

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BIOCHEMIE



**Enzymy kvasinky *Candida tropicalis*
biodegradující fenol**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Enzymes of *Candida tropicalis* yeast
biodegrading phenol**

DIPLOMA THESIS

2011

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BIOCHEMIE

**Enzymy kvasinky *Candida tropicalis*
biodegradující fenol**

Bc. Zuzana Koubková

Diplomová práce
2011

**Školitelka: Prof. RNDr. Marie Štiborová, DrSc.
Konzultantka: RNDr. Lenka Vilímková
Praha 2011**

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v seznamu použité literatury.

V Praze 24.1.2011

Bc. Zuzana Koubková

Poděkování :

Děkuji své školitelce Prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc., za odborné vedení, vstřícnost a všestrannou pomoc při vypracování této diplomové práce. Dále děkuji Prof. Janu Pácovi, DrSc., Ing. Janu Pácovi PhD., RNDr. Lence Vilímkové, RNDr. Veronice Kremláčkové za odborné vedení a velkou pomoc s vypracováním diplomové práce. Bc. Janě Jechové děkuji za spolupráci a podporu v laboratoři.

Zvláště velký dík za morální a materiální podporu ve studiu a při vypracovávání této diplomové práce patří mým rodičům.

Abstrakt

Průmyslové odpadní vody z ropných rafinerií, papíren, mlékáren a továren zpracujících keramiku, textil a plasty obsahují vysoké koncentrace aromatických sloučenin, jež jsou toxické pro živé organismy. Nutná je proto degradace těchto sloučenin v životním prostředí na přijatelné limity. Kvasinka *Candida tropicalis* je významným zástupcem z říše eukaryotních mikroorganismů schopných utilizace fenolu. V první fázi biodegradace fenolu používá *C. tropicalis*, pro katalýzu oxidace fenolu na katechol, cytoplasmatickou NADPH-dependentní fenolhydroxylázu. Ve druhé fázi biodegradčního procesu je katechol dále oxidován katechol-1,2-dioxygenázou na kyselinu *cis*, *cis*-mukonovou.

Předkládaná diplomová práce řešila poznání vlivu iontů těžkých kovů na reakce katalyzované NADPH-dependentní fenolhydroxylázou a katechol-1,2-dioxygenázou kvasinky *C. tropicalis*.

Fenolhydroxyláza byla inhibována ionty měďnatými (CuSO_4), až na 10 % aktivity enzymu. Fenolhydroxyláza byla rovněž inhibována ionty olovnatými (na 67 % původní enzymové aktivity). Ostatní testované ionty těžkých kovů (ionty kademnaté, manganaté, železnaté) tento enzym neovlivňovaly. Katechol-1,2-dioxygenáza byla inhibována všemi sloučeninami iontů těžkých kovů testovanými v předkládané diplomové práci, a to octanem olovnatým, chloridem manganatým, síranem železnatým, síranem měďnatým a chloridem kademnatým. Z hodnot IC_{50} je patrné, že aktivita katechol-1,2-dioxygenázy je senzitivnější vůči iontům těžkých kovů, než aktivita NADPH-dependentní fenolhydroxylázy *C. tropicalis*. Senzitivita enzymu může být způsobena přítomností histidylových zbytků v aktivním centru katechol-1,2-dioxygenázy, interagujících s ionty těžkých kovů.

Klíčová slova

NADPH-dependentní fenolhydroxyláza, katechol-1,2-dioxygenáza, *C. tropicalis*, ionty těžkých kovů, bioremediace

Abstract

Effluents of industrial wastewaters from oil refineries, paper mills, dyes, ceramic factories, resins, textiles and plastic contain high concentrations of aromatic compounds, which are toxic to organisms. Degradation of these compounds to tolerant limits before releasing them into the environment is an urgent requirement.

Candida tropicalis yeast is an important representative of eucaryotic microorganisms that are able to utilize phenol. During the first phase of phenol biodegradation, cytoplasmatic NADPH-dependent phenol hydroxylase of *C. tropicalis* oxidizes phenol to catechol. Catechol is in the second phase of biodegradative process oxidized to *cis,cis*-muconic acid by the reaction catalyzed with catechol-1,2-dioxygenase.

In this diploma thesis we investigated the effect of the heavy metal ions on NADPH-dependent phenol hydroxylase and catechol-1,2-dioxygenase of *C. tropicalis*.

Phenol hydroxylase was inhibited by Cu^{2+} and Pb^{2+} ions. Catechol dioxygenase was inhibited by all substances containing heavy metal ions (Fe^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} and Pb^{2+}), which were tested in this work.

The most effective inhibition was produced by Pb^{2+} followed by Mn^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{2+} and Cu^{2+} ions. The higher sensitivity of catechol-1,2-dioxygenase to heavy metal ions might follow from the presence of histidine residue in the active center of the enzyme, that can interact with ions of metals.

Keywords

NADPH-dependent phenol hydroxylase, catechol-1,2-dioxygenase, *C. tropicalis*, heavy metal ions, bioremediation

Seznam použitých zkratk & symbolů:

A₂₈₀: absorbance při 280 nm

BIS: N, N'-metylen-bis-akrylamid

BSA: hovězí sérový albumin

CoA: koenzym A

CYP: cytochrom P450

DEAE Sepharosa: diethylaminoethyl Sepharosa

EDTANa₂: dvojsodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové

FAD: flavinadeninukleotid

HPLC: vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Pressure Liquid Chromatography)

kDa: kilodalton

K_m: Michaelisova konstanta

MFO: systém oxygenas se smíšenou funkcí (mixed function oxidases)

M_r: relativní molekulová hmotnost

NADH: redukovaný nikotinamidadeninukleotid

NADP⁺: nikotinamidadeninukleotidfosfát

NADPH: redukovaný nikotinamidadeninukleotidfosfát

PbAc₂: octan olovnatý

RPM: otáčky za minutu

SDS: dodecylsírán sodný (sodium dodecylsulphate)

SDS-PAGE: elektroforesa na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS

T_f: teplota tání

T_v: teplota varu

TEMED: N, N, N', N'-tetramethylendiamin

TRIS: tris(hydroxymethyl)aminomethan

V_{max}: maximální rychlost enzymové reakce

v/v: objemová procenta

w/v: hmotnostní procenta

YNB: yeast nitrogen base

ρ²⁵: hustota při 25 °C

1. ÚVOD	11
1.1. Xenobiotika a životní prostředí.....	11
1.2. Fenolické látky, jejich využití a toxicita	13
1.2.1. Fenolické látky.....	13
1.2.2. Charakterizace a využití fenolických látek.....	13
1.2.3. Toxicita fenolu vůči lidskému organismu.....	16
1.3. Organismy schopné degradovat fenolické látky.....	18
1.3.1. Charakteristika kvasinek rodu <i>Candida</i>	27
1.3.2. Vlastnosti kvasinky <i>C. tropicalis</i>	28
1.4. Metabolismus xenobiotik	31
1.4.1. Penetrace xenobiotika do organismu.....	31
1.4.2. Biotransformace xenobiotik v živém organismu.....	31
1.5. Biodegradace fenolických látek	33
1.5.1. Mechanismus degradace fenolu.....	37
1.5.1.1. Aerobní degradace u prokaryot.....	37
1.5.1.2. Aerobní degradace u eukaryot	39
1.5.1.3. Využití kvasinky <i>Candida tropicalis</i> <i>pro biodegradaci fenolu</i>	40
1.5.1.4. <i>Metabolismus za anaerobních podmínek</i>	41
1.6. Enzymové systémy biotransformující fenolické látky	43
1.6.1. Monooxygenázy.....	43
1.6.1.1. <i>Cytochromy P450</i>	44
1.6.1.2. <i>Struktura cytochromu P450</i>	44
1.6.1.3. <i>NADPH:CYP reductáza</i>	45
1.6.1.4. <i>Fenolhydroxyláza</i>	46
1.6.2. Dioxygenázy.....	47
1.6.2.1. <i>Dioxygenázy štěpící aromatické kruhy</i>	47
1.6.2.2. <i>Katechol-1,2-dioxygenáza (EC 1.13.11.1)</i>	48
1.6.2.3. <i>Katechol-2,3-dioxygenáza (EC 1.13.11.2)</i>	49
1.6.3. Peroxidázy.....	52
1.6.4. Cykloisomerázy.....	52

1.6.5. Delaktonizace	53
2. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	54
3. MATERIÁL A METODY	55
3.1. POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A PŘÍSTROJE	55
3.1.1. Použité chemikálie.....	55
3.1.2. Použité přístroje.....	56
3.2. IZOLACE CYTOSOLÁRNÍ FRAKCE KVASINKY <i>C. tropicalis</i>	58
3.2.1. Desintegrace a homogenizace.....	58
3.2.2. Frakční centrifugace.....	58
3.3. METODY POUŽITÉ PRO PURIFIKACI NADPH-DEPENDENTNÍ FENOLHYDROXYLÁZY	59
3.3.1. Chromatografie cytosolární frakce na sloupci DEAE-Sepharosy.....	59
3.3.2. Chromatografie NADPH-dependentní fenolhydroxylázy na sloupci Sephacrylu S-300.....	60
3.4. ANALYTICKÉ METODY	62
3.4.1. Elektroforéza proteinů (enzymů) za přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS).....	62
3.4.2. Stanovení aktivity NADPH-dependentní fenolhydroxylázy	63
3.4.3. Vliv iontů těžkých kovů na aktivitu enzymu NADPH-dependentní fenolhydroxylázy.....	63
3.4.4. Vliv iontů těžkých kovů na aktivitu enzymu katechol-1,2-dioxygenázy	65
4. VÝSLEDKY	66
4.1. Purifikace NADPH-dependentní fenolhydroxylázy.....	66

4.1.1. Chromatografie cytosolárních proteinů na sloupci DEAE-Sepharosy.....	66
4.1.2. Rechromatografie NADPH-dependentní fenolhydroxylázy na sloupci DEAE-Sepharosy.....	67
4.1.3. Chromatografie NADPH-dependentní fenolhydroxylázy na sloupci Sephacrylu S-300.....	67
4.2. Vliv iontů těžkých kovů na NADPH-dependentní fenolhydroxylázu kvasinky <i>C. tropicalis</i>	69
4.3. Vliv iontů těžkých kovů na katechol-1,2-dioxygenázu kvasinky <i>C. tropicalis</i>	72
5. DISKUZE.....	76
6. ZÁVĚR	82
7. POUŽITÁ LITERATURA	83
8. PŘÍLOHY DIPLOMOVÉ PRÁCE	95

1. ÚVOD

1.1. Xenobiotika a životní prostředí

Rozvoj řady vědních disciplín umožnil syntézu látek, které nemají přirozený původ v přírodě, ale byly uměle syntetizovány člověkem, tzv. xenobiotik. Řada těchto sloučenin (polycyklické aromáty, chlorované alifatické uhlovodíky) ještě před nedávnem patřila díky svým výhodným fyzikálním a chemickým vlastnostem mezi látky průmyslově významně využívané. Mnohem později bylo zjištěno, že se jedná o toxické látky, perzistentní ve složkách životního prostředí. Mohou pronikat do potravního řetězce, a tak ohrožovat i lidské zdraví (Kučerová et al., 1999).

Nejde jen o odpadní látky průmyslových výrob, ale i jednotlivé výrobky se s časem přeměňují na odpad. Navíc sama společnost produkuje škodlivé odpady jako odpadní vody apod. Lidé jsou tedy ve vzrůstající míře vystavováni nejrůznějším cizorodým chemikáliím, ať už jsou to léky, potravinářské chemikálie, nebo jiné látky znečišťující životní prostředí (Murray et al., 2002).

Existuje řada účinných fyzikálně-chemických metod, které lze použít pro dekontaminaci složek životního prostředí, avšak většinou se jedná o ekonomicky velmi náročné postupy. Jedním z alternativních způsobů je levnější a přirozenější biologická dekontaminace, která využívá organismy schopné v kontaminovaném prostředí přežít a kontaminující látky degradovat.

V současné době jsou z tohoto hlediska středem zájmu bakterie a jiné mikroorganismy, které odbourávají organické polutanty a xenobiotika za aerobních i anaerobních podmínek (Kučerová et al., 1999).

Mikrobiální degradace se ukázala jako efektivní a ekonomicky přijatelná metoda zpracování těchto kontaminantů (Rigo and Alegre, 2004; Santos and Linardi, 2004; Vijayagopal and Viruthagiri, 2005; San-Chin et al., 2005).

Remediace oblastí kontaminovaných organickými látkami (jako jsou fenoly studované v předkládané práci) může být velmi obtížná díky inhibičním vlivům iontů toxických těžkých kovů přítomných v prostředí na sledovanou mikroflóru (Sandrin a Maier, 2003).

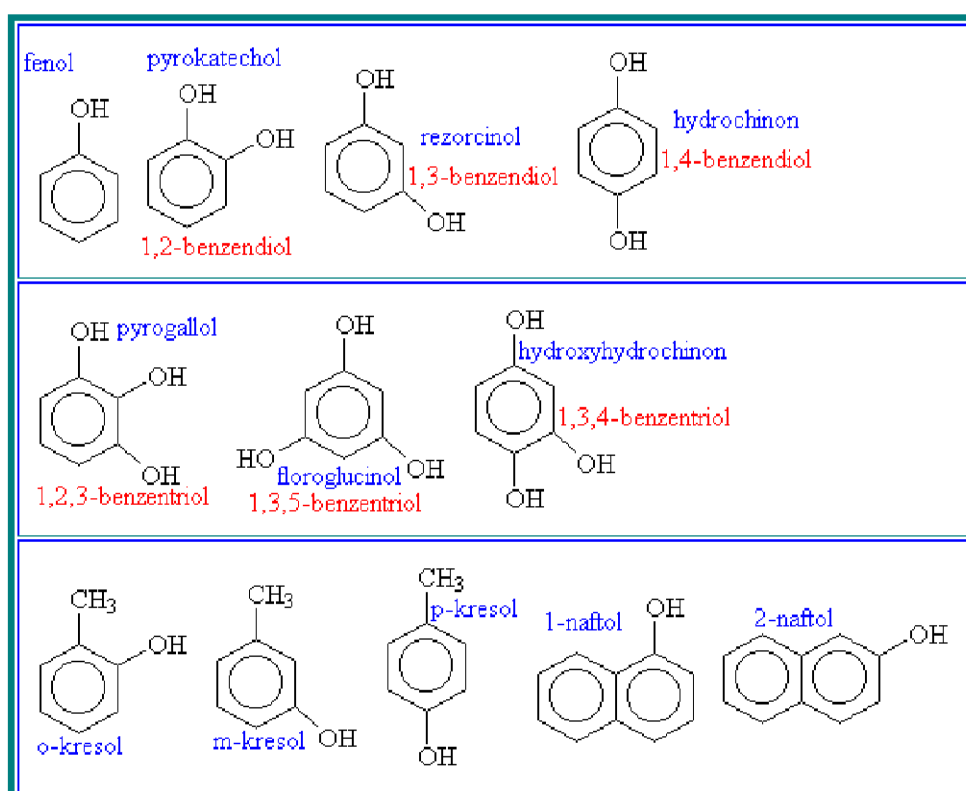
Některé práce ukazují, že v principu je možné zmírnit inhibice těžkými kovy použitím mikroorganismů resistantních vůči kovům, které specificky snižují toxickou zátěž způsobenou ionty kovů (Roane et al., 2001).

V současnosti probíhá testování spojení kmenů snižujících vliv těžkých kovů a kmenů využívajících organické polutanty jako zdroj uhlíku a energie. S využitím této techniky by nebylo zapotřebí geneticky modifikovat stávající mikroorganismy, a přesto by bylo docíleno kvalitativně stejných výsledků. Toto by znamenalo nemalé časové i finanční úspory (Fernandes et al., 2008).

1.2. Fenolické látky, jejich využití a toxicita

1.2.1. Fenolické látky

Fenoly spadají do třídy organických sloučenin obsahujících hydroxylové skupiny (-OH) vázané přímo na aromatickém jádře (jak je patrné na Obr. 1). Jsou využívány ve většině odvětví průmyslu. Mezi tři hlavní třídy fenolických sloučenin využívaných komerčně patří chlorfenoly, alkylfenoly a nitrofenoly (Šolín, 1955).



Obr. 1: Názvosloví fenolů (převzato z práce Piskač and Čermák, 1996-98).

1.2.2. Charakterizace a využití fenolických látek

Fenol se do organismu dostává trávicím traktem, inhalací i transdermálně. Do buňky vstupuje jak aktivním, tak i pasivním transportem. Díky chemickému charakteru fenolu se známky intoxikace buňky touto látkou projevují záhy po prvním kontaktu.

Hlavními cílovými orgány, které jsou fenolem ovlivňovány, jsou játra a ledviny, ale ovlivňovány jsou i respirační a kardiovaskulární systémy.

Po požití způsobuje fenol pálení sliznic a ložiska bílé nekrotizující tkáně v ústech, nosohltanu a žaludku, dále také zvracení a krev ve stolici. Při vstupu pokožkou následuje pálení pokožky a nevolnost. Systematické klinické příznaky otravy fenolem jsou ovšem na cestě vstupu do organismu nezávislé a zahrnují: bolest hlavy, apatii, srdeční arytmii, dýchací obtíže, mdloby a další. Příležitostně byla také zaznamenána methemoglobinemie a hemolytická anemie. Nejdůležitější příznaky krátkodobého působení fenolu jsou neurotoxicita, destrukce jaterních a ledvinných buněk a respirační obtíže (Allen et al., 1991).

Otravu fenolem lze rozpoznat podle charakteristického akrylového zápachu dechu nebo ji lze detekovat z tmavého zbarvení moči. Fenol působí „korozivně“ na sliznice, oči a působí spáleniny kůže (Geller, 1997).

Přírodní fenol je součástí uhelných ložisek nebo je produktem degradace benzenu. Na vzduchu se krystaly fenolu zbarvují růžově až červeně, což je urychleno v alkalickém prostředí. Fenol je citlivý k oxidačním činidlům. Odtržení atomu vodíku fenolické hydroxyskupiny je bezprostředně následováno rezonanční stabilizací fenoxylradikálu. Vzniklý radikál je nadále oxidovatelný, díky čemuž je fenol použitelný jako antioxidant, fungující jako činidlo vychytávající radikály.

Fenol je součástí některých komerčně dostupných desinfekčních a antiseptických roztoků a přípravků, je totiž toxický pro většinu mikroorganismů. Při požití pokožky, je rychle absorbován, což může vést k systémové otravě. Fenol denaturuje proteiny pokožky (Windholz, 1983).

In vivo se fenol váže na protein plasmy a způsobuje koagulační nekrózu. Akutní letálnost fenolu závisí na délce expozice a koncentraci dávky (Wood, 1978).

Zcela běžně a ve velké míře se fenoly vyskytují v přírodě. Vzhledem k tomu, že fenoly byly jako skupina látek objeveny poměrně brzy (r. 1834 byla provedena první izolace z kamenouhelného dehtu), většina z nich má triviální názvy. Typickým příkladem nám mohou sloužit methylofenoly, které se nazývají kresoly podle názvu uhelného nebo dřevěného dehtu, z kterých byly izolovány (Murray et al., 2002).

Nízkomolekulární fenoly jsou obvykle rozpustné ve vodě a mají velmi vysoký bod varu. To je způsobeno tím, že molekuly fenolů mohou mezi sebou tvořit vodíkové vazby. Vazba O-H je silně polarizovaná díky značné elektronegativitě kyslíkového atomu. Dochází tedy ke vzniku parciálního kladného náboje na vodíkovém atomu (Kučerová et al., 1999).

Fenoly jsou kyseliny, protože obsahují hydroxylovou skupinu, která může fungovat jako donor protonu:



Fenol je mnohokrát silnější kyselina než například ethanol. To je způsobeno rozdíly ve strukturách příslušných sloučenin. Hlavní důvod větší kyselosti fenolů oproti alifatickým alkoholům je v tom, že fenoxidový ion je stabilizovaný rezonancí. Negativní náboj fenoxidového iontu bývá delokalizován rezonancí především v polohách ortho a para benzenového kruhu. Vzhledem k tomu že tímto krokem dochází ke stabilizaci, je rovnováha reakce jejich vzniku z fenolu mnohem příznivější než rovnováha vzniku alkoxidových iontů z alkoholů (Allen, 1991).

Fenol $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$ (hydroxybenzen) je v čistém stavu bezbarvá až bílá látka, která má nasládlý zápach, je hořlavá, rozpustná ve vodě, etherech, ethanolu, acetonu, glycerolu, benzenu (Windholz, 1983).

Důležité fyzikální vlastnosti fenolu (Brooks and Riviere, 1996):

$M_r = 94,114$

$T_t = 40,90 \text{ }^\circ\text{C}$

$T_v = 181,84 \text{ }^\circ\text{C}$

$T_{vzplanutí} = 75,79 \text{ }^\circ\text{C}$

$52\rho = 1,132 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$

$pK_a = 10,0$

$pH (50 \text{ g/l vody, } 20 \text{ }^\circ\text{C}) = \text{cca } 5,0$

Fenol má hygroskopické vlastnosti a také snadno podléhá oxidaci. Proto je nutné ho uchovávat pod atmosférou dusíku, v chladu a ve tmě. Fenoly nepůsobí pouze jako kyseliny, ale také jako báze, protože mají nesdílený elektronový pár na kyslíku a jsou tudíž Lewisovskými bázemi.

Protonací fenolické hydroxy skupiny fenolu a následnou ztrátou molekuly vody by došlo k vytvoření fenylového kationtu, to je ale velmi obtížné vzhledem ke struktuře benzenu, neboť podmínka linearity je nesplnitelná (Kučerová et al., 1999).

Fenoly snadno oxidují. Na vzduchu získávají různobarevný nádech způsobený vznikem oxidačních produktů. Oxidace hydrochinonu dává benzen-1,4-chinon, obvykle nazývaný chinon. Oxidace hydrochinonů je reverzibilní a tento oxidačně-redukční proces má velmi významnou roli v mnoha biologických pochodech.

Fenolické látky se často používají jako antioxidanty. Přednostně se oxidují místo látek, ke kterým byly přidány. Jsou používány jako stabilizátory (např. butylovaný hydroxytoluen-BHT, nebo butylovaný hydroxyanisol-BHA) v potravinách, jedlých olejích, krmných směsích, ale též v chemickém průmyslu pro výrobu syntetických olejů, gumy a plastických hmot (Murray et al., 2002).

1.2.3. Toxicita fenolu vůči lidskému organismu

Fenoly se velmi dobře vstřebávají. Díky své kyselosti leptají a dráždí pokožku a sliznice. Jsou především neurotoxické, ale také hepatotoxické a nefrotoxické. Intoxikace probíhá inhalací nebo transdermálně. Po vstřebání dochází k rychlému vyloučení.

Akutní intoxikace vyvolá prudké bolesti v dutině ústní, bříše a často končí smrtelně. Chronická intoxikace je vzácná. Projevuje se bolestmi hlavy, ochablostí organismu, nechutenstvím, nebo ekzémy. Jako smrtelná dávka pro dospělého člověka je uváděno 5 až 12 g fenolu (Allen, 1991).

Dvojsytné fenoly, jako např. pyrokatechol jsou akutně toxičtější než fenol. Při chronické intoxikaci vyvolávají dermatitidy.

Při uvolnění velkého množství fenolu do vzduchu, půdy nebo vody nebo pokud je do prostředí fenol uvolňován dlouhou dobu v menších dávkách, přetrvává i po velmi dlouhou dobu. Malá množství fenolu však nepřetrvávají ve vzduchu déle než jeden den, z půdy jsou odstraněna do pěti dnů a ve vodách zůstávají nejdéle devět dní (Wood, 1978).

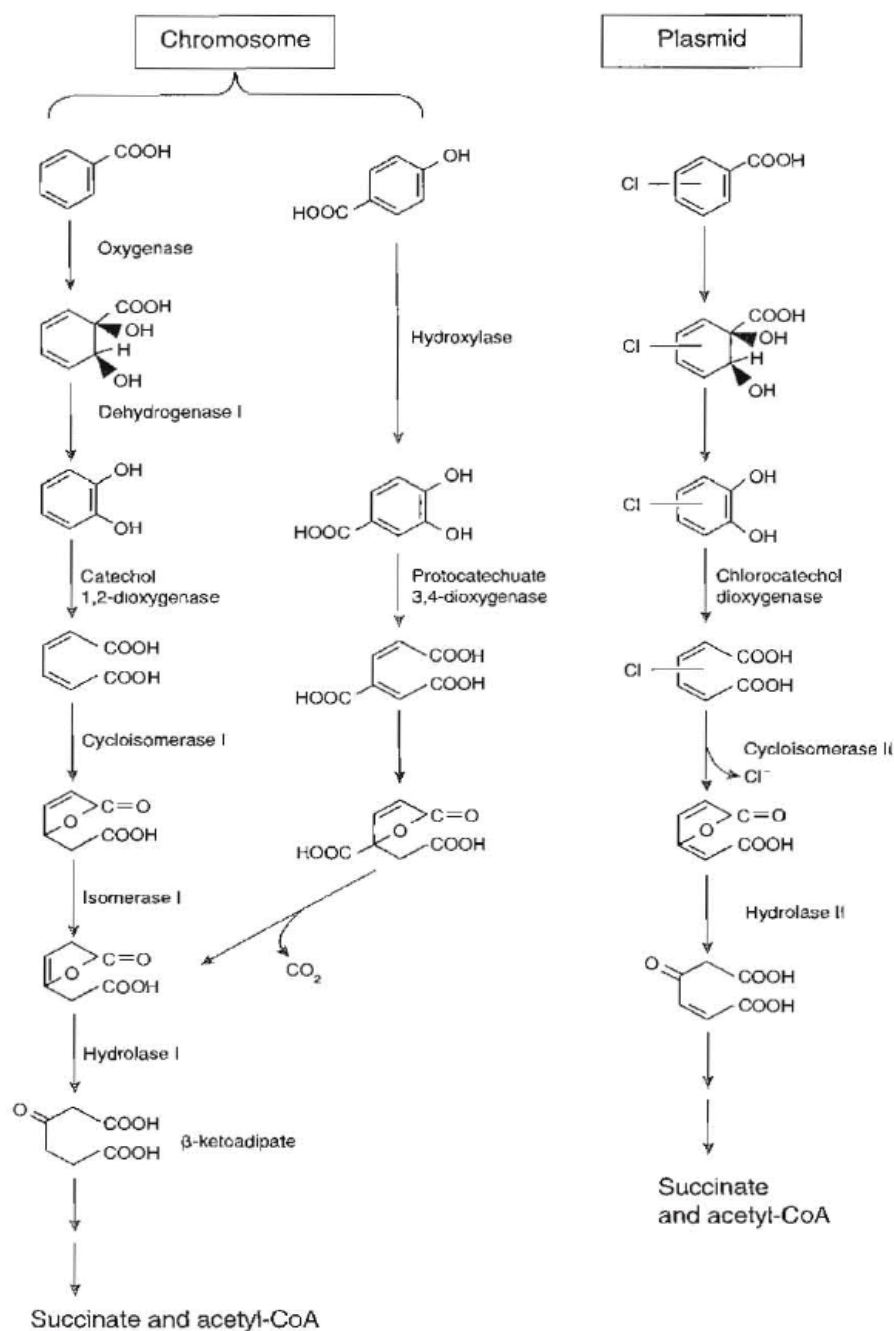
Při koncentraci fenolu v ovzduší 14 x vyšší než je přípustný limit, byla u mnoha žen vystavených těmto podmínkám popsána existence změn na placentě. U dělníků pracujících v dřevařském průmyslu byla prokázána spojitost dlouhodobé expozice fenolu se zvýšeným výskytem respiračních nádorů. U myši byla při studiu genotoxicity fenolu pozorována zvýšená frekvence výměny sesterských chromatid spojená s inhibicí mitózy a buněčného cyklu u T-lymfocytů při orálním podání jednorázové dávky 250 mg.kg^{-1} . LD_{50} orálně činí pro myši 270 mg.kg^{-1} , pro potkany 370 mg.kg^{-1} (Hoak, 1957).

1.3. Organismy schopné degradovat fenolické látky

Mikroorganismy představují podstatnou složku v komplexním koloběhu uhlíku. V poslední době se stále zvyšuje množství informací a poznatků o mikroorganismech schopných žít v přítomnosti fenolických látek a dokonce je i využívat jako zdroj uhlíku a energie pro svůj růst. Některé studie ukazují, že fenoly a kresoly mohou být degradovány velkým počtem mikroorganismů. Většina užitých mikroorganismů jsou aerobové schopni přeměny toxických organických sloučenin na netoxické anorganické sloučeniny, jako jsou oxid uhličitý a voda. (Torres et al., 1998)

Oxidační typ reakcí využívají k degradaci výlučně aerobní mikroorganismy, zatímco u anaerobních bakterií přicházejí v úvahu pouze reakce redukční. Oxidační sekvence reakcí aromatických sloučenin u aerobních bakterií poskytují intermediáty s dihydroxybenzenovou strukturou. Tyto intermediáty jsou dále štěpeny enzymy využívajícími oba atomy molekulárního kyslíku.

Mezi bakterie využívající fenol patří v první řadě rod *Pseudomonas*, který zahrnuje druhy schopné využít široké spektrum látek, např. alifatické, aromatické uhlovodíky, jejich halogen- či nitro- deriváty, polycyklické aromatické uhlovodíky a jiná organická rezidua, která jsou zřídka degradovatelná pomocí jiných mikrobiálních rodů. Degradace kyseliny benzoové u kmene *Pseudomonas sp.* je znázorněna na Obr. 2 (Broderick, 1999). Existují druhy, které jsou schopné využít i více než 100 odlišných organických sloučenin jako zdroje uhlíku a energie.



Obr. 2: Bakteriální degradace derivátů kyseliny benzoové (převzato z publikace Broderick, 1999). U rodu *Pseudomonas* je chromosomálně či plasmidově kódovaná.

Například *P. aeruginosa* dokáže využívat cukry, mastné kyseliny, alkoholy, di-, tri- karboxylové kyseliny, polyalkoholy, aromáty, aminokyseliny, aminy, atd.

Degradace fenolu pomocí čisté populace *P. putida* probíhá tzv. *meta*-dráhou. Při vysoké koncentraci fenolu dochází ovšem k inhibici růstu, tudíž i samotné degradace. Proto je vhodné mikroorganismy předem kultivovat tak, aby došlo ke zvýšení tolerance buněk k vyšším koncentracím fenolu.

Mezi další bakteriální kmeny využívající fenolické látky patří některé druhy rodu *Bacillus*, např. termofilní *B. stearothermophilus*, *B. thermoleovorans* A2, které mají enzymové vybavení schopné fungovat při vysokých teplotách. Termofilní bakterie rodu *Bacillus* jsou schopny degradovat fenol při teplotě vyšší než 70 °C (Hofrichter and Fritsche, 1992).

Bakterie *B. cereus* kompletně degraduje 150 mg/l benzenu do 25 dní. Tento mikrobiální kmen dokáže přeměnit benzen na fenol a benzoát, které následně využívá jako zdroj uhlíku a energie. Přítomnost benzenu má stimulační účinky na degradaci benzoátu a inhibiční účinky na degradaci fenolu. Přítomnost fenolu a benzoátu pravděpodobně stimuluje degradaci benzenu. Výzkumy ukázaly, že bakterie *B. cereus* je potenciálně použitelná pro remediaci oblastí kontaminovaných benzenem. Použitím nitrátu jako konečného akceptoru elektronů výrazně zvyšujeme potenciální aplikovatelnost v rámci bioremediativních technologií (Dou et al., 2010).

Dalším příkladem je *Ochrobacterium sp.*, jež transformuje fenolické látky na 2-hydroxymukosemialdehyd, který je dále metabolizován na intermediáty Krebsova cyklu. *Ochrobacterium sp.* má nejvyšší hodnoty degradace fenolu při pH 8 (Kilic, 2009; Van Schie and Young, 1998).

Použití *Corynebacteria sp. DJ1* je jedna z možností pro čištění odpadních vod s vysokou koncentrací fenolu. Při 30 °C a pH 7,5 se řád enzymové reakce u tohoto mikroorganismu blíží řádu nultému. Při koncentraci 1500 mg/l byl fenol plně degradován do 60 h. Při 2000 - 2500 mg/l se objevuje „lag“ fáze a degradace se zpomaluje. „Lag“ fáze trvá cca 12 hodin. Následně vzniklý katechol je odbouráván β -ketoadipátovou cestou (Brinkrolf et al., 2007).

Biodegradační schopnosti houby *Aspergillus awamori* byly sledovány v kapalném médiu obsahujícím sloučeniny fenolu. Utilizace fenolu o koncentraci 0,3 g/l proběhla do 60 hodin, 0,6 g/l do 72 h a 1,0 g/l do 7 - 8 dnů. *A. awamori* plně degradoval katechol o koncentraci 1, 2 a 3 g/l za 82, 108 a 124 hodin. Pro kompletní biodegradaci 2,4-dichlorfenolu o koncentraci 1 g/l bylo zapotřebí pět dní. Omezeně dokáže tento mikroorganismus degradovat i 2,6-dimethoxyfenol (Stoilova et al., 2006).

Efekt uhlíkového hladovění byl zkoumán u mikroorganismu *Ewingella americana*, který byl pěstován v médiu obsahujícím fenol. Buňky byly nejprve podrobeny uhlíkovému hladovění a následně byly stanoveny rozdíly ve specifické rychlosti růstu buněk i v rychlosti degradace fenolu. Zjištěná maximální specifická rychlost růstu kmene v závislosti na koncentraci média byla pouze 0,32 h⁻¹ u vyhladovělých a 0,29 h⁻¹ u nevyhladovělých buněk. Výzkum ukázal, že iniciační denzita buněk nemá výrazný efekt na počáteční rychlost degradace fenolu. Uhlíkové hladovění minimalizovalo u buněk aklimatizační dobu, urychlilo schopnost kompletní degradace fenolu a ovlivnilo jednotlivé fáze růstu buněk. Optimální podmínky pro degradaci fenolu byly stanoveny na 37 °C (teplota inkubace) a pH 7,5 (Khleifat, 2006).

Srovnání užití fenolu resp. *m*-kresolu pro kultivaci mikroorganismů bylo pozorováno na příkladu kmene *Alcaligenes faecalis*. Kmen *A. faecalis* byl pěstován na médiu obsahujícím fenol, nebo kresol jako zdroj uhlíku a energie. Ve vysoké koncentraci působí substrát inhibicí růstu buněk. Optimální růst buněk a degradace substrátu byly dosaženy při koncentraci 100 mg/l. Zejména při použití fenolu jako substrátu *A. faecalis* byla pozorována úplná degradace této látky do deseti hodin, což bylo o celých 22 hodin méně než u *m*-kresolu. Při použití fenolu buňky nevykazují žádnou „lag“ fázi, zatímco s použitím *m*-kresolu je „lag“ fáze až 12 h. Což lze chápat jako důkaz větší toxicity *m*-kresolu, který má větší inhibiční efekt na růst buněk. Specifický růst buněk i specifická rychlost degradace substrátu ukazují na lepší schopnost utilizace fenolu než *m*-kresolu (Bai et al., 2007).

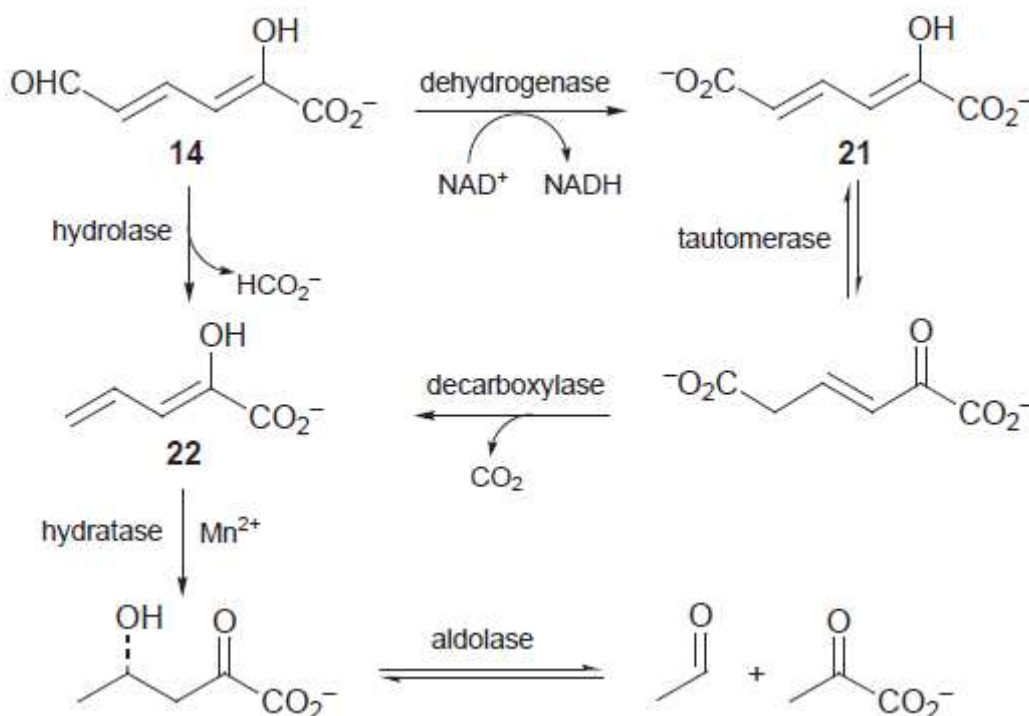
Příklad metabolismu využívajícího *ortho*-cestu poskytuje aerobní kvasinka *Rhodotorula glutinis*, mikroorganismus, který kompletně degraduje 5 mM roztok fenolu a využívá jej jako uhlíkatý zdroj (Kotturi et al., 1991).

Dalších zlepšení při výzkumu bioremediací odpadních vod od fenolických látek bylo dosaženo v oblasti imobilizace použitých degradujících kmenů.

Srovnání výhod volných buněk a imobilizovaných kmenů ukázalo, že hustota volných buněk v médiu je hlavní faktor ovlivňující rychlost úplné degradace fenolu. Pro tento výzkum byl využit například *Acinetobacter* (Beshay et al., 2002).

Kontinuální degradace fenolu ze 100 mg/l na 2,5 mg/l pomocí imobilizovaných buněk *P. putida* se ukázala výhodnější než s pomocí systému volných buněk. pH 5,5 až 6,0 a teplota mezi 25 - 30°C a průměr lůžka 1 - 2 mm jsou optimální podmínky pro degradaci fenolu v malých koncentracích (Mordocco et al., 1999).

U kmenů *P. stutzeri* bylo studováno srovnání volného růstu buněk v médiu obsahujícím fenol a buněk imobilizovaných na nosných částicích. Volné buňky kultury *Pseudomonas* transformují vzniklý katechol klasickou *meta*-cestou degradace aromatických molekul za vzniku 2-hydroxymukonaldehydu a kyseliny 2-hydroxymukonové (Obr. 3). Bakteriální růst je inhibován substrátem nad limitující koncentraci fenolu 600 mg/l. Testy imobilizace ukázaly, že stabilní bakteriální biofilm lze vytvořit na různých typech pevných nosičů, jako silikonový písek nebo aktivní uhlí, ale nikoli na hliníkové fólii. Efektivní je rovněž zachycení na alginátovém lůžku (Viggiani et al., 2006).



Obr. 3: Metabolismus monocyklických sloučenin u kmene *P. putida* (převzato z publikace Bugg and Winfield, 1998).

Použití mikroorganismu *Achromobacter sp.* ukázalo na velice dobrou schopnost utilizace 2,4-dichlorfenolu s použitím vzdušného bioreaktoru. Byl zkoumán i vliv přítomnosti fenolu jakožto druhého zdroje uhlíku a energie.

Výsledky ukazují, že se zvyšující se koncentrací fenolu v médiu, přebírá tento úlohu hlavního zdroje živin na úkor degradace 2,4-dichlorfenolu, která klesá ze 100 % na 87,9 % (Quan et al., 2004).

Trichosporum cutaneum při růstu na médiu YNB („yeast nitrogen base“) je schopno degradovat resorcinol a 0,3 g/l fenolu kompletně do 18 hodin, zatímco pokud je v médiu přítomen pouze resorcinol, trvá jeho úplná degradace až 27 hodin. Biodegradace buňkami imobilizovanými na polyamidových a polyakrylonitrilových granulech probíhala řádově o tři hodiny pomaleji než s použitím volných buněk (Aleksieva et al., 2001). Kvasinka *T. cutaneum* byla rovněž zkoumána při imobilizaci kovalentní vazbou na polyamidové a polyakrylonitrilové membráně s přídavkem glutaraldehydu (Godjevargova et al., 2006).

V určitých případech, kdy jeden typ mikroorganismu není schopen úplně degradovat danou látku, lze s úspěchem použít kombinace aerobní a anaerobní populace. Vzájemnou kooperací dochází ke kompletní mineralizaci (Krug et al., 1985; Krug and Straube, 1986).

K degradaci fenolu byly použity přesně definované směsné kultury např. kvasinky *Cryptococcus elinovie HI* a bakterie *P. putida P8*. Bakterie fenol degraduje *meta*-dráhou, zatímco kvasinka využívá *ortho*-dráhu (Mc Allister et al., 1996).

Živé buňky bakterie *Rhodococcus sp.* degradující fenol byly imobilizovány adsorpcí na aktivní uhlí (GAC) a alginátová lůžka. Tyto imobilizované částice byly použity pro kontinuální čištění minerálního média obsahujícího vysokou koncentraci fenolu. GAC byl zhotoven ze skořápky kokosového ořechu. Alginátová lůžka obsahovala 1% práškového aktivního uhlí, 4 % vápenného alginátu a 1 % mikrobiálních buněk. Aktivní uhlí resp. alginátová lůžka adsorbovala fenol, což způsobilo lokální podmínky nevhodné pro růst jiných bakterií mimo *Rhodococcus sp.*

Porovnání obou materiálů užitých k imobilizaci buněk ukázalo, že alginátová lůžka mají větší schopnost vázat fenol při koncentraci 1000 ppm v protékajícím roztoku (Pai et al., 1994).

Dalším zástupcem degradérů fenolu je, jak již bylo výše uvedeno, bakterie *A. faecalis* spolu s kvasinkou *Candida tropicalis*. Byly izolovány ze vzorku půdy po obohacení v přítomnosti fenolu a vysoké koncentrace solí. Tento vzorek půdy pochází z amazonských deštných pralesů. Předpokládá se, že tyto půdy nebyly nikdy kontaminovány xenobiotickými fenolickými sloučeninami, proto objev těchto izolátů je prvním popsáním případem mikroorganismů degradujících fenol objevených ve vzorcích půdy pocházejících z těchto oblastí (Stephenson, 1990).

Oba izoláty, *A. faecalis* i *C. tropicalis*, byly testovány na schopnost degradace fenolu. Jako referenční mikroorganismus schopný využít fenol byla použita bakterie *Rhodococcus erythropolis*. Izoláty byly srovnávány s mikrobiální populací získanou ze vzorků odpadní vody, která pocházela z prostředí kontaminovaného fenolem (Stephenson, 1990).

Tolerance k fenolu a solím byla vyšší u *C. tropicalis* (snáší 16 mM koncentraci fenolu a 15 % koncentraci solí). Oproti tomu *A. faecalis* snáší 12 mM koncentraci fenolu a 5,6 % koncentrace solí. Kvasinka stejně tak toleruje i širší rozmezí pH (3 - 9) v průběhu degradace. Bakterie *A. faecalis* využívá fenol při pH 7 - 9. Represi degradace fenolu u *C. tropicalis* způsobuje acetát a glukosa, ale ne laktát. U *A. faecalis* laktát degradaci fenolu stimuluje, glukosa a acetát mají jen malý efekt (Stephenson, 1990).

Souhrnný přehled mikroorganismů schopných asimilovat nejrůznější aromatické sloučeniny včetně fenolu byl publikován v práci Zacheho a Rehma (1989). Z tohoto přehledu je zřejmé, že fenol jako zdroj uhlíku a energie jsou schopny využívat např. některé druhy rodů *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Dipodascus*, *Stephanoascus*, černá kvasinka *Exophiala jeanselmei*, která je schopna asimilovat 54 aromatických sloučenin, *Debaryomyces hansenii* a samozřejmě již zmiňované mikroorganismy *Candida* a *Rhodotorula* (Zache and Rehm, 1989).

Velkou většinu průmyslových xenobiotik je možno degradovat způsobem, kdy kontaminant je využíván buď kombinací tzv. „kometabolických“ kroků, které často poskytují jen částečnou degradaci nebo je látka růstovým substrátem a dochází k mineralizaci přinejmenším části molekuly. Mezi organismy schopné takovéto degradace fenolických látek můžeme zařadit mnoho druhů bakterií, ale i kvasinky (například *C. tropicalis*).

Právě kvasinka *C. tropicalis* je významným zástupcem z říše eukaryotních mikroorganismů schopných utilizace fenolu. Je schopna jej utilizovat i v koncentraci kolem 2,5 g.l⁻¹ jako hlavní zdroj uhlíku a energie. Fenol metabolizuje β-ketoadipátovou cestou pomocí induktivního enzymového systému (Sierp and Fränsemeier, 1934).

Vláknitý rod kvasinek *Trichosporon* také využívá fenol i jeho deriváty. Kvasinka *T. cutaneum* je schopna degradovat poměrně vysoké koncentrace fenolu, nad 1 g.l⁻¹, jako výživu pro růst a rozvoj populace. *T. cutaneum* R57 roste a využívá deriváty fenolu, jako resorcinol, 3-nitrofenol, 2,6-dinitrofenol nebo m-kresol (Kaschabek et al., 2002).

Mikroorganismus *Sporotrichum thermophile* prokázal schopnost utilizace indolu. Při koncentraci indolu 1 g/l média došlo k úplné degradaci po šesti dnech. Tento mikroorganismus se zdá být vhodný i pro remediaci prostředí a odpadních vod od ostatních toxických sloučenin (Katapodis et al., 2007).

Z plísňí byly testovány možnosti degradace fenolu u druhu *Fusarium flocciferum*, kmenu *Penicillium simplicissimum* SK9117 (Kennes and Thalasso, 1998) a kmenu *Penicillium Bi 7/2*, který lze použít pro odbourávání různých fenolických látek včetně chloroderivátů a nitroderivátů (Bandyopadhyay et al., 1998).

U *Fusaria sp.* byl zkoumán efekt pH, teploty a přidání glukózy do kultivačního média na biodegraditvni kapacitu. U tohoto kmene byly již popsány hlavní metabolické cesty a mechanismy degradace fenolu. Tento kmen tvořil produkty reakcí katalyzovaných jak katechol-1,2-dioxygenázou, tak i katechol-2,3-dioxygenázou. Byly detekovány v extraktech volných buněk rostoucích exkluzivně na fenolu s možností přídavku sacharózy, což dokazuje, že intermediát katechol může být oxidován v *ortho*- i *meta*- poloze. Minerální soli přidané v kulturách inhibovaly účinky obou dioxygenáz. Tyto dva enzymy mohou být aktivní ve velkém rozsahu teplot a pH. Katechol-1,2-dioxygenáza má optimální aktivitu při pH 6,8 a teplotě 40 °C, aktivní je v rozmezí pH 3 - 8,8 a teploty od 30 – 50 °C.

V porovnání s katechol-1,2-dioxygenázou je katechol-2,3-dioxygenáza lehce citlivější vůči změnám pH a její aktivita se zvyšuje v alkalickém prostředí (pH 7,4 - 10,6) a enzym je stabilnější při vyšších teplotách 30 – 75 °C. Porovnáním hlavních cest metabolismu fenolu u hub bylo zjištěno, že základní iniciační kroky jsou podobné jako u bakterií a fenol je transformován na katechol. Tento dihydroxylovaný intermediáty je metabolizován *ortho*-drahou (β -ketoacidovou) nebo *meta*-drahou pomocí katechol-1,2-dioxygenázy nebo katechol-2,3-dioxygenázy. Oba typy cest vedou intermediáty centrálními metabolickými cestami, jako je cyklus trikarboxylových kyselin.

Fusarium má některé podobnosti ale i odchylky od enzymů ostatních mikroorganismů. Tento mechanismus je schopen metabolické adaptace houby a jejích mutantů nalezených v přírodě, běžně izolovaných z půdy vystavené působení aromatických sloučenin (Cai et al., 2007).

Výsledky získané z enzymologických studií ukazují, že fenol i *p*-kresol v houbě *Scedosporium apiospermum* indukují specifické oxygenázy. Kresol je metabolizován jednou cestou na 3-oxoadipát, fenol je degradován dvěma rozdílnými enzymovými cestami. V případě *p*-kresolu je methylová skupina oxidována *S. apiospermum* přes 4-hydroxybenzylalkohol, 4-hydroxybenzaldehyd a 4-hydroxybenzoát, který podle aktivity 4-hydroxybenzoát-3-hydroxylázy, vede k produkci protokatechuátu, což je indikováno detekcí některých z těchto metabolitů v kulturách rostoucích za přítomnosti *p*-kresolu.

Protokatechuát je dále odváděn *ortho*-cestou za přispění protokatechuát-3,4-dioxygenázy, což vede k tvorbě 3-oxoadipátu podle známých metabolických sekvencí (Hill et al., 1993). V případě fenolu dochází k simultánní degradaci v organismu sekvencí zahrnující katechol, 3-oxoadipát a současně sekvencí zahrnující hydrochinon, 1,2,4-trihydroxybenzen, maleylacetát a opět 3-oxoadipát. Podobný způsob degradace byl popsán pro *A. fumigatus* (Jones et al., 1995), kde rovněž fungoval metabolismus přes katechol i přes hydrochinon (Claussen and Schmidt, 1998).

1.3.1. Charakteristika kvasinek rodu *Candida*

Kvasinky tohoto rodu jsou chemoheterotrofní, eukaryotní, jednobuněčné houby, které se rozmnožují téměř výhradně nepohlavně pučením. Při rozmnožování dochází k tvorbě mycelia, kdy je mateřská buňka spojena s dceřinou úzkým kanálkem, kterým do ní přichází nově vytvořené jádro a buněčný materiál. Kvasinky rodu *Candida* mají schopnost odbourávat monosacharidy a některé oligo- a polysacharidy na ethanol a oxid uhličitý.

Z hlediska morfologie mají kvasinky většinou oválný tvar, který se u různých druhů pohybuje velikostně v rozmezí 3 až 13 μ m. Struktura buněk kvasinek je podobná struktuře ostatních eukaryotních buněk. Rozdíl spočívá v silné a pevné buněčné stěně, kterou jsou buňky kvasinek obaleny stejně jako buňky bakterií.

Tato stěna chrání kvasinku před vnějšími vlivy a zajišťuje její tvar. Stavebním materiálem buněčných stěn kvasinek jsou polysacharidy, většinou glukany a mannany, často ve formě fosforečných esterů, které mají strukturu vláken tvořících hustou, pevnou spleť, vyplněnou bílkoviny (Kučerová et al., 1999).

Pod buněčnou stěnou je tenká cytoplasmatická membrána, která obklopuje cytoplasmu s diferencovaným jádrem. Cytoplasmu dále obsahuje ribosomy, mitochondrie, endoplasmatické retikulum, Golgiho aparát, zrníčka rezervních látek a také vakuoly, podobně jako je tomu v rostlinných buňkách.

V současnosti známe více než 500 druhů kvasinek, které tvoří 37 rodů. Mezi kvasinky rodu *Candida* patří především *C. albicans*, *C. utilis*, *C. tropicalis* a *C. pseudotropicalis* (Kučerová et al., 1999).

Jelikož fenolické sloučeniny mohou mít vážný vliv na životní prostředí, jsou mikrobiologické a biochemické studie jejich aerobních degradací předmětem velkého zájmu a monitorování spotřeby kyslíku může poskytnout důležité informace o celém procesu. Bylo zjištěno, že *C. maltosa* dokáže využívat fenol a katechol jako hlavní živiny až do koncentrací 1,7 resp. 1,5 g/l a tuto schopnost neovlivňuje přítomnost resorcinolu až do koncentrace 2 g/l. *C. maltosa* také dokáže ko-metabolizovat *p*-kresol, ale utilizace benzoátu a salicylátu nebyla prokázána. Fenolhydroxylázová aktivita dosáhla maxima na začátku exponenciální fáze během kultivace kvasinky v médiu obsahujícím fenol. Po kompletní utilizaci fenolu enzymová aktivita pomalu klesala (Fialová et al., 2004).

1.3.2. Vlastnosti kvasinky *C. tropicalis*

Kvasinka *C. tropicalis* je aerobní mikroorganismus. Aerobní respirační řetězec je tvořen baterií oxidoreduktas, analogicky jako mitochondriální dýchací řetězec vyšších organismů. *C. tropicalis* také dokáže, stejně jako jiné kvasinky, využít cukry, např. glukózu, sacharózu, maltózu (Brooks and Riviere, 1996). Tento mikroorganismus také dokáže využít fenol, ale například i formaldehyd, jako svůj hlavní zdroj uhlíku a energie (Windholz, 1983).

Kvasinka *C. tropicalis* patří mezi oportunní patogeny. To znamená, že za normálních okolností je pro člověka zcela neškodná a je součástí mikroflóry na sliznicích v lidském organismu. U oslabených jedinců může ovšem vyvolat candidózu, což je infekce ohrožující zdraví a v některých případech i život pacienta.

C. tropicalis vytváří dlouhá, místy zaškrčená vlákna, na kterých se tvoří svazky kratších kulovitých buněk (blastospor) (Janderová and Bendová, 1999).

Technikou barvení chromozomů a elektronovou mikroskopií se rozlišuje pět stádií životního cyklu kvasinky *C. tropicalis*. Sexuálně aktivní haplofáze (Kučerová et al., 1999), která mutuje přímo na sexuálně inaktivní haplofázi, anebo se mění na diplofázi (autodiploidizace) (Murray et al., 2002). Nestabilní diplofáze se mění na sexuálně inaktivní haplofázi, která je stabilní. Tento proces změny fáze představuje určitý typ meiózy (Cunningham et al., 1995).

U *C. tropicalis* se vyskytují chlamydospor, jako velké kulaté buňky, které se mitoticky štěpí na filamenty (Allen, 1991). Během této specifické meiózy se může v diplofázi tvořit i vícejaderné buňky (Páca, 2005).

Buňky 19 kvasinkových kultur patřící k rodu *Candida* byly testovány na biodegradaci fenolu. Kultury byly vybrány tak, aby tvořily reprezentativní vzorek druhu. *C. tropicalis* a *C. lipolytica* efektivně degradovaly více než 90 % fenolu o koncentraci 2 g/l. *C. tropicalis* byla vybrána pro podrobnější studie, jelikož byla schopna metabolizovat více než 95 % fenolu za pouhých 16 hodin v porovnání s druhým kmenem, který metabolizoval stejné množství za 48 hodin. Maximální kompletně degradovatelná substrátová koncentrace byla 2 g/l. Studium indukce při různých koncentracích fenolu v médiu ukázalo, že toxicita vůči rostoucím buňkám se úměrně zvyšuje se zvyšující se koncentrací fenolu. Schopnost biodegradace fenolických derivátů *o*-kresolu, *m*-kresolu, 2,6-dimethylfenolu, *a*-naftolu, *o*-chlorfenolu, *p*-nitrofenolu se specificky liší pro jednotlivé substráty (Varma and Gaikwad, 2008).

Mutantní kmen CTM2 získaný ozářením přírodního typu *C. tropicalis* He-Ne laserem ukázal zvýšení schopnosti degradace fenolických sloučenin. Tento kmen je schopen degradovat 2,6 g/l fenolu a 0,3 g/l *m*-kresolu. Při dvousubstrátové biodegradaci působí fenol jako promotor pro degradaci *m*-kresolu, ale vždy je jako zdroj uhlíku utilizován přednostně. Naopak relativně nízká koncentrace *m*-kresolu může vést k velké inhibici degradace fenolu (Jiang et al., 2007).

1.4. Metabolismus xenobiotik

1.4.1. Vstup xenobiotika do organismu

Cesty vstupu cizorodých látek do organismu jsou různé. Nejčastější vstup xenobiotika do živočišných organismů je zažívacím traktem, méně častý pokožkou (dermální vstup) popř. sliznicí. Plynné látky a aerosoly vstupují do živočišného organismu respiračním systémem (inhalace). Ve výjimečných případech, např. při zraněních nebo některých aplikacích léků, může dojít k průniku podkožnímu, nitrosvalovému či nitrožilnímu (Prokeš, 1998). V případě mikroorganismů je vstup xenobiotika do buňky zprostředkován jak pasivním, tak i aktivním transportem v závislosti na povaze xenobiotika.

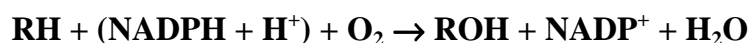
1.4.2. Biotransformace xenobiotik v živém organismu

1) Derivatizační fáze

V této první fázi biotransformace probíhají především reakce oxidační, při kterých jsou do skeletu xenobiotika zavedeny polární funkční skupiny (např. hydroxylové nebo oxoskupiny).

Často také dochází k odkrývání polárních funkčních skupin např. hydrolyzou esteru, amidu apod. Oxidaci cizorodé látky realizují většinou enzymy povahy monooxygenáz, např. systém cytochromu P450.

Látky, které se nemohou přímo přeměnit jinými reakcemi na polární sloučeniny nebo na látky schopné konjugace, jsou hydroxylovány podle následujícího schématu (Kučerová et al., 1999):



RH..... xenobiotikum

ROH... hydroxyderivát

2) *Konjugační fáze*

Účelem této druhé (konjugační) fáze je biotransformovat sloučeniny, které byly hydroxylovány nebo jinak změněny v první (derivatizační) fázi, pomocí specifických enzymů, což vede k dalšímu zvýšení polaritě metabolitů xenobiotik. Jedná se zejména o konjugaci s kyselinou glukuronovou, sulfátem, acetátem, glutathionem, některými aminokyselinami, popř. může dojít také k methylaci xenobiotika.

V konjugační fázi dochází k tvorbě tzv. konjugátů, v nichž se spojuje endogenní polární látka (konjugační složka) s metabolitem xenobiotika, který vznikl v první fázi biotransformace.

Účelem obou fází metabolismu je maximální zvýšení rozpustnosti metabolitů xenobiotika ve vodě, a tím usnadnění jejich vyloučení z živočišného organismu (Vodrážka, 1993).

Reakce konjugační fáze probíhají v mikroorganismech jen ve velmi malé míře nebo chybí úplně, zatímco ostatní fáze biotransformace xenobiotik probíhají v mikroorganismech prakticky obdobně jako v živočišných organismech. Většina mikroorganismů metabolity xenobiotik využívá především jako zdroj uhlíku a energie pro svůj růst. Cizorodá látka je u těchto mikroorganismů po derivatizační fázi biotransformace začleněna do jejich intermediárního metabolismu (Cunningham, 1995).

1.5. Biodegradace fenolických látek

Biodegradace i biosyntéza fenolických látek je samozřejmou součástí koloběhu prvků v přírodě, neboť jsou tyto látky velmi rozšířené a s časem se tedy staly běžnou součástí životního prostředí kolem nás. Obecně můžeme říct, že fenoly produkované průmyslovou činností mají vyšší toxicitu než přírodní fenolické látky (např. lignin, hydrochinon nebo kyselina salicylová).

V posledních letech je velká pozornost věnována biologickým degradacím přírodních polutantů včetně fenolů. Při těchto procesech se, jak bylo výše uvedeno, čím dál častěji využívá široký utilizační potenciál prokaryotických i eukaryotických organismů. Relativní spolehlivost, nízké provozní a investiční náklady, schopnost převádět velkou řadu toxických materiálů na neškodné finální produkty, aniž by vznikaly nebezpečné meziprodukty, jsou hlavní benefity mikrobiálních degradací.

K bioremediacím jsou využívány mikroorganismy, u nichž předpokládáme schopnost využít kontaminanty jako hlavní zdroj uhlíku a energie pro svůj růst a metabolickou činnost. Mikroorganismy mohou xenobiotické látky degradovat za aerobních, anaerobních podmínek (Tichý, 1998). Kontaminanty lze buďto převést na méně toxické sloučeniny transformačními reakcemi, nebo je zcela mineralizovat na základní anorganické sloučeniny jako jsou CO_2 , H_2O , H_2 , NH_3 , CH_4 a biomasu (Chudoba et al., 1991).

Výhoda biologického procesu oproti fyzikálně-chemickým metodám spočívá v tom, že dochází k totální oxidaci organické hmoty a zároveň nevzniká žádný odpadní materiál, který by musel být dále upravován. U všech biodegradací hraje klíčovou úlohu čas. Podle typu polutantu, zvoleného způsobu degradace, druhu mikroorganismu a souhrnu vnějších podmínek může degradace trvat hodiny, ale někdy také až roky.

Biologicky odbouratelné látky je možné degradovat jen v určitém koncentračním rozmezí (Masák et al., 1992). Problematické je odbourávání velmi nízkých koncentrací vyskytujících se u kontaminovaných podzemních vod, ale na druhou stranu i vysokých koncentrací, které jsou obvyklé pro skládky odpadů (Landa et al., 1959).

Pro degradaci vysokých koncentrací fenolických látek bývají využívány buňky dlouhodobě vystavené mezním koncentracím, při kterých však nedochází k zamezení buněčného růstu ani nevedou k buněčné smrti. K té by mohlo snadno dojít, neboť fenoly působí jako jedy poškozující všechny druhy buněk (Landa et al., 1959).

Předmětem zájmu výzkumu jsou stále častěji geneticky upravené mikroorganismy, jenž mají vhodně pozměněný genom vedoucí k vyšší degradační aktivitě a rozšíření spektra utilizovatelných látek, k vyšší stabilitě a odolnosti proti působení nežádoucích vlivů.

Buňky k degradaci lze užívat volně přítomné v médiu či určitým způsobem imobilizované. V laboratorních podmínkách jsou volné buňky využívány při kultivacích v kapalném médiu. Kultivace probíhají na třepačkách či v laboratorních fermentorech a v kapalném médiu dochází k rozkladu odpadního materiálu. Při práci s volnými buňkami je nutno zařadit druhý krok degradace, kterým je separace mikrobiální biomasy od přečišťované tekutiny. Dochází tedy k ekonomickému znevýhodnění celého procesu. Bioreaktory mohou být provozovány jako vsádkové, s postupným přítokem živin („fed-batch“), semikontinuálně, popř. kontinuálně s nízkými koncentracemi (Annadurai et al., 2000).

V dnešní době stále více a více roste zájem o imobilizaci buněk. Možnost imobilizace buněk na povrch nosiče se využívá například v bioreaktorech typu biofiltru (Chudoba et al., 1991), biologického fluidního lože apod. Jednotlivé typy bioreaktorů s pevnou náplní se od sebe liší konstrukcí, typem nosiče, typem mobilní fáze (kapalina, plyn), přívodem znečištěné vody či plynu a při použití aerace i způsobem aerace. Vlastní podstata degradace však zůstává stejná. Rozpuštěná odpadní látka se při průchodu bioreaktorem adsorbuje na povrch biofilmu a následně penetruje dovnitř. Uvnitř biofilmu je působením mikroorganismů degradována na konečné produkty, které z bioreaktoru odcházejí.

U těchto systémů odpadá náročný proces separace biomasy (imobilizace) od čištěného odpadního materiálu (mobilní fáze), což je nespornou výhodou poskytující časovou a tím mnohdy i finanční úsporu (Landa et al., 1959).

Mezi další výhody imobilizace buněk patří vyšší koncentrace biomasy v systému, jenž zaručuje větší specifický povrch pro příjem substrátu. S tímto úzce souvisí i vyšší metabolická aktivita buněk. V neposlední řadě se imobilizované buňky vyznačují vyšší stabilitou a rezistencí proti působení škodlivých vlivů, jako je například přítomnost antibiotik, apod.

K vlastnímu procesu imobilizace může dojít dvěma způsoby. Některé mikroorganismy mají přirozenou schopnost adsorbovat se na různé povrchy, nebo lze pomocí některé ze sofistikovaných technik vyvolat imobilizaci (připoutání) buněk uměle.

V prvním případě dochází k fixaci buněk na povrch nosiče pomocí některé z organel nebo struktur, kterými je buňka vybavena na svém povrchu. Mohou to být například fimbrie, pili, či jiné specifické kompartmenty buněčné stěny.

Často jsou buňky schopny v přirozeném prostředí syntetizovat glykokalyx, který je tvořen polysacharidovými či glykoproteinovými vlákny, pomocí nichž se buňka zachytí na povrch nosiče. K různým typům interakcí dochází mezi buněčným povrchem a povrchem nosiče v závislosti na druhu mikroorganismu, vlastnostech povrchu nosiče, vlastnostech procházející tekutiny a vnějších podmínkách. Nejčastěji se jedná o elektrostatické či hydrofóbní interakce, nebo se tvoří kovalentní vazby (Gallo et al., 1976).

V případech, kdy se jedná o uměle vyvolanou imobilizaci, jsou využívány speciální techniky. Příkladem může být tzv. mikroenkapsulace, která v podstatě spočívá v obalení kapičky obsahující mikroorganismy tenkou membránou, kterou bývá například nylon nebo nitrát celulosy. Buňky se mohou uvnitř kapsule volně pohybovat a přeměňovat substrát, jenž prochází membránou. Další technikou imobilizace je membránová separace, kde se buňky oddělují od tekutiny pomocí porézní ultrafiltrační membrány. V některých případech se používají selekční membrány, které propouští jen určité sloučeniny. Velká pozornost se věnuje metodě „entrapmentu“, která spočívá v upoutání mikroorganismu do trojrozměrné polymerní matrice. Póry v matrici jsou menší než mikrobiální buňky, které se tudíž udrží uvnitř matrice, a zároveň je díky velikosti pórů transportován do matrice substrát, který je zde následně degradován.

V současnosti patří mezi nejčastěji používané polymerní matrice algináty (Na^+), „polyacrylamid silica gel“, „polyacrylamid hydrazid gel“, polyvinylalkohol, polypropylenglykol, apod (Páca, 1994).

Bioreaktor je naplněn vybraným materiálem, dojde k fyzickému kontaktu s buňkami, ty se uchytí na povrch nosiče a vytvoří se biofilm o určité tloušťce. Z pevných porézních materiálů se v současnosti využívají především keramika, sklo, kamenná drť, plasty, dřevní štěpky a kůra, perlit, polystyren, polyuretanová pěna, rašelina, písek, suchý kal apod (Chudoba et al., 1991).

Materiál, jenž se používá pro přirozenou imobilizaci buněk, musí splňovat určitá kritéria. Musí být rezistentní k degradačnímu působení buněk, vysoce propustný pro substrát, porézní, odolný proti opotřebování, ekologicky nezávadný. V případě dekontaminace odpadní vody musí být nerozpustný (Annadurai et al., 2000). Jeho výběr závisí také na ceně a charakteristice povrchu či typu tekutiny. Výhoda organického materiálu je vyšší adsorpční kapacita, anorganický se vyznačuje vyšší termostabilitou a odolností k degradačnímu působení buněk (Kennes and Thalasso, 1998).

Samotné řešení sanace, ať se jedná o kontinuální vstupy nízkých koncentrací, které se vyskytují na velkém území, úniky z přírodních ložisek, kde přirozená biodegradace probíhá příliš pomalu, nebo havárie velkého množství látky na menším území (prasklé potrubí, tankery), závisí na mnoha faktorech. Musíme rozlišit, o jakou látku se jedná a zda došlo ke kontaminaci půdy, povrchové či podzemní vody. Podle toho pak volíme jednotlivé technologické procesy.

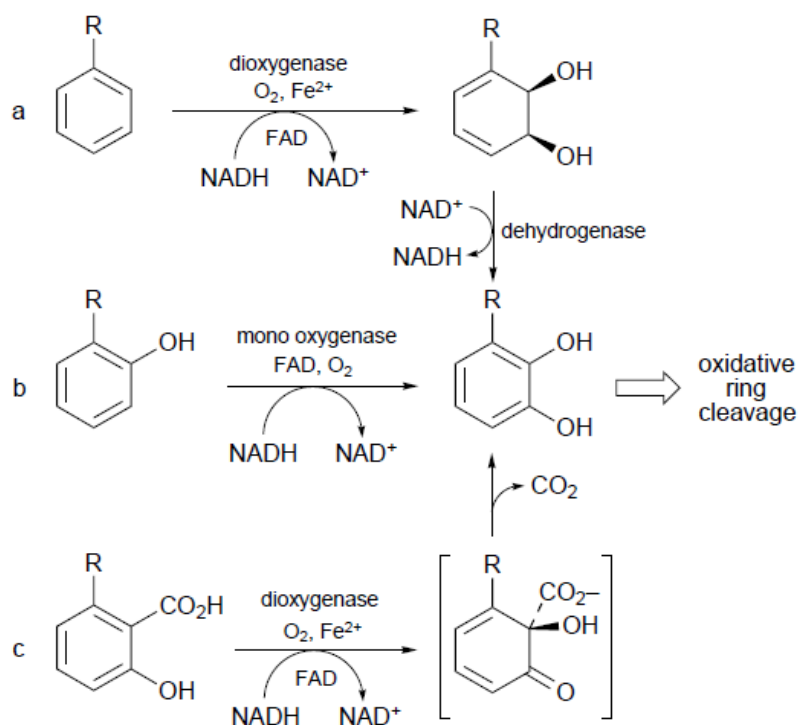
Musíme zajistit dostatečně velké množství inokula mikroorganismu, který je schopen degradovat danou kontaminující látku, zajistit optimální teplotu, pH, množství kyslíku, vody a anorganických živin. A poté aplikujeme metodu, která je v daném případě nejvhodnější.

1.5.1. Mechanismus degradace fenolu

U degradace mikrobiálními buňkami je nutno rozlišit, zda probíhá za aerobních podmínek, kdy je konečným akceptorem elektronů kyslík nebo za anaerobních podmínek, kdy jsou akceptory nitráty, sulfáty, CO₂, a další organické sloučeniny (Vilímková, 2008).

1.5.1.1. Aerobní degradace fenolu prokaryoty

Prokaryotní mikroorganismy disponují enzymovým aparátem, který jim umožňuje oxidovat aromatické skelety. Podle typu enzymového aparátu se liší i využívané mechanismy. Benzenové jádro tvoří běžnou součást přirozeně degradovaných materiálů. V případě, že jsou na aromatický kruh vázány další substituenty (Cl⁻, F⁻, NO₃⁻), stává se jádro obtížněji degradovatelným díky stabilizaci struktury. Bakterie mohou fenolické látky asimilovat katecholovou (*ortho*) nebo gentisátovou (*para*) dráhou. Zabudování molekuly kyslíku do aromatického kruhu za přispění oxygenas je společné pro obě užívané dráhy (Obr. 4).



Obr. 4: Strategie první fáze aromatické degradace (převzato z publikace Bugg and Winfield, 1998).

V první fázi degradace fenolu dochází k jeho oxidaci za vzniku *cis*-dihydrodiolu (1,2-epoxidu) zabudováním jednoho atomu kyslíku do aromatické struktury a dále k oxidaci *cis*-dihydrodiolu za vzniku katecholu. Tento počáteční krok katalyzuje enzym fenolhydroxyláza.

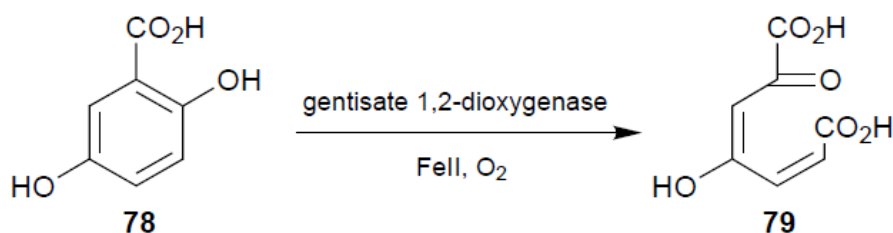
Vytvořený katechol je oxidován dioxygenázou. Dojde k rozštěpení aromatického kruhu, které může probíhat buď tzv. „*ortho*“ nebo „*meta*“ štěpením (Landa et al., 1959).

V případě *ortho*-štěpení (Obr. 5), které je katalyzováno katechol-1,2-dioxygenázou, dojde k rozštěpení aromatického jádra katecholu v poloze 1,2 (mezi dvěma atomy nesoucími hydroxylové skupiny). Jedná se tedy o intradiolové štěpení za vzniku kyseliny *cis*, *cis*-mukonové, která přechází na mukonolakton. Obdobným způsobem je degradován i protokatechuát, katalyzovaný protokatechuát-1,2-dioxygenázou, za vzniku analogických intermediátů β -karboxy-*cis*,*cis*-mukonátu, γ -karboxy-mukonolaktonu.

Po vzniku těchto intermediátů dochází ke konvergenci obou oddělených degradačních řetězců za vzniku společných meziproductů enol-laktonu- β -ketoacidové kyseliny, β -ketoacidu a β -ketoacyl-CoA. Thiolytickým štěpením β -ketoacyl-CoA vznikají produkty acetyl-CoA a sukcinát (Landa et al., 1959)

Při extradiolovém (tzv. *meta*-) štěpení dochází k rozštěpení jádra za přispění enzymu katechol-2,3-dioxygenázy mezi 2. a 3. atomem uhlíku a ke vzniku semialdehydu kyseliny 2-hydroxymukonové, který je dále metabolizován přes 4-oxalkrotonovou kyselinu, 2-keto-4-hydroxyvalerovou až na acetaldehyd a pyruvát.

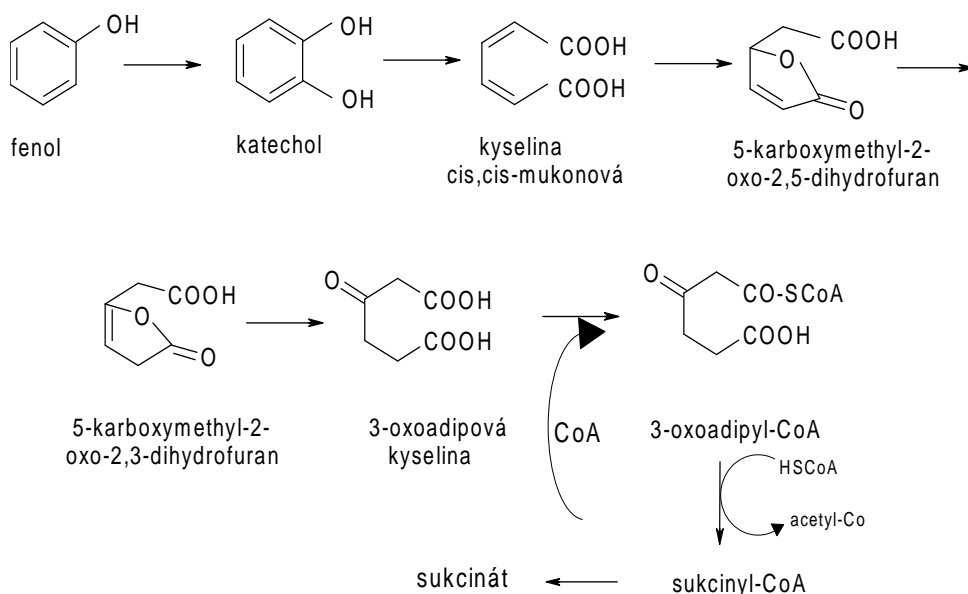
Gentisátová dráha (Obr. 5) vychází z kyseliny gentisové, jež má obě hydroxylové skupiny v poloze *para*-. Ke štěpení dochází mezi hydroxylovou a karboxylovou skupinou. Produktem tohoto štěpení je acetoacetát a fumarát, které se dále zapojují do metabolismu organických kyselin (Landa et al., 1959).



Obr. 5: Štěpení 2,5-dihydroxybenzoové kyseliny gentisát-1,2-dioxygenázou (převzato z publikace Bugg and Winfield, 1998).

1.5.1.2. Aerobní degradace fenolu eukaryoty

U většiny kvasinek byla objevena tzv. 3-oxoadipátová dráha užívaná pro degradaci fenolických sloučenin (Sierp and Fränsemeier, 1934). Prvním krokem této dráhy je hydroxylace fenolu za vzniku katecholu (Obr. 6). Tento krok je katalyzován NADPH-dependentní fenolhydroxylázou.



Obr. 6: 3-oxoadipátová dráha užívaná kvasinkami k utilizaci fenolu (vytvořeno v programu ACD/ChemSketch).

Katechol je následně štěpen *ortho*-štěpením. Reakcí s molekulárním kyslíkem se benzenový kruh otvírá intradiolovým štěpením a vzniká *cis,cis*-mukonát. Tuto reakci katalyzuje katechol-1,2-dioxygenáza. U kvasinek dosud nebyla objevena aktivita katechol-2,3-dioxygenázy. Konečným produktem degradace fenolu u kvasinek je acetyl-CoA a sukcinát.

1.5.1.3. Využití kvasinky *C. tropicalis* pro biodegradaci fenolu

V první fázi biodegradace fenolu používá kvasinka *C. tropicalis* (pro katalýzu hydroxylace fenolu na katechol) cytoplasmatickou NADPH-dependentní fenolhydroxylázu. K tomuto účelu slouží kvasince *C. tropicalis* také mikrosomální systém oxygenáz se smíšenou funkcí s cytochromem P450 jako terminální oxidázou (Stiborová et al., 2003; Páca et al., 2007; Varma and Gaikwad, 2009).

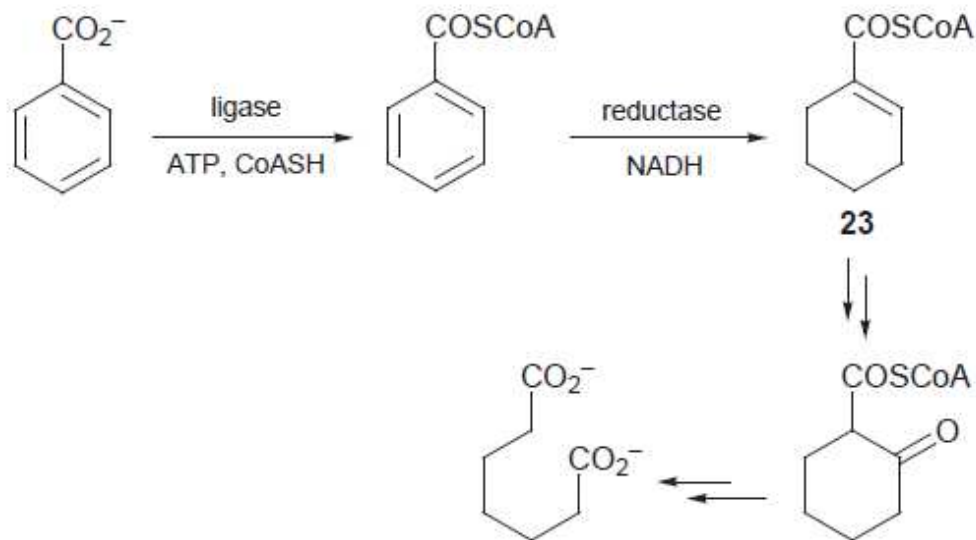
U *C. tropicalis* se tedy jedná o asimilaci fenolických látek katecholovou (*ortho*) cestou, během které je do aromatického kruhu zabudován jeden atom z molekuly kyslíku. Nejprve dochází k oxidaci fenolu za vzniku 1,2-epoxidu zabudováním atomu kyslíku do aromátové struktury a dále vzniká katechol (Hensel and Straube, 1990).

Katechol je ve druhé fázi oxidován katechol-1,2-dioxygenázou na kyselinu *cis, cis*-mukonovou. *C. tropicalis* byla použita jako modelový organismus v mnohých studiích. Například v substrátové inhibici oxidace fenolu, technice fúze protoplastů a degradaci fenolu v přítomnosti ostatních derivátů. Ve všech těchto případech byl fenol metabolizován rostoucími mikroorganismy jako zdroj uhlíku a energie (Jiang et al., 2010; Stephenson, 1990; Chang et al., 1995; Komárková et al., 2003).

1.5.1.4. Metabolismus fenolu za anaerobních podmínek

Přeměna fenolu na cyklohexanol nebo kyselinu benzoovou je prvním krokem metabolismu za anaerobních podmínek. Cyklohexanol je dále metabolizován přes cyklohexanon, kyselinu kapronovou na acetát.

Kyselina benzoová může být metabolizována dvěma cestami. Redukcí vzniklá kyselina cyklohexankarboxylová je dále přeměněna přes kyselinu máselnou a kyselinu propionovou na acetát (Obr. 7).



Obr. 7: Anaerobní degradace kyseliny benzoové (převzato z publikace Bugg and Winfield, 1998).

Druhou možností je redukce kyseliny benzoové na kyselinu cyklohexenkarboxylovou, která je přes kyselinu adipovou rovněž metabolizována na acetát. Acetát ze všech uvedených drah je přeměněn na metan a oxid uhličitý (Brányik et al., 2000).

1.6. Enzymové systémy biotransformující fenolické látky

Na oxidaci xenobiotik včetně fenolů se podílí početná skupina enzymů označovaných jako oxygenázy (Páca, 1994). Podle toho, zda dojde k začlenění jednoho nebo dvou atomů kyslíku do molekuly, rozlišujeme monooxygenázy a dioxygenázy. Obě tyto skupiny enzymů vyžadují pro svoji aktivitu biatomickou molekulu kyslíku a přítomnost kofaktoru schopného tuto O₂ molekulu aktivovat. Jako kofaktory mohou sloužit např. přechodných kovů nebo flaviny (Hofrichter et al., 1992). V některých organismech se na oxidaci fenolických látek podílejí také peroxidázy (Ijah, 1998).

1.6.1. Monooxygenázy

Tyto enzymy lze rozdělit do dvou základních skupin:

1. Oxygenázy se smíšenou funkcí („mixed function oxidases“, MFO), které mají širokou substrátovou specifitu. Tyto enzymové systémy katalyzují inkorporaci jednoho atomu kyslíku do molekuly hydrofobního substrátu, zatímco druhý atom je většinou redukován na vodu (Mamiko et al., 1995). Tento systém je v eukaryotických buňkách lokalizován v membráně hladkého endoplazmatického retikula a skládá se ze tří až čtyř složek:

Cytochrom P450 (CYP) (EC 1.14.15.1)

NADPH:CYP oxidoreduktáza (EC 1.6.2.4)

Membránové lipidy

Fakultativní složkou je NADH:cytochrom b₅ reduktáza (EC 1.6.6.2)

2. Flavinové monooxygenázy katalyzují monohydroxylaci aromatického kruhu xenobiotických látek. Do této skupiny enzymů řadíme především fenolhydroxylázu katalyzující hydroxylaci fenolu na katechol.

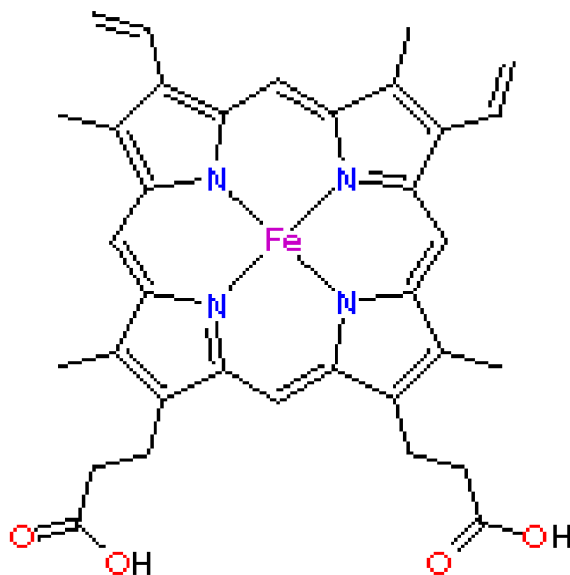
1.6.1.1. Cytochromy P450

Cytochromy P450 (EC 1.14.15.1, CYP) patří mezi klíčové enzymy metabolismu cizorodých látek. Zatímco u prokaryot jsou cytochromy P450 rozpustné cytoplazmatické proteiny, téměř všechny eukaryotické cytochromy P450 mají membránový charakter a bývají obvykle lokalizované v membránách endoplazmatického retikula (ER) nebo mitochondrií (Mamiko et al., 1995).

1.6.1.2. Struktura cytochromu P450

Cytochromy P450 jsou hemoproteiny s molekulovou hmotností pohybující se okolo hodnoty 50 kDa. Tyto hemoproteiny jsou složeny z hemu b (Obr. 8) a apoproteinu, který odpovídá za substrátovou specifitu. Vazba porfyrinového skeletu na protein není na rozdíl od ostatních známých hemoproteinů kovalentní. Ion železa v hemu je schopný tvořit 6 koordinačních vazeb. Čtyři z nich jsou vazbami s atomy dusíku tetrapyrrolového kruhu hemu. Ostatní dvě vazby jsou k rovině hemu kolmé.

První z vazeb je thiolátovou vazbou síry z aminokyseliny cysteinu proteinového řetězce, druhou může být vázán atom kyslíku obsažený v molekule vody. Pokud dojde k vazbě kyslíku, přechází CYP z pentakoordinované formy na hexakoordinovanou, jestliže je přirozeným ligandem některá aminokyselina z postranního řetězce, je CYP rovněž v hexakoordinované formě. Šestáým ligandem však mohou být některé sloučeniny jako např. CO, CN⁻ nebo voda. Apoprotein většiny CYP obsahuje hydrofobní „kapsu“, do které je umístěn hem a vazebné místo pro substrát (Hiroyuki et al., 1998).



Obr. 8: Struktura hemu b (převzato z <http://metallo.scripps.edu/promise>).

Také u kvasinky *C. tropicalis* byl detekován cytochrom P450 (pravděpodobně CYP52) indukovatelný fenolem (Stiborová et al., 2003).

1.6.1.3. NADPH:cytochrom P450 reduktáza

Vedle CYP se v mikrozosální frakci vyskytuje i druhá složka oxygenázového systému, a to NADPH:CYP reduktáza (Stiborová et al., 2003) (EC 1.6.2.4) s molekulovou hmotností 80 kDa. Tento enzym tvoří hydrofilní doména s molekulovou hmotností 70 kDa, která směřuje vně membrány endoplasmatického retikula. Tato část proteinové molekuly vykazuje NADPH:cytochrom c reduktázovou aktivitu.

Hydrofobní doména enzymu o molekulové hmotnosti 10 kDa slouží k ukotvení enzymu v membráně a k tvorbě funkčního enzymového systému s cytochromem P450 (Stiborová et al., 2004).

1.6.1.4. Fenolhydroxyláza

Fenolhydroxylázy jsou monooxygenázy schopné katalyzovat NADH- nebo NADPH-dependentní hydroxylaci monocyklických fenolů. V čistém stavu mají jasně žluté zbarvení dokazující přítomnost molekul FAD a tedy jejich zařazení mezi flavoproteiny. U kvasinky *T. cutaneum* je molekulová hmotnost enzymu 148 kDa. Fenolhydroxyláza tohoto kmene kvasinek obsahuje přesně jeden mol FAD na mol enzymu. Čistý enzym má přesně stejnou substrátovou specifitu jako nepřečištěné preparáty. Dokáže využít fenol stejně jako tři izomerní difenoly a množství fenolických derivátů. V těchto reakcích jsou produkovány vždy příslušné *ortho*-dioly.

Enzymová aktivita není ovlivněna chelatačními činidly, ale inhibují ji oxidační činidla (peroxydy) a některá redukční činidla, jako je kyselina askorbová. Někdy je inhibice redukčními činidly zvrácená oxidací, ale např. po redukci v přítomnosti borhydridu je zpětná oxidace velmi pomalá. Nejúspěšnější je opětová aktivace enzymu inkubací s FAD.

Enzym je velice citlivý k anorganickým solím, dusíkatým bázím a detergentům. Chloridy nemají výraznější efekt na aktivitu a fosfáty enzym stabilizují (Neujahr and Gaal, 1973).

NADPH-dependentní fenolhydroxyláza je řazena mezi flavinové enzymy, neboť její prosthetickou skupinou fenolhydroxylázy je FAD (Dong et al., 2001).

FAD může být lokalizován ve dvou pozicích podle toho, v jaké fázi hydroxylace substrátu se enzym právě nalézá:

FAD v poloze „out“: může se na něj navázat NADPH.

FAD v poloze „in“: FAD je zanořený dovnitř proteinu, což umožňuje ochranu dalšího navázaného substrátu (fenolu) před účinky rozpouštědla. Zároveň jsou chráněny i vznikající intermediáty reakce (Dong et al., 2001).

Enzym *C. tropicalis*, který je daleko méně charakterizovaný než fenolhydroxyláza *T. cutaneum*, má širokou substrátovou specifitu. Dokáže katalyzovat biodegradaci fenolu, ale i jeho monohalogen, monomethyl, či monoamino derivátů. U kvasinky *C. tropicalis* je enzym tetramer složený ze čtyř podjednotek o molekulové hmotnosti 60 kDa (Páca et al., 2007).

1.6.2. Dioxygenázy

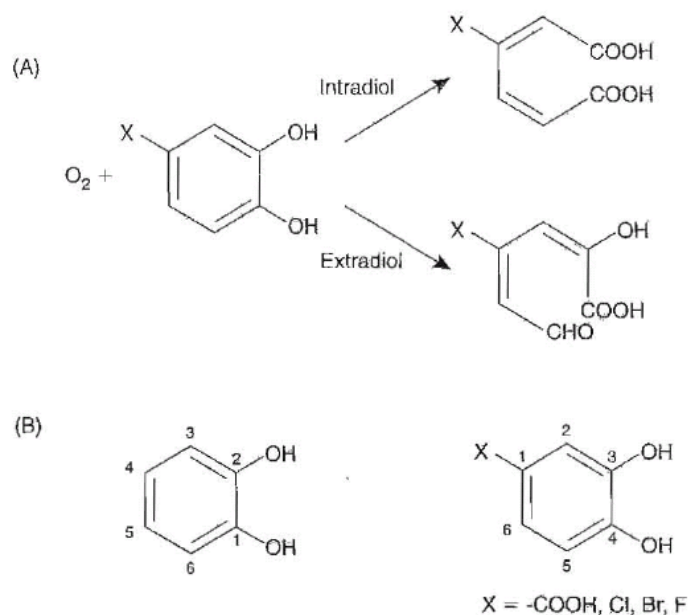
Oxygenázy inkorporující oba atomy kyslíku z biatomické molekuly O₂ do molekuly substrátu se nazývají dioxygenázy.

Jedna skupina dioxygenáz produkuje metabolity se dvěma atomy kyslíku začleněnými v molekule substrátu, přičemž nedochází k poškození základní struktury sloučeniny (aromatický kruh je zachován). Druhá skupina po zavedení dvou atomů kyslíku do substrátu způsobí rozštěpení aromatického kruhu metabolizované sloučeniny (Broderick, 1999). V případě metabolismu fenolu se jedná o dva enzymy:

1. Katechol-1,2-dioxygenáza (EC 1.13.11.1) (*ortho* dráha)
2. Katechol-2,3-dioxygenáza (EC 1.13.11.2) (*meta* dráha)

1.6.2.1. Dioxygenázy štěpící aromatické kruhy

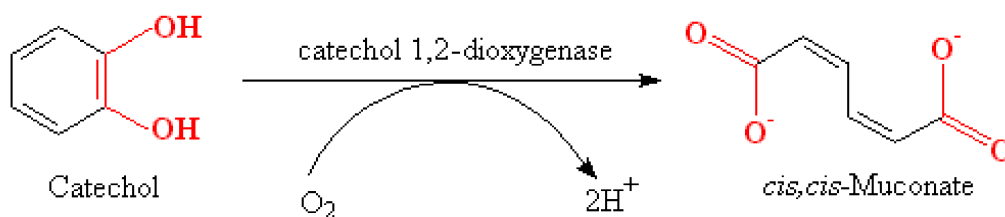
K rozštěpení kruhu aromatických dihydroxyderivátů, které jsou vůči sobě v poloze *ortho*, dochází buď v intradiolové nebo v extradiolové pozici (Obr. 9). Tyto dvě možné cesty degradace reakčního produktu fenolmonooxygenázy (katecholu), katalyzují enzymy katechol-1,2-dioxygenáza a katechol-2,3-dioxygenáza (Broderick, 1999).



Obr. 9: Intradiolové (A) a extradiolové štěpení katecholu (B). Způsob číslování katecholu a jeho derivátů (převzato z publikace Broderick, 1999).

1.6.2.2. Katechol-1,2-dioxygenáza

Reakcí s molekulárním kyslíkem se benzenový kruh otevírá intradiolovým štěpením (*ortho*-dráha) za vzniku *cis,cis*-mukonátu (Obr. 10) (Sanglard et al., 1986).



Obr. 10: Intradiolové štěpení katecholu na kyselinu *cis,cis*-mukonovou (vytvořeno v programu ACD/ChemSketch).

Katechol-dioxygenázy řadíme mezi enzymy, které katalyzují postupnou adici obou atomů kyslíku na 1,2-dihydroxybenzen (katechol) a jeho deriváty za současného otevření aromatického kruhu. Tyto enzymy hrají hlavní roli v degradaci aromatických sloučenin, která je u mikroorganismů (hlavně půdních bakterií) běžná.

Místo, kde je vázán ion kovu (např. trojmocné železo) dokáže katalyzovat reakci současnou aktivací molekuly kyslíku i organického substrátu. Aktivací rozumíme překonání spinové bariéry reakce. Aktivace kyslíku probíhá navázáním kyslíku na redukované, dvojmocné železo enzymu, následovaným redoxní reakcí za vzniku komplexu trojmocné železo-superoxid nebo peroxid, který dále reaguje s organickým substrátem. Takovou reakci například pozorujeme v prvním kroku aktivace kyslíku cytochromy P450. V případě intradiolových dioxygenáz vyžaduje reakce nejprve redukci atomu železa, protože kyslík se za standardních podmínek není schopen přímo vázat na centrum s trojmocným železem. Pro extradiolové dioxygenázy není takováto redukce nutná, neboť již obsahují atom železa v dvojmocném stavu (Broderick, 1999).

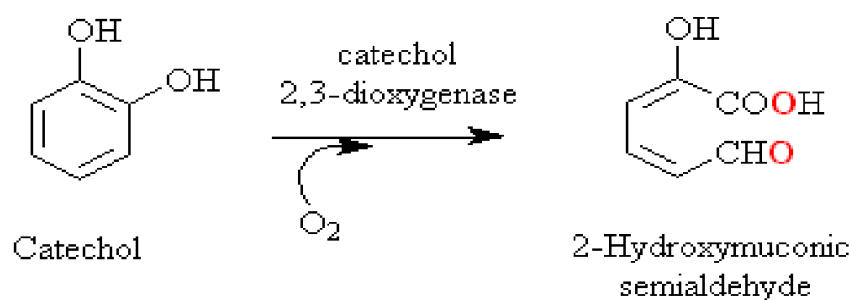
Katechol-1,2-dioxygenáza z buněk kvasinky *C. tropicalis* indukovaných fenolem do dnešních dní nebyla blíže charakterizována. V současné době se její bližší charakterizací zabývá naše laboratoř (Páca et al., 2007; Jechová, 2011).

1.6.2.3. Katechol-2,3-dioxygenáza

Reakcí s molekulárním kyslíkem se může benzenový kruh katecholu otevřít také extradiolovým štěpením (*meta*-dráha) za vzniku semialdehydu 2-hydroxymukonové kyseliny (Sanglard et al., 1986) (viz. Obr. 11).

Přestože extradiolové otevření je během biodegradací běžnější než intradiolové, jsou dodnes strukturální a mechanické aspekty extradiolových dioxygenáz méně známé.

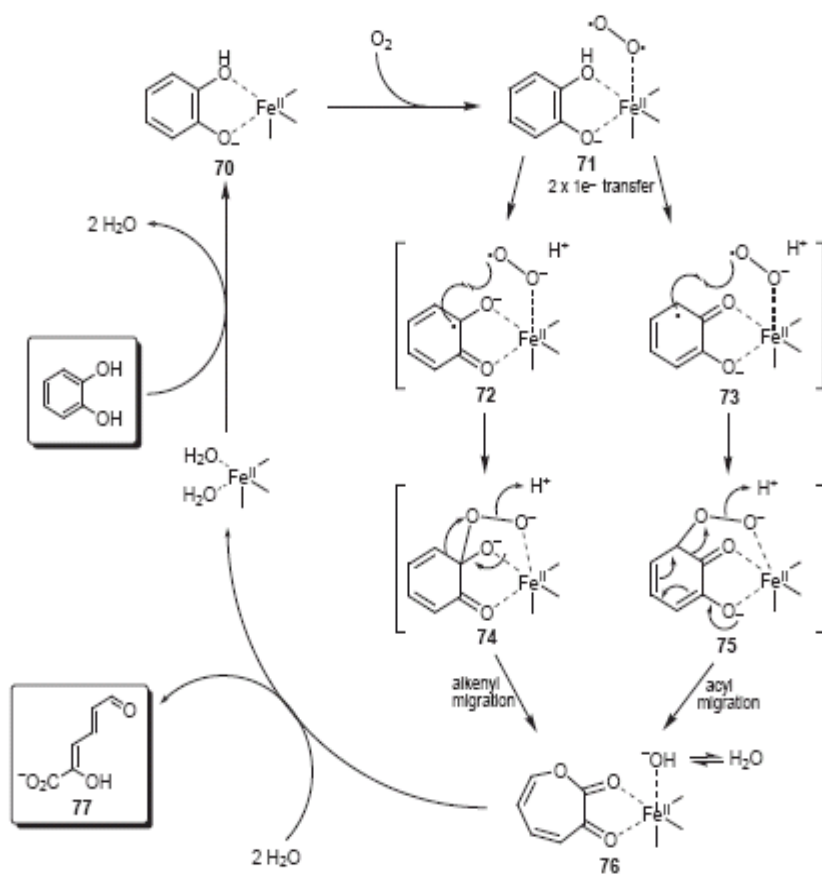
Komplex dvojjazného železa neukazuje typickou vazbu ligand-kov a nepůsobuje červenohnědé zbarvení jako je tomu u intradiolových katecholdioxygenáz. Proto nelze pro charakterizaci vazebného místa užít ani UV-spektroskopii, ani rezonanční Ramanovu spektroskopii. Pro zjištění struktury aktivního centra pro vazbu kovu byl užit magnetický cirkulární dichroismus a rentgenová absorpční spektroskopie (Mabrouk, 1995).



Obr. 11: Extradiolové štěpení katecholu na semialdehyd kyseliny 2-hydroxymukonové (vytvořeno v programu ACD/ChemSketch).

Katechol-2,3-dioxygenáza je první popsanou dioxygenázou štěpící aromatický kruh, u které byla stanovena primární struktura. Skládá se ze čtyř identických podjednotek o molekulové hmotnosti 32 kDa a obsahuje jeden katalyticky esenciální ion Fe^{2+} v každé podjednotce. Reakční produkt, semialdehyd kyseliny 2-hydroxymukonové, je žlutý. Reakce probíhá bi-uni uspořádaným mechanismem (Obr. 12). Katechol se nejprve váže na enzym, následuje vazba kyslíku za tvorby ternárního komplexu a aromatický kruh se následně štěpí za vzniku produktu (Benveniste et al., 1991).

Substrátová specifita tohoto enzymu je poměrně široká. Je schopen oxidovat 3-methyl-, 3-ethyl-, 4-methyl-, 4-chlorokatechol. Ion železa může tvořit pět koordinačních vazeb v uspořádání tetragonální pyramidy. Katechol se může vázat jako bivalentní ligand, který obsadí jednu axiální a jednu ekvatoriální vazbu aktivního centra. Navázání katecholu vyvolá konformační změnu, která umožní navázání molekuly kyslíku na ekvatoriální ligandové místo (Neujahr and Gall, 1973).



Obr. 12: Mechanismus působení extradiolových katecholdioxygenáz. (převzato z publikace Bugg and Winfield, 1998).

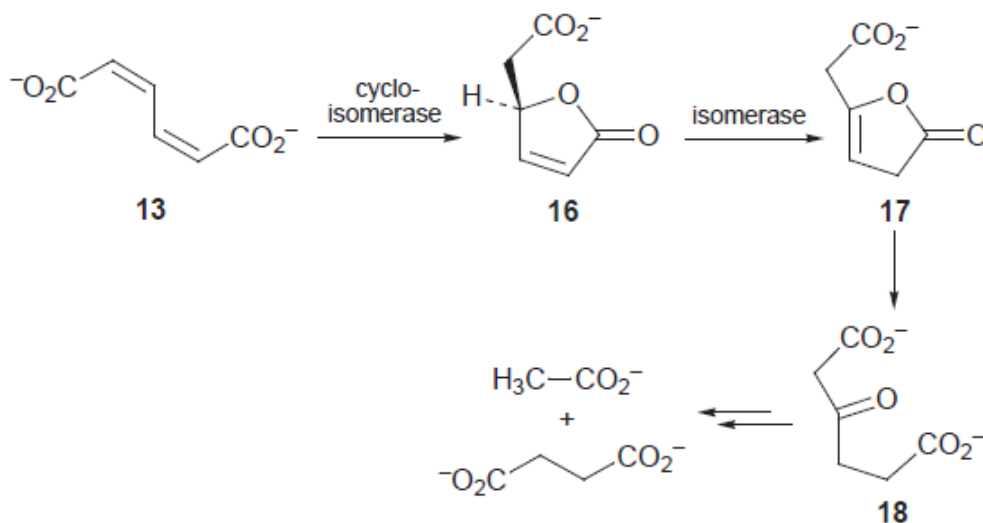
1.6.3. Peroxidázy

Další skupinou enzymů, které se podílí na biotransformaci fenolů jsou peroxidázy. Tyto enzymy spadají do oxidoreduktáz a redukují peroxid vodíku (nebo jiné peroxidy) za současné oxidace další sloučeniny (např. xenobiotika). V přírodě jsou peroxidázy hojně zastoupené glykoproteiny obsahující hem s velmi širokou substrátovou specifitou. Velmi dobrými substráty jsou právě fenoly a aromatické aminy (Ijah, 1998).

1.6.4. Cykloisomerázy

Cis,cis-mukonát, je dále metabolizován (cyklizace, isomerace) na 3-oxoadipát enollakton. Tento krok je katalyzován enzymem, cykloisomerázou (Obr. 13).

V buňkách kvasinky *T. cutaneum* kultivovaných na *p*-kresolu se prokázala jen jedna cykloisomeráza, schopná přeměny *cis,cis*-mukonátu a 3-methyl-*cis,cis*-mukonátu (Páca, 1994).



Obr. 13: Metabolismus *cis,cis*-mukonátu za přítomnosti cykloisomerázy (převzato z publikace Bugg and Winfield, 1998).

1.6.5. Delaktonizace

Delaktonizace 3-oxoadipátenollaktonu, spočívající v hydroxylaci delaktonizačními enzymy, poskytuje 3-oxoadipát. Může být katalyzována dvěma enzymy. První upřednostňuje methylované substráty a vytváří se u buněk kultivovaných nejprve na kresolech, druhý preferuje nesubstituované substráty (Landa et al., 1959). U buněk kmene *T. cutaneum* indukovaných fenolem je přeměna 3-oxoadipátenollaktonu na 3-oxoadipát zajištěna pouze jedním katalyzujícím enzymem (Sejlitz et al., 1990).

2. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem předkládané diplomové práce bylo zjištění vlivu iontů těžkých kovů na aktivitu cytosolárních enzymů NADPH-dependentní fenolhydroxylázy a katechol-1,2-dioxygenázy kvasinky *Candida tropicalis*. Oba enzymy se u tohoto mikroorganismu podílejí na prvních dvou krocích biodegradace fenolu. Pro tento cíl bylo nutné:

- 1) Izolovat oba enzymy z cytosolární frakce kvasinky *C. tropicalis*.
- 2) Zjištit vliv iontů těžkých kovů na reakce katalyzované NADPH-dependentní fenolhydroxylázou (oxidaci fenolu) a katechol-1,2-dioxygenázou (oxidaci katecholu).
- 3) Stanovit hodnoty IC_{50} pro ionty těžkých kovů, které inhibují aktivity NADPH-dependentní fenolhydroxylázy a katechol-1,2-dioxygenázy.

3. MATERIÁL A METODY

3.1. POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A PŘÍSTROJE

3.1.1. Použité chemikálie

Lachema (Brno)

dihydrogenfosforečnan sodný

ethanol

hydrogenfosforečnan sodný

hydroxid sodný

chlorid kademnatý

chlorid manganatý

chlorid sodný

kyselina octová

methanol

octan olovnatý

persíran amonný

síran měďnatý

síran železnatý

Serva (Německo)

Comassie Brilliant Blue

Fluka, Buchs (Švýcarsko)

akrylamid

dodecylsíran sodný (SDS)

fenol

katechol

methanol

TEMED

Linde (Německo)

plynný a kapalný dusík

Sigma (USA)

cytochrom c

deoxycholát sodný

dialyzační trubice

hovězí sérový albumin (BSA)

NADPH

„Wide Range“ – standardy proteinu pro SDS-PAGE

Pharmacia Biotech. (Švédsko)

DEAE Sepharose CL 6B

Sephadex G-100

3.1.2. Použité přístroje**Centrifugy:**

Janetzki K-24 (Německo), úhlový rotor 6x35 ml

Sanyo MicroCentaur MSE (Schoeller Instruments, U.K.), úhlový rotor 12 x 2 ml

Ultracentrifuga Optima™ LE-80K (Beckman Coulter, USA), úhlový rotor Ti 45, 6 x 70 ml

Spektrofotometry:

SPEKTROMOM 195 D (MOM Budapest, Hungary)

Váhy:

předvážky EW600-2M (KERN, SRN)

analytické váhy PESA 40SM - 200A (PESA, Švýcarsko)

Sestava HPLC:

pumpa P580 HPG (Dionex-Softron, Německo)

autosampler ASI-100 (Dionex-Softron, Německo)

UV-VIS detektor LCD 2563 (Laboratorní přístroje, Praha, CR)

kolona Nucleosil 100-5 C18 4 x 250 mm (Merck, Německo)

Software:

Chromeleon verze 6.01

Sestava pro elektroforesu:

zdroj napětí Electrophoresis Power Supply-EPS 301 (Amersham Biosciences, USA)

Další:

automatické mikropipety Nichipet EX (NICHIRYO, Japan)

homogenisátor dle Pottera a Elvehjema

chromatografické kolony C 2,6 x 22

C 1 x 10

C 1 x 60

(Pharmacia Biotech, Švédsko)

inkubátor Thermomixer compact (Eppendorf)

mikrostříkačka Hamilton (Hamilton Company, USA)

pH-metr model 370 (ATI Orion, USA)

sběrač frakcí BioLogic BioFrac (BIO-RAD, USA)

sonikátor (Ultrasonic compact cleaner, Teson1, Tesla, CR)

vortex MS 1 Minishaker (Scholler Pharma Praha, CR)

vortex MS 2 (IKA, USA)

hlubokomrazicí box -80 °C (Sanyo Ultra Low, Japan)

3.2. IZOLACE CYTOSOLÁRNÍ FRAKCE KVASINKY *C. TROPICALIS*

Izolace cytosolární frakce z buněk kvasinky *C. tropicalis* zahrnovala tři dílčí kroky: desintegraci a homogenizaci buněk a centrifugaci. Všechny tyto kroky probíhaly při teplotě 4 °C, a to buď v chladicí místnosti nebo v centrifugačních přístrojích (odstředivkách) chlazených na tuto teplotu.

3.2.1. Desintegrace a homogenizace

Desintegrováno bylo najednou vždy cca. 200 - 300 g zmražených buněk. Ty byly v kapalném dusíku po částech rozbíjeny a následně roztírány najemno ve třecí misce. Rozbité buňky *C. tropicalis* byly dále homogenizovány společně se 150 ml 50 mM Na-fosfátového pufru o pH 7,6 v homogenizátoru podle Pottera a Elvehjema. Pro homogenizaci bylo použito nejdříve volněji a následně i těsněji přiléhajícího pístu homogenizátoru.

3.2.2. Frakční centrifugace

Homogenát získaný z buněk *C. tropicalis* byl centrifugován při 15 000 g po dobu 20 minut (K-24, úhlový rotor 6 x 35 ml, 13 500 RPM). Dále byl supernatant oddělen od pelety a centrifugován ve vakuu při 105 000 g a teplotě 4 °C 65 minut (Ultracentrifuga Optima TM LE-80K, úhlový rotor Ti-45, 6 x 70 ml, 35 000 RPM).

3.3. METODY POUŽITÉ PRO PURIFIKACI NADPH-DEPENDENTNÍ FENOLHYDROXYLÁZY

Pro purifikaci NADPH-dependentní fenolhydroxylázy byla použita chromatografie a rechromatografie na sloupci DEAE-Sepharosy a následná gelová permeační chromatografie na sloupci Sephacrylu S-300. K eluci enzymů byl používán 50 mM Na-fosfátový pufr s 1 mM EDTANa₂ a 1 μM FAD o pH 7,6. Pufr byl používán čistý, nebo obsahující NaCl pro eluci pomocí gradientu této sloučeniny.

3.3.1. Chromatografie cytosolární frakce na sloupci DEAE-Sepharosy

Princip: DEAE Sepharosa je slabý anex, záporný náboj zde nese skupina DEAE (diethylaminoethyl).

Příprava kolon: Jednotlivé komponenty kolon C 2,6 x 22; C 1 x 10 (Pharmacia Biotech) jsme pečlivě omyli ethanolem a po oschnutí připevnili ke stojanům pomocí soustavy klem.

Příprava a regenerace nosiče: DEAE Sepharosa (100 ml, ve 20 % ethanolu) byla před použitím promyta 3 x 250 ml destilované vody, rozmíchána v 200 ml cyklizačního pufru (1 M Na-fosfátový pufr, pH 7,6) a nechána přes noc při teplotě 5 °C. Po opětovném promytí nosiče 3 x 250 ml destilované vody a 3 x 250 ml ekvilibračního pufru (50 mM Na-fosfátový pufr, pH 7,6). Druhý den byl nosič resuspendován v ekvilibračním pufru a za nulového průtoku nalit na kolony C 2,6 x 22; C 1 x 10 (Pharmacia Biotech). Po sedimentaci byl nosič dále ekvilibrován přímo na kolonách, a to až do momentu, kdy pH pufru nanášeného na kolonu se rovnalo pH pufru z kolony vytékajícího. Po použití byl nosič čištěn promýváním (1 x 250 ml 1 M NaCl, 1 x 250 ml 1 M octanu sodného (pH 3,0), 1 x 250 ml destilované vody, 1 x 250 ml 0,5 M NaOH, 1 x 250 ml destilované vody, 1 x 250 ml 1 M octanu sodného (pH 3,0), 2 x 250 ml 20 % ethanolu). Poté byl nosič rozmíchán ve 200 ml 20 % ethanolu a uchováván v polyethylenové lahvičce při 5 °C pro další použití.

Postup: Na kolonu DEAE Sepharosy ekvilibrovanou 50 mM Na-fosfátovým pufrům (pH 7,6) byl aplikován cytosol izolovaný z buněk *C. tropicalis* o objemu 200 ml. Rychlost průtoku byla 0,8 ml/min. Pomocí automatického sběrače frakcí byly jímány frakce, u kterých byla měřena absorbance při vlnové délce 280 nm. Po aplikaci vzorku byla kolona promývána 50 mM Na-fosfátovým pufrům o pH 7,6 až do poklesu absorbance na hodnotu 0,2.

Pro eluci fenolhydroxylázy bylo použito lineárního gradientu NaCl (0 - 0,3 M v 50 mM Na-fosfátovém pufru pH 7,6). Pro eluci enzymů bylo použito 2 x 350 ml mobilní fáze. Opět byla měřena absorbance jednotlivých frakcí eluovaných z kolony při 280 nm.

Pomocí elektroforézy na polyakrylamidovém gelu a vysokoúčinné kapalinové chromatografie, používané pro měření aktivity fenolhydroxylázy a katecholdioxygenázy, byla ve frakcích detekována přítomnost NADPH-dependentní fenolhydroxylázy. Frakce obsahující fenolhydroxylázovou aktivitu byly spojeny, přes noc dialyzovány proti 8 litrům 50 mM Na-fosfátového pufru a dále purifikovány.

Dialyzovaný preparát enzymu byl následně podroben rechromatografii s použitím 25 ml nosiče DEAE-Sepharosy na koloně 1 x 10 cm (Pharmacia Biotech). NADPH-dependentní fenolhydroxyláza byla eluována pomocí lineárního gradientu NaCl viz. jak je popsáno výše. Přítomnost fenolhydroxylázy v eluovaných frakcích byla detekována (viz. výše) a tyto frakce byly poté spojeny a dialyzovány proti 4 litrům 50 mM Na-fosfátového pufru pH 7,6 přes noc.

3.3.2. Chromatografie NADPH-dependentní fenolhydroxylázy na sloupci Sephacrylu S-300

Princip: Sephacryl S-300 se používá k separaci biomolekul. Jeho frakcionační rozsah je 10 – 150 kDa.

Příprava kolony: Jednotlivé komponenty kolony C 1 x 25 (Pharmacia Biotech) jsme pečlivě omyli ethanolem a po oschnutí připevnili ke stojanu pomocí soustavy klem.

Příprava a regenerace nosiče: Sephacryl S-300 (ve 20 % ethanolu) byl před použitím promyt 2 x 250 ml destilované vody, rozmíchán v 50 mM Na-fosfátovém pufru (pH 7,6) a nalit do chromatografické kolony (Pharmacia Biotech C 1 x 25 cm). Po skončení sedimentace byl sloupec nosiče promýván mobilní fází o průtoku 0,6 ml za minutu.

Po použití byl nosič promýván postupně 2 x 250 ml destilované vody a 2 x 250 ml 20 % ethanolu. Nakonec byl nosič resuspendován ve 120 ml 20 % ethanolu, přenesen do polyethylenové lahvičky a uchováván při 5 °C.

Postup: Na kolonu Sephacrylu S-300 (Pharmacia Biotech C 1 x 25 cm) v 50 mM Na-fosfátovém pufru byly při nulovém průtoku nanесeny dialyzované frakce s fenolhydroxylázovou aktivitou. Bílkoviny byly vymývány 50 mM Na-fosfátovým pufrem (pH 7,6) a průtoková rychlost byla nastavena na 0,67 ml za minutu. Absorbance eluovaných frakcí byla měřena při 280 nm ($A_{280\text{nm}}$). Ve frakcích obsahujících proteiny byla stanovována fenolhydroxylázová aktivita pomocí metody popsané v kapitole 3.4.2. Frakce vykazující aktivitu byly spojeny, dialyzovány přes noc proti 4 litrům destilované vody (odstranění zbytků NaCl použitého v gradientu) a následně lyofilizovány a uchovány při teplotě -80 °C pro další použití.

3.4. ANALYTICKÉ METODY

3.4.1. Elektroforéza proteinů (enzymů) za přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS)

Princip: Dodecylsulfát sodný uděluje všem molekulám stejně velký záporný náboj překrývající jejich vlastní náboj. SDS diskontinuální elektroforéza na polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE) v redukujícím prostředí tedy umožňuje rozdělení proteinů na základě jejich molekulové hmotnosti.

Použité roztoky a pufr:

Pufr A: 0,375 M TRIS/HCl, 0,1 % SDS (w/v), pH 8,8

Polymerační roztok A: 30 % akrylamid (w/v), 0,8 % BIS v pufru A (w/v)

Pufr B: 0,125 M TRIS/HCl, 0,1 % SDS (w/v), 0,0006 % bromfenolová modř (w/v), pH 6,8

Polymerační roztok B: 30 % akrylamid (w/v), 0,8 % BIS v pufru A (v/v)

Elektrodový pufr: 25 mM TRIS, 0,25 M glycin, 0,1 % SDS (w/v), pH 8,3

Vzorkový pufr: 0,063 M TRIS/HCl, 2 % SDS (w/v), 10 % glycerol (v/v), 5 % 2-merkptoethanol (v/v), 0,003 % bromfenolová modř (w/v), pH 6,8

Barvicí lázeň: 0,25 % Coomassie Brilliant Blue R-250, 46 % ethanol (v/v), 9,2 % kyselina octová (v/v)

Odbarvovací lázeň: 25 % ethanol (v/v), 10 % kyselina octová (v/v)

Postup: Všechny části aparatury určené k přípravě gelů jsme pečlivě omyli, odmastili ethanolem a osušili. Mezi skla byl nalit nejprve 10 % separační gel (8 ml pufru A, 4 ml polymeračního roztoku A, 10 μ l TEMED, 3 mg persíranu amonného), který byl po dobu polymerace převrstven destilovanou vodou. Poté byla voda vysušena filtračním papírem a separační gel převrstven 3 % velkoporovým rozdělovacím gelem (6,75 ml pufru B, 0,75 ml polymerační roztok B, 7,5 μ l TEMED, 3 mg persíranu amonného). Ihned po nalití gelu byl do něj vložen „hřeben“ pro vytvoření aplikačních jamek.

Tento plastový „hřeben“ byl po dokončení polymerace opatrně vyjmut a skla s gelem byla umístěna do aparatury pro elektroforézu. Dále byl do horní i spodní části elektroforetické nádoby nalit elektrodový pufr.

Vzorky byly smíchány 1:1 se 6 x koncentrovaným vzorkovým pufrům a vařeny po dobu 5 minut ve vodní lázni. Po vychladnutí byly vzorky a standard „Wide Range“ (Sigma, USA), připravený obdobně jako vzorky, aplikovány do jednotlivých jamek v gelu Hamiltonovou mikropipetou.

Elektroforéza probíhala za konstantního napětí 180 V po dobu cca 45 min a dalších 45 min probíhala elektroforéza při napětí 240 V. Následně byl gel oddělen od skel a přesunut do barvicí lázně, kde byl ponechán 45 min. Poté byl gel přenesen do odbarvovací lázně a tam ponechán přes noc. Další den byl gel vysušen v celofánové fólii.

3.4.2. Stanovení aktivity NADPH-dependentní fenolhydroxylázy

Enzymová aktivita fenolhydroxylázy byla měřena pomocí metody HPLC (High Performance Liquid Chromatography) na základě úbytku substrátu (fenolu), respektive přírůstku produktu reakce (katecholu). Množství těchto látek bylo detekováno na koloně NUCLEOSIL 100-5 C18 4 x 250 mm (Merck, Německo). Jako mobilní fáze byl použit 40 % roztok methanolu v destilované vodě. K detekci při 275 nm bylo použito UV-VIS detektoru (LCD 2563, Laboratorní přístroje Praha, ČR). Kolona byla temperována na 35 °C, dávkovací smyčka naplněna vzorky o objemu 20 µl, rychlost průtoku mobilní fáze byla nastavena na 0,5 ml/min (Pumpa P580, Dionex). Příslušné retenční časy substrátu a produktu reakce katalyzované fenolhydroxylázou jsou: fenol – 12,5 min, katechol – 7,9 min. Plochy píků obou látek byly vyhodnocovány pomocí programu CHROMELEON™ 6.01.

Fenolhydroxylázová aktivita byla stanovována v cytosolární frakci a ve vzorcích obsahujících „přečištěný“ enzym získaný izolací a následnou purifikací cytosolu buněk *C. tropicalis*.

Enzymová reakce probíhala ve směsi obsahující 140 μ l roztoku fenolhydroxylázy v 50 mM Na-fosfátovém pufru (pH 7,6), 17,5 μ l NADPH-generujícího systému (10 mM $MgCl_2$, 10 mM D-glukóza-6-fosfát, 1 mM $NADP^+$, 1 U/ml D-glukóza-6-fosfát dehydrogenázy), 17,5 μ l substrátu (fenolu). Koncentrace fenolu v reakční směsi byla 1 mM.

Inkubace probíhala v otevřených mikrozkušnicích na třepačce při teplotě 37 °C, což je optimální teplota pro aktivitu fenolhydroxylázy (Vilímková et al., 2008). V časech 0, 10, 20 minut bylo z reakční směsi odebráno 50 μ l a v tomto objemu byla reakce ukončena přidáním 10 μ l 0,6 M $HClO_4$. Denaturované proteiny byly odstraněny centrifugací při 13 000 RPM (Sanyo MicroCentaur MSE, úhlový rotor) po dobu 3 min. Aktivita vzorku byla následně měřena pomocí HPLC z úbytku substrátu (fenolu) a přibývajícím množstvím produktu reakce (katecholu).

3.4.3. Vliv iontů těžkých kovů na aktivitu enzymu NADPH-dependentní fenolhydroxylázy

Pro sledování vlivu těžkých kovů na aktivitu NADPH-dependentní fenolhydroxylázy byly použity následující sloučeniny: síran železnatý, octan olovnatý, chlorid manganatý, síran měďnatý, chlorid kademnatý. Enzymová reakce probíhala ve směsi obsahující 122,5 μ l roztoku fenolhydroxylázy v 50 mM Na-fosfátovém pufru (pH 7,6), 17,5 μ l NADPH-generujícího systému (10 mM $MgCl_2$, 10 mM D-glukóza-6-fosfát, 1 mM $NADP^+$, 1 U/ml D-glukóza-6-fosfát dehydrogenázy), 17,5 μ l 1 mM fenolu a 17,5 μ l 1 mM nebo 0,5 mM nebo 0,1 mM roztoku iontů těžkých kovů v 50 mM Na-fosfátovém pufru (pH 7,6). Koncentrace iontů těžkých kovů v reakční směsi byla 0,1 mM nebo 0,05 mM nebo 0,01 mM. Inkubace probíhala v otevřených mikrozkušnicích za stálého třepání při teplotě 37 °C. V časech 0 a 20 minut bylo z reakční směsi odebráno 50 μ l a v tomto objemu byla reakce ukončena přidáním 10 μ l 0,6 M $HClO_4$. Denaturované proteiny byly odstraněny centrifugací při 13 000 RPM (Sanyo MicroCentaur MSE) po dobu 3 min. Aktivita takto připraveného vzorku inhibovaného enzymu byla následně měřena pomocí HPLC z úbytku substrátu (fenolu), anebo přibývajícím množstvím produktu (katecholu) viz. kapitola 3.4.2.

3.4.4. Vliv iontů těžkých kovů na aktivitu enzymu katechol-1,2-dioxygenázy

Pro určování vlivu těžkých kovů na aktivitu katecholdioxygenázy byly použity následující sloučeniny: síran železnatý, octan olovnatý, chlorid manganatý, síran měďnatý, chlorid kademnatý.

Enzymová reakce probíhala ve směsi obsahující 140 μ l roztoku katecholdioxygenázy v 50 mM Na-fosfátovém pufru (pH 7,6), 17,5 μ l 1 mM katecholu a 17,5 μ l 1 mM nebo 0,5 mM nebo 0,1 mM roztoku iontů těžkého kovu v Na-fosfátovém pufru o pH 7,6. Koncentrace iontů těžkého kovu v reakční směsi byla 0,1 mM nebo 0,05 mM nebo 0,01 mM. Inkubace probíhala v otevřených mikrozkuvkách za stálého třepání při teplotě 30 °C (optimální teplota pro aktivitu katechol-1,2-dioxygenázy, Vilímková et al., 2009). V časech 0 a 7 minut bylo z reakční směsi odebráno 50 μ l a v tomto objemu byla reakce ukončena přidáním 10 μ l 0,6 M HClO₄. Precipitované proteiny byly odstraněny centrifugací při 13 000 RPM (Sanyo MicroCentaur MSE) po dobu 3 minut. Aktivita takto připraveného vzorku inhibovaného enzymu byla následně měřena pomocí HPLC z úbytku substrátu (katecholu), anebo přibývajících množství produktu (kyseliny *cis*, *cis*-mukonové).

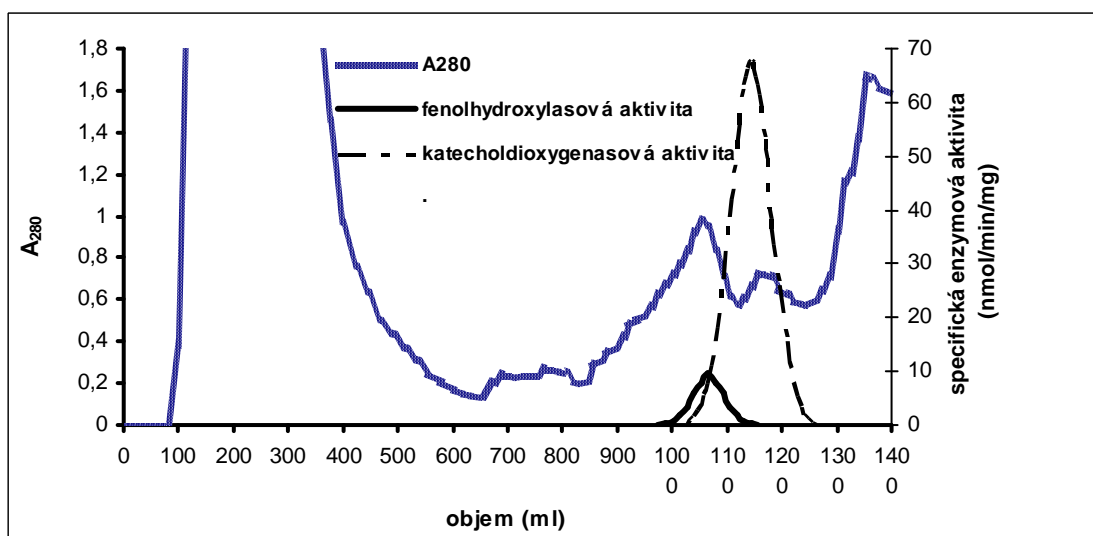
Z grafů získaných vynesemím závislosti aktivity fenolhydroxylázy (katecholdioxygenázy) na koncentracích roztoků solí iontů těžkých kovů jsme pro inhibující ionty těžkých kovů stanovili hodnoty IC₅₀. Tedy koncentraci inhibitoru, při které je aktivita enzymu snížena právě na polovinu.

4. VÝSLEDKY

4.1. Purifikace NADPH-dependentní fenolhydroxylázy

4.1.1. Chromatografie na sloupci DEAE-Sepharosy

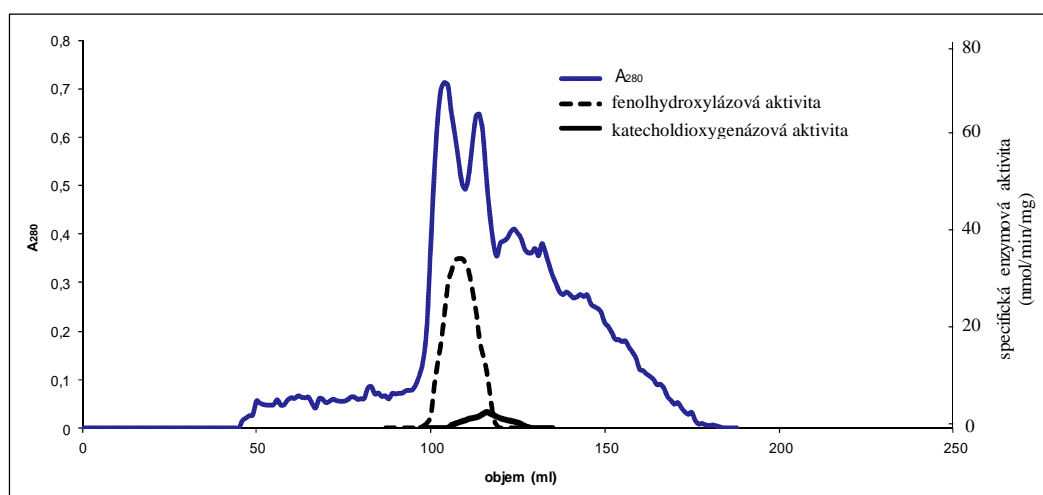
NADPH-dependentní fenolhydroxyláza kvasinky *C. tropicalis* byla nejdříve purifikována z cytosolární frakce tohoto mikroorganismu chromatografií na sloupci DEAE-Sepharosy. Fenolhydroxyláza byla eluována z kolony DEAE-Sepharosy při koncentracích NaCl 0,12 - 0,18 M. Katechol-1,2-dioxygenáza, která byla izolována tímto postupem současně, a to pro další charakterizaci J. Jechovou (Jechová, 2011), byla eluována při koncentraci NaCl 0,14 - 0,24 M. Výsledky ukazují, že použitím chromatografie na DEAE-Sepharose není možné získat čistý preparát NADPH-dependentní fenolhydroxylázy (Obr. 14), obsahuje ještě další proteiny a je proto nutná jeho následná purifikace.



Obr. 14: Chromatografie enzymů cytosolu buněk *C. tropicalis* na sloupci DEAE-Sepharosy. Z obrázku je patrné, že po první purifikaci nedochází k izolaci čistých frakcí NADPH-dependentní fenolhydroxylázy ani katechol-1,2-dioxygenázy. Experimentální podmínky (Materiál a metody, kapitola 3.3.1.). Výsledky zobrazované v tomto grafu byly vypracovány společně s RNDr. Lenkou Vilímkovou a Janou Jechovou (Vilímková et al., 2009; Jechová, 2011).

4.1.2. Rechromatografie NADPH-dependentní fenolhydroxylázy na sloupci DEAE-Sepharosy

Z výsledků rechromatografie fenolhydroxylázy na sloupci DEAE-Sepharosy (obr. 15) je patrné že došlo k dalšímu částečnému přečištění tohoto enzymu, získaného chromatografií na sloupci DEAE-Sepharosy. Ovšem získat frakce s čistou fenolhydroxylázou bez přítomnosti katechol-1,2-dioxygenázy se ani touto metodou nepodařilo. Částečně purifikovaný enzym byl tedy dále purifikován pomocí gelové chromatografie na sloupci Sephacrylu S-300.



Obr. 15: Rechromatografie frakcí obsahujících NADPH-dependentní fenolhydroxylázu na sloupci DEAE-Sepharosy (Výsledky, kapitola 4.1.1.). Experimentální podmínky (Materiál a metody, kapitola 3.3.1.).

4.1.3. Chromatografie NADPH-dependentní fenolhydroxylázy na sloupci Sephacrylu S-300

Sephacryl S-300 se používá k separaci biomolekul o velikosti 10 – 150 kDa. Díky rozdílným velikostem molekul fenolhydroxylázy a katecholdioxygenázy jsme předpokládali, že získáme čisté preparáty fenolhydroxylázy.

Ale ani tímto postupem se nepodařilo eluovat frakce obsahující NADPH-dependentní fenolhydroxylázu, které by zároveň nevykazovaly i aktivitu katechol-1,2-dioxygenázy (přibližně 1 %). K dalšímu určenému cíli předkládané diplomové práce, konkrétně zjištění vlivu iontů těžkých kovů na NADPH-dependentní fenolhydroxylázu a katechol-1,2-dioxygenázu nám ovšem postačily i tento částečně purifikované enzymy. Inhibici aktivity enzymu, vlivem přítomnosti iontů těžkých kovů, sledujeme pomocí měření úbytku substrátu (fenol, katechol) v reakční směsi a na tuto aktivitu přítomnost jednoho nebo druhého enzymu vliv nemá. Ke stanovení vlivu těžkých kovů na katechol-1,2-dioxygenázu byl použit enzym purifikovaný Janou Jechovou, postupem popsáním v její diplomové práci (Jechová, 2011).

4.2. Vliv iontů těžkých kovů na NADPH-dependentní fenolhydroxylázu kvasinky *C. tropicalis*

Pro zjištění vlivu iontů těžkých kovů na cytosolární enzymy *C. tropicalis* bylo použito metod měření aktivity fenolhydroxylázy a katecholdioxygenázy, konkrétně sledováním úbytku substrátu (fenol, katechol) za využití metody HPLC. Výsledky experimentů signalizují, že aktivita NADPH-dependentní fenolhydroxylázy (při přidavku 0,1 mM roztoku soli těžkého kovu) prakticky nebyla ovlivněna ionty železnatými a manganatými, zatímco ionty kadmennaté a olovnaté snižovaly enzymovou aktivitu o 15 – 33 %. Nejvýznamnější efekt na enzymovou aktivitu fenolhydroxylázy měl CuSO_4 , u kterého byl zjištěn pokles aktivity enzymu až o 90 %. Pro kvantifikaci míry inhibice aktivity fenolhydroxylázy byl vliv iontů těžkých kovů měřen též při 0,05 mM a 0,01 mM koncentracích solí iontů těžkých kovů ve vzorku (Tab. 1).

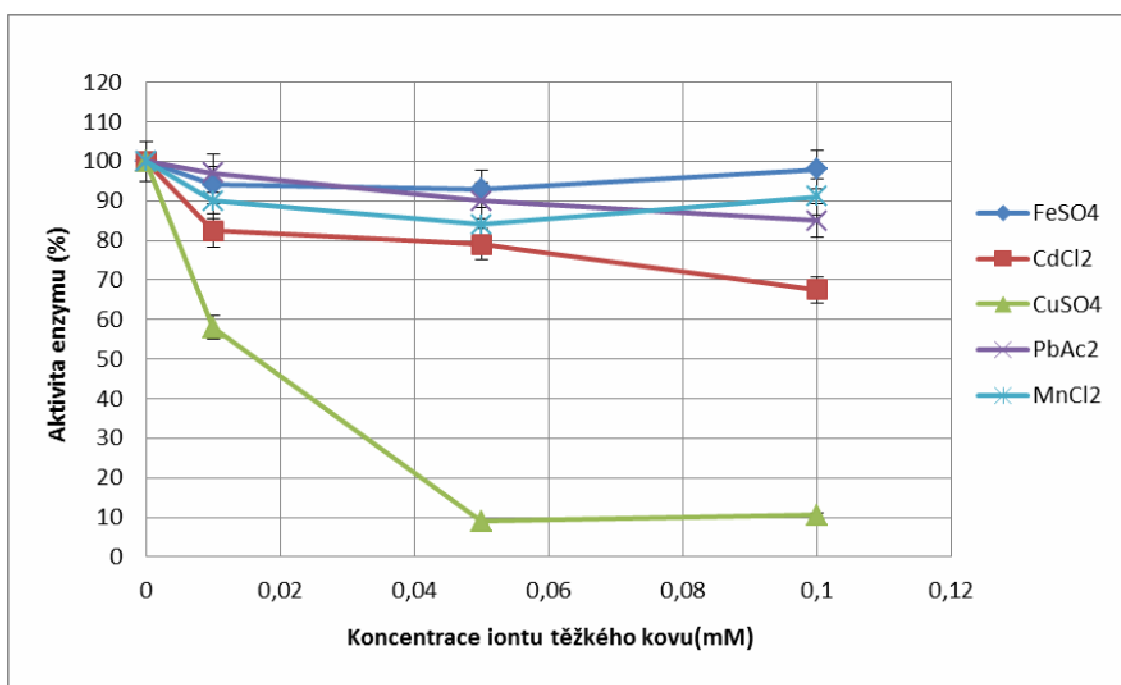
Inhibující ion těžkého kovu	Aktivita NADPH-dependentní fenolhydroxylázy (%)		
	$C_{\text{inhibitoru}} = 0,01 \text{ mM}$	$C_{\text{inhibitoru}} = 0,05 \text{ mM}$	$C_{\text{inhibitoru}} = 0,1 \text{ mM}$
žádný	100	100	100
Fe^{2+}	94 ± 3	93 ± 6	98 ± 5
Pb^{2+}	97 ± 6	90 ± 2	85 ± 10
Mn^{2+}	90 ± 8	84 ± 7	91 ± 1
Cu^{2+}	58 ± 9	9 ± 2	10 ± 2
Cd^{2+}	82 ± 3	79 ± 1	67 ± 4

Tab. 1: Vliv iontů těžkých kovů na aktivitu cytosolární NADPH-dependentní fenolhydroxylázy kvasinky *C. tropicalis*. Čísla v tabulce vyjadřují procenta původní aktivity enzymu bez přítomnosti iontů těžkých kovů (průměr a standardní odchylka ze tří měření).

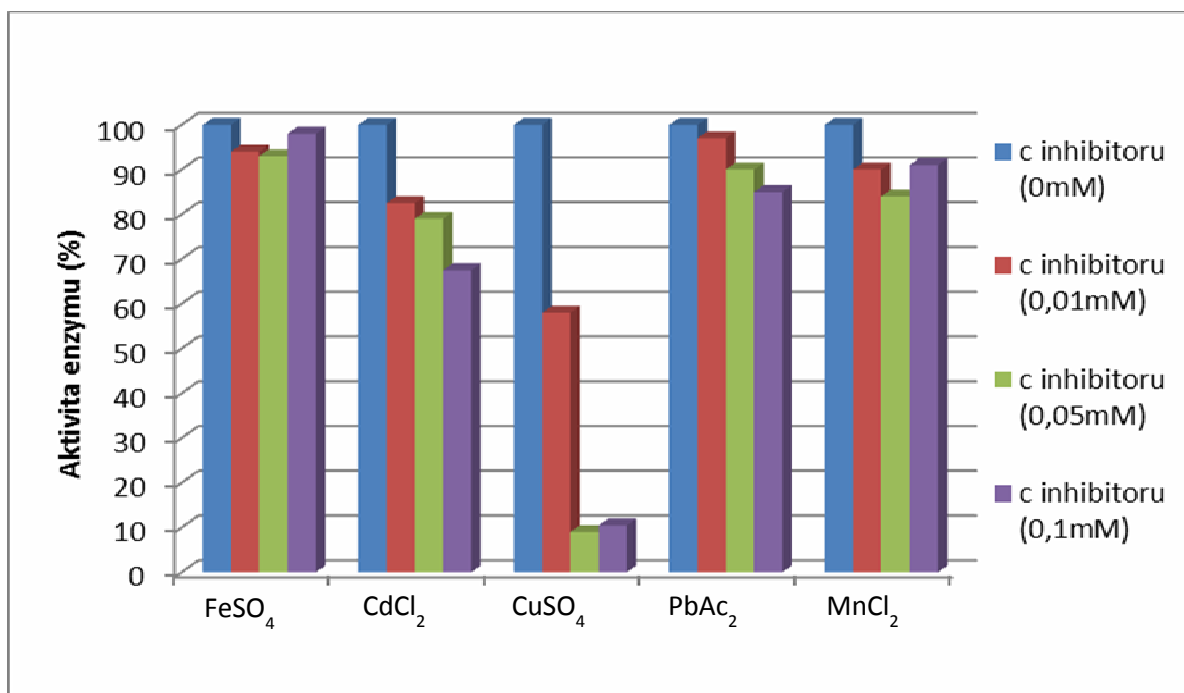
Obrázky 16 a 17 ilustrují vliv iontů těžkých kovů o rozdílných koncentracích na aktivitu fenolhydroxylázy. Enzymová aktivita byla v reakční směsi měřena v čase 0 a 20 min.

Z výsledků těchto experimentů je patrné, že CuSO_4 inhibuje aktivitu NADPH-dependentní fenolhydroxylázy nejvýrazněji, a to již při 0,01 mM koncentraci této sloučeniny. Při 0,05 mM koncentraci měďnatých iontů je aktivita enzymu inhibována téměř totálně.

CdCl_2 ovlivňuje aktivitu fenolhydroxylázy, ale až při koncentraci vyšší než 0,1 mM. Ionty železnaté, manganaté a olovnaté oxidaci fenolu katalyzovanou fenolhydroxylázou *C. tropicalis* neovlivňují.



Obr. 16: Závislost enzymové aktivity cytosolární NADPH-dependentní fenolhydroxylázy kvasinky *C. tropicalis* na koncentraci iontů těžkých kovů (mM). Jednotlivé křivky znázorňují vliv iontů železnatých, kademnatých, měďnatých, olovnatých a manganatých v koncentracích 0; 0,01; 0,05; 0,1 mM na aktivitu fenolhydroxylázy. Nejvyšší pokles aktivity enzymu byl pozorován za přítomnosti CuSO_4 , a to již při 0,05 mM koncentraci.



Obr. 17: Inhibice NADPH-dependentní fenolhydroxylázy *C. tropicalis* ionty těžkých kovů. Síran železnatý (0; 0,01; 0,05; 0,1 mM); chlorid kadmnatý (0; 0,01; 0,05; 0,1 mM); síran měďnatý (0; 0,01; 0,05; 0,1 mM); octan olovnatý (0; 0,01; 0,05; 0,1 mM); chlorid manganatý (0; 0,01; 0,05; 0,1 mM).

Ze získaných hodnot inhibice fenolhydroxylázy ionty těžkých kovů, bylo možné určit hodnoty IC_{50} . Hodnoty IC_{50} odpovídají koncentracím inhibitorů, při kterých za daných podmínek dochází k 50 % poklesu aktivity enzymu. Tyto hodnoty IC_{50} jsou uvedeny v Tab. 3.

Aktivitu NADPH-dependentní fenolhydroxylázy inhibují, jak již bylo dříve uvedeno, především kationty měďnaté. Pokles enzymové aktivity na polovinu je patrný již při 15 μ M koncentraci $CuSO_4$ v reakční směsi. Kadmnaté ionty taktéž vykazují inhibiční vliv na sledovaný enzym, padesátiprocentní inhibice fenolhydroxylázy však nebylo při námi používaných koncentracích dosaženo.

4.3. Vliv iontů těžkých kovů na katechol-1,2-dioxygenázu kvasinky *C. tropicalis*

Aktivitu katechol-1,2-dioxygenázy z použitých sloučenin iontů těžkých kovů nejvíce ovlivňoval octan olovnatý (až 100 % inhibice enzymu, Tab. 4). Výrazná inhibice aktivity katechol-1,2-dioxygenázy ionty olovnatými byla popsána již dříve, a to pro enzym bakteriálních kmenů *Acinetobacter sp.* KS-1 (Kim et al., 2003) a *Frateuria* ANA-18 (Aoki et al., 1984). Aktivitu katechol-1,2-dioxygenázy rovněž inhibičně ovlivňoval chlorid manganatý (snížení aktivity katechodioxygenázy až o 89 %). Pokles aktivity enzymu o 35 – 42 % byl zaznamenán také pro ionty měďnaté, železnaté a kademnaté. Pro kvantifikaci míry inhibice aktivity katechol-1,2-dioxygenázy byl vliv iontů těžkých kovů měřen též při 0,05 mM a 0,01 mM koncentraci solí iontů těžkých kovů ve vzorku (Tab. 2).

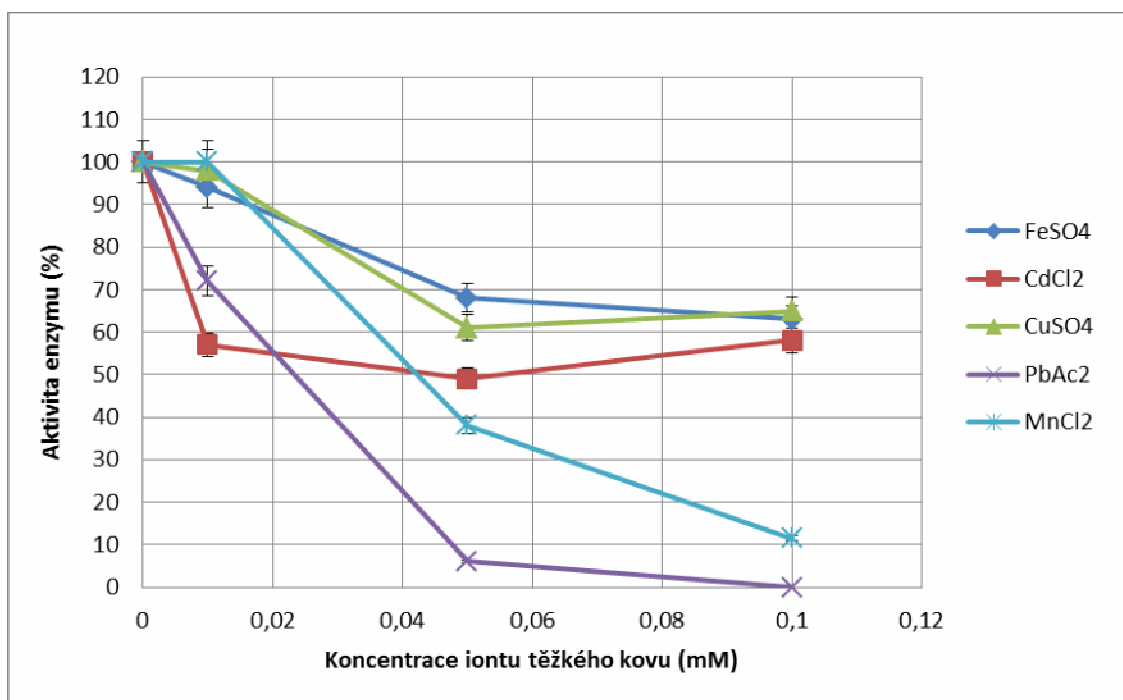
Inhibující ion těžkého kovu	Aktivita katechol-1,2-dioxygenázy (%)		
	C _{inhibitoru} = 0,01 mM	C _{inhibitoru} = 0,05 mM	C _{inhibitoru} = 0,1 mM
žádný	100	100	100
Fe ²⁺	94 ± 7	68 ± 6	63 ± 1
Pb ²⁺	72 ± 8	6 ± 4	0 ± 0
Mn ²⁺	101 ± 3	38 ± 5	11 ± 3
Cu ²⁺	98 ± 2	61 ± 5	65 ± 2
Cd ²⁺	57 ± 1	49 ± 2	58 ± 12

Tab. 2: Efekt iontů těžkých kovů na aktivitu cytosolární katechol-1,2-dioxygenázy kvasinky *C. tropicalis*. Čísla v tabulce vyjadřují procenta původní aktivity enzymu bez přítomnosti iontů těžkých kovů (průměr a standardní odchylka ze tří měření).

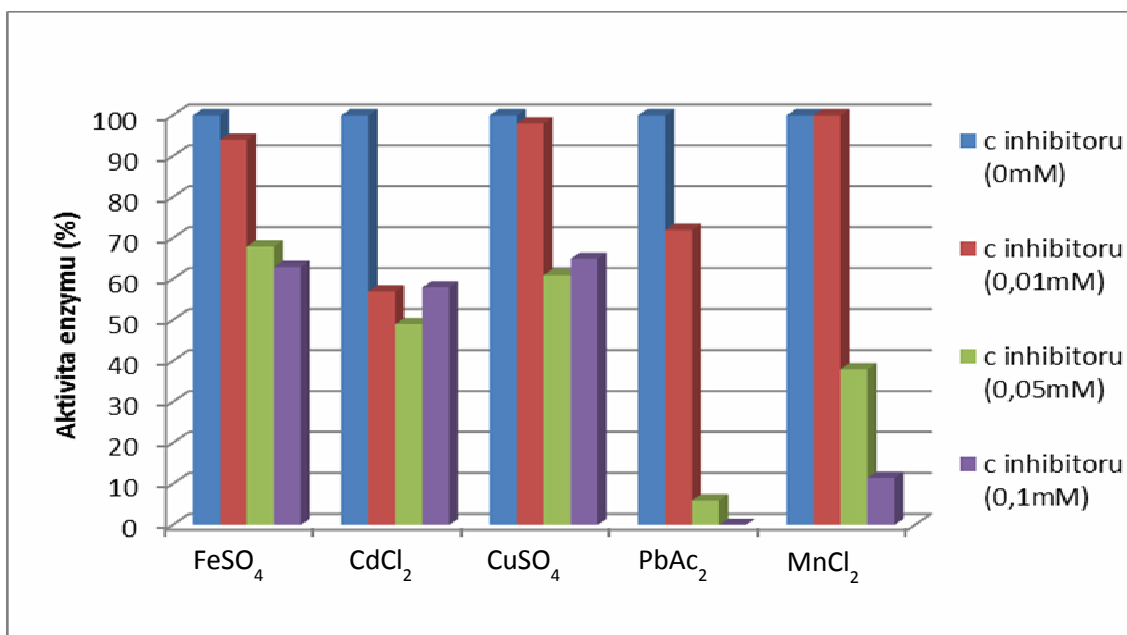
Obrázky 18 a 19 ilustrují vliv iontů těžkých kovů o rozdílných koncentracích na aktivitu katecholdioxygenázy. Enzymová aktivita byla v reakční směsi měřena v čase 0 a 7 min.

Z výsledků těchto experimentů je patrné, že octan olovnatý a chlorid manganatý ovlivňují aktivitu katechol-1,2-dioxygenázy nejvýrazněji, a to již při 0,05 mM koncentraci těchto sloučenin v reakční směsi. Při 0,05 mM koncentraci iontů olovnatých je aktivita enzymu inhibována téměř totálně. Při stejné koncentraci iontů manganatých klesá aktivita enzymu přibližně na 40 %.

Koncentrace octanu olovnatého vyšší než 0,1 mM způsobují 100 % inhibici aktivity katecholdioxygenázy. Chlorid manganatý způsobuje při koncentraci 0,1 mM inhibici aktivity na 11 %. Ionty kademnaté, železnaté a měďnaté v koncentraci 0,1 mM inhibují oxidaci katecholu, katalyzovanou katecholdioxygenázou *C. tropicalis* přibližně na 60 %.



Obr. 18: Závislost enzymové aktivity cytosolární katechol-1,2-dioxygenázy kvasinky *C. tropicalis* na koncentraci iontů těžkých kovů (mM). Jednotlivé křivky znázorňují vliv iontů železnatých, kademnatých, měďnatých, olovnatých a manganatých na katecholdioxygenázu v koncentracích 0; 0,01; 0,05; 0,1 mM. Nejvyšší pokles aktivity enzymu byl pozorován za přítomnosti octanu olovnatého a chloridu manganatého, a to již při 0,05 mM koncentraci.



Obr. 19: Inhibice katechol-1,2-dioxygenázy *C. tropicalis* ionty těžkých kovů. Síran železnatý (0; 0,01; 0,05; 0,1 mM); chlorid kadmnatý (0; 0,01; 0,05; 0,1 mM); síran měďnatý (0; 0,01; 0,05; 0,1 mM); octan olovnatý (0; 0,01; 0,05; 0,1 mM); chlorid manganatý (0; 0,01; 0,05; 0,1 mM).

Ze získaných hodnot inhibice katecholdioxygenázy, katalyzované ionty těžkých kovů, bylo možné určit hodnoty IC₅₀ pro jednotlivé ionty. Hodnoty IC₅₀ odpovídají koncentracím inhibitorů, při kterých za daných podmínek dochází k 50 % poklesu aktivity enzymu a jsou uvedeny v Tab. 3.

Jak již bylo uvedeno výše, aktivitu katechol-1,2-dioxygenázy nevýrazněji inhibují kationty olovnaté. Pokles enzymové aktivity na polovinu je patrný již při 23 μM koncentraci octanu olovnatého v reakční směsi. Ionty manganaté inhibují aktivitu sledovaného enzymu na 50 % při 42 μM koncentraci chloridu manganatého. Padesátiprocentní inhibice aktivity katechol-1,2-dioxygenázy bylo dosaženo při 45 μM koncentraci chloridu kadmnatého v reakční směsi. Ionty měďnaté a železnaté rovněž inhibují oxidaci katecholu katalyzovanou katecholdioxygenázou buněk *C. tropicalis*. Při námi použitých koncentracích však nebylo 50 % inhibice enzymu těmito sloučeninami dosaženo.

inhibující ion těžkého kovu	NADPH- dependentní fenolhydroxyláza	katechol-1,2- dioxygenáza
	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)
Fe ²⁺	-	-
Pb ²⁺	-	23
Mn ²⁺	-	42
Cu ²⁺	15	-
Cd ²⁺	-	45

Tab. 3: Hodnoty IC₅₀ iontů těžkých kovů inhibujících NADPH-dependentní fenolhydroxylázu a katechol-1,2-dioxygenázu kvasinky *C. tropicalis*.

-...IC₅₀ nebyla stanovena

5. DISKUZE

V předchozích letech byl výzkum degradačních schopností kvasinky *Candida tropicalis* za aerobních podmínek zaměřen především na detekci, purifikaci a charakterizaci jednotlivých enzymů kaskády využívané tímto mikroorganismem k degradaci fenolických látek a jejich utilizaci jako vlastního zdroje energie a uhlíku pro růst a vývoj mikroorganismu. Následně pak výzkum směřoval k optimalizaci procesu izolace těchto enzymů, s minimálními ztrátami jejich enzymové aktivity při izolaci. Poměrně podrobně byly doposud charakterizovány první dva enzymy oxidační kaskády fenolu. Pro NADPH-dependentní fenolhydroxylázu, jejíž purifikací a charakterizací se zabývala v uplynulých letech i naše laboratoř, bylo určeno pH a teplotní optimum, dále pak K_m a V_{max} při optimálním pH a teplotě. Pro katechol-1,2-dioxygenázu pak bylo stanoveno pH a teplotní optimum enzymu a v současné době je již známo K_m a V_{max} i pro tento enzym.

Cílem této předkládané diplomové práce bylo poznání vlivu iontů těžkých kovů na aktivitu obou zmíněných cytosolárních enzymů (fenolhydroxylázy a katecholdioxygenázy) kvasinky *C. tropicalis*. Jelikož není vyloučeno, že území kontaminované fenolickými sloučeninami nebude zároveň kontaminováno i těžkými kovy např. ionty měďnatými, železnatými, olovnatými, nebo kademnatými, je studium vlivu těchto iontů těžkých kovů na sledovanou enzymovou aktivitu nanejvýš žádoucí.

Z výsledků uvedených v diplomové práci vyplývá, že fenolhydroxyláza byla výrazně inhibována pouze ionty měďnatými (síran měďnatý). Jistý stupeň inhibice vykazovaly rovněž ionty olovnaté, u kterých ovšem docházelo pouze k mírnému poklesu enzymové aktivity, a nebylo proto možné zjistit hodnotu IC_{50} . Tato hodnota by tudíž nebyla pouhou interpolací prokazatelně stanovitelná.

NADPH-dependentní fenolhydroxyláza (z *Trichosporon cutaneum*) je tetramer s podjednotkami o velikosti 60 kDa. Každá z těchto podjednotek se skládá ze tří domén, z nichž první obsahuje β -list vázající FAD typickým motivem $\beta\alpha\beta$ vázajícím nukleotid a rovněž obsahuje místo pro vazbu NADPH. Aktivní centrum je lokalizováno na povrchu podjednotky, mezi první a druhou doménou.

Druhá doména váže fenolický substrát. Třetí doména se účastní vzájemného kontaktu podjednotek. Katalytický mechanismus fenolhydroxylázy funguje na bázi komplexu zahrnujícího FAD a tři substráty: molekulární kyslík, fenol a NADPH. Fenol se v aktivním centru váže vodíkovou vazbou k tyrosylovému zbytku (Tyr289). Tento tyrosin je také schopen vytvořit vodíkovou vazbu s atomem kyslíku C4a-peroxoflavinového intermediátu. V aktivním centru se nalézají hojně zbytky argininu a aspartátu, neobsahuje však ani histidylové ani cysteylové zbytky (Enroth et al., 1998). Otázka jakým mechanismem působí ionty Cu^{2+} zůstává tedy otevřená.

Katechol-1,2-dioxygenáza byla silně inhibována hned třemi sloučeninami testovanými v diplomové práci, a to octanem olovnatým, chloridem manganatým a chloridem kademnatým, které vykazovali při koncentraci 0,1 mM 100 %-ní, 89 %-ní a 52 %-ní inhibici katecholdioxygenázové aktivity. Vliv dalších iontů těžkých kovů na cytosolární katechol-1,2-dioxygenázu *C. tropicalis* použitých pro tuto studii rovněž nebyl zanedbatelný. FeSO_4 a CuSO_4 inhibují za jejich 0,1 mM koncentrace v reakční směsi aktivitu katecholdioxygenázy přibližně na 60 %.

Z hodnot IC_{50} je patrné, že aktivita katechol-1,2-dioxygenázy je podstatně více ovlivnitelná ionty těžkých kovů, než aktivita NADPH-dependentní fenolhydroxylázy *C. tropicalis*. To by mohlo být zapříčiněno uspořádáním aktivních center obou enzymů. Zdá se totiž, že katechol-1,2-dioxygenáza kvasinky *C. tropicalis* obsahuje aminokyselinu histidin v aktivním centru (Jechová, 2011). Imidazolový kruh této aminokyseliny pak může interagovat s ionty kovů.

V aktivním centru katechol-1,2-dioxygenázy mikroorganismů *P. aeruginosa*, *A. radioresistens* a *P. cepacia* byly skutečně nalezeny dva zbytky histidinu (Lipscomb and Orville, 1992; Que and Ho 1996; Walsh et al., 1983). Struktura aktivního centra katechol-1,2-dioxygenázy kvasinky *C. tropicalis* však zatím není známá.

Dosavadní výzkum vlivu iontů těžkých kovů na aktivitu katechol-1,2-dioxygenázy izolované z kmene *Pseudomonas putida* byl zaměřen především na ionty měďnaté a rtuťnaté. Přídavek 0,1 mM CuSO_4 do reakční směsi obsahující tento enzym inhiboval enzymovou aktivitu přibližně o 10 %.

Po hodinové inkubaci byla aktivita enzymu snížena na 86 %. Při přidavku rtuťnatých kationů (0,1 mM HgCl_2) byl pokles markantnější (až na 21 % původní enzymové aktivity). Při snaze o zmírnění tohoto inhibičního efektu na katechol-1,2-dioxygenázu byl úspěšně použit 1 mM 2-merkapt ethanol. Díky reakci této sloučeniny s ionty těžkých kovů klesla aktivita katecholdioxygenázy při přidavku 0,1 mM HgCl_2 pouze na 57 %. Na inhibiční vliv měďnatých iontů však přídavek 2-merkapt ethanolu vliv neměl a k desetiprocentnímu snížení enzymové aktivity stále docházelo (Dorn and Knackmuss, 1978).

Skutečnost, že ionty těžkých kovů ovlivňují i jiné enzymy kaskády odbourávající fenolické látky, dokazuje jejich vliv na aktivitu *cis, cis*-mukonátcyklázy *T. cutaneum*. To je třetí enzym oxidační kaskády umožňující využití fenolů. Při optimální teplotě a pH byla zjišťována míra inhibice tohoto enzymu ionty manganatými, železnatými, zinečnatými, měďnatými, stříbrnými a rtuťnatými, a to v 0,01 mM – 1 mM koncentraci v reakční směsi. Tento enzym, katalyzující přeměnu kyseliny *cis, cis*-mukonové na mukonolakton byl nejméně ovlivněn 1 mM MnSO_4 , jeho aktivita poklesla o 12 %. FeSO_4 inhiboval v téže koncentraci enzymovou aktivitu o 28 %. Residuální aktivita *cis, cis*-mukonátcyklázy s přídavkem ZnCl_2 v koncentraci 0,1 mM v reakční směsi klesla na 40 %. Ionty sloučenin CuSO_4 , AgNO_3 inhibovaly při své 0,1 mM koncentraci na méně než jedno procento původní aktivity a rtuťnaté ionty (HgCl_2) způsobily prakticky totální inhibici reakce již při 0,01 mM koncentraci (Gaal and Neujahr, 1980).

Dvojmocné ionty zinku (Zn^{2+}) vykazují inhibiční efekt na životaschopnost všech mikroorganismů využívajících fenolické látky jako zdroj uhlíku a energie. Tyto ionty ale mohou zároveň redukovat efekt ostatních iontů těžkých kovů. Ionty Zn^{2+} například neovlivňují růst buněk bez přítomnosti iontů kadmia, rovněž ionty hořečnaté redukuje toxicitu iontů nikelnatých vůči bakteriím a kvasinkám (*Sacharomyces cerevisiae*, *Hendersonula toruloidea*) (Babich and Stotzky, 1985).

Detailnější porozumění mechanismu inhibice iontů jedné kovů ionty kovů druhých by mohlo vést k rozvoji strategií bioremediací kontaminovaných míst, u kterých by byl pro zvýšení resistance mikroorganismů vůči toxickým iontům těžkých kovů použit relativně netoxický dvojmocný kation (např. vápenaté ionty).

Tím by došlo i ke zvýšení biodegradace organických látek (Sandrin and Meier, 2003). V tomto smyslu byly úspěšně zkoumány ionty kobaltnaté, měďnaté, železnaté, manganaté a zinečnaté. Konkrétně jejich schopnost snížení inhibice NADPH-dependentní biodegradace v půdách kontaminovaných kadmíem nebo zinkem. V současné době je tedy předmětem výzkumu, zda by prostřednictvím méně toxických dvojmocných iontů kovů bylo možné rovněž dosáhnout pozitivních výsledků v oblasti bioremediace polutantů životního prostředí.

Dlouhodobé snahy o zvýšení efektivity bioremediace fenolických látek a organických látek obecně, pomocí nejrůznějších druhů mikroorganismů, probíhají snad ve všech laboratořích, které se touto problematikou zabývají. Ionty těžkých kovů jsou totiž známy jako silné inhibitory enzymů biodegradujících xenobiotika. Zkoumán byl například inhibiční vliv iontů těchto kovů na biodegradaci fenolu s užitím plazmidů, po jejichž introdukci dochází k vývoji resistance vůči iontům těžkých kovů. Myšlenka kombinace těchto schopností vedla k vytvoření polyfunkčních kmenů, vhodných pro bioremediaci půdy kontaminované jak organickými polutanty, tak i ionty těžkých kovů. Připraven byl kmen *P. putida* PhCN, který obsahuje dva plasmidy (120 kb plazmid kódující odbourávání fenolu a 100 kb plazmid kódující resistenci vůči iontům kadmia a mědi). Resistentní kmen vykazoval vysokou schopnost degradace fenolu v přítomnosti Cu^{2+} a Cd^{2+} , neboť jeho schopnost utilizace této látky klesala jen minimálně (Deeb and Altalhi, 2009).

Negativní vliv iontů těžkých kovů na bioremediaci organických látek by mohl být zmírněn rovněž změnou pH. Mechanismus, podle kterého by pH mohlo ovlivňovat toxicitu těžkých kovů vůči mikroorganismům, zatím nebyl vysvětlen, ale mohl by zahrnovat a) redukci adsorpce iontů těžkých kovů a jejich příjem mikroorganismy, jak bylo pozorováno u *Burkholderia sp.* (Sandrin and Maier, 2003), *C. regularis* (Sakaguchi et al., 1979) a *Klebsiella pneumonia* (Rudd et al., 1983) nebo b) snížení toxicity iontů kovů (dosud neznámým mechanismem) (Babich and Stotzky, 1985; Collins and Stotzky, 1992; Seregin and Ivanov, 1997).

Výše uvedené experimenty byly prováděny v laboratorním měřítku, ale otázkou je, jak uvést takovou bioremediaci do praxe. Tedy pro její využití k odbourávání xenobiotik přímo „v terénu“.

Jednotlivé způsoby degradací organických polutantů můžeme rozlišovat podle toho, zda pracujeme s volnými či určitým způsobem imobilizovanými buňkami. Pokud je zvolený biologický proces řádně navržený a provedený, dojde k totální oxidaci organické hmoty a zároveň nevzniká žádný odpadní materiál, který by musel být dále nějakým způsobem upravován. V tomto postupu spočívá významný rozdíl od fyzikálně-chemických metod, které obvykle produkují rezidua, která musí být dále eliminována.

Při práci s volnými buňkami je nutno zařadit druhý krok degradace, kterým je separace mikrobiální biomasy od přečišťované tekutiny, což samozřejmě celý proces ekonomicky znevýhodňuje (Cohen, 2001). Bioreaktory mohou být provozovány jako vsádkové, s postupným přítokováním živin („fed-batch“), semikontinuálně, popř. kontinuálně s nízkými koncentracemi.

Možnost imobilizace buněk na povrch nosiče se využívá například v bioreaktorech typu biofiltru, biologického fluidního lože, submersního biofiltru, apod. (Kennes and Thalasso, 1998). Jednotlivé typy bioreaktorů s pevnou náplní se od sebe liší konstrukcí, typem nosiče, typem mobilní fáze (kapalina, plyn), přívodem znečištěné vody či plynu, způsobem „aerace“ (používá-li se). Vlastní podstata degradace však zůstává stejná. Rozpuštěná odpadní látka prochází bioreaktorem, adsorbuje se na povrch biofilmu a postupně penetruje dovnitř. Uvnitř biofilmu je působením mikroorganismů degradována podle typu metabolismu na konečné produkty, které z bioreaktoru odcházejí.

Výhodou těchto systémů je, že odpadá náročný proces separace biomasy od čištěného odpadního materiálu, neboť v tomto případě je biomasa statická (imobilizovaná) a degradovaná tekutina mobilní (Cohen, 2001). Další výhodou je vyšší koncentrace biomasy v systému, jenž nám zaručuje větší specifický povrch pro příjem substrátu.

Časově a cenově výhodná remediace území kontaminovaných jak organickými sloučeninami, tak ionty těžkých kovů je dosažitelná pouze v případě porozumění mechanismu inhibice biodegradace organických látek ionty těžkých kovů.

I když přítomnost iontů těžkých kovů působí rozdílně na jednotlivé enzymy oxidačních kaskád i celé kolonie používaných mikroorganismů, je zřejmé, že tyto ionty inhibují biodegradace organických polutantů včetně látek fenolických, a to jak v případě aerobních, tak i anaerobních systémů.

V současné době jsou testovány a vyvíjeny nové biologicky, časově a finančně přijatelné metody pro zvýšení efektivity bioremediace pomocí mikroorganismů. Existuje mnoho teorií, jako jsou například použití geneticky modifikovaných, k iontům těžkých kovů resistantních, mikroorganismů, změny pH a přídavky aditiv ovlivňujících biologickou přijatelnost, a tedy i míru toxicity iontů těžkých kovů pro mikroorganismy užívané k bioremediacím (Sandrin and Maier, 2003).

K vývoji těchto metod je však pochopitelně nejdříve nutné poznat, zda a jakým způsobem ionty těžkých kovů ovlivňují jednotlivé enzymy, které jsou pro bioremediace organických látek (včetně fenolů) esenciální. Předkládaná diplomová práce proto řešila poznání vlivu těchto iontů na první dva enzymy *C. tropicalis* degradující fenol, NADPH-dependentní fenolhydroxylázu a katechol-1,2-dioxygenázu.

6. ZÁVĚR

Cíle předkládané diplomové práce zahrnovaly izolaci a purifikaci NADPH-dependentní fenolhydroxylázy a zjištění vlivu iontů těžkých kovů na aktivitu NADPH-dependentní fenolhydroxylázy a katechol-1,2-dioxygenázy kvasinky *C. tropicalis*. V práci byly získány výsledky, které pro tyto cíle hledaly řešení:

1) Izolace a purifikace cytosolárního enzymu NADPH-dependentní fenolhydroxylázy se nezdařila dokonale a izolovaný enzym stále vykazoval, i když pouze mírnou, aktivitu katecholdioxygenázy (1 %). Tento fakt ovšem nebránil určení vlivu iontů těžkých kovů na aktivitu enzymu.

Katechol-1,2-dioxygenáza používaná pro experimenty sledující vliv iontů těžkých kovů na tento enzym byla získána od J. Jechové (Jechová, 2011).

2) Ionty měďnaté inhibují aktivitu NADPH-dependentní fenolhydroxylázy z testovaných iontů (Cu^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Pb^{2+}) nejvýrazněji. A to již při 0,01 mM koncentraci. Chlorid kademnatý inhibuje aktivitu fenolhydroxylázy při koncentraci vyšší než 0,1 mM. Ionty železnaté, manganaté a olovnaté aktivitu fenolhydroxylázy *C. tropicalis* neovlivňují.

Katechol-1,2-dioxygenáza je vůči iontům těžkých kovů senzitivnější. Ionty olovnaté inhibují aktivitu katechol-1,2-dioxygenázy za koncentrace 0,1 mM totálně. Manganaté ionty v koncentraci 0,1 mM inhibují aktivitu katechodioxygenázy o 89 %, v koncentraci 0,05 mM inhibují aktivitu tohoto enzymu o 62 %. Pokles aktivity enzymu o 35 – 42 % byl zaznamenán u iontů měďnatých, železnatých a kademnatých při 0,1 mM koncentraci těchto iontů.

3) Hodnota IC_{50} byla určena pro inhibici NADPH-dependentní fenolhydroxylázy ionty měďnatými ($\text{IC}_{50} = 15 \mu\text{M}$).

Hodnoty IC_{50} pro ionty těžkých kovů inhibující katechol-1,2-dioxygenázu byly určeny pro Pb^{2+} (23 μM), Mn^{2+} (42 μM) a Cd^{2+} (45 μM).

Část výsledků získaných při řešení diplomové práce je součástí publikace (Vilímková et al., 2009), která je uvedena jako příloha č. 1 diplomové práce.

7. POUŽITÁ LITERATURA

Aleksieva Z, Ivanova D, Godjevargova T and Atanasov B (2001). Degradation of some phenol derivatives by *Trichosporon cutaneum* R57. *Process Biochem* **37**: 1215–1219.

Allen R (1991). Chemical safety data sheets: Toxic chemicals (m-z). *Spec Publ Roy Soc Chem* **4b**: 65-67.

Annadurai G, Babu SR, Mahesh KPO and Murugesan T (2000). Adsorption and biodegradation of phenol by chitosan-immobilized *Pseudomonas putida* (NICM 2174) *Biomed Eng* **22**: 493–501.

Aoki K, Ohtsuka K and Nishira H (1984). Rapid biodegradation of aniline by *Frateuria species* ANA-18 and its aniline metabolism. *Agr Biol Chem* **48**: 865-872.

Babich H and Stotzky G (1985). Heavy metal toxicity to microbe-mediated ecologic processes: A review and potential application to regulatory policies. *Water Environ Res* **36**: 111-137 .

Bai J, Wen JP, Li HM and Jiang Y (2007). Kinetic modeling of growth and biodegradation of phenol and m-cresol using *Alcaligenes faecalis*. *Process Biochem* **42**: 510–517.

Bandyopadhyay K, Das D and Maiti BR (1998). Electrochemical synthesis of quasi-periodic quantum dot and nanostructure arrays. *Biomed Eng* **18**: 373–377.

Benveniste H (1991). The excitotoxin hypothesis in relation to cerebral ischemia. *Cerebrovasc Brain Metabol Rev* **3**: 213-245.

Beshay U, Abd-El-Haleem D, Moawad H and Zaki S (2002). Phenol biodegradation by free and immobilized *Acinetobacter*. *Biotechnol Lett* **24**: 1295–1297.

Brányik T, Kuncová G and Páca J (2000). The use of silica gel prepared by sol-gel method and polyurethane foam as microbial carriers in the continuous degradation of phenol. *Appl Microbiol Biotechnol* **54**: 168–172.

Broderick JB (1999). Catechol dioxygenases. *Essays Biochem* **34**: 322.

Brooks JD and Riviere JE (1996). Quantitative percutaneous absorption and cutaneous distribution of binary mixtures of phenol and para-nitrophenol in isolated perfused porcine skin. *Fund Appl Toxicol* **32**: 233-243.

Bugg TDH and Winfield CJ (1998). Enzymatic cleavage of aromatic rings: mechanistic aspects of the catechol dioxygenases and later enzymes of bacterial oxidative cleavage pathways. *Nat Prod Rep* **11**: 513-530.

Cai W, Li J and Zhang Z (2007). The characteristics and mechanisms of phenol biodegradation by *Fusarium sp.* *J Hazard Mater* **148**: 38-42.

Claussen M and Schmidt S (1998). Biodegradation of phenol and p-cresol by the hyphomycete *Scedosporium apiospermum*. *Res Microbiol* **149**: 399-406.

Cohen Y (2001). Biofiltration – the treatment of fluids by microorganisms immobilized into the filter bedding material – a review. *Bioresour Technol* **77**: 257-274.

Collins YE and Stotzky G (1992). Heavy metals alter the electrokinetic properties of bacteria, yeasts, and clay minerals. *Appl Environ Microbiol* **58**: 1592-1600.

Cunningham SD, Berti WR and Huang JW (1995). Phytoremediation of contaminated soils. *Trends Biotechnol* **13**: 393-397.

Deeb BE and Altalhi AD (2009). Degradative plasmid and heavy metal resistance plasmid naturally coexist in phenol and cyanide assimilating bacteria. *Am J Biochem Biotechnol* **5**: 84-93.

Dong X, Ballou DP and Massey V (2001). Studies of the mechanism of phenol hydroxylase: mutants Tyr289Phe, Asp54Asn, and Arg281Met. *Biochem J* **40**: 12369-12378.

Dorn E and Knackmuss HJ (1978). Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds: two catechol 1,2-dioxygenases from a 3-chlorobenzoate-grown *Pseudomonad*. *Biochem J* **174**: 73-84.

Dou J, Ding A, Liu X, Du Y, Deng D and Wang J (2010). Anaerobic benzene biodegradation by a pure bacterial culture of *Bacillus cereus* under nitrate reducing conditions. *J Environ Sci* **22**: 709–715.

Enroth C, Neujahr H, Schneider G and Lindqvist Y (1998). The crystal structure of phenol hydroxylase in complex with FAD and phenol provides evidence for a concerted conformational change on the enzyme and its cofactor during catalysis. *Food Struct* **6**: 605-617.

Fernandes VC, Albergaria JT, Oliva-Teles T, Delerue-Matos C and De Marco P (2008). Dual augmentation for aerobic bioremediation of MTB and TCE pollution in heavy metal-contaminated soil. *Biodegradation* **20**: 375–382.

Fialová A, Boschke E and Bley T (2004). Rapid monitoring of the biodegradation of phenol-like compounds by the yeast *Candida maltosa* using BOD measurements. *Int Biodeter Biodegrad* **54**: 69–76.

Gaal A and Neujahr HY (1980). *Cis,cis*-Muconate cyclase from *Trichosporon cutaneum*. *Biochem J* **191**: 37-43.

Gallo M, Roche B and Azoulay E (1976). Microsomal cytochromes of *Candida tropicalis* grown on alkanes. *Biochim Biophys Acta* **419**: 425-434.

Geller AS (1997). Botulinum toxin A. *Arch Phys Med Rehabil* **78**: 233.

Godjevargova T, Ivanova D, Aleksieva Z and Burdelova G (2006). Biodegradation of phenol by immobilized *Trichosporon cutaneum* R57 on modified polymer membranes. *Process Biochem* **41**: 2342–2346.

Hensel J and Straube G (1990). Kinetic studies of phenol degradation by *Rhodococcus sp.* P1 I. Batch cultivation. *Antonie Leeuwenhoek* **57**: 29-32.

Hill RA, Kirby GW, O'Loughlin GJ and Robins DJ (1993). Stereochemistry and mechanisms of the 3- carboxymuconate fungal pathway in *Neurospora crassa* SY4a. *J Chem Soc* **1**: 1967-1972.

Hiroyuki A, Saiko A, Tohru O and Toshiaki K (1998). Adaptation of *Cornamonas testosteroni* TAM1 to utilize phenol: organization and regulation of the genes involved in phenol. *Chin J Microbiol Immunol* **144**: 2895–2903.

Hoak RD (1957). The cause of taste and odor in drinking water. *Water Sewage Works* **6**: 24.

Hofrichter M and Fritsche W (1992). Metabolism of phenol, chloro- and nitrophenols by the *Penicillium* strain Bi 7/2 isolated from a contaminated soil. *Trends Microbiol* **24**: 163–172.

Chang SY, Li CT, Hiang SY and Chang MC (1995). Intraspecific protoplast fusion of *Candida tropicalis* for enhancing phenol degradation. *Appl Microbiol Biotechnol* **43**: 534-538.

Chudoba J, Dohányos M and Wanner J (1991). Čištění odpadních vod. Praha: SNTL str. 91

Ijah UJJ (1998). Studies on relative capabilities of bacterial and yeast isolates from tropical soil in degrading crude oil. J Air Waste Manag Assoc **18**: 293–299.

Janderová B and Bendová O (1999). Úvod do biologie kvasinek. Praha: Karolinum str. 7-12

Jechová J (2011). Diplomová práce. Praha: Přírodovědecká fakulta UK str. 40-41

Jiang Y, Wen J, Jia X, Caiyin Q, and Hu Z (2007). Mutation of *Candida tropicalis* by irradiation with a He-Ne laser to increase its ability to degrade phenol. Appl Environ Microbiol **73**: 226-231.

Jiang Y, Cai X, Wu D and Ren N (2010). Biodegradation of phenol and *m*-cresol by mutated *Candida tropicalis*. J Environ Sci **22**: 621–626.

Jones KH, Trudgill PW and Hopper DJ (1995). Detection of *Erwinia amylovora* by nested PCR and PCR-dot-blot and reverse blot hybridizations. Arch Microbiol **163**: 176–181.

Kaschabek SR, Kuhn B, Müller D, Schmidt E and Reineke W (2002). Degradation of aromatics and chloroaromatics by *Pseudomonas* sp. strain B13: Purification and characterization of 3-oxoadipate:succinyl-Coenzyme A (CoA) Transferase and 3-Oxoadipyl-CoA Thiolase. J Bacteriol **184**: 207-215.

Katapodis P, Moukouli M and Christakopoulos P (2007). Biodegradation of indole at high concentration by persolvent fermentation with the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile*. Int Biodeter Biodegrad **60**: 267–272.

Kennes Ch and Thalasso F (1998). Review: Waste gas biotreatment technology. J Chem Tech Biotechnol **72**: 303–319.

Khleifat KM (2006). Biodegradation of phenol by *Ewingella americana*: Effect of carbon starvation and some growth conditions. Process Biochem **41**: 2010–2016.

Kılıç NK (2009). Enhancement of phenol biodegradation by *Ochrobactrum sp.* Isolated from industrial wastewaters. Int Biodeter Biodegrad **63**: 778–781.

Kim SI, Song SY, Kim KW, Ho EM and Oh KH (2003). Proteomic analysis of the benzoate degradation pathway in *Acinetobacter sp.* KS-1. Res Microbiol **154**: 697-703.

Komárková E, Páca J, Klapková E, Stiborová M, Soccol CR and Sobotka M (2003). Physiological changes of *Candida tropicalis* population degrading phenol in fed batch reactor. Brazil Arch Biol Technol **46**: 537-542.

Kotturi G, Robinson CW and Inniss WE (1991). Phenol degradation by a psychrotrophic strain of *Pseudomonas putida*. Appl Microbiol Biotechnol **34**: 539–543.

Krug M and Straube G (1986). Degradation of phenolic compounds by yeast *Candida tropicalis* HP15. II. Some properties of the first two enzymes of the degradation pathway. J Basic Microbiol **5**: 271-281.

Krug M, Ziegler H and Straube G (1985). Degradation of phenolic compounds by yeast *Candida tropicalis* HP15. I. Physiology of growth and substrate utilization. J Basic Microbiol **2**: 102-110.

Kučerová P, Macková M and Macek T (1999). Perspektivy fytořemediace při odstraňování organických polutantů a xenobiotik z životního prostředí. Chem Listy **93**: 19-26.

Landa S, Viezer O, Kaplan EP, Chin-lang K and Petrov AD (1959). Synthesis of some highly branched paraffins. *Russ Chem Bull* **8**: 1374-1381.

Lipscomb JD and Orville AM (1992). Mechanistic aspects of dihydroxybenzoate dioxygenases. *Metal Ions Biol Syst* **28**: 243–298.

Mabrouk PA (1995). The use of nonaqueous media To probe biochemically significant enzyme intermediates: The generation and stabilization of horseradish peroxidase compound II in neat benzene solution at room temperature. *J Am Chem Soc* **117**: 2141–2146.

Mamiko S, Hiromi K, Shoji S and Masako O (1995). Pressure stress effects on the ultrastructure of cells of the dimorphic yeast *Candida tropicalis*. *FEMS Microbiol Lett* **131**: 11–15.

Masák J, Pelechová J and Plachý J (1992). Speciální mikrobiální technologie. Praha: VŠCHT, str. 21-22.

Mc Allister KA, Hung L and Trevors JT (1996). Microbial degradation of pentachlorophenol. *Biodegradation* **7**: 1–40.

Mordocco A, Kuek C and Jenkins R (1999). Continuous degradation of phenol at low concentration using immobilized *Pseudomonas putida*. *Enzym Microb Tech* **25**: 530–536.

Murray RK, Granner DK, Mayes PA and Rodwell VW (2002). Harperova biochemie. 23.vydání, Jinočany: H+H, Vyšehradská, s.r.o. str. 743.

Neujahr HY and Gall A (1973). Phenol hydroxylase from yeast: Purification and properties of the enzyme from *Trichosporon cutaneum*. *Eur J Biochem* **35**: 386-400.

Neujahr HY and Gall A (1975). Phenol hydroxylase from yeast. *Eur J Biochem* **58**: 351-357.

Páca J and Martius GGS (1996). Inhibition concentration of phenolic substances under different cultivation conditions. Part I. Phenol oxidation by mixed microbial population in a model system. *Acta Hydroc Hydrobiol* **24**: 127-131.

Páca J Jr, Kremláčková V, Turek M, Suchá V, Vilímková L, Páca J, Halecký M and Stiborová M (2007). Isolation and partial characterization of cytoplasmic NADPH-dependent phenol hydroxylase oxidizing phenol to catechol in *Candida tropicalis* yeast. *Enzym Microb Tech* **40**: 919-926.

Páca J, Komárková E, Prell A, Stiborová M and Sobotka M (2002). Kinetics of phenol oxidation by *Candida tropicalis*: effects of oxygen supply rate and nutrients on phenol inhibition. *Folia Microbiol* **47**: 685-692.

Pai SL, Hsu YL, Chong NM, Sheu CS and Chen CH (1994). Continuous degradation of phenol by *Rhodococcus sp.* immobilized on granular activated carbon and in calcium alginate. *J Chem Tech Biotechnol* **51**: 37-42.

Piskač P and Čermák V (1996-98). Ekotoxikologická databáze ETD. <http://plumbum.ceu.cz>

Prokeš J (1998). *Základy toxikologie II*. Praha: Karolinum str. 7, 40

Quan X, Shi H, Zhang Y, Wang J and Qian Y (2004). Biodegradation of 2,4-dichlorophenol and phenol in an airlift inner-loop bioreactor immobilized with *Achromobacter sp.* *Separ Purif Tech* **34**: 97-103.

Que L and Ho LYN (1996) Dioxygen activation by enzymes with mononuclear non-heme iron active sites. *Chem Rev* **96**: 2607-2624.

Rigo M and Alegre RM (2004). Isolation and selection of phenol-degrading microorganisms from industrial wastewaters and kinetics of the biodegradation. *Folia Microbiol* **49**: 41-45.

Roane TM, Josephson KL and Pepper IL (2001). Dual-bioaugmentation strategy to enhance remediation of cocontaminated soil. *Appl Environ Microbiol* **67**: 3208-3215.

Rudd JWM, Turner MA, Furutani A, Swick AL, and Townsend BE (1983). The english-wabigoon river system: I. A synthesis of recent research with a view towards mercury amelioration. *Can J Fish Aquat Sci* **40**: 2206–2217.

Sakaguchi T, Tsuji T, Nakajima A and Horikoshi T (1979). Accumulation of cadmium by green microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol* **8**: 207-215.

Sandrin TR and Maier RM (2003). Impact of metals on the biodegradation of organic pollutants. *Environ Health Perspect* **111**: 1093-1101.

Sanglard D, Käppeli O and Fiechter A (1986). Role of extracellular ligninases in biodegradation of benzo (a) pyrene by *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch Biochem Biophys* **251**: 276-286.

Santos VL and Linardi VR (2004). Biodegradation of phenol by a filamentous fungi isolated from industrial effluents- identification and degradation potential. *Process Biochem* **39**: 1001-1006.

Sejlitz T, Wernstedt Ch, Engström A and Neujahr HY (1990). Amino acid sequences around the pyridoxal-5'-phosphate-binding sites of phenol hydroxylase. *Eur J Biochem* **187**: 225-228.

Seregin IV and Ivanov VB (1997). Histochemical investigation of cadmium and lead distribution in plants. *Russ J Plant Physiol* **31**: 277-291.

Sierp F and Fränsemeier F (1934). Der biologische abbau von phenol. *Angew Chem* **47**: 277–285.

Stephenson T (1990). Substrate inhibition of phenol oxidation by a strain of *Candida tropicalis*. *Biotechnol Lett* **12**: 843-846.

Stiborová M, Hudeček J, Páca J Jr, Martínek V and Páca J. (2004). Study of enzymes metabolizing environmental pollutants as a means of modulating their biodegradation. *Chem Listy* **98**: 876-890.

Stiborová M, Suchá V, Mikšanová M, Páca J Jr and Páca J (2003). Hydroxylation of phenol to catechol by *Candida tropicalis*: involvement of cytochrome P450. *Gen Physiol Biophys* **22**: 167-179.

Stoilova I, Krastanov A, Stanchev V, Daniel D, Gerginova M and Alexieva Z (2006). Biodegradation of high amounts of phenol, catechol, 2,4-dichlorophenol and 2,6-dimethoxyphenol by *Aspergillus awamori* cells. *Enzym Microb Tech* **39**: 1036–1041.

Tichý M (1998). *Toxikologie pro chemiky*. Praha: Karolinum str. 68

Torres LG, Sánchez-de-la-Vega A, Beltrán NA and Jiménez BE (1998). Production and characterization of a Ca-alginate biocatalyst for removal of phenol and chlorophenols from wastewaters. *Process Biochem* **33**: 625-634.

Van Schie M and Young LY (1998). Isolation and characterization of phenol-degrading denitrifying bacteria. *Appl Environ Microbiol* **64**: 2432-2438.

Varma RJ and Gaikwad BG (2008). Rapid and high biodegradation of phenols catalyzed by *Candida tropicalis* NCIM 3556 cells. *Enzym Microb Tech* **43**: 431–435.

Varma RJ and Gaikwad BG (2009). Biodegradation and phenol tolerance by recycled cells of *Candida tropicalis* NCIM 3556. *Int Biodeter Biodegrad* **63**: 539–542.

Viggiani A, Olivieri G, Siani L, Di Donato A, Marzocchella A, Salatino P, Barbieri P and Galli E (2006). An airlift biofilm reactor for the biodegradation of phenol by *Pseudomonas stutzeri* OX1. *J Biotechnol* **123**: 464–477.

Vijayagopal V and Viruthagiri T (2005). Batch kinetic studies in phenol biodegradation and comparison. In *J Biotechnol (IJBT)* **4**: 565-567.

Vilímková L, Páca J Jr, Kremláčková V, Páca J and Stiborová M (2008). Isolation of cytoplasmic NADPH-dependent phenol hydroxylase and catechol-1,2-dioxygenase from *Candida tropicalis* yeast. *Interdiscipl Toxicol* **1**: 225-230.

Vilímková L, Jechová J, Koubková Z, Páca J Jr, Kremláčková V, Poljaková J, Páca J, Stiborová M (2009). Isolation and partial characterization of catechol-1,2-dioxygenase of phenol degrading yeast *Candida tropicalis*. *Neuroendocrinol Lett* **30 Suppl 1**: 80-87.

Vodrážka Z (1993). *Biochemie*. 3. vydání, Praha: Academia str. 20-22

Walsh TA, Ballou DP, Mayer JE and Que L (1983). Halogenated protocatechuates as substrates for protocatechuate dioxygenase from *Pseudomonas cepacia*. *J Biol Chem* **258**: 14422-14427.

Windholz M (1983). *An encyclopaedia of chemicals, drugs and biological*. 10. vydání, New Jersey: Rahway, Merck and Co. str. 89

Wood KA (1978). The use of phenol as a neurolytic agent: a review. *Pain* **5**: 205-225.

Zache G and Rehm JH (1989). Degradation of phenol by a coimmobilized entrapped mixed culture. *Appl Microbiol Biotechnol* **30**: 426.

8. PŘÍLOHY DIPLOMOVÉ PRÁCE

Příloha č. 1

Vilímková L, Jechová J, Koubková Z, Páca J Jr, Kremláčková V, Poljaková J, Páca J, Stiborová M (2009). Isolation and partial characterization of catechol-1,2-dioxygenase of phenol degrading yeast *Candida tropicalis*.
Neuro Endocrinol Lett **30 Suppl 1**: 80-87

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena
evidence vypůjčovatелů.

Jméno a příjmení Adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka