

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra Biochemie

BIODEGRADACE POLYCHLOROVANÝCH
BIFENYLŮ POMOCÍ LIGNINOLYTICKÝCH HUB A
JEJICH ENZYMŮ

BIODEGRADATION OF POLYCHLORINATED
BIPHENYLS BY WHITE - ROT FUNGI AND THEIR
ENZYMES

Diplomová práce
studijního programu Biochemie

Vypracovala: Bc. Lucie Linhartová

Vedoucí práce: RNDr. Lucie Bořek-Dohalská, Ph.D.

Školitel: RNDr. Tomáš Cajthaml, Ph.D.

Praha 2010

Tato diplomová práce byla financována z grantu č. 2B06156 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky a z ústavního výzkumného záměru č. AV0Z0200510.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele RNDr. Tomáše Cajthamla, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne

Podpis:

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školoteli RNDr. Tomášovi Cajthamlovi, Ph.D. za čas a cenné rady, které mi věnoval a za způsob, jakým ke mně přistupoval. Dále děkuji Mgr. Kateřině Svobodové, Ph.D., která mi velmi ochotně pomohla a poradila vždy, kdy jsem potřebovala. Za totéž děkuji i zbylému kolektivu Laboratoře environmentální biotechnologie, a to Zdeně, Míře, Móně, Milanovi, Alče, Tatianě, Stefanovi a ostatním.

Děkuji RNDr. Petru Baldrianovi, Ph.D. za možnost využívat FPLC, Ing. Otakaru Hlaváčkovi, Ph.D. za možnost měření na spektrofotometru.

V neposlední řadě děkuji Jaromírovi a zbytku své rodiny, která mi během studia pomáhala a vždy mě podporovala.

Obsah

Abstrakt.....	6
Abstract.....	7
Seznam použitých zkratek.....	8
1. Teoretický úvod.....	10
1.1. Polychlorované bifenyly.....	10
1.1.1. Fyzikální a chemické vlastnosti PCB.....	10
1.1.2. Výroba PCB a zdroje znečištění životního prostředí.....	12
1.1.3. Toxicita PCB a vliv na živé organismy.....	12
1.1.4. Odstraňování PCB ze životního prostředí.....	12
1.1.4.1. Bakteriální degradace PCB.....	13
1.1.4.2. Fytoremediace PCB.....	13
1.1.4.3. Mykoremediace PCB.....	13
1.2. Houby bílé hniloby a jejich degradační potenciál.....	15
1.2.1. Ligninolytické enzymy.....	16
1.2.1.1. Lakasa.....	16
1.2.1.2. Lignin peroxidasa.....	19
1.2.1.3. Mangan-dependentní peroxidasa.....	21
1.2.1.4. Versatilní peroxidasa.....	23
1.2.1.5. Minoritní ligninolytické enzymy.....	23
1.2.2. Cytochromy P450.....	24
1.2.3. Ostatní enzymy.....	28
1.2.3.1. Nitrát reduktasa.....	28
1.2.3.2. Tyrosinasy.....	28
2. Cíl práce.....	29
3. Materiály a metody.....	30
3.1. Použité mikroorganismy.....	30
3.1.1. Houbové kmeny.....	30

3.1.2. Bakterie	30
3.2. Materiál a chemikálie	30
3.2.1. Rozpouštědla	30
3.2.2. Standardy.....	30
3.2.3. Ostatní	31
3.3. Přístrojové vybavení	32
3.4. Pufry	33
3.5. Kultivace.....	34
3.5.1. Příprava kultivačních medií a sterilizace.....	34
3.5.2. Příprava inokula	35
3.6. Stanovení aktivity ligninolytických enzymů	36
3.6.1. Lakasa v kultivační tekutině.....	36
3.6.2. Lakasa vázaná na mycelium.....	36
3.6.3. Lignin peroxidasa v kultivační tekutině	37
3.6.4. Mangan-dependentní peroxidasa v kultivační tekutině	37
3.7. Stanovení koncentrace proteinů.....	38
3.8. Stanovení PCB a jejich metabolitů plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí	39
3.8.1. Extrakce PCB a jejich metabolitů.....	39
3.8.2. Derivatizace metabolitů.....	39
3.8.3. Podmínky plynové chromatografie s hmotnostní detekcí	40
3.9. Stanovení akutní toxicity	41
3.10. Produkce ligninolytických enzymů v čistém a kontaminovaném mediu.....	42
3.11. Isoelektrická fokusace	42
3.12. <i>In vivo</i> degradace D103 pomocí houby <i>P. ostreatus</i>	43
3.13. Kvalitativní stanovení produktů <i>in vivo</i> rozkladu PCB	43
3.14. Purifikace extracelulární lakasy z <i>P. ostreatus</i> indukované Cu^{2+}	43
3.15. Využití extracelulárních enzymů <i>P. ostreatus</i> pro degradaci PCB <i>in vitro</i>	45
3.15.1. <i>In vitro</i> inkubace PCB s extracelulární lakasou indukovanou Cu^{2+}	45

3.15.2. <i>In vitro</i> inkubace PCB s extracelulární tekutinou a myceliem po kultivaci <i>P. ostreatus</i> v přítomnosti PCB	46
3.16. Izolace mikrosomální frakce z houby <i>P. ostreatus</i>	47
3.16.1. CO vazebná spektra mikrosomální frakce.....	47
3.17. <i>In vitro</i> inkubace kongenerů PCB s mikrosomální frakcí <i>P. ostreatus</i>	47
4. Výsledky	49
4.1. <i>In vivo</i> degradace 200 µg, 1000 µg a 2000 µg D103 houbou <i>P. ostreatus</i>	49
4.2. Akutní toxicita metabolitů degradace 200 µg D103 houbou <i>P. ostreatus</i>	50
4.3. Aktivity lakas <i>P. ostreatus</i> v PCB kontaminovaném a nekontaminovaném mediu	51
4.4. Purifikace lakasy.....	52
4.5. <i>In vitro</i> inkubace PCB s purifikovanou lakasou	53
4.6. <i>In vitro</i> inkubace PCB s kultivační tekutinou a myceliem <i>P. ostreatus</i> z kultivace v přítomnosti PCB	55
4.7. pI jednotlivých isoformů lakas získaných při různých kultivačních podmínkách <i>P. ostreatus</i>	58
4.8. Charakterizace získané mikrosomální frakce	59
4.9. <i>In vitro</i> inkubace mikrosomální frakce s kongenery PCB.....	59
4.10. Analýza metabolitů z <i>in vivo</i> degradace PCB.....	61
4.11. Metabolity vzniklé po <i>in vitro</i> degradaci PCB mikrosomální frakcí	64
5. Diskuze.....	65
6. Souhrn	70
7. Seznam použité literatury.....	71

Abstrakt

Polychlorované bifenyly (PCB) jsou škodlivé perzistentní organopolutanty životního prostředí, jejichž množství uniklé do životního prostředí je odhadováno na 750000 tun. Houby bílé hniloby jsou dlouho studovány pro svůj degradační potenciál vůči různým aromatickým organopolutantům a je známo, že jsou schopny degradovat PCB *in vivo*. V této práci byla z hlediska biodegradace PCB studována houba *Pleurotus ostreatus*. V první části experimentů byl sledován vysoký degradační potenciál *P. ostreatus*, a to i při relativně vysokém množství přidaných PCB. Houba *P. ostreatus* byla schopna během 42 dní transformovat $780 \pm 50 \mu\text{g}$ PCB při počátečním množství $1000 \mu\text{g}$ PCB ve 20 ml kultivačního media. Dále byla sledována snižující se toxicita v průběhu degradace PCB, což tento organismus řadí mezi vhodné kandidáty pro dekontaminaci v praxi. *In vitro* experimenty s lakasou izolovanou z extracelulární tekutiny kultury *P. ostreatus* indukované Cu^{2+} neprokázaly účast lakasy při prvním kroku degradace PCB. Lakasa z houby *P. ostreatus* neprokázala schopnost transformovat PCB ani v případě, kdy byla získána z media obsahujícího PCB. V této práci bylo prokázáno, že první krok transformace PCB může probíhat intracelulárním procesem, a to na úrovni mikrosomální frakce. Byla detekována 44-67% degradace u vybraných di-pentachlorovaných bifenyly. Mechanismus transformace PCB není objasněn, ale pravděpodobně metabolismus PCB a jejich transformačních produktů pomocí houby *P. ostreatus* zahrnuje dva mechanismy. Charakterizace produktů rozkladu PCB ukazuje na uplatnění dehalogenačního mechanismu, který transformuje vícechlorované PCB a umožňuje tak jejich další transformaci.

Klíčová slova: Polychlorované bifenyly, *Pleurotus ostreatus*, Lakasa, Mikrosomální frakce, Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

Abstract

Polychlorinated biphenyls (PCB) represent relevant persistent organopollutants of the environment and the estimated amount of PCB released into the environment is 750000 metric tons. White-rot fungi have been studied for long time due to their degradative potential toward various aromatic pollutants and it is known that these fungi are able to decompose PCB *in vivo*. Biodegradation of PCB by the fungus *Pleurotus ostreatus* was studied in the frame of this work. A high degradative efficiency of *P. ostreatus* was observed in the first set of experiments, even in the presence of relative high amount of added PCB. Fungus was able to transform 780 ± 50 μg out of the initial amount 1000 μg in 20 ml of a cultivation media within 42 days. A decrease in toxicity was recorded during the degradation that suggests the suitability of this organism for a practical use in decontamination. *In vitro* experiments with purified laccase induced with Cu^{2+} from this fungus did not prove any participation of the enzyme in the first step of PCB transformation. The enzyme did not show an ability to degrade PCB even after purification from cultivation media containing PCB. It was found that the first step of PCB transformation can be performed by an intracellular process with microsomal fraction. A degradation of 44-67% was observed for selected PCB congeners possessing from 2 to 5 chlorine substituents. The degradation mechanism has not been clarified, however, the process include probably two mechanisms. Characterized PCB degradation products suggest a presence of a dechlorination mechanism that allows a further degradation of the produced lower chlorinated intermediates. (In Czech)

Keywords: Polychlorinated biphenyls, *Pleurotus ostreatus*, Laccase, Microsomal fraction, Gas chromatography – mass spectrometry

Seznam použitých zkratek

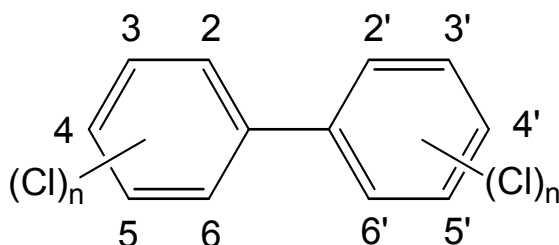
A	absorbance
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonová kyselina)
BSA	hovězí sérový albumin (bovine serum albumine)
BSTFA	<i>N</i> , <i>o</i> -bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamid
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DMP	2,6-dimethoxyfenol
DMSO	dimethylsulfoxid
DTT	dithiothreitol
D103	Delor 103
EA	enzymová aktivita
EDTA	kyselina ethylendiaminová
f	korekční faktor
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (gas chromatography-mass spectrometry)
HBA	4-hydroxybenzoová kyselina
HRP	křenuvová peroxidasa (horseradish peroxidase)
IEF	isoelektrická fokusace
IUPAC	Mezinárodní unie pro čistou a užitnou chemii
L	signál luminiscence
LiP	lignin peroxidasa
LNMM	dušičkem limitované minerální médium (low nitrogen mineral medium)
MEG medium	malt-extrakt glukosové médium
MFO	oxidasy se smíšenou funkcí (mixed function oxidase)
MIP	mangan-independentní peroxidasa
Mix	směs mediátorů (HBA, TEMPO, ViA, SA, RG, Tyr, 2-ClBa, 2,6-dClBa)
MnP	mangan-dependentní peroxidasa
NADH	redukovaný nikotinamid adenin dinukleotid
NADPH	redukovaný nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NR	nitrát reduktasa
PAU	polycyklické aromatické uhlovodíky
PB	piperonyl butoxid
PCB	polychlorované bifenyly
<i>pI</i>	isoelektrický bod

PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
RG	redukovaný glutathion
rpm	otáčky za minutu (rotations per minute)
SA	kyselina sinapová
TEMPO	2,2,6,6-tetrametyl piperidin 1-oxyl radikál
Tyr	tyrosin
T1, T2, T3	reakční centra lakasy
VA	veratryl alkohol
V _e	objem enzymatického preparátu
ViA	violurová kyselina
VP	versatilní peroxidasa
V _{rs}	objem reakční směsi
ϵ	molární extinkční koeficient
2-CIBa	2-chlorbenzaldehyd
2,6-dCIBa	2,6-dichlorbenzaldehyd

1. Teoretický úvod

1.1. Polychlorované bifenyly

PCB jsou deriváty bifenyly, které ve své molekule obsahují 1-10 atomů chloru (Obr. 1). Rozdílný počet a polohy atomů chloru v molekulách PCB umožňují existenci 209 kongenerů těchto látek. Podle Ballschmitera a Zella¹ bylo zavedeno číslování jednotlivých kongenerů, které bylo uznáno i Mezinárodní unií pro čistou a užitnou chemii (IUPAC). Počet a polohy atomů chloru v molekulách jednotlivých kongenerů označených podle IUPAC je shrnut v následující tabulce (Tab. 1, str. 11). Jednotlivé kongenery se liší v substituci v polohách *ortho* (2,2',6,6'), *meta* (3,3',5,5') a *para* (4,4'), což určuje jejich vlastnosti.



Obr. 1: Vzorec polychlorovaných bifenyly s vyznačenými polohami atomů chloru ($n = 0-5$).

1.1.1. Fyzikální a chemické vlastnosti PCB

PCB mohou být bezbarvé kapaliny (méně chlorované kongenery) či nažloutlé krystalické látky (více chlorované kongenery). PCB jsou velmi málo rozpustné ve vodě (rozpustnost se pohybuje v rozpětí 2,7-15000 $\mu\text{g/l}$ při teplotě 20 $^{\circ}\text{C}$) a jejich rozpustnost klesá se stoupajícím počtem atomů chloru v molekule. PCB jsou naopak rozpustné v tucích a organických rozpouštědlech. Teplotní stabilita těchto látek je velmi vysoká, stejně jako odolnost PCB vůči působení kyselin a zásad².

Tab. 1: Označení kongenerů PCB podle množství a polohy chlorů v molekule¹.

Kongener	Polohy Cl	Kongener	Polohy Cl	Kongener	Polohy Cl	Kongener	Polohy Cl
1	2	53	2,2',5,6'	105	2,3,3',4,4'	157	2,3,3',4,4',5'
2	3	54	2,2',6,6'	106	2,3,3',4,5	158	2,3,3',4,4',6
3	4	55	2,3,3',4	107	2,3,3',4',5	159	2,3,3',4,5,5'
4	2,2'	56	2,3,3',4'	108	2,3,3',4,5'	160	2,3,3',4,5,6
5	2,3	57	2,3,3',5	109	2,3,3',4,6	161	2,3,3',4,5',6
6	2,3'	58	2,3,3',5'	110	2,3,3',4',6	162	2,3,3',4',5,5'
7	2,4	59	2,3,3',6	111	2,3,3',5,5'	163	2,3,3',4',5,6
8	2,4'	60	2,3,4,4'	112	2,3,3',5,6	164	2,3,3',4',5',6
9	2,5	61	2,3,4,5	113	2,3,3',5',6	165	2,3,3',5,5',6
10	2,6	62	2,3,4,6	114	2,3,4,4',5	166	2,3,4,4',5,6
11	3,3'	63	2,3,4',5	115	2,3,4,4',6	167	2,3',4,4',5,5'
12	3,4	64	2,3,4',6	116	2,3,4,5,6	168	2,3',4,4',5',6
13	3,4'	65	2,3,5,6	117	2,3,4',5,6	169	3,3',4,4',5,5'
14	3,5	66	2,3',4,4'	118	2,3',4,4',5	170	2,2',3,3',4,4',5
15	4,4'	67	2,3',4,5	119	2,3',4,4',6	171	2,2',3,3',4,4',6
16	2,2',3	68	2,3',4,5'	120	2,3',4,5,5'	172	2,2',3,3',4,4',5'
17	2,2',4	69	2,3',4,6	121	2,3',4,5',6	173	2,2',3,3',4,5,6
18	2,2',5	70	2,3',4',5	122	2',3,3',4,5	174	2,2',3,3',4,5,6'
19	2,2',6	71	2,3',4',6	123	2,3,4,4',5	175	2,2',3,3',4,5',6
20	2,3,3'	72	2,3',5,5'	124	2',3,4,5,5'	176	2,2',3,3',4,6,6'
21	2,3,4	73	2,3',5',6	125	2',3,4,5,6'	177	2,2',3,3',4',5,6
22	2,3,4'	74	2,4,4',5	126	3,3',4,4',5	178	2,2',3,3',4,6,6'
23	2,3,5	75	2,4,4',6	127	3,3',4,5,5'	179	2,2',3,3',5,6,6'
24	2,3,6	76	2',3,4,5	128	2,2',3,3',4,4'	180	2,2',3,4,4',5,5'
25	2,3',4	77	3,3',4,4'	129	2,2',3,3',4,5	181	2,2',3,4,4',5,6
26	2,3',5	78	3,3',4,5	130	2,2',3,3',4,5'	182	2,2',3,4,4',5',6
27	2,3',6	79	3,3',4,5'	131	2,2',3,3',4,6	183	2,2',3,4,4',5',6
28	2,4,4'	80	3,3',5,5'	132	2,2',3,3',4,6'	184	2,2',3,4,4',6,6'
29	2,4,5	81	3,4,4',5	133	2,2',3,3',5,5'	185	2,2',3,4,5,5',6
30	2,4,6	82	2,2',3,3',4	134	2,2',3,3',5,6	186	2,2',3,4,5,6,6'
31	2,4',5	83	2,2',3,3',5	135	2,2',3,3',5,6'	187	2,2',3,4',5,5',6
32	2,4',6	84	2,2',3,3',6	136	2,2',3,3',6,6'	188	2,2',3,4',5,6,6'
33	2',3,4	85	2,2',3,4,4'	137	2,2',3,4,4',5	189	2,3,3',4,4',5,5'
34	2',3,5	86	2,2',3,4,5	138	2,2',3,4,4',5'	190	2,3,3',4,4',5,6
35	3,3',4	87	2,2',3,4,5'	139	2,2',3,4,4',6	191	2,3,3',4,4',5',6
36	3,3',5	88	2,2',3,4,6	140	2,2',3,4,4',6'	192	2,3,3',4,5,5',6
37	3,4,4'	89	2,2',3,4,6'	141	2,2',3,4,5,5'	193	2,3,3',4',5,5',6
38	3,4,5	90	2,2',3,4',5	142	2,2',3,4,5,6	194	2,2',3,3',4,4',5,5'
39	3,4',5	91	2,2',3,1',6	143	2,2',3,4,5,6'	195	2,2',3,3',4,4',5,6
40	2,2',3,3'	92	2,2',3,5,5'	144	2,2',3,4,5',6	196	2,2',3,3',4,4',5',6
41	2,2',3,4	93	2,2',3,5,6	145	2,2',3,4,6,6'	197	2,2',3,3',4,4',6,6'
42	2,2',3,4'	94	2,2',3,5,6'	146	2,2',3,4',5,5'	198	2,2',3,3',4,5,5',6
43	2,2',3,5	95	2,2',3,5',6	147	2,2',3,4',5,6	199	2,2',3,3',4,5,6,6'
44	2,2',3,5'	96	2,2',3,6,6'	148	2,2',3,4',5,6'	200	2,2',3,3',4,5',6,6'
45	2,2',3,6	97	2,2',3',4,5	149	2,2',3,4',5',6	201	2,2',3,3',4',5,5',6
46	2,2',3,6'	98	2,2',3',4,6	150	2,2',3,4',6,6'	202	2,2',3,3',5,5',6,6'
47	2,2',4,4'	99	2,2',4,4',5	151	2,2',3,5,5',6	203	2,2',3,4,4',5,5',6
48	2,2,4,5	100	2,2',4,4',6	152	2,2',3,5,6,6'	204	2,2',3,4,4',5,6,6'
49	2,2',4,5'	101	2,2',4,5,5'	153	2,2',4,4',5,5'	205	2,3,3',4,4',5,5',6
50	2,2',4,6	102	2,2',4,5,6'	154	2,2',4,4',5,6'	206	2,2',3,3',4,4',5,5',6'
51	2,2',4,6'	103	2,2',4,5',6	155	2,2',4,4',6,6'	207	2,2',3,3',4,4',5,6,6'
52	2,2',5,5'	104	2,2',4,6,6'	156	2,3,3',4,4',5	208	2,2',3,3',4,5,5',6,6'
						209	2',2,3,3',4,4',5,5',6,6'

1.1.2. Výroba PCB a zdroje znečištění životního prostředí

Vzhledem k chemickým a fyzikálním vlastnostem (dobré elektroizolační vlastnosti, nehořlavost, dobrá tepelná vodivost a malá rozpustnost ve vodě) našly PCB široké uplatnění v průmyslu. Pro průmyslové využití však nebyly vyráběny jednotlivé kongenery zvláště, ale celé směsi PCB, a to chlorací bifenyly za katalýzy solí železa. Zastoupení kongenerů v komerčně vyráběných směsích byla dána stupněm chlorace při jejich výrobě³. V USA byly tyto komerční směsi vyráběny pod názvem Aroclor, v ČSSR pod označením Delor. Jednotlivé komerční názvy byly dále označeny číselně, a to podle stupně chlorace směsi. Například Delor 106 obsahuje 60 % chloru a nejvíce jsou ve směsi zastoupeny hexachlorované bifenyly, kdežto Delor 103 (D103) obsahuje 30 % chloru. V 50. a 60. letech minulého století byla výroba PCB na svém vrcholu a tyto látky se používaly především jako přísady do barev, inkoustu, lepidel, některých pesticidů, umělých hmot nebo jako náhražka vosků při výrobě nábytku.

1.1.3. Toxicita PCB a vliv na živé organismy

V 70. letech byly PCB nalezeny v životním prostředí a začaly se projevovat jejich škodlivé účinky na lidské zdraví⁴. Díky tomu se výroba PCB značně omezila a použití bylo povoleno pouze v uzavřených systémech, ze kterých PCB neunikaly do životního prostředí. V ČSSR byla výroba těchto kontaminantů zastavena k 1. lednu 1984.

Přestože se PCB nevyrábí již čtvrt století, zůstávají vzhledem ke své chemické i fyzikální stabilitě v životním prostředí. Dnes se v biosféře nachází přibližně 750000 tun PCB. Jelikož jsou PCB lipofilní organopolutanty, začlenily se do potravního řetězce a představují tak zdravotní riziko i pro člověka. Jednotlivé kongenery mají různě závažný škodlivý vliv na nervový⁵, reprodukční⁶ i endokrinní systém⁷ a řadí se mezi tzv. podezřelé karcinogeny⁸. Toxicita jednotlivých kongenerů závisí na počtu atomů chloru v molekule (více chlorované bifenyly jsou obecně toxičtější), ale také na jejich poloze. Kongenery substituované v polohách *meta* a *para* jsou toxičtější, než kongenery substituované v polohách *ortho*².

1.1.4. Odstraňování PCB ze životního prostředí

V dnešní době se PCB likvidují nejčastěji velmi nákladným spalováním při teplotě nad 1300 °C². Jestliže nejsou tyto podmínky dodrženy, vznikají chlorované dioxiny a

dibenzofurany, které jsou toxičtější než samotné PCB. Při spalování půdy kontaminované PCB navíc dochází k její nevratné degradaci⁹. Proto jsou hledány alternativní cesty likvidace těchto perzistentních organopolutantů. Bioremediace využívající mikroorganismů se zdá být šetrná k životnímu prostředí a finančně méně náročná. Vhodnými kandidáty pro bioremediaci jsou některé druhy půdních bakterií, rostlin a ligninolytických hub².

1.1.4.1. Bakteriální degradace PCB

Bylo popsáno několik kmenů bakterií, které jsou schopny degradovat PCB¹⁰. Monochlorované bifenyly slouží dokonce jako zdroj uhlíku a energie, kdežto ostatní PCB mohou být transformovány kometabolismem, který bakterii neslouží pro výrobu energie. Bakteriální transformace může probíhat jak aerobně, tak anaerobně. Anaerobní bakterie jsou schopny reduktivní dechlorace více chlorovaných bifenyly v polohách *meta* a *para*, čímž dochází ke kumulaci *ortho* substituovaných PCB, a tedy ke snížení toxicity. Aerobní bakterie oproti tomu atakují bifenylový skelet méně chlorovaných bifenyly. Produkty aerobní degradace jsou pak chlorbenzoové a 5-C chloralifatické kyseliny². Charakter intermediátů se může u jednotlivých rodů bakterií lišit. Bakterie *Alkaligenes* produkovala chlorbenzoové kyseliny, kdežto v případě bakterie *Acinetobacter* byly jako intermediáty nalezeny hydroxylované PCB¹¹.

1.1.4.2. Fytoremediace PCB

Rostliny patří mezi organismy schopné transformovat PCB. Bylo prokázáno, že tabák (*Nicotina tabacum*) a křen (*Armoracia rusticana*) degraduje PCB v reálně kontaminované půdě¹². U několika dalších rostlin byla testována jejich schopnost transformovat PCB¹³. Degradace byly zpravidla částečně inhibovány inhibitory peroxidas a cytochromu P450. Také bylo popsáno několik typů metabolitů nalezených po degradaci PCB tabákem¹⁴. Skupina Magee a kol.¹⁵ popsala dechloraci kongeneru PCB 153 *in vitro* při využití surového extraktu nitrát reduktasy (NR) z rostliny *Tolice vojtěška* (*Medicago sativa*).

1.1.4.3. Mykoremediace PCB

Houby bílé hniloby patří do skupiny organismů, které mají vysoký potenciál pro degradaci širokého spektra organopolutantů. Vykazují degradační schopnost vůči chlorfenolům¹⁶, syntetickým barvivům^{17,18}, nitroaromátům, jako je například 2,4,6-trinitrotoluen¹⁹, atd.

V literatuře existuje několik prací zabývajících se degradací polycyklických aromatických uhlovodíků (PAU) ligninolytickými houbami. Jsou popsány metody *in vivo*^{18,20} využívající k degradačním pokusům celých houbových kultur, i metody *in vitro* využívající purifikované extracelulární ligninolytické enzymy MnP a lakasu^{21,22,23,24,25,26}.

Degradace PCB je oproti transformaci PAU méně prostudovaná. První práce využívající houbu bílé hniloby (*Phanerochaete chrysosporium*) k degradaci PCB byla publikována v roce 1985²⁷. Později bylo prokázáno, že houby bílé hniloby jsou schopny degradovat jak samostatné kongenery²⁸, tak i vyráběné komerční směsi^{29,30}. Od té doby byly publikovány práce, které diskutují možné využití dalších ligninolytických hub včetně vhodnosti jednotlivých kultivačních medií^{30,31}. Bylo potvrzeno, že houby bílé hniloby jsou schopny degradovat PCB jak v tekutých médiích^{29,30,31}, tak v kontaminovaných půdách³². Obecně platí, že jsou během *in vivo* degradačních pokusů lépe degradovány kongenery s nižším počtem atomů chloru v molekule PCB. Kongenery substituované v pozicích *meta* a *para* jsou odolnější vůči degradačním procesům, narozdíl od kongenerů substituovaných v polohách *ortho*, které jsou degradovány efektivněji^{29,33}. Do dnešního dne však chybí práce, ve které by byl publikován pozitivní výsledek *in vitro* degradace PCB s purifikovanými a charakterizovanými enzymy.

Existují však práce, ve kterých se autoři zaměřili na analýzu metabolitů se snahou sestavit posloupnost jednotlivých reakcí degradace PCB houbami bílé hniloby. Jako metabolity vzniklé při *in vivo* degradaci kongeneru PCB 15 (4,4'-dichlorbifenyl) houbou *P. chrysosporium* byly identifikovány monohydroxy deriváty PCB 15, monomethoxy deriváty PCB 15, 4-chlorbenzoová kyselina, 4-chlorbenzaldehyd a 4-chlorbenzylalkohol³¹.

Někteří autoři se zabývají degradací PCB houbami bílé hniloby s využitím jejich neligninolytických enzymů. De a kol.³⁴ studovali účast nitrát reduktasy (NR) při reduktivní dechloraci PCB 153 za aerobních podmínek a inhibice dechlorace za přítomnosti inhibitorů NR vypovídá o účasti enzymu v reakci. Autoři dechloraci PCB 153 sledovali také v případě, kdy použili komerčně dostupnou houbovou NR. Köller a kol.³⁵ popsali degradaci kongenerů PCB 9 a PCB 52 *in vivo* houbou *Trametes multicolor*, během které byla zjištěna zvýšená peroxidasová aktivita. Účast peroxidasy při degradaci kongenerů PCB 9 a PCB 52 byla v této práci prokázána experimentem *in vitro* s komerčně dostupnou křenovou peroxidasou (HRP).

Pozitivní výsledky degradace byly publikovány v pracích zabývajících se *in vitro* degradacemi hydroxylovaných PCB purifikovanými lakasami hub bílé hniloby^{36,37}. Lakasa purifikovaná z *Trametes versicolor* a *P. ostreatus* degradovala hydroxylované PCB³⁷, avšak hydroxylované bifenyly obsahující více než tři atomy chloru v molekule byly vůči degradaci rezistentní. Nižší odolnost méně chlorovaných hydroxylovaných PCB vůči degradaci lakasami byla diskutována také v práci Fujihira a kol.³⁸, který použil pro degradace lakasu z ligninolytické houby *T. versicolor*, heterologně exprimovanou organismem *Aspergillus oryzae*.

1.2. Houby bílé hniloby a jejich degradační potenciál

Houby bílé hniloby (ligninolytické houby) jsou organismy rostoucí na dřevě. Produkují tzv. ligninolytické enzymy, které jim umožňují rozkládat polymerní molekulu ligninu. Tím se pro tyto organismy zpřístupní celulósa a hemicelulósa, které mohou využívat jako zdroj uhlíku a energie. Většina těchto hub patří mezi basidiomycety. Hlavními zástupci ligninolytických hub jsou rody *Bjerkandera*, *Dichomitus*, *Phanerochaete*, *Pleurotus*, *Trametes*³⁹. Po degradaci ligninu těmito houbami zůstává zejména bíle zbarvená celulósa. Podle vzhledu napadeného dřeva jsou houby degradující lignin pojmenovány jako houby bílé hniloby.

Lignin je po celulóse a hemicelulóse třetím nejrozšířenějším biopolymerem na Zemi⁴⁰ a vyskytuje se u všech cévnatých rostlin. Lignin je heterogenní polyfenolický biopolymer skládající se ze tří základních jednotek, kterými jsou primární hydroxyskořicové alkoholy: *p*-kumarylalkohol, koniferylalkohol, sinapylalkohol. Tyto základní jednotky jsou u různých rostlinných druhů zastoupeny v různém poměru. V molekule ligninu se vyskytuje několik typů vazeb, které propojují jednotlivé monomerní jednotky, a to β -O-4, β -5, β - β , 5-5, 4-O-5, β -1. Struktura molekuly ligninu byla dlouho považována za náhodně uspořádanou, ale novější studie ukazují, že by se mohlo jednat o strukturu, jejíž syntéza podléhá biochemické kontrole^{41,42}. Lignin je velice odolný vůči degradaci. Rozkládat lignin je schopno pouze několik typů organismů, které jsou vybaveny příslušným enzymovým aparátem⁴².

1.2.1. Ligninolytické enzymy

Převážná většina enzymů participujících na degradaci ligninu je produkována extracelulárně. Nepravidelné uspořádání monomerních jednotek v molekule ligninu determinuje nízkou substrátovou specifitu ligninolytických enzymů. Mezi ligninolytické enzymy hub bílé hniloby jsou řazeny lignin peroxidasa (LiP; EC 1.11.1.14), mangan-dependentní peroxidasa (MnP; EC 1.11.1.13) a versatilní peroxidasa (VP; 1.11.1.16) a neméně významná fenoloxidas, lakasa (EC 1.10.3.2). Do této skupiny enzymů jsou řazeny i tzv. pomocné enzymy jako je např. glyoxal oxidasa (EC 1.2.3.5) a aryl alkohol oxidasa (EC 1.1.3.7)^{40,41,42}.

1.2.1.1. Lakasa

Lakasa (EC 1.10.3.2) patří mezi fenoloxidas. Poprvé byla lakasa popsána v roce 1883 u japonského stromu *Rhus vernicifera*⁴³ a patří mezi vůbec první popsané enzymy. Až poté byla lakasa nalezena u hub⁴⁴. Dnes je však popsána přítomnost lakasy i u některých skupin bakterií⁴² a hmyzu⁴⁵. Je popsáno více než 100 houbových isoenzymů lakasy, které mohou mít monomerní či dimerní proteinovou strukturu s různým stupněm glykosilace proteinu (10-45% u houbových)⁴². Velikost jedné monomerní jednotky se pohybuje v rozmezí 50-110 kDa⁴⁶. Isoelektrický bod (pI) těchto isoenzymů se často nachází v okolí pH 4,0. Většina lakas je produkována extracelulárně^{41,42}.

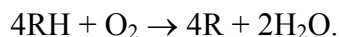
Funkcí lakas není jen rozklad ligninu, ale účastní se také sporulace a tvorby buněčného pigmentu u hub⁴⁶. U rostlin je lakasa začleněna v procesu hojení ran a spolu s peroxidasami participuje na biosyntéze ligninu⁴².

Charakteristickým znakem všech lakas je přítomnost dvoumocných iontů mědi v reakčním centru. Z tohoto důvodu patří lakasy do rodiny enzymů tzv. multi-copper oxidas⁴². Někteří autoři uvádí, že počet iontů Cu^{2+} v reakčním centru se u lakas může pohybovat od dvou do čtyř⁴⁶. Jiní autoři považují za lakasy pouze enzymy mající ve svém reakčním centru čtyři Cu^{2+} ionty⁴⁷.

Čtyři ionty Cu^{2+} jsou rozděleny do dvou reakčních center. První centrum, označováno jako T1, obsahuje pouze jeden ion Cu^{2+} (typ-1 Cu, charakteristická absorbance při 600 nm). Druhé centrum označované jako T2/T3 se skládá z vazebného místa T2, které váže jeden ion Cu^{2+}

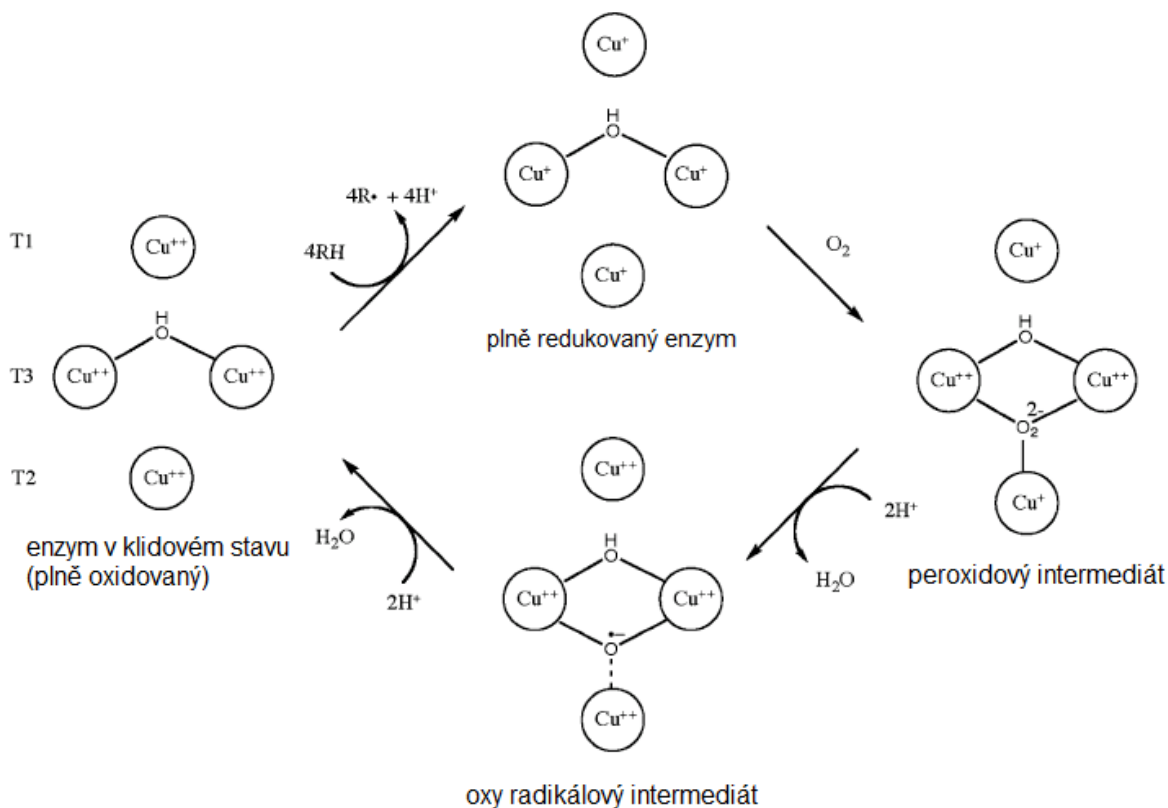
(typ-2 Cu, charakteristická absorpance ve viditelné oblasti světla), a vazebného místa T3 pro zbývající dva ionty Cu^{2+} (typ-3 Cu, charakteristická absorpance při 330 nm).

Reakci, kterou lakasa katalyzuje, je možné zapsat souhrnou rovnicí



Podrobněji je katalytický cyklus znázorněn na Obr. 2 (str. 18). První krok katalýzy probíhá na reakčním centru T1, které je primárním akceptorem elektronu. Zde po vazbě substrátu dochází k redukci Cu^{2+} na Cu^+ . Následně dochází k transportu 4 elektronů (ze 4 molekul substrátu) na druhé reakční centrum T2/T3. Transport je umožněn pravděpodobně prostřednictvím silně konzervované sekvence His-Cys-His. Tímto krokem se enzym dostává z plně oxidovaného (klidového) stavu do stavu plně redukovaného. Transport elektronů z reakčního centra T1 do centra T2/T3 je také krokem limitujícím celkovou rychlost katalýzy⁴².

Redukce kyslíku na vodu probíhá ve dvou krocích. Nejprve se molekula kyslíku váže na centrum T2/T3, což vede k rychlému transportu dvou elektronů ze dvou kationtů mědi uložených ve vazebném místě T3 a vzniká tak peroxidový intermediát. Při redukci kyslíku na vodu je rychlost limitujícím krokem vazba molekuly kyslíku na reakční centrum T2/T3. Poté nastává rychlý transport jednoho elektronu z reakčního centra T1 a dochází k rozpadu peroxidového intermediátu na oxy radikálový intermediát. Tento krok je následován reduktivním rozštěpením O-O vazby a dochází k uvolnění nově vzniklé molekuly vody. Pomalý rozpad intermediátu je usnadněn přenosem jednoho elektronu z kationtu mědi umístěném v centru T2. V posledním kroku jsou všechny čtyři kationty mědi v oxidačním stavu Cu^{2+} a O^{2-} je uvolněn jako druhá molekula vody^{41,42}.

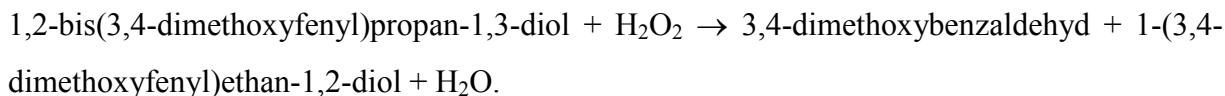


Obr. 2: Katalytický cyklus lakasy. RH = substrát, T1, T2, T3 = reakční centra enzymu. Upraveno podle⁴².

Bylo prokázáno, že katalytické působení lakas usnadňují tzv. mediátory. Mediátory jsou nízkomolekulární látky přírodního či syntetického původu, které zvyšují efektivitu katalyzovaných reakcí. Mediátor je lakasou oxidován a v reakční směsi pak působí jako oxidační činidlo. Substrát je tak sekundárně oxidován bez přímého kontaktu s enzymem. V literatuře je celá řada mediátorů popsána v souvislosti s degradací polycyklických aromatických uhlovodíků (PAU)⁴⁸ a dekolizací průmyslových barviv⁴⁹ pomocí lakas. Mezi syntetické mediátory lakasy jsou řazeny například 2,2'-azinobis(3-etylbenzthiazolin-6-sulfonová kyselina) (ABTS)⁵⁰, kyselina violurová (ViA) a 2,2,6,6-tetrametyl piperidin 1-oxyl radikál (TEMPO)⁵¹. Přírodními mediátory mohou být fenol, 4-hydroxybenzoová kyselina (HBA), tyrosin (Tyr), redukovaný glutathion (RG)⁴⁸, kyselina sinapová (SA)²⁵.

1.2.1.2. Lignin peroxidasa

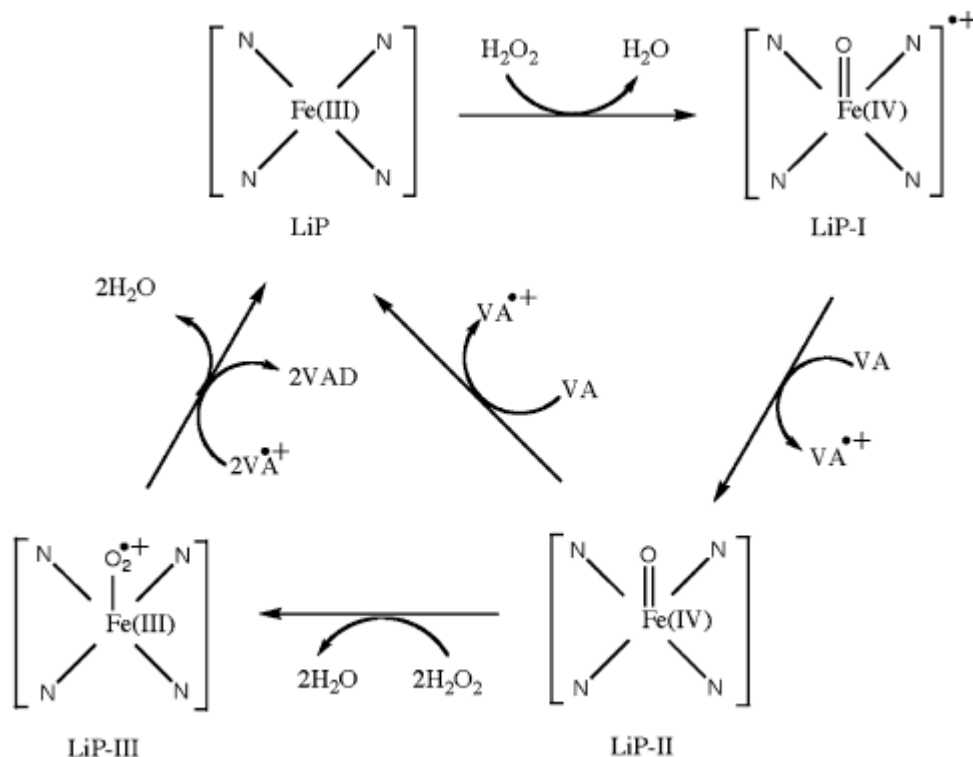
Lignin peroxidasa (LiP) katalyzuje H₂O₂-dependentní oxidativní depolymeraci ligninu⁴². Celkovou reakci lze zapsat jako



LiP je enzym s nízkou substrátovou specifitou. V přítomnosti H₂O₂ oxiduje fenolické aromatické substráty, ale také mnohé nefenolické lignin modelové sloučeniny jako například anisylalkohol a veratrylalkohol (VA)⁵².

LiP byla poprvé objevena u houby *P. chrysosporium*⁵³. Dnes je již známo mnoho různých isoenzymů LiP produkovaných houbami bílé hniloby. Isoenzymy LiP jsou glykoproteiny o velikosti 38-46 kDa, jejichž *pI* leží v rozmezí hodnot pH 3,2 a 4. Charakteristickým znakem LiP je neobvykle nízká hodnota pH optima, která se pohybuje okolo pH 3 a se stoupající hodnotou pH aktivita enzymu rychle klesá⁴².

LiP je globulární protein, který se skládá ze dvou domén. Mezi doménami se nachází štěrbin, ve které je začleněn hem přístupný prostřednictvím dvou malých kanálů. Jednomu molu proteinu odpovídá jeden mol železa protoporfyrinu IX. Struktura proteinu je bohatá na α -helixové struktury a obsahuje osm cysteinových zbytků, které se všechny podílí na vzniku disulfidických můstků. Na každé z domén se nachází kalcium-vazebné místo, které pravděpodobně napomáhá udržovat strukturu aktivního centra. Ve struktuře proteinu se vyskytují jak N-glykosidické, tak O-glykosidické vazby. Glykosilace je pro protein důležitá z hlediska ochrany C-terminálního peptidu před proteolysou. Vazebné místo pro peroxid je umístěno na distální straně hemu a je přístupné prostřednictvím kanálu sahajícímu až na povrch proteinu⁴².

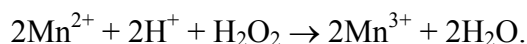


Obr. 3: Katalytický cyklus LiP. VA = veratrylalkohol, VAD = veratrylaldehyd, LiP I, II, III = sloučeniny I, II, III. Upraveno podle⁴².

Katalytický cyklus LiP (Obr. 3) se skládá ze dvou kroků⁵⁴. Prvním krokem je 2 elektronová oxidace nativního enzymu (Fe³⁺) vedoucí ke vzniku sloučeniny I (LiP-I) za současné redukce H₂O₂ na vodu. Druhý krok zahrnuje 1 elektronovou redukci LiP-I za vzniku sloučeniny II (LiP-II), přičemž substrát, např. VA, je oxidován. Další 1 elektronovou oxidací druhé molekuly substrátu se enzym vrací do svého nativního stavu. LiP-II však může při nedostatku substrátu a vysoké koncentraci H₂O₂ reagovat za vzniku sloučeniny III (LiP-III), která je neaktivní a zabraňuje dokončení katalytického cyklu LiP⁵⁵. Vzniku LiP-III brání přítomnost aromatických látek, jako například VA nebo tryptofan⁵⁶.

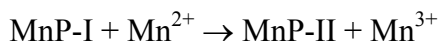
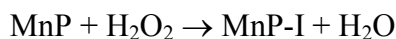
1.2.1.3. Mangan-dependentní peroxidasa

Mangan-dependentní peroxidasa (MnP; EC 1.11.1.13) katalyzuje Mn-dependentní reakci

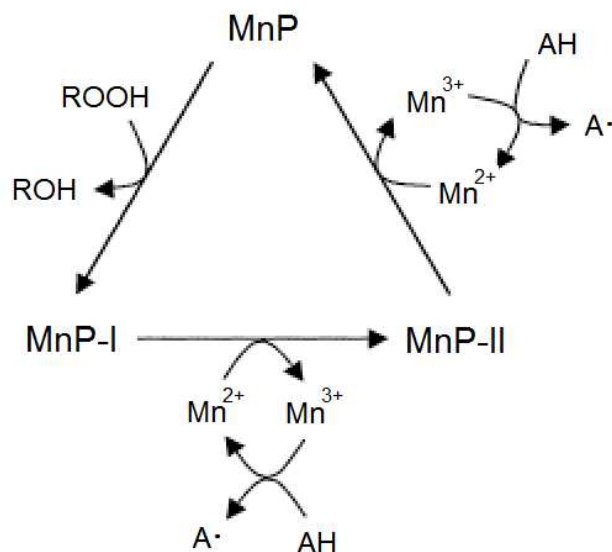


Poprvé byla MnP izolována z *P. chrysosporium*⁵⁷. MnP patří mezi glykoproteinové peroxidasy obsahující hem, jejichž molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí 45-55 kDa⁴⁰. Jednotlivé isoenzymy MnP se liší v hodnotě *pI*, která se nachází v rozmezí pH 3-4,5. Molekulová struktura MnP je velice podobná struktuře LiP. MnP se skládá ze dvou proteinových domén, mezi nimiž je uložen hem, jedenácti α -helixů a pěti disulfidických můstků. Disulfidický můstek na C-terminálním konci napomáhá formovat Mn^{2+} -vazebné místo⁴².

MnP dokáže využívat Mn^{2+} jako redukční substrát⁴². Katalytický cyklus MnP (Obr. 4, str. 22) je velice podobný katalytickému cyklu LiP a lze zapsat rovnicemi



Nativní enzym MnP reaguje s H_2O_2 za vzniku sloučeniny I (MnP-I), která následně váže Mn^{2+} a dochází k jeho oxidaci na Mn^{3+} . V tomto kroku je MnP-I redukována prostřednictvím Mn^{2+} na sloučeninu II (MnP-II). K této redukci však může dojít i prostřednictvím jiného donoru elektronu (například fenolické sloučeniny)⁵⁸. V posledním kroku katalytického cyklu dochází k druhé 1 elektronové redukci MnP-II a enzym se takto vrací do svého nativního stavu. V tomto posledním regeneračním kroku je však úloha Mn^{2+} nezbytná k dokončení katalytického cyklu⁴².



Obr. 4: Katalytický cyklus MnP. MnP I, II = sloučeniny I, II. Upraveno podle⁵⁹.

Během katalytického cyklu vzniká kation Mn^{3+} , který je velice reaktivní. Dochází k jeho disociaci z enzymu a následné stabilizaci v komplexu s α -hydroxy kyselinami (oxalát či malonát), jejichž přítomnost napomáhá disociaci Mn^{3+} a zvyšuje tak aktivitu enzymu⁴².

Mn^{3+} komplex je schopen difúze a působí jako oxidační činidlo schopné 1 elektronové oxidace fenolických substrátů za vzniku fenoxo radikálového intermediátu, jak je uvedeno v rovnici



Fenoxo radikál následně podléhá dalším, v této chvíli již neenzymatickým, reakcím (např. štěpení vazeb). Dále Mn^{3+} katalyzuje oxidaci fenolických substrátů (jednoduché fenoly, aminy, průmyslová barviva). Za fyziologických podmínek je oxidační schopnost Mn^{3+} komplexu jako takového omezena pouze na oxidaci fenolických sloučenin.

K oxidaci nefenolických substrátů komplex vyžaduje přítomnost mediátoru. V tomto případě se MnP liší od LiP, která je schopna oddělit elektron z aromatického kruhu za vzniku radikál kationtu. Mn^{3+} v přítomnosti thiolu (např. glutathion) zprostředkovává oxidaci například substituovaného benzylalkoholu na příslušný aldehyd. Při této reakci oxiduje thiol na thiolový radikál, který následně odštěpí vodík ze substrátu a vzniká radikál (benzyl), který poté podléhá neenzymatickým reakcím, vedoucím k tvorbě finálního produktu.

1.2.1.4. Versatilní peroxidasa

Versatilní peroxidasa (VP; EC 1.11.1.16) byla poprvé objevena u houby *Pleurotus eryngii*⁶⁰. Vzhledem ke katalytickým vlastnostem byla VP označena jako LiP-MnP hybrid⁴⁰, jelikož vykazuje jak aktivitu charakteristickou pro LiP, tak pro MnP. Proteinová struktura VP se více podobá struktuře LiP, než MnP⁴². V proteinové struktuře je Mn²⁺ vazebné místo, které je typické pro isoenzymy MnP. VP však obsahuje aminokyselinové zbytky charakteristické pro vazbu aromatického substrátu. Tento charakteristický rys se shoduje se strukturou LiP.

Katalytický cyklus houbové VP byl navržen Ruiz-Dueñas a kol.⁵⁹. Stejně jako u LiP a MnP dochází na počátku cyklu k 2 elektronové oxidaci enzymu prostřednictvím H₂O₂ a následné tvorbě sloučeniny typu I. Poté dochází ke dvěma 1 elektronovým oxidacím substrátu, při kterých postupně vzniká sloučenina II a enzym se vrací do svého nativního stavu. VP oxiduje jak aromatické substráty za vzniku příslušných radikálů (bez přítomnosti Mn²⁺), tak Mn²⁺ na reaktivní Mn³⁺, který později působí jako oxidační činidlo schopné difúze, jak je tomu u MnP.

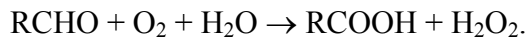
VP je unikátní tím, jaké substráty je schopna oxidovat. Je schopna oxidovat nejen VA, který je typickým substrátem LiP, ale i průmyslová barviva s vysokým redoxním potenciálem. Stejně tak VP oxiduje barviva s nízkým redoxním potenciálem, substituované fenoly a Mn²⁺, které jsou však oxidovány širokým spektrem houbových enzymů^{42,61}.

U hub bílé hniloby byla detekována také mangan-independentní peroxidasa (MIP), která ke své katalytické činnosti nepotřebuje mangan⁶².

1.2.1.5. Minoritní ligninolytické enzymy

Další enzymy zapojené v degradaci ligninu mají především pomocnou úlohu. Mnohé z nich generují H₂O₂, který je nezbytný pro funkci peroxidas⁴².

Glyoxal oxidasa (EC 1.2.3.5) je produkována houbami bílé hniloby, například *P. chrysosporium*. Jedná se o metaloenzym, který ve své molekule váže měď. Glyoxal oxidasa je pro extracelulární degradaci ligninu nezbytná, jelikož extracelulárně vyrábí H₂O₂. Katalyzuje oxidaci aldehydu na karboxylovou kyselinu, přičemž současně dochází k redukci molekuly kyslíku na peroxid vodíku podle rovnice



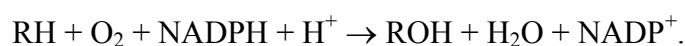
Houba během katalýzy sekretuje do prostředí jednoduché dikarboony (například glyoxal a methylglyoxal), čímž je zajištěn dostatek substrátu pro reakci generující H_2O_2 . Z glyoxalu nejprve vzniká glyoxylová kyselina. Ta je dále metabolisována na kyselinu oxalovou, která dále funguje také jako kofaktor MnP^{63} .

Aryl alkohol oxidasa (EC 1.1.3.7) patří mezi oxidoreduktasy, které mají kovalentně vázaný kofaktor FAD^{64} . Při degradaci ligninu má stejnou úlohu jako glyoxal oxidasa, tedy tvorbu H_2O_2 . Aryl alkohol oxidasa katalyzuje oxidativní dehydrogenaci širokého spektra polynenasycených alifatických primárních alkoholů, při které současně vzniká H_2O_2 . Analogicky, jen s využitím fenolického substrátu, funguje také například vanillyl alkohol oxidasa⁶⁵.

1.2.2. Cytochromy P450

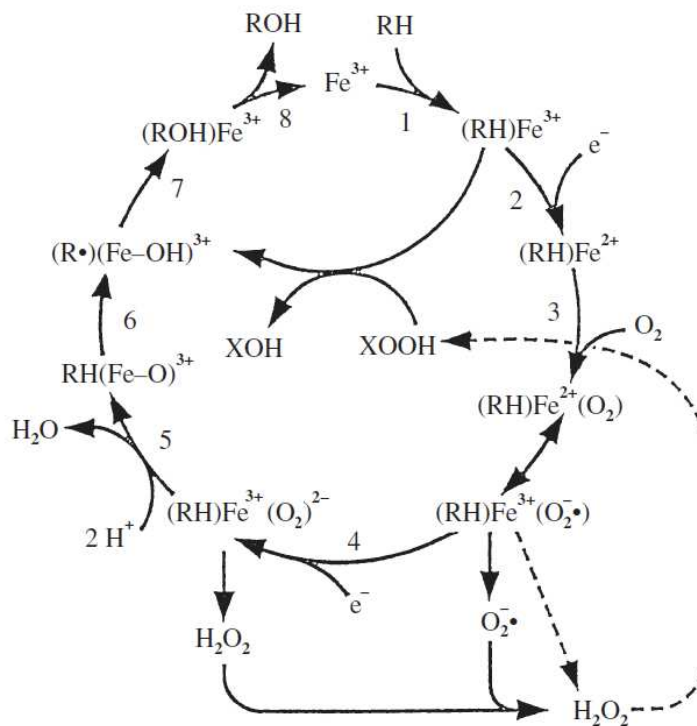
Cytochromy P450 jsou terminálním enzymem systému tzv. oxidas se smíšenou funkcí (MFO systém z anglického mixed function oxidase system). Systém MFO je v eukaryotické buňce lokalizován v membráně hladkého endoplasmatického retikula a je hlavní složkou metabolismu cizorodých látek. Endoplasmatické retikulum je pak při izolaci získáváno ve formě tzv. mikrosomů. Cytochrom P450 se v menší míře vyskytuje také v membráně mitochondrií, kde se podílí na biosyntéze steroidů (kůra nadledvin). U prokaryotických organismů se cytochromy P450 vyskytují v rozpustné formě^{66,67}.

Ačkoli se mohou svou strukturou jednotlivé formy cytochromů P450 značně lišit, aminokyselinové složení v okolí hemu zůstává silně konzervováno. Společným rysem všech cytochromů P450 je přítomnost porfyrinového skeletu (protoporfyrin IX). Ten je částečně vázán hydrofobními silami, ale také pomocí thiolátové síry sulfhydrylové skupiny cysteinu v aktivním centru (pátý ligand železa protoporfyrinu IX). Toto uspořádání determinuje unikátní katalytické a spektrální vlastnosti těchto hemoproteinů. Šestáým ligandem železa protoporfyrinu IX je kyslík molekuly vody. Dalším společným rysem cytochromů P450 je hydrofobní charakter jejich substrátů. Většinu katalyzovaných reakcí lze vyjádřit sumární rovnicí



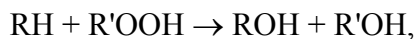
Katalytický cyklus^{66,67,68} je podrobněji znázorněn na Obr. 5 (str. 25). Cyklus začíná vazbou substrátu (RH) do dutiny v blízkosti Fe^{3+} protoporfyrinu IX (krok 1). Konformační změna

spojená s vazbou substrátu usnadňuje redukci Fe^{3+} . Redukce je zprostředkována přenosem elektronů z NADPH (nikotinamid adenin dinukleotid fosfát) na NADPH-cytochrom P450 reduktasu v endoplasmatickém retikulu nebo na ferredoxin reduktasu a nehemový FeS protein v mitochondriích, a poté na vlastní cytochrom P450 (krok 2). Na redukovaný cytochrom P450 se následně váže molekula O_2 (krok 3). Vzniká nestabilní komplex, který je redukován (nyní může elektron z NADPH přinášet NADPH-cytochrom P450 oxidoreduktasa nebo cytochrom b_5) za vzniku komplexu $(\text{RH})\text{Fe}^{3+}(\text{O}_2)^{2-}$ (krok 4). Tento komplex následně podléhá protonizaci (H^+ pochází z aminokyselin v okolí aktivního centra enzymu) a dochází ke štěpení O-O vazby biatomické molekuly kyslíku, přičemž je jeden atom kyslíku redukován na vodu a druhý zůstává vázán v aktivním centru enzymu v komplexu $\text{RH}(\text{Fe}-\text{O})^{3+}$ (krok 5). V následující reakci dochází k odštěpení vodíkového atomu z molekuly substrátu za vzniku radikálu substrátu v komplexu s $(\text{R}\cdot)(\text{Fe}-\text{OH})^{3+}$ (krok 6) a následně vzniká $(\text{ROH})\text{Fe}^{3+}$ (krok 7). Poté je uvolněn produkt (ROH) a nativní forma cytochromu P450 (Fe^{3+}) (krok 8).



Obr. 5: Katalytický cyklus cytochromu P450. RH = substrát, ROH = monooxygenační produkt, XOOH = peroxysloučenina (alternativní donor kyslíku), Fe = atom hemového železa enzymu. Upraveno podle⁶⁹.

Vedle kyslíku může cytochrom P450 pro oxidativní reakce využívat peroxidy a peroxokyseliny. Ty se stávají donorem kyslíku (Obr. 5, str. 25). Peroxidasovou aktivitu cytochromu P450 je pak možné zapsat reakcí



kde RH je substrát, R'OOH je hydroperoxid, ROH je produkt reakce a R'OH je alkohol vzniklý redukcí hydroperoxidu.

Cytochromy P450 jsou schopny katalyzovat velmi široké spektrum reakcí^{66,70}. Kromě hydroxylace substrátu katalyzují cytochromy P450 také například deaminace, dealkylace, dehydrogenace, dehydratace, epoxidaci, oxidativní i reduktivní dehalogenace a oxidativní štěpení C-C vazby.

Cytochromy P450 byly nalezeny u různorodých organismů, od bakterií až po rostliny a živočichy. Tato skutečnost naznačuje, že se jedná o velmi starý hemoprotein, který vznikl ještě před rozdělením vývojových větví eukaryot a prokaryot⁷¹. Cytochromy P450 se tedy vyskytují také u hub. K dnešnímu dni je známo přibližně 8500 houbových cytochromů P450⁷². Převážná většina houbových cytochromů P450 se vyskytuje v endoplasmatickém retikulu⁷³.

Izolace houbového cytochromu P450 je velice obtížná vzhledem k nízké stabilitě proteinu a nízké úrovni exprese těmito organismy. Velká část reakcí katalyzovaných houbovým cytochromem P450 byla prokázána nepřímo na základě závislosti reakce na NADPH a pomocí inhibice reakcí látkami, které jsou považovány za specifické inhibitory cytochromů P450 (např. piperonyl butoxidem (PB) či CO)^{73,74}. Na základě tohoto typu důkazů byla diskutována role houbových cytochromů P450 při degradaci různých organopolutantů. Jejich stručný přehled je uveden v následující tabulce (Tab. 2, str. 27).

Tab. 2: Přehled degradace různých organopolutantů jednotlivými houbami bílé hniloby prostřednictvím cytochromu P450, včetně nalezených metabolitů jednotlivých reakcí a použitého nepřímého důkazu.

Organopolutant	Houba bílé hniloby	Metabolity	Typ důkazu	Zdroj
PAU				
Benzo(a)pyren	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	Hydroxylovaný benzo(a)pyren	NADPH-dependentní reakce, inhibice pomocí CO	75,76
Fenantren	<i>P. ostreatus</i>	Kyselina 2,2'-bifenyldikarboxylová	Inhibice pomocí SKF 525-A, 1-aminobenzotriazolu, fluoxetinu	21
Naftalen	<i>Phlebia lindtneri</i>	Hydroxylovaný naphtalen	Inhibice PB	74
Chlorované dioxiny	<i>P. chrysosporium</i>	Chlorované hydroxydioxiny	Molekulárně-genetické metody	77
Kyselina benzoová	<i>P. chrysosporium</i>	Nebyly zjišťovány	NADPH-dependentní reakce, inhibice PB	78
Léčiva				
Ibuprofen	<i>T. versicolor</i>	Hydroxylovaný ibuprofen	Inhibice 1-aminobenzotriazolem, PB	79

PAU = polycyklické aromatické uhlovodíky, NADPH = redukovaný nikotinamid adenin dinukleotid fosfát, PB = piperonyl butoxid

1.2.3. Ostatní enzymy

V souvislosti s houbami bílé hniloby jsou však diskutovány i např. nitrát reduktasa (NR) a tyrosinasa, jejichž stručná charakteristika je uvedena v následujících kapitolách.

1.2.3.1. Nitrát reduktasa

NR je rozdělena do tří skupin podle toho, zda využívá koenzym NADH (nikotinamid adenin dinukleotid) či NADPH při redukci dusičnanu. První skupinou je NADH-dependentní NR (EC 1.6.6.1), která se vyskytuje především u vyšších rostlin. Další typ NR (EC 1.6.6.2), který se vyskytuje u zelených řas, pracuje se stejnou efektivitou při využití NADH i NADPH. Posledním typem je NADPH-dependentní NR (EC 1.6.6.3), která se vyskytuje u hub⁸⁰. U hub se NR vyskytuje především v mitochondriích⁸¹, kde je také jejich denitrifikační systém lokalizován. Ten houba využívá pro výrobu ATP při nedostatku kyslíku⁸². Existuje však i rozpustná forma NR, která je lokalizována v cytosolu⁸³.

1.2.3.2. Tyrosinasy

Poprvé byla tyrosinasa (polyfenoloxidasa) popsána spolu s lakasou⁴⁴. Tyrosinasy jsou bifunkční enzymy obsahující měď ve svém reakčním centru. Tyto enzymy využívají molekulární kyslík pro hydroxylaci fenolů v poloze *ortho* (monofenolasová aktivita, EC 1.14.18.1) a jejich následnou oxidaci na chinon (katecholasová aktivita, EC 1.10.3.2). Tyrosinasy se vyskytují u širokého spektra organismů od bakterií, hub, rostlin a hmyzu až po savce. U savců se tyrosinasa za fyziologických podmínek účastní procesu pigmentace kůže a u hub napomáhá sporulaci⁸⁴. Tyrosinasa je také studována v souvislosti s degradací chlorfenolů⁸⁵.

2. Cíl práce

Cílem práce bylo pokusit se objasnit participaci několika významných složek enzymového aparátu *P. ostreatus* v degradaci PCB. Dílčí cíle zahrnovaly:

- *In vivo* ověření potenciálu ligninolytické houby *P. ostreatus* pro degradaci PCB v tekutém mediu
- *In vitro* inkubace PCB s extracelulární lakasou získanou z houby *P. ostreatus* za různých podmínek
- *In vitro* inkubace PCB s mikrosomální frakcí získanou z houby *P. ostreatus*
- Charakterizace a identifikace metabolitů vzniklých při degradaci PCB

3. Materiály a metody

3.1. Použité mikroorganismy

3.1.1. Houbové kmeny

Všechny ligninolytické houby byly získány ze sbírky basidiomycetních hub CCBAS (Akademie věd České republiky, Praha) a uchovávány na malt-extrakt glukosových (MEG) agarových miskách při 4 °C. V práci byly použity kmeny *Bjerkandera adusta* 606/93, *Dichomitus squalens* CCBAS 750, *Irpex lacteus* 931, *Phanerochaete chrysosporium* ME 446, *Phanerochaete magnoliae* CCBAS 134/I, *Pleurotus ostreatus* 3004 CCBAS 278, *Pycnoporus cinnabarinus* CCBAS 595, *Trametes versicolor* 167/93.

3.1.2. Bakterie

Pro test akutní toxicity byly použity fluorescenční bakterie *Vibrio fischeri* NRRL-B-11177 od firmy Ing. R. Musial, ČR.

3.2. Materiál a chemikálie

3.2.1. Rozpouštědla

Ethylacetát pro HPLC
N,N-dimethylformamid (DMF) ≥ 99,9%
Dimethylsulfoxid (DMSO) ≥ 99,9%

Chromservis, ČR
Sigma-Aldrich, USA
Sigma-Aldrich, USA

3.2.2. Standardy

Delor 103 (D103)
Samostatné kongenery PCB

Chemko Strážské, SR
AccuStandards, USA

3.2.3. Ostatní

Glukosa monohydrát, p.a.	Penta, ČR	KH ₂ PO ₄ p.a.	Lachema, ČR
Malt extrakt Broth p.a.	Oxoid, USA	MgSO ₄ ·7 H ₂ O p.a.	HiChem, ČR
Agar p.a.	Penta, ČR	CaCl ₂ ·2 H ₂ O p.a.	Lachema, ČR
2,2'-dimethylsukcinát 99%	Sigma-Aldrich, USA	Piperonyl butoxid (PB)	Sigma-Aldrich, USA
Thiamin p.a.	Fluka, Německo	H ₂ O ₂ 30% p.a.	Sigma-Aldrich, USA
Vínan amonný p.a.	Lachema, ČR	Glycerol	Lach:ner, ČR
MgSO ₄ ·7 H ₂ O p.a.	Lachema, ČR	Tween 80	Serva, Německo
MnSO ₄ ·1 H ₂ O p.a.	Lachema, ČR	Sacharosa	Chemapol, ČR
NaCl p.a.	Lachema, ČR	Octan sodný p.a.	PENTA, ČR
FeSO ₄ ·7 H ₂ O p.a.	Lachema, ČR	Vínan sodný p.a.	Lachema, ČR
CoCl ₂ ·6 H ₂ O p.a.	Lachema, ČR	Malonát sodný p.a.	Sigma-Aldrich, USA
ZnSO ₄ ·7 H ₂ O p.a.	Lachema, ČR	NaCl min. 99,5%	Sigma-Aldrich, USA
CuSO ₄ ·5 H ₂ O p.a.	Lachema, ČR	HCl 96%	Sigma-Aldrich, USA
CaCl ₂ ·2 H ₂ O p.a.	Lachema, ČR	Na ₂ SO ₄ p.a.	Lach:ner, ČR
H ₃ BO ₃ p.a.	Lachema, ČR	N ₂ 99,99%	Linde, ČR
Nitriloacetát p.a.	Lachema, ČR	Tyrosin (Tyr)	Sigma-Aldrich, USA
2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonová kyselina) (ABTS) ≥ 98%	Sigma-Aldrich, USA	N,o-bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamid (BSTFA) 99%	Supelco Analytical, USA
2,2,6,6-tetramethyl piperidin 1-oxyl radikál (TEMPO)	Sigma-Aldrich, USA	2-chlorbenzaldehyd (2-CIBa)	Sigma-Aldrich, USA
Violurová kyselina (ViA)	Fluka, Německo	2,6-dichlorbenzaldehyd (2,6-dCIBa)	Sigma-Aldrich, USA
Redukovaný glutathion (RG)	Fluka, Německo	hydroxybenzoová kyselina (HBA)	Sigma-Aldrich, USA
Sinapová kyselina (SA)	Sigma-Aldrich, USA	Veratryl alkohol (VA)	Sigma-Aldrich, USA
Dithioničitan disodný	Sigma-Aldrich, USA	Dithiothreitol (DTT)	Roth, Německo
Fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, USA	Hovězí sérový albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, USA
Kyselina ethylendiaminoctová (EDTA) ≥ 99,9%	Sigma-Aldrich, USA	DEAE Sepharose Fast Flow	Amersham Biosciences AB, Švédsko
2,6-dimethoxyfenol (DMP) ≥ 97%	Sigma-Aldrich, USA	Pharmalite pH 2,5-5,0 a 3,5-10	Pharmacia, Švédsko
Kerosin	Penta, ČR	Diethylether	Chromservis, ČR
Nitrosomethylmočovina	Sigma-Aldrich, USA	KOH	Penta, ČR
Na ₂ S ₂ O ₄	Sigma-Aldrich, USA	NaOH p.a.	Lach:ner, ČR
NaN ₃	Sigma-Aldrich, USA	Činidlo podle Bradfordové	Sigma-Aldrich, USA
CO 99,97%	Linde, ČR		

3.3. Přístrojové vybavení

Autokláv Falcon	LTE Scientific LTD, Velká Británie
pH metr IQ 140	IQ Scientific Instrument, USA
Elektroda GP 61Q	IQ Scientific Instrument, USA
Dotyková elektroda P17	Sentek, Velká Británie
Analytické váhy AE 240	Mettler, Švýcarsko
Ultrafiltrační cela	Millipore, USA
Celulosaová membrána 10 kDa	Millipore, USA
Amicon Ultra 10 kDa	Millipore, USA
FPLC ÄKTA purifier	Amersham Biosciences, Švédsko
HiPrep™ 26/10 Desalting	GE Healthcare, Velká Británie
Mono Q HR 5/5	GE Healthcare, Velká Británie
Homogenizátor Ultra-Turrax T25	Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik, Německo
Vakuová odparka RVO 200 A	INGOS, ČR
Plynový chromatograf 450-GC	Varian, USA
Hmotnostní detektor 240-MS	Varian, USA
Autosampler CombiPAL	Varian, USA
Kolona VF-5MS	Varian, USA
Třepačka LT 2	Sklárny Kavalier, Závod Votice, ČSR
Třepačka Orbital shaker OS-10	Biosan, USA
Centrifuga Medifriger-BL	JP Selecta, Španělsko
Rorot or15655	JP Selecta, Španělsko
Centrifuga 5415 D	Eppendorf, Německo
Rotor F45-24-11	Eppendorf, Německo
Sorval Ultracentrifuga OTD Combi	Du Pont, USA
Rotor 50.2 Ti	Beckman, USA
Homogenizátor VirTis 45 blender	Machlett Laboratory, USA
Spektrofotometr SPECTRAMax PLUS ³⁸⁴	Molecular Devices, USA
Spektrofotometr Cary 4000	Varian, USA
IEF aparatura Multiphor II	Pharmacia, Švédsko
Dehydratovaný polyakrylamidový gel pro isoelektrickou fokusaci	GE Healthcare, Velká Británie
Luminometr LUMINO M90a	JZD Obránců míru, Dolní Újezd u Litomyšle, ČSSR
Kónický tkáňový homogenizátor	Wheaton, USA
Knihovna hmotnostních spekter NIST 08	National Institute of Standards and Technology, USA

3.4. Pufry

Octanový pufr (120 mM), pH = 5,0 pro měření aktivity lakasy a *in vitro* inkubace PCB s lakasou

Octan sodný	0,984 g
Deionizovaná voda	100 ml
Kyselina octová (99%)	Pro úpravu pH

Malonátový pufr (65,8 mM), pH = 4,5 pro měření aktivity MnP

Kyselina malonová	0,685 g
Deionizovaná voda	100 ml
NaOH (3 M)	Pro úpravu pH

Vínanový pufr (100 mM), pH = 3,0 pro měření aktivity LiP

Kyselina vinná	1,500 g
Deionizovaná voda	100 ml
NaOH (3 M)	Pro úpravu pH

Fosfátové pufry pro purifikaci lakasy pomocí FPLC (20 mM), pH = 6,0

Purf A		Pufr B	
NaH ₂ PO ₄	2,438 g	NaH ₂ PO ₄	2,438 g
Na ₂ HPO ₄ . 12 H ₂ O	0,882 g	Na ₂ HPO ₄ . 12 H ₂ O	0,882 g
Deionizovaná voda	1000 ml	NaCl	58,44 g
		Deionizovaná voda	1000 ml

Fosfátové pufrý pro izolaci mikrosomální frakce

Mixovací pufr (pufr M, 100 mM), pH = 7,2	Uchovávací pufr (pufr U, 50 mM), pH = 7,2
KH ₂ PO ₄ 8,16 g	KH ₂ PO ₄ 1,361 g
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O 21,48 g	Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O 3,580 g
Glycerol 120 g (96 ml)	Glycerol 60 g (48 ml)
Sacharosa 51,35 g	Deionizovaná voda 152 ml
BSA 900 mg	NaOH (3 M) Pro úpravu pH
DTT 463 mg	
EDTA 223 mg	
PMSF 26,13 mg (v 6 ml ethanolu)	
Deionizovaná voda 504 ml	
NaOH (3 M) Pro úpravu pH	

3.5. Kultivace

Všechny kultivace probíhaly stacionárně v temnu, při teplotě 28 °C.

3.5.1. Příprava kultivačních medií a sterilizace

Kultivační media byla vždy připravena bezprostředně před sterilizací. Sterilizace media probíhala v uzavřených Erlenmayerových baňkách vlhkou parou pod tlakem v autoklávu (121 °C po dobu 25 min). Drobné nástroje používané při přípravě inokul byly sterilizovány povrchově ethanolem a plamenem. Složení MEG media a dusíkem limitovaného minerálního media (LNMM z anglického low nitrogen mineral medium)⁸⁶ je uvedeno v Tab. 3 a Tab. 4 (str. 35).

Tab. 3: Složení MEG media.

MEG medium	
Glukosa	10 g
Malt extrakt Broth	5 g
Agar (při přípravě MEG agarových misek)	20 g
Deionizovaná voda	1000 ml

Tab. 4: Složení LNMM (A), stopových prvků (B) a basální směsi (C)⁸⁶.

A) LNMM (pH = 4,5)	
Glukosa	10 g
Stopové prvky (Tab. 4 B)	60 ml
2,2' - dimethylsukcinát	1,4 g
Thiamin	1 mg
Vínan amonný	0,1 g
Basální směs (Tab. 4 C)	100 ml
NaOH (3 M)	Pro úpravu pH

B) Stopové prvky		C) Basální směs	
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	3 g	KH ₂ PO ₄	20 g
MnSO ₄ ·1 H ₂ O	0,5 g	MgSO ₄ ·7 H ₂ O	5 g
NaCl	1 g	CaCl ₂ ·2 H ₂ O	1 g
FeSO ₄ ·7 H ₂ O	0,1 g	Stopové prvky (Tab. 4 B)	100 ml
CoCl ₂ ·6 H ₂ O	0,1 g	Deionizovaná voda	900 ml
ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	0,1 g		
CuSO ₄ ·5 H ₂ O	0,1 g		
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	0,1 g		
H ₃ BO ₃	10 mg		
Nitriloacetát	1,5 g		
Deionizovaná voda	1000 ml		

3.5.2. Příprava inokula

Inokulum pro tekuté kultury hub pěstovaných v MEG mediu bylo připraveno v 250 ml Erlenmayerových baňkách obsahujících 20 ml tekutého MEG media a tři agarové disky (o průměru 8 mm) s myceliem. Agarové disky byly vyříznuty z Petriho misky porostlé 7 denní houbovou kulturou. Inokulum pro tekuté kultury pěstované v LNMM bylo připraveno analogicky v LNMM. Po sedmidenní kultivaci byly kultury zhomogenizovány pomocí Ultra-Turrax T25 a použity jako inokulum.

3.6. Stanovení aktivity ligninolytických enzymů

Všechna stanovení aktivity ligninolytických enzymů byla měřena na spektrofotometru SPECTRAMax PLUS³⁸⁴ v mikrotitrační destičce. Při měření volných ligninolytických enzymů byla absorbance reakčních směsí vždy odečítána při dané vlnové délce ve 12 s intervalech. Změna absorbance během reakce byla dosazena do vztahu pro výpočet enzymové aktivity (EA) [U/l].

$$EA = \frac{\Delta A}{\varepsilon} \cdot \frac{V_{rs}}{V_e},$$

kde je ΔA – změna absorbance za 60 s měření, ε - molární extinkční koeficient při dané vlnové délce [$\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$], V_{rs} – objem reakční směsi [l], V_e – objem enzymového preparátu [l]. 1 jednotka EA [U] je podle tohoto vztahu definována jako takové množství enzymu, které přemění 1 μmol substrátu za 1 min.

3.6.1. Lakasa v kultivační tekutině

Aktivita lakasy byla stanovena na základě změny absorbance během oxidace ABTS při vlnové délce 420 nm⁸⁷. Reakční směs o objemu 200 μl obsahovala

octanový pufr (kapitola 3.4)	160 μl
vzorek	20 μl
50 mM ABTS	20 μl .

Reakce byla odstartována přidávkem ABTS. Molární extinkční koeficient ε_{420} pro ABTS činí 36000 $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

3.6.2. Lakasa vázaná na mycelium

Pro stanovení lakasové aktivity vázané na mycelium bylo mycelium filtrací odděleno od kultivační tekutiny, promyto v pufru (10 ml octanového pufru (kapitola 3.4) na 1 g mokrého mycelia) a zhomogenizováno pomocí Ultra-Turrax T25. Po centrifugaci (60 s, 16000 g) byl promývací pufr odstraněn a opět byl přidán pufr ve stejném poměru jako v předchozím kroku. Z takto připravené suspenze mycelia bylo odebráno 200 μl do zkumavky. Po centrifugaci (60 s, 16000 g) bylo k peletě přidáno 900 μl octanového pufru a 100 μl 50 mM ABTS. Po 2 min třepání byl vzorek opět centrifugován a absorbance supernatantu byla změřena při

vlnové délce 420 nm. Jako slepý vzorek byl použit octanový pufr (900 μl) a 50 mM ABTS (100 μl). Enzymatická aktivita byla vypočítána podle vztahu

$$EA = \frac{\Delta A \cdot V}{t \cdot \varepsilon_{420}},$$

kde je EA – enzymová aktivita [U], ΔA – absorbance vzorku mínus absorbance slepého vzorku, V – objem reakční směsi [l], t – čas reakce [min], ε - molární extinkční koeficient při 420 nm. Mycelium bylo poté při 80 °C usušeno a zváženo. Aktivita byla vztažena na mg suchého mycelia.

3.6.3. Lignin peroxidasa v kultivační tekutině

Aktivita LiP byla stanovena na základě změny spektrofotometrických vlastností VA po jeho přidání do reakční směsi při vlnové délce 310 nm⁸⁶. Reakční směs o objemu 200 μl obsahovala

vínanový pufr (kapitola 3.4)	155 μl
54 mM H ₂ O ₂	10 μl
vzorek	30 μl
25 mM VA	5 μl .

Reakce byla odstartována přidavkem VA. Molární extinkční koeficient ε_{310} pro VA činí 9300 M⁻¹.cm⁻¹.

3.6.4. Mangan-dependentní peroxidasa v kultivační tekutině

Aktivita MnP a zbytková peroxidasová aktivita nezávislá na přítomnosti Mn²⁺ (MIP) byla stanovena na základě změny spektrofotometrických vlastností DMP po jeho přidání do reakční směsi při vlnové délce 469 nm⁶². Pro stanovení výše enzymových aktivit MnP a MIP byly připraveny tři různé reakční směsi (I, II, III), jejichž složení je uvedeno v Tab. 5 (str. 38).

Tab. 5: Složení jednotlivých reakčních směsí při stanovení aktivity aktivity MnP a MIP.

	I	II	III
Malonátový pufr (kapitola 3.4)	170 μ l	152 μ l	152 μ l
10 mM H ₂ O ₂	-	8 μ l	8 μ l
20 mM MnSO ₄	-	10 μ l	-
20 mM EDTA	-	-	10 μ l
Vzorek	20 μ l	20 μ l	20 μ l
20 mM DMP	10 μ l	10 μ l	10 μ l

Reakce byly odstartovány přidavkem DMP. Molární extinkční koeficient ϵ_{469} pro DMP činí 49600 M⁻¹.cm⁻¹.

EA [U/l] pro MnP a MIP byla určena jako rozdíl naměřených EA [U/l] pro reakční směsi I, II, III podle rovnic

$$EA (\text{MnP}) = EA (\text{II}) - EA (\text{III})$$

$$EA (\text{MIP}) = EA (\text{III}) - EA (\text{I}).$$

3.7. Stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů byla stanovena na základě změny absorbance vzorku po 5 min inkubaci s činidlem podle Bradfordové při vlnové délce 595 nm⁸⁸. Kalibrační křivka byla sestavena ze standardů BSA o koncentraci 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10 μ g/ml. 20 μ l roztoku standardu nebo vzorku bylo inkubováno v mikrotitrační destičce se 180 μ l činidla při laboratorní teplotě. Po 5 min inkubace byl odečten rozdíl absorbance vzorku a slepého vzorku při vlnové délce 595 nm. Jako slepý vzorek bylo použito 180 μ l činidla s 20 μ l příslušného pufru.

3.8. Stanovení PCB a jejich metabolitů plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí

3.8.1. Extrakce PCB a jejich metabolitů

Před extrakcí celé houbové kultury bylo mycelium v tekutém mediu zhomogenizováno pomocí Ultra-Turrax T25 a okyseleno 200 μ l 1M HCl. Homogenát byl extrahován v pěti krocích pomocí 20 ml ethylacetátu vždy po dobu 15 min. Ke vzorkům po *in vitro* experimentech bylo před extrakcí přidáno cca 20 mg NaCl a 10 μ l 1M HCl. Extrakce byla v tomto případě provedena v pěti krocích s 2 ml ethylacetátu třepáním vždy po dobu 15 min. Oddělená organická fáze byla po každém kroku odebrána skleněnou stříkačkou a shromažďována v připravené uzavíratelné baňce.

Organická fáze byla v obou předchozích případech dále sušena pomocí bezvodého Na₂SO₄. Extrakty byly následně zakoncentrovány pod proudem N₂ nebo v případě extrakce celých houbových kultur na vakuové odparce RVO 200 A a analyzovány pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS).

3.8.2. Derivatizace metabolitů

Pro analýzu metabolitů byly ethylacetátové extrakty měřeny bez použití derivatizačního činidla a s použitím derivatizačních činidel diazomethanu a BSTFA pro zlepšení detekce některých metabolitů PCB⁸⁹.

Diazomehtan byl připraven v chlazené skleněné nádobě. Ke 100 ml diethyletheru bylo přidáno 40 ml 40% (w/v) KOH. Za stálého míchání byla postupně přidána nitrosomethylmočovina do výsledné koncentrace 0,1 M. Po 10 min byla odebrána diethyletherová fáze, která byla uchována v přítomnosti 10 g pevného KOH v -20 °C⁹⁰.

Methylace vzorků byla provedena diazomethanem. K 500 μ l extraktu bylo přidáno 500 μ l derivatizačního činidla. Reakční směs byla uzavřena a inkubována za laboratorní teploty. Po 30 min byl ether, v němž bylo reakční činidlo přidáno, odpařen pod proudem N₂. Takto připravené vzorky byly podrobeny kvalitativní analýze (kapitola 3.8.3).

Trimethylsililace analytů byla provedena prostřednictvím derivatizačního činidla BSTFA. K 500 μ l extraktu bylo přidáno 500 μ l činidla. Reakční směs byla uzavřena a inkubována při

60 °C. Po 2 hod byla reakční směs odpařena pod proudem N₂ na objem cca 200 µl a podrobena kvalitativní analýze (kapitola 3.8.3).

3.8.3. Podmínky plynové chromatografie s hmotnostní detekcí

Pro stanovení PCB a produktů jejich rozkladu byla použita metoda GC-MS. Látky byly separovány na koloně VF-5MS o délce 30 m, průměru 0,25 mm a stacionární fázi 0,25 µm. Byl dávkován 1 µl vzorku pomocí autosampleru Combi Pal. Nosným plynem bylo He o průtoku 1,2 ml/min. Teplota injektoru byla nastavena na 240 °C. Teplotní programy začaly isotermálně při zavřeném děliči. Poté byl dělič otevřen (split ratio 1:50) a teplota stoupala lineárně do 120 °C rychlostí 25 °C/min a poté rychlostí 2,5 °C/min do teploty 240 °C. Teplota 240 °C byla při kvantitativním stanovení PCB konstantní po dobu 8,6 min, pro kvalitativní stanovení produktů rozkladu PCB zůstala tato teplota konstantní 28,6 min. Detekce byla spuštěna 8 min po nástřiku. Byla použita EI ionizace (70 eV). Byl měřen celkový iontový proud v rozsahu 140-410 m/z pro kvantitativní stanovení PCB a 50-450 m/z pro kvalitativní stanovení. Jednotlivé kongenery byly identifikovány na základě porovnání hmotnostních spekter a retenčních časů s příslušnými standardy.

3.9. Stanovení akutní toxicity

Akutní toxicita byla stanovena na základě inhibice luminiscence emitované bakteriemi *V. fischeri* podle standardisované normy ČSN EN ISO 11348-2: 2000⁹¹.

Lyofilizované bakterie byly resuspendovány v 550 µl ledově vychlazeného 2% (w/v) roztoku NaCl. Suspenze byla ponechána při teplotě 0 °C - 2 °C. Po 15 min bylo k suspenzi přidáno 12 ml 2% (w/v) roztoku NaCl, který byl vytemperován na 15 °C. Takto naředěná bakteriální suspenze byla ponechána 1 hod ve vodní lázni o teplotě 15 °C. Od této chvíle byly používány pouze pomůcky a roztoky vytemperované na 15 °C.

Akutní toxicita byla stanovena pro ethylacetátové extrakty získané po *in vivo* degradaci 200 µg D103 ve 20 ml MEG media houbou *P. ostreatus*. Ethylacetát byl odpařen a akutní toxicita byla stanovena ve vzorcích, které byly ředěny 10x 4% (v/v) DMSO (připraveném ve 2% (w/v) NaCl).

Bakteriální suspenze o objemu 500 µl byla převedena do měřicí kyvety a byla odečtena hodnota napětí (signálu luminiscence) L_{i0} [V]. Poté bylo k suspenzi přidáno 500 µl roztoku vzorku, směs byla promíchána a ponechána v temperovací lázni. Po 15 min byla odečtena hodnota napětí L_{it} [V]. Hodnota inhibice luminiscence I_{it} v čase t [%] byla vypočítána podle vztahu

$$I_{it} = 100 - \frac{L_{it}}{f_{kt} \cdot L_{i0}} \cdot 100,$$

kde je f_{kt} - korekční faktor, vypočítaný podle vztahu

$$f_{kt} = \frac{L_{kt}}{L_{i0}},$$

kde je L_{kt} –intenzita luminiscence netoxické kontroly (místo vzorku měřeno 4% (v/v) DMSO ve 2% (w/v) NaCl) v čase t [V].

3.10. Produkce ligninolytických enzymů v čistém a kontaminovaném mediu

Houba *P. ostreatus* byla kultivována v 500 ml Erlenmayerových baňkách obsahujících 100 ml MEG media inokulovaného 5 % (v/v) homogenizovaného mycelia. Polovina kultur byla kontaminována 1000 µg D103 v DMF. Výsledná koncentrace DMF v kultuře činila 1 % (v/v). V průběhu kultivace byla po dobu 40 dnů měřena hladina aktivit ligninolytických enzymů (lakasa, MnP, MIP, LiP) jak u kontaminovaných, tak u nekontaminovaných kultur a hladiny enzymových aktivit byly v jednotlivých částech kultivace porovnány.

3.11. Isoelektrická fokusace

Stanovení *pI* jednotlivých isoenzymů lakas bylo provedeno metodou isoelektrické fokusace (IEF). Jako vzorky byly použity kultivační tekutiny *P. ostreatus* v MEG mediu při různých kultivačních podmínkách. Kultivační tekutiny byly koncentrovány přes 10 kDa „cut off“ celulosovou membránu a na gel bylo nanášeno 20 µl vzorku.

Při IEF byl použit komerčně dostupný dehydratovaný polyakrylamidový gel (7,5%) pro IEF, který byl rehydratován 30 min na horizontální třepačce (50 rpm) roztokem, který obsahoval

sorbitol	1,05 g
Pharmalyte pH 2,5 - 5	990 µl
Pharmalyte pH 3,5 – 10	110 µl
destilovanou vodu	9,4 ml.

Rehydratovaný gel byl přenesen na předchlazenou (2 °C) IEF aparaturu, jejíž deska byla rovnoměrně pokryta kerosinem. Po celé délce gelu byl v místě, kde přiléhá katoda, přiložen papírový proužek zvlhčený 1 ml 0,1 M NaOH. V místě, kde přiléhá anoda byl analogicky přiložen papírový proužek zvlhčený 1 ml 0,1 M H₂SO₄. Gradient pH byl poté vytvořen v gelu po 20 min při 1500 V. Po vytvoření gradientu pH byly na gel naneseny pomocí aplikačních papírků vzorky. IEF probíhala 40 min při 1500 V a poté byly aplikační papírky odstraněny z gelu. Fokusace byla dokončena při 1500 V po dobu 130 min.

Poté bylo v různých vzdálenostech od počátku gelu změřeno pomocí dotykové elektrody pH a byla sestavena kalibrační křivka. Gel byl poté inkubován v 5 mM ABTS v octanovém pufru (kapitola 3.4) do doby, než byly viditelné proužky. Poté byly změřeny vzdálenosti

jednotlivých proužků od okraje gelu a pomocí kalibrační křivky byly k jednotlivým proužkům přiřazeny hodnoty *pI*.

3.12. *In vivo* degradace D103 pomocí houby *P. ostreatus*

Tekuté kultury *P. ostreatus* byly inkubovány ve 250 ml Erlenmeyerových baňkách obsahujících 20 ml MEG media. Kultura byla inokulována 5 % (v/v) homogenizovaného mycelia za současné kontaminace D103 v DMF (200 μ l). Kultivace obsahující 20 ml kultivačního media byly kontaminovány 2000 μ g, 1000 μ g a 200 μ g D103. Jako kontroly byly použity 7 dní staré houbové kultury usmrcené sterilizací (25 min při 121 °C horkou parou pod tlakem), které byly následně kontaminovány příslušným množstvím D103. Kultury byly kultivovány 42 dní a poté byly připraveny podle kapitoly 3.8.1 pro kvantitativní analýzu (kapitola 3.8.3). Extrakt získaný z kultivace obsahující na počátku 2000 μ g D103 byl použit i pro kvalitativní stanovení produktů rozkladu PCB (kapitola 3.8.3).

3.13. Kvalitativní stanovení produktů *in vivo* rozkladu PCB

Kvalitativní stanovení produktů rozkladu PCB bylo provedeno po *in vivo* degradaci 400 μ g D103 osmi houbami bílé hniloby (*B. adusta*, *D. squalens*, *I. lacteus*, *P. chrysosporium*, *P. magnoliae*, *P. ostreatus*, *P. cinnabarinus*, *T. versicolor*) ve 20 ml kultivačního media. Všechny houby byly pěstovány jak v LNMM, tak v MEG mediu. Všechny kultivace byly doplněny příslušnými nekontaminovanými biotickými kontrolami a kontaminovanými usmrcenými kontrolami. Kultivace byly ukončeny 28. den a 42. den extrakcí ethylacetátem podle kapitoly 3.8.1. Extrakty byly připraveny kolegyní Koženou v rámci její diplomové práce⁹². Extrakty byly následně připraveny pro kvalitativní analýzu podle kapitoly 3.8.2 a podrobeny kvalitativní analýze podle kapitoly 3.8.3.

3.14. Purifikace extracelulární lakasy z *P. ostreatus* indukované Cu^{2+}

30 Erlenmeyerových baněk o objemu 500 ml obsahujících 100 ml MEG media bylo inokulováno 5 % (v/v) homogenizovaného mycelia. Pro indukci tvorby lakasy bylo k 6 denní kultuře sterilně přidáno CuSO_4 s výslednou koncentrací 50 μ M. V průběhu kultivace byly měřeny hladiny aktivit ligninolytických enzymů (lakasa, MnP, MIP, LiP).

Po 13 dnech kultivace bylo mycelium filtrací odděleno od kultivační tekutiny. Ta byla dále koncentrována ultrafiltrací v ultrafiltrační cele přes 10 kDa „cut off“ celulosovou membránu pod tlakem N₂ (0,2 MPa). Následující purifikační kroky byly provedeny pomocí proteinové kapalinové chromatografie (FPLC z anglického fast protein liquid chromatography), kde byl jako mobilní fáze použit ve všech purifikačních krocích pufr A (v některých purifikačních krocích v kombinaci s pufrem B). Složení pufrů A a B je uvedeno v kapitole 3.4. Koncentrovaná kultivační tekutina byla odsolena na koloně HiPrep™ 26/10 Desalting (průtok 1 ml/min). Odsolený proteinový preparát byl nanesen na DEAE Sepharosovou kolonu, odkud byl vymýván gradientem NaCl (viz Metoda I, Tab. 6). Jednotlivé frakce pak byly sbírány po 1 ml. Frakce s lakasovou aktivitou byly odsoleny na koloně HiPrep™ 26/10 Desalting (průtok 1 ml/min) a dále purifikovány na koloně Mono Q HR 5/5 (viz Metoda II, Tab. 6). Jednotlivé frakce pak byly sbírány po 0,75 ml. Ve všech purifikačních krocích byla eluce proteinů sledována při vlnových délkách 215 nm, 280 nm a 405 nm. Získané frakce s nejvyšší hladinou lakasové aktivity byly uchovány v 10% (v/v) glycerolu při -20 °C a poté použity pro *in vitro* inkubaci s PCB.

Po každém purifikačním kroku bylo uchováno 100 µl preparátu, ve kterých byla měřena koncentrace proteinu podle kapitoly 3.7 a hladina lakasové aktivity (kapitola 3.6.1). Poté byla sestavena tabulka, jejíž součástí je mimo jiné purifikační faktor definovaný jako poměr specifické aktivity [U/µg proteinu] uchované frakce a specifické aktivity [U/µg proteinu] původní kultivační tekutiny.

Tab. 6: Popis metod použitých při purifikaci lakasy.

Metoda I (použita kolona DEAE Sepharosa), průtok 1 ml/min						
V [ml]	0,0	13,0	38,0	48,0	48,0	63,0
Koncentrace pufru B [%]	0,0	0,0	100	100	0,0	0,0
Metoda II (použita kolona Mono Q HR 5/5), průtok 0,5 ml/min						
V [ml]	0,0	5,0	40,0	45,0	45,0	50,0
Koncentrace pufru B [%]	0,0	50	100	100	0,0	0,0

% = % (v/v)

3.15. Využití extracelulárních enzymů *P. ostreatus* pro degradaci PCB *in vitro*3.15.1. *In vitro* inkubace PCB s extracelulární lakasou indukovanou Cu²⁺

Všechny *in vitro* inkubační směsi byly připraveny v 60 mM octanovém pufru (pH = 5). Dále obsahovaly 15% (v/v) DMSO a 1% (v/v) Tween 80. Ostatní komponenty byly u jednotlivých vzorků přidány podle následující tabulky (Tab. 7) a inkubační směsi byly třepány při 160 rpm po dobu 40 nebo 168 hod při 25 °C. PCB byly přidány ve formě D103. Pro 168 hod inkubaci byly PCB přidány jak ve formě D103, tak ve směsi kongenerů (PCB 16, PCB 17, PCB 31, PCB 42, PCB 44, PCB 47). Jako mediátory byly použity HBA, TEMPO, ViA, SA, RG, Tyr, 2-ClBa, 2,6-dClBa nebo byly přidány společně pod označením mix. V kontrolách byl místo enzymového preparátu použit octanový pufr.

Tab. 7: Složení *in vitro* reakčních směsí pro degradaci D103 extracelulární lakasou indukovanou přídatkem Cu²⁺.

Označení vzorku Enzym(indukce) forma PCB_použitý mediátor	Koncentrace jednotlivých komponent				
	D103 [µg/ml]	Kongenery [µg/ml od každého kongeneru]	Lakasa [U/ml]	Mediátor	Koncentrace mediátoru [mM]
Lak(Cu) D103	2,5	-	1	-	-
Lak(Cu) D103_HBA	2,5	-	1	HBA	1
Lak(Cu) D103_TEMPO	2,5	-	1	TEMPO	1
Lak(Cu) D103_ViA	2,5	-	1	ViA	1
Lak(Cu) D103_Tyr	2,5	-	1	Tyr	1
Lak(Cu) D103_2-ClBa	2,5	-	1	2-ClBa	1
Lak(Cu) D103_2,6-dClBa	2,5	-	1	2,6-dClBa	1
Lak(Cu) D103_RG	2,5	-	1	RG	1
Lak(Cu) D103_mix	2,5	-	1	mix	1
Lak(Cu) kong	-	1	1	-	-
Lak(Cu) kong_HBA	-	1	1	HBA	1
Lak(Cu) kong_TEMPO	-	1	1	TEMPO	1
Lak(Cu) kong_ViA	-	1	1	ViA	1
Lak(Cu) kong_mix	-	1	1	mix	1

Lak = lakasa, kong = směs kongenerů, mix = směs mediátorů (viz kapitola 3.15.1)

Po inkubaci byly vzorky extrahovány ethylacetátem (viz kapitola 3.8.1). Extrakty byly podrobeny kvantitativní analýze (viz kapitola 3.8.3) pro zjištění degradačního potenciálu lakasy indukované Cu^{2+} v kultivaci *P. ostreatus* v MEG mediu.

3.15.2. *In vitro* inkubace PCB s extracelulární tekutinou a myceliem po kultivaci *P. ostreatus* v přítomnosti PCB

Pro *in vitro* inkubaci D103 byla použita extracelulární tekutina a mycelium z kultury *P. ostreatus*, která byla kontaminována 1000 μg D103 ve 100 ml MEG media. Extracelulární tekutina a mycelium bylo získáno z 13 denní a 39 denní kultivace. Extracelulární tekutina byla pro inkubaci zakoncentrována přes 10 kDa „cut off“ celulosovou membránu, mycelium bylo pomocí Ultra-Turrax T25 zhomogenizováno v octanovém pufru (kapitola 3.4).

Všechny *in vitro* inkubační směsi byly připraveny v 60 mM octanovém pufru (pH = 5). Obsahovaly 10% (v/v) DMSO, 1% (v/v) Tween 80. Ostatní komponenty byly u jednotlivých vzorků přidány podle následující tabulky (Tab. 8) a byly třepány při 400 rpm po dobu 168 nebo 504 hod při 25 °C. V kontrole byl použit enzym inhibovaný 20 min 50 mM NaN_3 .

Tab. 8: Složení *in vitro* reakčních směsí pro degradaci D103 extracelulární tekutinou a myceliem houby *P. ostreatus*, jejíž kultivace byla kontaminována D103.

Označení vzorku	Koncentrace jednotlivých komponent			
	D103 [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	Lakasa [U/ml]	Mediátor	Koncentrace mediátoru [mM]
Enzym (indukce_doba kultivace_lokalizace enzymu) forma PCB_použitý mediátor				
Lak (PCB_13_ex) D103	2,5	1	-	-
Lak (PCB_13_ex) D103_mix	2,5	1	mix	1
Lak (PCB_39_ex) D103_mix	2,5	0,5	mix	1
Lak (PCB_13_myc) D103	2,5	0,1	-	-
Lak (PCB_13_myc) D103_mix	2,5	0,1	mix	1
Lak (PCB_39_myc) D103	2,5	0,1	-	-
Lak (PCB_39_myc) D103_mix	2,5	0,1	mix	1

Lak = lakasa, ex = extracelulární tekutina s lakasovou aktivitou, myc = mycelium s lakasovou aktivitou, mix = směs mediátorů (viz kapitola 3.15.1)

Po inkubaci byly vzorky extrahovány ethylacetátem (viz kapitola 3.8.1). Extrakty byly podrobeny kvantitativní analýze (viz kapitola 3.8.3) pro zjištění degradačního potenciálu extracelulární tekutiny a mycelia z kultivace *P. ostreatus* indukované D103.

3.16. Izolace mikrosomální frakce z houby *P. ostreatus*

Houbové kultury *P. ostreatus* byly připraveny v 500 ml Erlenmayerových baňkách obsahujících 100 ml MEG media inokulovaného 5 % (v/v) homogenizovaného mycelia. Kultury byly kultivovány po dobu 12 dnů.

Pro izolaci mikrosomální frakce²⁰ byly použity pufrы M a U, jejichž složení je uvedeno v kapitole 3.4. Předchlazená houbová kultura byla přefiltrována přes nylonovou tkaninu. Mycelium bylo promyto v pufru M (10 ml M pufru na 10 g mokrého mycelia) a opět přefiltrováno. Poté bylo mycelium homogenizováno s pufrem M (30 ml pufru M na 10 g mokrého mycelia) pomocí homogenizátoru VirTis 45 blender (375 Hz, homogenizace 4x10 s střídaná chladícími fázemi 20 s). Poté byl surový homogenát zbaven nepotřebného buněčného materiálu centrifugací 20 min při 15000 g. Supernatant byl přefiltrován přes bavlněnou vatu a centrifugován 2 hod při 100000 g. Peleta byla resuspendována v 10 ml pufru U pomocí kónického tkáňového homogenizátoru. Poté byl homogenát opět centrifugován 2 hod při 100000 g a peleta resuspendována ve 3 ml pufru U. Takto připravený preparát byl označen za mikrosomální frakci, která byla uchována při -80 °C a poté použita pro měření CO vazebného spektra (kapitola 3.16.1), koncentrace proteinů (kapitola 3.7) a *in vitro* inkubaci s PCB (kapitola 3.17).

3.16.1. CO vazebná spektra mikrosomální frakce

CO vazebné spektrum cytochromu P420 a P450 bylo měřeno na dvoupaprskovém spektrofotometru v rozpětí vlnových délek 400 – 500 nm⁹³. K mikrosomální frakci byl přidán Na₂S₂O₄. Frakce byla dále 1 min probublána CO a použita jako vzorek. Jako slepý vzorek byla použita mikrosomální frakce v pufru U.

3.17. *In vitro* inkubace kongenerů PCB s mikrosomální frakcí *P. ostreatus*

Pro *in vitro* inkubační směs PCB s mikrosomální frakcí byly použity kongenery PCB 4, PCB 5, PCB 15, PCB 16, PCB 17, PCB 32, PCB 37, PCB 45, PCB 60, PCB 77, PCB 95,

PCB 118, PCB 149 o koncentraci 1 µg/ml každého kongeneru. Všechny inkubační směsi obsahovaly 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM DTT⁷⁸, 2% (v/v) DMSO. Zbylé složení, ve kterém se jednotlivé vzorky lišily je uvedeno v Tab. 9. PCB, PMSF, DTT, PB byly přidány v DMSO, ostatní komponenty byly přidány v pufru U (viz kapitola 3.4).

Tab. 9: Složení jednotlivých *in vitro* inkubačních směsí při degradaci PCB pomocí mikrosomální frakce *P. ostreatus*. Směsi dále obsahovaly 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, 2% (v/v) DMSO a 1 µg/ml od každého kongeneru PCB.

Označení inkubační směsi	Koncentrace proteinu mikrosomální frakce [mg/ml]	Koncentrace NADPH [mM]	Doba inkubace [hod]	Poznámka
Kontrola	0	0,2	1	Mikrosomální frakce nahrazena pufrům U
Vzorek 1 (0 mM NADPH, 3 hod)	0,5	0	3	-
Vzorek 2 (0,2 mM NADPH, 1 hod)	0,5	0,2	1	-
Vzorek 3 (0,2 mM NADPH, 3 hod)	0,5	0,2	3	-
Vzorek 4 (0,4 mM NADPH, 1 hod)	0,5	0,4	1	-
Vzorek 5 (vliv inkubace mikrosomální frakce při 100 °C)	0,5	0,2	1	Mikrosomální frakce ponechána 3 hod při teplotě 100 °C
Vzorek 6 (vliv CO)	0,5	0,2	1	Mikrosomální frakce redukována pomocí Na ₂ S ₂ O ₄ a následně bublána 1 min CO
Vzorek 7 (vliv PB)	0,5	0,2	1	2 mM PB

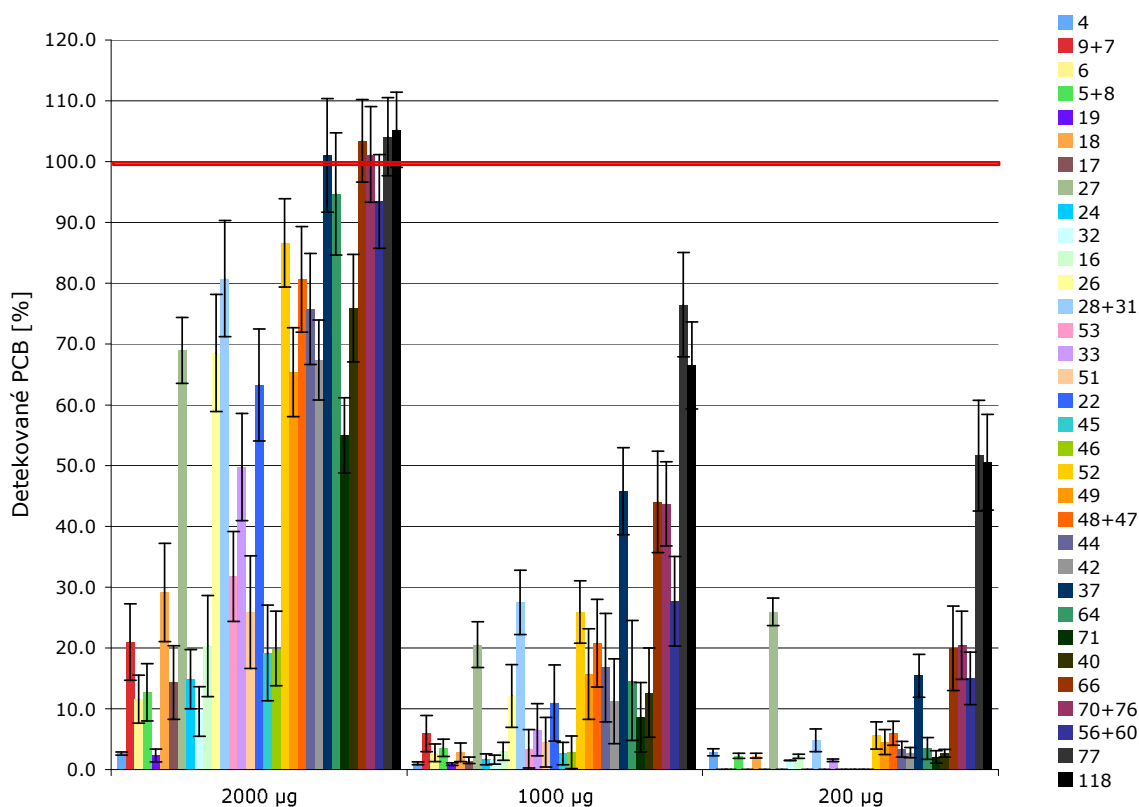
NADPH = redukovaný nikotinamid adenin dinukleotid fosfát, pufr U = uchovávací pufr (viz kapitola 3.4) PB = piperonyl butoxid

Po inkubaci byly vzorky extrahovány ethylacetátem (viz kapitola 3.8.1). Extrakty byly podrobeny kvantitativní analýze pro zjištění degradačního potenciálu mikrosomální frakce *P. ostreatus* a kvalitativní analýze pro identifikaci produktů rozkladu PCB (viz kapitola 3.8.3).

4. Výsledky

4.1. *In vivo* degradace 200 µg, 1000 µg a 2000 µg D103 houbou *P. ostreatus*

Byl studován vliv množství D103 na biodegradační potenciál houby *P. ostreatus*. Degradace byla detekována během kultivace *P. ostreatus* v MEG mediu s různou hladinou kontaminace PCB po 42 dnech kultivace. Jak je patrné z grafu (Obr. 6), rozsah degradace PCB se pro jednotlivé kultivační podmínky *P. ostreatus* lišil. Během kultivace s nejnižším množstvím D103 (200 µg) bylo detekováno pouze $6\pm 2\%$ všech PCB obsažených ve směsi D103 oproti příslušné usmrcené kontrole, což odpovídá degradaci 188 ± 4 µg PCB. Při počátečním množství 1000 µg D103 bylo detekováno $22\pm 5\%$ přidaných PCB směsi oproti příslušné kontrole, což odpovídá degradaci 780 ± 50 µg PCB. V kultivaci s počátečním množstvím 2000 µg D103 bylo detekováno $68\pm 7\%$ původního množství PCB, což odpovídá degradaci 640 ± 140 µg PCB).

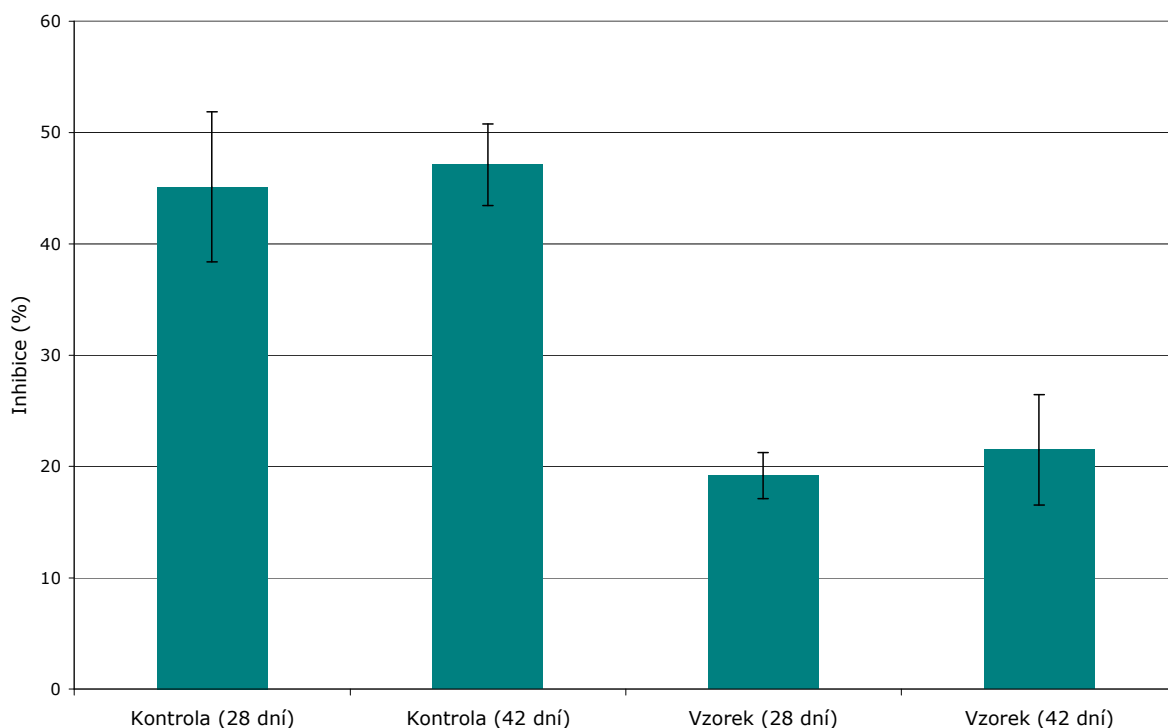


Obr. 6: Degradace D103 houbou *P. ostreatus*. Červená linka znázorňuje 100 % odpovídajících příslušné usmrcené kontrole. V pravém sloupci jsou uvedena číselná označení kongenerů PCB.

4.2. Akutní toxicita metabolitů degradace 200 µg D103 houbou *P. ostreatus*

Akutní toxicita byla stanovena na základě změny bioluminiscence bakterie *V. fischeri* po 15 min inkubace suspenze bakterií s příslušným vzorkem. Stanovení bylo provedeno pro usmrcené kontroly kontaminované 200 µg D103 ve dvou odběrech (28 dní, 42 dní) a houbové kultury *P. ostreatus* (vzorky) kontaminované 200 µg D103 ve dvou odběrech (28 dní, 42 dní).

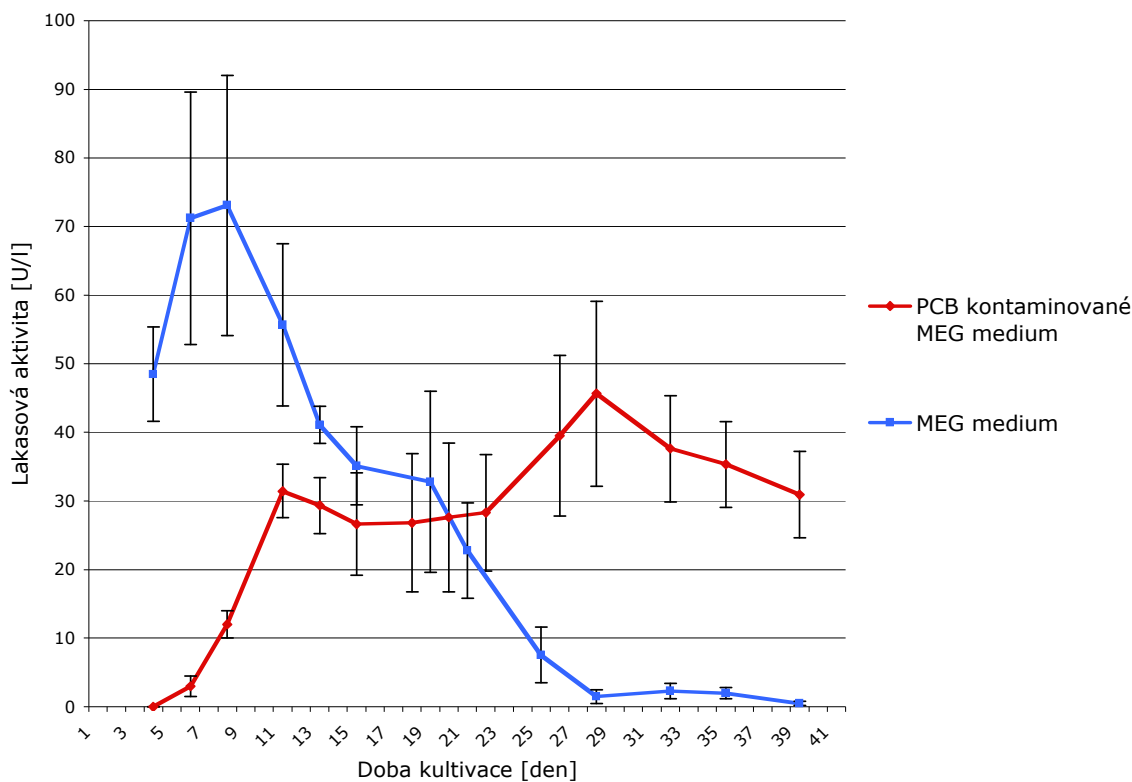
Jak je patrné z grafu (Obr. 7), toxicita usmrcené kontroly je vyšší, než toxicita vzorků po 28 a 42 dnech degradace *P. ostreatus*. Inhibice luminiscence pro usmrcené kontroly činila 45 ± 7 % po 28 dnech a 47 ± 4 % po 42 dnech. Po 28 denní kultivaci *P. ostreatus* byla u vzorků naměřena inhibice 19 ± 2 % a po 42 denní kultivaci byla inhibice luminiscence detekována na hladině 21 ± 5 %.



Obr. 7: Graf akutní toxicity stanovené na základě změny bioluminiscence bakterie *V. fischeri* pro usmrcené kontroly kontaminované 200 µg D103 ve dvou odběrech (28 dní, 42 dní) a houbové kultury *P. ostreatus* (vzorky) kontaminované 200 µg D103 při dvou odběrech (28 dní, 42 dní).

4.3. Aktivity lakas *P. ostreatus* v PCB kontaminovaném a nekontaminovaném mediu

Hladina extracelulární lakasové aktivity [U/l] byla měřena vždy ze tří kultivačních baněk. Aktivity byly měřeny pro kultivace *P. ostreatus* v MEG mediu a v kontaminovaném (1000 μg D103 ve 100 ml media) MEG mediu (viz kapitola 3.10). Z grafu (Obr. 8) je patrné, že se hladina lakasové aktivity v průběhu kultivace pro oba případy značně liší. Nekontaminovaná kultivace vykazuje nejvyšší hladinu lakasové aktivity (73 ± 19 U/l) okolo osmého dne kultivace. V tomto období lakasová aktivita u kontaminované kultivace dosahuje pouhých 12 ± 2 U/l. Opačný trend lze pozorovat v druhé polovině kultivace, kdy hladina lakasové aktivity 29. den dosahuje u nekontaminované kultury pouhých $1,5 \pm 1$ U/l, kdežto v kontaminované kultuře dosahuje v tomto období až 46 ± 13 U/l. Aktivity ostatních ligninolytických enzymů nebyly během kultivací detekovány.



Obr. 8: Graf znázorňuje průběh lakasové aktivity [U/l] během kultivace *P. ostreatus* v kontaminovaném MEG mediu (1000 μg D103 ve 100 ml media) a nekontaminovaném MEG mediu.

4.4. Purifikace lakasy

Houba *P. ostreatus* byla pěstována v MEG mediu a po 6 dnech byla indukována tvorba lakasy pomocí CuSO_4 . EA [U/l] ligninolytických enzymů byly stanovovány pro 5 kultivačních baněk. Hladiny aktivit MnP, MIP a LiP nebyly detekovány. Lakasová aktivita činila 13. den kultivace 300 ± 69 U/l. V tuto chvíli byla kultivace zastavena a podrobena purifikaci lakasy z extracelulární tekutiny.

Při purifikaci lakasy metodou FPLC byly použity chromatografické metody založené na dělení látek na základě iontové výměny a podle velikosti a tvaru proteinů.

Výchozí supernatant získaný filtrací kultivační tekutiny obsahoval 307 U/l lakasové aktivity a $0,405 \mu\text{g/ml}$ proteinu což odpovídá specifické lakasové aktivitě $1,9 \text{ U/mg}$ proteinu (Tab. 10). Pomocí DEAE Sepharosové kolony a Mono Q HR 5/5 byl protein částečně vypurifikován s výtěžností 7 %. Purifikační faktor činil ve výsledku $4,4 \times 10^{-3}$.

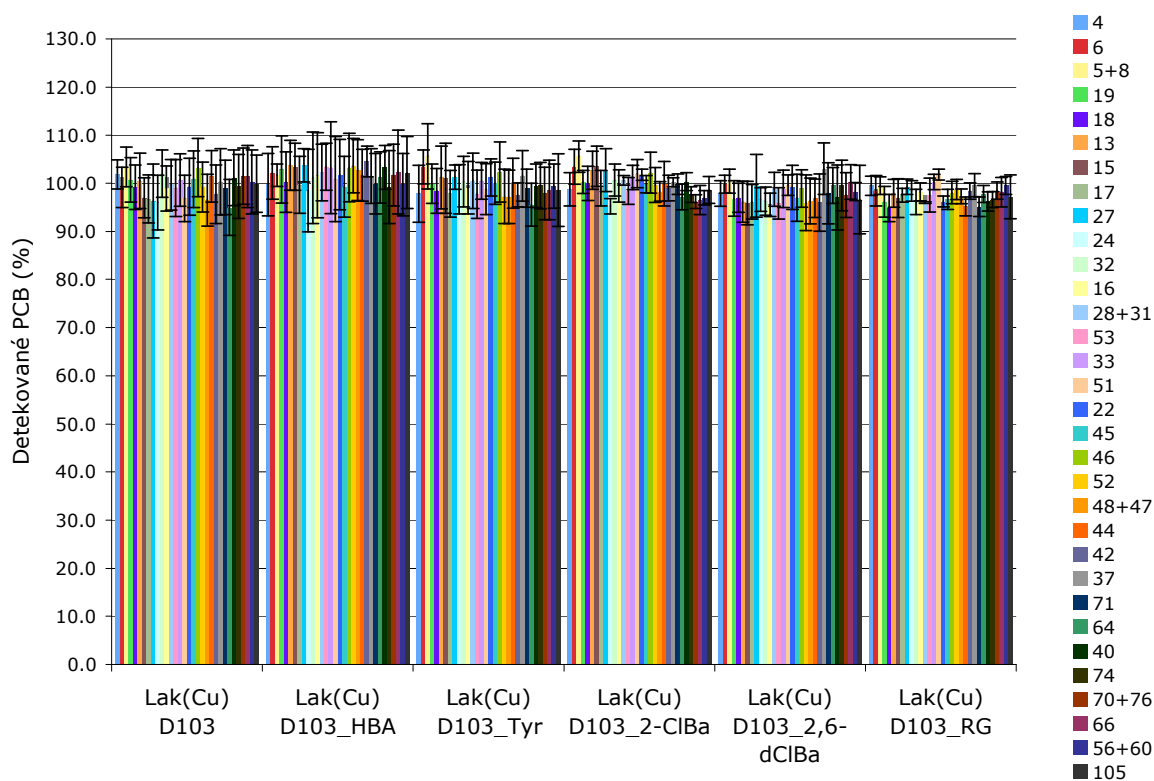
Tab. 10: Purifikační tabulka lakasy.

Purifikační krok	V [ml]	EA [U/l]	EA [U]	Koncentrace proteinu [$\mu\text{g/ml}$]	Specifická EA [U/mg proteinu]	Výtěžek purifikace [%]	Purifikační faktor
Supernatant	2500	307	769	0,405	1,9	100	1
Ultrafiltrace (10 kDa „cut off“)	25	11731	293	42,7	0,0069	38	0,0036
HiPrep Desalting	40	6233	249	19,7	0,013	32	0,0067
DEAE Sepharosa	17,5	3956	69	17,5	0,0040	9	0,0021
HiPrep Desalting	20	3329	67	12,9	0,0052	9	0,0027
Mono Q HR 5/5	17,5	2866	50	6	0,0084	7	0,0044

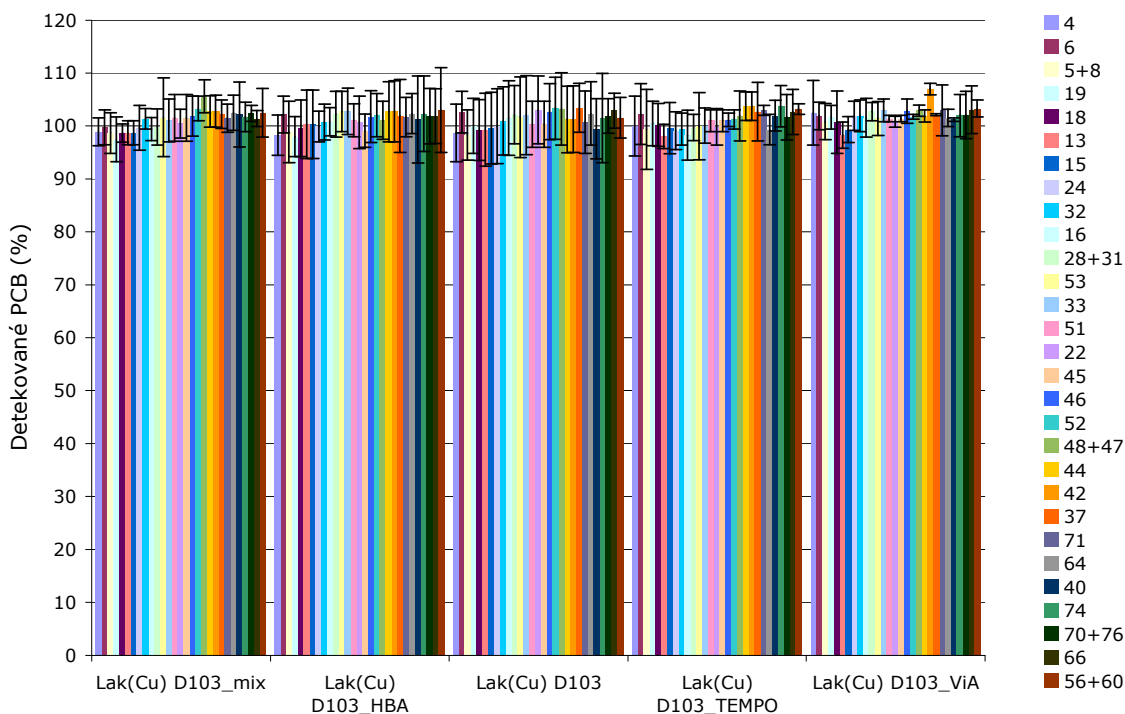
EA = enzymová aktivita

4.5. *In vitro* inkubace PCB s purifikovanou lakasou

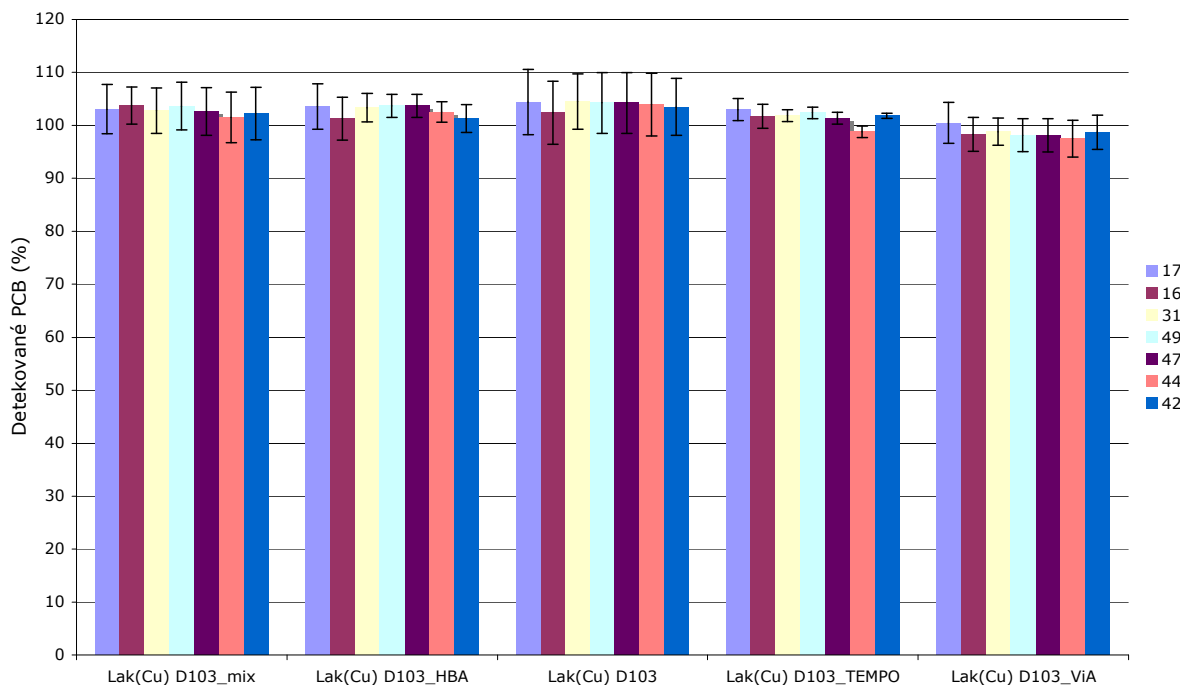
Pro zjištění degradačního potenciálu purifikované extracelulární lakasy byly provedeny *in vitro* inkubace 2,5 µg/ml D103 či 1 µg/ml kongenerů PCB s lakasovou frakcí získanou po monoQ separací. Inkubace probíhala po dobu 40 hod a 168 hod. Podmínky jednotlivých *in vitro* inkubací jsou uvedeny v kapitole 3.15. Během inkubace trvající 40 hod (Obr. 9) nebyla detekována degradace směsi D103 oproti kontrole (lakasová frakce nahrazena pufrém), a to ani v přítomnosti různých mediátorů. Inkubace trvající 168 hod, které obsahovaly 2,5 µg/ml D103 (Obr. 10, str. 54) či 1 µg/ml jednotlivých kongenerů PCB (Obr. 11, str. 55) částečně purifikovanou lakasu a mediátory, tyto negativní výsledky potvrdily. Po celou dobu inkubace byla detekována lakasová aktivita. Na počátku aktivita činila $1 \pm 0,021$ U/l, po 40 hod inkubace byla detekována aktivita $0,714 \pm 0,017$ U/l a po 168 hod $0,485 \pm 0,025$ U/l.



Obr. 9: *In vitro* inkubace D103 (2,5 µg/ml) s lakasou indukovanou Cu^{2+} (Lak(Cu), 0,5 U/ml) s různými mediátory (HBA, Tyr, 2-ClBa, 2,6-dClBa, RG, 1 mM) v 60 mM octanovém pufru (pH = 5), 15% (v/v) DMSO při teplotě 25 °C po dobu 40 hod. V pravém sloupci jsou uvedena číselná označení kongenerů PCB.



Obr. 10: *In vitro* inkubace D103 (2,5 µg/ml) s lakasou indukovanou Cu^{2+} (Lak(Cu), 1 U/ml) s různými mediátory (mix, HBA, TEMPO, ViA, 1 mM) v 60 mM octanovém pufru (pH = 5), 15% (v/v) DMSO, 1% (v/v) Tween 80 při teplotě 25 °C po dobu 168 hod. V pravém sloupci jsou uvedena číselná označení kongenerů PCB.



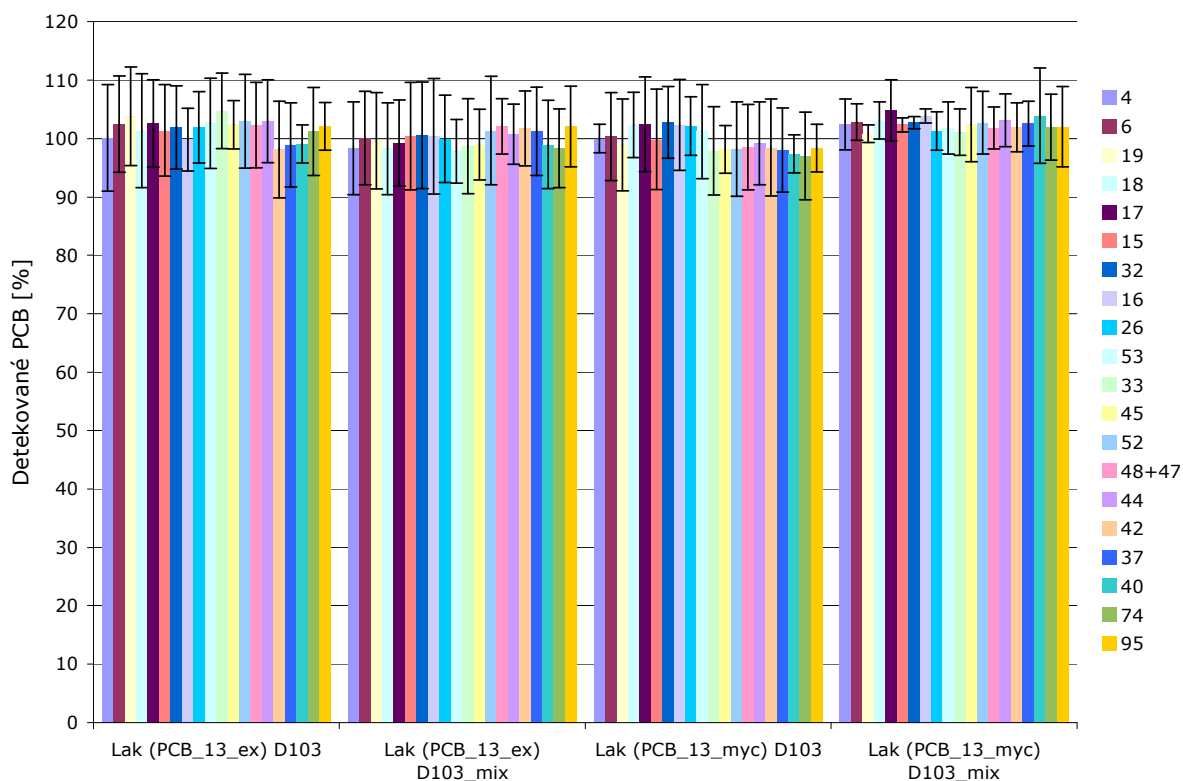
Obr. 11: *In vitro* inkubace směsi jednotlivých kongenerů PCB (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) s lakasou indukovanou Cu^{2+} (Lak(Cu), 1 U/ml) s různými mediátory (mix, HBA, TEMPO, ViA, 1 mM) v 60 mM octanovém pufru (pH = 5), 15% (v/v) DMSO, 1% (v/v) Tween 80 při teplotě 25 °C po dobu 168 hod. V pravém sloupci jsou uvedena číselná označení kongenerů PCB.

4.6. *In vitro* inkubace PCB s kultivační tekutinou a myceliem *P. ostreatus* z kultivace v přítomnosti PCB

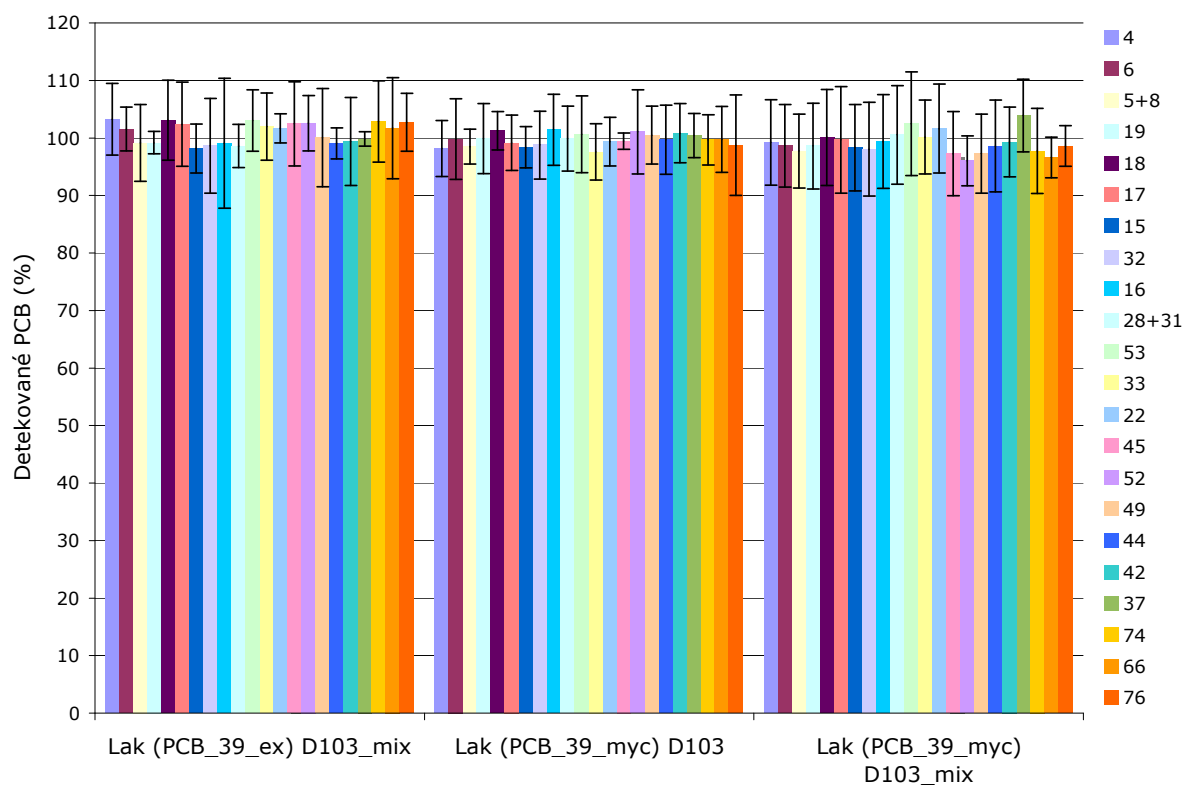
In vitro inkubační směsi byly připraveny s myceliem a extracelulární tekutinou ze dvou odběrů (13 denní a 39 denní) kultivace *P. ostreatus* kontaminované 1000 μg D103 ve 100 ml media. *In vitro* inkubační směsi byly připraveny podle kapitoly 3.15.2.

Výsledky *in vitro* inkubací 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ D103 s extracelulární tekutinou a myceliem z 13. dne kontaminované kultivace (Obr. 12, str. 56) ani analogicky provedené inkubace z 39. dne kultivace (Obr. 13, str. 57) *P. ostreatus* nevykazují ani v jednom případě známky úbytku PCB oproti kontrolám s enzymem inhibovaným pomocí NaN_3 , přestože v jednom případě inkubace trvala 168 hod (odběr 13. den) a v druhém případě 504 hod (odběr 39. den). Po celou dobu byla detekována lakasová aktivita. Při 168 hod inkubaci činila lakasová aktivita v kulivační tekutině na začátku $1 \pm 0,047$ U/ml a na konci $0,655 \pm 0,024$ U/ml a lakasa vázaná na mycelium byla na začátku 22 ± 4 U/mg suchého mycelia a po 168 hod inkubace 18 ± 2 U/mg suchého mycelia. Při inkubaci 504 hod byla na počátku naměřena v kulivační tekutině lakasová

aktivita $0,5 \pm 0,011$ U/ml a na konci $0,13 \pm 0,017$ U/ml a v myceliu činila lakasová aktivita na počátku 21 ± 2 U/mg suchého mycelia a po 504 hod $6 \pm 0,4$ U/mg suchého mycelia.



Obr. 12: *In vitro* inkubace D103 s extracelulární tekutinou (ex) s lakasovou aktivitou 1 U/ml a myceliem (myc) s lakasovou 0,1 U/ml z 13 denní kultivace *P. ostreatus* indukované D103. *In vitro* inkubace probíhala s různými mediátory (mix, 1 mM) v 60 mM octanovém pufru (pH = 5), 15% (v/v) DMSO, 1% (v/v) Tween 80 při teplotě 25 °C po dobu 168 hod. V pravém sloupci jsou uvedena číselná označení kongenerů PCB.



Obr. 13: *In vitro* inkubace D103 s extracelulární tekutinou (ex) s lakasovou aktivitou 0,5 U/ml a myceliem (myc) s lakasovou aktivitou 0,1 U/ml z 39 denní kultivace *P. ostreatus* indukované D103. *In vitro* inkubace probíhala s různými mediátory (mix, 1 mM) v 60 mM octanovém pufru (pH = 5), 15% (v/v) DMSO, 1% (v/v) Tween 80 při teplotě 25 °C po dobu 504 hod. V pravém sloupci jsou uvedena číselná označení kongenerů PCB.

4.7. *pI* jednotlivých isoform lakas získaných při různých kultivačních podmínkách *P. ostreatus*

Kultivační tekutiny *P. ostreatus* v MEG mediu při různých kultivačních podmínkách (Tab. 11) byly použity jako vzorky. V téže tabulce jsou uvedeny lakasové aktivity vzorků nanášených na gel pro IEF.

Tab. 11: Podmínky kultivací, z nichž byly získány extracelulární tekutiny pro IEF.

	Přídavek do 100 ml MEG media	Doba inkubace	Lakasová aktivita vzorku [U/l]
Bez indukce	-	13 dní	320±0,3
Indukce Cu ²⁺	50µM CuSO ₄	13 dní	809±59
Indukce D103 (13. den kultivace)	1000 µg D103	13 dní	2041±67
Indukce D103 (39. den kultivace)	1000 µg D103	39 dní	95±0,7

V kultivační tekutině neindukované kultivace *P. ostreatus* bylo nalezeno sedm isoform lakas s *pI* v rozmezí 5,30-7,52 (Tab. 12). Po indukci Cu²⁺ byly nalezeny pouze dvě isoformy lakas, a to s *pI* 4,65 a 7,52. Ve 13 denní kultivaci indukované PCB byly nalezeny isoformy lakas se shodným *pI* jako u nekontaminované kultivace, ale i další isoenzymy (*pI* 4,17, 4,65, 6,29). Po 39 dnech již nebyla detekována většina isoform lakas se shodným *pI* jako u 13 denní kultivace, ale naopak byly detekovány 2 nové isoformy, jejichž hodnoty *pI* činily 6,34 a 7,04.

Tab. 12: *pI* pro lakasy získané při různých kultivačních podmínkách *P. ostreatus*.

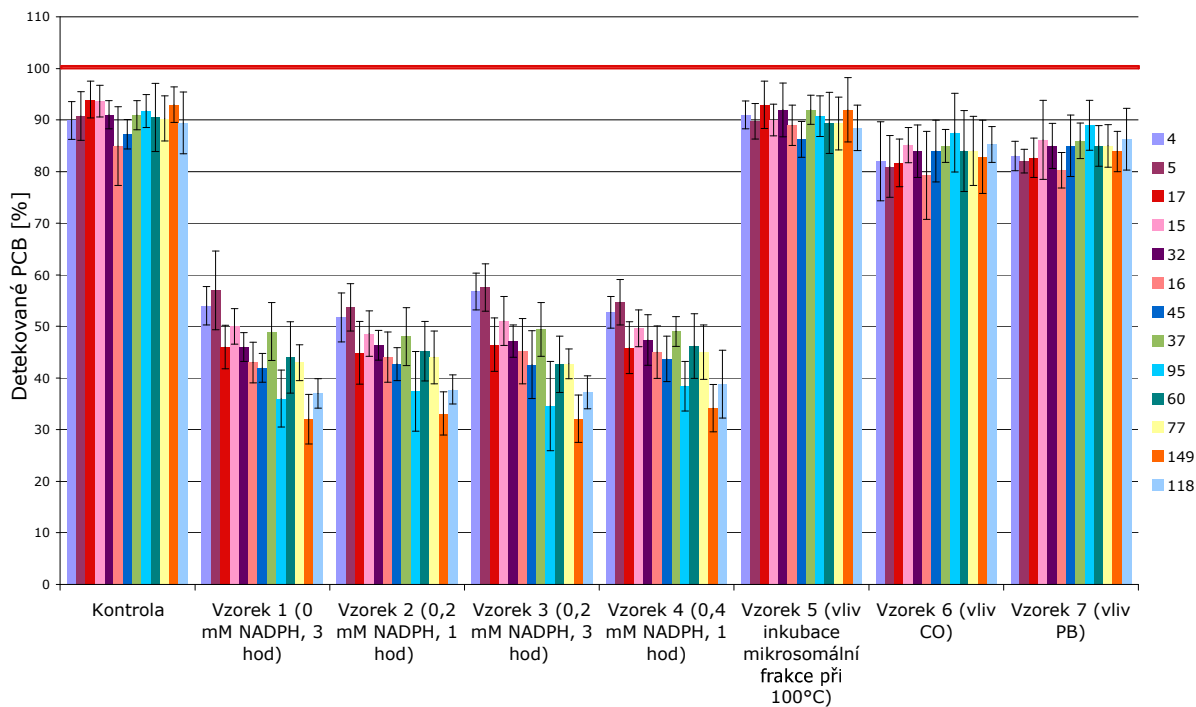
Lakasy produkované bez indukce (13. den kultivace)	Cu ²⁺ indukované lakasy (13. den kultivace)	PCB indukované lakasy (13. den kultivace)	PCB indukované lakasy (39. den kultivace)
		4,17	
	4,65	4,65	
5,30		5,30	
5,86		5,86	
6,07		6,07	
6,18		6,18	
		6,29	
			6,34
6,42		6,42	
6,52		6,52	
			7,04
7,52	7,52	7,52	

4.8. Charakterizace získané mikrosomální frakce

Mikrosomální frakce byla získána z 12 denní kultivace *P. ostreatus* v MEG mediu. Ze 70 g mokrého mycelia bylo získáno 7,2 mg proteinů v mikrosomální frakci. CO vazebná spektra byla měřena pro resuspendovanou peletu mikrosomální frakce v pufru U (kapitola 3.4) při koncentraci proteinu 1 mg/ml. Ve spektru nebyl pozorován pík při 450 nm.

4.9. *In vitro* inkubace mikrosomální frakce s kongenery PCB

In vitro inkubací vybraných kongenerů PCB s mikrosomální frakcí bylo dosaženo 44-67% degradace (Obr. 14, str. 60). Míra degradace jednotlivých kongenerů PCB byla rozdílná. Kongenery PCB 4 a PCB 5 byly degradovány nejméně, a to ze $46\pm 2\%$ a $44\pm 2\%$. Další kongenery byly degradovány v následujícím rozsahu: PCB 17 - $54\pm 1\%$, PCB 15 - $50\pm 1\%$, PCB 32 - $53\pm 1\%$, PCB 16 - $56\pm 1\%$, PCB 45 - $57\pm 1\%$, PCB 37 - $51\pm 1\%$, PCB 60 - $56\pm 2\%$, PCB 77 - $56\pm 1\%$. Nejlépe byly degradovány kongenery PCB 95 - $63\pm 2\%$, PCB 118 - $62\pm 1\%$ a kongener PCB 149, jehož degradace dosáhla $67\pm 1\%$. Degradace byla pozorována i v případě, kdy nebyl do reakční směsi přidán NADPH. U vzorků, které obsahovaly CO nebo PB, nebyla detekována degradace PCB.



Obr. 14: Degradace vybraných kongenerů PCB pomocí mikrosomální frakce *P. ostreatus*. Červená linka vyznačuje 100 % odpovídajících příslušně naředěnému zásobnímu roztoku PCB. V pravém sloupci jsou uvedena číselná označení kongenerů PCB.

4.10. Analýza metabolitů z *in vivo* degradace PCB

Produkty rozkladu PCB byly stanovovány pomocí GC-MS v ethylacetátových extraktech (derivatizovaných i bez derivatizace) získaných po *in vivo* degradaci 400 µg D103 osmi houbami bílé hniloby ve 20 ml MEG a LNMM při době kultivace 28 a 42 dní (kapitola 3.13). Ačkoli byla detekována degradace i v případě *D. squalens* a *P. ostreatus*⁹², nebyly nalezeny žádné produkty rozkladu PCB, a to ani po derivatizaci diazomethanem či BSTFA.

V nederivatizovaných extraktech po degradaci PCB ostatními houbami (*B. adusta*, *I. lacteus*, *P. cinnabarinus*, *P. chrysosporium*, *P. magnoliae*, *T. versicolor*) při kontaminaci 400 µg D103 byly nalezeny chlorované methoxybenzeny, chlorované methoxybenzaldehydy, chlorované methoxyfenoly, chlorované hydroxybifenyly. Po derivatizaci diazomethanem byly nalezeny methylestery chlorovaných benzoových kyselin, chlorované methoxybenzeny, chlorované methoxybenzaldehydy, chlorované methoxyfenoly, chlorované dimethoxybenzeny, chlorované benzylalkoholy, chlorované dimethoxybenzaldehydy, chlorované benzaldehydy, chlorované hydroxybifenyly a chlorované methoxybifenyly. Derivatizace BSTFA nepřispěla k nalezení dalších metabolitů. Podrobněji jsou výsledky kvalitativní analýzy uvedeny v následující tabulce (Tab. 13).

Tab. 13: Produkty rozkladu PCB po *in vivo* degradaci 400 µg D103 houbami bílé hniloby ve 20 ml kultivačního media.

Vzorek Houba (medium, derivatizace)	Odb.	Metabolit	RT [min]	m/z (relativní intenzita)
<i>B. adusta</i> (LNMM, -)	I, II	Dichlordimethoxybenzen	14,15	191 (100), 193 (67), 206 (36), 207 (17), 208 (32)
	I, II	Chlormethoxybenzaldehyd	14,48	169 (100), 170 (57), 171 (39)
	II	Dichlormethoxyfenol	19,16	177 (100), 179 (63), 192 (48), 194 (30)
<i>B. adusta</i> (LNMM, Me)	I	Methylester chlorhydroxybenzoové kys.	18,63	155 (100), 157 (33), 186 (31)
	I, II	Dichlordimethoxybenzen	18,88	113 (12), 191 (100), 193 (66), 206 (37), 208 (23)
	I, II	Chlormethoxybenzaldehyd	19,19	169 (100), 170 (56), 171 (38)
	II	Methylester chlormethoxybenzoové kys.	23,82	169 (100), 171 (34)
	II	Dichlormethoxyfenol	24,50	177 (100), 179 (62), 192 (38)
	I, II	Methylester dichlormethoxybenzoové kys.	24,98	203 (100), 205 (69), 234 (48), 236 (31)
	I, II	Dichlordimethoxybenzen	14,14	191 (100), 193 (70), 206 (41)
<i>B. adusta</i> (MEG, -)	I, II	Trichlorhydroxybifenyl	41,71	173 (27), 272 (100), 274 (86), 276 (26)

<i>B. adusta</i> (MEG, Me)	I, II	Chlordimethoxybenzen	15,48	129 (35), 157 (100), 159 (33), 172 (48), 174 (15)
<i>I. lacteus</i> (MEG, Me)	I, II	Methylester chlorbenzoové kys.	12,76	139 (100), 141 (35), 170 (22)
	II	Methylester dichlorbenzoové kys.	17,75	173 (100), 175 (65)
<i>P. cinnabarinus</i> (MEG, Me)	I	Methylester dichlorbenzoové kys.	17,90	145 (31), 173 (100), 175 (65), 204 (27), 206 (19)
	I	Methylester dichlorbenzoové kys.	18,55	173 (100), 175 (66), 204 (33)
	I	Methylester trichlorbenzoové kys.	20,68	207 (100), 211 (68), 238 (15), 240 (15)
	I	Methylester trichlorbenzoové kys.	22,67	207 (100), 209 (66), 238 (17)
	I	Methylester trichlorbenzoové kys.	23,32	179 (21), 181 (18), 207 (100), 209 (69), 211 (21), 238 (22), 240 (24)
<i>P. chrysosporium</i> (LNMM, Me)	I, II	Methylester dichlorbenzoové kys.	17,91	145 (27), 173 (100), 175 (65), 204 (26)
	I, II	Methylester dichlorbenzoové kys.	18,57	173 (100), 175 (71), 204 (31)
	I, II	Methylester dichlorbenzoové kys.	18,92	173 (100), 175 (62), 204 (28)
	II	Methylester dichlorbenzoové kys.	17,80	173 (100), 175 (64)
	II	Methylester trichlorbenzoové kys.	22,68	207 (100), 209 (57), 211 (19)
	II	Trichlorbenzaldehyd	29,38	207 (100), 209 (76), 211 (28)
<i>P. chrysosporium</i> (MEG, Me)	II	Methylester chlorbenzoové kys.	12,75	139 (100), 141 (35), 170 (23)
<i>P. magnoliae</i> (LNMM, Me)	I, II	Methylester dichlorbenzoové kys.	17,94	109 (18), 111 (6), 145 (25), 147 (18), 173 (100), 175 (66), 204 (29), 206 (18)
	II	Methylester dichlorbenzoové kys.	18,09	173 (100), 175 (70)
	I, II	Methylester dichlorbenzoové kys.	18,54	173 (100), 175 (58), 204 (26), 206 (21)
	I, II	Methylester dichlorbenzoové kys.	18,95	145 (28), 173 (100), 175 (65), 204 (26), 206 (16)
	II	Dichlorbenzylalkohol	21,20	77 (100), 75 (56), 113 (62), 115 (31), 139 (22), 141 (67), 176 (26)
	I, II	Methylester trichlorbenzoové kys.	22,68	207 (100), 209 (81), 211 (24), 238 (79), 240 (20)
	I, II	Methylester dichlorbenzoové kys.	23,36	179 (17), 207 (100), 209 (54), 240 (12)
	I, II	Methylester dichlorbenzoové kys.	27,73	207 (100), 209 (79), 240 (23)
	I	Methylester dichlorbenzoové kys.	29,42	207 (100), 209 (91), 211 (27)
	II	Trichlorbenzaldehyd	29,38	179 (21), 181 (20), 207 (100), 209 (95)
	<i>P. magnoliae</i> (MEG, Me)	II	Methylester chlorbenzoové kys.	12,75
II		Methylester dichlorbenzoové kys.	18,51	145 (38), 173 (100), 175 (64), 204 (29), 206 (21)
II		Methylester dichlorbenzoové kys.	19,90	145 (33), 173 (100), 175 (64), 204 (27), 206 (18)
II		Methylester trichlorbenzoové kys.	23,30	179 (19), 207 (100), 209 (71), 238 (21), 240 (21)
<i>T. versicolor</i> (LNMM, -)	II	Chlormethoxybenzaldehyd	14,48	169 (100), 170 (57), 171 (40)
	I, II	Trichlorhydroxybifenyl	37,35	173 (39), 272 (100), 274 (93), 276 (27)
<i>T. versicolor</i> (LNMM, Me)	I, II	Methylester dichlorbenzoové kys.	17,78	145 (25), 173 (100), 175 (60)
	I, II	Methylester dichlorbenzoové kys.	17,92	145 (37), 173 (100), 175 (66), 204 (26)
	I	Methylester dichlorbenzoové kys.	18,94	145 (30), 173 (100), 175 (60), 204 (26)
	I	Dichlorhydroxybifenyl	36,24	238 (100), 240 (65), 139 (60)
	II	Trichlormethoxybifenyl	42,27	243 (49), 245 (63), 273 (33), 286 (100), 288 (95), 290 (59)
	II	Trichlormethoxybifenyl	43,00	173 (64), 243 (55), 245 (53), 272 (63), 273 (37), 274 (61), 286 (100), 288 (89),

	II	Trichlormethoxybifenyl	43,10	290 (71), 292 (59) 173 (61), 243 (55), 245 (56), 272 (62), 274 (63), 286 (100), 288 (95), 290 (354)
	II	Trichlormethoxybifenyl	46,63	173 (51), 243 (69), 245 (63), 286 (100), 288 (93), 290 (33)
<i>T. versicolor</i> (MEG, -)	II	Trichlormethoxybifenyl	37,03	243 (39), 245 (33), 271 (25), 273 (29), 286 (95), 288 (100)
	I, II	Trichlormethoxybifenyl	41,26	243 (39), 245 (42), 271 (53), 273 (50), 286 (98), 288 (100), 290 (33)
<i>T. versicolor</i> (MEG, Me)	II	Trichlormethoxybifenyl	42,23	173 (40), 243 (59), 245 (50), 271 (32), 286 (93), 288 (100), 290 (34)

Odb = odběr, RT = retenční čas, MEG = MEG medium, Me = derivatizace diazomethanem, I = 28 denní kultivace, II = 42 denní kultivace

Dále byl pro kvalitativní stanovení produktů rozkladu PCB použit extrakt z kultivace *P. ostreatus* ve 20 ml MEG mediu, které bylo kontaminováno 2000 µg D103 (kapitola 3.12).

Jako produkty rozkladu PCB houbou *P. ostreatus* v MEG mediu po 42 dnech byly nalezeny chlorované benzaldehydy, chlorovaný dihydroxybifenyl a chlorované methoxybifenyly. Podrobněji jsou metabolity charakterizovány v následující tabulce (Tab. 14). Derivatizace nepřispěla k nalezení dalších metabolitů.

Tab. 14: Produkty rozkladu PCB po *in vivo* degradaci 2000 µg D103 houbou *P. ostreatus* ve 20 ml MEG media po 42 dnech.

Vzorek Houba (medium, derivatizace)	Metabolit	RT [min]	m/z (relativní intenzita)
<i>P. ostreatus</i> (MEG,-)	Dichlorbenzaldehyd	13,15	145 (32), 147 (23), 173 (100), 174 (61), 175 (69)
	Dichlorbenzaldehyd	13,75	145 (29), 147 (16), 173 (100), 174 (65), 175 (42)
	Dichlorbenzaldehyd	14,01	145 (56), 147 (32), 173 (100), 174 (55), 175 (56)
	Dichlordihydroxybifenyl	41,92	183 (36), 185 (22), 239 (100), 241 (65)
	Trichlormethoxybifenyl	45,51	243 (76), 245 (71), 286 (100), 288 (98)
	Trichlormethoxybifenyl	46,14	243 (70), 245 (71), 286 (100), 288 (92)
	Trichlormethoxybifenyl	46,68	243 (58), 245 (66), 271 (61), 273 (65), 286 (96), 288 (100)
	Tetrachlormethoxybifenyl	48,15	277 (77), 279 (79), 307 (35), 320 (78), 322 (100)
	Tetrachlormethoxybifenyl	49,54	277 (80), 279 (100), 307 (44), 320 (78), 322 (96)
	Tetrachlormethoxybifenyl	49,81	277 (72), 279 (100), 307 (10), 320 (66), 322 (82)
	Tetrachlormethoxybifenyl	52,65	277 (74), 279 (100), 307 (10), 320 (59), 322 (66)

RT = retenční čas, MEG = MEG medium

4.11. Metabolity vzniklé po *in vitro* degradaci PCB mikrosomální frakcí

Pro kvalitativní stanovení produktů rozkladu PCB mikrosomální frakcí *P. ostreatus* byly použity ethylacetátové extrakty inkubační směsi. Pomocí GC-MS byly tyto extrakty měřeny bez derivatizace a po derivatizaci diazomethanem a BSTFA.

Jako produkty rozkladu PCB mikrosomální frakcí *P. ostreatus* byly nalezeny bez derivatizace trichlorované bifenyly. Tyto trichlorbifenyly podle retenčních časů a hmotnostních spekter odpovídají kongenerům PCB 28 a PCB 33. Po derivatizaci diazomethanem byly nalezeny chlormethoxybenzaldehyd a methylestery chlorovaných benzoových kyselin. Derivatizace BSTFA nepřispěla k nalezení dalších metabolitů. Podrobněji jsou nalezené metabolity charakterizovány v následující tabulce (Tab. 15).

Tab. 15: Metabolity nalezené po *in vitro* degradaci vybraných kongenerů PCB.

Derivatizace	Metabolit	RT [min]	m/z (relativní intenzita)
Me	Chlormethoxybenzaldehyd	18,89	169 (100), 170 (58), 171 (34)
Me	Methylester trichlorbenzoové kys.	26,25	207 (100), 209 (70), 211 (20)
Me	Methylester trichlorbenzoové kys.	31,90	179 (28), 181 (25), 207 (100), 209 (89), 211 (30), 238 (25), 240 (30)
-	Trichlorbifenyl	36,10	186 (64), 188 (21), 256 (100), 258 (82), 260 (28)
-	Trichlorbifenyl	36,70	186 (100), 188 (29), 256 (89), 258 (97), 260 (33)

RT = retenční čas, Me = derivatizace diazomethanem

5. Diskuze

Houby bílé hniloby představují perspektivní organismy schopné degradovat velkou škálu perzistentních organopolutantů, jako jsou chlorfenoly, syntetická barviva, PAU a PCB^{16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26}. V této práci byla studována degradace PCB houbami bílé hniloby se zaměřením na houbu *P. ostreatus*, která již dříve prokázala vysoký potenciál pro degradaci PCB v komerční směsi D103³³. Ze všech hub bílé hniloby, které jsou v této práci uvedeny má houba *P. ostreatus* nejvyšší degradační potenciál⁹². Tato houba je pod českým názvem hlíva ústříčná hojně využívána v potravinářství a mycelium, které zbývá po sklizni plodnic, je snadno dostupné.

V této práci byl v počátku ověřován vliv množství PCB obsažených v komerční směsi D103 na degradační potenciál houby *P. ostreatus*. Nejlepších výsledků degradace bylo dosaženo při počátečním množství 1000 µg D103 ve vzorku. Při větším počátečním množství byla degradace negativně ovlivněna pravděpodobně toxickým kontaminantem, ale houba *P. ostreatus* byla stále schopna degradovat vysoké množství PCB.

Dále byla studována toxicita degradačních produktů PCB vzniklých během *in vivo* degradace D103 houbou *P. ostreatus*. Bylo publikováno, že houby bílé hniloby jsou schopny mineralizovat PCB⁹⁴. Je však také známo, že produkty rozkladu PCB jsou velmi často toxičtější, než samotné PCB⁹⁵. V tomto experimentu bylo prokázáno, že toxicita během degradace klesá, což *P. ostreatus* řadí mezi vhodné kandidáty pro mikrobiální dekontaminaci v praxi.

V literatuře je často diskutována úloha extracelulárního ligninolytického aparátu při degradaci aromatických organopolutantů⁴⁰. Základní jednotky přirozeného substrátu těchto enzymů, polymerního ligninu, mají aromatický charakter. Proto existuje předpoklad, že budou tyto enzymy s nízkou substrátovou specifitou schopny degradovat i jiné aromatické sloučeniny. Skutečně bylo prokázáno, že PAU jsou degradovány ligninolytickými enzymy *in vitro*^{21,22,23,24,25,26}. V případě PCB je v literatuře k dispozici pouze jediná práce⁹⁶, kde autoři provedli *in vivo* degradaci tří kongenerů (PCB 156, PCB 105, PCB 126) lakasou z houby *T. versicolor* a zaznamenali zhruba 20% úbytek po 4 dnech inkubace ve 37 °C, a to bez přídavku jakýchkoli dalších mediátorů.

Majoritním ligninolytickým enzymem *P. ostreatus* detekovaným v průběhu experimentů této práce je lakasa. Z tohoto důvodu byla lakasa purifikována z extracelulární tekutiny *P. ostreatus* a využita pro *in vitro* inkubaci s PCB. Vzhledem k tomu, že lakasa ve svém reakčním centru obsahuje měď⁴², byla pro vyšší výtěžnost její tvorba indukována přidávkou Cu^{2+} . Takto získaná lakasa však neprokázala schopnost degradovat PCB obsažené v komerční směsi D103, a to ani po 168 hod v přítomnosti řady mediátorů, které prokazatelně zvyšují efektivitu degradace např. PAU lakasou^{25,48}.

Pro ověření, zda za degradaci PCB není zodpovědný některý isoenzym lakasy indukovaný PCB, byl připraven *in vitro* experiment se zahuštěnou extracelulární tekutinou získanou z kultivace *P. ostreatus* kontaminované D103. Pro případ, že by byl příslušný enzym vázán na mycelium (a tudíž při purifikaci v prvním kroku oddělen), byl připraven z téže kultivace *in vitro* experiment s myceliem vykazujícím lakasovou aktivitu. Oba tyto experimenty byly provedeny z 13 denní a 39 denní kultivace, kdy byla hladina lakasové aktivity stále detekovatelná (viz dále). Ani jeden z těchto experimentů neprokázal úlohu lakasy *P. ostreatus* při degradaci PCB, a to ani v přítomnosti výše zmíněných mediátorů.

Využití extracelulárního ligninolytického aparátu *P. ostreatus* pro degradaci PCB *in vitro* bylo prvotním předpokladem této práce. Vzhledem k negativním výsledkům *in vitro* degradace PCB lakasami bylo dále zkoumáno, jaké další extracelulární enzymy jsou v průběhu kultivace produkovány v přítomnosti PCB. Proto byla měřena hladina aktivit ligninolytických enzymů v průběhu růstu *P. ostreatus* v nekontaminovaném MEG mediu a v MEG mediu kontaminovaném 1000 μg D103 ve 100 ml media. Tento experiment ukázal, že v PCB kontaminované kultivaci je z ligninolytických enzymů produkována pouze lakasa. Kultivace v přítomnosti PCB však, na rozdíl od kultivace bez přidavku PCB, v počátku (okolo osmého dne) vykazovala velmi nízkou hladinu lakasové aktivity. Oproti tomu v období, kdy lakasová aktivita v kultivaci bez PCB klesla až na hranici detekce, s přidávkou PCB kultivace vykazovala nárůst lakasové aktivity. Z tohoto trendu lze usuzovat, že PCB mohou inhibovat lakasovou aktivitu a naopak indukce tvorby lakas může být zprostředkována např. metabolity vzniklými degradací PCB v pozdější fázi kultivace. Vzhledem k faktu, že lakasa patří k fenoloxidasám, lze předpokládat, že hydroxylované aromatické metabolity PCB (viz dále) mohou fungovat dokonce jako induktory exprese lakas. V literatuře se objevuje práce, ve které autoři detekovali přítomnost nových isoform lakas vzniklých v přítomnosti fenolických a

aromatických sloučenin⁹⁷. V každém případě je vliv PCB na lakasovou aktivitu patrný. Stanovení *pI* lakas při různých kultivačních podmínkách tuto teorii rozšiřuje. Bylo prokázáno, že 39. den kultivace kontaminované PCB byly v extracelulární tekutině přítomny isoenzymy lakas, které nebyly přítomny ani v počáteční fázi téže kultivace, ani v kultivaci indukované Cu^{2+} a neindukované (tyto kultivace již 39. den nevykazovaly lakasovou aktivitu).

Někteří autoři diskutují úlohu cytochromů P450 při prvním kroku degradace PCB³¹. Bylo prokázáno, že transformace PCB je v lidském organismu zprostředkována cytochromy P450 a jako produkty této degradace byly detekovány hydroxylované PCB⁹⁸. Na základě těchto publikací byly naplánovány další *in vitro* experimenty v této práci.

Byla izolována mikrosomální frakce houby *P. ostreatus* a použita pro *in vitro* degradaci PCB. V tomto experimentu byl skutečně prokázán degradační potenciál mikrosomální frakce. Systém byl inhibován specifickými inhibitory cytochromů P450, a to CO a PB. Tento typ kontrol je často používán jako důkaz o úloze houbových cytochromů P450 při degradaci organopolutantů^{74,75,76,78,79}. Dalším důkazem je závislost systému na NADPH^{75,76,78}. V tomto experimentu však bylo prokázáno, že systém není závislý na přidavku tohoto koenzymu do reakční směsi a interpretace výsledků tohoto experimentu není zcela jednoznačná. Sono a kol.⁷⁰ publikovali, že existují i neobvyklé formy cytochromů P450, které mají donor elektronu (NADPH) vázaný na jednu z proteinových domén. V takovém případě by bylo možné diskutovat úlohu houbových cytochromů P450 při degradaci PCB v této práci. V každém případě byla degradace zprostředkována intracelulárně na úrovni mikrosomální frakce houby bílé hniloby *P. ostreatus*. Toto však nutně nevyvrací úlohu lakas či jiných ligninolytických enzymů při následném procesu transformace produktů degradace PCB. S tímto faktem souhlasí i výsledky testu toxicity, která v průběhu biodegradace PCB pomocí *P. ostreatus* klesala. V této souvislosti bylo publikováno, že lakasy jsou schopny degradovat hydroxylované PCB^{36,37,38,96}, které vzhledem ke své značně vyšší rozpustnosti ve vodě, mohou vykazovat vyšší akutní toxicitu, než samotné PCB.

Poslední část práce byla zaměřena na kvalitativní stanovení produktů rozkladu PCB, a to po *in vivo* degradaci osmi houbami bílé hniloby i po *in vitro* degradaci PCB mikrosomální frakcí. Všechny typy nalezených metabolitů (chlorované hydroxybifenyly, chlorované methoxybifenyly, chlorované benzoové kyseliny, chlorované benzaldehydy a chlorované

benzylalkoholy) již byly po degradacích PCB houbami bílé hniloby publikovány, avšak pouze v případě jednoho dichlorovaného derivátu.

Kamei a kol.³¹ detekovali monomethoxy deriváty PCB 15, 4-chlorbenzoovou kyselinu, 4-chlorbenzaldehyd a 4-chlorbenzylalkohol. Autoři předpokládají, že degradace PCB probíhá ve dvou metabolických cestách. Prvním krokem obou metabolických drah je hydroxylace PCB 15. V jedné metabolické dráze dochází ke vzniku methoxyderivátů PCB 15 a druhá metabolická dráha transformuje hydroxylované PCB 15 na 4-chlorbenzylalkohol, 4-chlorbenzaldehyd a 4-chlorbenzoovou kyselinu. Autoři se zabývali detekcí metabolitů pouze jednoho kongeneru. V této diplomové práci byly nalezeny metabolity vzniklé degradací celé řady kongenerů obsažených v komerční směsi D103.

Detekce methylovaných intermediátů v této práci není překvapující, neboť methylace fenolické funkční skupiny byla popsána také při metabolismu chlorfenolů houbami bílé hniloby^{99,100,101}. Methoxyderiváty PCB byly nalezeny také po degradaci PCB tabákem¹⁴. Methoxylace byla pozorována také u transformace fenantrenu houbou bílé hniloby⁸⁹. Výskyt tohoto typu metabolitů tedy není ojedinělý, avšak z uvedených prací není patrné, zda se jednalo o konečný produkt degradace. V případě hub lze usuzovat na případný autoprotektivní mechanismus peroxidas, kdy methoxylované substráty, jako například VA, brání vzniku tzv. sloučeniny III, a tedy inaktivaci katalytického cyklu^{42,102}.

Hydroxylované deriváty PCB podle Kamei a kol.³¹ slouží jako prekurzor pro ostatní metabolity. Jak bylo zmíněno, tito autoři se domnívají, že je za první krok transformace PCB zodpovědný houbový cytochrom P450. Tento předpoklad diskutují také jiní autoři^{14,103}. Systém cytochromu P450, který transformuje PCB na hydroxylované deriváty, byl pozorován u kvasinek¹⁰⁴, zvířat¹⁰⁵ a lidí⁹⁸.

Monoaromatické metabolity (chlorované benzoové kyseliny, chlorované benzaldehydy a chlorované benzylalkoholy) byly také publikovány v souvislosti s degradacemi PCB³¹. Tyto metabolity nasvědčují tomu, že jsou houby bílé hniloby schopny nejen modifikovat bifenylový skelet, ale rovněž rozštěpit aromatický kruh.

Částečně dechlorované PCB nasvědčují dehalogenaci více chlorovaných PCB. Vznik méně chlorovaných PCB může být důležitý pro další metabolické přeměny těchto látek. Bylo publikováno, že hydroxylované PCB s více než třemi atomy chloru v molekule velmi silně

odolávají degradaci lakasami^{37,38}. V této práci převážná většina detekovaných metabolitů obsahovala maximálně tři atomy chloru v molekule. Bylo publikováno, že jsou více chlorované bifenyly hůře degradovány *in vivo*³³. V případě bakterií je známo, že více chlorované PCB (4 a více chlorů) snadněji podléhají anaerobní dechloraci, kdy vzniklé méně chlorované deriváty jsou tímto způsobem výrazně méně transformovány. V případě oxidativní bakteriální transformace je tento trend opačný, kdy účinnost tohoto procesu roste s klesajícím počtem chlorových substituentů¹¹. Dehalogenace hexachlorbifenyly byla pozorována také v případě testování houbové NR³⁴. Z tohoto důvodu lze usuzovat, že i houbový metabolismus by mohl být schopen transformovat více chlorované kongenery na kongenery se třemi chlory v molekule nějakým dehalogenačním mechanismem a až poté by takto transformovaný kongener podléhal dalším oxidačním metabolickým úpravám.

6. Souhrn

Závěrem lze říci, že hlavní cíle této diplomové práce byly splněny. Výsledky práce jsou shrnuty v několika následujících bodech.

- Ligninolytická houba *P. ostreatus* může být zařazena mezi organismy vhodné pro dekontaminaci PCB v praxi díky vysokému degradačnímu potenciálu a schopnosti snižovat toxicitu živného media kontaminovaného PCB.
- Původní předpoklad zahrnující extracelulární ligninolytický enzymový aparát *P. ostreatus* do počátečního kroku degradace PCB nebyl potvrzen. Ligninolytické enzymy však z procesu degradace PCB nelze vyřadit, neboť se mohou účastnit degradace PCB transformovaných jinou složkou metabolismu.
- Pozitivní výsledek degradace PCB byl sledován intracelulárně, a to na úrovni mikrosomální frakce.
- Mechanismus degradace PCB není stále objasněn. Na základě stanovení některých metabolitů PCB lze předpokládat, že jsou PCB pravděpodobně transformovány dvěma mechanismy, z nichž v jednom je uplatňován dehalogenační mechanismus a v druhém oxidační transformace méně chlorovaných PCB.

7. Seznam použité literatury

- ¹ **Ballschmiter K, Zell M.** Analysis of polychlorinated biphenyls (PCB) by glass capillary gas chromatography. *Fresenius' J. Anal. Chem.* 1980; 302: 20-31.
- ² **Totevová S, Prouza M, Brenner V, Demmerová K.** Bakteriální degradace PCB. *Chem. Listy* 1997; 91: 858-866.
- ³ **Frame GM, Wagner RE, Carnahan JC, Brown JF, May RJ, Smullen LA, Bedard DL.** Comprehensive, quantitative, congener-specific analyses of eight aroclors and complete PCB congener assignments on DB-1 capillary GC columns. *Chemosphere* 1996; 33: 603-623.
- ⁴ **Skerfving S, Svensson BG, Asplund L, Hagmar L.** Exposure to mixtures and congeners of polychlorinated-biphenyls. *Clin. Chem.* 1994; 40: 1409-1415.
- ⁵ **Schantz SL, Widholm JJ, Rice DC.** Effects of PCB exposure on neuropsychological function in children. *Environ. Health Perspect.* 2003; 111: 357-576.
- ⁶ **Loch-Caruso R.** Uterine muscle as a potential target of polychlorinated biphenyls during the pregnancy. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 2002; 205: 121-130.
- ⁷ **Svobodová K, Plačková M, Novotná V, Cajthaml T.** Estrogenic and androgenic activity of PCBs, their chlorinated metabolites and other endocrine disruptors estimated with two in vitro yeast assays. *Sci. Total Environ.* 2009; 407: 5921-5925.
- ⁸ **Faroon OM, Keith S, Jones D, De Rosa C.** Carcinogenic effects of polychlorinated biphenyls. *Toxicol. Ind. Health* 2001; 17: 41-62.
- ⁹ **Holoubek I, Petrik J, Kohoutek J, Velek K, Ansorgová A.** Polychlorované bifenyly (PCBs) a další typy halogenovaných polutantů v prostředí. V knize *Polutanty v ekosystému II*, sborník referátů ze semináře. Čížek Z (ed.). BIJO TC, Praha, str. 9-38 (1996).
- ¹⁰ **Rein A, Fernqvist MM, Mayer P, Trapp S, Bittens M, Karlson UG.** Degradation of PCB congeners by bacterial strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007; 77: 469-481.
- ¹¹ **Furukawa K, Tomizuka N, Kamibayashi A.** Effect of chlorine substitution on the bacterial metabolism of various polychlorinated biphenyls. *Appl. Environ. Microbiol.* 1979; 38: 301-310.
- ¹² **Macková M, Prouzová P, Štursa P, Ryšlavá E, Uhlík O, Beranová K, Rezek J, Kurzawová V, Demnerová K, Macek T.** Phyto/rhizoremediation studies using long-term PCB-contaminated soil. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2009; 16: 817-829.
- ¹³ **Chromá L, Macková M, Kučerová P, Wiesche C, Burkhard J, Macek T.** Enzymes in plant metabolism of PCBs and PAHs. *Acta Biotechnol.* 2002; 22: 35-41.

- 14 **Rezek J, Macek T, Macková M, Tříška J, Růžičková K.** Hydroxy-PCBs, methoxy-PCBs and hydroxy-methoxy PCBs: Metabolites of polychlorinated biphenyls formed *in vitro* by Tobacco cells. *Environ. Sci. Technol.* 2008; 42: 5746-5751.
- 15 **Magee KD, Michael A, Ullah H, Dutta SK.** Dechlorination of PCB in the presence of plant nitrate reductase. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2008; 25: 144-147.
- 16 **Valli K, Gold MH.** Degradation of 2,4-dichlorophenol by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.* 1991; 173: 345-352.
- 17 **Baldrian P.** Purification and characterization of laccase from white-rot fungus *Daedalea quercina* and decolorization of synthetic dyes by the enzyme. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2004; 63: 560-563.
- 18 **Novotný Č, Svobodová K, Erbanová P, Cajthaml T, Kasinath A, Lang E, Šásek V.** Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. *Soil Biol. Biochem.* 2004; 36 1545-1551.
- 19 **Fernando T, Bumpus JA, Aust SD.** Biodegradation of TNT (2,4,6-trinitrotoluene) by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1990; 56: 1666-1671.
- 20 **Cajthaml T, Erbanová P, Kollmann A, Novotný Č, Šásek V, Mougin C.** Degradation of PAHs by ligninolytic enzymes of *Irpex lacteus*. *Folia Microbiol.* 2008; 53: 289-294.
- 21 **Bezalel L, Hadar Y, Fu PP, Freeman JP, Cerniglia CE.** Metabolism of phenanthrene by white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996; 62: 2547-2553.
- 22 **Pickard MA, Roman R, Tinoco R, Vazquez-Duhalt R.** Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by white rot fungi and oxidation by *Corioloropsis gallica* UAMH 8260 laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999; 65: 3805-3809.
- 23 **Johannes Ch, Majcherczyk A.** Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator system. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000; 66: 524-528.
- 24 **Baborová P, Möder M, Baldrian P, Cajthamlová K, Cajthaml T.** Purification of new manganese peroxidase of the white-rot fungus *Irpex lacteus*, and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the enzyme. *Res. Microbiol.* 2006; 157: 248-253.
- 25 **Camarero S, Canas AI, Nousiainen P, Record E, Lomascolo A, Martínez MJ, Martínez AT.** P-hydroxycinnamic acids as natural mediators for laccase oxidation of recalcitrant compounds. *Environ. Sci. Technol.* 2008; 42: 6703-6709.
- 26 **Covino S, Svobodová K, Křesinová Z, Petruccioli M, Federici F, D'Annibale A, Čvančarová M, Cajthaml T.** In vivo and in vitro polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by *Lentinus (Panus) tigrinus* CBS 577.79. *Bioresour. Technol.* 2010; 101: 3004-3012.
- 27 **Eaton DC.** Mineralization of polychlorinated biphenyls by *Phanerochaete chrysosporium*: a ligninolytic fungus. *Enzyme Microb. Technol.* 1985; 7: 194-196.
- 28 **Vyas BRM, Šásek V, Matucha M, Bubner M.** Degradation of 3,3',4,4'-

- tetrachlorobiphenyl by selected white rot fungi. *Chemosphere* 1994; 28: 1127-1134.
- 29 **Yadav JS, Quensen JF, Tiedje JM, Reddy CA.** Degradation of polychlorinated biphenyl mixtures (Aroclor-1242, Aroclor-1254, and Aroclor-1260) by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* as evidenced by congener-specific analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995; 61: 2560-2565.
- 30 **Novotný Č, Vyas BRM, Erbanová P, Kubátová A, Šašek V.** Removal of PCBs by various white rot fungi in liquid. *Folia Microbiol.* 1997; 42: 136-140.
- 31 **Kamei I, Kogura R, Kondo R.** Metabolism of 4,4'-dichlorobifenyl by white-rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Phanerochaete* sp. MZ142. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006; 72: 566-575.
- 32 **Kubátová A, Erbanová P, Eichlerová I, Homolka L, Nerud F, Šašek V.** PCB congener selective biodegradation by white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in contaminated soil. *Chemosphere* 2001; 43: 207-215.
- 33 **Möeder M, Cajthaml T, Koeller G, Erbanová P, Šašek V.** Structure selectivity in degradation and translocation of polychlorinated biphenyls (Delor 103) with a *Pleurotus ostreatus* (oyster mushroom) culture. *Chemosphere* 2005; 61: 1370-1378.
- 34 **De S, Perkins M, Dutta SK.** Nitrate reductase gene involvement in hexachlorobiphenyl dechlorination by *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Hazard. Mater.* 2006; 135: 350-354.
- 35 **Köller G, Möder M, Czihal K.** Peroxidative degradation of selected PCB: a mechanistic study. *Chemosphere* 2000; 41: 1827-1834.
- 36 **Schultz A, Jonas U, Hammer E, Schauer F.** Dehalogenation of chlorinated hydroxybiphenyls by fungal laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001; 67: 4377-4381.
- 37 **Keum YS, Li QX.** Fungal laccase-catalyzed degradation of hydroxyl polychlorinated biphenyls. *Chemosphere* 2004; 56: 23-30.
- 38 **Fujihiro S, Higuchi R, Hisamatsu S, Sonoki S.** Metabolism of hydroxylated PCB congeners by cloned laccase isoforms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009; 82: 853-860.
- 39 **Pointing SB.** Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2001; 57: 20-33.
- 40 **Šušla M, Svobodová K.** Ligninolytické enzymy jako účinné nástroje pro degradaci obtížně rozložitelných organopolutantů. *Chem. Listy* 2006; 100: 889-895.
- 41 **Baldrian P.** Fungal laccases – occurrence and properties. *FEMS Microbiol. Rev.* 2006; 30: 215-242.
- 42 **Wong DWS.** Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2009; 157: 174-209.
- 43 **Yoshida H.** Chemistry of lacquer (Urushi) Part 1. *J. Chem. Soc.* 1883; 43: 472-486.

- 44 **Bertrand G.** Sur la presence simultanee de la laccase et de la tyrosinase dans le suc de quelques champignons. C. R. Hebd. Seances. Acad. Sci. 1896; 123: 463-465.
- 45 **Hoegger PJ, Kilaru S, James TY, Tracker JR, Kues U.** Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. FEBS J. 2006; 273: 2308-2326.
- 46 **Thurston ChF.** The structure and function of fungal laccases. Microbiology (Reading, U.K.) 1994; 140: 19-26.
- 47 **Leontievsky A, Vares T, Lankinen P.** Blue and yellow laccases of ligninolytic fungi. FEMS Microbiol. Lett. 1997; 156: 9-14.
- 48 **Johannes Ch, Majcherczyk A.** Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator system. Appl. Environ. Microbiol. 1999; 66: 524-528.
- 49 **Soares GMB, Amorim MTP, Costa-Ferreira.** Use of laccase together with redox mediators to decolourize remazol brilliant blue R. J. Biotechnol. 2001; 89: 123-129.
- 50 **Bourbonnais R, Paice MG, Reid ID, Lanthier P, Yaguchi M.** Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization. Appl. Environ. Microbiol. 1995; 61: 1876-1880.
- 51 **Galli C, Gentili P.** Chemical messengers: mediated oxidations with the enzyme laccase. J. Phys. Org. Chem. 2004; 17: 973-977.
- 52 **Valli K, Wariishi H, Gold MH.** Oxidation of monomethoxylated aromatic compounds by lignin peroxidase: Role of veratryl alcohol in lignin biodegradation. Biochemistry 1990; 29: 8535-8539.
- 53 **Paszczynski A, Huynh VB, Crawford R.** Comparison of ligninase-I and peroxidase-M2 from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Arch. Biochem. Biophys. 1986; 244: 750-765.
- 54 **Renganathan V, Gold MH.** Spectral characterization of the oxidized states of lignin peroxidase, an extracellular heme enzyme from the white rot Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Biochemistry 1986; 25: 1626-1631.
- 55 **Warrishi H, Gold MH.** Lignin peroxidase compound-III formation, inactivation, and conversion to the native enzyme. FEBS Lett. 1989; 243: 165-168.
- 56 **Collins PJ, Field JA, Teunissen P, Dobson ADW.** Stabilization of lignin peroxidases in white rot fungi by tryptophan. Appl. Environ. Microbiol. 1997; 67: 2543-2548.
- 57 **Bonnarme P, Jeffries TW.** Mn(II) regulation of lignin peroxidases and manganese-dependent peroxidases from lignin-degrading white rot fungi. Appl. Environ. Microbiol. 1990; 56: 210-217.
- 58 **Warrishi H, Akileswaran L, Gold MH.** Manganese peroxidase from the Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: Spectral characterization of the oxidized states and the

- catalytic cycle. *Biochemistry* 1988; 27: 5365-5370.
- ⁵⁹ **Ruiz-Dueñas FJ, Martínez MJ, Martínez ÁT.** Molecular characterization of a novel peroxidase isolated from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Mol. Microbiol.* 1999; 31: 223-236.
- ⁶⁰ **Martínez MJ, Ruiz-Dueñas FJ, Guillén F, Martínez ÁT.** Purification and catalytic properties of two manganese peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. *Eur. J. Biochem.* 1996; 237: 424-432.
- ⁶¹ **Pérez-Boada M, Ruiz-Dueñas FJ, Pogni R, Basosi R, Choinowski T, Martínez MJ, Piontek K, Martínez ÁT.** Versatile peroxidase oxidation of high redox potential aromatic compounds: site-directed mutagenesis, spectroscopic and crystallographic investigation of three long-range electron transfer pathways. *J. Mol. Biol.* 2005; 354: 385-402.
- ⁶² **DeJong E, Cazemier AE, Field JA, Debont JAM.** Physiological-role of chlorinated aryl alcohols biosynthesized de-novo by white-rot fungus *Bjerkandera* sp strain BOS55. *Appl. Environ. Microbiol.* 1994; 60: 271-277.
- ⁶³ **Wittaker MM, Kersten PJ, Cullen D, Wittaker W.** Identification of catalytic residues in glyoxal oxidase by targeted mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 36226-36232.
- ⁶⁴ **Romero E, Ferreira P, Martínez AT, Martínez MJ.** New oxidase from *Bjerkandera arthroconidial* anamorph that oxidizes both phenolic and nonphenolic benzyl alcohols. *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics* 2009; 1794: 689-697.
- ⁶⁵ **Ferreira P, Medina M, Guillen F, Martínez MJ, Van Berkel WJH, Martínez ÁT.** Spectral and catalytic properties of aryl-alcohol oxidase, a fungal flavoenzyme acting on polyunsaturated alcohols. *Biochem. J.* 2005; 389: 731-738.
- ⁶⁶ **Guengerich FP.** Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem. Res. Toxicol.* 2001; 14: 611-650.
- ⁶⁷ **Stiborová M, Hudeček J, Hodek P, Frei E.** Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chem. Listy* 1999; 93: 229-237.
- ⁶⁸ **Chromá L, Macková M, Macek T, Martínek V, Stiborová M.** Rostlinné cytochromy P450 a peroxidasy a jejich úloha při degradaci kontaminantů životního prostředí. *Chem. Listy* 2001; 212-222.
- ⁶⁹ **Coon MJ, Ding XX, Pernecky SJ, Vaz ADN.** Cytochrome-P450 – progress and predictions. *FASEB J.* 1992; 6: 669-673.
- ⁷⁰ **Sono M, Roach MP, Coulter ED, Dawson JH.** Heme-Containing Oxygenases. *Chem. Rev.* (Washington, DC, U. S.) 1996; 96: 2841-2887.
- ⁷¹ **Nelson DR, Strobel HW.** Evolution of cytochrome-P-450 proteins. *Mol. Biol. Evol.* 1987; 4: 572-593.
- ⁷² <http://p450.riceblast.snu.ac.kr> (staženo 27.6.2010 ve 21:30) cit. dle **Park J, Lee S, Choi**

- J, Ahn K, Park B, Park J, Kang S, Lee YH.** Fungal cytochrome P450 database. *BMC Genomics* 2008; 9.
- ⁷³ **van den Brink HJM, van Gorcom RFM, van den Hondel CAMJJ, Punt PJ.** Cytochrome P450 Enzyme Systems in Fungi. *Fungal Genet. Biol.* 1998; 23: 1–17.
- ⁷⁴ **Mori T, Nakamura K, Kondo R.** Fungal hydroxylation of polychlorinated naphthalenes with chlorine migration by wood rotting fungi. *Chemosphere* 2009; 77: 1230-1235.
- ⁷⁵ **Masaphy S, Levanon D, Henis Y, Venkateswarlu K, Kelly SL.** Evidence for cytochrome P-450 and P-450-mediated benzo(a)pyrene hydroxylation in the white rot fungus. *FEMS Microbiol. Lett.* 1996; 135: 51-55.
- ⁷⁶ **Masaphy S, Lamb DC, Kelly SL.** Purification and characterization of a benzo[a]pyrene hydroxylase from *Pleurotus pulmonarius*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999; 266: 326-329.
- ⁷⁷ **Kasai N, Ikushiro S, Shinkyo R, Yasuda K, Hirose S, Arisawa A, Ichinose H, Wariishi H, Sakaki T.** Metabolism of mono- and dichloro-dibenzo-p-dioxins by *Phanerochaete chrysosporium* cytochromes P450. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010; 86: 773-780.
- ⁷⁸ **Ning D, Wang H, Zhuang Y.** Induction of functional cytochrome P450 and its involvement in degradation of benzoic acid by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biodegradation* 2010; 21: 297-308.
- ⁷⁹ **Marco-Urrea E, Pérez-Trujillo M, Vicent T, Caminal G.** Ability of white-rot fungi to remove selected pharmaceuticals and identification of degradation products of ibuprofen by *Trametes versicolor*. *Chemosphere* 2009; 74: 765-772.
- ⁸⁰ **Botton B, Chalot M.** Nitrogen assimilation: enzymology in ectomycorrhizas. V knize *Mycorrhiza: structure, function, molecular biology and biotechnology*. Varma AK, Hock B (ed.). Springer, Berlin, str. 325-363 (1995).
- ⁸¹ **Kobayashi M, Matsuo Y, Takimoto A, Suzuki S, Maruo F, Shoun H.** Denitrification, a novel type of respiratory metabolism in fungal mitochondrion. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 16263-16267.
- ⁸² **Takaya N.** Dissimilatory nitrate reductase metabolisms and their control in fungi. *J. Biosci. Bioeng.* 2002; 94: 506-510.
- ⁸³ **Zhou Z, Takaya N, Nakamura A, Yamaguchi M, Takeo K, Shoun H.** Ammonia fermentation, a novel anoxic metabolism of nitrate by fungi. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 1892-1896.
- ⁸⁴ **Mayer AM.** Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. *Phytochemistry* 2006; 67: 2318-2331.
- ⁸⁵ **Montiel AM, Fernández FJ, Marcial J, Soriano J, Barrios-González J, Tomasini A.** A fungal phenoloxidase (tyrosinase) involved in pentachlorophenol degradation.

- Biotechnol. Lett. 2004; 26: 1353-1357.
- ⁸⁶ **Tien M, Kirk TK.** Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. Methods Enzymol. 1988; 161: 238-249.
- ⁸⁷ **Matsumura E, Yamamoto E, Numata A, Kawano T, Shin T, Murao S.** Structures of the laccase-catalyzed oxidation products of hydroxybenzoic acids in the presence of ABTS [2,2'-Azinodi-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid)]. Agric. Biol. Chem. 1986; 50: 1355-1357.
- ⁸⁸ **Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 1976; 72: 248-254.
- ⁸⁹ **Cajthaml T, Möder M, Kačer P, Šašek V, Poop P.** Study of fungal degradation products of polycyclic aromatic hydrocarbons using gas chromatography with ion trap mass spectrometry detection. J. Chromatogr., A 2002; 213-222.
- ⁹⁰ **Arndt F.** Diazomethane. Org. Synth. 1943; 2: 165-157.
- ⁹¹ ČSN EN ISO 11348-2: 2000 Jakost vod-Stanovení inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi *Vibrio fischeri* (Zkouška na luminiscenčních bakterií)-část 2: Metoda se sušenými bakteriemi.
- ⁹² **Kožená L.** Studium degradace PCB pomocí ligninolytických hub: Kandidátská diplomová práce PřF UK Praha, Katedra analytické chemie, 43-58 (2010).
- ⁹³ **Omura T, Sato R.** The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. II. Solubilization, purification and properties. J. Biol. Chem. 1964; 239: 2370-2378.
- ⁹⁴ **Thomas DR, Carswell KS, Georgiou G.** Mineralization of biphenyl and PCBs by white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Biotechnol. Bioeng. 1992; 40: 1395-1402.
- ⁹⁵ **Cámara B, Herrea C, González M, Couve E, Hofer B, Seeger M.** From PCBs to highly toxic metabolites by the biphenyl pathway. Environ. Microbiol. 2004; 6: 842-850.
- ⁹⁶ **Takagi S, Shirota C, Sakaguchi K, Suzuki J, Sue T, Nagasaka H, Hisamatsu S, Sonoki S.** Exoenzymes of *Trametes versicolor* can metabolize coplanar PCB congeners and hydroxy PCB. Chemosphere 2007; 67: 54-57.
- ⁹⁷ **De Souza CGM, Tychanowicz GK, De Souza DF, Peralta RM.** Production of laccase isoforms by *Pleurotus pulmonarius* in response to presence of phenolic and aromatic compounds. J. Basic Microbiol. 2004;44: 129-136.
- ⁹⁸ **McGraw JE, Waller DP.** Specific human CYP 450 isoform metabolism of a pentachlorobiphenyl (PCB-IUPAC# 101). Biochem. Biophys. Res. Commun. 2006; 344: 129-133.
- ⁹⁹ **Lammer RT, Dietrich DM.** *In situ* depletion of pentachlorophenol from contaminated soil by *Phanerochaete* spp. Appl. Environ. Microbiol. 1990; 56: 3093-3100.

- ¹⁰⁰ **Reddy GVB, Gold MH.** Degradation of pentachlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*: intermediates and reactions involved. *Microbiology* 2000; 146: 405-413.
- ¹⁰¹ **Valli K, Warrishi H, Gold MH.** Degradation of 2,7-dichlorodibenzo-*p*-dioxin by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.* 1992; 174: 2131-2137.
- ¹⁰² **Cajthaml T, Erbanová P, Šašek V, Möeder M.** Breakdown products on metabolic pathway of degradation of benz[a]anthracene by ligninolytic fungus. *Chemosphere* 2006; 64: 560-564.
- ¹⁰³ **Chromá L, Möeder M, Kučerová P, Macek T, Macková M.** Plant enzymes in metabolism of polychlorinated biphenyls. *Fresenius Environ. Bull.* 2003; 12: 291-295.
- ¹⁰⁴ **Sietmann R, Hammer E, Moody J, Cerniglia CE, Schauer F.** Hydroxylation of biphenyl by the yeast *Trichosporon mucoides*. *Arch. Microbiol.* 2000; 174: 353–361.
- ¹⁰⁵ **White RD, Shea D, Schlezinger JJ, Hahn ME, Stegeman JJ.** In vitro metabolism of polychlorinated biphenyl congeners by beluga whale (*Delphinapterus leucas*) and pilot whale (*Globicephala melas*) and relationship to cytochrome P450 expression. *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Pharmacol., Toxicol. Endocrinol.* 2000; 126: 267-284.

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

Jméno a příjmení S adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka

