

**ČESKÉ VYSOKÉ
UČENÍ TECHNICKÉ
V PRAZE**

**FAKULTA
BIOMEDICÍNSKÉHO
INŽENÝRSTVÍ**



**BAKALÁŘSKÁ
PRÁCE**

2021

**MICHAELA
GLOZLOVÁ**



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ
Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

Detoxikace kyanidu a nitrilů pomocí buněk a enzymů vláknitých hub

Detoxication of cyanide and nitriles by cells and enzymes of filamentous fungi

Bakalářská práce

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví

Studijní obor: Zdravotní laborant

Autor bakalářské práce: Michaela Glozlová

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Pavla Bojarová, Ph.D.

Kladno 2021

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Glozlová** Jméno: **Michaela** Osobní číslo: **469747**
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:

Detoxikace kyanidu a nitrilů pomocí buněk a enzymů vláknitých hub

Název bakalářské práce anglicky:

Detoxication of cyanide and nitriles by cells and enzymes of filamentous fungi

Pokyny pro vypracování:

Vláknité houby (Ascomycota, Basidiomycota) obsahují enzymy degradující jedovaté kyanidy (KCN, NaCN) a nitrily (RCN) na méně toxické nebo netoxické látky (amoniak, formamid, kyselinu mravenčí, karboxylové kyseliny). Výskyt těchto enzymů v houbách oddělení Basidiomycota („basidiomycety“) je z tohoto hlediska velice málo prozkoumán. Cílem teoretické části práce bude rešerše způsobů degradace kyanidu a nitrilů nalezených u fungálních enzymů. Praktická část práce bude zahrnovat sekvenční analýzu veřejných databází genů a proteinů (GenBank) pro identifikaci nových enzymů s touto degradační aktivitou. Jeden vybraný enzym bude exprimován v hostiteli *E. coli* a budou stanoveny aktivity celých buněk pro různé substráty a za různých podmínek. Budou charakterizovány vlastnosti tohoto enzymu – jeho substrátová specifita, stabilita apod. Součástí práce bude vypracování postupu pro alespoň částečnou purifikaci enzymu.

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 (4), 2016, 167-113, ISSN: 0022-1260
- [2] Martínková L., Veselá A. B., Rinágelová A., Chmátal M., Cyanide hydratases and cyanide dihydratases: emerging tools in the biodegradation and biodection of cyanide. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, číslo 99(21), 2015, ISSN 0175-7598
- [3] Martínková L., Nitrile metabolism in fungi: A review of its key enzymes nitrilases with focus on their biotechnological impact, *Fungal Biol. Rev.*, číslo 33(2), 2019, 149-157 s., ISSN 1749-4613

Jméno a příjmení vedoucí(ho) bakalářské práce:

RNDr. Pavla Bojarová, Ph.D.

Jméno a příjmení konzultanta(ky) bakalářské práce:

Ing. Ludmila Martínková, DSc.

Datum zadání bakalářské práce: **21.9.2020**

Platnost zadání bakalářské práce: **18.09.2022**

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

prof. MUDr. Jozef Rosina, Ph.D., MBA
podpis děkana(ky)

III. PŘEVZETÍ ZADÁNÍ

Student(ka) bere na vědomí, že je povinnen(a) vypracovat bakalářskou práci samostatně, bez cizí pomoci, s výjimkou poskytnutých konzultací. Seznam použité literatury, jiných pramenů a jmen konzultantů je třeba uvést v bakalářské práci.

9.12.2020

Datum převzetí zadání



Podpis studenta(ky)

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem Detoxikace kyanidu a nitrilů pomocí buněk a enzymů vláknitých hub vypracovala 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), ve znění pozdějších předpisů.

V Kladně dne 12.05.2021

.....
Michaela Glozlová

PODĚKOVÁNÍ

Autorka děkuje doc. RNDr. Pavle Bojarové, PhD, za odborné vedení a cenné rady a Ing. Ludmile Martínkové, DSc., za věcné připomínky a nekonečnou trpělivost. Poděkování náleží též dalším pracovníkům Laboratoře biotransformací MBÚ AV ČR – Mgr. Petru Novotnému, Mgr. Anastasii Sedové, Mgr. Barboře Křístkové a Romaně Příhodové. Práce je součástí projektu zaměřeného na studium nitriláz u Basidiomycot podpořené grantem 18-00184S GAČR.

ABSTRAKT

Literární rešerše shrnuje vlastnosti kyanidu a nitrilů, jejich použití, výskyt a mechanismus jejich toxicity. Dále se věnuje kyanidovému znečištění, jeho právní regulaci v České republice a současným metodám čištění odpadních vod obsahujících kyanidy. Jsou popsány rozkladné dráhy kyanidu a nitrilů přirozeně se vyskytující u některých mikroorganismů. Je posouzen potenciál fungálních enzymů rozkládajících kyanidy a nitrily k detoxikaci odpadních vod a hlušin.

Náplní experimentální části byla příprava a stanovení vlastností kyanidhydratázy z houby *Exidia glandulosa*. Kyanidhydratázy (EC 4.2.1.66) přeměňují kyanid na méně toxický formamid. Vyskytují se v houbách, většinou v oddělení Ascomycota. Zkoumaný enzym je jednou z několika málo kyanidhydratáz z oddělení Basidiomycota. Jeho sekvence byla srovnána se sekvencemi charakterizovaných kyanidhydratáz. Enzym byl heterologně exprimován v buňkách *E. coli* v objemu 200 ml buněčné kultury. Enzym byl purifikován s 16% výtěžkem. Byla stanovena aktivita buněk s 25 mmol/l substráty, KCN ($88,4 \pm 2,2$ U/mg), fumaronitrilem ($0,15 \pm 0,03$ U/mg) a 2-kyanopyridinem ($0,50 \pm 0,08$ U/mg). Aktivita purifikovaného enzymu s 25 mmol/l KCN byla 811 ± 22 U/mg. Enzym vykazuje nejvyšší aktivity při pH 6,3–10,3 a teplotách 40–45 °C. Jeho stabilita je dostatečná při teplotách 27 a 37 °C. V simulovaných koksárenských a petrochemických odpadních vodách obsahujících fenol, amoniak, thiokyanatan a/nebo sulfid enzym téměř kompletně konvertoval 25 mmol/l KCN.

Klíčová slova

Kyanid; nitril; bioremediace; biodegradace; kyanidhydratáza; charakterizace enzymu; analýza sekvencí.

ABSTRACT

The literature review summarises cyanide and nitrile properties, their uses and the mechanism of their toxicity. It also focuses on cyanide pollution, its regulation in the Czech Republic and the currently used methods for the treatment of cyanide-containing wastewaters. Various cyanide-degrading pathways naturally occurring in microorganisms are described, as well as cyanide and nitrile remediation potential of fungal enzymes for treatment of wastewaters and tailings.

The topic of the experimental part was the preparation of cyanide hydratase from the fungus *Exidia glandulosa* and the determination of the properties of this enzyme. Cyanide hydratases (EC 4.2.1.66) transform cyanide into the less toxic formamide. They occur in fungi, primarily in the division Ascomycota. The studied enzyme is one of the few cyanide hydratases in the division Basidiomycota. Its sequence was compared with those of characterized cyanide hydratases. The enzyme was heterologously expressed in *E. coli* cells in 200 ml of culture. It was purified with a yield of 16%. The whole-cell activity towards KCN, fumaronitrile and 2-cyanopyridine (25 mmol/l each) was 88.4 ± 2.2 U/mg, 0.15 ± 0.03 U/mg and 0.50 ± 0.08 U/mg respectively. The activity of the purified enzyme towards 25 mmol/l KCN was 811 ± 22 U/mg. The enzyme exhibits its highest activities within pH 6.3–10.3 and temperatures 40–45 °C. Its stability is sufficient at temperatures 27 and 37 °C. In simulated coke-oven and petrochemical wastewaters containing phenol, ammonia, thiocyanate and/or sulphide, the enzyme almost completely converted 25 mmol/l KCN.

Keywords

Cyanide; nitrile; bioremediation; biodegradation; cyanide hydratase; enzyme characterization; analysis of sequences.

Obsah

1	Úvod.....	13
2	Cíle práce.....	14
3	Přehled současného stavu.....	15
3.1	Kyanid – vlastnosti a použití.....	15
3.1.1	Typy a vlastnosti kyanidů.....	15
3.1.2	Nitrily.....	16
3.1.3	Použití kyanidu.....	16
3.1.4	Toxicita kyanidu.....	17
3.1.5	Použití a toxicita nitrilů.....	18
3.2	Kyanidové znečištění a jeho regulace.....	19
3.2.1	Čištění odpadních vod přirozenou degradací.....	20
3.2.2	Chemické čisticí procesy.....	20
3.2.3	Biologické čisticí procesy.....	22
3.2.4	Čištění odpadních vod s nitrily.....	24
3.2.5	Regulace kyanidu v odpadní a pitné vodě.....	24
3.3	Rozkladné dráhy kyanidu a nitrilů.....	25
3.3.1	Oxidační reakce.....	25
3.3.2	Redukční reakce.....	26
3.3.3	Hydrolytické reakce.....	26
3.3.4	Substituční a transformační reakce.....	27
3.4	Enzymy rozkládající kyanidy a nitrily v houbách.....	28
3.4.1	Zdroje a izolace nitriláz hub.....	29
3.4.2	Rozšíření nitriláz u hub.....	30

3.4.3	Potenciál hub a jejich buněk v remediaci kyanidu a nitrilu.....	30
4	Metodika.....	33
4.1	Technické vybavení a materiál.....	33
4.1.1	Přístroje.....	33
4.1.2	Pufry.....	33
4.1.3	Mobilní fáze pro HPLC.....	34
4.1.4	Roztoky pro spektrofotometrická stanovení.....	34
4.1.5	Substráty.....	34
4.1.6	Standardy reakčních produktů.....	34
4.1.7	Simulované odpadní vody.....	35
4.1.8	Roztoky pro kultivaci buněk a purifikaci enzymu.....	36
4.1.9	Biologický materiál.....	36
4.2	Kultivace buněk.....	37
4.3	Aktivita buněk.....	37
4.3.1	Aktivita buněk ke kyanidu v alkalickém prostředí.....	37
4.3.2	Aktivita buněk k fumaronitrilu a 2-kyanopyridinu.....	38
4.4	Purifikace enzymu.....	38
4.4.1	Reakce s kyanidem.....	39
4.5	Charakterizace enzymu.....	39
4.5.1	Stanovení pH optima.....	39
4.5.2	Stanovení teplotního optima.....	40
4.5.3	Stanovení teplotní stability.....	40
4.6	Konverze kyanidu.....	40
4.6.1	Reakce v přítomnosti polutantů.....	40

4.6.2	Reakce v simulovaných odpadních vodách.....	40
4.7	Analytické metody.....	41
4.7.1	HPLC metody	41
4.7.2	Spektrofotometrické stanovení kyanidu s kyselinou pikrovou ..	41
4.7.3	Stanovení formamidu	42
4.7.4	Stanovení koncentrace bílkovin podle Bradforda.....	42
4.7.5	Kalibrační křivky.....	43
5	Výsledky	44
5.1	Sekvenční analýza.....	44
5.2	Kyanidhydratázová a nitrilázová aktivita buněk	46
5.3	Příprava enzymu.....	47
5.4	Biochemické vlastnosti enzymu	49
5.4.1	Vliv pH na aktivitu enzymu	49
5.4.2	Vliv teploty na aktivitu enzymu.....	50
5.4.3	Vliv teploty na stabilitu enzymu.....	50
5.5	Konverze kyanidu.....	51
5.5.1	Vliv polutantů na konverzi kyanidu.....	51
5.5.2	Reakce v simulovaných odpadních vodách.....	52
6	Diskuze	55
7	Závěr	60
8	Seznam použitých zkratk.....	62
9	Seznam použité literatury	63
10	Seznam použitých obrázků.....	68
11	Seznam použitých tabulek.....	69

12 Seznam příloh.....	70
Přílohy.....	71

1 ÚVOD

Kyanidy a nitrily patří mezi toxické polutanty, které produkuje lidská činnost, především těžařský, chemický a kovozpracující průmysl. Odpadní vody vznikající v těchto průmyslových odvětvích jsou od kyanidů čištěny, ale převládající chemické metody čištění nejsou šetrné k životnímu prostředí. Často používanou metodou je přirozená degradace na odkalištích, ale tato metoda je pro evropské země nevhodná vzhledem k vysoké hustotě zalidnění.

Vláknité houby obsahují enzymy schopné rozkládat kyanidy a nitrily na méně toxické látky, což z nich činí slibné prostředky pro detoxifikaci kyanidů a nitrilů v odpadních vodách metodami méně zatěžujícími životní prostředí. Vědecké práce zkoumající tuto tematiku se většinou zaměřují na enzymy z hub oddělení Ascomycota, zatímco oddělení Basidiomycota bylo v tomto směru donedávna opomíjeno.

Použití fungálních enzymů a buněk k detoxifikaci kyanidu se jeví jako perspektivní alternativa ke stávajícím metodám, ale jeho předpokladem je výběr vhodného enzymu např. na základě analýzy sekvencí uložených v databázích genů a proteinů. Vybrané enzymy a způsob jejich použití je nutné nejprve studovat na laboratorní úrovni, než bude možné vyzkoušet jejich použití ve větším měřítku. V první fázi studia těchto enzymů je třeba popsat jejich biochemické vlastnosti a faktory, které ovlivňují jejich aktivitu a stabilitu.

2 CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části této práce je shrnout poznatky o kyanidech a nitrilech, zejména jejich výskytu v prostředí, toxicitě a současných možnostech jejich degradace. Budou popsány enzymatické dráhy, kterými mikroorganismy rozkládají kyanid, a bioremediační metody, ve kterých by mohly být fungální enzymy a buňky použity. Hlavními zkoumanými enzymy jsou kyanidhydratázy, jejichž zástupci budou vyhledáni v databázi proteinů. Výsledkem sekvenční analýzy bude fylogenetický strom, který znázorní příbuznost vybraných enzymů a taxonomickou klasifikaci jejich producentů.

Jeden vybraný enzym bude v experimentální části práce připraven heterologní expresí v buňkách *E. coli*. Bude popsána aktivita buněk *E. coli* obsahujících enzym k různým substrátům a za různých podmínek. Enzym bude purifikován a následně charakterizován. Budou popsány jeho biochemické vlastnosti: aktivita k různým substrátům, optimální reakční podmínky a podmínky pro stabilitu. Bude posouzena jeho schopnost rozkládat kyanid v simulovaných odpadních vodách.

3 PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU

3.1 Kyanid – vlastnosti a použití

3.1.1 Typy a vlastnosti kyanidů

Kyanidy jsou chemické sloučeniny, které obsahují funkční skupinu $C\equiv N$. Nejznámějšími kyanidy jsou kyanovodík (HCN), kyanid sodný (NaCN) a kyanid draselný (KCN). Soli kyanovodíku (NaCN, KCN) ve vodných roztocích disociují. V roztocích tak vzniká volný kyanid, který je buď ve formě aniontu CN^- nebo ve formě kyanovodíku (HCN). V kyselém a mírně alkalickém prostředí, tj. přibližně do pH 8,5, je většina volného kyanidu v roztoku ve formě HCN, zatímco při pH vyšším než 10,5 významně převažuje CN^- (Kuyucak a Akcil 2013).

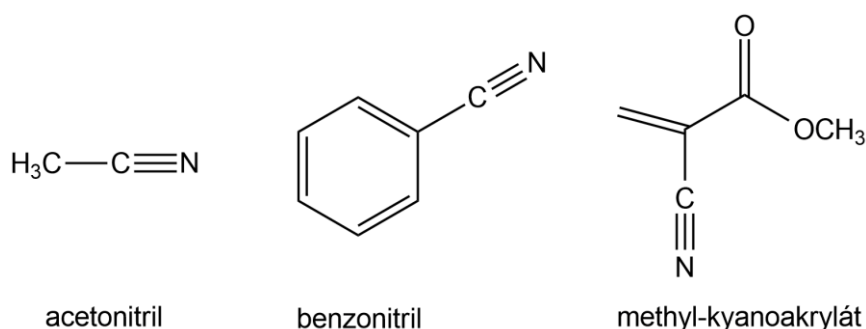
V přirozeném prostředí (např. přírodních vodách) má proto volný kyanid tendenci tékat ve formě plynného kyanovodíku. Množství takto uniklého kyanidu se zvyšuje s klesajícím pH, zvyšujícím se provzdušněním roztoku a s rostoucí teplotou. Kyanid takto téká i z povrchů půd (Kuyucak a Akcil 2013). Kyanid se rozpouští v silně zásaditých roztocích, aby se zabránilo těkání HCN (Luque-Almagro et al. 2016).

Kyanid tvoří komplexy s přechodnými kovy. Komplexy s kadmíem a zinkem snadno disociují v přítomnosti silné kyseliny nebo UV záření, proto jsou považovány za slabé. Středně silné komplexy tvoří měď, nikl a stříbro. Volný kyanid, slabé a středně silné komplexy se souhrnně označují CN-WAD (tzv. „*weak acid dissociable*“, disociovatelné slabou kyselinou). Silné komplexy tvoří kyanid se železem, kobaltem a zlatem. Tyto komplexy téměř nedisociují, zejména komplexy se železem jsou extrémně stabilní (Kumar et al. 2016).

Míra disociace kyanidových komplexů závisí na pH, intenzitě UV záření, teplotě, koncentraci daného komplexu v roztoku a na celkovém množství rozpuštěných pevných látek. (Kuyucak a Akcil 2013).

3.1.2 Nitrily

Organické sloučeniny obsahující funkční skupinu $C\equiv N$ se nazývají nitrily. Obecný vzorec nitrilů je RCN , kde R značí alkyl nebo aryl. Příkladem jednoduchých nitrilů je acetonitril ($R = \text{methyl}$) nebo benzonitril ($R = \text{fenyl}$). Některé nitrily se přirozeně nacházejí v rostlinách, hmyzu a mikroorganismech. Syntetické nitrily se používají k výrobě plastů, rozpouštědel, léčiv a pesticidů (3,5-dibromo-4-hydroxybenzonitril – bromoxynil, 2,6-dichlorobenzonitril – dichlobenil). Nitrily také figurují jako meziprodukty syntézy celé řady organických látek (aminů, amidů, karboxylových kyselin, esterů, aldehydů, ketonů, heterocyklických sloučenin aj.) (Kao et al. 2006). Nitrily najdeme i v běžných spotřebitelských produktech, jako jsou vteřinová lepidla (methylkyanoakrylát) a chirurgické rukavice (nitrilbutadienová pryž – „nitrile butadiene rubber“ – NBR) (Ramteke et al. 2013). Obrázek 1 představuje vzorce některých zmíněných nitrilů.



Obrázek 1 – Příklady nitrilů

3.1.3 Použití kyanidu

S kyanidem jsme v denním kontaktu prostřednictvím našeho jídla, pití, cigaret, léků a dalších výrobků obsahujících kyanid. Člověk je vystaven kyanidu například kouřením tabáku (0,5 mg na cigaretu), kontaktem s určitými pesticidy, insekticidy, hnojivy a kosmetikou nebo vdechováním výfukových plynů. Spalovací motory produkují asi 7–9 mg kyanidu/km. Některé potraviny přirozeně obsahují kyanid, např. mandle (30 mg/100 g), fazole lima (fazol měsíční; 100–300 mg/100 g), kuchyňská sůl (2 mg/100 g), maniok (maniok jedlý,

těž cassava, tapioka; 104 mg/100 g) a pomerančový a višňový džus (0,03–15,84 mg/l) (Kuyucak a Akcil 2013).

Průmyslové použití kyanidu je spojeno především s těžbou zlata a jiných drahých kovů, ale kyanid je nutný i v dalších průmyslových odvětvích. Je výchozí chemikálií k výrobě syntetického hedvábí, syntetické gumy, nylonu, barev, retardérů hoření, farmaceutických a zemědělských výrobků, barevných fotografických filmů a kinematografických pásů a kosmetiky. Také se používá pro galvanické pokovování a výrobu šperků. Povrchové vody v oblastech těchto průmyslových aktivit mohou být kyanidem znečištěny (Kuyucak a Akcil 2013).

Pro svou schopnost specificky rozpouštět zlato a stříbro z rud se kyanid používá k jejich těžbě procesem kyanizace (kyanidového loužení). V silně zásaditém prostředí (pH vyšší než 10) se mezi těmito vzácnými kovy a anionty kyanidu tvoří rozpustné komplexy $[\text{Au}(\text{CN})_2]^-$ a $[\text{Ag}(\text{CN})_2]^-$. Tento výluh se oddělí od zbylé rudniny, která se dopraví na odkaliště. Zlato a stříbro se z výluhu získávají precipitací zinkem nebo adsorpcí na aktivní uhlí. Zbylá odpadní voda a hlušina mohou obsahovat kyanid (Kuyucak a Akcil 2013).

3.1.4 Toxicita kyanidu

Kyanid se váže na krevní železo, čímž zabraňuje transportu kyslíku ke tkáním a způsobuje dušení. Také inhibuje cytochromoxidázu, součást dýchacího řetězce, čímž zablokuje elektronový transport a uvolňování energie v buňkách (Kuyucak a Akcil 2013). Inhibice aerobního dýchání vede ke tkáňové hypoxii (nedostatku kyslíku), která donutí buňky k anaerobnímu rozkladu pyruvátu na laktát. Přebytek vznikajícího laktátu způsobí acidózu (pokles pH pod 7,36), která společně s hypoxií vede k utlumení centrálního nervového systému a srdeční aktivity. Léčba probíhá podáním hydroxykobalaminu, který se přímo váže na kyanid a tím působí jako antidotum. Alternativou je 4-dimethylaminofenol (4-

DMAP), který vyvolá produkci methemoglobinu, k němuž má kyanid vyšší afinitu než k hemoglobinu (Luque-Almagro et al. 2016).

Do těla člověka a živočichů se dostává inhalací, ingescí a vstřebáním přes kůži a oči. Toxicita závisí na bráně vstupu: při inhalaci 2000 ppm plynného kyanovodíku nastává smrt do jedné minuty, LD50 (střední letální dávka, dávka smrtelná pro polovinu vystavené populace) při ingesci je 50–200 mg (nebo 1–3 mg/kg tělesné váhy), při kontaktu přes neporušenou kůži je LD50 100 mg/kg tělesné váhy. Kyanid se neakumuluje v těle, nicméně dlouhodobá expozice kyanidu škodí štítné žláze (Kuyucak a Akcil 2013). Chronická expozice kyanidu také způsobuje demyelinizaci periferních nervů, optickou neuropatii a hluchotu. Tato onemocnění se objevují v souvislosti s velkou konzumací manioku v některých afrických zemích (Cosmos et al. 2020). V Nigérii se proto vyskytuje tropická ataxická neuropatie, v jiných zemích je konzumace manioku spojována s onemocněním konzo (onemocnění horních motorických neuronů) (Bone a Mills 2013).

3.1.5 Použití a toxicita nitrilů

Toxicita nitrilů se liší a není vždy známa. Stabilní nitrily, jako je benzonitril a kyanopyridiny, jsou označeny jako škodlivé. Některé nitrily uvolňují HCN (tzn. jsou kyanogenní, např. kyanhydriny), což způsobuje jejich toxicitu.

Kyanhydriny jsou nitrily 2-hydroxykyselin a jsou součástí kyanogenních glykosidů přítomných v rostlinách (př. amygdalin v mandlích, prunasin v kůře třešňí ptačích, linustatin, neolinustatin a linamarin ve lněných semínkách). Kyanogenní glykosidy jsou metabolizovány pomocí β -glukosidázy na glukosu a kyanhydrin, který je nestabilní a rozkládá se na příslušný aldehyd a HCN. Konzumace těchto potravin v běžné míře není nebezpečná, protože množství uvolněného HCN je velice nízké. Dlouhodobý přísun kyanogenních glykosidů v nízkých dávkách však vede k chronické intoxikaci (Bone a Mills 2013).

V sedmdesátých letech byla patentována výroba syntetického kyanogenního glykosidu Laetrilu, který se užíval jako alternativní složka léčiv proti rakovině. Laetril (mandelonitril- β -glukuronid) byl odvozen od amygdalinu, ovšem v léčivech byl zaměňován za amygdalin. Principem účinku byla předpokládaná přítomnost β -glukosidázy v tumorových buňkách, která by zajistila selektivní toxicitu Laetrilu. Později bylo dokázáno, že aktivita β -glukosidázy v tumorových buňkách je velice nízká, a léčba rakoviny tak byla neúčinná (Bone a Mills 2013).

Mezi toxické nitrily patří také akrylonitril, který se používá k výrobě syntetických vláken (PAN – polyakrylonitril). Akutní toxické účinky se vyskytují po inhalaci, vstřebání kůží a po požití. Při vážné otravě dochází ke ztrátě vědomí, křeči, zástavě dechu a smrti. Akrylonitril má také embryotoxické a teratogenní účinky a je zařazen mezi látky podezřelé z karcinogenních účinků na člověka (Buchter a Peter 1984).

3.2 Kyanidové znečištění a jeho regulace

Rozsáhlé průmyslové používání kyanidu vede k produkci několika miliard litrů odpadních vod ročně. Za největší producenty se považují těžařský a šperkařský průmysl, zpracování kovů, galvanické pokovování, koksování uhlí a organická syntéza používající nitrily. Například šperkařský průmysl ve španělském městě Córdoba vyprodukuje ročně přibližně 10 tun alkalického odpadu s obsahem cca 40 g kyanidu/l. Koncentrace kyanidu ve vypouštěných odpadních vodách musí být snížena pod 1 mg/l pomocí čisticích procesů fyzikálních, chemických nebo biologických (Ibáñez et al. 2017).

Chemické metody odbourávání kyanidu z odpadních vod zahrnují především alkalickou chloraci, oxidaci peroxidem vodíku a oxidaci směsí vzduchu a oxidu siřičitého. Běžně používanou metodou je přirozená degradace na odkalištích. V některých případech je to přijatelná metoda, ale pokud vzniká voda

nedostačující kvality, následuje ještě chemické čištění. V posledních letech se pracuje na zdokonalení nebo úplném nahrazení této metody (Kuyucak a Akcil 2013).

3.2.1 Detoxikace odpadních vod přirozenou degradací

Přirozená degradace na odkalištích využívá kombinaci vypařování, fotochemického rozkladu, chemické a mikrobiální oxidace, hydrolyzy a chemického srážení. Ze všech těchto mechanismů je nejzásadnější vypařování, jímž je odstraněno více než 90 % volného kyanidu. Odbourávání kyanidu závisí na jeho typu, na pH, teplotě, přítomných bakteriích, provzdušnění, intenzitě UV záření a na parametrech daného odkaliště (plocha, hloubka, zákal, případně ledová pokrývka). pH odkališť se postupně snižuje vlivem přirozeného vázání oxidu uhličitého ze vzduchu a působením kyselé dešťové vody. Pokles pH napomáhá odpařování, neboť zvyšuje zastoupení kyanovodíku vůči kyanidovému aniontu (kyanovodík se dále vypařuje ve své plynné formě). Ke zlepšení odpařování dále přispívá promíchávání vody vlivem větru a vnitřních proudů. Teplota a provzdušnění napomáhají rozkladu komplexů kyanidu se zinkem, mědí a železem. Tyto komplexy rozkládá též UV záření (Kuyucak a Akcil 2013).

Na odkalištích je kyanid postupně převáděn na kyanatan (OCN^-) a poté hydrolyzován na uhličitán a amoniak. Přirozená degradace je dlouhotrvající proces: po devíti měsících se odbourá pouze 60 % kyanidu. Zvýšené koncentrace plynného kyanovodíku v okolí odkališť mohou představovat bezpečnostní riziko (Park et al. 2017).

3.2.2 Chemické detoxikační procesy

Chemické metody detoxikace odpadních vod byly zavedeny pro nedostačující kvalitu odpadních vod získaných přirozenou degradací. Zároveň se zvyšují nároky na čistotu odpadních vod – jak vzhledem ke kyanidu, tak i k dalším

polutantům vznikajícím v těžebním průmyslu (amoniak, měď a další kovy, dusičnany, thiokyanatan) (Kuyucak a Akcil 2013).

Již dlouho známou a účinnou metodou je alkalická chlorace. První krok probíhá v zásaditém prostředí, kde je kyanid oxidován pomocí chloru. Ve druhém kroku dochází k hydrolyze na kyanatan, který je poté oxidován na bikarbonát a dusík. První fáze probíhá ideálně při pH 11, druhá při pH 8,5; k úpravě pH se běžně používá vápno. Jako oxidační činidlo se používá plynný chlor nebo chlornan vápenatý. S koncentrovaným kyanidem však chlornan bouřlivě reaguje za vzniku plynného chloru, a proto není vhodný pro vysoce koncentrované výluhy. Zbylý odpad je možné přecistit elektrolytickou oxidací a tepelnou destrukcí (Kuyucak a Akcil 2013).

Alkalická chlorace je v těžebním průmyslu nejběžněji používanou metodou, avšak má mnoho nevýhod. V obou fázích vznikají sekundární toxické látky (chlorkyan, trihalomethany), které je třeba odstraňovat. Tím je metoda méně ekonomicky výhodná a neudržitelná pro životní prostředí. Alkalickou chlorací lze odbourávat slabé a středně silné komplexy, ale silné komplexy přetrvávají (Cosmos et al. 2020).

V roce 1984 byla společností Inco Metals Company vyvinuta metoda „Inco“. Směs oxidu siřičitého se vzduchem oxiduje volný kyanid i kyanid v komplexech s výjimkou komplexů železa. Při kontrolovaném pH (8–10) vzniká kyanatan, zatímco kovy jsou precipitovány z komplexů jako hydroxidy (kromě železa, které tvoří nerozpustný ferokyanid měďnatý a zinečnatý). Měď je zde používána jako katalyzátor a její potřebné množství se odvíjí od koncentrace dalších látek v odpadní vodě (např. od množství mědi vázané v komplexech). Oxid siřičitý vstupuje do reakce buď jako plynný SO₂, rozpustný siřičitan sodný (Na₂SO₃) nebo disiřičitan sodný (Na₂S₂O₅). Výhodami metody Inco jsou malé náklady,

možnost čistit polotekuté směsi a nízké výsledné koncentrace kyanidu a kovů (méně než 0,5 mg/l) (Kuyucak a Akcil 2013). Proto je považována za nejlepší ze současných průmyslových metod.

Oxidace peroxidem vodíku (H_2O_2) využívá přechodné kovy (např. měď) jako katalyzátory. Reakce probíhá při pH 9–10, aby se zamezilo vypařování HCN. Kyanid je oxidován na kyanatan, který je následně hydrolyzován na oxid uhličitý a amoniak. H_2O_2 se používá v kombinaci s UV zářením, čímž lze docílit rozklad komplexů železa. Hlavní nevýhodou peroxidové metody je její vysoká cena, která se odvíjí od spotřeby peroxidu (Park et al. 2017).

Mezi další chemické metody patří precipitace sulfidem železa – SART (sulfidizace – acidifikace – recyklace – zahuštění); jedná se o precipitaci dithioničtanem sodným ($Na_2S_2O_4$). Dále pak metoda AVR (acidifikace – volatilizace – regenerace), též známá jako metoda Mills-Croweho; zahrnuje okyselení odpadní vody a absorpci vytěkaného HCN v alkalickém roztoku (Kuyucak a Akcil 2013).

3.2.3 Biologické čisticí procesy

Biologické čisticí procesy využívají schopnosti některých mikroorganismů rozkládat kyanid a jeho komplexy na méně toxické sloučeniny. Některé mikroorganismy také používají kyanid jako zdroj uhlíku a dusíku pro vlastní růst. Reakce probíhají v automatizovaných bioreaktorech nebo v pasivních systémech (mokřadech, nádržích). Odpadní vody a polotekuté směsi z těžby představují pro bakterie nepříznivé prostředí a snižují jejich aktivitu, proto se biologické metody aplikují zejména na odkalištích, ve kterých je koncentrace kyanidu a kovů již přirozeně snížena (Kuyucak a Akcil 2013).

Společnost Homestake Mining začala v osmdesátých letech 20. století jako první používat biologický proces čištění, který se po ní posléze pojmenoval.

V nádržích (reaktorech či bioreaktorech) pomalu rotují disky s naočkovanými bakteriemi. V první fázi se kyanid oxiduje na oxid uhličitý a amoniak, ve druhé fázi se amoniak nitrifikuje na dusičnan. Jakmile je odstraněn kyanid, bakterie absorbují zbylé kovy za vzniku kalu, který je odfiltrován a přesunut na odkaliště (Kuyucak a Akcil 2013).

Homestake Mining později vyvinula další biologickou metodu čištění, která využívá kal s vysokou hustotou (HDS, „*high-density sludge*“). V prvním kroku se kyanid a další znečišťující látky (thiokyanatan, kyanatan) převádějí na amoniak a dusičnan pomocí dvoustupňového aerobního procesu s aktivovaným kalem. Ve druhém kroku probíhá anaerobní denitrifikace, při níž vzniká plynný dusík. Ve třetím kroku se reziduální kovy vysrážejí z roztoku za použití vápna a síranu železitého. Proces dále vyžaduje látky pro výživu bakterií (methanol, uhličitán sodný, kyselinu fosforečnou a sírovou), sloučeniny k neutralizaci a vysrážení (vápno, síran železitý) a teplotu přibližně 20 °C (Kuyucak a Akcil 2013).

K detoxikaci kyanidu z průmyslových odpadních vod se také využívá adsorpce na aktivní uhlí. Adsorpce probíhá pouze do té doby, než jsou vazebná místa uhlí zaplněna, poté se z uhlí stává sekundární odpad, který se musí buď likvidovat, nebo regenerovat. K regeneraci se experimentálně používají mikroorganismy (například bakterie *Serratia odorifera*), jedná se tedy o bioregeneraci (Singh a Balomajumder 2017).

Pasivní biologické metody vyžadují delší retenční dobu, větší prostor a teplejší podnebí, přesto jsou ekonomicky výhodnými alternativami konvenčních metod, protože nevyžadují chemikálie, obsluhu, průběžnou údržbu ani externí energii. Běžně se skládají z uměle vybudovaných mokřadů, nádrží nebo rybníků. V mokřadních systémech produkují aerobní mikroorganismy (např. bakterie rodu *Pseudomonas*, *Bacillus* a *Neisseria*) amoniak, který podporuje mikrobiální růst

a spotřebu kyanidu, thiokyanatanu, síranu, dusičnanu a amoniaku. Kromě toho dochází k metabolické degradaci polutantů rostlinami (např. vrbami, orobincem), k vypařování a k fotolytickému rozkladu komplexů železa. V nádržích a rybnících probíhá čištění přidáním chemikálií a podporou růstu vodních rostlin a řas (Kuyucak a Akcil 2013).

3.2.4 Čištění odpadních vod s nitrily

Toxicita některých nitrilů znemožňuje přímé vypouštění odpadních vod, které je obsahují. Chemické metody čištění jsou známé, ale jsou příliš finančně náročné, a proto se zkoumají možnosti bioremediace. Bylo nalezeno množství bakterií, které jsou schopné rozložit nitrily na neškodné meziproducty, nebo až na oxid uhličitý a vodu. Mezi tyto bakterie patří různé bakterie rodů *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium* aj. (Kao et al. 2006).

3.2.5 Regulace kyanidu v odpadní a pitné vodě

Pro živočichy a vodní organismy mohou být zdraví nebezpečné koncentrace vyšší než 0,1 mg celkového kyanidu/l. Specificky pro vodní organismy je letální už 0,01–0,1 mg/l (Ramzy 2014).

V zájmu ochrany lidského zdraví a životního prostředí jsou stanovovány regulační limity, které se odvíjejí od úrovně toxicity kyanidu pro dané prostředí. Povolená celková koncentrace kyanidu v pitné vodě se v různých zemích liší: v USA a Kanadě je limit stanoven na 0,2 mg/l, WHO doporučuje 0,07 mg/l, Evropská unie stanovuje 0,05 mg/l (Kuyucak a Akcil 2013).

V České republice je kyanid regulován Nařízením vlády 401/2015 Sb. o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových vod a odpadních vod. Pro výpusti vybraných průmyslových a zemědělských odvětví jsou stanoveny přípustné hodnoty znečištění odpadních vod pro celkový kyanid. Příkladem průmyslového odvětví používajícího kyanid je výroba elektrických

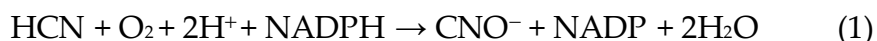
zařízení a povrchová úprava a zušlechťování kovů, pro něž je limit celkového kyanidu stanoven na 1 mg/l. V povrchových vodách je roční průměr přípustného znečištění stanoven na 0,023 mg/l (Nařízení vlády č. 401/2015 Sb.).

3.3 Rozkladné dráhy kyanidu a nitrilů

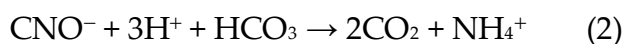
Kyanid přirozeně produkují některé rostliny, mikroorganismy a živočichové, ale jen v malých množstvích. Tato schopnost vznikla jako obranný mechanismus, v rámci něž se vyvinuly enzymy a metabolické dráhy rozkladu či transformace kyanidu. Hlavní metabolické dráhy zahrnují redukci, oxidaci a hydrolýzu a slouží k degradaci kyanidu na méně toxické sloučeniny. Substitučními reakcemi lze kyanid použít jako hlavní zdroj dusíku pro daný organismus (Park et al. 2017).

3.3.1 Oxidační reakce

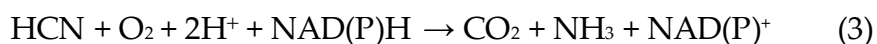
V přítomnosti NADPH (nikotinamidadeninukleotidfosfátu) probíhá přerušení trojné vazby mezi uhlíkem a dusíkem. Předpokládá se, že oxidační reakce zahrnují enzymy kyanidmonooxygenázu, kyanázu (EC 4.2.1.104) a kyaniddioxygenázu. Kyanidmonooxygenáza katalyzuje přeměnu kyanidu na kyanatan podle reakce (1).



Vzniklý kyanatan je rozložen kyanázou na amoniak a oxid uhličitý podle reakce (2).



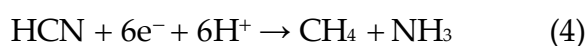
Kyaniddioxygenáza katalyzuje přeměnu kyanidu na amoniak a oxid uhličitý podle reakce (3).



Kyanáza je přítomna v různých bakteriích, houbách, rostlinách a živočiších; její hlavní rolí je detoxikace kyanidu. Zároveň usnadňuje asimilaci amoniaku a transport oxidu uhličitého po degradaci kyanatanu. Oxidační degradace kyanidu probíhá u několika mikroorganismů, např. *Pseudomonas fluorescences*, *Bacillus pumillus* a *Escherichia coli* (Cosmos et al. 2020).

3.3.2 Redukční reakce

Nitrogenázy redukují v anaerobních podmínkách HCN na metan a amoniak podle rovnice (4):



Vyžadují kyselé pH, ve kterém se kyanid vyskytuje ve formě HCN, zatímco CN^- je pro nitrogenázy inhibítorem. Některé kyanobakterie používají nitrogenázy k fixaci atmosférického dusíku, například *Rhodopseudomonas gelatinosa* a *Klebsiella oxytoca* (Park et al. 2017).

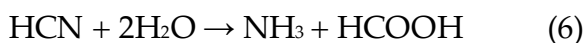
3.3.3 Hydrolytické reakce

Hydrolytická degradace kyanidu je katalyzována enzymy z nadrodiny nitriláz: kyanidhydratázou a kyaniddihydratázou. Oba enzymy jsou vhodnými kandidáty pro průmyslovou remediaci, protože nevyžadují další substráty ani kofaktory. Kyanidhydratáza (EC 4.2.1.66, CHT) rozkládá kyanid na formamid podle rovnice (5). Kyanidhydratáza se na rozdíl od ostatních nitriláz vyskytuje výhradně v houbách, např. u druhů *Neurospora crassa*, *Gibberella zeae*, *Gloeocercospora sorghi*, *Aspergillus nidulans*, *Fusarium lateritium* aj.



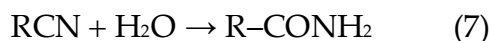
Kyaniddihydratáza (EC 3.5.5.1, CynD, také zvaná kyanidáza) rozkládá kyanid na amoniak a kyselinu mravenčí podle rovnice (6). Kyaniddihydratáza byla

nalezena pouze v několika bakteriích – *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas stutzeri* a *Alcaligenes xylosoxidans* (Park et al. 2017).



O nitrilázách je podrobněji pojednáno v kapitole 3.4.

Nitrilhydratázy rozkládají široké spektrum nitrilů na příslušné amidy podle obecné rovnice (7).



V aktivním místě nitrilhydratáz se nachází kobalt nebo železo, které zastávají roli kofaktoru. Tyto enzymy se vyskytují výhradně v bakteriích, především v rodu *Rhodococcus*. Společně s nitrilhydratázou se v bakteriích často tvoří i amidáza (EC 3.5.1.4), která vzniklý amid (rovnice (7)) štěpí na odpovídající karboxylovou kyselinu a amoniak. Díky nitrilhydratáze a amidáze mohou tyto organismy využívat nitrily jako zdroj dusíku. Tuto schopnost má např. *Klebsiella pneumoniae*, která používá benzonitril jako zdroj uhlíku a dusíku, a *Pseudomonas putida*, která stejným způsobem využívá butyronitril, glutaronitril, isobutyronitril aj. (Gupta et al. 2010).

3.3.4 Substituční a transformační reakce

Kyanid jako zdroj dusíku pro růst používají některé bakterie (např. *Chromobacterium violaceum*, *Bacillus megaterium*) a houby (př. *Rhizopus oryzae*, *Rhizoctonia solani*). Děje se tak asimilací kyanidu do primárních metabolických drah, což vede k detoxifikaci kyanidu a zároveň k syntéze potřebných látek. β -Kvano-L-alaninsyntáza (EC 4.4.1.9) nacházející se v mitochondriích některých vyšších rostlin, hmyzu a bakterií, katalyzuje reakci kyanidu s L-cysteinem na β -kvano-L-alanin a sirovodík (reakce (8)).



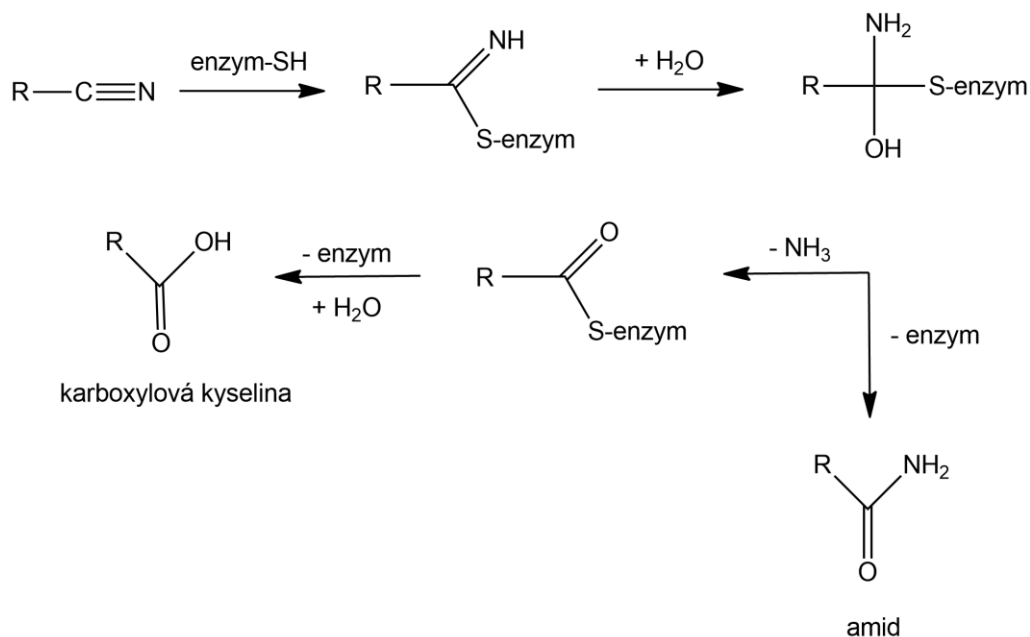
Dalším příkladem je rhodanáza (EC 2.8.1.1, sulfurtransferáza), která se nachází v játrech a ledvinách některých živočichů a v některých rostlinách a bakteriích, kde katalyzuje přeměnu thiosulfátu s kyanidem na siřičitan a thiokyanatan (reakce (9)) (Park et al. 2017).



3.4 Enzymy rozkládající kyanidy a nitrily v houbách

Hlavní enzymy, které houby používají k rozkladu kyanidů a nitrilů, patří do nadrodiny nitriláz. Jedná se především o kyanidhydratázu, jejíž funkce byla popsána v kapitole 3.3.3.

Většina nitriláz má molekulovou hmotnost vyšší než 400 kDa (některé vyšší než 1 MDa) a podle elektronové mikroskopie se jeví jako spirální oligomery (Park et al. 2017). Nitrilázy jsou charakteristické svým aktivním místem, které je složeno z cysteinu, dvou glutamových kyselin a lysinu. Cystein se váže na atom uhlíku kyanoskupiny a vzniká meziproduct, ze kterého se odštěpí karboxylová kyselina nebo amid (Obrázek 2). Hlavním produktem jsou karboxylové kyseliny; amidy vznikají ze specifických substrátů, např. ze substrátů s elektrofilními substituenty v α -pozici. Na poměr amidu a karboxylové kyseliny v produktu má vliv také původ enzymu (Martínková 2019).



Obrázek 2 – Schéma rozkladu kyanidu nitrilázou (převzato z Martínková 2019)

Nitrilázy mají své průmyslové použití, ač ojedinělé. Používají se jako alternativa k chemickým katalyzátorům k výrobě kyseliny pyrazin-2-karboxylové, pikolinové, nikotinové a mandlové a jejich derivátů. Organické syntézy využívají jejich aktivity při nízkých teplotách a téměř neutrálním pH, některé nitrilázy jsou také stereo- nebo regioselektivní (Martínková 2019).

3.4.1 Zdroje a izolace houbových nitriláz

Izolace nitriláz z hub může být časově náročná a neefektivní, proto se v posledních letech začaly produkovat heterologní expresí. Takto získaných enzymů bylo v nedávných pracích popsáno a charakterizováno jen několik, neboť většina výzkumů se soustředí na bakteriální nitrilázy. Mezi charakterizované nitrilázy z hub patří např. enzymy z *Trichophyton benhamiae*, *Nectria haematococca* (Veselá et al. 2013), *Gibberella moniliformis* a *Neurospora crassa* (Petříčková et al. 2012).

Pro heterologní expresi fungálních nitriláz je možné použít buňky *E. coli* podobně jako pro bakteriální nitrilázy. Gen kódující enzym je ligován do vektoru (plazmidu) typu pET a takto získaným vektorem jsou transformovány

kompetentní buňky. Indukce probíhá při nízké koncentraci isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosidu (IPTG) a za relativně nízké teploty (např. 20 °C), aby se zabránilo nesprávnému složení proteinů („*protein misfolding*“ – chyba při skládání proteinového řetězce do prostorového uspořádání). Produkci některých nitriláz zvyšuje současně probíhající exprese bakteriálního chaperonu GroEL/ES (Martínková 2019).

3.4.2 Rozšíření nitriláz u hub

Většina již popsanych i domnělých fungálních nitriláz pochází z hub oddělení Ascomycota (houby vřeckovýtrusné), pododdělení Pezizomycotina. (Na aktivitu „domnělých“ nitriláz se usuzuje podle sekvence genu.) Jedná se zejména o podtřídy Dothideomycetidae, Eurotiomycetidae, Leotiomycetidae a Sordariomycetidae, výjimečně jde o houby z pododdělení Saccharomycotina. Potenciální nitrilázy z oddělení Basidiomycota, druhého největšího oddělení hub, dosud nebyly příliš prozkoumány. Z Ascomycot bylo dosud heterologně připraveno a charakterizováno 15 nitriláz, z Basidiomycot pouze 5. Nespočet dalších enzymů z obou oddělení vykazuje nízkou podobnost k již charakterizovaným nitrilázám a jejich substrátová aktivita proto ještě nebyla plně objasněna (Rucká et al. 2020; 2019).

3.4.3 Potenciál hub a jejich buněk v remediaci kyanidu a nitrilu

Příkladem bioremediační metody, ve které je teoreticky možné použít houby a jejich buňky, je bioaugmentace. Jedná se o biologickou detoxikační metodu, při níž se do kontaminované oblasti zavádějí mikrobiální kultury pro zvýšení detoxikační činnosti přirozeně se vyskytujících mikrobiálních společenství (Cosmos et al. 2020).

K bioaugmentaci byly např. úspěšně použity kvasinky *Cryptococcus humicolus* a neidentifikované mikroorganismy, obojí schopné rozkladu kyanidu (Park et al. 2008). Mikroby byly použity k detoxikaci 1280 m³ kalu z koksárenské odpadní

vody, který byl obohacen o glukózu, KCN a další živiny. Po dvou měsících byla v odtékající vodě naměřena koncentrace 14 mg/l kyanidu ve formě ferrikyanidu, což však nebylo dostačující. Degradace probíhala pomalu kvůli nedostatku organického uhlíku.

Další možnou metodou jsou biovýsyvky (tzv. „*biopiling*“). Půda s kontaminanty je přesunuta z místa vzniku do místa ošetření. Čištění zahrnuje inokulaci mikroorganismy a provzdušňování. Dále se přidávají vyživující látky, optimalizuje se hladina kyslíku, hodnota pH, vlhkost a teplota. Díky tomu jsou zahájeny mikrobiální metabolické procesy, které vedou k detoxikaci kontaminujících látek. Výsyvky (haldy) mohou být až 6 metrů vysoké a je možné je přikrýt plastovou fólií, aby se omezilo odpařování. Dekontaminace půdy na výsypkách obvykle trvá 3 až 6 měsíců (Sharma 2012).

Bioremediace s použitím biovýsypek je metoda typická pro dekontaminaci uhlovodíkových polutantů, ale je potenciálně využitelná i pro detoxikaci kyanidu (Cosmos et al. 2020).

Vedle teoretických možností existují postupy bioremediace, které již byly experimentálně vyzkoušeny, ovšem pouze na laboratorní úrovni. Většina těchto výzkumů (Nazly et al. 1983; Basile et al. 2008; Rinágelová et al. 2014) používá vsádkové nebo kontinuální reaktory. Jako katalyzátory se zkoušely celé buňky hub, heterologně připravené buňky *E. coli* produkující fungální enzymy nebo samotný purifikovaný enzym. Také je možná kombinace více enzymů, což popisují následující dva experimenty.

V jednom z těchto postupů byly použity celé buňky *Fusarium oxysporum* imobilizované v alginátu vápenatém. Působením kyanidhydratázy byl kyanid konvertován na formamid, který byl dále hydrolyzován amidázou z buněk

Methylobacterium sp. na kyselinu mravenčí a amoniak. Proces probíhal v laboratorním kontinuálním reaktoru (Campos et al. 2006).

V další práci (Martínková a Chmátal 2016) byla zkoumána kombinace kyanidhydratázy z *Aspergillus niger* s tyrozinázou z *Agaricus bisporus* (žampiónu dvouvýtrusého). Kyanidhydratáza byla heterologně připravena v buňkách *E. coli*, tyrozináza byla izolována přímo z plodnic žampiónu. V prvním kroku došlo k odstranění kyanidu, který funguje jako inhibitor tyrozinázy. Po jeho eliminaci byla tyrozináza schopna rozkládat fenoly, další toxické polutanty vyskytující se v odpadních vodách. Výsledkem experimentu byla téměř úplná konverze kyanidu a konverze fenolů z cca 88 %.

4 METODIKA

4.1 Technické vybavení a materiál

4.1.1 Přístroje

- HPLC (vysokotlaké čerpadlo Waters 600, PDA (fotodiodový detektor) Waters 996, dávkovač Waters 717 plus, Waters, USA);
- chromatografická kolona ACE C8 (250 x 4 mm) ACT , Polsko;
- centrifuga MiniSpin Eppendorf, Německo;
- magnetická míchačka AREX VELP Scientifica, Itálie;
- pH-metr pH 211 Hanna, ČR;
- spektrofotometr UVmini-1240 Shimadzu, Japonsko;
- analytické váhy 80A-200M Precisa, Švýcarsko;
- vortex PV-1 Grant-bio, UK;
- Thermomixer Comfort Eppendorf, Německo;
- inkubátor KS 4000 ic control IKA, Německo;
- ultrasonický sonikátor Sonopuls HD2200 Bandelin, Německo;
- chromatografická gelová kolona TALON Gravity Column TaKaRa Bio Inc., Japonsko;
- centrifuga Avanti JXN-26 Beckman Coulter, USA;
- centrifuga 5804 R Eppendorf, Německo.

4.1.2 Pufry

- 20 mmol/l fosfátový pufr ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$), pH 7,6;
- 50 mmol/l Tris/HCl pufr, pH 9,0;
- 100 mmol/l a 200 mmol/l Tris/HCl pufr, pH 8,0;
- 50 mmol/l Tris/HCl pufr s 150 mmol/l NaCl, pH 8,0 (dále označován jako pufr A); pH 9,0;
- 100 mmol/l glycin/NaOH, pH 9,0 (dále označován jako pufr B); 9,1; 10,0 a 10,5;

- 50 mmol/l Britton-Robinsonův pufr (0,04 mol/l kyselina octová, 0,04 mol/l kyselina boritá, 0,04 mol/l kyselina fosforečná, 0,2 mol/l hydroxid sodný; pH 4,0–10,8).

4.1.3 Mobilní fáze pro HPLC

- 10% acetonitril v 5 mmol/l fosfátovém pufru ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$), pH 6,8.

4.1.4 Roztoky pro spektrofotometrická stanovení

- 0,5% kyselina pikrová (2,4,6-trinitrofenol) (0,05 g v 10 ml 0,25 M Na_2CO_3);
- 2,3 mol/l hydroxylamin (0,80 g v 5 ml destilované vody);
- hydroxylamin/NaOH (2,3 mol/l hydroxylamin + 10 mol/l NaOH, 1:1);
- Bradfordovo činidlo „*Protein Assay Dye Reagent Concentrate*“ (2 mg/ml zásobní roztok; Protein Assay Kit; Bio-Rad).

4.1.5 Substráty

- 500 mmol/l KCN (0,03 g v 1 ml pufru A, pH 8,0);
- 500 mmol/l 2-kyanopyridin (0,49 g v 10 ml pufru A, pH 8,0);
- 500 mmol/l fumaronitril (0,40 g v 10 ml 99,8% methanolu);
- 500 mmol/l β -kyano-L-alanin (0,06 g v 1 ml pufru A, pH 8,0).

4.1.6 Standardy reakčních produktů

- 500 mmol/l kyselina pikolinová (0,32 g v 5 ml pufru A, pH 8,0);
- 500 mmol/l pikolinamid (0,62 g v 10 ml pufru A, pH 8,0);
- 500 mmol/l (2E)-3-kyanakrylamid (vzorec viz Obrázek 3 vpravo; standard připraven jinými pracovníky laboratoře (viz Veselá et al. 2016), komerčně nedostupný);
- 500 mmol/l kyselina (2E)-3-kyanakrylová (Obrázek 3 vlevo), standard připraven jinými pracovníky laboratoře (viz Veselá et al. 2016), komerčně nedostupný).



Obrázek 3 – Kyselina (2E)-3-kyanakrylová vlevo, (2E)-3-kyanakrylamid vpravo

4.1.7 Simulované odpadní vody

- Koksárenská odpadní voda podle Yu et al. (2016), upraveno: 0,0813 g (25 mmol/l) kyanidu draselného, 0,006 g (1,5 mmol/l) sulfidu sodného, 0,0394 g (13,9 mmol/l) chloridu amonného, 0,045 g (9,6 mmol/l) fenolu, vše rozpuštěno v 50 ml pufru B, pH 9,1;
- koksárenská odpadní voda podle Pillai a Gupta (2016), upraveno: 0,0813 g (25 mmol/l) kyanidu draselného, 0,0222 g (4,6 mmol/l) thiokyanatanu draselného, 0,1049 g (38,9 mmol/l) chloridu amonného, 0,045 g (9,6 mmol/l) fenolu rozpuštěno v 50 ml pufru B, pH upraveno na 9,1 pomocí NaOH;
- koksárenská odpadní voda podle Papadimitriou et al. (2009), upraveno: 0,0813 g (25 mmol/l) kyanidu draselného, 0,0418 g (8,6 mmol/l) thiokyanatanu draselného, 0,0302 g (10,7 mmol/l) chloridu amonného, 0,06 g (12,8 mmol/l) fenolu rozpuštěno v 50 ml pufru B, pH upraveno na 9,1 pomocí HCl;
- petrochemická odpadní voda podle Jarrah a Mu'azu (2016), upraveno: 0,0813 g (25 mmol/l) kyanidu draselného, 0,0913 g (22,1 mmol/l) sulfidu sodného, 0,0394 g (2,5 mmol/l) chloridu amonného, 0,045 g (0,6 mmol/l) fenolu rozpuštěno v 50 ml pufru B, pH upraveno na 9,1 pomocí HCl;
- roztoky jednotlivých polutantů: 500 mg/l (8,6 mmol/l) thiokyanatan (0,0418 g thiokyanatanu draselného), 750 mg/l (23,4 mmol/l) sulfid (0,0913 g sulfidu sodného), 700 mg/l (38,9 mmol/l) amoniak (0,1099 g chloridu amonného) a 400 (4,3 mmol/l) a 1200 mg/l (12,8 mmol/l) fenol (0,02 g a 0,06 g fenolu); sloučeniny rozpuštěny v 50 ml pufru B.

4.1.8 Roztoky pro kultivaci buněk a purifikaci enzymu

- Kultivační medium 2TY: 16 g tryptonu (sójového agaru), 10 g kvasničného extraktu, 5 g NaCl, celkový objem 1 l, pH 7,5;
- 100 mg/ml ampicilin (1 g ampicilinu v 10 ml H₂O);
- 35 mg/ml chloramfenikol (0,35 g chloramfenikolu v 10 ml 99,8% ethanolu);
- 100 mmol/l IPTG (238,3 mg IPTG v 10 ml H₂O);
- TALON Resin (50 % w/w ve 20% ethanolu; Clontech Laboratories Inc.);
- 20 mmol/l fosfátový pufr s přidavkem 0,1 mmol/l PMSF (fenylmethylsulfonylfluorid, z 1 M zásobního roztoku připraveného rozpuštěním 1,74 g PMSF ve 100 ml DMSO), finální pH 7,6;
- 10% polyakrylamidový gel (2 ml 40% akrylamid, 2 ml 1,5 M Tris o pH 8,8, 80 µl 10% SDS (dodecylsírán sodný), 80 µl 10% APS, 8 µl TEMED (tetramethylethylendiamin);
- vzorkový pufr NuPAGE LDS Sample Buffer 4× (lithium dodecyl sulfát s barvivou SERVA Blue G250 a fenolovou červení, pH 8,5; Invitrogen);
- 1 M DTT (1,5 g dithiotreitolu v 8 ml H₂O);
- eluční roztok: 20 mmol/l fosfátový pufr, 0,1 mmol/l PMSF, 300 mmol/l NaCl, 200 mmol/l imidazol;
- pufr pro elektroforézu: „Laemmli Running Buffer“ (10x): 30 g Tris, 144 g glycin, 10 g SDS v 1 l H₂O, pH 8,3;
- kontrolní roztok s markery „Color Prestained Protein Standard“ (11–245 kDa, BioLabs Inc.).

4.1.9 Biologický materiál

- Kmen *Escherichia coli* Origami B obsahující plazmidy pET22b(+) a pGro7 (Rucká et al. 2019). Gen pro NitEg (optimalizovaný pro expresi v *E. coli*) je ligován do plasmidu pET22b(+) podobně jako geny pro jiné nitrilázy v citované práci. Komerční plasmid pGro7 (TaKaRa Bio Inc., Japonsko) kóduje bakteriální chaperon GroEL/ES. Tento gen zde nebyl exprimován,

protože chaperon může působit obtíže při purifikaci (váže se na žádaný protein a je s ním koeluován) (Petříčková et al. 2012).

4.2 Kultivace buněk

Kultivační médium bylo nejprve sterilizováno při teplotě 121 °C, po vychladnutí do něj byl přidán ampicilin (100 µg/ml) a chloramfenikol (35 µg/ml). Do 200 ml kultivačního média 2TY byl naočkován výše uvedený kmen *E. coli*. Kultivace proběhla aerobně při 37 °C na reciproké třepačce (160 ot./min). Optická hustota byla měřena při 600 nm (OD_{600}). Po dosažení $OD_{600} \approx 1,0$ následovala indukce exprese genu pomocí 0,02 mmol/l IPTG (1 ml 1 mmol/l roztoku na 50 ml kultivačního media), která probíhala při 20 °C po dobu 20 hodin. Buňky byly odstředěny a promyty 20 mmol/l fosfátovým pufrům s přidavkem 0,1 mmol/l PMSF (pH 7,6) a šokově zmrazeny na – 80 °C.

4.3 Aktivita buněk

4.3.1 Aktivita buněk ke kyanidu v alkalickém prostředí

Suspenze buněk byla naředěna na optickou hustotu $OD_{600} = 1$ pufrům A. Reakce probíhala v pufrům s různým pH (9,0–10,5). Použity byly pufrům: 100 mmol/l Tris/HCl, pH 9,0 a 100 mmol/l glycin/NaOH, pH 10,0 a 10,5. 950 µl suspenze buněk bylo preinkubováno 5 minut při 30 °C a 850 ot./min. Celkový objem reakční směsi činil 1 ml. Přidáním 50 µl 500 mmol/l substrátu (KCN) byla zahájena reakce, která probíhala za stejných podmínek. V průběhu reakce bylo odebíráno 100 µl reakční směsi do 200 µl methanolu ke stanovení volného kyanidu (viz 4.7.2). Odběry byly provedeny po 5, 10, 30 a 60 min.

V pufru A byla stanovena aktivita buněk ke kyanidu. Suspenze buněk byla naředěna pufrům A na $OD_{600} = 0,1$. Preinkubace a reakce proběhla při 30 °C, 850 ot./min a pH 8,0. Po preinkubaci (5 min) byl přidán 25 mmol/l KCN (z 500 mmol/l zásobního roztoku), celkový objem činil 0,5 ml. Reakce probíhala

4 min, poté bylo odebráno 200 μ l reakční směsi do 400 μ l methanolu k zastavení reakce. Vyhodnocení proběhlo metodou stanovení formamidu (viz 4.7.3).

Stejným způsobem byla stanovena aktivita bezbuněčného extraktu ke KCN (místo suspenze buněk byl použit extrakt v koncentraci 0,02 mg proteinu/ml reakční směsi).

4.3.2 Aktivita buněk k fumaronitrilu a 2-kyanopyridinu

Suspenze buněk byla naředěna na $OD_{600}=5$ v pufru A. Preinkubace a reakce proběhly jako v předchozím stanovení. Po preinkubaci (5 min) byl přidán fumaronitril na konečnou koncentraci 25 mmol/l (z 500 mmol/l zásobního roztoku v methanolu). Celkový objem reakční směsi činil 0,5 ml. Reakce trvala 10 min a byla zastavena přidavkem 50 μ l 2 M HCl. Ke stanovení aktivity buněk byla použita HPLC (viz 4.7.1).

Aktivita buněk ke 2-kyanopyridinu byla stanovena analogicky (s rozdílem v zásobním roztoku – 2-kyanopyridin byl rozpuštěn a ředěn pufrům A).

4.4 Purifikace enzymu

Buňky byly resuspendovány ve 20 mmol/l fosfátovém pufru s 1 mmol/l PMSF a sonikovány desetkrát 30 s při 10% výkonu sonikátoru. Dezintegrované buňky byly centrifugovány 15 min při 27 000 g a 4 °C (centrifuga Avanti JXN-26). Takto získaný bezbuněčný extrakt byl smíchan s 6 ml matrice TALON (předem ekvilibrované 20 mmol/l fosfátovým pufrům o pH 7,6) a 2 hodiny inkubován (za stálého míchání při 4 °C). Matrice s navázanými proteiny byla převedena do dvou 2 ml kolonek (TALON Gravity Column). Nikelnaté ionty v kolonce chelatovaly histidinové kotvy („His-Tag“) na C-terminální části molekul proteinu. Během promývání imidazolem došlo k navázání imidazolu na nikelnaté ionty, což způsobilo vyvázání enzymu z kolonky. Nespecifické proteiny byly vymyty 20 mmol/l fosfátovým pufrům s 10 mmol/l imidazolem.

Poté proběhla eluce proteinů 200 mmol/l roztokem imidazolu (eluční roztok obsahoval 20 mmol/l fosfátový pufr, 0,1 mmol/l PMSF, 300 mmol/l NaCl a 200 mmol/l imidazol). 1,5 ml frakce byly postupně odebírány a poté analyzovány pomocí SDS-PAGE (10% polyakrylamidový gel s dodecylsíránem sodným). Jako vzorkový pufr byl použit NuPAGE s 100 mmol/l DTT. Společně se vzorky byly elektroforézou analyzovány kontrolní roztoky s markery o velikosti 11–245 kDa (pro vyhodnocení elektroforeogramu). Aktivní frakce byly spojeny a zakoncentrovány ultrafiltrací na kolonkách Amicon Ultra 30K. Před dalšími experimenty (4.5) byl pufr vyměněn za pufr A (pH 8,0).

4.4.1 Reakce s kyanidem

Enzym ze zásobního roztoku byl naředěn na 0,02 mg/ml pufrém A (pH 8,0). 2 μ l enzymu a 473 μ l pufru A bylo preinkubováno při 30 °C a 850 ot./min po dobu 5 min. Reakce byla zahájena přidáním 25 μ l 500 mmol/l KCN (do finální koncentrace 25 mmol/l). Reakce probíhala 1,5 min (při 30 °C a 850 ot./min). Poté byla zastavena v odebraném vzorku (200 μ l) methanolem (400 μ l). Následovalo stanovení KCN metodou s kyselinou pikrovou, která je popsána v kapitole 4.7.2.

4.5 Charakterizace enzymu

4.5.1 Stanovení pH optima

Pro stanovení optimálního pH enzymu byly použity Britton-Robinsonovy pufrы o pH 4,0–10,8. Celkový objem reakční směsi činil 0,5 ml. Enzym (0,023 mg/ml v pufru A) byl preinkubován v Thermomixeru 5 minut při 30 °C a 850 ot./min. Reakce byla zahájena přidáním 500 mmol/l 2-kyanopyridinu na konečnou koncentraci 25 mmol/l. Inkubace probíhala 10 min za stejných podmínek, poté byla zastavena přidávkem 50 μ l 2 M HCl. Kvantifikace produktu proběhla pomocí HPLC (4.7.1).

4.5.2 Stanovení teplotního optima

Optimální teplota byla určena analogicky ke stanovení pH optima, ale za různých teplot (20–50 °C) a za konstantního pH (v pufru A o pH 8,0).

4.5.3 Stanovení teplotní stability

Teplotní odolnost enzymu byla stanovena během 50 h preinkubace za různých teplot (27, 37, 43 a 50 °C). Preinkubace probíhala v pufru A, při koncentraci proteinu 13,1 mg/ml a bez třepání. V časových intervalech (po 1, 4, 30 a 50 h) byly odebírány vzorky k reakci se substrátem, která probíhala ve všech vzorcích za stejných podmínek (1 nebo 2 min – podle odhadované rychlosti degradace kyanidu, 30 °C, 850 ot./min, pH 8,0 – pufr A). Celkový objem reakční směsi v této fázi experimentu činil 0,25 ml. Reakce byla zastavena dvojnásobným objemem methanolu. Úbytek kyanidu byl stanoven metodou s kyselinou pikrovou (4.7.2).

4.6 Konverze kyanidu

4.6.1 Reakce v přítomnosti polutantů

Vliv polutantů na konverzi kyanidu byl stanoven s pufrům B (pH 9,0) obsahujícím thiokyanatan (8,6 mmol/l), sulfid (23,4 mmol/l), amoniak (38,9 mmol/l) nebo fenol (4,3 nebo 12,8 mmol/l). Těsně před reakcí byl do roztoku přidán KCN do konečné koncentrace 25 mmol/l. Poté byla reakce zahájena přídatkem 8 µl enzymu (ze zásobního roztoku 13,1 mg/ml s aktivitou 811,4 U/mg), celkový objem reakce činil 1 ml. Preinkubace a reakce proběhly při 30 °C a 850 ot./min. Preinkubace probíhala 5 min, z reakce bylo po 5 a 30 min odebráno 100 µl do dvojnásobného objemu methanolu ke stanovení kyanidu metodou s kyselinou pikrovou (4.7.2).

4.6.2 Reakce v simulovaných odpadních vodách

Vzorek simulované odpadní vody (složení v 4.1.7) byl preinkubován 5 min při 30 °C a 850 ot./min. Těsně před zahájením reakce byl přidán 25 mmol/l KCN, poté bylo přidáno 8 µl enzymu (0,02 mg/ml v reakci, 811,4 U/mg). Celkový objem

reakční směsi činil 1 ml. Preinkubace, reakce a stanovení proběhly analogicky ke stanovení vlivu polutantů na konverzi kyanidu (4.6.1).

4.7 Analytické metody

4.7.1 HPLC metody

HPLC byla použita ke stanovení koncentrace 2-kyanopyridinu a fumaronitrilu a jejich produktů (4.3.2, 4.5.1–4.5.3). Reakční směsi byly centrifugovány při 1400 ot./min po dobu 4 min, supernatanty byly desetkrát zředěny mobilní fází. Byla použita kolona ACE C8 a mobilní fáze obsahující 10 % acetonitril s fosfátovým pufrem (viz 4.1.3). Průtok mobilní fáze byl 0,9 ml/min. Standardní roztoky 2-kyanopyridinu, kyseliny pikolinové, pikolinamidu, fumaronitrilu, (2E)-3-kyanakrylamidu a kyseliny (2E)-3-kyanakrylové byly analyzovány současně se vzorky. Standardní roztoky byly připraveny dvacetinásobným ředěním zásobních roztoků mobilní fází (příprava mobilní fáze a standardů: 4.1.3 a 4.1.6). Z výsledné plochy píků byla vypočtena koncentrace stanovované látky pomocí kalibračních křivek (viz 4.7.5).

4.7.2 Spektrofotometrické stanovení kyanidu s kyselinou pikrovou

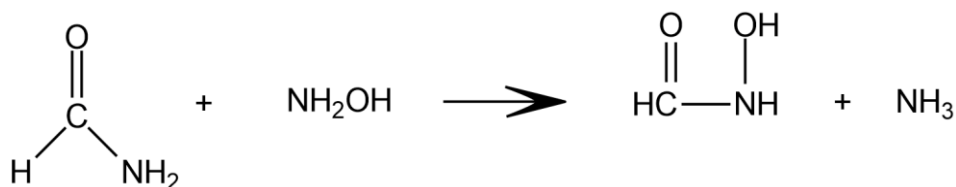
KCN reaguje s kyselinou pikrovou za vzniku barevného produktu, jehož koncentrace se stanovuje spektrofotometricky při 520 nm (Fisher a Brown 1952). Koncentrace produktu je přímo úměrná koncentraci kyanidu ve vzorku v rozmezí 0–1 mmol/l. Pro výpočet koncentrace byla použita kalibrační křivka, jejíž výpočet je popsán v kapitole 4.7.5.

Pro stanovení bylo z reakční směsi odebráno 100 μ l do zkumavky s dvojnásobným množstvím 100% methanolu k zastavení reakce. Tato směs byla centrifugována při 4500 ot./min po dobu 4 min. Pak bylo 10 μ l supernatantu odebráno do 90 μ l 200 mmol/l Tris pufru o pH 8,0. Ke směsi bylo přidáno 200 μ l 0,5% kyseliny pikrové a zkumavka byla přemístěna do vroucí vodní lázně. Po 5 min byla zkumavka prudce ochlazená ve vodě s ledovou tříští. Do zkumavky

bylo přidáno 700 μl destilované vody, obsah byl přemístěn do kyvety a následně proměřen spektrofotometrem při 520 nm proti slepému vzorku. Slepý vzorek byl připraven stejným postupem jako vzorek, ale místo reakční směsi bylo do methanolu přidáno 100 μl pufru používaného v reakci (většinou pufr A).

4.7.3 Stanovení formamidu

NitEg rozkládá kyanid na formamid, jenž je detekován kolorimetrickým stanovením železitého komplexu. Do reakce nejprve vstupuje hydroxylamin, který s formamidem vytváří v zásaditém prostředí kyselinu formohydroxamovou (Obrázek 4). Po přidavku FeCl_3 a HCl vzniká železitý komplex, který se proměří spektrofotometricky při 540 nm (Cantarella 1983).



Obrázek 4 – Přeměna formamidu na kyselinu formohydroxamovou

Pro stanovení formamidu bylo z reakční směsi odebráno 200 μl do zkumavky s dvojnásobným množstvím 100% methanolu k zastavení reakce. Zkumavka byla centrifugována při 4500 ot./min po dobu 4 min. Pak bylo 200 μl supernatantu odebráno do 400 μl roztoku hydroxylamin/NaOH (příprava viz 4.1.4), zkumavka byla umístěna do Thermomixeru a zahřívána při 60 $^\circ\text{C}$ po dobu 10 min. Poté bylo přidáno 200 μl 4 M HCl a 200 μl 1,23 M FeCl_3 . Obsah zkumavky byl promíchán, přemístěn do kyvety a proměřen spektrofotometrem při 540 nm vůči slepému vzorku. Koncentrace byla získána pomocí přepočtu podle rovnice získané z kalibrační křivky (viz 4.7.5).

4.7.4 Stanovení koncentrace bílkovin podle Bradforda

Stanovení probíhá pomocí vazby proteinu na barvivo Coomassie brilliantovou modř. Vazbou dochází ke změně absorpčního maxima barviva z 465 na 595 nm. Vazba vzniká již po 2 min reakce a je stabilní 1 h (Bradford 1976).

Pro stanovení koncentrace proteinu byl enzym NitEg naředěn na 0,05 mg/ml pufrém A. Z tohoto roztoku bylo odebráno 20 μ l a přidáno 180 μ l Bradfordova činidla. Reakce probíhala 4 min, poté následovalo spektrofotometrické stanovení. Absorbance vzorku byla proměřena vůči slepému vzorku (příprava slepého vzorku v 4.7.2) při 595 nm. Koncentrace proteinu byly vypočteny z kalibrační křivky (viz 4.7.5).

4.7.5 Kalibrační křivky

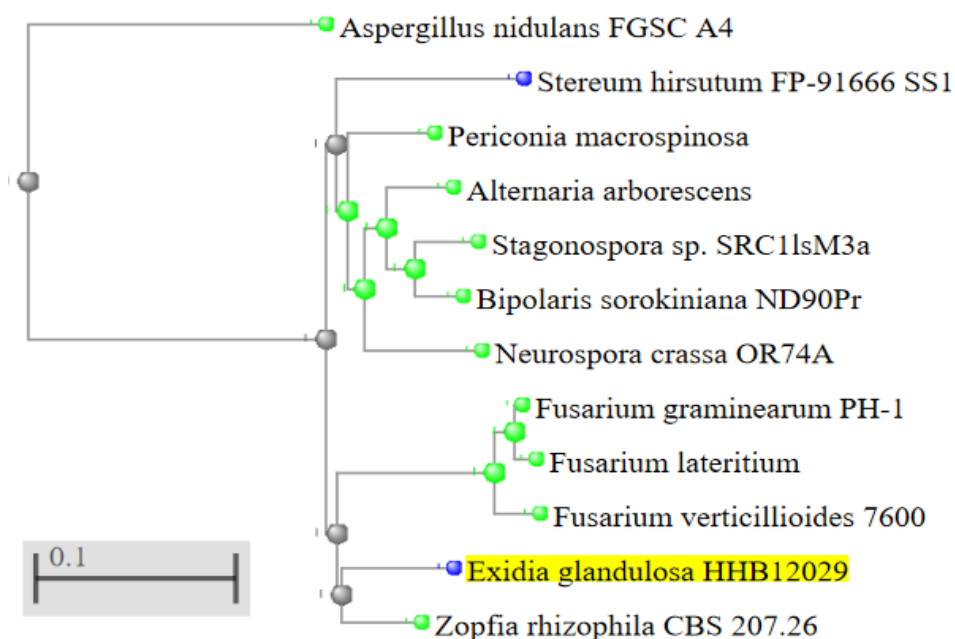
Kalibrační křivky pro výpočet koncentrací všech stanovovaných látek byly sestaveny obdobným způsobem: Pomocí HPLC nebo spektrofotometrie byla danou metodou proměřena řada roztoků stanovované látky o známých koncentracích. Zpravidla byly použity koncentrace v rozsahu 0–1 mmol/l (pro formamid byly použity koncentrace 0–10 mmol/l). Pro stanovení bílkovin metodou Bradforda byla sestavena kalibrační křivka s BSA (hovězí sérový albumin) v koncentraci 0–1 mg/ml. Kalibrační křivky jednotlivých látek jsou v příloze této práce.

5 VÝSLEDKY

5.1 Sekvenční analýza

Analýza sekvencí kyanidhydratáz uložených v databázi GenBank byla provedena pomocí programu BLAST („Basic Local Alignment Search Tool“), dostupného na webových stránkách Národního centra pro biotechnologické informace (NCBI, USA). Jako templát byla použita sekvence kyanidhydratázy NitEg z houby *Exidia glandulosa*, která byla vybrána během předchozího výzkumu v Laboratoři biotransformací MBÚ AV ČR. Enzym NitEg je jednou z mála kyanidhydratáz v oddělení Basidiomycota.

Fylogenetický strom (Obrázek 5) ukazuje příbuznost kyanidhydratázy NitEg a některých dříve charakterizovaných kyanidhydratáz z hub druhů *Aspergillus nidulans*, *Fusarium graminearum* (teleomorfa *Gibberella zeae*), *Fusarium lateritium*, *Fusarium verticillioides* (teleomorfa *Gibberella moniliformis*) a *Neurospora crassa* ((Basile et al. 2008; Petříčková et al. 2012). Z fylogenetického stromu je dále patrné, ve kterých houbách se vyskytují proteiny (hypotetické kyanidhydratázy) s nejvyšší podobností k enzymu NitEg. Jedná se o několik druhů z oddělení Ascomycota (*Zopfia rhizophila*, *Periconia macrospinosa*, *Alternaria arborescens*, *Stagonospora* sp., *Bipolaris sorokiniana*). Jediná dříve charakterizovaná kyanidhydratáza z houby oddělení Basidiomycota – *Stereum hirsutum* (Rucká et al. 2020) – je enzymu NitEg méně podobná než uvedené enzymy z oddělení Ascomycota. Z charakterizovaných kyanidhydratáz jsou enzymu NitEg nejpodobnější enzymy z *Neurospora crassa* a *Fusarium graminearum*, oba se stupněm identity aminokyselinové sekvence 86 % (Tab. 1).



Obrázek 5 – Fylogenetický strom vybraných kyanidhydratáz; zelená barva odpovídá houbám z oddělení Ascomycota, modrá houbám z oddělení Basidiomycota; obrázek vytvořen pomocí programu BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

Tabulka 1 – Stupeň identity aminokyselinových sekvencí vybraných kyanidhydratáz v porovnání se sekvencí z *Exidia glandulosa*

Oddělení	Druh	Stupeň identity
Ascomycota	<i>Zopfia rhizophila</i>	91 %
	<i>Periconia macrospinosa</i>	90 %
	<i>Alternaria arborescens</i>	90 %
	<i>Stagonospora sp.</i>	89 %
	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	89 %
	<i>Neurospora crassa</i>	86 %
	<i>Fusarium graminearum</i>	86 %
	<i>Fusarium lateritium</i>	85 %
	<i>Fusarium verticillioides</i>	85 %
Basidiomycota	<i>Stereum hirsutum</i>	82 %
Ascomycota	<i>Aspergillus nidulans</i>	68 %

5.2 Kyanidhydratázová a nitrilázová aktivita buněk

Buňky *E. coli*, u kterých byla indukována exprese genu pro NitEg, byly před purifikací enzymu podrobeny experimentům k potvrzení jejich schopnosti transformovat kyanid. Kromě aktivity ke KCN byla zkoumána aktivita k substrátům fumaronitrilu a 2-kyanopyridinu, protože kyanidhydratázy studované v předchozích pracích k nim vykazovaly určitou aktivitu (Martínková et al. 2015).

Specifická aktivita buněk ke kyanidu byla stanovena v reakční směsi se suspenzí buněk o $OD_{600}=0,01$ při pH 8,0 a vypočtena z rychlosti tvorby formamidu po 1,5 min, kdy konverze kyanidu proběhla z cca 20 %. Buňky měly specifickou aktivitu $88,4 \pm 2,2$ U/mg sušiny pro 25 mmol/l KCN.

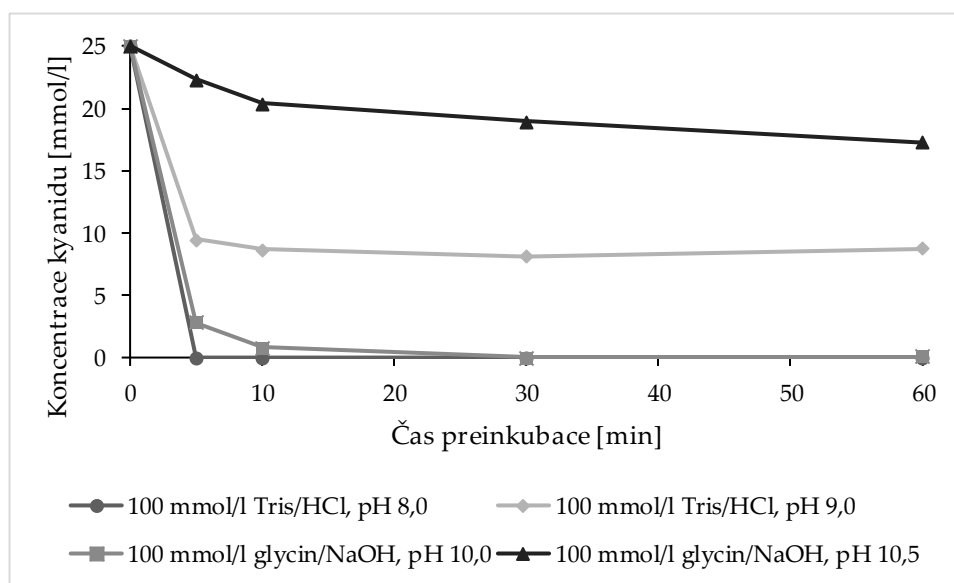
Po dezintegraci (sonikaci) buněk byla stejným způsobem stanovena aktivita bezbuněčného extraktu (0,02 mg/ml reakční směsi).. Tento extrakt měl aktivitu $175,6 \pm 2,2$ U/mg proteinu.

Pro reakce dalších substrátů byla použita vyšší koncentrace buněk, protože se podle předchozích výsledků s jinými kyanidhydratázami (Martínková et al. 2015) předpokládala nižší aktivita. Pro fumaronitril (25 mmol/l) byla specifická aktivita buněk stanovena se suspenzí o $OD_{600}=5$ (s obsahem sušiny 1,5 mg/ml) $0,15 \pm 0,03$ U/mg sušiny. Byla detekována dvojí aktivita enzymu a každá dala vzniknout jinému produktu. Pomocí nitrilázové aktivity vznikla z fumaronitrilu kyselina 3-kyanprop-2-enová (kyselina 3-kyanakrylová) a pomocí aktivity nitrilhydratázové vznikl 3-kyanprop-2-enamid (3-kyanakrylamid) (pro vzorce produktů viz Obrázek 3). Poměr kyseliny a amidu byl cca 3 : 1.

Pro 2-kyanopyridin (25 mmol/l) byla specifická aktivita buněk stanovena za stejných podmínek (se suspenzí $OD_{600}=5$). Podobně jako u fumaronitrilu vznikly

z 2-kyanopyridinu dva produkty: kyselina pyridin-2-karboxylová (kyselina pikolinová) a pyridin-2-karboxamid (pikolinamid) v poměru cca 2 : 1.

Konverze 25 mmol/l kyanidu byla dále prováděna v pufrech o různých hodnotách pH. Pro pH 8,0 a 9,0 byl použit pufr 100 mmol/l Tris/HCl, pro pH 10,0 a 10,5 pufr 100 mmol/l glycin/NaOH. Byla použita suspenze buněk o $OD_{600} = 1$ (obsah sušiny 0,3 mg/ml). Po 60 min bylo při pH 9,0 dosaženo konverze z cca 65 %, při pH 10,0 z cca 99,6 % a v pH 10,5 pouze z cca 30 %. Nižší konverze při pH 9,0 byla tedy zřejmě způsobena typem použitého pufru. V pH 8,0 bylo dosaženo 100% konverze již po 5 min reakce (Obrázek 6).

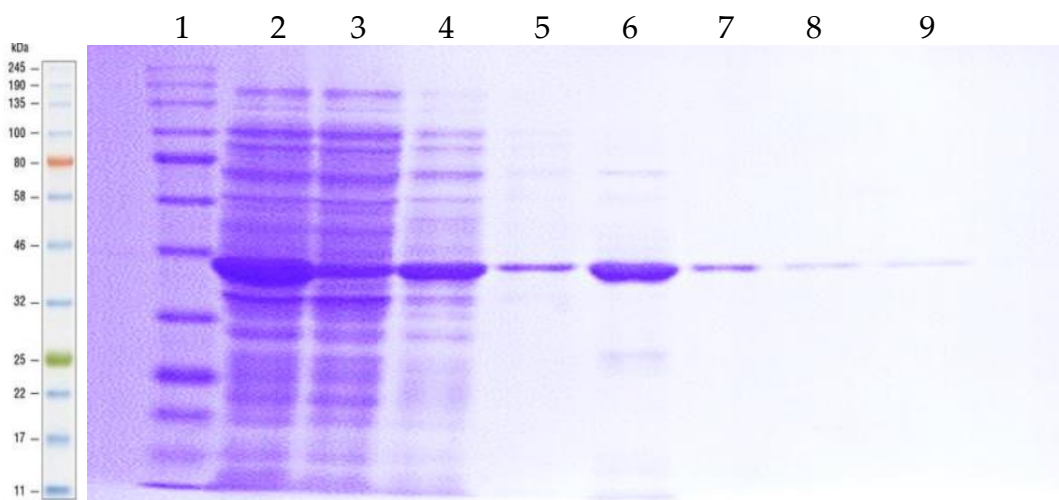


Obrázek 6 – Stanovení vlivu pH na aktivitu buněk ke KCN; reakce 60 min při 30 °C a různých pH

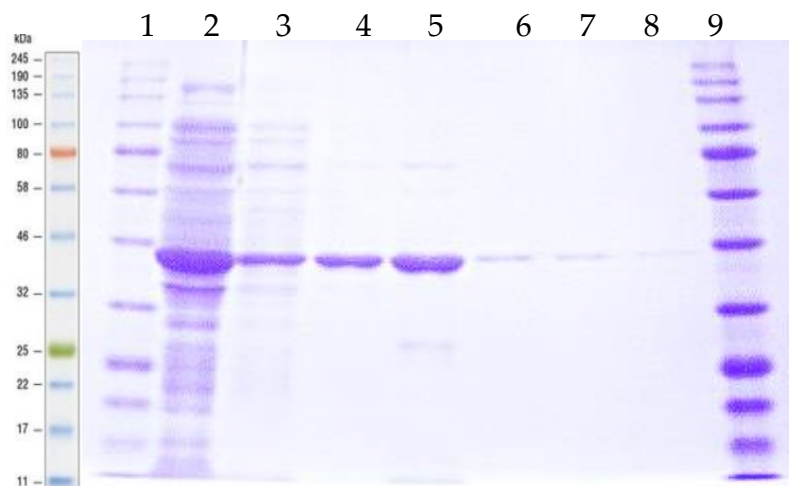
5.3 Příprava enzymu

Z 200 ml kultury buněk bylo připraveno 22 ml extraktu s obsahem proteinů 16,3 mg/ml (stanoveno podle Bradforda, 4.7.4). Pro purifikaci byly použity dvě chromatografické kolonky TALON Gravity Column, ze kterých byly sbírány frakce jednotlivých eluátů. Purifikovaný enzym byl získán spojením frakcí eluovaných z obou kolonek 200 mmol/l imidazolem (Obrázek 8 a 8). Zakoncentrováním spojených frakcí bylo získáno 0,92 ml purifikovaného

enzymu s koncentrací bílkovin 13,1 mg/ml. Výsledná čistota enzymu byla cca 24 %. Výtěžek purifikace činil 15,5 %.



Obrázek 7 – Elektroforeogram SDS-PAGE – purifikace NitEg na 1. kolonce TALON Gravity Column (2 ml); jednotlivé dráhy obsahují: 1 – kontrolní roztok s markery, 2 – supernatant bezbuněčného extraktu, 3 – nenavázaný protein, 4 – eluát z promytí kolonky 10 mM imidazolem, 5–9 – eluáty z promytí kolonky 200 mM imidazolem



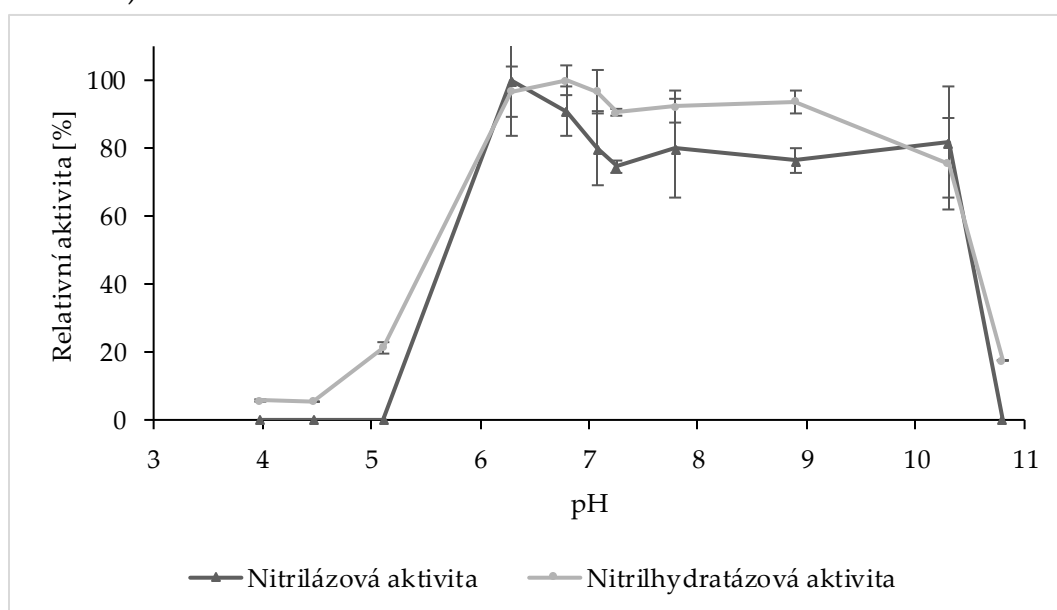
Obrázek 8 – Elektroforeogram SDS-PAGE – purifikace NitEg na 2. kolonce TALON Gravity Column (2 ml); jednotlivé dráhy obsahují: 1,9 – kontrolní roztok s markery, 2 – supernatant bezbuněčného extraktu, 3 – nenavázaný protein, 4–8 – eluáty z promytí kolonky 200 mM imidazolem

Aktivita purifikovaného enzymu ke kyanidu (25 mmol/l KCN) byla vypočtena z rychlosti úbytku kyanidu za 1,5 min při pH 8,0 (pufr A). Bylo dosaženo konverze kyanidu z cca 20 %. Aktivita enzymu se rovnala 811 ± 22 U/mg proteinu.

5.4 Biochemické vlastnosti enzymu

5.4.1 Vliv pH na aktivitu enzymu

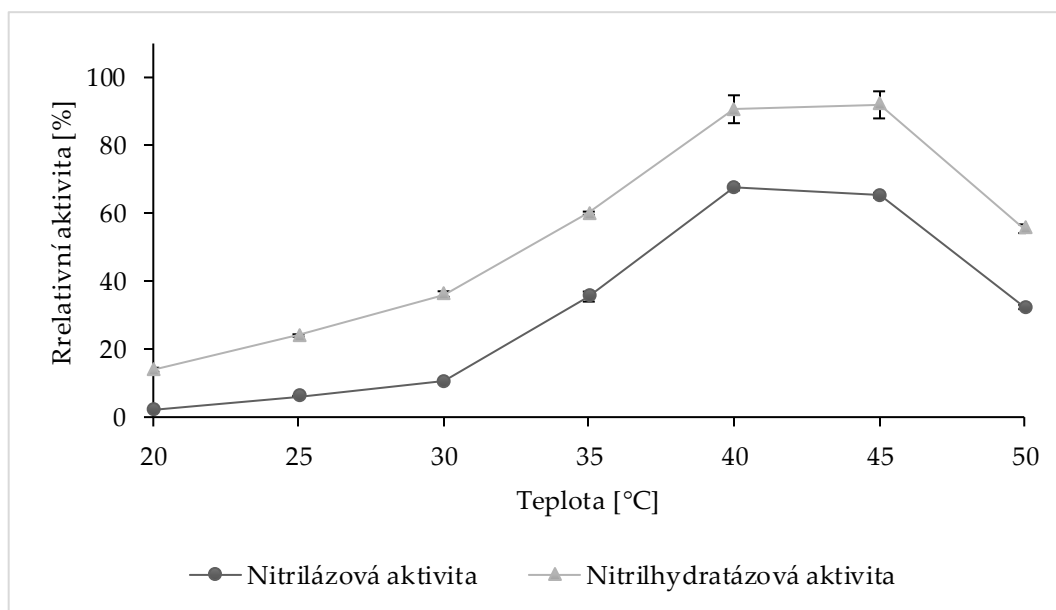
Vliv pH na aktivitu enzymu byl stanovován v pufrch o pH 4,0–10,8. Jako substrát byl vybrán 2-kyanopyridin pro svou stabilitu v tomto rozsahu pH. Naproti tomu stabilita roztoků kyanidu se s klesajícím pH snižuje. Aktivita purifikovaného enzymu s 25 mmol/l 2-kyanopyridinem byla $6,49 \pm 0,14$ U/mg při 30 °C a pH 8,0. Enzym vykazoval dvojitou aktivitu podobně jako celé buňky. Nitrilázová aktivita byla $4,85 \pm 0,10$ U/mg proteinu a nitrilhydratázová aktivita byla $1,64 \pm 0,04$ U/mg proteinu. Enzym byl aktivní v celém rozsahu pH, ale v krajních hodnotách (pod pH 4,5 a v 10,8) byla jeho aktivita nižší než 20 % maximální aktivity. pH optimum obou aktivit je široké, cca 6,3–10,3. Enzym má nitrilhydratázovou aktivitu v širším rozsahu pH než aktivitu nitrilázovou (Obrázek 9).



Obrázek 9 – Vliv pH na aktivitu enzymu NitEg pro substrát 2-kyanopyridin; reakce 10 min při 30 °C

5.4.2 Vliv teploty na aktivitu enzymu

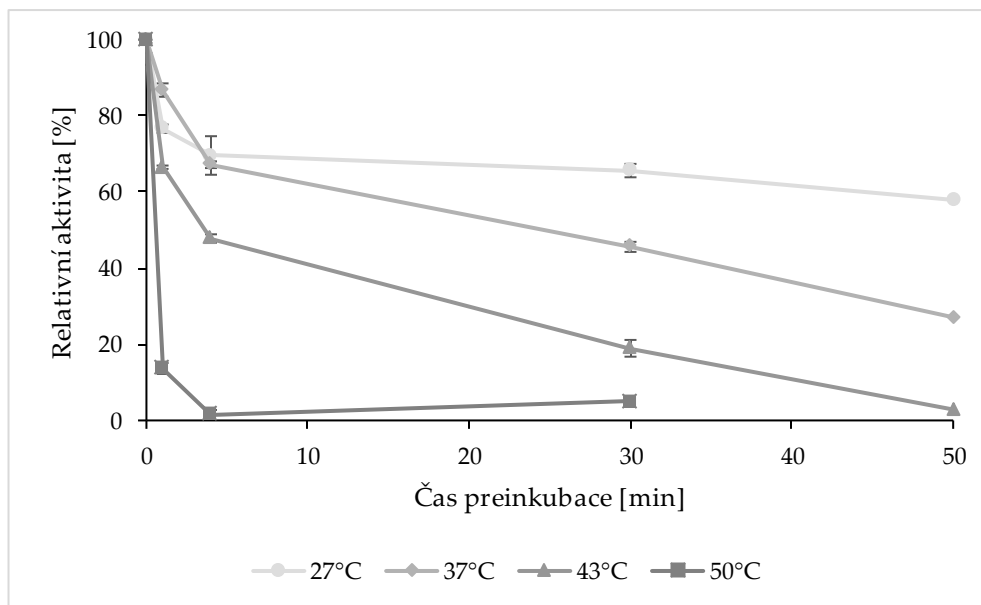
Optimální teplota pro NitEg byla stanovována v rozmezí 40–45 °C. Podobně jako v předchozím případě byl použit 2-kyanopyridin jako substrát pro svou stabilitu. Při 40–45 °C byla naměřena nejvyšší nitrilázová i nitrilhydratázová aktivita. Enzym byl také dostatečně aktivní při 35 °C a 50 °C, kde se aktivity rovnaly asi 50–60 % svých maxim. Poměr nitrilhydratázové a nitrilázové aktivity se v závislosti na teplotě měnil (Obrázek 10).



Obrázek 10 – Vliv teploty na aktivitu enzymu NitEg pro substrát 2-kyanopyridin; reakce 10 min při pH 8,0

5.4.3 Vliv teploty na stabilitu enzymu

Teplotní stabilita byla hodnocena po preinkubaci purifikovaného enzymu při různých teplotách bez třepání v pH 8,0. Zbytkové aktivity (Obrázek 11) byly stanoveny s 25 mmol/l KCN při pH 8,0 a 30 °C. Enzym byl nejstabilnější při 27 °C, kdy zůstalo zachováno 66 % původní aktivity po 30 h a 58 % po 53 h. Při 37 °C to bylo po 46 % a 27 %. Při 43 °C klesla aktivita na 19 % po 30 h a 5 % po 53 h. Při 50 °C se aktivita snížila na cca 14 % již po 1 h.



Obrázek 11 – Stanovení teplotní stability NitEg s 25 mmol/l KCN, preinkubace enzymu 50 h v různých teplotách, 1–2 min reakce se substrátem při 30 °C a pH 8,0; hodnota pro 50 °C v 50 h nebyla stanovena.

5.5 Konverze kyanidu

5.5.1 Vliv polutantů na konverzi kyanidu

Cílem této části práce bylo zjistit, zda některé polutanty přítomné v odpadních vodách neovlivňují funkci NitEg. Sledován byl vliv látek, které jsou běžně přítomné v odpadních vodách petrochemického a koksárenského průmyslu: sulfid, thiokyanatan, amoniak a fenol. Zastoupení těchto látek se liší v závislosti na zdroji odpadní vody.

V petrochemických a rafinérských odpadních vodách byly stanoveny tyto maximální koncentrace kontaminantů na 1 l: 3500 mg sulfidu, 600 mg amoniaku, 128 mg fenolu a 120 mg kyanidu (Jarrah a Mu'azu 2016). V 1 l koksárenské odpadní vody bylo nalezeno např. 22–72 mg sulfidu, 181–381 mg amoniaku a 2,4–5,6 mg kyanidu (Yu et al. 2016).

V této práci bylo zjištěno, že testované polutanty mají na konverzi v použitých koncentracích zanedbatelný vliv, ale některé z nich interferují se stanovením kyanidu (Tabulka 2). Do všech roztoků bylo na začátku reakce přidáno stejné

množství kyanidu (25 mmol/l), ale při stanovování koncentrace v 0 min (před přidáním enzymu) byly naměřeny odlišné hodnoty. Nicméně výsledná konverze kyanidu byla ve všech vzorcích téměř úplná.

Tabulka 2 – Koncentrace KCN v reakčních směsích s aditivou; reakce v pufru glycin/NaOH, pH 9,0, při 30 °C; koncentrace enzymu 0,02 mg/ml

Polutant	Čas reakce		
	0 min	5 min	30 min
	KCN (mmol/l)		
S ₂ ⁻ (23,4 mmol/l)	30,6	7,3	0,1
SCN ⁻ (8,6 mmol/l)	25,8	2,5	0,0
NH ₄ ⁺ (38,9 mmol/l)	16,3	1,0	0,0
Fenol (4,3 mmol/l)	25,9	3,1	0,0
Fenol (12,8 mmol/l)	26,2	3,8	0,0

5.5.2 Reakce v simulovaných odpadních vodách

Simulované odpadní vody byly navrženy podle publikací, ve kterých se popisuje složení reálných odpadních vod z koksárenského (1–3; Yu et al. 2016; Pillai a Gupta 2016; Papadimitriou et al. 2009) a petrochemického průmyslu (4; Jarrah a Mu'azu 2016). Tabulka 3 uvádí složení připravených vod. Koncentrace kyanidu byla ve všech případech upravena na 25 mmol/l, aby byla zajištěna srovnatelnost výsledků s ostatními experimenty. Ze stejného důvodu do reakcí vstupovalo vždy 0,02 mg/ml enzymu. Hodnota pH všech vod byla upravena na 9,1 (pufr 100 mmol/l glycin/NaOH), neboť toto pH se uvádí u zmíněných odpadních vod.

Tabulka 3 – Složení simulovaných odpadních vod připravených podle: 1 – Yu et al. 2016, 2 – Pillai a Gupta 2016, 3 – Papadimitriou et al. 2009, 4 – Jarrah a Mu'azu 2016

Odpadní voda	KCN (mmol/l)	pH	Polutant (mmol/l)			
			S ₂ ⁻	SCN ⁻	NH ₄ ⁺	Fenol
1	25	9,1	1,5	-	13,9	9,6
2			-	4,6	38,9	9,6
3			-	8,6	10,7	12,8
4			22,1	-	2,5	0,6

Koncentrace kyanidu byla stanovena metodou s kyselinou pikrovou, se kterou některé složky odpadních vod interagují, a tím interferují se stanovením. Mezi tyto látky patří sulfid, aceton (propan-2-on), formaldehyd a oxid siřičitý. Pokud je koncentrace těchto látek vysoká, poskytují s kyselinou pikrovou falešně pozitivní reakci, v nízkých koncentracích však koncentraci kyanidu falešně snižují. Například pro sulfid platí, že koncentrace nad cca 100 mg/l (cca 3,1 mmol/l) falešně zvyšují koncentraci kyanidu, zatímco koncentrace nižší ji falešně snižují. Míra zkreslení výsledků závisí nejen na koncentraci daných látek, ale i na jejich vzájemné interakci (Fisher a Brown 1952).

Ve čtvrté odpadní vodě bylo 750 mg/l (22,1 mmol/l) sulfidu a počáteční hodnota kyanidu je tímto evidentně zkreslená, stejně jako hodnota měřená v 5 min. Naopak v první odpadní vodě bylo 49 mg/l (1,5 mmol/l) sulfidu, což mělo vést ke snížené počáteční koncentraci kyanidu. Není jasné, proč byla naměřena naopak zvýšená koncentrace, stejně jako proč byla zvýšená počáteční koncentrace kyanidu naměřena ve vzorcích bez sulfidu.

Ve všech vzorcích odpadních vod byla konverze kyanidu úspěšná ($\approx 100\%$) (Tabulka 4). Při stanovení kyanidu před přidáním enzymu byla naměřena vyšší koncentrace, než kolik se rovnal přídavek KCN. Tuto skutečnost pravděpodobně způsobily právě interferující látky.

Z důvodu interference některých polutantů s použitou metodou stanovení kyanidu bude pokus zopakován pracovníky laboratoře, kdy bude zůstatek kyanidu stanoven pomocí komerčního kitu.

Tabulka 4 – Úbytek KCN v simulovaných odpadních vodách připravených podle: 1 – Yu et al. 2016, 2 – Pillai a Gupta 2016, 3 – Papadimitriou et al. 2009, 4 – Jarrah a Mu'azu 2016

Odpadní voda	Čas reakce		
	0 min	5 min	30 min
	Stanovený KCN (mmol/l)		
1	27,0	2,3	0,1
2	27,0	5,2	0,0
3	26,9	2,6	0,1
4	27,3	4,7	0,3

6 DISKUZE

Experimentální část této práce se zabývala kyanidhydratázou z houby *Exidia glandulosa* NitEg. Ačkoli byl tento enzym vybrán na základě genetické podobnosti s již charakterizovanými kyanidhydratázami, biochemické vlastnosti tohoto enzymu se od vlastností dříve popsanych kyanidhydratáz v některých ohledech liší. Následující část práce se věnuje srovnání NitEg s kyanidhydratázami, které byly purifikovány a alespoň částečně charakterizovány, nebo jejichž bioremediační potenciál byl experimentálně zkoumán. Pozornost je věnována zejména vlivům různých podmínek na aktivitu a biodegradační účinnost těchto enzymů. Zásadními faktory, které je třeba zohlednit, jsou teplota, pH, koncentrace kyanidu a přítomnost dalších polutantů.

Kyanid se v průmyslových odvětvích používá v různých koncentracích: např. chemické loužení rud užívá koncentrace v rozmezí 5–20 mmol/l, pokovování produkuje větší objemy odpadu s koncentracemi kyanidu překračujícími 1 mol/l (Park et al. 2017). V práci Basile et al. (2008) byla předmětem remediace odpadní voda z pokovování mědí a stříbrem, ve které byl kyanid obsažen ve vysoké koncentraci (1 mol/l) společně s reziduálními koncentracemi stříbra a mědi. Původní koncentrace kyanidu byla naředěna na 100 mmol/l, čímž se současně snížilo pH z 11 na 8. V práci Krátkého (2019) byla zkoumána degradace kyanidu jak v simulovaných, tak ve skutečných koksárenských odpadních vodách; v obou vodách byla počáteční koncentrace kyanidu 5 mmol/l. V této práci byla v experimentech používána konstantní koncentrace kyanidu (25 mmol/l), aby bylo možné srovnat vliv reakčních podmínek a složek odpadní vody. Tato koncentrace kyanidu mimoto simuluje okamžité zvýšení kyanidu v důsledku technologické závady nebo havárie (jedná se o odhad). Skutečné koncentrace kyanidu se v takových případech mohou lišit a rychle se měnit s časem.

Při degradaci kyanidu hraje významnou roli pH roztoku. Odpadní vody jsou udržovány v alkalickém pH, aby se zamezilo vypařování kyanidu, a proto je důležité najít enzymy, které jsou schopny rozkládat kyanid při vysokém pH. Toleranci k alkalickému pH lze zvýšit genetickou manipulací (záměrnou mutací a přípravou hybridů), jak to bylo popsáno u kyanidhydratáz v práci Park et al. (2017). V této práci byl testován vliv pH na aktivitu enzymu. Purifikovaný enzym NitEg má pH optimum v rozmezí pH 6,3–10,3, což bylo zjištěno pro alternativní substrát, 2-kyanopyridin, protože kyanid není v celém tomto rozsahu pH stabilní. Pro samotné buňky proběhlo hodnocení vlivu pH pouze v rozmezí 8,0–10,5, v němž byly buňky aktivní, zejména do pH 10. Užší rozmezí pH optima (8–9) bylo stanoveno u kyanidhydratázy z *Aspergillus niger* v práci Rinágelové et al. (2014). Úzké pH optimum bylo stanoveno také u kyanidhydratáz z *Neurospora crassa*, *Gloeocercospora sorghi*, *Aspergillus nidulans* a *Gloeocercospora zaeae* v práci Basile et al. (2008). Všechny tyto enzymy vykazovaly pH optimum mezi 6 a 7, v hodnotách pH vyšších než 10 jejich aktivita prudce klesla. Je otázkou, jak přesné bylo toto stanovení provedeno, víme-li, že kyanid v kyselém pH vytěkává. Kyanidhydratáza ze *Stereum hirsutum* v práci Krátkého (2019) měla pH optimum při pH 8, ale při pH vyšším než 9 byly naměřeny velice nízké aktivity.

Enzymy degradující kyanid jsou většinou produkovány mezofilními mikroorganismy; typické podmínky pro rozklad kyanidu jsou 20–40 °C (Kumar et al. 2016). Pro aktivitu NitEg bylo zjištěno teplotní optimum při 40–45 °C. Velice podobné teplotní optimum bylo stanoveno u kyanidhydratáz z *Aspergillus niger* (cca 45 °C) (Rinágelová et al. 2014) a *Stereum hirsutum* (cca 40 °C) (Krátký 2019). V práci Basile et al. (2008) byla monitorována dlouhodobá teplotní stabilita kyanidhydratáz (po 2 dny) a podobný experiment byl proveden s enzymem NitEg. Kyanidhydratázy připravené v předchozí práci (Basile et al. 2008) si po dvou dnech zachovaly aktivitu vyšší než 70 % svých počátečních aktivit při 27 °C. Podobnou aktivitu si uchoval enzym NitEg (58 % aktivity po 53 h.).

Rozmezí teplotních stabilit se pro jednotlivé enzymy lišilo: enzymy z *N. crassa* a *G. zeae* byly stabilní v širokém rozmezí 27–43 °C, enzymy z *A. nidulans* a *G. sorghi* mezi 27 a 37 °C. Kyanidhydratáza NitEg byla z tohoto hlediska podobná spíše druhým dvěma enzymům, i když přímé srovnání není možné pro chybějící údaje v předchozí práci (např. nebyla uvedena koncentrace enzymu při preinkubaci). Nicméně je možné hodnotit teplotní stabilitu NitEg jako velmi dobrou (s téměř 50% zbytkovou aktivitou po 30 h při 37 °C). Navíc je tento enzym velmi stabilní při uchovávání v ledové lázni (4 °C). Po cca šest týdnů si zachoval původní aktivitu bez významných ztrát; po dalších čtyřech týdnech klesla jeho aktivita na cca 500 U/mg proteinu, tj. cca 60 % původní aktivity.

Konverze kyanidu v simulovaných petrochemických a koksárenských odpadních vodách byla v této práci téměř úplná. Kyanid (25 mmol/l) byl v těchto prostředích enzymem NitEg (v množství 0,02 mg/ml reakční směsi; cca 16 U/ml) velmi rychle degradován (s konverzí cca 90 % po 5 min a téměř úplně po 30 min). Degradace byla sledována také s jinými koncentracemi enzymu a substrátu (mimo rámec této práce; Martínková 2021 – nepublikované výsledky). Při snížení koncentrace enzymu na 0,005 mg/l (cca 4 U) trvala degradace 25 mmol/l kyanidu 60–120 min. Vyšší koncentrace kyanidu (50 mmol/l, 100 mmol/l) byly enzymem (0,02 mg/ml) téměř úplně eliminovány po 30–60 min.

Konverze 0,1 mol/l kyanidu ve vodě z pokovování stříbrem pomocí kyanidhydratázy z *A. nidulans* proběhla po 48 h z cca 70 %, s ostatními enzymy připravenými v práci Basile et al. 2008 z 90 %. V téže práci byla testována voda z pokovování mědí, kde všechny čtyři enzymy konvertovaly kyanid ze 70 % (po 48 h). Nižší konverze byla nejspíš způsobena tvorbou komplexů mědi s kyanidem nebo enzymem. Enzymy byly použity v koncentracích 0,07–0,014 mg/ml reakční směsi. Téměř úplné konverze bylo docíleno jen s enzymem z *N. crassa* po 1 h podobně jako s enzymem NitEg; reakce katalyzované ostatními

enzymy trvaly cca 8–48 h. Účinnost degradace vysokých koncentrací kyanidu v přítomnosti kovů enzymem NitEg je v současnosti předmětem studia v Laboratoři biotransformací.

Realizace enzymových degradací ve větších objemech závisí do značné míry na nákladech na přípravu enzymu. V poslední době byla většina kyanidhydratáz připravena heterologní expresí. Enzymy v práci Basile et al. (2008) byly připraveny pomocí afinitní chromatografie, stejně jako v této práci (výtěžek purifikace ani specifické aktivity enzymů nebyly v přechozí práci uvedeny). K purifikaci kyanidhydratázy v práci Rinágelové et al. (2014) byla použita ionexová chromatografie, zakoncentrování a následná afinitní chromatografie. Výtěžek se rovnal cca 17 %, což je velice podobný výtěžek jako v této práci, kde bylo docíleno 15,5% výtěžku pouze pomocí afinitní chromatografie. Navíc předpokládáme, že výtěžek enzymu NitEg bude možné zlepšit optimalizací purifikačního postupu (část enzymu se na matici nenavázala a došlo tak k určitým ztrátám). Jedním z možných řešení je navázání polyhistidinové kotvy na N-terminální část molekuly proteinu. Výtěžek kultivace *E. coli* byl při přípravě NitEg vysoký (více než 60 000 U z 200 ml kultury). V práci Krátkého (2019) byla k purifikaci enzymu ze *Stereum hirsutum* použita hydrofobní chromatografie, poté byl protein zakoncentrován a podroben gelové permeační chromatografii. Purifikace byla tedy časově náročnější, avšak celkově bylo dosaženo cca 61% výtěžku.

Výroba heterologních buněk je oproti enzymům levnější, protože nevyžaduje kroky vedoucí k purifikaci. Tím se sníží cena přípravy, což může být zásadní pro úspěch metody. Příkladem je použití rekombinantních buněk *E. coli* produkujících enzym z *Aspergillus niger* (Rinágelová et al. 2014). Pomocí těchto buněk (3 mg sušiny/ml) bylo docíleno 83% konverze kyanidu (vypočteno ze stanovení produkce formamidu). Nebyl detekován téměř žádný residuální KCN,

proto se odhaduje, že 15–20 % kyanidu vytěkalo. Reakce probíhala s uvedenou konverzí po tři dny v míchaném membránovém reaktoru s průtokem 0,2 ml/min.

Použití celých buněk však může vést v některých případech ke snížení rychlosti degradace v důsledku menšího styčného povrchu buněk a přítomnosti dalších proteinů (Kampmann et al. 2014). V bioaugmentačních a biovýsypkových metodách (a dalších podobných, které neprobíhají v uzavřených systémech) není použití buněk vhodné, protože by se jednalo o uvádění geneticky modifikovaného organismu do životního prostředí, což není v souladu se současnou legislativou (Zákon č. 78/2004 Sb.).

7 ZÁVĚR

Lidská činnost zahrnuje životní prostředí nebezpečnými chemickými látkami, mimo jiné kyanidem, který je toxický prakticky pro všechny živé organismy.

Biologická detoxikace kyanidů a nitrilů pomocí mikroorganismů se ve srovnání s chemickými metodami jeví jako ekonomicky výhodná metoda šetrnější k životnímu prostředí (pro svou nižší spotřebu chemikálií). Tato detoxikace je možná díky bakteriím a houbám, které jsou přirozeně schopné rozkládat kyanid na neškodné látky. Umožňují to bakteriální a fungální enzymy především z nadrodiny nitriláz.

Na základě podobnosti genů kyanidhydratáz byly nalezeny nové hypotetické enzymy tohoto typu. Pro znázornění jejich příbuznosti byl pro vybrané organismy sestaven fylogenetický strom, do kterého byly zahrnuty i některé již popsané enzymy.

Pro tuto práci byla vybrána kyanidhydratáza z houby *Exidia glandulosa* (černorosol bukový nebo uřatý) z oddělení Basidiomycota. Enzym byl připraven heterologní expresí v buňkách *E. coli* a poté purifikován pomocí afinitní chromatografie.

Aktivita enzymu byla nejprve potvrzena u celých buněk exprimujících gen pro NitEg. Byla stanovena a kvantifikována schopnost purifikovaného enzymu rozkládat různé substráty (KCN, fumaronitril a 2-kyanopyridin). V případě 2-kyanopyridinu a fumaronitrilu byla zjištěna dvojí enzymová aktivita NitEg: aktivita nitrilázová a nitrilhydratázová. Každá aktivita dává vzniknout jinému produktu – nitrilázová aktivita tvoří karboxylové kyseliny, nitrilhydratázová dává vznik amidům.

Byla zkoumána aktivita buněk s NitEg při různém pH se substrátem KCN. Konverze proběhla v celém testovaném rozmezí pH (8,0–10,5), i když při pH 10,5 byla konverze nižší. Dále byl zkoumán vliv pH na aktivitu samotného enzymu. Experimenty byly provedeny s 2-kyanopyridinem, protože roztoky kyanidu jsou při pH nižším než cca 8,5 nestabilní. Optimální pH při reakci s 2-kyanopyridinem bylo stanoveno v rozmezí 6,3–10,3. Maximální aktivity při reakci s 2-kyanopyridinem bylo docíleno v teplotním rozmezí 40–45 °C. Enzym vykazoval přijatelnou stabilitu během dvoudenní inkubace při 27 a 37 °C. Navíc byl po několik týdnů stabilní při 4 °C.

Enzym byl použit ke konverzi kyanidu v simulovaných odpadních vodách. Ve všech čtyřech směsích s různým poměrem thiokyanátu, sulfidu, amoniaku a fenolu bylo dosaženo téměř úplné konverze kyanidu při minimální spotřebě enzymu a po krátké reakční době.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool

BSA – hovězí sérový albumin

CN-WAD – kyanidy disociovatelné slabou kyselinou

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

IPTG – isopropyl-1-thio- β -D-galaktopyranosid

NADPH – nikotinamidadeninukleotidfosfát

NitEg – kyanidhydratáza z houby *Exidia glandulosa*

OD – optická hustota

PMSF – fenylmethylsulfonylfluorid

SDS-PAGE – elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s dodecylsíránem sodným

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. BASILE, L. J., R. C. WILLSON, B. T. SEWELL a M. J. BENEDIK, 2008. Genome mining of cyanide-degrading nitrilases from filamentous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. **80**(3), 427–435. ISSN 1432-0614. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-008-1559-2
2. BONE, K. a S. MILLS, 2013. *Principles and practice of phytotherapy* [online]. B.m.: Elsevier [vid. 2021-03-09]. ISBN 978-0-443-06992-5. Dostupné z: doi:10.1016/C2009-0-48725-7
3. BRADFORD, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* [online]. **72**(1), 248–254. ISSN 0003-2697. Dostupné z: doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
4. BUCHTER, A. a H. PETER, 1984. Clinical toxicology of acrylonitrile. *Giornale Italiano Di Medicina Del Lavoro*. **6**(3–4), 83–86. ISSN 0391-9889.
5. CAMPOS, M. G., P. PEREIRA a J. C. ROSEIRO, 2006. Packed-bed reactor for the integrated biodegradation of cyanide and formamide by immobilised *Fusarium oxysporum* CCM1 876 and *Methylobacterium* sp. RXM CCM1 908. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. **38**(6), 848–854. ISSN 0141-0229. Dostupné z: doi:10.1016/j.enzmictec.2005.08.008
6. CANTARELLA, H., 1983. *Hydrolysis of formamide and volatilization of ammonia from nitrogen fertilizers added to soils* [online]. USA. Disertační práce. Iowa State University. Dostupné z: <https://lib.dr.iastate.edu/rtd/7700>
7. COSMOS, A., B. ERDENEKHUYAG, G. YAO, H. LI, J. ZHAO, W. LAIJUN a X. LYU, 2020. Principles and methods of bio detoxification of cyanide contaminants. *Journal of Material Cycles and Waste Management* [online]. **22**(4), 939–954. ISSN 1611-8227. Dostupné z: doi:10.1007/s10163-020-01013-6
8. FISHER, F. B. a J. S. BROWN, 1952. Colorimetric determination of cyanide in stack gas and waste water. *Analytical Chemistry* [online]. **24**(9), 1440–1444. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac60069a014
9. GUPTA, N., C. BALOMAJUMDER a V. K. AGARWAL, 2010. Enzymatic mechanism and biochemistry for cyanide degradation: A review. *Journal of Hazardous Materials* [online]. **176**(1), 1–13. ISSN 0304-3894. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhazmat.2009.11.038

10. IBÁÑEZ, M. I., P. CABELLO, V. M. LUQUE-ALMAGRO, L. P. SÁEZ, A. OLAYA, V. SÁNCHEZ DE MEDINA, M. D. LUQUE DE CASTRO, C. MORENO-VIVIÁN a M. D. ROLDÁN, 2017. Quantitative proteomic analysis of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 in response to industrial cyanide-containing wastewaters using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry (LC-MS/MS). *PloS One* [online]. **12**(3), e0172908. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0172908
11. JARRAH, N. a N. D. MU'AZU, 2016. Simultaneous electro-oxidation of phenol, CN⁻, S²⁻ and NH₄⁺ in synthetic wastewater using boron doped diamond anode. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. **4**(3), 2656–2664. ISSN 2213-3437.
12. KAMPMANN, M., S. BOLL, J. BIELECKI, S. UHL, B. KLEINER, R. WICHMANN a Jan KOSSUCH, 2014. Efficient immobilization of mushroom tyrosinase utilizing whole cells from *Agaricus bisporus* and its application for degradation of bisphenol A. *Water Research* [online]. **57**, 295–303. ISSN 0043-1354. Dostupné z: doi:10.1016/j.watres.2014.03.054
13. KAO, C.M., K. CHEN, J. LIU, S. CHOU a S. CHEN, 2006. Enzymatic degradation of nitriles by *Klebsiella oxytoca*. *Applied microbiology and biotechnology* [online]. **71**, 228–33. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-005-0129-0
14. KRÁTKÝ, J., 2019. *Enzymy z hub s detoxikačním potenciálem* [online]. B.m. [vid. 2021-04-27]. České vysoké učení technické v Praze. Vypočetní a informační centrum. Dostupné z: <https://dspace.cvut.cz/handle/10467/91278>
15. KUMAR, R., S. SAHA, S. DHAKA, M. KURADE, C. KANG, S. BAEK a B. JEON, 2016. Remediation of cyanide-contaminated environments through microbes and plants: a review of current knowledge and future perspectives. *Geosystem Engineering* [online]. **20**, 1–13. Dostupné z: doi:10.1080/12269328.2016.1218303
16. KUYUCAK, N. a A. AKCIL, 2013. Cyanide and removal options from effluents in gold mining and metallurgical processes. *Minerals Engineering* [online]. **50–51**, 13–29. ISSN 0892-6875. Dostupné z: doi:10.1016/j.mineng.2013.05.027
17. LUQUE-ALMAGRO, V., C. MORENO-VIVIÁN a M. ROLDÁN, 2016. Biodegradation of cyanide wastes from mining and jewellery industries. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. **38**, 9–13. Dostupné z: doi:10.1016/j.copbio.2015.12.004

18. MARTÍNKOVÁ, L., 2019. Nitrile metabolism in fungi: A review of its key enzymes nitrilases with focus on their biotechnological impact. *Fungal Biology Reviews* [online]. **33**(2), 149–157. ISSN 1749-4613. Dostupné z: doi:10.1016/j.fbr.2018.11.002
19. MARTÍNKOVÁ, L. a M. CHMÁTAL, 2016. The integration of cyanide hydratase and tyrosinase catalysts enables effective degradation of cyanide and phenol in coking wastewaters. *Water Research* [online]. **102**, 90–95. ISSN 0043-1354. Dostupné z: doi:10.1016/j.watres.2016.06.016
20. MARTÍNKOVÁ, L., A. B. VESELÁ, A. RINÁGELOVÁ a M. CHMÁTAL, 2015. Cyanide hydratases and cyanide dihydratases: emerging tools in the biodegradation and biodetection of cyanide. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. **99**(21), 8875–8882. ISSN 1432-0614. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-015-6899-0
21. NAŘÍZENÍ VLÁDY Č. 401/2015 SB., nedatováno. *Nářízení vlády o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových vod a odpadních vod, náležitostech povolení k vypouštění odpadních vod do vod povrchových a do kanalizací a o citlivých oblastech.*
22. NAZLY, N., C.J. KNOWLES a A.J. BEARDSMORE, 1983. Detoxification of cyanide by immobilised fungi. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* [online]. **33 B**(2), 119–126. Dostupné z: doi:10.1002/jctb.280330207
23. PAPADIMITRIOU, C. A., P. SAMARAS a G.P. SAKELLAROPOULOS, 2009. Comparative study of phenol and cyanide containing wastewater in CSTR and SBR activated sludge reactors. *Bioresource Technology* [online]. **100**(1), 31–37. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2008.06.004
24. PARK, D., D. S. LEE, Y. M. KIM a J. M. PARK, 2008. Bioaugmentation of cyanide-degrading microorganisms in a full-scale cokes wastewater treatment facility. *Bioresource Technology* [online]. **99**(6), 2092–2096. ISSN 0960-8524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2007.03.027
25. PARK, J. M., B. T. SEWELL a M. J. BENEDIK, 2017. Cyanide bioremediation: the potential of engineered nitrilases. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. **101**(8), 3029–3042. ISSN 1432-0614. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-017-8204-x
26. PETŘÍČKOVÁ, A., A. B. VESELÁ, O. KAPLAN, D. KUBÁČ, B. UHNÁKOVÁ, A. MALANDRA, J. FELSBERG, A. RINÁGELOVÁ, P. WEYRAUCH, V. KŘEN, K. BEZOUŠKA a L. MARTÍNKOVÁ, 2012.

- Purification and characterization of heterologously expressed nitrilases from filamentous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. **93**(4), 1553–1561. ISSN 1432-0614. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-011-3525-7
27. PILLAI, I. M. S. a A. K. GUPTA, 2016. Anodic oxidation of coke oven wastewater: Multiparameter optimization for simultaneous removal of cyanide, COD and phenol. *Journal of Environmental Management* [online]. **176**, 45–53. ISSN 03014797. Dostupné z: doi:10.1016/j.jenvman.2016.03.021
28. RAMTEKE, P. W., N. G. MAURICE, B. JOSEPH a B. J. WADHER, 2013. Nitrile-converting enzymes: An eco-friendly tool for industrial biocatalysis. *Biotechnology and Applied Biochemistry* [online]. **60**(5), 459–481. ISSN 1470-8744. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1002/bab.1139
29. RAMZY, E. M., 2014. Toxicity and stability of sodium cyanide in fresh water fish Nile tilapia. *Water Science* [online]. **28**(1), 42–50. ISSN 1110-4929. Dostupné z: doi:10.1016/j.wsj.2014.09.002
30. RINÁGELOVÁ, A., O. KAPLAN, A. B. VESELÁ, M. CHMÁTAL, A. KŘENKOVÁ, O. PLÍHAL, F. PASQUARELLI, M. CANTARELLA a L. MARTÍNKOVÁ, 2014. Cyanide hydratase from *Aspergillus niger* K10: Overproduction in *Escherichia coli*, purification, characterization and use in continuous cyanide degradation. *Process Biochemistry* [online]. **49**(3), 445–450. ISSN 1359-5113. Dostupné z: doi:10.1016/j.procbio.2013.12.008
31. RUCKÁ, L., M. CHMÁTAL, N. KULIK, L. PETRÁSKOVÁ, H. PELANTOVÁ, P. NOVOTNÝ, R. PŘÍHODOVÁ, M. PÁTEK a L. MARTÍNKOVÁ, 2019. Genetic and functional diversity of nitrilases in Agaricomycotina. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **20**(23) [vid. 2021-01-02]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms20235990
32. RUCKÁ, L., N. KULIK, P. NOVOTNÝ, A. SEDOVA, L. PETRÁSKOVÁ, R. PŘÍHODOVÁ, B. KŘÍSTKOVÁ, P. HALADA, M. PÁTEK a L. MARTÍNKOVÁ, 2020. Plant nitrilase homologues in fungi: phylogenetic and functional analysis with focus on nitrilases in *Trametes versicolor* and *Agaricus bisporus*. *Molecules* [online]. **25**(17), 3861. Dostupné z: doi:10.3390/molecules25173861
33. SHARMA, S., 2012. Bioremediation: features, strategies and applications. *Asian Journal of Pharmacy and Life Science*. **2**, 12. ISSN 231 – 4423.
34. SINGH, N. a C. BALOMAJUMDER, 2017. Equilibrium isotherm and kinetic studies for the simultaneous removal of phenol and cyanide by

use of *S. odorifera* (MTCC 5700) immobilized on coconut shell activated carbon. *Applied Water Science* [online]. **7**(6), 3241–3255. ISSN 2190-5495. Dostupné z: doi:10.1007/s13201-016-0470-8

35. VESELÁ, A. B., A. PETŘÍČKOVÁ, P. WEYRAUCH a L. MARTÍNKOVÁ, 2013. Heterologous expression, purification and characterization of arylacetonitrilases from *Nectria haematococca* and *Arthroderma benhamiae*. *Biocatalysis and Biotransformation* [online]. **31**(1), 49–56. ISSN 1024-2422. Dostupné z: doi:10.3109/10242422.2012.758117
36. VESELÁ, A. B., L. RUCKÁ, O. KAPLAN, H. PELANTOVÁ, J. NEŠVERA, M. PÁTEK a L. MARTÍNKOVÁ, 2016. Bringing nitrilase sequences from databases to life: the search for novel substrate specificities with a focus on dinitriles. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. **100**(5), 2193–2202. ISSN 1432-0614. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-015-7023-1
37. YU, X., R. XU, C. WEI a H. WU, 2016. Removal of cyanide compounds from coking wastewater by ferrous sulfate: Improvement of biodegradability. *Journal of Hazardous Materials* [online]. **302**, 468–474. ISSN 1873-3336. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhazmat.2015.10.013
38. ZÁKON Č. 78/2004 SB., nedatováno. *Zákon č. 78/2004 Sb. o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty* [online]. [vid. 2021-05-06]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2004-78>

10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1 – Příklady nitrilů	16
Obrázek 2 – Schéma rozkladu kyanidu nitrilázou.....	29
Obrázek 3 – Kyselina (2E)-3-kyanakrylová, (2E)-3-kyanakrylamid.....	35
Obrázek 4 – Přeměna formamidu na kyselinu formohydroxamovou	42
Obrázek 5 – Fylogenetický strom vybraných kyanidhydratáz.....	45
Obrázek 6 – Stanovení vlivu pH na aktivitu buněk ke KCN.....	47
Obrázek 7 – Elektroforeogram SDS-PAGE – purifikace NitEg.....	48
Obrázek 8 – Elektroforeogram SDS-PAGE – purifikace NitEg.....	48
Obrázek 9 – Vliv pH na aktivitu enzymu NitEg.....	49
Obrázek 10 – Vliv teploty na aktivitu enzymu NitEg.....	50
Obrázek 11 – Stanovení teplotní stability NitEg s 25 mmol/l KCN.....	51

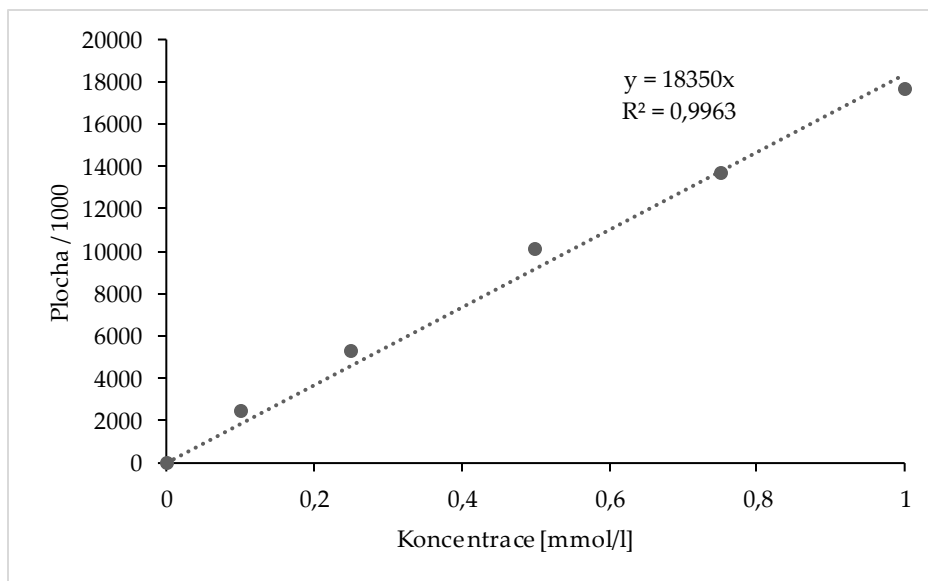
11 SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1 – Stupeň identity sekvencí hub	45
Tabulka 2 – Úbytek KCN v roztocích jednotlivých polutantů.....	52
Tabulka 3 – Složení simulovaných odpadních vod.....	53
Tabulka 4 – Úbytek KCN v simulovaných odpadních vodách	54

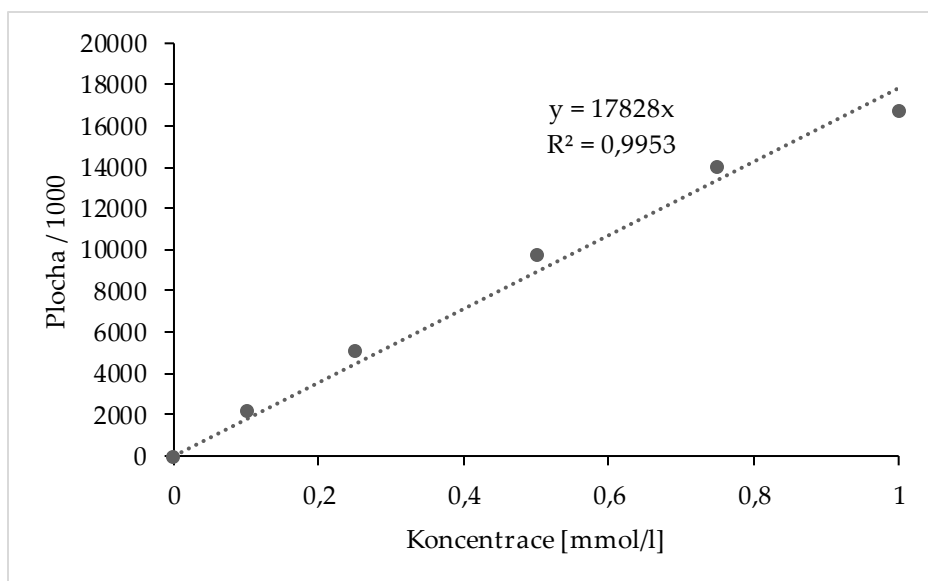
12 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1 Kalibrační křivka fumaronitrilu	71
Příloha 2 Kalibrační křivka pro (2E)-3-kyanakrylamid	71
Příloha 3 Kalibrační křivka pikolinamidu	72
Příloha 4 Kalibrační křivka kyseliny pikolinové	72
Příloha 5 Kalibrační křivka 2-kyanopyridinu	73
Příloha 6 Kalibrační křivka KCN	73
Příloha 7 Kalibrační křivka formamidu	74
Příloha 8 Kalibrační křivka pro stanovení bílkovin Bradfordovou metodou	74

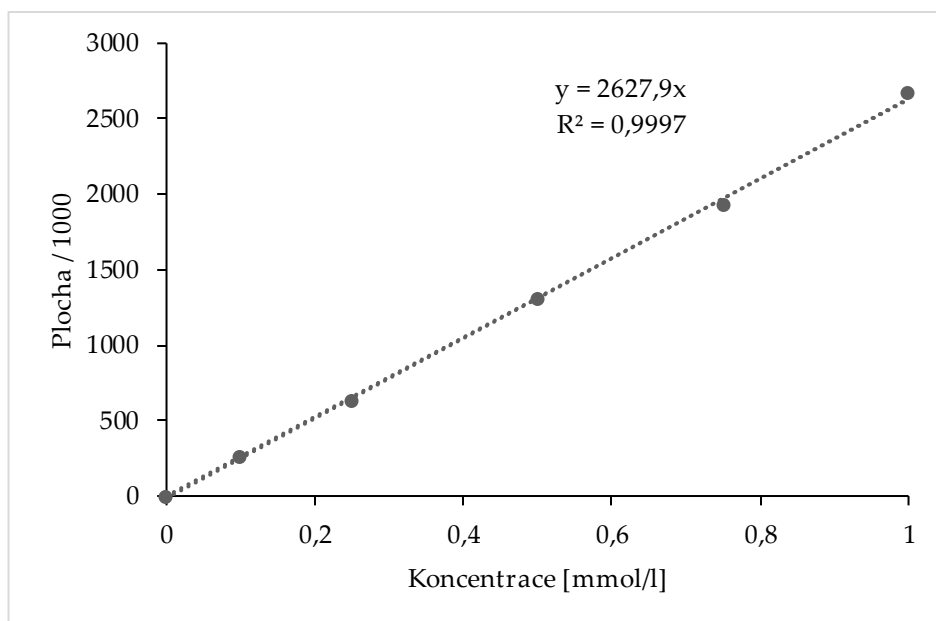
PŘÍLOHY



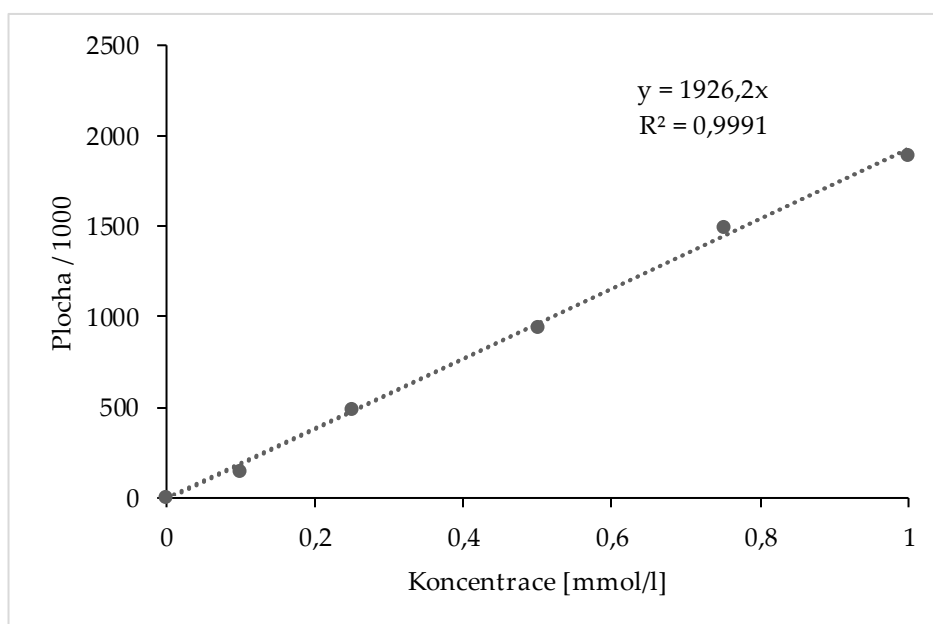
Příloha 1 – Kalibrační křivka fumaronitrilu, měřeno pomocí HPLC, retenční čas 5,8 min, odečet při 220 nm



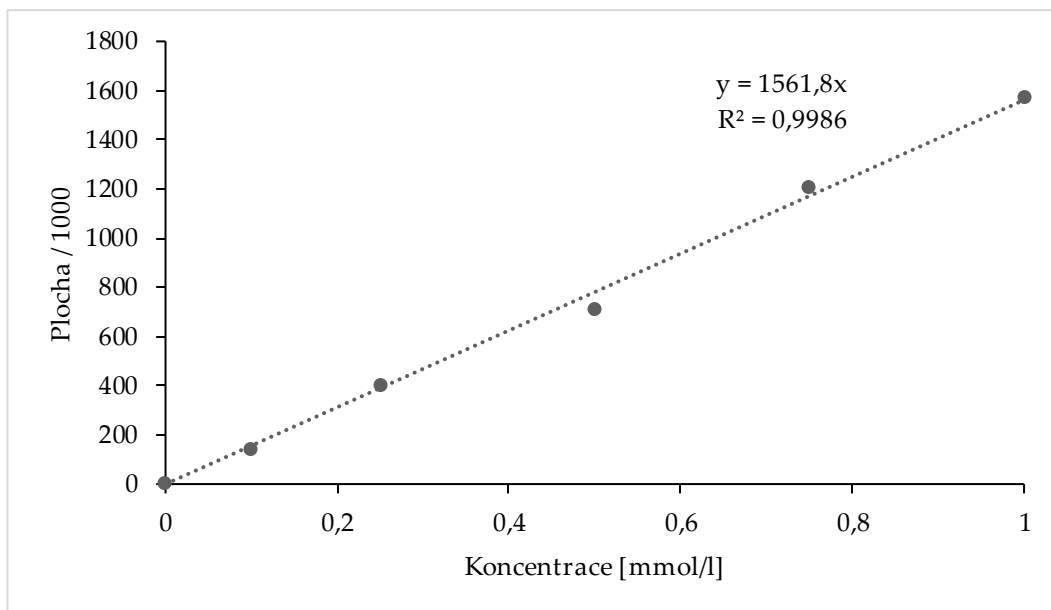
Příloha 2 – Kalibrační křivka pro (2E)-3-kyanakrylamid, měřeno pomocí HPLC, retenční čas 4,03 min, odečet při 221 nm



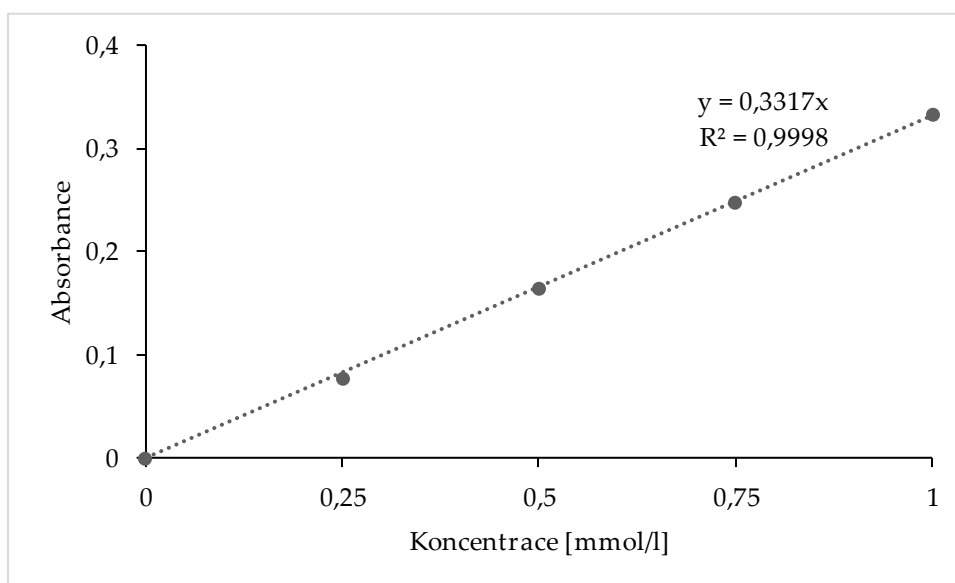
Příloha 3 – Kalibrační křivka pikolinamidu, měřeno pomocí HPLC, retenční čas 7,29 min, odečet při 266 nm



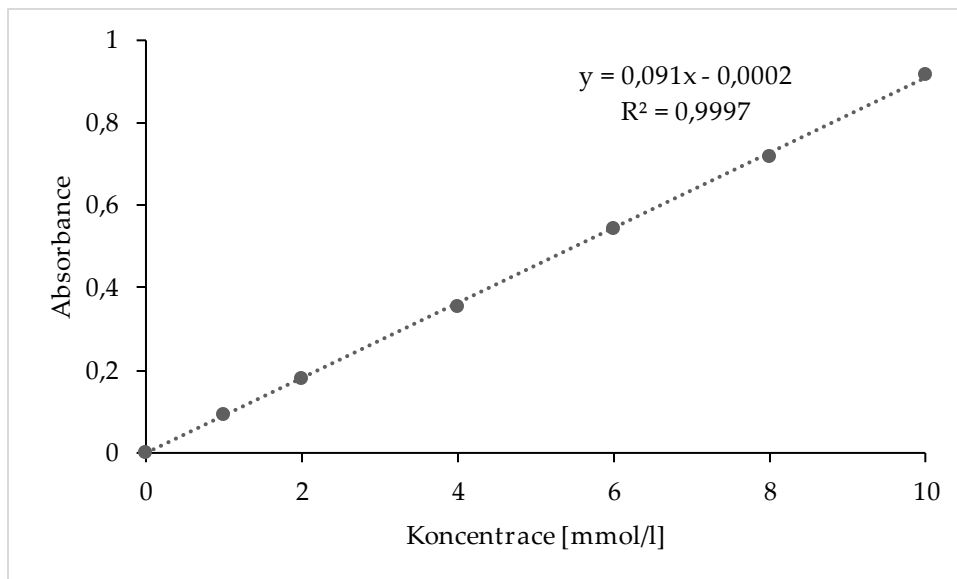
Příloha 4 – Kalibrační křivka kyseliny pikolinové, měřeno pomocí HPLC, retenční čas 2,8 min, odečet při 266 nm



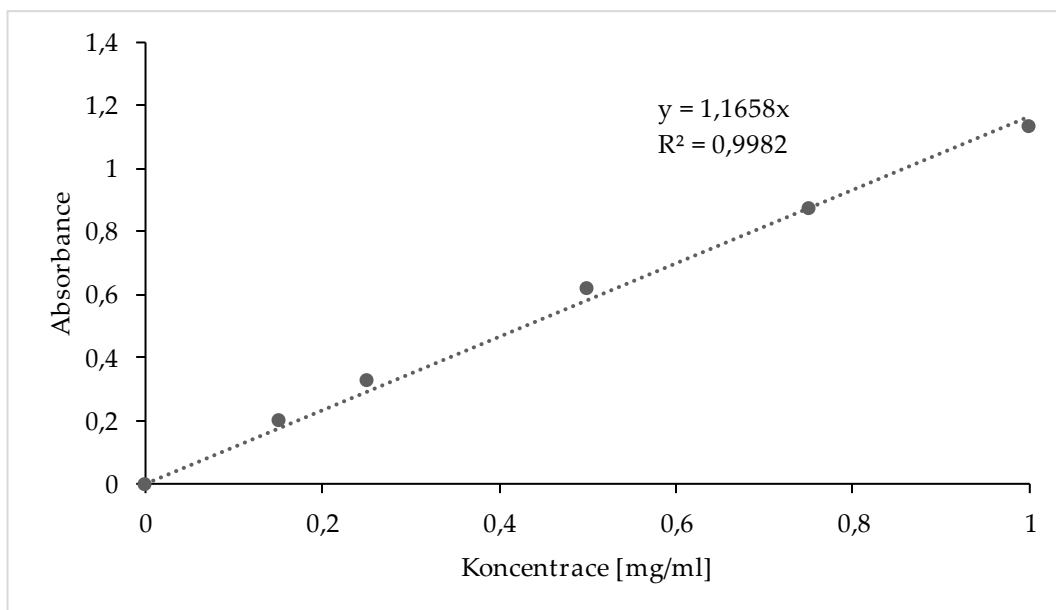
Příloha 5 – Kalibrační křivka 2-kyanopyridinu, měřeno pomocí HPLC, retenční čas 10,9 min, odečítáno při 266 nm



Příloha 6 – Kalibrační křivka KCN, měřeno spektrofotometricky metodou s kyselinou pikrovou, měřeno při 520 nm



Příloha 7 – Kalibrační křivka formamidu, měřeno spektrofotometricky při 540 nm



Příloha 8 – Kalibrační křivka pro stanovení bílkovin Bradfordovou metodou, měřeno spektrofotometricky při 595 nm