

**MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
AGRONOMICKÁ FAKULTA**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BRNO 2017

OVCHYNNIKOVA OLEKSANDRA

Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta
Ústav technologie potravin



Studium produkce lakázy vybranými druhy hub
Bakalářská práce

Vedoucí práce:
Mgr. Stanislava Voběrková, Ph.D.

Vypracovala:
Oleksandra Ovchynnikova

STRANA PRO ZADÁNÍ

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: *Studium produkce lakázy vybranými druhy hub* vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a v souladu s platnou Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací.

Jsem si vědom/a, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše

V Brně dne:.....

Podpis

.....

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěla poděkovat své vedoucí bakalářské práce, Mgr. Stanislavě Voběrkové, Ph.D., za odborné vedení a cenné rady. Dále pak děkuji své konzultantce Ing. Martině Vršanské za pomoc, trpělivost, ochotu a cenné rady v průběhu práce na této bakalářské práci, a rovněž mé rodině a osobně Edelině Memedliaeve a Ivanovi Gulievu za podporu.

ABSTRAKT

Význam lignin-degradujících hub a jejich ligninolytických enzymů je celosvětově oceňován zejména kvůli jejich možnému použití v řadě průmyslových odvětví. Tato bakalářská práce je zaměřena na studium možností produkce extracelulárních ligninolytických enzymů houbami hnědé hniloby. V literární rešerši jsou charakterizované vybrané kmeny hub hnědé hniloby a jejich nejprostudovanější ligninolytické enzymy. Dále jsou shrnuty možnosti využití lakázy v různých průmyslových odvětvích zejména v potravinářství. V průběhu submerzní kultivace po dobu 24 dní byla sledována aktivita ligninolytických enzymů produkovaných houbami *Laetiporus sulphureus*, *Serpula lacrymans*, *Gloeophyllum sepiarium*, *Phaeolus schweinitzii* a *Laetiporus montanus*. Spektrofotometricky byla měřena aktivita lakázy, lignin peroxidázy a Mn-dependentní peroxidázy. U všech enzymů byla nejvyšší aktivita pozorována 12. den. Vybrané houby vykazovaly nejvyšší aktivitu v případě lignin peroxidázy. Nejvyšší hodnoty měli *Laetiporus sulphureus* a *Gloeophyllum sepiarium*. Bylo zjištěno, že enzymatická aktivita hub je závislá na geografické poloze a konkrétním stanovišti. Hodnoty aktivit stejného kmene odebraného z různých míst byli odlišné.

KLÍČOVÁ SLOVA: lakáza, lignin peroxidáza, mangan-dependentní peroxidáza, houby hnědé hniloby, potravinářství

ABSTRACT

The importance of lignin-degrading fungi and their ligninolytic enzymes has been well appreciated globally, because of their potential use in various industries. This bachelor thesis is focused on study of potential production of extracellular ligninolytic enzymes by brown rot fungi. In the literary review selected strains of brown rot fungi and its most studied ligninolytic enzymes are characterized. The use of laccase in various industries especially food industry are summarized. Activity of ligninolytic enzymes produced by brown rot fungi *Laetiporus sulphureus*, *Serpula lacrymans*, *Gloeophyllum sepiarium*, *Phaeolus schweinitzii* and *Laetiporus montanus* during submerged cultivation for 24 days was evaluated. Laccase, lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase activities were measured spectrophotometrically. For all enzymes, the highest activity was observed on the 12 day. Selected fungi produced the most lignin peroxidase. *Laetiporus sulphureus* and *Gloeophyllum sepiarium* showed the highest values of enzyme activities. It has been found that the enzymatic activity of fungi depends on the geographical location and the specific habitat. Enzyme activities of the same strain taken from different locations were different.

KEY WORDS: laccase, lignin peroxidase, manganese-dependent peroxidase, brown rot fungi, food industry

OBSAH

1	ÚVOD.....	10
2	CÍL PRÁCE	11
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	12
3.1	Houby	12
3.2	Rozdělení hub	13
3.2.1	Vřeckovýtrusné houby	13
3.2.2	Houby nedokonalé (Fungi imperfecti, Deuteromycetes)	14
3.2.3	Stopkovýtrusné houby.....	14
3.2.4	Houby měkké hniloby	14
3.2.5	Celulózovorní houby (hnědé hniloby).....	15
3.2.6	Ligninovorní houby (bílé hniloby).....	15
3.3	Vybraní zástupci hub hnědé hniloby	16
3.3.1	Laetiporus sulphureus (Sírovec žlutooranžový)	16
3.3.2	Serpula lacrymans (Dřevomorka domácí).....	16
3.3.3	Gloeophyllum sepiarium (Trámovka plotní)	16
3.3.4	Laetiporus montanus (Sírovec horský)	17
3.3.5	Phaeolus schweinitzii (hnědák Schweinitzův).....	17
3.4	Enzymatické vybavení hub.....	17
3.4.1	Enzymy.....	17
3.4.2	Ligninolytické enzymy produkované houbami hnědé hniloby.....	18
3.5	Využití enzymů dřevokazných hub.....	25
3.5.1	Využití v papírenském průmyslu	25
3.5.2	Využití v delignifikaci dřeva	25
3.5.3	Využití v textilním průmyslu.....	26

3.5.4	Využití jako zdroj biologicky aktivních látek	26
3.5.5	Biosenzory	27
3.5.6	Využití v potravinářském průmyslu.....	28
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	36
4.1	Princip stanovení aktivit ligninolytických enzymů.....	36
4.2	Chemikálie	37
4.3	Biologický materiál.....	37
4.4	Přístrojové vybavení.....	39
4.5	Použité roztoky a jejich příprava	39
4.6	Kultivace houbové kultury	40
4.7	Stanovení lakázové aktivity.....	40
4.8	Stanovení aktivity lignin peroxidázy.....	41
4.9	Stanovení aktivity mangan-dependentní peroxidázy	41
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	42
6	ZÁVĚR.....	46
7	POUŽITÁ LITERATURA	47
8	SEZNAM OBRAZKŮ	59

1 ÚVOD

Houby vždy přitahovaly pozornost člověka svou tajemností. Patří mezi hlavní „uklízeče“ – utilizátory neživé organické hmoty. Jimi způsobený rozklad různého organického materiálu vede ke vzniku úrodných půd. Přeměna dřeva v přírodě způsobuje v konečném důsledku její úplný rozklad a humifikaci. Základní roli přitom hrají různé houby-xylotrofy. Na jejich objem připadá více než 90 % rozloženého dřeva. Bohatý enzymatický systém xylotrofních hub jim umožňuje využít obtížně degradovatelné polymery buněčných stěn dřeva až k téměř úplnému rozkladu. To zvyšuje zájem o jejich intenzivní výzkum. V závislosti na složení enzymatického komplexu se tyto houby dělí na:

Houby bílé hniloby (White rot fungi) narušují veškeré strukturní složky dřeva, přičemž dochází ke vzniku charakteristicky vláknitého a bledého vnějšího vzhledu.

Houby měkké hniloby (Soft rot fungi) poškozují dřevo, které je v kontaktu s půdou a nachází se ve vlhkém prostředí. Nejsilněji je poškozeno dřevo s vysokým obsahem vlhkosti.

Houby hnědé hniloby (Brown rot fungi) rozkládají celulózu, což vyvolává rozštěpení dřeva. Část stromu, postižená takovou hnilobou, zhnědne. Strom tmavne, praská a rozpadá se. Jsou zastoupeny výrazně menším počtem druhů, než houby bílé hniloby.

Prostudované jsou hlavně white rot fungi, nicméně brown rot fungi mohou mít velký potenciál a zatím nebyly moc studovány. Převládají v jehličnatých lesích a mnohem rychleji poškozují dřevo. Obsahují široký enzymatický aparát a mezi jejich nejprostudovanější enzymy patří peroxidázy (lignin peroxidáza, mangan - dependentní peroxidáza) a fenol oxidáza lakáza.

Přirozenou funkcí lakázy je rozklad ligninu za účelem získání přístupu k ostatním polysacharidům ve dřevě (celulóza a hemicelulóza). Jejich nízká substrátová specifita umožňuje lakáze, aby rozkládala sloučeniny se strukturou podobnou ligninu, jako jsou polyaromatické uhlovodíky (PAH), textilní barviva a jiné xenobiotické sloučeniny. Tato skutečnost spolu s jednoduchými požadavky lakázové katalýzy (přítomnost substrátu a O_2) činí lakázu vhodnou a velice zajímavou pro průmyslové použití.

2 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo vypracovat literární rešerši zabývající se studiem produkce lakázy u různých druhů hub a jejím využitím v potravinářském průmyslu. Následovala provedení série experimentů u vybraných druhů dřevokazných hub s ohledem na produkci enzymu a vyhodnocení získaných výsledků.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Houby

Houby patřící do samostatné říše v doméně Eukarya představují velice různorodou skupinu s nejasnými fylogenetickými vztahy. Jedná se o jednobuněčné nebo mnohobuněčné stélkaté, eukaryotní, heterotrofní organismy, které jsou evolučně poměrně staré a jejich fosílie pocházejí již z karbonu a permu. Pravděpodobně vznikly jako výsledek paralelního vývoje několika vývojových linií. V tomto pojetí se tedy jedná zcela jednoznačně o polyfyletickou skupinu (Storoženko a kol., 2000, Dostál, 2006).

Mají znaky živočichů i rostlin a vyskytují se v různém prostředí např. ve vodě (většinou sladká), v půdě, tělech jiných organismů nebo také v rozmanitém organickém materiálu (dřevo, kůže, papír, textilie atd.). Jejich buněčná stěna obsahuje chitin a β -glukan. Nicméně celulóza, která je typická pro buněčné stěny rostlinných buněk, je u nich velmi vzácná (Storoženko a kol., 2000).

U převážné většiny hub je stélka tvořena častěji trubicovitými nepřehrádkovanými či přehrádkovanými vlákny, které se nazývají hyfy. Hyfy rostou terminálním růstem, což znamená, že roste pouze vrcholová buňka do délky. Hyfy se mohou dále větvit a splétat, čímž vytvářejí podhoubí (mycelium). Někdy se mycelia splétají v tzv. rhizomorfy, což jsou dlouhé a tlusté provazce s částečně diferencovanými pletivy (Jablonský, Šašek, 1985).

Mohou mít jedno nebo víc jader. Většinou neobsahují plastidy, proto jsou houby nejčastěji bezbarvé. Vyšší houby obsahují různá barviva hlavně v plodnicích. Houby nejsou schopny využívat energii slunečního záření pro tvorbu organických molekul, chybí jim chlorofyl. Živiny musí tedy přijímat z vnějšího prostředí – osmotrofie (Dostál, 2006).

Glykogen a tuky jsou hlavními zásobními látkami u hub (podobně jako u živočichů). Sacharidy transportují stélkou ve formě cukerných alkoholů (manitolu a arabitolu) a disacharidu trehalózy (Rozsypal, 2003).

Prakticky všechny houby vznikající na dřevě (xylofilní, xylotrofní) náleží mezi 3 třídy vyšších hub. Jsou to askomycety, vřeckovýtrusé houby, deuteromycety čili nedokonalé houby, a basidiomycety (stopkpytrusé), které jsou nejvýraznějšími rozkladači (Storoženko a kol., 2000).

3.2 Rozdělení hub

Dřevokazné houby můžeme rozdělit z několika hledisek:

Podle způsobu tvorby výtrusů:

1. houby stopkovýtrusé (Basidiomycetes) - výtrusy se vytvářejí na zvláštních buňkách nazývaných basidie. Mezi ně patří většina dřevokazných hub.
2. houby vřekovýtrusé (Ascomycetes) - výtrusy se vytvářejí uvnitř kulovitých útvarů nazývaných vřeka.
3. houby nedokonalé (Deuteromycetes) - je označení pro stopkovýtrusé a vřekovýtrusé houby, u nichž nebylo pozorováno pohlavní rozmnožování (Holinka, 2015).

Podle zdrojů výživy:

1. houby celulózožravé – rozkládají pouze celulózu a příbuzné látky (hemicelulózy apod.)
2. houby ligninožravé – rozkládají pouze lignin (např. některé druhy rodu *Trametes*) (Balabán, Kotlaba, 1970).

Podle mechanismů rozkladu dřeva:

1. houby měkké hniloby
2. houby hnědé hniloby
3. houby bílé hniloby (Gabriel, 2013).

3.2.1 Vřekovýtrusé houby

Do velké skupiny vřekovýtrusých hub patří asi 60 % ze všech známých hub (Antonín a kol., 2003). U askomycetů jsou výtrusy umístěny uvnitř kyjovitých, červovitých nebo měchýřkovitých vřecek – asků, které jsou uloženy v hymeniu (roušku) (Keizer, 2005).

Mohou mít mikroskopickou nebo makroskopickou vláknitou stélku, s větveným přehrádkovaným myceliem. Často tvoří také plodnice. Hyfy mohou být volné nebo srostlé v nepravé pletivo – plektenchym. Buněčná stěna obsahuje dvě vrstvy, hlavními složkami jsou chitin a polyglukan. Převládá nepohlavní rozmnožování (educanet.cz). Nejčastěji probíhá fragmentací stélky nebo vznikají mitózou konidie (exogenní spory) na nosičích – konidioforech. Při pohlavním rozmnožování se tvoří pohlavní orgány (gametangia) – samčí antheridia a samičí kulovité askogony (Dostál, 2006).

3.2.2 Houby nedokonalé (Fungi imperfecti, Deuteromycetes)

U některých jedinců neznáme jednotlivé rozmnožovací formy, tj. pohlavní a nepohlavní. Z toho důvodu byla vytvořena umělá skupina mikromycet, známá jako skupina nedokonalých hub Fungi imperfecti či jako Deuteromycetes. U její zástupců není popsán pohlavní způsob rozmnožování (Ambrožová, 2008).

Jejich nepohlavní způsob rozmnožování konidiami je velmi podobný nepohlavnímu rozmnožování vřeckovýtrusých hub. Někdy se vůbec žádné rozmnožovací buňky nevytvářejí a houby žijí jen v podobě mycelia. Pohlavní rozmnožování Deuteromycet bylo pozorováno v přírodě jen zřídka a bylo vyřazeno z celého životního cyklu během evoluce těchto organismů (Alexopoulos, 1952). Tyto houby se vyživují saprofytickým nebo parazitickým způsobem (Dostál, 2006).

Vzácně se může jednat i o vývojovou příbuznost k houbám stopkovýtrusým. V některých případech snad může jít o druhy, jejichž pohlavní stádium (vřečka, bazidie) nebylo zatím nalezeno (Alexopoulos, 1952).

3.2.3 Stopkovýtrusé houby

Do tohoto oddělení patří nejznámější skupina hub s typickými makroskopickými plodnicemi. Jsou rozšířené po celé Zemi a mnohé z nich jsou hospodářsky značně významné. Tvoří asi 30 % známých hub, nazývané jako kloboukaté houby. Mají rozsáhlé přehrádkované podhoubí. Buněčnou stěnu tvoří dvě nebo více vrstev, hlavními složkami jsou chitin a polyglukany (Semerdžieva, Veselovský, 1986, educanet.cz).

Od vřeckovýtrusých hub se stopkovýtrusé houby liší zejména tím, že netvoří morfologicky odlišné pohlavní orgány. Kromě konidií slouží k nepohlavnímu rozmnožování také blastospory - pučivé buňky a fragmentace stélky (educanet.cz).

Pohlavní rozmnožování je charakterizováno bazidiami (meiosporangii), ve kterých vznikají redukčním dělením bazidiospory (meiospory) (Dostál, 2006).

3.2.4 Houby měkké hniloby

Hniloba zde v podstatě poškozují dřevo, které je v kontaktu s půdou a nachází se ve vlhkém prostředí. Typicky se vyskytuje ve dřevě s vysokým obsahem vody a dusíku (Geles, 2007). Houby měkké hniloby dřeva jsou schopny odbourávat nejen celulózu a hemicelulózy, ale v některých případech i lignin. Svůj název dostaly kvůli měknutí dřeva, které je způsobeno tvorbou charakteristických dutin v buněčné stěně (Gabriel, 2013).

Jedná se o zástupce rodů *Asco* a *Deuteromycota*. Měkká hniloba dřeva často vypadá hnědě a můžeme si ji splést s hnilobou působenou houbami rozkládajícími celulózu. Jejich hyfy rostou v lumenu jednotlivých buněk a tvoří se romboidní dutiny okolo jednotlivých hyf (Geles, 2007).

3.2.5 Celulózovorní houby (houby hnědé hniloby)

Rozklad dřeva, který způsobují celulózovorní a ligninovorní houby je od sebe navzájem výrazně odlišný. Celulózovorní houby rozkládají celulózu. Na počátku je dřevo žluté, avšak postupně hnědne. Silně lignifikovaná primární stěna a střední lamela zůstává nezměněná, naopak střední vrstva sekundární stěny se rozpouští. Vnitřní vrstva sekundární stěny zůstává taktéž déle nedotčená, protože obsahuje více ligninu a tukové látky (Urban, 1997).

Vzniká červenohnědá hniloba, způsobená uvolňovaným ligninem, která je typická pro tento typ hub. Dřevo postupně ztrácí na hmotnosti nebo objemu, rozpadá se na kostky, stává se křehké a lehké. Tenhle typ rozkladu se označuje jako destruktivní (Černý, 1989).

Houby hnědé hniloby nerozkládají lignin, pouze ho mohou chemicky přeměňovat. Štěpením polysacharidů získávají energii a živiny. Houby hnědé hniloby častěji napadají listnaté stromy než jehličnaté. To může být způsobeno odlišným chemickým složením dřeva, resp. ligninu. V současné době se odhaduje, že houby hnědé hniloby, mezi něž patří např. březovník obecný (*Piptoporus betulinus*), sírovec žlutooranžový (*Laetiporus sulphureus*) nebo dřevomorka domácí (*Serpula lacrymans*) tvoří jen asi 6 % druhů všech dřevokazných hub (Gabriel, 2013).

3.2.6 Ligninovorní houby (houby bílé hniloby)

Ligninovorní houby rozkládají kromě celulózní složky také lignin. Dřevo se zbarvuje uvolněnou celulózou světle hnědě nebo žlutobíle. Projevuje se zde bílá hniloba dřeva neboli korozivní rozklad. Někdy vznikají dvůrky vyplněné nestrávenou celulózou, tzv. voštiny (Černý, 1989). Dřevo se postupně stává měkkým až drobivým. Se ztrátou hmotnosti však prakticky neubývá na objemu a proto nedochází ke kostkovitému rozkladu jako u hnědé hniloby. K zástupcům těchto hub patří např. hlíva ústříčná (*Pleurotus ostreatus*), troudnatec kopitovitý (*Fomes fomentarius*) nebo outkovky (*Trametes*) (Gabriel, 2013).

3.3 Vybraní zástupci hub hnědé hniloby

3.3.1 *Laetiporus sulphureus* (Sírovec žlutooranžový)

Sírovec žlutooranžový je snadno rozpoznatelný kvůli oranžovému, poměrně měkkému, masitému tělu s mnoha póry, je široce rozšířený v severní Americe (Kuo, 2010). Patří do oddělení Basidiomycota, třída Agaricomycetes, Incertae sedis, řád Polyporales, čeleď Polyporaceae (Balabán, Kotlaba, 1970). Lupenité plodnice jsou zformované z jednoletých zpočátku citrónově žlutě zbarvených podušek. Bokem přirůstá k podkladu. Má zvlněný okraj lupenů, šťavnatou v mládí dužninu, okrouhlé až labyrintické rourky. Barva je nápadně žlutá až žlutooranžová, podhoubí je bělavé. Mladé plodnice jsou jedlé. Se stárnutím páchnou po svítiplynu, ztrácejí typickou barvu, blednou, jsou napadány hmyzem. Způsobuje hnědou hnilobu s kostkovitým až drobivým rozkladem (Palovčíková, 2011).

3.3.2 *Serpula lacrymans* (Dřevomorka domácí)

Dřevomorka domácí je nebezpečná hlavně v obydlených budovách, porůstá opracované dřevo jehličnanů i listnáčů, nachází se i ve volné přírodě. Patří do oddělení Basidiomycota, třída Agaricomycetes, podtřída Agaricomycetidae, řád Boletales, čeleď Serpulaceae (Balabán, Kotlaba, 1970). Má 2 až 10 mm tlusté plodnice, na okraji s vyšším bělavým plstnatým valem. Může vytvářet i odstávající klobouky. Rouško je tvořeno póry, které jsou velké, otevřené nebo uzavřené. Barvu má zlatooranžovou, žlutohnědou až tmavě červenohnědou nebo olivověhnědou. Plodnice narůstá velice rychle. Je schopen čerpat vodu ze vzdálenějších částí, pomocí myceliových provazců. Takže může narůstat i na relativně suchých místech. Tvoří hnědý kostkovitý rozklad (Palovčíková, 2011).

3.3.3 *Gloeophyllum sepiarium* (Trámovka plotní)

Trámovka plotní se vyskytuje velmi hojně na mrtvém dřevu jehličnanů, zejména smrků, jedlí a borovic, vzácně i některých listnáčů (osika). Na řezných plochách pařezů, na plotech, trámech apod. Patří do oddělení Basidiomycota (houby stopkovýtrusné), třída Agaricomycetes, Incertae sedis, řád Gloeophyllales, čeleď Gloeophyllaceae (Balabán, Kotlaba, 1970). Má polokruhový až kruhový klobouk, bokem přirostlý, tuhý, na okraji zprvu žlutavý. Povrch je hrboletý, hrubě chlupatý a kruhovitě zónovaný, ve stáří olysávající, černohnědý. Má radiálně uspořádané, tlustostěnné, okrově rezavé lupeny a řezavě hnědou dužninu (Palovčíková, 2011).

3.3.4 *Laetiporus montanus* (Sírovec horský)

Sírovec horský patří do oddělení Basidiomycota, třída Agaricomycetes, Incertae sedis, řád Polyporales, čeleď Fomitopsidaceae (Kunca, 2015). Plodnice jsou jednoleté, kloboukaté, masité, přisedlé. Klobouk má polokruhovitý až škeblovitý, který přirůstá bokem k substrátu. Má jasně oranžovou barvu, vybledávající do světlě hnědavě okrové, a hladký povrch. Má velmi drobné sírově žluté pory, zasycháním vybledávající. Hyfový systém má dimitický, cystidy chybí, spory jsou široce elipsoidní, hladké, neamyloidní ([mykoweb](#)).

3.3.5 *Phaeolus schweinitzii* (hnědák Schweinitzův)

Hnědák Schweinitzův hojně roste na bázi nebo na kořenech živých jehličnanů a také na pařezech. Plodnice jsou jednoleté, vějířovité až mělce nálevkovité, pokryté jemnou plstí. Mladé plodnice mají růstovou zónu žlutou, žlutorezavou až oranžově rezavou, střed plodnic je tmavě hnědý, staré jsou tmavě hnědé, polorozpadlé (Palovčíková, 2011). Způsobuje hnědou hnilobu, šíří se od kořenů do kmene a dále vyzrálým dřevem až do výšky 8 –12 m a to bez vnějších příznaků. Tlející dřevo se barví okrově, dá se rýpat nehtem, později se tvoří podélné a příčné trhlínky, obsahující bílé blanky podhoubí, v poslední fázi je tmavě červenohnědé, hranolovitě se rozpadá ([houbareni.cz](#)).

3.4 Enzymatické vybavení hub

3.4.1 Enzymy

Enzymy jsou bílkovinné makromolekuly s katalytickou funkcí. Nebílkovinná část enzymů se označuje jako kofaktor. Její funkce spočívá v přenosu atomů, elektronů nebo jejich skupin při biochemických reakcích. Je-li kofaktor pevně vázán na bílkovinnou část enzymu, nazývá se prostetická skupina a považuje se za stabilní součást molekuly. Je-li kofaktor vázán jen slabě a může se lehce oddělovat, nazýváme ho koenzym (Vodrážka, 2002).

Místo ve kterém probíhá enzymová reakce se označuje jako aktivní centrum. Aktivní centrum obsahuje určité, přesně rozmístěné funkční skupiny. Rychlost enzymově katalyzované reakce je závislá na několika faktorech, mezi které patří koncentrace substrátu, množství enzymu, fyzikálně chemické vlastnosti prostředí a přítomnost efektorů. S růstem teploty roste i rychlost enzymově katalyzované reakce. Za vysokých

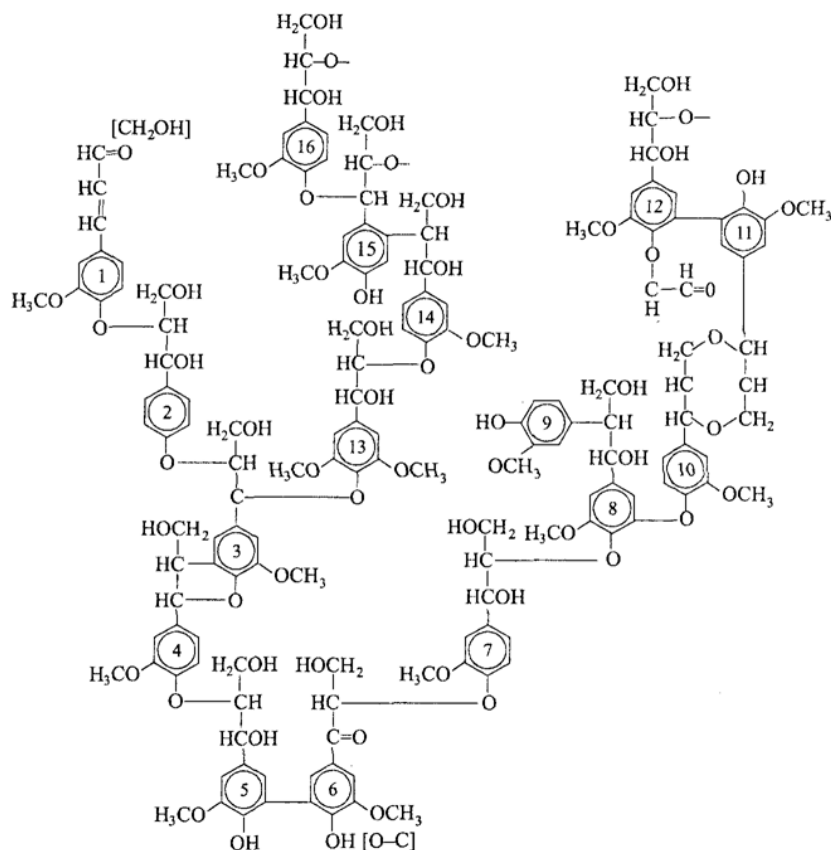
teplot dochází k inaktivaci enzymu v důsledku denaturace jeho bílkovinné části. Teplota při které je enzymová reakce nejrychlejší se nazývá teplotní optimum. Katalytická aktivita enzymu je také závislá na pH prostředí. Většina enzymů pracuje nejúčinněji jen v určité oblasti pH (pH optimum). Katalytickou účinnost enzymů také výrazně ovlivňuje řada látek – efektorů. Látky zvyšující aktivitu enzymu, se nazývají aktivátory (ionty některých kovů, organické látky), snižující účinek enzymu, označují se jako inhibitory (ionty těžkých kovů, organické i anorganické látky nízkomolekulové povahy) (Vodrážka, 2002).

3.4.2 Ligninolytické enzymy produkované houbami hnědé hniloby

Lignin je třetí nejrozšířenější biopolymer na Zemi (po celulóse a hemicelulóse). Je tvořen třemi základními monomery, koniferylalkoholem, sinapylalkoholem a p - kumarylalkoholem. Je obtížné určit jeho přesnou chemickou strukturu a molekulovou hmotnost, protože molekula ligninu je velmi složitá (Obr. 1). Rovněž izolace nativního ligninu je velmi komplikovaná (Šušla, Svobodová, 2006 cit. podle Hattaka, 2001).

Složení vysokomolekulární polymerní hydrofobní molekuly ligninu určuje vlastnosti enzymatického systému, který jej štěpí. Takový systém musí být extracelulární, nehydrolytický a nespecifický (Rabinovič a kol., 2001).

Lignin není schopen sloužit jako jediný zdroj uhlíku a energie. Aby proběhla degradace ligninu, dřevokazné houby potřebují dodatečný, snadněji využitelný zdroj uhlíku (Ander a Eriksson, 1975, Kirk a kol., 1976). *Phanerochaete chrysosporium* a *Lentinus edodes* metabolizují rozmanité ligninové preparáty pouze za přítomnosti alternativního zdroje uhlíku/energie (Leatham, 1986). Podle hypotézy, běžný způsob, kterým dřevokazné houby rozkládají dřevo je současné štěpení polysacharidů a ligninu. Odbouráváním celulózy získává houba glukózu, a když se tok cukru zastaví, houba hladoví a tím se „přepne“ z primárního metabolismu do sekundárního., Houba tudíž potřebuje pro degradaci ligninu snadno stravitelné živiny jako například cukry získané z polysacharidů dřeva (Boominathan a Reddy, 1992).



Obr. 1 Schematická struktura molekuly ligninu (Zdroj: Zaripov Š., 2009: Физико-механические основы разрушения древесины лиственницы в процессе конвективной сушки. Новосибирск: СО РАН, s. 110).

Nejprostudovanějšími ligninolytickými enzymy hub bílé hniloby jsou lignin peroxidáza (LiP, E.C. 1.11.1.14), mangan-dependentní peroxidáza (MnP, E.C. 1.11.1.13) a lakáza (Lac, E.C. 1.10.3.2) (Šušla, Svobodová, 2006 cit. podle Tuor, 1995). Někteří autoři uvádějí také mangan-independentní MnP a jiné versatilní peroxidázy (Ruiz-Duenas a kol., 2001, Heinfling a kol., 1998).

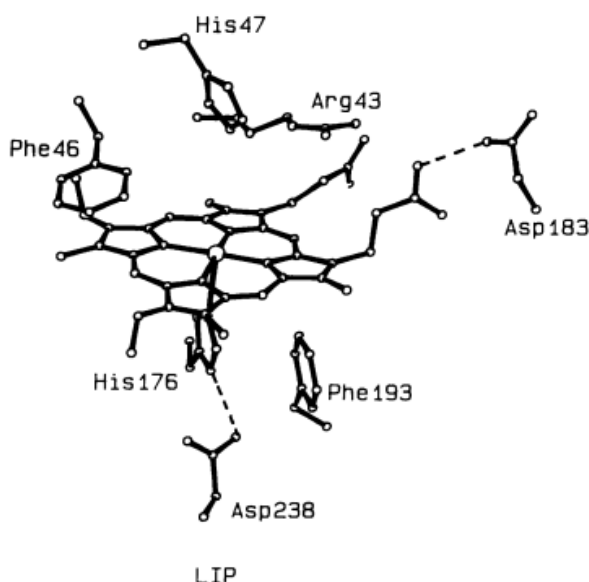
Vyšší basidiomycety se dle složení ligninolytických enzymů dělí do následujících skupin: do první skupiny patří houby, které produkují Lac, LiP a MnP (*Phellinus pini*, *Trametes hirsuta*, *Bjerkandera adusta*, *Phanerochaete chrysosporium*). Druhá skupina je zastoupena houbami *Lentinus edodes*, *Panus tigrinus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Dichomitus squalens*, vykazujícími Mn-peroxidázovou a lakázovou aktivitu. Třetí skupina je charakterizována lignin peroxidázovou a lakázovou aktivitou, jedná se o druhy *Trametes versicolor*, *Phlebia radiata*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii*, *Bjerkandera adusta*. Pro houby, tvořící čtvrtou skupinu (*Pleurotus ostreatus*), je

charakteristická produkce lakázy, arylalkoholoxydázy a dalších aromatických oxidáz (Storoženko a kol., 2000). Zástupci různých taxonomických a ekologických skupin disponují totožnou skladbou enzymů. Ovšem stupeň aktivity extracelulárních enzymů má podstatnou formální a druhovou variabilitu (Geles, 2007).

Lignin peroxidáza (LiP EC 1.11.1.14)

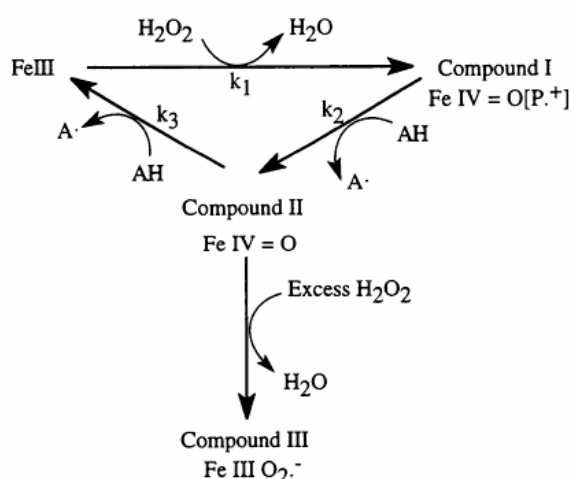
Lignin peroxidáza (diarylpropanoxigenáza, H₂O₂ oxigenáza, lignináza) je Hem obsahující enzym molekulární hmotnosti 38-43 kDa, který se jeví donorem H₂O₂ (Obr. 2). Je schopná oxidovat nefenolické aromatické struktury ligninu za přítomnosti endogenně produkovaného peroxidu vodíku. Tím vzniká aryl-kationtové radikály (Šušla, Svobodová, 2006 cit. podle Hattaka, 2001). Patří sem různé reakce:

1. C α -C β – roztržení propylové skupiny ligninu a modelových sloučenin.
2. Hydroxylace benzylových metylenových skupin.
3. Oxidace benzylových alkoholů na odpovídající aldehydy a ketony.
4. Oxidace fenolů a rozštěpení aromatického kruhu v nefenolových modelových sloučeninách ligninu (Kadimaliev a kol., 2004, Yadav a kol., 2009).



Obr. 2 Model aktivního místa LiP (Zdroj: Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 90, s. 754, 1993, Biochemistry).

Získaný aryl-kationový radikál spontánně ničí různé vazby v závislosti na struktuře a přítomnosti reaktantů. Během svého katalytického cyklu je LiP oxidována H_2O_2 . Dva elektrony z molekuly LiP se odštěpí a vzniká meziprodukt (sloučenina I), který oxiduje substrát odstraněním jednoho elektronu za vzniku redukovanejšího enzymového meziproduktu (sloučenina II). Tento meziprodukt oxiduje další molekulu substrátu odštěpením jednoho elektronu. Tím se enzym vrací do svého původního stavu. Při nízké koncentraci substrátu a nadbytku H_2O_2 může být sloučenina II přeměněna na neaktivní formu enzymu (sloučenina III) (Šušla, Svobodová, 2006 cit. podle Wariishi, 1989). Aromatické látky, jako např. veratrylalkohol a tryptofan brání inaktivaci enzymu v nadbytku H_2O_2 . Za přítomnosti těchto sloučenin s protektivním účinkem je umožněno dokončení katalytického cyklu LiP, protože jsou vhodnějším substrátem pro sloučeninu II (Obr.3) (Šušla, Svobodová, 2006 cit. podle Hattaka, 2001).



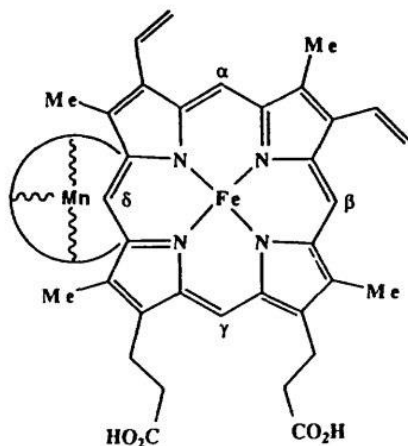
Obr. 3 Katalytický cyklus lignin peroxidázy (Zdroj: Gold a kol., 1989).

Lignin peroxidáza je schopna oxidovat i fenolové sloučeniny. Tento enzym se vyskytuje pouze u malého množství hub např. *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Trametes hirsuta*, *Panus tigrinus*, *Coriolopsis occidentalis* (Risínová, 2007).

Mn-dependentní peroxidasa (MnP EC 1.11.1.13)

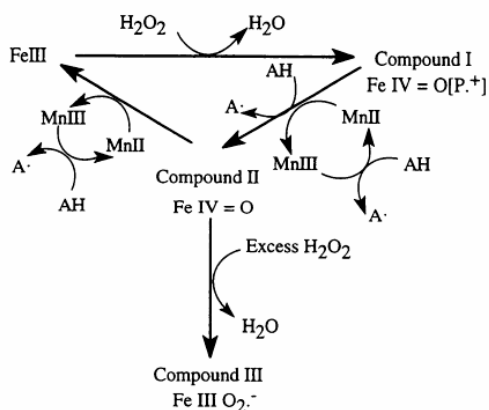
Mn-peroxidasa – hem obsahující enzym, podílející se na depolarizaci syntetického ligninu. Oxiduje fenolové sloučeniny za přítomnosti peroxidu vodíku. Projevuje aktivitu v prostředí obsahující mangan a má molekulární hmotnost kolem 46 kDa. Poprvé byla

isolována při submerzní kultivaci houby *Phanerochaete chrysosporium* (Bolobová a kol., 2002).



Obr. 4 Model aktivního místa MnP (Zdroj: Harris a kol., 1991).

Princip fungování enzymu spočívá v oxidaci Mn^{2+} na Mn^{3+} za použití vodíku jako oxidačního činidla (Obr. 5). Aktivita enzymu je stimulována jednoduchými organickými kyselinami (šřavelová, malonová, mléčná), které stabilizují Mn^{3+} ionty (Kadimaliev a kol., 2004). MnP je často produkována ve formě izoenzymů s různou molekulovou hmotností v rozmezí 45–55 kDa. Izoenzymy MnP jsou rozlišné zejména v izoelektrických bodech, které se nachází spíše v kyselé oblasti (pH 3–4). Katalytický cyklus MnP zahrnuje jak nativní formu enzymu obsahující kation Fe^{3+} , tak reaktivní meziproducty (sloučenina I, II) (Šušla, Svobodová, 2006 cit. podle Hattaka, 2001).

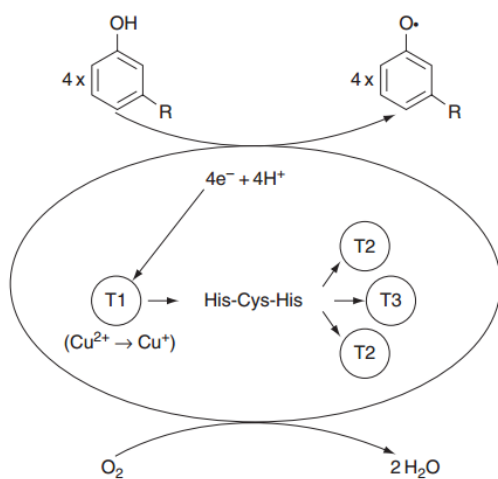


Obr. 5 Katalytický cyklus mangan dependentní peroxidázy (Gold a kol., 1989).

Regenerace Mn je uskutečňována spřaženou reakcí rozkladu peroxidu vodíku. V případě absence H_2O_2 v prostředí, je Mn-peroxidáza sama schopna produkovat peroxid vodíku. Mn-peroxidáza byla zaznamenána u takových hub jako *Trametes versicolor*, *Phlebia radiata*, *Dischomitus squalens* (Risínová, 2007).

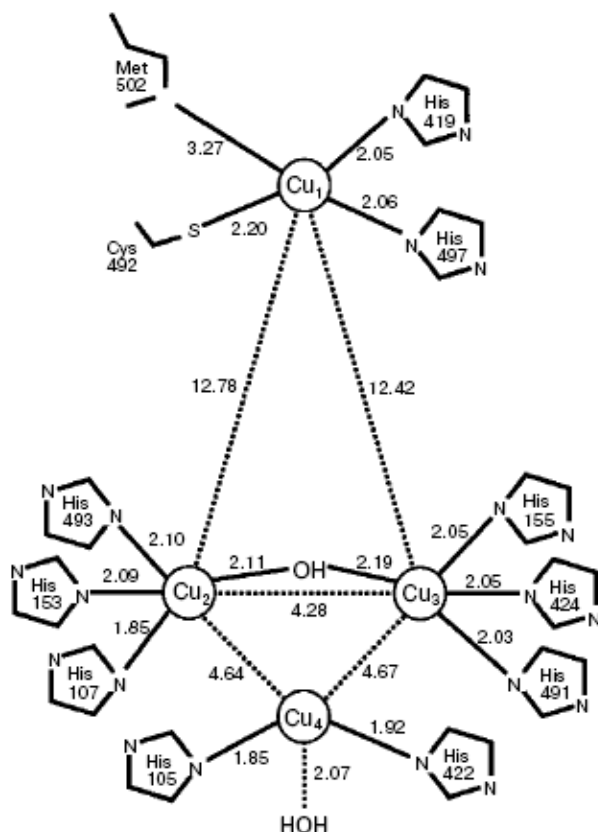
Lakáza (Lac EC 1.10.3.2)

Lakáza (benzendiol: oxid oxidoreduktáza) patří do skupiny oxidás obsahujících měď, které katalyzují čtyřelektronovou oxidaci fenolů, aromatických aminů a fenyldiaminu, přičemž využívají kyslík jako příjemce elektronů a vzniká voda (Obr. 6).



Obr. 6 Katalytický cyklus Lac (Zdroj: P. Singh nee' Nigam, A. Pandey, Biotechnology for agro-industrial residues utilisation, DOI 10.1007/978-1-4020-9942-7 22, Springer Science+Business Media, 2009).

Prakticky veškeré výzkumy lakázy uvádí, že je to monomer, glykoprotein se sacharidovým podílem od 1 do 15 % hmotnosti enzymu, který se skládá ze zbytků manózy a N-acetylglykosaminu (Kadimaliev a kol., 2004). V molekule lakázy ligninolytických hub jsou obsazeny čtyři atomy mědi (všechny v oxidačním stavu 2^+), které jsou rozmístěny mezi třemi odlišnými vazebnými místy a hrají důležitou roli v katalytickém mechanismu enzymu (Obr. 7) (Šušla, Svobodová, 2006 cit. podle Hattaka, 2001).



Obr.7 Schema T1 (Cu₁) a T2/T3 (Cu₄/Cu₂-Cu₃) aktivního místa lakázy CotA (Zdroj: ISSN 0006-2979, Biochemistry (Moscow), 72(10), s. 1136-1150, 2007).

Oxiduje široké spektrum substrátů především na fenolové bázi za současné tvorby fenoxylových radikálů a také nefenolové sloučeniny a to za přítomnosti elektronových přenašečů ABTS (2,2'-azino-bis-[3-etylbenzothiazolin-6-kyselina sulfonová]) či HBT (1-hydroxybenzotriazol) (Kadimaliev a kol., 2004). Kromě využívání lakázy při různých biochemických procesech, vyvolává tento enzym velký zájem z hlediska základních výzkumů jeho struktury a mechanismu katalýzy. Je to podmíněno stavbou aktivního centra lakázy, do kterého vstupují 4 ionty mědi tří různých typů, jejichž koordinované působení v průběhu katalytického procesu jedoelektronové oxidace donátorů elektronů či vodíku, umožňuje uskutečnění zabudování molekulárního kyslíku bezprostředně do vody, přičemž vypouští stádium tvorby peroxidu vodíku (Zahoskina a kol., 2009).

3.5 Využití enzymů dřevokazných hub

Dřevokazné houby můžou rozkládat celou řadu odpadů. K jejich kultivaci se využívá mnoho substrátů, jako jsou piliny, papír nebo rostlinné zbytky. Trh s dřevokaznými houbami se nejvíce rozvíjí v jihovýchodní Asii (státy jako jsou Čína, Korea nebo Vietnam). Hojně se uplatňuje v lékařství, ale současně také v biotechnologiích, mikrobiologii či potravinářství (Hlaváč, Hlaváčová, 2003). Důležitým procesem při průmyslové produkci enzymu je správná kultivace kmenů. Houby musí mít dostatečný zdroj živin, vhodný parciální tlak kyslíku, optimální hodnotu pH a teploty, aby mohly růst a množit se (Šilhánková, 2002, Veselá, Drdák, 1999).

Základní typy kultivace jsou:

Statická kultivace: kultura se naočkuje do tuhého nebo tekutého média. Dochází k vyčerpávání živin a tak k limitaci růstu, hromadí se produkty metabolismu, které často mohou mít inhibiční charakter (Veselá, Drdák, 1999).

Submerzní kultivace: probíhá v tekutém médiu, které je neustále třepáno a provzdušňováno. Růst je aktivnější při submerzní kultivaci než při kultivaci statické. Nevýhodou je nemožnost přesné specifikace aktuálních růstových podmínek a zajištění jejich konstantnosti (Veselá, Drdák, 1999).

3.5.1 Využití v papírenském průmyslu

Dřevokazné houby se začaly používat v papírenském průmyslu za účelem zlepšení kvality dřevěných polotovarů. Unikátní preparát Sylvanex 97, produkováný proslulou společností Clariant, byl na bázi kultury houby *Ophiostoma piliferum*. Prokázalo se, že tato houba skutečně umožňuje snížit obsah pryskyřičných látek ve dřevěné surovině, zlepšit fyzikálně-mechanické vlastnosti této suroviny, regulovat mikroflóru, čímž zabraňuje kontaminaci dřevokaznými houbami. V současné době náleží technologická práva vynálezky této technologie R. Farrell (Parrac Ltd., Nový Zéland) (Yegorová a kol., 2005).

3.5.2 Využití v delignifikaci dřeva

Lignin peroxidáza je enzym, který má velký význam pro biotechnologie a je užívaný při delignifikaci dřeva a získávání alternativního zdroje topiva, při konverzi složek kamenného uhlí na nízkomolekulární frakce, popř. slouží jako surovina pro chemický průmysl. Taktéž je používán ke změkčení a bělení celulózy v papírenském průmyslu,

odstranění trvanlivých organických sloučenin a při polymeraci v průmyslu polymerů (Yegorová a kol., 2005).

3.5.3 Využití v textilním průmyslu

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

3.5.4 Využití jako zdroj biologicky aktivních látek

Vyšší houby nedisponují pouze vysokou výživovou hodnotou, ale taktéž slouží jako zdroj biologicky aktivních látek, což je posouvá na první místo dle kvality levné suroviny pro získání farmakologicky hodnotných složek (Zaikina, 2007, Kutafjevá, 2003). Heteropolysacharidy a chitin-glukanový komplex *Ganoderma applanatum*, *Flamulina vuliteps*, *Fomes fomentarius* disponují výraznými imunostimulačními účinky. Lipidy v komplexu *Agrocybe aegerita*, *Lentinus edodes*, *Lactiporus sulphureus* s buněčnými polysacharidy se projevují antiedematózní aktivitou. Jsou vytvářeny kompozice na bázi extraktů z plodnic, mycelia. Preparát Mykoton na bázi houby *Fomes fomentarius* vykazuje aktivitu vůči širokému spektru onemocnění (Kožemiakina a kol., 2010). Velký význam má získávání biologicky aktivních látek pro medicínské účely – vitamínů, ubichinonů (koenzymů), enzymů, antioxidantů, esenciálních mastných kyselin a aminokyselin, stopových prvků atd. Je prokázána možnost využití odpadů potravinářského průmyslu pro pěstování basidiomycetů, které přitom neztrácejí své pozitivní vlastnosti (Zaikina, 2007).

3.5.5 Biosenzory

Řada biosenzorů obsahujících lakázu byla vyvinuta pro imunoanalýzu, dále pro stanovení glukózy, aromatických aminů a fenolových sloučenin. Montereali a kol. (2010) oznámili, že se jim podařilo detekovat polyfenoly, které jsou přítomné v mošttech a vínech pocházejících z Imoly (Itálie) a to prostřednictvím amperometrického biosenzoru založeného na využití tyrosinasy a lakázy získané z *Trametes versicolor*. Oba enzymy byly imobilizované na grafitových elektrodách modifikovaných prostřednictvím ferrocenu. Biosenzory vykázaly dobré vlastnosti při vzorkování ve srovnání s výsledky, které byly získány na základě spektrofotometrické analýzy. Přítomnost SO₂ však zjevně zabraňovala enzymatické aktivitě a tím došlo k významnému ovlivnění měření, která byla prováděna na mošttech a vínech, jenž byly před nedávnem uzavřeny v lahvích.

Di Fusco a kol. (2010) oznámili, že vyvinuli amperometrický biosenzor, který je založen na lakáze získané z *T. versicolor* a *T. hirsuta* a který slouží ke stanovení polyfenolového indexu ve vínech. Enzymy byly imobilizovány na karbonových elektrodách za použití polyazetidinového prepolymeru (PAP). Prokázali, že účinnost biosenzoru závisí na zdroji lakázy. Výsledky získané při užití lakázy pocházející z *Trametes hirsuta* byly podobné výsledkům, ke kterým se došlo prostřednictvím Folin-Ciocalteuovy metody, zatímco polyfenolový index změřený s lakázou z *Trametes versicolor* nesouhlasil s výsledky uvedenými v referenčním zdroji.

Prasetyo a kol. (2010) uskutečnili studii využití tetramethoxy azobismethylen quinonu (TMAMQ) pro měření aktivity antioxidantů u široké škály strukturně rozličných molekul, které jsou přítomny v potravinách a v lidském organismu. TMAMQ byl vytvořen prostřednictvím oxidace syringaldazinu s lakázami a byl použit za účelem detekce antioxidační aktivity u různých potravin.

Ibarra-Escutia a kol. (2010) vyvinuli a optimalizovali amperometrický biosenzor, který je založený na lakáze získané z *Trametes versicolor*, sloužící pro sledování obsahu fenolických sloučenin v čajových nálevech. Tento biosenzor vykázal vynikající stabilitu a snadné použití v rámci výrobního procesu, lze ho užívat pro přesné stanovení obsahu fenolů a to bez nutnosti předchozí úpravy vzorku.

3.5.6 Využití v potravinářském průmyslu

Mnoho lakázových substrátů, jako jsou karbohydráty, nenasycené mastné kyseliny, fenoly a thiol-obsahující proteiny, jsou důležitou součástí různých potravin a nápojů. Jejich modifikace prostřednictvím lakázy může vést k nové funkčnosti, zlepšení kvality a snížení nákladů. Lakázu lze využít v rámci jistých procesů, které zvýrazňují či pozměňují barevný vzhled potravin a nápojů (Minussi a kol., 2002, Nielsen a kol., 2000).

Stabilizace vína

Stabilizace vína představuje jedno z hlavních využití lakázy v potravinářském průmyslu, jakožto alternativy k fyzikálně-chemickým absorbentům (Minussi a kol., 2002). Mošty a vína představují komplexní směs různých chemických sloučenin, jako jsou etanol, organické kyseliny (aroma), soli a fenolické sloučeniny (barva a chuť). Odstranění polyfenolů musí být selektivní, aby se zabránilo nežádoucímu pozměnění organoleptické charakteristiky vína. Lakáza splňuje některé důležité požadavky jako je stabilita v kyselém prostředí a reverzibilní inhibice se sulfidem (Tanrioven, Eksi, 2005). Kromě toho se lakáza komerčním způsobem nabízí pro výrobu korkových zátek pro láhve na víno. Oxidativním způsobem redukuje charakteristický pach a trpkost korku, která se velice často vyskytuje u starých vín (Conrad a kol., 2000).

Stabilizace piva

Doba přechovávání piva je závislá na různých faktorech, jako je vznik zákalu, obsah kyslíku a teplota. V prvním případě dochází ke vzniku zákalu prostřednictvím malých množství přirozeně se vyskytujících proanthocyanidinů, polyfenolů, které vedou ke srážení proteinů a tak ke vzniku zákalu (Mathiasen, 1995). Dochází k tomu obvykle v průběhu chlazení, přičemž může dojít k opětovnému rozpuštění tohoto zákalu při pokojové teplotě (Minussi a kol., 2002). Ke vzniku tohoto zákalu může v případě dlouhodobého přechovávání dojít dokonce i u produktů, u nichž zákal při jejich balení nevzniká. Vznik zákalu je tak v pivovarnickém průmyslu přetrvávajícím problémem (McMurrough a kol., 1999). Využití lakázy pro oxidaci polyfenolů jako alternativy tradičního ošetření již bylo vyzkoušeno různými autory (Mathiasen, 1995, Giovanelli, 1989, Rossi a kol., 1988). Lakáza však již byla také využita pro účely odstranění kyslíku na konci procesu výroby piva. Podle Mathiasena (1995) by na konci tohoto procesu mohla

být lakáza přidávána, aby se tak odstranil nežádoucí kyslík ve finálním pivním produktu a dosáhlo se tak prodloužení doby jeho přechovávání. Pro komerční účely se rovněž na trhu nabízí lakázový přípravek s názvem „Flavourstar“, který vyrábí Novozymes A/S a který se využívá v pivovarnictví za účelem zabránění vzniku „off-flavour“ (např. trans-2-nonenal) prostřednictvím shromažďování kyslíku, který by jinak reagoval s mastnými kyselinami, aminokyselinami, proteiny a alkoholem a vytvářel tak „off-flavour“ prekurzory.

Zpracování ovocných šťáv

Od třicátých let dvacátého století se studují enzymatické přípravky pro filtraci šťáv (Minussi a kol., 2007). Interakce mezi proteiny a polyfenoly vede ke vzniku zákalu či usazenin v pročištěných ovocných šťávách. Proto jsou pročištěné ovocné šťávy typicky stabilizovány, aby se tak oddálil začátek tvorby proteino-polyfenolového zákalu (Siebert a kol., 1996). Několik autorů navrhlo využít lakázu pro stabilizaci ovocných šťáv (Neifar a kol., 2011, Sammartino a kol., 1998, Giovanelli, Ravasini, 1993, Stutz, 1993, Ritter a kol., 1992, Cantarelli, Giovanelli, 1990, Maier a kol., 1990, Cantarelli 1986), výsledky jsou však rozporuplné.

Na jedné straně Sammartino a kol. (1998) porovnali ošetření jablečné šťávy prostřednictvím konvenční metody (přidání SO₂, metabisulfit, polyvinylpyrrolidone (PVPP), bentonit) s uplatněním volné a imobilizované lakázy. Poukázali na to, že enzymaticky ošetřené šťávy jsou méně stabilní nežli šťávy ošetřené konvenčním způsobem. Giovanelli a Ravasini (1993) a Gokmen a kol. (1998) prostřednictvím testů stability vysoce filtrovaných vzorků poukázali na skutečnost, že ošetření lakázou zvýšilo náchylnost ke hnědnutí v průběhu přechovávání.

Na druhé straně Cantarelli (1986) užil mutantní lakázu od *Polyporus versicolor* k ošetření šťávy černého grepu. Ukázal, že bylo odstraněno 50 % celkového množství polyfenolů a došlo k vyšší stabilizaci než v případě fyzikálně-chemického ošetření. Uplatnění lakázy ve spojení s filtračním procesem prokázalo lepší výsledky. Tímto způsobem získali Ritter a kol. (1992) a Maier a kol. (1990) stabilní a čistou jablečnou šťávu a to tak, že využili lakázu v kombinaci s křížovou filtraceí (ultrafiltrací) v rámci kontinuálního procesu bez přidání finálních činidel. Cantarelli a Giovanelli (1990) poukázali na skutečnost, že uplatnění lakázy, po kterém následovala „aktivní“ filtrace či

ultrafiltrace, přidáním askorbové kyseliny a sulfidů, zlepšilo stabilitu barvy a chuti ve srovnání s konvenčními způsoby úpravy.

Rovněž Stutz (1993) využil lakázu a ultrafiltraci k tomu, aby získal čistý a stabilní koncentrát šťávy o světlé barvě. Artik a kol. (2004) studovali účinky využití lakázy za účelem stabilizace čistoty višňové šťávy. Zjistili, že vysoké čistoty bylo přidáním lakázy dosaženo v případě zahřátí na teplotu 50°C po dobu 6 hodin a vyfiltrováním přes membránu 20 kDa po 1 h oxidace. Došlo rovněž k poklesu obsahu fenolu o přibližně 70 %.

V nedávné době použili Neifar a kol. (2011) kombinovaný ultrafiltrační lakázový postup pro dosažení kontroly nad vznikem zákalu a zahnědnutí šťávy z granátových jablek. Provedli optimalizaci ošetření lakázou (koncentrace lakázy 5 U/mL; inkubační doba 300 min.; inkubační teplota 20 °C), po níž následovala ultrafiltrace, a dosáhli tak čisté a stabilní šťávy z granátových jablek.

Pečení

Lakázy se v současné době těší zájmu v oblasti pekárenství. Studie udávají, že při pečení za použití lakázy dochází u těsta ke zvýšení jeho síly, stability a snížení jeho lepkavosti a tím i zlepšení jeho zpracovatelnosti pomocí strojního zařízení. Kromě toho bylo zaznamenáno zvětšení objemu pečiva a zlepšená struktura drobků a měkkost (Labat a kol., 2000, Si, 1994).

Selinheimo a kol. (2006) poukázali na skutečnost, že lakáza získaná z bílé plísňovité houby *Trametes hirsuta* zvýšila maximální odolnost těsta a snížila jeho roztažnost a to jak u těsta moučného tak i těsta lepkového. Dospěli k závěru, že účinek lakázy spočívá především v křížném spojování esterované ferulické kyseliny (FA) na arabinoxylanovou (AX) frakci těsta, jenž vede ke vzniku silné sítě AX. Lepkové těsto, které bylo ošetřeno lakázou, rovněž vykazovalo určitou míru tuhosti, což napovídá, že lakáza může rovněž do určité míry mít účinek na matici lepkového proteinu. Tento ztužovací účinek lakázy byl však jasně nižší u lepkového těsta. Frakce AX je tedy u moučného těsta pro lakázu převládajícím substrátem a jeho aktivita je původcem tohoto ztužovacího účinku. Zajímavé je, že moučné těsto ošetřené lakázou v důsledku prodloužené inkubace změklo, míra tohoto změkčení stoupala se zvyšující se dávkou lakázy. To vede k domněnce, že toto změkčení má svůj původ v katalyzovaném rozkladu radikálů křížně spojené sítě AX.

Renzetti a kol. (2010) zjistili, že komerční lakázový přípravek výrazným způsobem zvýšil efektivitu procesů při produkci chleba z ovesné mouky a texturní jakost ovesného chleba tím, že došlo ke zvýšení specifického objemu a snížení tvrdosti drobků a žvýkavosti. Zvýšená efektivita při produkci chleba má vztah k vyšší vlhkosti, tvárnosti a elasticitě ovesného těsta s přidanou lakázou.

Zlepšení senzorických parametrů potravin

Pokles fyzikálně-chemických parametrů u potravinových produktů představuje jeden z hlavních problémů, který se váže k rozvoji skladovacích a distribučních systémů a ovlivňuje, jakým způsobem konzumenti vnímají jakost těchto produktů. Proto se u některých potravinových produktů užívají různé lakázy, aby se dosáhlo kontroly aroma, lepší chutě či redukci nežádoucích látek obsažených v produktu (Minussi a kol., 2002).

Takemori a kol. (1992) použil syrovou lakázu získanou ze *Coriolus versicolor* ke zlepšení aromatu a chutě u kakaových produktů. Díky ošetření lakázou došlo k odstranění hořkosti a nepříjemných pachutí u čokolády, která se z kakaové hmoty vyrábí. Měla lepší chuť než čokoláda z kontrolní várky.

Dalším typem potravinových produktů, u kterých se lakáza může využívat ke zlepšení senzorických vlastností, je olej. Olejové produkty lze deoxygenovat přidáním účinného množství lakázy (Petersen a kol., 1996). Rostlinné oleje (např. sojový olej), se vyskytují v mnoha potravinách, jako jsou dressingy, saláty, majonézy a jiné omáčky. Sojový olej obsahuje velké množství linolové a linolenové kyseliny, které mohou reagovat s kyslíkem rozpuštěným v produktu, přičemž vznikají nežádoucí těkavé sloučeniny. Proto může být kvalita aromatu některých olejů zlepšena tak, že se eliminuje kyslík, který je v oleji přítomen. Jiné potravinové produkty (např. šťávy, polévky, koncentráty, pyré, kaše a omáčky) lze rovněž deoxygenovat prostřednictvím lakázy (Petersen, Mathiasen, 1996).

Bouwens a kol. (1997) poukázali na skutečnost, že barvu čajových produktů lze zlepšit prostřednictvím lakázy, která se získává z druhu *Pleurotus*. Stejným způsobem byly rovněž ošetřeny nasekané olivy ve vodním nálevu lakázou získanou z *Trametes villosa*. V tomto případě došlo ke značnému snížení trpké chuti a ztmavnutí barvy ve srovnání s kontrolní várkou.

Tsuchiya a kol. (2000) použili rekombinantní lakázu získanou z *Myceliophthora thermophilum* a chlorogenovou kyselinu za účelem kontroly nežádoucího zápachu cysteinu. Poukázali na skutečnost, že enzymaticky ošetřený cystein vykazuje pouze slabý

zápach, zatímco cystein, který ošetřen nebyl, vykazuje silný charakteristický zápach H₂S. Analýza HPLC prokázala snížení cysteinu o více než 50 %.

Želirování pektinu cukrové řepy

Pektin z cukrové řepy představuje funkční potravinovou přísadu, která může vytvářet termicky nereverzibilní gely. Tyto typy gelů jsou pro potravinářský průmysl velice zajímavé, jelikož je lze zahřívat a zároveň zachovat strukturu gelu (Norsker a kol., 2000).

Norsker a kol. (2000) provedli rozbor gelovacího účinku dvou lakáz a peroxidázy u potravinových produktů. Zjistili, že lakázy vykazaly vyšší účinnost jako gelovací činidla v případě masa a mléka, než tomu bylo u peroxidázi. Kromě toho je v mnoha zemích zakázáno přidávat peroxidy vodíku do potravinových produktů, což využití peroxidázi jakožto ztužovacího činidla znemožňuje. Proto se jeví praktičtější přidávat do potravinových produktů lakázu.

Kuuva a kol. (2003) poukázali na skutečnost, že využitím lakázy jakožto křížně-spojovacího činidla spolu s vápníkem lze měnit poměr kovalentních a elektrostatických křížných vazeb gelů pektinu cukrové řepy a je tak možno upravovat různé typy gelových struktur.

Littoz a McClements (2008) zjistili, že lakázu lze využít za účelem kovalentního křížného spojení molekul pektinu cukrové řepy adsorbovaných k povrchu lipidových kapek pokrytých proteiny při hodnotě pH 4.5, což napovídá, že by mohly být připraveny emulze se zlepšenými funkčními vlastnostmi prostřednictvím biomimetického přístupu s využitím enzymů (lakáz) k navázání křížných spojení u adsorbovaných biopolymerů.

Biologická sanace odpadních vod produkovaných v potravinářském průmyslu

Přítomnost fenolů ve vypouštěných vodách v zemědělství a průmyslu vyvolala zájem o procesy, které jsou založeny na využití lakázy za účelem úpravy odpadních vod a jejich biologickou sanaci. Přítomnost fenolických sloučenin v pitné a zavlažovací vodě nebo v zemědělské půdě představuje závažné riziko pro zdraví a/nebo ochranu životního prostředí. Jelikož se státní regulace ohledně předcházení znečištění stává stále přísnější, je nutno hledat v oblasti průmyslu efektivnější technologie pro ošetření odpadních vod.

Určitý podíl odpadních vod produkovaných při výrobě piva představuje závažný problém v ochraně životního prostředí a to z důvodu vysokého obsahu polyfenolů a jejich tmavě hnědé barvy (Fiestas, 1981).

Odpadní voda v rámci destilačního procesu vzniká při výrobě etanolu při fermentaci třtinové melasy (vinázy). To vede k závažným ekologickým následkům z důvodu jejího vysokého obsahu v rozpustné organické hmotě a její intenzivně tmavohnědé barvě. Skutečností je, že vináza v rámci průmyslové výroby etanolu představuje závažný ekologický problém a je považována za nejagresivnější vedlejší produkt, který vzniká při průmyslovém zpracování cukrové třtiny. Většinu organické hmoty, jenž se nachází ve vináze, lze zredukovat prostřednictvím konvenční anaerobně-aerobní digesce, avšak zabarvení lze takto odstranit ztěží. Důsledkem je, že tato látka představuje potenciální zdroj znečištění vod, protože zabraňuje přístupu světla v řekách a potocích. Nemůže tedy docházet ke vzniku kyslíku prostřednictvím fotosyntézy a dochází tak k vyvolání eutropikace (Valdez, Obaya, 1985).

Strong a Burgess (2008) uskutečnili studii fungální (*Trametes pubescens*) a enzymatické (lakáza získaná z *Trametes pubescens*) sanace různých odpadních vod z průmyslových destilérií a zjistili, že fungální kultura vykázala mnohem lepší vlastnosti, než tomu bylo v případě využití samotné lakázy při odstraňování jak celkových fenolických sloučenin tak i zabarvení.

Odpadní voda produkovaná při zpracování oliv (OMW) představuje charakteristický vedlejší produkt při výrobě olivového oleje a závažný ekologický problém v oblasti Středomoří. V této oblasti se vyprodukuje 30 milionů m³ OMW (Fiestas, 1981) v důsledku čehož vzniká 2.5 litru odpadních látek na litr vyprodukovaného oleje (Borja a kol., 1992). OMW obsahuje vysokou koncentraci fenolových sloučenin (až 10 g/L) (Borja a kol., 1992, Klibanov a kol., 1983) jenž jsou vysoce toxické (Strong, Burgess, 2008, Fedorak, Hruđey, 1984).

Pro OMW je charakteristická tmavě červená až černá barva, v závislosti na stáří a typu zpracovaných oliv (Jaouani a kol., 2003), nízká hodnota pH (~ 5), vysoký obsah soli a organických látek se zvýšenou koncentrací aromatických sloučenin (D'Annibale a kol., 2004), mastných kyselin, pektinů, cukru, taninů a fenolických sloučenin, a to zvláště polyfenolů (Jaouani a kol., 2003).

Z důvodu velkého počtu sloučenin, z nichž mnoho vykazuje znečišťující, fytotoxické a antimikrobiální vlastnosti mají odpadní látky OMW velice škodlivý vliv na lidské zdraví a životní prostředí a jejich eliminace představuje jeden z hlavních ekologických problémů všech industriálních zemí (Paredes a kol., 1999).

Martirani a kol. (1996) publikovali zprávu, že ošetření odpadních vod OMW, které produkuje výroba olivového oleje v Abruzzo (Itálie), pomocí vyčištěné lakázy získané z *Pleurotus ostreatus* vedlo k výraznému snížení fenolického obsahu (až 90 %), avšak v rámci testů na *Bacillus cereus* nebylo pozorováno žádné snížení toxicity.

Gianfreda a kol. (1998) zjistili, že lakáza získaná z *Cerrena unicolor* prokázala svou schopnost oxidovat různé fenolické látky, které se v OMW obvykle vyskytují, přičemž oxidační poměr kolísal od 60 do 100 % po 24 h inkubace lakázy.

D'Annibale a kol. (1999) použili lakázu z bílé plísňovité houby *Lentinula edodes* imobilizované na chitosanu k úpravě OMW, která vzniká v rámci produkce ve výrobně olivového oleje nacházející se ve Viterbo (Itálie). Dospěli ke zjištění, že ošetření OMW pomocí imobilizované lakázy vedlo k částečnému odstranění zabarvení a také k významnému poklesu obsahu polyfenolů a ortodifenolů spolu se snížením toxicity odpadní vody. Poukázali rovněž na skutečnost, že uplatnění oxiranově imobilizované lakázy získané z *Lentinula edodes* vedlo k účinnému odstranění fenolů OMW (D'Annibale a kol., 2000).

Casa a kol. (2003) provedli výzkum s cílem prozkoumat potenciální možnosti lakázy získané z *Lentinula edodes* za účelem eliminace fytotoxicity OMW. Za tímto účelem uskutečnili testy klíčivosti na tvrdé pšenici (*Triticum durum*) s různými roztoky surové OMW či OMW ošetřené lakázou. Ošetření lakázou vedlo k 65 % až 86 % snížení celkového obsahu fenolů a ortodifenolů, z důvodu jejich polymerizace, jak dokládá chromatografie. Klíčivost tvrdé pšenice se kromě toho zvýšila o 57 % v případě roztoku 1:8 a o 94 % u roztoku 1:2 ve srovnání se stejnými roztoky OMW, které nebyly ošetřeny.

Attanasio a kol. (2005) uskutečnili studii ohledně uplatnění ne-izotermálního bioreaktoru s lakázou získanou z *Trametes versicolor* imobilizovanou na nylonové membráně k detoxifikaci OMW a prokázali, že technologie ne-izotermických bioreaktorů je při ošetření OMW velice prospěšná.

Jaouani a kol. (2005) provedli studii ohledně purifikované lakázy získané z *Pycnoporus coccineus* při odbourávání aromatických sloučenin z OMW. Dospěli ke zjištění, že ošetření OMW pomocí lakázy vedlo k podobným výsledkům, které již byly předtím zaznamenány u hub a které naznačují, že lakáza by v rámci procesu odbourávání mohla hrát důležitou úlohu.

Berrio a kol. (2009) realizovali studii ohledně ošetření OMW pomocí lakázy získané z *Phaseolus coccineus* a imobilizované na Eupergit C 250 L. Gelové filtrační profily

OMW ošetřené pomocí imobilizovaného enzymu (při pokojové teplotě po dobu 8 h) prokázaly jak odbourávání, tak i polymerizaci fenolických sloučenin.

Quarantino a kol. (2007) publikovali zjištění, že fenoly představují hlavní determinanty fytotoxicity OMW a ukázali na skutečnost, že využití komerčních přípravků lakázy (DeniLite, Novo Nordisk, Denmark) by mohlo být velkým příslibem v oblasti bezpečnějšího využití odpadních vod.

Iamarino a kol. (2009) provedli studii schopností lakázy získané z *Rhus vernicifera* při odbourávání a detoxifikaci vzorků OMW o různé komplexnosti a s různým složením.

Pant a Adholeya (2009) užili koncentrovaný enzymatický extract z pevných fermentačních (SSF) kultur různých hub na pšeničné slámě s cílem eliminovat zabarvení odpadních vod produkovaných v destilérii. Podle jejich zprávy bylo dosaženo maximální eliminace zabarvení 37 % v neředěných odpadních vodách produkovaných destilérií a to prostřednictvím užití extraktu z *Pleurotus florida* EM1303 z důvodu jeho vysoké schopnosti produkovat lakázu.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Princip stanovení aktivit ligninolytických enzymů

Houby bílé hniloby patří mezi nejvýznamnější producenty ligninolytických enzymů, díky kterým jsou schopny degradovat širokou škálu sloučenin, včetně ligninu. Patří mezi oxidačně-redukční enzymy. Vzhledem k velké polymerní molekule ligninu (substrátu ligninolytických enzymů) patří mezi extracelulárně produkované enzymy, kterými může být zahájena jeho degradace (Novotný, 2004). Ligninolytické houby mohou produkovat různé izoenzymy. Navíc jsou tyto enzymy kódovány vždy několika geny, a proto se mohou lišit svými katalytickými vlastnostmi v závislosti na vnějších podmínkách.

Pro stanovení enzymové aktivity se používá řada metod (spektrofotometrických, fluorescenčních, polarimetrických, radiometrických, elektrodoých a speciálních). Často se nejprve vychází z orientačních stanovení, která jsou lehce proveditelná a finančně nenáročná ([multitext/vyuka](#)).

Všechna stanovení aktivit ligninolytických enzymů budou měřena spektrofotometricky na spektrofotometru UV/VIS Lambda 25 Spectrophotometer (Perkin-Elmer). Při měření volných ligninolytických enzymů bude absorbance reakčních směsí vždy odečítána při dané vlnové délce po 1 minutě. Změna absorbance během reakce se dosadí do vztahu pro výpočet enzymové aktivity (EA) [U/l] (Obr.8) (1 U= 1 μmol/min).

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

kde je ΔA – změna absorbance za 60 s měření

ε - molární extinkční koeficient při dané vlnové délce ($l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$)

V_{rs} – objem reakční směsi

V_e – objem enzymového preparátu.

Enzymová jednotka EA [U] je podle tohoto vztahu definována jako takové množství enzymu, které přemění 1 μmol substrátu za 1 min za standardních podmínek. Jako vzorek enzymu je použit zcentrovaný supernatant (10 000 rpm, 4 °C, 5 min), který byl připravený kultivací kmene houby.

4.2 Chemikálie

- ABTS (2,2'-azino-bis-[3-etylbenzothiazolin-6-kyselina sulfonová]), Sigma Aldrich (Německo)
- Bramboro-dextrózový agar (Potato-Dextrose Agar), Himedia Laboratories Limited, Indie
- Bramborovo-dextrózový bujón (Potato-Dextrose Broth), Himedia Laboratories Limited, Indie
- Destilovaná voda, Mendelova univerzita Brno
- DMP – dimethoxyfenol, Sigma Aldrich (Německo)
- EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová), Sigma Aldrich (Německo)
- Ethanol (99%) p.a., Sigma Aldrich (Německo)
- Hydrogenfosforečnan sodný $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Sigma Aldrich (Německo)
- Hydroxid sodný, NaOH, Sigma Aldrich (Německo)
- Kyselina malonová, $\text{CH}_2(\text{COOH})_2$, Sigma Aldrich (Německo)
- Kyselina octová, Lachema (ČR)
- Kyselina vinná, $\text{HOOC}(\text{CHOH})_2\text{COOH}$, Sigma Aldrich (Německo)
- Octan sodný $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Lachema (ČR)
- Peroxid vodíku, H_2O_2 , Sigma Aldrich (Německo)
- Síran amonný, Sigma Aldrich (Německo)
- Síran manganatý, MnSO_4 , Sigma Aldrich (Německo)
- VA – Veratrylalkohol, Sigma Aldrich (Německo)

4.3 Biologický materiál

Jednotlivé druhy hub hnědé hniloby byly získané ze Sbírký organismů Lesnické a dřevařské fakulty Mendelovy univerzity v Brně, Ústav ochrany lesa a myslivosti, Česká republika.

Název (rod, druh)	Zkratka	Lokalita	GPS	Dřevina
<i>Laetiporus sulphureus</i> (Sírovec žlutooranžový)	LS	CHKO Litovelské pomoraví, PR Vrapač	49°44'24.3"N 17°00'53.8"E	<i>Quercus sp.</i> (Dub)
<i>Serpula lacrymans</i> (Dřevomorka domácí)	SL	Dolní Kounice	49°04'27.5"N 16°28'27.8"E	<i>Pinus</i> (Borovice)
<i>Serpula lacrymans</i> (Dřevomorka domácí)	SL1	Beskydy	49°31'59.4"N 18°39'57.6"E	<i>Cedrus</i> (Cedr)
<i>Laetiporus sulphureus</i> (Sírovec žlutooranžový)	LS1	Tišnov	49°20'45.6"N 16°26'13.9"E	<i>Prunus domestica</i> (Švestka domácí)
<i>Laetiporus sulphureus</i> (Sírovec žlutooranžový)	LS2	Lomnice u Tišnova	49°24'32.8"N 16°25'14.0"E	<i>Cerasus sp.</i> (Višeň obecná)
<i>Gloeophyllum sepiarium</i> (Trámovka plotní)	GS	Arboretum Křtiny, buková část u cesty	49°19'07.7"N 16°45'35.0"E	<i>Fagus sylvatica</i> (Buk lesní)
<i>Laetiporus montanus</i> (Sírovec horský)	LM	NP Šumava, Boubín	48°58'20.0"N 13°38'00.0"E	<i>Picea excelsa</i> (Smrk ztepilý)

<i>Serpula lacrymans</i> (Dřevomorka domácí)	SL2	Kuřim	49°17'39.3"N 16°31'52.8"E	<i>Pinus</i> (Borovice)
<i>Phaeolus schweinitzii</i> (hnědák Schweinitzův)	PS	ŠLP arboretum Křtiny	49°18'24.4"N 16°37'14.4"E	<i>Picea abies</i> živý strom (Smrk ztepilý)

4.4 Přístrojové vybavení

Analytické váhy RADWAG

Autokláv TUTTNAUER

Centrifuga EPPENDORF

Laminární box LABOX

Spektrofotometr UV/VIS Lambda 25, PERKIN ELMER

Temperovaná třepačka BIOSAN

Termostat ECOCELL

4.5 Použité roztoky a jejich příprava

0,1 M sodno-octanový pufr pH 4,5 pro substrát ABTS:

1,2 ml kyseliny octové bylo přidáno ke 100 ml destilované vody. 2,7 g octanu sodného $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ bylo rozpuštěno ve 100 ml destilované vody. Poté bylo odebráno 91,5 ml roztoku kyseliny octové a 58,5 ml roztoku octanu sodného $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ a doplněno destilovanou vodou na objem 150 ml. pH pufru se upravilo pomocí 1M NaOH.

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

1,5 g kyseliny vinné se rozpustí ve 100 ml deionizované vody. NaOH (3 M) byl použit pro úpravu pH.

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

0,685 g kyseliny malonové bylo rozpuštěno ve 100 ml deionizované vody. NaOH (3 M) byl použit pro úpravu pH.

10 mM ABTS:

10 mg tableta ABTS byla rozpuštěna v 1,8 ml 0,1 M sodno-octanovém pufru.

Bramboro-dextrózové živné médium (Potato-Dextrose Broth)

Příprava: rozpustit 24 g ve 1000 ml destilované vody. Sterilizace se provádí v autoklávu po dobu 15 minut. Dobře promíchat před dávkováním do Erlenmeyerových baňek.

Bramboro-dextrózový agar (Potato-Dextrose Agar)

Příprava: rozpustit 39 g ve 1000 ml destilované vody. Míchát za varu po dobu jedné minuty za účelem úplného rozpuštění média. Sterilizace se provádí v autoklávu po dobu 15 minut. Dobře promíchat před dávkováním na Petriho misky.

4.6 Kultivace houbové kultury

Kultury hub se kultivovaly na bramboro-dextrózovém agaru (Potato-Dextrose agar) na Petriho miskách 10 dní v termostatu při teplotě 22 °C ve tmě. Z Petriho misek byly vyřezány 3 disky o rozměru 1x1 cm² a použity pro naočkování 40 ml tekutého média (Potato-Dextrose Broth) v Erlenmeyerových baňkách. Byla provedena submerzní kultivace po dobu 24 dní na třepačkách se 25 mm orbitálním pohybem při rychlosti 200 otáček za minutu (RPM) v živném médiu při teplotě 25 °C. V pravidelných intervalech po 4, 8, 12, 16, 20, a 24 dnech byly odebrány aliquoty a byla měřena aktivita lakázy, lignin peroxidázy a mangan-dependentní peroxidázy. Enzymatická aktivita se měřila třikrát a byl stanoven průměr a směrodatná odchylka.

4.7 Stanovení lakázové aktivity

Houbová kultura byla po kultivaci centrifugována při 10000 ot/min, 4°C po dobu 5 minut. Ke stanovení enzymové aktivity byl následně použit supernatant. Jako substrát byl použit roztok 10 mM ABTS. Reakce probíhala tak, že se do kyvety napipetovalo 900 µl pufru (0,1 M sodno-octanového pufru pH 4,5), 50 µl supernatantu a 50 µl substrátu. Po minutě inkubace byla změřena absorbance při 415 nm a následně odečítány změny absorbance v časovém intervalu po 1 minutě. Do blanku bylo místo supernatantu přidáno 50 µl vody. Jednotka aktivity byla definována jako množství enzymu katalyzující

přeměnu substrátu doprovázenou nárůstem absorbance v čase, k výpočtu byl použit extinkční koeficient ($\epsilon=36000 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

4.8 Stanovení aktivity lignin peroxidázy

Pro stanovení LiP aktivity byla použita kultura připravená stejně jako v kapitole 4.6. a 4.7. Aktivita LiP se stanoví na základě změny spektrofotometrických vlastností veratrylalkoholu (VA) po jeho přidání do reakční směsi při vlnové délce 310 nm. Reakční směs o objemu 1000 μl obsahovala 775 μl vinanového pufru (100 mM), 50 μl H_2O_2 (54 mM), 150 μl supernatantu, 25 μl veratrylalkoholu (25 mM). Reakce byla zahájena přidáním VA. K výpočtu byl použit extinkční koeficient pro VA ($\epsilon = 9300 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

4.9 Stanovení aktivity mangan-dependentní peroxidázy

Pro stanovení MnP aktivity byla použita kultura připravená stejně jako v kapitole 4.6.a 4.7. Aktivita MnP se stanoví na základě změny spektrofotometrických vlastností 2,6-dimethoxyfenolu (DMP) po jeho přidání do reakční směsi při vlnové délce 469 nm. Pro stanovení enzymové aktivity MnP byly připraveny dvě různé reakční směsi (I, II). Reakce byla zahájena přidáním DMP. K výpočtu se použil extinkční koeficient pro DMP ($\epsilon = 49600 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Aktivita enzymu [U/l] pro MnP se určí jako rozdíl naměřených aktivit pro reakční směsi I, II podle rovnice $\text{EA (MnP)} = \text{EA (I)} - \text{EA (II)}$.

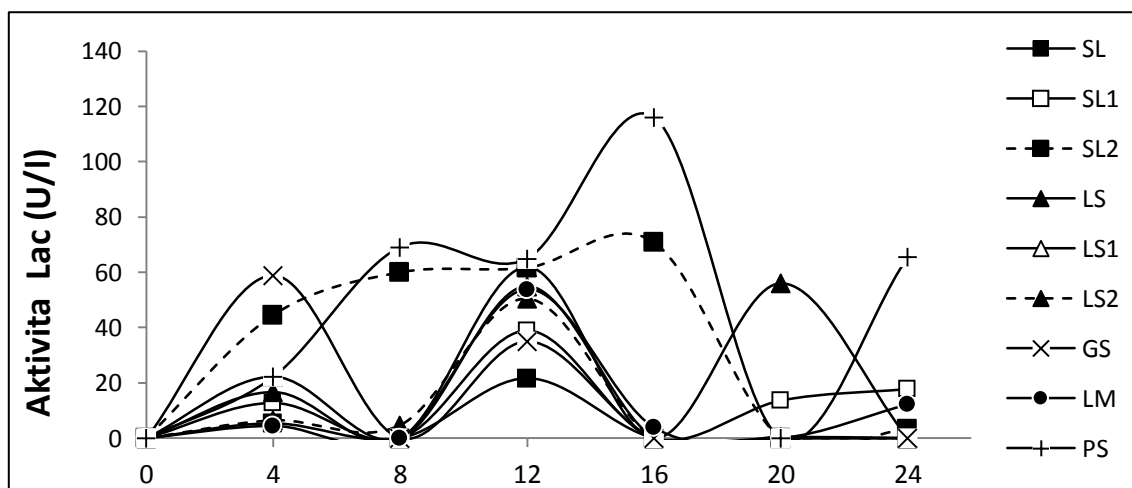
Reakční směs	I	II
	[μl]	[μl]
Malonátový pufr	760	760
10 mM H_2O_2	40	40
20 mM MnSO_4	50	-
20 mM EDTA	-	50
Supernatant	100	100
20 mM DMP	50	50

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Stanovení enzymových aktivit bylo provedeno dle uvedených postupů u vybraných druhů hub hnědé hniloby. Produkce enzymů byla sledována v závislosti na čase. Stanovení enzymových aktivit v médiu bylo provedeno 4., 8., 12., 16., 20., a 24. den kultivace.

Aktivita lakázy byla vyjádřena jako množství oxidovaného substrátu působením enzymu vztaženo na čas a množství supernatantu [U/l]. Jako substrát pro stanovení lakázové aktivity byl použit roztok ABTS (2,2'-azino-bis-[3-etylbenzothiazolin-6-kyselina sulfonová]). V grafu 1 jsou uvedeny aktivity lakázy produkované různými kmeny hub hnědé hniloby v závislosti na čase kultivace.

Aktivita mangan-dependentní peroxidázy a lignin peroxidázy byla vyjádřena jako množství oxidovaného substrátu působením enzymu vztaženo na čas a množství supernatantu [U/l]. Při stanovení aktivity mangan-dependentní peroxidázy byly použité 2 reakční směsi s $MnSO_4$ a EDTA. Enzymatická aktivita pro MnP se určí jako rozdíl naměřených aktivit pro reakční směsi I, II. Jako substrát pro stanovení aktivity ligninperoxidázy byl použit roztok veratrylalkoholu (3,4-dimethoxybenzyl alkohol). V grafech 2 a 3 jsou uvedeny závislosti aktivit mangan-dependentní peroxidázy a ligninperoxidázy produkované různými kmeny hub hnědé hniloby v závislosti na čase kultivace.

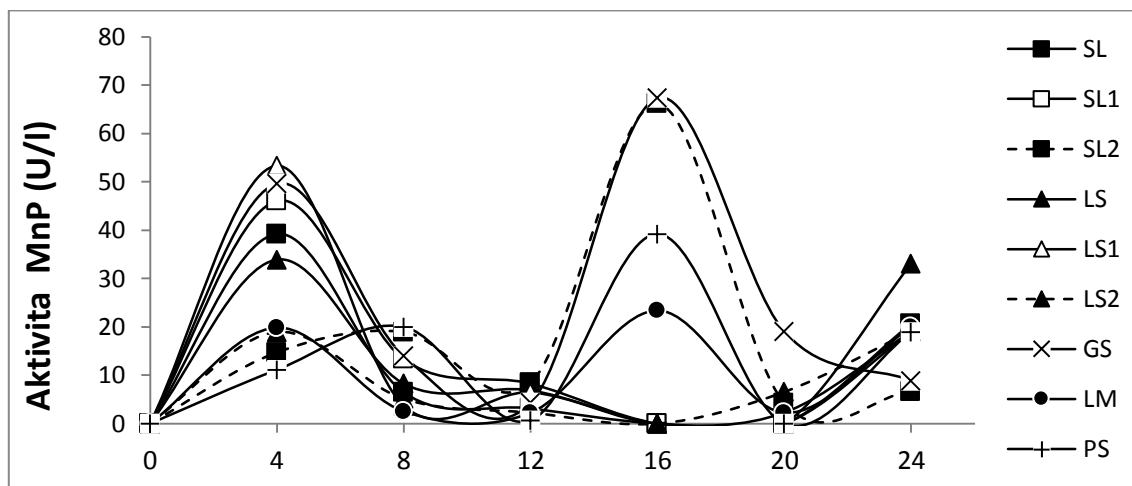


Graf 1: Závislost aktivity lakázy na době kultivace

Aktivita byla měřena třikrát, směrodatná odchylka je menší než 5 %.

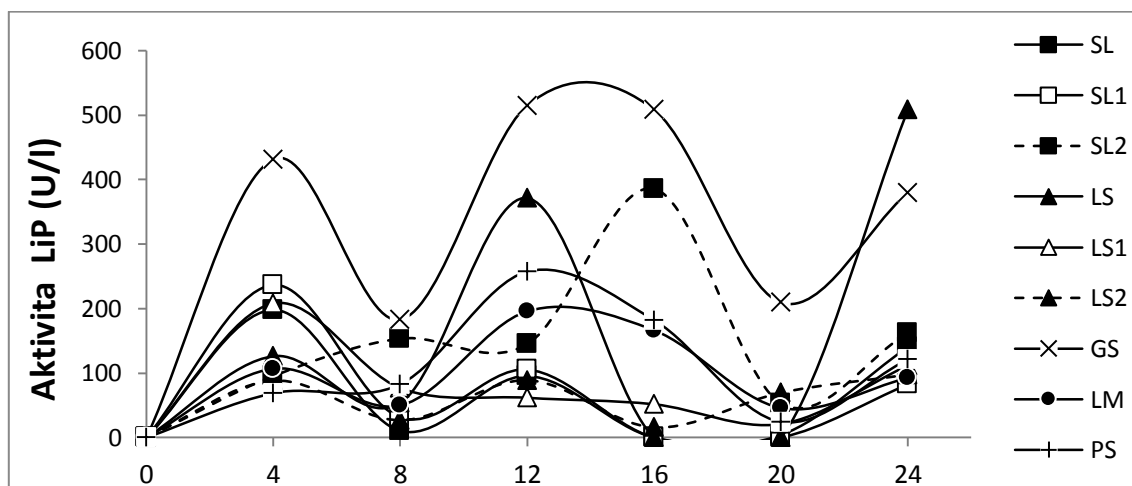
Celkový trend pro produkci lakázy je u většiny kmenů podobný (Graf 1). První aktivita byla detekována již 4. den kultivace. Odlišný trend byl pozorován v případě

Phaeolus schweinitzii a *Serpula lacrymans* (SL), kdy byla poměrně vysoká aktivita pozorována až do 16. dne kultivace. V průběhu celého experimentu byla nejvyšší aktivita lakázy měřena 12. den (v případě *Phaeolus schweinitzii* a *Serpula lacrymans* z Kuřimi 16. den) kultivace.



Graf 2: Závislost aktivity mangan-dependentní peroxidázy na době kultivace
Aktivita byla měřena třikrát, směrodatná odchylka je menší než 5 %.

U všech kmenů se první aktivita mangan-dependentní peroxidázy objevila 4. den kultivace, ale v průběhu dalšího měření 8. a 12. den poklesla (Graf 2). U *Gloeophyllum sepiarium*, *Laetiporus montanus* (z Boubína), *Serpula lacrymans* (z Kuřimi), *Phaeolus schweinitzii* aktivita výrazně vzrostla 16. den kultivace. Tyto kmeny také vykazovaly nejvyšší aktivitu mangan-dependentní peroxidázy.



Graf 3: Závislost aktivity ligninperoxidázy na době kultivace
Aktivita byla měřena třikrát, směrodatná odchylka je menší než 5 %.

Také v případě ligninperoxidázy se u všech testovaných kmenů objevila aktivita 4. den kultivace (Graf 3). V průběhu dalšího měření poklesla, ale pak zase vzrostla 12. den. Nejvyšší hodnoty byly naměřeny u kmene *Phaeolus schweinitzii*.

Co se týká srovnání aktivit mezi jednotlivými kmeny tak nejvyšší lakázovou aktivitu (116,11 U/l) vykazoval kmen *Phaeolus schweinitzii* a to 16. den kultivace. V případě MnP a LiP se vyznačoval tento kmen také poměrně vysokou aktivitou a to 16. (39,21 U/l) a 12. (257,35 U/l) den. Tyto výsledky jsou v souladu s prací Martinez a kol., 1995, který měl podobné hodnoty a prokázal, že *Phaeolus schweinitzii* vykazuje vysokou produkci ligninolytických enzymů.

U kmene *Laetiporus sulphureus* byly testovány 3 kmeny odebrané z Litovelského pomoraví, PR Vrapač (LS), Tišnova (LS1) a Lomnice u Tišnova (LS2). U všech kmenů byla naměřena nejvyšší aktivita lakázy 12. den kultivace (LS – 61,94 U/l; LS1 – 55 U/l; LS2 – 50,5 U/l) a nebyly pozorovány výraznější rozdíly mezi jednotlivými kmeny. Toto zjištění je v souladu s literaturou, kdy někteří autoři dokonce soudí, že obecně platí, že produkce enzymů začíná až po deseti dnech inkubace (Mtui, Masalu, 2008). Z grafu 2 a 3 je vidět, že v případě aktivit ostatních enzymů se u *Laetiporus sulphureus* (LS, LS1 a LS2) objevila nezanedbatelná aktivita MnP už 4. den kultivace (LS – 33,91 U/l; LS1 – 53,3 U/l; LS2 – 18,95 U/l). V průběhu další periody však klesala až po 16. den, kdy dosáhla 0. U ligninperoxidázy se měřená aktivita výrazně liší u LS a LS1, LS2. U LS aktivita výrazně vyrostla 12. den kultivace na hodnotu 371,33 U/l, poté však poklesla až na 0. U LS1 a LS2 byly hodnoty celkem podobné a pouze slabě kolísaly během celého měření. Mtui a Masalu, 2008, uvádí, že u *Laetiporus sulphureus* z Mbweni, Oyster Bay a Mtoni Mangrovových lesů v Dar es Salaam v Tanzanii se objevila aktivita jenom u lignin peroxidázy a mangan-dependentní peroxidázy, ale nebyla pozorována žádná aktivita lakázy. Což se jen částečně shoduje s mými výsledky.

V případě kmene *Serpula lacrymans* byly taktéž testovány 3 kmeny získané z Dolních Kounic (SL), Beskyd (SL1) a z Kuřimi (SL2). U *Serpula lacrymans* (SL, SL1) byla nejvyšší aktivita lakázy pozorována 12. den kultivace (SL – 21,67 U/l; SL1 – 38,94 U/l). Před tím skoro žádná aktivita detekována nebyla. U SL2 odebrané v Kuřimi se objevila relativně vysoká aktivita Lac (70,83 U/l), která poklesla až po 16 dnech kultivace. Aktivita MnP byla pozorována u SL (39,21 U/l) a SL1 (46,05 U/l) 4. den, v průběhu další kultivace už jen klesala. Výrazně jiný trend byl v případě kmene SL2, kdy došlo k nárůstu aktivity MnP 16. (66,13 U/l) den kultivace ve srovnání s 4. (14,72 U/l),

8. (18,95 U/l), a 12. (8,47 U/l) dnem. Korripally a kol., 2013, zaznamenali, že prvních 8 dnů nebyli schopni pozorovat aktivitu lakázy, MnP a LiP peroxidázy produkované houbou *Serpula lacrymans*. Je to ve shodě s mými výsledky ohledně SL a SL1. Co se týká SL2, prokázal poměrně vysokou aktivitu Lac téměř po celou měřenou periodu a taktéž LiP (385,66 U/l), ale až po 12 dni kultivace.

D'souza a kol., 1996, zjistili, že houba *Gloeophyllum sepiarium* vykazuje lakázovou aktivitu, což dříve nebylo detekováno u hub hnědé hniloby. I v případě mého měření byla u tohoto kmene pozorována výrazná lakázová aktivita, ale pouze 4. den (58,89 U/l), poté už klesala. Nicméně tento kmen vykazoval nejvyšší MnP (67,34 U/l) a LiP (514,7 U/l) aktivitu ze všech testovaných kmenů hub.

U *Laetiporus montanus* byla aktivita lakázy pozorována pouze 12. (53,89 U/l) den, všechny ostatní měření byla kolem 0. Nejvyšší aktivita LiP (195,7 U/l) a MnP (23,39 U/l) u daného kmenu byla detekovaná až po 12 dni kultivace, což souvisí s výsledky Banik a kol., 1998.

Na základě uvedených výsledků lze říci, že houby hnědé hniloby produkují enzym lakázu, nicméně její aktivita je podstatně nižší než aktivita ligninperoxidázy. Jednotlivé kmeny se od sebe liší v míře, kterou produkují jednotlivé enzymy. Rozdíly jsou patrné i mezi stejným kmenem, pouze z jiné lokace, což může souviset s prostředím, odkud byly houby získány.

6 ZÁVĚR

Cílem mé práce bylo studium možností produkce extracelulárních lignolytických enzymů vybranými druhy hub hnědé hniloby. Hlavními producenty lignolytických enzymů jsou houby bílé hniloby, o čemž existuje řada studií. Využití hub hnědé hniloby na produkci těchto enzymů bylo zatím opomíjeno a nebylo příliš studováno. Pro testování byly použity kmeny *Laetiporus sulphureus*, *Serpula lacrymans*, *Gloeophyllum sepiarium*, *Phaeolus schweinitzii* a *Laetiporus montanus*, které byly kultivovány submerzním způsobem v tekutém médiu. V průběhu kultivace (po dobu 24 dní) byla sledována produkce ligninolytických enzymů (lakáza, mangan-dependentní peroxidáza, lignin peroxidáza). Bylo zjištěno, že enzymatická aktivita hub je závislá na geografické poloze a konkrétním stanovišti. Hodnoty stejného kmene odebraného z různých míst byli odlišné.

Z mých výsledků je také patrné, že každá houba produkuje jeden z testovaných ligninolytických enzymů ve větší míře než ostatní. Nejvyšší aktivita jednotlivých enzymů byla skoro u všech kmenů nejčastěji pozorována po 12. den kultivace. V nejvyšší míře produkovaly všechny houby hnědé hniloby ligninperoxidázu. U *Laetiporus sulphureus* a *Gloeophyllum sepiarium* docházelo k hodnotám nad 500 U/l.

Lignolytické enzymy hrají důležitou roli při biodegradaci polychlorovaných bifenyly, degradaci a mineralizaci polycyklických aromatických uhlovodíků, také mají schopnost účinně degradovat syntetická barviva. Lakáza má široké potencionální využití v potravinářském průmyslu. Jedním z překážek širokého využití lakázy je však nedostatek možností k produkci velkého objemu vysoce aktivního enzymu za přijatelných finančních nákladů. V současné době se studují možnosti ohledně produkce lakázy s nízkými náklady.

7 POUŽITÁ LITERATURA

Alexopoulos C., 1952: *Introductory Mycology*. s. 482 John Wiley & Sons, NY. ISBN 0471063045

Ambrožová J., 2008: *Mikrobiologie v technologii vod*. Vyd. 2., přeprac., s. 66. Praha: Vydavatelství VŠCHT. ISBN 978-80-7080-676-0

Ander P., Eriksson K., 1975: Influence of carbohydrates on lignin degradation by the whiterot fungus *Sporotrichum pulverulentum*, s. 643– 652. Svensk Papperstidning, 78. ISSN: 0039-6680

Antonín V., Hagara L., Baier J., 2003: *Houby*, s. 416. Aventium nakladatelství s.r.o., Praha. ISBN 80-7151-218-4

Artik N., Karhan M., Aydar G., 2004: Effects of polyphenoloxidase (LACCASE) application on clarity stability of sour cherryjuice. *Journal of food technology*, 2(4), s. 237–243. ISSN 1684-8462.

Attanasio A., Diano N., Grano V., Sicuranza S., Rossi S., Bencivenga U., Fraconte L., Di Martino S., Canciglia P., 2005: Nonisothermal bioreactors in the treatment of vegetation waters from olive oil: laccase versus syringic acid as bioremediation model. *Biotechnology Progress*, 21(3), s. 806–815. ISSN: 1520-6033

Balabán K., Kotlaba F., 1970: *Atlas dřevokazných hub*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, s. 133, ISBN 07-028-70–04/40.

Banik M., Burdsall H., Thomas J., 1998: Academic paper: Identification of groups within *Laetiporus sulphureus* in the United States based on RFLP analysis of the nuclear ribosomal DNA. *Folia Cryptogamica Estonica*, Wisconsin, s. 9-14. Dostupno z: researchgate.net

Berrio J., Plou F., Ballesteros A., Martínez T., 2009: Immobilization of *Pycnoporus coccineus* laccase on Eupergit C: Stabilization and treatment of olive oil mill wastewaters. *Biocatalysis and Biotransformation* [online], 25(2-4), s. 130-134 [cit. 2017-01-12]. ISSN 1024-2422. Dostupné z: tandfonline

Beydilli M., Pavlostathis S., Tincher W., 1998: Decolorization and toxicity screening of selective reactive azo dyes under methanogenic conditions, s. 225-232. *Water Sci. Technol.* 38. ISSN 1684–5315

Bolobová A., Askadskij A., Kondrašenko V., Rabinovič M., 2002: Основы биотехнологии древесных композитов: ферменты, модели, процессы. Москва: Наука, s. 343.

Boominathan K., Reddy A., 1992: Fungal degradation of lignin: biotechnological applications, s. 763-822. *Handbook of applied mycology*. ISBN: 0-8247-8501-0.

Borchert M., Libra J., 2001: Decolorization of reactive dyes by the white rot fungus *Trametes versicolor* in sequencing batch reactors. *Biotechnol. Bioeng* (75), s. 313-321. ISSN: 1097-0290

Borja R., Martin A., Maestro R., Alba J., Fiestas J., 1992: Enhancement of the anaerobic digestion of olive mill wastewater by the removal of phenolic inhibitors. *Process Biochemistry* [online], 27(4), s. 231-237 [cit. 2017-01-12]. ISSN 13595113. Dostupné z: [linkinghub](#)

Bouwens E., Trivedi K., Van Vliet C., Winkel C., 1997: Method of enhancing color in a tea based foodstuff. European patent application, EP 760213 A1.

Cantarelli C., 1986: Trattamenti enzimatici sui costituenti fenolicidei mosti come prevenzione della maderizzazione. *Vinid'Italia*, 3, s. 87–98.

Cantarelli C., Giovanelli G., 1990: Stabilization of pome and grape juice against phenolic deterioration by enzymic treatments. *Internationale fruchtsaft-union, wissenschaftlich-technische commission*, 21, s. 35–57. ISBN 9783260049651.

Casa R., D'Annibale A., Pieruccetti F., Stazi S., Sermanni G., Lo Cascio B., 2003: Reduction of the phenolic components in olive-mill wastewater by an enzymatic treatment and its impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability. *Chemosphere* [online], 50(8), s. 959-966 [cit. 2017-01-12]. ISSN 00456535. Dostupné z: [linkinghub](#)

Conrad L., Sponholz W., Berker O., 2000: Treatment of cork with a phenol oxidizing enzyme, US patent 6152966 A.

- Černý A., 1989: Parazitické dřevokazné houby, s. 99, SZN, Praha, ISBN 80-209-0090X
- D'Annibale A., Casa R., Pieruccetti F., Ricci M., Marabottini R., 2004: Lentinula edodes removes phenols from olive-mill wastewater: impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability. *Chemosphere* [online], 54(7), s. 887-894 [cit. 2017-01-12]. ISSN 00456535. Dostupné z: [linkinghub](#)
- D'Annibale A., Stazi S., Vinciguerra V., Giovannozzi Sermanni G., 2000: Oxirane-immobilized Lentinula edodes laccase: stability and phenolics removal efficiency in olive mill wastewater. *Journal of Biotechnology* [online], 77(2-3), s. 265-273 [cit. 2017-01-12]. ISSN 01681656. Dostupné z: [linkinghub](#)
- D'Annibale A., Stazi S., Vinciguerra V., Mattia E., Giovannozzi Sermanni G., 1999: Characterization of immobilized laccase from Lentinula edodes and its use in olive-mill wastewater treatment. *Process Biochemistry* [online], 34(6-7), s. 697-706 [cit. 2017-01-12]. ISSN 13595113. Dostupné z: [linkinghub](#)
- D'souza M., Boominathan T., Adinarayana A., 1996: Isolation of Laccase Gene-Specific Sequences from White Rot and Brown Rot Fungi by PCR. *Applied And Environmental Microbiology*, s. 3742-3743. Department of Microbiology, Michigan State University.
- Di Fusco M., Tortolini C., Deriu D. a Mazzei F., 2010: Laccase-based biosensor for the determination of polyphenol index in wine. *Talanta* [online], 81(1-2), s. 235-240 [cit. 2017-01-12]. ISSN 00399140. Dostupné z: [linkinghub](#)
- Dostál P., 2006: *Evoluce a systém stélkatých organismů a cévnatých výtrusných rostlin*. Vyd. 2., Praha: Univerzita Karlova v Praze, Pedagogická fakulta, ISBN 80-7290-267-9.
- Fedorak P., Hrudey S., 1984: The effects of phenol and some alkyl phenolics on batch anaerobic methanogenesis. *Water Research* [online], 18(3), s. 361-367 [cit. 2017-01-12]. ISSN 00431354. Dostupné z: [linkinghub](#)
- Fiestas Ros de Ursinos J., 1981: Differentes utilisations des margines. *Proceedings of the Seminaire International sur la Valorisation des Produits de l'Olivier*, s. 93-110, Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture.
- Gabriel J., 2013: Dřevokazné houby v interiérech. *Živa : časopis pro biologickou práci*. Praha: Academia, 61(2), s. 54-57. ISSN 0044-4812.

Geles I., 2007: Древесное сырье — стратегическая основа и резерв цивилизации. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, s. 499.

Gianfreda L., Sannino F., Filazzola M., Leonowicz A., 1998: Catalytic behavior and detoxifying ability of a laccase from the fungal strain *Cerrena unicolor*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* [online], 4(1-2), s. 13-23 [cit. 2017-01-12]. ISSN 13811177. Dostupné z: [linkinghub](#)

Giovanelli G., 1989: Enzymic treatment of malt polyphenols for beer stabilization. *Industrie delle Bevande*, 18, s. 497–502. ISSN 03900541

Giovanelli G., Ravasini G., 1993: Apple juice stabilization by combined enzyme-membrane filtration process. *Food science and technology* [online], 26(1), s. 1-7 [cit. 2017-01-12]. ISSN 00236438. Dostupné z: [linkinghub](#)

Gokmen V., Borneman Z., Nijhuis H., 1998: Improved ultrafiltration for color reduction and stabilization of apple juice. *Journal of food science* [online], 63(3), s. 504-507 [cit. 2017-01-12]. ISSN 0022-1147. Dostupné z: [doi.wiley](#)

Hamdi M., 1993: Future prospects and constraints of olive mill wastewaters use and treatment: A review. *Bioprocess Engineering* [online], 8(5-6), s. 209-214 [cit. 2017-01-12]. ISSN 0178-515x. Dostupné z: [link.springer](#)

Heinfling A., Martínez M., Martínez A., Bergbauer M., Szewzyk U., 1998: Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese-independent reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(8), s. 2788-2793. ISSN 0099-2240

Hlaváč P., Hlaváčová M., 2003: Využití húb v lékarenstve. Ostrava: Přírodovědecká fakulta Ostravské univerzity, 183s.

Holinka M., 2015: *Impregnace dřeva, likvidace plísní, dřevokazných hub a hmyzu* [online]. [cit. 2017-04-13]. Dostupné z: [impregnacedreva](#)

Iamarino G., Rao M., Gianfreda L., 2009: Dephenolization and detoxification of olive-mill wastewater (OMW) by purified biotic and abiotic oxidative catalysts. *Chemosphere* [online], 74(2), s. 216-223 [cit. 2017-01-12]. ISSN 00456535. Dostupné z: [linkinghub](#)

Ibarra-Escutia P., Gómez J., Calas-Blanchard C., Marty J. a Ramírez-Silva M., 2010: Amperometric biosensor based on a high resolution photopolymer deposited onto a screen-printed electrode for phenolic compounds monitoring in tea infusions. *Talanta* [Online], 81(4-5), s. 1636-1642 [Cit. 2017-01-12]. ISSN 00399140. Dostupné z: [linkinghub](#)

Jablonský I., Šašek V., SRB A., 1985: *Pěstování jedlých hub*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství.

Jaouani A., Guill'en F., Penninckx M., Mart'inez A., Mart'inez M., 2005: Role of *Pycnoporus coccineus* laccase in the degradation of aromatic compounds in olive oil mill wastewater. *Enzyme and Microbial Technology* [online], 36(4), s. 478-486 [cit. 2017-01-12]. ISSN 01410229. Dostupné z: [linkinghub](#)

Jaouani A., Sayadi S., Vanthourhout M., Penninckx M., 2003: Potent fungi for decolourisation of olive oil mill wastewaters. *Enzyme and Microbial Technology* [online], 33(6), s. 802-809 [cit. 2017-01-12]. ISSN 01410229. Dostupné z: [linkinghub](#)

Kadimaliev D., Revin V., Atykian N., Šutová V., 2004: Фундаментальные и прикладные основы биотехнологии экологически безопасных композиционных материалов. Саранск: Издательство Мордов, s. 192.

Keizer J., 2005: *Houby: encyklopedie*. 2. vyd., s. 288. Čestlice: Rebo, Encyklopedie (Rebo). ISBN 80-7234-479-x

Kirk T., Connors W., Zeikus J., 1976: Requirements for a growth substrate during lignin decomposition by two wood rotting fungi, s. 192-194. *Appl Environ Microbiol*, 32. ISSN 0099-2240

Klibanov A., Tu T., Scott K., 1983: Peroxidase-catalyzed removal of phenols from coal-conversion waste waters. *Science* [online], 221(4607), s. 259-261 [cit. 2017-01-12]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: [sciencemag](#)

Korripally P, Timokhin V., Houtman C., Mozuch M., Hammel K., 2013: Evidence from *Serpula lacrymans* that 2,5-Dimethoxyhydroquinone Is a Lignocellulolytic Agent of

Divergent Brown Rot Basidiomycetes. *Appl Environ Microbiol*, 79(7), s. 2377–2383. ISSN 0099-2240

Kožemiakina N., Ananjeva E., Gurina S., 2010: Иммуностимулирующая активность мицелия некоторых базидиомицетов. Москва: МГУ Иммунопатология, s. 253-254.

Kuo M., 2010: *Laetiporus sulphureus: The chicken of the woods*. [online]. [cit. 2017-04-13]. Dostupné z: [mushroomexpert](#)

Kutařjev N., 2003: Морфология грибов: учеб. пособие для студентов вузов, 2-е издание. Новосибирск: Сибирское университетское издательство, s. 215.

Kuuva T., Lantto R., Reinikainen T., Buchert J., Autio K., 2003: Rheological properties of laccase-induced sugar beet pectin gels. *Food Hydrocolloids* [online], 17(5), s. 679-684 [cit. 2017-01-12]. ISSN 0268005x. Dostupné z: [linkinghub](#)

Labat E., Morel M., Rouau X., 2000: Effects of laccase and ferulic acid on wheat flour doughs. *Cereal Chemistry Journal* [online], 77(6), s. 823-828 [cit. 2017-01-12]. ISSN 0009-0352. Dostupné z: [aaccipublications](#)

Leatham G., Kirk T., 1983: Regulation of ligninolytic activity by nutrient nitrogen in white rot basidiomycetes, s. 65-67. *FEMS Microbiol Lett*, 16.

Leonowicz A., Cho N., Luterek J., Wilkolazka A., Wojtas-Wasilewska M., Matuszewska A., Hofrichter M., Wesenberg D., Rogalski J., 2001: Fungal laccase: properties and activity on lignin. *Journal Basic Microbiology*, 41, s. 185–227. ISSN 1521-4028

Littoz F., McClements D., 2008: Bio-mimetic approach to improving emulsion stability: Cross-linking adsorbed beet pectin layers using laccase. *Food Hydrocolloids* [online], 22(7), s. 1203-1211 [cit. 2017-01-12]. ISSN 0268005x. Dostupné z: [linkinghub](#)

Maier G., Dietrich H., Wucherpfenning K., 1990: Wine making without SO₂-with the aid of enzymes. *Weineirtschaft-Technik*, 126, s. 18–22. ISSN 0723-1369.

Martirani L., Giardina P., Marzullo L., Sannia G., 1996: Reduction of phenol content and toxicity in olive oil mill waste waters with the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Research* [online], 30(8), s. 1914-1918 [cit. 2017-01-12]. ISSN 00431354. Dostupné z: [linkinghub](#)

Mathiasen T., 1995: Laccase and beer storage, PCT international application, WO9521240 A2.

McMurrough I., Madigan D., Kelly R., O'Rourke T., 1999: Haze formation shelf-life prediction for lager beer. *Food technology*, 53(1), s. 58–63. ISSN 00156639.

Minussi R., Pastore G. a Durán N., 2002: Potential applications of laccase in the food industry. *Trends in food science & technology* [online], 13(6-7), s. 205-216 [cit. 2017-01-12]. ISSN 09242244. Dostupné z: [linkinghub](#)

Minussi R., Rossi M., Bologna L., Rotilio D., Pastore G. a Durán N., 2007: Phenols removal in musts: Strategy for wine stabilization by laccase. *journal of molecular catalysis B: Enzymatic* [online], 45(3-4), s. 102-107 [cit. 2017-01-12]. ISSN 13811177. Dostupné z: [linkinghub](#)

Monteali, M.R., L. Della Seta, W. Vastarella a R. Pilloton, 2010: A disposable Laccase–Tyrosinase based biosensor for amperometric detection of phenolic compounds in must and wine. *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic* [online], 64(3-4), s. 189-194 [cit. 2017-01-12]. ISSN 13811177. Dostupné z: [linkinghub](#)

Mtui G., Masalu R., 2008: Extracellular enzymes from brown-rot fungus *Laetiporus sulphureus* isolated from mangrove forests of coastal Tanzania, s. 156-159. Department of Molecular Biology and Biotechnology, University of Dar es Salaam. ISSN 1992-2248

Neifar M., Ellouze-Ghorbel R., Kamoun A., Baklouti S., Mokni A., Jaouani A., Ellouze-Chaabouni S., 2011: Effective clarification of pomegranate juice using laccase treatment optimized by response surface methodology followed by ultrafiltration. *Journal of food process engineering* [online], 34(4), s. 1199-1219 [cit. 2017-01-12]. ISSN 01458876. Dostupné z: [doi.wiley](#)

Nielsen P., Malmos H., Damhus T., 2000: Enzyme Applications, Industrial. *Kirk-othmer encyclopedia of chemical technology* [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, [cit. 2017-01-12]. ISBN 0471238961. Dostupné z: [doi.wiley](#)

Norsker M., Jensen M., Adler-Nissen L., 2000: Enzymatic gelation of sugar beet pectin in food products. *Food Hydrocolloids* [online], 14(3), s. 237-243 [cit. 2017-01-12]. ISSN 0268005x. Dostupné z: [linkinghub](#)

Novotný Č., Svobodová K., Erbanová P., Cajthaml T., Kasinath A., Lang E., Šašek V., 2004: Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. *Soil Biology and Biochemistry* [online], 36(10), s. 1545-1551 [cit. 2017-02-18]. ISSN 00380717. Dostupné z: [linkinghub](#)

Orth A., Tien M., 1995: Biotechnology of lignin degradation. *The Mycota. II*, s. 287–302. *Genetics and Biotechnology*. ISSN 1687-157X

Palovčíková D., 2011: Atlas poškození dřevin, Ústav ochrany lesa a myslivosti LDF Mendelu, Brno, dostupné na: [atlasposkozeni](#)

Pant D., Adholeya A., 2009: Concentration of fungal ligninolytic enzymes by ultrafiltration and their use in distillery effluent decolorization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [online], 25(10), s. 1793-1800 [cit. 2017-01-12]. ISSN 0959-3993. Dostupné z: [link.springer](#)

Paredes C., Cegarra J., Roig A., S´anchez-Monedero M., Bernal M., 1999: Characterization of olive mill wastewater (alpechin) and its sludge for agricultural purposes. *Bioresource Technology* [online], 67(2), s. 111-115 [cit. 2017-01-12]. ISSN 09608524. Dostupné z: [linkinghub](#)

Peláez F., Martínez M., Martínez A., 1995: Screening of 68 species of basidiomycetes for enzymes involved in lignin degradation, s. 37-42. Dostupno z: [academia.edu](#)

Petersen B., Mathiasen T., 1996: Deoxygenation of a food item using a laccase. PCT international application, WO9631133 A1.

Petersen B., Mathiasen T., Peelen B, Andersen H., 1996: Use of laccase for deoxygenation of oil-containing productsuch as salad dressing. PCT international application, WO9635768 A1.

Polskich S., Aksenovskaya V., Fedušina V., 2010: Применение зернового мицелия высших базидиальных грибов в птицеводстве. Москва: МГУ Иммунопатология, s. 262-263.

Prasetyo N., Kudanga E., Steiner W., Murkovic M., Nyanhongo G. a Guebitz G., 2010: Laccase-generated tetramethoxy azobismethylene quinone (TMAMQ) as a tool for

antioxidant activity measurement. *Food chemistry* [online], 118(2), s. 437-444 [cit. 2017-01-12]. ISSN 03088146. Dostupné z: [linkinghub](#)

Quaratino D., D'Annibale A., Federici F., Cereti C., Rossini F., Fenice M., 2007: Enzyme and fungal treatments and a combination thereof reduce olive mill wastewater phytotoxicity on *Zea mays* L. seeds. *Chemosphere* [online], 66(9), s. 1627-1633 [cit. 2017-01-12]. ISSN 00456535. Dostupné z: [linkinghub](#)

Rabinovič M., Bolobová A., Kondrashenko V., 2001: Теоретические основы биотехнологии древесных композитов: Древесина и разрушающие ее грибы. Москва: Наука, s. 264.

Renzetti S., Courtin C., Delcour J., Arendt E., 2010: Oxidative and proteolytic enzyme preparations as promising improvers for oat bread formulations: Rheological, biochemical and microstructural background. *Food Chemistry* [online], 119(4), s. 1465-1473 [cit. 2017-01-12]. ISSN 03088146. Dostupné z: [linkinghub](#)

Risínová T., 2007: Разработка технологий биосинтеза фермента лакказы базидиальными грибами *Trametes*. Москва: МГУ инженерной экологии, s. 191.

Ritter G., Maier G., Schoepplein E., Dietrich H., 1992: The application of polyphenoloxidase in the processing of apple juice. *Bulletin de liaison-groupe polyphenols*, 16, s. 209–212. ISSN 02428466

Rossi M., Giovanelli G., Cantarelli C., Brenna O., 1988: Effects of laccase and other enzymes on barley wort phenolics as a possible treatment to prevent haze in beer. *Bulletin de liaison-groupe polyphenols*, 14, s. 85–88. ISSN 02428466

Rozsypal S., 2003: *Nový přehled biologie*. Scientia, spol. s.r.o., s. 797. ISBN 80-7183-268-5

Ruiz-Duenas F., Camarero S., Perez-Boada M., Martinez M., Martinez A., 2001: A new versatile peroxidase from *Pleurotus*. *Biochemical Society Transactions*, 29, s. 116. ISSN 0300-5127

Sammartino M., Piacquadio P., De Stefano G., Sciancalepore V., 1998: Apple juice stabilization by conventional and innovative methods. *Industria delle Bevande*, 27, s. 367–369. ISSN 03900541

Selinheimo E., Kruus K., Buchert J., Hopia A., Autio K., 2006: Effects of laccase, xylanase and their combination on the rheological properties of wheat doughs. *Journal of Cereal Science* [online], 43(2), s. 152-159 [cit. 2017-01-12]. ISSN 07335210. Dostupné z: [linkinghub](#)

Semerdzieva M., Veselovský J., 1986: Léčivé houby dříve a nyní, s. 180. Nakladatelství Československé akademie věd, Praha. ISBN 21-129-86

Shaul G., Holdsworth T., Dempsey C., Dostal K., 1991: Fate of water soluble azo dyes in the activated sludge process, s.s 107-119. *Chemosphere* 22. ISSN 0045-6535

Si J., 1994: Use of laccase in baking industry. International patent application PCT/DK94/00232.

Siebert K., Carrasco A. a Lynn P., 1996: Formation of Protein–Polyphenol Haze in Beverages. *Journal of agricultural and food chemistry* [online], 44(8), s. 1997-2005 [cit. 2017-01-12]. ISSN 00218561. Dostupné z: [pubs.acs](#)

Storoženko V., Krutov V., Seločnik N., 2000: Грибные сообщества лесных экосистем: материалы координационных исследований РАН. Петрозаводск: Карельский научный центр, s. 320.

Strong P., Burgess J., 2008: Treatment methods for wine-related and distillery wastewaters: A Review. *Bioremediation Journal* [online], 12(2), s. s70-87 [cit. 2017-01-12]. ISSN 1088-9868. Dostupné z: [tandfonline](#)

Stutz C., 1993: The use of enzymes in ultrafiltration. *Fruit processing*, 3, s. 248–252. ISSN 0939-4435

Šilhánková L., 2002: *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. dopl. vyd. Praha: Academia, s. 363. ISBN 80-200-1024-6.

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

Takemori T., Ito Y., M. Ito, Yoshama M., 1992: Flavor and taste improvement of cacao nib by enzymatic treatment. JapanKokai Tokkyo Koho JP 04126037 A2.

- Tanrioven D., Eksi A., 2005: Phenolic compounds in pear juice from different cultivars. *Food chemistry* [online], 93(1), s. 89-93 [cit. 2017-01-12]. ISSN 03088146. Dostupné z: [linkinghub](#)
- Thurston C., 1994: The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* [online], 140(1), s. 19-26 [cit. 2017-02-18]. ISSN 1350-0872. Dostupné z: [mic.microbiologyresearch](#)
- Tsuchiya R., Petersen B., Christensen S., 2000: Oxidoreductases for reduction of malodor. US 6074631 A.
- Urban J., 1997: *Ochrana dřeva I: hlavní hmyzí dřevokazní škůdci*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, s. 134. ISBN 80-7157-254-3.
- Valdez E., Obaya M., 1985: Estudio del tratamiento anaerobico de los residuales de la industria alcoholera. *Revista ICIDCA*, 19(1), s. 7–10. ISSN 0138-6204
- Veselá M., Drdák M., 1999: *Praktikum z obecné mikrobiologie*. 2. vydání. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, s. 88. ISBN 80-214-1305-0.
- Vodrážka Z., 2002: *Biochemie*. 2. oprav. vyd. Praha : Academia. ISBN 80-200- 0600-1.
- Yadav M., Yadav P., Yadav K., 2009: Очистка и изучение свойств лигнинпероксидазы гриба *Lenzitiy seperia* МТСС – 1170 деминерализацию герминовой кислоты каменных углей. Горакхпур: Department of Chemistry, DDU Gorakhpur University, s. 1386-1387.
- Yegorová T., Klunová S., Živuchiná E., 2005: *Основы биотехнологии*, 2-е издание. Москва: Академия, s. 208.
- Yevtušenkov A., Fomičev Y., 2002: *Введение в биотехнологию: курс лекций*. Минск: Издательство БГУ, s. 105.
- Zahoskina N., Nazarenko L., Kalašnikova E., Živuchina E., 2009: *Биотехнология: теория и практика*. Москва: Оникс, s. 496.
- Zaikina N., 2007: *Основы биотехнологии высших грибов*. ММосква: Наука, s. 336.

Zollinger H., 1991: Color Chemistry. Synthesis, Properties and Applications of Organic Dyes and Pigments. 3rd revised edition. *Angewandte Chemie International Edition* [online], 43(40), s. 5291-5292 [cit. 2017-02-18]. ISSN 1433-7851. Dostupné z: doi.wiley.com

INTERNETOVÉ ZDROJE

http://ostrava-educanet.cz/biologie/ostrava-educanet.cz/www_biology/index.html

http://web2.mendelu.cz/af_211_multitext/vyuka/fyr1/rtf/12.pdf

<http://www.houbareni.cz/houba.php?id=32>

<http://www.mykoweb.cz/houba/laetiporus-montanus>

<http://www.nahuby.sk/atlas-hub/Laetiporus-montanus/sirovec-horsky/ID13631>

8 SEZNAM OBRAZKŮ

Obr. 1 Schematická struktura molekuly ligninu (Zdroj: Zaripov Š., 2009: Физико-механические основы разрушения древесины лиственницы в процессе конвективной сушки. Новосибирск: СО РАН, 110 с).

Obr. 2 Model aktivního místa LiP (Zdroj: Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 90, s. 754, 1993, Biochemistry).

Obr. 3 Katalytický cyklus lignin peroxidázy (Zdroj: Gold a kol., 1989).

Obr. 4 Model aktivního místa MnP (Zdroj: Harris a kol., 1991).

Obr. 5 Katalytický cyklus mangan dependentní peroxidázy (Gold a kol., 1989).

Obr. 6 Katalytický cyklus Lac (Zdroj: P. Singh nee' Nigam, A. Pandey, Biotechnology for agro-industrial residues utilisation, DOI 10.1007/978-1-4020-9942-7 22, Springer Science+Business Media, 2009).

Obr.7 Schema T1 (Cu1) a T2/T3 (Cu4/Cu2-Cu3) aktivního místa lakázy CotA (Zdroj: ISSN 0006-2979, Biochemistry (Moscow), 72(10), s. 1136-1150, 2007)