

Jaroslav Koloušek a Miroslav Závorka:

Sinice *Anabaena cylindrica* Lemmermann s hlediska obsahu aminokyselin.

(Zpráva z katedry půdoznalství, agrochemie a agrometeorologie Vysoké školy zemědělské, v Praze.)

Mezi organismy, majícími značný hospodářský význam, a které byt přímo přispívají k výživě lidí a zvířat, zaujímají neposlední místo bakterie, symbiotická rhizobia a některé sinice, a to proto, že jsou nadány schopností poutat vzdušný dusík. I když schopnost vázat vzdušný dusík není vlastností příliš rozšířenou, jsou uvedené organismy pro početně bohatý výskyt v příznivém prostředí, důležitým činitelem. Chemická reakce, pomocí kterých tyto mikroorganismy uskutečňují asimilaci atmosférického dusíku, je až dosud ve stadiu hypotes.

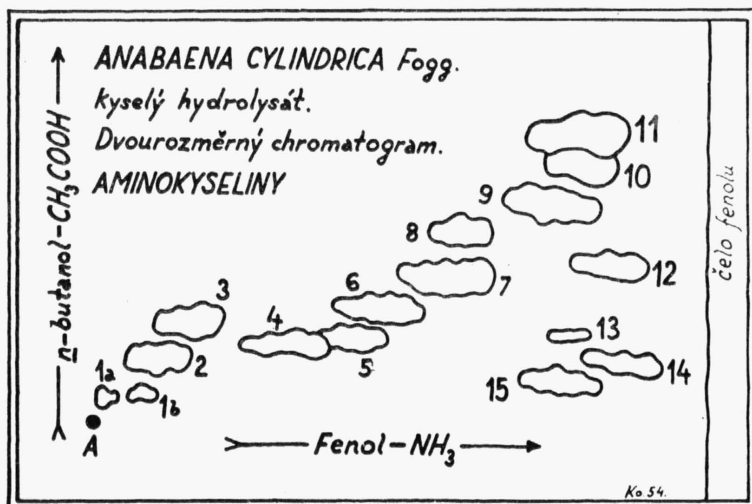
Zpráva, kterou předkládáme, je dílčí prací v problému fixace vzdušného dusíku s přihlédnutím k možnostem bezprostředního praktického využití megalokultury sinice *Anabaena cylindrica*. Práce podobného druhu byly již konány dříve (1, 2), ale neúplné a kusé zprávy a i hledisko, s jakého byly provedeny, nás přinutily, abychom učinili pokusy a rozborů vlastní a ověřili starší údaje (3).

K pokusům byla zvolena sinice *Anabaena cylindrica* Lemmermann proto, že je organismem autotrofním, rostoucím na čistě minerálním substrátě, snadno kontrolovatelného složení. Vzhledem k tomu, že její buňky jsou značně veliké, rostou v řetízkách, obdaných u sinic obvyklým slizem, lze Anabaenu odstředěním snadno oddělit od živného roztoku. (Pro sliz je jednoduchá filtrace nemožná.) Jelikož *Anabaena cylindrica* není řasou planktonní, která se vznáší výhradně volně ve vodě, nýbrž převážně lne slizem k předmětům, a poněvadž jsme zjistili předběžnými pokusy, že lze sklizeň zvětšit zvětšením povrchu, na kterém by řasa rostla, ponořili jsme do živného roztoku jemnou skleněnou vatu z resistantního pyrexového skla. Na skleněných vláknech vaty roste sinice neobyčejně rychle, takže k rozboru potřebné množství bylo získáno ve velmi krátké době (tři týdnů) a získaný materiál se skládal z buněk mladých, nerozpadlých nebo jinak stářím pozměněných.

K pokusům použitá čistá kultura řasy byla získána před několika lety ze Sbírký autotrofních organismů ČSAV.

Sinice byla pěstována po řadu let na bezdusíkatém substrátě. K pokusům jsme použili živný roztok doporučený Foggem (4) a užívaný s malým doplněním v ústavu rostlinné fyziologie university Karlovy (5). Přípravován byl z Merkových p. a. lučebním a redestilované vody, pH roztoku bylo 7,3. V 1 l takto připraveného roztoku nebyla nalezena ani stopa sloučeniny dusíku. Za vegetační nádoby sloužily 4 Fernbachovy 2 l baňky a každá obsahovala vedle zmíněné skleněné vaty 1 l živného roztoku. Jelikož pokus byl konán v zimě, byly baňky osvětlovány světlem 4 zářivek (à 40 W). Jejich světlo bylo

soustředěno reflektory na baňky tak, že intenzita světla v rovině hladiny roztoku byla velmi přibližně 5000 luxů. Osvětlováno bylo denně 16 hodin, teplota roztoku byla 22 °C ve dne a 17 až 18 °C v noci. Umělé osvětlení zářivkami se nám velmi osvědčilo při rozmanitých pokusech s kulturami zelených rostlin, neboť je prakticky studené, zářivky lze snadno uspořádat tak, aby osvětlení bylo stejnoměrné a je vcelku hospodárnější než starší osvětlení žárovkami; konečně odpadá komplikace odfiltrovávání tepelného záření žárovek vodním pláštěm.



Jako inokula bylo užito několika trichomů kultury, jejíž čistota byla bezprostředně vyzkoušena hlavně na přítomnost azotobaktera, obvyklými způsoby (6), (7) a na živné půdě s manitem.

Za 21 dní bylo množství sinic dostatečné, aby mohlo sloužit rozboru. Při mikroskopické kontrole kultur nebyly nalezeny žádné buňky uhynulé a jejich vzhled byl zdravý. Odstředěním byl oddělen živný roztok od skleněné vaty se sinicí, propláchnut jednou trochou redestilované vody, znovu odstředěn a vše rozestřeno v achátové misce a vpraveno do skleněných trubice, přidáno 6 n kyseliny chlorovodíkové. Po zatavení byly trubice zahřívány 48 hod. na 105 °C. Spojené hydrolyzáty byly vysušeny, aby byly zbaveny kyseliny chlorovodíkové ve vakuu, chromatografovány dvourozměrně na papíru Whatman 1 za použití systémů fenol-voda v atmosféře 3% amoniaku, v druhém směru bylo chromatografováno v n-butanolu-kyselině octové a vodě.

K identifikaci bylo užito standardních roztoků čistých aminokyselin. Podrobnosti chromatografické metodiky rozboru byly popsány jedním z autorů již dříve (8). Tryptofán byl stanoven v alkalickém hydrolyzátu (hydroxydu barnatého) detekcí kyselinou glyoxalovou. V hydrolyzátu byly nalezeny aminokyseliny, jak jsou uvedeny v mapě chromatogramu a v přehledu spolu s přehledem aminokyselin obsažených v seně vojtěšky, jetele červeného a kopřivy dvoudomé (semikvantitativní stanovení).

Ze získaných výsledků je patrné, že sinice *Anabaena cylindrica* může být pěstována po mnoho let v absolutně čisté kultuře, a to na čistě minerálním

substrátu neobsahujícím žádnou sloučeninu dusíku (substrát obsahoval pouze rozpuštěný vzdušný dusík nebo stopy dusíku z agaru). Sinice pěstovaná za shora uvedených podmínek ukázala schopnost poutat vzdušný dusík a produkovat vysoce hodnotnou bílkovinu, která s hlediska počtu a množství aminokyselin se rovná bílkovině našich nejlepších píceňin, t. j. vojtěšky, jetele červeného a kopřivy dvoudomé (s výjimkou kyseliny γ -aminomáselné, která nebyla v sinici nalezena).

Závěr

S hlediska obsahu aminokyselin bylo by lze zařadit sinici *Anabaena cylindrica* mezi rostliny, které poskytují nejhodnotnější bílkovinné krmivo hospodářských zvířat, vojtěšku a jetel červený. Srovnáním výsledků Fowdena (3) s výsledky uvedenými v této zprávě ukazuje, že oba užité klony sinice dovedou ze vzdušného dusíku tvořit bílkovinu o skoro stejném obsahu aminokyselin.

Přehled aminokyselin nalezených semikvantitativním stanovením v sinici *Anabaena cylindrica* F o g g (v čerstvém stavu) a v senech vojtěšky seté, jetele červeného a kopřivy dvoudomé. (Čísla znamenají: 1 – nejméně, 2 – dvakrát tolik co – 1 atd. až 5 – znamená nejvíce.)

Aminokyseliny	V h y d r o l y s á t u			
	<i>Anabaena cylindrica</i>	vojtěšky	jetele červeného	kopřivy dvoudomé
Cysteinová kys.	2	2	2	2
Asparagová kys.	5	5	5	5
Glutamová kys.	5	5	5	5
Serin	5	3	4	5
Glycin	4	3	4	5
Threonin	4	3	4	5
α -alanin	5	5	5	5
Tyrosin	3–4	1	—	—
γ -aminomáselná kys.	—	Jen v extraktech v hydrolysátech nebyla nalezena		
Valin + methionin	5	4	4	4
Fenylalanin	3	2	2	4
Leucin + iso-leucin	5	4	4	5
Prolin	3	3	2	4
Histidin	—	2	2	2
Metioninsulfoxyd	1	—	—	—
Arginin	4	3	3	3
Lysin	4–5	3	3	4–5

Tryptofan byl dokázán ve všech uvedených rostlinách

Aminokyseliny v kyselém hydrolysátu (6 n HCl, 105 °C, 48 hod.) z řasy *Anabaena cylindrica* L e m., dvourozměrný chromatogram. Rozpouštěcí systémy: 1. fenol-voda-NH₃, 2. n-butanol-kys. octová-voda. A – místo nakapání hydrolysátu. Aminokyseliny: 1. a, b cysteinová kys., 2. asparagová kys., 3. glutamová kys., 4. serin, 5. glycin, 6. threonin, 7. α -alanin, 8. tyrosin, 9. valin + methionin, 10. fenylalanin, 11. leucin + iso-leucin, 12. prolin, 13. methioninsulfoxyd, 14. arginin, 15. lysin. Barva skvrn je červeno-fialová, nebo fialová mimo prolinu (č. 12), který je žlutý. Detekováno ninhydrinem.

Literatura

- (1) W a t a n a b e A. (1951): Production in Cultural Solution of Some Amino-Acids by the Atmospheric Nitrogen-Fixing Blue-Green Algae. — Arch. Biochem. Biophys. 34, pp. 50–55.

- (2) Coulson, B. C. (1953): Amino-Acids of Marine Algae. — Chemistry and Industry, pp. 971—972.
- (3) Fowden, L. (1951): Amino-Acids of Certain Algae. — Nature 167, pp. 1030—1031.
- (4) Fogg, G. E. (1942): Studies on Nitrogen Fixation by Blue-Green Algae. — Journal of Experimental Biology 19, pp. 78—87.
- (5) Prát, S. (1948): Algarum, Hepaticarum Muscorumque in culturis collectio. — Plantarum Physiologiae institutum Universitatis Carolinae. Preslia XXII—XXIII : 61—72.
- (6) Pringsheim, E. G.: (1946): Pure Cultures of Algae. Their Preparation and Maintenance. — Cambridge at the University Press, p. 70.
- (7) Taylor, C. B. (1940): Bacteriology of Fresh Water. — J. Hyg. Camb. 40, p. 616.
- (8) Koloušek, J. a Coulson, C. B. (1952): Zpráva o aminokyselinách v seně píenín. — Chem. listy 46, pp. 186—189.
- (9) Koloušek - Lautner - Müller (1954): Příspěvek k poznání chemického složení a fyziologických vlastností kopřivy dvoudomé (*Urtica dioica*) ve vztahu k výživě hospodářských zvířat. — Sborník ČSZA V, serie A, 27, pp. 113—144.

Я. Колоушек и М. Зазворка:

Синезеленая водоросль (*Anabaena cylindrica*) с точки зрения содержания аминокислот

По содержанию аминокислот знабены (*Anabaena cylindrica*) можно приравнять к растениям, дающим наиболее ценные белковые корма для сельскохозяйственных животных, к люцерне и клеверу. Сравнение результата Фаудена (Fowden) с результатами приведенными в этой работе показывает, что оба типа знабены, употребляемые при исследовании, вырабатывают белки почти одинакового аминокислотного содержания.

J. Koloušek - H. Zázvorka:

Nutritive value of aminoacids content in blue-green alga *Anabaena cylindrica*

As far as aminoacids occurrence it is possible to number *Anabaena cylindrica* among plants such as alfaalfa and red clover, supply the most valuable protein feeding-stuff for domestic animals. Comparison of results obtained by Fowden (3) the results reported in this paper shows, that both clons of *Anabaena* used formed protein of the same aminoacids content.