

**UNIVERZITA KARLOVA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Tatiana Smidová

Aktivity oxidačných enzýmů v jedlých hubách oddelenia *Basidiomycota* a ich
bioremediačný potenciál
Activities of oxidative enzymes in edible fungi of division *Basidiomycota* and their
bioremediation potential

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Ing. Ludmila Martínková, DSc.

Praha 2019

Prehlásenie:

Prehlasujem, že som záverečnú prácu spracovala samostatne a že som uviedla všetky použité informačné zdroje a literatúru. Táto práca ani jej podstatná časť nebola predložená k získaniu iného alebo rovnakého akademického titulu.

V Praze, 13.8.2019

Podpis:

Ďakujem pani školiteľke Ing. Ludmile Martínkovej, DSc., konzultantke za jej cenné rady,
trpezlivosť, ochotu a čas.

Abstrakt

Práca sa zaoberá potenciálnym využitím húb oddelenia *Basidiomycota* na bioremediáciu. Rôzne druhy húb tohto oddelenia obsahujú rozličné enzýmy, ako sú lakáza alebo tyrozináza, ktoré môžu byť efektívne pri čistení životného prostredia. Ako vhodný zdroj týchto enzýmov sa ukázal byť zvyšný substrát po pestovaní húb. Nové metódy získavania enzýmov by mohli znížiť náklady na ich použitie na bioremediáciu a zvýšiť ich dostupnosť pre komerčné použitie.

Kľúčové slová: *Basidiomycota*, bioremediácia, lakáza, tyrozináza, extrakcia enzýmov

Abstract

The topic of the thesis is the potential use of fungi of the phylum *Basidiomycota* for bioremediation. Various species of this phylum contain enzymes such as laccase or tyrosinase that can be useful for the environment management. The residual substrate after fungi cultivation can be an efficient source of these enzymes. New methods of enzymes extraction could lower the costs of their usage for bioremediation as well as increase their availability for the commercial use.

Keywords: : *Basidiomycota*, bioremediation, laccase, tyrosinases, enzyme extraction

Obsah

Abstrakt	4
Obsah.....	6
Zoznam použitých skratiek	7
1 Výskyt, taxonómia a význam húb	8
2 Priemyselné pestovanie jedlých húb	13
3 Polyfenoloxidázy u priemyselne pestovaných jedlých húb	16
3.1 Lakáza	16
3.2 Tyrozináza	21
4 Získavanie enzýmov z plodníc a odpadov	25
5 Biodegradácia.....	27
Záver.....	29
Bibliografický zoznam	30

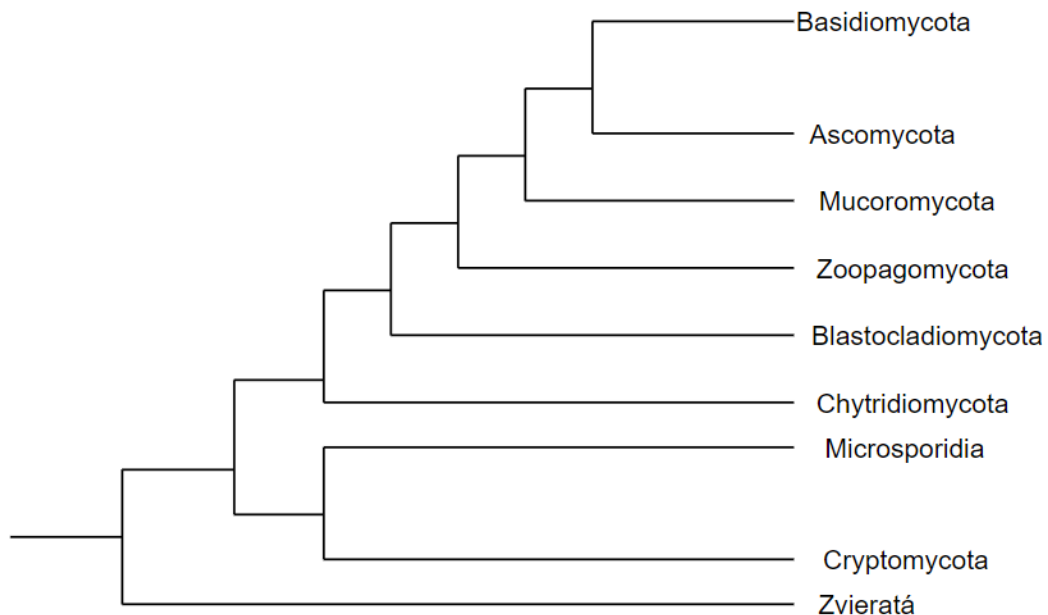
Zoznam použitých skratiek

SCGI	soil clone group I
EC	číslo EC (enzyme comission number)
EPR	elektrónová paramagnetická rezonancia
ABTS	2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)
CotA	endospore coat protein
L-DOPA	L-3,4-dihydroxyfenylalanín
PEG	polyethylénglykol
ATPS	dvojfázový vodný systém (aqueous two-phase system)
BPA	bisfenol A
UV-VIS	ultrafialová- viditeľná spektrofotometria

1 Výskyt, taxonómia a význam húb

Dlho sa diskutovalo o tom, ktoré organizmy sa dajú považovať za huby. Pri zahrnutí plesní, kvasiniek, snetí alebo hřívov sa táto ríša počtom zástupcov vyrovnáva živočíchom a dokonca prekonáva aj ríšu rastlín. Z tejto ríše pochádza aj mnoho dôležitých modelových organizmov, ako napríklad *Saccharomyces cerevisiae* alebo *Penicillium chrysogenum* (Blackwell, 2011) .

Priebežne sa taktiež mení názor na predpokladaný počet druhov húb. V minulosti sa tento počet odhadoval na 100 000 druhov (Blackwell, 2011) alebo 250 000 druhov, v roku 1991 bolo na základe pomeru húb a rastlín predpokladaných približne 1,5 milióna druhov. Keďže veľa geografických lokalít je zatiaľ nedostatočne preskúmaných, vzrástol odhad množstva nových druhov húb na 3,5 až 5 miliónov (Blackwell, 2011) .



Obr. 1. Phylogenetický strom húb. Upravené podľa http://www.davidmoore.org.uk/21st_Century_Guidebook_to_Fungi_PLATINUM/Ch02_08.htm

Huby majú schopnosti znášať rôzne životné podmienky, a to im umožňuje prežiť v takmer všetkých oblastiach. Jediné organizmy, ktoré majú lepšie predispozície znášať extrémne podmienky, sú baktérie. Predpokladá sa, že tropické regióny sveta obsahujú najväčšiu rôznorodosť skupín organizmov (Blackwell, 2011), a ešte stále prebieha výskum konkrétnych oblastí. Jedna skupina výskumníkov, študujúca oblasť Guyanskej vysočiny, dokázala za 11 rokov popísať dva nové rody a okolo 50 nových druhov húb, a predpokladá sa, že v rámci tohto, v súčasnosti ešte stále prebiehajúceho výskumu bude objavených okolo 500 nových druhov ektomykorhíznych húb, čo je dôkazom veľkej druhovej rozmanitosti v tomto tropickom regióne (Blackwell, 2011).

Veľká diverzita húb je taktiež v miernom podnebnom pásme. Tomu, že by sa aj v týchto podnebných podmienkach mohlo nachádzať mnoho dosiaľ nepopísaných húb, nasvedčujú štúdie vzduchu zvnútra budov, kde bola dokázaná vyššia miera druhovej rozmanitosti než v iných podnebných pásmach. Niektoré novoobjavené druhy by mohli potenciálne nájsť využitie vo výrobe liečiv, podobne ako v minulosti napríklad *Penicillium chrysogenum*, produkujúce liečivo penicilín, alebo *Tolyptocladium inflatum*, produkujúce imunosupresívum cyklosporín (Blackwell, 2011).

Huby sa nachádzajú aj v regiónoch s nízkymi teplotami, ako nasvedčuje zhoršený stav obydľí zo začiatku 20. storočia, postavených pre arktických objaviteľov, zapríčinený hubami (Blackwell, 2011). Lišajníky sa pomerne často vyskytujú v arktických a antarktických oblastiach a kvasinky vykazujú aktivitu aj v polárnych podmienkach Antarktídy. Niektoré druhy týchto kvasiniek sa nachádzajú aj v podmienkach líšiacich sa od polárneho podnebného pásma, napríklad v morských hĺbinách alebo v priesakoch ropy a zemného plynu na zemský povrch.

Mykorhízne huby a rastliny majú medzi sebou dôležitý vzťah, často nevyhnutný pre existenciu oboch organizmov (Blackwell, 2011). Huby pomáhajú rastlinám získavať vodu, dusík, fosfor a ďalšie živiny z pôdy, a pravdepodobne pomáhajú aj s ochranou koreňového systému. Bez hostiteľa by mykorízne huby nedokázali rásť, keďže má významnú rolu v ich vyživovaní. Z dvoch hlavných typov mykoríz je arbuskulárna mykoríza tá rozšírenejšia. Pri

tomto type mykorhízy vnikajú hýfy priamo do buniek koreňa. Druhý typ je ektomykoríza, pri ktorej nevnikajú hýfy dovnútra buniek a vytvárajú na povrchu hýfový plášť.

Endofyty sú huby, ktorými sú napadnuté takmer všetky rastliny na Zemi, ale ktoré týmto rastlinám nespôsobujú chorobné príznaky. Vyskytujú sa medzi bunkami nadzemných častí rastlín. Medzi endofytické huby sa radí veľký počet taxonomických skupín. Niektoré trávové endofyty sú príbuzné parazitom hmyzu a húb, a veľký počet ich druhov produkuje alkaloidy toxické pre hmyz a ďalšie bezstavovce aj stavovce. Miestami s výnimočne vysokou druhovou rozmanitosťou endofytických húb sú predovšetkým lesy v tropickom pásme, kde je možné nájsť až niekoľko stoviek týchto húb na jeden druh stromu. Je dokázané, že endofyty môžu efektívne chrániť listy napadnutých rastlín pred patogénmi a následnou infekciou (Blackwell, 2011).

Na rozdiel od endofytov, patogény spôsobujú preukázateľné symptómy chorôb. Existuje veľké množstvo rastlinných patogénov, väčšina z nich Ascomycota a Basidiomycota. Veľký význam má výskum nových, doposiaľ nepopísaných druhov patogénov, ktoré sú často objavené až spolu s pokročilými príznakmi ich infekcie, ako tomu bolo napríklad u patogénu spôsobujúceho grafiózu brestu. Predpokladá sa, že veľa doteraz neznámych druhov patogénov sa nachádza v exotických oblastiach. Zatiaľ čo ale tieto patogény v ich pôvodnom prostredí spôsobujú svojim hosťom len minimálne až mierne príznaky a často zostávajú nepovšimnuté, po prenose do iných regiónov je vysoká pravdepodobnosť ničivých následkov ich výskytu.

Huby hmyzu a článkonožcov sú v súčasnosti stále preskúvané nedostatočne. Podľa odhadov by mohlo existovať medzi 20 000 až 50 000 druhov týchto húb (Blackwell, 2011). Niektoré z týchto druhov sú biotrofné parazity napádajúce živý hmyz, zatiaľ bolo objavených a popísaných cca 2000 druhov. Parazitické huby hmyzu sa vyznačujú špecifickým životným cyklom, a vyžadujú špeciálne metódy odberu z hostiteľa a prípravy na kultiváciu. Veľa druhov *Laboulbeniomyces* sa našlo na dospelých chrobákoch alebo muchách a noví hostitelia z radu článkonožcov sú stále objavovaní (Blackwell, 2011). Medzi nekrotrofických parazitov hmyzu sa radia Chytridiomycota, Blastocladales, Entomophthorales a Tubeufiaceae (Blackwell, 2011). Tieto huby sa môžu vyskytovať taktiež ako symbiotické kvasinky v črevách hmyzu, kde hosťovi poskytujú enzýmy alebo

vitamíny. Hmyz môže predstavovať aj potravu pre huby, predovšetkým v prostrediach s nízkym obsahom dusíka. Niektoré huby produkujú látky toxické pre ich korisť, iné zase využívajú návnady a pasce na polapenie hmyzu, háďatok alebo iných bezstavovcov.

Veľké množstvo rôznych druhov húb obsahuje najmä pôda. Pôdne huby a baktérie sú dôležité v biogeochemických cykloch (Blackwell, 2011). Ich výskyt je koncentrovaný do blízkosti organickej hmoty, ako sú korene. V súčasnosti je objavovaný veľký počet nových druhov pôdných húb pomocou molekulárnych metód a predpokladá sa, že značné množstvo druhov čaká na objavenie. Aj napriek tomu, že sú rodové línie húb už relatívne vyčerpávajúco preskúmané, napríklad vďaka enviromentálnemu DNA sekvenovaniu, pôdne prostredie vďaka aktívne prebiehajúcemu výskumu nových druhov môže priniesť nové objavy, ako napríklad Soil clone group I (SCGI). SCGI je veľká rodina húb, ktorá sa vyskytuje v subtropických a tropických pôdach, ale nikto ešte nevidel a neizoloval žiadny druh z tejto kultúry (Blackwell, 2011).

Svoje zastúpenie majú huby aj vo vode, či už sú to sladkovodné prostredia alebo moria. Ich askospóry majú privesky a lepkavé puzdro na spóry, ktorým sa prichycujú na substrát. Sladkovodné huby sú v prevažnej väčšine saprofytické, môžu sa podieľať napríklad na rozklade opadaného lístia vo vodných tokoch a plochách, ale v niektorých prípadoch so sebou prinášajú negatívne dopady na ekosystém, ako napríklad v prípade *Batrachochytrium dendrobatidis*, ktorý spôsoboval chorobu chytridiomykózu, ktorá decimovala svetovú populáciu obojživelníkov. Väčšina morských húb sú *Ascomycota* a *Basidiomycota*, ale v špecifickom hlbokomorskom hydrotermálnom prostredí bola objavená aj doposiaľ neznáma rodová línia chytridov (Blackwell, 2011). Niektoré morské kvasinky degradujú uhľovodíkové zlúčeniny v podvodných priesakoch a výtokoch (Blackwell, 2011).

V minulosti sa huby poznávali najmä podľa fenotypu a morfológických znakov. Na rozlíšenie rôznych druhov sa používali testy kríženia. Schopnosť kríženia sa ale považuje za zastaralý znak, keďže sú dôkazy o vzniku bariér proti kríženiu.

Za posledné desaťročia ale rozmach molekulárnych metód, najmä DNA sekvenovanie, umožnil rekonštrukciu evolučných vzťahov a spôsobil revolúciu v procese klasifikácie organizmov (Jayasiri et al., 2005). Identifikácia podľa morfológických znakov je ale veľmi

subjektívna, a hoci tvorí základ taxonómie, čoraz častejšie sa využívajú práve molekulárne metódy.

Existuje mnoho databáz, ktoré umožňujú prehľad húb a poskytujú potrebné informácie, ako napríklad *Index Fungorum* s viac ako 370 000 názvami húb (Jayasiri et al., 2005), *Mycobank*, ktorá poskytuje mnoho novinek z nomenklatúry, ako aj popis a ilustrácie (Jayasiri et al., 2005), alebo *GenBank* s najrozsiahlejšou voľne dostupnou zbierkou nukleotidových a proteínových sekvencií (Jayasiri et al., 2005).

Význam húb pre prírodu aj človeka má pozitívne aj negatívne aspekty. Hoci majú huby relatívne malú výživovú a energetickú hodnotu, nachádzajú využitie ako potravina najmä vďaka ich výraznej chuti, ale aj kvôli vysokému obsahu esenciálnych aminokyselín a minerálnych látok (Kalina a Váňa, 2005). Ďalej sa používajú v biotechnológiách, pri výrobe antibiotík, ako napríklad penicilín, alebo produkujú mnoho rôznych ďalších látok využiteľných vo farmácii s cytostatickými účinkami, napríklad triterpenický alkohol betulín z *Piptoporus betulinus* alebo polysacharid lentinan z *Lentinus edodes*. V neposlednom rade predovšetkým v regióne strednej Európy sa zber húb považuje za oddychovú voľnočasovú aktivitu.

2 Priemyselné pestovanie jedlých húb

Už tradične majú huby význam hospodárskeho artiklu, ktorý predovšetkým v posledných desaťročiach vzrástol s novými objavmi napríklad vo farmaceutickom priemysle. Len v roku 2013 činil zisk z ich predaja niekoľko desiatok miliárd dolárov, či už sú to jedlé huby, huby používajúce sa na výrobu liečiv, alebo iné druhy s rôznymi funkciami. Napríklad len medzi rokmi 1997 až 2013 vzrástla svetová spotreba jedlých húb z 1 kg na 4,7 kg (Grimm D., et al., 2018). Medzi najviac pestované huby patria napríklad shiitake (*Lentinula*), hliva (*Pleurotus*), šampiňóny (*Agaricus*) alebo uchovec (*Auricularia*).

Jedlé kultivované huby sú plodnice saprobných basidiomycot. Tieto huby sa radia do skupín primárnych, sekundárnych alebo terciárnych rozkladačov. Toto rozdelenie reprezentuje postupnosť rozkladu organických materiálov od ligninocelulózy až po pôdu. Skupina primárnych rozkladačov sa zameriava na degradáciu celulózy, lignínu a iných zložiek rastlinného materiálu, a nie sú závislé na metabolitoch iných organizmov. Do tejto skupiny patria napríklad huby *Lentinula edodes* alebo *Pleurotus ostreatus*. Sekundárny rozkladači, ako napríklad *Agaricus bisporus*, sa nachádzajú najmä v kompostoch, a terciárnych rozkladačov, ako *Agrocybe* spp., možno nájsť v pôde.

Pri veľkoprodukcii môžu byť huby pestované na rôznych substrátoch. Skupina primárnych rozkladačov môže použiť ako substrát materiály obsahujúce celulózu a lignín, ako sú napríklad kukuričné klasy, slama, bavlna alebo papier (Grimm D., et al. 2018). Najstaršia metóda pestovania týchto húb pochádza pravdepodobne z Číny, kde sa pestovanie húb na dreve dokázateľne praktizuje už minimálne tisíc rokov. V súčasnosti je ale táto technika nahradzovaná efektívnejšou metódou pestovania na “umelom kmeni”. Týmto pojmom označujeme plastové vrece obsahujúce pilinový substrát doplnený o živiny. Po vybalení vrecia drží substrát pokope práve mycélium. Ďalšia, podobná technika, známa ako pilierová kultúra, využíva opäť vrecia z plastických materiálov naplnené substrátom, ktoré sú ale zavesené zo stropu. Do týchto vriec sú spravené diery, aby sa umožnilo hubám produkovať plodnice. Touto metódou sa pestuje napríklad *Pleurotus ostreatus*.

Sekundárne rozkladače, ako napríklad *A. Bisporus*, môžu byť pestované na nekompostových substrátoch ako kukuričné klasy. Štandardne sú ale pestované na

dvojfázovo fermentovanom komposte s druhou vrstvou, napríklad rašelinou, ako puzdrom. Toto puzdro podporuje prístupnosť vody (Grimm D., et al. 2018) a jeho bakteriálna aktivita pravdepodobne odstraňuje prchavé látky, ktoré tlmia produkciu plodníc (Grimm D., et al. 2018). Pri tejto technike pestovania sa substrát skladá prevažne z materiálu na rozklad, ako cukrová trstina alebo zvierací hnoj, aktivátorov kompostu ako sójové otruby alebo semená bavlny, a anorganických modifikátorov ako vápno alebo sadra. Voľba konkrétneho substrátu závisí od lokálnej dostupnosti surovín.

Prvá fáza kompostovania trvá 3-6 dní a je spojená s rastom teploty na 80 °C vďaka mikrobiálnej aktivite. Metabolická aktivita teplomilnej mikroflóry vytvára selektívnejší substrát pre *A. Bisporus* (Grimm D., et al. 2018). Druhá fáza má premenlivé teploty od 45 °C do 60 °C. Zmeny teplôt počas tohto procesu ovplyvňujú mikroflóru za zníženia hladiny amoniaku v substráte. Produkty metabolizmu enzýmov týchto húb sú využité baktériami na ich rast, pričom hubám poskytujú molekuly, ktoré im chýbajú, ako napríklad vitamíny.

Zvyšný substrát po pestovaní húb môže byť využitý viacerými spôsobmi, napríklad v procese jeho horenia sa uvoľňuje energia. Boli snahy spracovať substrát spaľovaním, pyrolýzou alebo splyňovaním (Grimm D., et al. 2018). Najefektívnejšou z týchto možností sa ukázalo byť spaľovanie, keďže je schopné sa udržiavať bez cudzej pomoci a vyprodukované teplo by mohlo byť použité na vykurovanie alebo ako zdroj energie. Pyrolýza produkuje zmes palív v pevnom, kvapalnom a plynnom skupenstve. Proces splyňovania zatiaľ napriek snahám nebol úspešný. Tieto metódy získavania palív zo substrátu sa ale ukazujú ako kapacitne nedostatočné pre produkciu energie pre väčší počet odberateľov.

Ďalšou možnosťou využitia substrátu sa ukázala byť výroba metánu v zmesi s kravský hnojom. Tento výťažok bol väčší než z jednotlivých zložiek osamote (Grimm D., et al. 2018). Substrát môže byť použitý aj na produkciu cukrov pre výrobu bioethanolu. Skúmané boli substráty obsahujúce slamu, kukuričné klasy alebo semená bavlny. Enzymatickou hydrolýzou bol dosiahnutý výťažok vyše 40 % xylózy a takmer 100% glukózy, čo je okolo 300 mg cukru na gram substrátu.

Substrát je možné efektívne použiť aj na zúrodňovanie pôdy a nahradiť tak anorganické hnojivá, na ktorých je súčasné poľnohospodárstvo vysoko závislé. Aj napriek tomu, že neobsahuje také vysoké hodnoty dusíku, fosforu a draslíku ako minerálne hnojivá, umožňuje rastlinám lepšie tieto živiny využiť vďaka pomalšiemu uvoľňovaniu (Grimm D., et al. 2018). Medzi ďalšie výhody použitia substrátu ako hnojiva patrí zlepšenie štruktúry pôdy, zvýšenie obsahu organickej zložky, vyššia vodná kapacita, mikrobiologická aktivita a vyššia teplota pôdy. Na rozdiel od anorganických hnojív taktiež zvyšuje hodnoty obsahu pôdneho fosforu, draslíku, vápniku a horčíku, ako aj organického uhlíku a dusíku. Miera efektivity tohto spôsobu zúrodňovania pôdy ale závislá na správnom dávkovaní. Okrem pestovania rastlín môže byť substrát použitý na kultiváciu ďalších jedlých húb, napríklad *Pleurotus sajor-caju* alebo *Agaricus blazei*.

Substrát z pestovania húb je tiež zaujímavým zdrojom potravy pre hmyz, ktorý je najväčšia skupina hubožravcov v prírode. Tomuto spôsobu kŕmenia hmyzu sa zatiaľ nedostáva veľká pozornosť aj napriek perspektíve využitia hmyzu ako potenciálneho zdroja proteínov v ľudskej potrave. Mycélium hrá významnú rolu aj v životnom cykle mnohých druhov hmyzu. Substrát sa používa aj ako zložka potravy pre ryby, hydiny alebo prasatá. Kŕmenie rýb a hydiny hubami môže dokonca pozitívne vplývať na ich imunitný systém. Podávanie extraktu z húb *Lentinula edodes* zvýšilo životnosť rýb pri infekcií bakteriálnym patogénom, podobné prospešné účinky malo aj na zdravie hydiny (Grimm D., et al. 2018).

3 Polyfenoloxidázy u priemyselne pestovaných jedlých húb

Huby produkujú enzýmy, ktorých úlohou je degradácia ich substrátu, aby mohol byť využitý ako živiny. Tieto enzýmy môžu byť extrahované zo substrátu a využité v produkcii biopaliva a bioplynu (Grimm D., et al. 2018). Ich výroba je ale nákladná, predstavuje 40-87% predajnej ceny biopaliva, čo by mohlo byť znížené kratšou fermentáciou a jednoduchšou prípravou enzýmov. Enzýmy zo substrátu by mohli byť dobrou alternatívou, keďže nie je potrebná fermentácia a aj ich extrakcia nevyžaduje tak náročnú techniku. Môžu byť použité priamo alebo v kombinácii s enzýmami z iných zdrojov. Medzi tieto enzýmy patria napríklad lakáza, celulóza, lignín, peroxidáza, xylánáza alebo tyrozináza (Grimm D., et al. 2018).

3.1 Lakáza

Lakáza (benzendiolkyslík oxidoreduktáza, EC 1.10.3.2) je enzým, oxidáza katalyzujúca redukciu kyslíku na vodu. Jej typickým substrátom je *p*-difenol. Aktívne miesto lakázy obsahuje niekoľko atómov medi, ktoré katalyzujú oxidáciu molekúl substrátu a redukciu kyslíku na vodu. Atóm medi T1 je viditeľný pri použití spektrofotometrie pri vlnovej dĺžke 600 nm, atóm T3 pri 330 nm. Atóm medi T2 nie je viditeľný v absorpčnom spektre, ale dá sa merať pomocou EPR. Tento enzým je schopný oxidovať veľké množstvo substrátov vrátane nefeolových zlúčenín. Lakáza sa nachádza v rastlinách a vláknitých hubách, ale nájdeme ju aj u hmyzu a baktérií (Jořenek M., et al. 2013).

Redoxný potenciál miesta T1 rozdeľuje lakázy do troch skupín: skupina s nízkym redoxným potenciálom, so stredným redoxným potenciálom a s vysokým redoxným potenciálom. Redoxný potenciál určuje prítomnosť methionínu, fenylalanínu alebo leucínu pre koordináciu atómu medi T1. Lakázy rastlín a baktérií majú prevažne nízky a stredný redoxný potenciál, kým vláknité huby majú predovšetkým vysoký redoxný potenciál.

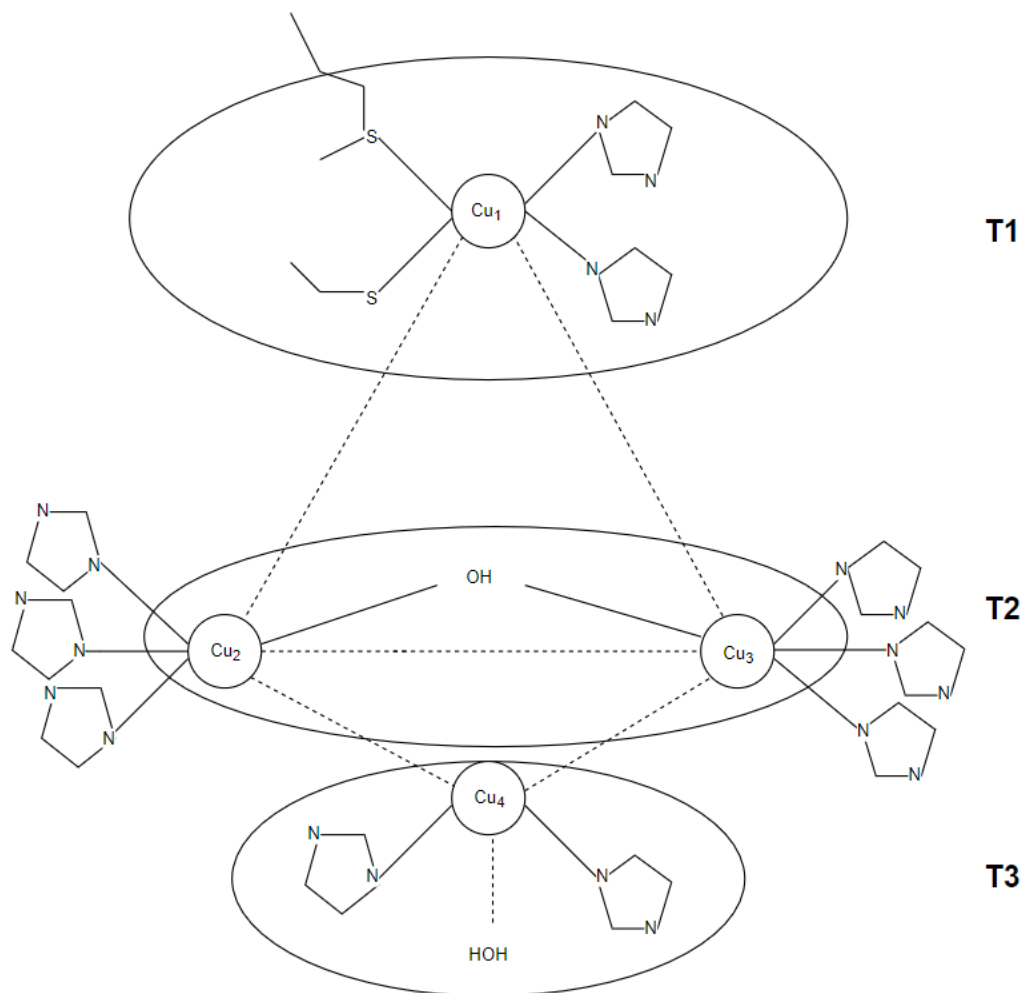
Prvýkrát bola lakáza nájdená v miazge japonského stromu *Rhus vernicifera*, ale obsahujú ju tiež napríklad mango, tabak, hrušky, javor klen, ale aj xylém topoľa. Rastlinné lakázy sú

zo všetkých druhov lakáz najviac glykosylované. V rastlinnom tele sa lakáza podieľa na polymerizácii lignínu tým, že katalyzuje homomolekulárnu dimerizáciu monolignolov, čím vznikajú dimery, ktoré následne môžu vytvárať oligoméry a polyméry lignínu. Okrem toho sa podieľa aj na regenerácii pletiva a oxidácii iónov železa z Fe^{2+} na Fe^{3+} .

Lakázu obsahujú aj vlákňité huby. U týchto húb sa lakáza podieľa na veľkom množstve rozličných funkcií, ako napríklad na degradácii biopolymérov, pigmentácii v časoch stresu, formovaní plodníc alebo na detoxifikácii zložiek obranného systému rastlín.

Lakázy sa vyskytujú aj u baktérií, hoci sú odlišné od tých, ktoré pochádzajú z húb. Majú väčšiu molekulárnu hmotnosť ako lakázy vlákňitých húb, sú intracelulárne a nie sú glykosylované. Sú aktívnejšie a stabilnejšie pri vysokých teplotách, vysokom pH a vyššej koncentrácii chloridových iónov a iónov medi. Keďže sa zúčastňuje na produkcii hnedého pigmentu, predpokladá sa, že jej funkcia je práve ochrana proti UV žiareniu a peroxidu vodíka.

Lakáza je charakteristická štyrmi atómami medi, ktoré sa líšia svojou absorbanciou vo viditeľnom svetle a signálom elektrónovej paramagnetickej rezonancie. Atómy medi sú rozdelené v troch oxidačných miestach T1-T3. Delenie atómov medi je podľa elektrónovej paramagnetickej rezonancie alebo podľa UV- VIS spektra. Atóm T1 je možné detekovať pomocou EPR aj spektrofotometrie. Má pokrivenú trigonálnu štruktúru kvôli dvom histidínom, methionínu a cysteínu. T2 je charakterizovaný obsahom dvoch histidínov a molekulou vody a je zachytiteľný pomocou EPR. T3 obsahuje dva atómy medi a šesť histidínov a je detekovaný pomocou spektrofotometrie. T2 a T3 vytvárajú spolu trojjadrový klaster.

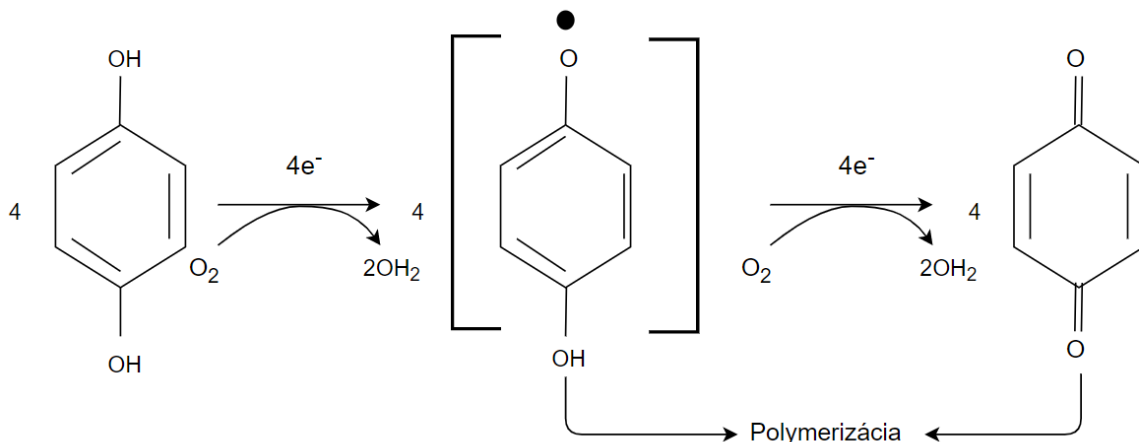


Obr. 2. Schéma štruktúry lakázy CotA z *Bacillus subtilis*. Upravené podľa Jořenek a Zajoncová, 2013.

Zo štruktúrneho hľadiska sú lakázy prevažne glykoproteíny. Ich cukornatú zložku tvoria z väčšej časti mannoza, *N*-acetylglukosamin a galaktóza. Lakázy z vlákнитých húb s nízkou molekulárnou hmotnosťou, nájdené napríklad u *Volvariella volvacea* a *Marasimus quercophilus*, majú štruktúru tvorenú tromi kupredoxinovými doménami. Každá z týchto domén má štruktúru β -skladaného listu, pričom β -skladané listy sú usporiadané do motívu Gréckeho kľúča. V doméne 3 leží atóm medi T1, kým atómy T2 a T3 ležia medzi doménou 1 a 3. Táto štruktúra je ďalej stabilizovaná disulfidovými mostíkmi.

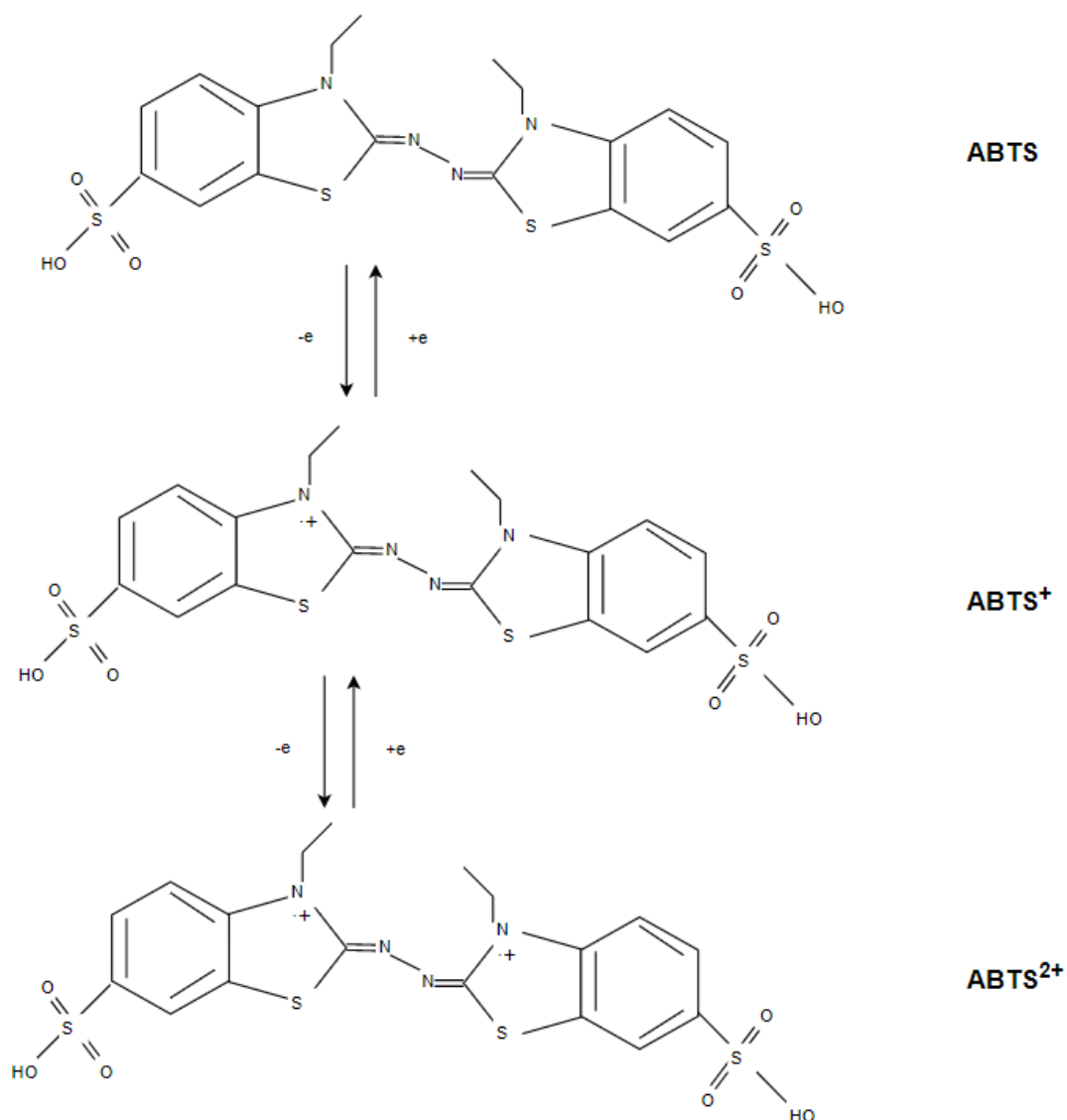
Medzi reakcie, ktoré lakáza katalyzuje, patria priama oxidácia derivátov fenolu, oxidácia fenolových a nefenolových substrátov a spájanie radikálov, ktoré lakáza vytvorila. Pri

širokej substrátovej špecificite lakáz sú bežným substrátom fenoly, pre väčšinu lakáz najlepšie *ortho*- substituované zlúčeniny (Jořenek M., et al. 2013). Lakáza je taktiež schopná oxidovať aj niektoré anorganické ionty alebo nežiadúce organické zlúčeniny, ako napríklad polycyklické aromatické uhľovodíky alebo farbivá.



Obr.3. Reakčný mechanizmus oxidácie fenolu lakázou. Upravené podľa Karigar CH. S., Rao S. S., 2011.

Počet substrátov je možné zvýšiť mediátormi, látkami s nízkou molekulovou hmotnosťou, vďaka ktorým dokáže lakáza oxidovať látky s vyšším redoxným potenciálom. Tieto mediátory sú napríklad ABTS (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)), syringaldazin alebo acetosyringon. Prebiehajú tu dva typy reakcií. Prvý typ odoberá elektrón za vzniku radikálu, u ktorého môže dôjsť k prešmyku alebo štiepeniu. Druhý typ odoberá vodíkový atóm za vzniku radikálu. Použitie mediátorov ale môže byť nákladné a nebezpečné kvôli vzniku toxických produktov.



Obr. 4. Schéma oxidácie ABTS v prítomnosti lakázy. Upravené podľa Christopher L. P., Yao B., et al. 2014.

Pri katalýze sa najskôr naviaže redukovaný substrát na atóm medi T1 za vzniku radikálu. Elektrón následne prejde na klastr T2/T3, kde sa naviaže na kyslík a redukuje ho za vzniku vody. Substrát môže poskytnúť viac elektrónov a radikál môže vstúpiť do viacerých reakcií.

Pre reakcie je veľmi podstatné pH, či už kyslé pH (3-6) u vláknitých húb alebo vyššie pH (6,0-8,5) bakteriálnych lakáz. S klesajúcim pH rastie redoxný potenciál fenolových zlúčenín. Pri vyššom pH sa do klastru T2/T3 viaže hydroxidový ion a prerušuje prenos elektrónov.

Rôzne látky, ako napríklad halogenidy, azidy, kyanidy alebo sulfidy, môžu inhibovať účinky lakáz väzbou do T2 alebo do mostíku medzi T2 a T3. T1 atóm môže byť nahradený iným nereaktívnym kationom, pričom takáto inhibícia je nevratná.

Lakáza je využívaná v mnohých odvetviach. V potravinárstve sa používa na odstránenie prebytočného kyslíku a fenolových zlúčenín pri výrobe vína, ovocných štiav a piva, čím sa zvyšuje trvanlivosť a zmyslové vlastnosti produktu.

Pri výrobe papiera slúži na čiastočnú degradáciu lignínu. Jej použitie je šetrnejšie pre životné prostredie a bezpečnejšie než chemikálie, ktoré sa na tento účel bežne používajú, ako sú napríklad rôzne zlúčeniny chlóru alebo kyslíkaté oxidanty, ako napríklad peroxid vodíku.

Lakáza má taktiež uplatnenie pri výrobe polymérov, kde z vhodných substrátov vznikajú radikály vstupujúce do reakcií. Dá sa tiež použiť na bioremediáciu prostredia a dokáže degradovať rôzne textilné farbivá, ktoré inak odchádzajú s odpadovými vodami.

3.2 Tyrozináza

Tyrozináza (monofenol, *o*-difenol:oxidoreduktáza, EC 1.14.18.1) je enzým med'natých proteínov typu 3. Do tejto skupiny patrí spoločne napríklad s rastlinnými katechoxidázami a hemocyanínmi z mäkkýšov (Gardemann C., et al., 2002).

Prvýkrát bol tento enzým popísaný u cicavcov pre jeho spojitosť so vznikom melatonínových nádorov a ďalších problémov s pigmentáciou, ako napríklad albinizmus alebo vitiligo (Riley P. A., 1997). U húb bola tyrozináza prvýkrát charakterizovaná u *Agaricus bisporus*, kde bola spájaná s hnednutím a pigmentáciou pri raste a skladovaní, čo znižovalo hodnotu produktu.

Výsledky prvých purifikácií tyrozinázy z extraktu z plodníc priniesli rôzne formy, často polyméry. Pomocou elektroforézy a hydroxyapatitovej chromatografie bolo rozlíšených niekoľko foriem tyrozinázy ktoré sú označované α , β , γ , δ . Neskôr bolo popísaných päť ďalších rozdielnych foriem (I, Ia, II – IV) . Dospelo sa k záveru, že izolované formy α , β , γ ,

δ boli heteropolyméry, predstavujúce dve rozdielne polymerné podjednotky: ťažký reťazec H a ľahký reťazec L (Halaouli S., et al., 2006). Identifikované boli dva typy ťažkého reťazcu : H^α a H^β. Vďaka konformačnému izomerizmu alebo rôznej génovej expresii môžu existovať rôzne formy (Halaouli S., et al., 2006).

Tyrozínázy sa v mikroorganizmoch, zvieratách, rastlinách alebo hmyze môžu nachádzať v aktívnej a latentnej forme. Napríklad v *A. bisporus* predstavuje latentná forma 98-99% celkovej tyrozínázovej aktivity (Van Leeuwen J., et al. 1999). Aktivácia tyrozínázy môže prebiehať pomocou kyslého šoku, dodecylsulfátu sodného alebo proteáz *in vitro*. *In vivo* je aktivácia tyrozínáz spájaná so starnutím, vystavením extrémnym podmienkam alebo patogénom. Predpokladá sa, že proces aktivácie zahŕňa proteázy podobné serinovým proteázam izolovaným z *A. bisporus* v senescencii (Halaouli S., et al., 2006).

Aktívne miesto tyrozínázy môže byť v troch prechodných stavoch v závislosti na oxidačnom čísle medených iónov a väzbe na kyslík. Tieto stavy sú *deoxy* (Cu^I- Cu^I), *oxy* (Cu^{II}- O₂ - Cu^{II}) a *met* (Cu^{II}- Cu^{II}). Tieto formy sa môžu meniť z *met*-formy na *deoxy*-formu redukciou dvoch elektrónov, pričom *deoxy*-forma je schopná reverzibilne viazať kyslík za vzniku *oxy*-formy. Táto forma sa tiež dá získať z *met*-formy pridaním peroxidu vodíka u *N. crassa* alebo pomocou redukčných činidiel, ako napríklad kyselina askorbová, hydroxylamin alebo dithionit u *Aspergillus flavipes*, a Fe²⁺ a dithiothreitol u *A. bisporus* (Halaouli S., et al., 2006).

In vivo je väčšina tyrozínázy v *met*-forme, kde nie je schopná viazať molekulárny kyslík. Je ale schopná viazať monofenoly, ku ktorým má vysokú afinitu, hoci nie je schopná s nimi reagovať. *In vivo* je tyrozínáza aktivovaná redukovaním *met*-formy na *deoxy*-formu za pomoci DOPA. V súčasnosti je navrhovaný reakčný model, ktorý zahŕňa krezolázu aj katecholázu. Tento model berie do úvahy že *met*- aj *oxy*-forma môže reagovať s difenolmi, ale len *oxy*-forma môže reagovať s monofenolmi, monofenoly môžu súperiť s difenolmi o naviazanie na *met*-tyrozínázu, čím inhibujú jej redukciu na *deoxy*-formu a chemický krok je nevyhnutný pre recykláciu L-DOPA z *ortho*-DOPA (Rodriguez-Lopez J.N., et. al. 1992). Nedávno bolo dokázané, že tyrozínáza by mohla mať aj katalázovú a peroxigenázovú aktivitu.

Hoci bola tyrozínáza jednou z prvých objavených monooxygenáz, jej štruktúra ešte stále nie je plne známa. Predpokladá sa, že má podobnú štruktúru ako hemocyanin a

katecholoxidáza. Nasvedčuje tomu oxidačné číslo a konformačné zmeny počas viazania kyslíku, porovnateľné spektroskopické a magnetické vlastnosti, homológne primárne sekvencie. Okrem toho hemocyníny ukázali katecholázovú aktivitu po pridaní dodecylsulfátu alebo proteázy (Halaouli S., et al., 2006).

Medené ióny sú obklopené vysoko konzervatívnymi aminokyselinami. Obidva medené regióny obsahujú tri imidazolové zvyšky, naviazané na medené ióny. Podľa kryštalografických dát pre katecholoxidázu a štruktúrneho predpokladu tyrozináz z *N. crassa* a *A. bisporus* bolo aktívne miesto tyrozináz popísané ako hydrofilná sféra oddelená štvorhelixovou skupinou obsahujúcou šesť imidazolových zvyškov. Hydrofilná sféra by bola obklopená hydrofóbnou vrstvou, ktorá je aromatická a tvorená vysoko konzervatívnymi zvyškami (Halaouli S., et al., 2006). Konfigurácia by bola udržiavaná elektrostatickými silami alebo väzbou katión- π .

V dnešnej dobe sa zvyšuje záujem o štúdium tyrozinázy najmä kvôli jej potenciálu v biotechnológiách a významu pre životné prostredie. Ako prvá zaujala jej schopnosť vytvoriť difenoly z monofenolov. Táto jej schopnosť by sa dala využiť pri výrobe antioxidantov ako doplnkov výživy alebo liečiv, ako napríklad kyselina kávová alebo hydroxytyrozol. Jedná sa o silný antioxidant nachádzajúci sa prírodne v olivovom oleji a ovocí, ktorý ale nie je voľne dostupný. Mohol by byť vyrábaný z *p*-tyrozolu nachádzajúceho sa v odpade z lisovania olív s použitím purifikovaných tyrozináz z *A. bisporus* a *P. sanguineus* (Halaouli S., et al., 2006). Tento systém by tiež mohol byť použitý pri výrobe liečiva L-DOPA, s použitím L-tyrozinu ako substrátu a tyrozinázy z *A. oryzae* a *Aspergillus flavus* ako katalyzátoru.

Tyrozináza z húb má tiež potenciál pri výrobe biopolymérov a enzymatickom spájaní. Chinóny produkované oxidovaním difenolov dokážu reagovať aj bez enzýmov s rôznymi nukleofilmi za vzniku biopolymérov. Tyrozináza z *A. bisporus* bola použitá na enzymatické spojenie fenolových skupín na polysacharid chitosan. Táto tyrozináza katalyzuje oxidáciu fenolov na elektrofilné *ortho*-chinóny schopné voľne reagovať s nukleofilnými aminovými skupinami chitosanu, čo poskytuje možnosť bezpečne vyrábať polyméry vhodné pre životné prostredie, ako napríklad kožné náhrady, lepidlá alebo matrice pre výrobu liečiv a tkanív pre bioinžinierstvo (Halaouli S., et al., 2006).

Dlho je známe využitie tyrozináz z húb ako riešenie znečistenia životného prostredia fenolmi a ďalším toxickým odpadom. Kým peroxidáza a lakáza potrebujú drahé kofaktory ako napríklad mangán, malonát alebo peroxid vodíku, tyrozináze stačí len molekulárny kyslík. Tyrozináza z húb je tiež účinná pri biotransformácií vodných fenolov a chlorfenolov. Napríklad tyrozináza z *Amylomyces rousii* dokáže účinne degradovať pesticíd pentachlorofenol (Montiel A.M., et al. 2004).

Na to, aby sme mohli ďalej študovať molekulárnu stavbu tyrozinázy a jej biotechnologickú aplikáciu, je nevyhnutné vyvinúť systém jej expresie pre produkciu vo väčšom merítke, predpokladá sa využitie extracelulárnej produkcie. Doteraz bolo popísaných len málo tyrozinázových promotorov a nie je plne známa regulácia expresie tohto enzýmu (Halaouli S., et al., 2006).

4 Získavanie enzýmov z plodníc a odpadov

Veľa druhov *Basidiomycota* efektívne produkuje lakázu. Ukazuje to napríklad screening génov pre lakázu v 18 druhoch *Basidiomycota*. Výsledky ukázali vysokú lakázovú aktivitu v 50% skúmaných kmeňoch (Pointing S.B. et al., 2005). Ďalší screening 50 kmeňov ukázal vysokú lakázovú aktivitu aj v ďalších kmeňoch, ako sú napríklad *Agaricus*, *Clitopilus*, *Faerberia* alebo *Fomes* (Eichlerová L., et al., 2006).

Basidiomycota použitá na produkciu lakázy bola pestovaná v ponorených kultúrach alebo v pevnom modeli. Najvyššie aktivity boli získané v ponorených kultúrach *Polyporus sp.* a *Ganoderma lucidum*, s približne $70\ 000\ \text{U L}^{-1}$ s ABTS ako substrátom po optimalizácií média (Martínková L., et al., 2016). Pre *Polyporus sp.* obsahovalo toto médium $1,5\ \text{mM}$ CuSO_4 bez ďalšieho regulátoru génovej expície. Pre *Ganoderma lucidum* obsahovalo médium $0,4\ \text{mM}$ CuSO_4 v kombinácii s ethanolom a kyselinou gallovou (Martínková L., 2016). Ďalej bola významná lakázová aktivita nájdená v *T. versicolor*. Táto bola pestovaná v kultúre znehynbenej v algináte pri použití ultrazvuku. Výhodné kultúry z hľadiska nízkej ceny prístrojov, nízkej spotreby energie a lacného substrátu pri značnom výťažku, sú aj *Agaricus bisporus*, *Trametes pubescens* a *Fomes fomentarius* (Martínková L., et al., 2016).

Existuje niekoľko metód purifikácie lakázy. Tieto metódy pozostávajú najmä z ultrafiltrácie, dialýzy, chromatografie a elektroforézy (Mayolo-Deloisa K., et al., 2009). Viackrokové postupy poskytujú malý výťažok lakázy pri nákladnom procese. Bolo preto navrhnuté použitie dvojfázového vodného systému. Tento systém využíva zmes polymérov, ako napríklad polyethylénglykol, a solí, ako napríklad fosfáty alebo sulfáty, na vytvorenie dvoch fáz použitých na extrakciu biomolekúl (Mayolo-Deloisa K., et al., 2009). Výhodami dvojfázového vodného systému oproti bežným procesom sú najmä biokompatibilita a nízka cena.

Experiment so získavaním lakázy zo zvyškov *A. bisporus* ukázal, že maximálna lakázová aktivita bola dosiahnutá pri pH 4.0 – 5.0. Zníženie pH pod 4.0 alebo zvýšenie pH nad 4.5 vyústilo v znížení lakázovej aktivity. Tento jav môže byť výsledkom nižšej rozpustnosti alebo straty aktivity (Mayolo-Deloisa K., et al., 2009). Napriek stabilite lakázy v nižšom pH, bolo získané väčšie množstvo lakázy z vrchnej polyethylénglykolovej fázy, pri pH vyššom ako 4.0 (Mayolo-Deloisa K., et al., 2009).

Lakáza sa lepšie oddeľovala pri pH 7.0. Z tohto dôvodu bol ďalej používaný systém PEG-fosfát, ktorý sa lepšie hodí pre pH vyššie než 7.0 (Mayolo-Deloisa K., et al., 2009). Ďalším faktorom pre použitie PEG-fosfátového systému bol vyšší zisk enzýmu až 80% pri molekulárnej hmotnosti 1000 g mol^{-1} a 72% pri molekulárnej hmotnosti 1450 g mol^{-1} oproti PEG-sulfátovému systému so ziskom 74% molekulárnej hmotnosti 1000 g mol^{-1} a 62% molekulárnej hmotnosti 1450 g mol^{-1} .

Vzhľadom na molekulovú hmotnosť PEG by mohlo dôjsť k zníženiu zisku lakázy. Veľký podiel na tom má hydrofobicita a objem vylúčený z fázy. Toto zníženie zisku lakázy sa vysvetľuje migráciou enzýmu z hornej fázy do dolnej fázy (Mayolo-Deloisa K., et al., 2009). Najlepší zisk lakázy bol zaznamenaný pri nízkej molekulovej hmotnosti PEG.

Koncentrácia surového extraktu má taktiež vplyv na zisk lakázy. ATPS (dvojfázový vodný systém) je schopný fragmentovať surový extrakt. Nízka molekulová hmotnosť PEG pomáha predchádzať nasýteniu hornej fázy (Mayolo-Deloisa K., et al., 2009). Pre tieto molekulové hmotnosti PEG bola najvyššia efektivita dosiahnutá pri koncentrácii 5% (w/w). Zo zvyšujúcou sa koncentráciou surového extraktu bolo pozorované zníženie efektivity izolácie lakázy (Mayolo-Deloisa K., et al., 2009).

V súčasnosti je najpoužívanejším zdrojom tyrozinázy *A. bisporus*. Surový extrakt tejto huby, ktorý je pripravovaný lyofilizáciou a mletím, obsahuje mnoho foriem tyrozinázy. Jeho stabilita sa zase dá zvýšiť precipitáciou a iónovou výmennou chromatografiou (Martínková L. et al. 2016). Po skúmaní rôznych metód znehybňovania tyrozinázy sa ukázalo, že najlepšie funguje zaistenie lyofilizovaného prášku do zmesi alginátu a kremíku. Táto metóda produkuje vysokú tyrozinázovú aktivitu a stabilitu (Kampmann M., et al., 2014).

Okrem tyrozináz z *A. bisporus* bola taktiež sekvenovaná tyrozináza z *Pycnoporus sanguineus*. Zopár týchto tyrozináz bolo produkovaných pomocou heterológnej génovej expresie. Gén pre tyrozinázu z *Pycnoporus sanguineus* bol vyjadrený v *A. niger*, pod kontrolou promotora glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenázy v trasených kultúrach na glukóze pri pH 6.5 (Martínková L., et al. 2016). Pri týchto podmienkach bolo vylúčených 90% enzýmu s použitím proteínového transportu hostiteľa. Týmto spôsobom bol produkovaný funkčný enzým bez oboch terminálnych domén (Halaouli S., et al., 2006).

5 Biodegradácia

Lakáza sa ukázala byť sľubnou v odstraňovaní fenolických látok z modelových aj reálnych odpadových vôd. V systémoch, ktoré väčšinou nepotrebovali žiadny mediátor, boli degradované bromované fenoly pri počiatočných koncentráciách v stovkách mg L^{-1} . Chlórované fenoly a alkylfenoly boli degradované pri nižších počiatočných koncentráciách 5-11 mg L^{-1} . Acetaminophén bol degradovaný pri koncentrácií nižšej než 0.18 mg L^{-1} (Ba S., et al., 2014). Lakáza degraduje taktiež látky ako guaiacol, tyrozol alebo kyselina *p*-kumarová pochádzajúce z odpadu výroby olivového oleja.

Podobne ako lakázy, tyrozinázy rozkladajú fenol a jeho deriváty a bisfenoly. Pri koncentráciách menších než 100 mg L^{-1} rozkladajú aj katecholy, *p*-alkylfenoly a naftoly. Signifikantné výsledky v degradácii polyfenolov boli zistené v odpade z výroby olivového oleja, ale taktiež vo vode z rieky obohatenej o bisfenol A (BPA). V tomto prípade bol BPA takmer celý degradovaný (Uhnáková B., et al., 2009).

Na zníženie vplyvu kyanidov pri degradácii sa používa enzým kyanid dehydrogenáza. Bolo skúmané využitie kombinácie tohto enzýmu a tyrozinázy pri čistení odpadových vôd obsahujúcich kyanid. V súčasnosti je jednou z najvyužívanejších metód chemická oxidácia pomocou chlóru alebo chlórnanu. Táto metóda má ale veľa nevýhod, najmä vysokú spotrebu chemikálií, potrebu špeciálneho nakladania s odpadom alebo formovanie chlórovaných organických zlúčenín (Martínková L., et al. 2016). Šetrnejšou metódou je použitie aktivovaného kalu alebo iných mikrobov. Tieto mikroorganizmy ale môžu byť ovplyvnené najmä vysokou koncentráciou kyanidu a fenolu (Martínková L., et al. 2016).

V prvých experimentoch bola použitá komerčne dostupná tyrozináza. Degradácia fenolov sa skúmala v pufrí s alebo bez kyanidu (Martínková L., et al. 2016). Pri koncentrácii 0.1 mM kyanid znížil degradáciu fenolov z 70% na 42% a pri koncentrácii 1 mM kyanid úplne zablokoval degradáciu fenolov (Martínková L., et al. 2016). Z tohto dôvodu bola ako v prvom kroku použitá reakčná zmes s kyanid dehydrogenázou. Po použití tejto zmesi bola efektivita degradácie fenolu ustálená na 68% - 70% bez ohľadu na počiatočný obsah kyanidu (Martínková L., et al. 2016).

V experimentoch s reálnymi odpadovými vodami bola pri koncentrácii kyanidu 8.3 mg L^{-1} účinnosť degradácie fenolu veľmi ovplyvnená touto koncentráciou. Efektivita degradácie

fenolov pri tejto koncentrácii bola len 15%. Pri použití kyanid dehydrogenázy na odpadové vody ako predprípravy pred použitím tyrozinázy stúpila účinnosť degradácie fenolov viac než dvojnásobne (Martínková L., et al. 2016).

Pri zvýšení množstva kyanid dehydrogenázy až osemnásobne pri ďalších experimentoch bola dosiahnutá degradácia fenolov a kreolov 88% a 62% po 4 hodinách (Martínková L., et al. 2016). Pri použití oboch enzýmov naraz ale nebol dosiahnutý rovnaký výsledok. Aby mohla byť táto metóda plne využitá, musí byť najskôr vykonaný experiment vo väčšom merítke. Keďže je produkované veľké množstvo odpadu, je potrebné produkovať katalyzátor v dostatočnom množstve za akceptovateľnú cenu. Produkcia kyanid dehydrogenázy vo veľkom množstve sa zdá byť perspektívna vďaka jej veľmi vysoko špecifickej aktivite. Produkcia tyrozinázy z húb vo veľkom nie je výhodná kvôli malému výťažku. (Martínková L., et al. 2016).

Záver

V tejto práci som sa zamerala na huby, ich enzýmy a ich účinky a uplatnenie v bioremediácii. Ešte donedávna boli predpoklady počtu druhov vykonávané bez použitia veľkoplošných sekvenačných metód. V súčasnosti ale pokrok v dostupných technológiách umožňuje lepšiu identifikáciu nových druhov, ako aj efektívnejší výskum ich biochemických vlastností. Tento rozvoj priniesol väčší záujem o huby a ich potenciál v rôznych odvetviach, ako aj zvýšenie produkcie húb v posledných desaťročiach.

Vedľajším produktom zvýšeného dopytu po hubách je nárast množstva zvyškového substrátu. Vzhľadom k tomu je aktuálnou výskumnou témou možnosť jeho praktického využitia. Jedným z produktov tohto zvyškového substrátu by mohli byť extrahované enzýmy. Tieto enzýmy majú potenciál byť alternatívou činidiel v reakciách, ktoré predstavujú záťaž pre životné prostredie. Náklady vynaložené na ich použitie ale v súčasnosti výrazne prevyšujú chemické látky doteraz používané na tento účel.

Najnovší výskum v tejto oblasti sa zaoberá práve otázkou nákladnosti a efektivity použitia týchto enzýmov. Ako perspektívna sa ukazuje možnosť kombinácie viacerých enzýmov, ako napríklad v prípade postupnej aplikácie kyanid dehydrogenázy a tyrozinázy. Konkluzívny výskum má potenciál otvoriť nové možnosti riešenia páľčivého problému chemikálií dlhodobo vážne zaťažujúcich životné prostredie.

Bibliografický zoznam

Ba, S., Haroune, L., Cruz-Morato, C., Jacquet, C., Touahar, I.E., Bellengner, J.P., Legault, C.Y., Jones, J.P., Cabana, H., 2014. Synthesis and characterisation of combined cross-linked laccase and tyrosinase transforming acetaminophen as a model phenolic compound in wastewaters. *Science of the Total Environment* 487: 748-755.

Blackwell, M., 2011. The Funghi: 1,2,3 ...5.1 million species?. *American Journal of Botany* 98: 426-438.

Christopher, L. P., Yao, B., Ji, Y., 2014. Lignin biodegradation with laccase-mediator systems. *Frontiers in Energy Research* 2: 1-13. doi: 10.3389/fenrg.2014.00012.

Eichlerová, I., Homolka, L., Lisá, L., Nerud, F., 2006. The influence of extracellular H₂O₂ production on decolorization ability in fungi. *Basic microbiology* 46: 449-455.

Gardemann, C., Christoph, E., Krebs, B., 2002. The crystal structure of catechol oxidase: New insight into the functions of Type-3 copper proteins. *Accounts of Chemical Research* 35: 183-191.

Grimm, D., Wösten, H. A. B., 2018. Mushroom cultivation in the circular economy. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102: 7795-7803.

Halaouli, S., Asther, M., Sigoillot, J.-C., Hamdi, M., Lomascolo, A., 2006. Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications. *Journal of Applied Microbiology* 100: 219-232.

Halaouli, S., Record, E., Casalot, L., Hamdi, M., Sigoillot, J.-C., Asther, M., Lomascolo, A., 2006. Cloning and characterization of a tyrosinase gene from the white-rot fungus *Pycnoporus sanguineus*, and overproduction of the recombinant protein in *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 70: 580-589.

Jayasiri, S.C., Hyde, K.D., Ariyawansa, H.A., Bhat, J., Buyck, B., Cai, L., Dai, Y.-C., Abd-El Salam, K.A., Ertz, D., Hidayat, I., Jeewon, R., Gareth Jones, E.B., Bahkali, A.H., Karunnarathna, S.C., Liu, J.-K., Luangsa-ard, J.J., Lumbsch, H.T., Maharachchikumbura, S.S.N., McKenzie, E.H.C., Moncalvo, J.-M., Ghobad-Nejhad, M., Nilsson, H., Pang, K.-L., Pereira, O.L., Phillips, A.J.L., Raspé, O., Rollins, A.W., et al. 2015. The faces of fungi database : fungal names linked with morphology, phylogeny and human impacts. *Fungal Diversity* 74: 3-18.

Jořenek, M., Zajoncová, L., 2013. Biotechnologický význam lakasy a její charakteristika. *Chemické Listy* 107: 921-928.

Kalina, T., Váňa, J. Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii. Univerzita Karlova v Praze. Karolinum, 2005, 606 s, ISBN 80-246-1036-1

Karigar, CH. S., Rao, S. S., 2011. Role of Microbial Enzymes in the Bioremediation of Pollutants: a Review. *Enzyme research*. ID 805187, 11 pages, doi:10.4061/2011/805187

Martínková, L., Chmátal, M., 2016. The integration of cyanide hydratase and tyrosinase catalysts enables effective degradation of cyanide and phenol in coking wastewaters. *Water research* 102: 90-95.

Martínková, L., Kotik, M., Marková, E., Homolka, L., 2016. Biodegradation of phenolic compounds by *Basidiomycota* and its phenol oxidases : a review. *Chemosphere* 149: 373-382.

Mayolo-Deloisa, K, Rito-Palomares, M., Trejo-Hernández, M.R., 2009. Recovery of laccase from residual compost of *Agaricus bisporus* in aqueous two-phase systems. *Process Biochemistry* 44: 435-439.

Montiel, A.M., Fernandez, F.J., Marcial, J., Soriano, J., 2004. A fungal phenoloxidase (tyrosinase) involved in pentachlorophenol degradation. *Biotechnology letters* 26: 1353-1357.

Pointing, S.B., Pelling, A.L., Smith, G.J.D., Hyde, K.D., Reddy, C.A., 2005. Screening of basidiomycetes and xylariaceous fungi for lignin peroxidase and laccase gene-specific sequences. *Mycology Research* 109: 115-124.

Riley, P.A., 1997. Molecules in focus: Melanin. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 29: 1235-1239.

Rodriguez-Lopez, J.N., Tudela, J., Varon, R., Garcia-Carmonas, F., Garcia-Canovas, F., 1992. Analysis of a kinetic model for melanin biosynthesis pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 267: 3801-3810.

Uhnáková, B., Petříčková, A., Biedermann, D., Homolka, L., Vejvoda, V., bednář, P., Papoušková, B., Sulc, M., Martínková, L., 2009. Biodegradation of brominated aromatics by cultures and laccase of *Trametes versicolor*. *Chemosphere* 76: 826-832.

Van Leeuwen, J., Wichers, H.J., 1999. Tyrosinase activity and isoforms composition in separate tissues during development of *Agaricus bisporus* fruit bodies. *Mycology Research* 103: 413-418.