

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
a
Mikrobiologický ústav AVČR, v.v.i.

DISERTAČNÍ PRÁCE

2008

Mgr. Martin Šušla

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Ústav pro životní prostředí
a
Mikrobiologický ústav AVČR, v.v.i.

**Účast ligninolytických enzymů
produkovaných imobilizovanými houbami
bílé hniloby v dekolorizaci syntetických
barviv**

Mgr. Martin Šušla

Praha, 2008

Prohlašuji, že disertační práci, kterou předkládám k obhajobě, jsem vypracoval samostatně.
U všech poznatků, které jsem převzal z odborné literatury, je v textu uveden jejich autor a citované prameny jsou uvedeny v přehledu použité literatury.

V Praze, dne

.....

Prohlašuji, že tuto disertační práci ani její podstatnou část jsem nepředložil k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne

.....

Rád bych na tomto místě poděkoval především svým školitelům, RNDr. Čeňkovi Novotnému, CSc. a Mgr. Kateřině Svobodové, Ph.D., za odbornou pomoc, cenné rady a věcné připomínky, jimiž velkou měrou přispěli k sepsání této disertační práce. Rovněž oběma děkuji za finanční podporu z grantů, která umožnila vznik předkládané práce.

Abstrakt

Cílem této disertační práce bylo charakterizovat ligninolytické aktivity dvou hub bílé hniloby, *Dichomitus squalens* a *Irpex lacteus*, rostoucích v kulturách imobilizovaných na různých pevných materiálech a určit roli produkovaných ligninolytických enzymů v dekolorizaci syntetických barviv.

V kulturách *D. squalens* imobilizovaných na borovicovém dřevě došlo ve srovnání s tekutými kulturami k signifikantní indukci produkce lakasy, za kterou jsou pravděpodobně zodpovědné fenolické látky extrahovatelné ze dřeva organickým rozpuštědlem. Z kultivačního media byly pomocí FPLC vyizolovány dvě lakasové isoformy, Lc1 a Lc2, se stejnou molekulovou hmotností (68 kDa), které se však lišily v isoelektrických bodech a ve schopnosti dekolorizovat syntetická barviva *in vitro*. Zatímco isoforma Lc1 způsobovala v přítomnosti redoxního mediátoru zpětnou kolorizaci vzorku s azobarvivem RO16, u isoformy Lc2 nebyl tento biotechnologicky nežádoucí jev pozorován. Imobilizace *I. lacteus* na dřevě k indukci lakasy nevedla a v kulturách byly naměřeny pouze nízké aktivity MnP a MIP.

Při růstu na pšeničné slámě byla u obou hub dominantně produkována MnP. Ze slámových kultur *D. squalens* byla vyizolována MnP, která v experimentech *in vitro* ukázala rychlejší dekolorizaci vybraných azo a anthrachinonových barviv ve srovnání se stejnou totální aktivitou lakasy Lc1. V přítomnosti obou enzymů bylo pozorováno jejich synergické působení při dekolorizaci barviv. MnP navíc bránila vzniku barevných produktů, které se objevovaly při dlouhodobější dekolorizaci Lc1 v reakční směsi s azobarvivem. Mycelium-vázaná lakasa *I. lacteus* nezpůsobovala na rozdíl od Lc1 *D. squalens* zpětnou kolorizaci vůbec. Dekolorizace RO16 v přítomnosti MnP a mycelia *I. lacteus* ukázala aditivní efekt obou enzymů.

Imobilizace hub na inertním polyurethanu vedla ke zvýšené produkci MnP a MIP, která byla potlačena vyšší koncentrací dusíku v kultivačním mediu. V kulturách *I. lacteus* docházelo během kultivace ke změnám v profilu isoform MnP, jejichž produkce byla rovněž regulována koncentrací manganu a přítomností syntetických barviv v kultivačním mediu. Zastoupení MnP isoform v kultivační tekutině mělo pak následně vliv i na rychlost dekolorizace vybraných barviv.

Abstract

The aim of this Ph.D. thesis was to characterize ligninolytic activities of two white-rot fungi, *Dichomitus squalens* and *Irpex lacteus*, cultivated on various solid supports in their immobilized form and to identify the role of ligninolytic enzymes in the decolorization of synthetic dyes. Significant induction of laccase activity was observed in *D. squalens* pine wood cultures when compared to liquid cultures. The induction of laccase was probably due to the presence of phenols, extractable from wood with organic solvents. Two laccase isoforms, Lc1 and Lc2, were isolated from the culture liquid using FPLC. The enzymes revealed identical molecular masses of 68 kDa, however, they differed in isoelectric points and their dye decolorization capacity. The decolorization of the azo dye RO16 by Lc1 in the presence of redox mediator was followed by a regressive colorization of the sample when incubated for 72 h. Conversely, no backward trend was observed during RO16 decolorization using Lc2. In contrast to *D. squalens*, *I. lacteus* immobilized on pine wood cubes produced a low level of manganese peroxidases and no laccase induction was observed.

Both fungi produced MnP as a dominant enzyme in solid state wheat straw cultures. *D. squalens* MnP obtained from the wheat straw cultures was able to decolorize selected azo and anthraquinone dyes more rapidly than *D. squalens* Lc1 per unit of enzyme activity. Decolorization in the presence of both enzymes showed a synergistic cooperation of MnP and Lc1. MnP prevented from production of differently colored products yielded from azo dyes degradation by Lc1. In contrast to *D. squalens* Lc1, no regressive colorization was observed during the long-term degradation of selected azo dyes using *I. lacteus* mycelium-associated laccase. The rate of RO16 decolorization in the presence of *I. lacteus* mycelium-associated laccase and MnP was additive.

Immobilization of both fungi on polyurethane foam, an inert material, led to a higher production of manganese peroxidases. The production was suppressed by the high nitrogen level in culture medium. The MnP isoenzyme profile underwent transitions during the fungal growth in polyurethane foam *I. lacteus* cultures. Moreover, the isoenzyme profile varied based upon the concentration of manganese and the presence of synthetic dyes in culture medium. The changes in the isoenzyme pattern of the cultures were connected to the changes in dye decolorization ability of crude culture liquids.

OBSAH

1. Úvod	8
2. Cíle práce	10
3. Současný stav problematiky	11
3.1. Dekolorizace syntetických barviv tekutými kulturami hub bílé hniloby.....	11
3.2. Produkce ligninolytických enzymů v imobilizovaných kulturách hub bílé hniloby a dekolozace syntetických barviv	15
3.3. <i>Dichomitus squalens</i>	18
3.4. <i>Irpex lacteus</i>	19
3.5. Ligninolytické enzymy jako účinné nástroje pro biodegradaci obtížně rozložitelných organopolutantů	23
4. Výsledky	31
4.1. Produkce ligninolytických enzymů v imobilizovaných kulturách <i>D. squalens</i> a <i>I. lacteus</i>	32
4.2. Účast isoenzymů lakasy v dekolozaci barviv imobilizovanými kulturami <i>D. squalens</i>	39
4.3. Účast mangan-dependentní peroxidasy <i>D. squalens</i> v dekolozaci barviv a spolupráce enzymu s lakasou	47
4.4. Vliv různých syntetických barviv na produkci isoenzymů mangan-dependentní peroxidasy v imobilizovaných kulturách <i>I. lacteus</i>	64
4.4.1. Sledování produkce enzymu, jeho IEF analýza a dekolozizační schopnost	65
4.4.2. Charakterizace MnP isoform pomocí nativní PAGE	72
4.5. Dekolorizace vybraných azobarviv myceliem <i>I. lacteus</i>	74
5. Diskuse	79
6. Závěr	85
7. Přehled použité literatury	87
8. Příloha	110
9. Seznam zkratk	111

1. ÚVOD

Syntetická barviva, organické látky rozličných chemických struktur, mají řadu aplikací v různých průmyslových odvětvích, např. při výrobě potravin, barvení textilu, výrobě plastů nebo ve farmacii. Nízká účinnost barvicích procesů, která u některých typů barviv může dosahovat pouze 50 %, vede k úniku těchto látek do odpadních vod (O'Neill a kol. 1999). Vzhledem k obtížné rozložitelnosti syntetických barviv je aerobní degradace probíhající v čističkách odpadních vod neúčinná (Willmont a kol. 1998). Pro odstranění syntetických barviv z odpadních vod je tedy v současné době používána převážně membránová filtrace, ozonizace nebo elektrochemická destrukce (Robinson a kol. 2001a). Uvedené metody jsou však finančně nákladné a v některých případech je efektivita odstranění barviv nízká. U řady syntetických barviv a jejich metabolitů bylo navíc zjištěno, že mohou působit na živé organismy mutageně a karcinogenně (Chung 1983).

Ligninolytické houby, tzv. houby bílé hniloby, jsou známy svou schopností degradovat řadu obtížně rozložitelných organických polutantů mezi něž patří chlorované organické sloučeniny, syntetické polymery, polycyklické aromatické uhlovodíky a také syntetická barviva (Pointing 2001). Degradace syntetických barviv těmito organismy je obecně spojována s produkcí ligninolytických enzymů, jako jsou ligninperoxidasy (LiP, E.C. 1.11.1.14), mangan-dependentní peroxidasy (MnP, E.C. 1.11.1.13) nebo lakasy (Lac, E.C. 1.10.3.2). Tyto enzymy jsou často produkovány v podobě několika isoform, které se mohou lišit svými katalytickými vlastnostmi (Wesenberg a kol. 2003).

Přestože byla prokázána účinná degradace syntetických barviv houbami bílé hniloby i jejich ligninolytickými enzymy (Fu a Viraraghavan 2001), žádná biotechnologická aplikace hub ani ligninolytických enzymů nebyla dosud uvedena do běžné praxe v čištění odpadních vod. Jednu z možností představují bioreaktory pracující s imobilizovanými houbami bílé hniloby (Couto a Sanromán 2005). Avšak většina dosavadních studií zaměřených na dekolizaci barviv byla prováděna zejména v tekutých kulturách, které se z hlediska produkce ligninolytických enzymů a dekolizační kapacity mohou od imobilizovaných kultur značně lišit (Nakamura a kol. 1999, Moldes a kol. 2003).

Tato práce by měla přispět k vysvětlení rozdílů mezi tekutými a imobilizovanými kulturami a k pochopení procesů probíhajících v imobilizovaných kulturách během dekolorizace barviv. Byly studovány dvě houby bílé hniloby, *Dichomitus squalens* a *Irpex lacteus*, kultivované v imobilizované formě na různých typech pevných nosičů. V kulturách obou hub byla sledována produkce ligninolytických enzymů a jejich isoform se zaměřením na účast enzymů v dekolorizaci syntetických barviv.

2. CÍLE PRÁCE

Tato práce je součástí dlouhodobého výzkumu zaměřeného na degradační kapacitu ligninolytických hub a charakterizaci mechanismů, které se uplatňují v dekolORIZACI syntetických barviv těmito houbami. Část předkládaných výsledků byla získána v rámci řešení projektu FRVŠ 359/2007 „Ligninolytická aktivita vybraných hub bílé hniloby kultivovaných v imobilizované formě“, který doplňoval dlouhodobý výzkumný záměr laboratoře.

Hlavní cíle práce jsou:

- Charakterizovat ligninolytické aktivity imobilizovaných kultur hub *D. squalens* a *I. lacteus*.
- Přinést informace o účasti ligninolytických enzymů imobilizovaných kultur v dekolORIZACI syntetických barviv se zaměřením na hlavní enzymové isoformy.

3. SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY

3.1. Dekolorizace syntetických barviv tekutými kulturami hub bílé hniloby

Syntetická barviva představují širokou skupinu obtížně degradovatelných organických polutantů, jejichž celková roční produkce je jen v textilním průmyslu odhadována na 800 tisíc tun ročně (Zollinger 1991). Syntetická barviva je možné rozdělit podle jejich chemické struktury do několika skupin, mezi něž patří azo, anthrachinonová, trifenylmethanová, ftalocyaninová, sirná a akridinová barviva (Wesenberg a kol. 2003). Všechna barviva používaná v textilním průmyslu jsou vyráběna tak, aby byla odolná vůči působení světla, vody, řady chemických sloučenin včetně oxidujících látek i mikroorganismů. Textilní barviva v odpadních vodách je proto obtížné dekolorizovat pomocí běžně užívaného biologického čištění (Shaul a kol. 1991). Pro degradaci syntetických barviv bylo navrženo několik biotechnologických metod využívajících bakterie nebo houby v kombinaci s fyzikálně chemickými technologiemi (Borchert a Libra 2001, Beydilli a kol. 1998). V současné době jsou mezi organismy degradujícími syntetická barviva považovány za nejúčinnější houby bílé hniloby.

Dekolorizace polymerních barviv byla z počátku používána pro měření ligninolytické aktivity a k rychlému screeningu biodegradační kapacity hub bílé hniloby (Glenn a Gold 1983, Field a kol. 1993). Teprve později se začala studovat dekolorizace barviv houbami bílé hniloby v tekutých kulturách. Nejstudovanější houbou v této souvislosti je *Phanerochaete chrysosporium*. Už v roce 1990 byla publikována práce o dekolorizaci azobarviv touto houbou a o čtyři roky později byl navržen degradační mechanismus azobarviv katalyzovaný peroxidasami (Cripps a kol. 1990, Goszczynski a kol. 1994). Schopnost dekolorizovat syntetická barviva byla studována také u řady dalších hub bílé hniloby, jako *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, *Bjerkandera adusta* aj. (Knapp a kol. 1995, Heinfling a kol. 1998a).

Jedním z faktorů, který ovlivňuje účinnost dekolorizace je chemická struktura barviva. Screeningovými experimenty s použitím 115-ti různých kmenů hub bylo zjištěno, že azobarviva, reprezentovaná v této studii Acid Red 183, jsou ve srovnání s anthrachinonovými barvivy podstatně hůře degradována (Jarosz-Wilkolazka a kol. 2002).

Vyšší odolnost azobarviv k biodegradaci houbami uvádí také studie Eichlerové a kol. (2007b). V tekutých kulturách *I. lacteus* byla rovněž zaznamenána nižší účinnost dekolorizace azobarviv oproti antrachinonovému barvivu RBBR (Novotný a kol. 2001). V tekutých kulturách *Pycnoporus sanguineus* byla kompletně dekolorizována dvě trifenylmethanová barviva na rozdíl od azobarviv, jejichž dekolorizace probíhala výrazně pomaleji (Pointing a Vrijmoed 2000).

Snadnější dekolorizace anthrachinonových barviv nebyla naopak pozorována při degradaci houbami *T. versicolor*, *Trametes modesta* a *Trametes hirsuta* (Nyanhongo a kol. 2002). Míra dekolorizace byla v této studii závislá na redoxním potenciálu a individuální struktuře barviva spíše než na jeho systematickém zařazení dle chemické struktury. Studie s lakasou *Trametes villosa* pak prokázala přímou korelaci mezi hodnotou redoxního potenciálu barviva a jeho biodegradabilitou daným enzymem (Zille a kol. 2004). Predikce dekolorizace barviva houbami bílé hniloby na základě jeho chemické struktury je však obtížná, neboť se zde uplatňuje řada dalších fyzikálně-chemických faktorů jako je rozpustnost barviva, přítomnost, pozice a počet substituentů a sterické vlivy (Lucas a kol. 2008).

Účinnost dekolorizace syntetických barviv se liší mezi jednotlivými druhy hub bílé hniloby. Srovnání dekolorizace syntetických barviv u sedmi různých isolátů hub bílé hniloby ukázalo rozdíly v jejich dekolorizačních schopnostech (Knapp a kol. 1995). Žádná z použitých hub neprokázala nejúčinnější dekolorizaci u všech testovaných barviv. Dekolorizace reaktivního barviva blue-BF-R třinácti různými druhy hub probíhala s různou účinností v závislosti na jejich růstu a na rozdílech v enzymových systémech (Dos Santos a kol. 2004). Gill a kol. (2002) uvádí, že *Phlebia* spp. a *D. squalens* dekolorizovaly v tekutých kulturách vybraná azo a trifenylmethanová barviva mnohem efektivněji, než *P. chrysosporium*.

Kultivační podmínky, které významným způsobem ovlivňují fyziologické chování houby a expresi ligninolytických enzymů (Dosoretz a Grethlein 1991), představují další faktor v souvislosti s účinností dekolorizace. Je známo, že v třepaných tekutých kulturách *P. chrysosporium* je potlačena ligninolytická aktivita (Faison a Kirk 1985). Na druhou stranu, stacionární tekuté kultury *P. chrysosporium* a *T. versicolor* nedekolorizovaly vybraná syntetická barviva, zatímco v třepaných kulturách k dekolorizaci většiny barviv došlo (Swamy a Ramsay 1999b). Je možné, že za dekolorizaci v třepaných kulturách byla zodpovědná rychlejší výměna kyslíku mezi buňkami a kultivačním médiem v důsledku míchání. Uvedený jev však nelze zobecnit pro všechny houby bílé hniloby, neboť studie

s *I. lacteus* naopak ukázala účinnější dekolorizaci barviv ve stacionárních kulturách (Svobodová a kol. 2006).

Vyšší koncentrace dusíku vedla k vyšší produkci ligninolytických enzymů u hub *P. chrysosporium* a *Coriolopsis gallica*, pozitivní efekt na dekolorizaci byl však zaznamenán pouze u *P. chrysosporium* (Robinson a kol. 2001b). Dekolorizace barviv *Lentinus edodes* byla obdobně ovlivněna koncentrací manganu v kultivačním mediu (Hatvani a Mécs 2002). Optimální koncentrace pro nejefektivnější dekolorizaci byla 20 μM . Kultivační teplota a pH media také určují účinnost dekolorizace. Maximální míra dekolorizace vybraných syntetických barviv třepanými kulturami *P. chrysosporium* byla naměřena při teplotě 35 °C a pH 4-5 (Radha a kol. 2005). Kultivační podmínky, za kterých probíhá dekolorizace barviv nejlépe, mohou být u jednotlivých hub bílé hniloby značně rozdílné, jak je shrnuto např. v práci Fu a Viraraghavan (2001). Pro biotechnologické aplikace je proto nutné optimalizovat kultivaci s ohledem na efektivitu dekolorizace individuálně pro každou houbu.

Při dekolorizaci barviv houbami se uplatňuje několik různých mechanismů. U ligninolytických hub mají hlavní podíl na degradaci barviv substrátově nespecifické ligninolytické enzymy jako je lakasa, MnP a LiP (Fu a Viraraghavan 2001). Podíl jednotlivých ligninolytických enzymů na dekolorizaci barviv se může mezi různými houbami bílé hniloby lišit. Ollikka a kol. (1993) uvádí, že hlavní roli v degradaci azo, trifenylmethanových, heterocyklických a polymerních barviv *P. chrysosporium* hraje LiP a že účast MnP nebyla pro dekolorizaci nezbytná. Podobná zjištění byla publikována u *T. versicolor*, kde LiP rozložila přes 80 % z testovaných barviv, zatímco MnP barviva nedekolorizovala (Young a Yu 1997). Naopak MnP a nikoli LiP byla zodpovědná za dekolorizaci odpadní vody vzniklé při zpracování bavlny (Zhang a kol. 1999). Lakasa *T. versicolor* pak byla zapojena v dekolorizaci anthrachinonových, azo a indigo barviv (Wong a Yu 1999). Účast jednotlivých ligninolytických enzymů v dekolorizaci barviv byla potvrzena v *in vitro* experimentech s použitím kultivačního media bez mycelia nebo purifikovaných enzymů.

V důsledku rozdílných katalytických vlastností je schopnost ligninolytických enzymů degradovat syntetická barviva odlišná. Práce Podgornikové a kol. (2001) ukazuje na různý degradační mechanismus barviva Indigo carmine mezi peroxidasami *P. chrysosporium*. Zatímco při transformaci barviva MnP docházelo ke vzniku červeně zbarveného intermediátu, který byl degradován na žlutý produkt, v reakční směsi s LiP nebyl červený meziprodukt detekován. Purifikovaná lakasa *T. versicolor* dekolorigovala

anthrachinonové barvivo RBBR 5-10krát rychleji než azobarviva, ale zcela opačná situace byla zjištěna v experimentech s purifikovanou MnP (Champagne a Ramsay 2005). Přesto že k dosažení maximální dekolorizační účinnosti vyžaduje řada MnP přítomnost manganu v reakční směsi (Mielgo a kol. 2003, Xiaobin a kol. 2007), existují také peroxidasy produkované houbami *B. adusta* a *Pleurotus eryngii*, které při dekolorizaci v nepřítomnosti manganu interagují přímo s barvivem (Heinfling a kol. 1998b). Rozdíly v dekolorizační kapacitě *in vitro* byly zjištěny i mezi lakasami izolovanými z různých druhů hub. Lakasy hub *Daedalea quercina* a *T. versicolor* degradovaly azobarvivo Reactive Black 5 (Baldrian 2004, Champagne a Ramsay 2005), zatímco lakasa z *Ischnoderma resinosa* barvivo neodbarvovala (Kokol a kol. 2007). Za rozdílnou substrátovou specifitu jednotlivých lakas jsou pravděpodobně zodpovědné jejich odlišné struktury a redoxní potenciály. Dekolorizace lakasami *in vitro* byla studována také v přítomnosti redoxních mediátorů, které umožňují degradovat širší spektrum syntetických barviv a zvyšují reakční rychlost (Reyes a kol. 1999, Camarero a kol. 2005).

U některých hub bílé hniloby mohou být ligninolytické enzymy kromě sekrece do kultivačního media také vázané v buněčné stěně (Garcia a kol. 1987). U pelet *P. chrysosporium* obsahujících LiP vázanou na povrchu mycelia byla částečně zachována schopnost degradovat lignin (Kurek a Odier 1990). Účast ligninolytických enzymů vázaných v myceliu v dekolorizaci barviva Amaranth byla navržena u *T. versicolor* (Swamy a Ramsay 1999a). Vázaná aktivita lakasového typu byla zodpovědná za dekolorizaci syntetických barviv u kultur *I. lacteus* (Svobodová a kol. 2008).

Přesto, že se ligninolytické enzymy významně podílí na dekolorizaci barviv houbami bílé hniloby, existují také další biodegradační mechanismy, u kterých se předpokládá přímá účast v dekolorizaci. Vyas a Molitoris (1995) uvádějí, že v dekolorizaci barviva RBBR se u *P. ostreatus* uplatňuje enzym označovaný jako RBBR-oxygenasa, který je produkovaný při růstu houby na pšeničné slámě. Aktivita RBBR-oxygenasy byla naměřena také ve stacionárních kulturách *I. lacteus* (Novotný a kol. 2001), nicméně korelace mezi dekolorizací RBBR a přítomností enzymu v kultivačním mediu zjištěna nebyla (Kasinath a kol. 2003). MnP ligninolytických hub je také schopna peroxidovat nenasycené mastné kyseliny za vzniku peroxyllipidových radikálů (Kapitch a kol. 1999). Při dekolorizaci azobarviva Reactive Red 120 purifikovanou MnP *P. chrysosporium* v přítomnosti Tweenu 80 byla zjištěna účast těchto peroxidovaných lipidů v dekolorizaci (Harazono a kol. 2003). Dále některé houby bílé hniloby produkují při růstu na dřevě několik typů vysoce reaktivních sloučenin, jako jsou hydroxylové, peroxylové a

hydroperoxylové radikály, které se podílejí na degradaci dřevní hmoty a mohou být zapojeny i v degradaci xenobiotik (Hammel a kol. 2002). Degradace nefenolického barviva Azure B se vedle ligninolytických enzymů účastnily také nízkomolekulární sloučeniny s Fe^{3+} -redukční aktivitou podporující tvorbu hydroxylových radikálů (Arantes a Milagres 2007). Při degradaci polycyklických aromatických uhlovodíků *P. ostreatus* byly detekovány metabolity, za jejichž vznik je pravděpodobně odpovědná cytochrom P-450 monooxygenasa (Bezalel a kol. 1996). Schopnost cytochromového enzymového systému transformovat trifenylmethanové barvivo Malachite green byla popsána u neligninolytické vláknité houby *Cunninghamella elegans* (Cha a kol. 2001), avšak detailnější informace o účasti cytochromu P-450 v dekolizaci syntetických barviv houbami bílé hniloby dosud chybí. Seznam oxidativních enzymů produkovaných houbami bílé hniloby není v současné době stále zcela kompletní, neboť se nadále pomocí molekulárně genetických a proteomických metod a kombinovaných přístupů objevují nové enzymy s možným degradačním potenciálem jako např. Pc faktor izolovaný z kultur *P. chrysosporium* (Hu a kol. 2006).

Kromě biodegradace se v dekolizaci barviv uplatňuje také biosorpce založená na fyzikálně-chemických interakcích jako je adsorpce a iontová výměna (Fu a Viraraghavan 2001). Benito a kol. (1997) uvádí, že adsorpce barviva myceliem *T. versicolor* představovala pouze 5-10% podíl z celkové dekolizace a byla doprovázena enzymovou degradací. Mechanismus biosorpce bez enzymové biodegradace barviva se u hub bílé hniloby vyskytuje minimálně, narozdíl od vláknitých hub, jako je např. *Aspergillus niger*, jehož biomasa může být využita jako adsorbent (Sumathi a Manju 2000).

3.2. Produkce ligninolytických enzymů v imobilizovaných kulturách hub bílé hniloby a dekolizace syntetických barviv

Většina studií zaměřených na produkci ligninolytických enzymů a degradační kapacitu hub bílé hniloby byla dosud prováděna v tekutých kulturách, přesto že tyto organismy rostou v přírodě na pevných substrátech (Couto a kol. 2006). Imobilizované kultury vykazují vyšší odolnost ke změnám pH, působení toxických látek a mohou produkovat větší množství enzymů ve srovnání s tekutými kulturami (Shin a kol. 2002). Houby mohou být imobilizovány v polymélní matici připravené např. z alginátu, chitosanu nebo celulosy (Arica a kol. 2001), anebo jsou imobilizovány přichycením na povrch pevných materiálů. Vzhledem k přirozené schopnosti vláknitých hub adherovat k

pevným povrchům je tato metoda imobilizace poměrně snadná a je považována za ekonomicky i ekologicky výhodný způsob aplikace hub bílé hniloby v průmyslu. Pro úspěšnou kultivaci je nezbytné věnovat pozornost výběru adekvátního pevného substrátu. Velké množství pevných materiálů používaných pro přípravu imobilizovaných houbových kultur je možné rozdělit do dvou skupin: inertní materiály sloužící pouze k přichycení mikroorganismu a neinertní materiály, které poskytují kromě pevné opory také živiny pro mikroorganismus (Ralph 1976).

Při použití inertních substrátů, jako je např. polyurethan nebo nylon, jsou extracelulární enzymy ve srovnání s kultivací na neinertních substrátech snadněji izolovatelné a obsahují méně nečistot. Nevýhodou kultivace na inertních substrátech jsou vyšší náklady spojené s výrobou kultivačního media. Navíc při růstu houby na přírodních neinertních materiálech dochází často k výrazné indukci enzymových aktivit a celkové výtěžky jsou proto vyšší (Couto a Sanromán 2005). Nakamura a kol. (1999) uvádějí, že imobilizace houby *B. adusta* na polyurethanu vedla ve srovnání s tekutými kulturami k vyšší produkci LiP, MnP i lakasy. U *P. chrysosporium* byla v polyurethanových kulturách detekována vysoká aktivita LiP (Nakamura a kol. 1997). Podobně u *P. ostreatus* došlo vlivem imobilizace ke zvýšení syntézy lakasy (Prasad a kol. 2005). V laboratorním bioreaktoru byla studována produkce MnP *P. chrysosporium* imobilizované na polyurethanu (Moreira a kol. 1997). V přítomnosti manganu a vysoké tenze kyslíku byla kultura schopna enzym kontinuálně produkovat v dostatečném množství pro aplikaci v průmyslu. V tubulárním bioreaktoru s houbou *P. chrysosporium* imobilizovanou na nylonových kostkách byla taktéž zajištěna kontinuální produkce MnP a LiP (Moldes a kol. 2003). Shin a kol. (2002) testoval schopnost *T. versicolor* kolonizovat různé druhy přírodních a syntetických materiálů. Za nejlepší pevný substrát jí byla označena juta, na které houba dobře rostla, aniž by narušovala integritu materiálu a zároveň účinně dekolorizovala barvivo Amaranth i bez přidání glukosy.

Mezi neinertní substráty používané k imobilizaci hub bílé hniloby patří zejména lignocelulosové materiály jako je sláma, piliny, kukuřičné palice, slupky z ovoce a otruby (Couto a Sanromán 2005). Tyto substráty obsahují dostatečné množství snadno metabolizovatelných sacharidů a také lignin, který může působit jako induktor syntézy ligninolytických enzymů. Nevýhodou lignocelulosových materiálů je jejich relativně snadná degradovatelnost, která brání dlouhodobějšímu využití imobilizovaných kultur v bioreaktorech. U řady hub bílé hniloby imobilizovaných na pšeničné slámě byla jako dominantní ligninolytický enzym produkována MnP (Vyas a kol. 1994b, Lang a kol. 1998,

Hofrichter a kol. 1999). Srovnání čtyř druhů lignocelulosových substrátů ukázalo, že lakasa *T. versicolor* je nejvíce indukována při růstu houby na otrubách z ječmene (Couto a kol. 2002). Vysoká aktivita lakasy *T. hirsuta* byla zjištěna při kultivaci houby na pomerančových slupkách (Rosales a kol. 2007).

Dekolorizace syntetických barviv imobilizovanými kulturami hub bílé hniloby byla testována v různých typech laboratorních reaktorů. Nilsson a kol. (2006) uvádí, že *Pleurotus flabellatus* imobilizovaný na lufě dekolorigoval textilní barviva v kontinuálním reaktoru. Účinnost dekolorigace houbou nebyla narušena přítomností bakterií a prvků v kontaminované odpadní vodě. Experimenty v tubulárním reaktoru prokázaly vysokou dekolorigační kapacitu houby *T. hirsuta* (Couto a kol. 2006). Díky regulované aeraci a limitovanému množství živin, které brání nadměrnému růstu mycelia, byla umožněna kontinuální degradace barviv. Houba *P. chrysosporium* dekolorigovala účinně odpadní vodu z textilního průmyslu v laboratorním air-lift reaktoru i bez přídavku dusíku (Shahvali a kol. 2000). Pro dlouhodobé kontinuální dekolorigace barviv mohou být použity rotační biologické reaktory, které umožňují střídavý kontakt houbového mycelia s polutantem, což brání ucpání reaktoru v důsledku nadměrné tvorby biomasy. *Bjerkandera* sp. imobilizovaná na kruhových discích z březového dřeva dekolorigovala směs textilních barviv v rotačním biologickém kontaktoru (Axelsson a kol. 2006). Bioreaktor byl schopen kontinuální degradace barviv po dobu 83 dní, aniž by bylo nutné vyměnit dřevěné disky. Srovnání tří různých laboratorních bioreaktorů s *I. lacteus* imobilizovaným na polyurethanu ukázalo, že i přes nižší účinnost dekolorigace v rotačním reaktoru je tento systém vhodný pro dlouhodobé použití (Tavčar a kol. 2006).

Textilní barviva v odpadních vodách je možné degradovat také v reaktorech s volnými nebo imobilizovanými ligninolytickými enzymy (López a kol. 2002). Ve srovnání s houbovou kulturou je degradace purifikovanými ligninolytickými enzymy snadněji regulovatelná, nedochází při ní ke vzniku biomasy a je účinná v širším koncentračním rozmezí polutantů. V reaktorech s volnými enzymy je však vysoká spotřeba biokatalyzátorů vzhledem k jejich úniku spolu se zdegradovanými polutanty. Řešením může být aplikace membránových bioreaktorů, u nichž dochází k odstranění degradačních produktů, nikoli však enzymů. López a kol. (2004) uvádí, že MnP *Bjerkandera* sp. dekolorigovala v membránovém reaktoru více než 85 % azobarviva Orange II s minimální spotřebou enzymu. Imobilizace lakas *P. ostreatus* v alginátu výrazně zvýšila stabilitu enzymů (Palmieri a kol. 2005). Imobilizovaný enzymový systém byl schopen kontinuálně dekolorigovat barvivo RBBR ve fixed-bed reaktoru. Širšímu použití enzymových reaktorů

v praxi však dosud brání několik faktorů, jako je např. malá stabilita hemových peroxidas k peroxidu vodíku, nízká reakční rychlost lakas a především dosud stále vysoká cena enzymů (Torres a kol. 2003).

3.3. *Dichomitus squalens*

D. squalens (Karst) Reid (*Polyporus anceps* Peck) je basidiomycetní houba bílé hniloby, která selektivně degraduje lignin (Blanchette 1984). V přítomnosti celulosy produkuje extracelulárně exo i endoglukanasy (Rouau a Odier 1986). Z myceliálních kultur *D. squalens* byly vyizolovány sesquiterpeny inhibičně působící proti *Bursaphelenchus xylophilus* (Huang a kol. 2004). Z L-fenylalaninu je *D. squalens* schopen syntetizovat benzylalkohol a benzaldehyd, jenž mají využití v potravinářském průmyslu (Lapadatescu a kol. 1997).

Z hlediska syntézy ligninolytických enzymů patří *D. squalens* mezi houby bílé hniloby, které extracelulárně produkují lakasu a MnP, nikoli však LiP (Hatakka 1994). Prvním ligninolytickým enzymem *D. squalens* vyizolovaným z kultivačního media byla lakasa (Petroski a kol. 1980). Studie Périého a Golda (1991) ukázala, že houba je schopna produkovat také MnP, jejíž syntéza je na rozdíl od lakasy striktně závislá na přítomnosti manganu v kultivačním mediu. Veratrylalkohol a guajakol indukují v tekutých kulturách *D. squalens* syntézu lakasy (Arora a Gill 2000), naopak produkce MnP je v přítomnosti těchto látek potlačována (Gill a Arora 2003). V kulturách imobilizovaných na pšeničné slámě byla aktivita MnP výrazně vyšší než aktivita lakasy (Lang a kol. 1998). Bylo zjištěno, že aktivity obou ligninolytických enzymů jsou při vyšší inkubační teplotě (34°C) nižší, nicméně degradace pšeničné slámy probíhala v těchto podmínkách efektivněji (Lang a kol. 2000). Při růstu houby na jedlových hoblinách byla zjištěna korelace mezi produkcí MnP a extracelulární akumulací oxalátu. V extraktu z mycelia *D. squalens* byla detekována aktivita oxalátdekarboxylasy, která zastává klíčovou roli v regulaci hladiny oxalátu uvnitř buněk a v blízkosti houbové hyfy (Mäkelä a kol. 2002).

Z tekutých kultur rostoucích v syntetickém mediu byly vyizolovány dva isoenzymy MnP s podobnou molekulovou hmotností a isoelektrickými body 4,15 a 3,90 (Périé a kol. 1996). Oba isoenzymy jsou blíže příbuzné s MnP1 *P. chrysosporium* a jsou kódovány různými geny, jejichž sekvence jsou známy (Li a kol. 1999). MnP *D. squalens* byla heterologně exprimována v *P. chrysosporium* (Li a kol. 2001). U rekombinantního proteinu byla ve srovnání s MnP *P. chrysosporium* zjištěna podstatně vyšší termostabilita,

kteřá mohla být způsobena rozdíly v glykosylaci. Izolaci z tekutých kultur *D. squalens* byly získány také dvě chromatografické formy lakasy s podobnou substrátovou specifitou (Périeré a kol. 1998). Analýza N-koncové sekvence obou forem ukázala, že lakasy jsou pravděpodobně kódovány stejným genem a liší se pouze v sacharidové části.

Studie s *D. squalens* byly rovněž zaměřeny na degrační kapacitu houby. Schopnost *D. squalens* degradovat pyren byla testována v imobilizovaných kulturách (Wiesche a kol. 1996). Mineralizace pyrenu byla v přítomnosti půdních mikroorganismů vyšší než při působení samotnou houbou. Degrační kapacita *D. squalens* byla také sledována v souvislosti s dekontaminací odpadní vody vzniklé při zpracování oliv (Aggelis a kol. 2002). Houba účinně snižovala koncentraci fenolů, ale na rozdíl od *P. ostreatus* nebyla schopna odpadní vodu dekolorizovat.

Screeningovými testy na agarových miskách a v tekutém mediu bylo zjištěno, že *D. squalens* dekolorizuje vybraná azo a trifenylmethanová barviva (Gill a kol. 2002). Eichlerová a kol. (2006) uvádí, že houba dekolorizuje azo, anthrachinonová a polyaromatická barviva i při jejich relativně vysoké koncentraci. Přítomnost barviv v kultivačním mediu stimulovala produkci MnP, lakasy i H₂O₂ a naopak inhibovala tvorbu houbové biomasy. Dekolorizace barviv Orange G a RBBR probíhala v třepaných a stacionárních kulturách se stejnou účinností (Eichlerová a kol. 2005). Barvivo Orange G bylo rychleji dekolorizováno v mediu s nízkou koncentrací dusíku, zatímco u RBBR tomu bylo naopak. Za dekolorizaci obou barviv byla pravděpodobně zodpovědná jak MnP, tak lakasa. Pomocí elektronové mikroskopie byly zjištěny značné morfologické změny mycelia kultur *D. squalens* rostoucích v mediu se syntetickými barvivy (Eichlerová a kol. 2007a). Deformace hyf se intenzivněji projevovala při růstu na pevných mediích než v tekutých kulturách a při dekolorizaci RBBR než Orange G. Chander a Arora (2007) měřili dekolorizaci syntetických barviv používaných v průmyslu v přítomnosti enzymových extraktů získaných odfiltrováním mycelia od tekutých kultur *D. squalens*. Maximální dekolorizace všech testovaných barviv bylo dosaženo s použitím extraktu získaného z 6-denních kultur, naopak dekolorizace 10-denním extraktem byla mnohem méně účinná.

3.4. *Irpex lacteus*

I. lacteus (Fr.:Fr.) Fr. (*Polyporus tulipiferae* Schw.) je kosmopolitní houba bílé hniloby kolonizující dřevo mrtvých listnatých stromů (Ryvarden a Gilbertson 1993). Je

schopna produkovat řadu extracelulárních enzymů jako jsou např. celulasy a proteasy (Kanda a kol. 1978, Kobayashi a kol. 1992). Pomocí celulasového systému, který obsahuje endo i exocelulasy, získává *I. lacteus* redukující sacharidy z nativní celulosy (Kanda a Nisizawa 1988). Fylogenetická analýza založená na srovnání sekvencí mitochondriální, ribozomální DNA ukázala, že houba *I. lacteus* je spíše příbuznější čeledi hub *Steccherinaceae*, než jiným houbám bílé hniloby jako např. *B. adusta* a *P. chrysosporium*, které jsou řazeny do čeledi *Polyporaceae* (Ko a Jung 1999, nepublikovaná data dostupná v NCBI databázi).

První informace o produkci ligninolytických enzymů *I. lacteus* přináší studie Novotného a kol. (2000). Houba produkovala LiP, MnP i lakasu v tekutých stacionárních kulturách rostoucích v minerálním mediu se zvýšenou koncentrací dusíku. Naproti tomu v kulturách s nízkou koncentrací dusíku byla detekována výrazně nižší aktivita MnP i lakasy a LiP nebyla produkována vůbec. Produkce ligninolytických enzymů byla měřena i ve sterilní půdě, kde byla zjištěna pouze aktivita LiP a lakasy.

Prvním charakterizovaným ligninolytickým enzymem *I. lacteus* byla LiP produkovaná v aerovaných imobilizovaných kulturách rostoucích v mediu bez manganu (Rothschild a kol. 2002). Chromatografickou izolací byly získány tři izoenzymy LiP, které se lišily v isoelektrických bodech i v katalytických vlastnostech. Analýzou aminokyselinových sekvencí byla zjištěna blízká příbuznost LiP *I. lacteus* s některými isoenzymy LiP z *Phlebia radiata*, *T. versicolor* a *P. chrysosporium*.

MnP *I. lacteus* byla charakterizována Shinem a kol. (2005) a Baborovou a kol. (2006). V prvním případě byl enzym vyizolován z kultur rostoucích v odpadní vodě z textilního průmyslu. Izoelektrický bod získané izoformy byl 3,7 a molekulová hmotnost 38,3 kDa. Srovnání aminokyselinových sekvencí MnP *I. lacteus* ukázalo jen malou podobnost s extracelulárními peroxidasami jiných hub bílé hniloby. Baborová a kol. (2006) purifikovala MnP z tekutých stacionárních kultur rostoucích v MEG mediu. Opět byla získána jedna izoforma MnP s molekulovou hmotností 37,5 kDa a isoelektrickým bodem 3,55. Oxidace substrátů purifikovanou MnP byla detekována pouze v přítomnosti Mn^{2+} a H_2O_2 .

Převážná část lakasové aktivity *I. lacteus* není sekretována do kultivačního media, nýbrž je vázána v houbovém myceliu (Svobodová a kol. 2008). S použitím ultrazvuku lze sice enzym z mycelia uvolnit, ale enzym je po uvolnění nestabilní a během chromatografické separace ztrácí svou aktivitu. Lakasa byla proto charakterizována pouze jako vázaná v myceliu. Na rozdíl od volných lakas jiných hub bílé hniloby vykazuje lakasa

I. lacteus vyšší toleranci k některým inhibitorům a vůči dimethoxyfenolu jako substrátu je aktivní v širším rozmezí pH.

I. lacteus je schopný degradace široké škály perzistentních organopolutantů. V nesterilní půdě, která byla kontaminována pentachlorofenolem, došlo po čtyřtýdenním působení *I. lacteus* k odstranění 86 % fungicidu (Leštan a Lamar 1996). Houba účinně rozkládá polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) jako je pyren, anthracen, fenantren, benz[a]anthracen a fluoranthen v tekutých kulturách i v kontaminované půdě (Hwang a Song 2000, Novotný a kol. 2000, Cajthaml a kol. 2006). Experimenty s purifikovanou MnP ukázaly, že enzym zastává významnou roli v degradaci PAU *I. lacteus*, poněvadž je schopen degradovat aromatické struktury za otevření aromatického cyklu (Baborová a kol. 2006). Kim a Song (2000) studovali degradaci 2,4,6-trinitrotoluenu (TNT) v tekutých kulturách *I. lacteus*, na které se podílelo jak houbové mycelium, tak extracelulární enzymy. Na rozdíl od jiných hub bílé hniloby, jako je např. *P. chrysosporium*, se v případě mineralizace TNT pomocí *I. lacteus* uplatňují společně dvě metabolické dráhy, denitrační dráha a dráha při níž dochází k redukci nitro skupin (Kim a Song 2003). Z osmi testovaných hub bílé hniloby byla zjištěna nejúčinnější degradace endokrinního disruptoru bisfenolu A u *I. lacteus* (Shin a kol. 2007). Během degradace této látky byl v kulturách *I. lacteus* detekován rapidní nárůst aktivity MnP a lakasy, což naznačuje možnou účast obou enzymů v rozkladu bisphenolu A.

Velká pozornost byla *I. lacteus* věnována v souvislosti s dekolorizací syntetických barviv. Screeningové testy na agarových miskách ukázaly, že *I. lacteus* je schopen účinně dekolorizovat široké spektrum strukturně rozdílných syntetických barviv (Novotný a kol. 2001). V tekutých stacionárních kulturách *I. lacteus* byla dekolorizace anthrachinonového, trifenylmethanového a ftalocyaninového barviva účinnější než dekolorizace mono a diazobarviva. Houba byla schopna degradovat anthrachinonové barvivo RBBR jak v tekutých kulturách, tak ve sterilní půdě (Kasinath a kol. 2003). I přes rozdíly v aktivitě extracelulárních ligninolytických enzymů byla v třepaných a stacionárních tekutých kulturách pozorována téměř stejná míra dekolorizace RBBR (Kasinath a kol. 2003). Selektivní inhibicí MnP bylo zjištěno, že enzym je pravděpodobně zodpovědný za dekolorizaci RBBR u stacionárních kultur. Naproti tomu u třepaných kultur, kde byla aktivita MnP výrazně nižší, se předpokládala účast jiných, blíže nespecifikovaných faktorů (Kasinath a kol. 2003). Nízkou korelaci mezi aktivitou ligninolytických enzymů *I. lacteus* a dekolorizací RBBR uvádí také Máximo a Costa-Ferreira (2004). Navíc bylo zjištěno, že produkce MnP a lakasy byla stimulována po přidání azobarviva Reactive Black 5 do

kultivačního media. Shin (2004) zaznamenal korelaci mezi dekolizací textilních barviv a produkcí tzv. nespecifických peroxidáz (NsP) v kulturách *I. lacteus* rostoucích v odpadní vodě z textilního průmyslu. V kultivační tekutině ze stacionárních kultur byly v polyakrylamidovém gelu detekovány minimálně tři NsP proužky, zatímco u třepaných kultur pouze jeden.

Degradace RBBR byla studována také v laboratorním reaktoru s houbou imobilizovanou na polyurethanu a borovicovém dřevě (Kasinath a kol. 2003). Oba typy imobilizovaných kultur barvivo účinně dekolizovaly stejně jako další barviva používaná v textilním průmyslu. Účinnost dekolizace azobarviva RO16 ve třech typech laboratorních reaktorů korelovala se suchou hmotností biomasy *I. lacteus* (Tavčar a kol. 2006). Na základě tohoto zjištění byla vyslovena hypotéza o účasti enzymů vázaných v myceliu na dekolizaci syntetických barviv.

I když z předchozích prací (Kasinath a kol. 2003, Novotný a kol. 2004, Máximo a Costa-Ferreira 2004) nevyplývala žádná korelace mezi MnP aktivitou a dekolizační schopností kultur *I. lacteus*, dekolizační experimenty s purifikovanou MnP *I. lacteus* prokázaly schopnost enzymu degradovat syntetická barviva *in vitro* (Shin a kol. 2005). Nejrychlejší dekolizace byla pozorována u azobarviva Methyl Orange, následovalo trifenylmethanové barvivo Bromophenol Blue a anthrachinonové barvivo RBBR. Svobodová a kol. (2006) potvrdila také, že neionogenní surfaktant Tween 80 stimuluje u třepaných kultur *I. lacteus* produkci MnP, která vede k vyšší dekolizaci azobarviva RO16, přičemž se Tween 80 neúčastnil vlastního dekolizačního procesu. Pomocí LC-MS analýzy byly identifikovány tři intermediáty vznikající při degradaci RO16 imobilizovanými kulturami *I. lacteus* (Svobodová a kol. 2007) s poukazem na možnost degradace aromatického kruhu barviva pomocí MnP detekované v kulturách, jejíž schopnost degradovat aromatické struktury byla potvrzena ve studii degradující PAU (Baborová a kol. 2006). Biodegradace RO16 s účastí *I. lacteus* také výrazně snížila mutagenitu barviva, což bylo prokázáno Amesovým testem (Malachová a kol. 2006). Účinná degradace syntetických barviv se současným snížením biologické toxicity vzorku činí *I. lacteus* vhodným pro použití v reaktorech ve formě celé kultury.

Studie Svobodové a kol. (2008) přinášející informace o lakasové aktivitě vázané v myceliu *I. lacteus* významně ovlivnila interpretaci výsledků dekolizačních experimentů. Protože je naprostá většina lakasy pevně vázaná v myceliu houby a jen velmi malá část je sekretována do kultivačního media, byla korelace mezi aktivitami ligninolytických enzymů měřených v kultivační tekutině a dekolizací barviv nízká anebo

žádná. Bylo však prokázáno, že mycelium *I. lacteus* má na dekolorizaci barviv významný podíl se kterým nebylo v předchozích studiích počítáno.

V kulturách *I. lacteus* dochází rovněž k produkci extracelulárních nízkomolekulárních glykopeptidů s redoxní aktivitou, které katalyzují v kulturách vznik hydroxylových radikálů (Tanaka a kol. 1991). Oxidační aktivita nízkomolekulárních glykopeptidů korelovala v těchto kulturách s degradací dřeva (Tanaka a kol. 1993) a rozšiřuje tak ještě dále spektrum enzymů *I. lacteus*, které by se mohly podílet na degradaci xenobiotik.

3.5. Ligninolytické enzymy jako účinné nástroje pro biodegradaci obtížně rozložitelných organopolutantů

Následující kapitola shrnuje dosavadní poznatky o lignin-degradujících enzýmech dřevokazných hub a jejich přímé účasti v biodegradčních procesech. Pozornost je dále věnována možnostem aplikace ligninolytických enzymů v bioremediacích těžko rozložitelných organopolutantů. Kapitola byla publikována jako samostatná časopisecká práce v Chemických listech: Šušla M., Svobodová K. (2006): Ligninolytické enzymy jako účinné nástroje pro biodegradaci obtížně rozložitelných organopolutantů. Chem. Listy 100: 889-895.

4. VÝSLEDKY

Části této kapitoly byly publikovány formou následujících prací ve vědeckých časopisech s impaktfaktorem, či recenzovaných příspěvků ve sbornících vědeckých konferencí:

- Svobodová K., Šušla M., Vandrovcová M., Pojerová E. (2006): Ligninolytic capacity of two fungi, *Irpex lacteus* and *Dichomitus squalens*, immobilized on solid support. Eds. E. Gidakos et al., *In Protection and restoration of the environment VIII*. 2006-07-03 – 2006-07-07, Chania, Greece, P104.
- Šušla M., Novotný Č., Svobodová K. (2007): The implication of *Dichomitus squalens* laccase isoenzymes in dye decolorization by immobilized fungal cultures. *Bioresour. Technol.* 98: 2109-2115.
- Šušla M., Novotný Č., Erbanová P., Svobodová K. (2008): Implication of *Dichomitus squalens* manganese-dependent peroxidase in dye decolorization and cooperation of the enzyme with laccase. *Folia Microbiol.* – submitted.
- Šušla M., Svobodová K. (2008): Effect of various synthetic dyes on the production of manganese-dependent peroxidase isoenzymes by immobilized *Irpex lacteus*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24: 225-230.

Všechny práce byly vypracovány samostatně pod vedením školitelů. V případě více autorů se Martin Šušla podílel na více jak 90-ti % experimentální části práce a přípravě publikací. Všichni spoluautoři souhlasí se zařazením těchto publikací do této disertační práce.

4.1. Produkce ligninolytických enzymů v imobilizovaných kulturách *D. squalens* a *I. lacteus*

Část kapitoly byla publikována v anglickém jazyce jako součást příspěvku ve sborníku: Svobodová K., Šušla M., Vandrovcová M., Pojerová E. (2006): Ligninolytic capacity of two fungi, *Irpex lacteus* and *Dichomitus squalens*, immobilized on solid support. Eds. E. Gidaracos et al., *In Protection and restoration of the environment VIII*. 2006-07-03 – 2006-07-07, Chania, Greece, P104.

Abstrakt

Práce srovnává aktivity ligninolytických enzymů dvou hub bílé hniloby, *D. squalens* a *I. lacteus*, v tekutých kulturách a v kulturách imobilizovaných na různých pevných materiálech (polyurethan, borovicové dřevo a pšeničná sláma). Imobilizace na borovicovém dřevě signifikantně indukovala syntézu lakasy u *D. squalens*, u *I. lacteus* byla dominantně produkována MIP. Při růstu *I. lacteus* na pšeničné slámě byla stimulována produkce MnP a LiP. V polyurethanových kulturách *D. squalens* byla oproti tekutým kulturám naměřena vyšší aktivita MIP, imobilizace *I. lacteus* na polyurethanu vedla ke zvýšené produkci MnP. U obou hub došlo vlivem vyšší koncentrace dusíku v kultivačním mediu k potlačení syntézy manganperoxidasy, zatímco u lakasy *D. squalens* byl efekt dusíku přesně opačný.

Úvod

Houby bílé hniloby *D. squalens* a *I. lacteus* jsou známy produkcí ligninolytických enzymů, které během růstu sekretují do kultivačního media (Périeré a Gold 1991, Novotný a kol. 2000). Produkce těchto enzymů, které se uplatňují v degradaci řady obtížně rozložitelných látek, byla studována zejména v tekutých kulturách (Eichlerová a kol. 2006, Novotný a kol. 2000, Shin 2004). Cílem této práce bylo přinést nové poznatky o ligninolytických aktivitách obou hub v imobilizovaných kulturách, u nichž se předpokládá možnost praktického využití v biodegradaci organopolutantů.

Materiál a metody

Houby *Irpex lacteus* Fr. 238 617/93 a *Dichomitus squalens* (P. Karst.) Reid CCBAS 750 byly získány z CCBAS sbírky mikroorganismů (Akademie věd České republiky, Praha) a byly uchovávány na MEG agarových miskách (5 g/l malt extrakt, 10 g/l glukosa, 20 g/l agar) při 4°C.

Inokulum pro tekuté a imobilizované kultury bylo připraveno v 250 ml Erlenmayerových baňkách obsahujících 20 ml N-limitovaného minerálního media (Tien a Kirk 1988) a dva agarové disky s myceliem. Po týdenní kultivaci při 28°C byly kultury zhomogenizovány pomocí Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik, Germany) a použity jako inokulum. Tekuté kultury byly připraveny v 250 ml Erlenmayerových baňkách obsahujících 50 ml N-limitovaného minerálního media (Tien a Kirk 1988) a 5 ml zhomogenizovaného inokula. Kultury imobilizované na polyurethanových kostkách a na kostkách z borovicového dřeva byly připraveny v 500 ml Erlenmayerových baňkách se 100 ml N-limitovaného minerálního media. Pro jednu kulturu bylo použito 15 g borovicového dřeva a 3 g polyurethanu promytého horkou destilovanou vodou. Po autoklávování (121°C, 20 min) byly kultury zaočkovány 10 ml inokula a kultivovány 25 dní při 28°C. V experimentu bylo rovněž použito minerální medium s vyšší koncentrací dusíku (5.4 mM vřan diamonný). V průběhu kultivace bylo odebíráno kultivační medium a měřeny enzymové aktivity. Kultury rostoucí v laboratorním reaktoru byly připraveny z imobilizovaných kultur. Poté co houba kolonizovala pevný substrát, byla imobilizovaná houba asepticky přenesena do nádrže cylindrického skleněného reaktoru. Pracovní objem použitého reaktoru byl 0,6 l. Do reaktoru bylo přidáno 150 ml minerálního media, které protékalo reaktorem rychlostí 5 ml/min. Reaktor byl během experimentu aerován pomocí akvarijního aeračního zařízení a byly odebírány vzorky ve kterých byly měřeny enzymové aktivity. Všechny experimenty byly provedeny ve trojím opakování.

Kultury rostoucí na pšeničné slámě byly připraveny ve 100 ml Erlenmayerových baňkách, které obsahovaly 5 g jemně namleté slámy zvlhčené 17 ml deionizované vody. Baňky byly sterilizovány autoklávováním (121°C, 20 min), zaočkovány dvěma agarovými disky kultury a kultivovány při 28°C. Pro extrakci enzymů z kultur bylo použito 30 ml Na-acetátového pufru (100 mM, pH=5,0), který byl přidán ke kolonizované slámě rozstříhané na malé kousky. Enzymy byly extrahovány 3 hodiny při 4°C za občasného třepání. Extrakt byl od pevné fáze oddělen filtrací a ve filtrátu byly měřeny enzymové aktivity (Lang a kol. 1998).

Degradace borovicového dřeva byla hodnocena jako úbytek jeho suché hmotnosti po dvou a šestitýdenní kultivaci dřeva s houbou na MEG agarové misce. Po degradaci bylo z kostek mechanicky odstraněno houbové mycelium, dřevo bylo vysušeno při 105°C a zváženo. V experimentu byly na jednu misku rozmístěny 4 kostky vysušeného (70°C) borovicového dřeva. Výsledná hodnota představuje aritmetický průměr získaný z osmi opakování. V experimentu byly použity kontrolní misky, které nebyly inokulovány houbovou kulturou.

Aktivita lakasy byla měřena pomocí oxidace 5 mM ABTS (Matsmura a kol. 1986). Aktivita MnP a MIP byla měřena s použitím DMAB/MBTH (Vyas a kol. 1994a) a s použitím 2,6-DMP (de Jong a kol. 1994). Aktivita LiP byla měřena podle Tiena a Kirka (1988). Jedna jednotka enzymové aktivity byla definována jako množství enzymu, které oxiduje 1 μ mol substrátu za minutu. Koncentrace glukosy v kultivační mediu byla měřena podle Millera (1959). Koncentrace amonných iontů v kultivační mediu byla měřena N-nitroprusidovou metodou (Botton a Chalot 1991).

Výsledky a diskuse

Houba bílé hniloby *D. squalens* byla kultivována v imobilizované formě na dvou typech nosičů, inertním polyurethanu a neinertním borovicovém dřevě. V kulturách imobilizovaných na dřevě byla pozorována signifikantní indukce lakasy. Aktivita lakasy byla až čtyřicetkrát vyšší ve srovnání s tekutými kulturami (Tab. 1.). Vyšší produkce lakasy v kulturách rostoucích na dřevě ve srovnání s kulturami imobilizovanými na polyurethanu byla zjištěna také u *T. versicolor* (Couto a kol. 2002b). Na rozdíl od lakasy k indukci MnP a MIP *D. squalens* v těchto kulturách nedošlo. Po přenesení kolonizovaného dřeva do reaktoru byla kultura dále schopna produkovat stabilní hladinu lakasy, aktivity MnP a MIP zůstaly během experimentu nízké.

Výsledky experimentů s degradací dřeva na agarových miskách ukázaly, že obě houby jsou schopny borovicové dřevo rozkládat. V případě *D. squalens* byl zjištěn 12 \pm 3% a 23 \pm 5% úbytek hmotnosti dřeva po dvou a šesti týdnech degradace. *I. lacteus* zdegradoval 6 \pm 1 % a 10 \pm 1 % za stejnou dobu. Za pozorovanou indukci lakasy u kultur *D. squalens* by tedy mohly být odpovědné metabolity uvolněné degradací dřeva kulturou.

U kultur imobilizovaných na polyurethanu (PUF LN) byla oproti tekutým kulturám zjištěna vyšší produkce MIP. Vyšší koncentrace dusíku v kultivačním mediu vedla u těchto kultur k potlačení syntézy MIP i MnP (srovnej PUF LN a PUF HN v Tab. 1), ale naopak

došlo k vyšší produkci lakasy. Stejná zjištění u houby *L. edodes* publikoval Buswell a kol. (1995). Z obr. 1 je patrné, že k produkci MnP a MIP pomocí *D. squalens* došlo v kulturách až po vyčerpání dusíku z kultivačního media. Kultury v laboratorním reaktoru byly schopny stabilně produkovat lakasu a MIP.

Tab. 1. Produkce ligninolytických enzymů *D. squalens* v tekutých kulturách (LI), kulturách imobilizovaných na polyurethanu (PUF), borovicovém dřevě (PW) a v laboratorním reaktoru (R) s použitím minerálního media s nízkou (LN) a vysokou (HN) koncentrací dusíku.

Čas (dny)	4	7	9	11	14	18	21	23	25
lakasa (U.l⁻¹)									
PUF LN	7,5±1,3	15,6±4,2	33,9±6,3	41,9±15,7	37,5±8,5	45,0±6,4	36,4±3,5	42,9±10,5	42,3±12,1
PUF LN R	18,6±2,3	21,4±0,2	24,1±0,9	12,7±4,8	17,8±3,8	30,1±0,8	25,0±1,2	27,6±1,1	31,3±0,1
PUF HN	12,4±2,8	40,3±7,7	45,6±12,4	59,0±12,4	51,5±9,4	112,0±7,8	82,9±13,6	104,7±25,0	128,6±10,0
PW LN	217±30,7	613±22,9	988±64,3	785±76,6	905±47,7	735±75,2	760±129,0	918±129,0	1070±164,0
PW LN R	202±3,2	153±6,8	141±2,4	156±2,6	151±3,8	246±9,4	237±7,9	210±18,2	208±6,3
LI LN	2,3±0,9	10,3±2,0	18,4±3,3	27,2±2,8	28,1±2,0	25,1±2,2	27,9±6,8	27,4±2,1	25,1±3,9
MIP (U.l⁻¹)									
PUF LN	2,4±0,3	0,0±0,3	0,0±0,5	8,1±0,3	39,1±1,2	54,9±2,9	45,5±2,3	27,1±1,5	10,7±1,9
PUF LN R	33,1±2,6	56,1±6,2	42,3±3,5	49,4±1,3	54,5±7,6	65,9±5,5	35,7±4,3	45,0±2,9	67,9±5,9
PUF HN	7,5±1,7	2,8±0,6	3,0±0,2	2,8±0,8	5,5±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	12,1±1,7	4,8±2,9
PW LN	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	1,6±0,1	0,0±0,0	2,1±1,1	1,4±0,3
PW LN R	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	6,4±1,3	0,0±0,0	0,0±0,0	2,1±0,6	4,4±0,9	0,0±0,0
LI LN	13,2±6,2	14,1±4,3	4,2±2,7	17,9±2,5	2,3±2,3	4,4±0,9	3,5±0,7	3,1±0,3	1,2±0,1
MnP (U.l⁻¹)									
PUF LN	0,1±0,5	0,0±0,0	0,3±0,5	20,4±2,1	29,9±4,3	31,3±3,4	7,4±3,6	4,5±5,5	24,7±0,7
PUF LN R	10,8±1,3	5,8±0,8	33,7±5,4	7,9±1,9	5,5±1,3	8,1±1,4	11,1±2,7	0,0±0,0	0,0±0,0
PUF HN	0,0±0,0	0,0±0,0	3,6±0,6	3,4±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,7±0,0	0,0±0,0	8,0±0,0
PW LN	0,0±0,0	5,6±5,6	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	14,5±1,8	26,7±5,9	22,6±14,0	0,0±0,0
PW LN R	6,2±0,9	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	5,2±2,1	0,0±0,0	1,2±0,3	2,5±0,2	2,1±0,6
LI LN	20,3±5,5	40,9±1,3	22,9±2,5	32,4±5,2	40,5±4,1	36,4±3,7	27,4±2,5	21,2±5,9	19,1±1,9

Ve srovnání s *D. squalens* byly aktivity lakasy produkované houbou *I. lacteus* nízké. Vyšší lakasová aktivita byla detekována pouze v přítomnosti vyšší koncentrace dusíku u kultur imobilizovaných na polyurethanu (Tab. 2). Ve srovnání s tekutými kulturami vedla imobilizace *I. lacteus* na polyurethanu k vyšší produkci MnP, jejíž syntéza byla stejně jako u *D. squalens* potlačována zvýšenou koncentrací dusíku v kultivačním

mediu. Po vyčerpání dusíku z kultivačního media (obr. 1) byla v kulturách detekována vyšší produkce MnP. PUF kultura *I. lacteus* přenesená do reaktoru byla schopna produkovat MnP, MIP i lakasu. Obr. 2 ukazuje, že spotřeba glukosy u obou hub byla výrazně rychlejší v kulturách s vyšší koncentrací dusíku.

Tab. 2. Produkce ligninolytických enzymů *I. lacteus* v tekutých kulturách (LI), kulturách imobilizovaných na polyurethanu (PUF), borovicovém dřevě (PW), pšeničné slámě (STR) a v laboratorním reaktoru (R) s použitím minerálního media s nízkou (LN) a vysokou (HN) koncentrací dusíku.

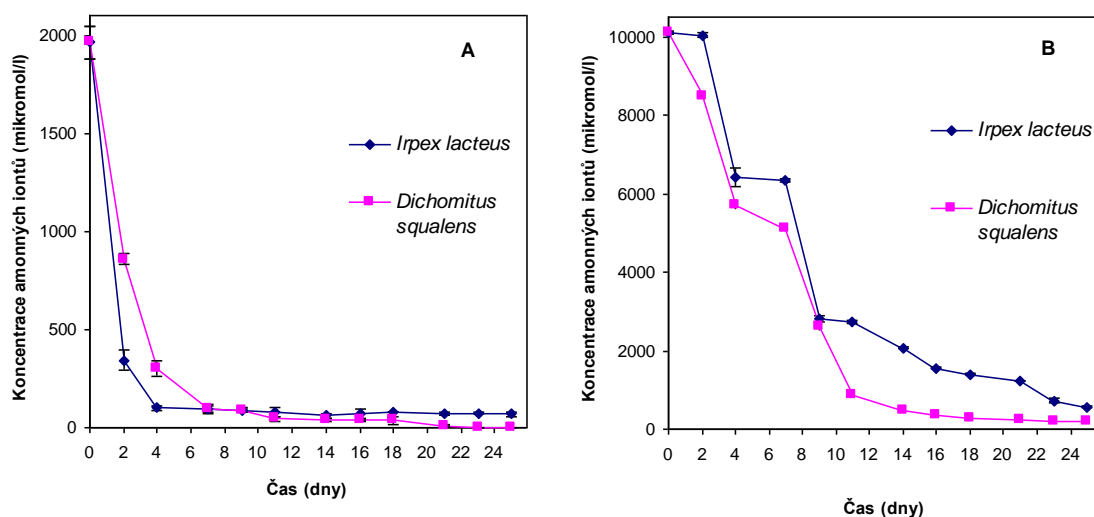
Čas (dny)	4	7	9	11	14	18	21	23	25
lakasa (U.l⁻¹)									
PUF LN	4,5±0,3	4,1±2,0	2,1±0,7	2,7±0,0	1,3±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	1,4±0,1
PUF LN R	4,2±0,2	3,0±0,1	3,3±0,1	4,4±0,2	2,3±0,8	1,2±0,7	4,8±0,1	0,0±0,0	0,0±0,0
PUF HN	2,7±0,8	17,7±3,2	5,1±0,0	17,9±6,6	2,1±0,6	2,9±0,1	3,5±0,1	3,2±0,6	2,9±0,01
PW LN	2,7±0,0	0,0±0,0	1,2±0,4	0,0±0,0	0,6±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
STR		0,3±01			0,4±0,1		0,0±0,0		
LI LN	0,7±0,3	0,8±0,4	0,7±0,6	0,6±0,3	0,5±0,2	0,3±0,3	0,9±0,6	0,7±0,6	0,0±0,0
MIP (U.l⁻¹)									
PUF LN	0,2±0,3	1,6±0,0	0,5±0,0	2,1±0,0	24,2±1,1	10,2±1,5	3,9±2,1	7,1±0,5	7,9±0,1
PUF LN R	9,3±0,1	15,1±0,3	30,3±2,1	21,2±0,8	22,7±8,8	12,5±0,5	13,2±0,4	6,4±0,7	7,7±0,9
PUF HN	3,5±0,1	1,3±0,0	0,0±0,0	4,0±0,0	0,0±0,0	7,4±0,0	7,9±0,0	11,2±1,2	0,0±0,0
PW LN	14,3±4,9	28,3±0,3	16,0±2,6	14,7±1,7	16,2±1,7	10,5±2,8	7,1±0,8	8,3±1,2	13,6±5,0
STR *		0,0±0,0			5,2±0,5		4,1±0,9		
LI LN	0,4±0,1	0,5±0,1	0,4±0,1	1,1±0,3	0,6±0,2	4,9±0,3	10,5±1,2	20,6±2,3	6,9±0,3
MnP (U.l⁻¹)									
PUF LN	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	60,9±1,9	71,8±4,7	52,6±3,9	69,4±0,9	31,5±4,1
PUF LN R	3,4±0,3	3,6±0,3	0,0±0,0	9,6±1,4	14,8±0,3	16,3±0,4	20,5±0,9	10,1±0,9	17,4±2,1
PUF HN	0,0±0,0	0,4±0,0	3,0±0,7	0,3±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	5,4±0,0	0,0±0,0	15,0±1,6
PW LN	0,0±0,0	4,4±0,9	1,7±2,6	3,5±1,8	4,4±2,6	6,4±1,3	3,2±0,1	6±1,9	10,4±4,5
STR *		26,8±3,0			119,6±7,3		55,2±7,0		
LI LN	0,0±0,0	0,1±0,0	0,0±0,0	0,1±0,0	3,2±0,5	0,9±0,2	2,5±0,2	9,6±0,9	15,6±1,2

* aktivita enzymů byla měřena pomocí 2,6-dimethoxyfenolu; u ostatních kultur byl použit DMAB/MBTH

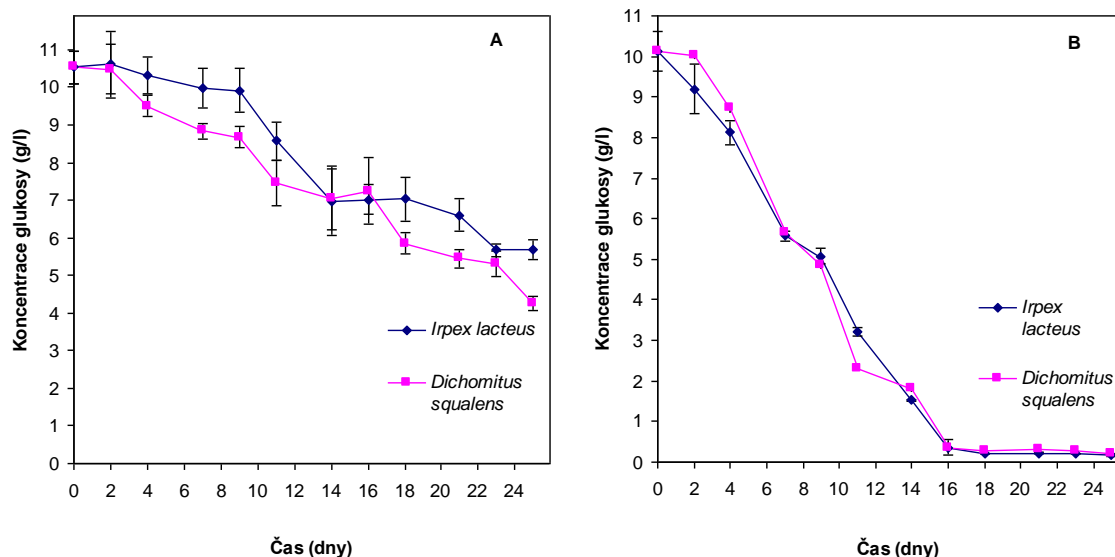
V kulturách *I. lacteus* rostoucích na pšeničné slámě byla účinně indukována produkce MnP. U těchto kultur byla rovněž naměřena aktivita LiP (maximum 24,2±7,0 U/l 21. den kultivace), která nebyla u ostatních typů kultur detekována. Vysoká hladina MnP a výrazně nižší produkce lakasy ve slámových kulturách byla popsána také u *Nematoloma*

frowardii a *D. squalens* (Hofrichter a kol. 1999, Lang a kol. 1998). U houby *Lentinus tigrinus* byla však situace přesně opačná (Lechner a Papinutti 2006).

Obr. 1. Koncentrace amonných iontů v kultivačním mediu kultur *D. squalens* a *I. lacteus* imobilizovaných na polyurethanu. A – kultury s nižší koncentrací dusíku, B – kultury s vyšší koncentrací dusíku.



Obr. 2. Spotřeba glukosy v polyurethanových kulturách *D. squalens* a *I. lacteus* s nízkou (A) a vysokou (B) koncentrací dusíku v kultivačním mediu.



Závěr

Výsledky této práce ukazují rozdíly v produkci ligninolytických enzymů mezi kulturami *D. squalens* a *I. lacteus* kultivovanými v imobilizované formě na různých typech

substrátů. Zatímco u *D. squalens* byla při růstu na borovicovém dřevě pozorována signifikantní indukce lakasy a aktivity MnP i MIP zůstaly nízké, *I. lacteus* produkoval zejména MnP a MIP. V kulturách imobilizovaných na inertním polyurethanu došlo u obou hub ke zvýšení produkce manganperoxidas až po kolonizaci pevného materiálu. Koncentrace dusíku v kultivačním mediu ovlivňovala produkci ligninolytických enzymů v PUF kulturách obou hub stejným způsobem. V přítomnosti vyšší koncentrace dusíku byly aktivity MnP potlačovány, naproti tomu aktivity lakasy byly vyšší. Při růstu *I. lacteus* na pšeničné slámě dochází k indukci MnP a LiP.

4.2. Účast isoenzymů lakasy v dekolorizaci barviv imobilizovanými kulturami *D. squalens*

D. squalens je houba bílé hniloby, která extracelulárně produkuje MnP a lakasu (Périé a Gold 1991). Screeningovými pokusy na agarových miskách bylo zjištěno, že *D. squalens* účinně dekolorizuje řadu strukturně rozdílných syntetických barviv (Gill a kol. 2002). Eichlerová a kol. (2006) uvádí, že *D. squalens* rostoucí na agarových miskách dekolorizoval syntetická barviva i v relativně vysokých koncentracích, což představuje výhodu pro potenciální využití houby v biotechnologiích. Dobrá dekolorizační kapacita *D. squalens* byla prokázána také v tekutých kulturách, kde byla navíc měřena produkce ligninolytických enzymů (Gill a kol. 2002, Eichlerová a kol. 2005). Přesto, že z tekutých kultur *D. squalens* byly vyizolovány a charakterizovány dvě chromatografické formy lakasy (Périé a kol. 1998), informace o podílu enzymu na dekolorizaci barviv chyběly.

Tato kapitola je zaměřena na dekolorizační kapacitu houby *D. squalens* kultivované v imobilizované formě na inertním a lignocelulosovém nosiči. Přináší nové informace o produkci lakasy v kulturách rostoucích na borovicovém dřevě, ze kterých byly vyizolovány pomocí FPLC dvě nové isoformy lakasy. Byla provedena charakterizace získaných isoform a enzymy byly použity k dekolorizačním pokusům *in vitro*. Pozornost je rovněž věnována dlouhodobější dekolorizaci azobarviva RO16, při níž může docházet působením lakasy *D. squalens* ke zpětnému zbarvení vzorku.

Práce byla publikována v anglickém jazyce v časopise *Bioresource Technology*:

Šušla M., Novotný Č., Svobodová K. (2007): The implication of *Dichomitus squalens* laccase isoenzymes in dye decolorization by immobilized fungal cultures. *Bioresour. Technol.* 98: 2109-2115.

4.3. Účast mangan-dependentní peroxidasy *D. squalens* v dekolORIZACI barviv a spolupráce enzymu s lakasou

V experimentech s tekutými kulturami *D. squalens* bylo zjištěno, že za dekolORIZACI syntetických barviv je kromě lakasy pravděpodobně zodpovědná i MnP (Eichlerová a kol. 2005). MnP je u kultur *D. squalens* na rozdíl od lakasy produkována pouze za přítomnosti manganu v kultivačním mediu (Périer a Gold 1991). Z tekutých třepných kultur *D. squalens* byly vyizolovány dvě isoformy MnP, které byly charakterizovány (Périer a kol. 1996). Chromatografické vlastnosti MnP podobné s lakasou však mohou způsobovat obtíže při izolaci MnP z tekutých kultur *D. squalens* (Li a kol. 2001). S tímto ohledem byla produkce tohoto enzymu dále studována v tekutých kulturách s použitím různých minerálních a komplexních medií (Gill a Arora 2003).

V této práci byla MnP vyizolována z kultur *D. squalens* rostoucích na pšeničné slámě. Lang a kol. (1998) ukázali, že kultivace *D. squalens* na pšeničné slámě způsobuje signifikantní indukci MnP, avšak produkce lakasy zůstává v těchto kulturách nízká, což představuje optimální podmínky pro purifikaci enzymu z kultur. Získaný enzym byl charakterizován a byla testována jeho dekolORIZAČNÍ kapacita ve srovnání s lakasou *D. squalens* získanou z kultur imobilizovaných na borovicovém dřevě. Tato kapitola je dále zaměřena na účast MnP *D. squalens* v dekolORIZACI syntetických barviv *in vitro* a možnou spolupráci enzymu s lakasou – dekolORIZACE barviv *in vitro* byla proto měřena také za přítomnosti obou enzymů v reakční směsi. Pozornost byla dále věnována indukci ligninolytických enzymů lignocelulosovými substráty v kulturách *D. squalens*. Bylo prokázáno, že lakasa je u *D. squalens* indukována látkami extrahovanými methanolem ze slámy i borovicového dřeva, zatímco v indukci MnP hraje větší roli způsob kultivace houby.

Práce v anglickém jazyce byla odeslána k publikaci v časopise *Folia Microbiologica*:

Šušla M., Novotný Č., Erbanová P., Svobodová K. (2008): Implication of *Dichomitus squalens* manganese-dependent peroxidase in dye decolorization and cooperation of the enzyme with laccase. *Folia Microbiol.* – submitted.

4.4. Vliv různých syntetických barviv na produkci isoenzymů mangan-dependentní peroxidasy v imobilizovaných kultrách *I. lacteus*

MnP *I. lacteus* je jedním z ligninolytických enzymů produkovaných touto houbou, který se přímo účastní degradace syntetických barviv (Svobodová a kol. 2006). Doposud byly známy dvě izoformy MnP s rozdílnými pI, které byly vyizolovány z tekutých stacionárních kultur (Shin a kol. 2005, Baborová a kol. 2006). Faktory ovlivňující produkci MnP v houbových kulturách mohou být mangan a aromatické sloučeniny zahrnující i některá syntetická barviva (Hakala a kol. 2006, Swamy a Ramsay 1999). Bylo zjištěno, že přítomnost některých syntetických barviv v kultivační mediu stimuluje produkci MnP *I. lacteus* (Máximo a Costa-Ferreira 2003). Imobilizace houby na pevném substrátu je dalším z faktorů, který může ovlivňovat syntézu MnP (Rogalski a kol. 2006).

Výsledky prezentované v této kapitole přinášejí nové informace o produkci isoform MnP v imobilizovaných kulturách *I. lacteus*. Pozornost je věnována změnám isoenzymového profilu MnP v průběhu kultivace v mediu s různou koncentrací manganu, vlivu strukturně rozdílných syntetických barviv na produkci MnP a dekolorizační kapacitě kultivační tekutiny s různým zastoupením MnP isoform.

Práce prezentovaná v podkapitole „4.4.1. Sledování produkce enzymu, jeho IEF analýza a dekolorizační schopnost“ byla publikována v časopise World Journal of Microbiology and Biotechnology:

Šušla M., Svobodová K. (2008): Effect of various synthetic dyes on the production of manganese-dependent peroxidase isoenzymes by immobilized *Irpex lacteus*. World J. Microbiol. Biotechnol. 24: 225-230.

4.4.1. Sledování produkce enzymu, jeho IEF analýza a dekolorizační schopnost

4.4.2. Charakterizace MnP isoform pomocí nativní PAGE

Úvod

Cílem této studie bylo charakterizovat barvivy nově indukované formy MnP *I. lacteus* co se týče jejich molekulové hmotnosti a doplnit tak předchozí IEF analýzu.

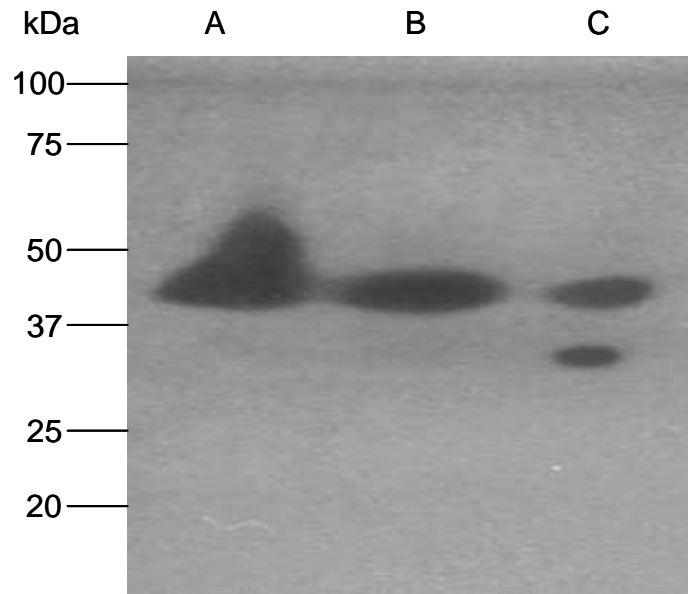
Materiál a metody

Vzorky kultivační tekutiny z 10-ti a 27 denních semi-solid-state kultur *I. lacteus* (kultivovaných bez a s barvivem BPB), které byly použity k dekolorizaci barviv RBBR a BPB *in vitro*, byly rovněž analyzovány pomocí nativní PAGE. Po zakoncentrování pomocí Amicon Ultra-4 (10 kDa cut off, Millipore) bylo na gel nanášeno 10 µl každého vzorku o aktivitě MnP 700 U/l. PAGE byla provedena s použitím 10% polyacrylamidového gelu. Gel byl aktivně barven pomocí 1 mM ABTS v přítomnosti 1 mM MnSO₄, 0,5 mM H₂O₂ v 50 mM Na-malonátovém pufru (pH=4,5). Rovněž bylo provedeno kontrolní barvení pro lakasovou aktivitu bez přítomnosti manganu a H₂O₂ v barvicí směsi.

Výsledky a diskuse

Pomocí nativní PAGE bylo zjištěno, že v kulturách *I. lacteus* rostoucích bez přítomnosti barviva BPB jsou produkovány isoformy MnP s podobnou molekulovou hmotností kolem 45 kDa (obr. 1). Naproti tomu u kultur rostoucích v přítomnosti BPB byly detekovány isoformy MnP s různou molekulovou hmotností (přibližně 34 a 45 kDa). V kulturách *I. lacteus* rostoucích v přítomnosti BPB tedy dochází nejen k produkci isoform MnP s odlišnou hodnotou pI (viz. kapitola 4.4.1.), ale isoformy se liší také v molekulové hmotnosti.

Obr. 1. Profil isoformů MnP *I. lacteus* v kultivačním mediu s vyšší koncentrací manganu získaný pomocí nativní PAGE a barvení s použitím ABTS. A – 10-ti denní kultura, B – 27 denní kultura, C – 27 denní kultura s 25 mg/l BPB.



4.5. Dekolorizace vybraných azobarviv myceliem *I. lacteus*

Abstrakt

Cílem této práce bylo přinést nové informace o schopnosti mycelium-vázané lakasy *I. lacteus* dekolorizovat vybraná azobarviva a srovnat získaná data s dekolorizací barviv pozorovanou u *D. squalens*. Dekolorizace byla měřena spektrofotometricky po dobu 72 hodin. Získaná UV-Vis spektra ukázala, že ani při dlouhodobém působení lakasy *I. lacteus* nedochází k nežádoucímu zpětnému kolorizování vzorku. V přítomnosti MnP a mycelia *I. lacteus* bylo pozorováno aditivní působení enzymů v dekolorizaci azobarviva RO16.

Úvod

Azobarviva představují největší skupinu syntetických barviv používaných v textilním průmyslu (Zollinger 1991). Houby bílé hniloby jsou díky produkci ligninolytických enzymů schopny tyto rekalcitrantní polutanty účinně degradovat. V souvislosti s biodegradací azobarviv patří k nejvíce studovaným enzymům lakasa a MnP (Wesenberg a kol. 2003). Přesto, že existuje řada studií o degradaci azobarviv lakasou, jen velmi málo z nich se zaměřuje na nežádoucí polymerizaci degradačních produktů navzájem nebo s nedegradovaným barvivem a následné zabarvení vzorku, ke kterému může docházet při dlouhodobějším enzymatickém působení (Zille a kol. 2005a). Cílem této práce bylo přinést informace o dlouhodobé dekolorizaci azobarviv mycelium-vázanou lakasou *I. lacteus* a zjistit, zda při této degradaci dochází ke zpětné kolorizaci vzorků, která byla zjištěna u nevázaných lakas jiných hub (Zille a kol. 2005a, Šušla a kol. 2007). Dále byla studována degradace modelového azobarviva RO16 kombinovaným působením lakasy a částečně purifikované MnP *I. lacteus*.

Materiál a metody

Mycelium *I. lacteus* bylo získáno z dvaceti čtyř denních stacionárních tekutých kultur rostoucích v minerálním Kirkově mediu (Tien a Kirk 1988). Kultivace *I. lacteus* a příprava mycelia byla provedena podle Svobodové a kol. (2008).

MnP byla izolována z kultur *I. lacteus* imobilizovaných na polyurethanu po patnácti dnech kultivace. Kultivace byla provedena v přítomnosti 2,9 mM Mn (II). Příprava kultur a

kultivační podmínky byly shodné s publikací Šušly a Svobodové (2008) – viz. kapitola 4.4.1. této práce. Kultivační tekutina byla filtrací oddělena od mycelia, zakoncentrována a odsolena na kolonách Sephadex G25 (Pharmacia, Švédsko). Po odsolení byl vzorek nanesen na kolonu Sepharose DEAE (Amersham Biosciences, Švédsko) a vymýván gradientem Na-acetátu (10 mM - 1 M Na-acetát, pH=6,0). Frakce s nejvyšší MnP aktivitou byla použita pro dekolorizační experimenty *in vitro*.

Aktivita lakasy v myceliu byla měřena oxidací 5 mM ABTS podle Svobodové a kol. (2008) a byla vyjádřena jako jednotky enzymové aktivity na miligram suché váhy houbového mycelia. Aktivita MnP byla měřena podle de Jong a kol. (1994).

V dekolorizačních experimentech byla použita následující azobarviva: Reactive Orange 16 (RO16) $\lambda_{\max}=494$ nm, Remazol Brilliant Violet 5R (RBV5R) $\lambda_{\max}=558$ nm, Chicago Sky Blue (CSB) $\lambda_{\max}=618$ nm a Remazol Schwarz B (RSB) $\lambda_{\max}=597$ nm. Všechna barviva byla zakoupena od Sigma (USA).

Reakční směs pro dlouhodobé experimenty s myceliem *I. lacteus* obsahovala 50 mM Na-malonátový pufr (pH=4,5), 150 mg/l barviva a 80 mU lakasy v myceliu ve finalním objemu 1 ml. UV-Vis analýza degradace azobarviv byla provedena na počátku experimentu a v časech 7, 24 a 72 hodin. Absorbance byla měřena po 2 nm v rozmezí vlnových délek 200-700 nm s použitím ELISA Reader SPECTRAMaxPLUS³⁸⁴ (Molecular Devices, USA).

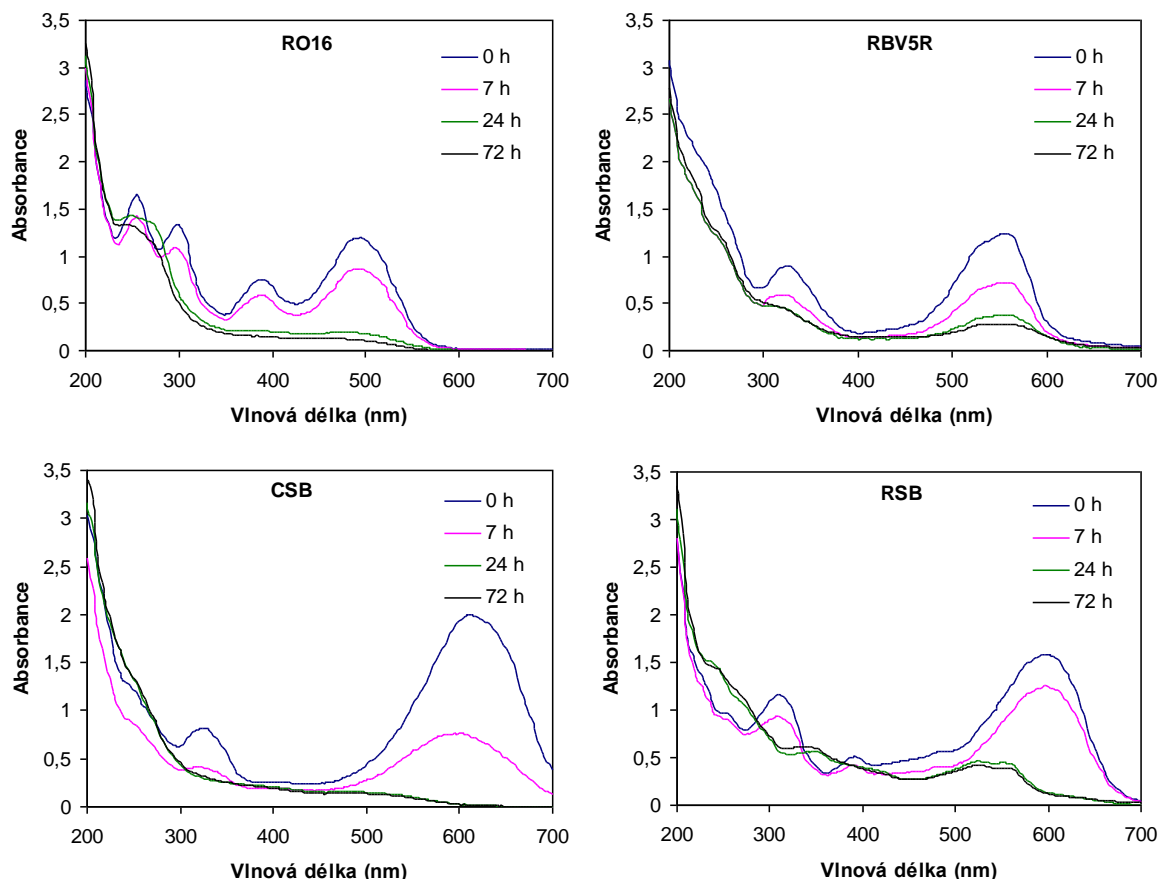
Reakční směs pro dekolorizaci pomocí MnP v kombinaci s myceliem obsahovala 50 mM Na-malonátový pufr (pH=4,5), 150 mg/l barviva, 1 mM MnSO₄, 0,5 mM H₂O₂, 60 mU lakasy a/nebo 50 mU částečně purifikované MnP ve finalním objemu 1 ml. Absorbance barviva v reakční směsi byla měřena na počátku experimentu a v časech 1; 1,5; 2 a 5 hodin. Výsledná dekolorizace byla vypočtena jako rozdíl mezi dekolorizací aktivními enzymy a dekolorizací tepelně inaktivovaným myceliem a MnP (70°C přes noc a 10 min při 100°C).

Výsledky a diskuse

Houba bílé hniloby *I. lacteus* produkuje v tekutých kulturách LiP, MnP a lakasu (Novotný a kol. 2000, 2004). Bylo prokázáno, že *I. lacteus* účinně dekolorizuje řadu strukturně rozdílných syntetických barviv (Novotný a kol. 2001, Kasinath a kol. 2003), avšak korelace mezi dekolorizací a aktivitou ligninolytických enzymů měřených v kultivačním mediu byla nízká anebo žádná (Máximo a Costa-Ferreira 2004, Novotný a

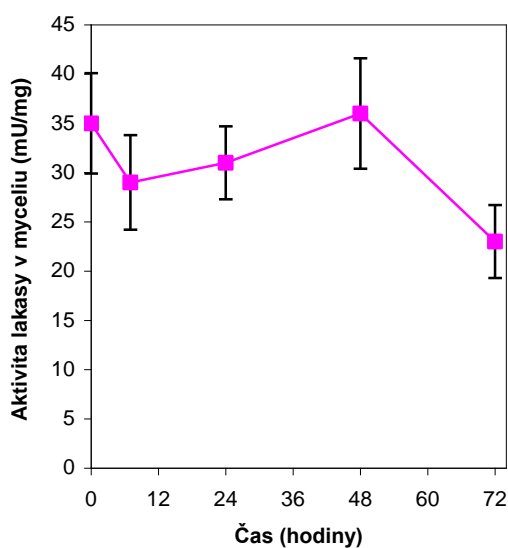
kol. 2004). Experimenty s purifikovanou MnP prokázaly schopnost enzymu dekolorizovat vybraná syntetická barviva *in vitro* (Shin a kol. 2005, Svobodová a kol. 2006). Nedávno bylo zjištěno, že významnou roli v dekolorizaci barviv *I. lacteus* hraje lakasa, která není sekretována do kultivačního media, ale je vázaná na houbové mycelium (Svobodová a kol. 2008).

Obr. 1. UV-Vis spektra azobarviv během dlouhodobé degradace myceliem *I. lacteus*.



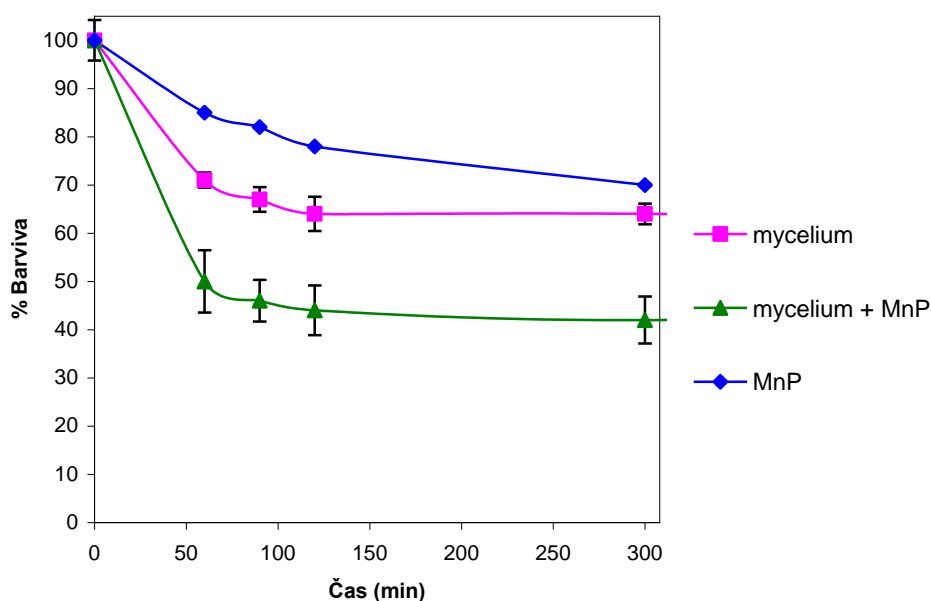
Mycelium *I. lacteus* s lakasovou aktivitou účinně dekolorizovalo všechna testovaná azobarviva. Za 24 h bylo odbarveno 86 % RO16, 70 % RBV5R, 100 % CSB a 92 % RSB. Během 72 h nebyla ani v jednom případě detekována zpětná kolorizace vzorku (obr. 1). Při degradaci RSB myceliem bylo barvivo metabolizováno na barevný meziprodukt s absorpčním maximem $\lambda=524$ nm, který nebyl rozložen ani po 72 h (obr. 1). V průběhu dlouhodobého dekolorizačního experimentu byla měřena aktivita lakasy v myceliu v kontrolních vzorcích neobsahujících barvivo. Z obr. 2 je zřejmé, že vázaný enzym byl v reakční směsi aktivní i po 72 h.

Obr. 2. Aktivita lakasy vázané v myceliu *I. lacteus* během 72-hodinového dekolorizačního experimentu.



Z imobilizovaných kultur *I. lacteus* byla pomocí DEAE Sepharosy získána částečně purifikovaná MnP, která byla použita k dekolorizačním experimentům *in vitro* s barvivem RO16. Samotná MnP dekolorizovala $30 \pm 0,5$ % barviva za 5 h. Přibližně stejná totální aktivita lakasy v myceliu dekolorizovala za stejný čas 36 ± 2 % barviva a kombinovaným působením obou enzymů bylo odbarveno 58 ± 5 % barviva (obr. 3).

Obr. 3. Dekolorizace azobarviva RO16 částečně purifikovanou MnP, myceliem a kombinací MnP a mycelia *I. lacteus*.



Výsledky experimentů s použitím obou enzymů znamenají, že příspěvek MnP a mycelia v degradaci RO16 je spíše aditivní než synergický, na rozdíl od výsledků naměřených s enzymy *D. squalens* (Šušla a kol. submitted, kapitola 4.3.). Aditivní efekt MnP a lakasy při dekolizaci azobarviva byl zjištěn rovněž u *T. versicolor* (Champagne a Ramsay 2005).

Schopnost MnP a lakasy *I. lacteus* dekolizovat azobarvivo RO16 byla dříve popsána Svobodovou a kol. (2006, 2008), nicméně degradace barviva v přítomnosti obou enzymů, které jsou běžně produkovány v tekutých kulturách, studována nebyla. Tato práce prokázala, že lakasa vázaná v myceliu *I. lacteus* je schopna dekolizovat strukturně rozdílná azobarviva a ani při dlouhodobém působení nedochází k nežádoucímu zpětnému zabarvení vzorku. Dekolorizace azobarviva RO16 v přítomnosti MnP a lakasy odhalila, že příspěvek každého z enzymů k dekolizaci je aditivní. Z tohoto důvodu je k degradaci azobarviv vhodné použít celou houbovou kulturu, která produkuje jak lakasu, tak MnP.

5. DISKUSE

Houby bílé hniloby *D. squalens* a *I. lacteus* byly v posledních letech studovány zejména v souvislosti s degradací organopolutantů v tekutých kulturách, kde prokázaly vysokou degradační kapacitu (Novotný a kol. 2001, Eichlerová a kol. 2006). Imobilizace hub na pevném nosiči představuje jednu z možností, jak využít degradační potenciál těchto mikroorganismů v praxi např. pro kontinuální degradaci rekalcitrantních syntetických barviv v bioreaktorech (Couto a kol. 2006). Ukazuje se však, že mezi tekutými a imobilizovanými kulturami hub bílé hniloby mohou existovat rozdíly v syntéze ligninolytických enzymů, které ovlivňují efektivitu degradace (Lobos a kol. 1994, Janse a kol. 1998). Výsledky předkládané v této práci přinášejí nové informace o produkci ligninolytických enzymů *D. squalens* a *I. lacteus* kultivovaných v imobilizované formě na inertním a lignocelulosovém substrátu a o účasti těchto enzymů v dekolorizaci syntetických barviv.

Imobilizace na inertním polyurethanovém nosiči ukázala rozdíly v syntéze ligninolytických enzymů mezi oběma mikroorganismy (kapitola 4.1., Tab. 1 a 2). U *D. squalens* došlo vlivem imobilizace k vyšší produkci MIP, zatímco u *I. lacteus* byla signifikantně indukována MnP. Ani u jedné houby nebyly detekovány prokazatelné rozdíly v aktivitě lakasy mezi tekutými a imobilizovanými kulturami. Naproti tomu u kultur *B. adusta* imobilizovaných na stejném nosiči byla zjištěna výrazně vyšší produkce všech sledovaných ligninolytických enzymů (Nakamura a kol. 1999). Nadbytek dusíku v kultivačním mediu stimuloval produkci lakasy a naopak inhiboval tvorbu MnP v imobilizovaných kulturách obou hub. Stejný efekt dusíku na syntézu ligninolytických enzymů byl popsán také u jiných hub bílé hniloby (Li a kol. 1994, Buswell a kol. 1995), přesto že např. u *Pleurotus pulmonarius* byla lakasa syntetizována až po vyčerpání dostupného dusíku (De Souza a kol. 2004).

Kultivace *D. squalens* na borovicovém dřevě vedla k signifikantní indukci lakasy na rozdíl od MnP a MIP, jejichž aktivity byly v imobilizovaných kulturách ve srovnání s tekutými kulturami nižší. Je známo, že při růstu hub bílé hniloby na dřevě může docházet k indukci syntézy ligninolytických enzymů. Studie s *Ganoderma lucidum* ukázala, že druh dřeva ovlivňuje, které enzymy budou indukovány (D'Souza a kol. 1999). MnP *G. lucidum*

byla indukována v kulturách rostoucích na topolovém dřevě, ale nikoli na borovicovém dřevě, zatímco u lakasy tomu bylo naopak. Podobně u *P. ostreatus* byla naměřena výrazně vyšší aktivita MnP u kultur imobilizovaných na topolovém dřevě než na jedlovém dřevě (Giardina a kol. 2000). V obou případech byla produkce MnP při růstu hub na dřevě jehličnatých stromů velmi nízká, což je v souladu s výsledky získanými s *D. squalens* a *I. lacteus*. Naproti tomu u *Physisporinus rivulosus* byla na smrkových hoblinách dominantně produkována MnP (Hakala a kol. 2005). Imobilizace hub na dřevě způsobuje nejen změny v totálních aktivitách ligninolytických enzymů, ale ovlivňuje také isoenzymovou skladbu. Srovnání tekutých kultur *P. chrysosporium* s kulturami rostoucími na osikovém dřevě odhalilo rozdíly v expresi genů kódujících ligninolytické enzymy (Janse a kol. 1998). V imobilizovaných kulturách *Ceriporiopsis subvermispora* byly detekovány jiné isoenzymové profily než v tekutých kulturách (Lobos a kol. 1994). Výsledky této práce (kapitola 4.2.) ukazují, že při růstu *D. squalens* na borovicovém dřevě dochází k produkci dvou lakasových isoform, které se liší od isoform vyizolovaných z tekutých kultur (Périé a kol. 1998).

Experimenty na agarových miskách prokázaly, že *D. squalens* degraduje borovicové dřevo dvakrát rychleji než *I. lacteus* (kapitola 4.1.). *D. squalens* patří mezi nejselektivnější rozkladače ligninu, jehož obsah se u dřeva jehličnatých stromů pohybuje okolo 30 % (Martin 1998). Signifikantní degradace ligninu *D. squalens* v jedlových hoblinách byla potvrzena infračervenou spektroskopií (Fackler a kol. 2006). Přidání methanolového extraktu ze dřeva k tekutým kulturám *D. squalens* rovněž indukovalo produkci lakasy, zatímco dřevo po extrakci indukční efekt ztratilo (kapitola 4.3.), což dokládá, že lakasovým induktorem jsou pravděpodobně fenolické látky, které jak uvádí Martínez a kol. (2005), jsou extrahovatelné ze dřeva organickým rozpouštědlem.

Zastoupení ligninolytických enzymů v kulturách rostlých na pšeničné slámě, dalším neinertním lignocelulosovém materiálu, bylo zcela odlišné od kultur rostoucích na borovicovém dřevě (kapitola 4.1. a 4.3.). Obě houby produkovaly jako dominantní enzym MnP. U *I. lacteus* byla navíc detekována aktivita LiP. Imobilizovaný *D. squalens* produkoval jiné isoformy MnP (kapitola 4.3.) než při růstu v tekutých kulturách (Périé a kol. 1996). Podobná zjištění byla publikována také u *Phlebia radiata* a *N. frowardii* (Vares a kol. 1995, Hofrichter a kol. 1999). V přítomnosti minerálního media nebyla u slámových kultur *D. squalens* indukována MnP, ale lakasa. Produkce ligninolytických enzymů je tedy závislá nejen na použitém imobilizačním substrátu, ale také na způsobu kultivace houby,

což dokládají studie s *P. chrysosporium* a *L. edodes* (Fujian a kol. 2001, Elisashvili a kol. 2008).

Expresí ligninolytických enzymů u hub a zastoupení jejich jednotlivých isoform jsou regulovány i řadou dalších faktorů mezi něž patří ionty kovů, jako jsou Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} (Gettemy a kol. 1998, Cohen a kol. 2001, Manubens a kol. 2003), organické kyseliny (Mester a Field 1997) a aromatické sloučeniny (Scheel a kol. 2000, Manubens a kol. 2003, Pérez a kol. 1998, De Souza a kol. 2004). Regulace často probíhá na úrovni transkripce a projevuje se rozdílným isoenzymovým složením enzymového aparátu hub. V tekutých kulturách *C. subvermispora* docházelo se zvyšující se koncentrací Mn^{2+} k produkci isoenzymů MnP s vyššími hodnotami isoelektrických bodů (Lobos a kol. 1994). Naproti tomu, u imobilizovaných kultur *I. lacteus* indukovala vyšší koncentrace Mn^{2+} syntézu isoform s nižším pI (kapitola 4.4.1., Tab. 2). Skladba isoform MnP v kulturách se zvýšenou koncentrací Mn^{2+} byla ovlivněna také přítomností syntetických barviv, která inhibovala produkci isoform s nízkým pI. Studie s *P. rivulosus* dokládá, že produkce isoform MnP je regulována multifaktoriálně (Hakala a kol. 2006). Isoenzymové profily MnP se v této studii lišily jak v kulturách obsahujících Mn^{2+} nebo veratrylalkohol, tak v kulturách obsahujících oba induktory zároveň. Multifaktoriální regulace syntézy MnP byla zjištěna také u *I. lacteus*, kdy došlo k produkci nové isoformy, odlišující se v pI ale i v molekulové hmotnosti (kapitola 4.4.1., Tab. 2 a kapitola 4.4.2., obr. 1), pouze v přítomnosti trifenylmethanového barviva BPB a vysoké koncentrace Mn^{2+} . BPB způsobilo v imobilizovaných kulturách *I. lacteus* také signifikantní zvýšení celkové hladiny MnP oproti kontrole. Podobný indukční efekt syntetických barviv na syntézu ligninolytických enzymů byl rovněž pozorován u *Phanerochaete sordida* a *T. versicolor* (Harazono a kol. 2003, Swamy a Ramsay 1999a).

Vzhledem k rozdílné substrátové specifitě isoenzymů má zastoupení isoform v kultivačním mediu také vliv na dekolorizaci syntetických barviv. Ollikka a kol. (1993) uvádějí, že isoenzymy LiP *P. chrysosporium* dekolorizují syntetická barviva *in vitro* s různou účinností. S použitím ABTS a guajakolu jako substrátů byly nalezeny rozdíly v substrátové specifitě mezi čtyřmi lakasovými isoenzymy *P. ostreatus* syntetizovanými v tekutých třepaných kulturách (Mansur a kol. 2003). Vzájemný poměr dvou isoenzymů lakasy pak hrál významnou roli v účinnosti dekolorizace barviva Indigo carmine v kulturách *T. versicolor* (Lorenzo a kol. 2006). V imobilizovaných kulturách *I. lacteus* byla míra dekolorizace barviv závislá na skladbě isoform MnP (kapitola 4.4.1., obr. 3). Nejrychlejší dekolorizace bylo dosaženo působením isoform produkovaných v první

třetině kultivace. Na konci kultivace, kdy došlo k výrazným změnám profilu isoform, byla dekolorizace barviv pomalejší. Různá substrátová specifita byla zjištěna také mezi dvěma lakasovými isoformami vyizolovanými z imobilizovaných kultur *D. squalens* (kapitola 4.2.). Tyto isoformy se lišily ve schopnosti dekolorizovat syntetická barviva *in vitro*, kdy navíc pouze isoforma Lc1 vykazovala schopnost zpětně polymerizovat degradační produkty vzniklé rozkladem azobarviva RO16.

Reálná účast enzymů *D. squalens* v dekolorizaci syntetických barviv byla studována za *in vivo* podmínek s imobilizovanými houbovými kulturami v laboratorním reaktoru. Míra dekolorizace pozorovaná u reaktorových kultur byla závislá na struktuře syntetického barviva (kapitola 4.2.). Ftalocyaninové barvivo CuP prokázalo značnou odolnost k degradaci jak celou houbovou kulturou, tak separovanou kultivační tekutinou i purifikovanou lakasou. Barvivo je ale např. dobře odbarvováno v kulturách *I. lacteus* (Svobodová a kol. 2006).

Dekolorizace anthrachinonového barviva RBBR probíhala s vysokou účinností v reaktorových kulturách s vysokou aktivitou lakasy (PW reaktor). Účast lakasy *D. squalens* v dekolorizaci barviva byla potvrzena v *in vitro* experimentech s kultivační tekutinou a purifikovaným enzymem. Podobná účinnost dekolorizace byla pozorována v PUF reaktoru s výrazně nižší lakasovou aktivitou a srovnatelnou aktivitou MnP. Obdobně dekolorizaci RBBR pozorovala Kasinath a kol. (2003) v PUF kulturách *I. lacteus* s MnP aktivitou. Na základě *in vivo* experimentů s *D. squalens* a *in vitro* dekolorizací purifikovanými enzymy (kapitola 4.3.) lze tedy usuzovat na účast obou enzymů v degradaci RBBR a jejich vzájemnou spolupráci.

Degradace azobarviva RO16 pomocí *D. squalens* probíhala rychleji v laboratorním reaktoru s PUF kulturami i přes několika násobně vyšší aktivitu lakasy v PW reaktorech, z čehož by bylo možné usuzovat, že samotná lakasa pravděpodobně nebyla zodpovědná za pozorovanou dekolorizaci RO16. Navíc barvivo nebylo dekolorizováno ani v *in vitro* experimentech jak s izolovanou lakasou tak s MnP. Avšak použití obou izolovaných enzymů v jedné reakční směsi vedlo k limitované dekolorizaci RO16. Při degradaci barviva celými kulturami tak pravděpodobně může hrát určitou roli spolupráce obou enzymů, ale současně se procesu dekolorizace účastní i další mechanismy, které by mohly zahrnovat jiné oxidativní enzymy či hydroxylové radikály.

Srovnání dekolorizační kapacity ligninolytických enzymů *D. squalens in vitro* odhalilo, že MnP dekolorizuje vybraná syntetická barviva rychleji než lakasa na jednotku enzymové aktivity (kapitola 4.3.). Navíc bylo zjištěno, že MnP účinně dekolorizuje

azobarvivo RBV5R na rozdíl od lakasy, která barvivo neodbarvuje vůbec. Rozdíly v dekolorizaci mezi oběma enzymy mohou souviset s hodnotami redoxních potenciálů, které jsou u peroxidas hub bílé hniloby zpravidla vyšší než u lakas (Leonowicz a kol. 2001). Účinnější dekolorizace azobarviv MnP ve srovnání s lakasou byla popsána také u *T. versicolor* (Champagne a Ramsay 2005). Přítomnost redoxního mediátoru HBT vedla k rychlejší dekolorizaci barviv lakasou *D. squalens* a umožnila účinně dekolorizovat i jinak obtížně degradovatelné barvivo RO16 (kapitola 4.2.).

Přestože lakasy hub bílé hniloby účinně dekolorizují strukturně rozdílná syntetická barviva *in vitro* (Abadula a kol. 2000, Baldrian 2004), může během dlouhodobého enzymatického působení docházet k nežádoucímu zabarvení vzorku vlivem polymerizace vzniklých meziproductů mezi sebou nebo s nedegradovaným barvivem (Zille a kol. 2005a). Tato vlastnost snižuje použití lakas jako biodegradačního agens v praxi. Murugesan a kol. (2007) uvádí, že inaktivace lakasy *G. lucidum* pomocí azidu sodného nebo tepla po dekolorizaci azobarviva Remazol Black 5 zabraňuje vzniku tmavě hnědých produktů objevujících se po delší době v reakční směsi. Zpětné zabarvení reakční směsi obsahující azobarvivo bylo pozorováno také v experimentech s lakasou Lc1 *D. squalens* (kapitola 4.2.). K opětovnému zabarvení vzorku však nedošlo, pokud byla ve směsi navíc přítomna MnP (kapitola 4.3.). Kombinované působení ligninolytických enzymů tak představuje další způsob, jak se vyhnout nežádoucímu zpětnému zabarvení. Při degradaci azobarviv myceliem *I. lacteus* obsahujícím vázanou lakasu nedochází k následnému vzniku barevných produktů vůbec a to i přes to, že je enzym v myceliu dlouhodobě aktivní. Zde je však možné, že se dekolorizačního procesu účastní také další myceliální enzymy, či přirozené redoxní mediátory, které brání polymerizaci vzniklých intermediátů.

Jiný příklad vzájemné kooperace ligninolytických enzymů byl popsán v případě lakasy houby *Stropharia rugosoannulata*, která oxiduje v přítomnosti organických chelátorů Mn^{2+} na Mn^{3+} , což vede prostřednictvím několika následných reakcí ke vzniku peroxidu vodíku, který je využíván MnP (Schlosser a Höfer 2002). Galliano a kol. (1991) uvádí, že degradace ligninu houbou bílé hniloby *Rigidoporus lignosus* probíhala extensivně za současného působení MnP a lakasy, ale samotná MnP ani lakasa lignin nedegradovala. Synergické působení MnP a lakasy bylo pozorováno také při dekolorizaci syntetických barviv *D. squalens* (kapitola 4.3., obr. 4). Přesto, že samotná lakasa *D. squalens* způsobuje v přítomnosti redoxního mediátoru rekolorizaci vzorku obsahujícího azobarvivo, při společném působení MnP a lakasy k tomu jevu nedochází. Na rozdíl od

enzymů *D. squalens* byl příspěvek MnP a mycelia *I. lacteus* v dekolizaci azobarviva RO16 aditivní (kapitola 4.5.) podobně jako u *T. versicolor*, kde během dekolizace pravděpodobně nedocházelo k interakci mezi MnP a lakasou (Champagne a Ramsay 2005).

Výsledky této práce dokládají schopnost imobilizovaných kultur *D. squalens* a *I. lacteus* produkovat ligninolytické enzymy, které se přímo účastní dekolizace syntetických barviv. Imobilizace hub na pevných substrátech ovlivňuje syntézu ligninolytických enzymů i skladbu jednotlivých isoform v závislosti na typu použitého nosiče. Složení kultivačního media, přítomnost syntetických barviv a délka a způsob kultivace představují další faktory určující výsledný enzymový profil v kulturách obou hub. Dekolorizace syntetických barviv je v imobilizovaných kulturách závislá na zastoupení ligninolytických enzymů a jejich isoform. I když je v *in vitro* experimentech možné ověřit dekolizační kapacitu purifikovaných enzymů, je výsledná dekolizace barviva celou houbovou kulturou ovlivněna také dalšími mechanismy, jako je kooperace mezi ligninolytickými enzymy a účast přirozených redoxních mediátorů, které zvyšují biodegradační potenciál hub bílé hniloby.

6. ZÁVĚR

- *D. squalens* produkuje v kulturách imobilizovaných na inertním polyurethanovém nosiči lakasu, MnP a MIP. Zatímco lakasa byla konstitutivně syntetizována po celou dobu kultivace, aktivita MnP a MIP signifikantně vzrostla až v druhé půli kultivace. U imobilizovaného *I. lacteus* byla aktivita lakasy v kultivačním mediu nízká stejně jako v tekutých kulturách. Po kolonizaci polyurethanu myceliem produkoval *I. lacteus* dominantně MnP. Nadbytek dusíku v kultivačním mediu inhiboval u obou hub syntézu manganperoxidasy a naopak stimuloval produkci lakasy *D. squalens*.
- Imobilizace *D. squalens* na borovicovém dřevě výrazně indukovala lakasu, u *I. lacteus* byly detekovány nízké aktivity MnP a MIP. Z imobilizovaných kultur *D. squalens* byly vyizolovány dvě lakasové isoformy se stejnou molekulovou hmotností a podobnými isoelektrickými body. Isoformy prokázaly rozdílnou substrátovou specifitu a lišily se ve schopnosti dekolorizovat syntetická barviva *in vitro*. Isoforma Lc1 způsobuje na rozdíl od Lc2 zpětnou kolorizaci azobarviva RO16 v přítomnosti redoxního mediátoru. Byla prokázána účast enzymů v dekolorizačním procesu *in vivo* v laboratorním reaktoru.
- Při růstu obou hub na pšeničné slámě dochází k indukci MnP. *I. lacteus* navíc produkoval LiP, jejíž aktivita nebyla u ostatních typů kultur detekována. Ze slámových kultur *D. squalens* byly vyizolovány tři chromatografické formy MnP, které se lišily od isoform vyizolovaných z tekutých kultur v isoelektrických bodech, pH optimu a zdánlivých konstantách K_m . Dekolorizačními experimenty *in vitro* bylo zjištěno, že MnP *D. squalens* dekolorizuje vybraná syntetická barviva rychleji než lakasa na jednotku enzymové aktivity. Přítomnost obou enzymů v reakční směsi vedla k účinnější dekolorizaci než při použití jednotlivých enzymů samostatně.
- Koncentrace manganu ovlivňuje jak totální aktivitu MnP, tak skladbu isoform MnP v imobilizovaných kulturách *I. lacteus*. Složení isoform MnP závisí také na přítomnosti syntetických barviv v kultivačním mediu. Trifenylnmethanové barvivo BPB indukuje syntézu nové isoformy MnP, která není za jiných kultivačních

podmínek produkována. Kultivační tekutiny s odlišným zastoupením isoformem MnP dekolorizovaly syntetická barviva s rozdílnou účinností. Regulace produkce isoformem MnP *I. lacteus* je multifaktoriální, neboť byla ovlivňována jak koncentrací manganu, tak přítomností syntetického barviva BPB.

- K rekolorizaci azobarviv dlouhodobým působením lakasy *D. squalens* nedochází, pokud je ve směsi navíc přítomna MnP. Na rozdíl od lakasy *D. squalens* nebyla u mycelium-vázané lakasy *I. lacteus* zjištěna polymerizace degradačních produktů azobarviv způsobující rekolorizaci odbarveného barviva. Kombinované působení mycelia a MnP *I. lacteus* má aditivní efekt na dekolorizaci azobarviva RO16. Přítomnost obou enzymů a jejich spolupráce hrají pravděpodobně důležitou roli v *in vivo* dekolorizaci houbami *D. squalens* a *I. lacteus*.

7. PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

Abadulla E., Tzanov T., Costa S., Robra K.H., Cavaco-Paulo A., Gubitz G.M. (2000): Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. Appl. Environ. Microbiol. 66: 3357-3362.

Aggelis G., Ehaliotis C., Nerud F., Stoychev I., Lyberatos G., Zervakis G.I. (2002): Evaluation of white-rot fungi for detoxification and decolorization of effluents from the green olive debittering process. Appl. Microbiol. Biotechnol. 59: 353-360.

Alic M., Akileswaran L., Gold M.H. (1997): Characterization of the gene encoding manganese peroxidase isozyme 3 from *Phanerochaete chrysosporium*. Biochim. Biophys. Acta 1338: 1-7.

Andersson B.E., Henrysson T. (1996): Accumulation and degradation of dead-end metabolites during treatment of soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons with five strains of white-rot fungi. Appl. Microbiol. Biotechnol. 46: 647-652.

Arantes V., Milagres A.M.F. (2007): The synergistic action of ligninolytic enzymes (MnP and Laccase) and Fe³⁺-reducing activity from white-rot fungi for degradation of Azure B. Enzyme Microb. Technol. 42: 17-22.

Arica M.Y., Kacar Y., Gene O. (2001): Entrapment of white rot fungus *Trametes versicolor* in Calcium alginate beads: preparation and biosorption kinetic analysis for cadmium removal from an aqueous solution. Bioresour. Technol. 80: 121-129.

Aro N., Pakula T., Penttilä M. (2005): Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. FEMS Microbiol. Rev. 29: 719-739.

Arora D.S., Gill P.K. (2000): Laccase production by some white rot fungi under different nutritional conditions. Bioresour. Technol. 73: 283-285.

Axelsson J., Nilsson U., Terrazas E., Aliaga T.A., Welander U. (2006): Decolorization of the textile dyes Reactive Red 2 and Reactive Blue 4 using *Bjerkandera* sp. strain BOL 13 in a continuous rotating biological contactor reactor. Enzyme Microb. Technol. 39: 32-37.

- Azmi W., Sani R.K., Banerjee U.C. (1998): Biodegradation of triphenylmethane dyes. *Enzyme Microb. Technol.* 22: 185-191.
- Baborová P., Möder M., Baldrian P., Cajthamlová K., Cajthaml T. (2006): Purification of new manganese-dependent peroxidase of the white-rot fungus *Irpex lacteus*, and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the enzyme. *Res. Microbiol.* 157: 248-253.
- Baldrian P. (2004): Purification and characterization of laccase from the white-rot fungus *Daedalea quercina* and decolorization of synthetic dyes by the enzyme. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63: 560-563.
- Baldrian P. (2006): Fungal laccases – occurrence and properties. *FEMS Microbiol. Rev.* 30: 215-242.
- Benito G.G., Miranda M.P., De Los Santos D.R. (1997): Decolorization of wastewater from an alcoholic fermentation process with *Trametes versicolor*. *Bioresour. Technol.* 61: 33-37.
- Beydilli M.I., Pavlostathis S.G., Tincher W.C. (1998): Decolorization and toxicity screening of selective reactive azo dyes under methanogenic conditions. *Water Sci. Technol.* 38: 225-232.
- Bezalel L., Hadar Y., Fu P.P., Freeman J.P., Cerniglia C.E. (1996): Initial oxidation products in the metabolism of pyrene, anthracene, fluorene, and dibenzothiophene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2554-2559.
- Bilgi S., Demir C. (2005): Identification of photooxidation degradation products of C.I. Reactive Orange 16 dye by gas chromatography-mass spectrometry. *Dyes Pigments* 66: 69-76.
- Blanchette R.A. (1984): Screening wood decayed by white rot fungi for preferential lignin degradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 647-653.
- Bogan B.W., Lamar R.T. (1995): One-electron oxidation in the degradation of creosote polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2631-2635.
- Bonnarme P., Jeffries T.W. (1990): Mn(II) regulation of lignin peroxidases and manganese-dependent peroxidases from lignin-degrading white rot fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 210-217.

- Borchert M., Libra J.A. (2001): Decolorization of reactive dyes by the white rot fungus *Trametes versicolor* in sequencing batch reactors. *Biotechnol. Bioeng.* 75: 313-321.
- Botton B., Chalot M. (1991): Techniques for the study of nitrogen metabolism in ectomycorrhiza. *Methods Microbiol.* 23: 203-252.
- Bradford M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254.
- Bumpus J.A., Brock B.J. (1988): Biodegradation of Crystal Violet by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1143-1150.
- Buswell J.A., Cai Y., Chang S. (1995): Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. *FEMS Microbiol. Lett.* 128: 81-88.
- Cajthaml T., Erbanová P., Šašek V., Moeder M. (2006): Breakdown products on metabolic pathway of degradation of benz[a]anthracene by a ligninolytic fungus. *Chemosphere* 64: 560-564.
- Camarero S., Ibarra D., Martinez M.J., Martinez A.T. (2005): Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1775-1784.
- Claus H., Faber G., König H. (2002): Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 672-678.
- Cohen R., Hadar Y., Yarden O. (2001): Transcript and activity levels of different *Pleurotus ostreatus* peroxidases are differently affected by Mn²⁺. *Environ. Microbiol.* 3: 312-322.
- Collins P., Dobson A.W. (1997): Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3444-3450.
- Collins P.J., Field J.A., Teunissen P., Dobson A.D.W. (1997): Stabilization of lignin peroxidases in white rot fungi by tryptophan. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2543-2548.

- Couto S.R., Domínguez A., Sanromán M.A. (2002): Production of manganese-dependent peroxidase in a new solid-state bioreactor by *Phanerochaete chrysosporium* grown on wood shavings. Application to the decolorization of synthetic dyes. *Folia Microbiol.* 47: 417-421.
- Couto S.R., Gundín M., Lorenzo M., Sanromán M.Á. (2002b): Screening of supports and inducers for laccase production by *Trametes versicolor* in semi-solid-state conditions. *Process Biochem.* 38: 249-255.
- Couto S.R., Rivela I., Muñoz M.R., Sanromán A. (2000): Stimulation of ligninolytic enzyme production and the ability to decolourise Poly R-478 in semi-solid-state cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Bioresour. Technol.* 74: 159-164.
- Couto S.R., Rosales E., Sanromán M.A. (2006): Decolourization of synthetic dyes by *Trametes hirsuta* in expanded-bed reactors. *Chemosphere* 62: 1558-1563.
- Couto S.R., Sanromán M.A. (2005): Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochem. Eng. J.* 22: 211-219.
- Cripps C., Bumpus J.A., Aust S.D. (1990): Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1114-1118.
- Dec J., Bollag J. M. (1995): Effect of various factors on dehalogenation of chlorinated phenols and anilines during oxidative coupling. *Environ. Sci. Technol.* 29: 657-663.
- de Jong E., Cazemier A.E., Field J.A., De Bont J.A.M. (1994): Physiological role of chlorinated aryl alcohols biosynthesis de novo by the white rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 271-277.
- de la Rubidia T., Linares A., Peres J., Muñoz-Dorado J., Romea J., Martínez J. (2002): Characterization of manganese-dependent peroxidase isoenzymes from the ligninolytic fungus *Phanerochaete flavid-alba*. *Res. Microbiol.* 153: 547-554.
- De Souza C.G.M., Tychanowicz G.K., De Souza D.F., Peralta R.M. (2004): Production of laccase isoforms by *Pleurotus pulmonarius* in response to presence of phenolic and aromatic compounds. *J. Basic. Microbiol.* 44: 129-136.

- Domínguez A., Couto S.R., Sanromán M.A. (2005): Dye decolorization by *Trametes hirsuta* immobilized into alginate beads. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21: 405-409.
- Donnelly K.C., Chen J., Huebner H. J., Brown K.W., Autenrieth R.L., Bonner J.S. (1997): Utility of four strains of white-rot fungi for the detoxification of 2,4,6-trinitrotoluene in liquid culture. *Environ. Toxicol. Chem.* 16: 1105-1110.
- Dosoretz C.G., Grethlein H.E. (1991): Physiological-aspects of the regulation of extracellular enzymes of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 28: 253-265.
- Dos Santos A.Z., Neto J.M.C., Tavares C.R.G., Da Costa S.M.G. (2004): Screening of filamentous fungi for the decolorization of a commercial reactive dye. *J. Basic Microbiol.* 44: 288-295.
- D'Souza D.T., Tiwari R., Sah A.K., Raghukumar C. (2006): Enhanced production of laccase by a marine fungus during treatment of colored effluents and synthetic dyes. *Enzyme Microb. Technol.* 38: 504-511.
- D'Souza T.M., Merritt C.S., Reddy C.A. (1999): Lignin-modifying enzymes of the white rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 5307-5313.
- Eggert C., Temp U., Dean J.F.D., Eriksson K.E.L. (1996): A fungal metabolite mediates oxidation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. *FEBS Lett.* 391: 144-148.
- Eichlerová I., Homolka L., Benada O., Kofroňová O., Hubálek T., Nerud F. (2007a): Decolorization of Orange G and Remazol brilliant blue R by the white rot fungus *Dichomitus squalens*: Toxicological evaluation and morphological study. *Chemosphere* 69: 795-802.
- Eichlerová I., Homolka L., Lisá L., Nerud F. (2005): Orange G and Remazol Brilliant Blue R decolorization by white rot fungi *Dichomitus squalens*, *Ischnoderma resinatum* and *Pleurotus calyptratus*. *Chemosphere* 60: 398-404.
- Eichlerová I., Homolka L., Nerud F. (2006): Synthetic dye decolorization capacity of white rot fungus *Dichomitus squalens*. *Bioresour. Technol.* 97: 2153-2159.
- Eichlerová I., Homolka L., Nerud F. (2007b): Decolorization of high concentrations of synthetic dyes by the white rot fungus *Bjerkandera adusta* strain CCBAS 232. *Dyes Pigments* 75: 38-44.

- Elisashvili V., Penninckx M., Kachlishvili E., Tsiklauri N., Metreveli E., Kharziani T., Kvesitadze G. (2008): *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. *Bioresour.Technol.* 99: 457-462.
- Fackler K., Gradinger C., Hinterstoisser B., Messner K., Schwanninger M. (2006): Lignin degradation by white rot fungi on spruce wood shavings during short-time solid-state fermentations monitored by near infrared spectroscopy. *Enzyme Microb. Technol.* 39: 1476-1483.
- Faison B.D., Kirk T.K. (1985): Factors involved in the regulation of a ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 299-304.
- Fernando T., Aust S.D., v knize: *Biological Degradation and Bioremediation of Toxic Chemicals* (Chandry G. R., ed.), str. 386-402. Chapman & Hall, London 1994.
- Field J.A., de Jong E., Feijoo-Costa G., de Bont J.A.M. (1993): Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. *Trends Biotechnol.* 11: 44-49.
- Fu Y., Viraraghavan T. (2001): Fungal decolorization of dye wastewaters: a review. *Bioresour. Technol.* 79: 251-262.
- Fujian X., Hongzhang C., Zuohu L. (2001): Solid-state production of lignin peroxidase (LiP) and manganese peroxidase (MnP) by *Phanerochaete chrysosporium* using steam-exploded straw as substrate. *Bioresour.Technol.* 80: 149-151.
- Galhaup C., Haltrich D. (2001): Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 225-232.
- Galliano H., Gas G., Seris J.L., Boudet A.M. (1991): Lignin degradation by *Rigidoporus lignosus* involves synergistic action of two oxidizing enzymes: Mn peroxidase and laccase. *Enzyme Microb. Technol.* 13: 478-482.
- Garcia S., Latge J.P., Prevost M.C., Leisola M. (1987): Wood degradation by white rot fungi: cytochemical studies using lignin peroxidase-immunoglobulin-gold complexes. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2384-2387.

- Gaskell J., Stewart P., Kersten P. J., Covert S. F., Reiser J., Cullen D. (1994): Establishment of genetic linkage by allele-specific polymerase chain reaction: application to the lignin peroxidase gene family of *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnology* 12: 1372-1375.
- Gettemy J.M., Ma B., Alic M., Gold M.H. (1998): Reverse transcription-PCR analysis of the regulation of the manganese-dependent peroxidase gene family. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 569-574.
- Giardina P., Palmieri G., Fontanella B., Riveccio V., Sannia G. (2000): Manganese peroxidase isoenzymes produced by *Pleurotus ostreatus* grown on wood sawdust. *Arch. Biochem. Biophys.* 376: 171-179.
- Gill P.K., Arora D.S., Chander M. (2002): Biodecolourization of azo and triphenylmethane dyes by *Dichomitus squalens* and *Phlebia* spp. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 28: 201-203.
- Gill P.K., Arora D.S. (2003): Effect of culture conditions on manganese peroxidase production and activity by some white rot fungi. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30: 28-33.
- Glenn J.K., Gold M.H. (1983): Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 1741-1747.
- Glenn J.K., Gold M.H. (1985): Purification and characterization of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* 242: 329-341.
- Goszczyński S., Paszczyński A., Pasti-Grigsby M.B., Crawford R.L., Crawford D.L. (1994): New pathway for degradation of sulfonated azo dyes by microbial peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*. *J. Bacteriol.* 176: 1339-1347.
- Ha H.C., Honda Y., Watanabe T., Kuwahara M. (2001): Production of manganese peroxidase by pellet culture of the lignin-degrading basidiomycete, *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55: 704-711.
- Hakala T.K., Hildén K., Majjala P., Olsson C., Hatakka A. (2006): Differential regulation of manganese peroxidases and characterization of two variable MnP encoding genes in the white-rot fungus *Physisporinus rivulosus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73: 839-849.

- Hakala T.K., Lundell T., Galkin S., Maijala P., Kalkkinen N., Hatakka A. (2005): Manganese peroxidases, laccases and oxalic acid from the selective white-rot fungus *Physisporinus rivulosus* grown on spruce wood chips. *Enzyme Microb. Technol.* 36: 461-468.
- Hamman O.B., de la Rubia T., Martinez J. (1999): The effect of manganese on the production of *Phanerochaete flavido-alba* ligninolytic peroxidases in nitrogen limited cultures. *FEMS Microbiol. Lett.* 177: 137-142.
- Hammel K.E., Kapich A.N., Jensen K.A., Ryan Z.C. (2002): Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi. *Enzyme Microb. Technol.* 30: 445-453.
- Harazono K., Watanabe Y., Nakamura K. (2003): Decolorization of azo dye by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete sordida* and by its manganese peroxidase. *J. Biosci. Bioeng.* 95: 455-459.
- Hatakka A. (1994): Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* 13: 125-135.
- Hatakka A., v knize: *Biopolymers* (Steinbüchel A., ed.), kap. 5. WILEY-VCH, Weinheim 2001.
- Hatvani N., Mész I. (2002): Effect of the nutrient composition on dye decolorisation and extracellular enzyme production by *Lentinus edodes* on solid medium. *Enzyme Microb. Technol.* 30: 381-386.
- Head I. M. (1998): Bioremediation: towards a credible technology. *Microbiology* 144: 599-608.
- Heinfling A., Martinez M.J., Martinez A.T., Bergbauer M., Szewzyk U. (1998a): Purification and characterization of peroxidases from the dye-decolorizing fungus *Bjerkandera adusta*. *FEMS Microbiol. Lett.* 165: 43-50.
- Heinfling A., Martinez M.J., Martinez A.T., Bergbauer M., Szewzyk U. (1998b): Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese-independent reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2788-2793.
- Hofrichter M. (2002): Review: lignin conversion by manganese peroxidase. *Enzyme Microb. Technol.* 30: 454-466.

- Hofrichter M., Vares T., Kalsi M., Galkin S., Scheibner K., Fritsche W., Hatakka A. (1999): Production of manganese peroxidase and organic acids and mineralization of ¹⁴C-labelled lignin (¹⁴C-DHP) during solid-state fermentation of wheat straw with the white rot fungus *Nematoloma frowardii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1864-1870.
- Hofrichter M., Ziegenhagen D., Vares T., Friedrich M., Jäger M.G., Fritsche W., Hatakka A. (1997): Oxidative decomposition of malonic acid as basis for the action of manganese peroxidase in the absence of hydrogen peroxide. *FEBS Lett.* 434: 362-366.
- Hou H.M., Zhou J.T., Wang J., Du C.H., Yan B. (2004): Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. *Process Biochem.* 39: 1415-1419.
- Hu M., Zhang W., Lu X., Gao P. (2006): Purification and characteristics of a low-molecular-weight peptide possessing oxidative capacity for phenol from *Phanerochaete chrysosporium*. *Sci. China Ser. C-Life Sci.* 49: 243-250.
- Huang Z., Dan Y., Huang Y., Lin L., Li T., Ye W., Wei X. (2004): Sesquiterpenes from the mycelial cultures of *Dichomitus squalens*. *J. Nat. Prod.* 67: 2121-2123.
- Hwang S.S., Song H.G. (2000): Biodegradation of pyrene by the white rot fungus, *Irpex lacteus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 10: 344-348.
- Cha C.J., Doerge D.R., Cerniglia C.E. (2001): Biotransformation of Malachite green by the fungus *Cunninghamella elegans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4358-4360.
- Champagne P.P., Ramsay J.A. (2005): Contribution of manganese peroxidase and laccase to dye decolorization by *Trametes versicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69: 276-285.
- Chander M., Arora D.S. (2007): Evaluation of some white-rot fungi for their potential to decolourise industrial dyes. *Dyes Pigments* 72: 192-198.
- Chivukula M., Spadaro J. T., Renganathan V. (1995): Lignin peroxidase-catalyzed oxidation of sulfonated azo dyes generates novel sulfophenyl hydroperoxides. *Biochemistry* 34: 7765-7772.
- Chung K.T. (1983): The significance of azo-reduction in the mutagenesis and carcinogenesis of azo dyes. *Mutat. Res.* 114: 269-281.

- Janse B.J.H., Gaskell J., Akhtar M., Cullen D. (1998): Expression of *Phanerochaete chrysosporium* genes encoding lignin peroxidases, manganese peroxidases, and glyoxal oxidase in wood. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3536-3538.
- Jarosz-Wilkolazka A., Kochmanska-Rdest J., Malarczyk E., Wardas W., Leonowicz A. (2002): Fungi and their ability to decolourize azo and antraquinonic dyes. *Enzyme Microb. Technol.* 30: 566-572.
- Jeffries T.W. (1990): Biodegradation of lignin-carbohydrate complexes. *Biodegradation* 1: 163-176.
- Johanes C., Majcherczyk A. (2000): Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 524-528.
- Kajita S., Sugawara S., Miyazaki Y., Nakamura M., Katayama Y., Shishido K., Iimura Y. (2004): Overproduction of recombinant laccase using a homologous expression system in *Coriolus versicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66: 194-199.
- Kanda T., Nakakubo S., Wakabayashi K., Nisizawa K. (1978): Purification and properties of an exo-cellulase of avicelase type from a wood-rotting fungus, *Irpex lacteus* (*Polyporus tulipiferae*). *J. Biochem.* 84: 1217-1226.
- Kanda T., Nisizawa K. (1988): Exocellulase of *Irpex lacteus* (*Polyporus tulipiferae*). *Methods Enzymol.* 160: 403-408.
- Kapich A.N., Jensen K.A., Hammel K.E. (1999): Peroxyl radicals are potential agents of lignin biodegradation. *FEBS Lett.* 461: 115-119.
- Kariminiaae-Hamedani H.R., Sakurai A., Sakakibara M. (2007): Decolorization of synthetic dyes by a new manganese peroxidase-producing white rot fungus. *Dyes Pigments* 72: 157-162.
- Kasinath A., Novotný Č., Svobodová K., Patel K.C., Šašek V., (2003): Decolorization of synthetic dyes by *Irpex lacteus* in liquid cultures and packed-bed bioreactor. *Enzyme Microb. Technol.* 32: 167-173.
- Kim H.Y., Song H.G. (2000): Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene by white rot fungus *Irpex lacteus*. *Biotechnol. Lett.* 22: 969-975.

- Kim H.Y., Song H.G. (2003): Transformation and mineralization of 2,4,6-trinitrotoluene by the white rot fungus *Irpex lacteus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61: 150-156.
- Knapp J.S., Newby P.S., Reece L.P. (1995): Decolorization of dyes by wood-rotting basidiomycete fungi. *Enzyme Microb. Technol.* 17: 664-668.
- Ko K.S., Jung H.S. (1999): Phylogenetic re-evaluation of *Trametes consors* based on mitochondrial small subunit ribosomal DNA sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* 170: 181-186.
- Kobayashi H., Kasamo K., Mizuno H., Kim H., Kusakabe I., Murakami K. (1992): Crystallization and preliminary x-ray diffraction studies of aspartamic proteinase from *Irpex lacteus*. *J. Mol. Biol.* 226: 1291-1293.
- Kokol V., Doliška A., Eichlerová I., Baldrian P., Nerud F. (2007): Decolorization of textile dyes by whole cultures of *Ischnoderma resinotum* and by purified laccase and Mn-peroxidase. *Enzyme Microb. Technol.* 40: 1673-1677.
- Kurek B., Odier E. (1990): Influence of lignin peroxidase concentration and localisation in lignin biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34: 264-269.
- Kuwahara M., Glenn J.K., Morgan M.A., Gold M.H. (1984): Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett.* 169: 247-250.
- Lang E., Gonser A., Zadrazil F. (2000): Influence of incubation temperature on activity of ligninolytic enzymes in sterile soil by *Pleurotus* sp. and *Dichomitus squalens*. *J. Basic Microbiol.* 40: 33-39.
- Lang E., Nerud F., Zadrazil F. (1998): Production of ligninolytic enzymes by *Pleurotus* sp. and *Dichomitus squalens* in soil and lignocellulose substrate as influenced by soil microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 167: 239-244.
- Lapadatescu C., Feron G., Vergoignan C., Djian A., Durand A., Bonnarme P. (1997): Influence of cell immobilization on the production of benzaldehyde and benzyl alcohol by the white-rot fungi *Bjerkandera adusta*, *Ischnoderma benzoidum* and *Dichomitus squalens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47: 708-714.

- Larrondo L.F., Avila M., Salas L., Cullen D., Vicuna R. (2003): Heterologous expression of laccase cDNA from *Ceriporiopsis subvermispora* yields copper-activated apoprotein and complex isoform patterns. *Microbiology* 149: 1177-1182.
- Lechner B.E., Papinutti V.L. (2006): Production of lignocellulosic enzymes during growth and fruiting of the edible fungus *Lentinus tigrinus* on wheat straw. *Process Biochem.* 41: 594-598.
- Leonowicz A., Cho N.S., Luterek J., Wilkolazka A., Wojtas-Wasilewska M., Matuszewska A., Hofrichter M., Wesenberg D., Rogalski J. (2001): Fungal laccase: properties and activity on lignin. *J. Basic Microbiol.* 41: 185-227.
- Leonowicz A., Matuszewska A., Luterek J., Ziegenhagen D., Wojtas-Wasilewska M., Cho N. S., Hofrichter M., Rogalski J. (1999): Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genet. Biol.* 27: 175-185.
- Leštan D., Lamar R.T. (1996): Development of fungal inocula for bioaugmentation of contaminated soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2045-2052.
- Li D., Alic M., Gold M.H. (1994): Nitrogen regulation of lignin peroxidase gene transcription. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3447-3449.
- Li D., Li N., Ma B., Mayfield M.B., Gold M.H. (1999): Characterization of genes encoding two manganese peroxidases from the lignin-degrading fungus *Dichomitus squalens*. *Biochim. Biophys. Acta* 1434: 356-364.
- Li D., Youngs H.L., Gold M.H. (2001): Heterologous expression of thermostable manganese peroxidase from *Dichomitus squalens* in *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* 385: 348-356.
- Lobos S., Larrain J., Salas L., Cullen D., Vicuna R. (1994): Isoenzymes of manganese-dependent peroxidase and laccase produced by the lignin-degrading basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. *Microbiology* 140: 2691-2698.
- López C., Mielgo I., Moreira M.T., Feijoo G., Lema J.M. (2002): Enzymatic membrane reactors for biodegradation of recalcitrant compounds. Application to dye decolourisation. *J. Biotechnol.* 99: 249-257.

- López C., Moreira M.T., Feijoo G., Lema J.M. (2004): Dye decolorization by manganese peroxidase in an enzymatic membrane bioreactor. *Biotechnol. Prog.* 20: 74-81.
- Lorenzo M., Moldes D., Sanromán M.A. (2006): Effect of heavy metals on the production of several laccase isoenzymes by *Trametes versicolor* and on their ability to decolourise dyes. *Chemosphere* 63: 912-917.
- Lu L., Zhao M., Zhang B.B., Yu S.Y., Bian X.J., Wang W., Wang Y. (2007): Purification and characterization of laccase from *Pycnoporus sanguineus* and decolorization of an anthraquinone dye by the enzyme. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74: 1232-1239.
- Lucas M., Mertens V., Corbisier A.M., Vanhulle S. (2008): Synthetic dyes decolourisation by white-rot fungi: Development of original microtitre plate method and screening. *Enzyme Microb. Technol.* 42: 97-106.
- Mäkelä M., Galkin S., Hatakka A., Lundell T. (2002): Production of organic acids and oxalate decarboxylase in lignin-degrading white rot fungi. *Enzyme Microb. Technol.* 30: 542-549.
- Malachová K., Pavlíčková Z., Novotný Č., Svobodová K., Lednická D., Musílková E. (2006): Reduction in mutagenicity of synthetic dyes by successive treatment with activated sludge and the ligninolytic fungus, *Irpex lacteus*. *Environ. Mol. Mutagen.* 47: 533-540.
- Mansur M., Arias M.E., Copa-Patino J.L., Flärdh M., González A.E. (2003): The white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* secretes laccase isoenzymes with different substrate specificities. *Mycologia* 95: 1013-1020.
- Manubens A., Avila M., Canessa P., Vicuna R. (2003): Differential regulation of genes encoding manganese peroxidase (MnP) in the basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. *Curr. Genet.* 43: 433-438.
- Martin A.M. (1998): Biconversion of waste materials to industrial products. Blackie Academic Professional, London.
- Martínez A.T. (2002): Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. *Enzyme Microb. Technol.* 30: 425-444.

- Martinez A.T., Speranza M., Ruiz-Duenas F.J., Ferreira P., Camarero S., Guillen F., Martinez M.J., Gutierrez A., del Rio J.C. (2005): Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Int. Microbiol.* 8: 195-204.
- Martinez M.J., Ruiz-Duenas F.J., Guillen F., Martinez A.T. (1996): Purification and catalytic properties of two manganese peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. *Eur. J. Biochem.* 237: 424-432.
- Matsumura E., Yamamoto E., Numata A., Kawano T., Shin T., Murao S. (1986): Structure of the laccase-catalyzed oxidation products of hydroxy-benzoic acids in the presence of ABTS (2,2'-azino-di-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfatic acid)). *Agr. Biol. Chem.* 50: 1355-1357.
- Máximo C., Costa-Ferreira M. (2004): Decolourisation of reactive textile dyes by *Irpex lacteus* and lignin modifying enzymes. *Process Biochem.* 39: 1475-1479.
- McMullan G., Meehan C., Conneely A., Kirby N., Robinson T., Nigam P., Banat I.M., Marchant R., Smyth W.E. (2001): Microbial decolourisation and degradation of textile dyes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 81-87.
- Mester T., Pena M., Field J.A. (1996): Nutrient regulation of extracellular peroxidases in the white rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44: 778-784.
- Mielgo I., Lopez C., Moreira M., Feijoo G., Lema J.M. (2003): Oxidative degradation of azo dyes by manganese peroxidase under optimized conditions. *Biotechnol. Prog.* 19: 325-331.
- Miller G.L. (1959): Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31: 426-428.
- Mohorcic M., Friedrich J., Pavko A. (2004): Decoloration of the diazo dye Reactive Black 5 by immobilised *Bjerkandera adusta* in a stirred tank bioreactor. *Acta Chim. Slov.* 51: 619-628.
- Moldes D., Couto S.R., Cameselle C., Sanromán M.A. (2003): Study of the degradation of dyes by MnP of *Phanerochaete chrysosporium* produced in a fixed-bed bioreactor. *Chemosphere* 51: 295-303.

Moldes D., Sanromán M.A. (2006): Amelioration of the ability to decolorize dyes by laccase: relationship between redox mediators and laccase isoenzymes in *Trametes versicolor*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22: 1197-1204.

Moreira M.T., Feijoo G., Palma C., Lema J.M. (1997): Continuous production of manganese peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium* immobilized on polyurethane foam in a pulsed packed-bed bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 56: 130-137.

Moreira M.T., Mielgo I., Feijoo G., Lema J.M. (2000): Evaluation of different fungal strains in the decolourisation of synthetic dyes. *Biotechnol. Lett.* 22: 1499-1503.

Moreira M.T., Palma C., Mielgo I., Feijoo G., Lema M.J. (2001): In vitro degradation of a polymeric dye (Poly R-478) by manganese peroxidase. *Biotechnol. Bioeng.* 75: 362-368.

Moreira P.R., Bouillenne F., Almeida-Vara E., Malcata F.X., Frere J.M., Duarte J.C. (2006): Purification, kinetics and spectral characterisation of a new versatile peroxidase from a *Bjerkandera* sp. Isolate. *Enzyme Microb. Technol.* 38: 28-33.

Moreira P.R., Duez C., Dehareng D., Antunes A., Almeida-Vara E., Frere J.M., Malcata F.X., Duarte J.C. (2005): Molecular characterisation of a versatile peroxidase from a *Bjerkandera* strain. *J. Biotechnol.* 118: 339-352.

Murugesan K., Nam I.H., Kim Y.M., Chang Y.S. (2007): Decolorization of reactive dyes by a thermostable laccase produced by *Ganoderma lucidum* in solid state culture. *Enzyme Microb. Technol.* 40: 1662-1672.

Nagai M., Sato T., Watanabe H., Saito K., Kawata M., Enei H. (2002): Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinula edodes*, and decolorization of chemically different dyes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60: 327-335.

Nakamura Y., Sawada T., Mtui G.S., Kobayashi F., Kuwahara M., Ito H. (1997): Lignin peroxidase production by *Phanerochaete chrysosporium* immobilized on polyurethane foam. *J. Chem. Eng. Japan* 30: 1-6.

Nakamura Y., Sungusia M.G., Sawada T., Kuwahara M. (1999): Lignin-degrading enzyme production by *Bjerkandera adusta* immobilized on polyurethane foam. *J. Biosci. Bioeng.* 88: 41-47.

- Necochea R., Valderrama B., Diaz-Saldival S., Folch-Mallol J.L., Vazquez-Duhalt R., Iturriaga G. (2005): Phylogenetic and biochemical characterisation of a recombinant laccase from *Trametes versicolor*. FEMS Microbiol. Lett. 244: 235-241.
- Nilsson I., Möller A., Mattiasson B., Rubindamayugi M.S.T., Welander U. (2006): Decolorization of synthetic and real textile wastewater by the use of white-rot fungi. Enzyme Microb. Technol. 38: 94-100.
- Novotný Č., Erbanová P., Cajthaml T., Rothschild N., Dosoretz C., Šašek V. (2000): *Irpex lacteus*, a white rot fungus applicable to water and soil bioremediation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 54: 850-853.
- Novotný Č., Rawal B., Bhatt M., Patel M., Šašek V., Molitoris H.P. (2001): Capacity of *Irpex lacteus* and *Pleurotus ostreatus* for decolorization of chemically different dyes. J. Biotechnol. 89: 113-122.
- Novotný Č., Svobodová K., Erbanová P., Cajthaml T., Kasinath A., Lang E., Šašek V. (2004): Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. Soil Biol. Biochem. 36: 1545-1551.
- Novotný Č., Vyas B.R.M., Erbanová P., Kubátová A., Šašek V. (1997): Removal of PCBs by various white rot fungi in liquid cultures. Folia Microbiol. 42: 136-140.
- Nyanhongo G.S., Gomes J., Gübitz G.M., Zvauya R., Read J., Steiner W. (2002): Decolorization of textile dyes by laccases from a newly isolated strain of *Trametes modesta*. Water Res. 36: 1449-1456.
- Ollikka P., Alhonmaki K., Leppanen V.M., Glumoff T., Rajjola T., Suominen I. (1993): Decolorization of azo, triphenyl methane, heterocyclic, and polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environmental. Microbiol. 59: 4010-4016.
- O'Neill C., Hawkes F.R., Hawkes D.L., Lourenco N.D., Pinheiro H.M., Delée W. (1999): Colour in textile effluents – sources, measurement, discharge consents and simulation: a review. J. Chem. Technol. Biotechnol. 74: 1009-1018.
- Palmieri G., Giardina P., Sannia G. (2005): Laccase-mediated Remazol Brilliant Blue R decolorization in a fixed-bed bioreactor. Biotechnol. Prog. 21: 1436-1441.

- Pandey A. (1999): Recent process developments in solid-state fermentation. *Process Biochem.* 27: 109-117.
- Paszynski A., Crawford R.L. (1995): Potential for bioremediation of xenobiotic compounds by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnol. Prog.* 11: 368-379.
- Pérez J., de la Rubidia T., Ben Hamman O., Martínez J. (1998): *Phanerochaete flavido-alba* laccase induction and modification of manganese peroxidase isoenzyme pattern in decolorized olive oil mill wastewaters. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2726-2729.
- Périé F.H., Gold M.H. (1991): Manganese regulation of manganese peroxidase expression and lignin degradation by the white rot fungus *Dichomitus squalens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2240-2245.
- Périé F.H., Reddy G.V.B., Blackburn N.J., Gold M.H. (1998): Purification and characterization of laccases from the white-rot basidiomycete *Dichomitus squalens*. *Arch. Biochem. Biophys.* 353: 349-355.
- Périé F.H., Sheng D., Gold M.H. (1996): Purification and characterization of two manganese peroxidase isoenzymes from the white-rot basidiomycete *Dichomitus squalens*. *Biochim. Biophys. Acta* 1297: 139-148.
- Petroski R.J., Peczynska-Czoch W., Rosazza J.P. (1980): Analysis, production, and isolation of an extracellular laccase from *Polyporus anceps*. *Appl. Environ. Microbiol.* 40: 1003-1006.
- Podgornik H., Podgornik A., Perdih A. (1999): A method of fast separation of lignin peroxidases using convective interaction media disks. *Anal. Biochem.* 272: 43-47.
- Podgornik H., Poljanšek I., Perdih A. (2001): Transformation of Indigo carmine by *Phanerochaete chrysosporium* ligninolytic enzymes. *Enzyme Microb. Technol.* 29: 166-172.
- Pointing S.B. (2001): Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57: 20-33.
- Pointing S.B., Vrijmoed L.L.P. (2000): Decolorization of azo and triphenylmethane dyes by *Pycnoporus sanguineus* producing laccase as the sole phenoloxidase. *World J. Microb. Biot.* 16: 317-318.

- Prasad K.K., Mohan S.V., Bhaskar Y.V., Ramanaiah S.V., Babu V.L., Pati B.R., Sarma P.N. (2005): Laccase production using *Pleurotus ostreatus* 1804 immobilized on PUF cubes in batch and packed bed reactors: Influence of culture conditions. *J. Microbiol.* 43: 301-307.
- Rabinovich M.L., Bolobova A.V., Vasilchenko L.G. (2004): Fungal decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics: a review. *Appl. Biochem. Microbiol.* 40: 1-17.
- Radha K.V., Regupathi I., Arunagiri A., Murugesan T. (2005): Decolorization studies of synthetic dyes using *Phanerochaete chrysosporium* and their kinetics. *Process Biochem.* 40: 3337-3345.
- Ralph B.J. (1976): Solid substrate fermentations. *Food Technol. Aust.* 28: 247-251.
- Reddy C.A. (1995): The potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 6: 320-328.
- Reddy C.A., D'Souza T.M. (1994): Physiology and molecular biology of the lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiol. Rev.* 13: 137-152.
- Reyes P., Pickard M.A., Vazquez-Duhalt R. (1999): Hydroxybenzotriazole increases the range of textile dyes decolorized by immobilized laccase. *Biotechnol. Lett.* 21: 875-880.
- Robinson T., Chandran B., Nigam P. (2001b): Studies on the decolourisation of an artificial textile-effluent by white-rot fungi in N-rich and N-limited media. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57: 810-813.
- Robinson T., McMullan G., Marchant R., Nigam P. (2001a): Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with proposed alternative. *Bioresour. Technol.* 77: 247-255.
- Rogalski J., Szczodrak J., Janusz G. (2006): Manganese peroxidase production in submerged cultures by free and immobilized mycelia of *Nematoloma frowardii*. *Bioresour. Technol.* 97: 469-476.
- Rosales E., Couto S.R., Sanromán M.A. (2007): Increased laccase production by *Trametes hirsuta* grown on ground orange peelings. *Enzyme Microb. Technol.* 40: 1286-1290.

- Rothschild N., Levkowitz A., Hadar Y., Dosoretz C. G. (1999): Manganese deficiency can replace high oxygen levels needed for lignin peroxidase formation by *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 65: 483-488.
- Rothschild N., Novotný Č., Šašek V., Dosoretz C.G. (2002): Ligninolytic enzymes of the fungus *Irpex lacteus* (*Polyporus tulipiferae*): isolation and characterization of lignin peroxidase. Enzyme Microb. Technol. 31: 627-633.
- Rouau X., Odier E. (1986): Production of extracellular enzyme by the white-rot fungus *Dichomitus squalens* in cellulose-containing liquid culture. Enzyme Microb. Technol. 8: 22-26.
- Ruiz-Duenas F.J., Camarero S., Perez-Boada M., Martinez M.J., Martinez A.T. (2001): A new versatile peroxidase from *Pleurotus*. Biochem. Soc. Trans. 29: 116-122.
- Ryvarden L., Gilbertson R.L. (1993): European polypores, part 1: *Abortiporus-Lindtneria*. (*Synopsis fungorum* 6) Fungiflora, Oslo, pp 351-353.
- Sarkar S., Martinez A.T., Martinez M.J. (1997): Biochemical and molecular characterization of a manganese peroxidase isoenzyme from *Pleurotus ostreatus*. Biochim. Biophys. Acta 1339: 23-30.
- Shahvali M., Assadi M.M., Rostami K. (2000): Effect of environmental parameters on decolorization of textile wastewater using *Phanerochaete chrysosporium*. Bioprocess Eng. 23: 721-726.
- Shaul G.M., Holdsworth T.J., Dempsey C.R., Dostal K.A. (1991): Fate of water soluble azo dyes in the activated sludge process. Chemosphere 22: 107-119.
- Shin E.H., Choi H.T., Song H.G. (2007): Biodegradation of endocrine-disrupting bisphenol A by white rot fungus *Irpex lacteus*. J. Microbiol. Biotechnol. 17: 1147-1151.
- Shin K.S. (2004): The role of enzymes produced by white-rot fungus *Irpex lacteus* in the decolorization of the textile industry effluent. J. Microbiol. 42: 37-41.
- Shin K.S., Kim Y.H., Lim J.S. (2005): Purification and characterization of manganese peroxidase of the white rot fungus *Irpex lacteus*. J. Microbiol. 43: 503-509.

- Shin M., Nguyen T., Ramsay J. (2002): Evaluation of support materials for the surface immobilization and decolorization of Amaranth by *Trametes versicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60: 218-223.
- Scheel T., Höfer M., Ludwig S., Hölker U. (2000): Differential expression of manganese peroxidase and laccase in white-rot fungi in the presence of manganese or aromatic compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54: 686-691.
- Scheibner K., Hofrichter M. (1998): Conversion of aminonitrotoluenes by fungal manganese peroxidase. *J. Basic Microbiol.* 38: 51-59.
- Schlosser D., Höfer C. (2002): Laccase-catalysed oxidation of Mn^{2+} in the presence of natural Mn^{3+} chelators as a novel source of extracellular H_2O_2 production and its impact on manganese peroxidase. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3514-3521.
- Soares G.M.B., de Amorim M.T.P., Costa-Ferreira M. (2001): Use of laccase together with redox mediators to decolourize Remazol Brilliant Blue R. *J. Biotechnol.* 89: 123-129.
- Soden D.M., Dobson A.D.W. (2001): Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*. *Microbiology* 147: 1755-1763.
- Stolz A. (2001): Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 69-80.
- Sumathi S., Manju B.S. (2000): Uptake of reactive textile dyes by *Aspergillus foetidus*. *Enzyme Microb. Technol.* 27: 347-355.
- Svobodová K., Erbanová P., Sklenář J., Novotný Č. (2006): The role of mn-dependent peroxidase in dye decolorization by static and agitated cultures of *Irpex lacteus*. *Folia Microbiol.* 51: 583-588.
- Svobodová K., Majcherczyk A., Novotný Č., Kües U. (2008): Implication of mycelium-associated laccase from *Irpex lacteus* in the decolorization of synthetic dyes. *Bioresour. Technol.* 99: 463-471.
- Svobodová K., Senholdt M., Novotný Č., Rehorek A. (2007): Mechanism of Reactive Orange 16 degradation with the white rot fungus *Irpex lacteus*. *Process Biochem.* 42: 1279-1284.

- Swamy J., Ramsay J.A. (1999a): Effects of Mn^{2+} and NH_4^+ concentrations on laccase and manganese peroxidase production and Amaranth decolorization by *Trametes versicolor*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 51: 391-396.
- Swamy J., Ramsay J.A. (1999b): The evaluation of white rot fungi in the decoloration of textile dyes. Enzyme Microb. Technol. 24: 130-137.
- Tanaka H., Fuse G., Enoki A. (1991): An extracellular H_2O_2 -producing and H_2O_2 -reducing glycopeptide preparation from the lignin-degrading white-rot fungus, *Irpex lacteus*. Mokuzai Gakkaishi 37: 986-988.
- Tanaka H., Hirano T., Enoki A. (1993): Extracellular substance from the white-rot basidiomycete *Irpex lacteus* for production and reduction of H_2O_2 during wood degradation. Mokuzai Gakkaishi 39: 493-499.
- Tavčar M., Svobodová K., Kuplenk J., Novotný Č., Pavko A. (2006): Biodegradation of azo dye RO16 in different reactors by immobilized *Irpex lacteus*. Acta Chim. Slov. 53: 338-343.
- Thurston C.F. (1994): The structure and function of fungal laccases. Microbiology-Uk 140: 19-26.
- Tien M., Kirk T.K. (1988): Lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. Methods Enzymol. 161: 238-248.
- Torres E., Bustos-Jaimes I., Le Borgne S. (2003): Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. Appl. Catal. B 46: 1-15.
- Tuor U., Winterhalter K., Fiechter A. (1995): Enzymes of white rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. J. Biotechnol. 41: 1-17.
- Valkonen M., Penttilä M., Saloheimo M. (2004): The *ire1* and *ptc2* genes involved in the unfolded protein response pathway in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. Mol. Gen. Genet. 272, 443-451.
- Vares T., Kalsi M., Hatakka A. (1995): Lignin peroxidases, manganese peroxidases, and other ligninolytic enzymes produced by *Phlebia radiata* during solid-state fermentation of wheat straw. Appl. Environ. Microbiol. 61: 3515-3520.

- Vyas B.R.M., Bakowski S., Šašek V., Matucha M. (1994a): Degradation of anthracene by selected white-rot fungi. *FEMS Microbiol. Ecol.* 14: 65-70.
- Vyas B.R.M., Molitoris H.P. (1995): Involvement of an extracellular H₂O₂-dependent ligninolytic activity of the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in the decolourisation of Remazol Brilliant Blue R. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2919-2927.
- Vyas B.R.M., Volc J., Šašek V. (1994b): Ligninolytic enzymes of selected white rot fungi cultivated on wheat straw. *Folia Microbiol.* 39: 235-240.
- Wariishi H., Gold M.H. (1989): Lignin peroxidase compound III formation, inactivation, and conversion to the native enzyme. *FEBS Lett.* 243: 165-168.
- Wariishi H., Valli K., Gold M.H. (1992): Manganese(II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.* 267: 23688-23695.
- Wesenberg D., Kyriakides I., Agasthos S.N. (2003): White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnol. Adv.* 22: 161-187.
- Wiesche C., Martens R., Zadrazil F. (1996): Two-step degradation of pyrene by white-rot fungi and soil microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46: 653-659.
- Willmott N., Guthrie J., Nelson G. (1998): The biotechnology approach to colour removal from textile effluent. *J.S.D.C.* 114: 38-41.
- Wong Y., Yu J. (1999): Laccase-catalysed decolorization of synthetic dyes. *Water Res.* 33: 3512-3520.
- Xiaobin C., Rong J., Pingsheng L., Shiqian T., Qin Z., Wenzhong T., Xudong L. (2007): Purification of a new manganese peroxidase of the white-rot fungus *Schizophyllum* sp. F17, and decolorization of azo dyes by the enzyme. *Enzyme Microb. Technol.* 41: 258-264.
- Yang G., Liu Y., Kong Q.G. (2000): Effect of environment factors on dye decolorization by *P. sordida* ATCC90872 in a aerated reactor. *Process Biochem.* 39: 1401-1405.
- Yang F.C., Yu J.T. (1996): Development of a bioreactor system using an immobilized white rot fungus for decolorization. *Bioprocess Eng.* 15: 307-310.

Yeh R.Y.L., Thomas A. (1995): Color difference measurement and color removal from dye wastewaters using different adsorbents. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 63: 55-59.

Young L., Yu J. (1997): Ligninase-catalysed decolorization of synthetic dyes. *Water Res.* 31: 1187-1193.

Zhang F., Knapp J.S., Tapley K.N. (1999): Decolorization of cotton bleaching effluent with wood rotting fungus. *Water Res.* 33: 919-928.

Zhu X.D., Gibbons J., Garcia-Rivera J., Casadevall A., Williamson P.R. (2001): Laccase of *Cryptococcus neoformans* is a cell wall-associated virulence factor. *Infect. Immun.* 69: 5589-5596.

Zille A., Górnacka B., Rehorek A., Cavaco-Paulo A. (2005a): Degradation of azo dyes by *Trametes villosa* laccase over long periods of oxidative conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 6711-6718.

Zille A., Munteanu F-D., Guebitz G.M., Cavaco-Paulo A. (2005b): Laccase kinetics of degradation and coupling reactions. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 33: 23-28.

Zille A., Ramalho P., Tzanov T., Millward R., Aires V., Cardoso M.H., Ramalho M.T., Guebitz G.M., Cavaco-Paulo A. (2004): Predicting dye biodegradation from redox potentials. *Biotechnol. Prog.* 20: 1588-1592.

Zollinger H., *Colour Chemistry: Synthesis Properties and Applications of Organic Dyes and Pigments*, VCH Publishers, New York, 1991.

8. PŘÍLOHA

Seznam recenzovaných publikací autora

Šušla M., Svobodová K. (2006): Ligninolytické enzymy jako účinné nástroje pro biodegradaci obtížně rozložitelných organopolutantů. *Chem. Listy* 100: 889-895.

Svobodová K., Šušla M., Vandrovcová M., Pojerová E. (2006): Ligninolytic capacity of two fungi, *Irpex lacteus* and *Dichomitus squalens*, immobilized on solid support. *Eds. Gidarakos et al., In Protection and restoration of the environment VIII. 2006-07-03 – 2006-07-07, Chania, Greece, P104.*

Šušla M., Svobodová K., Tavčar M., Pavko A., Novotný Č. (2006): Ligninolytic capacity of selected white rot fungi cultivated in their immobilized form. *Eds. Kočárek et al., In Environmental changes and biological assessment III. Scripta Facultatis Rerum Naturalium Universitatis Ostraviensis Nr. 163, Ostrava, pp. 347-353.*

Šušla M., Novotný Č., Svobodová K. (2007): The implication of *Dichomitus squalens* laccase isoenzymes in dye decolorization by immobilized fungal cultures. *Bioresour. Technol.* 98: 2109-2115.

Šušla M., Svobodová K. (2008): Effect of various synthetic dyes on the production of manganese-dependent peroxidase isoenzymes by immobilized *Irpex lacteus*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24: 225-230.

Šušla M., Novotný Č., Erbanová P., Svobodová K. (2008): Implication of *Dichomitus squalens* manganese-dependent peroxidase in dye decolorization and cooperation of the enzyme with laccase. *Folia Microbiol.* – submitted.

Účast na vědeckých konferencích

Environmental changes and biological assessment III. 26.-28.4. 2006, Ostrava.

Genetics of industrial microorganisms. 24.-28.6. 2006, Praha.

10th International Congress on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry. 10.-15.6. 2007, Madison, USA.

9. SEZNAM ZKRATEK

ABTS	2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonát)
BPB	Bromophenol Blue
CSB	Chicago Sky Blue
CuP	Copper(II)phthalocyanine
DMAB	3-dimethylaminobenzoová kyselina
2,6-DMP	2,6-dimethoxyfenol
FPLC	fast protein liquid chromatography
IEF	isoelektrická fokusace
kDa	kilo Dalton
LiP	ligninperoxidasa
MBTH	3-methyl-2-benzothiazolinon-hydrazon hydrochlorid
MEG	malt-extrakt glukosové medium
MIP	mangan-independentní peroxidasa
MnP	mangan-dependentní peroxidasa
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
pI	isoelektrický bod
PUF	polyurethan
PW	borovicové dřevo
RBBR	Remazol Brilliant Blue R
RBV5R	Remazol Brilliant Violet 5R
RO16	Reactive Orange 16
RSB	Remazol Schwarz B