



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STUDIUM PRODUKCE LIGNOLYTICKÝCH ENZYMŮ POMOCÍ HUB BÍLÉ HNILOBY

STUDY OF THE PRODUCTION OF LIGNOLYTIC ENZYMES BY WHITE ROT FUNGI

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Markéta Vejdová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Helena Hudečková, Ph.D.

BRNO 2024

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK2007/2023 Akademický rok: 2023/24
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Markéta Vejdová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Biochemická technologie
Vedoucí práce: **Ing. Helena Hudečková, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Studium produkce lignolytických enzymů pomocí hub bílé hniloby

Zadání bakalářské práce:

1. Vypracování literární rešerše zaměřené na přehled producentů lignolytických enzymů se zaměřením především na produkci pomocí hub bílé hniloby a možné využití těchto enzymů ve vybraných odvětvích průmyslu.
2. Kultivace vybraného kmene hub bílé hniloby za účelem nalezení optimálních podmínek pro produkci enzymů.
3. Stanovení aktivit vybraných produkovaných enzymů.
4. Vyhodnocení výsledků a z nich plynoucí závěry ohledně nejvhodnějšího kmene pro produkci vybraných enzymů.

Termín odevzdání bakalářské práce: 20.5.2024:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Markéta Vejdová
studentka

Ing. Helena Hudečková, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2024

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Předmětem této bakalářské práce je studium produkce lignolytických enzymů houbami bílé hniloby. Teoretická část práce je zaměřena na charakterizaci dřevokazných hub, především hub bílé hniloby a jimi produkované lignolytické enzymy, vhodné substráty pro kultivaci a závislost pH prostředí na růst biomasy, na základě čehož byla vybrána pH vhodná pro kultivaci vybraných hub bílé hniloby. Experimentální část se zaměřuje na submerzní kultivaci vybraných kmenů *Trametes versicolor* CCBAS 1383 a *Irpex lacteus* CCBAS 196 při různých pH, u nichž byly po dobu 36 dní sterilně odebírány vzorky pro sledování aktivity lignolytických enzymů a obsahu celkových extracelulárních proteinů, rovněž byl zaznamenáván nárůst biomasy. Pro porovnání produkce enzymů na různých substrátech byla provedena kultivace *Trametes versicolor* CCBAS 1383 na odpadním substrátu. Na základě porovnání výsledků vybraných kmenů hub lze říci, že optimalizace kultivačního média – zejména prostředí pH má zásadní vliv na aktivitu produkovaných enzymů. Nejvyšších enzymových aktivit bylo dosaženo submerzní kultivací *Trametes versicolor* při pH 5. Výjimkou je lignin peroxidáza, která při daném pH dosáhla maximální aktivity $(4 \pm 1) \cdot 10^{-6}$ U, zatímco nejvyšší naměřená aktivita lignin peroxidázy $(1,2 \pm 0,4) \cdot 10^{-5}$ U byla při pH 7. Obecně lze však říci, že *Trametes versicolor* je vhodnějším producentem lignolytických enzymů v porovnání s *Irpex lacteus*.

KLÍČOVÁ SLOVA

houby bílé hniloby, *Trametes versicolor*, *Irpex lacteus*, lignolytické enzymy

ABSTRACT

The topic of this bachelor thesis is the study of ligninolytic enzyme production by white rot fungi. The theoretical part of the thesis is focused on the characterization of wood-decay fungi, especially white rot fungi, and the ligninolytic enzymes produced on the synthetic and waste substrates for cultivation of the fungi and the impact of pH on the biomass growth. The experimental part focuses on the submerged cultivation of selected fungal strains *Trametes versicolor* CCBAS 1383 and *Irpex lacteus* CCBAS 196 at different pH levels. Samples were taken over a period of 36 days to observe the activities of individual ligninolytic enzymes, the content of total extracellular proteins, and biomass growth. The same parameters were also observed during the submerged cultivation of *Trametes versicolor* CCBAS 1383 on waste substrate. Based on the comparison of the results of selected fungal strains, it can be stated that the optimization of the cultivation medium, particularly the pH level, has a significant impact on the activity of produced enzymes. The highest enzyme activities were achieved by the submerged cultivation of *Trametes versicolor* at pH 5. An exception is lignin peroxidase, which reached a maximum activity of only $(4 \pm 1) \cdot 10^{-6}$ U at this pH, while the highest activity of lignin peroxidase $(1,2 \pm 0,4) \cdot 10^{-5}$ U was measured at pH 7. Overall, *Trametes versicolor* is a more suitable producer of ligninolytic enzymes compared to *Irpex lacteus*.

KEYWORDS

white rot fungi, *Trametes versicolor*, *Irpex lacteus*, ligninolytic enzymes

VEJDOVÁ, Markéta. *Studium produkce lignolytických enzymů pomocí hub bílé hniloby*. Brno, 2024. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/155364>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Helena Hudečková.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studentky

Na tomto místě bych ráda poděkovala své vedoucí práce Ing. Heleně Hudečkové, Ph.D. za její odborné vedení, cenné rady a připomínky, ochotu, trpělivost a věnovaný čas. Svůj vděk bych také chtěla vyjádřit své rodině, která mi po celou dobu studia byla oporou.

OBSAH

ÚVOD	7
1 TEORETICKÁ ČÁST	8
1.1 Říše hub.....	8
1.1.1 Morfologie hub.....	8
1.1.2 Výživa hub	8
1.1.3 Mechanismus rozmnožování hub	9
1.1.4 Dřevokazné houby.....	9
1.1.4.1 Izolace a laboratorní kultivace dřevokazných hub	10
1.1.5 Houby bílé hniloby.....	12
1.1.5.1 <i>Trametes versicolor</i>	12
1.1.5.2 <i>Irpex lacteus</i>	13
1.1.5.3 <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	13
1.1.5.4 <i>Pleurotus ostreatus</i>	13
1.2 Růstová křivka hub	14
1.3 Enzymy	14
1.3.1 Kinetika enzymových reakcí	16
1.3.2 Enzymová aktivita.....	17
1.3.3 Lignolytické enzymy.....	18
1.3.3.1 Lignin peroxidáza EC 1.11.1.14.....	18
1.3.3.2 Mangan-dependentní peroxidáza EC 1.11.1.13	20
1.3.3.3 Lakáza EC 1.10.3.2.....	21
1.3.3.4 Versatilní peroxidáza EC 1.11.1.16.....	22
1.4 Přirozené a odpadní substráty lignolytických enzymů.....	22
1.5 Další producenti lignolytických enzymů.....	23
1.6 Průmyslové aplikace lignolytických enzymů.....	24
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	25
2.1 Cíl práce	25
2.2 Používané chemikálie.....	25
2.2.1 Kultivačních média.....	25
2.2.2 Roztoky pro stanovení enzymových aktivit	25
2.2.3 Roztoky pro stanovení celkového obsahu proteinů	25
2.3 Biologický materiál.....	26
2.4 Seznam použitých přístrojů a pomůcek.....	26
2.5 Příprava roztoků a činidel	26
2.5.1 Příprava pufrů.....	26
2.5.1.1 Roztoky pro úpravu pH pufrů	26
2.5.1.2 Příprava octanového pufru (120 mM, pH 5).....	26
2.5.1.3 Příprava vlnanového pufru (100 mM, pH 3).....	26
2.5.1.4 Příprava malonátového pufru (65,9 mM, pH 4,5).....	27
2.5.2 Příprava substrátů	27
2.5.2.1 Příprava 50 mM roztoku ABTS pro stanovení Lac aktivity.....	27
2.5.2.2 Příprava 25 mM roztoku veratrylalkoholu pro stanovení LiP aktivity.....	27

2.5.2.3	Příprava 20 mM roztoku DMP pro stanovení MnP aktivity.....	27
2.5.3	Příprava reakčních činidel	27
2.5.3.1	Příprava 54 mM H ₂ O ₂ pro stanovení LiP aktivity.....	27
2.5.3.2	Příprava 10 mM H ₂ O ₂ pro stanovení MnP aktivity.....	27
2.5.3.3	Příprava 20 mM EDTA pro stanovení MnP aktivity	27
2.5.3.4	Příprava 20 mM MnSO ₄ pro stanovení MnP aktivity	27
2.5.4	Příprava činidel pro stanovení celkového obsahu proteinů dle Bradfordové	27
2.5.5	Příprava činidel pro stanovení celkového obsahu proteinů dle Hartree-Lowryho.....	28
2.6	Příprava živných médií a kultivace	28
2.6.1	Příprava tuhých médií pro inokula a uchovávání	28
2.6.2	Kultivace vybraných kmenů.....	28
2.6.2.1	Příprava tekutých médií pro kultivace za různých pH	28
2.6.2.2	Příprava odpadního substrátu pro kultivace	28
2.6.2.3	Inokulace tekutých médií o různém pH a odpadního substrátu	29
2.7	Stanovení aktivity jednotlivých enzymů a celkových proteinů	29
2.7.1	Příprava vzorku pro stanovení enzymových aktivit a celkového obsahu proteinů	29
2.7.2	Stanovení aktivity enzymů	29
2.7.2.1	Stanovení enzymové aktivity lakázy.....	29
2.7.2.2	Stanovení enzymové aktivity lignin peroxidázy	29
2.7.2.3	Stanovení enzymové aktivity mangan peroxidázy	30
2.7.3	Stanovení celkového obsahu proteinů metodou Bradfordové	31
2.7.4	Stanovení celkového obsahu proteinů metodou Hartree-Lowryho.....	31
2.8	Gravimetrické stanovení růstové křivky hub	31
2.9	Statistické zpracování výsledků	31
3	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	32
3.1	Růst biomasy v závislosti na pH	32
3.2	Produkce lignolytických enzymů	33
3.2.1	Produkce lignolytických enzymů pomocí <i>T. versicolor</i> za různých podmínek pH	33
3.2.2	Produkce lignolytických enzymů pomocí <i>I. lacteus</i> za různých podmínek pH.....	35
3.2.3	Porovnání aktivit produkovaných lignolytických enzymů pomocí <i>I. lacteus</i> a <i>T. versicolor</i> ...	37
3.2.4	Stanovení aktivit lignolytických enzymů na odpadním médiu.....	38
3.3	Stanovení celkového obsahu extracelulárních proteinů	39
3.3.1	Stanovení celkového obsahu extracelulárních bílkovin metodou Bradfordové.....	39
3.3.2	Stanovení celkového obsahu extracelulárních bílkovin metodou Hartree-Lowryho.....	42
3.4	Porovnání nárůstu celkového obsahu extracelulárních proteinů s aktivitami enzymů	44
4	ZÁVĚR.....	46
5	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	47
	SEZNAM ZKRATEK	50
	SEZNAM OBRÁZKŮ	51
	SEZNAM GRAFŮ	52
	SEZNAM PŘÍLOH	53

ÚVOD

Lignolytické enzymy sehrávají důležitou roli v přirozeném cyklu uhlíku v ekosystému. Disponují poměrně vzácnou schopností degradovat lignin, což je nejrozšířenější biopolymer s nízkou biologickou odbouratelností, která je dána složitou chemickou vazbou mezi jednotlivými monomerními jednotkami ligninu. Mezi nejprostudovanější lignolytické enzymy řadíme lakázu, lignin peroxidázu, mangan peroxidázu a verzatilní peroxidázu. [1]

V přírodě jsou lignolytické enzymy produkovány především houbami bílé hniloby, případně některými bakteriemi a zajišťují přirozený rozklad lignocelulózových materiálů. Díky jejich nízké substrátové specifitě, dané nepravidelnou strukturou ligninu, enzymy disponují širokým biodegradačním potenciálem. Mohou tak vystupovat jako biologická činidla v oblasti biodegradace a bioremediace průmyslových organopolutantů ze životního prostředí, zejména PAU (polycyklických aromatických uhlovodíků), syntetických barviv, pesticidů, herbicidů, PCB (polychlorovaných bifenyly) a xenobiotik. [1][2]

Významný potenciál mají houby bílé hniloby také v procesu mykoremediace průmyslových odpadních vod, obsahujících komplexní organopolutanty a těžké kovy, které jsou pomocí extracelulárně produkovaných lignolytických enzymů degradovány na méně toxické vedlejší produkty či dokonce zcela mineralizovány. [3]

V neposlední řadě houby bílé hniloby mohou být díky velmi silným oxidačním účinkům produkovaných lignolytických enzymů slibnou alternativou pro biodegradaci plastů. [4]

Předmětem této bakalářské práce je kultivace vybraných kmenů hub bílé hniloby za účelem nalezení optimálních podmínek pro produkci lignolytických enzymů a stanovení jejich aktivit. Výsledky této práce mohou přispět k lepšímu pochopení produkce a aktivity těchto enzymů; mimo jiné mohou být podkladem pro navazující práci s houbami bílé hniloby, u nichž by mohla být potencionálně zkoumána jejich průmyslová aplikace.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Říše hub

Houby (*Fungi*) řadíme mezi jednobuněčné nebo vícebuněčné eukaryotické heterotrofní organismy rozmnožující se sporami – výtrusy. Říši hub lze rozdělit do 5 kmenů – *Chytridiomycota*, *Microsporidiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota* a *Basidiomycota*. [5]

1.1.1 Morfologie hub

Stélka hub je složena z hyf, což jsou rozvětvená tenká vlákna tvořící základní stavební jednotky hub. Hyfy tvoří nepravá pletiva nazývaná plektenchym. Existují dva typy hyf – septované a neseptované hyfy. Septované hyfy mají přepážky (septa) oddělující jednotlivé segmenty. Tyto segmenty nejsou dokonale oddělené; v přepážce se nachází pór, kterým jsou vedeny živiny či některé buněčné organely. U neseptovaných hyf se septa nenacházejí, což vede k volnému proudění cytoplasmy a jader po celé délce hyfy; tato vlastnost umožňuje houbě se rychleji šířit skrze substrát a absorbovat živiny. Cytoplazma proudí směrem růstové zóny. V apikální oblasti růstové zóny se nacházejí vezikuly nesoucí složky a enzymy potřebné k tvorbě buněčné stěny. Rozrůstáním jednotlivých houbových vláken a jejich větvením vzniká mycelium, které čerpá živiny ze substrátu, jímž prorůstá. Srůstem sekundárního povrchového mycelia v kompaktní měkký, blanitý útvar vzniká syrrociium, jenž je charakteristickým znakem hub bílé hniloby. Syrrociium prostupuje hnilobu v podélném směru. [5][6]

1.1.2 Výživa hub

Houby rozkládají organické složky vně své stélky pomocí hydrolytických enzymů, které vylučují do svého okolí; tyto enzymy štěpí substrát na menší podjednotky, které jsou následně absorbovány. [5]

Z hlediska způsobu výživy lze houby rozlišit na saprotrofní a parazitické. Saprotrofní houby rostou na odumřelých tělech rostlin, živočichů či jiných organických zbytcích, které mohou být v různém stádiu rozkladu. Parazitické houby získávají organické látky přímo ze živých organismů. Biotrofní parazitické houby na rozdíl od nekrotrofně parazitických hub nezpůsobují nekrózy pletiv hostitele. U parazitických hub se často vyskytují haustoria, což jsou rozvětvené hyfy uvnitř buněk hostitele mající za úkol čerpání živin. [5]

Častým jevem vyskytujícím se u hub je, vyjma parazitie, i symbióza – konkrétně lichenizmus a mykorhiza. V případě lichenizmu se jedná o soužití mykobiontu (houby) s fotosyntetizujícím mikroorganismem; fotobiont fotosynteticky vytváří cukry a další organické látky a mykobiont dodává vodu a minerální živiny. Mykorhiza je příkladem symbiózy hub s cévnatými rostlinami. Rostlina zásobuje houby především monosacharidy, které houba následně přemění na cukerné alkoholy, čímž dochází k selektivnímu zvýšení permeability membrán kořenových buněk a pasivní difuzi monosacharidů do houbových hyf. [5]

Hlavní zásobní jednotky hub jsou glykogen a tuky. Sacharidy hub se vyskytují ve formě cukerných alkoholů – manitolu a arabitolu; dále se vyskytuje i disacharid trehalóza. Jejich oxidací získává houba energii nezbytnou pro své životní procesy. [5]

1.1.3 Mechanismus rozmnožování hub

Houby se rozmnožují nepohlavním i pohlavním mechanismem. Pro parazitické houby je především charakteristické nepohlavní rozmnožování, které spočívá ve tvorbě nepohlavních spor (zoospor, konidií či sporangiospor) nebo pomocí samotných fragmentů hyf, které se oddělují od mycelia a prorůstají substrátem. Tento způsob se využívá v laboratorní praxi při uchovávání kultur hub, kde na čerstvém živném médiu vyroste geneticky shodné mycelium. Nepohlavní rozmnožování je u hub časté a zajišťuje rychlý a účinný způsob rozmnožování, což je zvláště užitečné v nepříznivých podmínkách. [5]

Pohlavní rozmnožování u hub hraje roli v genetické variabilitě a adaptaci na změněné prostředí, zatímco nepohlavní rozmnožování zprostředkovává rychlé šíření a kolonizování nových oblastí. [5][7]

Pohyblivými zoosporami se nepohlavně rozmnožují výhradně zástupci oddělení *Chytridiomycota*, nepohyblivé sporangiospory jsou charakteristické pro oddělení *Zygomycota* a nepohyblivé konidie vznikající v konidioforách jsou typické pro *Ascomycota* a *Basidiomycota*. Konidie mohou vznikat rozpadem hyfy nebo pučením. [5]

Pohlavní rozmnožování je rozčleněno na fáze plazmogamie, karyogamie a meiózu. Orgán, ve kterém dochází k meióze je nazýván meiosporangium a pohlavní spory meiospory; u hub stopkovýtrusných (*Basidiomycota*) je meiosporangium nazýváno bazidie a spory bazidiospory. Gametangia, sexuální orgány hub, mohou být tvarově rozlišena nebo se v případě *Basidiomycota* ani nevytvářejí a dochází k pohlavnímu splynutí hyf mycelia. Z bazidiospor vyroste za příznivých podmínek primární mycelium, které je velmi jemné a složené z tenkoblaných mnohobuněčných hyf, jejichž buňky jsou obvykle jednojaderné; setkáním dvou primárních mycelií dochází k plazmogamii a vzniká sekundární mycelium, které se rozrůstá a vzniká plodnice s bazidiemi, kde dochází ke karyogamii za vzniku haploidních bazidiospor, které se z plodnice uvolní a po jejich vyklíčení vzniká opět haploidní primární mycelium. Sekundární mycelium rozlišujeme na 2 typy – substrátové a povrchové. Substrátové mycelium proniká dovnitř dřeva, rozkládá jej a čerpá z něj živiny. Tento typ mycelia je složen z tenkoblaných hyf, které nejsou morfologicky nijak rozlišené. Povrchové mycelium sestává z širokých hyf s tlustými blanami a menšími buněčnými luminy; z hyf se vytvářejí rhizomorfy nebo pro houby bílé hniloby charakteristické syroccia. Povrchové mycelium se rozrůstá na povrchu dřeva a dává vzniku tzv. vzdušnému podhoubí. V případě nepříznivých podmínek houba pomocí povrchového mycelia vytváří sklerocia, což jsou hlízovité útvary, které za příznivých podmínek opět začnou růst a šíří tak nákazu na nová místa. Na základě způsobu rozmnožování jsou houby systematicky tříděny. [5][7]

1.1.4 Dřevokazné houby

Většinu dřevokazných hub řadíme mezi stopkovýtrusné houby – *Basidiomycota*. Vřeckovýtrusné houby zaujímají mezi dřevokaznými houbami početně menší skupinu. Zásadním rozdílem oproti *Basidiomycota* jsou endogenně vznikající výtrusy ve vřečkách. [7]

Dřevokazné houby jsou řazeny mezi saprofyty, saproparazity nebo parazity se saprofytickou aktivitou. Způsobují tlení dřeva jeho prorůstáním hyfami, které rozkládají buď celulózní složku nebo i ligninovou. Na základě této skutečnosti lze rozlišit houby celulosovorní a ligninovorní. [7]

Houby celulosovorní rozkládají jen celulózní složku dřeva; dřevo se stává křehké a kostkovitě drobné. Tento typ hub způsobuje červený a hnědý typ hniloby. Mezi houby hnědé hniloby patří *Piptoporus betulonius*, *Laetiporus sulphureus* či *Osmoporus odoratus*. Tyto houby odbourávají dřevní sacharidy, čímž dřevo získává charakteristické tmavé zbarvení. [7]

Lignivorní houby kromě celulózy a hemicelulózy rozkládají i lignin. Oproti dřevu napadenému celulosovorní houbou není dřevo napadené lignivorní houbou kostkovitě drobné. Lignivorní houby způsobují bílý typ hniloby a voštinovou hnilobu. Mezi houby bílé hniloby řadíme např. *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* či *Pleurotus ostreatus*. [7][8]

Rozklad dřeva probíhá ve čtyřech etapách. Nejprve se dřevo v pruzích barví fialově, poté z fialového zbarvení přechází do slabě červené až zčervená zcela a ztrácí svou pevnost a váhu. Nakonec se dřevo zbarví do červenohnědé se světle zbarvenými pruhy či ostrůvky naplněnými bílými uvolněnými vlákny celulózy. Změna barvy dřeva bývá prvotním spolehlivým indikátorem počínajícího rozkladu; houby bílé hniloby však vyvolávají nápadnější změny barvy dřeva až v pozdějších stádiích rozkladu. Zcela jistě lze degradaci dřeva v počátečním stavu zachytit pod UV světlem nebo barvicími metodami – 10% roztok dusičnanu stříbrného zbarví hyfy hub červenohnědě až temně hnědě, zatímco dřevo má jen světlý odstín. Další metodou je barvení 1% safraninem a pikrinanilinovou modří, které hyfy hub barví modře a dřevo červeně. Třetí možností je barvení 0,25% světlou zelení a safraninem v 60% alkoholu, kdy hyfy se obarví zeleně a dřevo červeně. [7]

1.1.4.1 Izolace a laboratorní kultivace dřevokazných hub

Čistých kultur dřevokazných hub je možno dosáhnout ze spor, ale nejčastěji se čistá kultura izoluje z tkáně plodnic či z mycelia substrátu. Plodnice se očistí a sterilně se seřízne její povrch, případně se ze vnitřní plochy houby ostrou jehlou přenesou část tkáně na živnou půdu v Petriho misce. Petriho misky s tkáněmi plodnic se přenesou do termostatu, kde při teplotě 20-25 °C začne vyrůstat mycelium, a to obvykle paprskovitě kolem houbové tkáně. Vyrůstlé mycelium se po týdnu přeočkuje na novou sterilní živnou půdu. Z mycelia rostoucím na dřevině se provádí izolace sterilním seříznutím kousku dřeva, které je přeneseno na sterilní živnou půdu Petriho misky, která je následně umístěna do termostatu, kde při teplotě 20-25 °C vyrůstá vzdušné mycelium, které se po několika dnech opět přeočkuje na sterilní živnou půdu. První izoláty bývají většinou kontaminované, je tedy třeba za použití mikrobiologických technik získat opravdu čisté kultury. [7] Velmi častými kontaminacemi jsou bakteriální infekce, kterým je možno zamezit povrchovou dezinfekcí plodnice např. roztokem chloraminu či peroxidu před odběrem samotného vzorku. Lze jim také předejít přidáním streptomycinu do agarové půdy. Čisté kultury se udržují na pevných živných půdách nebo na tekutých živných roztocích. [8]

Kultivace značí cílené pěstování, rozmnožování a udržování mikroorganismů v podmínkách *in vitro*. Kultivační živná média jsou směsí látek tekuté, polotuhé či tuhé povahy. Obecně je nutno zajistit nutriční a fyzikálně-chemické požadavky kultivovaného organismu; živná půda musí obsahovat odpovídající zdroj energie, dostatek základních živin, které jsou zdrojem podstatných biogenních prvků a v případě auxotrofních organismů je nutno dodávat i růstové faktory. [9]

Živná média rozlišujeme obecně na přirozená živná média, polosyntetická a syntetická živná média. Přirozená jsou komplexní a obsahují přírodní produkty nebo komponenty z nich připravené – např. pepton, kvasničný extrakt či kaseinový hydrolyzát. Polosyntetická média jsou částečně složena z přírodních surovin a částečně z chemických látek. Syntetická média jsou přesně chemicky definovaná, označují se také jako minerální půdy a obsahují zejména anorganické sloučeniny. Dle složení lze rozlišit základní půdy, obohacené půdy, efektivní půdy, selektivní půdy, diagnostické půdy, selektivně-diagnostické půdy, chromogenní půdy, fluorogenní půdy a minimální půdy. [9] Komplexní půdy jsou vhodné pro izolace hub z přírodních materiálů i pro dlouhodobé uchovávání mycelií. Nejčastějším typem komplexní půdy pro izolaci a udržování kultur hub jsou půdy obsahující sladinu (malt extract), kukuřičný extrakt (corn-steep liquor) nebo kvasničný extrakt (yeast extract). Půdy mohou být dále obohaceny výtažky z různých přírodních materiálů. [8]

Dřevokazné houby lze laboratorně kultivovat na pevných půdách, na tekutých půdách i na odpadních substrátech – sláma, dřevěné špalíčky či pšeničné otruby. Připravené půdy pro kultivaci jsou sterilizovány pomocí autoklávu; tekuté a agarové půdy jsou běžně autoklávovány po dobu 20 minut, zatímco odpadní substráty je vhodné sterilizovat autoklávováním alespoň dvakrát s časovým odstupem 1-2 dnů. Tento postup slouží k eliminaci spor plísní, které by mohly kontaminovat substráty. [8]

Submersní kultivace hub v tekutých půdách

Nejčastějším způsobem kultivace vyšších hub je submersní kultivace v tekutých půdách při teplotách okolo 25-28 °C; inokulované baňky jsou umístěny na třepačku, což zajišťuje rovnoměrný přísun živin a provzdušnění. Třepáním se tvoří myceliální pelety dosahující velikosti od 2 mm do 2 cm. Koncentrace živin uvnitř pelet je oproti vnějšímu okolí značně nižší a omezuje tak růst, případně dochází i ke stavu, kdy roste pouze vnější část mycelia vnitřní část pelety je mrtvá. Inokulace může být provedena z agarových ploten či submersních kultur pomocí skleněné pipety s uříznutou špičkou. Inokulace je nejvhodnější z kultury v exponenciální fázi růstu či stacionární fáze. Fázi růstu lze stanovit pomocí HPLC na základě koncentrace specifických metabolitů – např. ergosterolu či chitinu, jejichž koncentrace je přímo úměrná houbové biomase. [8]

Stacionární kultivace v tekutých půdách

Při stacionární kultivaci v tekutém médiu dochází oproti submersní kultivaci k nárůstu mycelia výlučně na povrchu média. [8]

Stacionární kultivace na pevných půdách

Pevné agarové půdy jsou připravovány přidávkem 2–3 % agaru do tekuté půdy; pro běžnou kultivaci je dostačující 2% roztok agaru, u hub rozkládajících agar je vhodné použít 3% roztok. Dřevokazné houby lze kultivovat i na odpadních substrátech v Erlenmeyerových baňkách – např. na mleté slámě, pilinách, listí, ovesných vločkách aj. K inokulaci odpadních substrátů je vhodné použít agarové válečky z okrajů dobře narostlé agarové plotny, které lze vyjmout pomocí sterilního korkovrtu. [8]

1.1.5 Houby bílé hniloby

Houby bílé hniloby patřící do skupiny *Basidiomycota* jsou důležité při rozkladných procesech ligninocelulóзовého materiálu, neboť extracelulární enzymy, jež produkují, jsou důležitými katalyzátory recyklace organického materiálu v ekosystému. Extracelulární enzymy produkované houbami bílé hniloby urychlují proces oxidace a depolymerizace ligninu, což napomáhá zpřístupnit hemicelulóзовé a celulóзовé složky dřeva k získání živin a energie. Enzymové vybavení hub bílé hniloby čítá enzymy lignolytické a nelignolytické. Mezi lignolytické enzymy, které jsou předmětem stanovování v rámci této práce a budou dále rozebrány podrobně v samostatné kapitole, řadíme lignin peroxidázu (LiP), mangan peroxidázu (MnP) a lakázu (Lac). Vyjma zmíněných enzymů bylo zjištěno, že k přeměně určitých polutantů přispívají i další enzymy nerozkládající lignin, jako jsou např. cellobióзовá dehydrogenáza (CDH), versatilní peroxidáza (VP) a hydrolázy. CDH je schopna oxidovat cellobióзу, čímž uvolňuje elektrony, které jsou následně přenášeny na různé akceptory – včetně polutantů, čímž napomáhají jejich rozkladu. VP je schopna oxidovat širokou škálu aromatických sloučenin a hydrolázy jsou zodpovědné za hydrolýzu kontaminujících esterů, amidů, glykosidů, nitrilů, fosfátů a sulfátů. [3]

Houby bílé hniloby mohou být v neposlední řadě využity k procesům biosorpcie a bioprecipitace k odstranění některých kovů z průmyslových odpadních vod, což je umožněno stavbou buněčných stěn hub, která je vyplněna chitinem a dalšími polymery, na které houba může vázat ionty kovů. Mimo jiné má schopnost měnit pH v systému odpadních vod, čímž dochází k precipitaci iontů kovů na nerozpustné soli nebo hydroxidy. [3]

Některé druhy hub bílé hniloby produkují kyseliny – např. *Phanerochaete chrysosporium* produkuje kyselinu šťavelovou, níž napomáhá odstraňování polutantů chelatací kovů; kyselé prostředí má mimo jiné schopnost urychlit tvorbu a aktivitu lignolytických enzymů, čímž se zefektivní i samotný proces rozkladu kontaminantů. [3]

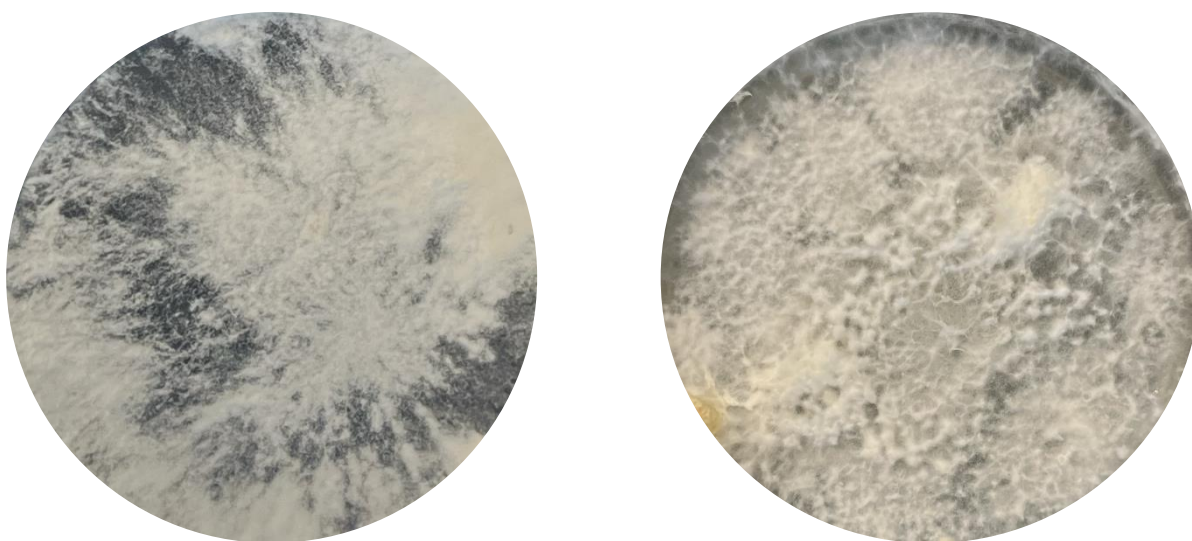
1.1.5.1 *Trametes versicolor*

Trametes versicolor neboli outkovka pestrá tvoří tence kloboukaté plodnice bokem přirostlé k substrátu. Klobouk je plochý, na povrchu suchý, sametově lesklý a jemně hustě chlupatý, vespod klobouku se nacházejí krátké rourky. Jedná se o jednoletou houbu rostoucí od jara do podzimu na pařezech, kmenech či odumřelých větvích; méně často také parazitují na živých listnatých stromech – zejména bříze, dubu, buku a vzácně i na jehličnanech. [10]

Outkovka pestrá je považována za jednu z nejefektivnějších hub bílé hniloby pro selektivní delignifikaci; produkuje významné množství lakázy, mangan peroxidázy i lignin peroxidázy. Zároveň je schopna degradovat a mineralizovat polysacharidy (např. škrob, pektin, celulóзу) na CO₂ a H₂O; na základě této skutečnosti má *Trametes versicolor* potenciál k rozkladu ligninocelulóзовých odpadních materiálů (např. otrub). Outkovka pestrá je dále známá produkcí bioaktivních látek s farmakologickým významem, jako je např. PSK (Polysaccharide Krestin), jež vykazuje protinádorovou aktivitu. Mimo jiné byla *in vitro* testována jako antibakteriální látka proti bakteriálním patogenům rajčat. [11]

1.1.5.2 *Irpex lacteus*

Irpex lacteus neboli bránovitka mléčná tvoří plodnice s kloboučky širokými 2-5 cm. Roste převážně od května do listopadu na odumřelých větvích a kmenech listnatých stromů a keřů, vzácněji se vyskytuje i na jehličnanech. *Irpex lacteus* je vzhledem k jeho bohatému enzymovému vybavení využitelný v biotechnologiích při likvidaci různých typů organických a chemických odpadů. Kromě uplatitelnosti v biotechnologiích je *Irpex lacteus* využitelný i v oblasti farmacie, vyznačuje se antibakteriálními účinky proti *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* či *Staphylococcus aureus*. Působí také inhibičně proti kvasinkám *Candida albicans*, *Candida glabrata* či *Candida parapsilosis*. [10]



Obrázek 1: *Trametes versicolor* CCBAS 1383 (vlevo), *Irpex lacteus* CCBAS 196 (vpravo)

1.1.5.3 *Phanerochaete chrysosporium*

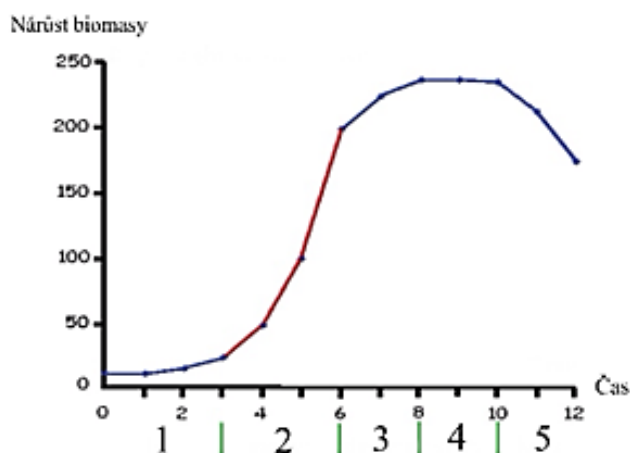
Phanerochaete chrysosporium je modelová houba bílé hniloby tvořící tenké plodnice způsobující bílý povlak na dřevě. Tato modelová houba je nejvíce prostudovanou houbou bílé hniloby a vyniká schopností degradovat pouze lignin, celulózuovou slůžku dřeva prakticky nedegraduje. [12] *Phanerochaete chrysosporium* je schopna produkovat kyselinu šťavelovou jako vedlejší metabolický produkt při rozkladu ligninocelulósových materiálů; kyselina pak následně reaguje s ionty kovů (např. železa, manganu, mědi) za vzniku chelátů, které jsou následnými enzymatickými reakcemi zapojeny do odstranění polutantů. [3]

1.1.5.4 *Pleurotus ostreatus*

Pleurotus ostreatus neboli hlíva ústříčná tvoří plodnice s kloboukem 5-20 cm, který je obvykle jazykovitý, vějířkovitý až mírně nálevkovitý; boční stranou je přirostlý nebo protažený do krátkého třeně. Barevně je proměnlivý. Pokožka klobouku je hladká a lysá, vespod se nacházejí husté, tlusté, na třeně sbíhavé lupeny. Hlíva roste od října do prosince, výjimečně i přes zimu, na odumřelých i živých kmenech listnatých stromů, zejména topolů, vrb, buků aj. Obsahuje řadu bioaktivních látek patřících do skupiny β -(1,3)-D-glukanů, které se vyznačují svými antioxidačními, imunomodulačními a protizánětlivými účinky. [10]

1.2 Růstová křivka hub

Růstová křivka hub má typický „S“ tvar. Lag fáze růstu (1) je velmi pomalá, houbové buňky se přizpůsobují prostředí. Během lag fáze dochází k syntéze RNA, enzymů a jiných molekul potřebných k dělení. Přejdem do exponenciální fáze (2) dochází k extrémně rychlému nárůstu buněk; rychlost růstu závisí na růstových podmínkách ovlivňujících frekvenci dělení buněk a pravděpodobnost, že obě dceřiné buňky přežijí. Exponenciální fáze pokračuje, dokud nedojde k vyčerpání živin či nahromadění odpadních produktů inhibujících další růst. Růst v daný moment začne zpomalovat (3) a může následovat stacionární fáze (4), při které nedochází k žádné dramatické změně koncentrace buněk nebo biomasy – růstová rychlost je rovna rychlosti odumírání. Poslední fází růstové křivky je buněčná smrt (5) a lýze, což vede ke snížení počtu buněk, tedy i biomasy. [13]



Obrázek 2: Růstová křivka hub [13], převzato a upraveno

1.3 Enzymy

Enzymy jsou biokatalyzátory produkované všemi živými organismy a jsou řazeny mezi bílkoviny. Strukturu enzymů lze analyzovat na čtyřech hierarchických úrovních. Primární struktura enzymů je určena sekvencí monomerních jednotek a typem chemických vazeb, které tyto jednotky spojují. Sekundární struktura poskytuje informace o prostorovém uspořádání sousedních nebo blízkých monomerních jednotek podél polypeptidového řetězce, a tím charakterizuje interní geometrii částí biomakromolekuly. Terciární struktura definuje vzájemné prostorové uspořádání vzdálenějších částí řetězce, což ovlivňuje celkový tvar molekuly. Kvartérní struktura popisuje prostorové rozmístění více polypeptidových podjednotek, které tvoří funkční biomolekulu. Pro enzymy typická je supermolekulová struktura popisující podjednotky uspořádané do symetrických útvarů za účasti nekovalentních interakcí. [14]

Enzymy se dále klasifikují na jednoduché, obsahující pouze bílkovinnou složku, jako jsou například hydrolázy (pepsin), a složené, které kromě bílkovinné složky (apoenzymu) zahrnují i nebílkovinnou složku (kofaktor). Kofaktory mohou být koenzymy, vázané nekovalentně, nebo prostetické skupiny, vázané kovalentně k apoenzymu, což je klíčové pro správnou funkci enzymu. [15] Koenzym je někdy přezdíván kosubstrátem, neboť zastává úlohu druhého reaktantu, který je vázán do oblasti aktivního místa zajišťující navázání kofaktoru. Tato oblast bývá prostorově lokalizována v bezprostřední blízkosti vazebného místa pro substrát. [14]

Katalytická aktivita enzymů závisí na konformaci aktivního centra, které umožňuje specifické interakce se substráty, následované chemickými reakcemi, které vedou k transformaci substrátu na produkt. Aktivní místo sestává z aminokyselinových residuí, které se přímo podílejí na navázání substrátu – tyto vazebné skupiny tvoří vazebné centrum aktivního místa. Dále obsahuje aktivní místo katalyticky aktivní skupiny tvořící katalytické centrum. Konformace aktivního centra přímo determinuje specifitu enzymu, neboť umožňuje vazbu pouze konformačně kompatibilních substrátů. Existují tři základní typy prostorové konformace aktivních míst – štěrbinové, aktivní centrum tvaru mělké prohlubně a aktivní centrum ve formě jamky. Vyjma aktivního centra se u některých typů enzymů objevují i allosterická centra; allosterická centra jsou speciálními regulačními oblastmi, do kterých jsou vázány efekory ovlivňující konformaci enzymu a tím i jeho aktivitu. Allosterické regulace jsou typické pro enzymy určující klíčové kroky metabolických drah, což umožňuje efektivní kontrolu metabolických procesů. [14]

Substrátová specifita enzymů

Substrátová specifita enzymů definuje schopnost enzymu rozpoznávat a přeměňovat specifické substráty. Enzym s vysokou substrátovou specifitou je schopen selektivně vázat a přeměňovat pouze konkrétní substráty. Substrátová specifita je dána uspořádáním aktivního centra a může být absolutní – enzym přeměňuje výhradně jeden konkrétní substrát, anebo skupinová – enzym přeměňuje více substrátů téhož typu. Zvláštními typy skupinové enzymové specifity je stereospecifita a regiospecifita; stereospecifita je schopnost enzymu v racemické směsi rozpoznat konkrétní enantiomer, který je substrátem katalyzované reakce a regiospecifita je schopnost enzymu katalyzovat v daném substrátu přeměnu na konkrétním místě. [14]

Reakční specifita enzymů

Reakční specifita definuje schopnost enzymu katalyzovat specifický typ chemické reakce, bez ohledu na substrát, který je použit. Enzymy s vysokou reakční specifitou mohou katalyzovat stejný typ reakce na široké spektrum substrátů. Reakční specifita je dána především kofaktorem, který se přímo účastní enzymové reakce. Na základě reakční specifity jsou enzymy tříděny do šesti tříd a značeny čtyřčíselným kódem EC – Enzyme Commission number. První číslice označuje příslušnou hlavní třídu a následující číslice odkazují na příslušné podtřídy popisující, kde a jak enzym působí. [14][16]

1. Oxidoreduktázy katalyzují intermolekulární redoxní přeměny přenosem vodíku nebo elektronů mezi substrátem a akceptorem nebo včleňováním atomů kyslíku do molekuly substrátů. Jako kofaktory slouží především pyridinové NAD^+ či NADP^+ , flavinové FAD či FMN, komplexně vázané ionty kovů. [14]
2. Transferázy katalyzují intermolekulární přenos aktivovaných skupin z donorové molekuly na akceptorovou. Mechanismus přenosu je zpravidla dvojstupňový - v prvním stupni je skupina přenesena z donoru na kofaktor transferázy a v dalším kroku kofaktor přenesne skupinu akceptoru. [14]
3. Hydrolázy katalyzují hydrolytické štěpení substrátů mechanismem přenesení části hydrolyzovaného substrátu na molekulu vody. Hydrolázy jsou dále klasifikovány do podtříd podle charakteru hydrolyzované vazby. [14]

4. Lyázy katalyzují nehydrolytický rozklad substrátu na dva produkty mechanismem odštěpování nebo vnášení malých molekul (např. H₂O, CO₂, NH₃) bez pomoci dalších reaktantů. [14]
5. Izomerázy katalyzují intramolekulární přesuny atomů a jejich skupin. Většinou mají povahu jednoduchých bílkovin a dělení podtříd je založeno na typech izomerie. [14]
6. Ligázy katalyzují vznik energeticky náročných vazeb za současného rozkladu makroergních sloučenin; mají povahu složených bílkovin a do podtříd jsou řazeny na základě typu vytvářených vazeb. [14]

1.3.1 Kinetika enzymových reakcí

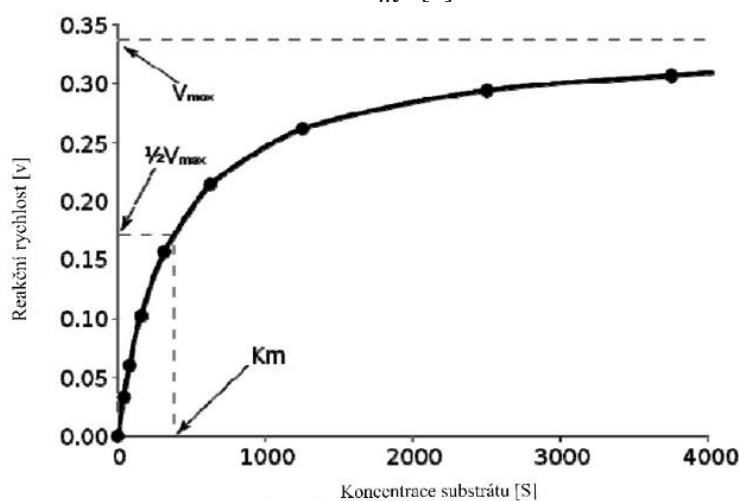
Podstatou enzymové kinetiky je studium průběhu enzymových reakcí za různých reakčních podmínek. Kinetika enzymových reakcí je závislá na koncentraci substrátu, množství enzymu, fyzikálně-chemických parametrech prostředí a přítomnosti efektorů. Na základě počtu molekul reaktantů rozlišujeme jednosubstrátové, dvousubstrátové a výjimečně třisubstrátové reakce. Jednosubstrátové reakce jsou nejčastěji izomerie katalyzované izomerázami; dále štěpení substrátu lyázami za vzniku dvou produktů. Nejčastějším typem jsou dvousubstrátové reakce, které jsou typické pro oxidoreduktázy a transferázy. Výjimečně probíhají také třisubstrátové reakce, které jsou katalyzovány ligázami. [14]

Enzymová kinetika je popisována modelem Michaelis-Mentenové (1913), který postuluje základní principy enzymové kinetiky. Model saturační kinetiky vychází z předpokladu, že enzym (E) a substrát (S) spolu reagují za vzniku komplexu (ES), který se následně může přeměnit na produkt (P) za uvolnění enzymu nebo se může zpětně disociovat na výchozí substrát (S) a enzym (E):



Reakční rychlost tvorby produktu v_0 je dána rovnicí Michaelise a Mentenové, kde v_0 je aktuální rychlost, v_{max} limitní rychlost, $[S]$ koncentrace substrátu a K_m Michaelisova konstanta. Výsledkem grafického zpracování rovnice Michaelise a Mentenové je saturační křivka zobrazená na obrázku 3. [14][15]

$$v_0 = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (2)$$



Obrázek 3: Saturační křivka [17], převzato a upraveno

Saturační křivka popisuje závislost rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu při konstantní koncentraci enzymu, jenž je substrátem saturován. Hodnota K_M rozděluje saturační křivku na dvě oblasti – při nízkých koncentracích substrátu jsou molekuly enzymu minimálně saturované, takže platí, že koncentrace volného enzymu $[E]$ je rovna koncentraci komplexu enzym-substrát $[ES]$. Rychlost reakce je úměrná koncentraci substrátu a reakce probíhá podle kinetiky prvního řádu. V případě vysokých koncentrací substrátu je veškerý enzym vázán v komplexu ES a dochází tedy k maximální saturaci aktivních míst enzymu a platí $[E] \ll [ES]$; maximálnímu nasycení odpovídá limitní rychlost reakce, která již dále nestoupá. [14]

K_M je konstanta vyjadřující koncentraci substrátu, při níž je dosaženo poloviny limitní rychlosti a je saturována substrátem polovina aktivních míst enzymu; tato konstanta je závislá na prostředí pH, teplotě, přítomnosti efektorů aj. Hodnoty Michaelisovy konstanty se pohybují v rozmezí 10^{-1} – 10^{-6} mol/l. Čím je hodnota K_M nižší, tím je afinita enzymu k danému substrátu vyšší. [14]

1.3.2 Enzymová aktivita

Katalytický účinek enzymu – neboli enzymová aktivita, se měří stanovením nárůstu reakční rychlosti za přesně definovaných podmínek v určitém časovém intervalu. Obvykle se vyjadřuje v jednotkách 1 U, což popisuje aktivitu enzymu, která za daných podmínek přemění 1 μ mol substrátu za 1 minutu. Enzymová aktivita se dále udává v jednotkách katal – 1 U = 16,67 nkat. Aktivita enzymu v roztoku se vztahuje na jeho objem – tedy např. U/ml. Specifická aktivita enzymu se pak udává na hmotnostní jednotku – např. U/mg. [15]

Stanovení aktivity enzymu lze docílit pouze kinetickými metodami; nejčastěji se využívají manometrické, spektrofotometrické, fluorescenční, polarimetrické či některé elektrochemické metody. [15]

Manometrické metody

Manometrické metody spočívají v kvantifikaci produkce nebo spotřeby plynu během enzymatické reakce; v průběhu reakce jsou zaznamenávány změny tlaku v uzavřeném systému. Pro běžné stanovování enzymové aktivity jsou manometrické metody nevhodné, nenahraditelné jsou však při měření aktivit enzymů suspenzí mikroorganismů, upravených vzorků tkání, pletiv aj. [15]

Spektrofotometrické metody

Spektrofotometrické techniky jsou nejrozšířenějšími technikami založenými na schopnosti enzymů katalyzovat reakce, které vytvářejí nebo spotřebovávají sloučeniny absorbující světlo v určité vlnové délce. Vlastní stanovení enzymové aktivity je zahájeno přidávkem substrátu; změna absorbance v čase může být měřena bodově nebo kontinuálně po dobu 3-5 minut v 30-60 s intervalu. [14][15]

Fluorescenční metody

Fluorescenční metody jsou velmi často využívány pro svou vysokou citlivost; jsou založené na tvorbě fluorescenčních produktů působením enzymu. Rychlost produkce fluorescenčních sloučenin závisí na koncentraci substrátu a enzymu; lze ji kvantitativně měřit pomocí fluorimetru jako nárůst fluorescence za jednotku času. Fluorescenční metody jsou nevhodné při analýze vzorků obsahujících proteiny – zejména s vyšším obsahem tryptofanu a tyrosinu, u nichž je typická interference. [14]

Polarimetrické metody

V případě odlišné optické rotace substrátu a produktu enzymové reakce lze využít metody polarimetrické. Touto technikou lze stanovit aktivitu např. mnoha oxidoreduktáz. V některých případech lze zvýšit optickou otáčivost vytvořením komplexů – např. pomocí hydroxykyselin, které vytvářejí komplex s molybdenanem vykazujícím výraznou optickou otáčivost. [15]

Elektrochemické metody

Elektrochemické techniky, mezi něž řadíme ampérometrii, coulometrii, polarografii a konduktometrii, vycházejí z principu sledování změn koncentrace produktů nebo substrátů v závislosti na změnách různých elektrických parametrů – např. redoxním potenciálu, elektrickém proudu, elektrickém náboji, vodivosti aj. [14]

1.3.3 Lignolytické enzymy

Lignolytické enzymy, produkované houbami bílé hniloby, jsou extracelulární enzymy s poměrně nízkou substrátovou specifitou, což je důsledek nepravidelné amorfní struktury ligninu. Tato nízká substrátová specifita zvyšuje jejich biodegradační potenciál. [8] Produkce lignolytických enzymů je stimulována stresem, který může být vyvolán vyčerpáním nebo naopak zvýšením koncentrace živin. [1]

Lignin houbám bílé hniloby neslouží jako zdroj uhlíku ani energie. [1] Jeho rozklad je oxidativní proces zahrnující enzymy lignin peroxidázu (LiP), mangan peroxidázu (MnP) a lakázu (Lac). S těmito enzymy schopnými rozkládat lignin dále spolupracují enzymy, které samy o sobě lignin rozložit nedokážou, ale produkují peroxid vodíku potřebný pro lignolytické peroxidázy – např. glyoxaloxidáza, superoxidodismutáza, glukosaoxidáza, arylalkoholoxidáza a cellobiosadehydrogenáza. [8]

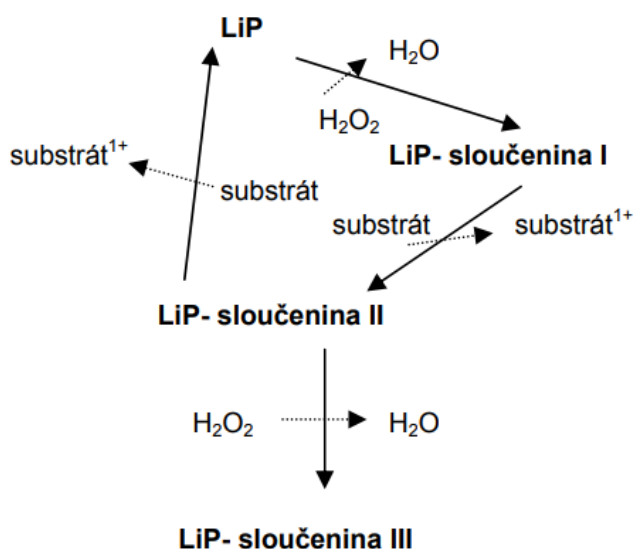
Některé lignolytické enzymy lze detekovat v kultivačních tekutinách při stacionárních kultivacích dřevokazných hub. Pro správnou detekci enzymů je podstatné odebírat kultivační tekutiny v pravidelných intervalech. Lignolytické enzymy jsou produkovány během sekundárního metabolismu hub bílé hniloby. [8][1]

1.3.3.1 Lignin peroxidáza EC 1.11.1.14

Lignin peroxidáza je globulární glykoprotein o molekulové hmotnosti 40–45 kDa a izoelektrickým bodem pI 3,2–4,0; obsahuje železo vázané na hemovou složku. Enzym byl poprvé objeven u *Phanerochaete chrysosporium*. [1][18]

LiP katalyzuje oxidační depolymerizaci ligninu závislou na H_2O_2 . Lignin peroxidáza se vyznačuje nízkou substrátovou specifitou; v přítomnosti endogenně vytvářeného peroxidu vodíku katalyzuje oxidaci řady nefenolických aromatických struktur ligninu za vzniku arylkationtových radikálů, které spontánně přecházejí na nízkomolekulární aromatické i nearomatické látky. [1] LiP je schopna oxidovat širokou škálu aromatických substrátů, včetně N-substituovaných anilinů a fenolických sloučenin (např. guajakol, katechol, aj). Vhodným substrátem pro měření enzymové aktivity LiP je veratrylalkohol, který je oxidován na veratrylaldehyd a je měřen nárůst jeho absorbance při 310 nm. Enzymová aktivita LiP je typická s rychlým poklesem aktivity enzymu při oxidaci substrátu, což je pravděpodobně způsobeno akumulací neaktivní LiP-III formy během katalýzy. [1][18]

Obrázek 4 znázorňuje katalytickou aktivitu LiP, během níž dochází k její oxidaci pomocí H_2O_2 . Dochází k odebrání 2 elektronů z molekuly, což vytváří její enzymatický meziprodukt LiP-sloučenina I. Tento meziprodukt následně oxiduje substrát za vzniku redukovanejšího enzymového meziproduktu LiP-sloučenina II, která posléze oxiduje další molekulu substrátu odejmutím jednoho elektronu, čímž se dostává do původního stavu. V případě, že je koncentrace substrátu nízká a oproti tomu koncentrace H_2O_2 vysoká, dochází k přeměně LiP-sloučeniny II na neaktivní LiP-sloučeninu III. Této inaktivaci enzymu v nadbytku H_2O_2 brání aromatické látky – např. veratrylalkohol a tryptofan, které se stávají pro sloučeninu LiP-II vhodnějším substrátem a umožní tak dokončení katalytického cyklu LiP. [1]



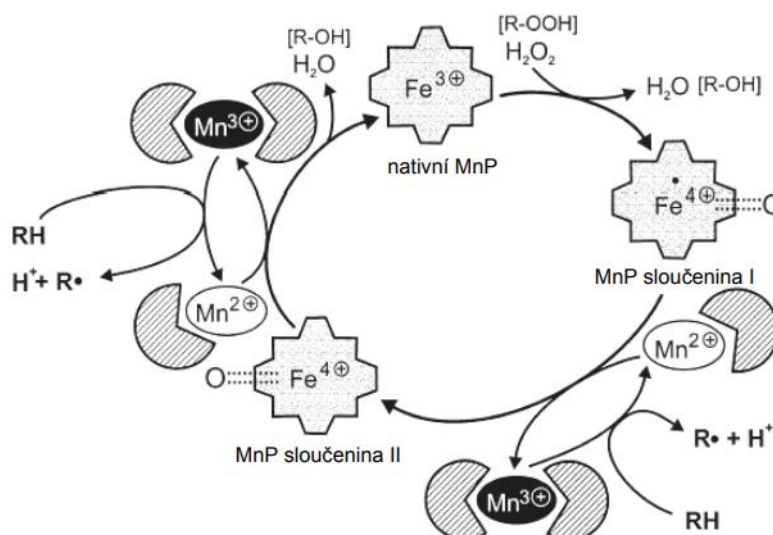
Obrázek 4: Katalytická aktivita LiP [1]

Peroxidázy vyžadují ke své činnosti peroxid vodíku, který působí ve vyšších koncentracích jako buněčný jed a jeho nadbytek je regulován katalázou. Proto H_2O_2 vzniká účinkem extracelulárních enzymů přímo v okolí hyf; mezi enzymy podílejícími se na produkci H_2O_2 řadíme např. arylalkoholoxidázy, pyranosa-2-oxidázy a glyoxaloxidázy. Arylalkoholoxidázy oxidují aromatické alkoholy na odpovídající aldehydy a peroxid vodíku za současné spotřeby kyslíku. Substrátem pro arylalkoholoxidázy je např. benzylalkohol, veratrylalkohol či anisylalkohol. Pyranosa-2-oxidázy katalyzují oxidaci monosacharidů na dikarboxylové cukry za současné spotřeby kyslíku a vzniku H_2O_2 . Glyoxaloxidáza oxiduje glyoxal na kyselinu glyoxalovou pomocí vody, na kterou je přenesen jeden kyslík za vzniku peroxidu vodíku. [8]

1.3.3.2 Mangan-dependentní peroxidáza EC 1.11.1.13

Mangan-dependentní peroxidáza (MnP) je extracelulární peroxidáza, katalyzující H_2O_2 -dependetní oxidaci Mn^{2+} na vysoce reaktivní Mn^{3+} ; Mn^{3+} následně oxiduje fenolické části ligninu za vzniku volných radikálů. Vysoká reaktivita Mn^{3+} si vyžaduje stabilizaci chelátory. Mangan-dependentní peroxidáza je obvykle produkována ve formě izoenzymů s molekulovou hmotností 45-55 kDa; tyto izoenzymy se liší zejména v izoelektrických bodech, které se nacházejí v kyselé oblasti pH (3-4). [1]

Na obrázku 5 je znázorněn katalytický cyklus mangan-dependentní peroxidázy, který je v principu velmi podobný katalytickému cyklu LiP. Na rozdíl od jiných peroxidáz vyžaduje MnP jako substrát Mn^{2+} , který vystupuje jako donor jednoho elektronu a je tak oxidován na Mn^{3+} , který je sám o sobě silně reaktivní a je stabilizován karboxylovými kyselinami (např. kyselinou šťavelovou, kyselinou mléčnou či kyselinou malonovou). Vzniklé cheláty Mn^{3+} poté mohou katalyzovat oxidaci různých substrátů – např. fenolických sloučenin za vzniku fenoxyl radikálového intermediátu, který následně podléhá dalším neenzymatickým reakcím. [1][18]



Obrázek 5: Katalytický cyklus MnP [1]

Nativní forma enzymu MnP reaguje s H_2O_2 za vzniku sloučeniny I, která váže Mn^{2+} a oxiduje jej na Mn^{3+} , současně se sloučenina MnP I redukuje na sloučeninu MnP II. K této redukci může dojít stejně tak i prostřednictvím jiného donoru elektronu (např. fenolické sloučeniny). V posledním kroku dochází k druhé jednoelektronové redukci sloučeniny MnP II za vzniku nativní formy MnP. [18]

1.3.3.3 Lakáza EC 1.10.3.2

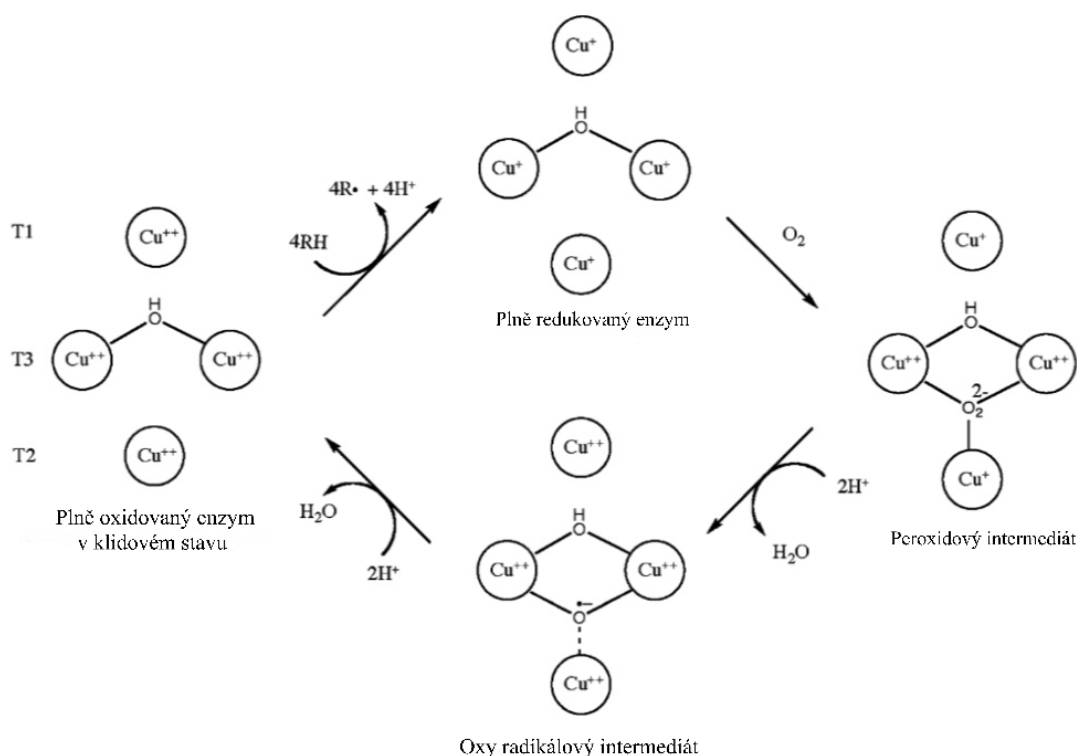
Lakáza (Lac) je N-glykosylovaná fenoloxidáza obsahující měď, díky čemuž katalyzuje čtyř-elektronovou redukci kyslíku na vodu. Poprvé byla lakáza popsána u japonského stromu *Rhus vernicifera*, kterému je přezdíváno také „Chinese lacquer tree“; odtud lakáza získala svůj název. [1][18]

Houbová lakáza se často vyskytuje ve formě izoenzymů s monomerními nebo dimerními proteinovými strukturami; *Trametes versicolor* produkuje 5 izoenzymů v závislosti na stupni glykosylace. Její molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí 60-70 kDa. Lac obsahuje ve své molekule čtyři atomy mědi v oxidačním stavu Cu^{2+} , které jsou rozmístěny mezi tři odlišná vazebná místa – T1 obsahující 1 atom mědi, T2 obsahující 1 atom mědi a T3 obsahující zbylé 2 atomy mědi. [18]

Lakáza oxiduje mnoho sloučenin – např. fenoly, polyfenoly, aromatické aminy a nefenolické substráty za vzniku reaktivních radikálů, které následně podléhají neenzymatické depolymerizaci, repolymerizaci nebo demethylaci. Vyjma degradace ligninu se lakáza podílí na sporulaci, detoxifikaci či tvorbě pigmentů. [1]

Aktivita lakázy je mnohdy inhibována; mezi významné inhibitory řadíme azidy, halogenidy, kyanidy či hydroxidy. Inhibice probíhá navázáním inhibitoru na atom mědi, čímž dochází k přerušení vnitřního přenosu elektronů a aktivita enzymu je potlačena. [19]

Obrázek 6 ilustruje katalytický cyklus lakázy; katalyzuje čtyři jednoelektronové oxidace substrátu se současnou dvouelektronovou redukcí kyslíku na vodu. První fáze katalýzy začíná na reakčním centru T1, které funguje jako primární akceptor elektronu. Po navázání substrátu dochází k redukcí měděných iontů z Cu^{2+} na Cu^{+} následované přenosem čtyř elektronů (ze čtyř molekul substrátu) do druhého reakčního centra T2/T3. Přenos elektronů mezi centry je zprostředkován sekvencí aminokyselin His-Cys-His; tento proces převádí enzym z plně oxidovaného stavu do plně redukovaného stavu. Rychlost celkové katalýzy je limitována právě přenosem elektronů z centra T1 do T2/T3. Redukce kyslíku na vodu probíhá ve dvou etapách. Nejdříve se molekula kyslíku váže na centrum T2/T3, což vede k rychlému přenosu 2 elektronů ze 2 kationtů mědi v centru T3, čímž vzniká peroxidový intermediát. Limitujícím faktorem pro rychlost této reakce je vázání kyslíku na centrum T2/T3. Poté probíhá rychlý přenos jednoho elektronu z centra T1, což vede k rozkladu peroxidového intermediátu na oxy radikálový intermediát. Tento krok je následován reduktivním štěpením O-O vazby a uvolněním nově vzniklé molekuly vody. Pomalé štěpení intermediátu je podpořeno přenosem jednoho elektronu z měděného kationtu v centru T2. V závěrečné fázi se všechny čtyři kationty mědi vracejí do oxidačního stavu Cu^{2+} a O^{2-} je uvolněn jako druhá molekula vody. [18]



Obrázek 6: Katalytický cyklus lakázy, převzato a upraveno [18]

1.3.3.4 Versatilní peroxidáza EC 1.11.1.16

Versatilní peroxidáza byla poprvé popsána u houby *Pleurotus eryngii*. Katalytické vlastnosti VP vedly k označení versatilní peroxidázy jako hybrid LiP-MnP; hybridní vlastnosti byly potvrzeny analýzou trojrozměrného modelu enzymu, na kterém byly přítomny struktury vlastní MnP tak i LiP, strukturně je však blíže LiP. VP zároveň vykazuje vyšší afinitu k H_2O_2 a Mn^{2+} , než je tomu u peroxidáz houby *Phanerochaete chrysosporium*, současně však dobře oxiduje substituované fenoly, jež zmíněné peroxidázy běžně neoxidují. [1][18]

Katalytický cyklus versatilní peroxidázy je podobný LiP a jiným peroxidázám obsahujícím hemovou složku; zahrnuje na počátku dvou elektronovou oxidaci enzymu za použití H_2O_2 , což vede k vytvoření meziprojektu I. Následuje oxidace substrátu, která probíhá ve dvou krocích, při každém z nich je odebrán jeden elektron, což postupně generuje meziprojekt II a umožňuje návrat enzymu do jeho původního stavu. VP je schopná oxidovat aromatické substráty na odpovídající radikály i bez přítomnosti Mn^{2+} . Kromě toho dokáže oxidovat Mn^{2+} na reaktivní Mn^{3+} , který následně funguje jako difúzní oxidační činidlo, podobně jako u mangan peroxidázy (MnP). [20]

1.4 Přírodní a odpadní substráty lignolytických enzymů

Houby bílé hniloby se vyznačují zcela unikátní schopností degradace ligninu, který se řadí mezi třetí nejpočetnější biopolymer na Zemi. Biodegradace ligninu je zásadním krokem v přirozeném koloběhu uhlíku; lignin, jako substrát lignolytických enzymů, však houbám bílé hniloby neslouží jako zdroj uhlíku ani energie. Nízká substrátová specifita lignolytických enzymů vede k širokému biodegradačnímu potenciálu hub bílé hniloby; v závislosti na vnějších podmínkách jsou houby bílé hniloby schopny produkovat různé izoenzymy lišící se svými katalytickými vlastnostmi. [1]

Ročně jako odpad končí 1,3 bilionů tun potravin, což odpovídá třetině celkové produkce; je tedy snaha tyto odpady valorizovat, neboť za tímto odpadem stojí i plýtvání zdroji, které byly na výrobu potravin využity – půda, voda, energie a finanční prostředky. Potravinářský odpad je komplexní biomasa obsahující různé složky, které lze využít jako vhodný substrát pro mikrobiální biokonverzi pomocí fermentačních procesů – např. škrob, bílkoviny, tuky, celulóznové materiály aj. Kromě samotných potravin je snaha valorizovat i odpady spojené s produkcí potravin – např. pšeničné otruby či bagasa z cukrové třtiny. Pšeničné otruby tvoří asi 25 % celkového množství pšenice a obsahují 56 % sacharidů včetně škrobu, 13-18 % bílkovin a 3,5 % tuku. Otruby mohou být využity jako zdroj uhlíku a dusíku v SSF (solid-state fermentation) při produkci enzymů pomocí hub. Výlisky z cukrové třtiny jsou jedním z nejrozšířenějších odpadů vzhledem k celosvětové produkci cukrové třtiny. I přes svou nízkou nutriční hodnotu může být bagasa z cukrové třtiny použita jako médium v SSF pro produkci enzymů necelulolytickými mikroorganismy. [21]

1.5 Další producenti lignolytických enzymů

Lignolytické enzymy jsou produkovány převážně houbami bílé hniloby, kromě hub však mohou být produkovány i dalšími mikroorganismy, včetně některých druhů bakterií a plísní. Degradace ligninu může být realizována řadou bakterií, které se přirozeně vyskytují v půdě. Genomické a proteomické studie bakterií prokázaly existenci bakteriálních lakáz a peroxidáz odbarvujících barviva (Dye-decolorizing peroxidase), zároveň ale i nedostatek lignin peroxidáz, mangan peroxidáz a verzatilních peroxidáz. Lakázové geny byly identifikovány u kmenů *Firmicutes* (*Bacillota*), *Proteobacteria* (*Pseudomonadota*), *Actinobacteria* (*Actinomycetota*) a v mnohem menší míře u kmenů *Bacteroidetes* (*Bacteroidota*) a *Cyanobacteria* (*Cyanobacteriota*). Bakteriální lakázy jsou především intracelulární, houbové jsou i extracelulární. [22]

Příkladem bakterií degradujících lignin je *Streptomyces viridosporus* T7A patřící do kmene *Actinomycetota*; řadí se mezi nejprostudovanější bakterie degradující lignin pomocí několika extracelulárních peroxidáz. *Actinomycetota* jsou bakterie, které se houbám podobají díky tvorbě mnohobuněčných vláken; oproti houbám tento kmen bakterií snáší vyšší hodnoty pH i teplot a lignin odbourávají jako součást primárního metabolismu – u hub je lignin degradován hlavně jako součást sekundárního metabolismu. Bakterie *Streptomyces* sp. mají především významnou aktivitu enzymů MnP. [22] Další bakterií prokazatelně produkující lignolytické enzymy je *Arthrobacter* sp. C2, jedná se o psychrofilní bakterii produkující LiP a MnP, jako substrát byl ve studii Jiang a kol. využit ligninsulfonát sodný. [23] Niu a kol. se ve své studii zabývali bakterií *Brevibacillus thermoruber* mající schopnost produkovat Lac, LiP i MnP, které jsou termostabilní – účinnost degradace ligninu se zvyšovala se zvyšováním teploty. Lakáza je vyjma *Brevibacillus thermoruber* produkována také bakteriemi *Escherichia coli* a *Streptomyces cinnamoneus*. [24][22] Lignin peroxidázu produkují kromě *Arthrobacter* sp. C2 také bakterie *Pseudomonas fluorescens*, *Streptomyces cinnamoneus* a *Brevibacillus thermoruber*. Mangan peroxidázu produkují bakterie *Pseudomonas putida*, *Streptomyces* sp., *Microbacterium* sp., *Arthrobacter* sp. C2 a *Brevibacillus thermoruber*. [22]

1.6 Průmyslové aplikace lignolytických enzymů

Nízká substrátová specifita lignolytických enzymů zvyšuje jejich biodegradační potenciál, který může být uplatněn v odvětvích biosenzorů, celulózového průmyslu, potravinářského průmyslu, kosmetiky a biodegradace. Lignolytický enzymový systém hub bílé hniloby lze efektivně využít i k degradaci toxických organických látek, čímž jsou využitelné i v odvětví bioremediace. Mezi nejčastěji zkoumané látky patří polyaromatické uhlovodíky (PAH), polychlorované bifenyly (PCB) a další chemické látky, například aromatické herbicidy, trinitrotoluene a nedávno i léčiva, zejména z kategorie endokrinních disruptorů. Aktuálním tématem je i praktické využití hub bílé hniloby při dekontaminaci znečištěných půd nebo vod. V praxi se v laboratorním měřítku experimenty provádějí tak, že inokulovaná sláma se v momentě, kdy je dobře prorostlá houbou (zpravidla po několika týdnech), pokryje vzorkem hlíny obsahujícím toxické organopolutanty a během určených časových intervalů se odebírají vzorky za účelem sledování úbytku pozorovaných kontaminantů. [8][25]

V potravinářském průmyslu jsou lakázy aplikovatelné v řadě procesů, které cílí na zlepšení nebo modifikaci barevného vzhledu potravin a nápojů; řeší problém eliminace nežádoucích fenolických sloučenin odpovědných za procesy hnědnutí a tvorby zákalu v čirých ovocných šťávách, pivu a víně. Lakáza se dále používá při želatinaci pektinu extrahovaného z cukrové řepy, v pekařském průmyslu a při úpravě odpadních vod z olivových mlýnů. Lignin peroxidáza a mangan peroxidáza mají potenciál produkovat přírodní aromatické příchutě. [25]

V celulózovém a papírenském průmyslu má lakáza potenciál jako mediátor při bělení sulfátové buničiny; tato schopnost by v budoucnu mohla mít potenciál k navázání různých chemických sloučenin na povrch vláken. Lignin peroxidáza a mangan peroxidáza jsou využívány jako biokatalyzátory při procesech bělení, zejména při odbarvování odpadních vod celulózového průmyslu. Odbarvovací schopnosti lignolytických enzymů se využívá také v textilním průmyslu; lakáza, lignin peroxidáza a mangan peroxidáza mohou biodegradovat i syntetická barviva. [25]

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Cíl práce

Cílem práce je vypracování literární rešerše ohledně producentů lignolytických enzymů se zaměřením na houby bílé hniloby a jejich případném využití ve vybraných průmyslových odvětvích. V rámci experimentální části by měla být provedena série experimentů u vybraných druhů hub s ohledem na stanovení aktivit vybraných enzymů a vyhodnocení získaných výsledků.

2.2 Používané chemikálie

2.2.1 Kultivačních média

- Agar, Himedia
- destilovaná voda
- NaOH, PENTA Chemicals
- PDB (potato dextrose broth), VWR Chemicals BDH
- pšeničné otruby
- 96% H₂SO₄, PENTA Chemicals

2.2.2 Roztoky pro stanovení enzymových aktivit

- ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonová kys.), Sigma-Aldrich
- destilovaná voda
- DMP (2,6-dimethoxyfenol), Sigma-Aldrich
- EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová), Lach:ner
- kyselina malonová, Riedel-de Haën AG
- kyselina vinná, Lach:ner
- MnSO₄, Lach:ner
- NaOH, PENTA Chemicals
- octan sodný, Lach:ner
- 30% H₂O₂, Lach:ner
- 96% 3,4-dimethoxybenzylalkohol (veratrylalkohol), Sigma-Aldrich
- 96% H₂SO₄, PENTA Chemicals

2.2.3 Roztoky pro stanovení celkového obsahu proteinů

- absolutní ethanol, VWR Chemicals BDH
- Coomassie Brilliant Blue G250, Sigma-Aldrich
- destilovaná voda
- Folin-Ciocalteavo činidlo, PENTA Chemicals
- Na₂CO₃, Lach:ner
- NaOH, PENTA Chemicals
- Pentahydrát CuSO₄, Lach:ner
- Tetrahydrát vinanu sodno-draselného, Lachema
- 98% BSA (hovězí sérový albumin), Sigma-Aldrich
- 85% H₃PO₄, Lach:ner

2.3 Biologický materiál

Pro experimenty byly použity kmeny *Trametes versicolor* CCBAS 1383 a *Irpex lacteus* CCBAS 196 poskytnuty Sbírkou kultur basidiomycetů CCBAS Mikrobiologického ústavu AV ČR.

2.4 Seznam použitých přístrojů a pomůcek

- analytické váhy Balance Pioneer PX124
- autokláv
- centrifuga Eppendorf MiniSpin plus
- ELISA reader, BioTek Synergy HTX Multi-mode reader
- exsikátor
- flow box BioAir AURA-MINI s UV lampou
- chlazená centrifuga HERMLE Z 36 HK
- kompaktní váhy HELAGO EK-300i
- mikropipety a běžné laboratorní sklo
- pH metr InoLab 720 SET
- spektrofotometr SPEKOL 1300
- sušárna Binder FD 53
- temperovaná vodní lázeň Polystat CC1
- třepačka Unimax1010
- 96 jamková mikrotitrační destička ELISA

2.5 Příprava roztoků a činidel

2.5.1 Příprava pufků

2.5.1.1 *Roztoky pro úpravu pH pufků*

Roztok 3% kyseliny sírové byl připraven odměřením 3 ml zásobního roztoku 96% H₂SO₄, který byl doplněn po rysku do odměrné baňky na 100 ml destilovanou vodou.

Roztok 5M NaOH byl připraven rozpuštěním 19,9740 g navážky NaOH v destilované vodě; směs byla převedena do odměrné baňky na 100 ml a doplněna po značku destilovanou vodou.

2.5.1.2 *Příprava octanového pufku (120 mM, pH 5)*

Na přípravu 100 ml 120 mM roztoku octanového pufku byla navážka 0,9845 g octanu sodného rozpuštěna ve 100 ml destilované vody; vzniklý roztok byl za použití pH metru upraven pomocí 3% kyseliny sírové na pH 5.

2.5.1.3 *Příprava vinnanového pufku (100 mM, pH 3)*

Na přípravu 100 ml 100 mM vinnanového pufku byla navážka 1,5013 g kyseliny vinné rozpuštěna ve 100 ml destilované vody; vzniklý roztok byl za použití pH metru upraven pomocí 5M NaOH na pH 3.

2.5.1.4 Příprava malonátového pufru (65,9 mM, pH 4,5)

Na přípravu 100 ml 65,9 mM roztoku malonátového pufru byla navážka 0,6853 g kyseliny malonové rozpuštěna ve 100 ml destilované vody; vzniklý roztok byl za použití pH metru upraven pomocí 5M NaOH na pH 4,5.

2.5.2 Příprava substrátů

2.5.2.1 Příprava 50 mM roztoku ABTS pro stanovení Lac aktivity

Na přípravu 10 ml 50 mM roztoku ABTS byla navážka 0,2751 g ABTS rozpuštěna v 10 ml destilované vody.

2.5.2.2 Příprava 25 mM roztoku veratrylalkoholu pro stanovení LiP aktivity

Na přípravu 10 ml 25 mM roztoku veratrylalkoholu bylo odměřeno 38 μ l 96% veratrylalkoholu do 10ml odměrné baňky, která byla následně doplněna destilovanou vodou po značku.

2.5.2.3 Příprava 20 mM roztoku DMP pro stanovení MnP aktivity

Na přípravu 10 ml 20 mM roztoku DMP byla navážka 0,0311 g DMP rozpuštěna v 10 ml destilované vody.

2.5.3 Příprava reakčních činidel

2.5.3.1 Příprava 54 mM H₂O₂ pro stanovení LiP aktivity

Na přípravu 54 mM roztoku H₂O₂ bylo odměřeno 50,14 μ l 30% H₂O₂ a doplněno v odměrné baňce na 10 ml po značku destilovanou vodou.

2.5.3.2 Příprava 10 mM H₂O₂ pro stanovení MnP aktivity

Na přípravu 10 mM roztoku H₂O₂ bylo odměřeno 10,31 μ l 30% H₂O₂ a doplněno v odměrné baňce na 10 ml po značku destilovanou vodou.

2.5.3.3 Příprava 20 mM EDTA pro stanovení MnP aktivity

Na přípravu 20 mM roztoku EDTA (kyseliny ethylendiamintetraoctové) bylo odváženo 0,0586 g EDTA; navážka byla kvantitativně rozpuštěna v destilované vodě a v odměrné baňce byl objem doplněn na 10 ml.

2.5.3.4 Příprava 20 mM MnSO₄ pro stanovení MnP aktivity

Na přípravu 20 mM roztoku MnSO₄ byla navážka 0,0338 g kvantitativně rozpuštěna v 10 ml destilované vody.

2.5.4 Příprava činidel pro stanovení celkového obsahu proteinů dle Bradfordové

Na přípravu 100 ml činidla byla navážka 10 mg Coomassie Brilliant Blue G250 rozpuštěna v 4,7 ml absolutního ethanolu. Poté bylo ke směsi přidáno 10 ml 88% H₃PO₄ a 80 ml destilované vody. Směs byla zfiltrována a filtrát byl kvantitativně převeden do odměrné baňky na 100 ml a doplněn po značku destilovanou vodou.

2.5.5 Příprava činidel pro stanovení celkového obsahu proteinů dle Hartree-Lowryho

Na přípravu roztoku A bylo smícháno 0,5 l 1M roztoku NaOH s navázkou 2 g tetrahydrátu vinanu sodno-draselného rozpuštěného spolu se 100 g Na₂CO₃ v destilované vodě. Objem směsi činidla byl po rozpuštění doplněn na objem 1 l. Roztok B byl připraven rozpuštěním 2 g tetrahydrátu vinanu sodno-draselného spolu s 1 g pentahydrátu CuSO₄ v 90 ml destilované vody a 10 ml 1M roztoku NaOH. Roztok C byl připraven smícháním Folin-Ciocalteuova činidla v poměru 1:15 s destilovanou vodou.

2.6 Příprava živných médií a kultivace

2.6.1 Příprava tuhých médií pro inokula a uchovávání

Pro kultivace a uchovávání vybraných kmenů hub byly použity PDB agarové plotny. PDB agarové plotny byly připraveny rozpuštěním navážky 4,5 g agaru a 7,2 g PDB ve 300 ml destilované vody; směs byla vysterilována v autoklávu při 118 °C po dobu 15 minut a poté byla sterilně za horka nalita do sterilních Petriho misek. Po zatuhnutí agarových ploten byly Petriho misky zaočkovány vybranými kmeny hub a po dobu 10 dní byly v termostatu kultivovány ve tmě při pokojové teplotě. Po 10 dnech byly vybrány nejlépe narostlé plotny, které dále sloužily jako inokulum pro zaočkování tekutých médií k produkci lignolytických enzymů.

2.6.2 Kultivace vybraných kmenů

2.6.2.1 Příprava tekutých médií pro kultivace za různých pH

Pro optimalizaci růstu *Trametes versicolor* CCBAS 1383 za různých podmínek pH byla připravena média o pH 3,5 a 7. Pro porovnání produkce lignolytických enzymů byl dále vybrán kmen *Irpex lacteus* CCBAS 196, u kterého byl porovnáván růst pouze u pH 5 a 7.

Na přípravu 1000 ml tekutého živného média bylo naváženo 24 g PDB. Směs živného média byla následně rozdělena na 3 díly, které byly upraveny 3% roztokem H₂SO₄ nebo 5M roztokem NaOH na výslednou hodnotu pH 3, 5 a 7.

Pro každou hodnotu pH byly připraveny 3 kultivační baňky na stanovování enzymových aktivit a 6 kultivačních baněk určených ke stanovení růstové křivky; do každé baňky bylo odměřeno 50 ml příslušného živného média. Takto připravené baňky byly vysterilovány v autoklávu při 118 °C po dobu 15 minut a následně inokulovány.

2.6.2.2 Příprava odpadního substrátu pro kultivace

Pro srovnání produkce enzymů na optimálním živném médiu a odpadním substrátu byla provedena kultivace *Trametes versicolor* na pšeničných otrubách. Bylo připraveno 6 kultivačních baněk obsahujících pšeničné otruby o koncentraci 50 g/l; do každé ze šesti baněk bylo odváženo 2,5 g pšeničných otrub, které byly doplněny 50 ml destilované vody. Tři baňky byly spolu s PDB vysterilovány, zatímco zbylé tři baňky byly ponechány nevysterilované. Takto připravené baňky byly dále inokulovány.

2.6.2.3 Inokulace tekutých médií o různém pH a odpadního substrátu

Z vybraných Petriho misek byla pomocí sterilního vykrajovátko o průměru 1 cm vyříznuta část mycelia, která byla sterilně přenesena do jednotlivých baněk připravených podle postupů uvedených v kapitole 2.6.2.1 a 2.6.2.2. Baňky byly po inokulaci umístěny na třepačky, kde byly kultivovány po dobu 36 dní. Z jednotlivých baněk byly v pravidelném intervalu odebírány vzorky pro stanovení celkového obsahu proteinů a stanovení enzymových aktivit.

2.7 Stanovení aktivity jednotlivých enzymů a celkových proteinů

2.7.1 Příprava vzorku pro stanovení enzymových aktivit a celkového obsahu proteinů

V průběhu experimentu byly v pravidelných intervalech sterilně odebírány 2 ml vzorku kultivačního média do 2ml centrifugačních zkumavek. Vzorky byly zcentrifugovány při 10 000 RPM po dobu 5 minut a supernatant byl následně použit pro analýzy enzymových aktivit a stanovení obsahu celkových proteinů.

2.7.2 Stanovení aktivity enzymů

Aktivita všech lignolytických enzymů byla naměřena pomocí ELISA readeru na mikrotitrační 96 jamkové destičce, a to v minutových intervalech při dané vlnové délce po dobu 10 minut. Enzymová aktivita byla po odečtu příslušných blanků vypočtena ze vztahu (3), kde ΔA [-] značí změnu absorbance za 60 s měření, ε [$\text{dm}^3/\text{mol}\cdot\text{cm}$] molární extinkční koeficient při dané vlnové délce, V_r [dm^3] objem reakční směsi a V_e [dm^3] objem supernatantu vzorku, u něhož byla v případě ředění provedena korekce odpovídajícím faktorem ředění. [26]

$$EA = \frac{\Delta A}{\varepsilon} \cdot \frac{V_{rs}}{V_e} \quad (3)$$

2.7.2.1 Stanovení enzymové aktivity lakázy

Do jamky mikrotitrační destičky ELISA bylo napipetováno 20 μl neředěného či vhodně naředěného supernatantu vzorku a 160 μl 120 mM octanového pufru pH 5. Paralelně byl připraven i blank, u něhož byl objem vzorku nahrazen destilovanou vodou. Reakce byla zahájena přidávkem 20 μl substrátu (50 mM ABTS). Destička byla ihned vložena do ELISA readeru a absorbance byla měřena při vlnové délce 420 nm v minutových intervalech po dobu 10 minut. [26]

Z naměřených dat byla provedena korekce na blank a vypočítána enzymová aktivita lakázy podle vztahu (3). Molární extinkční koeficient pro ABTS $\varepsilon_{420\text{ nm}}$ činí 36 000 $\text{dm}^3/\text{mol}\cdot\text{cm}$. [26]

2.7.2.2 Stanovení enzymové aktivity lignin peroxidázy

Do jamky mikrotitrační ELISA destičky bylo napipetováno 30 μl neředěného nebo vhodně naředěného supernatantu vzorku, 155 μl 100 mM vinanového pufru pH 3 a 10 μl 54 mM H_2O_2 ; obdobně byl připraven také blank, u něhož bylo 30 μl vzorku nahrazeno stejným objemem destilované vody. Reakce byla zahájena přidávkem 5 μl substrátu (25 mM veratrylalkoholu). Destička byla vložena do ELISA readeru a byla změřena absorbance vzorků v minutových intervalech po dobu 10 minut při vlnové délce 310 nm. [26]

Posléze byl od naměřených hodnot odečten příslušný blank a byla vypočtena aktivita lignin peroxidázy podle vztahu (3). Molární extinkční koeficient pro veratrylalkohol $\epsilon_{310\text{nm}}$ činí $9\,300\text{ dm}^3/\text{mol}\cdot\text{cm}$. [26]

2.7.2.3 Stanovení enzymové aktivity mangan peroxidázy

Do 96 jamkové ELISA destičky byly postupně pipetovány všechny tři reakční směsi. Směs I sestávala pouze ze 170 μl 65,9 mM malonátového pufru pH 4,5 a 20 μl neředěného či vhodně ředěného supernatantu vzorku. Směs II obsahovala 152 μl 65,9 mM malonátového pufru pH 4,5, 20 μl neředěného či vhodně ředěného supernatantu vzorku, 10 μl 20 mM MnSO_4 a 8 μl 10 mM H_2O_2 . Směs III byla složena ze 152 μl 65,9 mM malonátového pufru pH 4,5, 20 μl neředěného či vhodně ředěného supernatantu vzorku, 10 μl 20 mM EDTA a 8 μl 10 mM H_2O_2 . Ke směsím byly připraveny i odpovídající blanky, u kterých byl objem vzorku nahrazen destilovanou vodou. Reakce všech tří směsí byla odstartována přidavkem 10 μl 20 mM DMP. Následně byla destička vložena do ELISA readeru a byla změřena absorbance vzorků v minutových intervalech po dobu 10 minut při vlnové délce 469 nm.

Posléze byl od naměřených hodnot odečten blank a byla vypočtena enzymová aktivita EA(I-III) jednotlivých směsí podle vztahu (3). Molární extinkční koeficient pro DMP $\epsilon_{469\text{ nm}}$ činí $49\,600\text{ dm}^3/\text{mol}\cdot\text{cm}$ [26].

Tabulka 1: Složení reakčních směsí pro stanovení mangan peroxidázy

Složky reakčních směsí [μl]	EA(I)	EA(II)	EA(III)
65,9 mM malonátový pufr (pH 4,5)	170	152	152
Supernatant vzorku	20	20	20
20 mM MnSO_4	-	10	-
20 mM EDTA	-	-	10
10 mM H_2O_2	-	8	8
20 mM DMP	10	10	10

Aktivita směsi EA(I) poskytuje potřebná data pro korekci na Lac oxidující substrát DMP. Aktivita směsi EA(II) poskytuje informace o kombinované aktivitě MIP a MnP; Mn^{2+} je pomocí H_2O_2 oxidován na Mn^{3+} , jenž vystupuje jako oxidační činidlo DMP, který oxidací vytváří oranžovo-hnědý dimer s absorpčním maximem při 469 nm. Aktivita EA(III) představuje aktivitu mangan-independentní peroxidázy, od které ve výpočtu musí být následně odečtena korekce na Lac EA(I). Přepočtem dle schématu (4) byla vypočtena enzymová aktivita MnP a dle schématu (5) byla vypočtena enzymová aktivita MIP [26].

$$EA(\text{MnP}) = EA(\text{II}) - EA(\text{III}) \quad (4)$$

$$EA(\text{MIP}) = EA(\text{III}) - EA(\text{I}) \quad (5)$$

2.7.3 Stanovení celkového obsahu proteinů metodou Bradfordové

Byl připraven zásobní roztok hovězího sérového albuminu (BSA) o koncentraci 30 µg/ml, z něhož byla sestavena kalibrační řada o koncentracích 3 µg/ml až 30 µg/ml.

Do zkumavek bylo napipetováno 500 µl kalibračních vzorků albuminu, k nimž bylo dále přidáno 1000 µl činidla Bradfordové. Směs byla protřepána a po 5 minutách inkubace při pokojové teplotě byla spektrofotometricky změřena absorbance při 595 nm proti paralelně připravovanému blanku, u kterého byl objem vzorku nahrazen destilovanou vodou. [27] U měření jednotlivých vzorků byl postup obdobný, přičemž 500 µl roztoku albuminu bylo nahrazeno 500 µl supernatantu vzorku. Z příslušné kalibrační rovnice grafu 12 byl následně vypočítán obsah celkových extracelulárních proteinů, který byl graficky zpracován v závislosti na době kultivace a včetně odchylek měření byla data zpracována do tabulek.

2.7.4 Stanovení celkového obsahu proteinů metodou Hartree-Lowryho

Byl připraven zásobní roztok hovězího sérového albuminu (BSA) o koncentraci 0,3 mg/ml, z něhož byla sestavena kalibrační řada o koncentracích 0,03 mg/ml až 0,3 mg/ml.

Ke kalibračním roztokům bylo přidáno 0,9 ml činidla A, a po protřepání byly na 10 minut umístěny do temperované vodní lázně vyhřáté na 50 °C. Po 10 minutách inkubace byly roztoky ochlazeny na laboratorní teplotu a bylo k nim přidáno 0,1 ml činidla B. Takto připravené směsi byly inkubovány po dobu 10 minut při laboratorní teplotě. Po ukončení inkubace byly k roztokům přidány 3 ml činidla C; takto připravené roztoky byly důkladně protřepány a vloženy do temperované vodní lázně na 50 °C, kde byly inkubovány po dobu 10 minut. Po 10 minutách inkubace byly roztoky ochlazeny na pokojovou teplotu a ihned změřeny na spektrofotometru při 650 nm proti paralelně připravovanému blanku, u něhož byl objem proteinového vzorku nahrazen destilovanou vodou. [27] U měření jednotlivých vzorků byl postup obdobný, přičemž 1 ml roztoku albuminu byl nahrazen 1 ml vhodně ředěného supernatantu vzorku. Z příslušné kalibrační rovnice grafu 15 byl následně vypočítán obsah celkových extracelulárních proteinů, který byl graficky zpracován v závislosti na době kultivace a včetně odchylek měření byla data zpracována do tabulek.

2.8 Gravimetrické stanovení růstové křivky hub

Do předem zvážených centrifugačních zkumavek byl převeden obsah kultivační baňky, která byla následně zcentrifugována při 10000 RPM po dobu 15 minut, supernatant byl opatrně dekantován, aby nedošlo ke ztrátám a zbylý precipitát byl sušen v sušárně při teplotě 80 °C do konstantní hmotnosti. Od naměřených dat byla odečtena počáteční hmotnost inokula, takže výsledná růstová křivka je grafická závislost nárůstu hmotnosti biomasy na době kultivace vybraných kmenů hub.

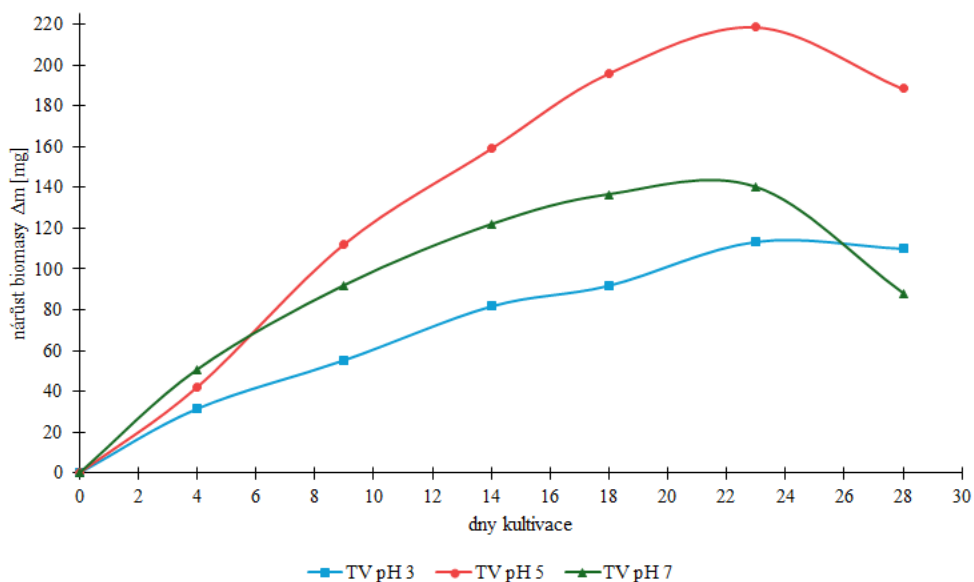
2.9 Statistické zpracování výsledků

Veškerá stanovení byla proměřena třikrát. Z těchto hodnot byl vypočítán průměr pomocí funkce PRŮMĚR, vždy pro tři měření, a hodnota intervalu spolehlivosti pomocí funkce CONFIDENCE s hladina statistické významnosti $\alpha = 0,05$ v programu Microsoft Excel 365.

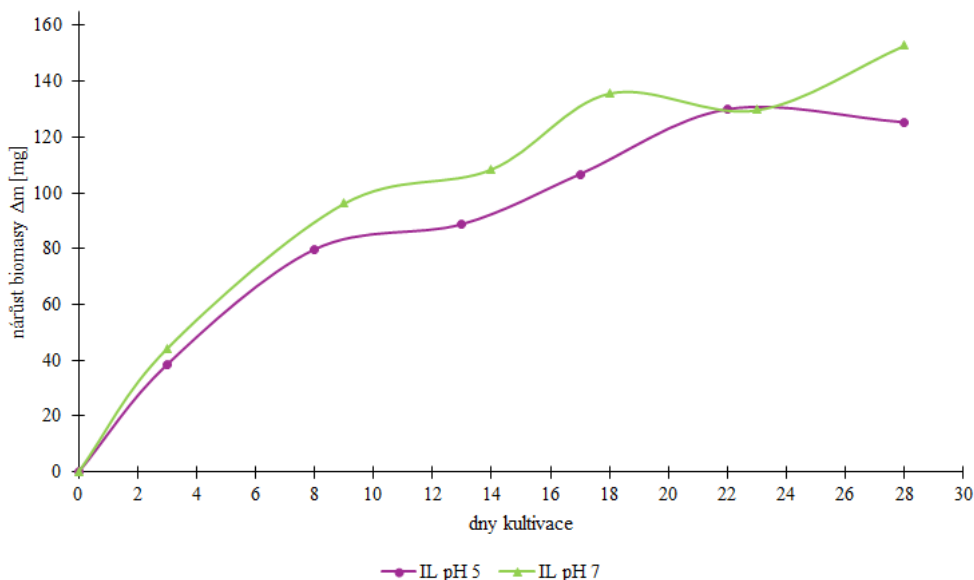
3 VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1 Růst biomasy v závislosti na pH

Byly sestaveny růstové křivky z důvodu ověření schopnosti růstu vybraných hub za různých podmínek pH byly stanoveny růstové křivky, a to pomocí metody stanovení sušiny. Postup a podmínky měření jsou uvedeny v kapitole 2.8.



Graf 1: Růstové křivky *T. versicolor* při pH 3, 5 a 7



Graf 2: Růstové křivky *I. lacteus* při pH 5 a 7

Grafy 1 a 2 zobrazují naměřené růstové křivky vybraných kmenů hub bílé hniloby. Z růstových křivek je patrné, že bylo dostatečně narostlé inokulum a u zaočkovaných baněk prakticky nelze pozorovat lag-fázi. U všech růstových křivek je pozorovatelná exponenciální fáze růstové křivky, která se projevuje rychlým nárůstem biomasy. V této fázi růstu jsou mikroorganismy obvykle metabolicky nejaktivnější.

Nejdéle trvající exponenciální fázi růstu lze pozorovat u vzorku *T. versicolor* kultivovaného při pH 5. V publikaci od Veena a Pandey [28] se uvádí optimální pH pro nárůst biomasy 4,5-6,0, což odpovídá získaným výsledkům.

Po exponenciální fázi lze pozorovat fázi zpomalení růstu biomasy, ke které došlo u obou kmenů většinou mezi 12-22 dnem kultivace. U naměřených růstových křivek není patrná stacionární fáze, která přechází do fáze odumírání a lýze buněk, což je patrné z naměřeného poklesu buněčné biomasy.

3.2 Produkce lignolytických enzymů

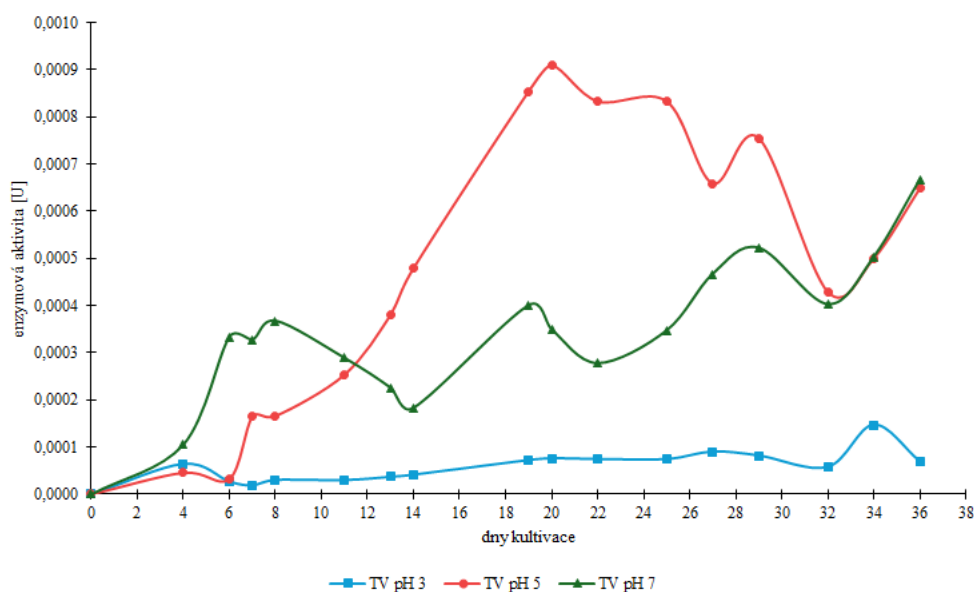
Za vybraných podmínek pH (3, 5 a 7) pro kultivaci *T. versicolor*, byl sledován nejen nárůst biomasy, ale zejména také produkce lignolytických enzymů a celkový obsah extracelulárních proteinů.

Z analýzy naměřených dat enzymových aktivit *T. versicolor* byla posléze pro kultivaci *I. lacteus* vybrána prostředí pH 5 a pH 7, neboť při těchto hodnotách pH byly naměřeny nejvyšší hodnoty enzymových aktivit produkovaných *T. versicolor* (viz graf 3, 4 a 5).

Enzymové aktivity obou vybraných hub byly přehledně zpracovány do grafů. Pro lepší přehlednost byly odchylky měření dány do tabulek s naměřenými hodnotami jednotlivých aktivit. Tyto tabulky jsou uvedeny v příloze I.

3.2.1 Produkce lignolytických enzymů pomocí *T. versicolor* za různých podmínek pH

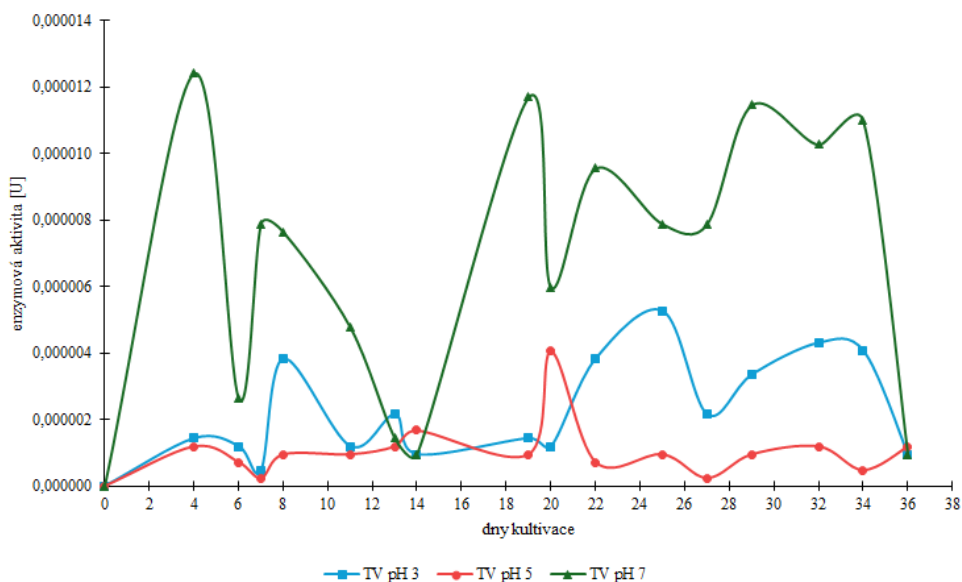
Stanovení enzymových aktivit bylo provedeno dle postupů uvedených v kapitole 2.7. Produkce lignolytických enzymů byla sledována v závislosti na čase, pH a druhu použitého živného média.



Graf 3: Aktivita Lac *T. versicolor*

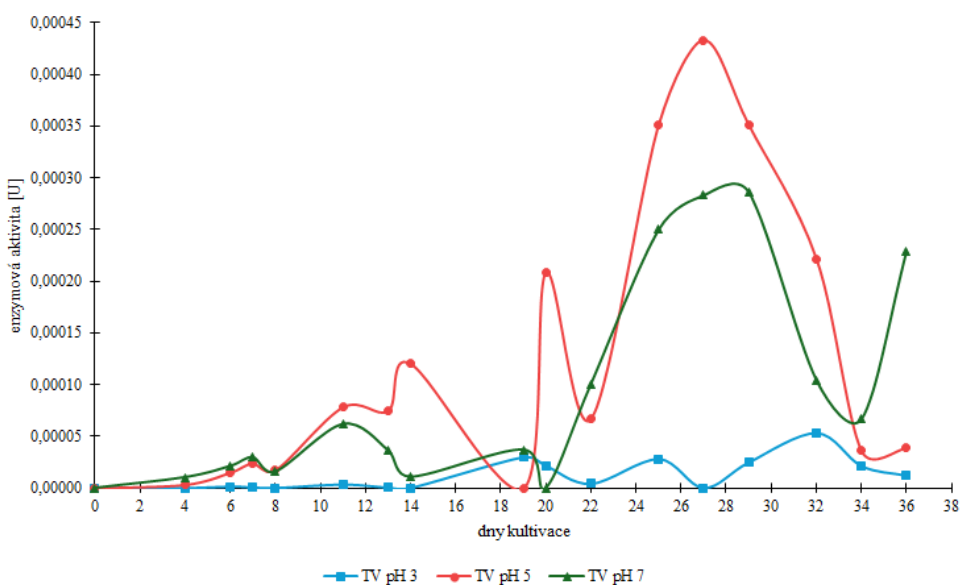
Z grafu 3, jehož cílem bylo porovnání enzymové aktivity Lac v kultivačních médiích o různých hodnotách pH je patrné, že nejvyšší enzymová aktivita Lac byla zaznamenána v médiu o pH 5, následovaná médiem o pH 7. V prostředí pH 3 je aktivita Lac ve srovnání s ostatními pH velmi nízká a téměř konstantní po celou dobu kultivace.

Oproti tomu v prostředí pH 5 začíná aktivita dramaticky růst od 6. do 20. dne kultivace, kdy dosahuje svého maxima $(91 \pm 2) \cdot 10^{-5}$ U. Poté aktivita klesá, ale zůstává relativně vysoká až do konce kultivace. Při pH 7 aktivita Lac vzrůstá již 4. den kultivace a kolísavě narůstá až do 36. dne kultivace.



Graf 4: Aktivita LiP *T. versicolor*

Graf 4 ukazuje aktivitu LiP produkované *T. versicolor*, která vykazuje nejvyšší hodnoty enzymové aktivity při pH 7 $(1,2 \pm 0,4) \cdot 10^{-5}$ U a to již 4. den po inokulaci. Aktivita LiP v médiu o pH 7 je výrazně vyšší a proměnlivější než u ostatních pH. V kultivačním médiu o pH 3 bylo dosaženo 25. den kultivace maximální aktivity $(5 \pm 2) \cdot 10^{-6}$ U a u pH 5 byla maximální aktivita $(4 \pm 1) \cdot 10^{-6}$ U naměřena 20. den kultivace. Pro produkci LiP je tedy na základě experimentu optimální prostředí pH 7.



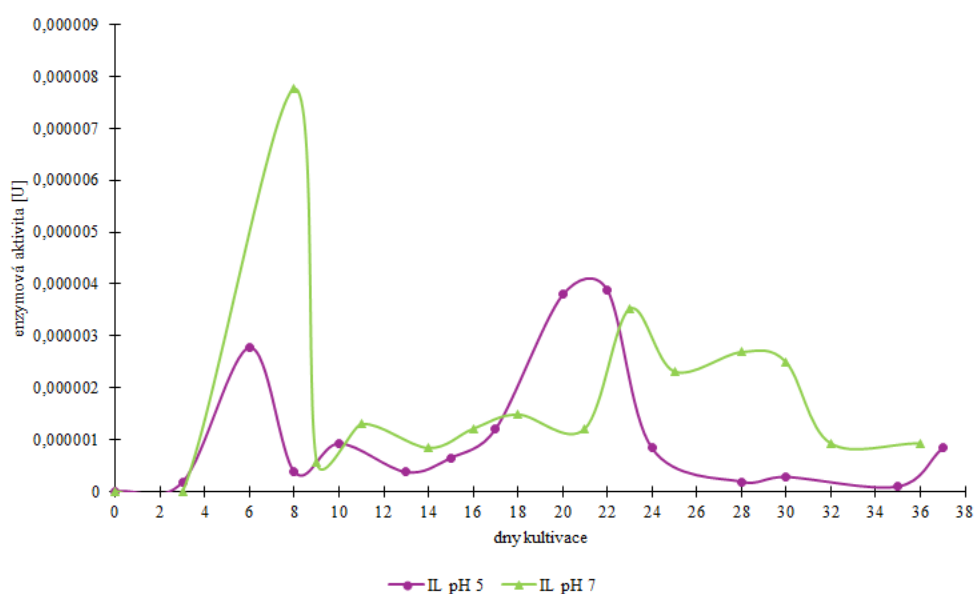
Graf 5: Aktivita MnP *T. versicolor*

Aktivita MnP, jenž je porovnávána grafem 5, nabývá významných aktivit při pH 5 a pH 7. V médiu o pH 3 je aktivita MnP ve srovnání s ostatními pH relativně nízká a téměř konstantní po celou dobu kultivace; mírně kolísá s několika malými nárůsty a maximem $(30 \pm 2) \cdot 10^{-6}$ U, čehož bylo dosaženo 19. den kultivace. Aktivita MnP u média o pH 5 nabývá maximální aktivity $(433 \pm 117) \cdot 10^{-6}$ U 27. den kultivace; její průběh je po celou dobu kultivace velice kolísavý. Svého maxima dosahuje velmi podobně i MnP média o pH 7, které bylo dosaženo 29. den kultivace s hodnotou $(29 \pm 2) \cdot 10^{-5}$ U.

Z naměřených enzymových aktivit *Trametes versicolor* vyplývá, že enzymová aktivita lakázy dosahuje nejvyšších aktivit při pH 5, což je zároveň i nejvhodnější kultivační prostředí pro maximální aktivitu mangan peroxidázy. Pro maximální enzymovou aktivitu lignin peroxidázy je optimálním prostředím pH 7. Na základě těchto výstupů byla vybrána prostředí pH 5 a pH 7 pro kultivace *Irpex lacteus*.

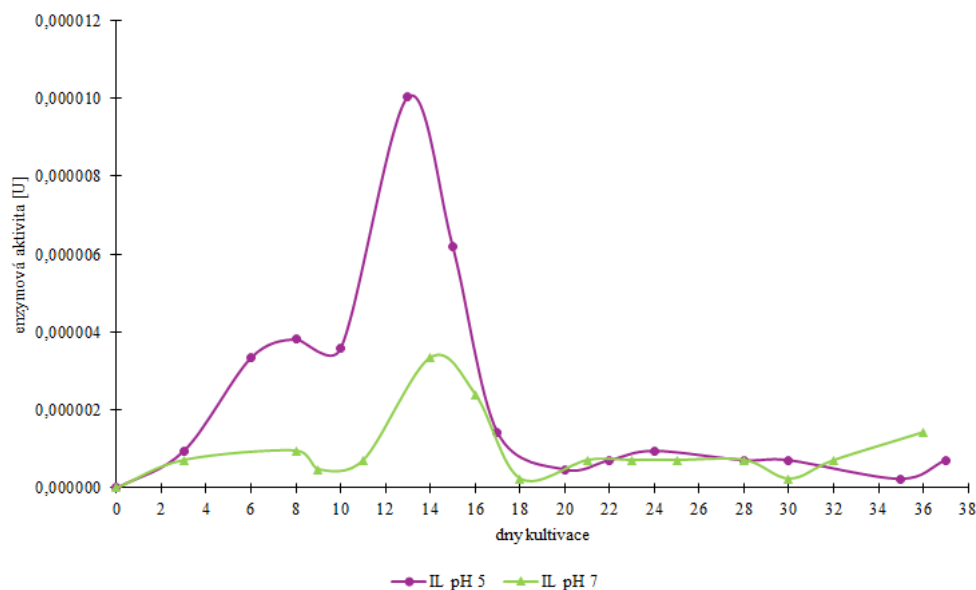
3.2.2 Produkce lignolytických enzymů pomocí *I. lacteus* za různých podmínek pH

Pro porovnání výsledků získaných kmenem *T. versicolor* byla provedena kultivace dalšího kmene hub bílé hniloby. Pro kultivace byl vybrán kmen *Irpex lacteus*. Ten byl kultivován při pH 5 a 7; tyto podmínky byly vybrány na základě experimentálních dat *Trametes versicolor*. Příprava tekutého média a inokulace byla provedena podle postupu v kapitolách 2.6.2.1 a 2.6.2.3; měření enzymových aktivit a obsahu celkových proteinů bylo provedeno podle postupu v kapitole 2.7.



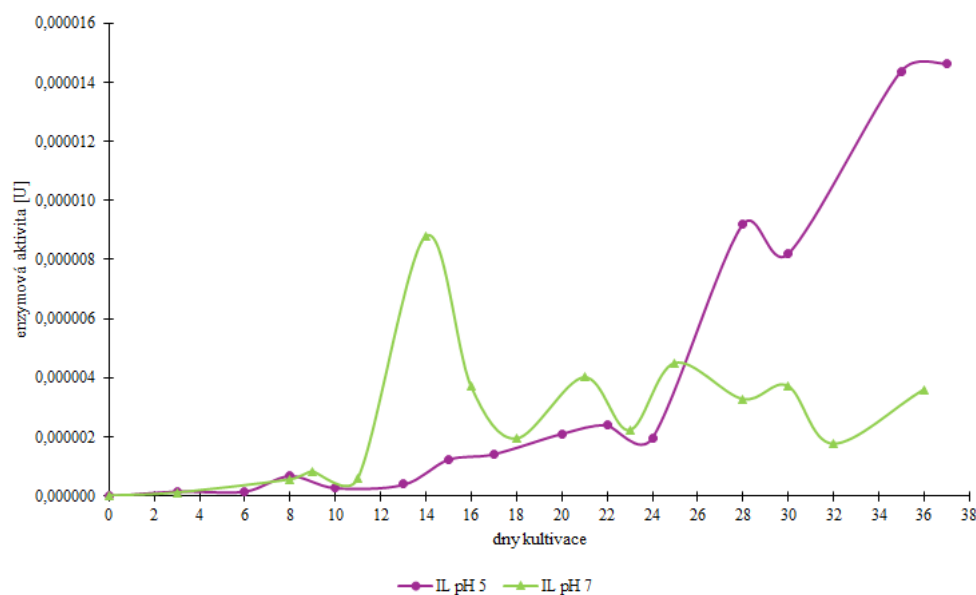
Graf 6: Aktivita Lac *I. lacteus*

Graf 6 porovnává aktivitu lakázy produkované *I. lacteus* při pH 5 a pH 7. V prostředí pH 7 dochází již 8. den kultivace k maximální enzymové aktivitě Lac s hodnotou $(78 \pm 21) \cdot 10^{-7}$ U, poté aktivita klesá, ale udržuje se stále na vyšší úrovni, než při pH 5. V prostředí pH 5 dosahuje Lac nejvyšší aktivity $(389 \pm 101) \cdot 10^{-8}$ U 22. den kultivace.



Graf 7: Aktivita LiP *I. lacteus*

Aktivita lignin peroxidázy izolované z kulturačních médií *Irpex lacteus* o pH 5 a 7 je porovnána v grafu 7. Z grafu je patrné, že optimální prostředí pro produkci LiP houbou *I. lacteus* odpovídá pH 5, při němž dosahuje svého maxima aktivity $(100 \pm 35) \cdot 10^{-7}$ U 13. den kultivace; u pH 7 je maximum $(33 \pm 12) \cdot 10^{-7}$ U dosaženo o den později.



Graf 8: Aktivita MnP *I. lacteus*

Graf 8 srovnává aktivity MnP za různých podmínek pH. Pro pH 7 bylo dosaženo maxima 14. den kultivace $(880 \pm 134) \cdot 10^{-8}$ U. Aktivita MnP v médiu s pH 5 měla i 36. den kultivace stále rostoucí tendenci. Z grafu však lze usuzovat, že pravděpodobně bylo dosaženo maxima. Aktivita za těchto podmínek činila $(1465 \pm 982) \cdot 10^{-8}$ U.

Z naměřených hodnot enzymových aktivit *Irpex lacteus* vyplývá, že pH 5 je ideálním prostředím pro maximální aktivitu lignin peroxidázy a zároveň i mangan peroxidázy; optimálním prostředím pro maximální aktivitu lakázy je kulturační médium o pH 7.

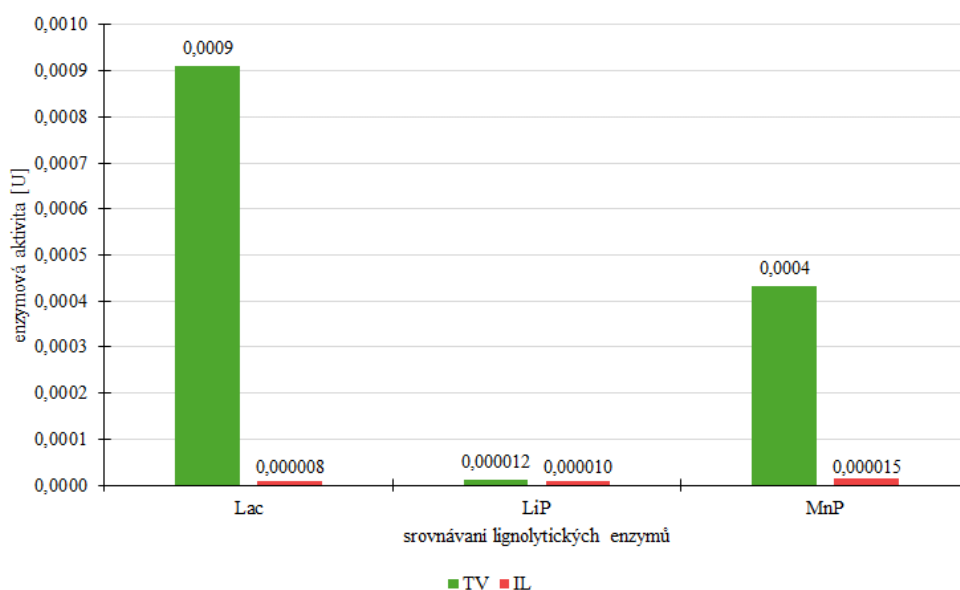
3.2.3 Porovnání aktivit produkovaných lignolytických enzymů pomocí *I. lacteus* a *T. versicolor*

Porovnáním aktivit jednotlivých enzymů produkovaných vybranými kmeny hub bílé hniloby bylo zjištěno, že kmenem vhodnějším pro produkci lignolytických enzymů je *Trametes versicolor*.

Enzymová aktivita lakázy produkovaná *Trametes versicolor* je výrazně vyšší a stabilnější v porovnání s lakázou produkovanou *Irpex lacteus*, jejíž aktivita byla v porovnání s *Trametes versicolor* velice nízká, nehledě na prostředí pH. Tento výsledek však odpovídá předpokladu; Novotný a kol. [29] ve své práci stanovili aktivity všech zmíněných enzymů a lakázová aktivita v porovnání s ostatními enzymy byla naměřena velice nízká, čímž potvrzují námi dosažené výsledky.

V případě enzymové aktivity lignin peroxidázy bylo zjištěno, že u vybraných kmenů jsou si velice podobné. *Trametes versicolor* dosahuje maximálních hodnot aktivity $(1,2 \pm 0,4) \cdot 10^{-5}$ U při pH 7 a *Irpex lacteus* dosahuje aktivity $(1,00 \pm 0,35) \cdot 10^{-5}$ U při pH 5. Aktivita LiP *T. versicolor* vykazuje velmi dynamický průběh enzymové aktivity během kultivace, oproti tomu LiP produkovaná *I. lacteus* má jediný výrazný vrchol následovaný poklesem aktivity. Z tohoto hlediska se zdá být vhodnějším kmenem pro produkci lignin peroxidázy *T. versicolor*.

I v případě mangan peroxidázy bylo pomocí *Trametes versicolor* dosaženo vyšších aktivit než-li kultivací *Irpex lacteus*, nehledě na prostředí pH.

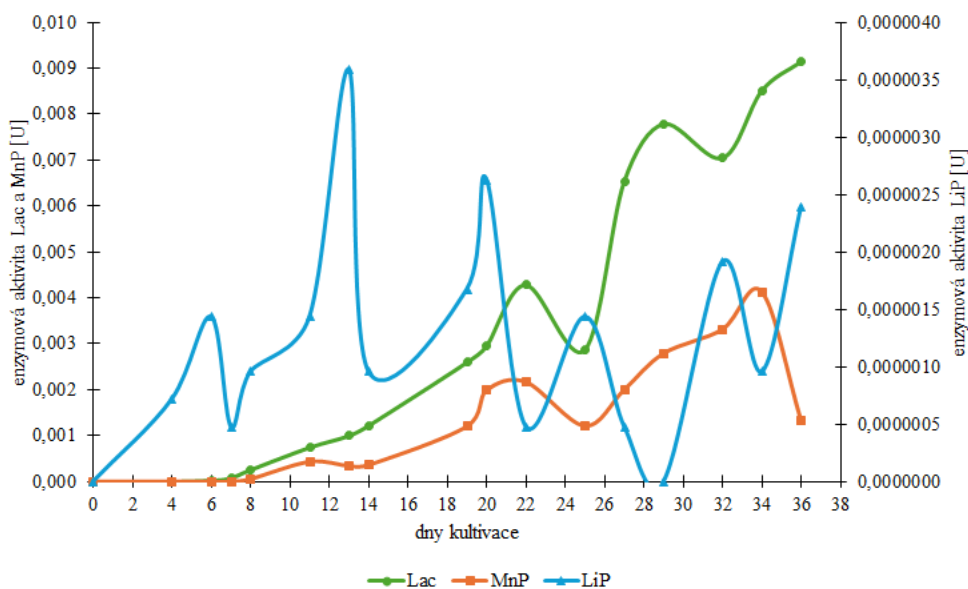


Graf 9: Srovnání produkce lignolytických enzymů vybranými kmeny hub

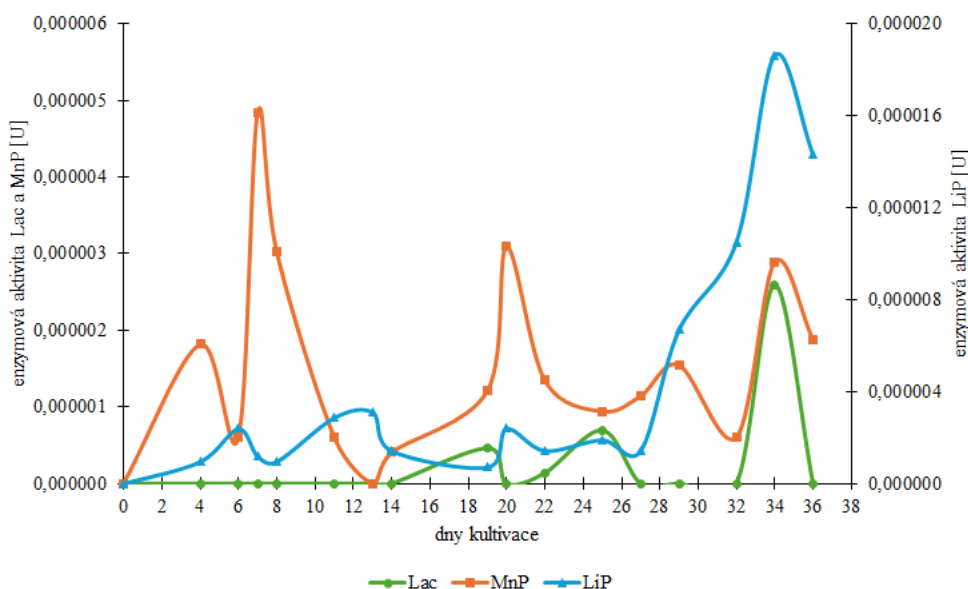
Z grafu 9, který porovnává maximální aktivity jednotlivých lignolytických enzymů produkovaných vybranými druhy hub bílé hniloby, je patrná dominantní aktivita lakázy a mangan peroxidázy produkované *Trametes versicolor*, srovnatelnou enzymovou aktivitu vykazují oba druhy v případě lignin peroxidázy. Na základě těchto srovnání lze říci, že vhodnějším druhem pro produkci lignolytických enzymů je *Trametes versicolor*, o níž se mimo jiné zmiňují i ve studii Montoya a kol. [11] jako o nejefektivnějším zástupci z řad basidiomycetů pro selektivní delignifikaci.

3.2.4 Stanovení aktivit lignolytických enzymů na odpadním médiu

Po optimalizaci produkce na živných médiích byla vyzkoušena produkce enzymů na odpadním substrátu. Byla zkoumána aktivita vybraných enzymů submerzní kultivací *T. versicolor* na pšeničných otrubách, a to ve dvou variantách – sterilovaných otrubách (SO) a nesterilovaných otrubách (NO). Příprava a postup experimentu je zmíněna v kapitolách 2.6.2.2, 2.6.2.3 a 2.7.



Graf 10: Aktivita lignolytických enzymů při kultivaci *T. versicolor* na SO



Graf 11: Aktivita lignolytických enzymů při kultivaci *T. versicolor* na NO

Z grafu 10, jež zobrazuje aktivity enzymů produkovaných na sterilních pšeničných otrubách, je patrný okamžitý nástup aktivity LiP. Tento trend byl pozorován a popsán také v článku publikovaného H. E. Schoemaker a kol. [30]. LiP v prostředí lignocelulózových materiálů sehrává klíčovou roli v přípravě vhodného prostředí pro aktivitu dalších enzymů – Lac a MnP. LiP oxidací ligninu tvoří aryl-kationtové radikály, které dále mohou využít Lac a MnP. [30] Postupně se začínají zvyšovat aktivity i ostatních enzymů, které dosahují svých maximálních aktivit 34. a 36. den kultivace.

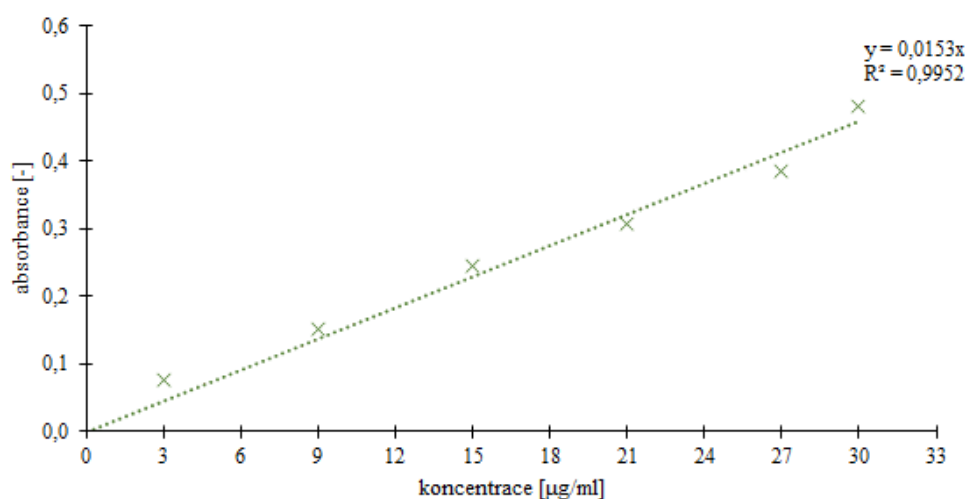
Na grafu 11 je zobrazena aktivita enzymů produkovaných na nesterilních pšeničných otrubách. Ve srovnání aktivitami naměřenými na sterilních otrubách (graf 10) je zřejmá mnohem nižší enzymová aktivita LiP i MnP a prakticky absence aktivity Lac. Tuto skutečnost lze vysvětlit možnou kontaminací pšeničných otrub, která mohla vzniknout z důvodu použití nesterilního materiálu.

3.3 Stanovení celkového obsahu extracelulárních proteinů

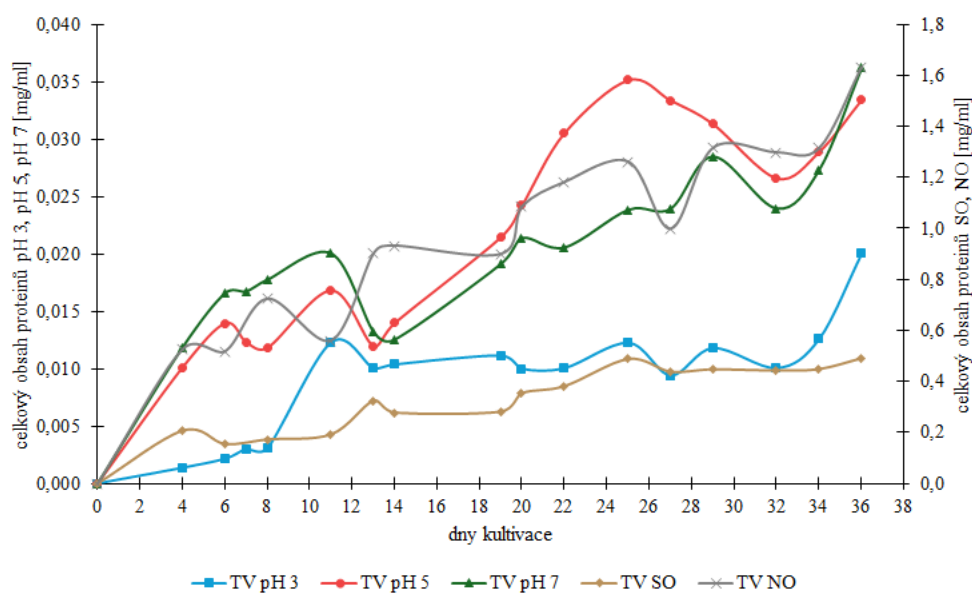
Stanovení celkového obsahu extracelulárních proteinů bylo provedeno podle popisu v kapitole 2.7.3 a 2.7.4. u vybraných druhů hub bílé hniloby *Trametes versicolor* CCBAS 1838 a *Irpex lacteus* CCBAS 196. Závislost změny koncentrace extracelulárních proteinů byla vztažena na mililitr supernatantu vzorku. Naměřené hodnoty byly vyneseny do grafů a obsah proteinů včetně odchylek byl zpracován do tabulek; tabulky jsou pro přehlednost uvedeny v příloze II.

3.3.1 Stanovení celkového obsahu extracelulárních bílkovin metodou Bradfordové

U jednotlivých odběrů během kultivace byl stanoven obsah celkových proteinů pomocí metody Bradfordové podle postupu uvedeného v kapitole 2.7.3. Pro výpočet celkového obsahu extracelulárních proteinů byla použita rovnice kalibrační křivky zobrazené v grafu 12.



Graf 12: Kalibrační křivka metody Bradfordové

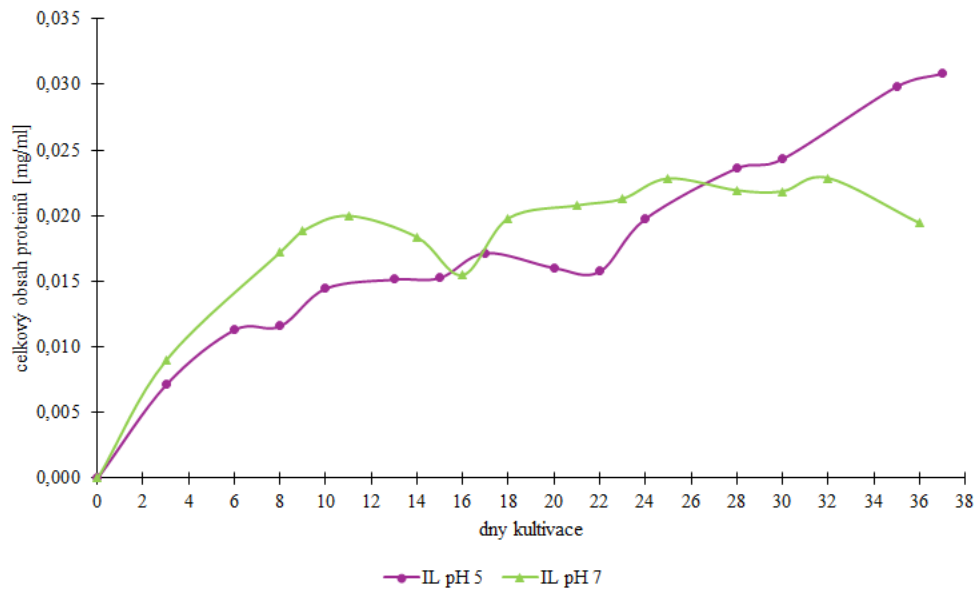


Graf 13: Obsah celkových extracelulárních proteinů produkovaných *T. versicolor* stanovených metodou Bradfordové

Graf 13 porovnává celkový obsah extracelulárních proteinů produkovaných *T. versicolor*. Obsah stanovených proteinů *T. versicolor* kultivované na odpadních substrátech SO a NO byl záměrně vynesena na vedlejší osu, neboť na hlavní ose byl obsah proteinů ostatních vzorků vysokými hodnotami odpadních substrátů upozaděn. Vysoké hodnoty proteinů u sterilního odpadního substrátu jsou pravděpodobně zapříčiněny tepelnou hydrolýzou pšeničných otrub. U nesterilovaných otrub se lze domnívat, že docházelo k postupné extrakci proteinů otrub do roztoku.

V kulturačních médiích o různém pH byl naměřen nejvyšší obsah celkových extracelulárních proteinů $0,035 \pm 0,006$ mg/ml v prostředí pH 5 25. den kultivace. U všech podmínek pH dochází 32. den kultivace k poklesu celkového obsahu proteinů; tento pokles pravděpodobně může korelovat s poklesem aktivity všech lignolytických enzymů (viz graf 3, graf 4 a graf 5).

Porovnání produkce extracelulárních proteinů houbou *Irpex lacteus* v prostředí pH 5 a pH 7 představuje graf 14, z něhož je patrný podobný trend produkce proteinů pro obě prostředí pH kulturačního média. V prostředí s pH 5 se obsah proteinů během experimentu prakticky neustále zvyšuje, s výjimkou období mezi 17. a 22. dnem, kdy došlo k mírnému poklesu. U pH 7 byl obdobný pokles zaznamenán mezi 11. a 16. dnem kultivace. Od přibližně 27. dne kultivace se v prostředí s pH 7 obsah celkových proteinů stabilizuje a od 32. dne dochází k výraznému poklesu. Na rozdíl od prostředí s pH 5, kde ke konci kultivace k poklesu nedochází a trend rostoucího obsahu extracelulárních bílkovin pokračuje až do maximální naměřené hodnoty $0,03 \pm 0,02$ mg/ml.

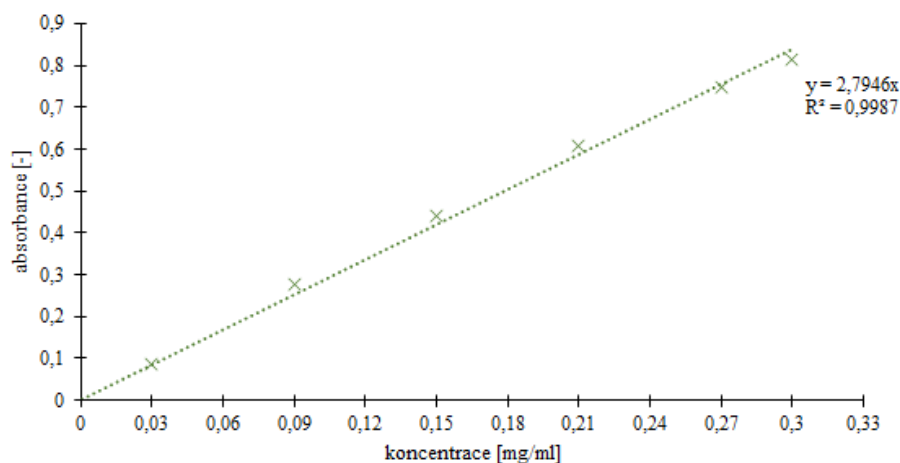


Graf 14: Obsah celkových extracelulárních proteinů produkovaných *I. lacteus* stanovených metodou Bradfordové

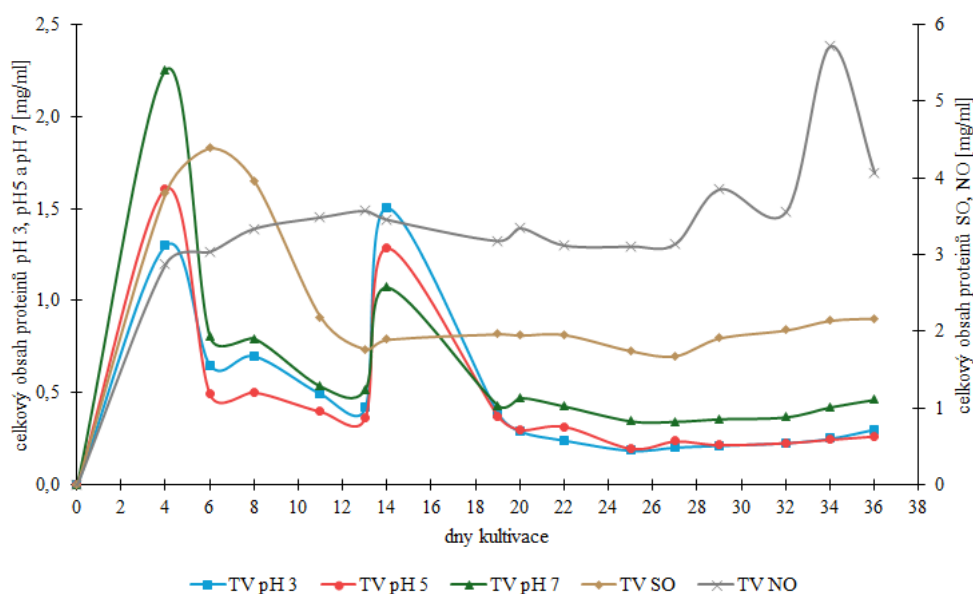
Srovnání obsahů extracelulárních bílkovin během kultivací hub *T. versicolor* a *I. lacteus* při pH 5 a pH 7 ukázalo, že produkce proteinů je pro oba kmeny bílé hniloby velmi podobná. Výraznější rozdíl byl pozorován pouze v případě kultivace *T. versicolor* při pH 5, kde byl při odběru 25. den vyšší obsah bílkovin než u ostatních vzorků ($0,035 \pm 0,006$ mg/ml). Téhož dne bylo pro *I. lacteus* kultivovaný v prostředí pH 7 naměřeno $0,0228 \pm 0,0009$ mg/ml celkových extracelulárních proteinů. Porovnáním enzymových aktivit s obsahem celkových proteinů produkovaných při pH 5 nebyla nalezena žádná korelace. Maximální aktivity enzymů Lac a LiP pro pH 5 bylo dosaženo již 20. den kultivace a pro MnP až 27. den kultivace.

3.3.2 Stanovení celkového obsahu extracelulárních bílkovin metodou Hartree-Lowryho

U jednotlivých odběrů během kultivace byl stanován obsah celkových proteinů pomocí metody Hartree-Lowryho podle postupu uvedeného v kapitole 2.7.4. Pro výpočet celkového obsahu proteinů byla použita rovnice kalibrační křivky zobrazené v grafu 15.



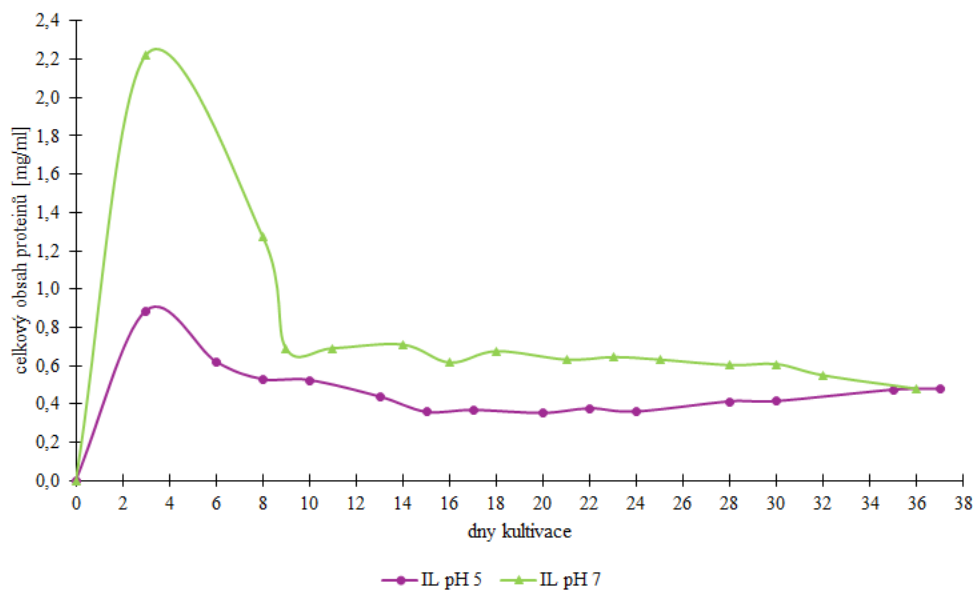
Graf 15: Kalibrační křivka metody Hartree-Lowryho



Graf 16: Obsah celkových extracelulárních proteinů produkovaných *T. versicolor* stanovených metodou Hartree-Lowryho

V grafu 16 je zobrazeno porovnání celkových obsahů extracelulárních proteinů produkovaných *T. versicolor*. Nejvyšších hodnot celkových proteinů je dosaženo u vzorků kultivovaných na odpadním substrátu. Stanovení je však do značné míry ovlivněno hydrolyzou otrubových proteinů nebo jejich pravděpodobnou postupnou extrakcí do roztoku.

Pro všechna kultivační média o různých hodnotách pH je z grafu patrný prudký nárůst obsahu proteinů již 4. den od inokulace, kdy také pH 5 a pH 7 dosahuje svého maxima. V prostředí pH 5 bylo dosaženo maximálního obsahu celkových proteinů $1,6 \pm 0,1$ mg/ml a v prostředí pH 7 hodnoty dosahovaly $2,25 \pm 0,02$ mg/ml – tento pík by mohl korelovat s vysokou aktivitou LiP, která 4. den kultivace dosahovala svého maxima $(1,2 \pm 0,4) \cdot 10^{-5}$ U. V prostředí pH 3 je dosaženo maximálního obsahu extracelulárních proteinů až 14. den kultivace, kdy také u ostatních médií dochází k výraznému nárůstu. Od 14. dne kultivace vykazují data stabilní obsah proteinů, který mírně kolísá.



Graf 17: Obsah celkových extracelulárních proteinů produkovaných *I. lacteus* stanovených metodou Hartree-Lowryho

Na grafu 17 je porovnávána produkce extracelulárních proteinů u vzorků *I. lacteus* kultivovaných při pH 5 a pH 7. U obou vzorků je 3. den po inokulaci pozorován prudký nárůst obsahu extracelulárních proteinů, jejichž hodnota zároveň odpovídá maximu obsahu celkových extracelulárních proteinů; pro pH 5 byl naměřen obsah $0,89 \pm 0,06$ mg/ml a pro pH 7 obsah $2,2 \pm 0,2$ mg/ml. Tyto píky však nekorelují s aktivitami lignolytických enzymů, které svých maxim dosahují až později.

Srovnání obsahů extracelulárních bílkovin během kultivací hub *T. versicolor* a *I. lacteus* při pH 5 a pH 7 ukázalo, že produkce proteinů je pro oba kmeny bílé hniloby velmi podobná i v případě stanovení proteinů metodou Hartree-Lowryho. Průběh v čase je pro všechny 4 vzorky velmi podobný, obsahem proteinů se však liší i více než dvojnásobně, např. obsah proteinů ve vzorku *I. lacteus* kultivovaného při pH 5 je 3. den kultivace více než 2x nižší oproti vzorku kultivovanému při pH 7.

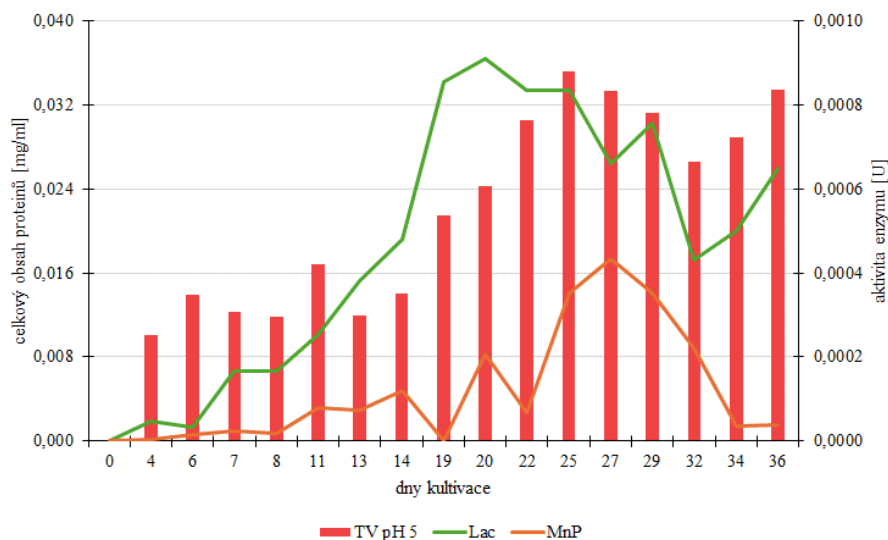
Výsledky metod stanovení celkového obsahu proteinů se poměrně liší. Tato skutečnost může být způsobena interferencemi látek, které jsou vybranými kmeny hub produkovány či metabolizovány a vyskytují se v kultivačním médiu.

Za přesnější výsledky lze považovat ty, které byly naměřeny metodou podle Bradfordové. Činidlo Bradfordové je velmi přesné při stanovování globulárních proteinů (např. BSA), mezi něž se lignolytické enzymy také řadí. Metoda Bradfordové vykazuje minimální interference se sodnými či draselnými ionty a zásadní vliv na stanovení nemají ani sacharidy – Marion M. Bradford [31] zmiňuje konkrétně sacharózu. Metoda Hartree-Lowryho není pro stanovení celkového obsahu proteinů příliš vhodná, neboť na základě své nízké specifity interferuje s řadou nežádoucích látek – především se sacharidy, fenoly, puriny, hydraziny, salicyláty, histaminem a volnými aminokyselinami (např. glycinem, tyrosinem, tryptofanem a cysteinem). [32][33][34][35]

3.4 Porovnání nárůstu celkového obsahu extracelulárních proteinů s aktivitami enzymů

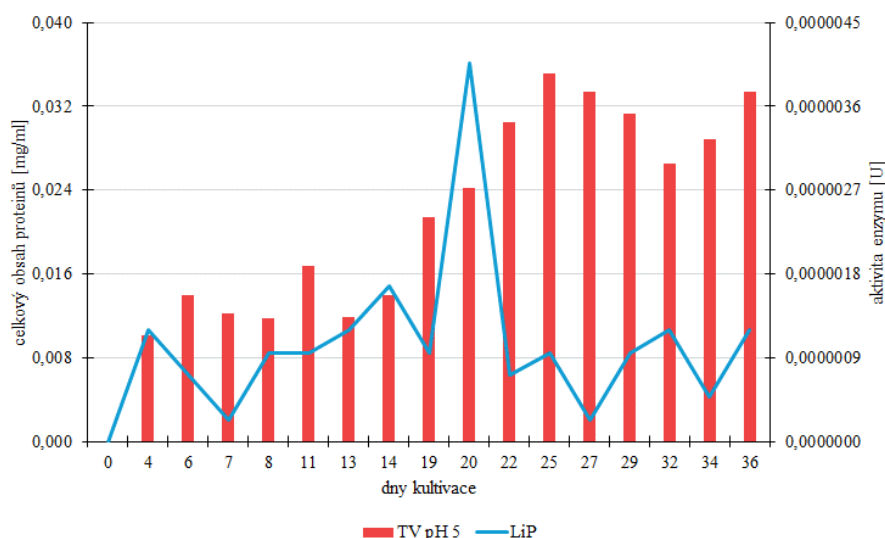
Bylo provedeno porovnání trendu nárůstu celkového obsahu extracelulárních proteinů s aktivitami jednotlivých enzymů. K porovnání byla vybrána pH kultivace *T. versicolor* i *I. lacteus*, při nichž bylo dosaženo nejvyšších aktivit enzymů.

Jak bylo předpokládáno mezi celkovým obsahem proteinů a enzymovými aktivitami byla korelace, která však není patrná u všech stanovení. Jak můžete vidět na grafech 18, 19, 20 a 21, zvyšování enzymové aktivity se stejným nebo velmi podobným trendem propisuje do celkového obsahu extracelulárních proteinů.



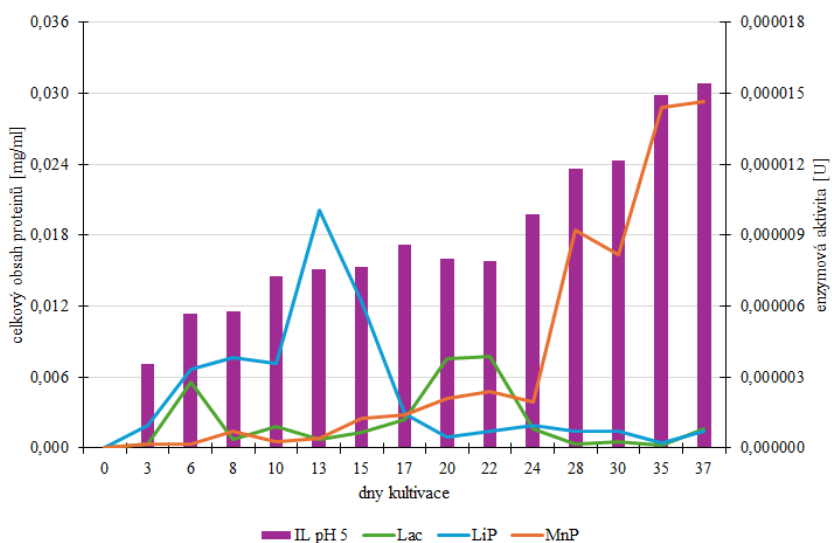
Graf 18: Trend korelace celkového obsahu extracelulárních proteinů (stanovených metodou Bradfordové) a enzymové aktivity Lac a MnP produkovaných *T. versicolor* při pH 5

Na grafu 18 je porovnáván trend korelace celkového obsahu extracelulárních proteinů *T. versicolor* produkovaných v prostředí o pH 5 a aktivity Lac a MnP při téže pH. Aktivita LiP byla pro přehlednost zpracována samostatně do grafu 19, neboť oproti zbylým dvěma enzymům byly její naměřené aktivity velice nízké.



Graf 19: Trend korelace celkového obsahu extracelulárních proteinů (stanovených metodou Bradfordové) a enzymové aktivity LiP produkované *T. versicolor* při pH 5

Kultivací *I. lacteus* při pH 5 i pH 7 byly aktivity produkovaných lignolytických enzymů srovnatelné; k porovnání trendu korelace bylo tedy vybráno prostředí pH 5, u něhož bylo dosaženo vyšších aktivit lignin peroxidázy i mangan peroxidázy, oproti pH 7, která naopak dosahovala vyšších hodnot enzymové aktivity v případě lakázy.



Graf 20: Trend korelace celkového obsahu extracelulárních proteinů (stanovených metodou Bradfordové) a enzymové aktivity Lac, LiP a MnP produkovaných *I. lacteus* při pH 5

Na grafu 20 je porovnávána korelace enzymové aktivity lignolytických enzymů produkovaných *I. lacteus*, které se v průběhu kultivace střídají, s celkovým obsahem extracelulárních proteinů. Mezi 10. a 15. dnem kultivace lze pozorovat podobný vývojový trend sledovaných veličin pro LiP. Od 17. dne dochází k útlumu aktivity LiP, a aktivitu, ačkoli ve srovnání s ostatními enzymy velmi malou, vykazuje Lac. Po 24. dni kultivace dominuje svou aktivitou MnP a stejným trendem narůstá i celkový obsah extracelulárních proteinů.

4 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo studium produkce lignolytických enzymů vybranými kmeny hub bílé hniloby a optimalizace podmínek pro produkci enzymů. Pro produkci byly vybrány kmeny *Trametes versicolor* CCBAS 1383 a *Irpex lacteus* CCBAS 196. Výsledky ukázaly, že *T. versicolor* je vhodnějším kmenem pro produkci lignolytických enzymů díky vyšší a stabilnější enzymové aktivitě, zejména lakázy, v porovnání s *I. lacteus*.

Bylo zjištěno, že maximální aktivita Lac produkovaná *T. versicolor* $(91 \pm 2) \cdot 10^{-5}$ U byla dosažena kultivací při pH 5, zatímco u *I. lacteus* byla maximální aktivita výrazně nižší $(13 \pm 4) \cdot 10^{-7}$ U a byla dosažena kultivací houby při pH 7. U LiP byly naměřené aktivity podobné pro oba zvolené producenty. V případě *T. versicolor* dosahovala maximálních hodnot $(1,2 \pm 0,4) \cdot 10^{-5}$ U kultivací při pH 7 a *I. lacteus* vykazoval maximální aktivitu $(1,00 \pm 0,35) \cdot 10^{-5}$ U kultivací při pH 5. Aktivita LiP *T. versicolor* vykazuje velmi dynamický průběh enzymové aktivity v průběhu kultivace, oproti tomu LiP produkovaná *I. lacteus* má jediný výrazný vrchol následovaný poklesem aktivity. Lze se domnívat, že dynamický průběh aktivity může být spojen s tvorbou izoenzymů. MnP vykazovala vyšší aktivity u *T. versicolor* než u *I. lacteus* bez ohledu na pH prostředí. U *T. versicolor* nabývá maximální aktivity $(433 \pm 117) \cdot 10^{-6}$ U při pH 5, rovněž u *I. lacteus* dosahuje maximální aktivity při tomto pH $(1465 \pm 982) \cdot 10^{-8}$ U. Z výsledků vyplývá, že optimální pH pro produkci vybraných enzymů pomocí *T. versicolor* bylo u Lac a MnP pH 5 a u LiP pH 7. V případě *I. lacteus* to bylo u Lac pH 7 a u LiP a MnP pH 5.

Další část práce byla zaměřena na produkci lignolytických enzymů pomocí *T. versicolor* kultivované na odpadním substrátu. Bylo zjištěno, že sterilizace substrátu je klíčová pro dosažení vyšších enzymových aktivit, což však představuje zvýšení nákladů v praktickém využití. Maximální aktivita Lac z prostředí sterilních otrub činila $(91 \pm 5) \cdot 10^{-4}$ U, u nesterilních otrub byla naměřena $(26 \pm 6) \cdot 10^{-7}$ U. LiP sterilních otrub dosahovala maximální hodnoty $(3,6 \pm 0,9) \cdot 10^{-6}$ U a nesterilních otrub $(46 \pm 143) \cdot 10^{-7}$ U. MnP sterilních otrub dosahovala své maximální aktivity $(413 \pm 30) \cdot 10^{-5}$ U, oproti tomu u nesterilních otrub byla naměřena $(4,8 \pm 0,8) \cdot 10^{-6}$ U.

Mimo jiné byl průběžně zkoumán celkový obsah extracelulárních proteinů obsažených v kultivačním médiu, měřený metodou Bradfordové a Hartree-Lowryho. Celkový obsah proteinů vykazoval částečnou korelaci s enzymovými aktivitami. Zvýšená enzymová aktivita se odrazila ve zvýšeném obsahu extracelulárních proteinů.

Pro vybrané kmeny (*T. versicolor* a *I. lacteus*) byly pro různá pH prostředí sestaveny růstové křivky, aby bylo zjištěno optimální pH růstu. Růstové křivky byly stanovovány gravimetricky jako závislost množství biomasy v čase. *T. versicolor* vykazovala nejvyšší nárůst biomasy kultivací v prostředí pH 5. U *I. lacteus* byl nárůst biomasy při obou sledovaných pH velmi podobný, avšak vyššího nárůstu biomasy bylo dosaženo při pH 7.

Závěrem lze konstatovat, že v této práci byly získány důležité poznatky o optimálních podmínkách pro produkci lignolytických enzymů a vhodných kmenech hub bílé hniloby, které mohou být dále využity jako podklad pro navazující diplomovou práci. V té by bylo možné zaměřit se na praktické průmyslové využití těchto enzymů, zejména jejich schopnosti biodegradace a remediace organopolutantů.

5 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] SVOBODOVÁ, Kateřina a ŠUŠLA, Martin. Lignolytické enzymy jako účinné nástroje pro biodegradaci obtížně rozložitelných organopolutantů. In: Chemické listy. 100. Praha, 2006, s. 889-895.
- [2] PAUL, Manish; PANDEY, Niteesh Kumar; BANERJEE, Ayan; SHROTI, Gireesh Kumar; TOMER, Preeti et al. An insight into omics analysis and metabolic pathway engineering of lignin-degrading enzymes for enhanced lignin valorization. Online. *Bioresource Technology*. 2023, roč. 379. ISSN 0960-8524. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129045>. [cit. 2024-05-19].
- [3] LATIF, Waqas; CINIGLIA, Claudia; IOVINELLA, Manuela; SHAFIQ, Muhammad a PAPA, Stefania. Role of White Rot Fungi in Industrial Wastewater Treatment: A Review. Online. *Appl. Sci.: Novel Technologies for Wastewater Treatment and Reuse*. 2023, č. 14: 8318. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/app13148318>. [cit. 2024-05-06].
- [4] BAUTISTA-ZAMUDIO, Paula Andrea; FLÓREZ-RESTREPO, María Alejandra; LÓPEZ-LEGARDA, Xiomara; MONROY-GIRALDO, Leidy Carolina a SEGURA-SÁNCHEZ, Freimar. Biodegradation of plastics by white-rot fungi: A review. Online. *Science of The Total Environment*. Roč. 901. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969723045758?via%3Dihub>. [cit. 2024-05-19].
- [5] ROSYPAL, Stanislav a JEGOROV, Alexandr. *Nový přehled biologie*. Praha: Scientia, 2003. ISBN 978-80-86960-23-4.
- [6] Troudnatec kopytovitý. Online. In: ČERMÁK, Petr; PALOVČÍKOVÁ, Dagmar; BERÁNEK, Jakub a MARTINEK, Petr. MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ. ATLAS POŠKOZENÍ DŘEVIN LESNICKÉ A DŘEVAŘSKÉ FAKULTY MENDELOVY UNIVERZITY V BRNĚ. Dostupné z: <https://rumex.mendelu.cz/atlasposkozenidrevin/index.php/troudnatec-kopytovity/>. [cit. 2023-11-05].
- [7] RYPÁČEK, Vladimír. *Biologie dřevokazných hub*. Praha: Nakladatelství České akademie věd, 1957.
- [8] GABRIEL, Jiří. Úvod do experimentální mykologie. Texty k přednášce. Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Praha: Přírodovědná fakulta, Univerzita Karlova, 2021.
- [9] TRACHTOVÁ, Štěpánka. Kultivace mikroorganismů, růstový výtěžek, rozmnožování, dynamika růstu. *Mikrobiologie*. Fakulta chemická, VUT v Brně.
- [10] SOCHA, Radomír a JEGOROV, Alexandr. *Encyklopedie léčivých hub*. Praha: Academia, 2014. ISBN 978-80-200-2312-4.
- [11] MONTOYA, Sandra; PATIÑO, Alejandra a SÁNCHEZ, Óscar J. Production of Lignocellulolytic Enzymes and Biomass of *Trametes versicolor* from Agro-Industrial Residues in a Novel Fixed-Bed Bioreactor with Natural Convection and Forced Aeration at Pilot Scale. Online. *Novel Processes for Development of Fermentation-Based Products*. Article 9(2), 397. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/pr9020397>. [cit. 2024-05-06].

- [12] OHM, Robin A.; RILEY, Robert; SALAMOV, Asaf; MIN, Byoungnam; CHOI, In-Geol et al. Genomics of wood-degrading fungi. Online. In: Fungal Genetics and Biology. 2014, s. 82-90. ISSN 10871845. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.05.001>. [cit. 2024-01-13].
- [13] ABD EL-GHANY, Tarek M. a EL-SHEIKH, Hussein Hosny (ed.). *Mycology*. Foster City, USA: OMICS Group eBooks, 2016.
- [14] VODRÁŽKA, Zdeněk; RAUCH, Pavel a KÁŠ, Jan. *Enzymologie*. Vyd. 3. přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1998. ISBN 80-708-0330-4.
- [15] KRÁLOVÁ, Blanka. *Bioanalytické metody*. 3., přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001. ISBN 978-807080-449-3.
- [16] KOOLMAN, Jan a RÖHM, Klaus-Heinrich. *Color atlas of biochemistry*. 3rd ed. Thieme flexibook. Stuttgart: Thieme, c2013. ISBN 978-3-13-169693-9.
- [17] SKAGSETH, Susann. *Site-directed mutagenesis of the metallo- β -lactamase VIM-7 from the opportunistic human pathogenic bacteria Pseudomonas aeruginosa*. Online, Master Thesis in Chemistry. Tromsø: University of Tromsø, 2012. Dostupné z: <https://munin.uit.no/bitstream/handle/10037/4377/thesis.pdf?sequence=2&isAllowed=y>. [cit. 2024-05-05].
- [18] WONG, Dominic W. S. Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes. Online. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2009, roč. 157, č. 2, s. 174-209. ISSN 0273-2289. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8279-z>. [cit. 2024-05-07].
- [19] STOILOVA I., KRASTANOV A., STANCHEV V. Properties of crude laccase from *Trametes versicolor* produced by solid-substrate fermentation. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 1, 2010, 208-215. <https://doi.org/10.4236/abb.2010.13029>
- [20] RUIZ-DUEÑAS, Francisco Javier; MARTÍNEZ, María Jesús a MARTÍNEZ, Angel T. Molecular characterization of a novel peroxidase isolated from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. Online. *Molecular Microbiology*. 2002, roč. 31, č. 1, s. 223-235. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01164.x>. [cit. 2024-05-07].
- [21] ESCARAMBONI, Bruna; GARNICA, Bárbara Castelli; ABE, Mateus Manabu; PALMIERI, Dario Abel; NÚÑEZ, Eutimio Gustavo Fernández et al. Food Waste as a Feedstock for Fungal Biosynthesis of Amylases and Proteases. Online. *Waste and Biomass Valorization*. 2022, č. 13, s. 213-226. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s12649-021-01511-0>. [cit. 2024-05-07].
- [22] GRGAS, Dijana; RUKAVINA, Matea; BEŠLO, Drago; ŠTEFANAC, Tea; CRNEK, Vlado et al. The Bacterial Degradation of Lignin—A Review. Online. *Water*. 2023, roč. 15, č. 1272. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/w15071272>. [cit. 2024-05-07].
- [23] JIANG, Cheng; CHENG, Yi; ZANG, Hailian; CHEN, Xi; WANG, Yue et al. Biodegradation of lignin and the associated degradation pathway by psychrotrophic *Arthrobacter* sp. C2 from the cold region of China. Online. *Cellulose*. 2020, roč. 27, č. 3, s. 1423-1440. ISSN 0969-0239. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02858-3>. [cit. 2024-05-07].

- [24] NIU, Jiayu; LI, Xiufen; QI, Xiguang a REN, Yueping. Pathway analysis of the biodegradation of lignin by *Brevibacillus thermoruber*. Online. *Bioresource Technology*. 2021, roč. 341. ISSN 09608524. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125875>. [cit. 2024-05-07].
- [25] ALAMI, Abdul Hai. *Mechanical Energy Storage for Renewable and Sustainable Energy Resources*. Switzerland: Springer Nature, 2020. ISBN 978-3-030-33787-2.
- [26] LINHARTOVÁ, Lucie. *BIODEGRADACE POLYCHLOROVANÝCH BIFENYLŮ POMOCÍ LIGNOLYTICKÝCH HUB A JEJICH ENZYMŮ*. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, 2010.
- [27] KÁŠ, Jan; KODÍČEK, Milan a VALENTOVÁ, Olga. *Laboratorní techniky biochemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2005. ISBN 80-7080-586-2.
- [28] VEENA, S S a PANDEY, Meena. Physiological and cultivation requirements of *Trametes versicolor*, a medicinal mushroom to diversify Indian mushroom industry. Online. *The Indian Journal of Agricultural Sciences*. 2012, roč. 82, č. 8, s. 672-5. ISSN 2394-3319. Dostupné z: <https://doi.org/10.56093/ijas.v82i8.23047>. [cit. 2024-05-12].
- [29] NOVOTNÝ, Č.; CAJTHAML, T.; SVOBODOVÁ, K.; ŠUŠLA, M. a ŠAŠEK, V. *Irpex lacteus*, a white-rot fungus with biotechnological potential — review. Online. *Folia Microbiologica*. 2009, roč. 54, č. 5, s. 375-390. ISSN 0015-5632. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12223-009-0053-2>. [cit. 2024-05-18].
- [30] SCHOEMAKER, Hans. E. a PIONTEK, Klaus. On the interaction of lignin peroxidase with lignin. *Pure & Applied Chemistry*. 1996, roč. 68, s. 2089-2096.
- [31] BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Online. *Analytical Biochemistry*. 1976, roč. 72, č. 1-2, s. 248-254. ISSN 0003-2697. Dostupné z: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3). [cit. 2024-05-11].
- [32] TANTRAY, Javeed Ahmad; MANSOOR, Sheikh; WANI, Rasy Fayaz Choh a NISSA, Nighat Un. Protein estimation by Lowry's method. Online. *Basic Life Science Methods*. 2023, s. 65-67. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-443-19174-9.00016-7>. [cit. 2024-05-11].
- [33] LOVRIEN, Rex a MATULIS, Daumantas. Assays for Total Protein. In: *Current Protocols in Protein Science*.
- [34] SOŚNICKA, Agata. White-rot fungi and their lignin modifying enzymes: an effective tool to fight recalcitrant organic pollutants. Online. *EDUKACJA BIOLOGICZNA I ŚRODOWISKOWA*. 2018, roč. 3. Dostupné z: <https://doi.org/10.24131/3247.180301>. [cit. 2024-05-13].
- [35] BONITATI, J.; ELLIOTT, W.B. a MILES, P.G. Interference by carbohydrate and other substances in the estimation of protein with the Folin-Ciocalteu reagent. Online. *Analytical Biochemistry*. 1969, roč. 31, s. 399-404. ISSN 00032697. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(69\)90281-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(69)90281-4). [cit. 2024-05-19].

SEZNAM ZKRATEK

PAU	polycyklické aromatické uhlovodíky
PCB.....	polychlorované bifenyly
HPLC.....	vysokovýkonná kapalinová chromatografie
MnP	mangan peroxidáza
LiP	lignin peroxidáza
Lac	lakáza
CDH.....	cellobiózová dehydrogenáza
VP	verzatilní peroxidázu
PSK.....	Polysaccharide Krestin
EC	Enzyme Commission
NAD ⁺	nikotinamidadenindinukleotid
NADP ⁺	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
FAD	flavinadenindinukleotid
FMN	flavinmononukleotid
SSF	solid state fermentation
PDB	potato dextrose broth
ABTS.....	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonová kys.
DMP	2,6-dimethoxyfenol
EDTA.....	kyselina ethylendiamintetraoctová
BSA	bovine serum albumin, hovězí sérový albumin
ELISA.....	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
<i>T. versicolor</i>	<i>Trametes versicolor</i>
TV	<i>Trametes versicolor</i>
<i>I. lacteus</i>	<i>Irpex lacteus</i>
IL	<i>Irpex lacteus</i>
SO	sterilní otruby
NO	nesterilní otruby

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: <i>Trametes versicolor</i> CCBAS 1383 (vlevo), <i>Irpex lacteus</i> CCBAS 196 (vpravo).	13
Obrázek 2: Růstová křivka hub [13], převzato a upraveno	14
Obrázek 3: Saturační křivka [17], převzato a upraveno	16
Obrázek 4: Katalytická aktivita LiP [1]	19
Obrázek 5: Katalytický cyklus MnP [1]	20
Obrázek 6: Katalytický cyklus lakázy, převzato a upraveno [18]	22

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Růstová křivka <i>T. versicolor</i> při pH 3, 5 a 7	32
Graf 2: Růstová křivka <i>I. lacteus</i> při pH 5 a 7	32
Graf 3: Aktivita Lac <i>T. versicolor</i>	33
Graf 4: Aktivita LiP <i>T. versicolor</i>	34
Graf 5: Aktivita MnP <i>T. versicolor</i>	34
Graf 6: Aktivita Lac <i>I. lacteus</i>	35
Graf 7: Aktivita LiP <i>I. lacteus</i>	36
Graf 8: Aktivita MnP <i>I. lacteus</i>	36
Graf 9: Srovnání produkce lignolytických enzymů vybranými kmeny hub	37
Graf 10: Aktivita lignolytických enzymů při kultivaci <i>T. versicolor</i> na SO	38
Graf 11: Aktivita lignolytických enzymů při kultivaci <i>T. versicolor</i> na NO	38
Graf 12: Kalibrační křivka metody Bradfordové	39
Graf 13: Obsah celkových extracelulárních proteinů produkovaných <i>T. versicolor</i> stanovených metodou Bradfordové	40
Graf 14: Obsah celkových extracelulárních proteinů produkovaných <i>I. lacteus</i> stanovených metodou Bradfordové	41
Graf 15: Kalibrační křivka metody Hartree-Lowryho	42
Graf 16: Obsah celkových extracelulárních proteinů produkovaných <i>T. versicolor</i> stanovených metodou Hartree-Lowryho	42
Graf 17: Obsah celkových extracelulárních proteinů produkovaných <i>I. lacteus</i> stanovených metodou Hartree-Lowryho	43
Graf 18: Trend korelace celkového obsahu extracelulárních proteinů (stanovených metodou Bradfordové) a enzymové aktivity Lac a MnP produkovaných <i>T. versicolor</i> při pH 5	44
Graf 19: Trend korelace celkového obsahu extracelulárních proteinů (stanovených metodou Bradfordové) a enzymové aktivity LiP produkované <i>T. versicolor</i> při pH 5	45
Graf 20: Trend korelace celkového obsahu extracelulárních proteinů (stanovených metodou Bradfordové) a enzymové aktivity Lac, LiP a MnP produkovaných <i>I. lacteus</i> při pH 5	45

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha I – Stanovení aktivit lignolytických enzymů

Příloha II – Stanovení celkového obsahu extracelulárních proteinů

Příloha I – Stanovení aktivit lignolytických enzymů

Příloha I - Tabulka 1: Enzymová aktivita Lac T. versicolor

den kultivace	EA [U]				
	pH 3	pH 5	pH 7	SO	NO
4	$(6 \pm 2) \cdot 10^{-5}$	$(4,6 \pm 0,1) \cdot 10^{-5}$	$(10,6 \pm 0,5) \cdot 10^{-5}$	0	0
6	$(2,7 \pm 0,4) \cdot 10^{-5}$	$(3,3 \pm 0,4) \cdot 10^{-5}$	$(33 \pm 6) \cdot 10^{-5}$	$(0,27 \pm 0,04) \cdot 10^{-4}$	0
7	$(1,93 \pm 0,06) \cdot 10^{-5}$	$(16,5 \pm 0,4) \cdot 10^{-5}$	$(32,8 \pm 0,9) \cdot 10^{-5}$	$(0,76 \pm 0,01) \cdot 10^{-4}$	0
8	$(3,0 \pm 0,3) \cdot 10^{-5}$	$(16,6 \pm 0,3) \cdot 10^{-5}$	$(37 \pm 2) \cdot 10^{-5}$	$(2,56 \pm 0,06) \cdot 10^{-4}$	0
11	$(3,0 \pm 0,2) \cdot 10^{-5}$	$(25 \pm 2) \cdot 10^{-5}$	$(29 \pm 2) \cdot 10^{-5}$	$(7,4 \pm 0,3) \cdot 10^{-4}$	0
13	$(3,7 \pm 0,2) \cdot 10^{-5}$	$(38 \pm 2) \cdot 10^{-5}$	$(23 \pm 2) \cdot 10^{-5}$	$(10 \pm 0,4) \cdot 10^{-4}$	0
14	$(4,2 \pm 0,3) \cdot 10^{-5}$	$(48 \pm 2) \cdot 10^{-5}$	$(18 \pm 2) \cdot 10^{-5}$	$(12 \pm 1) \cdot 10^{-4}$	0
19	$(7,2 \pm 0,2) \cdot 10^{-5}$	$(85 \pm 3) \cdot 10^{-5}$	$(40 \pm 2) \cdot 10^{-5}$	$(25,9 \pm 0,4) \cdot 10^{-4}$	$(5 \pm 2) \cdot 10^{-7}$
20	$(7,6 \pm 0,1) \cdot 10^{-5}$	$(91 \pm 2) \cdot 10^{-5}$	$(35 \pm 2) \cdot 10^{-5}$	$(29,5 \pm 0,8) \cdot 10^{-4}$	0
22	$(7,5 \pm 0,3) \cdot 10^{-5}$	$(83 \pm 3) \cdot 10^{-5}$	$(28 \pm 3) \cdot 10^{-5}$	$(43 \pm 2) \cdot 10^{-4}$	$(1,4 \pm 0,5) \cdot 10^{-7}$
25	$(7,5 \pm 0,5) \cdot 10^{-5}$	$(83 \pm 3) \cdot 10^{-5}$	$(35 \pm 4) \cdot 10^{-5}$	$(29 \pm 1) \cdot 10^{-4}$	$(7 \pm 2) \cdot 10^{-7}$
27	$(9,0 \pm 0,4) \cdot 10^{-5}$	$(66 \pm 3) \cdot 10^{-5}$	$(47 \pm 4) \cdot 10^{-5}$	$(65 \pm 5) \cdot 10^{-4}$	0
29	$(8,2 \pm 0,8) \cdot 10^{-5}$	$(76 \pm 3) \cdot 10^{-5}$	$(52 \pm 4) \cdot 10^{-5}$	$(78 \pm 5) \cdot 10^{-4}$	0
32	$(5,8 \pm 0,8) \cdot 10^{-5}$	$(43 \pm 2) \cdot 10^{-5}$	$(40 \pm 3) \cdot 10^{-5}$	$(70 \pm 4) \cdot 10^{-4}$	0
34	$(14,7 \pm 0,6) \cdot 10^{-5}$	$(50 \pm 2) \cdot 10^{-5}$	$(50 \pm 4) \cdot 10^{-5}$	$(85 \pm 4) \cdot 10^{-4}$	$(26 \pm 6) \cdot 10^{-7}$
36	$(7,0 \pm 0,6) \cdot 10^{-5}$	$(65 \pm 6) \cdot 10^{-5}$	$(67 \pm 3) \cdot 10^{-5}$	$(91 \pm 5) \cdot 10^{-4}$	0

Příloha I - Tabulka 2: Aktivita LiP T. versicolor

den kultivace	EA [U]				
	pH 3	pH 5	pH 7	SO	NO
4	$(1,4 \pm 0,4) \cdot 10^{-6}$	$(1,2 \pm 0,3) \cdot 10^{-6}$	$(1,2 \pm 0,4) \cdot 10^{-5}$	$(0,7 \pm 0,2) \cdot 10^{-6}$	$(3 \pm 10) \cdot 10^{-7}$
6	$(1,2 \pm 0,3) \cdot 10^{-6}$	$(0,7 \pm 0,2) \cdot 10^{-6}$	$(0,3 \pm 0,1) \cdot 10^{-5}$	$(1,4 \pm 0,3) \cdot 10^{-6}$	$(8 \pm 24) \cdot 10^{-7}$
7	$(0,5 \pm 0,2) \cdot 10^{-6}$	$(0,2 \pm 0,1) \cdot 10^{-6}$	$(0,8 \pm 0,3) \cdot 10^{-5}$	$(0,5 \pm 0,2) \cdot 10^{-6}$	$(4 \pm 12) \cdot 10^{-7}$
8	$(4 \pm 1) \cdot 10^{-6}$	$(1,0 \pm 0,3) \cdot 10^{-6}$	$(0,8 \pm 0,3) \cdot 10^{-5}$	$(1,0 \pm 0,3) \cdot 10^{-6}$	$(4 \pm 10) \cdot 10^{-7}$
11	$(1,2 \pm 0,4) \cdot 10^{-6}$	$(1,0 \pm 0,3) \cdot 10^{-6}$	$(0,5 \pm 0,1) \cdot 10^{-5}$	$(1,4 \pm 0,2) \cdot 10^{-6}$	$(7 \pm 29) \cdot 10^{-7}$
13	$(2,2 \pm 0,7) \cdot 10^{-6}$	$(1,2 \pm 0,4) \cdot 10^{-6}$	$(0,14 \pm 0,05) \cdot 10^{-5}$	$(3,6 \pm 0,9) \cdot 10^{-6}$	$(3 \pm 31) \cdot 10^{-7}$
14	$(1,0 \pm 0,3) \cdot 10^{-6}$	$(1,7 \pm 0,4) \cdot 10^{-6}$	$(0,10 \pm 0,03) \cdot 10^{-5}$	$(1,0 \pm 0,2) \cdot 10^{-6}$	$(3 \pm 14) \cdot 10^{-7}$
19	$(1,4 \pm 0,5) \cdot 10^{-6}$	$(1,0 \pm 0,3) \cdot 10^{-6}$	$(1,2 \pm 0,4) \cdot 10^{-5}$	$(1,7 \pm 0,5) \cdot 10^{-6}$	$(2 \pm 7) \cdot 10^{-7}$
20	$(1,2 \pm 0,4) \cdot 10^{-6}$	$(4 \pm 1) \cdot 10^{-6}$	$(0,6 \pm 0,2) \cdot 10^{-5}$	$(2,6 \pm 0,9) \cdot 10^{-6}$	$(5 \pm 24) \cdot 10^{-7}$
22	$(4 \pm 1) \cdot 10^{-6}$	$(0,7 \pm 0,2) \cdot 10^{-6}$	$(1,0 \pm 0,3) \cdot 10^{-5}$	$(0,5 \pm 0,2) \cdot 10^{-6}$	$(5 \pm 14) \cdot 10^{-7}$
25	$(5 \pm 2) \cdot 10^{-6}$	$(1,0 \pm 0,3) \cdot 10^{-6}$	$(0,8 \pm 0,3) \cdot 10^{-5}$	$(1,4 \pm 0,5) \cdot 10^{-6}$	$(6 \pm 19) \cdot 10^{-7}$
27	$(2,2 \pm 0,7) \cdot 10^{-6}$	$(0,2 \pm 0,1) \cdot 10^{-6}$	$(0,8 \pm 0,3) \cdot 10^{-5}$	$(0,5 \pm 0,2) \cdot 10^{-6}$	$(5 \pm 14) \cdot 10^{-7}$
29	$(3,3 \pm 0,9) \cdot 10^{-6}$	$(1,0 \pm 0,2) \cdot 10^{-6}$	$(1,1 \pm 0,4) \cdot 10^{-5}$	0	$(22 \pm 67) \cdot 10^{-7}$
32	$(4 \pm 1) \cdot 10^{-6}$	$(1,2 \pm 0,4) \cdot 10^{-6}$	$(1,0 \pm 0,4) \cdot 10^{-5}$	$(1,9 \pm 0,6) \cdot 10^{-6}$	$(34 \pm 105) \cdot 10^{-7}$
34	$(4 \pm 1) \cdot 10^{-6}$	$(0,5 \pm 0,2) \cdot 10^{-6}$	$(1,1 \pm 0,4) \cdot 10^{-5}$	$(1,0 \pm 0,4) \cdot 10^{-6}$	$(42 \pm 186) \cdot 10^{-7}$
36	$(1,0 \pm 0,3) \cdot 10^{-6}$	$(1,2 \pm 0,1) \cdot 10^{-6}$	$(0,10 \pm 0,03) \cdot 10^{-5}$	$(2,4 \pm 0,8) \cdot 10^{-6}$	$(46 \pm 143) \cdot 10^{-7}$

Příloha I - Tabulka 3: Aktivita MnP *T. versicolor*

den kultivace	EA [U]				
	pH 3	pH 5	pH 7	SO	NO
4	0	$(3 \pm 2) \cdot 10^{-6}$	$(1,0 \pm 1,2) \cdot 10^{-5}$	$(0,007 \pm 0,008) \cdot 10^{-5}$	$(1,8 \pm 0,3) \cdot 10^{-6}$
6	$(1,3 \pm 0,9) \cdot 10^{-6}$	$(15 \pm 6) \cdot 10^{-6}$	$(2,1 \pm 0,3) \cdot 10^{-5}$	$(0,03 \pm 0,10) \cdot 10^{-5}$	$(0,6 \pm 0,2) \cdot 10^{-6}$
7	$(0,5 \pm 0,8) \cdot 10^{-6}$	$(24 \pm 5) \cdot 10^{-6}$	$(3 \pm 1) \cdot 10^{-5}$	0	$(4,8 \pm 0,8) \cdot 10^{-6}$
8	0	$(17 \pm 13) \cdot 10^{-6}$	$(1,6 \pm 0,7) \cdot 10^{-5}$	$(6 \pm 3) \cdot 10^{-5}$	$(3,0 \pm 0,7) \cdot 10^{-6}$
11	$(3 \pm 4) \cdot 10^{-6}$	$(78 \pm 43) \cdot 10^{-6}$	$(6 \pm 3) \cdot 10^{-5}$	$(43 \pm 21) \cdot 10^{-5}$	$(0,6 \pm 0,6) \cdot 10^{-6}$
13	$(0,3 \pm 3,8) \cdot 10^{-6}$	$(75 \pm 60) \cdot 10^{-6}$	$(4 \pm 4) \cdot 10^{-5}$	$(34 \pm 23) \cdot 10^{-5}$	0
14	0	$(120 \pm 81) \cdot 10^{-6}$	$(1 \pm 3) \cdot 10^{-5}$	$(36 \pm 41) \cdot 10^{-5}$	$(0,4 \pm 0,1) \cdot 10^{-6}$
19	$(30 \pm 2) \cdot 10^{-6}$	0	$(4 \pm 5) \cdot 10^{-5}$	$(120 \pm 60) \cdot 10^{-5}$	$(1,2 \pm 0,2) \cdot 10^{-6}$
20	$(21 \pm 12) \cdot 10^{-6}$	$(208 \pm 241) \cdot 10^{-6}$	0	$(198 \pm 26) \cdot 10^{-5}$	$(3,1 \pm 0,8) \cdot 10^{-6}$
22	$(4 \pm 8) \cdot 10^{-6}$	$(67 \pm 82) \cdot 10^{-6}$	$(10 \pm 6) \cdot 10^{-5}$	$(217 \pm 75) \cdot 10^{-5}$	$(1,3 \pm 0,4) \cdot 10^{-6}$
25	$(28,0 \pm 0,4) \cdot 10^{-6}$	$(351 \pm 149) \cdot 10^{-6}$	$(25 \pm 5) \cdot 10^{-5}$	$(121 \pm 93) \cdot 10^{-5}$	$(0,9 \pm 0,3) \cdot 10^{-6}$
27	0	$(433 \pm 117) \cdot 10^{-6}$	$(28 \pm 13) \cdot 10^{-5}$	$(200 \pm 83) \cdot 10^{-5}$	$(1,1 \pm 0,2) \cdot 10^{-6}$
29	$(25 \pm 10) \cdot 10^{-6}$	$(351 \pm 119) \cdot 10^{-6}$	$(29 \pm 2) \cdot 10^{-5}$	$(279 \pm 75) \cdot 10^{-5}$	$(1,5 \pm 0,4) \cdot 10^{-6}$
32	$(53 \pm 5) \cdot 10^{-6}$	$(222 \pm 33) \cdot 10^{-6}$	$(10 \pm 2) \cdot 10^{-5}$	$(331 \pm 34) \cdot 10^{-5}$	$(0,6 \pm 0,2) \cdot 10^{-6}$
34	$(21 \pm 20) \cdot 10^{-6}$	$(36 \pm 73) \cdot 10^{-6}$	$(7 \pm 9) \cdot 10^{-5}$	$(413 \pm 30) \cdot 10^{-5}$	$(2,9 \pm 0,9) \cdot 10^{-6}$
36	$(12 \pm 5) \cdot 10^{-6}$	$(39 \pm 42) \cdot 10^{-6}$	$(23 \pm 2) \cdot 10^{-5}$	$(133 \pm 80) \cdot 10^{-5}$	$(1,9 \pm 0,5) \cdot 10^{-6}$

Příloha I - Tabulka 4: Dílčí stanovení aktivity MnP *T. versicolor* EA(I)

den kultivace	EA [U]				
	pH 3	pH 5	pH 7	SO	NO
4	$(0,67 \pm 0,03) \cdot 10^{-5}$	$(1,4 \pm 0,3) \cdot 10^{-5}$	$(6,25 \pm 0,07) \cdot 10^{-5}$	$(0,020 \pm 0,009) \cdot 10^{-5}$	$(2,0 \pm 0,7) \cdot 10^{-7}$
6	$(1,17 \pm 0,03) \cdot 10^{-5}$	$(6,3 \pm 0,1) \cdot 10^{-5}$	$(5 \pm 2) \cdot 10^{-5}$	$(1,51 \pm 0,07) \cdot 10^{-5}$	$(0,7 \pm 2,0) \cdot 10^{-7}$
7	$(1,15 \pm 0,04) \cdot 10^{-5}$	$(3,3 \pm 0,7) \cdot 10^{-5}$	$(6,6 \pm 0,5) \cdot 10^{-5}$	$(3,7 \pm 0,1) \cdot 10^{-5}$	$(0,7 \pm 0,6) \cdot 10^{-7}$
8	$(1,20 \pm 0,06) \cdot 10^{-5}$	$(2,5 \pm 0,2) \cdot 10^{-5}$	$(5 \pm 1) \cdot 10^{-5}$	$(11,4 \pm 0,9) \cdot 10^{-5}$	$(0,7 \pm 2,1) \cdot 10^{-7}$
11	$(1,2 \pm 0,2) \cdot 10^{-5}$	$(2 \pm 4) \cdot 10^{-5}$	$(1 \pm 4) \cdot 10^{-5}$	$(4 \pm 23) \cdot 10^{-5}$	$(4,0 \pm 0,9) \cdot 10^{-7}$
13	$(1,8 \pm 0,1) \cdot 10^{-5}$	$(10 \pm 3) \cdot 10^{-5}$	$(11 \pm 1) \cdot 10^{-5}$	$(65 \pm 8) \cdot 10^{-5}$	$(0,7 \pm 0,2) \cdot 10^{-7}$
14	$(1,51 \pm 0,07) \cdot 10^{-5}$	$(0,4 \pm 10,3) \cdot 10^{-5}$	$(8,1 \pm 0,7) \cdot 10^{-5}$	$(7 \pm 32) \cdot 10^{-5}$	$(0,7 \pm 0,3) \cdot 10^{-7}$
19	$(2,8 \pm 0,4) \cdot 10^{-5}$	$(18 \pm 17) \cdot 10^{-5}$	$(22,9 \pm 0,8) \cdot 10^{-5}$	$(52 \pm 88) \cdot 10^{-5}$	$(0,7 \pm 2,3) \cdot 10^{-7}$
20	$(4,2 \pm 0,2) \cdot 10^{-5}$	$(53 \pm 2) \cdot 10^{-5}$	$(23,7 \pm 0,3) \cdot 10^{-5}$	$(162 \pm 57) \cdot 10^{-5}$	$(1 \pm 3) \cdot 10^{-7}$
22	$(3,6 \pm 0,3) \cdot 10^{-5}$	$(31 \pm 3) \cdot 10^{-5}$	$(63 \pm 3) \cdot 10^{-5}$	$(87 \pm 117) \cdot 10^{-5}$	$(3 \pm 1) \cdot 10^{-7}$
25	$(1,5 \pm 0,8) \cdot 10^{-5}$	$(12 \pm 7) \cdot 10^{-5}$	$(10 \pm 10) \cdot 10^{-5}$	$(47 \pm 120) \cdot 10^{-5}$	$(3 \pm 2) \cdot 10^{-7}$
27	$(3,0 \pm 0,3) \cdot 10^{-5}$	$(14 \pm 13) \cdot 10^{-5}$	$(5 \pm 15) \cdot 10^{-5}$	$(91 \pm 188) \cdot 10^{-5}$	$(3 \pm 2) \cdot 10^{-7}$
29	$(1,5 \pm 0,8) \cdot 10^{-5}$	$(4 \pm 14) \cdot 10^{-5}$	$(1 \pm 10) \cdot 10^{-5}$	$(42 \pm 152) \cdot 10^{-5}$	$(3 \pm 3) \cdot 10^{-7}$
32	$(3 \pm 1) \cdot 10^{-5}$	$(26 \pm 3) \cdot 10^{-5}$	$(6 \pm 8) \cdot 10^{-5}$	$(65 \pm 172) \cdot 10^{-5}$	$(3 \pm 4) \cdot 10^{-7}$
34	$(3 \pm 1) \cdot 10^{-5}$	$(25 \pm 2) \cdot 10^{-5}$	$(22 \pm 3) \cdot 10^{-5}$	$(208 \pm 156) \cdot 10^{-5}$	$(2 \pm 7) \cdot 10^{-7}$
36	$(0,1 \pm 1,1) \cdot 10^{-5}$	$(6 \pm 8) \cdot 10^{-5}$	$(8 \pm 15) \cdot 10^{-5}$	$(243 \pm 175) \cdot 10^{-5}$	$(1 \pm 6) \cdot 10^{-7}$

Příloha I - Tabulka 5: Dílčí stanovení aktivity MnP *T. versicolor* EA(II)

den kultivace	EA [U]				
	pH 3	pH 5	pH 7	SO	NO
4	$(5,91 \pm 0,09) \cdot 10^{-6}$	$(1,4 \pm 0,2) \cdot 10^{-5}$	$(4 \pm 1) \cdot 10^{-5}$	$(0,027 \pm 0,004) \cdot 10^{-5}$	$(4,3 \pm 0,5) \cdot 10^{-6}$
6	$(7,2 \pm 0,1) \cdot 10^{-6}$	$(2,7 \pm 0,9) \cdot 10^{-5}$	$(5,2 \pm 0,6) \cdot 10^{-5}$	$(1,78 \pm 0,03) \cdot 10^{-5}$	$(0,7 \pm 0,2) \cdot 10^{-6}$
7	$(10,7 \pm 0,8) \cdot 10^{-6}$	$(4 \pm 1) \cdot 10^{-5}$	$(8 \pm 2) \cdot 10^{-5}$	$(4,2 \pm 0,4) \cdot 10^{-5}$	$(8 \pm 1) \cdot 10^{-6}$
8	$(12 \pm 2) \cdot 10^{-6}$	$(4 \pm 1) \cdot 10^{-5}$	$(5,1 \pm 0,9) \cdot 10^{-5}$	$(14 \pm 3) \cdot 10^{-5}$	$(3,3 \pm 0,9) \cdot 10^{-6}$
11	$(18 \pm 4) \cdot 10^{-6}$	$(13 \pm 5) \cdot 10^{-5}$	$(11 \pm 4) \cdot 10^{-5}$	$(66 \pm 23) \cdot 10^{-5}$	$(1,5 \pm 0,2) \cdot 10^{-6}$
13	$(14 \pm 4) \cdot 10^{-6}$	$(18 \pm 6) \cdot 10^{-5}$	$(13 \pm 5) \cdot 10^{-5}$	$(75 \pm 26) \cdot 10^{-5}$	$(7 \pm 2) \cdot 10^{-6}$
14	$(16 \pm 3) \cdot 10^{-6}$	$(24 \pm 9) \cdot 10^{-5}$	$(11 \pm 3) \cdot 10^{-5}$	$(119 \pm 42) \cdot 10^{-5}$	$(0,5 \pm 0,2) \cdot 10^{-6}$
19	$(33 \pm 12) \cdot 10^{-6}$	0	$(19 \pm 7) \cdot 10^{-5}$	$(167 \pm 59) \cdot 10^{-5}$	$(1,4 \pm 0,4) \cdot 10^{-6}$
20	$(41 \pm 14) \cdot 10^{-6}$	$(67 \pm 24) \cdot 10^{-5}$	$(13 \pm 1) \cdot 10^{-5}$	$(258 \pm 91) \cdot 10^{-5}$	$(3,4 \pm 0,9) \cdot 10^{-6}$
22	$(43 \pm 8) \cdot 10^{-6}$	$(35 \pm 8) \cdot 10^{-5}$	$(19 \pm 6) \cdot 10^{-5}$	$(244 \pm 86) \cdot 10^{-5}$	$(1,7 \pm 0,4) \cdot 10^{-6}$
25	$(36 \pm 9) \cdot 10^{-6}$	$(56 \pm 18) \cdot 10^{-5}$	$(30 \pm 10) \cdot 10^{-5}$	$(210 \pm 74) \cdot 10^{-5}$	$(1,4 \pm 0,3) \cdot 10^{-6}$
27	$(18 \pm 3) \cdot 10^{-6}$	$(52 \pm 18) \cdot 10^{-5}$	$(43 \pm 14) \cdot 10^{-5}$	$(361 \pm 127) \cdot 10^{-5}$	$(1,3 \pm 0,2) \cdot 10^{-6}$
29	$(37 \pm 12) \cdot 10^{-6}$	$(44 \pm 16) \cdot 10^{-5}$	$(31 \pm 11) \cdot 10^{-5}$	$(321 \pm 112) \cdot 10^{-5}$	$(1,8 \pm 0,5) \cdot 10^{-6}$
32	$(56 \pm 19) \cdot 10^{-6}$	$(32 \pm 10) \cdot 10^{-5}$	$(26 \pm 9) \cdot 10^{-5}$	$(398 \pm 135) \cdot 10^{-5}$	$(1,2 \pm 0,3) \cdot 10^{-6}$
34	$(65 \pm 21) \cdot 10^{-6}$	$(28 \pm 7) \cdot 10^{-5}$	$(27 \pm 10) \cdot 10^{-5}$	$(416 \pm 143) \cdot 10^{-5}$	$(3,2 \pm 0,9) \cdot 10^{-6}$
36	$(26 \pm 7) \cdot 10^{-6}$	$(19 \pm 4) \cdot 10^{-5}$	$(25 \pm 9) \cdot 10^{-5}$	$(381 \pm 129) \cdot 10^{-5}$	$(2,2 \pm 0,6) \cdot 10^{-6}$

Příloha I - Tabulka 6: Dílčí stanovení aktivity MnP *T. versicolor* EA(III)

den kultivace	EA [U]				
	pH 3	pH 5	pH 7	SO	NO
4	$(6,5 \pm 0,1) \cdot 10^{-6}$	$(1,1 \pm 0,3) \cdot 10^{-5}$	$(2,8 \pm 0,3) \cdot 10^{-5}$	$(0,020 \pm 0,009) \cdot 10^{-5}$	$(2,5 \pm 0,4) \cdot 10^{-6}$
6	$(5,8 \pm 0,9) \cdot 10^{-6}$	$(1,2 \pm 0,7) \cdot 10^{-5}$	$(3,1 \pm 0,6) \cdot 10^{-5}$	$(1,7 \pm 0,1) \cdot 10^{-5}$	$(0,1 \pm 0,3) \cdot 10^{-6}$
7	$(10,1 \pm 0,1) \cdot 10^{-6}$	$(2 \pm 1) \cdot 10^{-5}$	$(4,6 \pm 0,9) \cdot 10^{-5}$	$(4,5 \pm 0,3) \cdot 10^{-5}$	$(2,8 \pm 0,8) \cdot 10^{-6}$
8	$(12,1 \pm 0,3) \cdot 10^{-6}$	$(2,1 \pm 0,5) \cdot 10^{-5}$	$(3,5 \pm 0,6) \cdot 10^{-5}$	$(8 \pm 1) \cdot 10^{-5}$	$(0,3 \pm 0,5) \cdot 10^{-6}$
11	$(14,2 \pm 0,6) \cdot 10^{-6}$	$(5 \pm 1) \cdot 10^{-5}$	$(4 \pm 1) \cdot 10^{-5}$	$(23 \pm 9) \cdot 10^{-5}$	$(0,9 \pm 0,6) \cdot 10^{-6}$
13	$(14,1 \pm 0,7) \cdot 10^{-6}$	$(10 \pm 2) \cdot 10^{-5}$	$(9 \pm 2) \cdot 10^{-5}$	$(41 \pm 13) \cdot 10^{-5}$	$(11 \pm 8) \cdot 10^{-6}$
14	$(15,7 \pm 0,7) \cdot 10^{-6}$	$(12 \pm 3) \cdot 10^{-5}$	$(9,7 \pm 0,3) \cdot 10^{-5}$	$(83 \pm 8) \cdot 10^{-5}$	$(0,07 \pm 0,08) \cdot 10^{-6}$
19	$(4 \pm 12) \cdot 10^{-6}$	$(10 \pm 19) \cdot 10^{-5}$	$(16 \pm 4) \cdot 10^{-5}$	$(47 \pm 84) \cdot 10^{-5}$	$(0,2 \pm 0,3) \cdot 10^{-6}$
20	$(20 \pm 6) \cdot 10^{-6}$	$(46,6 \pm 0,9) \cdot 10^{-5}$	$(13,4 \pm 0,2) \cdot 10^{-5}$	$(60 \pm 95) \cdot 10^{-5}$	$(0,3 \pm 0,3) \cdot 10^{-6}$
22	$(38,6 \pm 0,7) \cdot 10^{-6}$	$(28,4 \pm 0,9) \cdot 10^{-5}$	$(9,1 \pm 0,3) \cdot 10^{-5}$	$(28 \pm 114) \cdot 10^{-5}$	$(0,3 \pm 0,2) \cdot 10^{-6}$
25	$(8 \pm 9) \cdot 10^{-6}$	$(21 \pm 11) \cdot 10^{-5}$	$(5 \pm 9) \cdot 10^{-5}$	$(89 \pm 118) \cdot 10^{-5}$	$(0,5 \pm 0,2) \cdot 10^{-6}$
27	$(28 \pm 3) \cdot 10^{-6}$	$(8 \pm 14) \cdot 10^{-5}$	$(14 \pm 6) \cdot 10^{-5}$	$(161 \pm 152) \cdot 10^{-5}$	$(0,1 \pm 0,1) \cdot 10^{-6}$
29	$(13 \pm 7) \cdot 10^{-6}$	$(9 \pm 10) \cdot 10^{-5}$	$(3 \pm 11) \cdot 10^{-5}$	$(43 \pm 135) \cdot 10^{-5}$	$(0,3 \pm 0,2) \cdot 10^{-6}$
32	$(3 \pm 18) \cdot 10^{-6}$	$(10 \pm 10) \cdot 10^{-5}$	$(15 \pm 9) \cdot 10^{-5}$	$(67 \pm 139) \cdot 10^{-5}$	$(0,6 \pm 0,2) \cdot 10^{-6}$
34	$(44 \pm 6) \cdot 10^{-6}$	$(24 \pm 1) \cdot 10^{-5}$	$(20 \pm 2) \cdot 10^{-5}$	$(3 \pm 146) \cdot 10^{-5}$	$(0,3 \pm 0,4) \cdot 10^{-6}$
36	$(14 \pm 4) \cdot 10^{-6}$	$(15 \pm 1) \cdot 10^{-5}$	$(2 \pm 9) \cdot 10^{-5}$	$(248 \pm 152) \cdot 10^{-5}$	$(0,3 \pm 0,3) \cdot 10^{-6}$

Příloha I - Tabulka 7: Aktivita Mn-independentní peroxidázy *T. versicolor*

den kultivace	EA [U]				
	pH 3	pH 5	pH 7	SO	NO
4	0	0	0	0	$(22,8 \pm 3,8) \cdot 10^{-7}$
6	0	0	0	$(0,2 \pm 0,1) \cdot 10^{-5}$	0
7	0	0	0	$(0,8 \pm 0,3) \cdot 10^{-5}$	$(26,9 \pm 8,2) \cdot 10^{-7}$
8	$(0,1 \pm 0,5) \cdot 10^{-6}$	0	0	0	$(2 \pm 4,6) \cdot 10^{-7}$
11	$(2,7 \pm 2,2) \cdot 10^{-6}$	$(2,8 \pm 4,1) \cdot 10^{-5}$	$(3,1 \pm 4) \cdot 10^{-5}$	$(19 \pm 21,4) \cdot 10^{-5}$	$(4,7 \pm 5,9) \cdot 10^{-7}$
13	0	0	0	0	$(113,6 \pm 77,7) \cdot 10^{-7}$
14	$(0,6 \pm 0,2) \cdot 10^{-6}$	$(11,3 \pm 9,9) \cdot 10^{-5}$	$(1,6 \pm 0,7) \cdot 10^{-5}$	$(76,6 \pm 31,2) \cdot 10^{-5}$	0
19	0	0	0	0	$(1,3 \pm 2,2) \cdot 10^{-7}$
20	0	0	0	0	$(2 \pm 2,1) \cdot 10^{-7}$
22	$(2,4 \pm 2,6) \cdot 10^{-6}$	0	0	0	$(0,7 \pm 1,3) \cdot 10^{-7}$
25	0	$(8,7 \pm 8,3) \cdot 10^{-5}$	0	$(42,1 \pm 21,3) \cdot 10^{-5}$	$(1,3 \pm 1,2) \cdot 10^{-7}$
27	0	0	$(8,8 \pm 13,9) \cdot 10^{-5}$	$(70,2 \pm 111) \cdot 10^{-5}$	0
29	0	$(4,3 \pm 9,9) \cdot 10^{-5}$	$(1,8 \pm 4,4) \cdot 10^{-5}$	$(0,8 \pm 69,5) \cdot 10^{-5}$	0
32	0	0	$(9,5 \pm 5,6) \cdot 10^{-5}$	$(2 \pm 100,7) \cdot 10^{-5}$	$(3,4 \pm 3,2) \cdot 10^{-7}$
34	$(16,5 \pm 12,7) \cdot 10^{-6}$	0	0	0	$(1,3 \pm 6,2) \cdot 10^{-7}$
36	$(12,6 \pm 10) \cdot 10^{-6}$	$(9,1 \pm 7,9) \cdot 10^{-5}$	0	$(5,2 \pm 87,4) \cdot 10^{-5}$	$(2 \pm 4,4) \cdot 10^{-7}$

Příloha I - Tabulka 8: Aktivita *Lac I. lacteus*

pH 5		pH 7	
den kultivace	EA [U]	den kultivace	EA [U]
3	$(19 \pm 6) \cdot 10^{-8}$	3	0
6	$(278 \pm 70) \cdot 10^{-8}$	8	$(78 \pm 21) \cdot 10^{-7}$
8	$(37 \pm 11) \cdot 10^{-8}$	9	$(6 \pm 2) \cdot 10^{-7}$
10	$(93 \pm 27) \cdot 10^{-8}$	11	$(13 \pm 4) \cdot 10^{-7}$
13	$(37 \pm 15) \cdot 10^{-8}$	14	$(8 \pm 3) \cdot 10^{-7}$
15	$(65 \pm 20) \cdot 10^{-8}$	16	$(12 \pm 4) \cdot 10^{-7}$
17	$(120 \pm 29) \cdot 10^{-8}$	18	$(15 \pm 5) \cdot 10^{-7}$
20	$(380 \pm 110) \cdot 10^{-8}$	21	$(12 \pm 4) \cdot 10^{-7}$
22	$(389 \pm 101) \cdot 10^{-8}$	23	$(35 \pm 12) \cdot 10^{-7}$
24	$(83 \pm 17) \cdot 10^{-8}$	25	$(23 \pm 7) \cdot 10^{-7}$
28	$(19 \pm 6) \cdot 10^{-8}$	28	$(27 \pm 8) \cdot 10^{-7}$
30	$(28 \pm 9) \cdot 10^{-8}$	30	$(25 \pm 9) \cdot 10^{-7}$
35	$(9 \pm 3) \cdot 10^{-8}$	32	$(9 \pm 3) \cdot 10^{-7}$
37	$(83 \pm 29) \cdot 10^{-8}$	36	$(9 \pm 3) \cdot 10^{-7}$

Příloha I - Tabulka 9: Aktivita LiP I. lacteus

pH 5		pH 7	
den kultivace	EA [U]	den kultivace	EA [U]
3	$(10 \pm 3) \cdot 10^{-7}$	3	$(7 \pm 2) \cdot 10^{-7}$
6	$(33 \pm 11) \cdot 10^{-7}$	8	$(10 \pm 3) \cdot 10^{-7}$
8	$(38 \pm 13) \cdot 10^{-7}$	9	$(5 \pm 2) \cdot 10^{-7}$
10	$(36 \pm 13) \cdot 10^{-7}$	11	$(7 \pm 2) \cdot 10^{-7}$
13	$(100 \pm 35) \cdot 10^{-7}$	14	$(33 \pm 12) \cdot 10^{-7}$
15	$(62 \pm 22) \cdot 10^{-7}$	16	$(24 \pm 8) \cdot 10^{-7}$
17	$(14 \pm 5) \cdot 10^{-7}$	18	$(2 \pm 1) \cdot 10^{-7}$
20	$(5 \pm 2) \cdot 10^{-7}$	21	$(7 \pm 2) \cdot 10^{-7}$
22	$(7 \pm 2) \cdot 10^{-7}$	23	$(7 \pm 2) \cdot 10^{-7}$
24	$(10 \pm 3) \cdot 10^{-7}$	25	$(7 \pm 2) \cdot 10^{-7}$
28	$(7 \pm 3) \cdot 10^{-7}$	28	$(7 \pm 2) \cdot 10^{-7}$
30	$(7 \pm 2) \cdot 10^{-7}$	30	$(2 \pm 1) \cdot 10^{-7}$
35	$(2,4 \pm 0,8) \cdot 10^{-7}$	32	$(7 \pm 3) \cdot 10^{-7}$
37	$(7 \pm 2) \cdot 10^{-7}$	36	$(14 \pm 4) \cdot 10^{-7}$

Příloha I - Tabulka 10: Aktivita MnP I. lacteus

pH 5		pH 7	
den kultivace	EA [U]	den kultivace	EA [U]
3	$(16 \pm 6) \cdot 10^{-8}$	3	$(11 \pm 4) \cdot 10^{-8}$
6	$(16 \pm 3) \cdot 10^{-8}$	8	$(55 \pm 15) \cdot 10^{-8}$
8	$(69 \pm 5) \cdot 10^{-8}$	9	$(82 \pm 5) \cdot 10^{-8}$
10	$(28 \pm 2) \cdot 10^{-8}$	11	$(58 \pm 4) \cdot 10^{-8}$
13	$(39 \pm 11) \cdot 10^{-8}$	14	$(880 \pm 134) \cdot 10^{-8}$
15	$(124 \pm 33) \cdot 10^{-8}$	16	$(372 \pm 129) \cdot 10^{-8}$
17	$(142 \pm 28) \cdot 10^{-8}$	18	$(194 \pm 93) \cdot 10^{-8}$
20	$(211 \pm 98) \cdot 10^{-8}$	21	$(402 \pm 490) \cdot 10^{-8}$
22	$(241 \pm 127) \cdot 10^{-8}$	23	$(222 \pm 515) \cdot 10^{-8}$
24	$(196 \pm 87) \cdot 10^{-8}$	25	$(450 \pm 324) \cdot 10^{-8}$
28	$(919 \pm 53) \cdot 10^{-8}$	28	$(328 \pm 253) \cdot 10^{-8}$
30	$(820 \pm 496) \cdot 10^{-8}$	30	$(372 \pm 197) \cdot 10^{-8}$
35	$(1438 \pm 1410) \cdot 10^{-8}$	32	$(176 \pm 73) \cdot 10^{-8}$
37	$(1465 \pm 982) \cdot 10^{-8}$	36	$(360 \pm 397) \cdot 10^{-8}$

Příloha I - Tabulka 11: Dilční stanovení aktivity MnP *I. lacteus* EA(I)

pH 5		pH 7	
den kultivace	EA [U]	den kultivace	EA [U]
3	$(7 \pm 4) \cdot 10^{-8}$	3	$(7 \pm 2) \cdot 10^{-8}$
6	$(13 \pm 6) \cdot 10^{-8}$	8	$(7 \pm 4) \cdot 10^{-8}$
8	$(141 \pm 10) \cdot 10^{-8}$	9	$(20 \pm 11) \cdot 10^{-8}$
10	$(27 \pm 9) \cdot 10^{-8}$	11	$(20 \pm 11) \cdot 10^{-8}$
13	$(34 \pm 16) \cdot 10^{-8}$	14	$(349 \pm 27) \cdot 10^{-8}$
15	$(74 \pm 20) \cdot 10^{-8}$	16	$(34 \pm 59) \cdot 10^{-8}$
17	$(87 \pm 50) \cdot 10^{-8}$	18	$(27 \pm 66) \cdot 10^{-8}$
20	$(121 \pm 52) \cdot 10^{-8}$	21	$(13 \pm 109) \cdot 10^{-8}$
22	$(148 \pm 67) \cdot 10^{-8}$	23	$(54 \pm 103) \cdot 10^{-8}$
24	$(128 \pm 66) \cdot 10^{-8}$	25	$(40 \pm 129) \cdot 10^{-8}$
28	$(40 \pm 137) \cdot 10^{-8}$	28	$(47 \pm 99) \cdot 10^{-8}$
30	$(27 \pm 130) \cdot 10^{-8}$	30	$(289 \pm 106) \cdot 10^{-8}$
35	$(7 \pm 43) \cdot 10^{-8}$	32	$(40 \pm 107) \cdot 10^{-8}$
37	$(7 \pm 253) \cdot 10^{-8}$	36	$(27 \pm 140) \cdot 10^{-8}$

Příloha I - Tabulka 12: Dilční stanovení aktivity MnP *I. lacteus* EA(II)

pH 5		pH 7	
den kultivace	EA [U]	den kultivace	EA [U]
3	$(2,0 \pm 0,8) \cdot 10^{-7}$	3	$(1,3 \pm 0,5) \cdot 10^{-7}$
6	$(11,4 \pm 0,4) \cdot 10^{-7}$	8	$(13 \pm 2) \cdot 10^{-7}$
8	$(25,5 \pm 0,8) \cdot 10^{-7}$	9	$(22 \pm 3) \cdot 10^{-7}$
10	$(23,5 \pm 0,7) \cdot 10^{-7}$	11	$(34 \pm 1) \cdot 10^{-7}$
13	$(37 \pm 2) \cdot 10^{-7}$	14	$(124 \pm 13) \cdot 10^{-7}$
15	$(44 \pm 4) \cdot 10^{-7}$	16	$(104 \pm 13) \cdot 10^{-7}$
17	$(60 \pm 5) \cdot 10^{-7}$	18	$(77 \pm 10) \cdot 10^{-7}$
20	$(105 \pm 13) \cdot 10^{-7}$	21	$(171 \pm 54) \cdot 10^{-7}$
22	$(118 \pm 14) \cdot 10^{-7}$	23	$(160 \pm 52) \cdot 10^{-7}$
24	$(124 \pm 12) \cdot 10^{-7}$	25	$(135 \pm 34) \cdot 10^{-7}$
28	$(215 \pm 72) \cdot 10^{-7}$	28	$(128 \pm 27) \cdot 10^{-7}$
30	$(220 \pm 68) \cdot 10^{-7}$	30	$(147 \pm 22) \cdot 10^{-7}$
35	$(439 \pm 152) \cdot 10^{-7}$	32	$(120 \pm 12) \cdot 10^{-7}$
37	$(401 \pm 133) \cdot 10^{-7}$	36	$(140 \pm 46) \cdot 10^{-7}$

Příloha I - Tabulka 13: Dílčí stanovení aktivity MnP *I. lacteus* EA(III)

pH 5		pH 7	
den kultivace	EA [U]	den kultivace	EA [U]
3	$(4 \pm 5) \cdot 10^{-8}$	3	$(3 \pm 3) \cdot 10^{-8}$
6	$(98 \pm 3) \cdot 10^{-8}$	8	$(73 \pm 4) \cdot 10^{-8}$
8	$(187 \pm 9) \cdot 10^{-8}$	9	$(140 \pm 26) \cdot 10^{-8}$
10	$(207 \pm 7) \cdot 10^{-8}$	11	$(278 \pm 10) \cdot 10^{-8}$
13	$(331 \pm 20) \cdot 10^{-8}$	14	$(363 \pm 12) \cdot 10^{-8}$
15	$(320 \pm 14) \cdot 10^{-8}$	16	$(669 \pm 25) \cdot 10^{-8}$
17	$(456 \pm 36) \cdot 10^{-8}$	18	$(579 \pm 26) \cdot 10^{-8}$
20	$(837 \pm 88) \cdot 10^{-8}$	21	$(1312 \pm 219) \cdot 10^{-8}$
22	$(942 \pm 51) \cdot 10^{-8}$	23	$(1378 \pm 86) \cdot 10^{-8}$
24	$(1040 \pm 78) \cdot 10^{-8}$	25	$(901 \pm 89) \cdot 10^{-8}$
28	$(1231 \pm 726) \cdot 10^{-8}$	28	$(949 \pm 85) \cdot 10^{-8}$
30	$(1384 \pm 470) \cdot 10^{-8}$	30	$(1093 \pm 87) \cdot 10^{-8}$
35	$(2950 \pm 571) \cdot 10^{-8}$	32	$(1027 \pm 93) \cdot 10^{-8}$
37	$(2547 \pm 896) \cdot 10^{-8}$	36	$(1044 \pm 229) \cdot 10^{-8}$

Příloha I - Tabulka 14: Aktivita Mn-independentní peroxidázy *I. lacteus*

pH 5		pH 7	
den kultivace	EA [U]	den kultivace	EA [U]
3	0	3	0
6	$(8,5 \pm 0,5) \cdot 10^{-7}$	8	$(7 \pm 0) \cdot 10^{-7}$
8	$(4,6 \pm 0,3) \cdot 10^{-7}$	9	$(12 \pm 2) \cdot 10^{-7}$
10	$(18 \pm 0,5) \cdot 10^{-7}$	11	$(25,8 \pm 0,3) \cdot 10^{-7}$
13	$(30 \pm 1) \cdot 10^{-7}$	14	$(1 \pm 2) \cdot 10^{-7}$
15	$(25 \pm 1) \cdot 10^{-7}$	16	$(64 \pm 5) \cdot 10^{-7}$
17	$(37 \pm 4) \cdot 10^{-7}$	18	$(55 \pm 6) \cdot 10^{-7}$
20	$(72 \pm 7) \cdot 10^{-7}$	21	$(130 \pm 19) \cdot 10^{-7}$
22	$(79 \pm 4) \cdot 10^{-7}$	23	$(132 \pm 6) \cdot 10^{-7}$
24	$(91 \pm 4) \cdot 10^{-7}$	25	$(86 \pm 9) \cdot 10^{-7}$
28	$(119 \pm 71) \cdot 10^{-7}$	28	$(90 \pm 5) \cdot 10^{-7}$
30	$(136 \pm 45) \cdot 10^{-7}$	30	$(80 \pm 6) \cdot 10^{-7}$
35	$(294 \pm 57) \cdot 10^{-7}$	32	$(99 \pm 5) \cdot 10^{-7}$
37	$(254 \pm 86) \cdot 10^{-7}$	36	$(102 \pm 18) \cdot 10^{-7}$

Příloha II – Stanovení celkového obsahu extracelulárních proteinů

Příloha II - Tabulka 1: Celkový obsah extracelulárních proteinů T. versicolor stanovený metodou Bradfordové

den kultivace	c [mg/ml]				
	pH 3	pH 5	pH 7	SO	NO
4	0,0014 ± 0,0002	0,010 ± 0,001	0,0119 ± 0,0004	0,21 ± 0,02	0,53 ± 0,08
6	0,0022 ± 0,0003	0,014 ± 0,001	0,0166 ± 0,0005	0,155 ± 0,008	0,52 ± 0,04
7	0,0030 ± 0,0005	0,012 ± 0,002	0,0167 ± 0,0006	0,17 ± 0,03	0,72 ± 0,05
8	0,0031 ± 0,0008	0,012 ± 0,001	0,018 ± 0,001	0,19 ± 0,04	0,56 ± 0,05
11	0,012 ± 0,004	0,017 ± 0,001	0,020 ± 0,002	0,36 ± 0,01	0,90 ± 0,07
13	0,010 ± 0,002	0,012 ± 0,002	0,013 ± 0,001	0,28 ± 0,03	0,93 ± 0,08
14	0,0104 ± 0,0007	0,0140 ± 0,0007	0,013 ± 0,003	0,28 ± 0,03	0,9 ± 0,1
19	0,011 ± 0,002	0,021 ± 0,007	0,0191 ± 0,0008	0,35 ± 0,03	1,08 ± 0,04
20	0,0100 ± 0,0008	0,024 ± 0,009	0,021 ± 0,001	0,38 ± 0,06	1,18 ± 0,09
22	0,0101 ± 0,0005	0,031 ± 0,007	0,021 ± 0,001	0,49 ± 0,05	1,26 ± 0,07
25	0,012 ± 0,002	0,035 ± 0,006	0,024 ± 0,002	0,44 ± 0,05	1,00 ± 0,07
27	0,0094 ± 0,0007	0,033 ± 0,004	0,024 ± 0,003	0,45 ± 0,06	1,32 ± 0,06
29	0,012 ± 0,003	0,031 ± 0,006	0,028 ± 0,006	0,44 ± 0,06	1,30 ± 0,09
32	0,010 ± 0,002	0,027 ± 0,005	0,024 ± 0,007	0,45 ± 0,03	1,31 ± 0,07
34	0,013 ± 0,004	0,029 ± 0,004	0,027 ± 0,006	0,49 ± 0,04	1,632 ± 0,003
36	0,020 ± 0,005	0,033 ± 0,008	0,036 ± 0,004	0,53 ± 0,04	1,6 ± 0,1

Příloha II - Tabulka 2: Celkový obsah extracelulárních proteinů I. lacteus stanovený metodou Bradfordové

pH 5		pH 7	
den kultivace	c [mg/ml]	den kultivace	c [mg/ml]
3	0,0071 ± 0,0009	3	0,0090 ± 0,0004
6	0,0113 ± 0,0004	8	0,017 ± 0,001
8	0,012 ± 0,003	9	0,019 ± 0,001
10	0,0145 ± 0,0005	11	0,0200 ± 0,0007
13	0,0152 ± 0,0006	14	0,0184 ± 0,0006
15	0,015 ± 0,002	16	0,0155 ± 0,0007
17	0,017 ± 0,002	18	0,0198 ± 0,0009
20	0,016 ± 0,001	21	0,021 ± 0,001
22	0,016 ± 0,001	23	0,0213 ± 0,0009
24	0,0198 ± 0,0006	25	0,0228 ± 0,0009
28	0,024 ± 0,003	28	0,0219 ± 0,0008
30	0,024 ± 0,004	30	0,0218 ± 0,0005
35	0,03 ± 0,01	32	0,023 ± 0,001
37	0,03 ± 0,02	36	0,019 ± 0,002

Příloha II - Tabulka 3: Celkový obsah extracelulárních proteinů *T. versicolor* stanovený metodou Hartree-Lowryho

den kultivace	c [mg/ml]				
	pH 3	pH 5	pH 7	SO	NO
4	1,30 ± 0,09	1,6 ± 0,1	2,25 ± 0,02	3,81 ± 0,07	2,9 ± 0,2
6	0,65 ± 0,03	0,49 ± 0,03	0,80 ± 0,03	4,4 ± 0,1	3,0 ± 0,5
7	0,70 ± 0,06	0,50 ± 0,02	0,80 ± 0,06	4,0 ± 0,2	3,3 ± 0,4
8	0,49 ± 0,05	0,40 ± 0,03	0,54 ± 0,05	2,2 ± 0,1	3,5 ± 0,2
11	0,42 ± 0,04	0,36 ± 0,01	0,52 ± 0,03	1,8 ± 0,2	3,6 ± 0,2
13	1,5 ± 0,1	1,28 ± 0,08	1,1 ± 0,2	1,9 ± 0,3	3,5 ± 0,4
14	0,39 ± 0,02	0,37 ± 0,04	0,43 ± 0,01	1,97 ± 0,09	3,2 ± 0,1
19	0,29 ± 0,01	0,30 ± 0,04	0,5 ± 0,1	1,9 ± 0,2	3,3 ± 0,2
20	0,242 ± 0,007	0,32 ± 0,06	0,43 ± 0,02	2,0 ± 0,1	3,1 ± 0,3
22	0,187 ± 0,007	0,20 ± 0,03	0,35 ± 0,04	1,7 ± 0,1	3,1 ± 0,3
25	0,20 ± 0,01	0,24 ± 0,05	0,34 ± 0,08	1,7 ± 0,2	3,1 ± 0,2
27	0,214 ± 0,009	0,22 ± 0,05	0,36 ± 0,07	1,9 ± 0,2	3,9 ± 0,2
29	0,23 ± 0,02	0,23 ± 0,05	0,37 ± 0,08	2,0 ± 0,1	3,6 ± 0,2
32	0,25 ± 0,03	0,25 ± 0,05	0,4 ± 0,1	2,1 ± 0,1	5,71 ± 0,08
34	0,30 ± 0,03	0,26 ± 0,06	0,46 ± 0,09	2,2 ± 0,1	4,1 ± 0,3
36	1,30 ± 0,09	1,6 ± 0,1	2,25 ± 0,02	3,81 ± 0,07	2,9 ± 0,2

Příloha II - Tabulka 4: Celkový obsah extracelulárních proteinů *I. lacteus* stanovený metodou Hartree-Lowryho

pH 5		pH 7	
den kultivace	c [mg/ml]	den kultivace	c [mg/ml]
3	0,89 ± 0,06	3	2,2 ± 0,2
6	0,62 ± 0,06	8	1,3 ± 0,3
8	0,5 ± 0,1	9	0,69 ± 0,01
10	0,5 ± 0,1	11	0,69 ± 0,02
13	0,4 ± 0,1	14	0,71 ± 0,06
15	0,4 ± 0,1	16	0,62 ± 0,04
17	0,37 ± 0,07	18	0,68 ± 0,02
20	0,35 ± 0,09	21	0,63 ± 0,02
22	0,4 ± 0,1	23	0,64 ± 0,02
24	0,4 ± 0,1	25	0,63 ± 0,04
28	0,41 ± 0,02	28	0,60 ± 0,03
30	0,41 ± 0,02	30	0,61 ± 0,03
35	0,5 ± 0,1	32	0,55 ± 0,04
37	0,5 ± 0,1	36	0,48 ± 0,01