



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ**

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**PRODUKCE LIGNIN-DEGRADUJÍCÍCH ENZYMŮ ZA  
POMOCÍ PLÍSNĚ PHANEROCHAETE  
CHRYSOSPORIUM**

PRODUCTION OF LIGNIN-DEGRADING ENZYMES BY PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

MASTER'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

Bc. Bianka Péčiová

**VEDOUcí PRÁCE**

SUPERVISOR

prof. Ing. Adriána Kovalčík, Ph.D.

BRNO 2023

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1793/2022 Akademický rok: 2022/23  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Studentka: **Bc. Bianka Péčiová**  
Studijní program: Chemie přírodních látek  
Studijní obor: bez specializace  
Vedoucí práce: **prof. Ing. Adriána Kovalčík, Ph.D.**

### Název diplomové práce:

Produkce lignin–degradujících enzymů za pomoci plísně *Phanerochaete chrysosporium*

### Zadání diplomové práce:

1. Literární rešerše (produkce extracelulárních oxidativních enzymů degradujících lignin, degradace ligninu za pomoci extracelulárních oxidativních enzymů).
2. Optimalizace produkce lignin–degradujících enzymů (např. pH, složení média).
3. Efekt imobilizace enzymů na jejich účinek.
4. Využití naprodukovaných enzymů k modifikaci vybraných modelových fenolických sloučenin.
5. Shrnutí a závěr práce.

### Termín odevzdání diplomové práce: 8.5.2023:

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

-----  
Bc. Bianka Péčiová  
studentka

-----  
prof. Ing. Adriána Kovalčík, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

-----  
prof. Ing. Michal Veselý, CSc.  
děkan

## ABSTRAKT

Táto diplomová práca sa zaoberá štúdiom produkcie ligninolytických enzýmov produkovaných plesňou *P. chrysosporium* a následne ich imobilizáciou. Teoretická časť popisuje vybraný produkčný mikroorganizmus, princípy účinku ligninolytických enzýmov (lignín-peroxidázy, mangán-dependentnej peroxidázy a lakázy) a metódy ich imobilizácie.

V experimentálnej časti boli sledované optimálne podmienky produkcie lignolytických enzýmov plesňou *P. chrysosporium* v kultivačných médiách s rôznym obsahom glukózy a dvoch rôznych induktorov: lignínu a guaiacolu. V priebehu 14-dňových kultivačných cyklov bola sledovaná enzýmová aktivita lignín-peroxidázy, mangán-dependentnej peroxidázy a lakázy v jednotlivých dňoch kultivácie. Na základe optimalizovaného postupu produkcie enzýmov boli následne enzýmy imobilizované rôznymi metódami: metódou tvorby enzýmových agregátov (CLEA), adsorpciou na bakteriálnu celulózu (BC) a spojením týchto dvoch metód (CLEA + BC). Ako najúčinnější sa ukázala metóda CLEA, u ktorej však nastal problém s izoláciou enzýmových agregátov. Preto bola ako najvýhodnější vybraná imobilizácia na bakteriálnej celulóze spojená s tvorbou agregátov. U tejto metódy bola sledovaná aj operačná stabilita imobilizovaných enzýmov v 7. po sebe nasledujúcich reakčných cykloch. Následne boli imobilizáty CLEA a CLEA s BC použité na modifikáciu modelovej fenolickej látky, kde bol vybraný alkalický lignín. U oboch sád imobilizátov bol potvrdený účinok enzýmov na štruktúru lignínu meraním molekulovej hmotnosti (Mw) a indexu polydisperzity (PI).

## KLÚČOVÉ SLOVÁ

ligninolytické enzýmy, lignín, plesne bielej hniloby, imobilizácia, CLEA, bakteriálna celulóza modifikácia

## **ABSTRACT**

This diploma thesis deals with the study of the production of ligninolytic enzymes produced by the mold *P. chrysosporium* and subsequently their immobilization. The theoretical part describes the selected production microorganism, principles of action of ligninolytic enzymes (lignin-peroxidase, manganese-dependent peroxidase and laccase) and methods of their immobilization.

In the experimental part, optimal conditions of the production of ligninolytic enzymes by *P. chrysosporium* were monitored as a composition of culture medium with different glucose content and with using two different inducers: lignin and guaiacol. During the 14-day cultivation cycles, the enzyme activity of lignin-peroxidase, manganese-dependent peroxidase and laccase was monitored on each day of cultivation. Based on the optimized enzyme production procedure, the enzymes were subsequently immobilized by various methods: by method of forming enzyme aggregates (CLEA), adsorption on bacterial cellulose (BC) and a combination of both (CLEA + BC). The CLEA method proved to be the most effective, but there was problem with isolation of enzyme aggregates. Therefore, immobilization on bacterial cellulose associated with the enzymes aggregates was chosen as the most advantageous. With this method, the operational stability of the immobilized enzymes was monitored in 7 consecutive reaction cycles. Subsequently, CLEA and CLEA with BC were used to modify the model phenolic substance, where the alkali lignin was selected. For both sets of immobilizers was confirmed the effect of the enzymes on the lignin structure by measuring the molecular weight (Mw) and polydispersity index (PI).

## **KEY WORDS**

ligninolytic enzymes, lignin, white rot fungi, immobilization, CLEA, bacterial cellulose, modification

PÉČIOVÁ, Bianka. *Produkce lignin-degradujících enzymů za pomoci plísně Phanerochaete chrysosporium* [online]. Brno, 2023 [cit. 2023-05-04]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/146249>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Adriána Kovalčík.

## PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som svoj diplomovú prácu vypracovala samostatne pod vedením vedúcej záverečnej práce a že všetky použité zdroje som citovala správne a úplne v zozname literatúry na konci práce. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúcej diplomovej práce a dekana FCH VUT. Zároveň prehlasujem, že pri spracovaní diplomovej práce som neporušila autorské práva tretích osôb ani inak nezasiahla nedovoleným spôsobom do cudzích autorských práv.

.....

podpis autora

## POĎAKOVANIE

Touto cestou by som rada poďakovala vedúcej svojej diplomovej práce prof. Ing. Adriáne Kovalčík, Ph.D. za jej odborné rady, podnetné pripomienky pri spracovaní výskumu a konzultácie. Ďalej by som rada poďakovala svojmu konzultantovi Ing. Pavlovi Vostrejšovi za jeho ochotu, čas a cenné rady pri práci v laboratóriu. V neposlednej rade patrí poďakovanie Ing. Radimovi Křížovi za jeho pomoc pri experimentoch s bakteriálnou celulózu.

## OBSAH

1. ÚVOD.....	7
2. TEORETICKÁ ČASŤ.....	8
2.1. Plesne.....	8
2.1.1. Rastové nároky plesní.....	8
2.1.2. Využitie plesní v priemysle.....	8
2.2. Drevokazné huby.....	9
2.2.1. Pleseň Phanerochaete chrysosporium.....	9
2.3. Kultivácia húb bielej hniloby.....	10
2.4. Lignín.....	11
2.4.1. Štruktúra Lignínu.....	12
2.4.2. Chemické a fyzikálne vlastnosti.....	14
2.4.3. Modifikácia makromolekuly lignínu.....	14
2.5. Ligninolytické enzýmy.....	15
2.5.1. Peroxidázy.....	15
2.5.2. Lakázy.....	17
2.5.3. Aplikácia lignolytických enzýmov v priemysle.....	18
2.6. Stabilizácia enzýmov.....	19
2.7. Techniky imobilizácie enzýmov.....	20
2.7.1. Imobilizácia enzýmov na bakteriálnej celulóze.....	22
2.7.2. Imobilizácia pomocou zosieťovaných enzýmových agregátov.....	23
2.8. Využitie imobilizovaných enzýmov v priemysle.....	25
2.8.1. Imobilizované enzýmy v potravinárskom priemysle.....	26
2.8.2. Imobilizované enzýmy v chemickom priemysle.....	26
2.8.3. Imobilizované enzýmy vo farmácii a v lekárstve.....	26
2.8.4. Imobilizované enzýmy ako biosenzory.....	27
3. CIEĽ PRÁCE.....	28
4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ.....	29
4.1. Materiál a metódy.....	29
4.1.1. Použité mikroorganizmy.....	29
4.1.2. Použité chemikálie.....	29
4.1.3. Použité prístroje a pomôcky.....	30
4.1.4. Kultivačné médiá.....	30
4.1.5. Indukcia produkcie lignín-degradujúcich enzýmov.....	32
4.1.6. Stanovenie enzýmovej aktivity lakázy.....	32

4.1.7.	Stanovenie enzýmovej aktivity lignín peroxidázy .....	32
4.1.8.	Stanovenie enzýmovej aktivity Mn-dependentnej peroxidázy .....	33
4.1.9.	Stanovenie bielkovín podľa Bradfordovej .....	33
4.1.10.	Optimalizácia CLEA imobilizácie lignolytických enzýmov .....	34
4.1.11.	Imobilizácia na bakteriálnej celulóze .....	35
4.1.12.	Porovnanie účinnosti imobilizačných metód .....	36
4.1.13.	Sledovanie operačnej stability enzýmov imobilizovaných na BC.....	36
4.1.14.	Modifikácia modelových fenolických zlúčenín .....	37
5.	VÝSLEDKY A DISKUSIA .....	39
5.1.	Výsledky optimalizácie kultivačných podmienok plesne <i>P.chrysosporium</i> .....	39
5.2.	Výsledky optimalizácie CLEA imobilizácie lignolytických enzýmov .....	43
5.2.1.	Výsledky optimalizácie pH.....	43
5.2.2.	Výsledky optimalizácie koncentrácie síranu amónneho.....	45
5.2.3.	Výsledky optimalizácie koncentrácie sietujúceho činidla .....	47
5.3.	Výsledky imobilizácie lignolytických enzýmov na bakteriálnej celulóze.....	50
5.4.	Porovnanie použitých imobilizačných metód .....	52
5.5.	Výsledky sledovania operačnej stability imobilizovaných enzýmov na bakteriálnej celulóze .....	52
5.6.	Výsledky modifikácie lignínu.....	55
5.6.1.	Výsledky merania molekulovej hmotnosti .....	55
5.6.2.	Výsledky merania FTIR .....	57
6.	ZÁVER .....	59
8.	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY .....	61
9.	ZOZNAM OBRÁZKOV .....	73
10.	ZOZNAM. TABULIEK.....	75
12.	ZOZNAM SKRATIEK .....	76

## 1. ÚVOD

Ligninolytické enzýmy zohrávajú kľúčovú úlohu pri degradácii lignocelulózovej hmoty, a tým poskytujú možnosť trvalo udržateľného a zeleného riešenia jej zhodnocovania [29]. Okrem toho zohrávajú dôležitú úlohu aj pri detoxikácii a dekontaminácii životného prostredia. Hlavnými ligninolytickými enzýmami sú lakáza, lignín peroxidáza a mangán-dependentná peroxidáza. Tieto enzýmy sú produkované extracelulárne hubami bielej hniloby, ale aj niektorými druhmi aeróbnych baktérií. Ako modelový kmeň pre pochopenie systému produkcie ligninolytických enzýmov sa skúma plesň *Phanerochaete chrysosporium* [14]. Táto plesň produkuje komplexný enzymatický aparát zložený z peroxidáz a oxidáz, ktoré nešpecificky pôsobia na heterogénnu štruktúru lignínu [7]. Potenciál využitia v biotechnológiách poskytuje aj vysoká rastová teplota a fakt, že štruktúru celulózy ponechávajú nedotknutú. Pri kultivácii plesne je možné navýšiť produkciu enzýmov prídavkom induktoru, ktorým bývajú látky s podobnou štruktúrou ako má lignín – veratrylalkohol (VA), PEG alebo Tween 80. Ďalej možno použiť aj alkalický lignín alebo prirodzené zdroje lignínu, napr. otruby alebo drevnú štiepku [64–71]. Využitie ligninolytických enzýmov je v súčasnej dobe skúmané ako jedna z ciest depolymerizácie lignínu, ktorý má potenciál byť obnoviteľným zdrojom a v niektorých oblastiach nahradiť petrochemické materiály [16].

Kvôli náchylnosti enzýmových preparátov ku kontaminácii a strate katalytických schopností pôsobením nevhodných podmienok je tendencia enzýmy imobilizovať [50; 77]. Imobilizované enzýmy možno regenerovať, čím sa zvýši využiteľnosť na niekoľko cyklov za sebou a tým sa aj znížia náklady pri ich použití. Okrem toho sú stabilnejšie voči zmenám pH, teplôt a proti účinku inhibítorov. V práci boli použité imobilizačné metódy adsorpciou na bakteriálnej celulóze (BC), tvorbou sieťovaných agregátov v póroch BC a samostatným zosieťovaním enzýmových agregátov (tzv. CLEA). Bakteriálna celulóza použitá ako nosič bola vo forme lyofilizovaných krúžkov s priemerom 1,7 cm. CLEA metóda vyniká absenciou imobilizačného nosiča, pričom enzýmové agregáty vznikajú v 2 krokoch [59]. Tie spočívajú najprv v precipitácii enzýmov zrážajúcim činidlom (síranom amónnym) a následným zosieťovaním za použitia glutaraldehydu (GA). V porovnaní s inými imobilizačnými metódami sa CLEA agregáty označujú ako lepšie obnoviteľné, recyklovanejšie a stabilnejšie v rámci skladovania aj v rámci prevádzky [76]. Pripravené imobilizované enzýmy boli použité k modifikácii lignínovej štruktúry, ktorá sa následne preverila meraním molekulárnej hmotnosti ( $M_w$ ) a indexu polydispersity (PI) za použitia metódy SEC–MALS–DIR. Zmeny v štruktúre boli zisťované pomocou spektier získaných FTIR analýzou oproti nemodifikovanej referenčnej vzorke alkalického lignínu.



## 2. TEORETICKÁ ČASŤ

### 2.1. Plesne

Plesne sú chemoorganotrofné mikroskopické vláknité eukaryotické mikroorganizmy patriace do ríše Huby (*Fungi*) [1; 2]. Sú všadeprítomné, parazitujú na plodinách, vyvolávajú kazenie uskladneného ovocia a zeleniny či potravín živočíšneho pôvodu. Plesne sú tiež významnými producentmi antibiotík. Na druhú stranu produkujú mykotoxíny, ktoré môžu vyvolávať závažné zdravotné problémy. Podľa typu pohlavného rozmnožovania sa delia do nasledujúcich taxonomických skupín:

- 1) *Zygomycotina* (trieda *Zygomycetes*) – rody tvoria jednobunkové nepriehradkované mycélium, pohlavné rozmnožovanie je charakteristické tvorbou zygot, pri nepohlavnom rozmnožovaní vznikajú endospóry (napr. rody *Mucor* a *Rhizopus*);
- 2) *Ascomycotina* – rody tvoria priehradkované mycélium; pri pohlavnom rozmnožovaní vznikajú askospóry; pri nepohlavnom exospóry (napr. rody *Penicillium* a *Aspergillus*);
- 3) *Deuteromycotina* (tzv. *Fungi imperfecti*) – rody tvoriace priehradkované mycélium, ktoré sa množí len vegetatívne a tvorí vegetatívne exospóry (napr. rody *Alternaria* a *Fusarium*).

Plesne sa rozmnožujú spórami, a to pohlavne aj nepohlavne, alebo aj rozrastaním hýf [3]. Vlákna, z ktorých sa skladá telo húb sa nazývajú hýfy. Navzájom prepletené a rozrastené hýfy tvoria podhubie, tzv. mycélium. Mycélium, ktoré rastie na agare alebo čiastočne preniká do neho sa nazýva substrátové; mycélium rastúce na povrchu agaru sa nazýva vzdušné mycélium. Za nepriaznivých podmienok sa môžu hýfy premeniť na guľovité útvary obalené hrubou stenou, tzv. spóry.

#### 2.1.1. Rastové nároky plesní

Plesne patria medzi aeróbne mikroorganizmy, ktoré k svojmu rastu a množeniu potrebujú vzdušný kyslík [1]. Výnimkou sú niektoré rody (napr. *Mucor* spp.), ktoré sú schopné rásť aj za anaeróbných podmienok, kedy prechádzajú na fermentačný proces. Potreba kyslíku je daná skutočnosťou, že esenciálnou zložkou ich cytoplazmatickej membrány sú steroidy (najmä ergosterol), ktorých biosyntéza vyžaduje prítomnosť kyslíku.

V porovnaní s baktériami sú plesne schopné znášať veľmi extrémne podmienky [4]. Tolerujú široké rozmedzie pH 3–9; niektoré druhy sú schopné rásť aj pri pH menšom ako 2. Dobre fungujú aj pri nízkej aktivite vody; xerofilné plesne majú hranicu minimálnej aktivity vody 0,60. Väčšina plesní nerastie pri teplotách pod 2–5 °C; avšak niektoré druhy (napr. *Cladosporium herbarum*) sú schopné rásť aj pri teplotách pod bodom mrazu až do – 6 °C. Obvykle sa plesne vyskytujú na povrchu napadnutého materiálu.

Čo sa týka uhlíkatého substrátu, sú plesne pomerne nenáročné, pretože vďaka širokej variabilite enzýmového aparátu dokážu veľmi efektívne využívať akýkoľvek zdroj uhlíka [1]. Vďaka tomu môžu využívať rôzne druhy organického materiálu, ako napr. potraviny, drevo, kožu, tkaniny alebo niektoré plasty, uloženého najmä vo vlhkom prostredí. Plesne dokážu využívať aj vzdušnú vlhkosť a chemicky viazanú vodu, ktorá sa uvoľňuje za vyšších teplôt, čo umožňuje rast napr. aj na vlhkom murive.

#### 2.1.2. Využitie plesní v priemysle

Plesne nachádzajú využitie pri produkcii komerčných enzýmov, antibiotík a organických kyselín (napr. kyselina citrónová, fumarová, šťaveľová) [5]. Ďalej sa plesne uplatňujú pri

aeróbnom čistení odpadných vôd alebo pri výrobe insekticídov. V potravinárskom priemysle sa kultúrne kmene plesní používajú pri výrobe niektorých druhov syrov, kde umožňujú ich zrenie a rozvoj charakteristických sensorických vlastností. Podobne je tomu tak aj v prípade niektorých druhov fermentovaných mäsových výrobkov.

## 2.2. Drevokazné huby

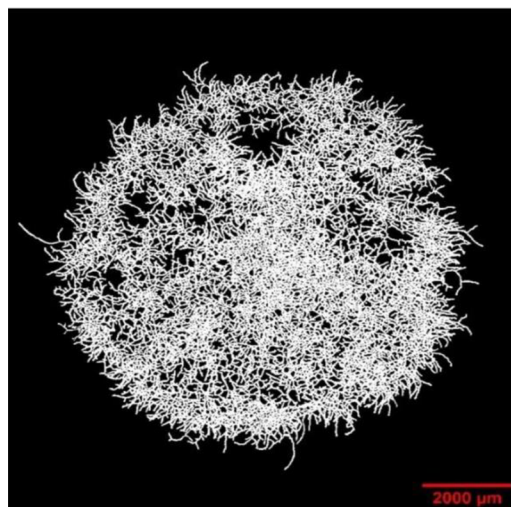
Termínom drevokazné huby sa označujú všetky druh húb, ktoré k svojmu rastu a rozmnožovaniu vyžadujú drevnú hmotu [6]. Tá sa skladá z 3 hlavných zložiek – celulózy, hemicelulózy a lignínu. Drevokazné huby patria medzi bazidiomycety (stopkovýtrusné huby) a počas evolúcie sa rozdelili do 2 veľkých skupín, na tzv. „huby bielej hniloby“ a „huby hnedej hniloby“. Huby bielej hniloby sú svojim enzýmovým aparátom schopné rozkladať okrem svetlej celulózy aj tmavohnedý lignín; napadnuté drevo tak máva svetlú vláknitú štruktúru. Na druhej strane huby hnedej hniloby rozkladajú a využívajú len celulózu. Oba druhy húb sa bežne vyskytujú v prírode.

### 2.2.1. Pleseň *Phanerochaete chrysosporium*

Spomedzi ligninolytických húb sa *P.chrysosporium* považuje za modelový kmeň pre vývoj a pochopenie systému produkcie ligninolytických enzýmov, pretože dokáže produkovať veľmi komplexný enzýmový aparát [14]. Pleseň *Phanerochaete chrysosporium* (viď. Obr.1(B)) patrí do kmeňa *Basidiomycota*, konkrétne k hubám bielej hniloby, ktoré produkujú extracelulárne oxidačné enzýmy degradujúce lignín alebo jemu príbuzné zlúčeniny [7]. Na drevnom substráte tvoria biele povlaky (viď. Obr.1(A)).



(A)



(B)

**Obr. 1 (A)** Pleseň *P.chrysosporium* rozkladajúca lignín v dreve [7]; **(B)** Mikroskopická snímka plesne *P.chrysosporium* [8].

*P.chrysosporium* je najintenzívnejšie študovanou hubou bielej hniloby [7]. Vylučuje rad peroxidáz a oxidáz, ktoré pôsobia nešpecificky na nejednotnú štruktúru lignínu. Výsledkom nešpecifických reakcií je tvorba voľných radikálov lignínu. Radikály následne podliehajú spontánnym štiepnym reakciám.

Nešpecifická povaha a výnimočný oxidačný potenciál enzýmov vzbudili značný záujem o aplikáciu v bioprocesoch, ako napr. degradácia organických znečisťujúcich látok alebo bielenie vlákien. Najväčšou výhodou, ktorú táto pleseň poskytuje, je ponechanie

prakticky nedotknutej štruktúry celulózy. Ďalej má vysokú optimálnu teplotu rastu (asi 40 °C), čo znamená, že môže rásť na drevných štiepkach v kompostových hromadách, ktoré dosahujú veľmi vysokú teplotu. Tieto charakteristiky majú potenciál využitia v biotechnológiách.

### 2.3. Kultivácia húb bielej hniloby

Ako kultúry sú označované mikroorganizmy kultivované v laboratórnych podmienkach na živných médiách [9]. Ak pracujeme s kultúrou jedného druhu, hovoríme o čistej kultúre. Kultúry zmiešané sú pozostávajú z niekoľkých druhov (napr. izoláty z prirodzeného prostredia, ktoré je potrebné prečistiť). Ako kultúry technické sa označujú kultúry používané pre výskumné alebo prevádzkové účely (v čističkách odpadných vôd, bakteriálne filtre, bioreaktory). Technické kultúry môžu byť ako čisté (pivovarské kvasinky), tak aj zmiešané (mliečne baktérie pre výrobu jogurtov). Kultúra je prenášaná tzv. preočkovaním z čerstvého tekutého alebo tuhého média do kultivačného média zloženého podľa charakteristických rastových podmienok (živiny, pH, teplota, množstvo rozpusteného kyslíka, atď.).

Kultivácia v tekutom médiu prebieha kontinuálne alebo staticky. Pri kontinuálnej kultivácii sú neustále do média privádzané potrebné živiny a mikroorganizmus produkuje metabolity, ktoré sú zase odvádzané. Pri statickej kultivácii sú živiny dodané na začiatku, ešte pred samotným naočkovaním, a v priebehu kultivácie sa už nedodávajú. Statická kultivácia môže byť submerzná alebo vzdušnená. Týmito procesmi sa premiešavaním zväčšuje plocha fázového rozhrania, čím dochádza k efektívnejšej výmene plynov (napr. prevzdušňovacie rošty v bioreaktoroch).

Hlavnými problémami pri kultivácii húb bielej hniloby produkujúcich lignín-degradujúce enzýmy sú nestabilita a nízka úroveň ich produkcie [14]. Tieto huby rastú typicky ako mycélium a nedarí sa im pri vysokom stupni miešania. Z týchto dôvodov je viacej preferovaná submerzná kultivácia v celom objeme média (SmC) alebo statická kultivácia v tuhom stave (SSC) [10].

V štúdií *Tien a Kirk (1988)* prvýkrát popísali médium na udržiavanie a sporuláciu plesne *P.chrysosporium* (vid'. Tab.1) [11]. K produkcii lignín-degradujúcich peroxidáz je však potrebné vytvoriť nedostatok živín uhlíka, dusíka a síry, čo spôsobí spomalenie rastu plesne a iniciuje tvorbu sekundárnych metabolitov [12]. Ďalšími kritickými podmienkami pre reguláciu tvorby enzýmov sú pH, miešanie, prítomnosť organických kyselín, stopových prvkov a obsah rozpusteného kyslíka [13]. Okrem štandardizovaného zloženia média podľa *Tien a Kirk (1988)*, boli skúmané aj iné zdroje živín [14, 64-71]. Ako zdroj uhlíka bol skúmaný glycerol v koncentrácii 0,5 a 1 % alebo prírodné zdroje uhlíku (napr. parou explodovaná slama v koncentrácii 0,5 %). Ako zdroje dusíku boli použité najčastejšie použité vínan amónny, vínan diamónny alebo polypeptón. V niektorých štúdiách boli použité aj komplexné zdroje živín ako napr. kvasničný extrakt. Okrem toho je nevyhnutný aj obsah stopových prvkov Ca, Mn, Fe, Zn, Cu a Mg.

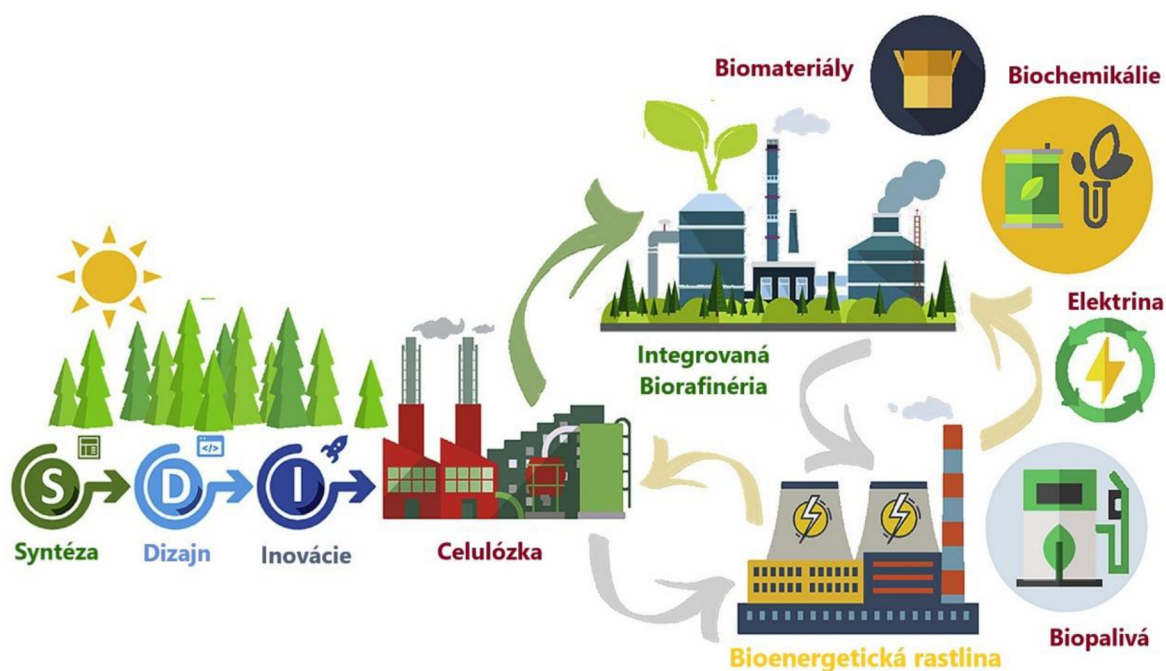
**Tab. 1** Médium pre udržiavanie plesne *P.chrysosporium* popísané v štúdii Tien a Kirk (1988) [11].

Zložka	Koncentrácia
Glukóza	1 %
Zemiakovo-dextrózový extrakt (PDA)	1 %
Peptón	0,2 %
Kvasničný extrakt	0,2 %
Asparagíny	0,1 %
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 %
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,1 %
Tiamín	0,0001 %
Agar	2 %

Pri kultivácii je tiež možné použiť induktor alebo stimulátor produkcie lignín-degradujúcich enzýmov. Najčastejšie sa používajú zdroje lignínu (napr. alkalický lignín, otruby, drewná štiepka), VA, PEG alebo Tween 80. Vhodné pH média sa pohybuje od 4,2 do 6,2 (optimálne pod 6,0) a kultivačná teplota od 25 do 39 °C (optimálne 37 °C) v stacionárnom režime alebo s trepaním optimálne pod 200 ot./min.

## 2.4. Lignín

Lignín je zložkou lignocelulózovej biomasy rastlín, kde tvorí približne 20 – 30 %. Práve pre to patrí k najviac rozšíreným biopolymérom na planéte [15]. Vzniká tzv. lignifikáciou, čo je proces drevnatenia súvisiaci s tvorbou cievneho systému rastlín. Lignín poskytuje rastlinám pevnosť a odolnosť voči biodegradácii a environmentálnym stresom. Svoj potenciál a široké využitie by mohol lignín nájsť ako obnoviteľný a udržateľný zdroj v koncepte biorafinérie (viď. Obr.2), kde by mohol nahradiť klasické petrochemické zdroje [16].

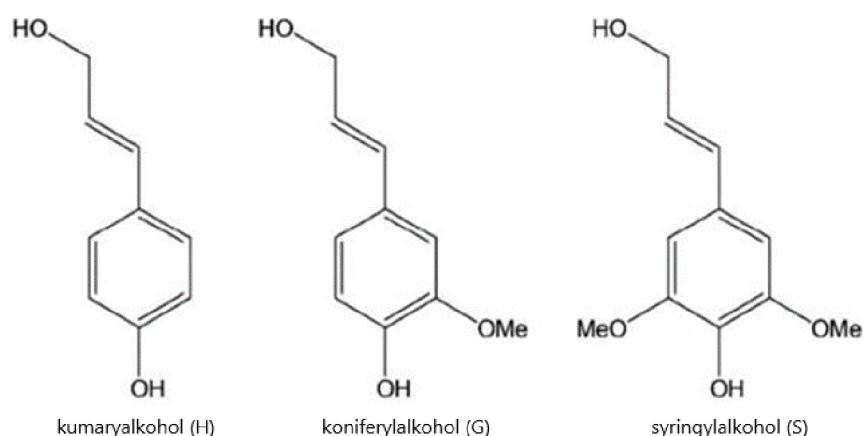


**Obr. 2** Schéma konceptu biorafinérie [16].

Heterogénna štruktúra lignínu avšak prináša aj mnohé problémy pri jeho separácii z biomasy [17]. Získanie lignínu touto cestou je energeticky náročný a vyžaduje použitie drsných chemikálií (silné kyseliny/báze, rozpúšťadlá a katalyzátory). Súčasný výskum sa sústreďuje na hľadanie mikrobiálnych a enzymatických ciest depolymerizácie lignínu.

### 2.4.1. Štruktúra Lignínu

Lignín sa vyskytuje v rastlinách vo forme komplexu prepojený kovalentnými väzbami s celulórou a hemicelulórou [18]. Jeho úlohou je dodať pevnosť bunkovým stenám a zabezpečiť ich ochranu pred biologickými škodcami. Okrem drevokazných húb, lignín nerozloží baktéria ani vírus, nanajvýš dôjde k modifikácii štruktúry.



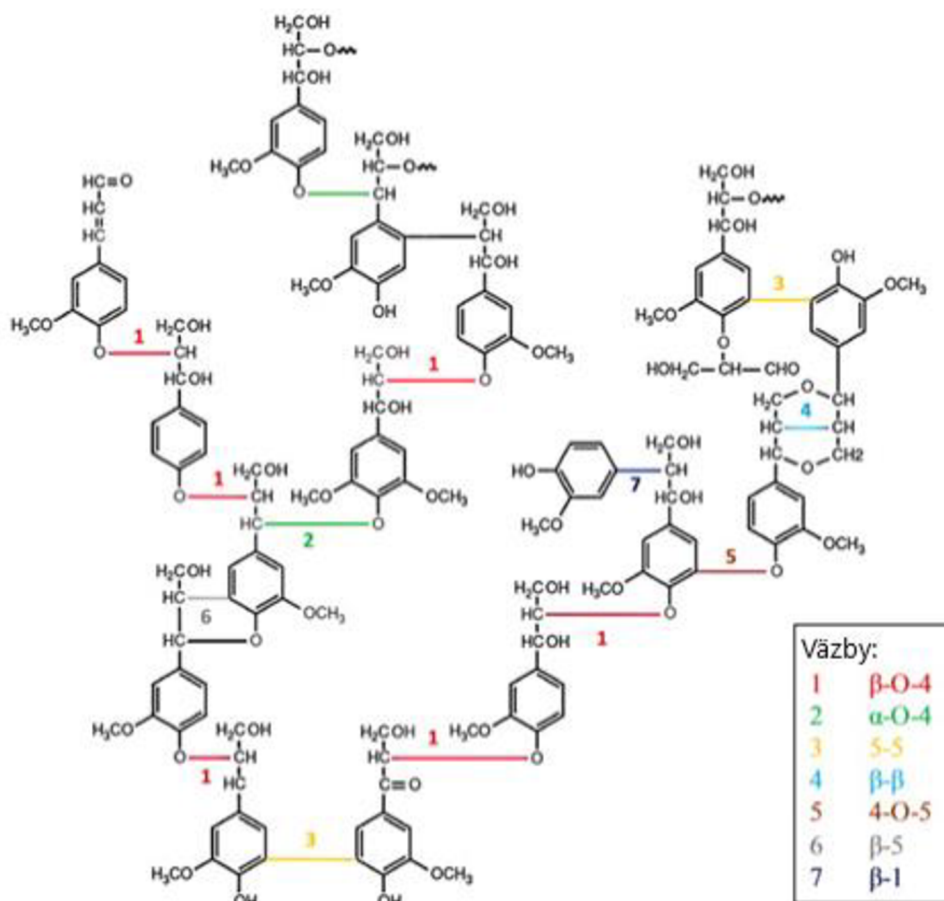
**Obr. 3** Monolignoly vyskytujúce a v štruktúre lignínu [20].

Štruktúra samotného lignínu je veľmi zložitá a nedá sa úplne jednoznačne identifikovať. Je však známe, že lignín tvoria 3 fenylpropánové jednotky (vid'. Obr.3), tzv. monolignoly: G (koniferylalkohol), S (syringylalkohol) a H (kumarylalkohol) [19].

Jednotlivé monolignoly sa odlišujú substituovanými methoxyskupinami na fenolovom jadre. Celkovo je štruktúra heterogénna a monolignoly sú zastúpené v rôznych pomeroch podľa druhu dreva. V mäkkom dreve je najviac monolignolov typu G. V tvrdom dreve sú G- a S-jednotky v rôznych pomeroch. V trávnatých rastlinách je H-jednotiek menej ako 5 %.

Rovnako rôznorodé sú aj typy väzieb medzi monolignolmi (vid'. Obr.4). Väzby môžeme rozdeliť do 2 typov: éterové a C-C väzby. Najviac zastúpenou je éterová väzba  $\beta$ -O-4, ktorá tvorí okolo 50 % všetkých väzieb. Celá štruktúra lignínu je navyše stabilizovaná van der Waalsovými interakciami. Na fenylpropánových jadrách sa okrem methoxyskupin substituujú aj hydroxylové a fenolové funkčné skupiny.

Lignín možno klasifikovať ako natívny a technický lignín. Natívny lignín predstavuje heterogénny biopolymér v pôvodnom stave bez akejkoľvek modifikácie. V prírode sa vyskytuje v komplexe spolu s celulórou a hemicelulórou. Technický lignín je získavaný extrakciou biomasy alebo ako vedľajší produkt papierenského priemyslu. Najznámejšie typy technického lignínu sú zhrnuté v Tab.2. Chemická reaktivita molekuly kľúčom k štruktúre lignínu je zložitou jeho priestorovou štruktúrou. Dôvodom je blokovanie reaktívnych miest, ako sú alifatické a aromatické hydroxylové skupiny v komplexnej heterogénnej štruktúre. Depolymerizáciou sa tieto funkčné skupiny uvoľnia a lignínový fragment je tak citlivejší k chemickým reakciám.



Obr. 4 Vázby vyskytujúce sa v štruktúre lignínu [21].

Tab. 2 Súhrn typov technických lignínů podľa použitej metódy izolácie a extrakcie [upravené podľa [22]].

Typ technického lignínu	Rozpúšťadlá	Použitá teplota (°C)	pH	Proces extrakcie
kraft lignín	alkalické, organické	155 – 175	13 – 14	sulfátové rozvlákňovanie s NaOH, Na <sub>2</sub> S
lignosulfonáty	voda	125 – 145 (kyslý hydrogensíran) 150 – 170 (bisulfit)	1 – 2 (kyslý hydrogensíran) 3 – 5 (bisulfit)	sulfitové rozvlákňovanie
organosolvent lignín	organické	180 – 210	7	organické rozpúšťanie
hydrolyzovaný lignín	voda	-	-	enzymatická hydrolýza
steam explosion lignín	organické	180 – 230	-	hydrotermálny proces
lignín z mletého dreva (MWL)	hydrofóbne	-	-	mletie v prítomnosti nenapučiavacích rozpúšťadiel
soda lignín	alkalické	155 – 175	13 – 14	extrakcia NaOH s prídavkom antrachinónu (AQ)

### 2.4.2. Chemické a fyzikálne vlastnosti

Lignín je amorfny polymér s vlastnosťami termoplastického materiálu [23]. Prírodný lignín je takmer bezfarebný a až po kyslom alebo zásaditom spracovaní nadobudne hnedú až tmavohnedú farbu. Prítomnosť jednotlivých funkčných skupín sa odvíja od spôsobu extrakcie lignínu z biomasy [24]. Teplota skleneného prechodu sa mení podľa spôsobu izolácie, množstva sorbovanej vody, molekulovej hmotnosti a tepelného spracovania, v priemere od 90 do 150 °C.

V poslednej dobe sa oceňujú vlastnosti, ktoré lignín zaraďujú k obnoviteľným zdrojom [25]. Ďalej bolo zistené, že lignín vykazuje antioxidačnú, antifugálnu a antimikrobiálnu aktivitu. Je dostupný vo veľkých množstvách ako vedľajší produkt papierenského priemyslu. Ďalšou výhodou je jeho biologická odbúrateľnosť až na konečný CO<sub>2</sub>. V rámci bunkovej steny rastlín je zodpovedný za jej pevnosť a integritu vďaka svojej odolnosti voči biologickým a chemickým atakom. Lignín vykazuje schopnosť absorbovať UV žiarenie a v kompozitoch môže mať aj protipožiarne vlastnosti [26; 27].

Prítomnosť reaktívnych funkčných skupín umožňuje modifikáciu cieľenými molekulami, ako napr. peptidmi alebo protilátkami, a prípravu očkovacích kopolymérov [28]. Medzi ďalšie významné vlastnosti patrí hydrofilita alebo hydrofobita, ktoré sa odvíjajú od zdroja lignínu. Vďaka dobrým reologickým a visko-elastickým vlastnostiam je lignín vhodný na tvorbu biokompatibilných filmov.

### 2.4.3. Modifikácia makromolekuly lignínu

Vzhľadom ku komplexnosti lignínovej štruktúry v lignocelulózovej biomase je používaná predúprava, ktorá má fyzikálne – chemický charakter. Súčasné termochemické metódy zamerané na depolymerizáciu lignocelulózového materiálu sú však energeticky náročné, nie sú šetrné k životnému prostrediu a produkujú toxické chemikálie. Z tohto dôvodu sú výskumy čoraz viac zamerané na trvalo udržateľné prístupy k biologickému odbúraniu lignocelulózu pomocou oxidatívnych enzýmov.

K zvýšeniu reaktivity molekuly lignínu je potrebné použiť chemickú modifikáciu, ktorá vo všeobecnosti pozostáva z 3 krokov: fragmentácia alebo depolymerizácie molekuly, chemickej syntézy nového aktívneho miesta a funkcionalizáciu hydroxylových skupín [21; 72]. K depolymerizácii molekuly dochádza najčastejšie pyrolýzou, hydrogenáciou, hydrolyzou alebo oxidáciou. Nové aktívne miesto býva syntetizované alkyláciou alebo dealkyláciou, hydroxyláciou, amináciou, halogenáciou, hydroxyalkyláciou, sulfonáciou alebo nitráciou. Nové funkčné skupiny sa zavádzajú esterifikáciou alebo uretanizáciou. Podľa použitých metód je možné získať lignín s odlišnými vlastnosťami podľa požadovanej aplikácie. Modifikovaný lignín sa využíva ako epoxidový kompozit alebo živica na báze biopolyméru, lepidlo na drevo, termoplastický materiál, dispergačné činidlo, biosurfaktant pre enzymatickú hydrolyzu, polyuretánová živica alebo ako ohňovzdorná prísada do vlákien.

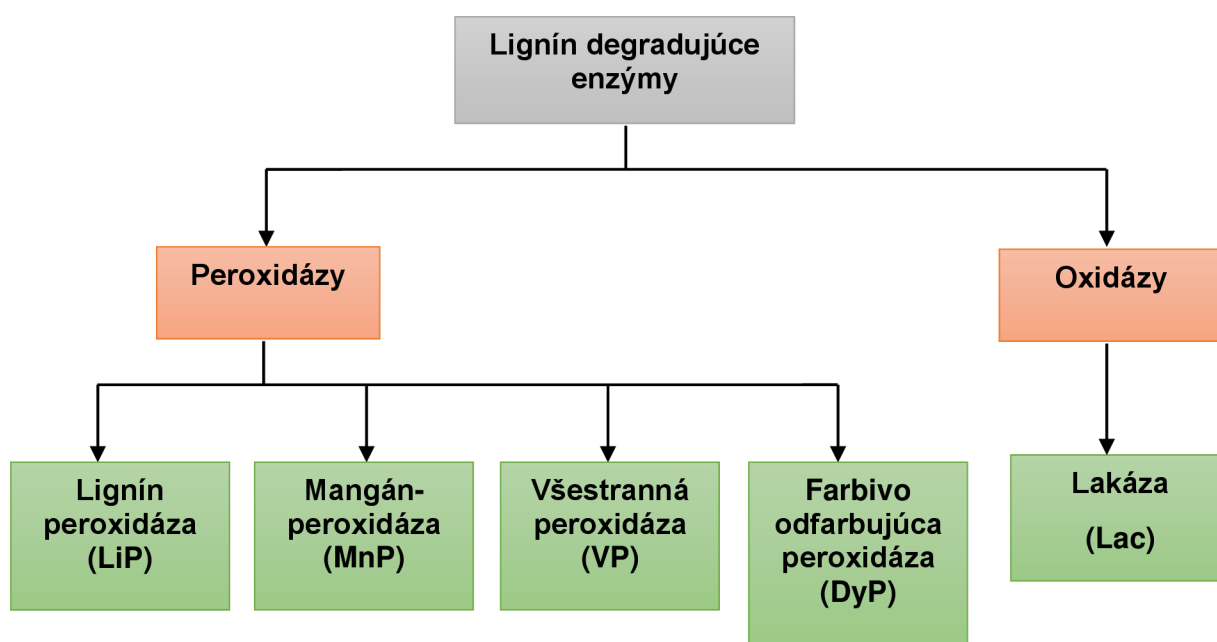
Depolymerizácia lignínu môže prebiehať aj mikrobiálnou činnosťou alebo enzymatickou oxidáciou [73]. Tie vychádzajú z biodegradácie lignínu, ktorá v prírode prebieha dvojstupňovo: depolymerizácia natívneho lignínu a mineralizácia výsledných heterogénnych aromatických zlúčenín. Najviac využívané sú huby bielej hniloby (napr. *Phanerochaete chrysosporium*, *Ceriporiopsis subvermispota* a i.), ktoré produkujú extracelulárne lignín-degradujúce enzýmy (peroxidázy a lakázy), ktoré depolymerizujú lignín prostredníctvom tvorby lignínových fenoxylradikálov. Okrem húb, sú využívané aj niekoľké baktérie rodu *Amycolatopsis*, *Streptomyces*

a Rhodococcus, alebo archea [74]. Ich aktivita je však v porovnaní s hubami výrazne menšia.

## 2.5. Ligninolýtické enzýmy

Ligninolýtické enzýmy sú makromolekuly zodpovedné za biokatalytický rozklad lignocelulózy až na monoméne jednotky [29]. Tie sa môžu ďalej konvertovať na produkty s pridanou hodnotou. Komplikácie rozkladu lignínu mikroorganizmami vyplývajú z extracelulárnej povahy a oxidačného mechanizmu degradujúcich enzýmov v dôsledku prítomnosti éterových väzieb a väzieb C-C, ako aj menšej špecificity enzýmov v dôsledku nerovnomerného priestorového usporiadania atómov v polymérnych reťazcoch [30].

Lignocelulózy sú komplexné extracelulárne enzýmy podieľajúce sa na rozklade celulóзовých a ligninolýtických zložiek rastlinnej biomasy [29]. Pozostávajú z lignín degradujúcich extracelulárnych polypeptidov (oxidáz a peroxidáz, ktorých delenie je zhrnuté na Obr.5) a hydrolytických enzýmov (celuláz, pektináz, amyláz, hemiceluláz, manáz, esteráz a proteáz). Za vhodných reakčných podmienok urýchľujú tvorbu užitočných produktov z biologických substrátov, čo vedie k mnohým užitočným biotechnologickým aplikáciám.



Obr. 5 Schéma kategorizácie ligninolýtických enzýmov [upravené podľa [29]].

### 2.5.1. Peroxidázy

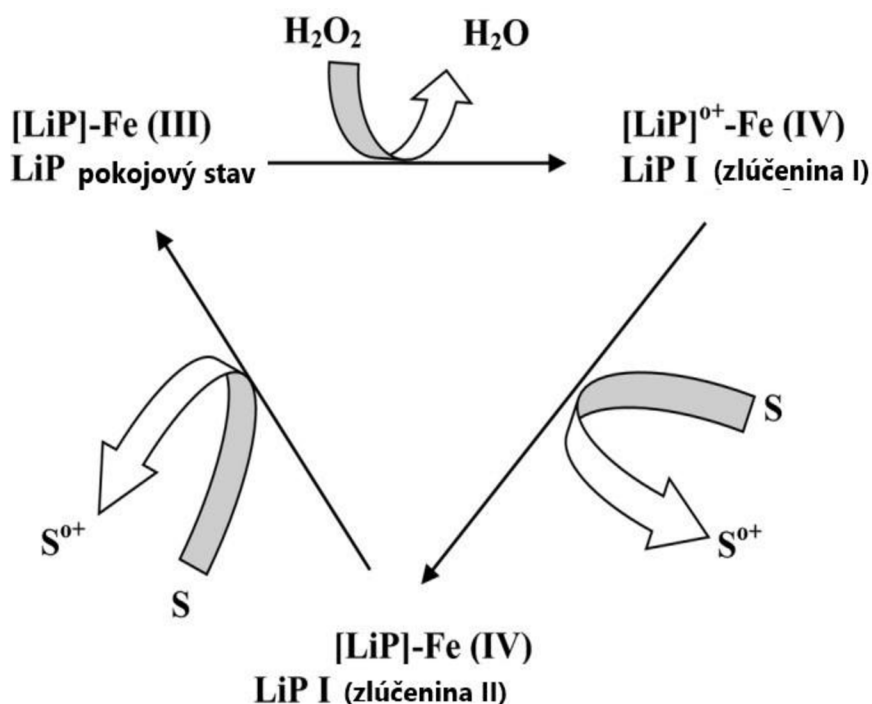
Peroxidázy (EC 1.11.1) sú glykoproteíny s hemovými prostetickými skupinami, ktoré vyžadujú oxidačné vlastnosti peroxidu vodíka na iniciáciu a uľahčenie oxidácie lignínu [31]. Princíp depolymerizácie lignínu je tvorbou voľných radikálov (napr. arylový kation a fenoxylové radikály) alebo aniónov (napr. OCl<sup>-</sup>). Tieto radikály iniciujú degradáciu lignínu, čím sa uvoľnia humínové látky a monolignoly. Peroxidázy degradujúce lignín možno rozdeliť do 4 triedy: LiP, MnP, VP a DyP [32].



## LIGNÍN-PEROXIDÁZA

Lignín-peroxidáza (LiP, EC 1.11.1.14.) bola objavená ako extracelulárny enzým produkovaný plesňou bielej hniloby *P.chrysosporium*, ktorá rastla v podmienkach limitácie dusíkom [30]. Iné plesne produkujúce LiP sú napr. *T.versicolor*, *Bjerkandera sp.*, *T.cervina* a iné. LiP sú monoméne hemoproteíny s molekulárnou hmotnosťou okolo 40 kDa. Ich štruktúra je podobná klasickým peroxidázam, ktoré majú kation  $\text{Fe}^{3+}$  koordinovaný k štyrom hemovým tetrapyrrolovým dusíkom a k His-zvyškom.

Katalytický cyklus LiP zahŕňa 3 kroky (znázornené aj na Obr.6) [33]. Prvým reakčným krokom je oxidácia pokojového stavu enzýmu  $[\text{Fe}(\text{III})]$  peroxidom vodíka ako akceptorom elektrónov. Táto reakcia vedie k tvorbe oxo-ferrylového medziproduktu LiP-I deficitného o 2 elektróny. V druhom kroku sa oxo-ferrylový medziprodukt redukuje molekulou substrátu (nefenolický aromatický substrát), ktorý je donorom jedného elektrónu zlúčenine LiP-I a vzniká druhý medziprodukt LiP-II deficitný o 1 elektrón. Posledný krok zahŕňa darovanie druhého elektrónu zlúčenine LiP-II redukovaným substrátom, čím sa enzým vráti do pôvodného oxidačného stavu. V molekule lignínu tieto enzýmy preferujú väzby  $\text{C}\alpha\text{-C}\beta$ .



Obr. 6 Schéma katalytickej reakcie Li-peroxidázy [upravené podľa [34].

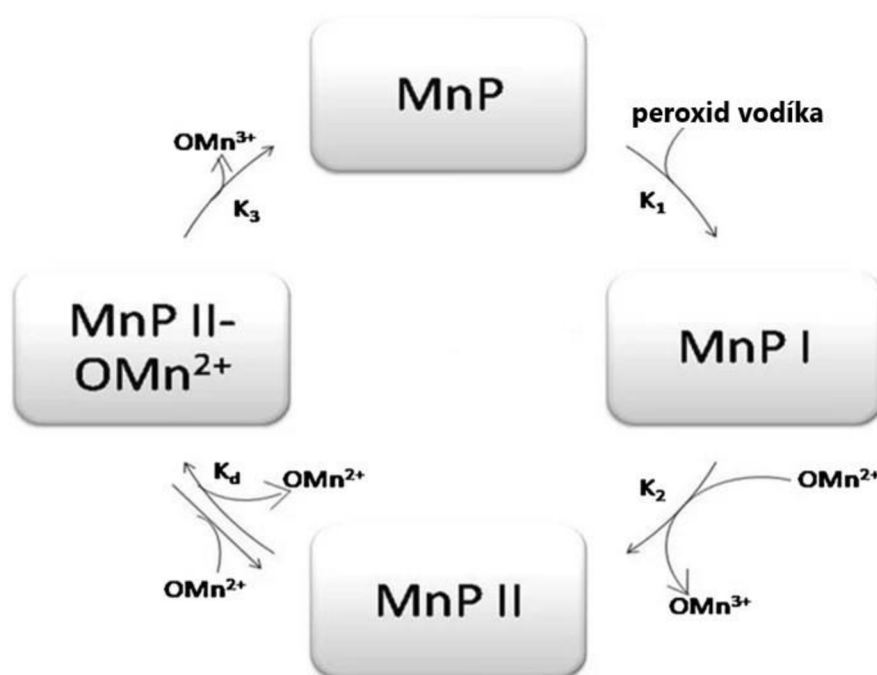
Enzým LiP je možné použiť pri detoxikácii vôd, čistení odpadových vôd znečistených fenolickými látkami, bio-bielení a vývoji krémov na zosvetlenie pokožky, pri vývoji bio-senzorov na určenie prítomnosti peroxidu vodíka a jemu príbuzných zlúčenín [33]. V poslednej dobe sa rozšírila aplikácia LiP vo vývoji kozmetických a dermatologických produktov, napr. na rozjasnenie pleti alebo liečbu hyperpigmentácie (škvrn zo slnka alebo tzv. stareckých škvŕn).

## MANGÁN-PEROXIDÁZA

Mangán-peroxidáza (EC 1.11.1.13.) je všade prítomný enzým katalyzujúci Mn-dependentné reakcie fenolového aj nefenolového substrátu za prítomnosti peroxidu vodíka [30]. Produkcia MnP bola objavená u *P.chrysosporium*, *Pleurotus ostretus*, *Trametes spp.* a u rodov *Meruliaceae*, *Coriolaceae* a *Polyporaceae*.

Katalytický cyklus je zahájený pokojovým železitým stavom enzýmu a peroxidom vodíka za vzniku medziproduktu MPI [35]. Prvý medziprodukt reakcie je komplexom  $\text{Fe}^{4+}$  oxo-porfyrínových radikálov. Monochelátované ióny  $\text{Mn}^{2+}$  poskytujú jeden elektrón na porfyrín intermediovaný na medziprodukt MP II, pričom vzniká  $\text{Mn}^{3+}$ . Chelátované ióny  $\text{Mn}^{3+}$  následne pôsobia ako mediátory prenosu náboja S-S, umožňujúce oxidáciu rôznych fenolových substrátov, ako sú jednoduché fenoly, amíny, fenolický lignín a niekoľko farbív. Celý cyklus katalýzy MnP je znázornený na Obr.7.

MnP má potenciálne biotechnologické a zároveň aj bioremediačné využitie [36]. Ďalej sa používa pri výrobe prírodnej arómy vanilínu, odfarbovanie priemyselných odpadových materiálov ako textil, celulóza a mnoho ďalších [37].



Obr. 7 Katalytický cyklus Mn-dependentnej peroxidázy [upravené podľa [35].

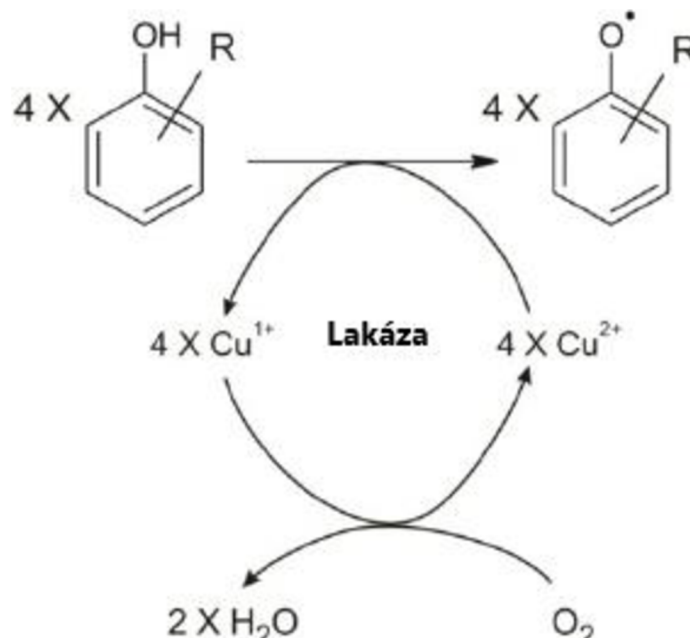
### 2.5.2. Lakázy

Lakázy (EC 1.10.3.2.) sú produkované plesňami bielej hniloby a niektorými baktériami vo forme enzýmov alebo izoenzýmov [30]. Patria do skupiny N-glykozylovaných polyfenoloxidáz obsahujúcich 4 ióny medi (v oxidačnom stave 2+) distribuovaných medzi 3 rôzne väzobné miesta (viď. Obr.8). Tieto ióny katalyzujú 4-elektrónovú redukciu kyslíku na vodu a úzko súvisia s katalytickým mechanizmom reakcie. Lakázy (Lac) sú nešpecifické enzýmy s molekulárnou hmotnosťou v rozmedzí 60-80 kDa. Dokáže oxidovať nefenolické látky s nízkou molekulovou hmotnosťou, katalyzuje tvorbu fenoxylových radikálov a ich nešpecifické reakcie vedúce k oxidácii hydroxyly na ketón, alkyl-aryl štiepenie, demetoxyláciu ako aj polymerizačné reakcie. Podľa spektroskopických a paramagnetických vlastností aktívneho miesta s naviazanými iónmi medi sú lakázy kategorizované do 3 skupín: modrá, žltá a biela [38].

Princíp účinku Lac spočíva v degradácii  $\beta$ -1 a  $\beta$ -O-4 dimérov prostredníctvom C-C štiepenia, C-oxidácie a alkyl-arylového štiepenia. Katalyzuje odštiepenie jedného elektrónu z fenolických hydroxylových skupín lignínu za vzniku fenoxylradikálov, ktoré ďalej reagujú

neenzymaticky. Elektrón je prijatý na štvormednatým klastrom, kde dochádza k redukcii kyslíku na vodu [75].

Uplatnenie týchto enzýmov možno nájsť v potravinárskom, papierenskom a celulózovom priemysle [40]. Ďalej v textile, syntetickej chémii, kozmetike a biodegradácii environmentálnych fenolických polutantov.



*Obr. 8 Katalytický mechanizmus lakázy [upravené podľa [39]].*

### 2.5.3. Aplikácia lignolytických enzýmov v priemysle

Lignolytické enzýmy nachádzajú široké spektrum komerčných aplikácií pri oxidácii farbív, lignínov a lignosulfonátov, analýze liečiv, výrobe etanolu, čírení muštov a vín, čistení odpadových vôd, zlepšenie belosti pri konvenčnom bielení bavlny a degradáciu toxických polycyklických aromatických uhľovodíkov [41]. Odstránenie vrstiev lignínu v lignocelulózovej biomase umožňuje lepší prístup hydrolytických enzýmov (xylánáz a celuláz) k polysacharidovým vláknam [42]. Súčasne sa k delignifikácii biomasy používajú hydrotermálne procesy alebo chemické a fyzikálne prostriedky, ktoré majú často obmedzenú selektivitu a sú prekursorom toxických a nebezpečných látok [43]. Lignolytické enzýmy majú preto veľký potenciál v rámci zavedenia ekologických prístupov do priemyslu.

Lakázy boli skúmané ako účinný nástroj na elimináciu zápachu produkovaného na skládkach odpadu, na farmách s chovom dobytka alebo v celulózkach [41]. Používajú sa aj na odbúravanie xenoiotík a polutantov, na odfarbovanie a degradáciu chemických farbív bežne používaných v textilnom priemysle. Ďalšie environmentálne aplikácie zahŕňajú úpravu odpadových vôd, bielenie a odstraňovanie odpadu, v celulózovom a papierenskom priemysle. Vďaka svojej biologickej povahe sa čoraz viac uplatňujú vo farmácii a v nanotechnológiách na výrobu biosenzorov a bioreportérov pre imunotesty, skúmanie glukózy, aromatických amínov a fenolových zlúčenín alebo na stanovenie TAC v ľudskej plazme [44].

## 2.6. Stabilizácia enzýmov

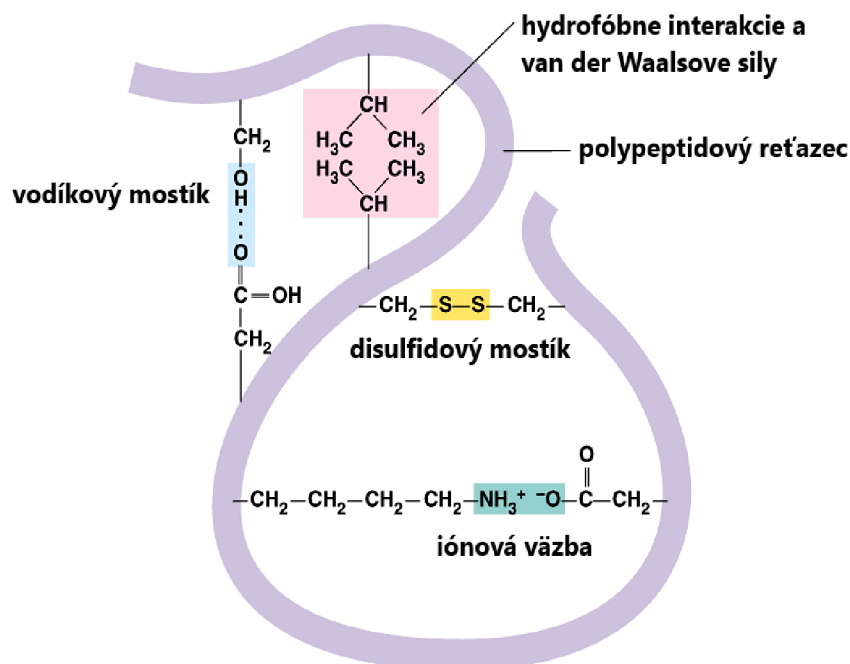
Stabilita proteínov pri manipulácii a skladovaní nebýva zachovaná [45]. Enzýmy postupom času strácajú enzýmy svoje katalytické schopnosti, napr. v dôsledku pôsobenia tepla či extrémneho pH. Postupy, ktorými sa zvýši stabilita enzýmu, možno rozdeliť do 3 hlavných kategórií:

- Imobilizácia;
- Chemická modifikácia;
- Proteínové inžinierstvo.

Imobilizácia je postup, ktorý využíva afinitu enzýmu ku konkrétnemu polyméru slúžiacemu ako základná matrica [46]. Naproti tomu, chemická modifikácia poskytuje vo vode rozpustné stabilné enzýmy bez potreby polymérnej matrice. Pri chemickej modifikácii je roztok enzýmu inkubovaný s roztokom modifikátora a následne je enzým z reakčnej zmesi odseparovaný dialýzou alebo gélovou filtráciou. Pri reakcii dochádza k modifikácii externých funkčných skupín na povrchu molekuly (viď. Obr.9). Aby došlo k modifikácii vnútorných funkčných skupín, tzv. kľúčových, je potrebné aplikovať väčšie množstvo modifikátora alebo dlhší inkubačný čas.

Pri chemickej modifikácii je veľmi náročné predpovedať termálnu stabilitu modifikovaného enzýmu. Chemická modifikácia môže prebiehať rôznymi spôsobmi:

- Modifikácia s bifunkčnými činidlami (sieťovanie povrchových funkčných skupín);
- Modifikácia nepolárnymi činidlami (posilnenie hydrofóbných interakcií);
- Zavedenie novej polárnej alebo nabitej skupiny (adícia vodíkovej alebo iónovej väzby);
- Hydrofilizácia povrchu proteínu (ako prevencia pred nežiaducimi hydrofóbnymi interakciami);
- Modifikácia fotogenerovaným heterobifunkčným činidlom (intramolekulárne zosieťovanie činidlom na báze arylazidu).



Obr. 9 Typy interakcií, ktorými je stabilizovaná terciárna štruktúra proteínu [upravené podľa [47].

V rámci proteínového inžinierstva je možné stabilitu enzýmu zvýšiť nasledujúcimi spôsobmi:

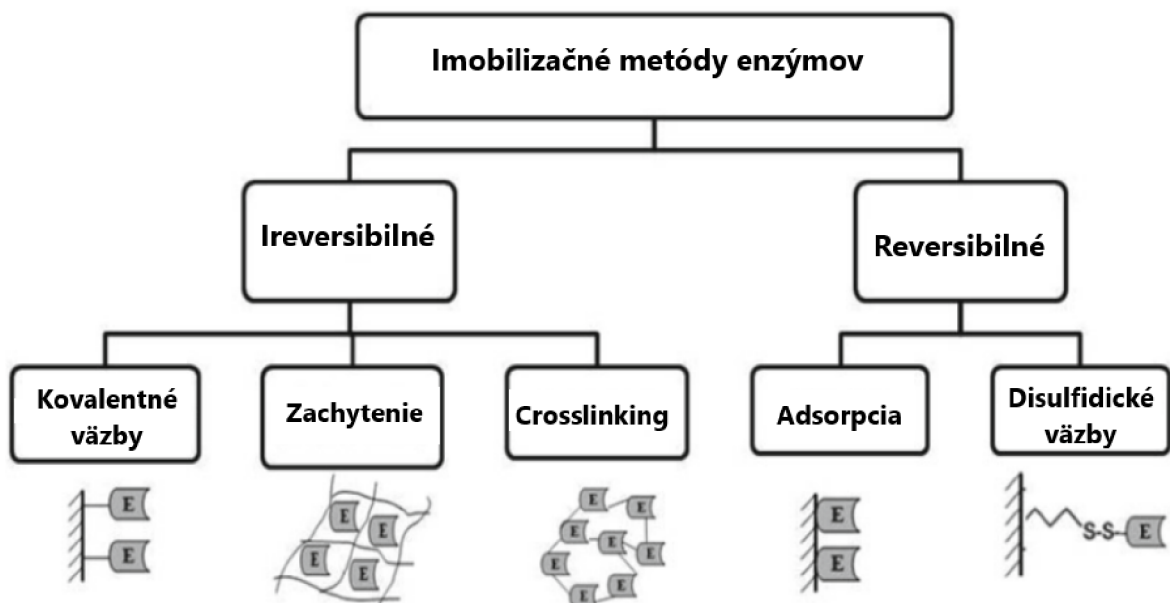
- Vloženie interného alebo externého disulfidového mostíka;
- Zlepšenie vnútornej hydrofóbnej výplne;
- Zvýšenie počtu vnútorných vodíkových väzieb;
- Zvýšenie povrchových solných mostíkov;
- Vloženie aromatických zvyškov.

Pri použití enzýmov v priemysle sú kladené určité požiadavky, bez ktorých by aplikácia enzýmu bola bezvýznamná. Enzýmové preparáty musia byť stabilizované voči teplote, extrémnym hodnotám pH a voči prítomnosti solí, zásad a povrchovo aktívnych látok.

## 2.7. Techniky imobilizácie enzýmov

Enzýmy sa vo všeobecnosti používajú ako vodné roztoky, čo spôsobuje problémy pri regenerácii a opätovnom použití alebo tiež môže viesť aj ku kontaminácii produktu [77]. Preto je tendencia prekonať tieto prekážky a zlepšiť využiteľnosť enzýmov využitím imobilizačných techník.

Imobilizácia je chemická metóda používaná na zlepšenie stability enzýmov, regeneráciu a opätovné použitie enzýmov, a zároveň poskytuje zníženie nákladov pri priemyselnej enzymatickej katalýze [48; 49]. Imobilizované enzýmy sú odolné proti zmenám pH a teploty, proti účinku inhibítorov, denaturantov a organických rozpúšťadiel [50].



**Obr. 10** Schematické znázornenie hlavných imobilizačných metód [upravené podľa [51]].

Imobilizačné techniky (viď. Obr. 10) možno rozdeliť do dvoch skupín: chemické a fyzikálne. Fyzikálna imobilizácia je sprostredkovaná slabšími interakciami (napr. vodíkovými väzbami), hydrofóbnymi interakciami, van der Waalsovými silami, afinitnou väzbou, iónovou väzbou s nosičom alebo mechanickými zadržaním na nosiči [51]. Chemické metódy sú charakteristické tvorbou kovalentných väzieb medzi enzýmom a nosičom [52].

Mobilita enzýmov môže byť obmedzená niekoľkými spôsobmi [53; 54]:

- 1) *Reversibilne* – prichytenie alebo priľnutie na povrch adhéziou, adsorpciou alebo chemickou väzbou (iónové a afinitné interakcie);
- 2) *Ireversibilne* – zachytenie v medzerách vláknitých alebo pórovitých materiálov, fyzikálne zachytenie v pevnej alebo poréznej matrici, ako napr. stabilizovaný gél alebo membrána, kovalentná väzba alebo mikroenkapsulácia.

K imobilizácii sa používajú organické, ako aj anorganické nosiče (napr. bentonit, oxid kremičitý). Organické nosiče možno rozdeliť na prírodné (polysacharidy: celulóza, agar, chitín, alginát; proteíny: kolagén, albumín) alebo syntetické polyméry (polystyrén, polyakrylamid, polyakrylát) [54; 51]. Imobilizácia na pevný nosič v bioreaktore vedie k zníženiu vymývania buniek, čím sa výrazne zvýši koncentrácia biokatalyzátora pri optimálnej koncentrácii a kontakte s nosným materiálom.

Hlavnými parametrami, ktoré musia spĺňať materiály použité ako nosiče, sú tepelná, mechanická a chemická odolnosť; musia byť inertné voči enzýmom, biokompatibilné a odolné voči mikrobiálnemu rastu [51]. V tomto smere sú výhodnejšími anorganické materiály, ktoré majú dobre definovanú geometriu, distribúciu pórov, veľkosť povrchu ako aj pomer veľkosti plochy povrchu k objemu, čím sa výrazne zlepšuje zaťažiteľnosť enzýmu.

K imobilizácii sa používajú porézne aj neporézne materiály alebo komplexy materiálu s prechodným kovom [53; 55]. Prítomnosť kovových iónov v nanočasticiach zvyšuje konformačnú zmenu v enzýme. Aktívne miesta viažuce substrát zostávajú v otvorenej konformácii, čím sa zvyšuje väzba enzým–substrát. Výhodami imobilizačných procesov v priemyselnej aplikácii sú stabilita voči reakčným podmienkam, dobrá manipulácia, zachovanie alebo dokonca zlepšenie katalytickej aktivity, opätovná použiteľnosť, špecifickosť a selektivita enzýmov. Prístupy, ktoré sa pri imobilizácii enzýmov na anorganické nanočastice používajú sú napr. fyzikálna adsorpcia, kovalentná väzba, sieťovanie (crosslinking), enkapsulácia alebo His-značenie.

Imobilizácia enzýmu na nerozpustnej matrici má mnoho ekonomických výhod (vid'. Tab.3), najmä jeho opätovné použitie, zastabilizovanie enzýmu a využitie katalýzy v rôznom prostredí [41]. Pevné podklady ako napr. xerogély, piesok, hlina alebo pôda, nepredstavujú žiadne environmentálne riziká a v priemyselných bioreaktoroch umožňujú oddeliť tok kvapaliny nesúcej činidlá a produkty. Imobilizácia pomáha pri rozvoji kontinuálnych procesov, kde umožňuje hospodárnejšiu organizáciu prevádzky, automatizáciu, zníženie pracnosti a zlepšuje pomer investícia/kapacita. Stabilizáciu enzýmu je možné dosiahnuť aj imobilizáciou bez nosiča, napr. tvorbou zosieťovaných enzýmových agregátov alebo kryštálov.

**Tab. 3** Porovnanie výhod a nevýhod jednotlivých imobilizačných metód [upravené podľa [56; 51].

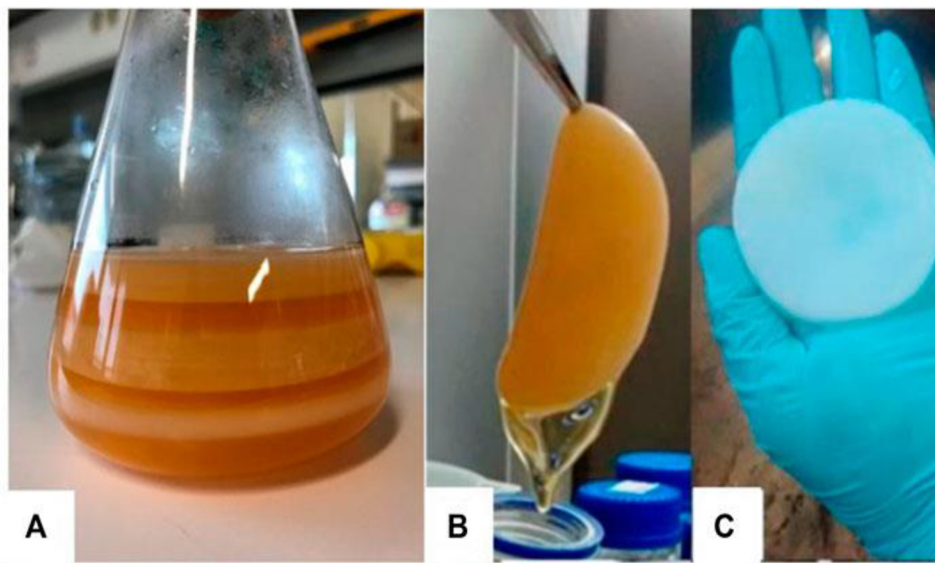
Metóda	Výhody	Nevýhody
<i>Fyzikálna absorpcia</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Jednoduchá</li> <li>• Nie sú potrebné činidlá</li> <li>• Bez obmedzení difúziou enzýmov z pórov</li> <li>• Minimálne aktivačné kroky</li> <li>• Pomerne lacná</li> <li>• Časovo menej náročná</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nižšia účinnosť</li> <li>• Desorpcia enzýmov z nosiča</li> <li>• Skreslenie kinetiky a zmena stability pH</li> </ul>
<i>Kovalentné väzby</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Širšia použiteľnosť</li> <li>• Pomerne jednoduchá</li> <li>• Bez rizika desorpcie</li> <li>• Veľká variabilita dostupných nosičov</li> <li>• Silná väzba</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Problémy kompetitívnej inhibície</li> <li>• Chemická modifikácia enzýmu</li> <li>• Strata funkčnej konformácie</li> </ul>
<i>Zachytenie (entrapment)</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mierne podmienky</li> <li>• Jednoduchá, rýchla metóda</li> <li>• Pomerne lacná</li> <li>• Menšie riziko konformačných zmien</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Desorpcia</li> <li>• Obmedzenie difúzie pórov</li> <li>• Riziko mikrobiálnej kontaminácie</li> <li>• Malý rozsah implementácie</li> </ul>
<i>Zapuzdrenie</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dlhodobá stabilita enzýmu</li> <li>• Bez potreby extrakčných alebo purifikačných krokov</li> <li>• Udržanie natívnej konformácie</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nižšie koncentrácie</li> <li>• Tvorba nežiaducich produktov</li> <li>• Modifikácia produktov inými enzýmami</li> <li>• Obmedzenie veľkosti pórov</li> </ul>
<i>Zosieťovanie</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bez použitia matrice alebo nosiča</li> <li>• Pomerne jednoduchá</li> <li>• Široké možnosti využitia v priemysle</li> <li>• Rýchla a lacná</li> <li>• Zosieťovanie veľkého množstva enzýmu</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Potreba polyfunkčných činidiel</li> <li>• Riziko denaturácie alebo štruktúrálnej modifikácie sieťujúcimi činidlami</li> </ul>

### 2.7.1. Imobilizácia enzýmov na bakteriálnej celulóze

Bakteriálna celulóza (BC) je čistý biopolymér celulózy, ktorá je produkovaná baktériami [57; 79]. Najviac používanou je gram-negatívna baktéria *Gluconacetobacter xylinus*, avšak okrem nej sú schopné BC produkovať aj rody *Agrobacterium* spp., *Acetobacter* spp., *Azotobacter*, *Rhizobium* spp. alebo *Pseudomonas*.

Oproti rastlinnej celulóze, vyniká BC čistotou a odlišnými fyzikálno-chemickými vlastnosťami. Tieto vlastnosti umožňujú jej široké uplatnenie v priemysle (napr. balenie potravín, biomedicína a tkanivové inžinierstvo, kozmetika, tvorba nanokompozitov a biopolymérov).

Okrem vysokej čistoty, sú ďalšími výhodami BC jej jedinečná štruktúra, mechanická pevnosť, ultrajemné vlákno, biologická odbúrateľnosť a vysoká kryštalinita [58].



**Obr. 11** Bakteriálna celulóza produkovaná vo vsádkovom móde (A); vlhká membrána bakteriálnej celulózy po vyňatí z kultivačného média (B); bakteriálna celulóza po prečistení hydroxidom sodným (C) [88].

Produkcia BC prebieha môže prebiehať v rôznych módoch kultivácie a fermentoroch podľa požadovaných vlastností [78]. Tradičná kultivácia prebieha v stacionárnych podmienkach (viď. Obr.11), kde sa BC zhromažďuje na povrchu kultivačného média a pripomína hrubú želatínovú membránu. V mechanicky miešaných kultivačných podmienkach je produkovaná celulóza vo forme vláknitej suspenzie. Pri kultivácii vo vzduchovom reaktore vytvorí BC pelety. Aplikácia BC vo forme peliet má potenciál v imobilizácii enzýmov. Budúca perspektíva zavedenia tejto produkcie aj do priemyslu je podporená zavedením kultivácie pomocou konvenčného airlift reaktora s objemom 50 l alebo modifikovaného airlift reaktora s objemom 20l.

Použitie BC pre imobilizáciu enzýmov alebo mikroorganizmov je stále nedostatočne preštudované [54; 58]. Doteraz boli skúmané podmienky imobilizácie glukoamylázy na BC guľôčkach s použitím rôznych imobilizačných techník a imobilizácia lakázy na BC. V experimentoch boli použité guľôčky BC naprodukované kmeňom *Acetobacter xylinum* v trepacej banke s prepážkou. K vytvoreniu aktívnej BC, na ktorú je možné imobilizovať enzýmy, boli skúmané rôzne metódy, napr. glutaraldehydové, EDC kopulačné alebo epoxidové. Najlepšie výsledky priniesla kopulačná metóda epoxidu s glutaraldehydom.

Imobilizované enzýmy vykazovali zdanlivé zlepšenie stability pri tepelnej denaturácii, mierny pokles enzýmovej aktivity pri skladovaní a úspešnú opätovnú použiteľnosť bez významnej straty aktivity v rámci prevádzkovej aktivity [54].

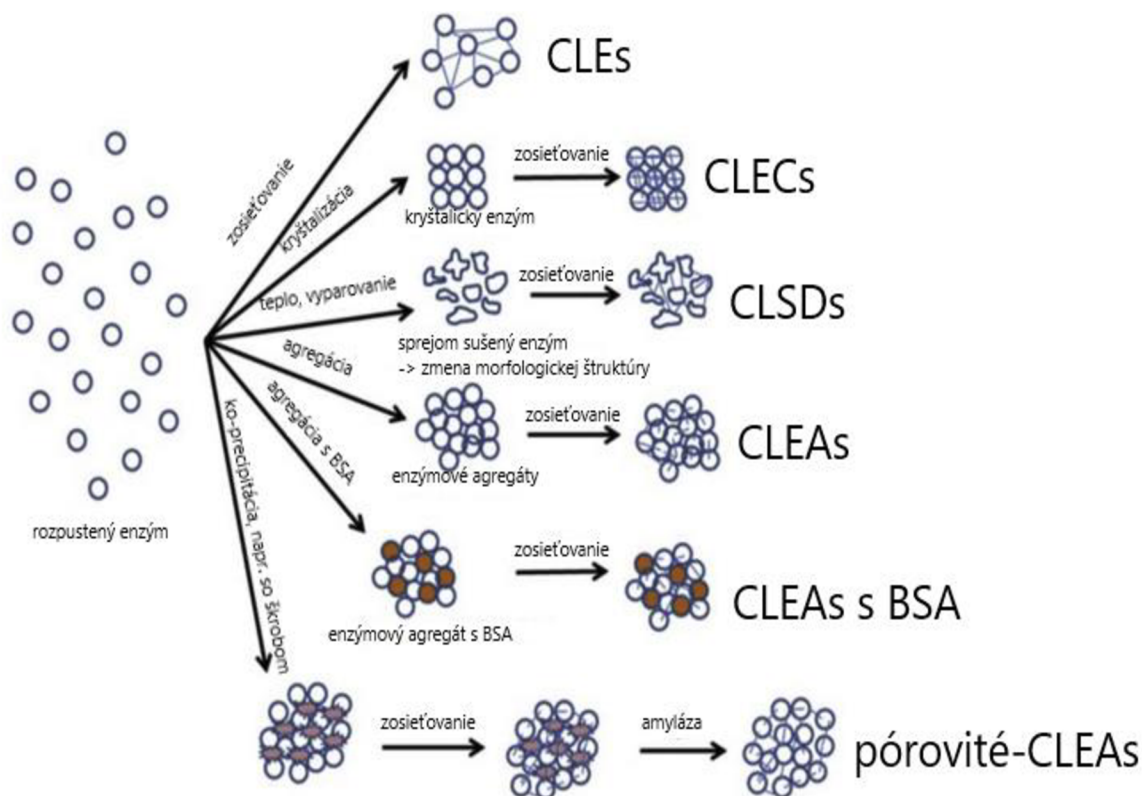
### 2.7.2. Imobilizácia pomocou zosieťovaných enzýmových agregátov

Zosieťovanie enzýmových agregátov (CLEA) je jedna z techník imobilizácie bez potreby použitia nosiča, ktoré možno pripraviť aj zo surových enzýmových extraktov [59]. Enzýmové agregáty sú pripravované v 2 krokoch. V prvom kroku dôjde k precipitácii, kedy je vzorka vo vodnom roztoku zmiešaná so zrážacím činidlom, najčastejšie síranom amónnym, organickými rozpúšťadlami alebo polymérmi. Dôležitým faktorom je získať enzým v dostatočnej



koncentracii, aby vôbec bolo možné vytvoriť agregáty, príp. je možné pridať iné proteíny (napr. BSA, ktorý funguje zároveň aj ako stabilizátor). Druhý krok zahŕňa ireverzibilné vyvrážanie enzýmových agregátov pomocou sieťovania. K tomu sa používajú sieťujúce činidlá, najčastejšie glutaraldehyd (GA) pre svoju vysokú reaktivitu, dostupnosť a nízku cenu. Takýmto procesom sa získajú enzýmové agregáty, resp. zosieťované polyméry, viazané kovalentnými väzbami medzi voľnými aminoskupinami lyzínových zvyškov na povrchu susedných molekúl enzýmu s aldehydovými skupinami oligomérov alebo polymérov GA [77]. Zosieťovanie môže zahŕňať aj tvorbu Schiffovej báze alebo 1,4-adíciu Michaelovho typu na  $\alpha,\beta$ -nenасыtené aldehydové skupiny. Presný spôsob sieťovania závisí od hodnoty pH roztoku. Všetky doteraz známe techniky imobilizácie enzýmov prostredníctvom zosieťovaných agregátov sú zhrnuté na Obr. 12.

Medzi najväčšie výhody využitia CLEA v priemysle patrí zníženie výrobných nákladov v priemysle, nakoľko nie je potrebné použiť nosič; poskytuje širší rozsah aplikácií a vyššie výnosy; látky interagujú v jednej nádobe v rámci jednej operácie; postačuje menšie množstvo rozpúšťadiel a cyklus imobilizácie nie je časovo náročný. Navyše sa tieto agregáty označujú ako lepšie obnoviteľné, stabilnejšie a recyklovanejšie v porovnaní s inými metódami imobilizácie [76].



**Obr. 12** Imobilizácia enzýmov bez nosiča pomocou zosieťovania [upravené podľa [60; 61].

CLEA agregáty vykazujú lepšiu skladovacu a prevádzkovú stabilitu voči denaturácii teplom, organickými rozpúšťadlami, autoproteolýzou a lúhovaním vo vodnom prostredí [77]. Tento postup imobilizácie nemusí byť použitý len pre jeden enzým, ale existujú aj možnosti koimobilizácie viacerých enzýmov, ktoré sú schopné katalyzovať viaceré biotransformačné reakcie. Medzi najväčšie problémy tejto stratégie možno spomenúť nízku mechanickú odolnosť a značné difúzne obmedzenia.

Pri optimalizácii protokolu na prípravu enzýmových agregátov je potrebné zohľadniť parametre ako teplota, pH, koncentráciu činidiel, rýchlosť miešania, príp. použitie iných zložiek. Dôležitý je aj molárny pomer sieťujúceho činidla k enzýmu, pretože ovplyvňuje aktivitu, stabilitu a veľkosť výsledných častíc. Pri nízkom pomere nedôjde k dostatočnému zosieťovaniu a naopak vysoký pomer môže viesť k strate aktivity enzýmu. Kľúčovým parametrom určujúcim náklady celkovej imobilizačnej techniky je aj obnova aktivity, ktorá by sa mala pokiaľ možno blížiť k 100%. v konečnom dôsledku rozhoduje aj to, koľkokrát je možné daný enzým recyklovať.

## 2.8. Využitie imobilizovaných enzýmov v priemysle

Vďaka úspechom dosiahnutým v proteínovom inžinierstve spojeného s úspešnou imobilizáciou koncom 90. rokov minulého storočia, je dnes možné uskutočniť prechod od chemického procesu k zelenému procesu [80]. V priemysle sa používajú voľné rozpustené enzýmy vo forme roztoku alebo imobilizované enzýmy v nerozpustnej forme. Výber konkrétneho enzymatického preparátu je do značnej miery závislý od ceny enzýmu, ako aj možností jeho použitia. Optimálna nákladová efektivita bude závisieť od ceny enzýmu, imobilizačnej matrice a zároveň aj pomeru, v ktorom sú zmiešané [81]. Na výrobu 1 kg imobilizovaného enzýmu sa bežne používa 5–10 % enzýmu. Je potrebné mať na pamäti, že samotná cena imobilizovaného enzýmu sama o sebe nič nehovorí. Pre efektívny priemyselný proces je potrebná dobrá produktivita (kg produktu/kg biokatalyzátora), stabilita a životnosť enzýmu.

Imobilizované enzýmy sú v podstate špecializovanou formou heterogénnej katalýzy, ktoré sa dajú regenerovať a znovu použiť, pričom ich aktivity zostáva zachovaná počas dlhých časových období, a sú použiteľné pre rôzne formáty procesov [80]. Pre suspendované častice imobilizovaného enzýmu vo vodnom reakčnom médiu však existuje aj riziko poškodenia pri vysokých rýchlostiach miešania v bioreaktore. Imobilizované enzýmy majú rôzne biotechnologické, biomedicínske a priemyselné aplikácie. Okrem toho v posledných rokoch postúpil ich využitie aj do environmentálnych a klinických oblastí. Výhody a nevýhody imobilizovaných enzýmov sú zhrnuté v *Tab.4*.

**Tab. 4** Výhody a nevýhody použitia imobilizovaných enzýmov v priemyselných procesov [upravené podľa 80].

Výhody	Nevýhody
Jednoduchá separácia biokatalyzátora	Nižšia enzýmová aktivita oproti natívnemu enzýmu
Znížené náklady na následné spracovanie	Dodatočné náklady na nosiče a imobilizáciu
Recyklácia biokatalyzátora	Nižšie reakčné rýchlosti oproti natívnemu enzýmu
Lepšia stabilita, najmä voči organickým rozpúšťadlám a vyšším teplotám	Možnosť kontaminácie
Použitie reaktorov s pevným lôžkom alebo vsádkových reaktorov bez potreby membrány na izoláciu enzýmu z produktu	Likvidácia vyčerpaného imobilizovaného enzýmu (spálenie)
Možnosť ko-imobilizácie s inými enzýmami	

### 2.8.1. Imobilizované enzýmy v potravinárskom priemysle

V potravinárskom priemysle je žiaduce produkovať väčšie množstvá produktov, preto sa uprednostňujú kontinuálne procesy [80]. Imobilizované enzýmy sa v kontinuálnom procese využívajú pri výrobe kukuričného sirupu s vysokým obsahom fruktózy (HFCS), analógov kakaového masla, sladidiel (napr. allulóza, tagatóza, fruktóza alebo sukralóza) galakto-oligosacharidov, bezlaktózových mliečnych výrobkov alebo antioxidantov.

Enzýmy v potravinárstve bývajú najčastejšie na iónomeničových živiciach, ktoré možno regenerovať *in situ* pomocou cenovo dostupných činidiel (NaOH alebo HCl). Keď je enzým vyčerpaný, resp. jeho aktivita je nízka, použije sa činidlo, ktoré odstráni zvyšky enzýmu a očistí živicu. Následne sa pridá nová dávka enzýmu priamo do kolóny a dôjde k imobilizácii.

Pri výrobe bezlaktózového mlieka sa používajú kolóny naplnené imobilizovaným enzýmom laktáza, ktorý hydrolyzuje sacharid laktózu na glukózu a galaktózu [86]. Tieto monosacharidy sú ľahko stráviteľné u ľudí s intoleranciou na laktózu. Získaným vedľajším produktom je srvátka, ktoré sa používa do proteínových nápojov, krmív alebo sa môže použiť aj na výrobu etanolu a droždia.

Celosvetovo najrozšírenejším využitím imobilizovaných enzýmov v potravinárskom priemysle je premena glukózových sirupov na kukuričný sirup s vysokým obsahom fruktózy prostredníctvom imobilizovanej glukózaizomerázy [87]. Druhým najvýznamnejším je využitie imobilizovanej pektinázy, ktorá hydrolyzuje pektín v bunkových stenách ovocných plodov pri výrobe ovocných štiav.

### 2.8.2. Imobilizované enzýmy v chemickom priemysle

V posledných rokoch je chemický priemysel zameraný na implementáciu ekologických a udržateľných procesov [80]. Podobne ako v potravinárskom priemysle, sú uprednostňované biokatalyzátory, ktoré umožnia generovať produkty vo veľkých množstvách. Z tohto dôvodu je opäť kľúčovým faktorom čo najvyššia recyklovateľnosť. Najviac používanými enzýmami sú lipáza (z baktérií rodu *Candida*) alebo aminoacyláza, ktoré sa používajú na výrobu chirálnych amínov, polymérov, herbicídov, povrchovo aktívnych látok alebo L-aminokyselín. Tieto enzýmy bývajú adsorbované na PE, kopolymér metakrylát/divinylbenzén alebo na iónomeničových živiciach.

### 2.8.3. Imobilizované enzýmy vo farmácii a v lekárstve

V medicínskych odboroch spôsobil objav imobilizovaných enzýmov revolúciu, pretože umožnil diagnostiku a liečbu rôznych chorôb za omnoho kratší čas, s väčšou spoľahlivosťou a presnosťou. V klinickej praxi nachádzajú imobilizované enzýmy široké využitie v terapeutických postupoch. Tráviaci enzým lipáza imobilizovaný na polymérnych guľôčkach alebo kovalentne na metakrylovom polyméry sa podáva pacientom pri problémoch so vstrebávaním tukov, kde dokážu zvýšiť hydrolýzu tukov až o 90% [82]. Zavedenie imobilizovanej ureázy umožňuje výrobu malých prenosných dialyzačných prístrojov na báze regeneračných dialyzačných systémov so sorbentom [83].

Pre využitie vo farmaceutickom priemysle je dôležitá okrem regenerácie, aj bezpečnosť a vysoká selektivita imobilizovaného enzýmu [80]. Využívajú sa v procese výroby liečiv na osteoporózy alebo hepatitídu C, antibiotík s beta-laktámovým kruhom alebo antidiabetík. Najvyužívanejším procesom imobilizácie je adsorpcia na epoxidové a aminometakrylátové polyméry alebo kopolymér metakrylát/divinylbenzén.

#### **2.8.4. Imobilizované enzýmy ako biosenzory**

Ďalším významným uplatnením imobilizovaných enzýmov sú biosenzory používané nielen v medicíne a klinickej diagnostike, ale aj v potravinárstve, sledované bezpečnosti potravín, poľnohospodárskom priemysle alebo aj pri monitorovaní životného prostredia [80]. Prvá trieda biosenzorov deteguje prítomnosť substrátu alebo komplexu substrát-kofaktor. Príkladom je glukózooxidázový biosenzor používaný na monitorovanie hladiny glukózy v krvi u ľudí s cukrovkou. Druhá trieda je založená na detekcii inhibítorov enzýmov v prítomnosti substrátu. Najbežnejším príkladom je detekcia ťažkých kovov, organofosfátových alebo organochlórových zlúčenín používaných ako pesticídy, glykoalkaloidov a insekticídov [84; 85]. Hlavnými výhodami týchto prístupov sú vysoká citlivosť a špecifickosť katalyticky aktívnych enzýmov voči cieľovým molekulám, rýchlosť odozvy a jednoduchosť manipulácie.

### 3. CIEĽ PRÁCE

Cieľom diplomovej práce je štúdium produkcie lignín-degradujúcich enzýmov pomocou plesne *Phanerochaete chrysosporium* za rôznych kultivačných podmienok a ich využitie pri degradácii lignínových fragmentov.

Práca bola spracovaná podľa nasledujúcich bodov:

- Vypracovanie literárnej rešerše na tému produkcie extracelulárnych oxidatívnych enzýmov degradujúcich lignín pomocou plesní.
- Optimalizácia produkcie lignín-degradujúcich enzýmov.
- Sledovanie efektu imobilizácie enzýmov na ich účinok.
- Využitie naprodukovaných imobilizovaných enzýmov k modifikácii vybraných fenolických zlúčenín.
- Vyhodnotiť výsledky, vytvoriť zhrnutie a záver práce.

## 4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 4.1. Materiál a metódy

#### 4.1.1. Použité mikroorganizmy

V práci bola použitá kultúra plesne *Phanerochaete chrysosporium* CCM 8074 (Česká zbierka mikroorganizmov Brno).

#### 4.1.2. Použité chemikálie

ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) (Sigma-Aldrich)

Agar powder (Carl-Roth)

Alkali lignín (Sigma-Aldrich)

Bromid draselný p.a.(Honeywell, Fluka)

Bromid lítny p.a. (Sigma-Aldrich)

Celuláza Celluclast (Novozymes)

Coomassie Blue G-250 (Sigma-Aldrich)

DMP (2,6-dimethoxyfenol, Lach-ner)

DMSO pre HPLC (dimetylsulfoxid, Lach-ner)

EDTA (kyselina etyléndiamintetraoctová, Lach-ner)

Ethanol UV-VIS (Lach-ner)

Fosforečnan draselný (Lach-ner)

Glukóza p.a. (Lach-ner)

Glutaraldehyd (Carl-Roth)

Guaiacol (Sigma-Aldrich)

Hydroxid sodný p.a. (Penta)

Chlorid kobaltnatý (Lach-ner)

Chlorid sodný p.a. (Lach-ner)

Chlorid vápenatý (Lach-ner)

Kyselina boritá p.a. (Lach-ner)

Kyselina chlorovodíková 35% p.a. (Lach-ner)

Kyselina fosforečná konc.(Lach-ner)

Kyselina malónová p.a. (Riedel de Haen)

Kyselina octová (Lach-ner)

Kyselina vínna (LACHEMA)

Octan amónny (Agros organics)

Octan sodný (Lach-ner)

Peroxid vodíka (Lach-ner)

Síran amónny p.a. (Penta)  
Síran horečnatý (Lach-ner)  
Síran manganatý (Lach-ner)  
Síran meďnatý (Lach-ner)  
Síran zinočnatý heptahydrát (Lach-ner)  
Síran železnatý heptahydrát (Lach-ner)  
Sladový extrakt (Carl-Roth)  
Tiamín (Alfa Aesar)  
Veratrylalkohol (Sigma-Aldrich)  
Vínan sodno-amónny (Lach-ner)

#### 4.1.3. Použité prístroje a pomôcky

Analytické váha  
Centrifúga chladená  
Centrifúga EPA 200 s rotorom  
FTIR spektrometer Nicolet iS5  
Homogenizátor  
Inkubátor  
Laboratórne váhy  
Lyofilizátor VirTis  
Magnetická miešačka  
Očkovací box BIOAIR  
Spektrofotometer UV-VIS SPEKOL 1300

Ďalej boli pri práci použité automatické pipety a bežné laboratórne pomôcky.

#### 4.1.4. Kultivačné médiá

Tuhé kultivačné médium bolo pripravené podľa *Tab.5*. Tuhé médium bolo použité na preočkovanie a uchovávanie plesne *P.chrysosporium* na Petriho miskách. Sterilizácia média bola vykonaná v tlakovom hrnci po dobu 30 min pri 121 °C. Kultivácia na tuhom médiu prebiehala 7 dní pri teplote 32 °C. Následne bola kultúra uchovávaná v tme pri teplote 4 °C.

**Tab. 5** Zloženie tuhého média *P.chrysosporium*.

Zložky	Množstvo
Sladový extrakt	2 g
Agar	2 g
Destilovaná voda	100 ml

Tekuté minerálne médium používané na kultiváciu v Erlenmeyerových bankách bolo pripravené podľa *Tab.6*. Sterilizácia média prebiehala v tlakovom hrnci po dobu 30 min pri 121°C. Kultúra *P.chrysosporium* bola zaočkovaná zo zásobnej kultúry do 50 ml sterilného média v 100ml Erlenmeyerových bankách. Kultivácia prebiehala staticky pri teplote 32 °C.

Pre porovnanie vplyvu koncentrácie glukózy ako uhlíkatého substrátu na množstvo produkovaných lignín-degradujúcich enzýmov bola vykonaná kultivácia v minerálnom médiu s koncentráciou glukózy 1 g/l a 2 g/l (vid'. *Tab.6*).

**Tab. 6** Zloženie tekutého minerálneho média *P.chrysosporium*.

Zložky	Množstvo
Basal III médium	1 ml
Glukóza	0,1 g   0,2 g
Roztok stopových prvkov	0,6 ml
Destilovaná voda	100 ml
Tiamín	0,1 mg
Octan amónny	15,42 mg
Vínan sodno-amónny	23,63 mg

Použitie Basal III médium bolo pripravené podľa *Tab.7*.

**Tab. 7** Zloženie Basal III média.

Zložky	Množstvo
Roztok stopových prvkov	100 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20 g
MgSO <sub>4</sub>	5 g
CaCl <sub>2</sub>	1 g
Destilovaná voda	900 ml

Roztok stopových prvkov použitý v Basal III médiu a tekutom kultivačnom médiu je bol pripravený podľa *Tab.8*.

**Tab. 8** Zloženie stopových prvkov.

Zložky	Množstvo
MgSO <sub>4</sub>	3 g
MnSO <sub>4</sub>	0,5 g
NaCl	1 g
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,1 g
CoCl	0,1 g
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,1 g
CuSO <sub>4</sub>	0,1 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10 mg
Destilovaná voda	1000 ml



#### 4.1.5. Indukcia produkcie lignín-degradujúcich enzýmov

Súbežne so sledovaním vplyvu glukózy prebiehalo aj sledovanie vplyvu prítomnosti induktoru na množstvo produkovaných lignolytických enzýmov. Druh použitého induktoru a jeho množstvo sú zhrnuté v *Tab.9*. Induktory boli použité z dôvodu overenia ich účinku popísaného v niekoľkých štúdiách.

**Tab. 9** Fenolické látky použité ako induktory.

Chemikália	Množstvo
Lignín	0,5 g/l
	1 g/l
	3 g/l
Guaiacol	0,01 g/l
	0,5 g/l

#### 4.1.6. Stanovenie enzýmovej aktivity lakázy

K stanoveniu enzýmovej aktivity bol odobratý 1 ml kultivačného média, ktorý bol následne centrifugovaná pri 4 °C, 10000 ot/min po dobu 10 min. Ďalej bol používaný len supernatant.

Zloženie reakčnej zmesi pre stanovenie enzýmovej aktivity *lakázy* je popísané v *Tab.10*. Sodno-octanový pufer (0,1M; pH = 4,5) bol pripravený zmiešaním 0,2M kyseliny octovej a 0,2M octanu sodného. Ako substrát bol použitý 10mM roztok ABTS.

Po napipetovaní reakčnej zmesi do kyvety a 1-minútovej inkubácii bola zmeraná absorbanca pri vlnovej dĺžke 415 nm. Vypočítaná enzýmová aktivita (U/ml) vyjadruje množstvo enzýmu, ktoré katalyzuje premenu 1  $\mu$ mol substrátu (ABTS) za 1 minútu. K výpočtu bol použitý extinkčný koeficient pre ATS ( $\epsilon = 36\,000\text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).

**Tab. 10** Zloženie reakčnej zmesi stanovenia enzýmovej aktivity lakázy.

Zložka	Množstvo
Sodno-octanový pufer	900 $\mu$ l
Supernatant	50 $\mu$ l
10 mM ABTS	50 $\mu$ l

#### 4.1.7. Stanovenie enzýmovej aktivity lignín peroxidázy

K stanoveniu enzýmovej aktivity LiP bol odobratý 1 ml kultúry, ktorá bola následne centrifugovaná pri 4 °C, 10000 ot/min po dobu 10 min. Ďalej bol používaný len supernatant.

Ako substrát bol v reakčnej zmesi použitý 25mM veratrylalkohol (VA). Presné zloženie a pomer jednotlivých komponentov reakčnej zmesi je uvedený v *Tab.11*. Vínanový pufer (100 mM, pH 3) bol pripravený rozpustením 3 g kyseliny vínnej v 200 ml destilovanej vody. K úprave pH bol použitý 3M roztok NaOH.

Po napipetovaní reakčnej zmesi do kyvety prebehla 1-minútová inkubácia, po ktorej bola zmeraná absorbanca pri vlnovej dĺžke 310 nm. Vypočítaná enzýmová aktivita (U/ml) vyjadruje množstvo enzýmu, ktoré katalyzuje premenu 1  $\mu$ mol substrátu (VA) za 1 minútu. K výpočtu bol použitý extinkčný koeficient pre VA ( $\epsilon = 9300\text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).

**Tab. 11** Zloženie reakčnej zmesi stanovenia enzýmovej aktivity LiP.

Zložka	Množstvo
Vínanový pufer	775 µl
Supernatant	150 µl
54 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	50 µl
VA	25 µl

#### 4.1.8. Stanovenie enzýmovej aktivity Mn-dependentnej peroxidázy

Z kultivačnej Erlenmeyerovej banky bol odobratý 1 ml kultúry, ktorá bola následne centrifugovaná pri 4 °C, 1000 ot/min po dobu 10 min. K ďalšej analýze bol použitý supernatant.

Pre stanovenie enzýmovej aktivity MnP boli pripravené 2 rôzne zmesi popísané v *Tab. 12*. Malonátový pufer (65,8 mM, pH 4,5) bol pripravený rozpustením 0,658 g kyseliny malónovej v 100 ml destilovanej vody. Nakoniec bolo pH pufru upravené na hodnotu 4,5 3M roztokom NaOH. Ako substrát reakčnej zmesi bol použitý roztok 2,6-dimethoxyfenolu (DMP). Absorbancia bola meraná pri 469 nm. Stanovená enzýmová aktivita (U/ml) vyjadruje množstvo enzýmu, ktoré katalyzuje premenu 1 µmol substrátu (DMP) za 1 minútu. K výpočtu bol použitý extinkčný koeficient pre DMP ( $\epsilon = 49600 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

Enzýmová aktivita pre MnP bola určená ako rozdiel nameraných enzýmových aktivít pre reakčné zmesi 1 a 2 podľa rovnice (1):

$$E_a(\text{MnP}) = E_a(1) - E_a(2) \quad (1)$$

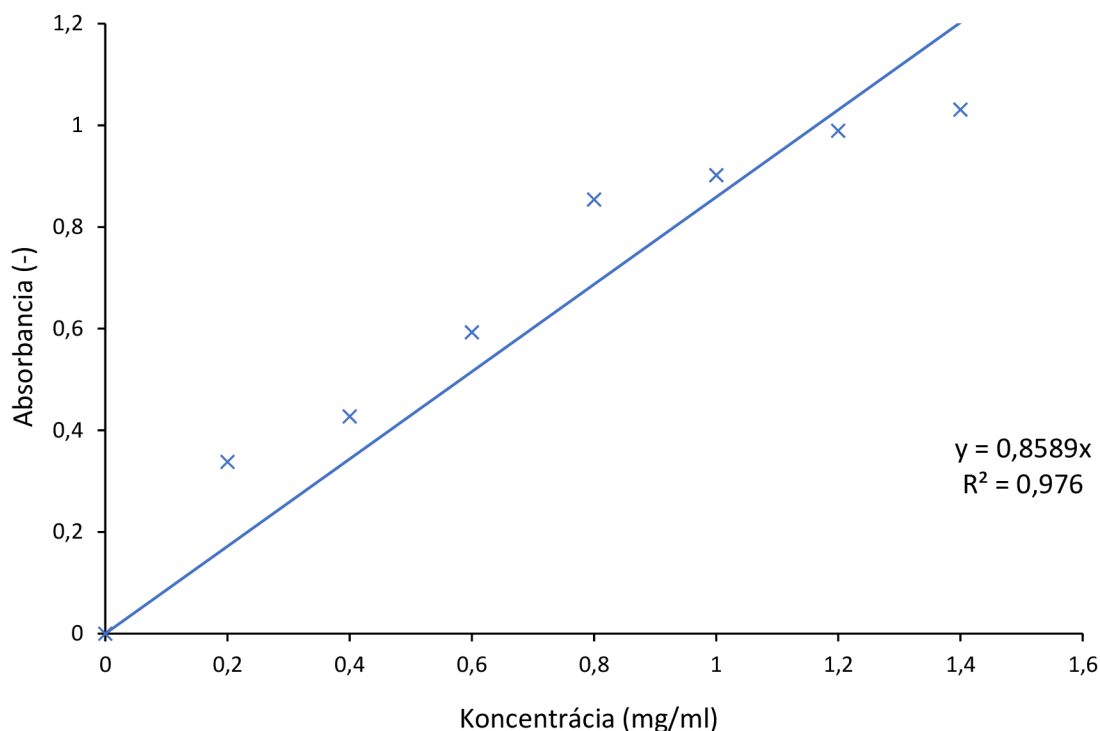
**Tab. 12** Zloženie reakčných zmesí pre stanovenia enzýmovej aktivity MnP.

Zložky	Reakčná zmes 1	Reakčná zmes 2
Malonátový pufer	760 µl	760 µl
10 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	40 µl	40 µl
20 mM MnSO <sub>4</sub>	50 µl	-
20 mM EDTA	-	50 µl
Supernatant	100 µl	100 µl
20 mM DMP	50 µl	50 µl

#### 4.1.9. Stanovenie bielkovín podľa Bradfordovej

Stanovenie bielkovín prebieha v prítomnosti farbiva Comassie Blue G-250, ktoré sa naviaže na molekulu proteínu. Čím dôjde k farebnej zmene z hnedej na intenzívne modrú. Reakčné činidlo bolo pripravené rozpustením 10 mg Comassie Blue G-250 v 6 ml etanolu za stáleho miešania po dobu 30 min. Následne bolo pridaných 10 ml koncentrovanej kyseliny fosforečnej a objem bol doplnený destilovanou vodou na 100 ml. Roztok bol prefiltrovaný a uchovávaný v tme v chladničke.

Po napipetovaní 900 µl Bradfordovej činidla a prídavku 100 µl supernatantu prebiehala 5-minútová inkubácia. Absorbancia bola meraná pri 595 nm. Koncentrácia proteínov bola vypočítaná pomocou kalibračnej krivky s použitím štandardu BSA (vid'. *Obr. 13*).



**Obr. 13** Kalibračná krivka pre stanovenie bielkovín podľa Bradfordovej.

#### 4.1.10. Optimalizácia CLEA imobilizácie lignolytických enzýmov

Na základe optimalizovaných podmienok koncentrácie glukózy a induktoru bolo vybrané vhodné médium a doba kultivácie použité k produkcii enzýmov určených na imobilizáciu. Kultivácia prebiehala v 100ml Erlenmeyerových bankách, kde bolo 50 ml tekutého kultivačného média. Kultivácia prebiehala staticky pri teplote 32 °C po optimalizovanú dobu.

Pre správnu imobilizáciu enzýmov bolo potrebné optimalizovať pH, koncentráciu zrážacieho činidla (síranu meďnatého) a sieťujúceho činidla (GA).

##### **OPTIMALIZÁCIA pH**

Po kultivácii bolo mycélium prefiltrované a filtrát bol rovnomerne rozdelený do 3 kadičiek, kde bolo následne upravené pH v rozmedzí 5,0–7,0 pomocou HCl a NaOH. Následne bol do každej kadičky pridaný síran amónny o hmotnosti 0,01 g. Zrážanie prebiehalo za stáleho miešania (350 rpm) po dobu 1 hod pri teplote 4 °C.

Po ukončení zrážania boli média prevedené do centrifugačných skúmaviek a centrifugované pri 3460 RCF po dobu 15 min. Následne bola zmeraná zvyšková enzýmová aktivita pre LiP, MnP a Lac v supernatante. Výsledky boli vyjadrené v U/ml. Experiment bol vykonaný v 2 paralelných meraniach.

##### **OPTIMALIZÁCIA KONCENTRÁCIE SÍRANU AMÓNNEHO**

Po kultivácii bolo mycélium prefiltrované a vo filtráte bolo pH upravené na základe výsledkov optimalizácie pH. Supernatant bol rovnomerne rozdelený do 3 kadičiek a bol pridaný síran amónny v rôznych koncentráciách: 65, 70 a 75 hm.%. Zrážanie prebiehalo za stáleho miešania (350 rpm) pri 4 °C po dobu 1 hod.

Po ukončení zrážania boli jednotlivé médiá z kadičiek prevedené do centrifugačných skúmaviek a centrifugované pri 3460 RCF po dobu 15 min. Následne bola zmeraná zvyšková enzýmová aktivita pre MnP, LiP a Lac v supernatante (vyjadrená v U/ml). Experiment bol vykonaný v 2 paralelných meraniach.

#### **OPTIMALIZÁCIA KONCENTRÁCIE SIEŤUJÚCEHO ČINIDLA**

Po kultivácii bolo mycélium prefiltrované a získaný filtrát média bol upravený podľa optimalizovaných podmienok pH a koncentrácie síranu amónneho. Bolo vykonané zrážanie pri teplote 4 °C a 3460 RCF po dobu 1 hod. Následne bol enzýmový precipitát rozdelený do 3 kadičiek, do ktorých bolo pridané sieťujúce činidlo GA v rôznych koncentráciách: 10, 50 a 100 mM. Sieťovanie prebiehalo za stáleho miešania (350 rpm) pri teplote 4 °C po dobu 1 hod.

Po ukončení sieťovania boli médiá z kadičiek prevedené do centrifugačných skúmaviek a centrifugované pri 3460 RCF po dobu 15 min. Následne bola zmeraná enzýmová aktivita v supernatante vyjadrená ako špecifická aktivita v U/ml. Experiment prebiehal v 2 paralelných meraniach.

#### **4.1.11. Imobilizácia na bakteriálnej celulóze**

Bakteriálna celulóza (BC) použitá v práci bola prevzatá od doktoranda Ing. Radima Stříža. Z hydrogélu BC boli vykrojené krúžky s priemerom 1,7 cm, ktoré boli následne zmrazené a zlyofilizované. Takto pripravená BC bola ďalej použitá na imobilizáciu enzýmov naprodukovaných podľa optimalizovaných podmienok a doby kultivácie plesne *P.chrysosporium*.

#### **IMOBILIZÁCIA ADSORPCIOU NA BAKTERIÁLNEJ CELULÓZE**

Lyofilizovaná bakteriálna celulóza (po 2 kolieska) bola ponorená do 10 ml kultivačného média po dobu 2 hod. Po ukončení inkubácie bola zmeraná zvyšková enzýmová aktivita v použitom kultivačnom médiu. Následne bola BC z média vyňatá a ponorená do roztoku 100 mM GA. Takto pripravená zmes bola miešaná po dobu 1 hod pri 4 °C a 100 rpm.

K stanoveniu enzýmových aktivít imobilizovaných enzýmov bola BC rozpustená 50 µl celuláz v 25 ml citrátového pufru. Reakčná zmes bola inkubovaná pri 30 °C a 150 rpm po dobu 24 hod. Následne bola zmeraná enzýmová aktivita v roztoku po rozpustení BC. Celý experiment bol vykonaný v 3 paralelných stanoveniach.

#### **IMOBILIZÁCIA NA BAKTERIÁLNEJ CELULÓZE SPOJENÁ S CLEA**

Imobilizácia enzýmov na BC spojená s CLEA prebiehala v 4 paralelných stanoveniach (viď. Tab. 13). Do každej kadičky boli odvážené 2 kolieska lyofilizovanej BC (viď. Tab. 13). Následne bolo do každej kadičky pridaných 5 ml tekutého kultivačného média s naprodukovanými extracelulárnymi enzýmami podľa optimalizovaných podmienok. V médiu bolo upravené pH na hodnotu 6 a bol pridaný síran amónny na koncentráciu 75 hm.%. Takto pripravená zmes bola inkubovaná po dobu 1 hod pri 4 °C a 100 rpm.

V ďalšom kroku bol do kultivačného média pridaný GA na sieťovanie precipitovaných enzýmov v BC v množstve 50 mM. Opäť prebiehala inkubácia zmesi pri 4 °C a 100 rpm po dobu 1 hod. Po ukončení druhej inkubácie boli zmerané zvyškové enzýmové aktivity (LiP, MnP a Lac) v kultivačnom médiu vyjadrené v U/ml.

**Tab. 13** Navážka 2 kúskov lyofilizovanej BC pre jednotlivé kadičky.

Kadička	Hmotnosť BC (g)	Využitie
1	0,0129	Sledovanie operačnej stability
2	0,0183	Sledovanie operačnej stability
3	0,0166	Rozpustenie celulázami
4	0,0180	Sledovanie hmotnosti

Imobilizované enzýmy na BC v kadičkách č. 1 a 2 boli ďalej použité pri sledovaní operačnej stability presne popísanej v kapitole 4.1.13. Pre stanovenie enzýmových aktivít enzýmov, ktoré sa podarilo imobilizovať, boli z kadičky č.3 vybrané kúsky BC, ktoré boli vložené do roztoku 25 ml citrátového pufru (0,05M, pH 4,8) a 50 µl celulázy. Rozpúšťanie BC prebiehalo pri stálom miešaní 150 rpm a teplote 30 °C po dobu 24 hod. Enzýmové aktivity imobilizovaných enzýmov boli vyjadrené v U/ml. Pre overenie naviazania enzýmov do pórov BC boli kolieska BC z kadičky č.4 vyňaté, vysušená a zvážená.

#### 4.1.12. Porovnanie účinnosti imobilizačných metód

V rámci porovnania účinnosti jednotlivých imobilizačných metód boli podľa optimalizovaných postupov pripravené enzýmové imobilizáty v kapitolách vyššie (vid'. kapitola 4.1.10 a kapitola 4.1.11). Následne boli vyjadrené enzýmové aktivity CLEA imobilizátov ako rozdiel enzýmovej aktivity voľného enzýmu v kultivačnom médiu a zvyškovej enzýmovej aktivity v supernatante získanom po imobilizácii. Enzýmové aktivity oboch druhov imobilizátov na BC boli zmerané po jej rozpustení celulázami.

Stanovené enzýmové aktivity imobilizátov boli následne porovnané s aktivitami voľných enzýmov v produkčnom médiu v 10. deň kultivácie. Účinnosť imobilizácie bola stanovená podľa nasledovnej rovnice (2):

$$\text{Účinnosť (\%)} = \frac{E_a(\text{imobilizovaného enzýmu}) \left(\frac{U}{ml}\right)}{E_a(\text{voľného enzýmu}) \left(\frac{U}{ml}\right)} \cdot 100\% \quad (2)$$

#### 4.1.13. Sledovanie operačnej stability enzýmov imobilizovaných na BC

Po porovnaní účinnosti imobilizačných postupov s využitím BC ako nosiča boli vybrané imobilizáty s najlepšou účinnosťou, tzn. s najvyššou enzýmovou aktivitou pre sledovanie operačnej stability.

Operačná stabilita bola sledovaná po dobu 7 cyklov nasledovných reakcií stanovenia enzýmových aktivít pre každý enzým. Reakčné zmesi boli vopred pripravené v sklenených skúmavkách, do ktorých bola postupne vkladaná BC s imobilizovanými enzýmami. Medzi jednotlivými cyklami bola BC jemne premytá destilovanou vodou.

Enzýmové aktivity v jednotlivých cykloch boli vyjadrené ako relatívne aktivity  $R(\%)$  podľa rovnice (3):

$$R(\%) = \frac{E_a(1. \text{cyklus})}{E_a(n - \text{tý cyklus})} \cdot 100\% \quad (3)$$

#### 4.1.14. Modifikácia modelových fenolických zlúčenín

Ako modelová fenolická zlúčenina bol vybratý lignín. Navážka lignínu na celkovú koncentráciu roztoku 1 g/l bola rozpustená po dobu 24 hod na magnetickej miešačke v roztoku DMSO určenom pre HPLC a 0,1 % (w/v) LiBr. Následne bol roztok prefiltrovaný a skladovaný pri izbovej teplote.

#### **PRÍPRAVA IMOBILIZOVANÝCH ENZÝMOV METÓDOU CLEA**

Enzýmy imobilizované metódou CLEA pripravené optimalizovanou metódou (viď. kapitola 4.1.10.) boli centrifugované pri 3460 RCF po dobu 15 min. Po odstránení supernatantu bol sediment rozpustený v 30 ml destilovanej vody. Následne bol enzymatický roztok zmrazený a lyofilizovaný. Nakoniec bola zistená hmotnosť získaného lyofilizátu a stanovené enzymová aktivita v 1 g.

#### **PRÍPRAVA IMOBILIZOVANÝCH ENZÝMOV NA BC**

Po optimalizácii metodiky imobilizácie na BC (viď. kapitola 4.1.11.) boli k modifikácii lignínu pripravené enzýmy na BC spojené s CLEA. Po príprave boli kolieska BC jemne premyté destilovanou vodou a vložené do 30 ml vopred pripraveného roztoku lignínu určeného k modifikácii v počte 3 a 6 koliesok. V jednej dávke boli 3 krúžky BC dezintegrované v 30 ml roztoku lignínu v DMSO určeného k modifikácii.

#### **MODIFIKÁCIA LIGNÍNU**

K modifikácii lignínu bol pripravený 0,1% roztok lignínu rozpustený v DMSO pre HPLC s obsahom LiBr v koncentrácii 0,1 hm.%. Takto pripravený roztok bol miešaný po dobu 24 hod a prefiltrovaný. Do centrifugačných skúmaviek bolo odmeraných 30 ml roztoku lignínu. Následne boli do každej skúmavky pridané jednotlivé imobilizáty pripravené podľa optimalizovaných podmienok popísaných v kapitolách 4.1.10 a 4.1.11 (viď. Tab.14). Modifikácia lignínu prebiehala po dobu 24 hod. pri teplote 30 °C a stálom trepaní 200 rpm.

**Tab. 14** Množstvo a metódy imobilizácie enzýmov určených k modifikácii lignínu.

Označenie	Množstvo imobilizátu	Metóda imobilizácie
BP_3BC	3 krúžky BC	BC + CLEA
BP_6BC	6 krúžkov BC	BC + CLEA
BP_3BC_D	3 krúžky dezintegrovannej BC	BC + CLEA
BP_C1	1 mg lyofilizátu CLEA	CLEA
BP_C1,5	1,5 mg lyofilizátu CLEA	CLEA
BP_C2,5	2,5 mg lyofilizátu CLEA	CLEA

#### **MERANIE MOLEKULOVEJ HMOTNOSTI**

Po 24hod inkubácii roztoku lignínu s imobilizovanými enzýmami bol roztok prefiltrovaný a pripravený do vialiek určených na meranie molekulovej hmotnosti. Následne bola zmeraná molekulová hmotnosť modifikovaného lignínu metódou SEC–MALS–dRI (rozmerovo vylučovacia gélová permeačná chromatografia s viacuhlovým rozptylom svetla a detektorom diferenciálneho indexu lomu) s PolarGel-M kolónou (300 x 7,5 mm) a detektorom Agilent PL-GPC 50 (podmienky analýzy viď. Tab.15).

**Tab. 15** Podmienky analýzy GPC pre meranie molekulovej hmotnosti modifikovaného lignínu.

<b>Kolóna</b>	PL gel mixed-C
<b>Eluent</b>	DMSO + 0,1 % LiBr
<b>Prietok</b>	0,6 ml/min
<b>Nástriek</b>	50 $\mu$ l
<b>Teplota</b>	50 °C
<b>Detektor</b>	Agilent PL-GPC 50, RI

U pripravených vzoriek bola premeraná molekulárna hmotnosť (Mw) a index polydisperzity (PI) dvakrát. Výsledné hodnoty boli stanovené ako priemer z oboch meraní. Zároveň bola premeraná aj referencia (nemodifikovaný 0,1 % roztok lignínu v DMSO a 0,1 % LiBr).

#### **INFRAČERVENÁ SPEKTROSKOPIA S FOURIEROVOU TRANFORMÁCIOU (FTIR)**

Pre zistenie chemickej štruktúry modifikovaného lignínu bola použitá infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou (FTIR) na spektrometre Nicolet iS5. Modifikovaný lignín bol pred meraním upravený do formy pevnej fázy technikou tablety KBr. Tableta bola zlisovaná z približne 200 mg zmesi KBr a modifikovaného lignínu (5 mg), ktorá bola poriadne vysušená a rozotretá v achátovej trecej miske. Spektrá boli merané v rozsahu vlnočtov 400 až 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Pre porovnanie zmien v štruktúre lignínu boli zmerané aj spektrá alkalického lignínu bez modifikácie. Získané dáta boli následne spracované pomocou programu OriginPro 2018b.

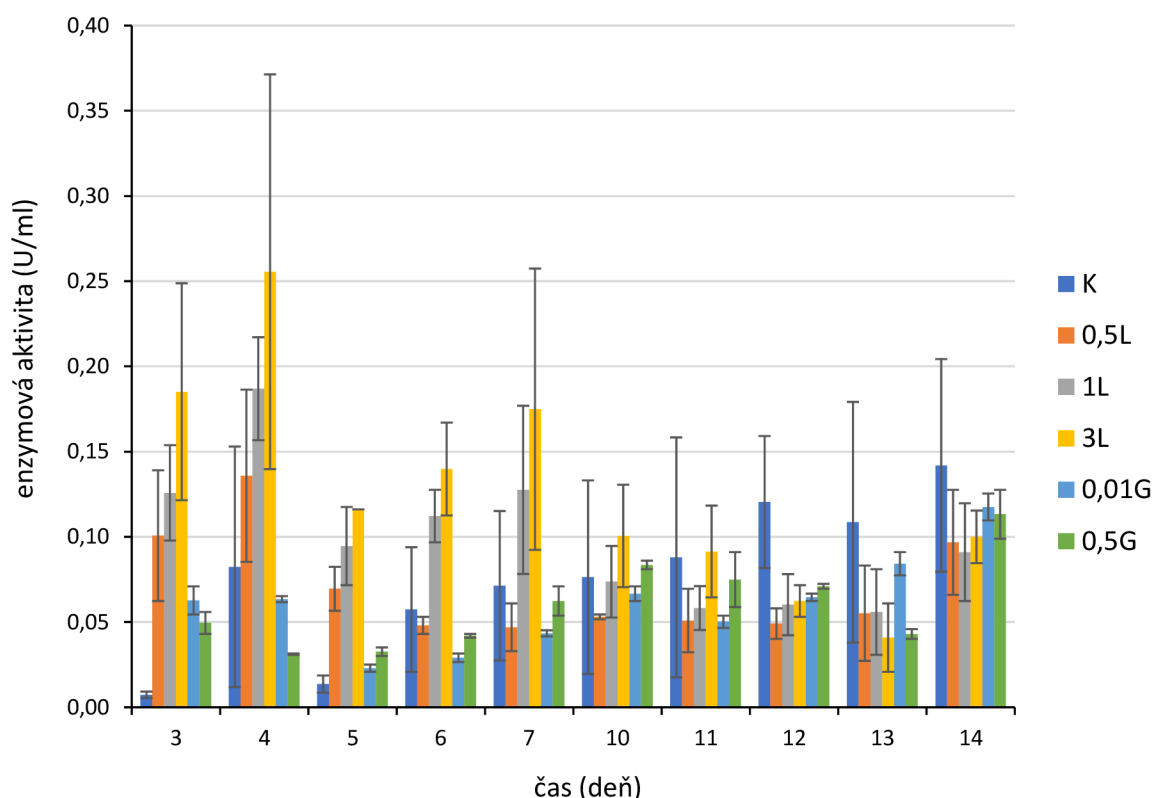
## 5. VÝSLEDKY A DISKUSIA

Ligninolytické enzýmy vykazujú potenciál širokého uplatnenia v priemysle potravín, liečiv alebo úpravy polymérnych materiálov, najmä v súčasnosti, keď sa kladie dôraz na využitie miernejších a ekologickejších podmienok. Vďaka týmto požiadavkám sa čoraz viac skúmajú možní producenti ligninolytických enzýmov, ako aj optimálne podmienky ich produkcie, navýšenie množstva a spôsob mnohonásobného využitia enzýmov.

### 5.1. Výsledky optimalizácie kultivačných podmienok plesne *P.chrysosporium*

V práci bol vybraným produkčným organizmom plesneň *Phanerochaete chrysosporium*, ktorá vykazovala produkciu lignín-peroxidázy, mangán-peroxidázy a lakázy kultivovaná staticky v 50 ml média pri teplote 32 °C.

Kultivácia plesne prebiehala za štandardizovaných podmienok, pričom ovplyvnenie produkovaného množstva enzýmov bola skúmaná použitím rôznych koncentrácií uhlíkatého substrátu (Glu) a použitím induktora (lignín a guaiacol). Tieto látky boli vybrané z toho dôvodu, že aromatické zlúčeniny už v skorších štúdiách vykazovali zvýšenie sekrécie lignolytických enzýmov, najmä lakázy [93]. Nárast produkcie lignolytických enzýmov zaznamenali aj Makela a kol. (2013), ktorí používali ako zdroj uhlíku drevo a ako induktor rozdrvenú jelšu. Tieto substráty obsahujú lignín ako prirodzenú zložku drevnej štruktúry [94].



**Obr. 14** Porovnanie vplyvu prítomnosti induktora a jeho koncentrácie v médiu na produkciu lignín-peroxidázy (K: kontrola; 0,5L: induktor 0,5 g/l lignínu; 1L: induktor 1 g/l lignínu; 3L: induktor 3 g/l lignínu; 0,01G: induktor 0,01 g/l guaiacolu; 0,5G: induktor 0,5 g/l guaiacolu).

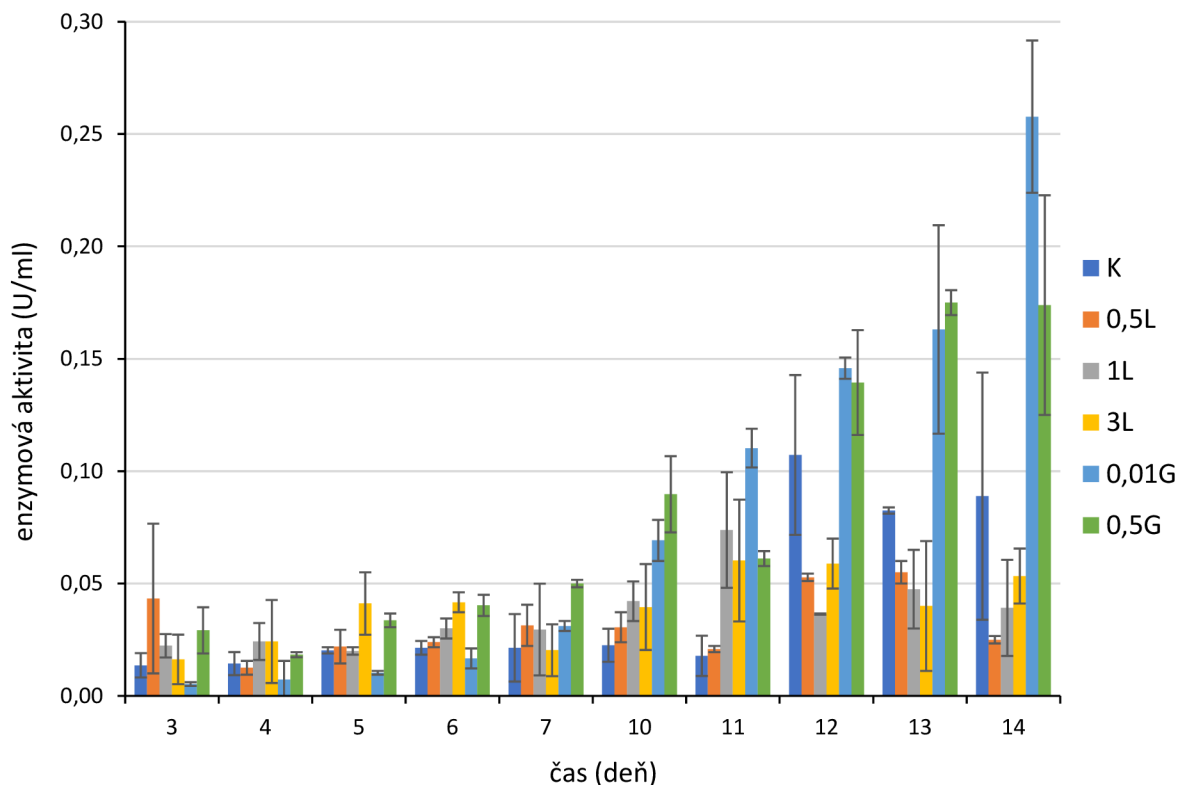
Sledovanie produkcie enzýmov prebiehal po dobu 14. dní, pričom každý deň boli vykonané odbery na stanovenie enzýmových aktivít a množstva bielkovín v produkčnom médiu. Je dôležité poznamenať, že nie je možné zabezpečiť optimálne podmienky pre



maximálnu produkciu všetkých troch enzýmov súčasne (LiP, MnP a Lac) v jednom rastovom médiu [89].

V priebehu sledovania vplyvu koncentrácie uhlíkatého substrátu (glukózy) na produkciu ligninolýtických enzýmov boli použité kultivačné médiá s 1 g/l a 2 g/l glukózy. V týchto médiách bol pridaný ako induktor lignín v koncentráciách 1 g/l a 3 g/l, pričom sa sledovala synergia účinku glukózy a lignínu na produkciu enzýmov. Pri sledovaní účinku na LiP vykazovala kontinuálne najvyššie hodnoty enzýmových aktivít v médiu s 2 g/l glukózy a 3 g/l lignínu; do 9.dňa kultivácie enzýmová aktivita neklesla pod 0,17 U/ml. Najvyššia aktivita lignín-peroxidázy bola nameraná vo 4.deň ( $0,2556 \pm 0,1158$  U/ml). V štúdií *Wang a kol. (2008)* bol sledovaný vplyv koncentrácie dextrózy ako uhlíkatého substrátu v rôznych koncentráciách (2, 5 a 10 g/l). Médium s koncentráciou dextrózy 2 g/l dosiahlo najvyššie enzýmové aktivity LiP taktiež vo 4.deň kultivácie [90].

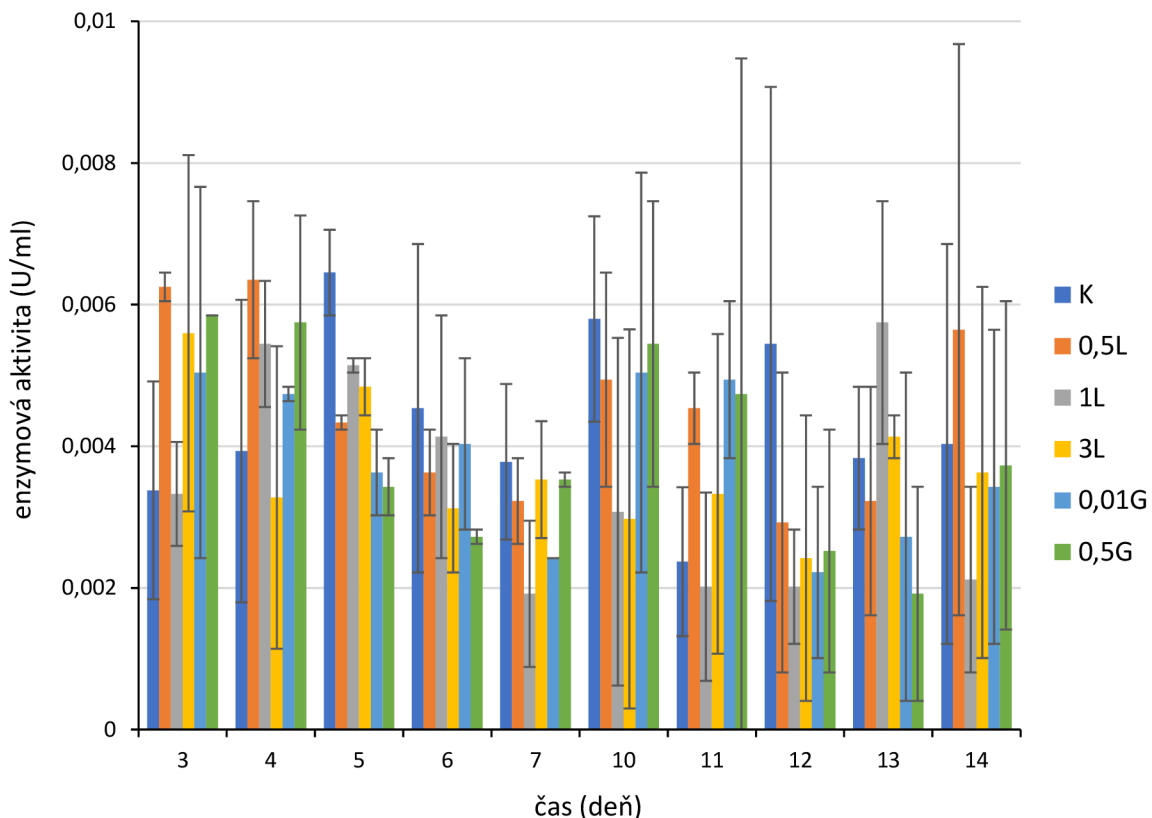
Pridaním induktora do kultivačného média bolo očakávané zvýšenie produkcie LiP. Zvýšenie produkcie peroxidázy sa potvrdilo najmä v prvých dňoch kultivácie (viď. *Obr. 14*), kde bol pozorovaný značný nárast enzýmovej aktivity oproti kultivačnému médiu bez induktora. Najvýraznejší nárast vykazovalo médium s 3 g/l lignínu v 3.deň kultivácie ( $0,2326 \pm 0,0197$  U/ml). Indukčný vplyv lignínu sa však postupom času znižoval a naopak viacej peroxidázy sa produkovalo v médiu bez induktora. Vplyv guaiacolu sa tiež začal prejavovať až v neskorších dňoch kultivácie. Mierne vyšší vplyv vykazovalo médium s 0,01 g/l guaiacolu, kde sa najvyššej hodnoty dosiahlo v 14. deň ( $0,1176 \pm 0,0079$  U/ml).



**Obr. 15** Porovnanie vplyvu prítomnosti induktora a jeho koncentrácie na produkciu lakázy (K: kontrola; 0,5L: induktor 0,5 g/l lignínu; 1L: induktor 1 g/l lignínu; 3L: induktor 3 g/l lignínu; 0,01G: induktor 0,01 g/l guaiacolu; 0,5G: induktor 0,5 g/l guaiacolu).

Pri sledovaní vplyvu koncentrácie uhlíkatého substrátu na produkciu lakázy, bola najvyššia enzýmová aktivita nameraná v 11. deň kultivácie v médiu s 1 g/l glukózy spolu s 3 g/l lignínu ( $0,1042 \pm 0,0188$  U/ml). Trend rastúcej produkcie s dobou kultivácie bol pozorovaný aj u média s 2 g/l glukózy, pričom najvyššia synergia bola s 3 g/l lignínu, podobne ako u lignín-peroxidázy. Tu bolo najvyššej enzýmovej aktivity dosiahnuté opäť v 11. deň ( $0,0863 \pm 0,0020$  U/ml).

V rámci pozorovania vplyvu induktoru boli najlepšie enzýmové aktivity dosiahnuté v médiách s obsahom guaiacolu, ktorý sa postupne zvyšoval s dobou kultivácie (vid'. Obr. 15). Najvyššej hodnoty lakázy dosahovala v 14. deň v médiu s 0,01 g/l guaiacolu ( $0,2578 \pm 0,0339$  U/ml). Ako ďalšie médium, ktoré vykazovalo tretie najlepšie hodnoty enzýmových aktivít sa ukázalo médium s 3 g/l lignínu. V ňom boli najvyššie hodnoty namerané v 10. a 12. deň ( $0,0583 \pm 0,0039$  U/ml a  $0,0589 \pm 0,0111$  U/ml).

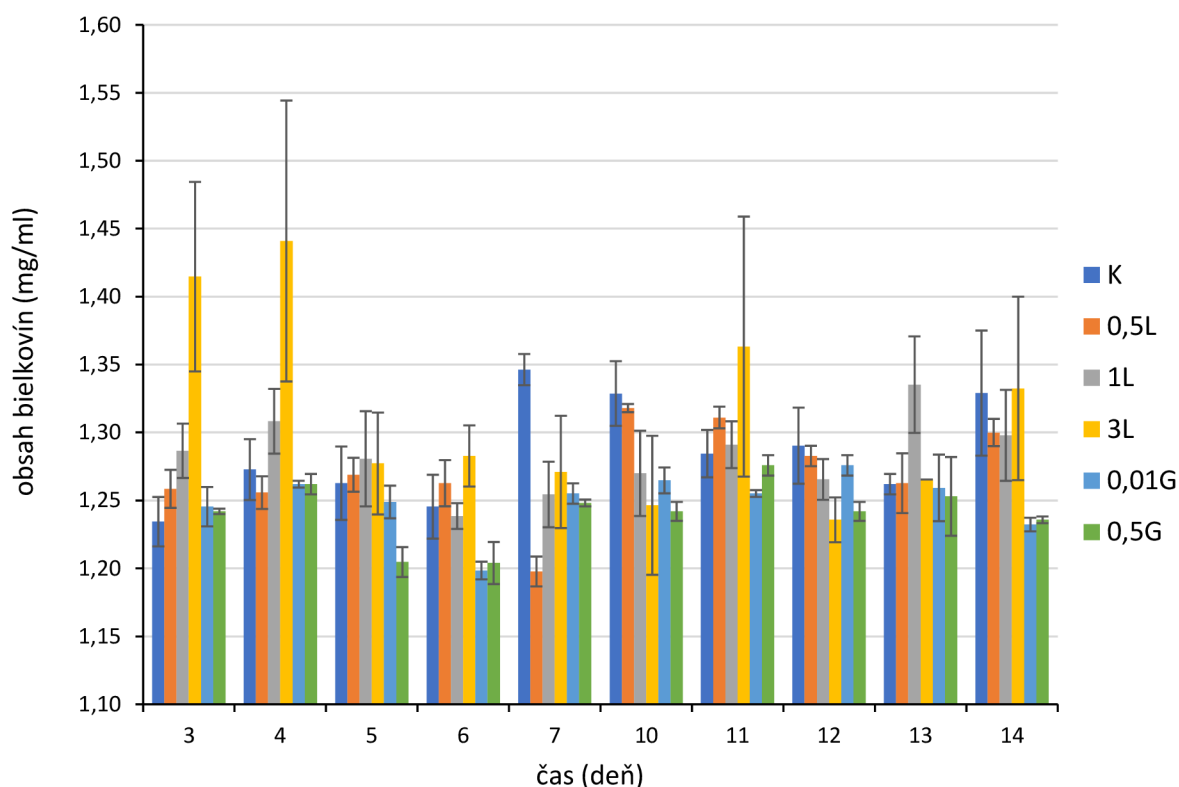


**Obr. 16** Porovnanie vplyvu prítomnosti induktoru a jeho koncentrácie na produkciu mangán-peroxidázy (K: kontrola; 0,5L: induktor 0,5 g/l lignínu; 1L: induktor 1 g/l lignínu; 3L: induktor 3 g/l lignínu; 0,01G: induktor 0,01 g/l guaiacolu; 0,5G: induktor 0,5 g/l guaiacolu).

Produkcia mangán-peroxidázy bola najvyššia opäť v médiu s 3 g/l lignínu (vid'. Obr.16), pričom najvýznamnejšia synergia bola zistená v spojení s koncentráciou glukózy 2 g/l. Táto enzýmová aktivita bola nameraná v 3. deň kultivácie ( $8,1 \pm 0,6$  mU/ml). V 10.deň bola dosiahnutá druhá najvyššia hodnota ( $5,7 \pm 0,2$  mU/ml). Po tomto dni bol pozorovaný náhly pokles enzýmovej aktivity v 11.deň. Obsah guaiacolu v médiu preukázal v prvých dňoch mierny nárast v produkciu MnP oproti kontrole, avšak postupom času bola produkcia MnP skôr inhibovaná. Podobný priebeh produkcie MnP bol sledovaný v médiu s 2 g/l dextránu ako uhlíkatého zdroja aj v štúdiu Wang a kol. (2008), kde boli najvyššie produkčné hodnoty dosiahnuté v 5. a 6.deň [90]. Po týchto dňoch bol taktiež sledovaný značný pokles produkcie MnP.

Pre ďalšie použitie extracelulárnych enzýmov na imobilizáciu bolo potrebné sledovať obsah bielkovín v médiu [105]. Niektoré enzýmy majú na svojom povrchu málo reaktívnych aminoskupín, v dôsledku čoho nedokážu vytvoriť dostatočné prepojenia s glutaraldehydom pri CLEA imobilizácii. Najčastejšie sú týmito skupinami Lys zvyšky. Ak ich je v štruktúre proteínu málo, pridáva sa tzv. proteínový napájač, ktorý je bohatý na Lys zvyšky (najmä BSA). Jeho prídavkom dôjde k lepšiemu prepojeniu enzýmových agregátov a zvýši sa ich stabilita. Rovnaký problém nedostatočného prepojenia agregátov môže nastať aj vtedy, keď je enzýmov (resp. proteínov) v kultivačnom médiu málo. Z toho dôvodu bol sledovaný obsah extracelulárnych bielkovín meraný metódou podľa Bradfordovej.

Meranie obsahu bielkovín preukázalo najvyššiu hodnotu v 3.deň (viď. Obr.17) v médiu s obsahom lignínu 3 g/l ( $1,3490 \pm 0,0195$  mg/ml). V prvých dňoch preukázal lignín značný indukčný efekt na produkciu bielkovín. Guaiacol indukčný efekt nepreukázal; v neskorších dňoch bol oproti kontrole pozorovaný inhibičný efekt. U kontrolného média bez obsahu induktoru bola najvyššia produkcia pozorovaná v 7.deň ( $1,3463 \pm 0,0115$  U/ml).



**Obr. 17** Sledovanie obsahu bielkovín na základe vplyvu induktoru (K: kontrola; 0,5L: induktor 0,5 g/l lignínu; 1L: induktor 1 g/l lignínu; 3L: induktor 3 g/l lignínu; 0,01G: induktor 0,01 g/l guaiacolu; 0,5G: induktor 0,5 g/l guaiacolu).

Pre pozorovanie vplyvu koncentrácie glukózy na produkciu lignínolytických enzýmov boli použité koncentrácie 1 g/l a 2 g/l v médiu s rôznym obsahom lignínu ako induktoru (1 g/l a 3 g/l). Vo všetkých variantoch bol pozorovaný synergický účinok glukózy s lignínom na obsah extracelulárnych bielkovín stanovených v médiu. Najvyššie hodnoty vykazovalo médium s obsahom 3 g/l lignínu a 2 g/l glukózy. Toto zvýšenie bolo pozorované v prvé dni kultivácie (1.–4. deň) kedy sa obsah bielkovín pohyboval v rozmedzí 1,33–1,37 mg/ml. V 7. deň nasledoval mierny pokles na 1,23 mg/ml. Na 8. deň bol pozorovaný opäť nárast na 1,37 mg/ml, pričom nasledujúce dni obsah bielkovín klesol pod hodnotu 1,15 mg/ml.

Na základe pozorovaní vplyvu induktora a koncentrácie glukózy u všetkých troch enzýmov (MnP, LiP aj Lac) bolo k ďalším experimentom vybrané kultivačné médium s obsahom 3 g/l lignínu a 2 g/l glukózy. Doba kultivácie bola optimalizovaná na 10 dní.

## 5.2. Výsledky optimalizácie CLEA imobilizácie lignolytických enzýmov

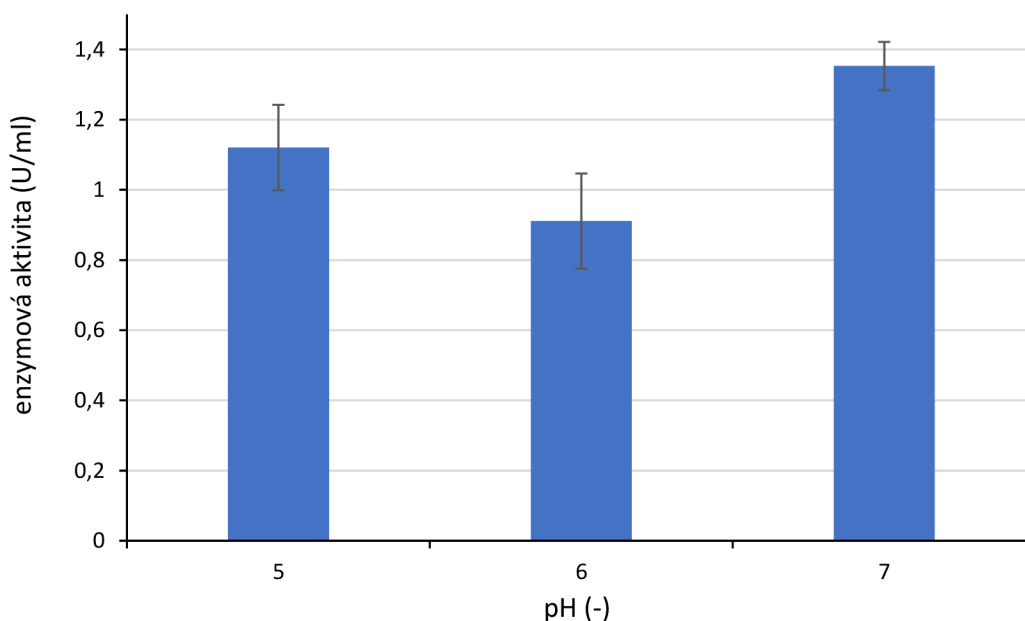
CLEA je imobilizačná stratégia bez potreby matrice, pri ktorej je imobilizovaný enzým vytvorený reakciou agregácie a zosieťovania molekúl enzýmu. Výhodami tejto metódy sú nízka cena, účinnosť a jednoduchosť prevedenia. Ako zrážacie činidlo sa bežne používa síran amónny a ako sieťujúce činidlo GA. Zrážanie patrí zároveň aj k purifikačnému kroku proteínov, preto metóda CLEA poskytuje prečistenie enzýmu a jeho imobilizáciu v jednom kroku.

Podľa výsledkov z optimalizácie kultivačných podmienok boli vybrané podmienky, za ktorých prebehla produkcia lignolytických enzýmov určených k imobilizácii. Kultivačné médium obsahovalo glukózu v koncentrácii 2 g/l, lignín ako induktor v koncentrácii 3 g/l a prebiehala pri teplote 32 °C po dobu 10 dní. V tento deň bolo médium prefiltrované a následne bola vykonaná optimalizácia imobilizačných podmienok pre metódu CLEA.

### 5.2.1. Výsledky optimalizácie pH

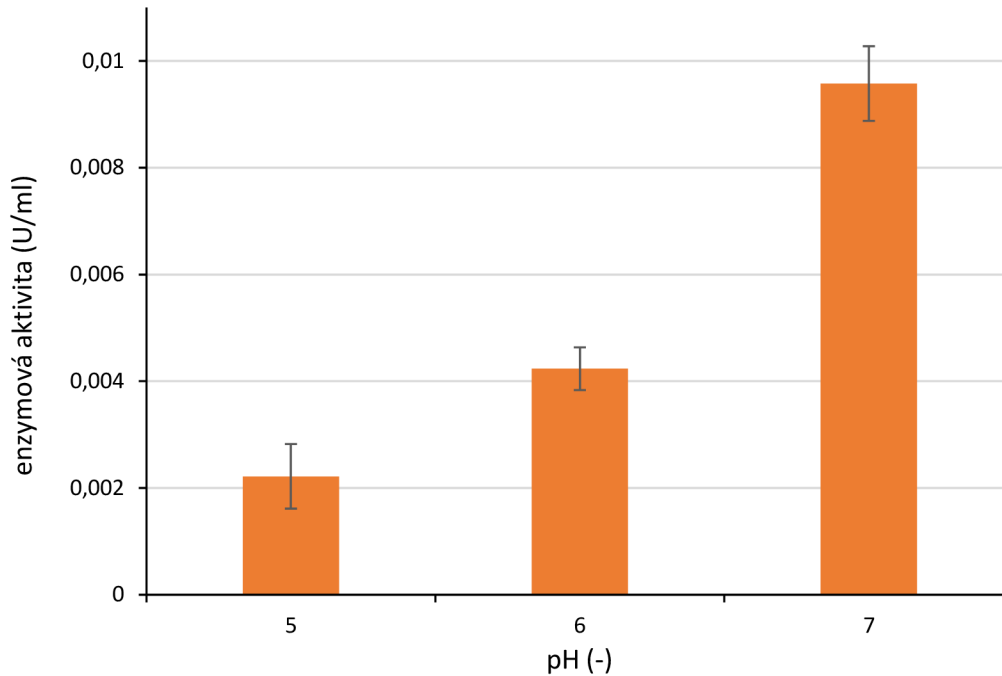
Pri ko-imobilizácii enzýmov MnP, LiP a Lac bolo potrebné stanoviť optimálne pH pre zrážanie enzýmov. Nakoľko optimálne pH pre každý enzým je rôzne, bolo dôležité pri výbere konkrétneho pH prihliadať aj na veľkosť enzýmovej aktivity v roztoku. V rámci optimalizácie pH boli vybrané hodnoty blízke optimálnym hodnotám precipitácií všetkých enzýmov. Optimálne pH bolo vybrané podľa najnižšej zvyškovej enzýmovej aktivity v supernatante získanom po stočení média.

Podľa grafu (vid' Obr.18) optimalizácie pH precipitácie pre LiP preukázala najnižšiu zvyškovú aktivitu hodnota 6,0, konkrétne  $1,33 \pm 0,14$  U/ml. To znamená, že v tejto hodnote pH sa vyzrážalo z média najviac enzýmu. Najmenej výhodné pH pre precipitáciu LiP sa ukázalo pri pH 7,0, pri ktorom bola zistená najvyššia zvyšková aktivita  $1,35 \pm 0,07$  U/ml.



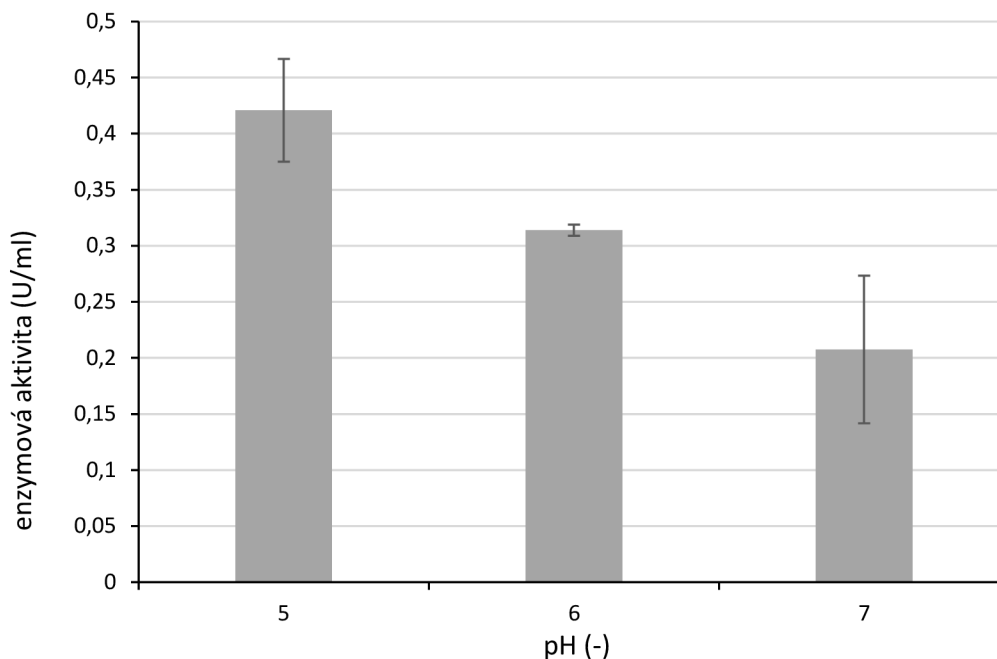
**Obr. 18** Optimalizácia pH pre zrážanie lignín-peroxidázy (najväčšie vyzrážanie enzýmu pri najnižšej hodnote enzýmovej aktivity).

Pri optimalizácii pH precipitácie pre enzým MnP (vid'. Obr. 19) bola najnižšia zvyšková enzymová aktivita nameraná pre hodnotu 5 ( $2,2 \pm 0,6$  mU/ml). To značí najväčšiu precipitáciu enzýmu v tomto pH. Naopak k najmenšiemu vyzrážaniu došlo pri neutrálnom pH 7, kde bola zvyšková aktivita enzýmu  $9,6 \pm 0,7$  mU/ml.



**Obr. 19** Optimalizácia pH pre zrážanie mangán-peroxidázy (najnižšia hodnota enzymovej aktivity znamená najlepšie vyzrážanie enzýmu).

Optimálne pH pre precipitáciu Lac sa pohybuje v rozmedzí 4,0–7,0 [91]. Pri precipitácii Lac sa ako najvhodnejšie pH pre zrážanie ukázalo v hodnote 7, pri ktorom bola nameraná zvyšková aktivita  $0,2075 \pm 0,0658$  U/ml (vid'. Obr. 20). Najmenej enzýmu sa naopak vyzrážalo pri pH 5, kde bola najvyššia zvyšková aktivita  $0,4208 \pm 0,0458$  U/ml. Solčány a kol. (2016) uviedli optimálne pH 6,0 pre precipitáciu Lac izolovanej z *Trametes versicolor* a pH 8,0 pre Lac z *Fomes fomentarius* [91]. V inej štúdii Patel a kol. (2014) precipitovali Lac z *Pleurotus ostreatus* pri pH 4,5 [92]. Podľa toho možno tvrdiť, že optimálne pH precipitácie sa odvíja od producenta enzýmu a je teda potrebné ho optimalizovať pre konkrétny kmeň.



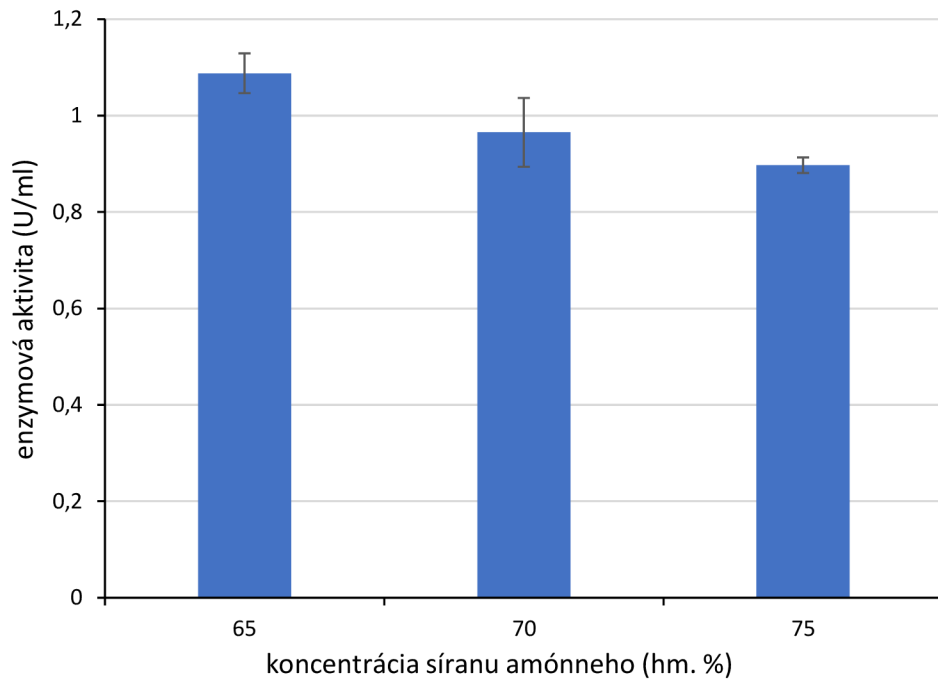
**Obr. 20** Optimalizácia pH pre zrážanie lakázy (najnižšie enzymová aktivita znamená najlepšie vyzrážanie enzýmu).

Po zohľadnení všetkých nameraných výsledkov pre jednotlivé enzýmy, bola pre ďalšie pokračovanie experimentu vybraná hodnota pH 6. Pri výbere sa prihliadalo aj na veľkosť enzymových aktivít v rámci jednotlivých meraní. Toto pH bolo najvhodnejšie pri precipitácii LiP, ktorá vykazovala najvyššie enzymové aktivity. Zároveň bola táto hodnota aj druhá najlepšia pre zvyšné 2 enzýmy: MnP a Lac.

### 5.2.2. Výsledky optimalizácie koncentrácie síranu amónneho

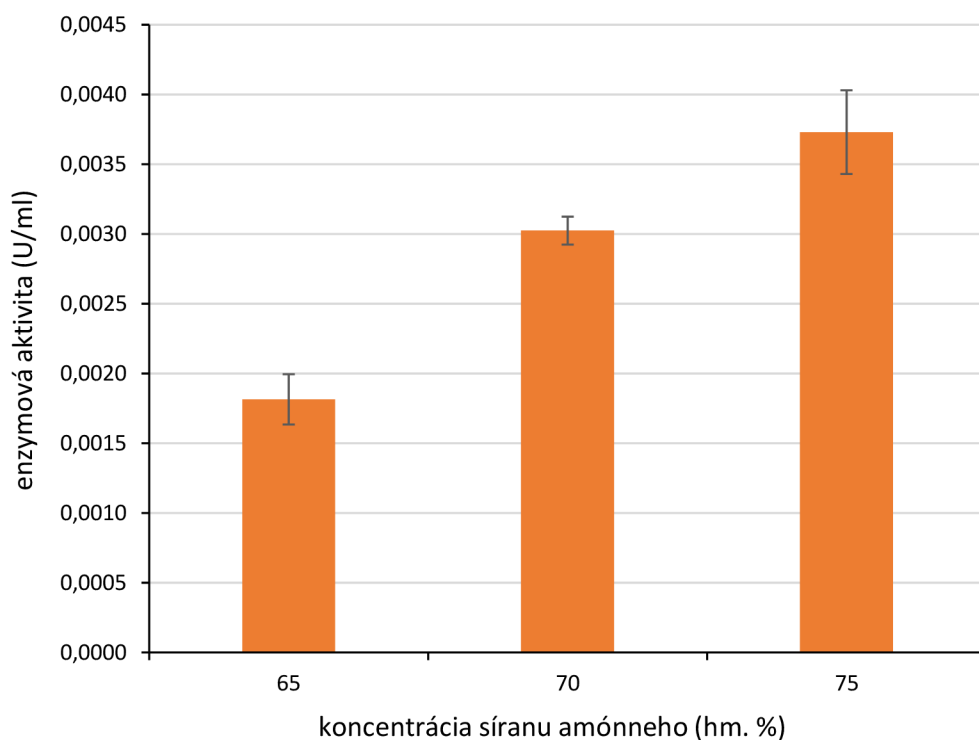
Druhým krokom bola optimalizovať koncentráciu síranu amónneho, ktorý slúži ako precipitačné činidlo. Dôležité bolo vybrať vhodnú koncentráciu, ktorá by vyzrážala pokiaľ možno maximálne množstvo enzýmu a zároveň by nepoškodila jeho štruktúru. Sledované boli koncentrácie 65, 70 a 75 hm.% síranu amónneho v roztoku média (15 ml).

Pri optimalizácii pre LiP bola najnižšia zvyšková enzymová aktivita nameraná pri koncentrácii 75 hm.% a to  $0,8971 \pm 0,01613$  U/ml (vid'. Obr. 21). Trend, ktorý bol pri zrážaní LiP pozorovaný, ukazuje, že so zvyšujúcim sa obsahom síranu amónneho sa zvyšuje aj množstvo precipitácie enzýmu. Najvyššia precipitácia bola teda pozorovaná pri koncentrácii 75 hm.%. Precipitácia zároveň znižuje aktívnu plochu enzýmu, ktorá sa dostane do kontaktu so substrátom, avšak zvyšuje zároveň aj stabilitu enzymových agregátov. V štúdií *Parveen a kol. (2021)* bola LiP zrážaná síranom amónnym v koncentráciách 10–80 %, v ktorej bol potvrdený trend rastúcej precipitácie so zvyšujúcou sa koncentráciou síranu amónneho [95]. V tejto štúdií bola najvyššia precipitácia LiP dosiahnutá pri koncentrácii síranu 80 %.

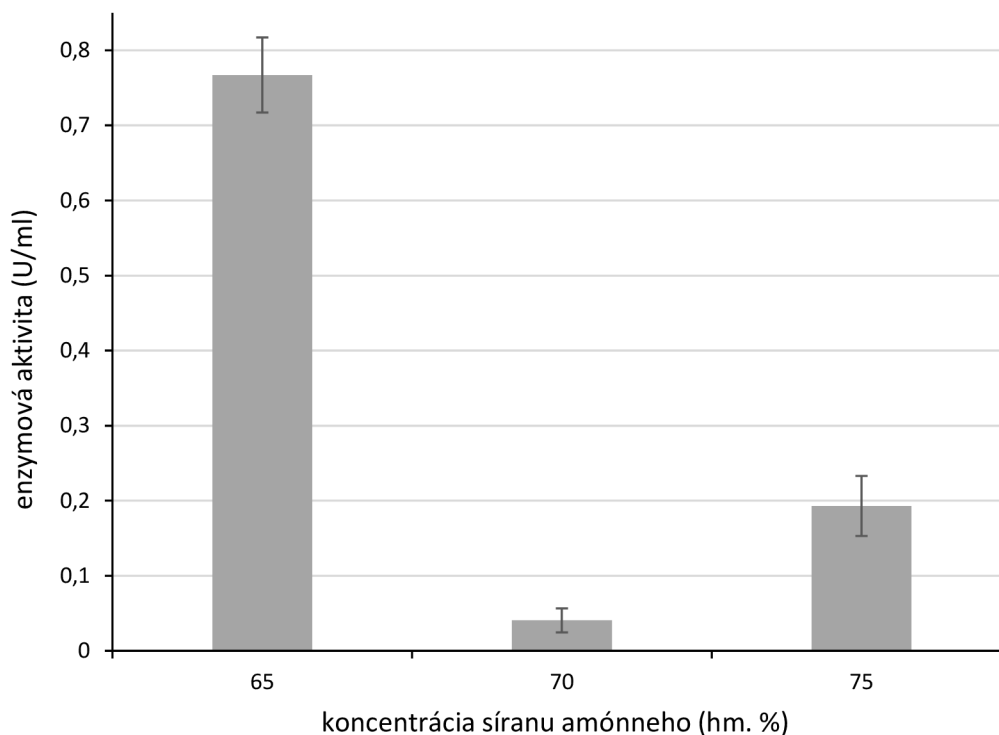


**Obr. 21** Optimalizácia koncentrácie síranu amónneho pre vyzrážanie lignín-peroxidázy (najnižšia enzymová aktivita znamená najlepšie vyzrážanie enzýmu).

V rámci optimalizácie koncentrácie síranu amónneho pre MnP bola najnižšia zvyšková enzymová aktivita ( $0,0018 \pm 0,0002$  U/ml) nameraná v roztoku média so 65 hm.% (viď Obr. 22).



**Obr. 22** Optimalizácie koncentrácie síranu amónneho pre zrážanie mangán-peroxidázy (najlepšie vyzrážanie enzýmu vyjadrené najnižšou zvyškovou enzymovou aktivitou).



**Obr. 23** Optimalizácie koncentrácie síranu amónneho pre zrážanie lakázy (najlepšie vyvrážanie enzýmu pri najnižšej zvyškovej enzymovej aktivite).

Pre lakázu bola najvyššia precipitácia sledovaná v roztoku média s obsahom síranu amónneho 70 hm.% (viď. Obr. 23). Zvyšková aktivita lakázy v tomto roztoku bola  $0,0406 \pm 0,016$  U/ml. V štúdiách *Mukhopadhyay a Banerjee (2015)*, ktorí izolovali Lac z *Lentinus squarrosulus*, a *Sinirlioglu a kol. (2013)*, ktorí izolovali Lac z baktérie *Shewanella putrefaciens*, sa ukázala ako najvhodnejšia koncentrácia pre precipitáciu Lac 60 hm.% [96;97]. V iných experimentoch *Patel a kol. (2014)* a *Vršanská a kol. (2018)* je popísaná minimálna koncentrácia na vyvrážanie Lac z *Pleurotus ostreatus* a *Trametes versicolor* 75 hm.% [92;98]. Nakoľko v štúdiách boli použité rôzni producenti Lac je možné opäť tvrdiť, že pravdepodobne záleží na zdroji ligninolytických enzýmov.

Pre ďalší optimalizačný krok bol vybraný roztok s koncentráciou síranu amónneho 75 hm.%, ktorý vykazoval najlepšiu precipitáciu pre LiP. Vo výbere bol braný ohľad aj na veľkosť hodnôt enzymových aktivít.

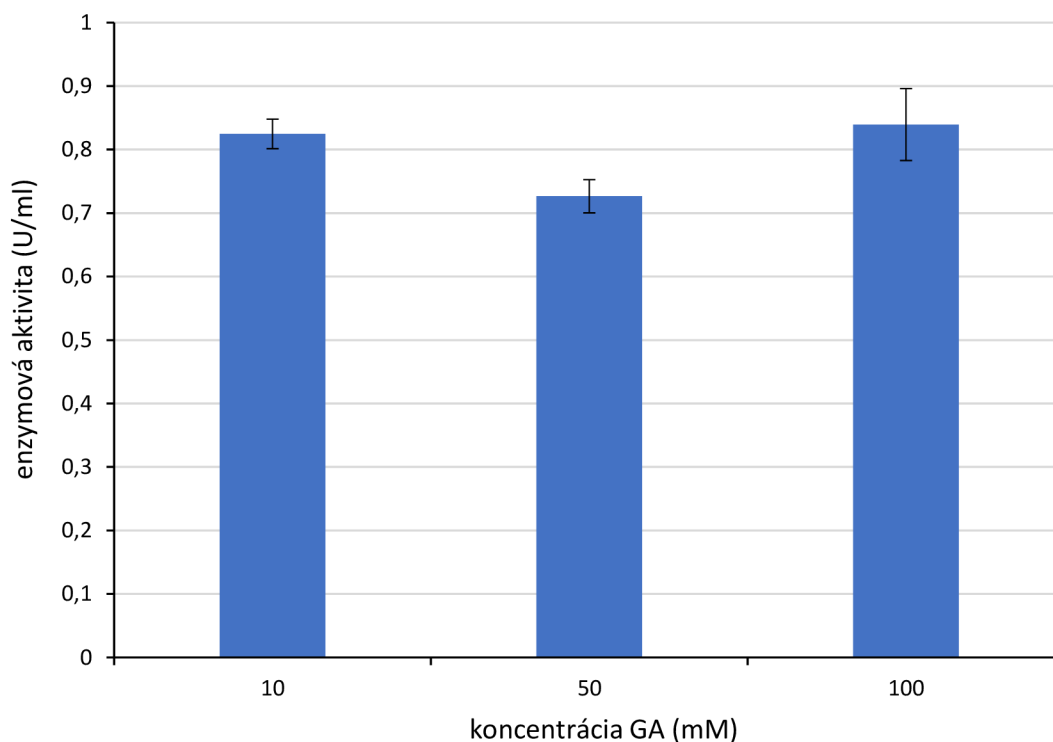
### 5.2.3. Výsledky optimalizácie koncentrácie sieťujúceho činidla

Po optimalizácii pH a koncentrácie zrážajúceho činidla síranu amónneho bolo potrebné optimalizovať aj koncentráciu sieťujúceho činidla GA, pri ktorej prebehlo najlepšie zosieťovanie proteínu a zároveň nebola poškodená jeho aktivita a stabilita. Koncentrácia GA ovplyvňuje aktivitu enzýmu v roztoku. Pri použití príliš nízkej koncentrácie je možné, že molekula enzýmu nebude dostatočne zosieťovaná a stabilná, čo môže viesť k vylúhovaniu enzýmu do roztoku. Na druhej strane pri použití vysokej koncentrácie GA môže dôjsť k prílišnému zosieťovaniu a sférickému obmedzeniu prístupu substrátu k aktívnym miestam, a tým aj strate aktivity enzýmu [99]. Toto sieťujúce činidlo sa veľmi často používa pre tvorbu CLEA aj z dôvodu jeho nízkej ceny.



K sieťovaniu boli v experimente použité 3 rôzne koncentrácie GA v roztoku: 10 mM, 50 mM a 100 mM. Najlepšia koncentrácia GA bola zhodnotená podľa najnižšej enzýmovej aktivity (U/ml) v supernatante získanom po imobilizácii.

Na grafe (vid'. Obr. 24) je zobrazená nameraná zostatková enzýmová aktivita LiP pre rôzne koncentrácie GA. Z grafu sa jasne javí ako najvhodnejšia koncentrácia GA 50 mM, v ktorej bola nameraná najnižšia zvyšková enzýmová aktivita  $0,7265 \pm 0,0262$  U/ml.

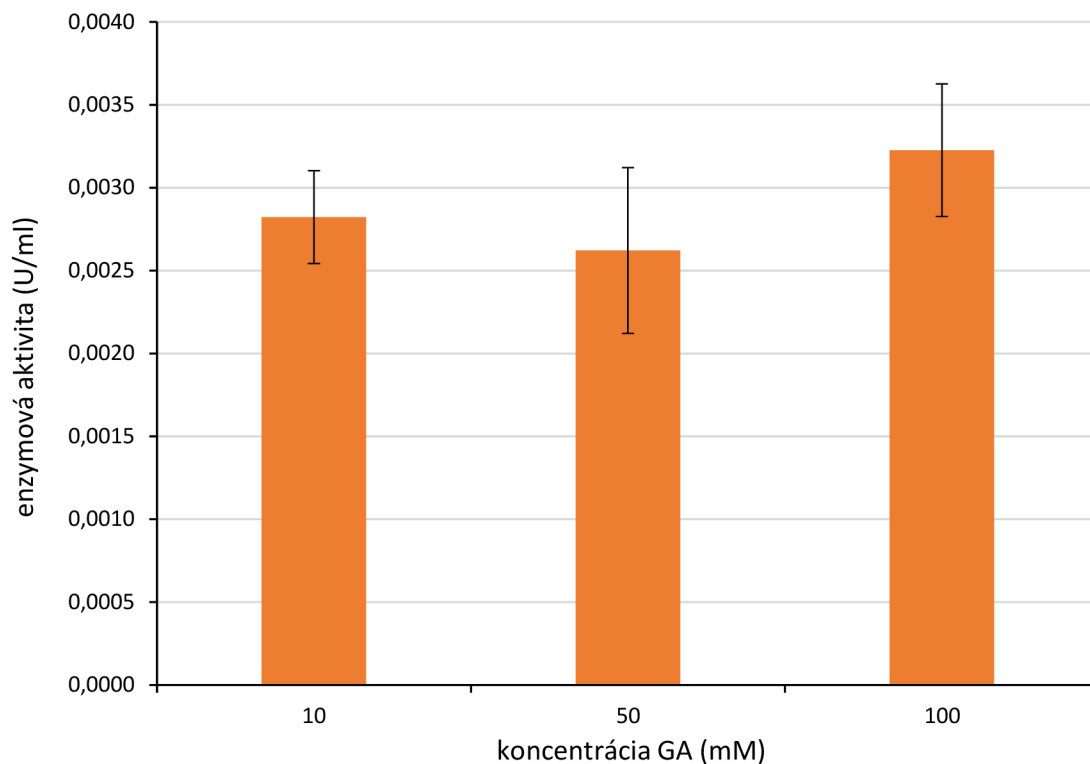


**Obr. 24** Optimalizácia koncentrácie glutaraldehydu pre zrážanie lignín-peroxidázy (najlepšie vyvrážanie enzýmu pri najnižšej zvyškovej enzýmovej aktivite) .

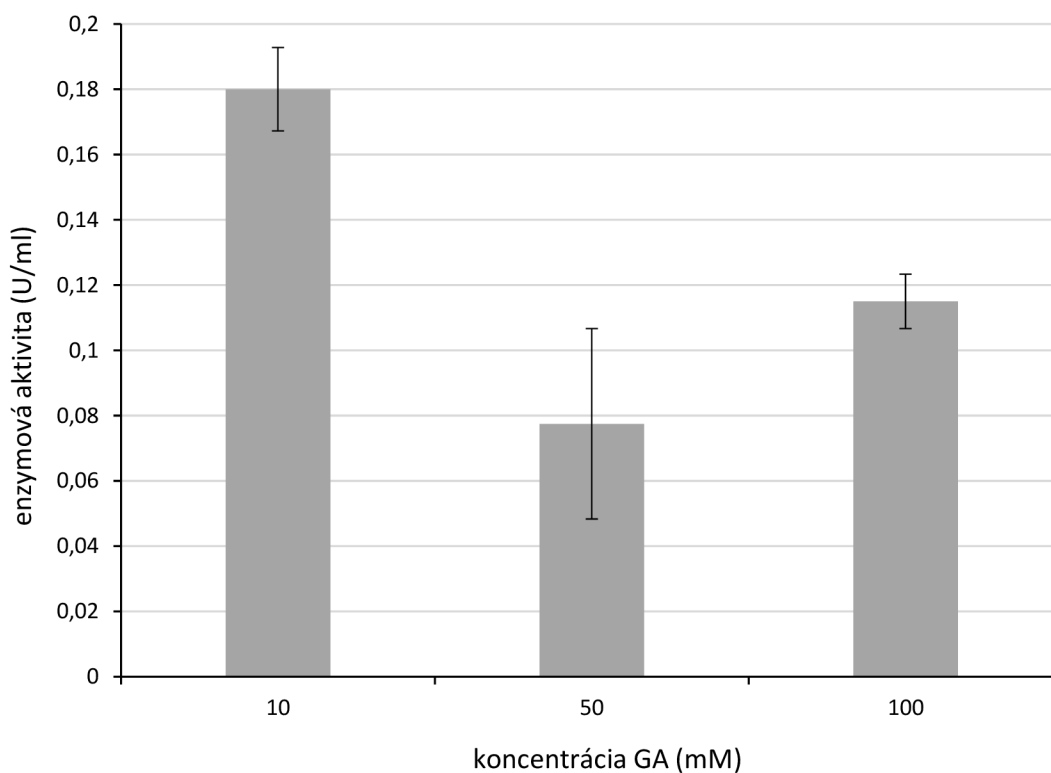
Z grafu (vid'. Obr. 25) pre optimalizáciu koncentrácie GA pre MnP vyplýva, že k najlepšiemu zosieťovaniu došlo pri koncentrácii 50 mM. Pri 10 mM ako aj pri 100 mM bola nameraná zvyšková enzýmová aktivita vyššia, čo znamená, že v týchto koncentráciách nedošlo k správne mu zosieťovaniu.

Podľa Obr. 26 pre optimalizáciu koncentrácie GA pre Lac je možné tvrdiť, že k najvhodnejšiemu zosieťovaniu došlo pri koncentrácii 50 mM. Pri nižšej koncentrácii 10 mM bola pozorovaná najvyššia zvyšková enzýmová aktivita, pričom pravdepodobne došlo k nedostatočnému zosieťovaniu. O niečo nižšia zvyšková aktivita bola stanovená pri koncentrácii 100 mM. Sieťovanie Lac pri takto vysokých koncentráciách GA bolo popísané aj v štúdií Vršanská a kol. (2018), kde bol pozorovaný pokles enzýmovej aktivity CLEA agregátu. To bolo pravdepodobne spôsobené tzv. stuhnutím štruktúry, kde nie sú možné konformačné zmeny enzýmu a tým dochádza aj k blokácii aktívnych miest [76].

Z optimalizácie koncentrácie sieťujúceho činidla GA vyplýva, že pre všetky 3 enzýmy LiP, MnP a Lac boli pozorované najnižšie zvyškové aktivity v rovnakej koncentrácii 50 mM. Podľa toho možno určiť, že k najlepšiemu zosieťovaniu enzýmových agregátov došlo pri tejto koncentrácii a ďalej v práci bola používaná len ona.



**Obr. 25** Optimalizácia koncentrácie glutaraldehydu pre zrážanie mangán-peroxidázy (najnižšia zvyšková aktivita znamená najväčšie vyzrážanie enzýmu).



**Obr. 26** Optimalizácia koncentrácie glutaraldehydu pre zrážanie lakázy (najnižšia zvyšková enzymová aktivita znamená najväčšie vyzrážanie enzýmu).

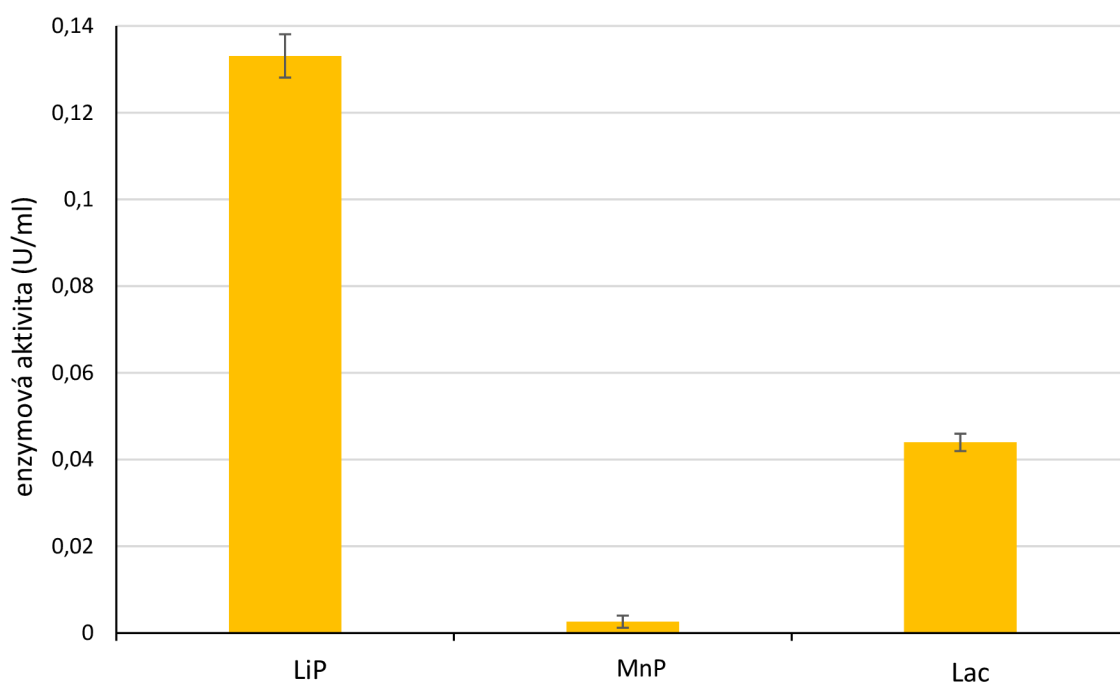
### 5.3. Výsledky imobilizácie lignolytických enzýmov na bakteriálnej celulóze

V ďalšom experimente imobilizácie lignolytických enzýmov bol ako nosič použitý biopolymér bakteriálna celulóza produkovaná baktériami *Komagataeibacter xylinus*. Imobilizácia prebehla v prvom pokuse formou adsorpcie, pri ktorej však hrozí vymývanie enzýmu, pretože interakcia medzi nosičom a enzýmom je slabá. V druhom pokuse bola metóda adsorpcie na BC spojená s metódou CLEA, kde boli enzýmy vyzrážané za pomoci síranu amónneho a následne zosieťované pomocou GA. Druhá metóda zosieťovaných agregátov na BC (BC + CLEA) vykazovala o niečo vyššie enzýmové aktivity (vid'. Tab.16). v imobilizácii MnP a Lac. Naopak pri imobilizácii LiP bola pozorovaná nižšia aktivita o 39 %. Z dôvodu rizika vymývania enzýmov z nosiča bola sledovaná operačná stabilita imobilizovaných enzýmov u metódy BC+CLEA (vid'. 4.2.3.1 Výsledky sledovania operačnej stability imobilizovaných enzýmov na bakteriálnej celulóze).

Tab. 16 Enzýmové aktivity namerané pre jednotlivé metódy imobilizácie na BC.

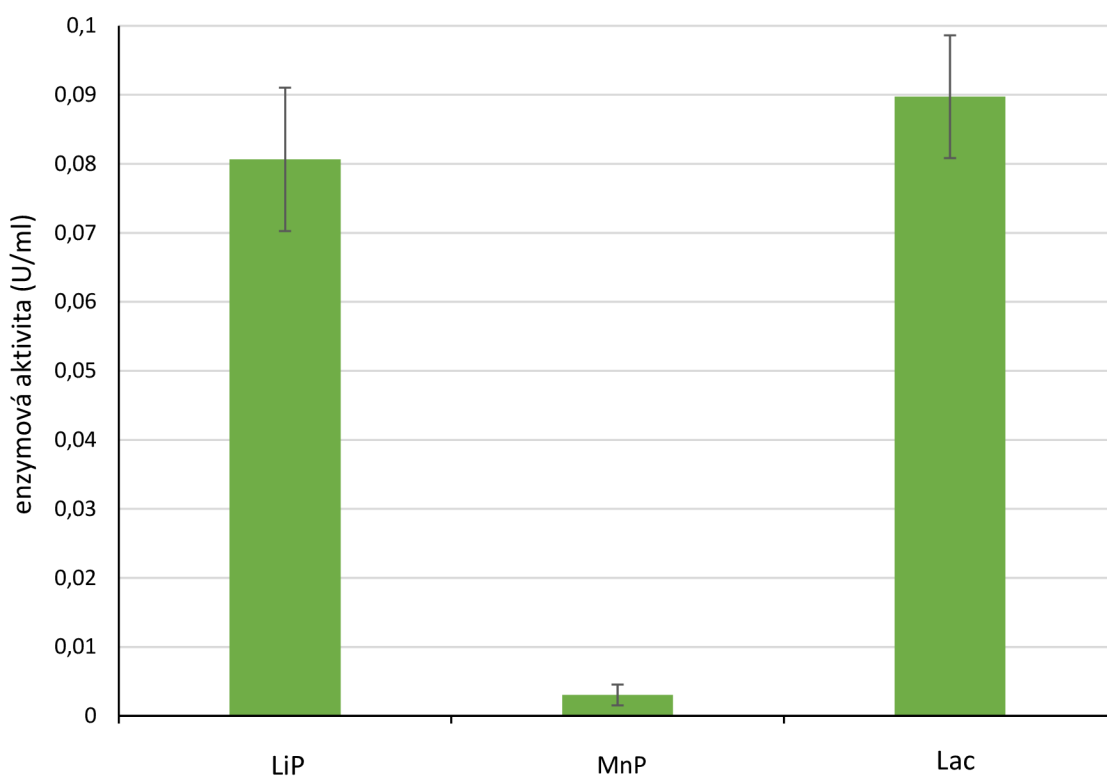
Enzým	BC	BC + CLEA
	<i>a</i> (U/ml)	<i>a</i> (U/ml)
<i>LiP</i>	0,133 ± 0,005	0,081 ± 0,010
<i>MnP</i>	0,003 ± 0,001	0,003 ± 0,002
<i>Lac</i>	0,044 ± 0,002	0,090 ± 0,009

Pri adsorpčnej metóde BC boli použité kruhové disky BC s priemerom 1,8 cm. Tie boli po imobilizácii rozpustené celulázami, aby sa zistili aktivity adsorbovaných enzýmov v póroch BC. Najvyššie hodnoty enzýmovej aktivity vykazovala LiP (vid'. Obr. 27) a to konkrétne  $0,1331 \pm 0,005$  U/ml. Druhá najvyššia enzýmová aktivita bola nameraná pre Lac ( $0,044 \pm 0,002$  U/ml). Najmenej sa podarilo imobilizovať MnP, ktorá mala najnižšiu enzýmovú aktivitu  $2,6 \pm 1,4$  mU/ml.



Obr. 27 Aktivity enzýmov imobilizovaných na BC adsorpciou.

Po zistení nízkej účinnosti adsorpcie enzýmov na BC bola vykonaná druhá metóda, ktorá spájala adsorpciu na BC spolu so zrážaním a sieťovaním. Podmienky imobilizácie enzýmov v rastovom médiu boli optimalizované vyššie (viď. 4.2.2. *Výsledky optimalizácie CLEA imobilizácie lignolytických enzýmov*). Zrážanie prebiehalo pri pH 6 a koncentrácii síranu amónneho 75 hm.%. Pri sieťovaní bol použitý GA v koncentrácii 50 mM. Po ukončení imobilizácie bola BC opäť rozpustená celulázami, aby sa zistila enzýmová aktivita adsorbovaných enzýmov. Najvyššiu špecifickú aktivitu vykazovala Lac  $0,0897 \pm 0,0089$  U/ml, čo je asi o 51 % viac ako len u samotnej adsorpčnej metódy (viď. Obr.28). U LiP po zrážaní a sieťovaní bola nameraná špecifická aktivita  $0,0806 \pm 0,0104$  U/ml. Nárast enzýmovej aktivity oproti samotnej adsorpcii bol zistený aj u MnP, ktorej špecifická aktivity bola  $0,0030 \pm 0,0015$  U/ml, čo je viac asi o 13 %.



**Obr. 28** Aktivita enzýmov imobilizovaných na BC v spojení s metódou CLEA.

V porovnaní so štúdiou *Chen a kol. (2015)*, ktorý skúmali vplyv veľkosti častíc lyofilizovanej BC na jej adsorpčnú schopnosť a následne na enzýmovú aktivitu imobilizovaného enzýmu (lakáza), bola potvrdená nepriama závislosť [100]. Pre najväčšie lyofilizované častice s rozmerom 20 x 20 mm dosiahla lakáza aktivitu  $5,9 \pm 0,2$  U/g BC. Rovnako porovnávali aj vplyv počtu kúskov BC v celkovej hmotnosti 10,2 mg inkubovaných v médiu za použitia len fyzikálnej adsorpcie. Pre 2 kúsky lyofilizátu bola dosiahnutá enzýmová aktivita Lac  $7,1 \pm 0,3$  U/g BC. Po prepočte pomocou faktoru (289 ml/g), ktorý zahŕňal pomer inkubačného média a hmotnosti lyofilizátu BC, bola zistená špecifická aktivita Lac  $223,67 \pm 2,73$  U/g BC. Takto značný nárast enzýmovej aktivity lakázy je možné vysvetliť použitím tvorby sieťovaných agregátov enzýmu pomocou síranu amónneho a GA.

#### 5.4. Porovnanie použitých imobilizačných metód

Po optimalizovaní oboch imobilizačných metód boli porovnané účinnosti imobilizácie vyjadrené ako pomer enzýmových aktivít imobilizovaných enzýmov oproti enzýmovej aktivite voľného enzýmu.

Tab. 17 Zhrnutie enzýmových aktivít a účinnosti použitých imobilizačných metód.

	Voľný enzým	CLEA		BC		BC + CLEA	
	<i>a</i> (U/ml)	<i>a</i> (U/ml)	účinnosť (%)	<i>a</i> (U/ml)	účinnosť (%)	<i>a</i> (U/ml)	účinnosť (%)
<b>LiP</b>	0,9921	0,2656	26,77	0,1331	13,42	0,0806	8,13
<b>MnP</b>	0,0226	0,0200	88,39	0,0026	11,61	0,0030	13,39
<b>Lac</b>	0,3283	0,2508	76,40	0,0440	13,40	0,0897	27,33

Účinnosť CLEA imobilizácie bola u každého enzýmu rozdielna (vid'. Tab.17). Najvyššia účinnosť bola pozorovaná pre MnP približne až 88 %. Ako druhá najúspešnejšia bola imobilizovaná Lac, ktorá vykazovala účinnosť približne 76 %. Najmenej úspešná bola imobilizácia LiP (len približne 27 %).

Pri imobilizácii adsorpciou na BC bola samotná adsorpcia veľmi málo úspešná. Enzýmové aktivity imobilizátov sa u jednotlivých enzýmov pohybovali medzi 12–13 %. Takto nízka účinnosť mohla byť spôsobená príliš malou veľkosťou enzýmov, ktoré sa ťažko uchycovali v pórov BC alebo sa veľmi rýchlo vymyli. Ďalším možným vysvetlením neúspešnosti tejto imobilizácie môže byť príliš nízka koncentrácia enzýmov v kultivačnom médiu, ktorá bola nedostatočná k inkorporácii enzýmov do pórov BC.

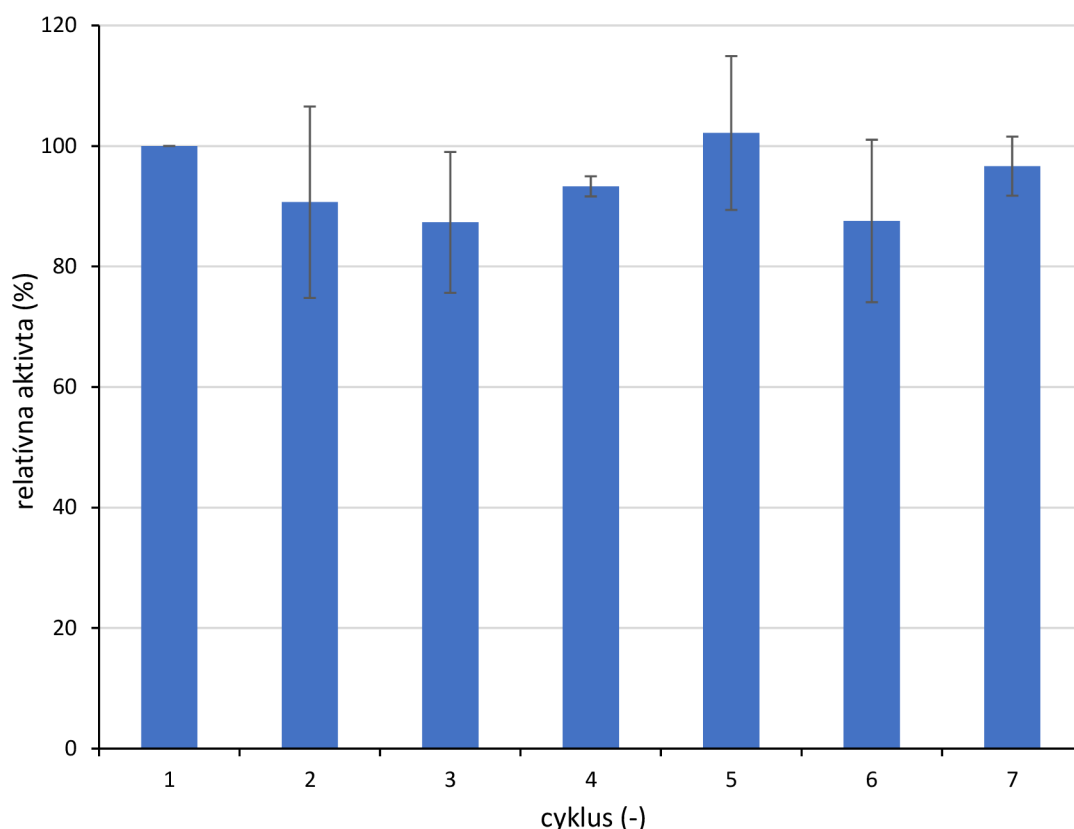
Mierne zlepšenie mohlo priniesť spojenie BC a CLEA metódy, kedy sa jednotlivé enzýmy najprv vyzrážali, aby vytvorili väčšie agregáty. Tie boli následne adsorbované do pórov BC a zasieťované prídavkom GA. Takto pripravené imobilizáty sľubovali menšie straty enzýmu spôsobené vymývaním z pórov BC. Mierne zlepšenie potvrdila aj účinnosť imobilizácie u MnP (asi 13 %) a Lac (asi 27 %). Naopak pokles účinnosti bol pozorovaný u LiP, ktorá bola len približne 8 %. Aj napriek tejto skutočnosti, bola k ďalšiemu experimentu sledovania operačnej stability použitá BC spojená s CLEA imobilizáciou.

#### 5.5. Výsledky sledovania operačnej stability imobilizovaných enzýmov na bakteriálnej celulóze

Po vykonaní imobilizácie na BC bola sledovaná operačná stabilita jednotlivých enzýmov počas 7 cyklov, v ktorých boli merané enzýmové aktivity. Pre nízku účinnosť imobilizácie na BC (vid'. Tab.14) bola relatívna aktivita  $R(\%)$  počítaná z enzýmovej aktivity zistenej v prvom cykle. Možnosť opätovného použitia enzýmu je jedným z najdôležitejších hľadísk budúceho priemyselného využitia. Použitím enzýmu v niekoľkých po sebe nasledujúcich dávkach sa dokázu v značnej miere znížiť prevádzkové náklady.

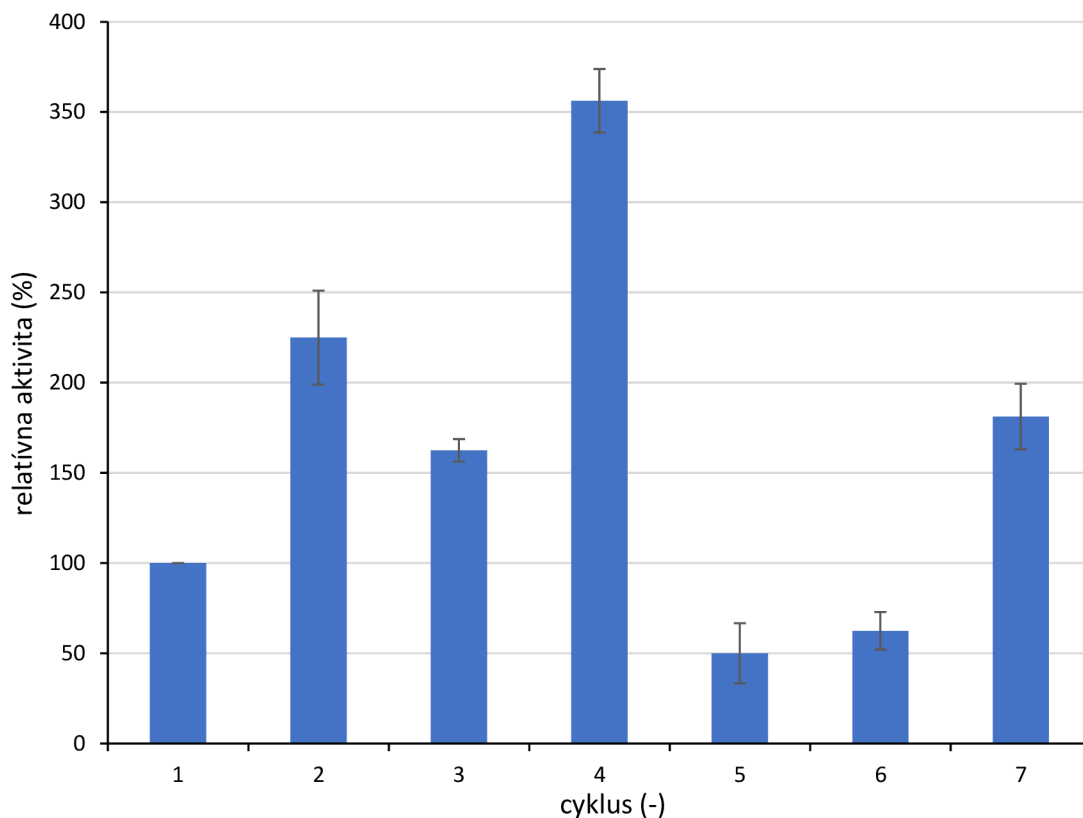
Operačná aktivita lakázy bola sledovaná v oxidačnej reakcii ABTS po sebe nasledujúcimi cyklami (vid' Obr.29). V cykle 2 a 3 bol pozorovaný mierny pokles relatívnej aktivity (91 % a 87 %). Vo 4. a 5. cykle nasledoval nárast aktivity, kedy bola dosiahnutá najvyššia relatívna aktivita 102 % (5.cykus), čo indikuje aktiváciu enzýmu, resp. prechod z pokojového stavu do aktívnej katalýzy. Po tejto hodnote bol opäť pozorovaný pokles relatívnej aktivity v 6. cykle (88%) a mierny nárast v poslednom 7. cykle (97%). V každom cykle experimentu vykazovala

LiP vysokú relatívnu aktivitu nad 85 % svojej pôvodnej aktivity, čo značí dobrú opätovnú použiteľnosť imobilizovaného enzýmu. Takto vysoká relatívna aktivita (nad 85 %) bola potvrdená aj v štúdií *Qiu a kol. (2009)* pri ko-imobilizácii LiP a GOD (glukózaoxidázy) na nanopóry zlata po 7. cykloch sledovania opätovnej použiteľnosti [101]. Stabilita imobilizovaného enzýmu a jeho katalytická schopnosť súvisia s vlastnosťami použitého nosiča, najmä s pórovitosťou. Zároveň je pre opätovné použitie imobilizovaného enzýmu dôležitý aj mechanizmus prichytenia. Pri slabých nekovalentných interakciách môže dochádzať k vyššiemu vymývaniu enzýmu z pórov nosiča, čím sa zníži aj opakovateľnosť jeho použitia.



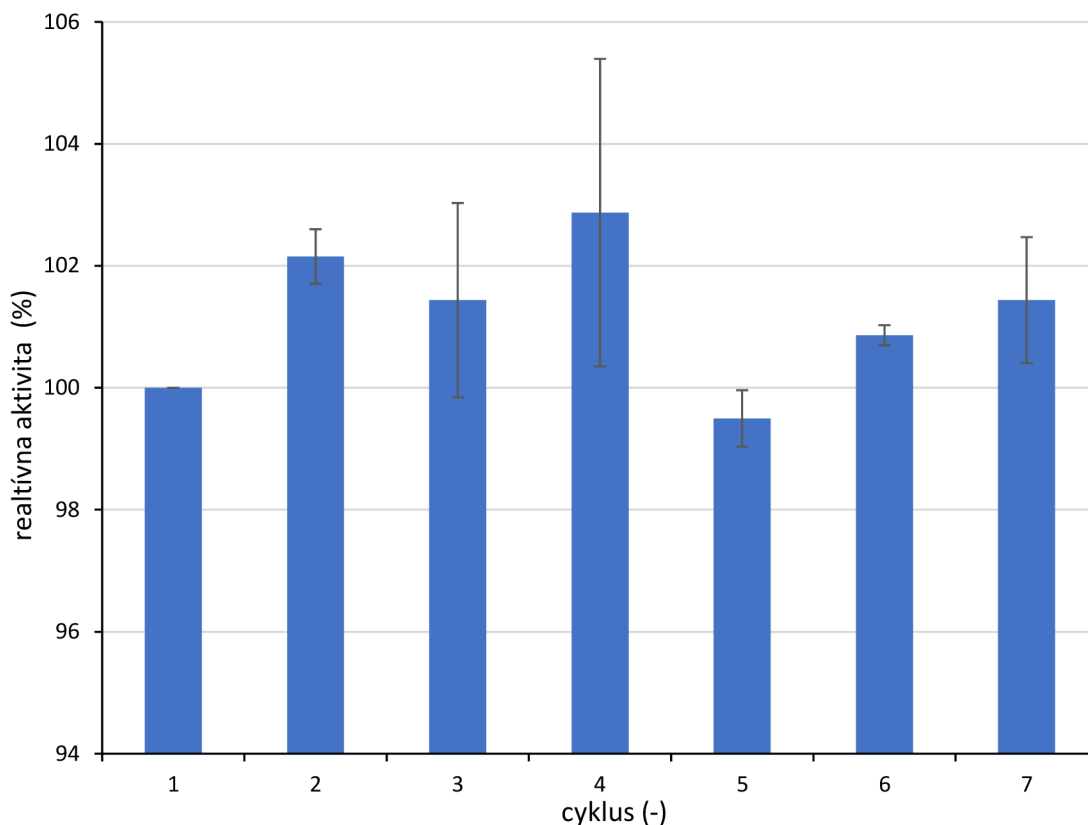
**Obr. 29** Operačná stabilita imobilizovanej lignín peroxidázy na bakteriálnej celulóze (100%-ná enzýmová aktivita znázornená v 1.cykle).

Relatívna enzýmová aktivita MnP v sledovaní operačnej stability vykazovala v prvých cykloch (2.–4.) značný nárast nad 150 % (vid'. *Obr.30*), pričom najvyššia relatívna aktivita bola zistená vo 4. cykle až 365 %. V tomto kroku možno predpokladať najlepšiu katalytickú aktiváciu enzýmu MnP. V 5.a 6. cykle nastal významný pokles aktivity na 50 a 63 %. V poslednom 7. cykle bol pozorovaný opäť ďalší nárast aktivity na 181 %. Pri pokusoch *Kalsoom a kol. (2022)* bola MnP imobilizovaná na nanočastice oxidu železitého a následne bola použitá na degradáciu farbív [102]. S postupným opätovným použitím imobilizovanej MnP bola viditeľná znižujúca sa účinnosť dekolORIZÁCIE použitých farbív až pod 10 % v záverečnom 7. cykle. Výsledky v grafe (*Obr.30*) nevyjadrujú jednoznačný znižujúci sa trend uvádzaný v štúdiách, čím sú v rozpore s predpokladom znižujúcej sa enzýmovej aktivity s počtom cyklov pri sledovaní operačnej stability ako je popísané vyššie v práci.



**Obr. 30** Operačná stabilita mangán-peroxidázy imobilizovanej na bakteriálnej celulóze (relatívna enzýmová aktivita v 1.cykle znázorňuje 100%).

Operačná stabilita imobilizovanej lakázy preukázala relatívne konštantnú účinnosť nad 100 % po celú dobu trvania cyklov (vid'. Obr. 31). Jediný významný pokles relatívnej aktivity bol pozorovaný v 5. cykle približne na 99 %. Naopak najvyššie aktivity približne 102 a 103 % boli zistené v 2. a 4. cykle experimentu. Ako je viditeľné z grafu (Obr.31), rozdiely medzi enzýmovými aktivitami v jednotlivých cykloch sú veľmi malé, čo značí vysokú operačnú stabilitu po celú dobu trvania experimentu. Porovnaním s experimentom *Frazaio a kol. (2014)*, ktorí taktiež imobilizovali Lac na lyofilizovaných kúskoch BC, bola dokázaná operačná stabilita nad 85 % po celú dobu trvania pokusu [54]. V štúdiu *Saravanakumar a kol. (2016)* pri imobilizácii čerstvej lakázy zistili zachovanie aktivity okolo 85 % až po 16 reakčných cykloch [103]. Sledovanie stability zapuzdrenej Lac v sol-gélovej matici *Lloretom a kol. (2011)* potvrdilo zvyškovú aktivitu 87 % po 7 operačných cykloch [104].



**Obr. 31** Operačná stabilita lakázy imobilizovanej na bakteriálnej celulóze (relatívna enzýmová aktivita počítaná z 1.cyklu), kde je enzýmová aktivita 100%-ná).

## 5.6. Výsledky modifikácie lignínu

K modifikácii lignínu boli pripravené imobilizované enzýmy podľa optimalizovaných podmienok CLEA metódou a metódou na BC spojenou s enzýmovými agregátmi (BC + CLEA). Roztok lignínu o koncentrácii 0,1 hm.% bol pripravený rozpustením alkalického lignínu v DMSO a 0,1 hm.% LiBr. Následne boli do 30 ml roztoku lignínu vložené rôzne koncentrácie imobilizovaných enzýmov. Modifikácia prebiehala po dobu 24 hod pri stálom miešaní na trepačke 200 rpm a teplote 30 °C.

### 5.6.1. Výsledky merania molekulovej hmotnosti

Molekulová hmotnosť modifikovaného lignínu bola meraná z dôvodu potvrdenia modifikácie účinkom imobilizovaných enzýmov pomocou metód CLEA a enzýmových agregátov inkorporovaných v póroch BC. Ako referenčná vzorka bol použitý roztok lignínu v koncentrácii 1 g/l v DMSO a 0,1 % LiBr. Meranie prebiehalo metódou SEC–MALS–dRI.

Výsledky merania molekulovej hmotnosti (Mw) a indexu polydisperzity (PI) sú zhrnuté v Tab.18. U všetkých vzoriek boli tieto hodnoty vypočítané ako priemerné hodnoty z 2 paralelných meraní. Zmena molekulovej hmotnosti oproti referencii je ukazovateľom úspešnej modifikácie lignínovej štruktúry. Jej zmena značí rozklad lignínu pomocou použitia enzymatických preparátov získaných imobilizáciou na BC alebo CLEA metódou. Okrem molekulárnej hmotnosti bol meraný aj index polydisperzity (PI), ktorý je mierou heterogenity vzorky [106]. Podľa ustanovení Medzinárodnej organizácie pre normalizáciu (ISO) sú hodnoty  $PI < 0,05$  charakteristické pre monodisperzné vzorky a hodnoty  $PI > 0,7$  pre polydisperzné vzorky.



**Tab. 18** Výsledky molekulovej hmotnosti a polydisperzity v ligníne modifikovanom imobilizovanými enzýmami (R... referenčná vzorka nemodifikovaného lignínu; C1... CLEA imobilizát v množstve 1 mg; C1,5... CLEA imobilizát v množstve 1,5 mg; C2,5... CLEA imobilizáty v množstve 2,5 mg; 3BC... 3 krúžky BC; 6BC... 6 krúžkov BC; 3BC\_D... 3 krúžky dezintegrovanaj BC).

Vzorka	Molekulová hmotnosť (kDa)	Index polydisperzity (-)
R	17,74 ± 0,06	3,03 ± 0,73
C1	12,19 ± 0,25	2,10 ± 0,08
C1,5	16,45 ± 0,42	2,32 ± 0,48
C2,5	29,78 ± 0,52	2,16 ± 0,08
3BC	10,11 ± 0,30	1,35 ± 0,24
6BC	9,19 ± 0,35	1,12 ± 0,03
3BC_D	8,75 ± 0,32	1,20 ± 0,07

Molekulová hmotnosť lignínu modifikovaného metódou CLEA (C1; C1,5 a C2,5) by podľa predpokladu mala vykazovať nižšie hodnoty ako referencia. Tento predpoklad bol potvrdený u 2 vzoriek: C1 a C1,5. Prídavok imobilizátu CLEA v množstve 1 mg úspešne modifikovalo lignín, ktorého molekulová hmotnosť bola stanovená na približne na 12 kDa. Imobilizát v množstve 1,5 mg modifikoval lignín na molekulovú hmotnosť približne 16 kDa. Lignín modifikovaný 2,5 mg imobilizátu CLEA vykazoval najvyššiu molekulovú hmotnosť približne 30 kDa. Táto hodnota je vyššia ako hodnota referencie, preto možno považovať v tomto prípade modifikáciu za neúspešnú. Na základe rôzneho množstva prídavkov imobilizátu sa očakávala aj iná účinnosť enzýmov; so zvyšujúcim sa množstvom enzýmov by sa mala zvyšovať účinnosť procesu modifikácie a tým aj klesať molekulárna hmotnosť modifikovaného lignínu. Tento domnienka však bola počas merania vyvrátená a najlepšie účinkovali imobilizované enzýmy v množstve 1 mg.

Pri modifikácii lignínu enzýmami imobilizovanými v BC bola u všetkých vzoriek potvrdená úspešnosť experimentu nameraním nižšej molekulovej hmotnosti ako u referencie. Pri použití 3 krúžkov imobilizátu bola molekulová hmotnosť približne 10 kDa. Modifikácia 6 krúžkami BC s imobilizovanými enzýmami bola opäť o niečo nižšia a to približne 9 kDa. Najnižšia molekulová hmotnosť bola stanovená u modifikácie s použitím 3 dezintegrovaných krúžkov BC, približne 9kDa. Trend zvyšujúcej sa účinnosti a zároveň klesajúcej molekulárnej hmotnosti modifikovaného lignínu bol potvrdený pri porovnaní výsledkov 3 krúžkov a 6 krúžkov BC. O niečo vyššia účinnosť, resp. nižšia molekulová hmotnosť, bola pozorovaná u dezintegrovaných krúžkov BC, aj napriek tomu, že boli použité len 3. K zvýšenej modifikácii lignínu prispelo predupravenie krúžkov BC dezintegráciou po imobilizácii enzýmov. To umožnilo lepšiu difúziu enzýmov z pórov BC do roztoku lignínu, a tým lepší prístup k modifikovanej molekule.

Index polydisperzity sa používa ako miera šírky distribúcie molekulovej hmotnosti [107]. Čím väčší je PI, tým väčšia je molekulová hmotnosť. Všetky hodnoty PI stanovené pri meraní molekulovej hmotnosti v *Tab.18* sú podľa ISO noriem charakteristické pre polydisperzné vzorky. Najvyššiu polydisperzitu, teda distribúciu molekulových hmotností, vykazovala referencia, približne hodnotu 3. U hodnôt PI meraných vzoriek bol pozorovaný podobný trend ako u Mw. U sady enzýmov imobilizovaných metódou CLEA bola najnižšia polydisperzita

(2,10) stanovená pre vzorku s 1mg imobilizátu (C1), čo znamená, že táto vzorka je z danej sady najviac homogénna. Najvyššiu polydisperzitu (2,32) vykazovala vzorka C1,5, kde bola navážka imobilizátu 1,5 mg. Pri ďalšom zvýšení prídavku imobilizátu na 2,5 mg (C2,5) bol pozorovaný pokles polydisperzity (2,16), avšak nie až na hodnotu ako u C1 vzorky. U imobilizátov na BC bola najnižšia polydisperzita (1,12) pozorovaná u vzorky 6BC, kde bolo použitých 6 krúžkov imobilizovaných enzýmov. Z toho možno usúdiť, že tento imobilizát dokázal modifikovať lignín do najviac homogénnej vzorky. Najviac heterogénna sa ukázala vzorka 3BC, kde bola nameraná polydisperzita 1,35. U vzorky s dezintegrovanou BC sa očakávalo podľa trendu sledovaného u Mw ďalšie zníženie polydisperzity, ktoré však nebolo potvrdené. Naopak, hodnota PI sa oproti vzorke 6BC ešte mierne zvýšila na hodnotu 1,20.

### 5.6.2. Výsledky merania FTIR

Meranie FTIR bolo vykonané z dôvodu zistenia, či pri modifikácii lignínu získanými enzýmami skutočne došlo k zmene jeho štruktúry. Vzorky modifikovaného lignínu boli merané vo forme tablet KBr (viď. Obr.32). Do každej tablety bolo navážených približne 5 mg lignínu, získaného po modifikácii imobilizovanými ligninolytickými enzýmami a následným vysušením.

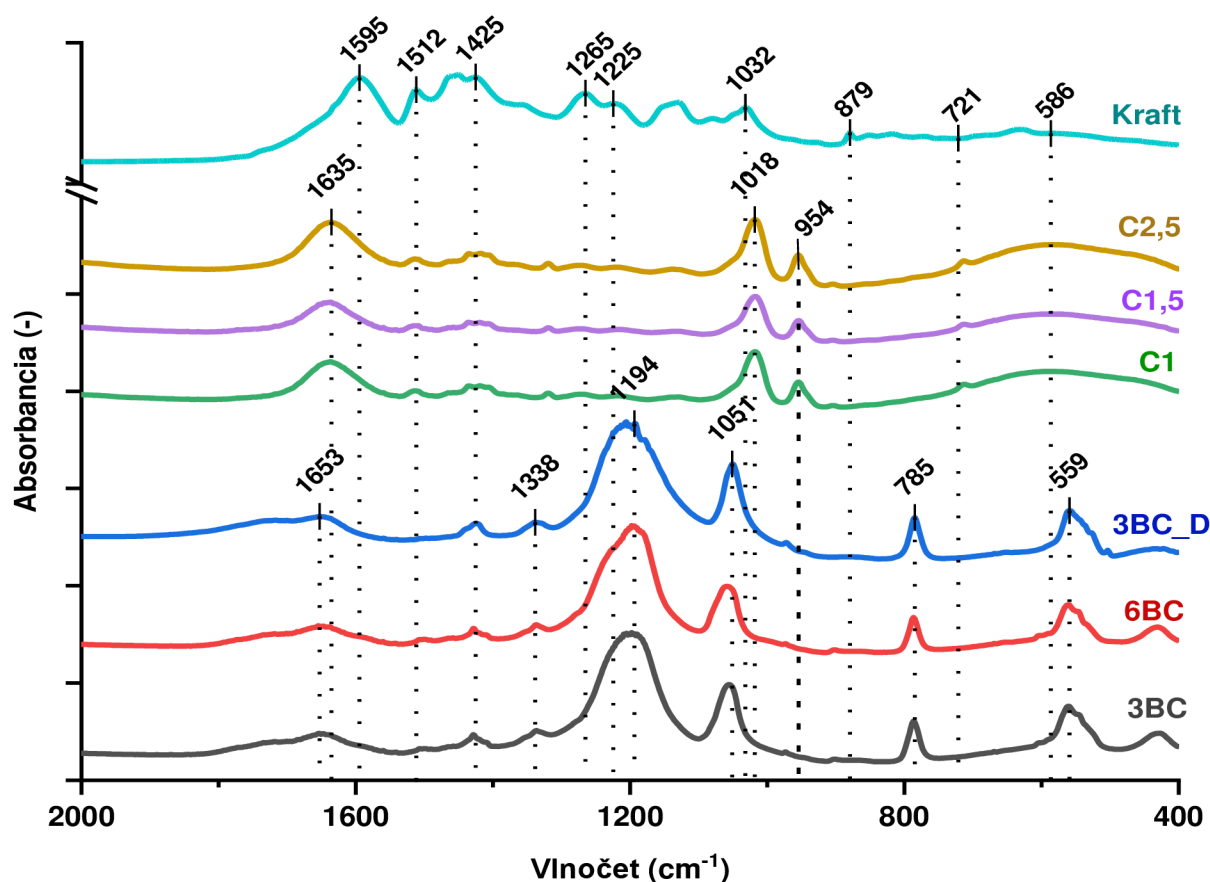


**Obr. 32** Tableta modifikovaného lignínu pre meranie FTIR (1... 1 mg CLEA imobilizátu; 2... 1,5 mg CLEA imobilizátu; 3... 2,5 CLEA imobilizátu; 4... 3 krúžky imobilizátu BC; 5... 6 krúžkov imobilizátu BC; 6... 3 krúžky dezintegrovaného imobilizátu BC).

Spektrá získané meraním vzoriek modifikovaných lignínov a referenčnej vzorky kraft lignínu sú zobrazené na Obr.33. Jednotlivé spektrá sú pomenované skratkami podľa použitých imobilizačných techník a množstva použitého enzýmu podľa Tab.14. Podľa údajov z literatúry boli k absorpčným pásom v spektre priradené charakteristické funkčné skupiny. Vzorky vykazovali absorpčné pásmo v oblasti  $3000\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$ , ktoré sú charakteristické pre valenčné vibrácie hydroxylových skupín v aromatických a alifatických štruktúrach [108; 111]. Nakoľko sa tieto pásma nachádzali u všetkých meraných vzoriek ako aj u referenčnej vzorky lignínu, bol tento vlnočet zanedbaný. Dôležité zmeny v štruktúre lignínu boli viditeľné v oblasti  $400\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$ . Podľa nameraných absorpčných spektier zobrazených v grafe (Obr. 33) je viditeľné, že spektrá vzoriek modifikovaného lignínu možno rozdeliť do 2 skupín podľa použitej imobilizačnej metódy enzýmov.

V spektre patriacemu referenčnej vzorke kraft lignínu bola nameraná absorbanca pri vlnových dĺžkach  $1595$ ,  $1512$  a  $1425\text{ cm}^{-1}$ , ktorá je priradovaná vibrácii aromatického kruhu fenypropánovej (C9) kostry [109–111]. U analyzovaných vzoriek po modifikácii je viditeľný mierny posun tohto maxima absorbanca do  $1635\text{ cm}^{-1}$  pre CLEA imobilizáty a  $1653\text{ cm}^{-1}$  pre imobilizáty na BC. U oboch sád bol pozorovaný aj pokles intenzity absorbanca, ktorý bol však výraznejší u bakteriálnej celulózy. Oproti referenčnej vzorke kraft lignínu došlo v hodnotách  $1512$  a  $1425\text{ cm}^{-1}$  k značnému zníženiu intenzity absorbanca u vzoriek CLEA imobilizátov (C1; C1,5 a C2,5). Pri enzýmoch imobilizovaných na BC (vzorky 3BC; 6BC a 3BC\_D) absorbanca v  $1512\text{ cm}^{-1}$  úplne vymizla. Vibrácie aromatických jadier možno pripísať aj vzorkám s BC, pričom aj v tomto prípade došlo k zníženiu intenzity absorbanca. Na druhej strane sa u týchto

vzoriek objavilo ďalšie absorpčné maximum v hodnote  $1338\text{ cm}^{-1}$ . K tomuto pásmu možno priradiť vibráciu methoxylovej skupiny.



*Obr. 33 FTIR spektrá lignínu modifikovaného imobilizovanými enzýmami.*

Kraft lignín ďalej vykazoval vibrácie pri  $1265$  a  $1225$ , ktoré sú typické pre C–O väzby karbonylov a pre vibrácie C–C, C–O a C=O valenčnej (stretching) väzby v aromatickom guajacylovom kruhu. Tieto absorpčné maximá u CLEA imobilizátov boli potlačené úplne alebo vykazujú posun maxima do hodnoty  $1018\text{ cm}^{-1}$ . Naopak u BC boli absorpčné maximá mierne posunuté bližšie k sebe do hodnôt  $1194$  a  $1051\text{ cm}^{-1}$ . Okrem toho možno absorbciu v  $1194\text{ cm}^{-1}$  interpretovať aj ako stretching fenolických a éterových väzieb. Absorpčné maximum v  $1032\text{ cm}^{-1}$  je typické pre vibrácie C–O alebo primárne alkoholy. U modifikácie CLEA agregátmi sa v spektrách objavilo ďalšie absorpčné maximum v  $954\text{ cm}^{-1}$ , ktoré charakterizuje karboxylovú skupinu. Absorpčné pásmo s maximom v  $879\text{ cm}^{-1}$  patrí mimo-rovinné deformačné vibračné väzby C–H aromatického kruhu. Absorpčné maximá v hodnotách vlnočtov  $721$  a  $586\text{ cm}^{-1}$  charakterizujú násobné väzby medzi uhlíkatými atómami (dvojnú a trojnú). V skupine lignínu modifikovaného imobilizátmi na BC je tento pík mierne posunutý k hodnote  $559\text{ cm}^{-1}$ . Oproti kraft lignínu a CLEA imobilizácii vykazuje značne zvýšenú hodnotu intenzity absorpcie. Ďalej sa v tejto sade zobrazilo absorpčné maximum v  $785\text{ cm}^{-1}$ , ktoré potvrdilo výskyt aromatických štruktúr v modifikovanom ligníne.

## 6. ZÁVER

Táto diplomová práca bola zameraná na produkciu ligninolytických enzýmov MnP, Lac a LiP pomocou plesne *P.chrysosporium* a následnou imobilizáciou týchto enzýmov. V rámci optimalizácie kultivačných podmienok bol sledovaný vplyv rôznej koncentrácie uhlíkatého zdroja a induktorov na produkciu extracelulárnych ligninolytických enzýmov v kultivačnom médiu. Ako uhlíkatý substrát bola vybraná glukóza v koncentráciách 1 g/l a 2 g/l. Ako induktory boli sledované lignín a guaiacol, vybrané podľa predchádzajúcich štúdií, v koncentráciách 0,5 g/l, 1 g/l a 3 g/l pre lignín a 0,02% a 1 % pre guaiacol. Kultivácia prebiehala po dobu 14 dní v 50 ml kultivačného média, pričom bola každý deň sledovaná enzýmová aktivita LiP, MnP a Lac v médiu. V tomto bode sa ako najvýhodnejší synergický efekt ukázal medzi glukózou v koncentrácii 1 g/l a lignínom v koncentrácii 3 g/l. Lignín v tejto koncentrácii preukázal najvyšší vplyv na produkciu enzýmov, ktorý bol najviac pozorovaný v prvých dňoch kultivácie. Guaiacol preukázal významnejší vplyv len na produkciu lakázy až v posledných dňoch kultivácie.

Po optimalizovaní produkčných podmienok boli enzýmy ko-imobilizované niekoľkými metódami: CLEA, adsorpciou na BC a spojením oboch metód, tzn. tvorbou enzýmových agregátov inkorporovaných do pórov BC. Samotná adsorpcia enzýmov na BC nebola veľmi účinná a enzýmy sa podarilo imobilizovať len na 11–13 %. O niečo vyššiu účinnosť preukázalo spojenie BC s CLEA imobilizáciou pre MnP 13,4 a Lac 27,3 %. Nižšia účinnosť bola nameraná pri imobilizácii LiP, kde jej hodnota klesla na 8,1 %. Najviac účinnou sa v experimente preukázala CLEA imobilizácia, ktorá pozostávala z 2 krokov: precipitácie enzýmov pri vhodnom pH síranom amónnym a následným sieťovaním pomocou GA. Pri optimalizovaní precipitácie boli sledované pH v rozmedzí 5–7, pričom ako najvhodnejšia bola vybraná hodnota 6,0. Sledovanie rôznych koncentrácií síranu amónneho (65, 70 a 75 hm.%) preukázalo najlepšiu precipitáciu pri 75 hm.%. Nakoľko boli optimálne podmienky precipitácie pre každý enzým iné, vhodné pH a množstvo síranu boli vybrané podľa enzýmu, ktorý dosahoval najvyššiu enzýmovú aktivitu. V rámci optimalizácie množstva GA, boli skúmané taktiež 3 koncentrácie: 10 mM, 50 mM a 100 mM. Tu sa pre všetky tri enzýmy ukázala ako najvhodnejšia koncentrácia 50 mM. Optimalizované podmienky boli zároveň použité aj pri imobilizácii BC + CLEA.

Ďalším krokom bolo overiť operačnú stabilitu imobilizovaných enzýmov, pričom z dôvodu ľahšej manipulácie bol tento krok prevedený len s metódou BC + CLEA. Operačná stabilita bola sledovaná v 7. po sebe nasledujúcich cykloch odbúravania substrátu použitých pri meraní enzýmových aktivít. U LiP bola pozorovaná relatívne stabilná účinnosť po celú dobu 7. cyklov, pričom relatívna enzýmová aktivita nikdy neklesla pod 87 %. Operačná stabilita MnP vykazovala značné rozdiely relatívnych aktivít v jednotlivých cykloch merania. Najvyššej aktivity dosiahla MnP vo 4. cykle, až 356 %. Operačná stabilita Lac vykazovala viac ako 100%-nú relatívnu aktivitu takmer vo všetkých cykloch, pričom však nikdy neklesla pod 99 %. Z týchto meraní vyplynulo, že aj lakáza a lignín-peroxidáza vykazovali kontinuálne vysoké relatívne enzýmové aktivity po celú dobu trvania experimentu.

V poslednom bode boli imobilizované enzýmy použité na modifikáciu lignínu, pripraveného vo forme roztoku o koncentrácii 0,1 hm.% v DMSO pre HPLC s 0,1 hm.% LiBr. Po 24hod inkubácii lignínu s imobilizovanými enzýmami v rôznych koncentráciách a rôznych formách boli zmerané molekulárne hmotnosti (Mw) a index polydisperzity (PI) metódou SEC–MALS–dRI. Okrem jednej vzorky (C2,5), boli u všetkých imobilizátov potvrdené úspešné modifikácie lignínovej štruktúry znížením jeho molekulovej hmotnosti ako aj znížením polydisperzity.

Z toho možno usúdiť, že enzýmy úspešne depolymerizovali lignín a zvýšili jeho homogenitu. Zmeny v štruktúre boli analyzované aj metódou FTIR, kde spektrá modifikovaných lignínov vykazovali mierne odchýlky od nemodifikovaného alkalického lignínu.

## 8. ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] BURSOVÁ, Š, L NECIDOVÁ a M DUŠKOVÁ. Mikrobiologie potravin a mikrobiologické laboratorní metody. Obecná mikrobiologie. 1. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014. ISBN 978-80-7305-742-8.
- [2] VOTAVA, Miroslav. Lékařská mikrobiologie speciální. Brno: Neptun, 2003. ISBN 80-902-8966-5.
- [3] VESELÁ, Mária a Milan DRDÁK. Praktikum z obecné mikrobiologie. 2. vyd. přeprac. Brno: VUTIUM, 1999. ISBN 80-214-1305-0.
- [4] ROSYPAL, Stanislav. Přehled biologie. 3. upr. vyd., v nakl. Scientia 2. vyd. Praha: Scientia, 1998. ISBN 80-718-3110-7.
- [5] FASSATIOVÁ, Olga. Plísňe a vláknité houby v technické mikrobiologii: (příručka k určování). Praha: SNTL, 1979. Řada potravinářské literatury.
- [6] ZALEŠ, F. a J. GABRIEL. Vybrané aktuálně používané chemické přípravky proti dřevokazným houbám a mechanismus jejich účinku. Chemické listy. 2021, 115(2), 91-98. ISSN 0009-2770.
- [7] The genome portal of the Department of Energy joint Genome Institute. In: The genome portal of the Department of Energy joint Genome Institute [online]. Nucleic Acids Res., 2014 [cit. 2022-08-07]. Dostupné z: [https://mycocosm.jgi.doe.gov/Phchr3\\_2/Phchr3\\_2.home.html](https://mycocosm.jgi.doe.gov/Phchr3_2/Phchr3_2.home.html)
- [8] KHALIL, Hassan, Estelle LEGIN, Bernard KUREK, Patrick PERRE a Behnam TAIDI. Morphological growth pattern of *Phanerochaete chrysosporium* cultivated on different *Miscanthus x giganteus* biomass fractions. BMC Microbiology. 2021, 21(1), 105-110. ISSN 1471-2180. Dostupné z: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-021-02350-8> doi:10.1186/s12866-021-02350-8
- [9] KOPECKÁ, Jana a Gabriela ROTKOVÁ. Skripta ke cvičení z obecné mikrobiologie, cytologie a morfologie bakterií [online]. 1.vydání. Brno: Masarykova univerzita, 2017 [cit. 2022-08-19]. ISBN 978-80-210-8787-3, 978-80-210-8788-0. Dostupné z: <http://is.muni.cz/elportal/?id=1383503>
- [10] WINQUIST, Erika, Ulla MOILANEN, Aila METTÄLÄ, Matti LEISOLA a Annele HATAKKA. Production of lignin modifying enzymes on industrial waste material by solid-state cultivation of fungi. Biochemical Engineering Journal. 2008, 42(2), 128-132. ISSN 1369703X. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1369703X08002106> doi:10.1016/j.bej.2008.06.006
- [11] TIEN, Ming a T.Kent KIRK. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. Biomass Part B: Lignin, Pectin, and Chitin. Elsevier, 1988, 238-249. Methods in Enzymology. ISBN 9780121820626. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0076687988610251> doi:10.1016/0076-6879(88)61025-1
- [12] OCHI, K. *Streptomyces relC* mutants with an altered ribosomal protein ST-L11 and genetic analysis of a *Streptomyces griseus relC* mutant. Journal of Bacteriology. 1990, 172(7), 4008-4016. ISSN 0021-9193. Dostupné z: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jb.172.7.4008-4016.1990> doi:10.1128/jb.172.7.4008-4016.1990
- [13] LEISOLA, M S, B KOZULIC, F MEUSSDOERFFER a A FIECHTER. Homology among multiple extracellular peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*.

- Journal of Biological Chemistry. 1987, 262(1), 419-424. ISSN 00219258. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925819759432> doi:10.1016/S0021-9258(19)75943-2
- [14] SINGH, Deepak, Shulin CHEN, Dayanand C. KALYANI, J. Dalgaard MIKKELSEN a Anne S. MEYER. The white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: conditions for the production of lignin-degrading enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008, **81**(3), 399-417. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-008-1706-9> doi:10.1007/s00253-008-1706-9
- [15] ARGYROPOULOS, D. a S. MENACHEM. Lignin. *Biopolymers from Renewable Resources*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1998, 292-322. ISBN 978-3-642-08341-9. Dostupné z: <https://link.springer.com/chapter/10.1007/BFb0102073> doi:10.1007/978-3-662-03680-8\_12
- [16] MONGKHONSIRI, Ghochapon, Pongtorn CHAROENSUPPANIMIT, Amata ANANTPINIJWATNA, Rafiqul GANI a Suttichai ASSABUMRUNGRAT. Process development of sustainable biorefinery system integrated into the existing pulping process. *Journal of Cleaner Production*. 2020, 255. ISSN 09596526. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0959652620303255> doi:10.1016/j.jclepro.2020.120278
- [17] DAVIS, Kirsten, Marjorie ROVER, Robert BROWN, Xianglan BAI, Zhiyou WEN a Laura JARBOE. Recovery and Utilization of Lignin Monomers as Part of the Biorefinery Approach. *Energies*. 2016, 9(10). ISSN 1996-1073. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/1996-1073/9/10/808> doi:10.3390/en9100808
- [18] STERNBERG, James, Olivia SEQUERTH a Srikanth PILLA. Green chemistry design in polymers derived from lignin: review and perspective. *Progress in Polymer Science*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2021, 113, 292-322. ISBN 978-3-642-08341-9. ISSN 00796700. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079670020301374?via%3Dihub> doi:10.1016/j.progpolymsci.2020.101344
- [19] CHIO, Chonlong, Mohini SAIN a Wensheng QIN. Lignin utilization: A review of lignin depolymerization from various aspects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2019, 107, 232-249. ISSN 13640321. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S136403211930142X> doi:10.1016/j.rser.2019.03.008
- [20] HATFIELD, Ronald a Wilfred VERMERRIS. Lignin Formation in Plants. The Dilemma of Linkage Specificity. *Plant Physiology*. 2001, 126(4), 1351-1357. ISSN 1532-2548. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/11843451\\_Lignin\\_Formation\\_in\\_Plants\\_The\\_Dilemma\\_of\\_Linkage\\_Specificity](https://www.researchgate.net/publication/11843451_Lignin_Formation_in_Plants_The_Dilemma_of_Linkage_Specificity) doi:10.1104/pp.126.4.1351
- [21] LAURICHESSE, Stéphanie a Luc AVÉROUS. Chemical modification of lignins: Towards biobased polymers. *Progress in Polymer Science*. 2014, **39**(7), 1266-1290. ISSN 00796700. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079670013001421> doi:10.1016/j.progpolymsci.2013.11.004
- [22] RADHIKA, N.L., Sarita SACHDEVA a Manoj KUMAR. Lignin depolymerization and biotransformation to industrially important chemicals/biofuels. *Fuel*. 2022, 312. ISSN 00162361. Dostupné z:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0016236121027964>  
doi:10.1016/j.fuel.2021.122935

- [23] IRVINE, G.M. The glass transition of lignin and hemicellulose and their measurement by differential thermal analysis. *Trappi*. 1984, (67), 118-121.
- [24] NORGRÉN, Magnus a Håkan EDLUND. Lignin: Recent advances and emerging applications. 2014, 19(5), 409-416. ISSN 13590294. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1359029414000867>  
doi:10.1016/j.cocis.2014.08.004
- [25] THAKUR, Vijay Kumar a Manju Kumari THAKUR. Recent advances in green hydrogels from lignin: a review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2015, 72, 834-847. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141813014006461>doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.09.044
- [26] RÉTI, C., M. CASETTA, S. DUQUESNE, S. BOURBIGOT a R. DELOBEL. Flammability properties of intumescent PLA including starch and lignin. *Polymers for Advanced Technologies*. 2008, 19(6), 628-635. ISSN 10427147. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pat.1130> doi:10.1002/pat.1130
- [27] TOH, Kazuko, Satoshi NAKANO, Hidekatsu YOKOYAMA, Kenichi EBE, Kiichi GOTOH a Hiroyuki NODA. Anti-deterioration Effect of Lignin as an Ultraviolet Absorbent in Polypropylene and Polyethylene: Towards biobased polymers. *Polymer Journal*. 2005, 37(8), 633-635. ISSN 0032-3896. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/pj200589> doi:10.1295/polymj.37.633
- [28] DOHERTY, William O.S., Payam MOUSAVIOUN a Christopher M. FELLOWS. Value-adding to cellulosic ethanol: Lignin polymers. *Industrial Crops and Products*. 2011, 33(2), 259-276. ISSN 09266690. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669010002670>  
doi:10.1016/j.indcrop.2010.10.022
- [29] OKEKE, Emmanuel Sunday, Arinze Linus EZUGWU, Emeka Godwin ANADUAKA, Mida Habila MAYEL, Tobechukwu Christian EZIKE a Emmanuel Chekwube OSSAI. Ligninolytic and cellulolytic enzymes — biocatalysts for green agenda. *Biomass Conversion and Biorefinery*. ISSN 2190-6815. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9864444/> doi:10.1007/s13399-022-02777-7
- [30] ISROI, Ria MILLATI, Siti SYAMSIAH, Claes NIKLASSON, Muhammad Nur CAHYANTO, Knut LUNDQUIST a Mohammad J. TAHERZADEH. Biological pretreatment of lignocelluloses with white-rot fungi and its applications: A review. *BioResources*. 2011, 6(4), 5224-5259. ISSN 19302126. Dostupné z: [https://bioresources.cnr.ncsu.edu/BioRes\\_06/BioRes\\_06\\_4\\_5224\\_Isroi\\_MSNCCLT\\_Biolog\\_Pretreat\\_Ligno\\_WRF\\_Review\\_1754.pdf](https://bioresources.cnr.ncsu.edu/BioRes_06/BioRes_06_4_5224_Isroi_MSNCCLT_Biolog_Pretreat_Ligno_WRF_Review_1754.pdf) doi:10.15376/biores.6.4.Isroi
- [31] LOPES, A.M., E.X. FERREIRA FILHO a L.R.S. MOREIRA. An update on enzymatic cocktails for lignocellulose breakdown. *Journal of Applied Microbiology*. 2018, 125(3), 632-645. ISSN 13645072. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jam.13923> doi:10.1111/jam.13923
- [32] ASINA, FNU, Ivana BRZONOVA, Evguenii KOZLIAK, Alena KUBÁTOVÁ a Yun JI. Microbial treatment of industrial lignin: Successes, problems and challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2017, 77, 1179-1205. ISSN 13640321. Dostupné z:



<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1364032117304343>  
doi:10.1016/j.rser.2017.03.098

- [33] FALADE, Ayodeji O., Uchechukwu U. NWODO, Benson C. IWERIEBOR, Ezekiel GREEN, Leonard V. MABINYA a Anthony I. OKOH. Lignin peroxidase functionalities and prospective applications. *MicrobiologyOpen*. 2017, 6(1). ISSN 20458827. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/mbo3.394> doi:10.1002/mbo3.394
- [34] ABDEL-HAMID, Ahmed M., Jose O. SOLBIATI a Isaac K.O. CANN. Insights into Lignin Degradation and its Potential Industrial Applications. Elsevier, 2013, 1-28. *Advances in Applied Microbiology*. ISBN 9780124076792. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780124076792000016> doi:10.1016/B978-0-12-407679-2.00001-6
- [35] CHOWDHARY, Pankaj, Gargi SHUKLA, Garima RAJ, Luiz Fernando Romanholo FERREIRA a Ram Naresh BHARAGAVA. Microbial manganese peroxidase: a ligninolytic enzyme and its ample opportunities in research. *SN Applied Sciences*. 2019, 1(1). ISSN 2523-3963. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s42452-018-0046-3> doi:10.1007/s42452-018-0046-3
- [36] BILAL, Muhammad, Muhammad ASGHER, Hafiz M.N. IQBAL, Hongbo HU, Wei WANG a Xuehong ZHANG. Bio-catalytic performance and dye-based industrial pollutants degradation potential of agarose-immobilized MnP using a Packed Bed Reactor System. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017, 102, 582-590. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28431941/> doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.04.065
- [37] BARBOSA, E., D. PERRONE, A. AMARAL VENDRAMINI a S. FERREIRA LEITE. Vanillin production by *Phanerochaete chrysosporium* grown on green coconut agroindustrial husk in solid state fermentation. *BioResources*. 2008, 3(4), 1042-1050. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/26543486\\_Vanillin\\_production\\_by\\_Phanerochaete\\_chrysosporium\\_grown\\_on\\_green\\_coconut\\_agroindustrial\\_husk\\_in\\_solid\\_state\\_fermentation](https://www.researchgate.net/publication/26543486_Vanillin_production_by_Phanerochaete_chrysosporium_grown_on_green_coconut_agroindustrial_husk_in_solid_state_fermentation) doi:10.15376/biores.3.4.1042-1050
- [38] BRUGNARI, Tatiane, Dayane Moreira BRAGA, Camila Souza Almeida DOS SANTOS, Bruno Henrique Czelusniak TORRES, Tatiani Andressa MODKOVSKI, Charles Windson Isidoro HAMINIUK a Giselle Maria MACIEL. Laccases as green and versatile biocatalysts: from lab to enzyme market—an overview. *Bioresources and Bioprocessing*. 2021, 8(1). ISSN 2197-4365. Dostupné z: <https://bioresourcesbioprocessing.springeropen.com/articles/10.1186/s40643-021-00484-1> doi:10.1186/s40643-021-00484-1
- [39] [online]. In: . [cit. 2022-09-28]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/figure/General-reaction-mechanism-of-laccases-Four-monoelectronic-oxidations-are-catalyzed-from\\_fig1\\_232659844](https://www.researchgate.net/figure/General-reaction-mechanism-of-laccases-Four-monoelectronic-oxidations-are-catalyzed-from_fig1_232659844)
- [40] RODRÍGUEZ COUTO, Susana a José Luis TOCA HERRERA. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnology Advances*. 2006, 24(5), 500-513. ISSN 07349750. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0734975006000619> doi:10.1016/j.biotechadv.2006.04.003
- [41] ASGHER, Muhammad, Muhammad SHAHID, Shagufta KAMAL a Hafiz Muhammad Nasir IQBAL. Recent trends and valorization of immobilization

- strategies and ligninolytic enzymes by industrial biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2014, 101, 56-66. ISSN 13811177. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1381117713003755>  
doi:10.1016/j.molcatb.2013.12.016
- [42] HAKALA, Terhi K., Taina LUNDELL, Sari GALKIN, Pekka MAIJALA, Nisse KALKKINEN a Annele HATAKKA. Manganese peroxidases, laccases and oxalic acid from the selective white-rot fungus *Physisporinus rivulosus* grown on spruce wood chips. *Enzyme and Microbial Technology*. 2005, 36(4), 461-468. ISSN 01410229. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S014102290400328X>  
doi:10.1016/j.enzmictec.2004.10.004
- [43] ENOKI, M. Extracellular lipid peroxidation of selective white-rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispora*. *FEMS Microbiology Letters*. 180(2), 205-211. ISSN 03781097. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsle/article/180/2/205/526612>  
doi:10.1016/S0378-1097(99)00487-5
- [44] MAZUMDER, S., S. BOSE, A. BANDOPADHYAY, S. ALAM a M. MUKHERJEE. Study of laccase production by *Pleurotus ostreatus* in a 5 l bioreactor and application of the enzyme to determine the antioxidant concentration of human plasma. *Letters in Applied Microbiology*. 2008, 47(4), 355-360. ISSN 02668254. Dostupné z: <https://ami-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1472-765X.2008.02418.x>  
doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02418.x
- [45] Ó'FÁGÁIN, Ciarán. Enzyme stabilization—recent experimental progress. *Enzyme and Microbial Technology*. 2003, 33(2-3), 137-149. ISSN 01410229. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141022903001601>  
doi:10.1016/S0141-0229(03)00160-1
- [46] JANEČEK, Štefan. Strategies for obtaining stable enzymes. *Process Biochemistry*. 1993, 28(7), 435-445. ISSN 13595113. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/003295929385026C>  
doi:10.1016/0032-9592(93)85026-C
- [47] Protein structure. In: *BioNinja* [online]. [cit. 2022-11-14].
- [48] BILAL, Muhammad, Hafiz M.N. IQBAL, Shuqi GUO, Hongbo HU, Wei WANG a Xuehong ZHANG. State-of-the-art protein engineering approaches using biological macromolecules: A review from immobilization to implementation view point. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018, 108, 893-901. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29102791/>  
doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.10.182
- [49] BILAL, Muhammad, Muhammad ASGHER, Roberto PARRA-SALDIVAR, Hongbo HU, Wei WANG, Xuehong ZHANG a Hafiz M.N. IQBAL. Immobilized ligninolytic enzymes: An innovative and environmental responsive technology to tackle dye-based industrial pollutants – A review. *Science of The Total Environment*. 2017, 576, 646-659. ISSN 00489697. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27810752/>  
doi:10.1016/j.scitotenv.2016.10.137
- [50] SHELDON, R.A. Cross-linked enzyme aggregates (CLEA@s): stable and recyclable biocatalysts. *Biochemical Society Transactions*. 2007, 35(6), 1583-1587. ISSN 0300-5127. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18031271/>  
doi:10.1042/BST0351583
- [51] BRENA, Beatriz, Paula GONZÁLEZ-POMBO a Francisco BATISTA-VIERA. Immobilization of Enzymes: A Literature Survey. *Immobilization of Enzymes and*

- Cells. Totowa, NJ: Humana Press, 2013, 15-31. *Methods in Molecular Biology*. ISBN 978-1-62703-549-1. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23934795/>  
doi:10.1007/978-1-62703-550-7\_2
- [52] CHIOU, Shao-Hua a Wen-Teng WU. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. *Biomaterials*. 2004, 25(2), 197-204. ISSN 01429612. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14585707/>  
doi:10.1016/S0142-9612(03)00482-4
- [53] SCOTT, Charles D. Immobilized cells: a review of recent literature. *Enzyme and Microbial Technology*. 1987, 9(2), 66-72. ISSN 01410229. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0141022987901451>  
doi:10.1016/0141-0229(87)90145-1
- [54] FRAZÃO, Cláudio J. R., Nuno H. C. SILVA, Carmen S. R. FREIRE, Armando J. D. SILVESTRE, Ana M. R. B. XAVIER a Ana P. M. TAVARES. Bacterial cellulose as carrier for immobilization of laccase: Optimization and characterization. *Engineering in Life Sciences*. 2014, 14(5), 500-508. ISSN 16180240. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/elsc.201400054>  
doi:10.1002/elsc.201400054
- [55] TANG, Kuok Ho Daniel, Serene Sow Mun LOCK, Pow-Seng YAP et al. Immobilized enzyme/microorganism complexes for degradation of microplastics: A review of recent advances, feasibility and future prospects. *Science of The Total Environment*. 2022, 832. ISSN 00489697. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0048969722019611>  
doi:10.1016/j.scitotenv.2022.154868
- [56] SCOUTEN, W, J LUONG a R STEPHENBROWN. Enzyme or protein immobilization techniques for applications in biosensor design. *Trends in Biotechnology*. 1995, 13(5), 178-185. ISSN 01677799. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167779900889350#!>  
doi:10.1016/S0167-7799(00)88935-0
- [57] LAHIRI, Dibyajit, Moupriya NAG, Bandita DUTTA et al. Bacterial Cellulose: Production, Characterization, and Application as Antimicrobial Agent. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, 22(23). ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/23/12984> doi:10.3390/ijms222312984
- [58] WU, Sheng-Chi a Ying-Ke LIA. Application of bacterial cellulose pellets in enzyme immobilization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2008, 54(3-4), 103-108. ISSN 13811177. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1381117708000052>  
doi:10.1016/j.molcatb.2007.12.021
- [59] BLANCO-LLAMERO, Cristina, Paz GARCÍA-GARCÍA a Francisco Javier SEÑORÁNS. Cross-Linked Enzyme Aggregates and Their Application in Enzymatic Pretreatment of Microalgae: Comparison Between CLEAs and Combi-CLEAs. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2021, 9. ISSN 2296-4185. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34957082/>  
doi:10.3389/fbioe.2021.794672
- [60] VOBĚRKOVÁ, Stanislava, Veronika SOLČÁNY, Martina VRŠANSKÁ a Vojtěch ADAM. Immobilization of ligninolytic enzymes from white-rot fungi in cross-linked aggregates. *Chemosphere*. 2018, 202, 694-707. ISSN 00456535. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0045653518305058>  
doi:10.1016/j.chemosphere.2018.03.088

- [61] CAO, Linqiu, Luuk van LANGEN a Roger A SHELDON. Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free?. *Current Opinion in Biotechnology*. 2003, 14(4), 387-394. ISSN 09581669. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12943847/> doi:10.1016/S0958-1669(03)00096-X
- [62] KUWAHARA, Masaaki, Jeffrey K. GLENN, Meredith A. MORGAN a Michael H. GOLD. Separation and characterization of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters*. 1984, 169(2), 247-250. ISSN 00145793. Dostupné z: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1016/0014-5793%2884%2980327-0> doi:10.1016/0014-5793(84)80327-0
- [63] ELISASHVILI, Vladimir, Eva KACHLISHVILI a Michel PENNINGCKX. Effect of growth substrate, method of fermentation, and nitrogen source on lignocellulose-degrading enzymes production by white-rot basidiomycetes. 2008, 35(11), 1531-1538. ISSN 1367-5435. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18716810/> doi:10.1007/s10295-008-0454-2
- [64] BONO, Jean-Jacques, Philippe GOULAS, Jean-Francois BOE, Nadine PORTET a Jean-Louis SERIS. Effect of Mn(II) on reactions catalyzed by lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *European Journal of Biochemistry*. 1990, 192(1), 189-193. ISSN 0014-2956. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2401291/> doi:10.1111/j.1432-1033.1990.tb19213.x
- [65] CAPDEVILA, Cecile, Serge MOUKHA, Miklos GHYCZY, Jacques THEILLEUX, Brigitte GELIE, Michel DELATTRE, Georges CORRIEU a Marcel ASTHER. Characterization of Peroxidase Secretion and Subcellular Organization of *Phanerochaete chrysosporium* INA-12 in the Presence of Various Soybean Phospholipid Fractions. *Applied and Environmental Microbiology*. 1990, 56(12), 3811-3816. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16348381/> doi:10.1128/aem.56.12.3811-3816.1990
- [66] ARORA, Daljit S a Paramjit K GILL. Comparison of two assay procedures for lignin peroxidase. *Enzyme and Microbial Technology*. 2001, 28(7-8), 602-605. ISSN 01410229. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141022901003027> doi:10.1016/S0141-0229(01)00302-7
- [67] KHIYAMI, Mohammad A., Anthony L. POMETTO a William J. KENNEDY. Ligninolytic Enzyme Production by *Phanerochaete chrysosporium* in Plastic Composite Support Biofilm Stirred Tank Bioreactors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006, 54(5), 1693-1698. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16506821/> doi:10.1021/jf051424I
- [68] KARIMI, A., F. VAHABZADEH a B. BONAKDARPOUR. Use of *Phanerochaete chrysosporium* Immobilized on Kissiris for Synthetic Dye Decolourization: Involvement of Manganese Peroxidase. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2006, 22(12), 1251-1257. ISSN 0959-3993. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11274-006-9169-6> doi:10.1007/s11274-006-9169-6
- [69] PODGORNIK, Helena, Aleš PODGORNIK, Petra MILAVEC a Anton PERDIH. The effect of agitation and nitrogen concentration on lignin peroxidase (LiP) isoform composition during fermentation of *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Biotechnology*. 2001, 88(2), 173-176. ISSN 01681656. Dostupné z:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S016816560100270X>  
doi:10.1016/S0168-1656(01)00270-X

- [70] NAKAMURA, Yoshitoshi, Tatsuro SAWADA, Mutui Godliving SUNGUSIA, Fumihisa KOBAYASHI, Masaaki KUWAHARA a Hiromichi ITO. Lignin Peroxidase Production by Phanerochaete Chrysosporium Immobilized on Polyurethane Foam. JOURNAL OF CHEMICAL ENGINEERING OF JAPAN. 1997, **30**(1), 1-6. ISSN 0021-9592. Dostupné z: <https://www.semanticscholar.org/paper/Lignin-Peroxidase-Production-by-Phanerochaete-on-Nakamura-Sawada/37e2abe45c92398e9cee3b4a77b054b03541b782> doi:10.1252/jcej.30.1
- [71] FUJIAN, X. Solid-state production of lignin peroxidase (LiP) and manganese peroxidase (MnP) by Phanerochaete chrysosporium using steam-exploded straw as substrate. Bioresource Technology. **80**(2), 149-151. ISSN 09608524. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852401000827> doi:10.1016/S0960-8524(01)00082-7
- [72] FIGUEIREDO, Patrícia, Kalle LINTINEN, Jouni T. HIRVONEN, Mauri A. KOSTIAINEN a Hélder A. SANTOS. Properties and chemical modifications of lignin: Towards lignin-based nanomaterials for biomedical applications. Progress in Materials Science. 2018, **93**, 233-269. ISSN 00796425. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0079642517301421> doi:10.1016/j.pmatsci.2017.12.001
- [73] MARTÍNEZ, A. T., S. CAMARERO, F. J. RUIZ-DUEÑAS a M. J. MARTÍNEZ. Chapter 8. Biological Lignin Degradation. Lignin Valorization. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2018, 2018, 199-225. Energy and Environment Series. ISBN 978-1-78262-554-4. Dostupné z: <https://pubs.rsc.org/tr/content/chapter/bk9781782625544-00199/978-1-78262-554-4> doi:10.1039/9781788010351-00199
- [74] KAMIMURA, Naofumi, Shingo SAKAMOTO, Nobutaka MITSUDA, Eiji MASAI a Shinya KAJITA. Advances in microbial lignin degradation and its applications. Current Opinion in Biotechnology. 2019, **56**, 179-186. ISSN 09581669. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0958166918301034> doi:10.1016/j.copbio.2018.11.011
- [75] YOUN, Hong-Duk, Yung Chil HAH a Sa-Ouk KANG. Role of laccase in lignin degradation by white-rot fungi. FEMS Microbiology Letters. 1995, **132**(3), 183-188. ISSN 03781097. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsle/article/132/3/183/517387> doi:10.1111/j.1574-6968.1995.tb07831.x
- [76] CABANA, Hubert, J. Peter JONES a Spiros N. AGATHOS. Preparation and characterization of cross-linked laccase aggregates and their application to the elimination of endocrine disrupting chemicals. Journal of Biotechnology. 2007, **132**(1), 23-31. ISSN 01681656. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168165607014216> doi:10.1016/j.jbiotec.2007.07.948
- [77] SHELDON, Roger A. Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). Applied Microbiology and Biotechnology. 2011, **92**(3), 467-477. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-011-3554-2> doi:10.1007/s00253-011-3554-2

- [78] SHODA, Makoto a Yasushi SUGANO. Recent advances in bacterial cellulose production. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2005, **10**(1), 1-8. ISSN 1226-8372. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02931175> doi:10.1007/BF02931175
- [79] JONAS, Rainer a Luiz F. FARAH. Production and application of microbial cellulose. *Polymer Degradation and Stability*. 1998, **59**(1-3), 101-106. ISSN 01413910. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141391097001973> doi:10.1016/S0141-3910(97)00197-3
- [80] TUFVESSON, Pär, Wenjing FU, Jacob Skibsted JENSEN a John M. WOODLEY. Process considerations for the scale-up and implementation of biocatalysis. *Food and Bioproducts Processing*. 2010, **88**(1), 3-11. ISSN 09603085. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960308510000052> doi:10.1016/j.fbp.2010.01.003
- [81] BASSO, Alessandra a Simona SERBAN. Industrial applications of immobilized enzymes—A review. *Molecular Catalysis*. 2019, **479**. ISSN 24688231. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2468823119304560> doi:10.1016/j.mcat.2019.110607
- [82] FREEDMAN, Steven, David ORENSTEIN, Philip BLACK, Perry BROWN, Karen MCCOY, John STEVENS, Danica GRUJIC a Russell CLAYTON. Increased Fat Absorption From Enteral Formula Through an In-line Digestive Cartridge in Patients With Cystic Fibrosis. 2017, **65**(1), 97-101. ISSN 0277-2116. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28471913/> doi:10.1097/MPG.0000000000001617
- [83] AGAR, JOHN WM. Review: Understanding sorbent dialysis systems. *Nephrology*. 2010, **15**(4), 406-411. ISSN 13205358. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20609091/> doi:10.1111/j.1440-1797.2010.01321.x
- [84] RAJANGAM, Bhuvanagayathri, David K. DANIEL a Albert Ivanov KRASTANOV. Progress in enzyme inhibition based detection of pesticides. *Engineering in Life Sciences*. 2018, **18**(1), 4-19. ISSN 16180240. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/elsc.201700028> doi:10.1002/elsc.201700028
- [85] MALITESTA, C. a M.R. GUASCITO. Heavy metal determination by biosensors based on enzyme immobilised by electropolymerisation. *Biosensors and Bioelectronics*. 2005, **20**(8), 1643-1647. ISSN 09565663. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956566304003653> doi:10.1016/j.bios.2004.08.003
- [86] ROIG, Manuel G, J Felipe BELLO, Fernando G VELASCO, Carmen D DE CELIS a Juan M CACHAZA. Biotechnology and applied biology section applications of immobilized enzymes. *Biochemical Education*. 1987, **15**(4), 198-208. ISSN 03074412. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0307441287900112> doi:10.1016/0307-4412(87)90011-2
- [87] SIRISHA, V.L., Ankita JAIN a Amita JAIN. Enzyme Immobilization. *Marine Enzymes Biotechnology: Production and Industrial Applications, Part II - Marine Organisms Producing Enzymes*. Elsevier, 2016, 2016, 179-211. *Advances in Food and Nutrition Research*. ISBN 9780128047149. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27770861/> doi:10.1016/bs.afnr.2016.07.004

- [88] HO, Yuh-Shan, A. F. M. FAHAD HALIM a Mohammad Tajul ISLAM. The Trend of Bacterial Nanocellulose Research Published in the Science Citation Index Expanded From 2005 to 2020: A Bibliometric Analysis. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2022, **9**. ISSN 2296-4185. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8801885/> doi:10.3389/fbioe.2021.795341
- [89] BONNARME, P. a T. W. JEFFRIES. Mn(II) Regulation of Lignin Peroxidases and Manganese-Dependent Peroxidases from Lignin-Degrading White Rot Fungi. *Applied and Environmental Microbiology*. 1990, **56**(1), 210-217. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16348093/> doi:10.1128/aem.56.1.210-217.1990
- [90] WANG, Peng, Xiaoke HU, Sean COOK, Maria BEGONIA, Ken S. LEE a Huey-Min HWANG. Effect of culture conditions on the production of ligninolytic enzymes by white rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* (ATCC 20696) and separation of its lignin peroxidase. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2008, **24**(10), 2205-2212. ISSN 0959-3993. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11274-008-9731-5> doi:10.1007/s11274-008-9731-5
- [91] SOLČÁNY, Veronika, Martina VRŠANSKÁ a Stanislava VOBĚRKOVÁ. *Optimization of the procedure for ligninolytic enzymes isolation from the white-rot fungi* [online]. Brno, 2016 [cit. 2023-03-29]. Dostupné z: <https://mendelnet.cz/pdfs/mnt/2016/01/181.pdf>
- [92] PATEL, Hardik, Shilpa GUPTA, Mayur GAHLOUT a Akshaya GUPTA. Purification and characterization of an extracellular laccase from solid-state culture of *Pleurotus ostreatus* HP-1. *3 Biotech*. 2014, **4**(1), 77-84. ISSN 2190-572X. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28324461/> doi:10.1007/s13205-013-0129-1
- [93] KOCYIGIT, Ali, M. Baris PAZARBASI, Ihsan YASA, Guven OZDEMIR a Ismail KARABOZ. Production of laccase from *Trametes trogii* TEM H2: a newly isolated white-rot fungus by air sampling. *Journal of Basic Microbiology*. 2012, **52**(6), 661-669. ISSN 0233111X. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/221855760\\_Production\\_of\\_laccase\\_from\\_Trametes\\_trogii\\_TEM\\_H2\\_A\\_newly\\_isolated\\_white-rot\\_fungus\\_by\\_air\\_sampling](https://www.researchgate.net/publication/221855760_Production_of_laccase_from_Trametes_trogii_TEM_H2_A_newly_isolated_white-rot_fungus_by_air_sampling) doi:10.1002/jobm.201100341
- [94] MÄKELÄ, Miia R., Taina LUNDELL, Annele HATAKKA a Kristiina HILDÉN. Effect of copper, nutrient nitrogen, and wood-supplement on the production of lignin-modifying enzymes by the white-rot fungus *Phlebia radiata*. *Fungal Biology*. 2013, **117**(1), 62-70. ISSN 18786146. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1878614612001961> doi:10.1016/j.funbio.2012.11.006
- [95] PARVEEN, Sofia, Muhammad ASGHER a Muhammad BILAL. Lignin peroxidase-based cross-linked enzyme aggregates (LiP-CLEAs) as robust biocatalytic materials for mitigation of textile dyes-contaminated aqueous solution. 2021, **21**. ISSN 23521864. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2352186420315261> doi: 10.1016/j.eti.2020.101226
- [96] MUKHOPADHYAY, Mainak a Rintu BANERJEE. Purification and biochemical characterization of a newly produced yellow laccase from *Lentinus squarrosulus*

- MR13.3 Biotech. 2015, **5**(3), 227-236. ISSN 2190-572X. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13205-014-0219-8>  
doi:10.1007/s13205-014-0219-8
- [97] SINIRLIOGLU, Zeynep Aydin, Deniz SINIRLIOGLU a Fahri AKBAS. Preparation and characterization of stable cross-linked enzyme aggregates of novel laccase enzyme from *Shewanella putrefaciens* and using malachite green decolorization. *Bioresource Technology*. 2013, **146**, 807-811. ISSN 09608524. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852413012613>  
doi:10.1016/j.biortech.2013.08.032
- [98] VRŠANSKÁ, Martina, Stanislava VOBĚRKOVÁ, Ana JIMÉNEZ JIMÉNEZ, Vladislav STRMISKA a Vojtěch ADAM. Preparation and Optimisation of Cross-Linked Enzyme Aggregates Using Native Isolate White Rot Fungi *Trametes versicolor* and *Fomes fomentarius* for the Decolourisation of Synthetic Dyes. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2018, **15**(1). ISSN 1660-4601. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/1660-4601/15/1/23> doi:10.3390/ijerph15010023
- [99] KHANAHMADI, Soofia, Faridah YUSOF, Azura AMID, Safa Senan MAHMUD a Mohd Khairizal MAHAT. Optimized preparation and characterization of CLEA-lipase from cocoa pod husk. *Journal of Biotechnology*. 2015, **202**, 153-161. ISSN 01681656. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168165614009912>  
doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.11.015
- [100] CHEN, Lin, Min ZOU a Feng F. HONG. Evaluation of Fungal Laccase Immobilized on Natural Nanostructured Bacterial Cellulose. *Frontiers in Microbiology*. 2015, **6**. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26617585/>  
doi:10.3389/fmicb.2015.01245
- [101] QIU, Huajun, Ying LI, Guanglei JI, Guiping ZHOU, Xirong HUANG, Yinbo QU a Peiji GAO. Immobilization of lignin peroxidase on nanoporous gold: Enzymatic properties and in situ release of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by co-immobilized glucose oxidase. *Bioresource Technology*. 2009, **100**(17), 3837-3842. ISSN 09608524. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852409002703>  
doi:10.1016/j.biortech.2009.03.016
- [102] KALSOOM, Umme, Zainab AHSAN, Haq Nawaz BHATTI, Faiza AMIN, Raziya NADEEM, Kiran AFTAB a Muhammad BILAL. Iron oxide nanoparticles immobilized *Aspergillus flavus* manganese peroxidase with improved biocatalytic, kinetic, thermodynamic, and dye degradation potentialities. *Process Biochemistry*. 2022, **117**, 117-133. ISSN 13595113. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1359511322001179>  
doi:10.1016/j.procbio.2022.04.002
- [103] SARAVANAKUMAR, Thiyagarajan, Han-Sung PARK, Ae-Young MO, Myoung-Suk CHOI, Dae-Hyuk KIM a Seung-Moon PARK. Detoxification of furanic and phenolic lignocellulose derived inhibitors of yeast using laccase immobilized on bacterial cellulosic nanofibers. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2016, **134**, 196-205. ISSN 13811177. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1381117716302193>  
doi:10.1016/j.molcatb.2016.11.006



- [104] LLORET, L., G. EIBES, G. FEIJOO, M. T. MOREIRA, J. M. LEMA a F. HOLLMANN. Immobilization of laccase by encapsulation in a sol-gel matrix and its characterization and use for the removal of estrogens. *Biotechnology Progress*. 2011, **27**(6), 1570-1579. ISSN 87567938. Dostupné z: [https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/44208758/Immobilization\\_of\\_laccase\\_by\\_encapsulati20160330-16714-5535tk-libre.pdf?1459380934=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DImmobilization\\_of\\_laccase\\_by\\_encapsulati.pdf&Expires=1680268962&Signature=eyz0cdmh68mzlCuWUBCKOII090Tq9cfchvPUXI5ycJfjxeQX98CghCPPTSEKJ9an2w8yBzFpuciNh9vUfdUyAKTslnp3phfIBSHQAWByRiHnFX2h~KyTIquYYkUAUaUqyG8Mbsfi8MkhILAQfTC7D7hbMob-SBgOeBBnkZzpXShob7kXWOD1ossftCHS7N9dnHukx5g9p0dIIMWRIKHkL9DfKoEUubHEQd3mVSDSweGM9OrtFftmLvQF-frK9ZXXcuLe-DM~mbWVhfNQa2HtzGPwrPCwqpS8Vr56Onbs1P~b5470IhtwEJiR3D2xlVkyFKrFyqbYVZp4fvNTTRjKw\\_\\_&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA](https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/44208758/Immobilization_of_laccase_by_encapsulati20160330-16714-5535tk-libre.pdf?1459380934=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DImmobilization_of_laccase_by_encapsulati.pdf&Expires=1680268962&Signature=eyz0cdmh68mzlCuWUBCKOII090Tq9cfchvPUXI5ycJfjxeQX98CghCPPTSEKJ9an2w8yBzFpuciNh9vUfdUyAKTslnp3phfIBSHQAWByRiHnFX2h~KyTIquYYkUAUaUqyG8Mbsfi8MkhILAQfTC7D7hbMob-SBgOeBBnkZzpXShob7kXWOD1ossftCHS7N9dnHukx5g9p0dIIMWRIKHkL9DfKoEUubHEQd3mVSDSweGM9OrtFftmLvQF-frK9ZXXcuLe-DM~mbWVhfNQa2HtzGPwrPCwqpS8Vr56Onbs1P~b5470IhtwEJiR3D2xlVkyFKrFyqbYVZp4fvNTTRjKw__&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA) doi:10.1002/btpr.694
- [105] TALEKAR, Sachin, Asavari JOSHI, Gandhali JOSHI, Priyanka KAMAT, Rutumbara HARIPURKAR a Shashikant KAMBALE. Parameters in preparation and characterization of cross linked enzyme aggregates (CLEAs). *RSC Advances*. 2013, **3**(31). ISSN 2046-2069. Dostupné z: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2013/ra/c3ra40818c/unauth> doi:10.1039/c3ra40818c
- [106] MUDALIGE, Thilak, Haiou QU, Desiree VAN HAUTE, Siyam M. ANSAR, Angel PAREDES a Taylor INGLE. Characterization of Nanomaterials. *Nanomaterials for Food Applications*. Elsevier, 2019, 2019, 313-353. ISBN 9780128141304. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/topics/engineering/polydispersity-index> doi:10.1016/B978-0-12-814130-4.00011-7
- [107] SHRIVASTAVA, Anshuman. Polymerization. *Introduction to Plastics Engineering*. Elsevier, 2018, 2018, 17-48. ISBN 9780323395007. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/topics/engineering/polydispersity-index> doi:10.1016/B978-0-323-39500-7.00002-2
- [108] PIŃKOWSKA, Hanna, Paweł WOLAK a Adrianna ZŁOCIŃSKA. Hydrothermal decomposition of alkali lignin in sub- and supercritical water. *Chemical Engineering Journal*. 2012, **187**, 410-414. ISSN 13858947. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1385894712001155?via%3Dihub> doi:10.1016/j.cej.2012.01.092
- [109] SAMMONS, Rhea J., David P. HARPER, Nicole LABBÉ, Joseph J. BOZELL, Thomas ELDER a Timothy G. RIALS. Characterization of Organosolv Lignins using Thermal and FT-IR Spectroscopic Analysis. *BioResources*. 2013, 2013(8), 2752-2767
- [110] SEBHAT, Woldemichael, Ayman EL-ROZ, Agnès CREPET, et al. Comparative study of solvolysis of technical lignins in flow reactor. *Biomass Conversion and Biorefinery*. 2020, **10**(2), 351-366. ISSN 2190-6815. Dostupné z: [https://hal.science/hal-03031346v1/file/publi%20Sebhat\\_version%20publiee.pdf](https://hal.science/hal-03031346v1/file/publi%20Sebhat_version%20publiee.pdf) doi:10.1007/s13399-019-00435-z
- [111] ABDELAZIZ, Omar Y. a Christian P. HULTEBERG. Physicochemical Characterisation of Technical Lignins for Their Potential Valorisation. *Waste and Biomass Valorization*. 2017, **8**(3), 859-869. ISSN 1877-2641. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12649-016-9643-9> doi:10.1007/s12649-016-9643-9

## 9. ZOZNAM OBRÁZKOV

<b>Obr. 1 (A)</b> Pleseň <i>P.chrysosporium</i> rozkladajúca lignín v dreve [7]; <b>(B)</b> Mikroskopická snímka plesne <i>P.chrysosporium</i> [8].	9
<b>Obr. 2</b> Schéma konceptu biorafinérie [16].	11
<b>Obr. 3</b> Monolignoly vyskytujúce a v štruktúre lignínu [20].	12
<b>Obr. 4</b> Väzby vyskytujúce sa v štruktúre lignínu [21].	13
<b>Obr. 5</b> Schéma kategorizácie ligninolytických enzýmov [upravené podľa [29].	15
<b>Obr. 6</b> Schéma katalytickej reakcie Li-peroxidázy [upravené podľa [34].	16
<b>Obr. 7</b> Katalytický cyklus Mn-dependentnej peroxidázy [upravené podľa [35].	17
<b>Obr. 8</b> Katalytický mechanizmus lakázy [upravené podľa [39].	18
<b>Obr. 9</b> Typy interakcií, ktorými je stabilizovaná terciárna štruktúra proteínu [upravené podľa [47].	19
<b>Obr. 10</b> Schematické znázornenie hlavných imobilizačných metód [upravené podľa [51].	20
<b>Obr. 11</b> Bakteriálna celulóza produkovaná vo vsádkovom móde (A); vlhká membrána bakteriálnej celulózy po vyňatí z kultivačného média (B); bakteriálna celulóza po prečistení hydroxidom sodným (C) [88].	23
<b>Obr. 12</b> Imobilizácia enzýmov bez nosiča pomocou zosieťovania [upravené podľa [60; 61].	24
<b>Obr. 13</b> Kalibračná krivka pre stanovenie bielkovín podľa Bradfordovej.	34
<b>Obr. 14</b> Porovnanie vplyvu prítomnosti induktoru a jeho koncentrácie v médiu na produkciu lignín-peroxidázy (K: kontrola; 0,5L: induktor 0,5 g/l lignínu; 1L: induktor 1 g/l lignínu; 3L: induktor 3 g/l lignínu; 0,01G: induktor 0,01 g/l guaiacolu; 0,5G: induktor 0,5 g/l guaiacolu)...	39
<b>Obr. 15</b> Porovnanie vplyvu prítomnosti induktoru a jeho koncentrácie na produkciu lakázy (K: kontrola; 0,5L: induktor 0,5 g/l lignínu; 1L: induktor 1 g/l lignínu; 3L: induktor 3 g/l lignínu; 0,01G: induktor 0,01 g/l guaiacolu; 0,5G: induktor 0,5 g/l guaiacolu).	40
<b>Obr. 16</b> Porovnanie vplyvu prítomnosti induktoru a jeho koncentrácie na produkciu mangán-peroxidázy (K: kontrola; 0,5L: induktor 0,5 g/l lignínu; 1L: induktor 1 g/l lignínu; 3L: induktor 3 g/l lignínu; 0,01G: induktor 0,01 g/l guaiacolu; 0,5G: induktor 0,5 g/l guaiacolu).	41
<b>Obr. 17</b> Sledovanie obsahu bielkovín na základe vplyvu induktoru (K: kontrola; 0,5L: induktor 0,5 g/l lignínu; 1L: induktor 1 g/l lignínu; 3L: induktor 3 g/l lignínu; 0,01G: induktor 0,01 g/l guaiacolu; 0,5G: induktor 0,5 g/l guaiacolu).	42
<b>Obr. 18</b> Optimalizácia pH pre zrážanie lignín-peroxidázy (najväčšie vyvrážanie enzýmu pri najnižšej hodnote enzýmovej aktivity).	43
<b>Obr. 19</b> Optimalizácia pH pre zrážanie mangán-peroxidázy (najnižšia hodnota enzýmovej aktivity znamená najlepšie vyvrážanie enzýmu).	44
<b>Obr. 20</b> Optimalizácia pH pre zrážanie lakázy (najnižšie enzýmová aktivita znamená najlepšie vyvrážanie enzýmu).	45
<b>Obr. 21</b> Optimalizácia koncentrácie síranu amónneho pre vyvrážanie lignín-peroxidázy (najnižšia enzýmová aktivita znamená najlepšie vyvrážanie enzýmu).	46
<b>Obr. 22</b> Optimalizácie koncentrácie síranu amónneho pre zrážanie mangán-peroxidázy (najlepšie vyvrážanie enzýmu vyjadrené najnižšou zvyškovou enzýmovou aktivitou).	46
<b>Obr. 23</b> Optimalizácie koncentrácie síranu amónneho pre zrážanie lakázy (najlepšie vyvrážanie enzýmu pri najnižšej zvyškovej enzýmovej aktivite).	47
<b>Obr. 24</b> Optimalizácia koncentrácie glutaraldehydu pre zrážanie lignín-peroxidázy (najlepšie vyvrážanie enzýmu pri najnižšej zvyškovej enzýmovej aktivite).	48
<b>Obr. 25</b> Optimalizácia koncentrácie glutaraldehydu pre zrážanie mangán-peroxidázy (najnižšia zvyšková aktivita znamená najväčšie vyvrážanie enzýmu).	49
<b>Obr. 26</b> Optimalizácia koncentrácie glutaraldehydu pre zrážanie lakázy (najnižšia zvyšková enzýmová aktivita znamená najväčšie vyvrážanie enzýmu).	49

<b>Obr. 27</b> Aktivity enzýmuv imobilizovaných na BC adsorpciou.....	50
<b>Obr. 28</b> Aktivita enzýmuv imobilizovaných na BC v spojení s metódou CLEA.....	51
<b>Obr. 29</b> Operačná stabilita imobilizovanej lignín peroxidázy na bakteriálnej celulóze (100%-ná enzýmová aktivita znázornená v 1.cykle). .....	53
<b>Obr. 30</b> Operačná stabilita mangán-peroxidázy imobilizovanej na bakteriálnej celulóze (relatívna enzýmová aktivita v 1.cykle znázorňuje 100%). .....	54
<b>Obr. 31</b> Operačná stabilita lakázy imobilizovanej na bakteriálnej celulóze (relatívna enzýmová aktivita počítaná z 1.cyklu), kde je enzýmová aktivita 100%-ná).....	55
<b>Obr. 32</b> Tableta modifikovaného lignínu pre meranie FTIR (1... 1 mg CLEA imobilizátu; 2... 1,5 mg CLEA imobilizátu; 3... 2,5 CLEA imobilizátu; 4... 3 krúžky imobilizátu BC; 5... 6 krúžkov imobilizátu BC; 6... 3 krúžky dezintegrovaného imobilizátu BC).....	57
<b>Obr. 33</b> FTIR spektrá lignínu modifikovaného imobilizovanými enzýmami. ....	58

## 10. ZOZNAM. TABULIEK

<b>Tab. 1</b> Médium pre udržiavanie plesne <i>P.chrysosporium</i> popísané v štúdií Tien a Kirk (1988) [11].	11
<b>Tab. 2</b> Súhrn typov technických lignínu podľa použitej metódy izolácie a extrakcie [upravené podľa [22].	13
<b>Tab. 3</b> Porovnanie výhod a nevýhod jednotlivých imobilizačných metód [upravené podľa [56; 51].	22
<b>Tab. 4</b> Výhody a nevýhody použitia imobilizovaných enzýmov v priemyselných procesov [upravené podľa 80].	25
<b>Tab. 5</b> Zloženie tuhého média <i>P.chrysosporium</i> .	30
<b>Tab. 6</b> Zloženie tekutého minerálneho média <i>P.chrysosporium</i> .	31
<b>Tab. 7</b> Zloženie Basal III média.	31
<b>Tab. 8</b> Zloženie stopových prvkov.	31
<b>Tab. 9</b> Fenolické látky použité ako induktory.	32
<b>Tab. 10</b> Zloženie reakčnej zmesi stanovenia enzýmovej aktivity lakázy.	32
<b>Tab. 11</b> Zloženie reakčnej zmesi stanovenia enzýmovej aktivity LiP.	33
<b>Tab. 12</b> Zloženie reakčných zmesí pre stanovenia enzýmovej aktivity MnP.	33
<b>Tab. 13</b> Navážka 2 kúskov lyofilizovanej BC pre jednotlivé kadičky.	36
<b>Tab. 14</b> Množstvo a metódy imobilizácie enzýmov určených k modifikácii lignínu.	37
<b>Tab. 15</b> Podmienky analýzy GPC pre meranie molekulovej hmotnosti modifikovaného lignínu.	38
<b>Tab. 16</b> Enzýmové aktivity namerané pre jednotlivé metódy imobilizácie na BC.	50
<b>Tab. 17</b> Zhrnutie enzýmových aktivít a účinnosti použitých imobilizačných metód.	52
<b>Tab. 18</b> Výsledky molekulovej hmotnosti a polydisperzity v ligníne modifikovanom imobilizovanými enzýmami (R... referenčná vzorka nemodifikovaného lignínu; C1... CLEA imobilizát v množstve 1 mg; C1,5... CLEA imobilizát v množstve 1,5 mg; C2,5... CLEA imobilizáty v množstve 2,5 mg; 3BC... 3 krúžky BC; 6BC... 6 krúžkov BC; 3BC_D... 3 krúžky dezintegrovanej BC).	56

## 12. ZOZNAM SKRATIEK

ABTS: diamónna soľ kyseliny 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfónovej)

ATR: attenuated total reflectance (úplný odraz žiarenia)

BC: bakteriálna celulóza

BSA: bovine serum albumin (bovinný sérový albumín)

CLEA: cross-linked enzyme aggregates (zosieťované enzýmové agregáty)

DyP: dye de-colorizing peroxidase (farbivo odfarbujúca peroxidáza)

DMP: dimetylftalát

DMSO: dimetylsulfoxid

EDC: 1-etyl-3-(3-dimetylamino)propylkarbodiimid

FTIR: infračervená spektrometria s Fourierovou transformáciou

G: koniferylalkohol

GA: glutaraldehyd

GPC: gélová permeačná chromatografia

H: kumarylalkohol

HPLC: high-performance liquid chromatography (vysokoučinná kvapalinová chromatografia)

Lac: lakáza

LiBr: bromid lítny

LiP: lignin peroxidáza

MnP: mangán-dependentná peroxidáza

Mw: molar weight (molárna hmotnosť)

MWL: milled wood lignin (lignín z mletého dreva)

PDA: potato-dextrose agar (zemiakovo-dextrózový agar)

PI: index polydisperzity

S: syringylalkohol

SEC-MALS-dRI: rozmerovo vylučovacia gélová permeačná chromatografia s viacuhlovým rozptylom svetla a detektorom diferenciálneho indexu lomu

SmC: submerzná kultivácia

SSC: statická kultivácia v tuhom stave

TAC: total antioxidant capacity (celková antioxidačná kapacita)

UV: ultrafialové žiarenie

VA: veratrylalkohol

VP: versatile peroxidase (veštranná peroxidáza)