

AKTIVITA FENOLHYDROXYLASY BAKTERIE RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS A KVASINKY TRICHOSPORON CUTANEUM

Miriam Polová, Dagmar Pospíšilová, Alena Čejková

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6,
Česká republika, e-mail: miriam.polova@vscht.cz

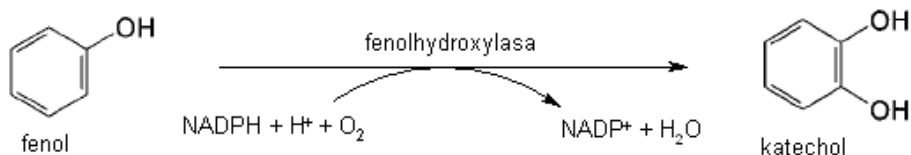
Abstract: *The Rhodococcus erythropolis and Trichosporon cutaneum Phenol Hydroxylase Activity.* One of the most problematic environmental pollutants is phenol. It is a toxic chemical substance, that is a by-product of many branches of industry. One of the possibilities to remove it is the application of bioremediation technologies using appropriate biological agent – microorganism. The ability of a microorganism to utilize unusual and not easily degradable substrates is due to the special metabolic pathways and enzymes presence. Getting more informations about those enzymes and their activities opens the door to set the conditions of the biodegradation process to be the most effective. In the phenol degradation pathway the most important enzyme is phenol hydroxylase (EC 1.14.13.7), that catalyses the phenol to catechol conversion. In this research work the activity of phenol hydroxylase of *Rhodococcus erythropolis* and *Trichosporon cutaneum* was measured.

Klíčová slova: fenol, biodegradace, fenolhydroxylasa

ÚVOD

Životní prostředí je znečištěno celou řadou antropogenních polutantů. Tyto látky jsou často toxické jak pro přítomné organismy, tak i pro člověka. Efektivním a ekonomicky výhodným řešením pro jejich odstranění je použití vhodné bioremediační technologie, tedy technologie využívající biologického činitele, zpravidla mikroorganismus. Schopnost některých mikroorganismů využít neobvyklé, často toxické, substráty je dána mimo jiné přítomností příslušných metabolických drah a enzymů. Jednou z látek znečišťujících životní prostředí je fenol. Tato toxická organická látka se do prostředí dostává především jako odpadní produkt některých průmyslových výroby. V důsledku malé těkavosti a špatné odbouratelnosti fenolu dochází k jeho akumulaci v půdě (Manahan 2003). V současné době je známo mnoho mikroorganismů, které jsou schopny využívat fenol jako jediný zdroj uhlíku a energie, mimo jiné i kvasinka *Trichosporon cutaneum* (Neujahr et al. 1973; Santos et al. 2001) a bakterie *Rhodococcus erythropolis* (Čejková et al. 2005; Preito et al. 2002). V prvním kroku degradace fenolu dochází k jeho přeměně na katechol. Tato reakce (viz

obr. 1) je katalyzována enzymem fenolhydroxylasou (EC 1.14.13.7). Fenolhydroxylasa je podjednotkový enzym, který patří mezi NADPH dependentní monooxygenasy a tedy využívá kyslík k iniciaci oxidace substrátu za přítomnosti NADPH jako donoru elektronu (Leahy et al. 2003).



Obr. 1: Oxidace fenolu na katechol katalyzovaná fenolhydroxylasou

METODIKA

V této práci byly použity dva mikroorganismy, bakterie *Rhodococcus erythropolis* CCM 2595 a kvasinka *Trichosporon cutaneum*. Oba kmeny byly dlouhodobě adaptovány na růst na fenolu. Kultivace mikroorganismů probíhala v třepaných Erlenmeyerových baňkách (100 rpm) při teplotě 27 °C. Použito bylo minimální minerální médium (KH_2PO_4 0,34 g.l⁻¹, K_2HPO_4 0,26 g.l⁻¹, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2,84 g.l⁻¹, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ g.l⁻¹, stopové prvky), pH 7. Jako zdroj uhlíku a energie byl přidán fenol o počáteční koncentraci 0,3 g.l⁻¹. Pro stanovení zbytkové koncentrace fenolu v médiu byla použita spektrofotometrická metoda, která je založena na barevné reakci fenolu s aminoantipyrinem (Martin 1949). Aktivita fenolhydroxylasy byla stanovena spektrofotometrickou metodou (Neujahr et al. 1973), kdy je měřen pokles absorpance v důsledku úbytku NADPH.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Byla proměřena aktivita fenolhydroxylasy u zástupců prokaryotních (*Rhodococcus erythropolis*) a eukaryotních (*Trichosporon cutaneum*) mikroorganismů při růstu na fenolu v exponenciální a stacionární fázi růstu. Z prvních výsledků je patrné, že aktivita fenolhydroxylasy je značně závislá na fázi růstu mikroorganismu a především na zbytkové koncentraci fenolu v médiu. V exponenciální fázi růstu je aktivita tohoto enzymu vyšší, zatímco s klesající koncentrací substrátu (fenolu) aktivita klesá, což odpovídá předpokladu, že fenolhydroxylasa je induktivní enzym (Ampe 1998). V dalším výzkumu budou zkoumány vnější vlivy na aktivitu tohoto enzymu.

LITERATURA

- Ampa F., Léonard D., Lindley N. D. 1998. Repression of phenol catabolism by organic acids in *Ralstonia eutropha*. Appl. Environ. Microbiol. 64, pp. 1-6.
- Čejková A., Masák J., Jirků V., Veselý M., Pátek M., Nešvera J. 2005. Potencial of *Rhodococcus erythropolis* as a bioremediation organism. World J. Microb. Biotech. 21, pp. 317-321.
- Leahy G. J., Batchelor P. J., Morcome S. M. 2003. Evolution of the soluble diiron monooxygenases. FEMS Microb. Rew. 27, pp. 449-479.
- Manahan S. E. 2003. Toxicological Chemistry and Biochemistry. Lewis Publisher. 3rd edition, pp. 297-298.
- Martin R. W. 1949. Rapid colorimetric estimation of phenol. Nature 21, pp. 1419-1420.
- Neujahr H. Y., Gaal A. 1973. Phenol hydroxylase from yeast. Purification and properties of the enzyme from *Trichosporon cutaneum*. Eur. J. Biochem. 35, pp. 386-400.
- Prieto M. B., Hidalgo A., Serra J. L., Llama M. J. 2002. Degradation of phenol by *Rhodococcus erythropolis* UPV-1 immobilized on Biolite in a packed-bed reactor. J. Biotech. 97, pp. 1-11.
- Santos V. L., Linardi V. R. 2001. Phenol degradation by yeasts from industrial effluents. J. Gen. Appl. Microbiol. 47, pp. 213-221.