich producenty velký biotechnologický potenciál. Studie srovnávající strukturu těchto enzymů s jejich mesofilními a termofilními analogy ukázaly, že molekulární podstata jejich adaptace na teploty blízké 0 °C je z největší části způsobena snahou zachovat flexibilitu jejich struktury. Ta u dosud studovaných enzymů vychází z oslabení intramolekulárních interakcí a naopak ze zesílení interakcí s rozpouštědlem. Tyto modifikace jsou však doprovázeny malou stabilitou za vyšších teplot, což je cena za jejich vysokou

aktivitu při teplotách, které jsou obecně považovány za nízké. Výše zmíněné vlastnosti umožňují jejich použití v biotechnologiích, a to především tam, kde jsou běžné teploty nežádoucí (potravinářský průmysl) a kde nízké provozní teploty znamenají snížení nákladů a také snížené riziko běžné kontaminace. Ze složek membránových lipidů jsou to hlavně mastné kyseliny, které se největší měrou podílejí na zachování fluidity buněčné membrány. A právě nenasyčené mastné kyseliny našly uplatnění v potravinářském průmyslu a jsou dosud jediným známým příkladem sloučenin nebílkovinového původu z chladově adaptovaných mikroorganismů s přímou aplikací. Nové poznatky studia molekulární genetiky chladově adaptovaných mikroorganismů umožnily vedle přímého využití těchto mikroorganismů v moderních biotechnologiích i využití některých jejich buněčných produktů.

2. Výskyt a definice psychrofilních a psychrotrofních mikroorganismů

Velká část naší planety nedosahuje ani teploty 5 °C, což je teplota při níž člověk pocituje chlad. Je třeba si uvědomit, že tři čtvrtiny Země pokrývají oceány, v jejichž hlubinách je teplota nízká a celý jeden světadíl, Antarktida, má chladné prostředí v průběhu celého roku. Mikroorganismy schopné růst za nízkých teplot jsou známy již více než 100 let a to jak v přírodních podmínkách (moře, půda) tak v prostředí vytvořeném člověkem (potraviný). Z hlediska zařazení těchto mikroorganismů již v roce 1902 Schmidt-Nielsen¹ použil termín psychrofil a to pro bakterie schopné růst při 0 °C. O rok později Muller argumentoval, že mnoho bakterií rostoucích při 0 °C má optimální teplotu růstu v rozmezí 20–30 °C, tj. v oblasti, kde běžně rostou mesofilní mikroorganismy a navrhl pro tyto mikroorganismy označení psychrotolerantní². I přesto, že se v průběhu let definice psychrofilních a psychrotolerantních mikroorganismů několikrát změnila, v současnosti je obecně uznávána definice popsána Moritou³, který v roce 1975 popsal chladově adaptované mikroorganismy pomocí jejich minimálních, optimálních a maximálních růstových teplot. Tak pro psychrofilní mikroorganismus je minimální, optimální a maximální teplota <0, <15 a <20 °C. Na druhou stranu mikroorganismy, které mají tyto růstové teploty 0–5, >15, >20 °C jsou nazývány psychrotrofními. V některé literatuře je pro tuto skupinu mikroorganismů dosud používán termín psychrotolerantní⁴ a pro úplnost je třeba zmínit, že před Moritovou definicí byl také pro tyto mikroorganismy používán termín fakultativně psychrofilní⁵. Přes jasnou a přesnou definici nelze však předpokládat, že všechny mikroorganismy beze zbytku zapadají do jedné ze dvou skupin. Psychrofilní mikroorganismy rostou, na rozdíl od psychrotrofních, v užším rozmezí teplot a jsou nejčastěji izolovány ze stále chladných oblastí i když nepředstavují dominantní typy⁶. Pravděpodobně i v těchto oblastech mají psychrotrofní kmeny určité výhody jako je například dostupnost živin. Výjimkou je tající led u břehů Antarktidy, kde řada studií ukázala, že hlavní skupinou mikroorganismů jsou psychrofilní⁷. Přestože je schopnost růst za

nízkých teplot široce rozšířená mezi mikrobiální florou a zahrnuje všechny jejich hlavní skupiny (bakterie, kvasinky, řasy, houby, plísňe), v poslední době byla věnována největší pozornost bakteriím. Dosud není znám jediný zástupce archaeobakterií s touto vlastností, ale je jen otázka času, kdy i v této skupině mikroorganismů bude izolován psychrofilní nebo psychrotolerantní druh. Zdá se pravděpodobné, že podobně jako schopnost fotosyntetizovat, byla schopnost růst při nízkých teplotách získávána v průběhu evoluce a řada mikroorganismů reprezentující široké spektrum taxonomicky odlišných druhů si tuto vlastnost postupně osvojovala. Obecně lze však říct, že psychrofilní a psychrotrofní mikroorganismy se vyskytují ve dvou prostředích, v potravinách skladovaných za nízkých teplot a v chladných pozemních a vodních prostředích.

2.1. Potravin y

Běžným způsobem jak prodloužit skladovací dobu čerstvých nebo částečně konzervovaných potravin je použití snížení teploty⁸. Takto uměle vytvořené, energeticky bohaté prostředí, je vhodným prostředím pro psychrotrofní a psychrofilní mikroorganismy⁹. Bakterie nemohou růst za teploty $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ a nižší, což je teplota správně skladovaných potravin. Hraniční teplota pro růst bakterií je $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$, což je teplota při které dochází k vnitrobuněčnému tvoření ledu¹⁰. Pro plísňe a kvasinky je však tato teplota stále dostačující pro zachování jejich buněčných funkcí. Teploty mezi $0\text{--}5\text{ }^{\circ}\text{C}$, které slouží k běžnému skladování potravin, jsou kritické pro výskyt mikroorganismů, které mohou jak znehodnocovat potraviny tak i produkovat toxické látky. Nejběžnější psychrotrofní a psychrofilní bakterie jsou gramnegativní rody *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Escherichia* a *Aerobacter*¹¹, a to i přesto, že jejich vegetativní buňky jsou zničeny při pasterizaci. Z kvasinek jsou to hlavně rody *Candida* a *Rhodotorula*. Vzhledem ke schopnosti růst za nízké vodní aktivity jsou houby přítomny zvláště v suchých nebo částečně dehydratovaných potravinách. Jako příklad psychrotrofní plísně je možno zmínit některé druhy rodu *Penicillium* izolované z potravin¹². Přestože většina mikroorganismů, které jsou přítomny v potravinách a způsobují jejich znehodnocení, neznamená zdravotní riziko pro člověka, existuje několik výjimek. Zejména se jedná o druh *Listeria monocytogenes* způsobující listeriózu¹³ a určité sérotypy druhu *Yersenia enterocolitica*, které způsobují infekce vyskytující se především u dětí. Z dalších patogeních druhů lze zmínit *Bacillus cereus* produkující toxiny a vyskytující se například v rýži. Mezi nebezpečné druhy patří anaerobní *Clostridium botulinum*, které roste za teplot $3\text{--}4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a má vedle toho i teplotně rezistentní spóry¹⁴. Jako příklad psychrotolerantní houby lze uvést *Cladosporium herbarum*, která tvoří černé kolonie na chlazeném mase¹⁵. Častým důvodem proč dochází k vlastnímu kažení potravin jsou lipolytické a proteolytické enzymy, kterým lze také přičíst zápach doprovázející kažení potravin. Ačkoliv je snížená teplota nejběžnějším prostředkem pro uchování potravin a prodloužení doby skladovatelnosti, velmi často se používají i další prostředky, jako například přísady soli nebo modifikovaná atmosféra. I těmto podmínkám se však dokáží některé mikroorganismy úspěšně přizpůsobit. Jako mikroorganismus, který roste za nízkých teplot a vedle toho je rezistentní na vysoké koncentrace oxidu uhličitého a nízké koncentrace kyslíku, lze uvést psychrotolerantní bakterii *Brochothrix thermopacta*¹⁶.

2.2. Pozemní a vodní ekosystémy

Na rozdíl od psychrofilních mikroorganismů, které nejčastěji obývají stále chladná prostředí, psychrotolerantní mikroorganismy se nacházejí v oblastech, kde dochází v průběhu roku k výkyvům teplot¹⁷. Jako příklad pro výskyt psychrotolerantních mikroorganismů lze uvést arktické a antarktické půdy, kde se teplota pohybuje pod $5\text{--}10\text{ }^{\circ}\text{C}$ (cit.¹⁸), avšak v krátkém letním období stoupá. Naopak průměrná teplota polárních moří je $-1,8\text{ }^{\circ}\text{C}$, průměrná teplota oceánů se stále udržuje pod $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ a tak jsou tyto epitopy ideálními oblastmi pro výskyt psychrofilních mikroorganismů. Psychrofilní bakterie jsou nedílnou součástí potravinového řetězce v mořských hlubinách¹⁹. Hluboká moře jsou vedle toho i oblasti s vysokým tlakem vody a tak mnoho izolátů získaných při výzkumu tohoto epitopy jsou také barofilní nebo barotolerantní²⁰. Z evropských lokalit, kde jsou běžně přítomny psychrotrofní a psychrofilní mikroorganismy, je nejznámější alpská oblast²¹. Tam se vyskytují jak v půdě tak v ledovcích.

Vedle půdy a vodních ekosystémů jsou však tyto mikroorganismy asociovány i s rostlinami a studenokrevními živočichy²².

3. Izolace psychrotrofních a psychrofilních mikroorganismů

První bakterie schopná růst za nízkých teplot byla izolovaná Forstem v roce 1887 z konzervované ryby²³. Od té doby bylo publikováno mnoho studií popisujících izolaci psychrofilních a psychrotrofních mikroorganismů^{24–26}. Vedle aseptické práce není nutno při izolaci těchto mikroorganismů zachovávat speciální postupy, samozřejmě kromě stálého udržování nízké teploty. Psychrofilní nebo psychrotrofní izoláty nevyžadují speciální nároky na živiny kromě určitých skupin, které jsou však systematicky odlišeny a definovány právě díky těmto nárokům. Příkladem mohou být rhizobia schopné vázat plynný dusík nebo bakterie podílející se na metabolismu síry²⁶. Přesto je u jedné skupiny většinou psychrofilních mikroorganismů nutné zachovávat prostředí, z kterého pochází; jsou to organismy z hlubokých oceánů a mořských sedimentů²⁷. V těchto oblastech v hloubce dosahující až 11 000 m jsou za pomoci speciálních technologií asepticky odebírány vzorky, z kterých jsou pak izolovány jednotlivé barofilní a barotolerantní kmeny²⁸. Přestože je těžké předpovídat, jaký mikrobiální druh bude izolován z určité oblasti, lze nalézt několik trendů, z nichž nejčastěji je zmiňovaný fakt, že gramnegativní bakterie převládají nad grampozitivními v mořích u Antarktidy. Naopak v suchých antarktických údolích převládají grampozitivní rody *Planococcus* a *Micrococcus*²⁹. Tento fakt byl také pozorován u izolátů z alpských ledovců³⁰, kdy byl izolován velký počet zejména pigmentovaných kmenů. Takto vybavené organismy absorbují svými pigmenty radiční záření, což jim slouží jako účinná obrana. Zajímavým údajem je skutečnost, že z 430 psychrotrofních izolátů z alpských oblastí bylo 77 % bakterií, 20 % kvasinek a zbytek tvořily plísňe³⁰. Řada mikroorganismů, převážně bakterií izolovaných z mořských oblastí, byla vedle schopnosti růst za nízkých teplot také schopna tolerovat různé koncentrace soli a tak řada izolačních postupů používá právě sůl, nejčastěji NaCl, jako přísadu do kultivačního média³¹.

4. Molekulární adaptace

K tomu, aby mohli růst a rozmnožovat se za nízkých teplot, si psychrotrofní a psychrofilní mikroorganismy vyvinuly řadu mechanismů, kterými se odlišují od svých mesofilních a termofilních analogů. V zásadě je lze rozdělit do dvou skupin: změny ve struktuře proteinů a změny související se složením lipidů tvořící buněčné membrány.

4.1. Struktura proteinů

Psychrofilní a psychrotrofní mikroorganismy obsahují enzymy s vysokou specifickou aktivitou za teplot blízkých 0 °C, což jim umožňuje přežívat teploty, za kterých jsou základní životní funkce mesofilních mikroorganismů zastaveny. Tyto enzymy mají obvykle o 20–30 °C nižší teplotní optimum než odpovídající mesofilní enzym a jsou obecně termolabilní. Laktátdehydrogenasa z psychrotrofní bakterie *Bacillus psychrosaccharolyticus*³² byla prvním enzymem z psychrotolerantního mikroorganismu, u něž byla stanovena aminokyselinová sekvence. Do současné doby byly studovány jak extracelulární tak intracelulární enzymy a u některých z nich jsou známy i terciární a kvartérní struktury (citrátsynthasa, α -amylasa). Jednotlivé enzymy společně se svým zdrojem jsou obsaženy v tabulce I. Mezi extracelulární patří α -amylasa³³ a lipasa³⁴. Vzhledem k existenci izoenzymů a tomu, že jsou v současné době známé primární sekvence některých enzymů z více zdrojů, je možné tvrdit, že se stejné enzymy výrazně liší svými teplotními a kinetickými charakteristikami. Nejmarkantnějším příkladem je existence dvou izoenzymů isocitrátdehydrogenasy (ICDH) u psychrofilního kmene *Vibrio* sp. ABE-1 (cit³⁵). ICDH 1 má větší termostabilitu než ICDH 2 a je také na rozdíl od monomerní ICDH 2 složena ze dvou identických podjednotek. Dimerní struktura ICDH 1 umožňuje řadu hydrofobních interakcí což má za následek větší teplotní odolnost³⁵. Avšak na základě kinetických parametrů má naopak ICDH 2 70× větší aktivitu za nízkých teplot³⁶. Dominantní charakteristika enzymů z psychrotrofních a psychrofilních mikroorganismů je jejich vyšší katalytická konstanta (k_{kat}) a vyšší katalytická účinnost³⁷ (k_{kat}/K_m). Studiemi dosud známých enzymů, které se podařilo připravit v krystalické formě, se ukázalo, že aktivní centrum těchto enzymů je na úrovni primární struktury identické s aktivními centry odpovídajících mesofilních enzymů³⁸, a to platí i o postraních řetězcích, které k aktivnímu centru přiléhají. Z těchto závěrů vyplývá, že unikátní vlastnosti těchto enzymů jsou způsobeny aminokyselinovými zbytky, které se přímo neúčastní vlastní chemické reakce. Flexibilita struktury těchto enzymů má však na druhou stranu za důsledek větší teplotní labilitu. Menší rigidita struktury psychrotrofních a psychrofilních enzymů je způsobena především interakcí molekul enzymu s rozpouštědlem a to na základě nekovalentních elektrostatických interakcí jako jsou vodíkové vazby, solné můstky a aromatické interakce³⁷. Pro příklad jsou v tabulce II uvedeny základní rozdíly ve struktuře psychrofilní a mesofilní α -amylasy³⁹. Z porovnání těchto struktur vyplývá, že výrazné snížení hydrofobního jádra psychrofilního enzymu je způsobeno výměnou alaninových zbytků za prolinové⁴⁰ což má za následek flexibilnější enzymovou molekulu. Podobný efekt má úbytek argininových aminokyselinových zbytků, který vede k oslabení intermolekulárních interakcí. Z hlediska průmyslových enzymů má v současnosti

Tabulka I

Enzymy z psychrotrofních a psychrofilních bakterií u nichž je známa primární struktura

Enzym	Bakterie	Lit.
Laktátdehydrogenasa	<i>Bacillus psychrosaccharolyticus</i>	43
Lipasa	<i>Moraxella</i> sp. TA 144	44
	<i>Psychrobacter immobilis</i>	45
	<i>Alteromonas haloplanctis</i>	46
α -Amylasy	<i>Alteromonas haloplanctis</i>	46
Isocitrátdehydrogenasa	<i>Vibrio</i> sp. ABE-1	47
Subtilisin (proteinasa)	<i>Bacillus</i> sp. TA 39	41
	<i>Bacillus</i> sp. TA 41	48
Triosafosfátisomerasa	<i>Moraxella</i> sp. TA 137	49
β -Galaktosidasa	<i>Arthrobacter</i> sp. B7	50,51
β -Laktamasa	<i>Psychrobacter immobilis</i>	52
Citrátsynthasa	<i>Moraxella</i> sp. DS2-3R	53
Esterasa	<i>Pseudomonas</i> sp. LS 107d2	54
Alkalická fosfatasa	kmen HK47 z mořské vody	55

Tabulka II

Adaptace psychrofilní α -amylasy z *Alteromonas haloplanctis* A23 vzhledem k mesofilní α -amylase³⁹

Parametr	Hodnoty [%] u psychrofilního enzymu
Solné můstky	63
Aromatické interakce	5
Hydrofobní interakce	54
Obsah prolinu	38
Obsah argininu	55

největší význam subtilisin⁴¹. Přestože lze říci, že je psychrofilní subtilisin asi o 30–40 aminokyselin delší než subtilisin z mesofilních zdrojů, odvozená třídídimenzionální struktura je velmi podobná, a to hlavně v klíčových oblastech enzymu. U tohoto enzymu byly nalezeny velmi podobné strukturální adaptační změny – snížení aromatických interakcí, úbytek solných můstků, snížení počtu prolinových a argininových zbytků. Snížení počtu argininových zbytků vedlo k nižší afinitě k Ca^{2+} , které jsou pro tuto serinovou proteasu esenciální. Avšak když byl klíčový threonin nahrazen cílenou mutagenézí kyselinou asparagovou, aktivita tohoto enzymu se podstatně zvýšila⁴². Z tohoto pokusu jasně vyplývá, že molekulárním přístupem lze zdokonalit vlastnosti enzymů z psychrofilních a psychrotrofních zdrojů především za účelem jejich využití v biotechnologických aplikacích.

4.2. Membránové lipidy

Psychrotrofní a psychrofilní mikroorganismy nemají unikátní složení buněčné membrány a jednotlivé druhy si vytvořily odlišné mechanismy jak si uchovat všechny životní funkce za nízkých teplot. Základním rysem všech změn, a to jak změn ve složení mastných kyselin tak ve složení fosfolipidů, je snaha o zachování fluidity membrány⁵⁶. Díky poměrně jednoduchosti provedení lipidové analýzy byl tento problém studo-

ván velmi podrobně a v současnosti existuje řada studií^{57,58}, které se jím podrobně zabývají. Přestože dochází ke změnám ve složení jak polárních lipidů tak hydrofobních mastných kyselin, které jsou uvnitř lipidové dvojvrstvy, hlavní část adaptačních změn vedoucích k zvýšení fluidity membrány postihuje mastné kyseliny⁵⁷. Jednoduchost při stanovení mastných kyselin pomocí plynové chromatografie umožnila poměrně přesně definovat, k jakým změnám dochází u jednotlivých mastných kyselin při snížení růstové teploty. Mezi základní charakteristiky, které si mikroorganismy v průběhu evoluce vytvořily, patří syntéza nenasycených mastných kyselin, zkracování délky řetězce mastných kyselin, větvení mastných kyselin a vzrůst poměru *anteisolo* větvených mastných kyselin. Je třeba zdůraznit, že každá z charakteristik může být jedinou možností jak se jednotlivé mikroorganismy přizpůsobují nízkým teplotám, přesto však většina mikroorganismů používá více typů adaptačních mechanismů⁵⁸. Jako příklad lze uvést grampozitivní a gramnegativní bakterie, které se odlišují ve složení buněčných membrán⁵⁹ a tím v zastoupení jednotlivých mastných kyselin, takže u nich zákonitě dochází k odlišným změnám, které jsou v úzkém vztahu k jejich složení. Grampozitivní rody obsahují velké procento větvených mastných kyselin a tak je velmi častý vzrůst poměru *anteisolo* větvených mastných kyselin⁶⁰. U gramnegativních rodů dochází k syntéze nenasycených mastných kyselin nebo ke snižování průměrné délky řetězce⁶¹. U některých mořských psychrofilních izolátů se zvyšuje poměr *transcis* nenasycených mastných kyselin, jak je například dokumentováno u druhu *Vibrio*⁶². Přísun živin je jedním z důležitých aspektů zachování viability buňky a jak naznačují některé studie^{63,64} je tak tomu i u organismů schopných růst za nízkých teplot. Příkladem mohou být dvě psychrotolerantní bakterie⁶⁵, z nichž jedna má vypracován lepší mechanismus příjmu živin a tak roste lépe za teplot blízkých 0 °C.

5. Genetika psychrofilních a psychrotolerantních mikroorganismů

Znalosti molekulární biologie psychrotrofních a psychrofilních mikroorganismů jsou v porovnání se znalostmi termofilních mikroorganismů malé. Jako příklad lze uvést, že v současné době neexistuje žádný systém pro klonování v psychrofilních nebo psychrotrofních mikroorganismech. Dosud byly všechny enzymy exprimovány v mesofilních hostitelích³⁷. Do současnosti se pozornost věnovala hlavně purifikaci a následné krystalizaci enzymů z těchto mikroorganismů. Z regulačních procesů podílejících se na expresi daného proteinu byla částečně studována jen transkripce⁶⁶. Z této studie vyplývá, že se snížením teploty dochází z největší pravděpodobností k produkci některých enzymů (lipasa, kyselá fosfatasa). Jako další příklad sloužící k rozšíření znalostí o těchto mikroorganismech a jejich adaptaci na nízké teploty je izolace genů podílejících se na syntéze nenasycených mastných kyselin a existence tzv. proteinů chladového šoku. Na syntéze nenasycených mastných kyselin se podílí membránově vázaný protein, jehož purifikace je díky jeho lokalizaci velmi obtížná. Pomocí molekulárně genetických technik bylo však naklonováno několik genů kódující tento protein⁶⁷. Transformací tohoto genu z teplotně rezistentní *Synechocystis* sp. PCC6803 do teplotně senzitivního kmene *Anacystis nidulans* byla tomu-

to kmenu umožněna syntéza nenasycených mastných kyselin a tím získal dříve mesofilní *A. nidulans* schopnost tolerovat nízké teploty⁶⁸. Náhlým snížením teploty dochází k transkripci a translaci nové sady genů, které kódují proteiny chladového šoku (Csp). Ty jsou analogy k proteinům exprimovaným při náhlém zvýšení teploty⁶⁹ nazývané proteiny tepelného šoku (Hsp). Hlavním rozdílem mezi Csp a Hsp je fakt, že Hsp vznikají jako odpověď na širokou škálu podnětů (stresů), jako například přítomnost ethanolu, zvýšená teplota, přítomnost těžkých kovů nebo anaerobní podmínky⁷⁰. Podobně jako Hsp jsou Csp přítomny jak v psychrofilních a psychrotolerantních tak v termofilních a mesofilních mikroorganismech⁶⁹. Nejvíce jsou Csp prostudovány u *Escherichia coli* a *Bacillus subtilis*⁷¹. Hlavní Csp u *E. coli*, Csp A se zdá být transkripčním regulátorem ostatních proteinů chladového šoku⁷² a syntéza tohoto proteinu je právě na transkripční úrovni regulovaná teplotou⁷³. Funkce dalších proteinů chladového šoku není přesně známa, ale předpokládá se, že podobně jako proteiny tepelného šoku, jsou Csp součástí syntézy proteinů za nízkých teplot a podílejí se na identifikaci a odstraňování denaturovaných proteinů⁷⁴. Vedle Csp byla u psychrofilních bakterií a kvasinek izolována druhá skupina proteinů, která však není na rozdíl od Csp syntetizovaná při náhlém snížení teploty, ale je syntetizovaná konstitutivně při růstu za nízkých teplot⁷⁵. Tyto proteiny byly nazvány chladově aklimatizované proteiny (Cap). Bylo zjištěno, že se tyto proteiny v období, kdy dochází ke snížení teploty, syntetizují vždy odlišným mechanismem nezávisle na Csp⁷⁶. Fyziologické funkce některých Csp a Cap jsou známy, jako příklad je možné uvést hlavní Csp izolovaný z *B. subtilis*. Tento enzym byl určen jako enzym citrátového cyklu akonitasa. Z hlediska praktického využití se slibným zdá být přenos TOL plazmidu z mesofilního kmene *Pseudomonas putida* do psychrotrofního kmene *P. putida*⁷⁷. Kmen obsahující TOL plazmid je schopen odbourávat toluen a po konjugacím přenosu tohoto plazmidu do psychrotrofního kmene *P. putida* byl tento kmen schopen utilizovat toluen za teplot blízkých 0 °C.

6. Biotechnologické aplikace

Psychrotrofní a psychrofilní mikroorganismy představují velký potenciál pro současné biotechnologie, a to právě díky své unikátní schopnosti žít, růst a rozmnožovat se za teplot, které jsou člověkem chápány jako extrémní⁷⁸. Přestože jsou mikroorganismy často využívány v řadě výrob a biotechnologiích, přímé použití psychrotrofního nebo psychrofilního mikroorganismu nedosahuje významných aplikací. Jejich buněčné produkty však již našly řadu praktických aplikací a v současné době je tato oblast intenzivně studována. Pro názornost jsou hlavní výhody při použití produktů z psychrofilních a psychrotolerantních mikroorganismů uvedeny v tabulce III. Snížení energetického nároku snížením reakční doby vede automaticky ke snížení nákladů na celý proces. K nezanedbatelným výhodám patří také snížené riziko běžné kontaminace za teplot, kdy mesofilní produkty nevykazují žádnou nebo minimální aktivitu. Z hlediska praktického využití se nejvhodnějšími kandidáty jeví enzymy z těchto mikroorganismů a přehled hlavních produktů společně s možným použitím jsou shrnuty v tabulce IV. Teplotní senzitivita jak bylo například popsáno u alkalické fosfatasy⁵⁵ vedla k inaktivaci tohoto enzymu již v kompletním mediu a k zabránění nežádoucích

Tabulka III

Hlavní výhody použití produktů z psychrofilních a psychrotolerantních mikroorganismů

Rychlé a ekonomické ukončení procesu za mírných teplotních podmínek
Vysoké výtěžky při reakcích zahrnujících teplotně sensitivní složky
Ovlivňování (stereo)specifity u reakcí katalyzovaných enzymy
Snížení nákladů eliminací chladících/ohřívajících kroků v procesu
Zvýšená kapacita při on-line monitorování v enviromentálních podmínkách

Tabulka IV

Využití produktů z psychrotrofních a psychrofilních mikroorganismů

Aplikace	Příklad produktu
Prací prášky	proteiny, lipasy, celulasy
Tenderizace masa	proteiny
Hydrolyza laktosy v mléce	β -galaktosidasa
Přidávky do potravin	nenasycené mastné kyseliny
Enviromentální biosenzory	různé enzymy (např. oxidasy)
Bioremediace	různé enzymy (např. oxidasy)
Čištění kontaktních čoček	proteiny
Biotransformace	různé enzymy (např. dehydrogenasy)

aktivit tohoto enzymu. K nejpoužívanějším enzymům, které našly uplatnění v potravinovém průmyslu a jako přísady do detergentů, patří lipasy a proteasy⁷⁹. Proteasy jsou právě díky nižším teplotám široce vyhledávané v řadě konkrétních aplikací (výroba sýru, úprava piva, pekařské výrobky) a jejich použití v pracích prostředcích je rozšířené zvláště v Japonsku, kde je praní za nízkých teplot tradicí⁸³. Vedle proteas se do pracích prostředků přidávají i amylasy, celulasy a lipasy. V pivovarnictví mají využití vedle proteas i amylasy ke zrychlení vstírání sladu za nízkých teplot. Odstraňování pektinů, zvláště z ovocných šťáv za chladu, je jednou z možností jak zabránit zbytečnému zkracování doby trvanlivosti⁸⁴. Klasická hydrolyza laktosy na glukosu a galaktosu v mléce probíhá za 30–40 °C po dobu 4 hodin za katalýzy β -galaktosidasou z kvasinky rodu *Kluyveromyces*. Alternativní cestou je hydrolyza psychrofilním enzymem za teplot 5–10 °C po dobu 24 hodin, což také snižuje riziko kontaminace⁸⁵.

Z lipidových složek, které našly uplatnění jako přísady do potravy, jsou jediným dosud známým příkladem vícesytné nenasyčené mastné kyseliny⁸⁶. Pro člověka esenciální linolová a α -linolenová kyselina jsou vedle toho, že slouží jako prekurzory dalších nenasyčených mastných kyselin, nezbytné pro zdravý růst. Jsou základními stavebními jednotkami prostaglandinů, leukotrienů a dalších membránových struktur v mozku a zornici. Dalším příkladem, kdy měl základní výzkum přímou návaznost na biotechnologickou aplikaci, je

využití proteinů tvořících krystaly ledu při výrobě zmrzliny, umělého sněhu a řadě dalších potravinových aplikací⁸⁷. Tvorba krystalků ledu byla pozorována u řady psychrotolerantních bakterií parazitujících na rostlinách⁸⁸. Kmeny rodu *Pseudomonas*, *Erwinia* a *Xanthomonas* tvoří krystalky na květech a listech za tvorby proteinů, které jsou kódovány specifickými geny⁸⁹. Vytvořené modely vysvětlující vazbu vody na tyto proteiny a tím zahájení tvorby ledových krystalků^{90,91} byly základem k využití těchto proteinů k výše zmíněným účelům. Z výskytu psychrotrofních a psychrofilních mikroorganismů vychází snaha o zapojení těchto organismů do procesů podléhajících se na odstranění nežádoucích látek ze životního prostředí, k čemuž je mikrobiální biodegradace velmi často využívána⁷⁹. Příkladem je biodegradace motorové nafty půdními mikroorganismy⁸⁰ a degradace uhlovodíků psychrotrofní bakterií rodu *Pseudomonas*⁸¹. Vhodným prostředkem k čištění odpadních vod za teplot pod 15 °C se jeví právě chladově adaptované mikroorganismy nebo jejich produkty⁸². K zajímavým aplikacím nezapadajících do mikrobiální říše a zároveň patřících do lékařství, patří tvorba vakcín z chladově adaptovaných virů parainfluenza⁹². Na závěr je třeba zdůraznit, že nedávné pokroky v imobilizaci enzymů a zejména v genetickém inženýrství, jsou významným nástrojem sloužícím k dalšímu zdokonalení vlastností psychrofilních a psychrotolerantních mikroorganismů a jejich produktů pro širší uplatnění v moderních biotechnologiích.

LITERATURA

- Schmidt-Nielsen S.: Zentralbl. Bacteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. 9, 145 (1902).
- Muller M.: Arch. Hygiene 47, 127 (1903).
- Morita R. Y.: Bacteriol. Rev. 39, 144 (1975).
- Russell N. J., v knize: *Trends in Microbial Ecology* (Guerrero R., Pedro-Alio C., ed.). Spanish Society for Microbiology, Madrid 1993.
- Bhakoo M., Herbert A. R.: Arch. Microbiol. 1979, 121.
- Wyn-Williams D. D.: *Advances in Microbial Ecology*. Plenum Press, New York 1990.
- Nichols D. S., Russell N. J.: Microbiology 1996, 142.
- Collins M. A., Buick R. K.: Food Microbiol. 1989, 6.
- Gould G. W., Russell N. J.: *Food Preservatives*. Blackie, Glasgow 1991.
- Russell N. J.: *Molecular Biology and Biotechnology of Extremophiles*. Blackie, Glasgow 1992.
- Tanner A. C., Herbert R. A.: Kiel Meeresforsch. Sonderh. 5, 390 (1981).
- Land C. J., Bahnhidi Z. G., Albertsson A. C.: Nord. J. Botany 7, 97 (1987).
- Wilkins P. O., Bourgeois R., Murray R. G. E.: Can. J. Microbiol. 18, 543 (1972).
- Walker S. J., Springer M. F., v knize: *Cilled Foods, the State of the Art* (Gormley T. R., ed.), kap. 3. Elsevier, London 1990.
- Reuter G.: *Psychrotrophic Microorganisms in Spoilage and Pathogenicity*. Academic Press, London 1981.
- Boghar A., Bohling H., Fort H., v knize: *Cilled Foods, the State of the Art* (Gormley T. R., ed.), kap. 5. Elsevier, London 1990.
- Bowman J. P., Brown M. V., Nichols D. S.: Antarctic Sci. 9, 134 (1997).

18. Friedmann E. I.: *Antarctic Microbiology*. Wiley-Liss, New York 1993.
19. Morita R. Y.: *Can. J. Microbiol.* 26, 1375 (1980).
20. Jannasch H. W., Wirsén C. O., Taylor C. D.: *Science* 216, 1315 (1982).
21. Gounout A. M.: *Can. J. Microbiol.* 22, 839 (1976).
22. Margesin R., Schinner F.: *Biotechnological Applications of Cold-adapted Organisms*. Springer, Berlin 1999.
23. Forster J.: *Zentr. Bacteriol. Parasitenk. Infekt. Hyg.* 2, 337 (1887).
24. Innis W. E.: *Ann. Rev. Microbiol.* 29, 445 (1975).
25. Russell N. J.: *Phil. Trans. Roy. Soc. London B* 329, 595 (1990).
26. Schlegel H. G.: *General Microbiology*. Cambridge University Press, Cambridge 1993.
27. Austin B.: *Marine Microbiology*. Cambridge University Press, Cambridge 1988.
28. Kato Ch., Li L., Nogi Y., Nakamura Y., Tamaoka J., Horikoshi K.: *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1510 (1998).
29. Miller K. L., Leschine S. B., Huguenin R. L.: *Ant. J. United States* 18, 222 (1983).
30. Schinner F., Margesin R., Pumpel T.: *Arctic Alpine Res.* 24, 88 (1992).
31. Yayanos A. A., DeLong E. F., v knize: *Current Perspectives in High Pressure Biology* (Jannasch H. W., Marquis R. E., Zimmerman A. M., ed.), kap. 5. Academic Press, London 1987.
32. Schlatter D., Kriech O., Suter F., Zuber H.: *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 368, 1435 (1987).
33. Kimura T., Hirikoshi K.: *Starch/Stärke* 42, 403 (1990).
34. Feller G., Thiry M., Arpigny J. L., Mergeay M., Gardey C.: *FEMS Microbiol. Lett.* 66, 1669 (1989).
35. Ochiai T., Fukunaga N., Sasaki S.: *J. Biochem.* 86, 377 (1979).
36. Ochiai T., Fukunaga N., Sasaki S.: *J. Gen. Appl. Microbiol.* 30, 479 (1984).
37. Feller G., Gerday Ch.: *Cell. Mol. Life Sci.* 53, 830 (1997).
38. Mosimann S., Meleshko R., James M. N. G.: *Proteins Struct. Funct. Genet.* 23, 301 (1995).
39. Feller G., Payan F., Theys F., Qian M., Haser R., Gerday Ch.: *Eur. J. Biochem* 222, 441 (1994).
40. Russell N. J.: *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* 61, 1 (1998).
41. Davail S., Feller G., Narinx E., Gerday Ch.: *J. Biol. Chem.* 269, 17 (1994).
42. Feller G., Gerday Ch.: *FEMS Microbiol. Rev.* 18, 189 (1996).
43. Vckovski V., Schlatter D., Zuber H.: *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 371, 103 (1990).
44. Feller G., Thiry M., Gerday Ch.: *DNA Cell Biol.* 10, 381 (1991).
45. Arpigny J. L., Feller G., Gerday Ch.: *Biochim Biophys. Acta* 1171, 331 (1993).
46. Feller G., Lonhienne T., Deroanne C., Libiouille C., Van Beeumen J., Gerday Ch.: *J. Biol. Chem.* 267, 5217 (1992).
47. Ishii A., Susuki M., Sahara T., Takada Y., Sasaki S., Fukunaga N.: *J. Bacteriol.* 175, 6873 (1993).
48. Davail S., Feller G., Narinx E., Gerday Ch.: *Gene* 119, 143 (1992).
49. Rentier-Delrue F., Mande S. C., Moyens S., Terpstra P., Mainfroid V., Goray K., Lion M., Hol W. G. J., Martial J. A.: *J. Mol. Biol.* 229, 85 (1993).
50. Trimbur D. E., Gutshall K. R., Prema P., Brenchley J. E.: *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 4544 (1994).
51. Gutshall K. R., Trimbur D. E., Kasmir J. J., Brenchley J. E.: *J. Bacteriol.* 177, 1981 (1995).
52. Feller G., Narinx E., Arpigny J. L., Aittaleb M., Baise E., Genicot S., Gerday Ch.: *FEMS Microbiol. Lett.* 18, 189 (1996).
53. Gerike U., Russell N. J., Hough D., Danson M. J.: *Eur. J. Biochem.* 248, 49 (1997).
54. McKay D. B., Jennings M. P., Godfrey E. A., MacRae I. C., Rogers P. J., Beacham I. J.: *J. Gen. Microbiol.* 138, 701 (1992).
55. Kobori H., Sullivan C. W., Shizuya H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 6691 (1984).
56. Ingraham J. L., Bailey G. F.: *J. Bacteriol.* 77, 609 (1959).
57. Russell N. J.: *Trends Biochem. Sci.* 9, 108 (1984).
58. Russell N. J., v knize: *Microbial Lipids* (Ratledge C., Wilkinson S. G., ed.), kap. 8. Academic Press, London 1989.
59. Kates M.: *Techniques of Lipidology*, 2. vydání. Elsevier, New York 1988.
60. Bhakoo M., Herbert R. A.: *Arch. Microbiol.* 126, 51 (1980).
61. Ratledge C., Wilkinson S. G.: *Microbial Lipids*. Academic Press, London 1988.
62. Okujama H., Okajima N., Sasaki S., Higashi S., Murata N.: *Biochim. Biophys. Acta* 1084, 13 (1991).
63. Baxter R. M., Gibbons N. E.: *Can. J. Microbiol.* 8, 511 (1962).
64. Rose A. H., Evison L. M.: *J. Gen. Microbiol.* 38, 131 (1965).
65. Fukunaga N., Russell N. J.: *J. Gen. Microbiol.* 136, 1669 (1990).
66. Burini J. F., Gugi B., Merieau A., Guespin-Michel J. F.: *FEMS Microbiol. Lett.* 122, 13 (1994).
67. Wada H., Gombos Z., Murata N.: *Nature* 347, 200 (1990).
68. Wada H., Gombos Z., Murata N.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 4273 (1994).
69. Jones P. G., Inouye M.: *Mol. Microbiol.* 11, 811 (1994).
70. Russell N. J., Hamamoto T., v knize: *Extremophiles: Microbial Life in Extreme Environments* (Hirikoshi K., Grant W. D., ed.), kap. 2. Wiley-Liss, New York 1997.
71. Schindelin H., Marahiel M. A., Heinemann U.: *Nature* 364, 164 (1993).
72. Jones P. G., Krah R., Tafuri S. R., Wolffe A. P.: *J. Bacteriol.* 174, 5798 (1992).
73. Tanabe H., Goldstein J., Yang M., Inouye M.: *J. Bacteriol.* 174, 3867 (1992).
74. Lundheim R., Zachariassen K. E., v knize: *Extremophiles: Microbial Life in Extreme Environments* (Hirikoshi K., Grant W. D., ed.), kap. 5. Wiley-Liss, New York 1997.
75. Whyte L. G., Inniss W. E.: *Can. J. Microbiol.* 38, 1281 (1992).
76. Lottering E. A., Sneips U. N.: *Curr. Microbiol.* 30, 193 (1995).
77. Kolenc R. J., Inniss W. E., Glick B. R., Robinson C. W., Mayfield C. I.: *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 638 (1988).
78. Margesin R., Schinner F.: *J. Biotechnol.* 33, 1 (1994).
79. Koch A. K., Kappeli O., Fiechter A., Reiser J.: *J. Bacteriol.* 173, 4212 (1991).

80. Margesin R., Schinner F.: *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2660 (1997).
81. Whyte L. G., Bourbonniere L., Greer Ch. W.: *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3719 (1997).
82. Atlas R. M.: *Microbiol. Rev.* **45**, 180 (1981).
83. Bahn M., Schmid R. D., v knize: *Biotec 1* (Hollengerg C. P., Sahm H., ed.), kap. 9. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart 1987.
84. Brenchley J. E.: *J. Ind. Microbiol.* **17**, 432 (1996).
85. Herbert R. A.: *Trends Biotechnol.* **10**, 395 (1992).
86. Ring E., Sinclair P. D., Birkbeck H., Barbour A.: *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3777 (1992).
87. Li J., Lee T.-C.: *Trends Food Sci. Technol.* **6**, 259 (1995).
88. Gurian-Sherman D., Lindow S. E.: *FASEB J.* **7**, 1338 (1993).
89. Wolber P. K.: *Adv. Microb. Physiol.* **34**, 203 (1993).
90. Wolber P. K., Warren G.: *Trends Biochem. Sci.* **14**, 179 (1989).
91. Kajava A., Lindow S. E.: *J. Mol. Biol.* **232**, 709 (1993).
92. Murphy B. R.: *Bull. W.H.O.* **66**, 391 (1988).

M. Stibor and B. Králová (*Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Psychrophilic and Psychrotrophic Microorganisms, Their Adaptation and Utilization in Modern Technologies**

Cold-adapted (psychrotolerant and psychrophilic) microorganisms are distinguished from mesophiles by their ability to grow at low temperatures. They are widely distributed in nature and they have evolved a complex range of adaptations enabling them to grow and survive in cold environment. Adaptation changes include both enzymes present in the microorganisms and lipids forming cell membranes. Due to their unique properties, cold-active enzymes are used in several biotechnological applications (detergents, biotransformations, contact lens cleaning, hydrolysis of lactose in milk). Of the lipids, polyunsaturated fatty acids serve as dietary supplements in food industry. Current knowledge of cold-adapted microorganisms indicates their high biotechnological potential for the future.