

## Abstrakt

Kvasinka *Candida tropicalis* a bakterie *Comamonas testosteroni* se vyznačují schopností využívat fenol jako jediný zdroj uhlíku a energie. V naší laboratoři se zabýváme zejména studiem cytoplasmatických enzymů zodpovědných za první a druhý krok odbourání fenolu: NADPH-dependentní fenolhydroxylasy *C. tropicalis* i *C. testosteroni* a katechol 1,2-dioxygenasy *C. tropicalis*. Cílem naší práce je izolovat a částečně charakterizovat tyto enzymy.

Fenolhydroxylasa *C. tropicalis* byla purifikována použitím následující kombinace metod: chromatografie a rechromatografie cytosolárních proteinů na DEAE Sepharose, frakční precipitace polyethylenglykolem 6000 a gelové permeační chromatografie na Sephacrylu S-300. Extracelulární fenolhydroxylasa *C. testosteroni* byla získána frakční precipitací kultivačního média polyethylenglykolem 6000 a gelovou permeační chromatografií na 4B Sepharose a Sephacrylu S-300. Katecholdioxygenasa byla z cytosolu *C. tropicalis* izolována za použití metod: chromatografie a rechromatografie cytosolárních proteinů na DEAE Sepharose, lyofilizace enzymového preparátu a gelové permeační chromatografie na Sephadexu G-100

Enzymová aktivita byla měřena buď pomocí HPLC nebo spektrofotometricky. Čistota enzymů byla sledována elektroforézou SDS-PAGE. Molekulová hmotnost enzymů byla určena pomocí SDS-PAGE a gelové chromatografie na Sephacrylu S-300/Sephadexu G-100.

NADPH-dependentní fenolhydroxylasa kvasinky *C. tropicalis* je tetramer o molekulové hmotnosti  $240 \pm 5$  kDa. pH optimum oxidace fenolu na katechol je 7,6. Byly určeny kinetické charakteristiky pro oxidace fenolu na katechol. Aktivita fenolhydroxylasy je inhibována působením iontů těžkých kovů, konkrétně  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Pb}^{2+}$ .

NADPH-dependentní fenolhydroxylasa bakterie *C. testosteroni* je rovněž tetramer o molekulové hmotnosti  $240 \pm 5$  kDa a také byly stanoveny její kinetické charakteristiky.

Katechol 1,2-dioxygenasa *C. tropicalis* je dimer s molekulovou hmotností  $63 \pm 5$  kDa. pH optimum pro tvorbu *cis,cis*-mukonátu je 7,7 a optimální teplota pro tuto reakci je 30°C. Enzym byl charakterizován z hlediska kinetických parametrů oxidace katecholu a bylo zjištěno silné ovlivnění jeho aktivity ionty  $\text{Pb}^{2+}$ , a dále ionty  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{2+}$ .

**Klíčová slova:** NADPH-dependentní fenolhydroxylasa, katechol 1,2-dioxygenasa, kvasinka *Candida tropicalis*, bakterie *Comamonas testosteroni*, fenol, bioremediace