

**ČESKÉ VYSOKÉ  
UČENÍ TECHNICKÉ  
V PRAZE**

**FAKULTA  
BIOMEDICÍNSKÉHO  
INŽENÝRSTVÍ**



**BAKALÁŘSKÁ  
PRÁCE**

**2019**

**JOSEF  
KRÁTKÝ**





ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

---

Fakulta biomedicínského inženýrství  
Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

Enzymy z hub s detoxikačním potenciálem

Enzymes from Fungi with Detoxication Potential

Bakalářská práce

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví  
Studijní obor: Zdravotní laborant

Vedoucí práce: RNDr. Pavla Bojarová, Ph.D.  
Konzultantka: Ing. Ludmila Martínková, DSc.

**Josef Krátký**

---

KLADNO, KVĚTEN 2019



# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

## I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Krátký** Jméno: **Josef** Osobní číslo: **433956**  
Fakulta: **Fakulta biomedicínského inženýrství**  
Garantující katedra: **Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva**  
Studijní program: **Specializace ve zdravotnictví**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**

## II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

**Enzymy z hub s detoxikačním potenciálem**

Název bakalářské práce anglicky:

**Enzymes from Fungi with Detoxication Potential**

Pokyny pro vypracování:

Vláknité houby produkují enzymy schopné účinně degradovat toxické látky typu fenolů, kyanidů a nitrilů - zvláště kyanidhydratasy, nitrilasy a polyfenoloxidasy. Cílem teoretické části práce je literární rešerše shrnující bioremediační a detoxikační potenciál hub, výskyt kyanidu a fenolů v odpadních vodách a způsoby jejich eliminace a výskyt, funkce a biotechnologické využití kyanidhydratas. Cílem praktické části práce je rekombinantní exprese vybrané kyanidhydratasy (enzym detoxifikující kyanid). Praktická část práce bude zahrnovat expresi genu v *E. coli*, stanovení aktivity takto získaných buněk, purifikaci enzymu a stanovení jeho vlastností (substrátové specifity, pH a teplotních profilů, stability). Bude provedena enzymová degradace kyanidu na formamid pomocí tohoto enzymu a posouzena vhodnost enzymu pro detoxifikaci kyanidu v odpadních vodách v kombinaci s polyfenoloxidasami, a také pro stanovení kyanidu. Součástí praktické části práce bude dále in silico sekvenční analýza proteinů s prokázanými nebo hypotetickými aktivitami jmenovaných enzymů u vláknitých hub.

Seznam doporučené literatury:

- [1] Kumano T., Suzuki T., Shimizu S., Kobayashi M., Nitrile-synthesizing enzyme: Screening, purification and characterization. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, číslo 62, 167-173, 2016, ISSN 0022-1260
- [2] Martínková L., Chmátal M., The integration of cyanide hydratase and tyrosinase catalysts enables effective degradation of cyanide and phenol in coking wastewaters. *Water Res.*, číslo 102, 90-95, 2016, ISSN 2047-4849. ISSN 0043-1354
- [3] Martínková L., Veselá A. B., Rinágelová A., Chmátal M., Cyanide hydratases and cyanide dihydratases: emerging tools in the biodegradation and biodetection of cyanide. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, číslo 99, 8875-8882, 2015, ISSN: 0175-7598
- [4] Rinágelová A., Kaplan O., Veselá A. B., Chmátal M., Křenková A., Plíhal O., Pasquarelli F., Cantarella M., Martínková L., Cyanide hydratase from *Aspergillus niger* K10: Overproduction in *Escherichia coli*, purification, characterization and use in continuous cyanide degradation. *Proc. Biochem.*, číslo 49, 445-450, 2014, ISSN: 1359-5113

Jméno a příjmení vedoucí(ho) bakalářské práce:

**RNDr. Pavla Bojarová, PhD.**

Jméno a příjmení konzultanta(ky) bakalářské práce:

**Ing. Ludmila Martínková DSc.**

Datum zadání bakalářské práce: **28.09.2018**

Platnost zadání bakalářské práce: **18.09.2020**

prof. MUDr. Leoš Navrátil, CSC., MBA, dr.h.c.  
podpis vedoucí(ho) katedry

prof. MUDr. Ivan Dylevský, DrSc.  
podpis děkana(ky)

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem práci s názvem Enzymy z hub s detoxikačním potenciálem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů, které uvádím v seznamu bibliografických odkazů.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon).

V Kladně dne 14. 5. 2019.

.....  
podpis

## **Poděkování**

Chtěl bych poděkovat své vedoucí bakalářské práce RNDr. Pavle Bojarové Ph.D., za odborné vedení práce a podnětné rady. Dále bych chtěl velmi poděkovat Ing. Ludmile Martínkové, DSc., za neutuchající podporu a nekonečnou trpělivost a za podnětné připomínky. Poté Ing. Martinu Chmátalovi, CSc., za odborné vedení při mé praktické části. Dále bych chtěl poděkovat prof. Ing. Vladimíru Křenovi, DrSc., za podnětné připomínky v průběhu celé práce. Nemohu zapomenout na všechny ostatní zaměstnance v Laboratoři biotransformací, MBÚ AV ČR, v.v.i, kteří byli vždy ochotní a nápomocní při mé práci a vytvořili mi tím skvělé pracovní podmínky.

## Abstrakt

Kyanidhydratasy jsou enzymy patřící do velké skupiny proteinů označované jako „nadorodina nitrilas“. Jejich funkcí je přeměna kyanidu na formamid za spotřeby vody, což předurčuje jejich možné využití při biologickém odstraňování kyanidu a fenolů z odpadních vod. Kyanidhydratasy se vyskytují výhradně v houbách. V této práci byla používána kyanidhydratasa z houby *Stereum hirsutum* (první zkoumaná kyanidhydratasa z oddělení *Basidiomycota*).

Literární rešerše shrnuje bioremediační a detoxikační potenciál hub, dále výskyt kyanidu a fenolů v odpadních vodách, vlastnosti a toxicitu těchto látek, aktuálně používané způsoby jejich eliminace a možnosti využití kyanidhydratas a nitrilas. Byla provedena sekvenční analýza kyanidhydratas oddělení *Basidiomycota* a *Ascomycota* a sestaven fylogenetický strom.

V praktické části byl gen pro kyanidhydratasu ze *S. hirsutum* heterologně exprimován v *Escherichia coli* a byly stanoveny vlastnosti kyanidhydratasy - aktivita celých buněk, reakční podmínky, stabilita a substrátová specifita. Následně byl enzym purifikován pomocí hydrofobní a gelové permeační chromatografie a biochemicky charakterizován (reakční podmínky, stabilita a kinetika). Celé buňky *E. coli* obsahující kyanidhydratasu byly použity pro konverzi kyanidu v modelové a skutečné koksárenské odpadní vodě.

## Klíčová slova

Kyanidhydratasa; kyanid; fenol; bioremediace; biodegradace; koksárenská odpadní voda; charakterizace enzymu; *Escherichia coli*; sekvenční analýza.

## Abstract

Cyanide hydratases are enzymes belonging to a large group of proteins called "nitrilase superfamily". Their function is the conversion of cyanide to formamide under water consumption, which predetermines their possible use in the biological removal of cyanide and phenols from wastewaters. Cyanide hydratases occur exclusively in fungi. In frame of this work, cyanide hydratase from the fungus *Stereum hirsutum* was used (the first cyanide hydratase investigated in the *Basidiomycota* division).

The literature review summarizes the bioremediation and detoxication potential of fungi, the occurrence of cyanide and phenols in wastewaters, the properties and toxicity of these substances, the currently used methods of their elimination and the possibility of using cyanide hydratases and nitrilases. Sequence analysis of the cyanide hydratases from the *Basidiomycota* and *Ascomycota* divisions was performed and a phylogenetic tree assembled.

In the practical part, the gene coding the cyanide hydratase in *S. hirsutum* was heterologously expressed in *Escherichia coli* and its properties were determined - activity of whole cells, reaction conditions, stability and substrate specificity. Subsequently, the enzyme was purified by hydrophobic and gel permeation chromatography and biochemically characterized (reaction conditions, stability, and kinetics). Whole cells of *E. coli* containing cyanide hydratase were used for cyanide conversion in model and real coking wastewater.

## Keywords

Cyanide hydratase; cyanide; phenol; bioremediation; biodegradation; coking wastewater; enzyme characterization; *Escherichia coli*; sequential analysis.



## Obsah

1	ÚVOD .....	12
2	SOUČASNÝ STAV .....	13
2.1	Bioremediační a detoxikační potenciál hub .....	13
2.1.1	Bioremediace a detoxikace .....	13
2.2	Kyanidhydratasy .....	14
2.2.1	Zařazení do skupiny, vlastnosti .....	14
2.2.2	Nitrilasy .....	16
2.2.3	Využití kyanidhydratas .....	17
2.3	Kyanid .....	18
2.3.1	Vlastnosti kyanidů .....	18
2.3.2	Výskyt v odpadních vodách .....	20
2.3.3	Toxicita a odbourávání .....	21
2.4	Fenoly .....	22
2.4.1	Vlastnosti fenolů .....	22
2.4.2	Výskyt v odpadních vodách .....	23
2.4.3	Toxicita a odbourávání .....	25
3	Cíl práce .....	26
4	Metodika .....	27
4.1	Vybavení, přístroje .....	27
4.1.1	Přístroje .....	27
4.1.2	Kultivační médium a roztoky .....	28
4.1.3	Substráty .....	30
4.1.4	Biologické materiály .....	30

4.2	Sekvenční analýza .....	30
4.3	Kultivace buněk <i>E. coli</i> .....	31
4.4	Stanovení aktivity enzymu.....	32
4.4.1	Stanovení aktivity celých buněk .....	32
4.4.2	Stanovení aktivity purifikovaného enzymu.....	32
4.4.3	pH optimum celých buněk .....	32
4.4.4	pH optimum purifikovaného enzymu.....	33
4.4.5	pH stabilita celých buněk.....	33
4.4.6	pH stabilita purifikovaného enzymu .....	33
4.4.7	Teplotní optimum celých buněk .....	33
4.4.8	Teplotní optimum purifikovaného enzymu.....	33
4.4.9	Teplotní stabilita celých buněk.....	33
4.4.10	Teplotní stabilita purifikovaného enzymu.....	34
4.4.11	Substrátová specifita .....	34
4.4.12	Stanovení kinetiky pro substrát kyanid .....	34
4.5	Purifikace proteinu.....	35
4.5.1	Zakoncentrování vzorku.....	35
4.5.2	Hydrofobní chromatografie.....	35
4.5.3	Gelová permeační chromatografie .....	35
4.6	Analytické metody .....	36
4.6.1	Spektrofotometrické stanovení kyanidu s kyselinou pikrovou .....	36
4.6.2	Spektrofotometrické stanovení formamidu s hydroxylaminem .....	36
4.6.3	Stanovení amonných iontů s <i>o</i> -ftaldialdehydem (OPA) .....	37
4.6.4	Stanovení proteinu .....	37

4.6.5	HPLC.....	37
4.7	Elektroforéza .....	38
4.7.1	SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu .....	38
4.8	Konverze kyanidu v modelové odpadní vodě.....	39
5	Výsledky.....	40
5.1	Sekvenční analýza kyanidhydratas a nitrilas u vláknitých hub .....	40
5.1.1	Kyanidhydratasy .....	40
5.1.2	Shoda kyanidhydratasy s nitrilasami.....	41
5.2	Stanovení vlastností kyanidhydratasy v celých buňkách.....	43
5.2.1	Substrátová specifita kyanidhydratasy v buňkách <i>E.coli</i> .....	46
5.3	Purifikace kyanidhydratasy .....	47
5.4	Charakterizace purifikovaného enzymu.....	49
5.4.1	Teplotní stabilita a optimum.....	49
5.4.2	pH stabilita a optimum .....	51
5.4.3	Kinetické vlastnosti .....	52
5.5	Biodegradace kyanidu na formamid v modelové a skutečné odpadní vodě	53
6	Diskuse .....	54
7	Závěr .....	57
8	Seznam použitých zkratk.....	58
9	Seznam použité literatury.....	59
10	Seznam použitých obrázků .....	67
11	Seznamu použitých tabulek .....	68
12	Seznam příloh.....	69

# 1 ÚVOD

Volné kyanidy a nitrily a jejich sloučeniny patří mezi sloučeniny s nepříznivým vlivem nejenom na zdraví lidí, ale i na ekosystémy, a jsou v současné době velmi rozšířeny v životním prostředí. Kyanidy se v přírodě vyskytují nejenom jako přirozený výsledek biologických procesů, ale také a hlavně jako výsledek aktivity lidí. Za poslední roky dochází ke snižování množství kyanidů a fenolů v odpadech a odpadních vodách, ale i tak představuje jejich přítomnost velkou ekologickou zátěž, hlavně v ekonomicky slabších státech. Toto znečištění pochází zejména z chemického průmyslu, hornictví a hutnictví, zemědělství, potravinářského průmyslu nebo z výroby léků.

V současné době se používají k degradaci těchto látek hlavně fyzikálně-chemické metody, např. chlorace a detoxikace peroxidem vodíku k odstranění kyanidů. Tyto metody jsou finančně náročné a mohou vytvářet další chemické odpady. Oproti tomu houby a bakterie, které mají schopnost přirozeně degradovat kyanidy a fenoly, nabízejí velmi zajímavou a pro ekosystémy neškodnou cestu pro odstranění těchto látek. Nejenom z těchto důvodů je bioremediace v současné době aktuální a stále častěji diskutované téma, které si zaslouží pozornost.

Tato práce shrnuje literární údaje o detoxikačním potenciálu hub, výskytu fenolů a kyanidů, jejich vlastnostech a výskytu v odpadních vodách, a dále o způsobech degradace a možnosti využití kyanidhydratas. V praktické části byla charakterizována nová kyanidhydratasa ze *S. hirsutum*. Pomocí celých buněk *E. coli*, které obsahují kyanidhydratasu, byla provedena konverze kyanidu v modelové a skutečné odpadní vodě.

## 2 SOUČASNÝ STAV

### 2.1 Bioremediační a detoxikační potenciál hub

#### 2.1.1 Bioremediace a detoxikace

Bioremediaci lze definovat jako přirozený biologický proces, při kterém dochází k přeměně toxické nebo škodlivé látky na látku méně toxickou nebo netoxickou. Tato degradace nastává působením různých druhů organismů, případně jejich enzymů. Jedná se tedy o rozklad primárních polutantů způsobený specifickými organismy [1].

Bioremediaci je možné rozdělit podle způsobu provedení na dvě základní skupiny: *in-situ* a *ex-situ*.

*In-situ* metody probíhají za použití přirozených mikroorganismů, a to hlavně bakterií, často aktinomycet (vláknitých bakterií kmene *Actinobacteria* připomínajících v některých případech svou morfologií houby) a hub. Mezi výhody této metody patří její flexibilita a malé finanční náklady. Efektivita bývá ovlivněna např. teplotou, pH nebo dostupností specifických živin pro mikroorganismy [1; 2].

*Ex-situ* metody se provádějí ve speciálních zařízeních a na velkých plochách speciálně upravených pro bioremediační procesy. Výhodou těchto metod oproti metodám *in-situ* je vyšší účinnost a rychlost, ale nevýhodou je vyšší finanční náročnost [1].

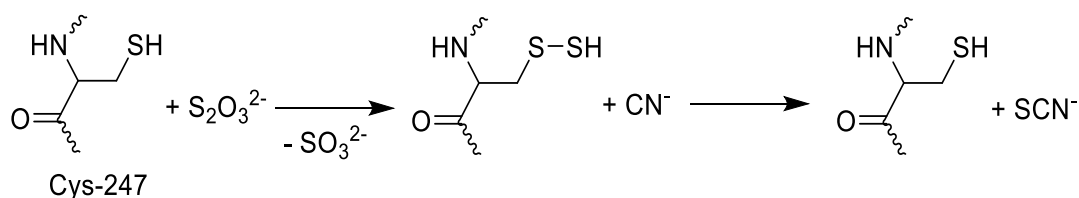
V současné době jsou houby jedním z hlavních kandidátů pro bioremediaci (mykoremediace). Jedním z důvodů je to, že některé z druhů hub jsou přirozenými rozkladači vysoce toxických odpadních látek jako fenolů, kyanidů a jejich derivátů.

Přírozně vytvářejí řadu enzymů pro transformaci těchto látek. Pro navržení účinného postupu mykoremediace je nutné správně identifikovat a vybrat druh houby, který je schopný degradovat danou znečišťující látku, aby došlo k účinné mykoremediaci. V souvislosti s degradacemi fenolových látek je nejvíce zkoumána a využívána skupina ligninolytických hub, které se také označují jako houby bílé hniloby dřeva. Svůj název dostaly podle toho, že jsou dřevokazné a rozkládají ligninovou složku v dřevinách. Do této skupiny patří např. houby rodů *Phanerochaete*, *Armillaria*, *Ganoderma*, *Stereum*, *Trametes*, *Pleurotus* nebo *Pycnoporus* [2; 3].

## 2.2 Kyanidhydratasy

### 2.2.1 Zařazení do skupiny, vlastnosti

Baktérie a houby zastávají klíčovou roli v degradaci a detoxikaci HCN a nitrilů. V současné době je známa řada enzymatických cest pro degradaci volného kyanidu (CN<sup>-</sup>) a HCN pomocí mikrobů. Jednou z nich je anaerobní asimilace s thiosulfátem katalyzovaná enzymem rhodanasou (EC 2.8.1.1). Principem reakce je tzv. pingpongový mechanismus. V první fázi dochází k vazbě atomu síry v thiosíranu na aktivní centrum cysteinu. Ve druhé fázi reakce je síra přenesena z aktivního místa na akceptor, tedy kyanid (Obr. 1). Triviální název enzymu rhodanasa vznikl z důvodu tvorby produktu thiokyanatanu, který je možné pojmenovat také rhodanid [4].



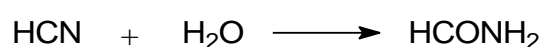
Obr. 1: Schéma reakce katalyzované rhodanasou (převzato z [5])

Alternativou je hydrolýza, kterou katalyzují enzymy ze skupiny „nadrodiny nitrilas“ - kyanidhydratasa (EC 4.2.1.66) a kyaniddihydratasa (EC 3.5.5.1) [5; 6].

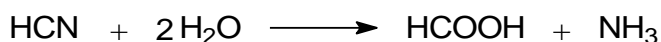
První záznam o enzymu kyanidhydratase pochází z roku 1972 [7], kdy byla nalezena podobnost mezi tímto enzymem (z houby *Stemphylium loti*) a enzymem nitrilasou. Od té doby byly popsány a analyzovány další kyanidhydratasy, ale pouze z hub; v rostlinách nebo bakteriích nebyly dosud žádné z těchto enzymů nalezeny. Kyanidhydratasy patří do velké skupiny enzymů, které se souhrnně nazývají „nadrodina nitrilas“ („*nitrilase superfamily*“). Kyanidhydratasy patří však formálně do skupiny lyas (podle klasifikačního systému enzymů, který byl zaveden Mezinárodní biochemickou a molekulárně biologickou unií, IUBMB). Zařazení kyanidhydratas do „nadrodiny nitrilas“ je dáno podobností primární struktury. Tato skupina enzymů působí na nepeptidové vazby C-N. Obecnou vlastností těchto proteinů je přítomnost katalytické tetrády Glu – Lys – Glu - Cys [6], kdy je zbytek cysteinu nukleofilní a atakuje C-atom C-N skupiny.

Kyanidhydratasy katalyzují chemickou reakci (hydrataci), kdy se volný kyanid (CN<sup>-</sup>) nebo HCN přeměňuje na formamid za spotřeby vody. Kyaniddihydratasy, které hydrolyzují HCN na kyselinu mravenčí a vodu. Kyanidhydratasy patří do první třídy (z celkově třinácti) v „nadrodině nitrilas“, společně s nitrilasami neboli nitrilaminohydrolasami (EC 3.5.5.-). Tyto enzymy, které se nacházejí v rostlinách, houbách a bakteriích jsou schopné hydrolyzovat nitrily různých struktur - aromatické nebo alifatické. Ze všech třinácti tříd má známou substrátovou specifitu pouze devět tříd [6; 8; 9].

Kyanidhydratasy katalyzují reakci:



Kyanidhydratasy katalyzují reakci:



Téměř všechny známé kyanidhydratasy vykazují vysokou vzájemnou podobnost (identita primárních struktur je větší než 60 %), na rozdíl od skupiny nitrilás, mezi jejichž aminokyselinovými sekvencemi jsou větší rozdíly (identita >25 %). Molekulové hmotnosti podjednotek kyanidhydratas se většinou pohybují mezi 40-45 kDa, zatímco molekulové hmotnosti nitrilas jsou v průměru menší (30-45 kDa. [9])

### 2.2.2 Nitrilasy

Původním názvem enzymu byl indolacetonitrilasa; poprvé byl tento enzym izolovaný z ječmene a název získal podle schopnosti přeměňovat indol-3-acetonitril na indol-3-octovou kyselinu, což je růstový hormon pro rostliny. Enzym byl později přejmenován, když se zjistilo, že hydrolyzuje širší spektrum nitrilů, než bylo původně známo, a některé z nich s několikanásobně vyšší rychlostí než indol-3-acetonitril. Nitrilasy mají zpravidla širší substrátovou specifitu než kyanidhydratasy, což je jejich výhodou, ale až na několik málo enzymů téměř nedegradují kyanid [10; 11].

V poslední době se stále více studují nitrilasy z vláknitých hub. Stále častěji se používají rekombinantní enzymy připravené většinou v *E. coli*. Tento hostitel se běžně používá z důvodu odolnosti organismu, rychlosti buněčného cyklu a malé náročnosti na finanční a časové podmínky [12].

Nitrilasy se obvykle dělí dle substrátové specifity na alifatické, arylalifatické a aromatické. Strukturně jsou nitrilasy tvořeny podjednotkami, z nichž nejméně dvě, ale často daleko vyšší (sudý) počet tvoří aktivní formu enzymu [12].



### 2.2.3 Využití kyanidhydratas

Kyanidhydratasy jsou schopné kromě kyanidu transformovat také některé nitrily (např. fumaronitril). Naopak některé z nitrilas jsou schopné akceptovat jako substrát i volný kyanid. Nicméně aktivity kyanidhydratas pro organické nitrily a aktivity nitrilas pro volný kyanid jsou zpravidla nízké [6].

V některých průmyslových výroбах dochází k uvolňování kyanidu v různých formách do odpadních vod, a to například v těžebním, koksárenském a metalurgickém průmyslu. Také fenolové odpady se dostávají do odpadních vod z koksárenské výroby, ale i z aerosolových desinfekčních prostředků, některých deodorantů, desinfekčních prostředků na ruce, ústních vod nebo přípravků na léčbu akné (konkrétně hexachlorfenolu). Kontaminace chlorfenoly pocházejí také ze spalování nebo skladování odpadů z dřevařského, papírenského a chemického průmyslu. Z odpadních vod se následně mohou kyanidy a fenoly dostat i do podzemních vod [13; 14].

Při zpracovávání některých zemědělských plodin se tvoří odpady s vysokým obsahem kyanidů; příkladem je například *Manihot esculenta* (maniok jedlý, kasava). Tento keř původně z Jižní Ameriky v současné době patří mezi tři největší zdroje sacharidů v tropických oblastech společně s rýží a kukuřicí, avšak kořeny obsahují významné množství kyanidu, které používá rostlina jako ochranu proti býložravcům. Množství v kořenech záleží na odrůdě; sladké kultivary obsahují 20 mg/kg čerstvých kořenů, hořké mohou obsahovat až 50-krát více – 1 g/kg čerstvých kořenů [15]. Plodina se proto před konzumací nakládá na vody na tři až pět dní. Následně se suší, nebo vaří. Poté je již *Manihot esculenta* bezpečně požitelná, ale při tomto procesu zpracování plodiny vzniká velké množství vody s obsahem kyanidu [16].

V současné době se k čištění odpadních vod od kyanidů nejčastěji používá chemická oxidace chlorem, ale tato metoda má značné nevýhody, protože vyžaduje použití velkých množství škodlivých látek a speciální zacházení s chemickým odpadem. Při tomto postupu mohou navíc vznikat organické chlorované látky s potenciálně vysokou toxicitou. Další metody, které se používají pro odstranění kyanidu z průmyslových vod, jsou adsorpční metody, při kterých se kyanid zachytí na povrch sorbentů, nebo oxidace ozonem, peroxosloučeninami a manganistanem draselným. Proto jsou enzymy hydrolyzující kyanidy, odolné k vysokým koncentracím kyanidu, zajímavou a perspektivní alternativou. Zejména kyanidhydratasy mají vysoké specifické aktivity pro kyanid (řádově  $10^2$ - $10^3$  U/mg proteinu) [6; 17].

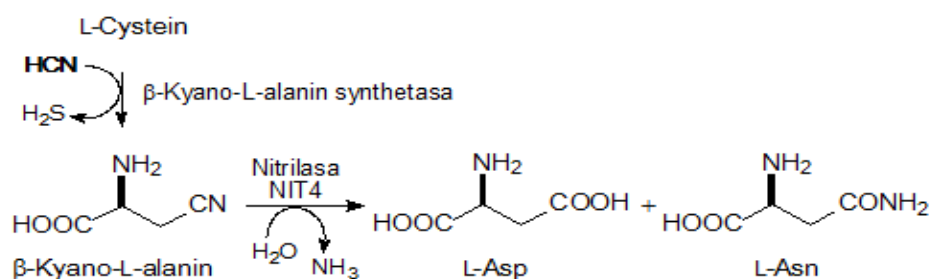
Enzymy kyanidhydratasy mohou velmi úspěšně spolupracovat s tyrosinaseou v detoxikačních procesech. Samotná tyrosinasa je inhibována pomocí kyanidu. Proto je nutné nejprve použít kyanidhydratasu ke zmírnění inhibice tyrosinasy a následně pomocí tyrosinasy degradovat fenoly. Tímto bienzymatickým procesem dojde k téměř úplnému odstranění dvou nejtoxičtějších složek odpadní průmyslové vody [17; 8].

## 2.3 Kyanid

### 2.3.1 Vlastnosti kyanidů

Kyanidy jsou bílé krystalické látky, které v kyselém prostředí uvolňují kyanovodík. Mohou obsahovat ve formě kationtu kovy, hlavně draslík a sodík. Jsou rozpustné jak ve vodě, tak v methanolu a ethanolu. Kyanidy jsou odvozené od kyseliny kyanovodíkové neboli kyanovodíku ( $\text{H-C}\equiv\text{N}$ ). Kyselina kyanovodíková má bod tání  $-13,4$  °C a bod varu  $25,6$  °C. Jedná se o bezbarvou kapalinu, která voní po hořkých mandlích. Kyanovodík vzniká v přírodě i přirozenými procesy: vulkanickou činností nebo přirozenými chemickými

procesy v bakteriích a rostlinách. Eliminace kyanidu v rostlinách je podmíněná přítomností enzymu NIT4 hydrolyzujícího  $\beta$ -kyano-L-alanin. V rostlinách je kyanid přeměněn na  $\beta$ -kyano-L-alanin pomocí enzymu  $\beta$ -kyano-L-alanin syntetasy (EC 4.4.1.9) a produkt je následně detoxikován transformací na kyselinu L-asparagovou, asparagin a amoniak pomocí nitrilasy NIT4.



Obr. 2: Přeměna kyanidu v rostlinách [12]

Naopak vznik kyanidu v rostlinách souvisí s produkcí ethylenu. Zajímavostí je, že právě aktivita enzymu NIT4 může mít vliv na fyziologii a vývoj kořenů rostlin. Dochází ke komplexní interakci mezi metabolismem kyanidu a hormonální regulací růstu rostlin. Při větším množství NIT4 dochází k nárůstu kořenových aminokyselin až o 50% a o cca 10% se zvětší i akumulace kořenových proteinů [15; 18].

Průmyslově lze kyanovodík připravit spalováním směsi methanu a amoniaku za přítomnosti katalyzátoru nebo reakcí amoniaku s oxidem uhelnatým za přítomnosti oxidu hlinitého (při teplotách 500-700 °C) [18].

Kyanovodík je toxický pro všechny organismy, ale v rozdílné míře; nejtoxičtější je pro ryby a další vodní organismy. Ve větším množství je toxický i pro půdní organismy, zejména pro bakterie [6].

Organické kyanidy (nitrily) se přirozeně vyskytují v přírodě, kde vznikají činností bakterií, řas a rostlin, a to nejenom v plodech (např. se vyskytují v některých

druzích ovoce), ale i v jiných částech rostliny. V rostlinách se vyskytují ve formě kyanogenních glykosidů (KG), které se skládají se z nesacharidové složky  $\alpha$ -hydroxynitrilu a sacharidové složky, nejčastěji  $\beta$ -D-glukopyranosy. Pokud KG přijdou do styku s glykosidasou, dochází k rozštěpení glykosidové vazby za vzniku nestabilního  $\alpha$ -hydroxynitrilu a uvolní se kyanovodík. L-Valin nebo L-leucin (u skupiny linamarinů) jsou jen některé z L-aminokyselin, z nichž odvozujeme KG. Rostliny jsou schopné pomocí kaskády enzymů přeměnit L-aminokyseliny na kyanhydrin, který je následně glykosylován [6; 14; 13].

Obsah KG se v rostlinách liší v závislosti na části rostliny, stáří nebo růstových podmínkách. Mezi rostliny, které obsahují nejvíce KG, řadíme fazol měsíční, kde koncentrace v semenech se pohybuje v rozmezí 10-400 mg/ 100 g, hořké mandle-semena 280-310 mg/ 100g, bambus, který má v špičkách výhonků až 800 mg/ 100 g a semena meruněk s 40-400 mg/ 100g [16].

V současné době je již známo přes 3000 kyanogenních druhů rostlin, živočichů, mikrobů a hub [2].

### 2.3.2 Výskyt v odpadních vodách

Výskyt kyanidů v odpadních vodách je celosvětovým problémem, jen v USA je ročně kontaminováno kyanidy a jejich deriváty cca 18 miliard litrů odpadní vody [19]. Nejčastěji se ve vodě vyskytují kyanidy, které nejsou z přirozeného přírodního zdroje, ale jsou odpadem při průmyslovém zpracování. Koksárenský a metalurgický průmysl, výroba chemikálií, syntéza polymerů, zemědělství, výroba pesticidů nebo fotografický průmysl jsou jenom některá z průmyslových odvětví, ve kterých dochází při zpracování surovin ke vzniku odpadní vody s vysokým obsahem kyanidů, ale i těžkých kovů, se kterými často kyanidy tvoří komplexy. Kyanidy se v minulosti využívaly i jako chemické zbraně či k hromadnému vyhlazování lidí. V odpadních vodách a jiných odpadech jsou

přítomné kyanidy buď volné (HCN), v jednoduché formě (KCN) nebo v komplexních sloučeninách; velký vliv na jejich stabilitu má pH, které částečně určuje jejich aktivitu a vliv na přírodu a okolní prostředí. Typickým jevem je únik kyanovodíku při nízkých hodnotách pH [17; 18; 20].

Vzhledem k nebezpečí pro životní prostředí je vypouštění a skladování kyanidů regulováno právními předpisy. Kromě platných Evropských nařízení je v platnosti i nařízení vlády České republiky č. 401/2015 Sb., které se odkazuje na zákon č. 254/2001 Sb. a pojednává o maximálních povolených hodnotách pro průmyslové znečištění povrchových odpadních vod kyanidem. Hodnota stanovená právním předpisem je 0,023 mg celkového kyanidu/l. Pro volný kyanid je tato hodnota 0,005 mg/l [21].

### 2.3.3 Toxicita a odbourávání

Toxické vlastnosti přírodních i syntetických kyanidů jsou známé již od starověku. Jednoduché kyanidy mají vyšší toxicitu než kyanidové komplexy. Kyanovodík je metabolický a respirační inhibitor. Afinita  $\text{CN}^-$  je v organismu vysoká zvláště k  $\text{Fe}^{3+}$ , který se nachází v enzymu dýchacího řetězce cytochromoxidase. Důsledkem této afinity dochází k zablokování přenosu elektronů na kyslík, které jsou potřeba pro následující oxidační pochody. Z tohoto důvodu dochází k postupné inhibici buněčného dýchání a k dušení. Rychlost inhibice je přímo úměrná množství kyanidu. Venózní krev obsahuje za těchto podmínek zvýšenou koncentraci oxyhemoglobinu z důvodu blokovaného využití kyslíku pro tkáň a její zbarvení je světle červené. Kyanid se vstřebává do organismu v různých formách, a to nejrychleji plicemi, dále zažívacím traktem a pokožkou. Mezi počáteční klinické příznaky otravy patří rozšíření zornic, nauzea, bušení srdce, dyspnea, halucinace, únava a bolest hlavy, po kterých může následovat pokles krevního tlaku, zpomalení srdečního rytmu a zástava srdce. Tyto účinky jsou způsobené nedostatkem  $\text{O}_2$ , na který je nejcitlivější nervová tkáň

(mozkové buňky odumírají již po pěti minutách bez kyslíku). Při těžších otravách může také docházet k hypoxickým křečím [22].

Kyanid a jeho sloučeniny patří do skupiny jedů s nejrychlejším účinkem, smrt může nastat při vysokých dávkách už do několika minut od expozice. Letální dávka HCN může být u člověka (dospělého muže o váze 80 kg) již 50 mg. Smrt nastává v důsledku intracelulární anoxie v centrech v prodloužené míše [23; 22].

V případě intoxikace je nutné rychle provést účinná léčebná opatření. Po přemístění postiženého ze zamořeného prostředí nebo odstranění zdroje intoxikace se využívá zvrát vazby  $\text{CN}^-$  na  $\text{Fe}^{3+}$  cytochromoxidasu dostatečnou nabídkou železitých iontů. Podávají se nitrity schopné oxidovat  $\text{Fe}^{2+}$  hemoglobin na  $\text{Fe}^{3+}$  methemoglobin, který váže  $\text{CN}^-$ . Inhaluje se amylium nitrosum (dusitan amylnatý), nebo je možné podávat intravenózně roztok dusitanu sodného. V případě, že došlo ke kontaminaci inhalací, je možné aplikovat kyslíkovou masku. Alternativní metodou je podání šestimocných kobaltových sloučenin; důvodem je jejich velká afinita k  $\text{CN}^-$  vazbě za tvorby komplexů [23; 22].

## 2.4 Fenoly

### 2.4.1 Vlastnosti fenolů

Fenoly jsou organické látky obsahující hydroxylovou funkční skupinu (OH), která se váže přímo na aromatický kruh (benzenové jádro). Fenoly patří do skupiny pevných krystalických látek s jedinou výjimkou, kterou je kapalný *m*-kresol. Fenoly jsou bezbarvé, při reakci se vzduchem se barví do červena až fialova. Jejich teplota varu je obecně vyšší, než by se očekávalo vzhledem k jejich molekulové hmotnosti z důvodu tvorby vodíkových můstků. Jsou dobře rozpustné v etheru a ethanolu, naopak špatně rozpustné ve vodě. V případě, že se rozpouštějí v roztoku hydroxidů alkalických kovů (Na, Li, K), vznikají sloučeniny fenoláty (soli fenolů) [24].

Fenoly mají široké spektrum biologických účinků, jsou antiseptické, a proto se dříve hojně používaly k desinfekci; avšak na člověka mají toxické i karcinogenní účinky. Reaktivitu fenolů ovlivňuje jak hydroxyskupina, tak i aromatické jádro. Hydroxyskupina je substituentem 1. řádu, což znamená, že má kladný mezomerní efekt (dodává elektrony do konjugovaného systému) [24].

#### 2.4.2 Výskyt v odpadních vodách

Fenoly vyskytující se v odpadních vodách pocházejí z mnoha zdrojů, a to z koksárenského průmyslu, městských odpadů, z farmaceutického průmyslu jako antimikrobiální činidlo, nemocničních odpadů, petrochemie a dále z procesu zpracování oliv a uzení masa [6; 14].

V prostředí se mohou vyskytovat také přirozené fenolové látky, které jsou produkty rostlin a živočichů. Mohou vznikat i organickým rozkladem látek, jako např. isopropylbenzenu (triviální název kumen), který je velmi využívanou surovinou, nejvíce v USA, kde se používá až pro 97% celkové výroby fenolu. Proto byl zařazen agenturou pro ochranu přírody v USA mezi prioritní znečišťující látky [19]. Další možností je získávání fenolu z černouhelného dehtu, z frakce nazývané karbolový olej. Jestliže není v podzemních vodách dostatečné množství kyslíku, stávají se fenoly stabilnější a hůře odbouratelné a zpracovatelné [25; 26].

Fenol a jeho deriváty i přes jejich nízkou těkavost patří mezi významné znečišťující látky odpadních a podzemních vod. Vodní ekosystémy jsou velmi citlivé na toxicitu fenolů a jejich derivátů; velmi škodlivé jsou např. chlorfenoly, které jsou bioakumulativní a vznikají při úpravě vody procesem chlorace. Nejčastěji se k odbourávání fenolů využívají fyzikálně-chemické metody jako například oxidace peroxidem vodíku nebo ozonem, či elektrochemické oxidace. Dalšími metodami je membránová separace, extrakce rozpouštědlem, destilace nebo adsorpce na porézní materiál. Tyto metody mají vysokou účinnost s různými

fenolovými sloučeninami, ale nevýhodou těchto procesů jsou jejich vysoké nároky na energii [24; 17; 8].

Biologická degradace fenolů je v současné době alternativní a velmi rychle se rozvíjející metodou pro dekontaminaci ekosystémů. Výhodou je možnost degradovat fenoly přímo v prostředí, z čehož plynou hlavně ekonomické výhody oproti fyzikálně-chemickým metodám. Principem mikrobiální degradace je schopnost některých organismů využívat fenol jako jediný zdroj energie a uhlíku. Mezi tyto organismy patří např. *Pseudomonas putida*, *Rhodococcus erythropolis* nebo *Bacillus subtilis*. Uvádí se, že nativní mikrobiální druhy se lépe adaptují než mikroorganismy, které přirozeně nepatří do určitého ekosystému a nejsou proto schopné konkurovat nepůvodním mikroorganismům při sanaci znečištěného území [27; 28; 29].

Mikroorganismy přeměňují fenoly pomocí kaskády enzymů jako např. oxygenas, která se dělí na monooxygenasy a dioxygenasy, dále pomocí peroxidas a fenolhydroxylas. Právě oxygenasy katalyzují klíčový krok v metabolismu aromatické sloučeniny: pomocí hydroxylace dochází k narušení rezonanční struktury a následně je pomocí enzymu dioxygenasy aromatická sloučenina přeměněna na katechol (1,2-benzendiol). Aktivita metabolických procesů mikroorganismů je ovlivňována teplotou; nižší teplota zpomaluje až zastavuje transformaci fenolů, vysoká teplota naopak může způsobit vytěkání fenolů. Transformace probíhá u výše uvedených bakterií v rozmezí pH 5-8. Další z biologických možností představují houby. Jejich výhodou je hojný výskyt, růst v extrémních podmínkách jako nedostatek živin, nízké pH či omezený přísun vody. Jsou také schopny přežít v přítomnosti různých xenobiotik, které jsou toxické pro řadu dalších. Příkladem jsou houby bílé hniloby dřeva, které mají enzymové vybavení pro rozklad ligninu a příbuzných aromatických látek [30; 27].



### 2.4.3 Toxicita a odbourávání

Fenol je chemická látka, která může způsobit vážné poškození zdraví a ve velkých dávkách i smrt. Do organismu se fenol může dostat přes sliznice a kůži nebo plícemi. V organismu dochází k jeho částečné metabolizaci na hydrochinon a katechol. Z těla je následně vyloučen močí ve formě konjugátů s kyselinou sírovou. Pokud je fenol v koncentraci vyšší než 1 %, má již leptavé účinky, více než 10 % koncentrace způsobuje nekrózy. Trvalé poškození oka nastává potřísněním při koncentraci vyšší než 15 % [22].

Po adsorpci může dojít k životu ohrožujícím stavům z důvodu akutní intoxikace, při akutní fázi dochází nejdříve k napadení CNS a jako symptomy se objevují křeče, slabost, zvracení, bolest břicha, závrať a bezvědomí. V chronické fázi se přidává poškození ledvin například ve formě hematurie. Toxická dávka pro dospělého je 1-2 g, letální je 2-10 g. Citlivost dětí na fenol je mnohem vyšší než u dospělých [22].

Při kontaminaci fenolem je nutné izolovat postiženého od zdroje intoxikace, a následně dle formy intoxikace zahájit první pomoc. Při lokálním zasažení pokožky fenolem není vhodné použít pro oplach vodu, která zvyšuje penetraci. Doporučení je tedy setřít plochu tampóny s olivovým olejem. V případě požití fenolu je vhodné použít medicínální uhlí, jak bylo prokázáno *in vitro* pokusy [22; 23].

### 3 CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části je rešerše shrnující bioremediační a detoxikační potenciál hub, výskyt kyanidů a fenolů v odpadních vodách, způsoby jejich eliminace a výskyt, funkce a biotechnologické využití kyanidhydratas.

Cílem praktické části je rekombinantní exprese vybrané kyanidhydratasy, tj. exprese genu v *E. coli*, stanovení aktivity takto získaných buněk, purifikace enzymu a stanovení jeho vlastností (pH a teplotních profilů, stability). Podle výsledků enzymové degradace kyanidu na formamid pomocí tohoto enzymu bude posouzena vhodnosti enzymu pro detoxifikaci kyanidu v odpadních vodách. Dále bude provedena *in silico* sekvenční analýza kyanidhydratas z vláknitých hub, zejména oddělení *Basidiomycota*, a srovnání s nitrilasami.

## 4 METODIKA

### 4.1 Vybavení, přístroje

#### 4.1.1 Přístroje

- Äktapurifier™ (GE Healthcare, Velká Británie)
- Centrifuga Beckman Avanti JXN-26 (Beckman Coulter, USA)
- Centrifuga Minicentrifuge Eppendorf MiniSpin Eppendorf, Německo),
- Eppendorf Centrifuge 5804 R (Eppendorf, Německo)
- HPLC (IndianMART, Indie)
- Kolony pro purifikace (Äktapurifier™) – HiTrap Phenyl Sepharose 6 Fast Flow; HiPrep Sephacryl HR column (60 × 26 mm)
- Kolony pro HPLC Chromolith SpeedRod RP-18 (50 × 4,6 mm; Merck, USA), ACE C8 (5 µl, 250×4 mm; ACT, Polsko)
- Magnetická míchačka Arex (VELP Scientifica)
- pH metr - pH 211 Microprocessor pH Meter (Hanna Instruments, Česká republika)
- Sonikátor Bandelin Sonopuls (Bandelin, Německo)
- Sorvall centrifuge RC G+ (Thermo Fischer Scientific, USA) ;
- Spektrofotometr UVmini-1240 (Shimadzu, Japonsko)
- Termomixér Eppendorf Thermomixer Comfort (Eppendorf, Německo)
- Třepačka IKA KS 4000 ic control (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Německo)
- Váhy Preciosa 80A-200M (Swiss Quality, Švýcarsko)
- Vortex Grant-bio (Grant Instruments, Velká Británie)

#### 4.1.2 Kultivační médium a roztoky

Kultivační medium pro *E. coli* - TY medium: trypton 16 g, NaCl 5 g, kvasničný extrakt 10 g, doplnit destilovanou vodou do 100 ml, pH 7 ( upraveno pomocí 5M NaOH)

Pevné kultivační medium pro *E. coli* - LB agar: NaCl 10 g, trypton 10 g, kvasničný extrakt 5 g, agar 20 g, doplnit vodou do 1 l

0,5% kyselina pikrová: kyselina pikrová 0,05 g, 10 ml 25mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

1,23 M chlorid železitý: FeCl<sub>3</sub> 1,995 g, 0,59 ml koncentrované HCl, doplnit destilovanou vodou do 10 ml

2,3M hydroxylamin: 1,598 g NH<sub>2</sub>OH, doplnit destilovanou vodou do 10 ml

3,5M NaOH: 3,5 ml 10M NaOH, 7,5 ml destilované vody

Pufr 50 mM TRIS/HCl s 1M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8

Pufr 50 mM TRIS/HCl 150 mM NaCl, pH 8

Pufr acetonitril/ 5mM natriumfosfátový, pH 7,2

Pufr 50mM TRIS/HCl pH 8, 50 mM NaCl

Pufr 1,5M TRIS/HCl 100 μl 10% SDS, 100 μl 10% APS a 4 μl TEMED pH 8,8

Činidlo pro metodu OPA (80 mg OPA v 400 μl methanolu bylo rozpuštěno v 40 ml 15 mM tetraborátu sodného, pH 9,25)

Vzorkový pufr pro SDS-PAGE (250 mM TRIS, 500 mM DTT, 10 % SDS, 0,5 % bromfenolová modř a 50 % glycerol).

Britton a Robinson pufr, složka A (0,04 M kyseliny boritá, 0,04 M kyselina octová a 0,04 M kyselina trihydrogenfosforečná) a složka B (0,2 M hydroxid sodný)

Bradfordovo činidlo Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad, USA)

Coomassie blue (2,5 g Coomassie Brilliant Blue R, 455 ml methanolu, 455 ml destilované vody, 90 ml kyseliny octové)

TRIS/HCl (1,5 M, pH 8,8), 100  $\mu$ l 10% SDS, 100  $\mu$ l 10% APS a 4  $\mu$ l TEMED

10 % SDS gel (4 ml destilované vody, 3,3 ml 30% polyakrylamidu, 2,5 ml TRIS/HCl (1,5 M, pH 8,8), 100  $\mu$ l 10% SDS, 100  $\mu$ l 10% APS a 4  $\mu$ l TEMED (tetramethylethylendiamid))

Zaostřovací gel (3,4 ml destilované vody, 830  $\mu$ l 30% polyakrylamidu, 630  $\mu$ l TRIS/Cl (1 M, pH 6,8), 50  $\mu$ l 10% SDS, 50  $\mu$ l 10% APS a 5  $\mu$ l TEMED

Modelová koksárenská odpadní voda byla připravena dle Papadimitriou a kol. [26]. Pro přípravu 250 ml modelové vody, která svým složením simuluje složení odpadních koksárenských vod, bylo naváženo 500 mg octanu sodného, 25 mg chloridu sodného, 12,5 mg chloridu vápenatého, 5 mg chloridu draselného, 150 mg chloridu amonného a 83 mg hydrogenfosforečnanu draselného, 100 mg fenolu a 50 mg thiokyanátu. Takto připravená laboratorní voda má pH ca. 7. Z předem připraveného zásobního roztoku bylo odebráno 9,9 ml roztoku a bylo přidáno 100  $\mu$ l 500 mM kyanidu. Skutečná odpadní voda byla poskytnuta Třineckými železárnami, a.s.

#### 4.1.3 Substráty

Všechny uvedené substráty byly pořízeny od firmy Sigma-Aldrich a byly připraveny zásobní roztoky o požadované koncentraci.

500 mM KCN (0,0325 g/ml), každý den připraven nový roztok

500 mM fenol (0,0470 g/ml), skladován při 4 °C

500 mM fumaronitril (0,0395 g/ml), skladován při 4 °C

500 mM 2-kyanopyridin (0,052 g/ml), skladován při 4 °C

#### 4.1.4 Biologické materiály

Rekombinantní kmen *E. coli* ORIGAMI/pET22bcynSH+pGro 7 nesoucí geny pro kyanidhydratasu z *S. hirsutum* a pro chaperon GroEL/ES, který je nutný pro správné skládání enzymu při expresi.

Syntéza genu pro kyanidhydratasu optimalizovaného pro *E. coli* byla provedena pomocí GeneArt. Expresní vektor byl zkonstruován klonováním genu do míst *NdeI* a *XhoI* v pET22b+ a použit k transformaci *E. coli* Origami B, který koexprimuje GroEL/ES chaperon (MBÚ AV ČR, v.v.i., nepublikované výsledky).

## 4.2 Sekvenční analýza

Pro vyhledávání sekvencí v databázi GenBank byl využit program BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Po zadání identifikačního čísla sekvence do vyhledávače byly nalezeny enzymy s podobnou strukturou, shoda byla vyjádřena v %. Následně byly zkonstruovány fylogenetické stromy na základně podobnosti pro konkrétní enzymy. A to metodou spojování sousedských skupin, dle shody v sekvenci.

### 4.3 Kultivace buněk *E. coli*

Zpracování syntetického genu a transformaci do *E. coli* provedl jiný zaměstnanec laboratoře molekulární genetiky bakterií Ing. Lenka Rucká, Ph.D (nepublikované výsledky). Buňky byly sterilně zaočkovány z jedné izolované kultury *E. coli* ORIGAMI/pET22bcynSH+pGro 7, která narostla na LB agaru (ampicilin 10 mg/ml, chloramfenikol 3,5 mg/ml), do 100 ml TY media (4.1.2) a poté bylo přidáno 100  $\mu$ l roztoku ampicilinu (zásobní roztok o koncentraci 100 mg/ml byl nejdříve 10krát naředěn destilovanou vodou) a 100  $\mu$ l roztoku chloramfenikolu (zásobní roztok o koncentraci 35 mg/ml byl nejdříve 10krát naředěn destilovanou vodou). Kultura byla inkubována při 37 °C, 170 ot·min<sup>-1</sup> do dosažení optické hustoty cca 1.

Po přidání 2  $\mu$ l roztoku IPTG (1M isopropyl-1-thio  $\beta$ -D-galaktopyranosid; indukuje expresi proteinu) do výsledné koncentrace 0,02 mM, a 0,17% arabinosy (indukuje produkci chaperonu), byly buňky kultivovány 20 h při 20 °C 170 ot·min<sup>-1</sup>. Poté byly šokově zmrazeny na -80 °C a při této teplotě skladovány do doby použití pro stanovení enzymových aktivit a purifikaci exprimovaného enzymu.

Medium s buňkami bylo rozděleno do dvou kyvet a centrifugováno 5 min při 5000 ot·min<sup>-1</sup> (centrifuga Beckman Avanti JXN-26). Supernatant byl odstraněn, pelet promyt TRIS pufrem (50 mM TRIS/HCl s 1M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8) s PMSF (fenylmetansulfonylfluorid) a resuspendován v tomto pufru na 10 ml.

Buňky byly dezintegrovány sonikací, která probíhala v 8 cyklech po 30 sekundách, při 20% výkonu sonikátoru; mezi jednotlivými cykly se buňky chladily na ledu. Po sonikaci proběhla centrifugace buněk při 27 000 ot·min<sup>-1</sup> po dobu 20 min při 4 °C (centrifuga Beckman Avanti JXN-26). Supernatant byl použit pro stanovení aktivit a purifikaci.

## 4.4 Stanovení aktivity enzymu

### 4.4.1 Stanovení aktivity celých buněk

Pro stanovení aktivity byla použita přeměna kyanidu na formamid s následným spektrofotometrickým stanovením formamidu (viz 4.6.1). Reakční směs obsahovala 475  $\mu\text{l}$  buněčné suspenze (optická densita měřená při 600 nm byla 0,1) v 50 mM TRIS/HCl pufru se 150 mM NaCl o pH 8. Takto připravená směs byla preinkubována v termomixéru 5 min při 30 °C a 850  $\text{ot}\cdot\text{min}^{-1}$ . Po 5 min preinkubace byla reakce zahájena přidáním 25  $\mu\text{l}$  500 mM KCN (výsledná konc. 25 mM KCN). Reakce probíhala za stejných podmínek jako preinkubace. Po 5 min bylo odebráno 200  $\mu\text{l}$  směsi, kde byla reakce zastavena přidáním 400  $\mu\text{l}$  96% methanolu. Tato směs byla centrifugována (13 400 g, 4 min), veškerá stanovení se prováděla v triplicátech. Výsledkem je aktivita v U/mg, kde U je množství enzymu, které za daných podmínek (30 °C, pH 8) přemění 1  $\mu\text{mol}$  HCN za 1 min. Kontrolní stanovení bylo provedeno se vzorkem, který neobsahoval buňky (tj. obsahoval jen pufr).

### 4.4.2 Stanovení aktivity purifikovaného enzymu

Reakční směs obsahovala 25  $\mu\text{l}$  enzymu (naředěného podle koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích 0,2 mg/ml reakční směsi) a 450  $\mu\text{l}$  50 mM TRIS/HCl pufru se 150 mM NaCl o pH 8. Dále se postupovalo jako v části 4.4.1. Kontrolní stanovení bylo provedeno se vzorkem, který neobsahoval enzym (tj. obsahoval jen pufr).

### 4.4.3 pH optimum celých buněk

Postupovalo se jako v části 4.4.1 s tím rozdílem, že buněčné suspenze byly připraveny v pufrch o různých pH. Byly použity pufrы podle Brittona a Robinsona. pH pufru bylo určeno poměrem těchto složek (viz příloha č.4), v tomto případě byla použita stupnice pH od 5,0 do 11,9 .



#### 4.4.4 pH optimum purifikovaného enzymu

Postupovalo se jako v části 4.4.2 a byly použity pufrы podle části 4.4.3.

#### 4.4.5 pH stabilita celých buněk

Pro stanovení pH stability byly použity buněčné suspenze připravené v pufrách o různém pH (viz 4.4.3), které byly následně preinkubovány v termomixéru 120 min při 30 °C a 850 ot · min<sup>-1</sup>). Dále se postupovalo jako v části 4.4.1.

#### 4.4.6 pH stabilita purifikovaného enzymu

Postupovalo se jako v části 4.4.5 s tím rozdílem, že místo buněčných suspenzí byly použity roztoky enzymů v pufrách o různých pH podle 4.4.3.

#### 4.4.7 Teplotní optimum celých buněk

Pro stanovení teplotního optima byla buněčná suspenze (OD<sub>600</sub> = 0,1) v 50 mM TRIS/HCl pufru se 150 mM NaCl o pH 8 rozdělena do mikrozkušavek po 475 μl. Jednotlivé mikrozkušavky se preinkubovaly v termomixéru při odlišných teplotách, a to 10, 15, 20, 25, 35, 40, 45, 50 a 60 °C, po dobu 5 min při 850 ot · min<sup>-1</sup>. Dále se postupovalo jako v části 4.4.1.

#### 4.4.8 Teplotní optimum purifikovaného enzymu

Postupovalo se jako v části 4.4.7 s tím rozdílem, že místo buněčné suspenze byl použit roztok enzym podle části 4.4.2.

#### 4.4.9 Teplotní stabilita celých buněk

Výše uvedená směs (viz 4.4.7) byla rozdělena do mikrozkušavek po 475 μl a jednotlivé mikrozkušavky se preinkubovaly v termomixéru při odlišných

teplotách, a to 10, 15, 20, 25, 35, 40, 45, 50 a 60 °C, po dobu 180 min při 850 ot · min<sup>-1</sup>. Dále se postupovalo jako v části 4.4.1.

#### 4.4.10 Teplotní stabilita purifikovaného enzymu

Postupovalo se jako v části 4.4.9 s tím rozdílem, že místo buněčných suspenzí byl použit roztok enzym podle části 4.4.2.

#### 4.4.11 Substrátová specifita

Při stanovení substrátové specifity se postupovalo jako v části 4.4.1, ale jako substráty byly mimo KCN použity fumaronitril, 2-kyanopyridin nebo benzonitril (500mM zásobní roztoky). Výsledná koncentrace substrátu byla vždy stejná, jako když byl substrátem kyanid (25 mM).

#### 4.4.12 Stanovení kinetiky pro substrát kyanid

Pro stanovení kinetických vlastností enzymu bylo potřeba 500 µl reakční směsi, která obsahovala 25 µl roztoku enzymu (naředěného podle koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích) a 450 µl pufru 50 mM TRIS/HCl s 150 mM NaCl o pH 8. Po preinkubaci za standardních podmínek (viz 4.5.1) byla přidána různá množství 500mM kyanidu do počáteční koncentrace 5, 10, 20, 30, 40 nebo 50 mM. Reakční směs byla doplněna pufrům tak, aby bylo ve všech reakcích 500 µl. Dále se postupovalo podle části 4.4.1. Hodnoty počátečních rychlostí reakcí byly vyneseny v závislosti na příslušných počátečních koncentrací substrátu v programu GraphPad Prism 7.0. Nelineární regresí byly vyhodnoceny kinetické parametry maximální rychlost  $V_{max}$  a Michaelisova konstanta  $K_m$ .

## 4.5 Purifikace proteinu

### 4.5.1 Zakoncentrování vzorku

Zakoncentrování extraktu z buněk (viz 4.3) bylo provedeno ultracentrifugací při 15 000 ot · min<sup>-1</sup> po dobu 8 min při 4 °C. Při ultracentrifugaci byl použit filtr Amicon ultra 10 kDa

### 4.5.2 Hydrofobní chromatografie

Purifikace hydrofobní chromatografií byla provedena na koloně HiTrap Phenyl Sepharose 6 Fast Flow/low sub (1 ml). Byl použit program UNICORN. Kolona byla nejdříve promývána ekvilibračním pufrem 50 mM TRIS/HCl s 1M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> při průtoku 0,5 ml/min po dobu 20 min. Po ustálení konduktivity byl nanesen vzorek (10 ml) při průtoku 0,25 ml/min. Po nanesení vzorku byla kolona promývána ekvilibračním pufrem 50 mM TRIS/HCl s 1M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,5 ml/min) po dobu 20 min. Eluce byla prováděna pomocí gradientu a to z 1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> na 0 M v 50 mM TRIS/HCl pufru (30 ml, 0,5 ml/min). Při tomto procesu dochází k poklesu konduktivity. Po dobu poklesu konduktivity byly odebírány vzorky pro další zpracování. Po skončení eluce byla kolona promývána ultračistou vodou (pro HPLC) při průtoku 2ml/min, 1M NaOH, destilovanou vodou a nakonec 20% ethanolem. Každá fáze promývání probíhala minimálně 20 minut. Před další purifikací bylo vzorek opět zakoncentrován (viz 4.5.1).

### 4.5.3 Gelová permeační chromatografie

Pro purifikaci gelovou permeační chromatografií byla použita kolona HiPrep Sephacryl HR column o objemu 5 ml. V první fázi byla promyta pouze nástřiková smyčka, a to pufrem (50 mM TRIS/HCl pH 8, 150 mM NaCl). Postupně byl zvyšován průtok z 1 ml/min až na 4 ml/min. Následně byla instalována kolona pomocí redukci na obou koncích kolony. Byl spuštěn program UNICORN. Kolona, která byla uchovávána ve 20% ethanolu, byla promývána přefiltrovanou

destilovanou vodou pro HPLC (0,5 ml/min) po dobu 3 h. Následně byla spuštěna ekvilibrace pomocí pufru (50 mM TRIS/HCl pH 8, 50 mM NaCl) při průtoku 0,5 ml/min. Ekvilibrace probíhala přes noc při průtoku 0,2 ml/min. Poté byl nanesen koncentrovaný vzorek proteinu (2,5 ml) a při průtoku 0,5 ml/min byly jímány frakce (2 ml), které byly dále analyzovány. Po skončení separace byla kolona promývána vodou pro HPLC (2ml/min), 1M NaOH, vodou pro HPLC a nakonec 20% ethanolem. Každá fáze promývání probíhala minimálně 20 min.

## 4.6 Analytické metody

### 4.6.1 Spektrofotometrické stanovení kyanidu s kyselinou pikrovou

Kyanid byl stanoven metodou podle Fischera a Browna (1952) [31]; provedení bylo mírně modifikováno. Pro stanovení kyanidu bylo použito 100  $\mu$ l vzorku, který obsahoval 30  $\mu$ l supernatantu reakční směsi (viz 4.5) a 70  $\mu$ l 50mM TRIS/HCl pufru se 150mM NaCl (pH 8). Po přidání 200  $\mu$ l 0,5% kyseliny pikrové (2,4,6 -trinitrofenol) byly vzorky inkubovány ve vroucí vodě po dobu 5 min a reakce byla ukončena ochlazením v ledové vodě. Po ochlazení vzorků bylo přidáno 700  $\mu$ l destilované vody. Absorbance vzorků byla stanovena spektrofotometrem UVmini-1240 při 520 nm. Výpočet koncentrace byl proveden z kalibrační řady pro stanovení kyanidu (viz příloha č.1). Veškerá měření se prováděla v triplicátech.

### 4.6.2 Spektrofotometrické stanovení formamidu s hydroxylaminem

Formamid byl stanoven metodou podle Cantarely [30], provedení bylo mírně modifikováno. Pro spektrofotometrické stanovení formamidu bylo použito 200  $\mu$ l supernatantu reakční směsi (viz 4.5), ke kterému bylo přidáno 400  $\mu$ l směsi 3,5M NaOH a 2,3M hydroxylaminu (1:1). Inkubace probíhala při 60 °C po dobu 10 min, při 850 ot·min<sup>-1</sup>. Poté bylo přidáno 200  $\mu$ l 4M HCl a 200  $\mu$ l 1,23M FeCl<sub>3</sub>. Ve vzorcích byla stanovena absorbance na spektrofotometru UVmini-1240 při 540 nm.

Výpočet koncentrace byl proveden z kalibrační řady pro formamid (viz příloha č. 2). Veškerá měření se prováděla v triplikátech.

#### 4.6.3 Stanovení amonných iontů s *o*-ftaldialdehydem (OPA)

Byla použita metoda podle Blacka [32], která byla mírně modifikována. Do mikrozkušky bylo napipetováno 186  $\mu$ l 50% DMSO, následně bylo přidáno 132  $\mu$ l činidla a 66  $\mu$ l supernatantu reakční směsi (viz 4.5). Po promíchání bylo přidáno 66  $\mu$ l 10% kyseliny trichloroctové. Nakonec bylo přidáno 450  $\mu$ l 50% DMSO. Inkubace probíhala 10 minut při laboratorních podmínkách. Následovalo spektrofotometrické stanovení na spektrofotometru UVmini-1240 při 675 nm. Výsledná hodnota byla stanovena z kalibrační řady pro chlorid amonný (viz příloha 3). Kalibrace byla provedena zaměstnancem laboratoře Mgr. Petrem Novotným.

#### 4.6.4 Stanovení proteinu

Množství proteinu bylo stanoveno metodou podle Bradforda [33]. Vzorky obsahovaly 5, 15 nebo 25  $\mu$ l vzorku v celkovém objemu 25  $\mu$ l (objem byl případně upraven destilovanou vodou). Poté byl přidán 1 ml Bradfordova činidla Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad, USA), zásobní roztok byl připraven naředěním destilovanou vodou v poměru 1:4 a po 5 min inkubace za laboratorní teploty následovalo spektrofotometrické stanovení při 595 nm. Množství proteinu bylo stanoveno z kalibrační řady připravené pro koncentrace 0,1 - 0,8 mg/ml (viz příloha č. 1) Veškeré měření probíhalo v duplikátech.

#### 4.6.5 HPLC

Pro stanovení koncentrací benzonitrilu a fumaronitrilu a jejich reakčních produktů byla použita kolona Chromolith SpeedRod RP-18 (50  $\times$  4,6 mm; Merck) a mobilní fáze acetonitril/ voda v objemovém poměru 20/ 80 s 0,1% kyselinou

fosforečnou. Průtok mobilní fáze byl 2 ml/min. Koncentrace 2- kyanopyridinu (2CP) a jeho reakčních produktů byly stanoveny za použití kolony ACE C8 (5  $\mu$ l, 250 $\times$ 4 mm; ACT) a mobilní fáze složenou acetonitril/ 5mM natriumfosfátový pufr pH 7,2, 20/ 80. Průtok mobilní fáze byl 0,9 ml/min. Teplota kolony byla v obou metodách 35 °C. Substráty a produkty byly identifikovány pomocí retenčních časů a UV spekter autentických standardů. Obsluha zařízení byla prováděna zaměstnancem laboratoře Mgr. Petrem Novotným.

## **4.7 Elektroforéza**

### **4.7.1 SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu**

Vzorky pro elektroforézu obsahovaly 10  $\mu$ l proteinu a 2  $\mu$ l vzorkového pufru. Takto připravené vzorky byly v termomixéru denaturovány při 99 °C po dobu 5 min. Byl připraven 10% SDS gel. Roztok byl napipetován mezi skla v aparatuře, následně byl přelit isobutanolem a po zatuhnutí (1 hodina při 37° C) a odsátí butanolu byl přidán zaostřovací gel . Do zaostřovacího gelu byl zasazen hřebínek pro vytvoření jamek. Po zatuhnutí gelu byl vytažen hřebínek a desky s gelem vloženy do aparatury, do které bylo poté nalito 700 ml elektrodového pufru (242 g Tris, 57,1 ml kyseliny octové a 100 ml roztoku 500 mM EDTA, pH 8,0) a konečný objem doplněn na 1 l). Do takto připravené aparatury byly nanесeny do jednotlivých jamek vzorky. Jako marker byl použit zásobní roztok LMW (40  $\mu$ l 5krát koncentrovaného roztoku se 160  $\mu$ l vody pro HPLC). Tento marker obsahuje proteiny fosforylasu b (97 kDa), albumin (67 kDa), ovalbumin (45 kDa), karbononanhydrasu (30 kDa), inhibitor trypsinu (20 kDa) a laktalbumin (14 kDa).

První hodinu probíhala elektroforéza při 90 V, následně po zaostření vzorků na rozhraní zaostřovacího a separačního gelu bylo napětí zvýšeno na 130 V.

Elektroforéza byla ukončena ve chvíli, kdy bylo barvivo na konci gelu. Následovalo sejmutí gelu ze skla a obarvení, které probíhalo 10 min pomocí barvy

Coomassie blue. Následovalo odbarvení v odbarvovací lázni pomocí směsi vody, ethanolu a kyseliny octové (450 ml ethanolu, 100 ml kyseliny octové, doplněno do 1 l destilovanou vodou). Poté byl gel uchováván v 1 % kyselině octové.

#### **4.8 Konverze kyanidu v modelové odpadní vodě**

Buněčná suspenze (výsledné  $OD_{600} = 0,1$ ) v modelové odpadní vodě (4.1.2) byla inkubována při 30 °C; během inkubace byly odebírány vzorky a provedeno standardní stanovení kyanidu s kyselinou pikrovou (viz 4.6.1.) a stanovení formamidu s hydroxylaminem (viz 4.6.2).

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Sekvenční analýza kyanidhydratas a nitrilas u vláknitých hub

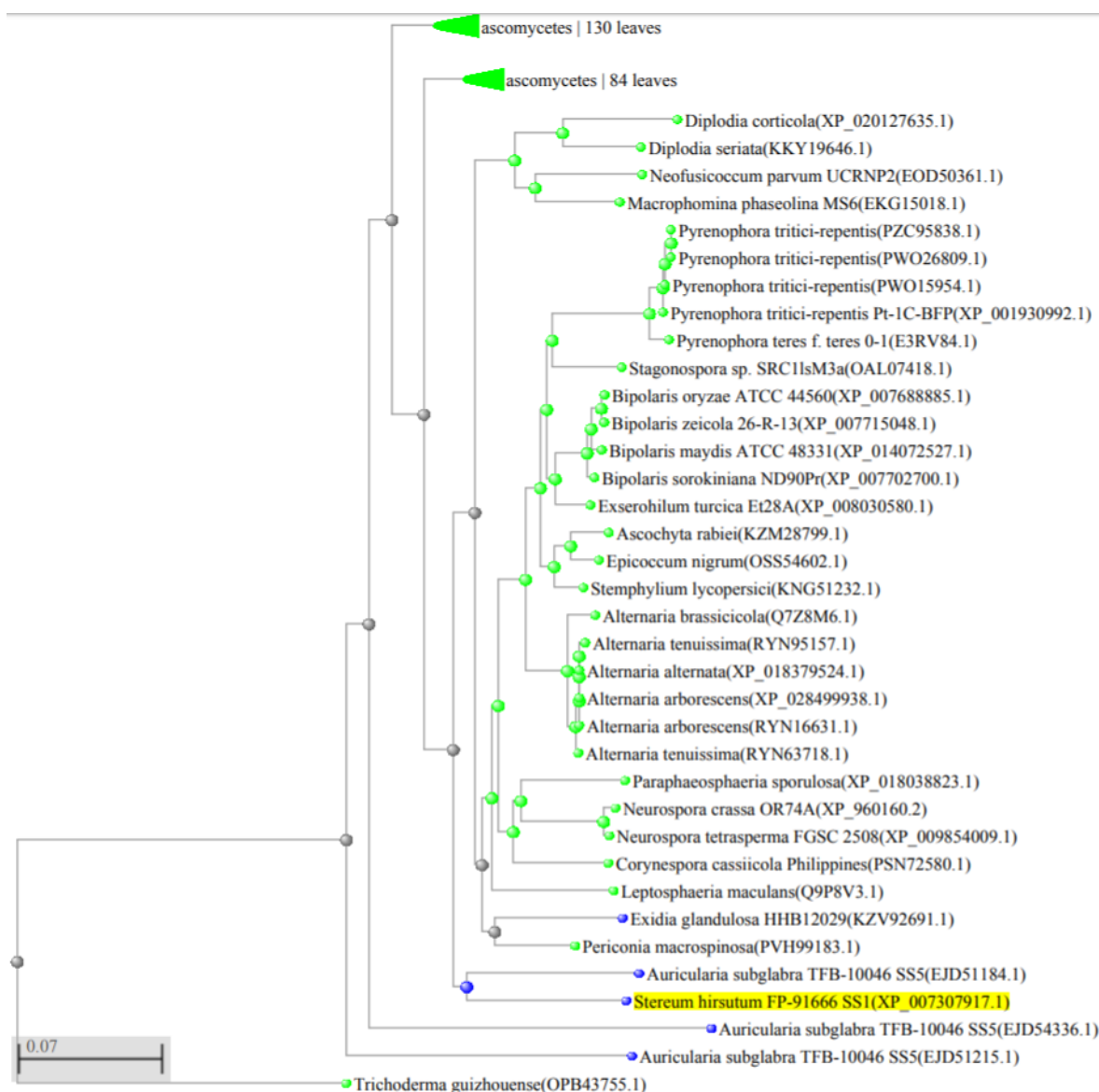
#### 5.1.1 Kyanidhydratasy

Kyanidhydratasa s identifikačním číslem GenBank: XP\_007307917.1 pochází z houby *Stereum hirsutum* z oddělení *Basidiomycota* (kmene FP-91666 SS1). Obsahuje 371 aminokyselin. Tento enzym byl vybrán k charakterizaci v rámci předchozího řešení projektu „Nové proteiny "nitrilasové nadrodiny" u *Basidiomycot* ...“ (GAČR 18-00184S) a před zahájením této bakalářské práce byla předběžně potvrzena jeho kyanidhydratasová aktivita pro substrát KCN (za použití celých buněk *E. coli* exprimujících daný gen)

Na začátku této bakalářské práce byly v databázi GenBank vyhledávány sekvence příbuzné kyanidhydratase z *S. hirsutum*. Touto analýzou bylo zjištěno, že v oddělení *Basidiomycota* obsahují geny pro hypotetické kyanidhydratasy mimo *S. hirsutum* také *Auricularia subglabra* a *Exidia glandulosa*, ale že většina hypotetických kyanidhydratas se vyskytuje u hub oddělení *Ascomycota*. Nejvyšší shodu (více než 85% shodných aminokyselinových zbytků) vykazuje enzym ze *S. hirsutum* s kyanidhydratasami z hub *Auricularia subglabra*, a dále *Corynespora cassiicola*, *Macrophomina phaseolina* a *Diplodia seriata*, které patří do oddělení *Ascomycota*.

Fylogenetický strom (Obr. 3) byl vytvořen pro všechny proteiny se shodou minimálně 60%. Celkově bylo nalezeno 256 proteinů, přičemž 108 proteinů vykazuje větší shodu než 80%. Větší shoda než 70% je cca u 156 proteinů. U proteinů vykazujících takto vysokou shodu s charakterizovaným enzymem lze předpokládat stejnou funkci, jedná se tedy s největší pravděpodobností o funkční kyanidhydratasy.

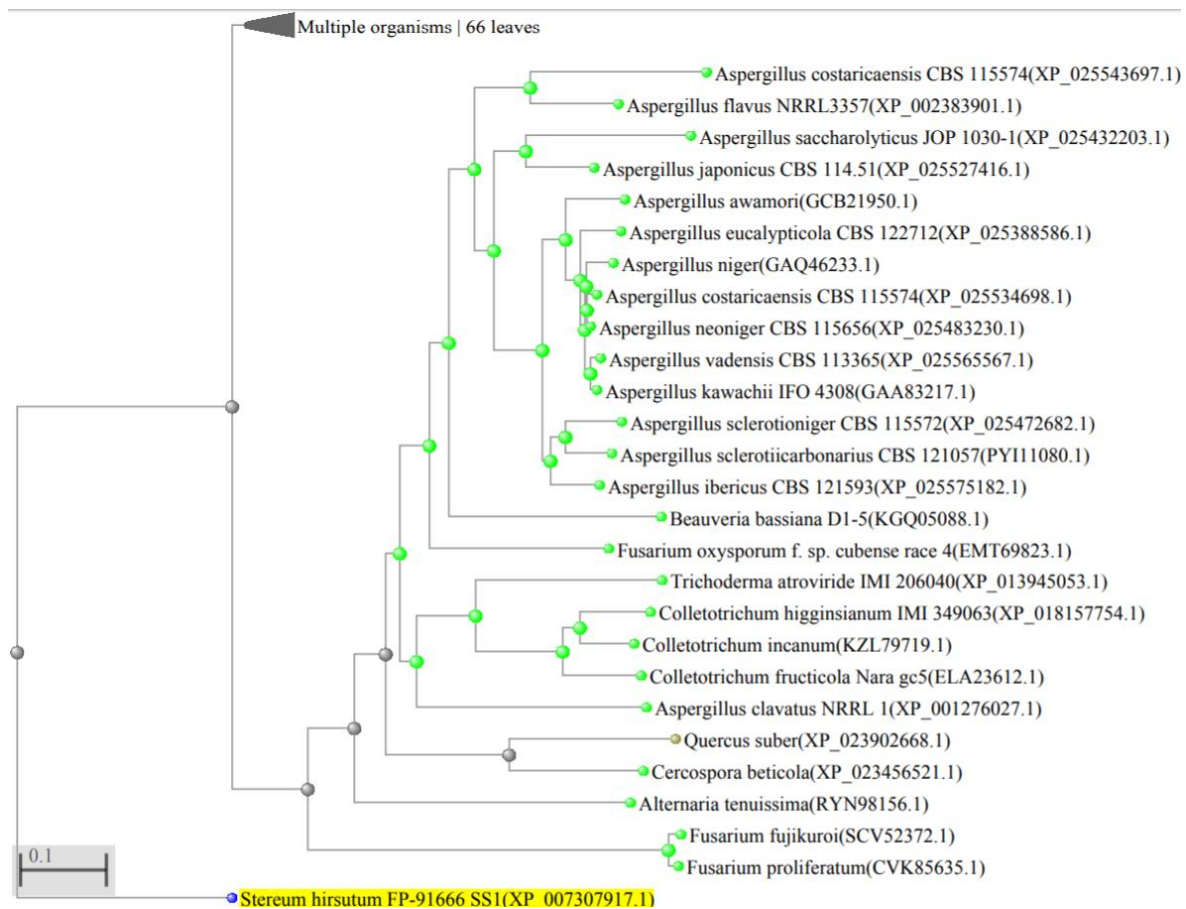




Obr. 3: Fylogenetický strom kyanidhydratas u Basidiomycot (označena modrou barvou) a Ascomycot (označena zelenou barvou).

### 5.1.2 Shoda kyanidhydratasy s nitrilasami

Sekvence kyanidhydratasy z houby *S. hirsutum* byla porovnána se sekvencemi skupiny nitrilas, tj. enzymů hydrolyzujících organické nitrily. Nejvyšší shodu 38,7% vykazovala s nitrilasou *Fusarium proliferatum* (oddělení *Ascomycota*). Celkově bylo nalezeno 96 nitrilas se shodou v rozmezí 30–40 % (Obr. 4). Další nitrilasy vykazují ještě nižší shodu s kyanidhydratasami (v Obr. 4 nejsou tyto nitrilasy uvedeny).

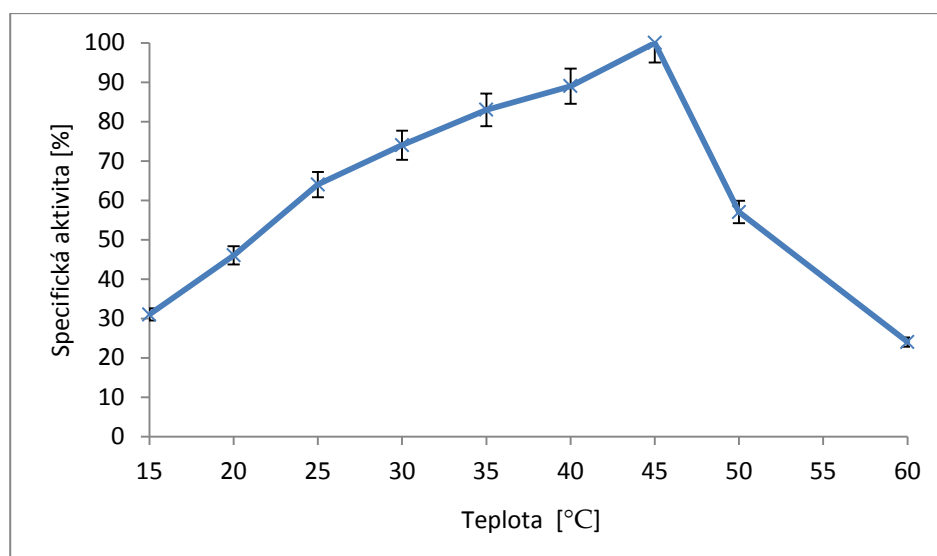


Obr. 4: Fylogenetický strom nitrilas – příbuznost s kyanidhydratasou ze *Stereum hirsutum* (zelenou barvou označena Ascomycota, světle hnědou barvou označeny vyšší dvouděložné rostliny – „eudicots“, ostatní organismy označeny šedou šípkou)

## 5.2 Stanovení vlastností kyanidhydratasy v celých buňkách

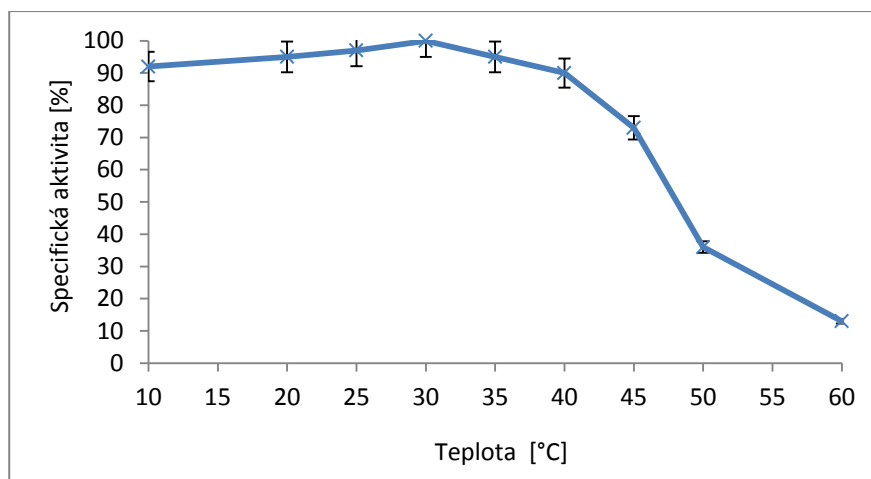
Pro stanovení vlastností kyanidhydratasy byly nejprve použity celé buňky *E. coli* obsahující kyanidhydratasu. Aktivní buňky byly připraveny kultivací v přítomnosti induktoru IPTG. Zároveň byl exprimován chaperon GroEL/GroES potřebný pro správné skládání rekombinantního proteinu. Podrobný popis kultivace je v části 4.3.

Teplotní optimum pro kyanidhydratasu bylo 45 °C, aktivita při této teplotě byla cca. 23 U/mg sušiny pro KCN. Aktivita se s rostoucí teplotou zvyšovala mezi 15 °C a 45 °C, při vyšších teplotách rychle klesala. Aktivita při 60 °C byla nižší než aktivita v 15 °C (Obr. 5).



Obr. 5: Teplotní optimum kyanidhydratasy v buňkách *E. coli*, substrát KCN (25 mM), doba reakce 5 min, pH 8, 100% = 23,1 U/mg sušiny

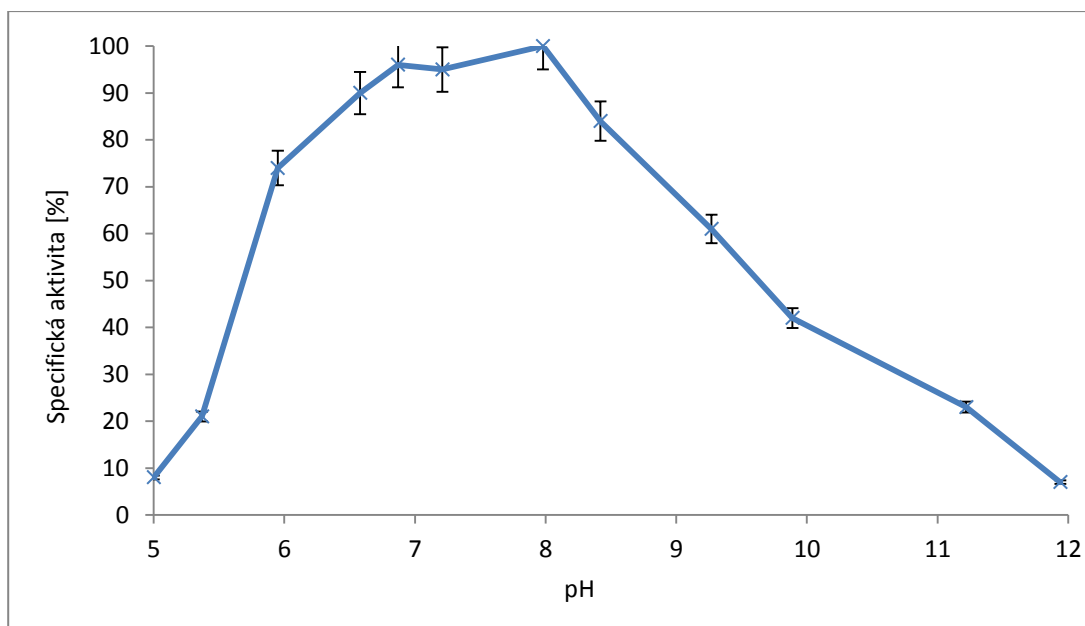
Enzym vykazoval dobrou teplotní stabilitu od 10 °C do 30 °C, aktivita byla při těchto teplotách v rozmezí ca. 25 - 27 U/mg sušiny. Od teploty 30 °C stabilita velmi rychle klesala, při 60 °C byla pouze na úrovni 10 % maxima (Obr. 6).



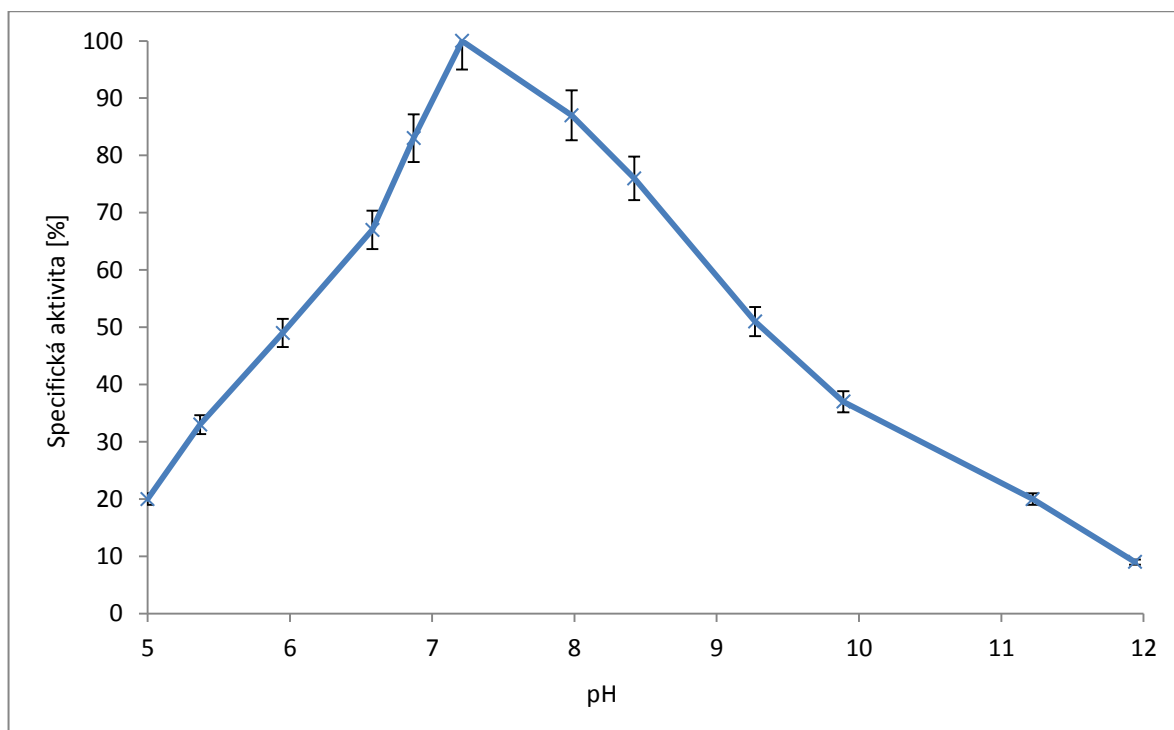
Obr. 6: Teplotní stabilita kyanidhydratasy v buňkách *E. coli*, substrát KCN (25 mM), doba preinkubace 180 min při 10-60 °C, doba reakce 5 min při 30 °C, pH 8, 100% = 27,2 U/ mg sušiny

Pro kyanidhydratasu bylo stanoveno pH optimum 8,0. Při tomto pH měl enzym aktivitu 24,5 U/mg sušiny. V rozmezí pH 6,5-8,0 byly aktivity enzymu nejméně na 90% maximální hodnoty. Naopak při pH nad 9 docházelo k rychlému poklesu aktivity; při pH 10 byla aktivita pouze 40 % maxima, při pH 5 vykazoval enzym aktivitu 10 % maxima, mezi pH 5,3 a pH 6 docházelo k velkému nárůstu aktivity z 20 na 70 % (Obr. 7).

Kyanidhydratasa vykazovala nejvyšší stabilitu při hodnotě pH 7,2. Aktivita při tomto pH byla ca. 23 U/ mg sušiny. Stabilita byla vyšší v mírně zásaditém prostředí než v mírně kyselém. Stabilita byla stejná při pH 5 jako při pH 11,2 (Obr. 8).



Obr. 7: pH optimum kyanidhydratasy v buňkách E. coli, substrát KCN (25 mM), doba reakce 5 min, 100% = 24,5 U/ mg sušiny



Obr. 8: pH stabilita kyanidhydratasy v buňkách E.coli, substrát KCN (25 mM), doba preinkubace 120 min při různých pH, doba reakce 5 min při pH 8, 100% = 23,1 U/ mg sušiny

### 5.2.1 Substrátová specifita kyanidhydratasy v buňkách *E.coli*

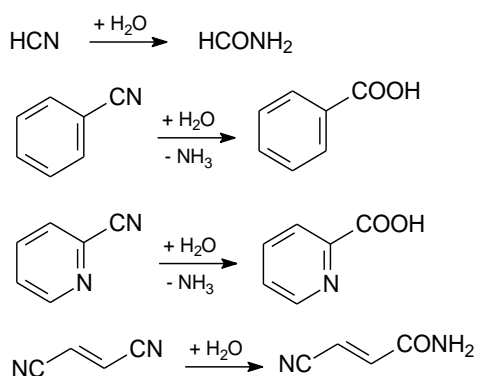
Nejvyšší specifickou aktivitu měl enzym ke KCN, aktivita byla asi 110× vyšší než pro substrát fumaronitril. Fumaronitril a 2-kyanopyridin byly nejlepší substráty z použitých nitrilů, a substrátem enzymu byl také benzonitril (Tab. 1).

Tab. 1: Substrátová specifita kyanidhydratasy v buňkách *E. coli*

Substrát	Aktivita (U/mg sušiny)
KCN	25,4 ± 0,7
2-Kyanopyridin	0,22 ± 0,02
Fumaronitril	0,23 ± 0,07
Benzonitril	0,044 ± 0,005

Podmínky stanovení: Koncentrace substrátů 25 mM, pH 8, 30 °C, doba reakce 10 min.

Produkty konverze kyanidu byl formamid a produkty konverze 2-kyanopyridinu a benzonitrilu byly převážně příslušné karboxylové kyseliny (Obr. 9), jak bylo zjištěno srovnáním s komerčními standardy pomocí HPLC. Naproti tomu byl hlavním produktem transformace fumaronitrilu příslušný kyanamid, tj. 3-kyanakrylamid (Obr. 9). Standard pro tento produkt (komerčně nedostupný) byl připraven jinými pracovníky v laboratoři. Pro další testované substráty jako fenylacetonitril, 3-fenylpropionitril nebo 4-kyanopyridin neměl enzym prakticky žádnou aktivitu.

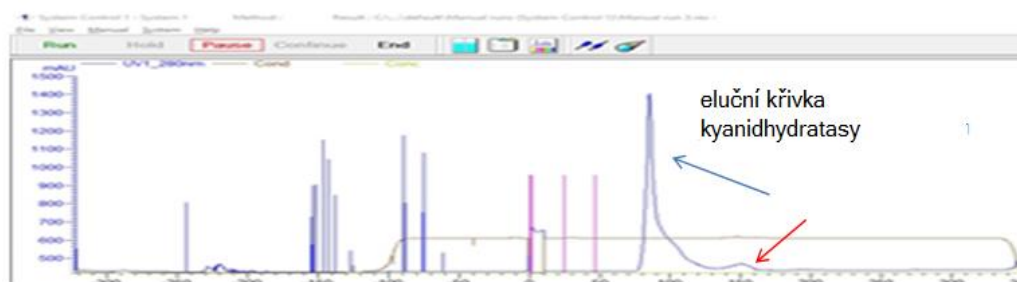


Obr. 9: Reakční produkty biotransformace různých substrátů kyanidhydratasy ze *S. hirtusum*.

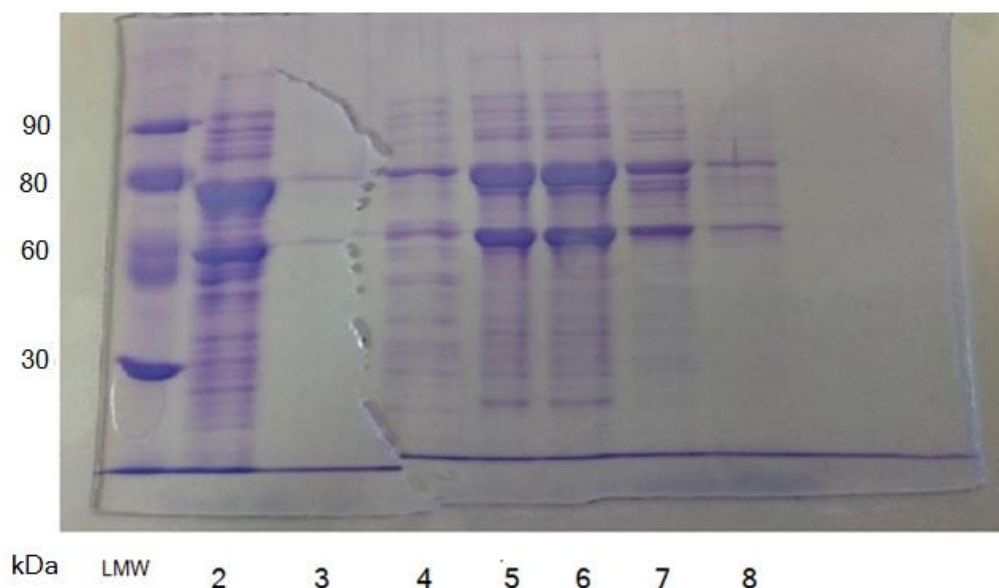
### 5.3 Purifikace kyanidhydratasy

Extrakt byl připraven z buněk *E. coli* kultivovaných podle postupu v části 4. 3 a měl vstupní koncentraci proteinu 17 mg/ml a objem 7,5 ml. Jeho specifická aktivita byla 67 U/mg proteinu pro KCN, tedy více než dvojnásobná ve srovnání s celými buňkami. V prvním kroku byl enzym purifikován hydrofobní chromatografií (Obr. 10). Frakce obsahující protein očekávané velikosti (viz elektroforeogram na Obr. 11), které zároveň vykazovaly nejvyšší aktivitu, byly spojeny a použity pro další purifikaci. Jednalo se o frakce 4-7 o celkovém objemu 3 ml, obsahující 2,2 mg/ml proteinu, tj. celkem ca. 6,6 mg proteinu.

Pomocí SDS-PAGE (elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecyl síranu sodného) byl detegován majoritní protein se zdánlivou molekulovou hmotností kolem 45 kDa, což přibližně souhlasí s teoretickou hodnotou pro tuto kyanidhydratasu - 41,5 kDa. Dalším majoritním proteinem ve vzorku byl chaperon, který měl ve srovnání s kyanidhydratasou vyšší molekulovou hmotnost kolem 70 kDa (byl použit kmen s plasmidem kódujícím komplex chaperonů GroEL a GroES s molekulovými hmotnostmi 58 a 10 kDa).

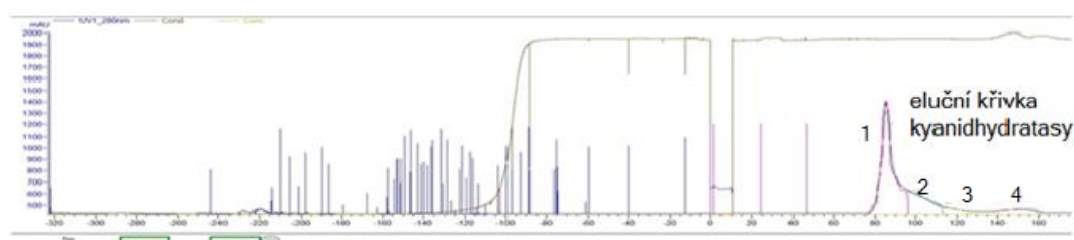


Obr. 10: Průběh hydrofobní chromatografie, provedení viz 4.6.3.; frakce vybrané pro elektroforetickou analýzu označeny šipkami



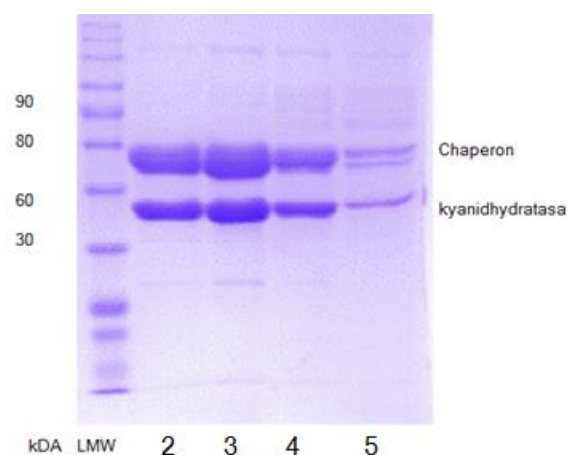
Obr. 11: Elektroforeogram frakcí z hydrofobní chromatografie, 1- „low-molecular weight“ marker (LMW), 2- výchozí vzorek, 3- nezachycený protein, 4-7 frakce odebrané během eluce majoritního proteinu (označeno modrou šipkou v Obr. 11), 8- poslední frakce (označena červenou šipkou v Obr. 10)

Pro další purifikaci enzymu byla provedena gelová permeační chromatografie se zakoncentrovaným enzymem z hydrofobní chromatografie. Byly odebírány frakce označené v Obr. 12. V těchto frakcích byla ověřena přítomnost enzymu a jeho čistota elektroforézou (Obr. 13). K charakterizaci purifikovaného enzymu byly použity frakce s nejvyšší aktivitou, tj. frakce 1 a 2. Podobně jako neaktivnější frakce z hydrofobní chromatografie obsahovaly i tyto frakce také chaperon, který zřejmě tvoří s žádaným proteinem komplex.



Obr. 12: Průběh gelové permeační chromatografie, provedení viz 4.6.4, frakce pro další analýzu jsou označené čísly





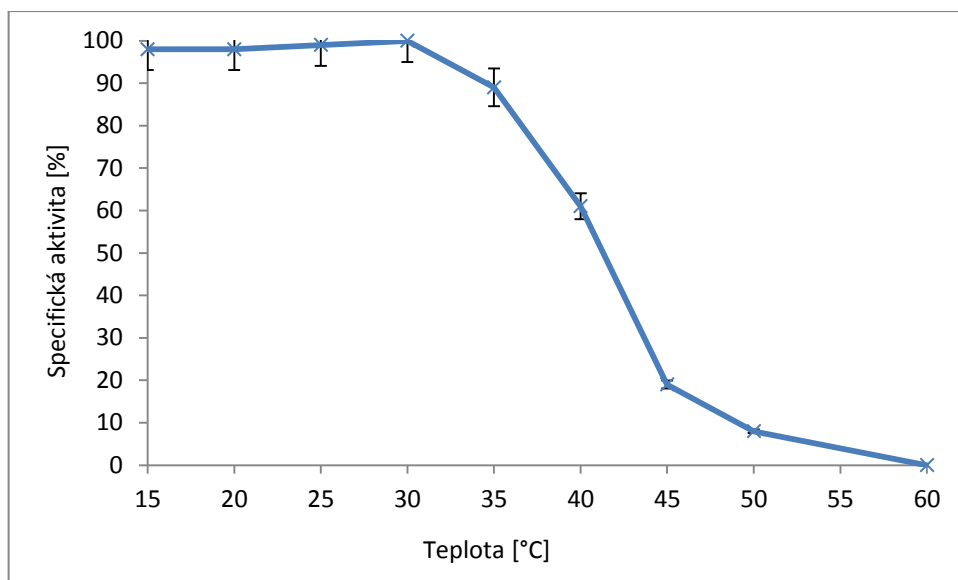
Obr. 13: Elektroforeogram frakcí z gelové chromatografie, LMW- marker, 2- frakce 1, 3- frakce 2, 4- frakce 3, 5 frakce 4 (viz Obr. 12).

## 5.4 Charakterizace purifikovaného enzymu

Po hydrofobní chromatografii byla specifická aktivita enzymu 107 U/mg proteinu a po gelové chromatografii 736 U/mg proteinu. Oproti extraktu se zvýšila aktivita 10,9 krát. Celkově bylo získáno 3409 U a 4,6 mg proteinu. Výtěžek purifikace byl 61 %.

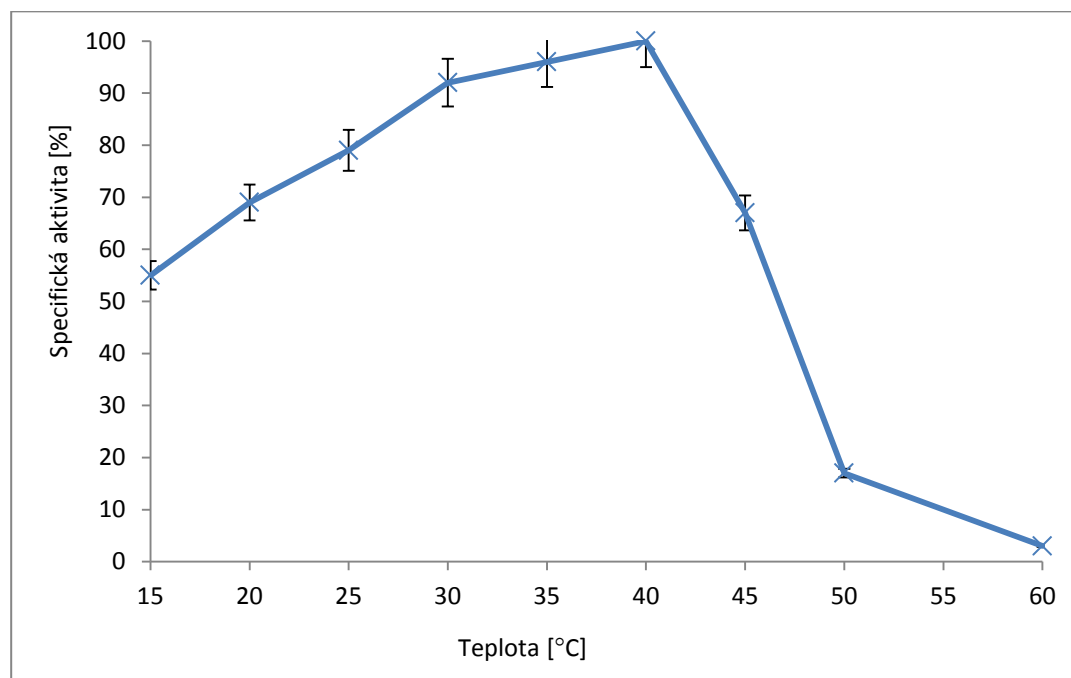
### 5.4.1 Teplotní stabilita a optimum

Purifikovaná kyanidhydratasa ze *S. hirsutum* vykazuje dobrou teplotní stabilitu od 10 °C do 30 °C, aktivita byla při těchto teplotách vždy v rozmezí 710-730 U/ mg proteinu. Při teplotách nad 30 °C stabilita velmi rychle klesá, v 45 °C je teplotní stabilita již na úrovni 10 % naměřeného maxima (Obr. 14).



Obr. 14: Teplotní stabilita purifikovaného enzymu, substrát KCN (25 mM), doba reakce 5 min, pH 8, 30 °C, 100% = 726,9 U mg proteinu

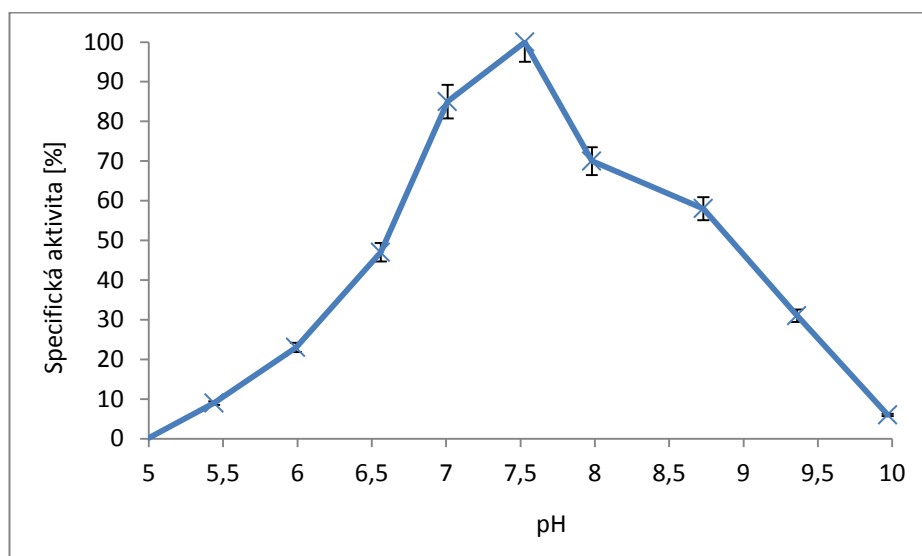
Teplotní optimum pro purifikovanou kyanidhydratasu bylo stanoveno na 40 °C, aktivita byla 772 U/mg proteinu. Aktivita s teplotou vzrůstala do 40 °C, mezi 45 °C a 50 °C se snížila z 60 % na 20 % maxima. Aktivita při 60 °C byla již téměř nulová (Obr. 15).



Obr. 15: Teplotní optimum purifikovaného enzymu, substrát KCN (25 mM), doba reakce 5 min, pH 8, 100% = 772,6 U/mg proteinu

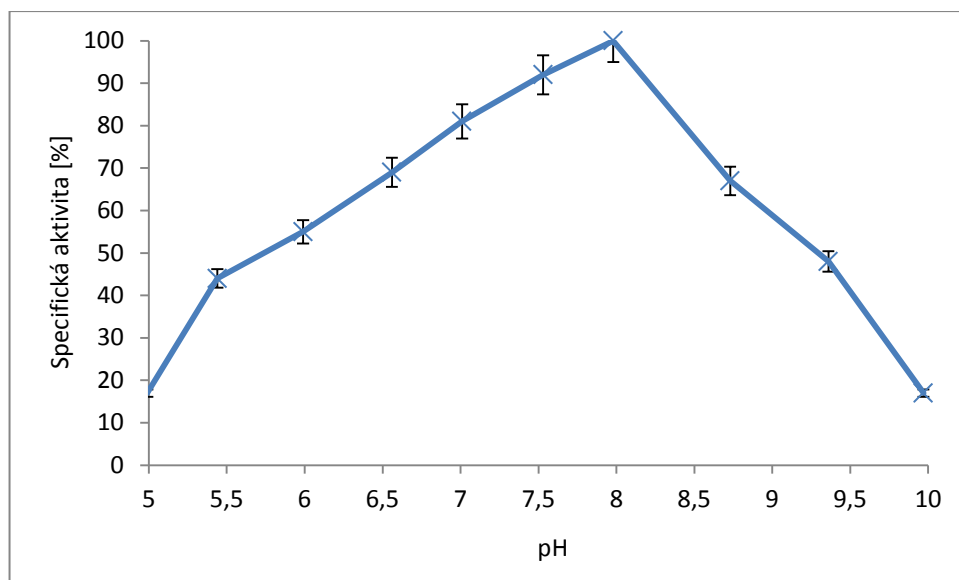
#### 5.4.2 pH stabilita a optimum

Purifikovaná kyanidhydratasa vykazovala nejvyšší stabilitu při pH 7,5. Aktivita při tomto pH byla 758 U/mg proteinu. Od pH 5 stabilita zvolna rostla až do maxima při pH 7,5, naopak od pH 8,5 rychle klesala (Obr. 16).



Obr. 16: pH stabilita purifikovaného enzymu, substrát KCN (25 mM), doba reakce 5 min, pH 8, 30 °C, 100% = 786 U/mg proteinu

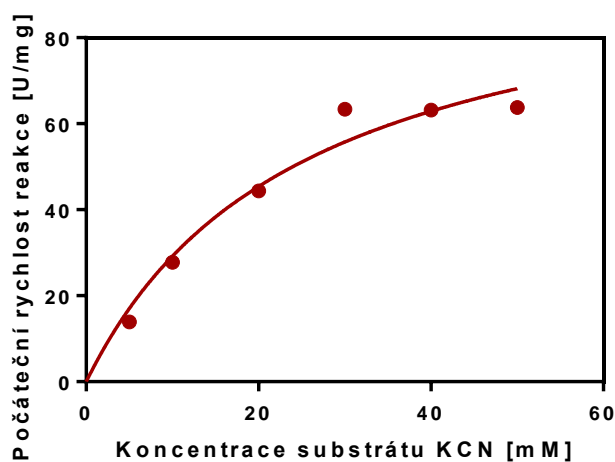
pH optimum pro purifikovanou kyanidhydratasu bylo 8,0, aktivita byla 765 U/mg proteinu. Aktivita enzymu při pH 5 byla srovnatelná s aktivitou při pH 10. V mírně kyselém prostředí vykazoval enzym lepší aktivitu než v mírně zásaditém, aktivita při pH 7 byla na cca 90 % maxima a při pH 8,5 cca 75 % maxima (Obr. 17).



Obr. 17: pH optimum purifikovaného enzymu, koncentrace substrátu 25 mM, čas reakce 5 minut, 100 % = 765 U/mg proteinu

#### 5.4.3 Kinetické vlastnosti

Byly naměřeny hodnoty počátečních rychlostí reakce při různých koncentracích substrátu KCN (viz obr. 18) a byla zkonstruována kinetická křivka (Obr. 18). Výpočet hodnot  $V_{\max}$  a  $K_m$  pro KCN byl proveden nelineární regresi v programu GraphPad Prism 7.0. Reakce proběhla s 10× ředěným enzymem. Bylo stanoveno  $V_{\max} = 1490 \pm 1,240$  U/mg a  $K_m = 35 \pm 0,6$  mM.



Obr. 18: Stanovení kinetických parametrů purifikované kyanidhydratasy pro KCN. Počáteční koncentrace substrátu 5- 50 mM, doba reakce 5 min, pH 8, 30 °C. Reakční rychlost byla vypočtena z množství vzniklého formamidu.

## 5.5 Biodegradace kyanidu na formamid v modelové a skutečné odpadní vodě

Byla zkoumána schopnost buněk s kyanidhydratasovou aktivitou odstranit kyanid z odpadní vody. Byla použita jednak modelová voda (viz 4.1.2), jednak skutečná odpadní voda z koksáren Třineckých železáren. V obou typech vod byla počáteční koncentrace KCN 5 mM. Stanovení kyanidu a formamidu bylo prováděno standardním způsobem (viz 4.6.1 a 4.6.2). V obou typech vody byl detekován úbytek kyanidu a tvorba formamidu (Tab. 2). Po 10 min bylo z 5 mM kyanidu vytvořeno 2,12 mM formamidu, ale reakce nadále pokračovala jen velmi pomalu s 2,52 mM formamidu po 60 min. Pokles kyanidu (koncentrace 1,55 mM po 60 min) byl vyšší než odpovídá tvorbě formamidu. Je třeba uvážit abiotický úbytek kyanidu, tvorbu dalších produktů nestanovených použitou spektrofotometrickou metodou a interferenci výsledků metody s dalšími složkami vzorku, např. thiokyanáty. Ve skutečné odpadní vodě však tvorba formamidu (3,02 mM) zhruba odpovídala úbytku kyanidu (koncentrace 1,91 v 60. min). Zdá se tedy, že vliv na přesnost stanovení kyanidu, a případně i formamidu, má složení matrice odpadní vody. V navazující práci bude přesnost stanovení formamidu v těchto vzorcích ověřena pomocí HPLC.

Tab. 2: Konverze kyanidu (5 mM) na formamid v modelové a skutečné koksárenské vodě po různých dobách reakce

	Modelová odpadní voda		Skutečná odpadní voda	
	10 min	60 min	10 min	60 min
Kyanid [mM]	1,71 ± 0,08	1,6 ± 0,1	3,0 ± 0,2	1,9 ± 0,2
Formamid [mM]	2,12 ± 0,05	2,5 ± 0,2	1,96 ± 0,03	3,02 ± 0,06

## 6 DISKUSE

Předkládaná bakalářská práce se zabývá enzymy z hub s detoxikačním potenciálem, hlavně přípravou a studiem enzymu kyanidhydratasy z houby *Stereum hirsutum*. Kyanidhydratasa je enzym patřící do nitrilasové nadrodiny.

Funkcí kyanidhydratasy v houbách může být ochrana před býložravci, recyklace dusíku, účast na metabolismu kyanoglykosidů a glukosinolátů, další možností je detoxikace HCN různými cestami [12].

Z fylogenetického stromu vyplývá, že kyanidhydratasy se vyskytují hlavně v oddělení *Ascomycota* a jen zřídka v oddělení *Basidiomycota*. Kyanidhydratasy vykazují velkou shodu, pokud jde o jejich aminokyselinové sekvence, např. více než 100 hypotetických enzymů má shodu vyšší než 80 %. Celkově bylo nalezeno 256 hypotetických enzymů se shodou více než 60 %. U těchto proteinů lze proto předpokládat stejnou funkci, tj. schopnost hydratovat a tím detoxifikovat KCN za vzniku méně škodlivého a dále metabolizovatelného formamidu. Naproti tomu homologie mezi kyanidhydratasami a nitrilasami je maximálně cca 40 %. Celkově bylo nalezeno přes 95 nitrilas, které se shodují s kyanidhydratasami v 30 až 40 % aminokyselinové sekvence, jiné nitrilasy mají ještě menší homologii. To odpovídá jejich odlišné funkci, kterou je hydrolýza nitrilů.

Kyanidhydratasy byly nejdříve získávány přímo z mycelia hub, jako např. u *Stemphylium loti* nebo *Gloeocercospora sorghi*; později byly připraveny v *E. coli* jako heterologním hostiteli. Takto byly získány např. kyanidhydratasy z *Fusarium lateritium*, *Aspergillus niger* a *Neurospora crassa* [34] a také ze *S. hirsutum* (v této práci).

Kyanidhydratasa ze *S. hirsutum* byla připravena ve vysokém výtěžku a byly popsány její reakční podmínky, a to jak s celými buňkami *E. coli*, tak i s purifikovaným enzymem. Buňky měly teplotní optimum při 45 °C, naopak teplotní optimum purifikovaného enzymu sejevilo o něco nižší (40 °C). Z naměřených hodnot také vyplynulo, že celé buňky a purifikovaný enzym vykazují odlišnou teplotní stabilitu; purifikovaný enzym vykazuje přijatelnou stabilitu při teplotách pod 40 °C, zatímco celé buňky pod 45 °C, což zhruba odpovídá výsledkům práce Rinágelové a kol. [20], kde byla studována kyanidhydratasa z *Aspergillus niger*.

U celých buněk bylo stanoveno optimum aktivity při pH 8, nejvyšší stabilitu vykazuje enzym při pH 7,2. Purifikovaný enzym měl stejné optimum - při pH 8 a nejvyšší pH stabilitu vykazoval při pH 7,5. Naopak při pH vyšším než 9 byla naměřena nízká aktivita a při pH vyšším než 10 nebyla ani u jednoho enzymového preparátu naměřena prakticky žádná aktivita. Podobné výsledky byly získány pro kyanidhydratasu z *A. niger* [20], která měla nejvyšší aktivitu mezi pH 8-9. V práci autorů Basile a kol. [34] byla aktivita u purifovaných enzymů z *G. sorghi*, *Gibberella zeae*, *Neurospora crassa* a *Aspergillus nidulans* nalezena při pH v rozmezí 4,5-11, což je větší rozsah než u kyanidhydratasy ze *S. hirsutum*, kde byla aktivita nalezena pouze v rozmezí pH 5-10. Maximální aktivita byla vždy mezi hodnotami pH 6 a pH 7, což jsou nižší hodnoty než u námi charakterizovaného proteinu (s optimem při pH 8). V práci autorů Wang a kol. [35] je zmíněno, že teplotní optimum kyanidhydratasy (enzymu podobné funkce, avšak produkujícího kyselinu mravenčí místo formamidu) je nižší než u kyanidhydratas, ale že mutovaná forma enzymu z *B. pulimus* je aktivní i při pH 9-10.

Z provedené charakterizace vyplývá, že nejvyšší aktivitu má enzym pro substrát kyanid - cca 110-krát vyšší než pro 2-kyanopyridin a fumaronitril. Pro substrát benzonitril je aktivita nižší cca 500-krát. V článku Rinágelové a kol. [20] je uvedena substrátová aktivita pro kyanidhydratasu *Aspergillus niger*. Výsledky se shodují,

pokud jde o nejvyšší aktivitu pro kyanid, a také aktivitu pro fumaronitril a 2-kyanopyridin (ca. 100-krát nižší).

Z výše uvedených výsledků je zřejmé, že ideální teplotní a pH podmínky pro celé buňky a pro purifikovaný enzym se liší. Rozdíl může být způsoben tím, že uvnitř buněk jsou odlišné podmínky než ty, které měříme vně buňky, typickým příkladem je pH, kdy si buňka udržuje pH odlišné od pH okolí. Při stanovení optimálních podmínek pro buňky a purifikovaný enzym je tedy rozdíl pravděpodobně zdánlivý. Tento jev je ale velmi výhodný pro proces biotransformace, kdy je buňka schopná katalyzovat žádaný proces v širším rozmezí pH reakčního media. Z tohoto důvodu se také enzym charakterizuje vždy v co nejčistší formě, aby došlo k vyloučení ostatních nežádoucích vlivů, například pH v buňce.

U purifikovaného enzymu bylo stanoveno  $V_{\max} = 1490 \pm 1,240$  U/mg a  $K_m = 35 \pm 0,6$  mM V článku Rinágelové a kol. [20] se uvádí, že pro kyanidhydratasu z *A. niger* byla  $V_{\max}$  6800 U/mg a  $K_m$  měla hodnotu kolem 100 mM. Obě hodnoty naměřené u purifikovaného enzymu z *S. hirsutum* jsou tedy nižší, což znamená, že má lepší afinitu, ale nižší rychlost probíhající reakce. U kyanidhydratas se uvádějí nižší hodnoty  $V_{\max}$  a  $K_m$ , např. 100 U/mg a 2,8 mM pro kyanidhydratasu z *Pseudomonas stutzeri* [36].

Dále bylo provedeno stanovení kyanidu a formamidu v odpadní a laboratorní vodě, do které byly přidány aktivní buňky a proběhla inkubace při standardních podmínkách spektrofotometickou metodou. Z výsledků vychází, že použitím kyanidhydratasy dochází k odstranění kyanidu, který je převeden v odpadní vodě na formamid. Kyanidhydratasa je tedy schopná degradovat kyanid na méně toxický formamid a je vhodná pro další studium bioremediace koksárenské odpadní vody a jiných odpadních vod obsahujících kyanidy.



## 7 ZÁVĚR

V teoretické části práce byla zpracována literární rešerše o vlastnostech a možnostech využití kyanidhydratas v bioremediaci odpadních vod, a dále o vlastnostech a výskytu kyanidů a fenolů v odpadních vodách.

V praktické části byla charakterizována kyanidhydratasa ze *Stereum hirsutum* a to jak v celých buňkách, tak i ve formě purifikovaného enzymu. Byly stanoveny podmínky (pH, teplota), za kterých je enzym funkční a stabilní. Dále byla stanovena substrátová specifita a provedeno měření kyanidu a formamidu během enzymové konverze kyanidu v modelové a reálné odpadní koksárenské vodě spektrofotometrickou metodou. Pro stanovení formamidu v odpadní vodě bude v další práci lepší použít selektivního stanovení pomocí HPLC, kdy nedochází k interferenci se složkami odpadních vod.

Kyanidhydratasy by mohly být použity pro účinnou bioremediaci kyanidu v odpadních vodách. Enzym vykazoval dobrou aktivitu v pH rozmezí od 6 do 10 a dobrou teplotní stabilitu do 40 °C, což je široké rozmezí, které je výhodné pro využití v bioremediacích.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

KG	kyanogenní glykosidy
EPA	<i>USA Environmental Protection Agency</i>
LMW	Low molecular weight (protein marker)
OD	Optická denzita
TEMED	Tetramethylethyldiamid
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
HPLC	High-performance liquid chromatography
SDS	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s dodecylsíránem sodným
APS	persíran amonný
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid (inhibitor proteas)
DTT	Dithiotreitol
OPA	<i>o</i> -Ftaldialdehyd
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

## 9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] *Dekontaminační technologie* [online]. Praha: VŠCHT, 2001 [cit. 2019-05-03].  
Dostupné z: <https://old.vscht.cz/uchop/CDmartin/index.html>
- [2] ADAMSKI, Juliusz J., Pawel NOWAK a Jolanda KOCHANA. Simple sensor for the determination of phenol and its derivatives in water based on enzyme tyrosinase. *Electrochimica Acta*. 2008, **55**(7), 2363-2367. ISSN 0013-4686.
- [3] Ligninolytické houby. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2016 [cit. 2019-05-03]. Dostupné z: [https://www.enviwiki.cz/w/index.php?title=Ligninolytick%C3%A9\\_houby&oldid=17045](https://www.enviwiki.cz/w/index.php?title=Ligninolytick%C3%A9_houby&oldid=17045)
- [4] BORDO, Domenico. The rhodanese/Cdc25 phosphatase superfamily: Sequence-structure-function relations. *EMBO Reports*. 2002, **3**(8), 741-746. DOI: 10.1093/embo-reports/kvf150. ISSN 1469221X. Dostupné také z: <http://embor.embopress.org/cgi/doi/10.1093/embo-reports/kvf150>
- [5] Rhodanase. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2018 [cit. 2019-05-03]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/w/index.php?>
- [6] MARTÍNKOVÁ, Ludmila, Alicja B. VESELÁ, Anna RINÁGELOVÁ a Martin CHMÁTAL. Cyanide hydratases and cyanide dihydratases: emerging tools in the biodegradation and biodetection of cyanide. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* [online]. 2015, (21), 8875-8882 [cit. 2019-02-02].

Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00253-015-6899-0>

- [7] FRY, William E., Roy.L. MILLAR, B. Trevor SEWELL, Michael J. BENEDIK, Graeme TURNBULL a Meng ZHANG. Cyanide degradation by an enzyme from *Stemphylium loti*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online]. 1972, **151**(2), 468-474 [cit. 2019-05-01]. DOI: 10.1016/0003-9861(72)90523-1. ISSN 00039861. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003986172905231>
- [8] THUKU, Robert N., Dean BRADY, Michael J. BENEDIK a Bryan T. SEWELL. Microbial nitrilases: versatile, spiral forming, industrial enzymes. *Journal of Applied Microbiology I* [online]. 2008, **2009**(1), 703-727 [cit. 2019-02-02]. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2672.2008.03941.x>
- [9] O'REILLY, Catherine. a Peter D. TURNER. The nitrilase family of CN hydrolysing enzymes - a comparative study. *Journal of Applied Microbiology*. 2003, **95**(6), 1161-1174. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2003.02123.x. ISSN 1364-5072. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2672.2003.02123.x>
- [10] KAPLAN, Ondřej, Alicja B. VESELÁ, Alena PETŘÍČKOVÁ et al. A Comparative Study of Nitrilases Identified by Genome Mining. *Molecular Biotechnology*. 2013, **54**(3), 996-1003. DOI: 10.1007/s12033-013-9656-6. ISSN 1073-6085. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s12033-013-9656-6>
- [11] THIMANN, Kenneth a Sundararaman MAHADEVAN. Nitrilase. I. occurrence, preparation, and general properties of enzymes. *Arch Biochem*

*Biophys.* 1964, **1964**, 133-141.

- [12] HOWDEN, Andrew J.M. a kol. A conserved mechanism for nitrile metabolism in bacteria and plants. *The Plant Journal* [online]. 2009 [cit. 2019-03-14]. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-313X.2008.03682.x>
- [13] LOVASOA, Christine R., Karoui HELA, Anderson Andrianisa HARINAIVO a Yacouba HAMMA. Bioremediation of soil and water polluted by cyanide: A review. *African Journal of Environmental Science and Technology* [online]. 2017, **11**(6), 272-291 [cit. 2019-05-03]. DOI: 10.5897/AJEST2016.2264. ISSN 1996-0786. Dostupné z: <http://academicjournals.org/journal/AJEST/article-abstract/A02C9AA64350>
- [14] VESELÁ, Alicja B., Lenka RUCKÁ, Ondřej KAPLAN, Helena PELANTOVÁ, Jan NEŠVERA, Miroslav PÁTEK a Ludmila MARTÍNKOVÁ. Bringing nitrilase sequences from databases to life: the search for novel substrate specificities with a focus on dinitriles. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016, **100**(5), 2193-2202. DOI: 10.1007/s00253-015-7023-1. ISSN 0175-7598. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-015-7023-1>
- [15] ZIDENGA, Tawanda, Dimuth SIRITUNGA a Richard T. SAYRE. Cyanogen Metabolism in Cassava Roots: Impact on Protein Synthesis and Root Development. *Frontiers in Plant Science*. 2017, **8**(2), 220. DOI: 10.3389/fpls.2017.00220. ISSN 1664-462X. Dostupné také z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2017.00220/full>

- [16] WHITE, Wanda L.B., Diana I. ARIAS-GARZON, Jennifer M. MCMAHON a Richard T. SAYRE. Cyanogenesis in Cassava. *Plant Physiology*. 1998, **116**(4), 1219-1225. DOI: 10.1104/pp.116.4.1219. ISSN 0032-0889. Dostupné také z: <http://www.plantphysiol.org/lookup/doi/10.1104/pp.116.4.1219>
- [17] MARTÍNKOVÁ, Ludmila a Martin CHMÁTAL. The integration of cyanide hydratase and tyrosinase catalysts enables effective degradation of cyanide and phenol in coking wastewaters. *Water Research*. 2016, **102**, 90-95. DOI: 10.1016/j.watres.2016.06.016. ISSN 00431354. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135416304547>
- [18] GREENWOOD, Norman a Alan EARNSHAW. *Chemistry of the Elements*. 1. vyd. Oxford: Pergamon Pres pcl, 1984, s. 356-360. ISBN 80-85427-38-9.
- [19] *Environmental Protection Agency (EPA) Sampling and Analysis Procedure for Screening of Industrial Effluents for Priority Pollutants*. EPA; Cincinnati, OH, USA: 1977. b.r.
- [20] RINÁGELOVÁ, Anna, Ondřej KAPLAN, Alicja B. VESELÁ et al. Cyanide hydratase from *Aspergillus niger* K10: Overproduction in *Escherichia coli*, purification, characterization and use in continuous cyanide degradation. *Process Biochemistry*. 2014, **49**(3), 445-450. DOI: 10.1016/j.procbio.2013.12.008. ISSN 13595113. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511313006934>
- [21] *Zákon o vodách a o změně některých zákonů* [online]. Praha, 2001 [cit. 2019-05-03]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2001-254>

- [22] VOPRŠALOVÁ, Marie a Pavla ŽÁČKOVÁ. *Základy toxikologie pro farmaceuty*. Praha: Karolinum, 2000. ISBN 80-7184-282-6.
- [23] PATOČKA, Jiří a kol. *Vojenská toxikologie 178 s.* ISBN 80-247-0608-3. 1. vyd. Praha: Grada Publishing a.s., 2014.
- [24] JANEČKOVÁ, Anna a Pavel KLOUDA. *Organická chemie*. 2. vyd. Ostrava: Nakladatelství Pavel Klouda, 1998. ISBN 80-902155-6-4/9802.
- [25] PITTER, Pavel. *Hydrochemie*. 4., aktualiz. vyd. Praha: Vydavatelství VŠCHT Praha, 2009. ISBN 978-80-7080-701-9.
- [26] PAPADIMITRIOU, Crysí A., Petros SAMARAS a George P. SAKELLAROPOULOS. Comparative study of phenol and cyanide containing wastewater in CSTR and SBR activated sludge reactors. *Bioresource Technology* [online]. 2009, 2009(1), 31-37 [cit. 2019-02-01].  
Dostupné z:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852408005221?via%3Dihub>
- [27] TAY, Stephen T.-L., Benjamin Yan-Pui MOY, Abdul Majid MASZENAN a Joo-Hwa TAY. Comparing activated sludge and aerobic granules as microbial inocula for phenol biodegradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005, 67(5), 708-713. DOI: 10.1007/s00253-004-1858-1. ISSN 0175-7598. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-004-1858-1>
- [28] BARBOSA, T.C.P., A.P. LUZ, M.L. BEDIN a N.H. GABILAN. *Effect of ceramic plant effluent on phenol degradation by Acinetobacter calcoaceticus*. 1996,

37(1-2). DOI: 10.1016/0964-8305(96)84345-9. ISSN 09648305. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0964830596843459>

- [29] TAM, Le Thi, Christine EYMANN, Dirk ALBRECHT, Rabea SIETMANN, Frieder SCHAUER, Michael HECKER a Haike ANTELMANN. Differential gene expression in response to phenol and catechol reveals different metabolic activities for the degradation of aromatic compounds in *Bacillus subtilis*. *Environmental Microbiology*. 2006, 8(8), 1408-1427. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2006.01034.x. ISSN 1462-2912. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1462-2920.2006.01034.x>
- [30] CANTARELLA, Heitor. *Hydrolysis of formamide and volatilization of ammonia from nitrogen fertilizers added to soils*. USA, 1983. Disertační. Iowa State University.
- [31] FISHER, F. B. a J. S. BROWN. Colorimetric Determination of Cyanide in Stack Gas and Waste Water. *Analytical Chemistry*. 1952, 24(9), 1440-1444. DOI: 10.1021/ac60069a014. ISSN 0003-2700. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac60069a014>
- [32] BLACK, Gary W., Nicola L. BROWN, Justin J. B. PERRY, P. David RANDALL, Graeme TURNBULL a Meng ZHANG. A high-throughput screening method for determining the substrate scope of nitrilases. *Chemical Communications*. 2015, 51(13), 2660-2662. DOI: 10.1039/C4CC06021K. ISSN 1359-7345. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C4CC06021K>
- [33] BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of



protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976, **72**(1-2), 248-254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3. ISSN 00032697. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003269776905273>

- [34] CLUNESS, Martin J., Peter D. TURNER, E. CLEMENTS, D. T. BROWN a Catherine O'REILLY. Purification and properties of cyanide hydratase from *Fusarium lateritium* and analysis of the corresponding chy1 gene. *Journal of General Microbiology*. 1993, **139**(8), 1807-1815. DOI: 10.1099/00221287-139-8-1807. ISSN 0022-1287. Dostupné také z: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-139-8-1807>
- [35] BASILE, Lacy J., Richard C. WILLSON, B. Trevor SEWELL a Michael J. BENEDIK. Genome mining of cyanide-degrading nitrilases from filamentous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008, **80**(3), 427-435. DOI: 10.1007/s00253-008-1559-2. ISSN 0175-7598. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-008-1559-2>
- [36] WANG, Lan, Jean M. WATERMEYER, Andani E. MULELU, B. Trevor SEWELL a Michael J. BENEDIK. Engineering pH-tolerant mutants of a cyanide dihydratase. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2012, **94**(1), 131-140 [cit. 2019-05-03]. DOI: 24. 10.1021/ac60069a014. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-011-3620-9>
- [37] JANDHYALA, Dakshina M., Richard C. WILLSON, B. Trevor SEWELL a Michael J. BENEDIK. Comparison of cyanide-degrading nitrilases. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005, **68**(3), 327-335. DOI: 10.1007/s00253-005-1903-8. ISSN 0175-7598. Dostupné také z:

<http://link.springer.com/10.1007/s00253-005-1903-8>

## 10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

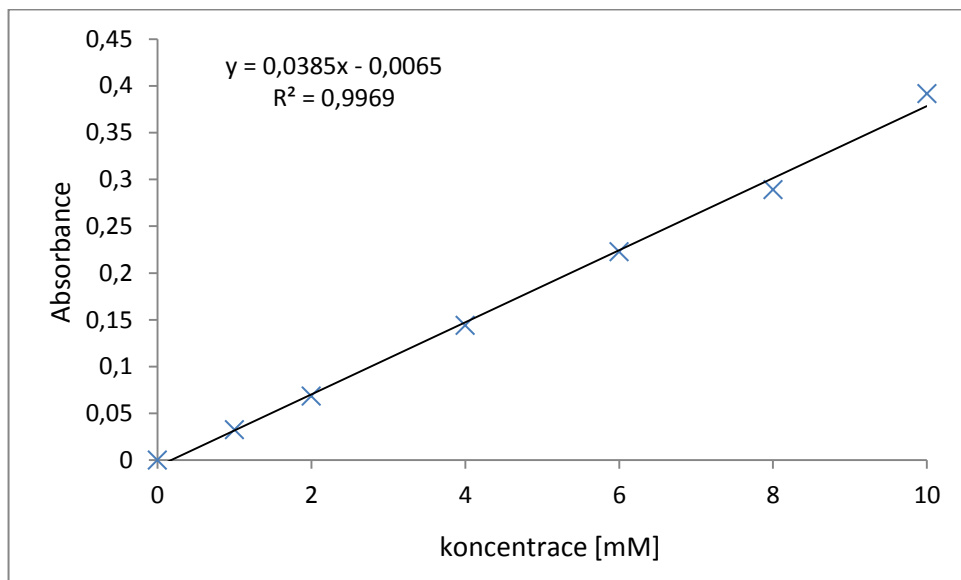
Obr. 1: Schéma reakce katalyzované rhodanasou (převzato z [5]).....	14
Obr. 2: Přeměna kyanidu v rostlinách [12].....	19
Obr. 3: Fylogenetický strom kyanidhydratas u <i>Basidiomycot</i> a <i>Ascomycot</i> .....	41
Obr. 4: Fylogenetický strom nitrilas – příbuznost s kyanidhydratasou ze <i>Stereum hirsutum</i> .....	42
Obr. 5: Teplotní optimum kyanidhydratasy v buňkách <i>E. coli</i> , substrát KCN .....	43
Obr. 6: Teplotní stabilita kyanidhydratasy v buňkách <i>E. coli</i> , substrát KCN.....	44
Obr. 7: pH optimum kyanidhydratasy v buňkách <i>E. coli</i> , substrát KCN .....	45
Obr. 8: pH stabilita kyanidhydratasy v buňkách <i>E.coli</i> , substrát KCN.....	45
Obr. 9: Transformace různých substrátů kyanidhydratasy z <i>S. hirtusum</i> - reakční produkty.....	46
Obr. 10: Průběh hydrofobní chromatografie.....	47
Obr. 11: Elektroforeogram frakcí z hydrofobní chromatografie .....	48
Obr. 12: Průběh gelové permeační chromatografie .....	48
Obr. 13: Elektroforeogram frakcí z gelové chromatografie. ....	49
Obr. 14: Teplotní stabilita purifikovaného enzymu .....	50
Obr. 15: Teplotní optimum purifikovaného enzymu.....	50
Obr. 16: pH stabilita purifikovaného enzymu .....	51
Obr. 17: pH optimum purifikovaného enzymu .....	52
Obr. 18: Stanovení kinetických parametrů purifikované kyanidhydratasy pro KCN .....	52

## 11 SEZNAMU POUŽITÝCH TABULEK

Tab. 1: Substrátová specifita kyanidhydratasy v buňkách E. coli .....	46
Tab. 2: Konverze kyanidu (5 mM) na formamid v modelové a skutečné koksárenské vodě po různých dobách reakce .....	53

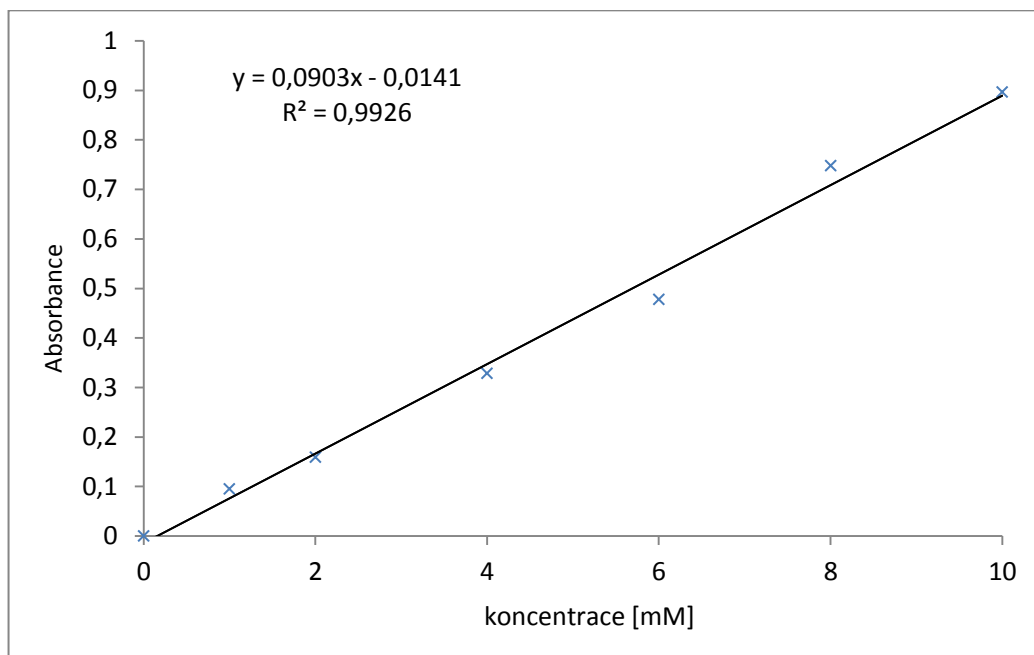
## 12 SEZNAM PŘÍLOH

1,



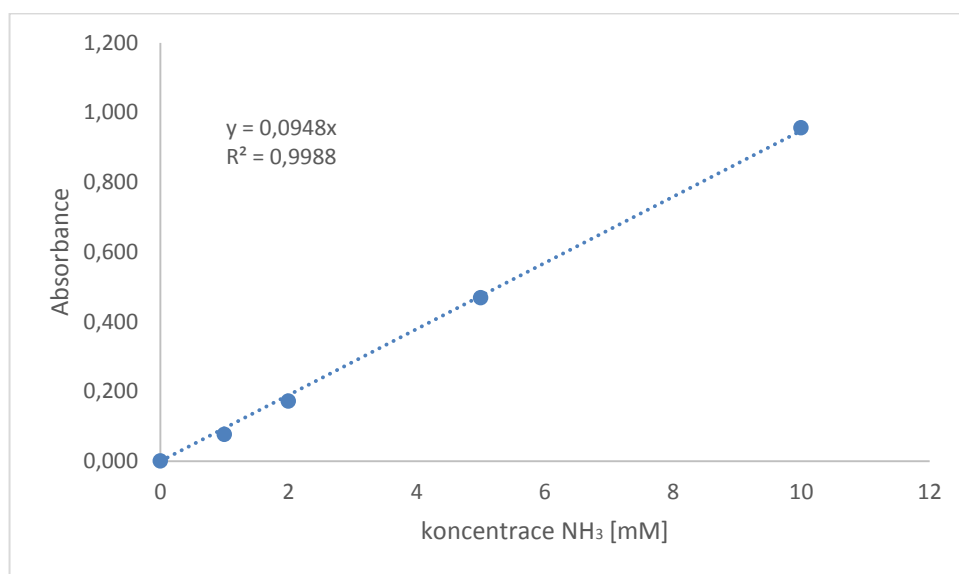
Příloha 1: Kalibrační křivka závislosti absorbance na koncentraci kyanidu v reakční směsi, měřeno při 520 nm

2,



Příloha 2: kalibrace pro stanovení formamidu, závislost koncentrace kyanidu na absorbanci měřeno při 540 nm

3,



Příloha 3: Kalibrace pro metodu o-ftaldialdehydem závislost koncentrace  $\text{NH}_3$  na absorbanci, měřeno při 675 nm

4,

pH	Britton-Robinson buffer			
	Composition (g/l)			
	NaOH	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> H	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	H <sub>2</sub> BO <sub>3</sub>
1.81	0.000	2.402	3.920	2.473
1.89	0.195	2.343	3.824	2.413
1.98	0.381	2.288	3.733	2.355
2.09	0.558	2.234	3.647	2.301
2.21	0.772	2.184	3.564	2.248
2.36	0.889	2.135	3.484	2.198
2.56	1.043	2.089	3.409	2.151
2.87	1.191	2.044	3.336	2.105
3.29	1.333	2.002	3.267	2.061
3.78	1.469	1.961	3.200	2.019
4.10	1.600	1.922	3.136	1.979
4.35	1.725	1.884	3.075	1.940
4.56	1.846	1.848	3.015	1.902
4.78	1.962	1.813	2.958	1.867
5.02	2.074	1.779	2.904	1.832
5.33	2.182	1.747	2.851	1.799
5.72	2.286	1.716	2.800	1.767
6.09	2.386	1.686	2.751	1.736
6.37	2.483	1.657	2.703	1.706
6.59	2.576	1.628	2.658	1.677
6.80	2.667	1.601	2.613	1.649
7.00	2.754	1.575	2.570	1.622
7.24	2.839	1.550	2.529	1.596
7.54	2.921	1.525	2.489	1.570
7.96	3.000	1.501	2.450	1.546
8.36	3.077	1.478	2.412	1.522
8.69	3.152	1.456	2.376	1.499
8.95	3.224	1.434	2.340	1.477
9.15	3.294	1.413	2.306	1.455
9.37	3.362	1.392	2.272	1.434
9.62	3.429	1.373	2.240	1.413
9.91	3.493	1.353	2.208	1.393
10.38	3.556	1.334	2.178	1.374
10.88	3.616	1.316	2.148	1.355
11.20	3.676	1.298	2.119	1.337
11.40	3.733	1.281	2.091	1.319
11.58	3.789	1.264	2.063	1.302
11.70	3.844	1.248	2.036	1.285
11.82	3.897	1.232	2.010	1.268
11.92	3.949	1.216	1.985	1.252
11.98	4.000	1.201	1.960	1.237

Příloha 4: Britton-Robinson pufrů poměry složek