

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie
Studijní obor: Biochemie



Šárka Loukotová

*Volatilizace anorganických chloridů haloperoxidasami půdních
mikroorganismů a rostlin*

*Volatilization of inorganic chlorides by haloperoxidases of soil
microorganisms and plant*

Bakalářská práce

Vedoucí/Školitel: prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Konsultant: prof. Ing. Zdeněk Wimmer

Praha, 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 25.5.2012

Podpis

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svým konsultantům Dr. Sandorovi Forczekovi, PhD. a prof. Ing. Zdeňku Wimmerovi, kteří mi byli po celou dobu nápomocni, za jejich ochotu, užitečné rady a připomínky.

Abstract

Biogeochemical cycle of chlorine, particularly formation of organically bound chlorine (Cl_{org}), is still known only in outlines. In continental ecosystems chloride acts as stress factor, and also as source of chlorine; it originates from precipitation, which comes from marine cloud masses. Cl_{org} are formed naturally by biotical and abiotical way. The biological factors are microorganisms, soil enzymes, plants and even animals. Halogenation processes undergo in marine environment as well, the main difference is the presence of bromine besides chlorine, therefore the reaction and formation of brominated compounds. One group of Cl_{org} represents volatile chlorinated hydrocarbons (VOCl). Several VOCl can react with atmospheric ozone, consequently causing its depletion. The best known sources of VOCl are soil, the microorganisms living in it, and their exoenzymes released into it.

The heme peroxidases in the group EC 1.11.1.X can perform halogenation of organic compounds. Hydrogen peroxide or organic peroxides are the substrates of this reaction in which hypochlorous acid is generated. The halogen in reactive form then carries chlorine onto the organic compound.

To study enzymatic mediation of chlorination processes, we chose commercially available enzymes (chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago* and horseradish peroxidase). To concentrate the formed analytes, we used solid-phase microextraction (SPME) method or cryofocusing method, followed by GC-ECD or GC-MS analysis.

The formation of VOCl was confirmed in experiments, where enzyme, citric acid buffer, halogen ions (KBr, NaCl) and substrates (acetic acid, acetone) were present. Contrary to the literature, both enzymes formed chlorinated and brominated volatile compounds. The main volatile organic halogenated compounds were chloroform, bromoform, trichloroethylene, tetrachloroethylene, halogenated methane derivatives and aliphatic compounds. The formation was dependent on the length of the enzyme reaction. (In Czech)

Key word: halogen, heme peroxidases, volatile halogenated hydrocarbons, GC-ECD, SPME

Abstrakt

Biogeochemický cyklus chloru, zvláště utváření organicky vázaného chloru (Cl_{org}) je znám pouze okrajově. V pevninském ekosystému chloridy hrají roli jako stresový faktor a také jako zdroj chloru; jeho původ je ze srážek, které pocházejí z oblačnosti tvořené nad mořem. Cl_{org} jsou přírodně tvořeny biotickou a abiotickou cestou. Biologickými faktory jsou mikroorganismy, půdní enzymy a dokonce i živočichové.

Halogenační procesy také probíhají v mořských oblastech, kde hlavním rozdílem je přítomnost bromu vedle chloru, tudíž zde dochází k utváření bromovaných sloučenin. Jednu skupinu Cl_{org} představují těkavé chlorované uhlovodíky (VOCl). Některé VOCl mohou reagovat s atmosférickým ozonem s následkem rozkladu ozonové vrstvy. Nejznámějším zdrojem VOCl je půda, zde žijící mikroorganismy a jejich exoenzymy, které do ní vylučují.

Hemové peroxidasy EC 1.11.1.X mohou zprostředkovávat halogenaci organických sloučenin. Peroxid vodíku nebo organické peroxidy jsou substráty pro tyto reakce, kterými je produkována oxokyselina chloru. Poté halogen v reaktivní formě přenáší chlor do organické sloučeniny. Pro studium enzymatického zprostředkování chloračních procesů jsme vybrali komerčně dostupné enzymy (chloroperoxidasa z *Caldariomyces fumago* a křenová peroxidasa). Ke prekoncetraci tvořících se analytů jsem použila metodu mikroextrakce tuhou fází nebo kryofokusační metodu. Analýzy byla provedené na GC-ECD.

Experimentálně byla potvrzena tvorba VOCl, za přítomnosti enzymu, citrátového pufru, halogenového iontu (KBr, NaCl) a substrátu (kyselina octová, aceton). Oproti literatuře, oba enzymy tvořily chlorované a bromované těkavé sloučeniny. Hlavním těkavou organickou sloučeninou byly chloroform, bromoform, trichloethylen, tetrachlorethylen, halogenované deriváty methanu a alifatické sloučeniny. Produkce těchto látek byla závislá na době enzymatické reakce.

Klíčová slova: halogen, hemové peroxidasy, těkavé halogenované uhlovodíky, GC-ECD, SPME

Obsah

Abstrakt.....	5
Obsah	6
Seznam použitých zkratk	7
Teoretický úvod	8
1. Obecné znaky chloru	8
1.1. Rezervoáry chloru	9
1.2. Koloběh chloru	9
1.3. Mýty o chloru	9
2. Organohalogeny.....	10
2.1. Biogenní organohalogeny.....	10
2.2. Zdroje biogenních organohalogenů	11
2.3. Abiogenní zdroje organohalogenů	14
3. Enzymy schopné produkce těkavých halogenovaných uhlovodíků	14
3.1. Hemové peroxidasy	14
3.1.1. Křenová peroxidasa (HRP)	16
3.1.2. Chloroperoxidasa	19
3.2. Nehemové peroxidasy	21
3.2.1. Vanad-dependentní haloperoxidasy	21
3.2.2. Perhydrolasy.....	22
3.2.3. FADH ₂ -dependentní halogenasy.....	22
Cíl práce.....	23
Materiál a metody	24
Výsledky	34
Diskuze	44
Souhrn.....	46
Seznam použité literatury	47
Seznam příloh	49

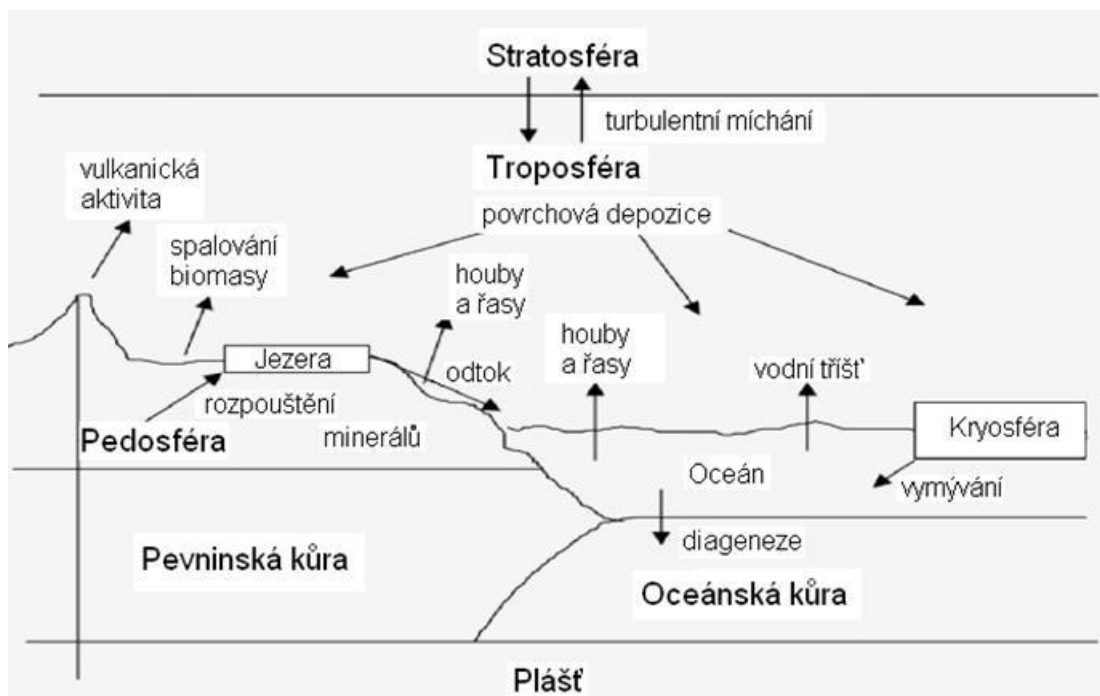
Seznam použitých zkratek

Cl _{org}	Organicky vázaný chlor
CPO	Chloroperoxidasa
DI – SPME	Přímá mikroextrakce tuhou fází
DMS	Dimethyldichlorsilan
DVB	Divinylbenzen
GC – ECD	Plynový chromatograf s detektorem elektronového záchytu
GC – MS	Plynový chromatograf s hmotnostním detektorem
HOX	Halogenoxokyseliny
HRP	Horseradish peroxidase – křenová peroxidasa
HRP C	Horseradish peroxidase isoenzyme C – křenový peroxidasový izoenzym C
HS – SPME	„Head-space“ mikroextrakce tuhou fází
n.d.	Nedetkováno
PDMS	Polydimethylsiloxan
PTFE	Polytetrafluorethylen
SPME	Mikroextrakce tuhou fází
V – BrPO	Vanad – dependentní bromoperoxidasa
V – ClPO	Vanad – dependentní chloroperoxidasa
V – HPO	Vanad – dependentní haloperoxidasa

Teoretický úvod

1. Obecné znaky chloru

Chlor patří do skupiny halogenů, kterou v roce 1811 pojmenoval Humphrey Davy podle toho, že chlor byl jedinečný ve schopnosti přímo reagovat s kovy za vzniku soli.¹ Jako všechny přírodní prvky i chlor pochází z vesmíru, kde se utváří a transformuje procesem nukleosyntézy ve hvězdách. Analýzou bylo zjištěno, že obsah chloru v zemském jádře je odhadem mezi 2 a 6×10^{18} t. Novějšími odhady byl chlor zařazen jako devatenáctým nejhojněji se vyskytujícím prvkem na zemi. Takže zatímco chlor je stopovým prvkem, kromě v hydrosféře a v solných ložiscích, celkové množství chloru přítomné v zemi je stále obrovské.¹



Obrázek 1. Hlavní zemské rezervoáry chloru a přírodní procesy, které zprostředkovávají přenos chloru mezi rezervoáry¹

Zemi můžeme rozdělit do několika geologických kompartmentů, které jsou tvořeny jádrem, pláštěm a kůrou. V průběhu geologického doby, všechny složky migrují uvnitř a mezi geologickými kompartmenty a zároveň jsou transportovány a transformovány, což vede ke vzniku globálních cyklů a s nimi spojených endogenních a exogenních sub-cyklů. Endogenní sub-cykly zahrnují transport netěkavých prvků prostřednictvím magmatu, sedimentárních a metamorfovaných hornin. Exogenní sub-cykly zahrnují těkavé a ve vodě rozpustné prvky v hydrosféře, atmosféře biosféře.

1.1. Rezervoáry chloru

Zemský chlor se vyskytuje v několika hlavních rezervoárech (Obrázek 1): horniny (plášť a kůra), půda (pedosféra), sladké vody (podzemní voda, jezera a řeky), slané vody (moře, oceány), ledovce (kryosféra), nižší vrstva atmosféry (troposféra) a střední vrstva atmosféry (stratosféra).²

1.2. Koloběh chloru

V tabulce 1 je uvedeno množství chloru, které je uloženo v osmi hlavních rezervoárech. Hodnoty toku chloru mezi jednotlivými rezervoáry jsou uvedeny v tabulce 2. Rozdílnost, v množství chloru v jednotlivých rezervoárech je značná. Plášť zadržuje zdaleka nejvíce chloru, avšak je téměř celkově nepřístupný, jediný přenos chloru je v podobě vulkanických erupcí. Také v kůře a pedosféře probíhá koloběh chloru jenom v relativně malém množství a to díky zvětrávání. Kdežto chlor přítomný v hydrosféře je naopak velmi přístupný, je to tedy rezervoár, ve kterém všechny významné přenosy chloru začínají.²

Tabulka 1. Množství chloru uloženého v jednotlivých rezervoárech³

Rezervoár	Množství chloru [g]	Výskyt
Plášť	22×10^{24}	Minerální
kůra	60×10^{21}	Minerální
Oceány	26×10^{21}	Iontový
Pedosféra	24×10^{15}	Minerální
Sladká voda	320×10^{15}	Iontový
Kryosféra	$0,5 \times 10^9$	Iontový
Troposféra	$4,3 \times 10^{12}$	Plynný
Troposféra	$1,0 \times 10^{12}$	Aerosol
Stratosféra	$0,4 \times 10^{12}$	Plynný

1.3. Mýty o chloru

Až donedávna se věřilo, že všechny chlorované látky jsou xenobiotika a že chlor se neúčastní biologických procesů. Ale důkazy získané několikaletým výzkumem odhalily, že

chlor hraje aktivní roli ve složitém biogeochemickém cyklu. Například široká řada organismů je schopna přeměňovat chlorid na „organický chlor“, tudíž existují tisíce chlorovaných sloučenin, které jsou produkovány přírodou.³ Vzhledem k jeho nezbytnosti k životu (např. chlor je nezbytný kofaktor při fotosyntéze), je překvapující, že distribuce a toky sloučenin chloru nejsou lépe prozkoumány. A také je zážející, že hojnost chloru, biologická a biochemická důležitost nevedla k širšímu poznání.

Tabulka 2. Tok chloru mezi jednotlivými rezervoáry³

Transport mezi rezervoáry	Tok Cl [10⁶ tun/rok]
Z pláště do troposféry	2
Z pedosféry do troposféry	
Minerální aerosoly	15
Hoření biomasy	3
Bioprodukce	0,5
<i>Ze zemské kůry do sladkých vod</i>	175
Z pedosféry do sladkých vod	
Srážky	34
Solné usazeniny	11
<i>Ze sladkých vod do oceánu</i>	220
Z oceánu do troposféry	
Z mořské soli	6000
HCl z mořské soli	25
Intruze magmatu	4
Bioprodukce	2
<i>Z troposféry na zemský povrch</i>	
Oceány	5990
Pedosféra	34
Kryosféra	6
<i>Z troposféry do stratosféry</i>	0,03
<i>Ze stratosféry do troposféry</i>	0,03
<i>Z oceánu do zemské kůry</i>	17

2. Organohalogeny

2.1. Biogenní organohalogeny

Před třiceti lety bylo teprve známo okolo 200 přírodních organohalogenů (150 chlorovaných a 50 bromovaných látek). Postupem času a usilovným výzkumem je jich dnes známo již přes 3800. K tak velkému nárůstu počtu těchto látek přispělo především prozkoumávání oceánů, které produkují veliký počet organohalogenů z mořských rostlin, živočichů a bakterií. Také k objevení nových organohalogenů přispěl rozvoj metod odběru vzorků a testů pro identifikace biologicky aktivních sloučenin. Ačkoliv nejvíce biogenních

organohalogenů jsou mořského původu, mnoho dalších bylo nalezeno v suchozemských rostlinách, houbách, lišejnících, bakteriích, hmyzu, u některých vyšších živočichů a lidí. ⁴ K roku 2004 je rozdělení organohalogenů dáno přibližně: 2300 chlorovaných, 2050 bromovaných, 110 jodovaných a 30 fluorovaných organohalogenů. ⁵

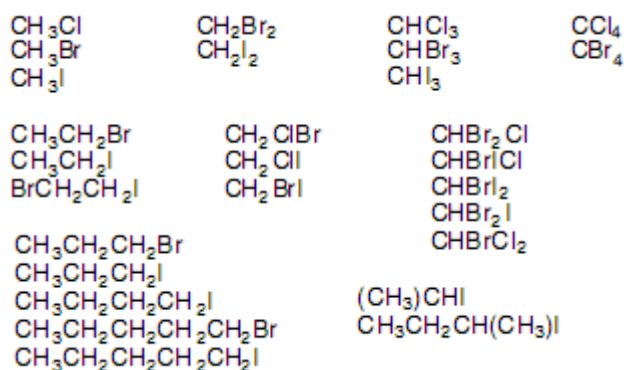
2.2. Zdroje biogenních organohalogenů

Mořské organismy

Vzhledem k hojnému zastoupení chloridů a bromidů v oceánech, není překvapením, že nejvíce přírodních organohalogenů jsou mořského původu. Ačkoliv je chlorid zastoupen více v oceánu než bromid, mořské organismy využívají spíše bromid než chlorid. Nicméně velké množství mořských organismů obsahuje jak brom, tak i chlor. ⁴

Mořské rostliny a řasy

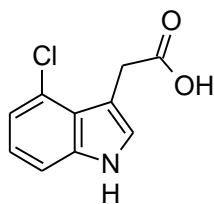
Rozsah a neuvěřitelná rozmanitost organohalogenů z mořských rostlin, jak mořských řas, tak i fytoplanktonu je ohromující. Celkově tvoří asi 20-25% všech známých přírodních organohalogenů. Mořské řasy produkují celou řadu jednoduchých i složitých organohalogenů, které pravděpodobně slouží jako chemická ochrana organismů proti patogenům. Některé jednoduché halogenalkany vyskytující se v mořských řasách jsou uvedeny na obrázku 2. Například velice oblíbená jedlá řasa *Asparagopsis taxiformis* obsahuje více než 100 organohalogenů, které donedávna byly neznámými sloučeninami. ^{6,7} Hlavním organohalogenem v této mořské řase je však bromoform.



Obrázek 2. Některé druhy halogenalkanů produkovaných mořskými řasami ⁵

Suchozemské rostliny

Ve srovnání s mořskými rostlinami, suchozemské prakticky nevyklučují žádné halogenované sloučeniny, ale i přesto existují výjimky. Růstový hormon 4-chloroindol-3-octová kyselina (obrázek 3) a její methylester jsou syntetizovány v rostlinách, jako je hrách, čočka, vikev nebo fazole. ⁸

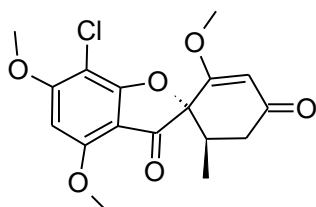


Obrázek 3. Růstový hormon 4-chloroindol-3-octová kyselina

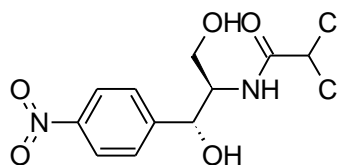
Organohalogeny jako methylbromid a methylchlorid jsou produkovány několika rostlinnými zdroji. Methylchlorid je produkován bramborovými hlízkami a methylbromid, používaný jako fumigant nebo nematicid, je též produkován přirozeně brokolící, zelím, ředkvičkami, tuřínem nebo semeny řepky olejky.⁸

Houby a lišejníky

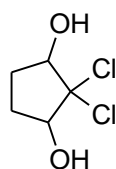
Houby a lišejníky produkují širokou škálu organohalogenů, od jednoduchého methylchloridu a chloroformu až po mimořádně složité sloučeniny. Dříve objevené organohalogeny griseofulvin, chloramfenikol, aureomycin, caldariomycin, sporidesmin nebo ochratoxin A jsou sloučeniny, které obsahují chlor a jsou to metabolity hub (obrázek 4). Studium tří druhů hub (*Caldariomyces fumago*, *Mycena metata* a *Peniophora pseudopini*) se ukázalo, že produkují *de novo* až 70 µg chloroformu/l kultury/den a celkově za 40 dní vyprodukují 5000-8000ng na kulturu.⁹



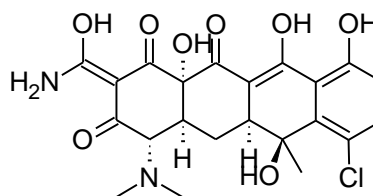
Griseofulvin



Chloramfenikol



Caldariomycin



Aureomycin

Obrázek 4. Příklady chlorovaných metabolitů hub

Vyšší živočichové a člověk

Výskyt organohalogenů u vyšších živočichů je vzácné, nicméně několik takových sloučenin bylo objeveno. Nedávno bylo objeveno několik halogenovaných sloučenin, které jsou produktem činnosti lidských bílých krvinek. Tyto krvinky obsahují myeloperoxidasu, která při napadení organismu patogenem nebo při různých onemocnění vyvolá halogenaci. Lidská myeloperoxidasa je schopná přeměnit chlorfenoly na chlorované dioxiny a dibenzofurany, tudíž biosyntéza dioxinů v lidském těle je možná.¹²

2.3. Abiogení zdroje organohalogenů

Přírodní zdroje spalování, jako je hoření biomasy, vulkány a další geotermální procesy produkují širokou škálu organohalogenů. Poslední studium vulkánů Kuju, Satsuma Iwojima, Mt. Etna a Vulcano odhalilo mimořádné množství organohalogenů, zahrnující 100 chlorovaných, 25 bromovaných, 5 flourovaných a 4 jodované organické sloučeniny.

3. Enzymy schopné produkce těkavých halogenovaných uhlovodíků

3.1. Hemové peroxidasy

Peroxidasy (EC 1.11.1.X) jsou enzymy, které redukují peroxid vodíku (nebo jiné peroxidy) za současné oxidace další sloučeniny. Funkcí společnou pro všechny peroxidasy je schopnost detoxikovat H_2O_2 ¹³

Klasifikace

Peroxidasy se na základě své podobnosti ve struktuře a podle společného evolučního původu rozdělují do dvou hlavních tříd: rostlinné peroxidasy a živočišné peroxidasy. Na základě sekvenční homologie Welinder navrhl tři třídy rostlinných peroxidas: Třída I - Peroxidasy prokaryotického původu, Třída II – Sekreční peroxidasy hub a Třída III – Klasické sekreční rostlinné peroxidasy.¹⁴

Peroxidasy Třídy I se vyskytují v organelách prokaryotického původu, jako jsou plastidy a mitochondrie. Společným znakem je absence disulfidického můstku, uhlovodíku, vápenatých iontů a sekrečních signálních peptidů. Do této třídy se řadí cytochrom *c* peroxidasa kvasinek, rostlinná askorbátperoxidasa a bakteriální katalasa-peroxidasa.

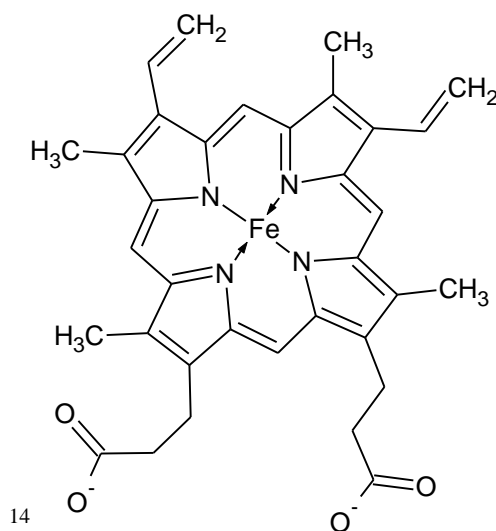
Peroxidasy Třídy II na rozdíl od první třídy peroxidas mají signální peptidovou sekvenci zodpovědnou za sekreci z endoplazmatického retikula. Obsahují asi 5% sacharidů, dva vápenaté ionty a čtyři zachované disulfidické můstky. Mezi zástupce této třídy patří lignin peroxidasa a manganová peroxidasa.

Peroxidasy Třidy III obsahují také peptidovou signální sekvenci na N-konci, dva vápenaté ionty a čtyři disulfidické můstky ve čtyřech různých místech lišících se od Třidy II. Obsah sacharidů se vyskytuje v rozmezí 0-25%. Nejvíce prozkoumaným příkladem této třídy je křenový peroxidase izoenzym C, dalším příkladem je peroxidasa ze sojových bobů nebo ječná peroxidasa z ječmene.

Chloroperoxidasa z *Caldariomyces fumago* a cytochrom *c* peroxidasa z *Pseudomonas aeruginosa* se liší od ostatních peroxidas a svými znaky se nehodí do žádné ze tří rostlinných peroxidas.¹⁴

Struktura

Běžným znakem všech hemových peroxidas jsou jejich aktivní místa obsahující velmi podobnou prostetickou skupinu hem. Pro téměř všechny známé rostlinné peroxidasy je prostetickou skupinou ferriprotoporfyrin IX zobrazený na obrázku 6, kdežto prostetická skupina u savčích peroxidas je odlišná. Ferriprotoporfyrin IX je složený ze čtyř pyrrolových kruhů spojených methanovými můstky a uprostřed s atomem železa v oxidačním stupni III. Dva vodíkové atomy spojené s dusíky pyrrolo jsou nahrazeny železem. Z tetrapyrrolového jádra vystupuje osm vedlejších řetězců: čtyři methylové skupiny, dvě vinylové skupiny a dvě propionátové skupiny.



Obrázek 6. Struktura ferriprotoporfyrinu IX.

V peroxidasach je hem připojený k apoproteinu vazbou, která je tvořena vedlejším řetězcem aminokyselinového zbytku a váže se na pátou koordinační pozici Fe^{3+} . Tato vazba je kovalentní a může být rozrušena v kyselém roztoku. Propionátový vedlejší řetězec tvoří vodíkové vazby s okolními zbytky. Vazby hemu na protein doplňují ještě slabé

hydrofobní síly, které spojují hydrofobní aminokyseliny. Hem, který není obvykle snadno oddělitelný od apoproteinu, je nazýván prostetickou skupinou. Při enzymatické reakci zůstává připojený k proteinu. ¹⁴

3.1.1. Křenová peroxidasa

Když v roce 1810 Louis Antoine Planché pozoroval, že kořeny křenu selského namočené v tinktuře guajakové pryskyřice měly tendenci vyvolat změnu barvy, nebyl si vědom, že látka zodpovědná za onu změnu barvy – křenová peroxidáza – se stane jednou z nejvíce studovaných peroxidas vůbec. ¹⁵

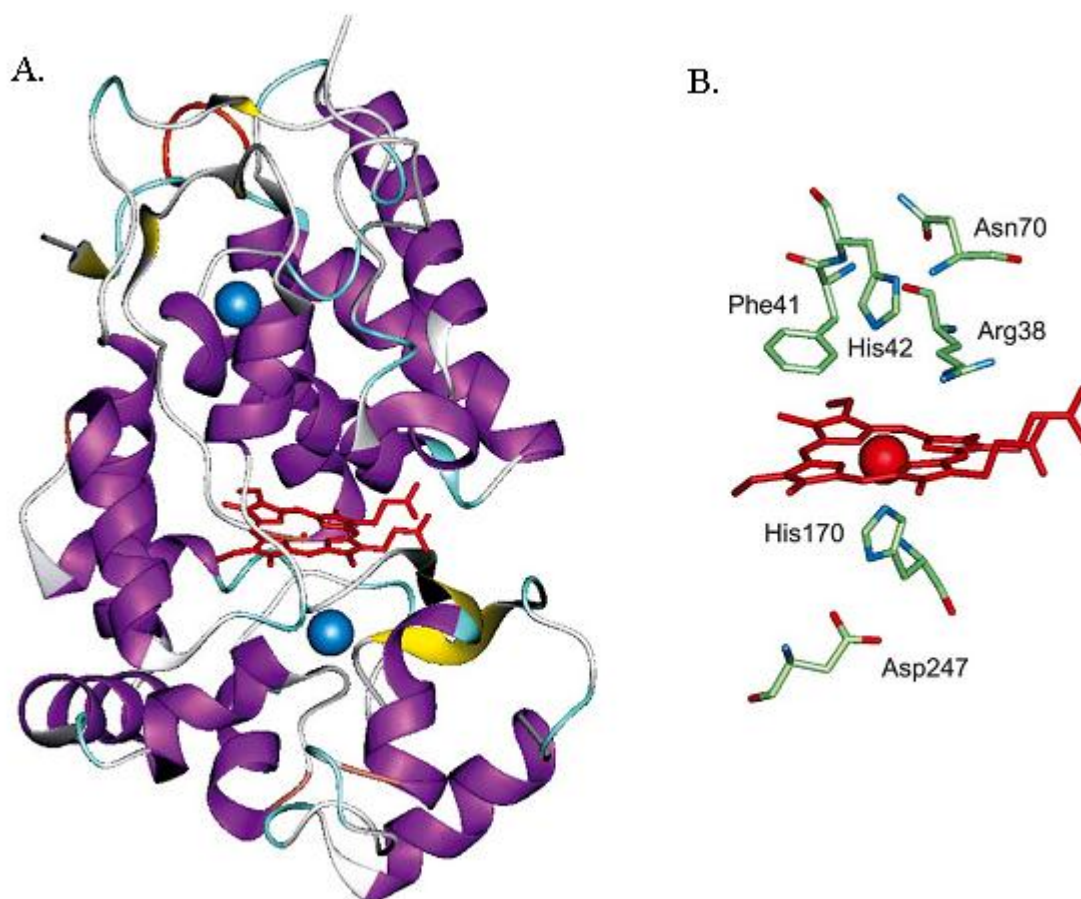
Křen selský, *Armoracia rusticana*, je totiž bohatým zdrojem peroxidasy, enzymu, který obsahuje ve své struktuře hem, a který využívá peroxid vodíku k oxidaci nejrůznějších organických i anorganických sloučenin. Kořeny křenu obsahují velký počet odlišných peroxidasových izoenzymů, z nichž izoenzym C (HRP C) je v křenu zastoupen nejvíce. ¹⁶

Struktura křenové peroxidasy

Křenový peroxidasový izoenzym C obsahuje jednoduchý polypeptid složený ze zbytků 308 aminokyselin. N-terminální zbytek je blokován pyroglutamátem a C-konec je heterogenní. Nacházejí se zde 4 disulfidické můstky mezi cysteinovými zbytky. HRP C obsahuje v aktivním centru dva odlišné typy kovů, trojmocný železný kation Fe^{3+} a dva vápníkové atomy (obrázek 6). Oba tyto kovy jsou nepostradatelné jak pro strukturu enzymu, tak i pro funkční integritu. ¹⁶

Hemová skupina je vázána k enzymu přes His170 (proximální histidylový zbytek) koordinační vazbou mezi atomem $N^{\epsilon 2}$ vedlejšího řetězce histidinu a atomem železa. Druhé koordinační místo (distální) je navázáno k atomu železa nad rovinou hemu a v klidovém stavu enzymu je neobsazeno, ale je dostupné pro peroxid vodíku během enzymové reakce. Vazná místa, která obsahují atom vápníku, se nachází v proximální a distální doméně enzymu, k němuž jsou vázány sítě vodíkových vazeb.

Struktura enzymu je převážně α -helikální, přesto se zde nachází malá oblast β -skládaných listů. Celý enzym tvoří dvě domény, proximální a distální, mezi nimiž je umístěna hemová skupina (obrázek 7A). ¹⁶



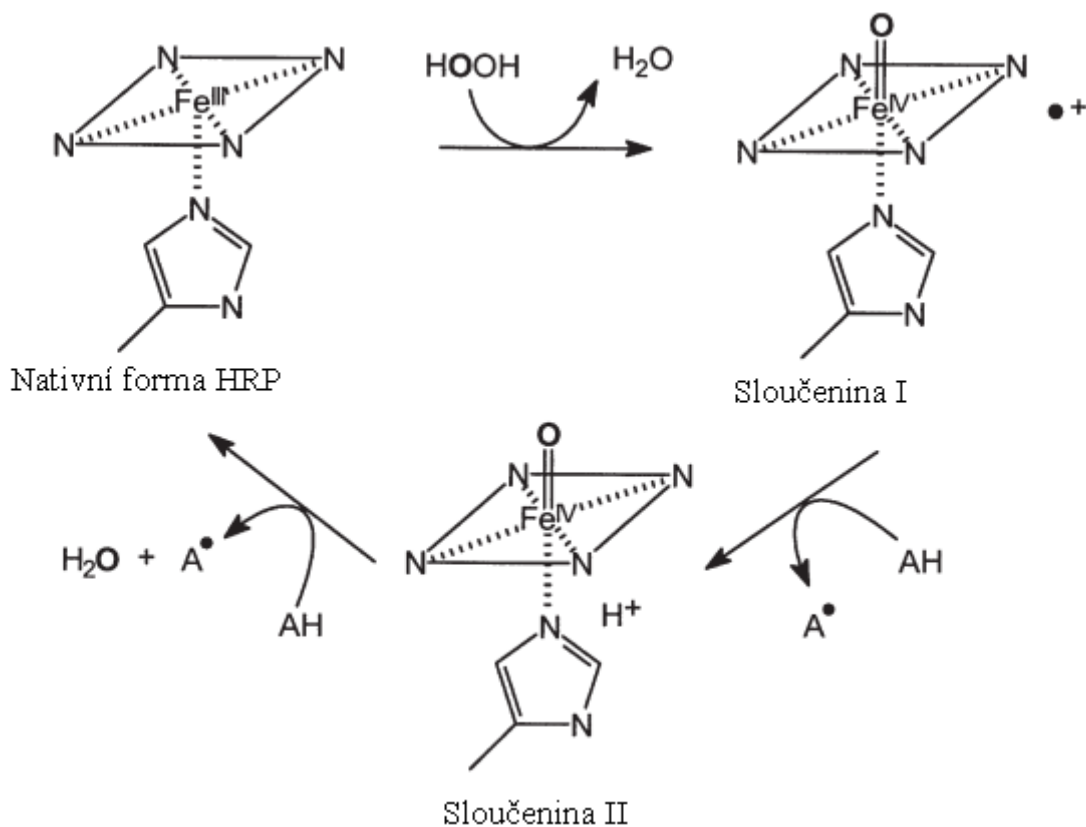
Obrázek 7. A. Trojrozměrný model krystalové struktury křenového peroxidásového izoenzymu C. Hemová skupina (červeně) je umístěna mezi distální a proximální doménou, z nichž každá obsahuje jeden atom vápníku (modře). B. Klíčové aminokyselinové zbytky v oblasti vazby hemu HRP C. Hemová skupina a hemové železo jsou znázorněny červeně ¹⁶

Reakční cyklus

Peroxidasy katalyzují oxidaci nejrůznějších elektron donorových substrátů, jako jsou fenoly, aromatické aminy, thioanisoly a jodidy za využití peroxidu vodíku. Většina reakcí katalyzovaných HRP C lze vyjádřit rovnicí (1), ve které AH_2 a AH představují redukující se substrát a jeho radikálový produkt.



Celá reakce zahrnuje trojkrokový cyklický proces, ve kterém je enzym nejprve oxidován peroxidem vodíku a potom redukován zpátky do nativní formy ve dvou po sobě následných krocích zahrnujících utváření dvou enzymových intermediátů – Sloučenina I a II (obrázek 8).



Obrázek 8. Reakční cyklus HRP zobrazující enzymové intermediáty, Sloučenina I a II. ¹⁵

Prvním krokem je rozštěpení molekuly H₂O₂ doprovázené produkcí ekvivalentního množství vody a zabudování jednoho z kyslíkových atomů H₂O₂, čímž vznikne Sloučenina I, kde železo je v oxidačním stupni IV. Nyní je Sloučenina I schopna oxidovat širokou škálu redukujících se substrátových molekul mechanismem zahrnující přenos jednoho elektronu. Tento proces vede ke vzniku druhého enzymového intermediátu Sloučenině II, která je poté redukována druhou molekulou substrátu zpět do nativní formy enzymu. ¹⁵

Fyziologická role peroxidas v rostlinách

Rostlinné peroxidasy jsou stavební enzymy, které se převážně vyskytují v buněčné stěně, vakuolách, v transportních organelách, ale také se vyskytují na povrchu drsného endoplazmatického retikula. Hrají důležitou roli v rostlinných fyziologických odpovědích jako např. katabolismus auxinů, modifikace buněčné stěny, lignifikace, obrana proti patogenům nebo při hojení ran. ¹⁵

Aplikace

Obecně rostlinné peroxidasy mají značný potenciál pro využití v mnoha oblastech. Používají se při organické syntéze a biotransformaci, protože jsou schopné katalyzovat

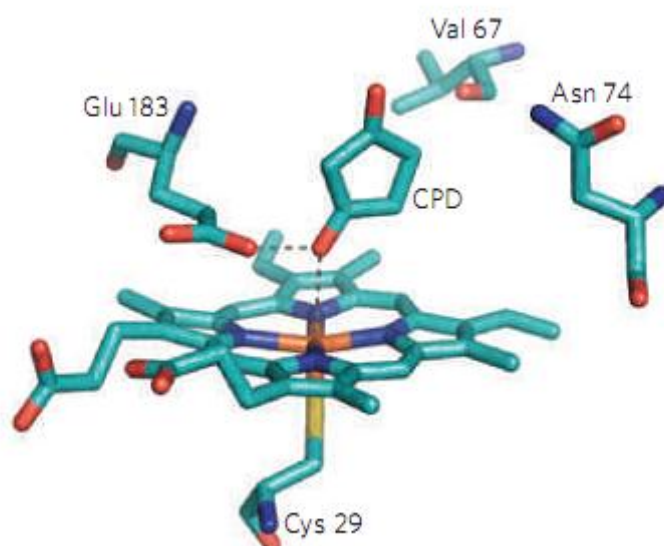
velký počet selektivních reakcí. Dále se využívají jako biosenzory, které lze definovat jako analytické nástroje, které kombinují biologickou část s vhodným přenašečem, který přeměňuje biologický signál na elektrický. Biologickou částí se rozumí např. tkáň, buňky, orgány nebo molekuly. V neposlední řadě se peroxidasy používají v různých imunitních testech, kterými se detekují a kvantifikují antigeny a protilátky. HRP je především používána v ELISE nebo Western-Blottingu.¹⁵

3.1.2. Chloroperoxidasa

Studium biosyntézy caldariomycinu, metabolitu, produkovaného plísní *Caldariomyces fumago* vedlo k objevu chloroperoxidasy v roce 1959, kdy začal intenzivní výzkum. Laboratorní testy ukázaly, že tento enzym je schopný přeměňovat β -ketoadipovou kyselinu na δ -chlorolevulinovou kyselinu, čímž byly prokázány halogenační vlastnosti chloroperoxidasy.¹⁷ Další výzkumy se zabývaly purifikací a charakterizováním tohoto enzymu.¹⁸

Struktura enzymu

Chloroperoxidasa (chlorid: peroxid vodíku oxidoreduktasa, EC 1.11.1.10) je monomerní hemový protein s molekulovou hmotností přibližně 42 000 kDa. CPO (obrázek 9) je glykoprotein produkovaný do růstového média plísní *Caldariomyces fumago* během konečné fáze jejího růstu. Koncentrace tohoto enzymu v médiu dosahuje až 100 mg/l kultury, tudíž je tento organismus jeho výborným zdrojem.¹⁹

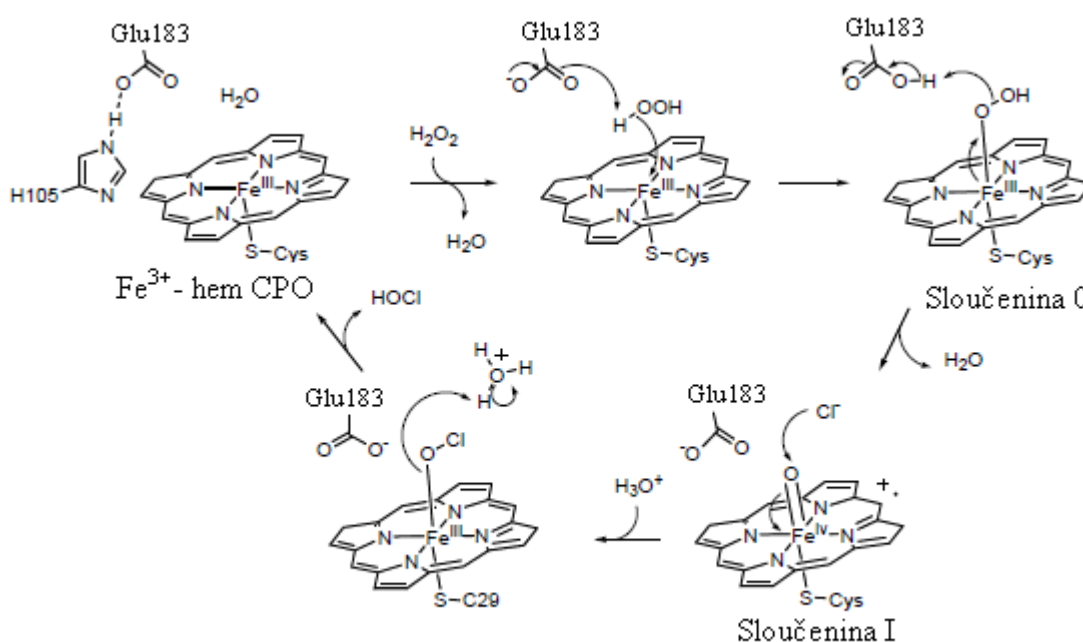


Obrázek 9. Struktura aktivního místa hemu chloroperoxidasy z *C. fumago* s navázaným substrátem 1,3-cyklopentadienonem

Celkový obsah sacharidových jednotek v chloroperoxidase je v rozmezí 25-30% celkové hmotnosti enzymu. Zarážející je aminokyselinové uspořádání, protože vykazuje převahu kyselých aminokyselin nad zásaditými, což vysvětluje relativně kyselý izoelektrický bod proteinu.²⁰

Katalytický cyklus

Na distální straně hemu je umístěna molekula vody vzdálená 3,4 Å od atomu železa. Tato voda je vytlačena přicházející molekulou peroxidu vodíku (obrázek 10). Glu183 na sebe naváže proton z peroxidu vodíku vázaného na hem a tím na krátko vznikne peroxyanion (Sloučenina 0). V dalším kroku Glu183 protonizuje terminální kyslík ve Sloučenině 0, čímž napomáhá heterolytickému štěpení O-O vazby. Následně je odštěpena molekula vody a utvoří se Sloučenina I s železem v oxidačním stupni IV. Sloučenina I pak oxiduje chloridový anion a hemové železo se redukuje zpět na Fe³⁺. Nyní oxidovaný chlorovaný intermediát (HOCl) může chlorovat organický substrát nebo reagovat s ekvivalentním množstvím peroxidu vodíku za vzniku kyslíku.^{20,21}



Obrázek 10. Mechanismus hem-dependentní halogenace²²

Biologická funkce

Primární biologickou funkcí CPO je chlorace, avšak CPO také katalyzuje další oxidační reakce charakteristické pro hemové peroxidasy, katalasy a cytochrom P450. Díky

její rozmanitosti je CPO nejrozmanitějším známým hemovým enzymem a je předmětem intenzivního výzkumu.²³

Chloroperoxidasa katalyzuje širokou škálu organických substrátů, od jednoduchých sloučenin²⁴, např. kyselina octová, kyselina propionová, aceton nebo D(+)-glukosa až po složité sloučeniny jako je kyselina fulvová.²⁵

3.2. Nehemové peroxidasy

3.2.1. Vanad-dependentní haloperoxidasy

Vanad patří mezi stopové prvky a je v přírodě široce rozšířen. Po molybdenu je vanad druhým nejhojnějším přechodným kovem v oceánu, koncentrace se pohybuje mezi 35-50 nM a v sedimentu mořského původu bylo stanoveno až 100 mg/kg. Koncentrace v čisté vodě se udává asi 1,3 µg/l (50 nM) a v zemské kůře je přítomnost vanadu odhadována na 100 mg/l.²⁶ Vanad existuje v několika oxidačních stupních, z nichž nejrozšířenější je V⁵⁺, který se vyskytuje v mořích a oceánech. Oxidační stupně V³⁺ a V⁴⁺, včetně V⁵⁺ jsou zahrnuty do biologických systémů.²⁷ Nejčastěji se vanad vykytuje při neutrální pH ve formě oxyaniontu vanadičnanu, který je oxidační činidlo a má strukturně a elektronově podobnou strukturu jako fosfát. Tudíž vanadičnan a deriváty vanadičnanu jsou zabudovány v celé řadě enzymů, které interagují s fosforylovanými substráty.²⁷

Klasifikace a struktura enzymů obsahující vanad

Dnes jsou popsány dvě třídy enzymů obsahující vanad: vanadnitrogenasy a vanad-dependentní haloperoxidasy (V-HPO).²⁸

Nitrogenasy jsou využívány bakteriemi, které váží dusík tím, že redukují molekulu dusíku na amoniak. Ačkoliv tento metaloenzymový systém běžně obsahuje Mo-Fe kofaktor, některé bakterie produkují navíc nitrogenasy, které jsou geneticky odlišné a místo Mo-Fe obsahují buď V-Fe, nebo Fe-Fe jako centrální kovy.²⁷ Vanadnitrogenasy byly identifikovány z rozmanité skupiny diazotrofních mikroorganismů.

Druhou skupinou enzymů, které obsahují vanad, jsou vanad-dependentní haloperoxidasy, které mají mnohem širší uplatnění v přírodě než vanad nitrogenasy. Tyto enzymy oxidují halogenidové ionty na jim odpovídající halogenoxokyseliny (HOX), na úkor peroxidu vodíku. Klasifikovány jsou podle toho, jak hodně elektronegativní halogenid oxidují. Tudíž vanad-dependentní chloroperoxidasy (V-ClPO) oxidují chlorid, bromid a jodid, kdežto vanad-dependentní bromoperoxidasy (V-BrPO) oxidují pouze bromid a jodid.

Izolace

První V-HPO byla izolována a charakterizována V-BrPO z hnědé řasy *Ascophyllum nodosum* v roce 1984.²⁹ Dnes je V-BrPO izolována a popsána z většiny mořských řas, tak i ze suchozemských lišejníků. V roce 1987 byla identifikována haloperoxidasa neobsahující hem z *Curvularia inaequalis*. Šest let poté byla charakterizována jako V-CIPO. Druhá V-CIPO byla izolována z houby *Embellisia didymospora*.

3.2.2. Perhydrolasy

Další typ halogenačních enzymů, který vyžaduje peroxid vodíku, byl izolován z kmenů *Pseudomonas* a *Streptomyces*.³⁰ Tyto halogenační enzymy ve své struktuře neobsahují hemovou skupinu, ani žádný kov. Ačkoliv vyžadují peroxid vodíku pro halogenační aktivitu, nepatří mezi peroxidasy. Prostorová struktura tohoto enzymu ukázala, že katalytické místo obsahuje zbytky aminokyselin serinu, aspartátu a histidinu, čímž se řadí mezi α / β hydrolasy.³¹

3.2.3. FADH₂-dependentní halogenasy

Halogenační enzym chloroperoxidasa byla již objevena v roce 1959. Ačkoliv tento enzym byl zkoumán při průběhu biosyntézy caldariomycinu, produkovaného *Caldariomyces fumago*, nikdy nebylo dokázáno, že tento enzym je skutečně zahrnut do jeho biosyntézy. Toto vše platí také pro velký počet ostatních haloperoxidas, které byly detekovány a izolovány později. Jak již bylo řečeno, během reakčního mechanismu enzymu, haloperoxidasa produkuje HOX jako halogenační činidlo a tudíž nevykazuje žádnou substrátovou specifitu nebo regiosektivitu. Jelikož tyto vlastnosti spolu s perhydrolasami postrádají, nejsou vhodné pro specifické halogenační reakce vyžadované při biosyntéze halometabolitů. Hlavní roli v biosyntéze musí hrát tedy jiné enzymy, které tyto vlastnosti mají. Nová třída halogenačních enzymů, FADH₂-dependentních halogenas, byla objevena 45 let poté, co byly identifikovány haloperoxidasy.³²

Cíl práce

1. Provést rešerši na téma výskytu a příčině vzniku halogenovaných sloučenin v přírodě
2. Seznámení s analytickými metodami GC-ECD, kryofokusace a SPME
3. Aplikace vhodného enzymu pro tvorbu halogenovaných sloučenin v laboratorních podmínkách
4. Zhodnocení výsledků práce

Materiál a metody

1. Použitý materiál

Standardy

- Plynný standard RESTEK P/N 34436-PI (65 komponentů, každý v 1PPM koncentraci)
- Kapalný standard KDWR VOC Mix B (10 µg/ml v metanolu), mix 10 těkavých organických uhlovodíků:
 1. Bromdichlormethan
 2. Bromoform
 3. Tetrachlormethan
 4. Chloroform
 5. Dibromchlormethan
 6. Dichlormethan
 7. Tetrachlorethylen
 8. Trichlorethylen
 9. 1,1-dichlorethylen
 10. 1,1,1-trichlorethan
- 1,1-dichlorethan, Sigma
- Chloroform, Sigma
- Bromoform, Sigma-Aldrich
- Trichlorethylen, Sigma-Aldrich
- Dibromchlormethan, Sigma-Aldrich
- Tetrachlorethylen, Sigma-Aldrich
- Dichlormethan
- Tetrachlormethan
- Trans 1,2-dichlorethylen

Rozpouštědla

- Methanol HPLC, LAB-SCAN

Enzymy

- Chloroperoxidasa z *Caldariomyces fumago* (EC 1.11.1.10)
Sigma-Aldrich, 10 000 U/ml
- Peroxidasa z *Amoracia rusticana* (EC 1.11.1.7), Typ XII, 330 U/mg , Sigma

Reagencie

- Kyselina octová, p.a., Lachema
- Aceton, p.a., Lachema
- bromid draselný, Penta
- chlorid sodný, Penta
- peroxid vodíku, p.a., Fluka
- Citrátový pufr, pH 3,56
- Citrátový pufr, pH 5,52

2. Metody

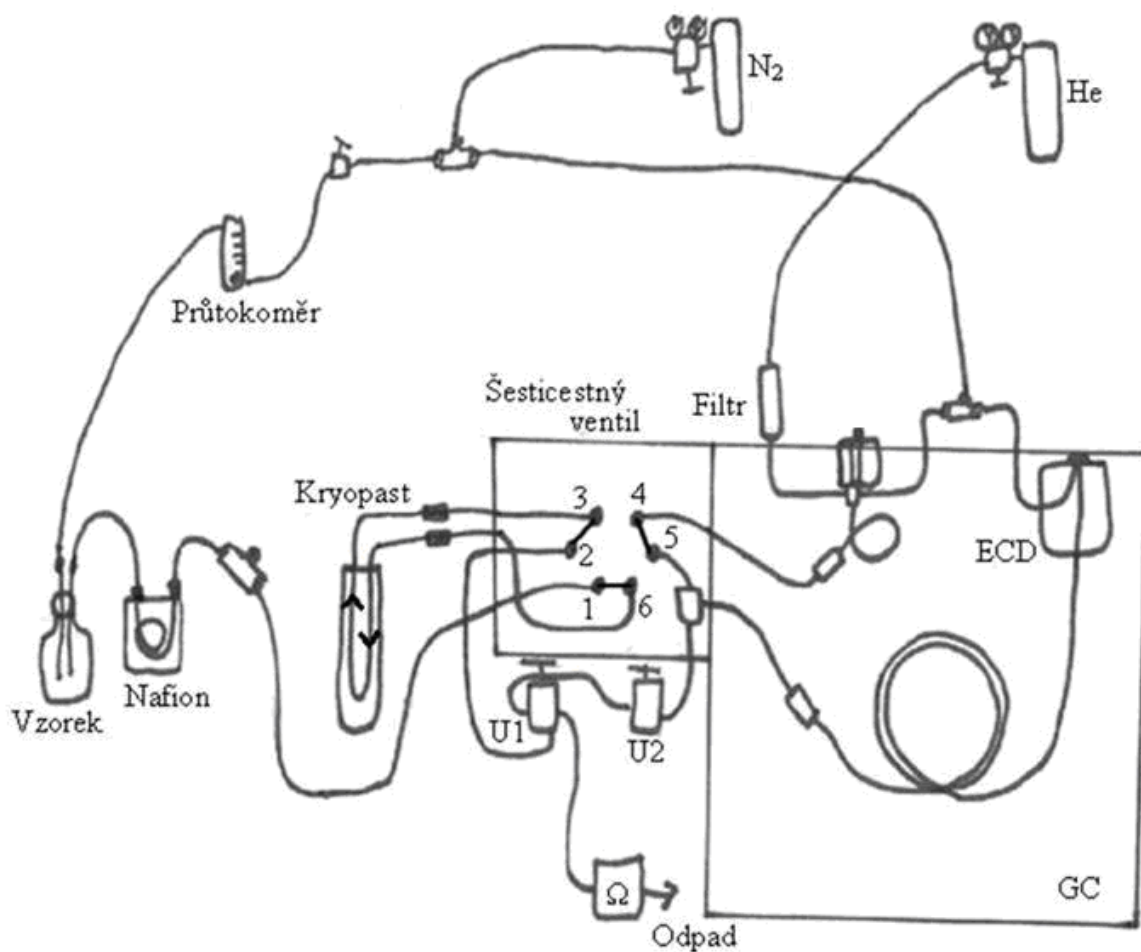
2.1. Plynová chromatografie spojená s kryofokusací

Kryofokusace

Kryofokusace je analytická metoda, která se používá pro prekoncentraci vzorků před měřeními na plynovém chromatografu (GC). Tato metoda je vhodná pro stanovení těkavých látek ze živého přírodního materiálu, např. z rostlin, mechů a lišejníků nebo z půdy (obrázek 11).

Nejprve se vloží rostlinný materiál do skleněné „vialky“ (např. 250 ml) a uzavře se plastovým šroubovacím víčkem obsahující silikonové „septum“ potažené polytetrafluorethylenem (PTFE), který „vialku“ utěsní a tím zabrání úniku vzorku do okolí. Do „vialky“ je přiváděn kapilárou velmi čistý dusík (čistota 4.0, Linde Gas, ČR). Pro odstranění vodní páry, prochází plyn Nafionovou[®] trubicí (sulfonovaný tetrafluoroethylen, model DM s molekulovým sítem o 4Å, Perma Pure, USA), která odstraní vlhkost ze vzorku. Nakonec proud vstupuje do kryopasti, která je vložena do kapalného dusíku, čímž se přítomné těkavé látky rychle a hluboce zmrazí před chromatografickou separací. Kryopast je vyrobena z 20 cm dlouhé ocelové kapiláry, stočené ve tvaru U a s vnitřním průměrem 1 mm. Dva centimetry trubice jsou vyplněny skleněnými kuličkami (Ø 25 µm) a uzavřeny malým kouskem skelné vaty pro zvětšení povrchu k zachycení látek během prekoncentrace. Skleněné kuličky a vata jsou ošetřeny dimethyldichlorsilanem pro deaktivaci povrchu skla.

Optimální průtoková rychlost pro mnou stanovované látky byla zjištěna na hodnotu 45 ml/min a objem plynu, který je potřebný pro dokonalé vymytí „vialky“, je závislý na jejím objemu. Optimálně bylo stanoveno promytí dusíkem objemem čtyřech „vialek“.



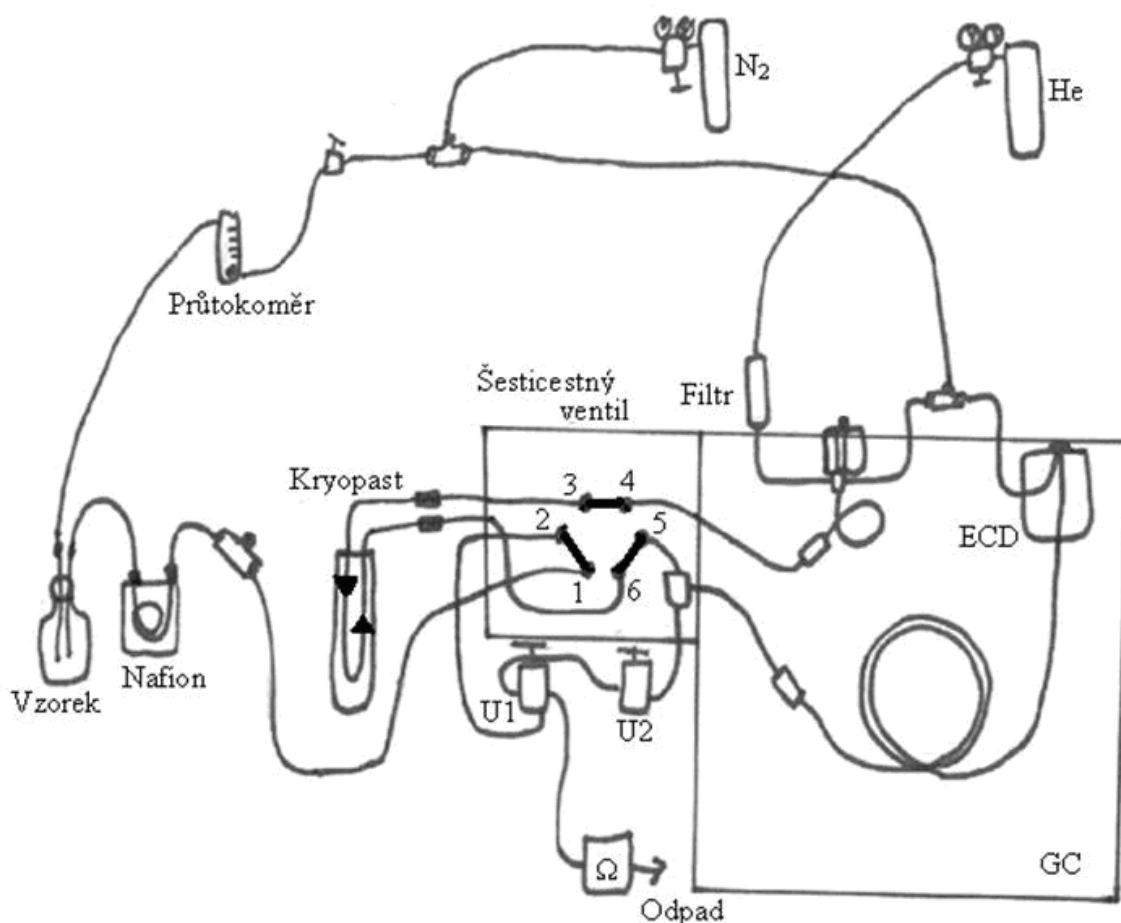
Obrázek 11. Schéma prekoncentrace vzorku pomocí kryofokusace. Kryopast ponořená do tekutého dusíku – zachycení a zmrazení vzorku. S ventily U1 a U2 je možné regulovat a s průtokoměrem (Ω) je možné měřit rozdělení vzorku na GC.

Po prekoncentraci (obrázek 12) jsou látky přemístěny na chromatografickou kolonu tím, že se vymění kapalný dusík za vroucí vodu, čímž dojde k jejich uvolnění z kryopasti. Látky putují přes šesticestný ventil (6C6WE, Valco, Houston, USA), který je uložen v termostatu vyhřívaném na 80 °C a dále na kolonu.

Plynový chromatograf s detektorem elektronového záchytu

Kryofokusační technika je propojena s GC Varian 3400 (Walnut Creek, USA). Separace látek probíhá na kapilární koloně Rxi-624Sil MS (Restek, USA, délka 30 m, vnitřní průměr 0,32 mm, tloušťka filmu 1,8 μm). Tato kolona obsahuje středně polární Crossbond® silarylenovou fázi, vykazuje nízký bleeding, vysokou teplotní stabilitu – teplotní maximum až 320°C a je inertní, čímž poskytuje kvalitní píky pro širokou škálu sloučenin. K detekci separovaných složek probíhá na detektoru elektronového záchytu

(ECD). Jeho podstatou je β -zářič (většinou izotop ^{63}Ni) emitující rychlé elektrony. Tyto elektrony interagují s částicemi mobilní fáze, čímž dochází k ionizaci molekul nosného plynu a emisi sekundárních termálních elektronů.



Obrázek 12. Schéma prekoncentrace vzorku pomocí kryofokusace. Kryopast ponořená do vroucí vody – uvolnění vzorku z kryopasti a následná separace na koloně. Vysvětlivky viz. Obrázek 11.

Díky přítomnosti těchto elektronů prochází mezi anodou, kterou je stěna detektoru a katodou elektrický proud. Když se do detekčního prostoru dostane z výstupu chromatografické kolony látkám, která pohlcuje termální elektrony, tak poklesne jejich počet a tím poklesne i hodnota procházejícího proudu. Pokles proudu závisí na druhu a koncentraci vystupující látky.³³ ECD detektor je specifický detektor pro halogeny. Pracovní podmínky pro GC-ECD jsou uvedeny v tabulce 3.

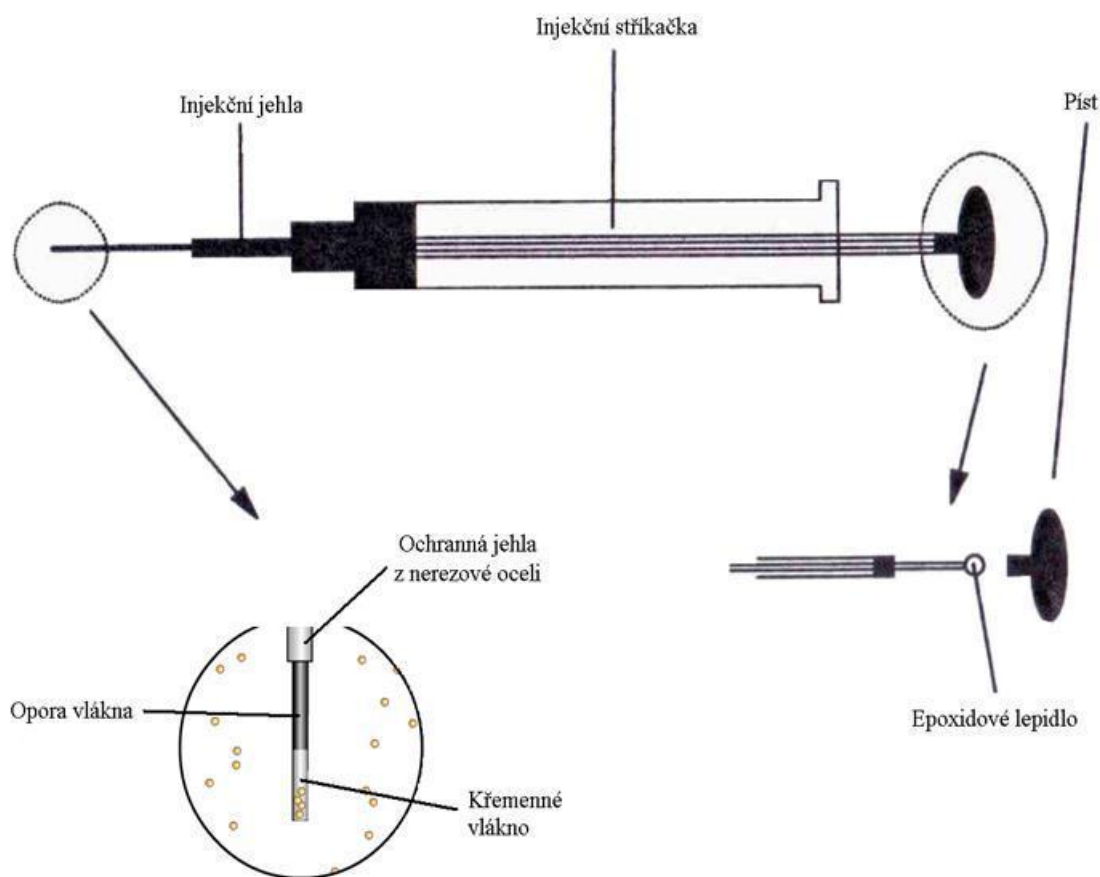
Tabulka 3. Pracovní podmínky pro GC-ECD

Teplota injektoru	250°C
Teplota detektoru	290°C
Nosný plyn	He
Průtok He	2 ml/min
Vstupní tlak	145 kPa
Detektorový plyn	N ₂
Průtok N₂	30 ml/min
Teplotní program	40°C (4 min) na 60°C, 11°C/min (0 min) na 220 °C, 20°C/min (2 min)

2.2. Plynová chromatografie spojená s mikroextrakcí tuhou fází

Mikroextrakce tuhou fází

Solid phase microextraction (SPME), mikroextrakce tuhou fází je izolační metoda, při níž dochází ke sjednocení procesu vzorkování a extrakce. Principem této metody je sorpce vzorku na stacionární fázi pokrývající křemenné vlákno, které se nachází uvnitř kovové jehly. Vlákno o délce 1 cm pokryté polymerem je nejdůležitější součástí zařízení. Jehla slouží k ochraně vlákna před mechanickým poškozením a k propíchnutí „septa“ v zátce „vialky“, ve které se nachází matrice. Jehla s vláknem se zasune do vzorku, vlákno se z jehly při procesu vzorkování vysune pomocí pístu a po dosažení sorpční rovnováhy se zase zasune zpět do jehly. Po dosažení rovnováhy (individuální; 2 – 90 min) se vlákno zatáhne a celá jehla se ze vzorkované matrice vytáhne a vloží se do nástřikového prostoru chromatografu a vlákno se opět vysune, kde dojde rychlé desorpci látek. K výhodám této metody patří rychlost stanovení, citlivost a také vysoká přesnost.



Obrázek 13. Schéma SPME zařízení ³⁴

Optimalizace SPME metody

K získání dobrých a spolehlivých výsledků při používání metody SPME je ovlivněno řadou faktorů, např. polaritou a tloušťkou stacionární fáze, způsobem vzorkování, pH, iontovou silou roztoku, teplotou vzorku, mícháním apod., a všechny faktory musí být v optimálním rozmezí. K získání reprodukovatelných vzorků je také vhodný použití automat provádějící vzorkování.

Tloušťka a materiál vlákna

Citlivost SPME metody ovlivňuje tloušťka stacionární fáze vlákna. Vhodnou volbou vlákna se dosáhne maximální efektivity. Existuje celá řada SPME vláken, nejpoužívanějším polymerem, kterým je vlákno obaleno, je polydimethylsiloxan (PDMS), často ve směsi s Carboxenem nebo divinylbenzenem (DVB). Pro analýzu nízkomolekulárních těkavých sloučenin je doporučeno používat silnější vlákno a polymer PDMS (SUPELCO 100 μm , PDMS, 57300-U). V tabulce č. 4 je uveden přehled SPME vláken pro prekoncentraci vzorků a jejich použití.

Tabulka 4. Přehled SPME vláken pro prekoncentraci vzorků a jejich použití

DRUH FÁZE	TLOUŠŤKA FÁZE (μm)	Analyty	URČENA PRO
Polydimethylsiloxane	100	těkavé	GC/HPLC
	30	středně	GC/HPLC
	7	těkavé středně těkavé	GC/HPLC
Polyakrylát	85	středně těkavé polární	GC/HPLC
Carbowax/divinylbenzen	65	polární	GC
Polydimethylsiloxane/ Carboxen	75	těkavé stopová množství	GC
Polydimethylsiloxane/ divinylbenzen	65	těkavé polární	GC
	60	obecné použití	HPLC
Polyvinylmethylsiloxan/Carboxen/ divinylbenzen	30/50	obecné použití	GC

Délka doby sorpce

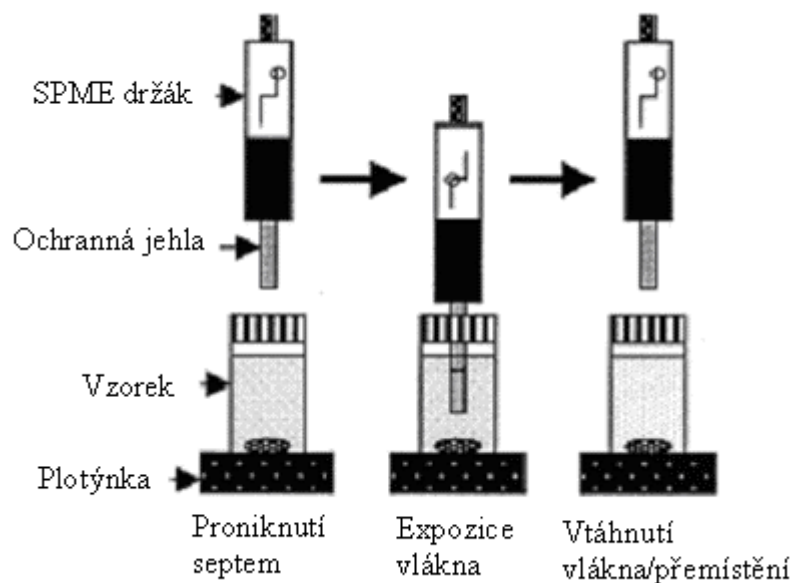
Délka sorpce se většinou volí tak, aby bylo dosaženo co možná největší extrakce analytu, tzn., aby došlo k rovnováze mezi vzorkem a vláknem. Pro různé látky se délka sorpce mění, proto je nutné opakovaným měřením stanovit optimální délku sorpce.

Zahřívání vzorku

Zahřívání vzorku napomáhá ke zkrácení doby, potřebné k ustanovení rovnováhy.

Způsob vzorkování

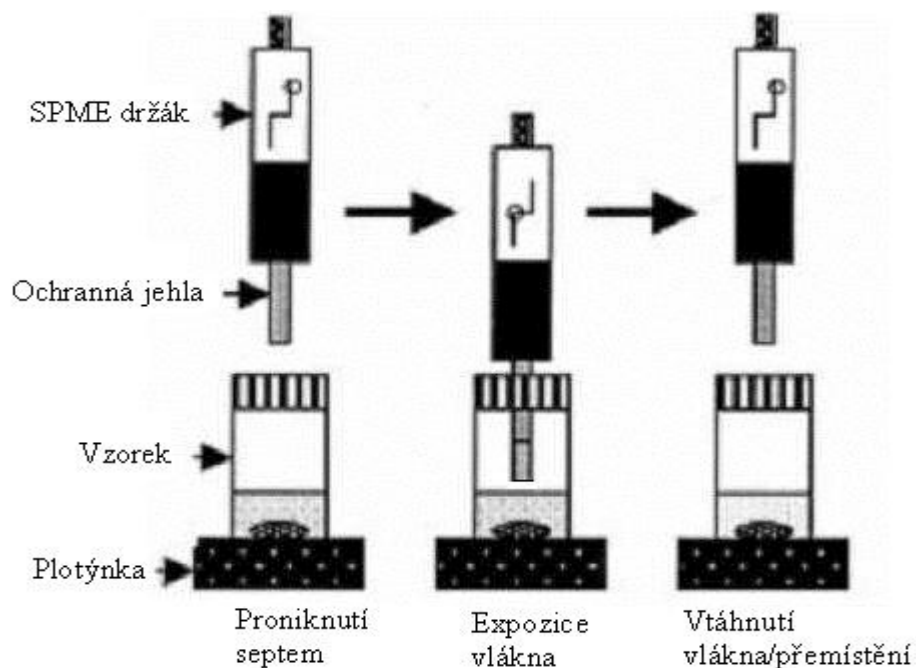
Metoda SPME nám nabízí dva způsoby extrakce. První způsob je přímá SPME, označovaná jako DI-SPME (Direct Immersing SPME), při které dochází k přímému kontaktu vlákna se vzorkem. Nejvíce se tento způsob používá pro látky v kapalném skupenství a některých tuhých látek. Druhý způsob vzorkování je HS-SPME (Headspace SPME), kdy je vlákno vsunuto pouze do prostoru nad vzorkem. Tímto způsobem se extrahují především těkavé látky. Na obrázcích 14 a 15 jsou znázorněny oba způsoby vzorkování.



Obrázek 14. Extrakční postup při DI-SPME. ³⁵

Automatické vzorkování

Plynový chromatograf Varian CP-3800 (Walnut Creek, USA) je spojený s automatickým robotem Combi PAL (CTC Analytics, Švýcarsko). Tento automatický robot umožňuje několik prvků, které usnadňují práci se vzorky: výběr z 2, 10 nebo 20 ml „vialek“, třepání a zahřívání vzorku v agitátoru během extrakčního procesu a hlavně přesné časové intervaly, čímž se snižuje chybovost a zvyšuje reprodukovatelnost měření. K detekci látek se používá ECD, jehož princip je popsán v kap. 2.1. Separace látek opět probíhá na kapilární koloně Rxi-624Sil MS (Restek, USA, délka 30 m, vnitřní průměr 0,32 mm, tloušťka 1,8 μm). Pracovní podmínky pro GC-ECD a SPME jsou uvedeny v tabulkách 5 a 6.



Obrázek 15. Extrakční postup při HS-SPME. ³⁵

K vyhodnocení chromatogramů z GC-ECD spojeného s kryofokusací i s SPME byl použit program Star Chromatography Workstation, verze 6.41.

Tabulka 5. Pracovní podmínky pro GC-ECD.

Teplota injektoru	250°C
Teplota detektoru	290°C
Nosný plyn	He
Průtok He	1 ml/min
Vstupní tlak	135 kPa
Detektorový plyn	N ₂
Průtok N₂	25 ml/min
Teplota pece	40°C 280°C, 20°C/min (3 min)

Tabulka 6. Pracovní podmínky pro CombiPAL AutoSampler.

Teplota agitátoru	40°C
Preinkubační doba	10 min
Počet otáček za min během preinkubace	500 rpm
Počet otáček za min během extrakce	250 rpm
Agitátor zapnutý	5 s
Agitátor vypnutý	5 s
Hloubka ponoření vlákna	20 mm
Doba extrakce	5 min
Doba desorpce	10 min

3. Příprava pokusů pro enzymové reakce

Pokusy jsem prováděla obdobně na dva enzymy, u každý jsem použila pufr při optimální pH, v následném objemu 7,15 ml. Inkubace směsí byla provedena v časových intervalech 3h, 6h, 24h a 48h.

3.1. Halogenid, H₂O₂, chloroperoxidasa a substrát

Inkubační směs obsahuje 7,15 ml citrátového pufru o pH 3,56, 500 µl 2M NaOH nebo 2M KBr, 100 µl kyseliny octové nebo acetonu, 50 µl 35% peroxidu vodíku a 10 µl CPO. Vzorky byly připravovány do 20 ml „vialek“. Inkubace byla zahájena přidavkem enzymu a přemístěním vzorků na „třepačku“ (Heidolph Promax 1020) při 100 rpm za laboratorní teploty. Byl také proveden „slepý“ pokus bez přidavku CPO (Tabulka 7).

Tabulka 7. Přehled připravených vzorků pro enzymové reakce s CPO.

	citrátový pufr pH 3,56	KBr/NaCl	kyselina octová/ aceton	H ₂ O ₂	CPO
Blank bez enzymu	+	+	+	+	-
Blank bez peroxidu	+	+	+	-	+
Blank bez substrátu	+	+	-	+	+
Vzorky	+	+	+	+	+

3.2. Halogenid, H₂O₂, křenová peroxidasa a substrát

Inkubační směs obsahuje 7,15 ml citrátového pufru o pH 5,52, 500 µl 2M NaOH nebo 2M KBr, 100 µl kyseliny octové nebo acetonu, 50 µl 35% peroxidu vodíku a 50 µl HRP. Roztok HRP byl připraven „navážením“ 1 mg HRP a rozpuštěním v 3300 µl citrátového pufru o pH 5,52. Vzorky byly připravovány do 20 ml „vialek“. Inkubace byla zahájena přidavkem enzymu a přemístěním vzorků na „třepačku“ (Heidolph Promax 1020) při 100 rpm za laboratorní teploty. Byl také proveden „slepý“ pokus bez přidavku HRP (Tabulka 8).

Tabulka č. 8. Přehled připravených vzorků pro enzymové reakce s HRP.

	citrátový pufr pH 5,52	KBr/NaCl	kyselina octová/ aceton	H ₂ O ₂	HRP
Blank bez enzymu	+	+	+	+	-
Blank bez peroxidu	+	+	+	-	+
Blank bez substrátu	+	+	-	+	+
Vzorky	+	+	+	+	+

Výsledky

1. Analýza halogenovaných standardů metodou GC-ECD a kryofokusace

1.1. Určení retenčních časů jednotlivých halogenovaných sloučenin metodou GC-ECD a kryofokusace

Jelikož detektor je velmi citlivý již při přítomnosti stopového množství halogenovaných sloučenin, pro kvalitativní analýzu byly použity 2 µl nasycených par nad roztokem jednotlivých standardů. Při analýze, za podmínek uvedených v tabulce 3, byly zjištěny retenční časy halogenovaných látek, které byly použity pro identifikaci píků při analýze kapalného standardu VOC Mix B a plynného standardu RESTEK.

1.2. Analýza kapalného standardu VOC Mix B

Prekoncentrační metodou kryofokusace bylo analyzováno 20 µl nasycených par standardu VOC Mix B, na základě jejich retenčních časů byly identifikovány píky pro jednotlivé halogenované látky přítomné ve standardu. V tabulce 9 jsou uvedeny přítomné halogenované sloučeniny a jejich retenční časy. V příloze 1 je znázorněn chromatogram VOC Mix B.

Tabulka 9. Retenční časy halogenovaných látek ve VOC Mix B, z důvodu nízkého bodu varu dichlormethanu (39°C) a 1,1-dichlorethylenu (32°C), nebyly tyto látky detekovány.

Látka	Retenční čas /min
1,1-dichlorethylen	n.d.
Dichlormethan	n.d.
Chloroform	5,20
1,1,1-trichlorethan	5,49
Tetrachlormethan	5,87
Trichlorethylen	8,37
Bromdichlormethan	9,58
Tetrachlorethylen	11,46
Dibromchlormethan	11,86
Bromoform	13,42

1.3. Analýza plynného standardu firmy RESTEK

K vlastní analýze na GC-ECD bylo použito 60, 40, 20 a 10 µl tohoto standardu. Porovnáním chromatogramů odpovídajících jednotlivým objemům vyplývá, že v případě analýzy 10 µl byly píky nejostřejší a tudíž nejlépe vyhodnotitelné. V tabulce 10 jsou retenční časy získané analýzou a v příloze 2 je chromatogram analýzy standardu o objemu

10 µl. Jelikož tento standard obsahuje i nehalogenované sloučeniny, které GC-ECD nedetekuje, na chromatogramu jsou přítomny pouze halogenované sloučeniny.

Tabulka 10. Retenční časy detekovaných halogenovaných sloučenin obsažených ve standardu RESTEK

Látka	Retenční čas/min
Dichlormethan	2,64
Trans-1,2-dichlorethylen	2,87
Cis-1,2-dichlorethylen	4,33
Chloroform	4,89
1,1,1-trichlorethan	5,14
Tetrachlormethan	5,44
Trichlorethylen	7,68
Tetrachlorethylen	10,94
Dibromchlormethan	11,35
Bromoform	12,91

2. Analýza halogenovaných standardů pomocí GC-ECD a SPME

2.1. Určení retenčních časů jednotlivých halogenovaných sloučenin metodou GC-ECD a SPME

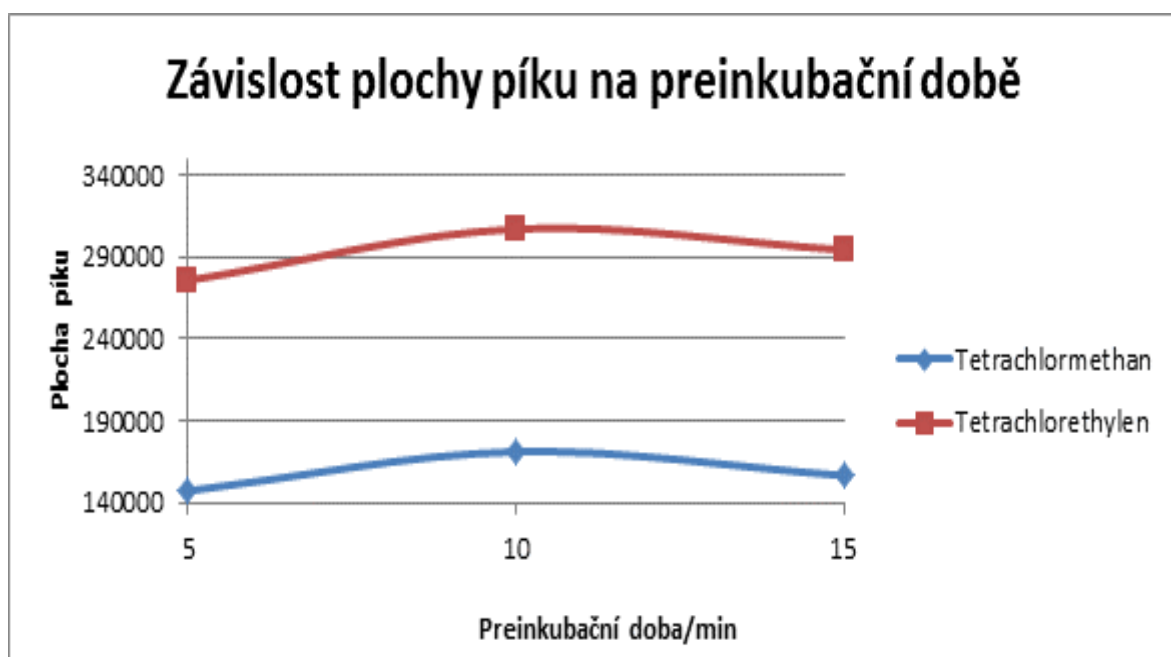
Pro analýzu bylo přidáno 10 µl nasycených par nad roztokem standardů jako standardu do 10 ml „vialky“. Proměřením jednotlivých vzorků za podmínek uvedených v tabulce 5 a 6 byly zjištěny jejich retenční časy, které jsou uvedeny v tabulce 11. Na základě retenčních časů těchto standardů byla sestavena metoda pro vyhodnocování vzorků enzymových reakcí.

Tabulka 11. Retenční časy analyzovaných halogenovaných standardů

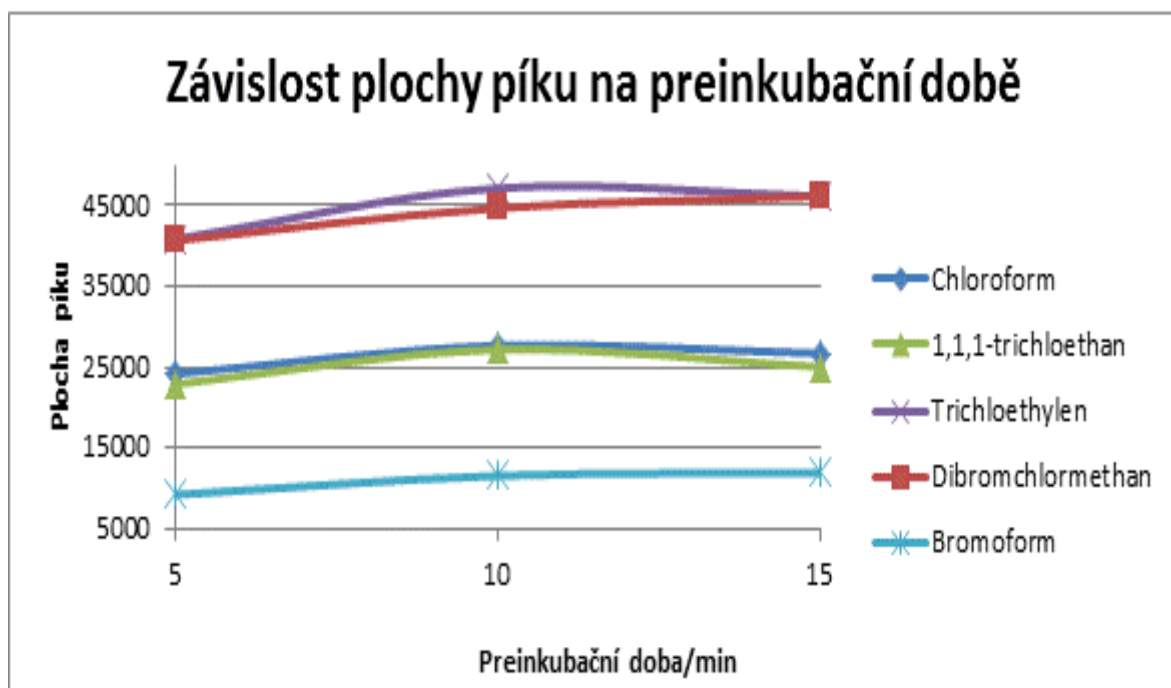
Látka	Retenční čas /min
1,1-dichlorethylen	4,17
Dichlormethan	4,40
Chloroform	5,18
Tetrachlormethan	5,43
Trichlorethylen	5,85
Tetrachlorethylen	6,89
Dibromchlormethan	7,03
Bromoform	8,00

2.2. Analýza kapalného standardu VOC Mix B – optimalizace preinkubační doby

Závislost preinkubační doby byla optimalizována pomocí 100x ředěného standardu VOC Mix B, analýzou 1, 5 a 20 μl roztoku v 8 ml destilované vody. Následná koncentrace látek byla v rozmezí 12,5-250 ng/l. Na obrázcích 17 a 18 můžeme sledovat závislosti plochy píku na preinkubační době. Z uvedených závislostí lze říci, že optimální doba preinkubace je závislá na druhu analytu a také na množství analytu přítomného ve vzorku, viz. tabulka 12. Pro většinu analytů je plocha píku maximální při 10 minutách, proto doba preinkubace byla optimalizována na 10 minut. Všechny další analýzy byly provedeny metodou s preinkubační dobou 10 minut.



Obrázek 17. Graf závislosti odezvy na preinkubační době pro látky tetrachlormethan a tetrachlorethylen. Optimální doba preinkubace pro obě látky je 10 minut. Vzorky obsahovaly 20 μl 100x ředěného roztoku VOC Mix B.



Obrázek 18. Graf závislosti odezvy na preinkubační době pro látky chloroform, 1,1,1-trichloethan, trichlorethylen, dibromchlormethan a bromoform. Optimální doba preinkubace pro tyto látky je 10 minut, kromě dibromchlormethanu, který by vyžadoval delší dobu preinkubace. Vzorky obsahovaly 20 μl 100x ředěného roztoku VOC Mix B.

Tabulka12. Závislost ECD odezvy na množství analyzované látky a preinkubační době

Látka	doba preinkubace 5 minut			doba preinkubace 10 minut			doba preinkubace 15 minut		
	1 μl	5 μl	20 μl	1 μl	5 μl	20 μl	1 μl	5 μl	20 μl
Chloroform	25494	24840	24144	28593	30112	27638	32138	27818	26667
1,1,1-trichlorethan	2088	6420	22859	n.d.	7055	27130	n.d.	7444	24994
Tetrachlormethan	11418	38197	147143	12138	40934	171049	12665	44029	156480
Trichlorethylen	16470	20250	40831	17652	24691	47138	18908	22566	46127
Bromdichlormethan	7364	6014	4757	8516	5223	4780	7568	5773	5272
Tetrachlorethylen	52262	75148	275617	75107	78153	306957	87981	85293	294184
Dibromchlormethan	32438	15301	40666	50605	18311	44684	57689	17325	46134
Bromoform	2972	2348	9148	3083	2806	11511	2428	2826	11867

3. Enzymové reakce s chloroperoxidasou

3.1. Reakce „blanků“

Reakce „blanku“ bez chloroperoxidasy byla provedena za stejných podmínek jako enzymové inkubace.

3.1.1. Reakce „blanku“ bez enzymu

Kyseliny octová jako substrát

Pro jednotlivé časové intervaly inkubací se v malém množství tvořil chloroform, jehož přítomnost může být důsledkem kontaminace. Další přítomnou sloučeninou byla neznámá látka „unknown I“ s retenčním časem 5,23 min, která se tvoří vždy v přítomnosti kyseliny octové jako substrátu.

Aceton jako substrát

Při reakci blanku bez enzymu, ale za přítomnosti acetonu jako substrátu nedocházelo k formování žádných halogenovaných uhlovodíků.

3.1.2. Reakce „blanku“ bez H₂O₂

Chromatogram inkubace bez peroxidu vodíku, za stejných podmínek jako s peroxidem vodíku (substrát kyselina octová/aceton, KBr/NaCl a CPO v citrátovém pufru), nevykazuje žádné píky, které by potvrzovaly tvorbu těkavých halogenovaných látek.

3.1.3. Reakce „blanku“ bez substrátu

Při enzymové reakci bez kyseliny octové jako substrátu a za přítomnosti KBr byly detekovány tyto látky: dichlormethan, tetrachlorethylen, dibromchlormethan, bromoform a neznámé sloučeniny „unknown II“ ($r_t = 8,27$ min), „unknown III“ ($r_t = 9,45$ min), „unknown IV“ ($r_t = 11,16$ min) v různém množství. V největším množství se podle očekávání tvořil bromoform. V tabulce 13 je uvedeno porovnání množství tvořených látek v 3, 6, 24 a 48 hodinové inkubaci.

Tabulka 13. Odezvy detekovaných sloučenin při reakci „blanku“ bez substrátu kyseliny octové a za přítomnosti KBr.

Látka	Inkubační doba			
	3 hod	6 hod	24 hod	48 hod
Dichlormethan	2449	7662	14520	29503
Tetrachlorethylen	2505	2481	2961	3021
Dibromchlormethan	1206	5589	9576	41172
Bromoform	245581	215253	422032	931961
„unknown II“	52005	41567	50323	257944
„unknown III“	6266	5428	7055	20150
„unknown IV“	8426	6903	10399	148969

Při enzymové reakci bez kyseliny octové jako substrátu a za přítomnosti NaCl byly detekovány tyto látky: chloroform, trichlorethylen, tetrachlorethylen, dibromchlormethan a neznámé látky „unknown II“ ($r_t = 8,27$ min) a „unknown III“ ($r_t = 9,52$ min) v různém množství. V tabulce 14 je porovnání množství tvořených látek v 3, 6, 24 a 48 hodinové inkubaci.

Tabulka 14. Odezvy detekovaných sloučenin při reakci „blanku“ bez substrátu kyseliny octové a za přítomnosti NaCl.

Látka	Inkubační doba			
	3 hod	6 hod	24 hod	48 hod
Chloroform	21113	21267	23058	25486
Tetrachlormethan	n.d.	n.d.	n.d.	4524
Trichlorethylen	7556	13476	15373	14055
Tetrachlorethylen	1044	1262	2592	14828
Dibromchlormethan	9778	7984	8681	1204
„unknown II“	1564	2156	n.d.	2807
„unknown III“	2881	1527	n.d.	14384
„unknown IV“	n.d.	934	n.d.	1842

Při enzymové reakci bez acetonu jako substrátu a za přítomnosti KBr se tvořily tyto látky: dichlormethan, tetrachlorethylen, dibromchlormethan, bromoform a neznámé látky „unknown II-IV“ v různém množství. V největším množství se tvořil opět bromoform.

Za přítomnosti NaCl se tvořil chloroform, tetrachlorethylen, dibromchlormethan a neznámá látka „unknown II“. V tabulce 15 je uvedeno množství tvořících se látek po 3 a 6 hodinové inkubaci.

Tabulka 15. Odezvy detekovaných sloučenin při reakci „blanku“ bez substrátu kyseliny octové a za přítomnosti KBr/NaCl.

KBr	Inkubační doba		NaCl	Inkubační doba	
	3 hod	6 hod		3 hod	6 hod
Dichlormethan	2491	4213	Chloroform	17013	20955
Tetrachlorethylen	7106	2262	Tetrachlorethylen	1478	1245
Dibromchlormethan	1353	4426	Dibromchlormethan	4266	7020
Bromoform	377849	161641	„unknown II“	4521	3457
„unknown II“	57771	38637	„unknown III“	n.d.	1206
„unknown III“	7045	4426			
„unknown IV“	11615	7384			

3.2. Reakce chlorperoxidasy, kyseliny octové, H₂O₂ a KBr/NaCl

Hlavními produkty této reakce s KBr byly dichlormethan, tetrachlorethylen, dibromchlormethan, bromoform a neznámé látky „unknown II-IV“. Podle očekávání se opět nejvíce tvořil bromoform. V tabulce 17 je přehled 3, 6, 24 a 48 hodinových inkubací a v příloze 3 je jeden chromatogram této analýzy jako příklad. Při reakci s NaCl vznikl jako hlavní produkt chloroform, poté v menším množství trichlorethylen, bromdichlormethan, tetrachlorethylen a dibromchlormethan. Také zde byly přítomny neznámé látky „unknown II“ ($r_t = 8,26$ min) a III ($r_t = 11,05$ min).

Tabulka 17. Odezvy detekovaných sloučenin při enzymové reakci za přítomnosti kyseliny octové a KBr.

Látky	Inkubační doba			
	3 hod	6 hod	24 hod	48 hod
Dichlormethan	1207	n.d.	n.d.	42709
„unknown I“	97151	103920	110892	92164
Tetrachlorethylen	3883	1791	1762	1019
Dibromchlormethan	2341	5093	11110	45575
Bromoform	286286	213798	242842	899748
„unknown II“	57958	75715	61259	260507
„unknown III“	6052	11360	6182	21718
„unknown IV“	24232	50312	19195	219375

Jelikož v této reakci byla přítomna kyselina octová, na chromatogramu se opět objevil pík pro neznámou látku „unknown I“ ($r_t = 5,12$ min).

3.3. Reakce chloroperoxidasy, acetonu, H₂O₂ a KBr/NaCl

V přítomnosti acetonu jako substrátu a KBr se nejvíce tvořil tetrachlorethylen (příloha 4). Dalšími produkty této reakce jsou dichlormethan, trichlorethylen, bromdichlormethan, dibromchlormethan, bromoform a neznámé látky II-IV. Mezi hlavní produkty reakce s NaCl patří dichlormethan, chloroform, trichlorethylen, tetrachlorethylen a opět neznámé látky II-IV. V tabulce 18 je uvedeno množství produktů reakce s NaCl a KBr po 3 a 6 hodinové inkubaci.

Tabulka 18. Odezvy detekovaných sloučenin při enzymové reakci za přítomnosti acetonu a KBr/NaCl.

KBr	Inkubační doba		NaCl	Inkubační doba	
	3 hod	6 hod		3 hod	6 hod
Dichlormethan	1326	4213	Dichlormethan	2476	2742
Tetrachlorethylen	1442246	2416108	Chloroform	20391	19769
Dibromchlormethan	1454	4079	Trichlorethylen	12475	24702
Bromoform	393458	239465	Tetrachlorethylen	10854	13595
„unknown II“	692298	2209330	„unknown II“	3273	3245
„unknown III“	16760	209949	„unknown III“	3201	1400
„unknown IV“	10503	217870	„unknown IV“	1370	1864

4. Enzymové reakce s křenovou peroxidasou

4.1. Reakce „blanků“

Reakce „blanků“ bez křenové peroxidasy byla provedena za stejných podmínek jako enzymové inkubace.

4.1.1. Reakce „blanků“ bez enzymu

Kyselina octová jako substrát

Při reakci bez enzymu, kyselinou octovou jako substrátem a KBr/NaCl se netvořily žádné halogenované sloučeniny.

Aceton jako substrát

Produktem této reakce v přítomnosti KBr byl v malém množství tetrachlorethylen a neznámé látky II-IV. V přítomnosti NaCl se netvořily žádné halogenované sloučeniny.

4.1.2. Reakce „blanků“ bez H₂O₂

Za nepřítomnosti peroxidu vodíku v reakci se netvořily žádné halogenované sloučeniny, kromě tetrachlorethylenu a neznámé látky III, které vznikaly v přítomnosti KBr.

4.1.3. Reakce „blanku“ bez substrátu

Při enzymové reakci bez kyseliny octové jako substrátu a s KBr vznikaly tyto látky: tetrachlorethylen, dibromchlormethan, bromoform a neznámé sloučeniny „unknown I a III“ v různém množství. Hlavním produktem reakce s NaCl vznikal v malém množství chloroform, trichlorethylen a dibromchlormethan. V tabulce 19 jsou uvedeny výsledky této reakce po 3 a 6 hodinové inkubaci.

Tabulka 19. Odezvy detekovaných sloučenin při enzymové reakci bez substrátu, za přítomnosti KBr/NaCl.

KBr	Inkubační doba		NaCl	Inkubační doba	
	3h	6h		3h	6h
Tetrachlorethylen	2234	4459	Chloroform	3205	2894
Dibromchlormethan	1860	3940	Trichlorethylen	1610	3458
Bromoform	2211	3067	Bromdichlormethan	238	n.d.
„unknown II“	8635	20401	Dibromchlormethan	1245	4179
„unknown III“	26476	59742			

Při enzymové reakci bez acetonu jako substrátu a KBr/NaCl vznikalo pouze malé množství halogenovaných sloučenin. Přehled produktů a jejich množství po 3 a 6 hodinové inkubaci je uvedeno v tabulce 20.

Tabulka 20. Odezvy detekovaných sloučenin při enzymové reakci bez substrátu, za přítomnosti KBr/NaCl.

KBr	Inkubační doba		NaCl	Inkubační doba	
	3h	6h		3h	6h
Tetrachlorethylen	1667	28402	Chloroform	3205	2894
Dibromchlormethan	279	396	Trichlorethylen	1610	1390
„unknown II“	6915	20870	Bromdichlormethan	238	694
„unknown III“	19625	28402	Dibromchlormethan	1245	672

4.2. Reakce křenové peroxidasy, kyseliny octové, H₂O₂ a KBr/NaCl

Hlavním produktem této reakce s KBr byl bromdichlormethan, tetrachlorethylen, bromoform a neznámé látky „unknown II-IV“. Jelikož byla v reakci přítomna kyselina octová jako substrát, na chromatogramu byl opět pík s retenčním časem 5,12 min odpovídající neznámé látce „unknown I“. V porovnání s chloroperoxidasou se bromoform tvořil pouze v malém množství.

Chromatogram reakce s NaCl vykazoval píky pro chloroform, tetrachlorethylen a neznámou látku „unknown II“. Pík s retenčním časem 5,11 min opět odpovídal neznámé látce „unknown I“. V tabulce 21 je přehled produktů reakce po 3 a 6 hodinové inkubaci.

Tabulka 21. Odezvy detekovaných sloučenin při enzymové reakci za přítomnosti kyseliny octové a KBr/NaCl.

KBr	Inkubační doba		NaCl	Inkubační doba	
	3h	6h		3h	6h
„unknown I“	107716	74603	„unknown I“	108010	73098
Bromdichlormethan	2502	2519	Chloroform	23217	19352
Tetrachlorethylen	1705	1509	Bromdichlormethan	167	n.d.
Bromoform	23036	2750	Tetrachlorethylen	2099	1908
„unknown II“	50107	14914	„unknown II“	5582	4523
„unknown III“	5479	37899			
„unknown IV“	12070	n.d.			

4.3. Reakce křenové peroxidasy, acetonu, H₂O₂ a KBr/NaCl

Hlavním produktem této reakce v přítomnosti KBr byl tetrachlorethylen, dále pak neznámé látky „unknown II-IV“. Při reakci s NaCl vznikal v nepatrném množství dichlormethan a chloroform. V tabulce 22 jsou uvedeny látky vznikající při reakci s KBr a NaCl.

Tabulka 22. Odezvy detekovaných sloučenin při enzymové reakci za přítomnosti acetonu a KBr/NaCl.

KBr	Inkubační doba		NaCl	Inkubační doba	
	3h	6h		3h	6h
Dichlormethan	2684	n.d.	Dichlormethan	3405	2546
Tetrachlorethylen	19138	31928	Chloroform	8938	15754
Dibromchlormethan	2304	3922	Trichlorethylen	4607	3246
Bromoform	3324	1935	Tetrachlorethylen	1096	13595
„unknown II“	14914	16754	Dibromchlormethan	3789	12005
„unknown III“	37241	48758	„unknown II“	n.d.	7465
„unknown IV“	1855	6354			

Diskuze

Přítomnost halogenovaných těkavých uhlovodíků byla detekována pomocí GC-ECD a pro prekoncentraci analytu enzymových reakcí byla zvolena metoda mikroextrakce tuhou fází, díky její automatizaci a omezenému objemu reakčních „vialek“. Kdežto pro měření těkavých halogenovaných uhlovodíků z rostlinného materiálu by byla vhodnější metoda kryofokuse, která je časově náročnější a není automatizovaná.

Srovnáním chromatogramů v příloze 1 a 2 je patrné, že retenční časy jsou odlišné, i když analýza byla provedena za stejných podmínek. Tento posun byl způsoben nestálostí tlakových podmínek během „nástřiku“ na kolonu po prekoncentraci v kryopasti. Po výměně tekutého dusíku za vroucí vodu dojde k uvolnění látek z kryopasti a tím i k tlakové vlně, která následně ovlivní retenční časy.

Během provedených reakcí „blanku“ bez chloroperoxidasy se netvořily žádné halogenované sloučeniny, což potvrzuje fakt, že pro vznik halogenovaných sloučenin je nutná přítomnost enzymu, který naváže anorganický chlorid a zabuduje ho do organické struktury.

Reakce „blanku“ bez peroxidu vodíku také nevykazovaly tvorbu halogenovaných sloučenin, protože nebyly detekovány žádné píky produktů reakce, čímž se potvrdil fakt, že chloroperoxidasa je skutečně peroxidasa, protože vyžaduje přítomnost peroxidu vodíku pro enzymovou reakci (halogenaci) a nestačí ji pouze vzdušný kyslík. Proto není nutné pracovat v inertní atmosféře nebo se nemusíme zbavovat kyslíku z reakčních „vialek“. Jelikož peroxid vodíku je toxinem pro žijící buňky, existuje řada enzymů, které ho rozkládají (např. katalasa), tedy chloroperoxidasa může sloužit také jako ochranný faktor pro organismus tím, že peroxid vodíku v buňce rozkládá. Poté halogenace může být následujícím krokem reakce za přítomnosti halogenidu a organického substrátu.²⁴ Při použití křenové peroxidasy a NaCl nevznikaly žádné halogenované sloučeniny, kdežto v případě KBr vznikal tetrachlorethylen a neznámá látka „unknown III“, což je zajímavé a překvapivé, jelikož jako zdroj halogenidů byl použit bromid

V případě reakce „blanku“ bez substrátu docházelo ke vzniku halogenovaných sloučenin v poměrně velkém množství a ve stejném zastoupení jako při enzymové reakci se substrátem, H₂O₂ a halogenidem. Je několik možností, které způsobují vznik těchto produktů. Jedním z nich je sama chloroperoxidasa, která může sloužit jako substrát pro halogenační reakce, ve které glykoproteinové tělo enzymu slouží jako cílové místo pro

reakci s HOX.²⁴ Tento glykoproteinový zbytek má dostatek aktivovaných míst, které mohou být využity jako substrát. Další možností je přítomnost pufru v reakční směsi, který může sloužit jako další organický substrát. Ovšem mohlo v určité míře dojít i ke kontaminaci, proto u všech pokusů byly provedeny slepé vzorky pouze s destilovanou vodou, které při vyhodnocování byly odečteny od reálných vzorků.

Podle literatury¹⁴ chloroperoxidasa i myeloperoxidasa mohou oxidovat chlorid, bromid a jodid. Oproti tomu laktoperoxidasa může oxidovat bromid a jodid a křenová peroxidasa pouze jodid. Kdežto provedeným pokusem byly detekované jak chlorované, tak i bromované látky, především tedy tetrachloroethylen. Ten se však při reakci „blanku“ bez substrátu tvoří pouze v malém množství, proto zřejmě přítomnost acetonu jako substrátu zapříčiňuje vznik tetrachlorethylenu v tak velkém množství.

Analýzou inkubací chloroperoxidasy s KBr, popř. NaCl a použitými substráty byl podle očekávání hlavní produkt bromoform, popř. chloroform. Také další, vedlejší produkty byly detekovány. Utváření nenasycených uhlovodíků (např. tetrachlorethylen) může být vysvětleno hydrolýzou jejich korespondujících prekurzorů (např. tetrachlorethan). Porovnáním s reakcemi „blanku“ bez enzymu je patrné, že výskyt sloučeniny „unknown I“ je způsobena přítomností kyseliny octové.

Přítomnost jak chlorovaných, tak bromovaných sloučenin může být způsobeno kontaminací bromidu draselného chloridy a naopak.

Co se týče neznámých látek, které byly detekovány, je nutné je identifikovat dalšími pokusy. Jedním z nich je analýza na GC-MS, pomocí které se zjistí jejich molekulová hmotnost. Inkubace se provede za stejných podmínek, a po prekoncentraci na SPME vlákno se musí provést analýza na GC-MS. Při enzymových reakcích vznikají halogenované sloučeniny v nízké koncentraci a hmotnostní detektor je méně citlivý a neselektivní na halogenované látky, proto koncentrační faktor musí být vyšší. Další možností je použití kryofokusace před GC-MS analýzou.

Souhrn

V přírodě se dnes vyskytuje několik tisíc halogenovaných sloučenin vznikajících biogenně. Největší zastoupení mají bromované a chlorované sloučeniny. Jednou z možností vzniku těchto látek je schopnost některých mikroorganismů zabudovávat anorganický chlor do organického substrátu.

Za laboratorních podmínek byly detekovány halogenované těkavé uhlovodíky, především chloroform a bromoform, jako produkty enzymových reakcí katalyzovaných peroxidasami. V menší míře dále vznikaly nenasycené uhlovodíky, halogenované methany a nám neznámé sloučeniny. Pokusy byly provedeny s chloroperoxidasou z *Caldariomyces fumago* a křenovou peroxidasou. Bylo potvrzeno, že oba enzymy vykazovaly schopnost halogenace. K detekci látek byl použit GC-ECD a metoda SPME pro prekoncentraci analytu.

Dalším krokem výzkumu bude identifikace neznámých látek nebo použití jiných substrátů pro enzymovou reakci.

Seznam použité literatury

- (1) Winterton, N. *Green Chemistry* **2000**, 2, 173-225.
- (2) Graedel, T. E.; Keene, W. C. *Pure and applied chemistry* **1996**, 68, 1689-1697.
- (3) Oberg, G. *Applied microbiology and biotechnology* **2002**, 58, 565-81.
- (4) Gribble, G. W. *Pure and applied chemistry* **1996**, 68, 1699-1712.
- (5) Gribble, G. W. Natural Organohalogenes www.eurochlor.com.
- (6) McConnell, O.; Fenical, W. *Phytochemistry* **1977**, 16, 367-374.
- (7) Gribble, G. M. I. *Environmental Health* 161-176.
- (8) Gribble, G. W. *Chemosphere* **2003**, 52, 289-97.
- (9) Hoekstra, E. J.; Verhagen, F. J. M.; Field, J. A.; Leer, E. W. B.; Brinkman, U. A. T. *Phytochemistry* **1998**, 49, 91-97.
- (10) Williams, D. H.; Bardsley, B. *Angewandte Chemie International Edition* **1998**, 38, 1172-1193.
- (11) Khalil, M. a. K.; Rasmussen, R. a.; French, J. R. J.; Holt, J. a. *Journal of Geophysical Research* **1990**, 95, 3619-3634.
- (12) Wittsiepe, J.; Kullmann, Y.; Schrey, P.; Selenka, F.; Wilhelm, M. *Chemosphere* **2000**, 40, 963-8.
- (13) Chromá, L.; Macková, M.; Macek, T.; Martínek, V.; Stiborová, M. *Chemické listy* **2001**, 95, 212-222.
- (14) Dunford, H. B. *Heme peroxidases*; Wiley-VCH: New York, 1999.
- (15) Azevedo, A. M.; Cabral, J. M. S.; Fonseca, L. P. *Biotechnology Annual Review* **2003**, 9, 199-247.
- (16) Veitch, N. C. *Phytochemistry* **2004**, 65, 249-259.
- (17) Shaw, P. D.; Hager, L. P. *The Journal of biological chemistry* **1959**, 234, 2565-2569.
- (18) Hager, P.; Morris, D. R.; Brown, S.; Eberwein, H. *The Journal of biological chemistry* **1966**, 241, 1763-1768.
- (19) Hallenberg, P. F.; Hager, L. P. *The Journal of biological chemistry* **1976**, 2560, 521-529.

- (20) Kühnel, K.; Blankenfeldt, W.; Terner, J.; Schlichting, I. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281*, 23990-8.
- (21) Butler, A.; Sandy, M. *Nature* **2009**, *460*, 848-54.
- (22) Whitteck, J. T. *Synthesis* **2006**, 49-56.
- (23) Sundaramoorthy, M.; Terner, J.; Poulos, T. L. *Structure* **1995**, *3*, 1367-77.
- (24) Walter, B.; Ball *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **1992**, *342*, 827-833.
- (25) Niedan, V.; Pavasars, I.; Oberg, G. *Chemosphere* **2000**, *41*, 779-85.
- (26) Bertini, I.; Sigel, A.; Sigel, H. *Handbook of metalloproteins*; 2001.
- (27) Winter, J. M.; Moore, B. S. *The Journal of biological chemistry* **2009**, *284*, 18577-81.
- (28) Rehder, D. *Inorganic Chemistry Communications* **2003**, *6*, 604-617.
- (29) Hinrichs, W.; Vilter, H. *Science* **1988**, *239*, 292-294.
- (30) van Pée, K.-H. *Annual Reviews* **1996**, *50*, 375-399.
- (31) van Pée, K. H.; Unversucht, S. *Chemosphere* **2003**, *52*, 299-312.
- (32) van Pée, K. H.; Dong, C.; Flecks, S.; Naismith, J.; Patallo, E. P.; Wage, T. *Advances in applied microbiology* **2006**, *59*, 127-57.
- (33) Opekar, F.; Rychlovský, P.; Plzák, Z. *Základní analytická chemie*; PřF UK - Nakladatelství Karolinum: Praha, 2003; pp. 150-164.
- (34) Pawliszyn, J.; Pawliszyn, B.; Pawliszyn, M. *The Chemical Educator* **1997**, *2*, 1-7.
- (35) http://web.vscht.cz/poustkaj/ISM_SPME_1007.pdf, platné ke dni 16.5.2012

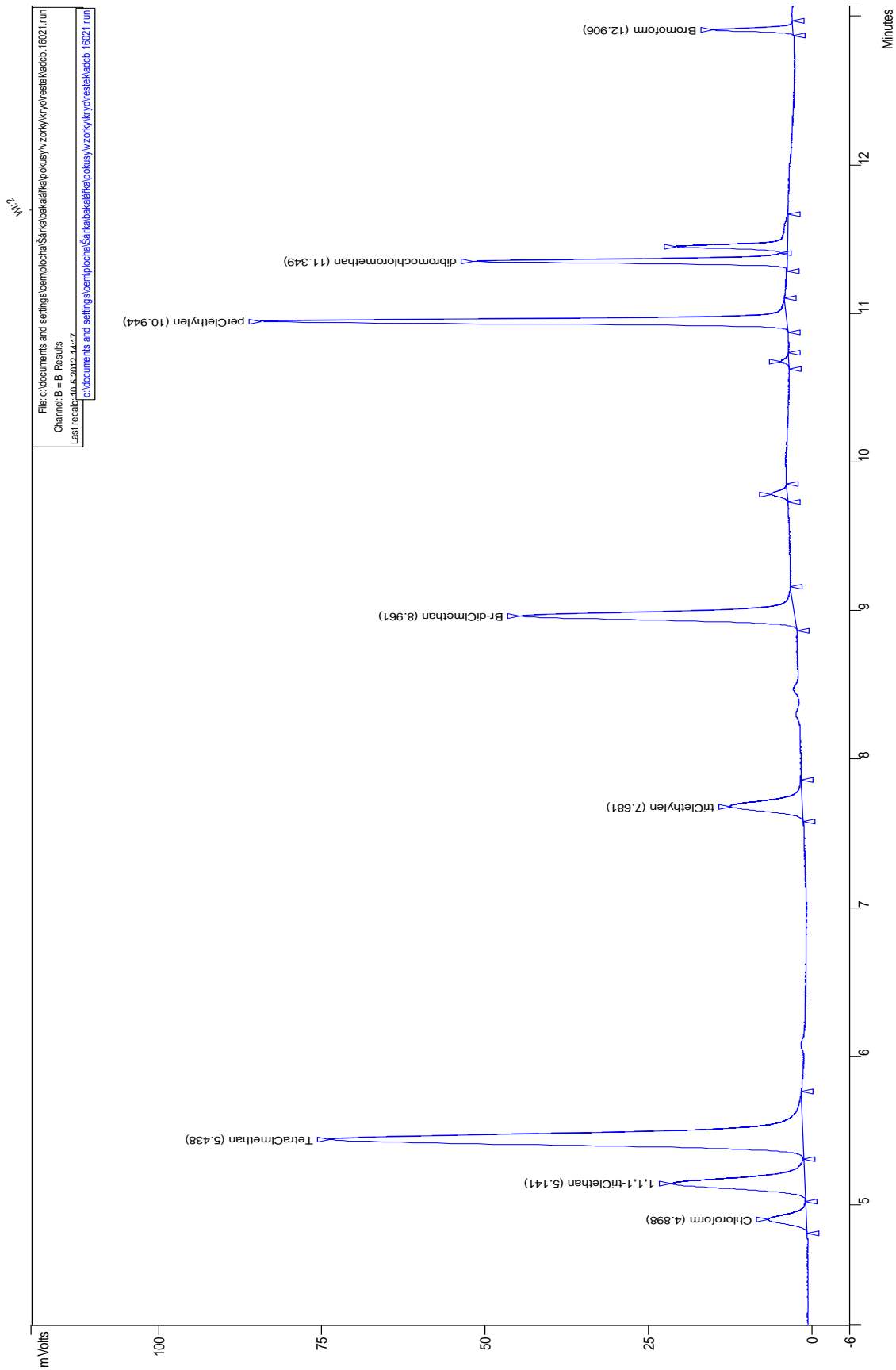
Seznam příloh

Příloha č. 1

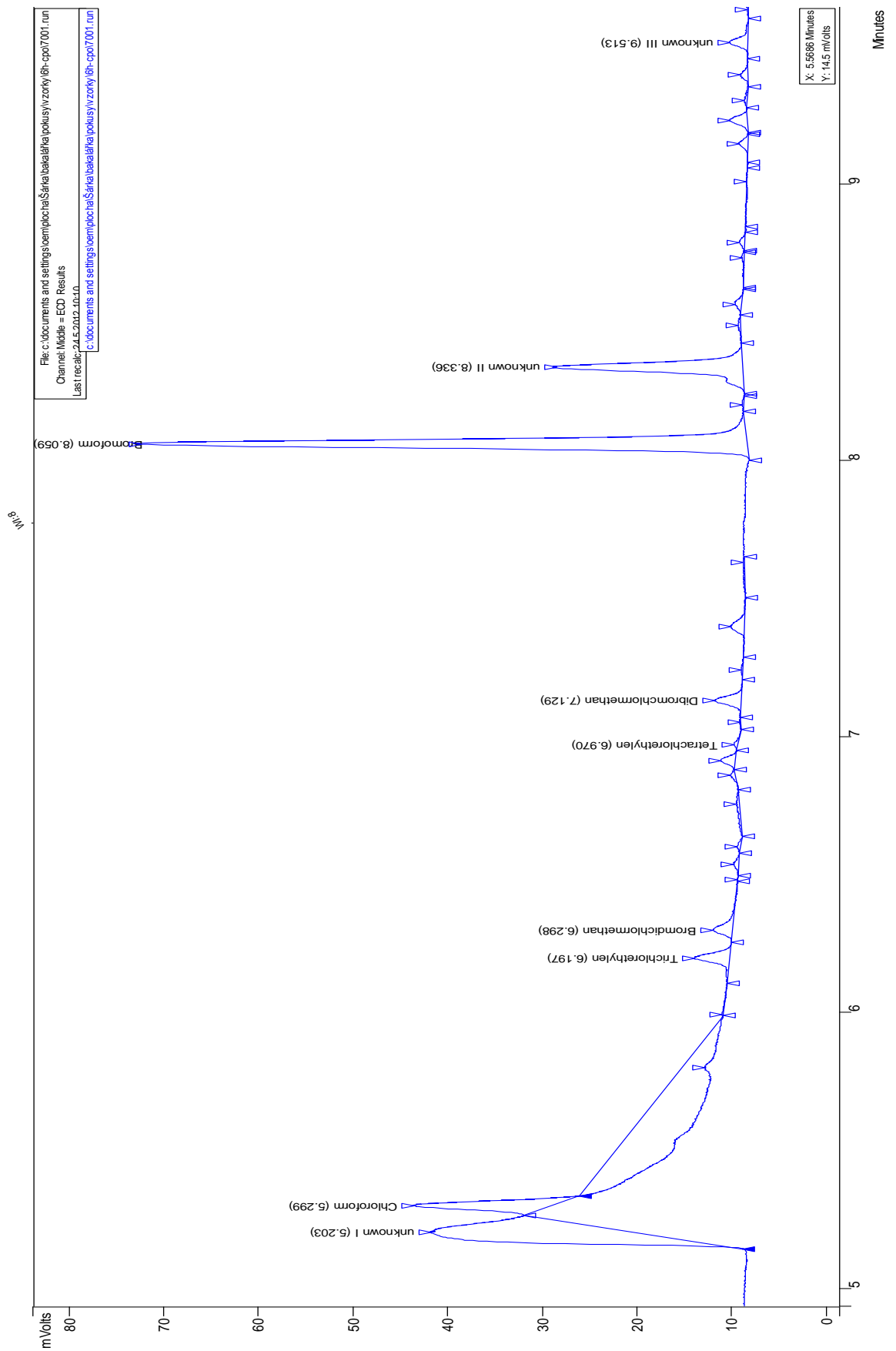
Příloha č. 2

Příloha č. 3

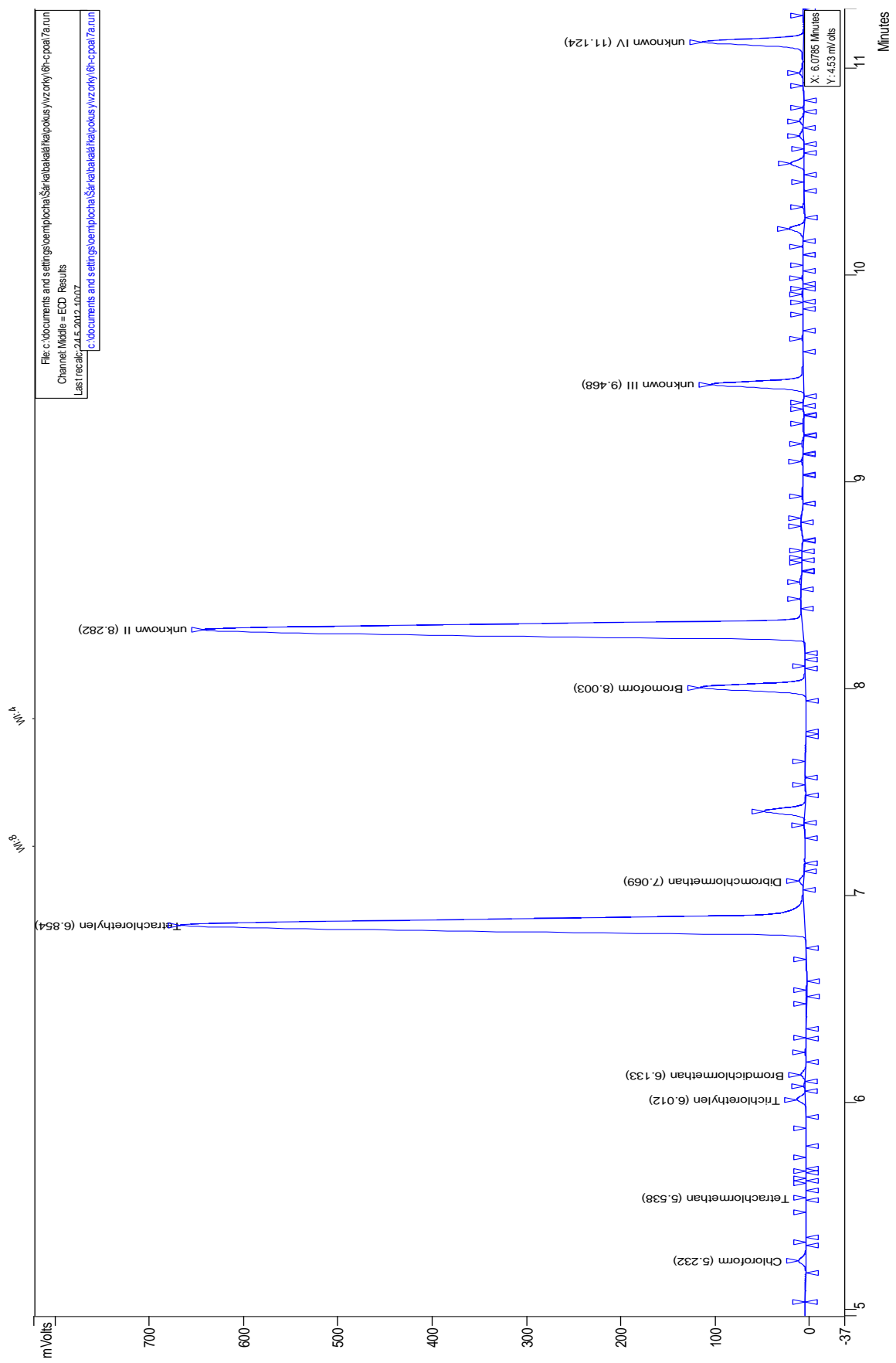
Příloha č. 4



Příloha 2. Chromatogram plynného standardu firmy RESTEK metodou kryofokusace



Příloha 3. Chromatogram 6 hodinové inkubace CPO, kyseliny octové, KBr a H₂O₂.



Příloha 4. Chromatogram 6 hodinové inkubace CPO, acetonu, KBr a H₂O₂.