

**BIOLOGICKÁ FAKULTA JIHOČESKÉ UNIVERZITY
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**



Bakalářská práce

ENZYMY LIGNINOLYTICKÉHO SYSTÉMU HUB

Vypracovala: Martina Koláčková

Vedoucí práce: RNDr. Anna Lepšová, CSc.

**České Budějovice
1999**

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla poděkovat své školitelce Anně Lepšové za pomoc při vyhotovování mé bakalářské práce.

Prohlašuji, že jsem uvedenou práci vypracovala samostatně, pouze s použitím uvedené literatury.

Marlora Kolářová

OBSAH

ABSTRACT.....	1
1.ÚVOD.....	2
1.1.Chemické složení dřeva.....	2
1.1.1.Charakteristika celulózy.....	2
1.1.2.Charakteristika hemicelulóz.....	2
1.1.3.Charakteristika ligninu.....	3
1.2.Trofické skupiny hub.....	4
1.2.1.Houby dřevokazné.....	4
<i>I.Hniloby dřeva způsobené houbami.....</i>	4
<i>I.a) Typy hniloby podle enzymatické výbavy dřevokazných hub.....</i>	4
α) Celulolytický rozklad dřeva.....	4
β) Ligninolytický rozklad dřeva.....	5
<i>II.Biodegradace ligninu.....</i>	5
<i>II.a) Extracelulární enzymy dřevokazných hub.....</i>	6
α) Charakteristika jednotlivých enzymů ligninolytického aparátu.....	7
β) Způsoby detekce ligninolytických enzymů.....	11
1.2.2.Houby mykorhizní.....	12
<i>I.Produkce enzymů ligninolytického aparátu mykorhizními houbami.....</i>	12
2.CÍL PRÁCE.....	14
3.MATERIÁL A METODY.....	15
3.1.Získání izolátů.....	15
3.2.Napěstování kultur hub.....	15
3.2.1.Příprava kultivačních médií.....	15
3.2.2.Očkování.....	16
3.2.3.Vlastní kultivace.....	17
3.3.Enzymatické testy.....	17
4.VÝSLEDKY.....	19
5.DISKUZE.....	21
5.1.Enzymatické testy hub.....	21
5.2.Srovnání provedených testů.....	22
6.ZÁVĚR.....	25
7.SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY.....	26
8.PŘÍLOHY.....	29
8.1.Vědecké názvy hub.....	29
8.2.Fotografie.....	30
8.2.1.Pěstované kultury vybraných druhů hub.....	30
8.2.2.Barevné reakce.....	31

ABSTRACT

Bavendamm and spot tests are used to distinguish ligninolytic enzymes produced by fungi. In these tests chemical reagents react as a substrate with the enzymes to form products which are coloured.

Production of the ligninolytic enzymes is a typical feature of white-rot fungi. Anyway we tried to verify information from the literature that following trophic groups of fungi could synthesize these enzymes. So they would have saprophytic activity of WR fungi despite it is possible that the enzymes might have other functions.

There were 27 species of fungi which were tested by 5 tests. We tested wood-decaying fungi and the enzymatic tests proved that they could be used to detect the ligninolytic enzymes even though there were some cases when would be more accurate to use another methods of enzyme detection.

Tests also showed that it was not just the specific tool of white-rot fungi but also mycorrhizal fungi synthesized ligninolytic enzymes.

In the end it was investigated the difference among fungi cultivated on a diverse medium. *Hygrophorus pustulatus* and *Suillus bovinus* were find out to produce all tested ligninolytic enzymes on MMN and KHO medium but not on BaF or MEA medium. Anyway it is not statistically significant amount of tested fungi for I was limited by choice of fungi in the collection of fungi and by their growth on only some medium. It is suggested that this problem is worth of other investigation.

1. ÚVOD

1.1. Chemické složení dřeva

Dřevní hmota a další rostlinný materiál (listy, plody) je tvořen buňkami, v jejichž buněčných stěnách je zastoupena především celulóza, hemicelulózy a lignin. Tyto látky jsou různými organismy, např. bakterie, houby, hmyz, využívány jako zdroj energie. Aby ji však organismy mohly získávat, potřebují vhodné rozkladné systémy. Zda organismy vlastní degradační enzymy nebo využívají rozkladné činnosti organismů jiných, je předmětem výzkumu.

1.1.1. Charakteristika celulózy

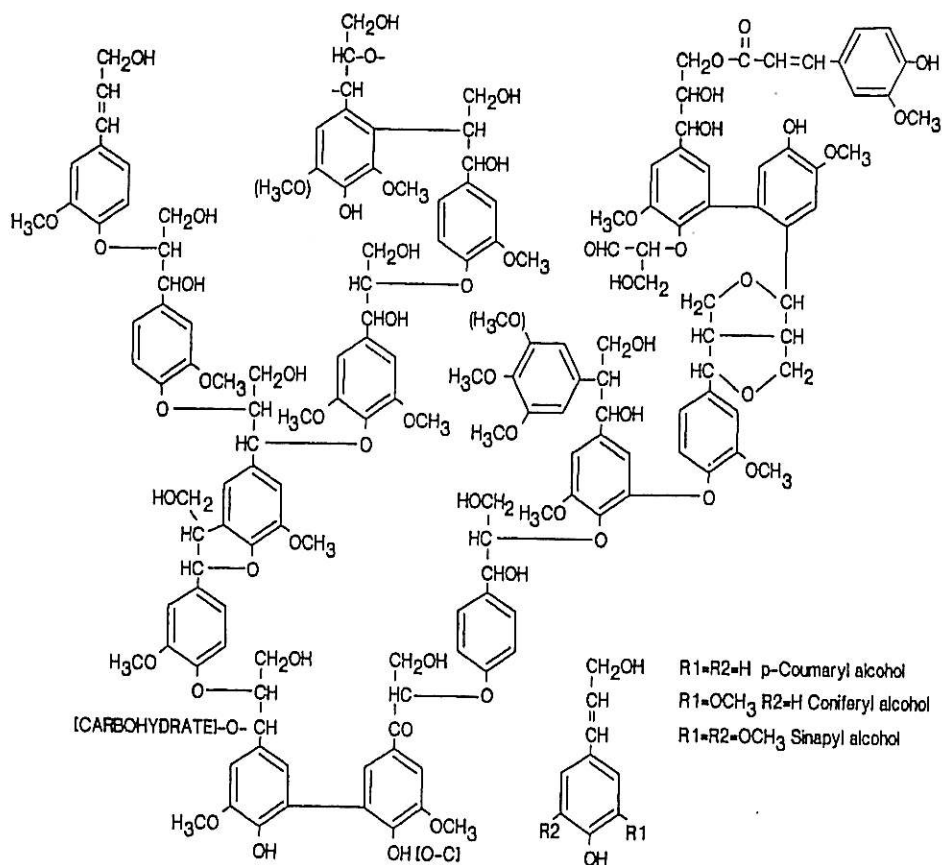
Celulóza je dominantní složkou zahrnující přibližně 40 - 50 % sušiny buněčných stěn jak u jehličnatých, tak u listnatých dřevin. Ve dřevě vystavovanému napětí se obvykle vyskytuje ve větších procentech. Celulóza je sacharid s poměrně pravidelnou strukturou, takže může sloužit organismům vybaveným příslušným enzymatickým aparátem jako snadno dostupný zdroj uhlíku a energie. Základem celulózy je přímý řetězec tvořený glukózovými jednotkami spojenými vazbou β - 1,4. Krystalická struktura (micely) molekul celulózy vytváří fibrily. Tato fibrilární struktura je důležitá při napětí, kterému je dřevo vystavováno (Rayner et Boddy 1988).

1.1.2. Charakteristika hemicelulóz

Hemicelulózy jsou polymery hexózy, pentózy nebo podjednotek uronové kyseliny. Mají nižší relativní molekulovou hmotnost; jejich řetězec je kratší, větvený nebo přímý. Ve větší míře jsou hemicelulózy zastoupeny v listnácích (přibližně 25 - 40 %) než u jehličnatých stromů (25 - 30 %). Převládající hemicelulózou v listnácích je xylan (O-acetyl 4-O-metylglukorono-xylan). Dalším typem je glukomannan (O-acetyl galaktomannan), který se udává v mnohem menší míře, tak 3 - 5 %. Naopak u jehličnanů jsou převládající složkou glukomannany (asi 20 % sušiny buněčných stěn). V některých listnatých stromech a modřínu byl nalezen další typ hemicelulózy - arabinogalaktan (arabino-4-O-metylglukoronoxyylan); přítomný v jiných jehličnanech pouze ve stopovém množství (Rayner et Boddy 1988).

1.1.3. Charakteristika ligninu

Lignin se nachází ve všech vyšších rostlinách a dokonce i u kapradin; ve větším množství je přítomný v dřevě jehličnanů (25 - 35 %) než u listnatých stromů (18 - 25 %) s výjimkou tropických listnáčů. Lignin je pro rostliny nezbytný, protože jim zaručuje hlavně pevnost a ochranu před mikrobiálním napadením. Jedná se o amorfni látku, která je svou stavbou unikátní (Obr. 1).



Obr. 1 – Schematický model ligninu. Hlavní podjednotky molekuly ligninu (de Jong et al. 1994)

Biosyntéza ligninu probíhá jako náhodná polymerizace volných radikálů z kumaryl alkoholu (p-hydroxyskořicový alkohol : p-hydroxyfenylové jednotky), koniferyl alkoholu (4-hydroxy-3-methoxyskořicový alkohol : guaiakylové jednotky) a sinapyl alkoholu (3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicový alkohol : syringylové jednotky). Je tak zformován polymer s nepravidelnou, neopakující se strukturou, kde chirální atomy mohou mít jak L - , tak D - konfiguraci a kde se vazby C - C, C - O vyskytují v různém poměru a vůbec kde se zastoupení jednotlivých jednotek liší (např. jehličnany obsahují hlavně guaiakylové jednotky, zatímco listnáče stejné množství guaiakylových a syringylových jednotek).

Tyto vlastnosti způsobují, že je lignin velmi rezistentní k mikrobiální degradaci, protože jen málo organismů je vybaveno vlastním biodegradačním systémem, který by byl schopný rozkládat substrát s takovým nedostatkem strukturní a prostorové pravidelnosti (Kirk et Farrell 1987).

1.2. Trofické skupiny hub

Zjednodušeně můžeme houby v ekosystému rozdělit na tyto skupiny (Klán 1989):

- houby parazitické (parazité rostlin, živočichů a hub)
- houby saprofytické (získávající uhlíkaté živiny a minerály z organických látek různého původu)
- houby mutualisticky symbiotické (symbionti rostlin, živočichů a případně hub)

1.2.1. Houby dřevokazné

V souvislosti s výzkumem enzymatických systémů je pozornost věnována především houbám saprofytickým, jejichž zdroje živin jsou často značně odolné vůči působení fyzikálnímu i působení živých organismů. Saprofytické houby vlastní velice účinné systémy schopné rozkládat neživý organický materiál jako listí, větévky (opad), mrtvé dřevo. Specializovanou skupinou hub jsou houby dřevokazné patřící mezi saprofyty, saproparazity nebo parazity se saprofytickou aktivitou (Černý 1989).

I. Hniloby dřeva způsobené houbami

Dřevokazné houby bývají rozlišovány podle schopnosti degradovat jen celulózu nebo celulózu a lignin. Charakter a poměr těchto látek společně s hemicelulózami má vliv na kolonizaci substrátu houbami a způsob, jakým je posléze substrát degradován.

I. a) Typy hniloby podle enzymatické výbavy dřevokazných hub

Existují různé způsoby rozkladu dřeva – destrukční a korozivní rozklad dřeva (Rypáček 1957).

α) Celulolytický rozklad dřeva

K destrukčnímu typu rozkladu dřeva patří červená nebo hnědá hniloba - označení podle změny barvy dřevní hmoty, kdy zpočátku načervenalé dřevo hnědne uvolňovaným ligninem. Avšak při rozkladu dochází i k jiným změnám, kdy se dřevo stává lehké, lámavé,

ubývá na váze i objemu, kostkovitě praská. Houby vlastníci celulólytické exoenzymy jsou Rypáčkem (1957) označovány jako houby celulosovorní.

Celulázový komplex zahrnuje nejméně tři hydrolytické enzymy: **exo- β -1,4-glukonáza**, **endo- β -1,4-glukonáza**, které rozštěpí dlouhé celulózové řetězce na dvouglukózové jednotky- celobiózu, přičemž exoglukonázy odštěpují celobiózové jednotky od konců celulózového řetězce a endoglukonázy štěpí celulózové řetězce uvnitř; celobióza je rozštěpena dalším enzymem, **β -glukosidázou**, na molekuly glukózy. Tento typ rozkladu ovládá např. síťkovec dubový, sírovec žlutooranžový, březovník obecný. Houby jsou označovány jako brown-rot (BR dále v textu) fungi = houby způsobující hnědou hnilobu (Rayner et Boddy 1988).

β) Ligninolytický rozklad dřeva

Korozivní rozklad je způsoben houbami, které kromě celulólytického systému vlastní enzymy i pro degradaci ligninu. Dřevo je světlé (z toho plyne označení bílá hniloba), ztrácí na hmotnosti, avšak ne na objemu. Někdy jsou ve dřevě patrné otvůrky, pak se říká hnilobě voštinovitá; způsobuje ji např. kořenovník vrstevnatý. Korozivní rozklad vyvolává mnoho druhů hub, např. šedopórka osmahlá, troudnatec kopytovitý, ohňovec obecný (Rypáček 1957). Houby jsou označovány jako white-rot (WR dále v textu) fungi = houby způsobující bílou hnilobu (Rayner et Boddy 1988); česky také jako houby ligninovorní (Rypáček 1957).

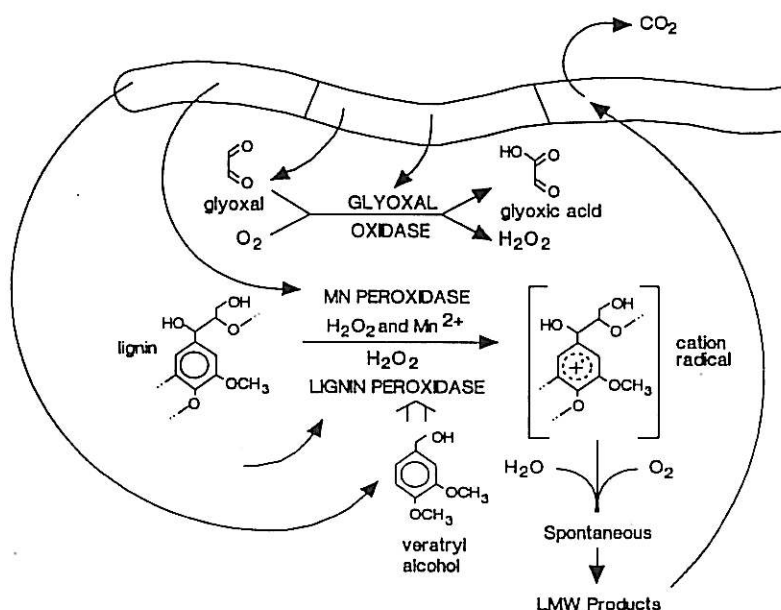
Jako zvláštní typ hniloby je uváděna měkká hniloba, ke které dochází ve velmi teplém, vlhkém období. Podle některých autorů zahrnuje rovněž degradaci ligninu, ale polysacharidy jsou stravovány přednostně. Podílejí se na ní hlavně vřeckovýtrusé houby např. dřevnatka parohatá, dřevomor kořenový; v menší míře houby stopkovýtrusé např. pevník nachový. Houby působící měkkou hnilobu jsou označovány jako soft - rot fungi (Kirk et Farrell 1987).

II. Biodegradace ligninu

Pro nepravidelnou strukturu ligninu s výskytem chirálních atomů je nutné, aby biodegradace byla nespecifický, extracelulární, oxidativní proces, kdy určité části ligninolytického komplexu zahajují nehydrolytický rozklad ligninu. Bylo objeveno, že se počátek degradace ligninu shoduje se sekrecí H_2O_2 a že jsou v průběhu reakce přítomny „aktivní kyslíkové druhy“, z nichž OH^- radikály vznikají Fentonovou reakcí:



Tento radikál způsobuje oxidaci fenolických i nefenolických částí ligninu, protože je značně reaktivní oproti O_2^- , který je dalším z aktivních kyslíkových druhů prokázaných in vitro (Rayner et Boddy 1988). Kromě toho se také vyskytuje jiný mechanismus, kdy oxyferrylový komplex, spojený ve své funkci s ligninázami způsobuje štěpení jednotlivých podjednotek ligninu, jednoelektronovou oxidaci mnoha ligninových aromatických kruhů a katalyzuje vytvoření volných radikálů kationtů. Tyto nízkomolekulární kationtové radikály reagují buďto každý s každým, nebo s molekulárním kyslíkem a podstupují radikálovou terminační reakci, anebo jako „Palmer skupiny“ difundují z enzymu do kostry ligninu, kde reagují s polymerem a způsobují další depolymerizaci (Bumpus et Aust 1985). Průběh degradace ligninu je schematicky zachycen na Obr. 2.



Obr. 2 – Ligninolytický systém WR houby *Phanerochaete chrysosporium* (de Jong et al. 1994)

II. a) Extracelulární enzymy dřevokazných hub

Mezi extracelulární enzymy ligninolytického systému patří hlavně **lignin peroxidáza**, **manganová peroxidáza**, **lakáza**, **aryl alkohol oxidáza** a popř. **glyoxal oxidáza** a **peroxidáza**. Ne všechny jsou produkovány všemi houbami způsobujícími bílou hnilobu; např. *Phellinus igniarius*, ač patří mezi WR houby, vyznačuje se pouze produkcí **lakázy**, zatímco *Bjerkandera adusta* produkuje všechny ligninolytické enzymy, někdy s výjimkou **lakázy**.

Lakáza se často používá jako enzym sloužící k rozlišení, zda se jedná o WR- houbu, které ji zpravidla syntetizují, nebo houby způsobující hnědou hnilobu, které **lakázu** nevytvářejí. Je to

rozlišení poněkud nespolehlivé, protože třeba zmíněná šedopórka osmahlá nemusí a *Phanerochaete chrysosporium* nesyntetizuje **lakázu**. Často také záleží na chemickém složení média, na kterém jsou kultury hub pěstovány a na kterém se potom pomocí „barvicích technik“, enzymy dokazují. Je zajímavé, že jsou to hlavně minerálně chudá média, která provokují houby k syntéze různých enzymů. Byly např. sledovány aktivity ligninolytických enzymů (**lakáza, peroxidáza, mangan dependentní peroxidáza a lignin peroxidáza**) u *Phlebia radiata*. Hodnoty enzym. aktivity **lakázy** a **peroxidázy** v kultuře rostoucí na médiu bez veratryl alkoholu (sekundární metabolit produkovaný spolu s ligninolytickými enzymy) a s limitovaným obsahem dusíku dosahovaly svých vrcholů 10,8 U/l a 4,3 U/l desátý a šestý den po inokulaci kultury. Aktivita **mangan peroxidázy** byla nevýznamná. V souvislosti s tím, hodnoty **lakázy, peroxidázy** a **mangan peroxidázy** v kultuře bez veratryl alkoholu a nelimitovaným dusíkem činily 2,9 U/l , 3,0 U/l a 1,0 U/l sedmý, šestý a šestý den po inokulaci. Aktivita **lakázy** v kultuře s limitovaným obsahem dusíku a doplněné veratryl alkoholem vrcholila den po inokulaci hodnotou 597 U/l ! Aktivity dalších enzymů byly bezvýznamné (Krčmář et Marais 1996).

Aktivita lignin **peroxidázy** nebyla detekovatelná v žádné z kultur (Krčmář et Marais 1996). Dokonce podle de Jong a kol. (1994) *Phlebia radiata* **peroxidázu** vůbec neprodukuje.

α) Charakteristika jednotlivých enzymů ligninolytického aparátu

Nejčastější enzymy ligninolytického systému zahrnují **extracelulární peroxidázy, lakázy** a **H₂O₂ - produkující oxidázy**.

Reakce katalyzované **fenoloxidázami (lakázy a peroxidázy - lignin peroxidáza, mangan (dependentní) peroxidáza)** jsou velmi podobné, protože mohou katalyzovat oxidaci fenolických sloučenin a takto působit na vznik fenoxylových radikálů.

LAKÁZA

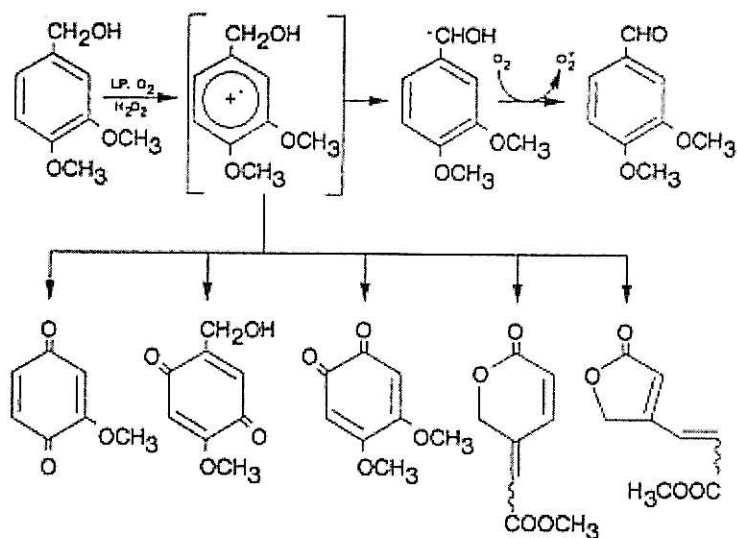
- benzendiol : kyslíková oxidoreduktáza, EC 1.10.3.2., jsou měď obsahující enzymy. Katalyzují čtyř-elektronovou oxidaci mnoha hlavně polyhydričných fenolických sloučenin a simultánní čtyř-elektronovou redukci molekuly kyslíku za vzniku vody. Jedná se o N- nebo O-glykosylovaný protein, který je produkován téměř všemi WR houbami a jeho produkce je závislá na podmínkách kultury (!). Enzym je znám v konstitutivní i inducibilní formě, která má vyšší enzymovou aktivitu. **Lakáza** oxiduje (fenolické) sloučeniny s relativně nižším ionizačním potenciálem ($E_{1/2} \leq 0,81$ V) jako např. 1,2,4,5 - tetramethoxybenzen na příslušné

kationtové radikály (de Jong et al. 1994).

PEROXIDÁZY

Lignin - peroxidáza

- EC 1.11.1.-, monomerní N- a O- glykosylovaný protein se čtyřmi disulfidickými vazbami. Obsahuje Fe protoporfyrin IX jako prostetickou skupinu. Jeho pH optimum 3 je neobvykle nízké. Je produkován jako skupina blízce příbuzných izozymů s molekulární hmotností od 38 do 43 kDa. Enzym byl objeven v ligninolytickém systému *Phanerochaete chrysosporium* a je produkován mnoha WR houbami; je schopný depolymerizovat lignin (štěpení nefenolických podjednotek ligninu), oxidovat a depolymerizovat škálu dimerů a oligomerů strukturně příbuzných ligninu a dále katalyzovat produkci aktivovaného druhu kyslíku ($O_2^{\cdot-}$) za účasti H_2O_2 ; (reakční produkty **lignin peroxidázy** jsou zachyceny na Obr. 3),



Obr. 3 - Reakční produkty lignin peroxidázy katalyzující oxidaci veratryl alkoholu (de Jong et al. 1994)

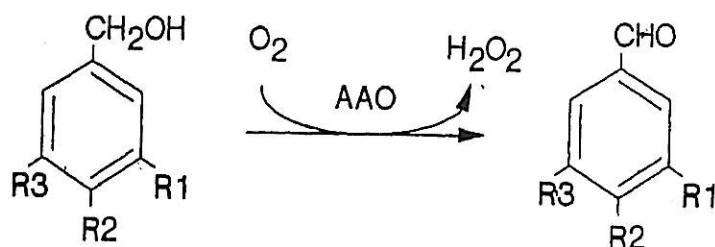
- exprese genů **lignin peroxidázy** je regulována inverzní funkcí Mn^{II} koncentrace, (která však nemá vliv na množství biosyntetizovaného veratryl alkoholu chránícího **lignin peroxidázu** před účinky peroxidu vodíku),- bylo zjištěno, že rychlost rozkladu ligninu je mnohem větší v přítomnosti **lignin peroxidázy** a že při degradaci syntetického [^{14}C] - ligninu na $^{14}CO_2$ hraje důležitější roli než **mangan dependentní peroxidáza** (de Jong et al. 1994).

Mangan (dependentní) peroxidáza

- EC 1.11.1.-, glykoprotein (46 kDa) obsahující Fe protoporfyrin IX jako prostetickou skupinu. Jedná se o skupinu blízce příbuzných enzymů, které mohou být kódované u různých

rodů různými geny (*Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*) jako je tomu u **lignin peroxidázy**, exprese peroxidázových genů je regulována přímou funkcí Mn^{II} koncentrace,

- enzym katalyzuje depolymerizaci a oxidaci několika fenolických substrátů zahrnujících lignin a je rovněž schopen degradace vysokomolekulárních chloroligninů. Dokonce bylo ověřeno, že spektrální charakteristiky **mangan peroxidázy** a jejího katalytického cyklu jsou velmi podobné **lignin peroxidáze**; hlavní odlišnost mezi **mangan peroxidázou** a dalšími **fenol oxidázami** spočívá ve schopnosti enzymu přímo oxidovat Mn^{II} na Mn^{III} bez účasti jak fenolických, tak nefenolických kosubstrátů (zatímco **lignin peroxidáza** potřebuje ke generaci Mn^{III} přenašeč nábojů – veratrylalkohol a **lakáza** přítomnost nějakého fenolu např. m-krezolu),
- převážně **mangan peroxidáza** je zodpovědná za dekolizaci dřeva podléhajícího ligninolýze,
- odlišný průběh oxidace veratryl alkoholu **mangan** a **lignin peroxidázou** je naznačen průběhem reakce na Obr. 4.



Substates:

Benzyl alcohol; $R1=R2=R3=H$

Anisyl alcohol; $R1=R3=H, R2=OCH_3$

Veratryl alcohol; $R1=R2=OCH_3, R3=H$

3-Chloro-anisyl alcohol; $R1=Cl, R2=OCH_3, R3=H$

3,5-Dichloro-anisyl alcohol; $R1=R3=Cl, R2=OCH_3$

Obr. 4 - Oxidace veratryl alkoholu mangan peroxidázou a lakázou (de Jong et al. 1994)

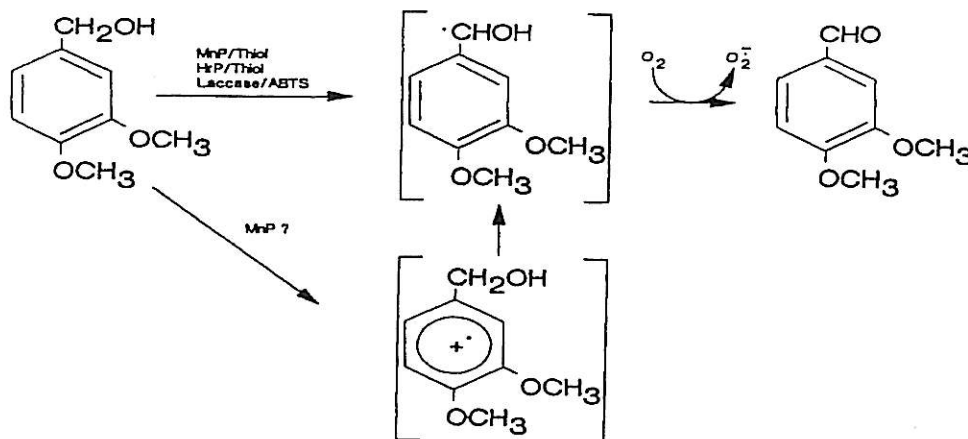
Peroxidázy (mangan a lignin) na rozdíl od **lakázy** oxidují sloučeniny s vyšším ionizačním potenciálem ($E_{1/2} \leq 1,06 - 1,12 V$), přičemž přesná oxidační aktivita **mangan peroxidázy** není známá.

Samozřejmě existují další **peroxidázy**, které však nejsou přesně charakterizované; příkladem je třeba „**horseradish**“ **peroxidáza** mající podobný katalytický cyklus jako **lignin peroxidáza** (de Jong et al. 1994).

H₂O₂ PRODUKUJÍCÍ ENZYMY

Aryl alkohol oxidáza

- u *Pleurotus eryngii* se jedná o glykoprotein (72,6 kDa) obsahující FAD jako prostetickou skupinu; je extracelulární a houbám slouží jako systém k produkci extracelulárního peroxidu vodíku (Obr. 5),



Obr. 5 - Reakční mechanismus aryl alkohol oxidázy a chemické struktury sekundárních metabolitů, které jsou pro aryl alkohol oxidázu substrátem (de Jong et al. 1994).

- tento enzym oxiduje aromatické alkoholy na aldehydy a redukuje O₂ na H₂O₂,
- enzym má vyšší aktivitu s nefenolickými aryl alkoholy, ale ukazuje rovněž aktivitu s alifatickými alkoholy s konjugovanými vazbami; čím více dvojných vazeb, tím lépe (se 4-hydroxy-substituovanými aryl alkoholy ukazuje redukcí popřípadě žádnou aktivitu).

Součástí redoxního cyklu je spolu s **aryl alkohol oxidázou** také **aryl alkohol dehydrogenáza** detekovaná pouze v myceliu, kde redukuje aromatické aldehydy v přítomnosti NADP⁺.

Jsou známy další systémy obsahující enzymy s produkcí H₂O₂; např. extracelulární **glyoxalát oxidáza**, **mangan dependentní peroxidáza** (vznik H₂O₂, když MnP katalyzuje oxidaci NAD(P)H), **pyranoso 2-oxidáza** nebo **intracelulární methanol oxidáza**, **glukoso 1-oxidáza** ... (de Jong et al. 1994).

Použité zkratky : MnP = mangan peroxidáza, LiP = lignin peroxidáza, AAO = aryl alkohol oxidáza, VA = veratryl alkohol, VA⁺ = radikálový kation veratryl alkoholu, Vald = veratralaldehyd

β) Způsoby detekce ligninolytických enzymů

Ligninolytické enzymy bývají testovány jak kvalitativními, tak kvantitativními enzymatickými testy.

Zatímco kvantitativními testy jsme schopni zjistit enzymatickou aktivitu příslušného enzymu (**fotometrické metody**), kvalitativní testy ověřují pouze jeho produkci houbou. Chemická testovací činidla slouží přitom jako substrát pro ligninolytické enzymy; reagují s nimi za vzniku produktu, který je barevně odlišný. Tak je možné u kvalitativních testů detekovat přítomnost enzymu přímo na Petriho misce, kde kultura houby roste, pouze přidáním kapky činidla (**Nobles, lakázový, peroxidázový test**) nebo připravením půdy, do které bylo činidlo dáno ještě před kultivací a kde v průběhu růstu kultury dochází k barevné změně (**Bavendamm test**).

Testy jsou hodnoceny podle barevné změny, která odpovídá přítomnosti určitého enzymu produkovaného houbou.

Historie testování ligninolytických enzymů započala v době, kdy Bavendamm (1928) prokázal u některých hub schopnost syntetizovat **polyfenoloxidázy**. Použil testu, kdy do média přidal kyselinu gallovou nebo tanninovou. Při oxidaci fenolického substrátu **fenoloxidázou** došlo k rozptýlení hnědého zbarvení na kultivačním médiu. Takto pozitivně však reagovaly pouze WR houby, zatímco BR houby se neprojevily.

Jinou metodu vyvinula Nobles (1958), která testovala přítomnost **polyfenoloxidáz** pomocí gum guaiaku, kapkového testu, který vede v případě pozitivního výsledku k modrému zbarvení v místě aplikace – vznik sloučeniny označované jako „guaiakum blue“.

Käärik (1965) objevil lakázovým testem, že WR houby syntetizují na rozdíl od BR hub **lakázu**. Test může být prováděn pomocí tří chemických reagensů: syringaldazinu, kdy vzniká „magenta red pigment“; α-naftolu, kdy specifické produkty nejsou známy (výsledek reakce je rudá barva) a guaiakolu, což se projeví vznikem hnědočervených pigmentů.

Kromě těchto enzymů jsou často testovány **peroxidázy** za použití pyrogallolu. Reakcí dojde k vytvoření směsi produktů, kde je hlavní složkou „purpurogallin“ (Marr 1979).

Další metody opět využívají barevné změny, která proběhne, přidá-li se příhodný substrát (chemické činidlo) – fenol, p-krezol, L-tyrozin aj. Některé je možné použít v kvalitativních i kvantitativních testech; např. barvivo Poly B-411, Poly R-481 (Gold et al. 1988).

Jaké enzymy jsou dokazovány jakými druhy činidel, vyplývá z Tab. 1.

Tab. 1 –Enzymy reagující s fenolickými substráty používanými v enzymatických testech (Gramss et al. 1998)

	kyselina galová	kyselina taninové	gum guaiak	α -naftol	<i>p</i> -kresol	pyrogallol	
						-H ₂ O ₂	+H ₂ O ₂
Katechol oxidáza <i>EC 1.10.3.1</i> (<i>o</i> -difenol oxidáza, polyfenol oxidáza)	+	+	+			+	+
Lakáza <i>EC 1.10.3.2</i> (<i>p</i> -difenol oxidáza)	+		+	+	-	+	+
Monofenol monooxidáza <i>EC 1.14.18.1</i> (tyrozin, krezol, polyfenol oxidáza)	+	+	+	-	+	+	+
Peroxidáza <i>EC 1.11.1.7</i>	-	-	-	-	-	-	+

1.2.2. Houby mykorhizní

Princip symbiomy houby s rostlinou spočívá zjednodušeně ve výměně produktů fotosyntézy (cukry) za minerální látky (fosfor, voda).

V mnohých extrémních stanovištích jsou v mykorhize zúčastněny houby, které proteolytickými enzymy uvolňují organicky vázaný dusík – erikoidní mykorhiza (Read 1990).

Houby ektomykorhizní se vyskytují v závislosti na množství organické hmoty, opadu, v lese (Tyler 1984).

Při enzymatických testech byly u některých hub s těmito typy mykorhizy prokázány enzymy, které jsou součástí ligninolytického systému dřevokazných hub (Gramms et al. 1998).

I. Produkce enzymů ligninolytického aparátu mykorhizními houbami

Zkoumáním mykorhizních hub bylo zjištěno, že některé druhy dokáží mineralizovat rostlinný materiál. Vedle rozkladu přirozených ligninocelulózních substrátů, rozkládají také organopolutanty jako atrazin, polychlorované bifenyly. Odpovědný enzymatický systém však není znám, ale je pravděpodobné, že je svou funkcí příbuzný ligninolytickému systému dřevokazných hub. Byly detekovány tyto enzymy – **polyfenoloxidázy**, **lakázy**, **peroxidázy** (Gramss et al. 1998).

Mykorhizní houby byly testovány kvalitativními enzymatickými již dříve. Lindeberg (1948) testoval Bavendamm testem značné množství mykorhizních hub a ukázal, že některé např. *Boletus subtomentosus*, *Lactarius torminosus*, vykazují velmi silnou pozitivní reakci; tzn., že produkují **polyfenoloxidázy**, které rozkládají fenolické sloučeniny přidané do kultivačního média, což se barevně projeví.

Další testy provedla Marr (1979), která použila jiných testů a zjistila přítomnost **lakázy**, **tyrozinázy**, **peroxidázy** např. u *Amanita rubescens*, *Hygophorus borealis*.

V průběhu let byly mykorrhizní houby dále testovány a produkce enzymů sloužila hlavně jako taxonomický rozlišovací znak – př. je oddělení rodu *Plicaria* od rodu *Peziza* (Egger 1987). Protože ektomykorrhizní houby v čisté kultuře vlastní jen málo nebo žádné mikromorfologické struktury sloužící k odlišení jednotlivých druhů, centrem zájmu se stala biochemická a fyziologická charakteristika ektomykorrhizních hub ve spojení s jejich morfologií (Hutchison 1990).

Výzkum degradačních enzymů má svou důležitost rovněž z ekologického hlediska. Přestože funkce **fenoloxidáz** u ektomykorrhizních hub není zcela objasněna, předpokládá se, že produkce těchto enzymů má stejně jako celulolytický aparát roli při penetraci stěny buňky kořene hostitelské rostliny a vytvoření mykorrhizy (Ramstedt et Söderhäll 1983). Společně s jinými degradačními enzymy jsou pravděpodobně důležité při využití nutričních složek z buněk symbionta (Cairney et Burke 1998).

Je však možné, že fenoloxidázy mají další nebo jiný význam, např. v regulaci mikrobiálních symbióz vytvářených rostlinou, v saprofytickém způsobu získávání potravy, případně díky nespecifické oxidaci jako ochrana rostliny před polutanty vyskytujícími se v životním prostředí (Gramss et al. 1998).

Poněkud spekulativní je u mykorrhizních hub přítomnost **peroxidáz** (částečný enzym **fenoloxidáz**), které se účastní vzniku radikálů uplatňujících se při iniciaci degradace ligninu. Ektomykorrhizní a houby tvořící erikoidní mykorrhizu produkují peroxid vodíku, který reaguje s železem přítomným v substrátu, popř. kultivačním médiu, třeba jen v nepatrném množství. Tato reakce vede ke vzniku radikálů majících za následek nespecifické oxidační procesy. Proto testy využívající ve svých postupech železa, případně jeho sloučenin, obsahují falešné výsledky (Cairney et Burke 1998).

Otázky, do jaké míry jsou mykorrhizní houby schopny degradační aktivity a jak jsou ve svých životních strategiích závislé a ovlivněné interakcemi se saprofytickými organismy, by měly být podnětem pro další výzkum.

2. CÍL PRÁCE

Mým úkolem bylo:

- 1) testovat vybrané druhy hub metodami kvalitativního stanovení ligninolytických enzymů
- 2) zjistit rozdílnosti v produkci ligninolytických enzymů u různých druhů hub
- 3) zaznamenat odlišnosti v produkci ligninolytických enzymů u hub pěstovaných na rozmanitých médiích, popř. u hub, které jsou stejným druhem, ale jiným kmenem

3. MATERIÁL A METODY:

3.1. Získání izolátů

Použila jsem houby izolované v letech 1976 až 1998, které jsou součástí sbírky dřevokazných a mykorrhizních hub (při ÚEK AVČR a BF JU v ČB).

3.2. Napěstování kultur hub

3.2.1. Příprava kultivačních médií

Kultivační média byla připravována vařením v Erlenmayerových baňkách, poté sterilizována v autoklávu (výrobce Chirana; Česká Republika) při tlaku 100 kPa a teplotě 120 °C a za horka ve sterilním boxu (výrobce Gelaire; Kanada) byla rozlévána do Petriho misek o průměru 70 mm; 10 ml média/ Petriho miska. Jednalo se o typy půd uvedené v Tab. 1.

Tab. 2 - Druhy použitého kultivačního média

<p><u>KHO půda</u> NH₄Cl - 0,5 g KH₂PO₄ - 0,5 g MgSO₄ · 7H₂O - 0,5 g Fe₂(SO₄)₃ - 0,05 g GLUKOSA - 5 g MALT EXTRAKT - 5 g KASEINOVÝ HYDROLYZÁT - 1 g AGAR - 15 g doplnit do 1 l destilovanou vodou; pH 5,5</p>	<p><u>MEA půda</u> MALT EXTRAKT - 20 g AGAR - 13 g doplnit do 1 l destilovanou vodou</p>
<p><u>MMN půda</u> (NH₄)₃PO₄ - 0,25 g KH₂PO₄ - 0,5 g MgSO₄ · 7H₂O - 0,05 g NaCl - 0,025 g CaCl₂ - 0,05 g FeCl₃ - 1,2 ml 1% roztok GLUKÓZA - 10 g MALT EXTRAKT - 3 g THIAMIN - 100 µg AGAR - 10 g doplnit do 1 l destilovanou vodou; pH 5,5-5,7</p>	<p><u>BaF půda</u> KH₂PO₄ - 0,5 g MgSO₄ · 7H₂O - 0,5 g CaCl₂ - 0,1 g PEPTON - 2 g GLUKÓZA - 30 g KVASICOVÝ EXTRAKT - 0,2 g AGAR - 15 g FeCl₃ · 6H₂O - 1 ml 1% roztoku ZnSO₄ · 7H₂O - 0,5 ml 0,2% roztoku MnSO₄ - 5 ml 0,1% roztoku THIAMIN - 50 µg BIOTIN - 50 µg Kyselina listová - 10 µg PYRIDOXIN - 50 µg ANTIBIOTIKA (do 10 ml vody): - STR - 1 g - PNC - 0,8 g - CHLP - 0,8 g doplnit do 1 l vodou</p>

Pozn.: MEA půda je běžné médium pro izolaci a kultivaci saprofytických hub; KHO, MMN, BaF půdy jsou speciální média pro izolaci a kultivaci mykorrhizních hub.

3.2.2. Očkování

Očkování hub probíhalo ve sterilním boxu za sterilních podmínek. Izoláty, jejichž stáří je uvedeno v Tab. 2, byly přemístěny pomocí mikrobiologického náradí ze zkumavek, (ve kterých jsou houby ve sbírce uchovány), do Petriho misek s připraveným kultivačním médiem příznivým pro růst daného kmene (ověřeno ze záznamů růstu izolátu).

K napěstování jednoho kmene je třeba použít 1-5 Petriho misek, protože dochází k časté kontaminaci kultur při manipulaci s nimi. Nárůst kultury ve zkumavce však obvykle není dostatečný, a je nutné nejprve kulturu na Petriho misce „předpěstovat“ a po určité době (záleží na růstové rychlosti daného kmene) kulturu pomocí korkovrtu přemístit do dalších misek se stejným typem kultivačního média. Ukázky pěstovaných kultur jsou v příloze 8.2.1.

Tab. 3 – Stáří jednotlivých izolátů ve sbírce mykorhizních a dřevokazných hub

Kmen	Druh	Rok izolace
R2	<i>Amanita rubescens</i>	1991
11/94	<i>Armillaria borealis</i>	1994
45	<i>Boletus aestivalis</i>	1983
4/94	<i>Fomitopsis pinicola</i>	1994
17/94	<i>Gymnopilus junonius</i>	1994
35/94	<i>Hericium clathroides</i>	1994
L16	<i>Hygrophorus olivaceoalbus</i>	1986
L48	<i>Hygrophorus pustulatus</i>	1986
38/94	<i>Ischnoderma resinosum</i>	1994
39/94	<i>Ischnoderma resinosum</i>	1994
XI/4	<i>Lactarius piperatus</i>	1976
94/94	<i>Laetiporus sulphureus</i>	1994
X/10	<i>Lycoperdon pyriforme</i>	1987
75/94	<i>Oudemansiella mucida</i>	1994
30/94	<i>Phellinus igniarius</i>	1994
45/94	<i>Phellinus igniarius</i>	1994
65/94	<i>Phellinus robustus</i>	1994
66/94	<i>Phellinus robustus</i>	1994
35/97	<i>Pholiota aurivella</i>	1997
13/94	<i>Piptoporus betulinus</i>	1994
97	<i>Pleurotus dryinus</i>	1997
10/97	<i>Pleurotus ostreatus</i>	1997
30/97	<i>Postia fragilis</i>	1997
K/IV	<i>Psilocybe cyanescens</i>	1992
20/5	<i>Russula ochroleuca</i>	1989
X/8	<i>Suillus bovinus</i>	1987
B206	<i>Suillus grevillei</i>	1987
3/98	<i>Trametes hirsuta</i>	1998
12/97	<i>Trametes serialis</i>	1997
VII/1	<i>Xerocomus badius</i>	1985

Pozn.: Nomenklatura hub řádu Aphyllophorales je upravena podle Jülichy (1984); nomenklatura hub řádu Agaricales a Boletales podle Mosera (1983).

3.2.3. Vlastní kultivace

Houby byly kultivovány v termostatu (výrobce Laboratorní přístroje Praha) při 22 °C. Kontrola probíhala zpravidla po týdnu a testovací "způsobilost" hub byla hodnocena v mm podle délky narostlého mycélia; max. průměr Petriho misky.

3.3. Enzymatické testy

Testy byly kvalitativní, tzn. nezjišťovala jsem množství, resp. aktivitu enzymů, ale pouze jejich výskyt. Byly testovány tyto enzymy:

FENOLOXIDÁZA (BAVENDAMM TEST)
EXTRACELULÁRNÍ OXIDÁZA (NOBLES TEST)
LAKÁZA (α-NAFTOLOVÝ TEST A GUAIAKOLOVÝ TEST)
PEROXIDÁZA (PYROGALLOLOVÝ TEST)

Byly použity testy:

I) Noblesové test

- důkaz **extracelulárních oxidáz**
- kapkový test: na mycélium se přidá kapka z roztoku vytvořeného z 2 g gum guaiaku v 96 % ethanolu (100 ml)
- mycélium se v místě aplikace zbarví temně modře, zeleně (Nobles 1964)

II) Test na přítomnost lakázy I (lakáza je jedním z enzymů fenoloxidáz)

- kapkový test: na mycélium se přidá kapka z 0,1 M roztoku guaiakolu (1,24 g) v 96 % ethanolu (100 ml)
- mycélium se v příslušném místě zbarví růžově, červeně až červenohnědě (4 - 24 h) (Rayner et Boddy 1988)

III) Test na přítomnost lakázy II

- kapkový test: na kolonii se přidá kapka z 0,1 M roztoku α- naftolu (1,44 g) v 96 % ethanolu (100 ml)
- fialová až purpurová (4 - 24 h) (Rayner et Boddy 1988)

IV) Test na přítomnost peroxidáz

- degradace peroxidu
- kapkový test: do kolonie se přidá stejná kapka z 0,4 % peroxidu vodíku a 1 % pyrogallolu ve vodě (10 g pyrogallolu ve 100 ml vody)
- zbarvení je oranžovožluté, oranžovočervené, žlutohnědé (4 - 48 h) (Rayner et Boddy 1988)

V) Bavendamm test

- důkaz **fenoloxidáz**
- houby rostou na médiu 5 g kyseliny tanninové a galaktové + 20 g agaru, 15 g maltózového extraktu a 1l destilované vody
- po týdnu se v mycéliu rozptýlí hnědá barva (Rayner et Boddy 1988)

Průběh těchto kvalitativních testů byl hodnocen tak, že byla zaznamenána změna, která nastala (+) nebo nenastala (-).

Hodnoty byly odečítány po časových intervalech 10 min, 30 min, 1 h, 3 h, 5 h. Vzniklé barevné změny proběhly v intervalu tří až pěti hodin.

4. VÝSLEDKY

Vyhodnocení testovaných hub je uvedeno v Tab. 2 a Tab. 3.

Čtyři druhy použitých testů jsou obsaženy v Tab. 2. **Nobles test** ukazuje, zda vůbec houba produkuje nějaké **extracelulární oxidázy**, mezi které patří všechny další detekované enzymy (**lakáza, peroxidáza**).

Tab. 4 - Zjištěné přítomnosti enzymů kvalitativními kapkovacími testy u kultur hub různých trofických skupin

Trofické skupiny hub	Kmen	Použité druhy hub/testy	I) Nobles test	II) lakázový test I	III) lakázový test II	IV) peroxidázový test	Kultivační médium
M	R2	<i>Amanita rubescens</i>	+	+	+	+	BaF
P-S	9/94	<i>Armillaria borealis</i>	+	+	+	+	MEA
M	45	<i>Boletus aestivalis</i>	+	+	+	+	BaF
M	45	<i>Boletus aestivalis</i> , •	+	+	+	+	KHO
P-S	4/94	<i>Fomitopsis pinicola</i>	+	-	-	-	MEA
P-S	17/94	<i>Gymnopilus junonius</i>	+	+	+	+	MEA
S	35/94	<i>Hericium clathroides</i>	+	+	+	+	MEA
M	L16	<i>Hygrophorus olivaceoalbus</i>	+	-	-	-	BaF
M	L48	<i>Hygrophorus pustulatus</i>	+	-	+	+	BaF
M	L48	<i>Hygrophorus pustulatus</i>	+	+	+	+	MMN
S	38/94	<i>Ischnoderma resinosum</i>	+	+	+	+	MEA
S	39/94	<i>Ischnoderma resinosum</i>	+	+	+	+	MEA
M	XI/4	<i>Lactarius piperatus</i>	+	-	-	-	KHO
S-P	94/94	<i>Laetiporus sulphureus</i>	+	-	-	+	MEA
S	X/10	<i>Lycoperdon pyriforme</i>	+	-	-	+	KHO
S-P	75/94	<i>Oudemansiella mucida</i>	+	+	-	+	MEA
S-P	30/94	<i>Phellinus igniarius</i>	+	-	-	-	MEA
S-P	45/94	<i>Phellinus igniarius</i>	+	+/-	+	+	MEA
S-P	65/94	<i>Phellinus robustus</i>	+	+	+	-	MEA
S-P	66/94	<i>Phellinus robustus</i>	+	+	+	-	MEA
S-P	35/97	<i>Pholiota aurivella</i>	+	+	+	+	MEA
S-P	13/94	<i>Piptoporus betulimus</i>	+	-	-	-	MEA
S-P	97	<i>Pleurotus dryinus</i>	+	-	-	-	MEA
S-P	10/97	<i>Pleurotus ostreatus</i>	+	+	+	+	MEA
S-P	30/97	<i>Postia fragilis</i>	-	-	-	-	MEA
S	K/IV	<i>Psilocybe cyanescens</i>	-	-	-	-	MMN
M	20/5	<i>Russula ochroleuca</i>	+	-	-	-	KHO
M	20/5	<i>Russula ochroleuca</i>	+	-	-	-	MEA
M	X/8	<i>Suillus bovinus</i>	+	+	+	+	KHO
M	X/8	<i>Suillus bovinus</i>	+	-	-	-	MEA
M	B206	<i>Suillus grevillei</i>	+	-	+/-	-	BaF
S	3/98	<i>Trametes hirsuta</i>	+	+	+	+	MEA
S	12/97	<i>Trametes serialis</i>	+	+	+	+	MEA
M	VII/1	<i>Xerocomus badius</i>	+/-	+/-	+/-	+/-	KHO

Výsledky **Bavendamm testu**, který slouží k detekci **fenoloxidáz** patřících mezi

extracelulární oxidázy, jsou uvedeny v Tab. 3.

Tab. 5 - Zjištěné přítomnosti fenoloxidáz u testovaných hub

Trofické skupiny hub	Kmen	Použité druhy hub/testy	Bavendamm test
M	R2	<i>Amanita rubescens</i>	+
P-S	9/94	<i>Armillaria borealis</i>	/
M	45	<i>Boletus aestivalis</i>	+
P-S	4/94	<i>Fomitopsis pinicola</i>	-
P-S	17/94	<i>Gymnopilus junonius</i>	+
S	35/94	<i>Hericium clathroides</i>	+
M	L16	<i>Hygrophorus olivaceoalbus</i>	-
M	L48	<i>Hygrophorus pustulatus</i>	+
S	38/94	<i>Ischnoderma resinosum</i>	+
S	39/94	<i>Ischnoderma resinosum</i>	+
M	XI/4	<i>Lactarius piperatus</i>	/
S-M	94/94	<i>Laetiporus sulphureus</i>	+/-
S	X/10	<i>Lycoperdon pyriforme</i>	/
S-P	75/94	<i>Oudemansiella mucida</i>	/
S-P	30/94	<i>Phellinus igniarius</i>	+
S-P	45/94	<i>Phellinus igniarius</i>	+
S-P	65/94	<i>Phellinus robustus</i>	+
S-P	66/94	<i>Phellinus robustus</i>	+
S-P	35/97	<i>Pholiota aurivella</i>	+
S-P	13/94	<i>Piptoporus betulinus</i>	-
S-P	97	<i>Pleurotus dryinus</i>	/
S-P	10/97	<i>Pleurotus ostreatus</i>	+
S-P	30/97	<i>Postia fragilis</i>	/
S	K/IV	<i>Psilocybe cyanescens</i>	-
M	20/5	<i>Russula ochroleuca</i>	/
M	20/5	<i>Russula ochroleuca</i>	/
M	X/8	<i>Suillus bovinus</i>	/
M	X/8	<i>Suillus bovinus</i>	/
M	B206	<i>Suillus grevillei</i>	+/-
S	3/98	<i>Trametes hirsuta</i>	+
S	12/97	<i>Trametes serialis</i>	/
M	VII/1	<i>Xerocomus badius</i>	/

Pozn.: Výsledky některých barevných reakcí jsou uvedeny v příloze 8.2.2.

Vysvětlivky:

M = mykorhizní symbiont

S = saprofyt

P = parazit

/ = test neproveden, kultura na daném médiu neroste

+ = reakce pozitivní; pravděpodobná přítomnost enzymu

- = reakce negativní; enzym se daným testem nepodařilo dokázat

+/- = reakci není možno objektivně zhodnotit (příliš slabá, výsledek barevné reakce interferuje s barvou mycélia)

• = reakce *Boletus aestivalis* rostoucího na KHO je při enzymatických testech silnější

Typ použité půdy:

KHO = KHO půda, BaF = BaF půda, MMN = MMN půda, MEA = MEA půda

5. DISKUZE

5.1. Enzymatické testy hub

Z publikovaných prací je možné zjistit, které shodné enzymatické testy byly prováděny u druhů hub jako byly použity v mých pokusech. Dosažené výsledky jsou zachyceny v následující Tab. 4.

Tab. 4 – Literární údaje o enzymatickém vybavení sledovaných druhů

Druh houby/testu	Bavendamm test – fenoloxidázy	Nobles test – extracelulární oxidázy	Lakázový test (testovací činidla)			Peroxidázový test
			α -n	g	s	
<i>Amanita rubescens</i>	- ⁷⁾ , + ¹¹⁾	+ ⁷⁾ , + ¹¹⁾	- ⁶⁾ , + ¹¹⁾		+ ⁶⁾ , ⁷⁾	+ ⁶⁾ , ¹¹⁾
<i>Fomitopsis pinicola</i>	- ¹⁾	- ³⁾				
<i>Ischnoderma resinosum</i>			- ⁶⁾	+ ⁶⁾	- ⁶⁾	+ ⁶⁾
<i>Laetiporus sulphureus</i>		- ³⁾	- ⁶⁾	+ ⁶⁾	- ⁶⁾	+ ⁶⁾
<i>Phellinus igniarius</i>	+ ¹⁾	+ ³⁾	+ ⁸⁾			+ ⁸⁾
<i>Phellinus robustus</i>	+ ¹⁾		+ ⁸⁾			+ ⁸⁾
<i>Pholiota aurivella</i>		+ ³⁾				
<i>Piptoporus betulinus</i>	- ¹⁾	- ³⁾	- ⁸⁾			- ⁸⁾ , + ¹⁰⁾ m
<i>Pleurotus ostreatus</i>		+ ³⁾		+ ⁵⁾	+ ⁵⁾	+ ¹⁰⁾ m, - ¹⁰⁾ l
<i>Postia fragilis</i>		- ³⁾				
<i>Suillus grevillei</i>	- ²⁾	- ⁴⁾	- ⁹⁾			
<i>Trametes hirsuta</i>		+ ³⁾	+ ⁸⁾			+ ⁸⁾
<i>Trametes serialis</i>	- ¹⁾		- ⁸⁾			- ⁸⁾
<i>Xerocomus badius</i>			- ⁹⁾			

Vysvětlivky:

Čísla označují autory publikací:

- 1) Davidson et al. (1938)
- 2) Lideberg (1948)
- 3) Nobles (1964)
- 4) Pantidou (1966)
- 5) Harkin et al. (1974)
- 6) Marr (1979)
- 7) Miller et al. (1983)
- 8) Rayner et Boddy (1988)
- 9) Hutchison (1990)
- 10) de Jong et al. (1994)
- 11) Gramss et al. (1998)

Znaménka označují, zda byla reakce:

+ = pozitivní

- = negativní

Zkratky značí:

s -k důkazu reakce byl použit syringaldazin

α -n -k důkazu reakce byl použit α -naftol

g -k důkazu reakce byl použit guaiakol

m -prokázání mangan dependentní peroxidázy

l -prokázání lignin peroxidázy

5.2. Srovnání provedených testů

Tab. 6 – Typy hniloby u vybraných druhů hub (Rypáček 1957)

Druh	Typ dřevokazné houby
<i>Armillaria borealis</i>	WR
<i>Fomitopsis pinicola</i>	BR
<i>Gymnopilus junonius</i>	?
<i>Hericium clathroides</i>	?
<i>Ischnoderma resinosum</i>	WR
<i>Laetiporus sulphureus</i>	BR
<i>Oudemansiella mucida</i>	WR
<i>Phellinus igniarius</i>	WR
<i>Phellinus robustus</i>	WR
<i>Pholiota aurivella</i>	WR
<i>Piptoporus betulinus</i>	BR
<i>Pleurotus dryinus</i>	?
<i>Pleurotus ostreatus</i>	WR
<i>Postia fragilis</i>	BR
<i>Trametes hirsuta</i>	WR
<i>Trametes serialis</i>	BR

Pozn.: Houby způsobující bílou hnilobu jsou označovány jako white-rot (WR) fungi; houby působící hnilobu hnědou jako brown-rot (BR) fungi.

Dřevokazné houby působící bílou a hnědou hnilobu (viz. Tab. 5) nebývají odlišovány jen podle změn charakteru dřeva (barva, struktury, objem, váha) při rozkladu, ale také pomocí jejich biochemie, kdy enzymologické metody umožňují detekovat ligninolytické enzymy přítomné pouze u WR hub. Jedním z nejstarších testů používaných k rozlišení byl **Bavendamm test** a potom **Nobles test**, oba sloužící k ověření syntézy **polyfenoloxidáz**.

Srovnáním literárních údajů s mými výsledky nacházíme shodné hodnoty v případě **Bavendamm testu** u *Fomitopsis pinicola*, *Piptoporus betulinus* (Davidson et al. 1938), kdy výsledek testu je negativní, protože se jedná o BR houby, které ligninolytické enzymy neprodukují. Odpovídající jsou rovněž hodnoty **Nobles testu** v případě *Postia fragilis* (-, BR houba), *Pleurotus ostreatus* (+), *Trametes hirsuta* (+) a *Pholiota aurivella* (+). *Postia fragilis*, *Pleurotus ostreatus* a *Trametes hirsuta* patří mezi WR houby vlastníci ligninolytický systém, proto je zřejmé, že budou syntetizovat polyfenoloxidázy. Tento test prováděla Nobles (1964).

Různé výsledky byly získány při testování **polyfenoloxidáz Bavendamm testem** *Trametes serialis* (Davidson et al. 1938) a při testování **Nobles testem** *Fomitopsis pinicola*, *Laetiporus sulphureus* a *Piptoporus betulinus* (Nobles 1964).

Protože u všech čtyř druhů hub se jedná o BR houby, je nepravděpodobné, že by se vyznačovaly přítomností **fenoloxidáz**. Výsledek je zřejmě zatížen chybou způsobenou příliš silným zbarvením, které v médiu šíří mycélium během svého růstu.

Testy založené na detekci **lakázy** a **peroxidázy** jsou neméně spolehlivé jako testy předchozí, ale k odlišení WR od BR hub ne vždy použitelné. Některé WR houby neprodukují **lakázu** a některé BR houby naopak syntetizují **peroxidázu**, která by měla být vlastní houbám ligninolytickým (de Jong et al. 1994).

Lakáza bývá testována vícero druhy testů, snad protože zahrnuje několik izozymů, které mohou na přítomnost testovacích činidel reagovat různě podle toho, zda substrát "vyhovuje" aktivnímu centru enzymu.

Hodnot shodných s literaturou bylo dosaženo u *Laetiporus sulphureus* a *Ischnoderma resinosum* testovaných Marr (1979). V prvním případě byl **lakázový test** byl pozitivní, jestliže bylo k důkazu použito α -naftolu. U *Ischnoderma resinosum* byla **lakáza** detekována, užilo-li se jako testovacího reagents guaiakolu. U obou druhů **peroxidázový test** ukázal přítomnost **peroxidázy**.

Mé výsledky se shodují rovněž s Rayner et Boddy (1988), kteří testovali *Phellinus igniarius*, *Trametes hirsuta* (**lakáza** (α -naftol), **peroxidáza** přítomny) a *Piptoporus betulinus* (**lakáza** (α -naftol), **peroxidáza** nebyly syntetizovány).

Odpovídající si hodnoty byly nalezeny také u *Pleurotus ostreatus*, kde Harkin et al. (1974) dokázal přítomnost **lakázy** pomocí guaiakolu a de Jong et al. (1994) přítomnost **peroxidázy**.

Rozdílné hodnoty **lakázového testu** byly zachyceny, když testovacím reagents u *Laetiporus sulphureus* byl guaiakol a u *Ischnoderma resinosum* a *Trametes serialis* α -naftol. *Laetiporus sulphureus* a *Ischnoderma resinosum* byly testovány Marr (1979); *Trametes serialis* byla testována Rayner et Boddy (1988).

Peroxidázový test se lišil u *Phellinus robustus* a *Trametes serialis*. *Piptoporus betulinus* a *Pleurotus ostreatus* byly testovány (de Jong et al. 1994) konkrétně na přítomnost **mangan peroxidázy**, která nalezena byla v obou

případech, a **lignin peroxidázy**, která nebyla zjištěna ani u jednoho z těchto druhů.

Dosažené odlišné výsledky nemusí být chybou pozorování. Produkce **lakázy** a **peroxidázy** je silně závislá na podmínkách prostředí, které pro vyvolání syntézy těchto enzymů u různých druhů hub mohou mít jinou indukční hodnotu.

U mykorrhizních druhů se výsledky testů víceméně shodují kromě hodnot **Nobles testu**, případně **Bavendamm testu**, u *Suillus grevillei*. Lindeberg (1948) a Pantidou (1966) na rozdíl od mých výsledků detekovali **fenoloxidázy** u tohoto druhu nepřítomné.

Výsledky mnou provedených testů u *Xerocomus subtomentosus* a **lakázového testu** u *Suillus grevillei* nejsou jednoznačné, zbarvení kultivačního média bylo příliš silné a výsledek reakce slabý.

Kromě *Amanita rubescens* jsem zjistila schopnost produkovat hlavní enzymy ligninolytického aparátu také u *Boletus aestivalis*, *Hygrophorus pustulatus* a *Suillus bovinus*. U mnohých dalších mykorrhizních hub (*Hygrophorus olivaceoalbus*, *Lactarius piperatus*, *Russula ochroleuca*, *Suillus grevillei*) bylo ověřeno, že produkují alespoň některé z uvedených enzymů – **polyfenoloxidázy**, prokázané **Nobles testem**.

Příčinou rozdílů v hodnotách mých testů u druhů *Suillus bovinus* (kmen X/8) a *Hygrophorus pustulatus* (kmen L48), jsou pravděpodobně odlišná kultivační média, která budou mít vliv na indukci ligninolytických enzymů. V případě WR houby *Phellinus igniarius* nebyly u kmene 30/94 kromě **fenoloxidáz** detekovány další enzymy ligninolytického aparátu na rozdíl od kmene 45/94, kde byla prokázána syntéza všech testovaných enzymů. Tyto odlišnosti lze vysvětlit vlivem původního prostředí, ze kterého byly kmeny izolovány – kmen 30/94 z jabloně (*Malus*), kmen 45/94 z olše (*Alnus*). Avšak nelze vyloučit, že se u kmene 30/94 jednalo o mutanta, což nebylo žádným testováním vyvráceno.

Z provedených testů se jeví, že *Gymnopilus junonius* a *Hericium clathroides* patří mezi WR houby, zatímco *Pleurotus dryinus* je druh působící hnědou hnilobu.

6. ZÁVĚR

Produkce ligninolytických enzymů je typickým rysem hub působících bílou hnilobu. Kvalitativní enzymatické testy prokázaly, že mohou být užity k detekci těchto enzymů, třebaže zde byly případy, kdy by bylo vhodnější a přesnější použít jiné metody.

Testy dále ukázaly, že schopnost syntézy ligninolytických enzymů není vlastní pouze WR houbám, ale rovněž jiné trofické skupiny hub dokáží vytvářet enzymy ligninolytického systému, které zde mohou mít různé funkce.

Byly zkoumány rozdíly mezi houbami kultivovanými na odlišných médiích. U dvou druhů *Hygrophorus pustulatus* a *Suillus bovinus* bylo zjištěno, že produkují všechny testované ligninolytické enzymy, pokud jsou kultivovány na MMN (*Hygrophorus pustulatus*) a na KHO (*Suillus bovinus*), ale ne v případě, je-li jako kultivačního média použito BaF (*Hygrophorus pustulatus*) nebo MEA (*Suillus bovinus*).

Byly testovány dva kmeny druhu *Phellinus igniarius* izolované z různých substrátů a enzymatické testy odhalily, že pouze jeden kmen vytváří příslušné enzymy. Testy dalších druhů přítomných ve více kmenech (*Ischnoderma resinatum*, *Phellinus robustus*) nepotvrdily domněnku vlivu substrátu na produkci enzymů ligninolytického aparátu.

Nicméně se ani v jednom případě nejedná o statisticky významné množství testovaných vzorků, protože jsem byla limitována výběrem hub pocházejících ze sbírek a jejich růstem pouze na určitých typech médií. Je zřejmé, že tento problém by měl být dále zkoumán.

7. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

- BUMPUS, J.A. & AUST, S.D. (1985). Biodegradation of environmental pollutants by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*, *BioEssays* **6** (4), 167–168.
- CAIRNEY, J.W.G. & BURKE, R.M. (1998). Do ecto- and ericoid mycorrhizal fungi produce peroxidase activity?, *Mycorrhiza* **8**, 61–65.
- ČERNÝ, A. (1989). *Parazitické dřevokazné houby*, Státní zemědělské nakladatelství, Praha.
- DAVIDSON, W.R., CAMPBELL, W.A. & BLAISDELL, D.J. (1938). Differentiation of wood-decaying fungi by reactions on gallic and tannic acid medium, *J. Agri. Res.* **57** (9), 683–695.
- DE JONG, E. & FIELD, J.A. (1994). Physiological role of chlorinated aryl alcohols biosynthesized by the white - rot fungus *Bjerkandera* (Strain BOS 55), *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 271–277.
- DE JONG, E., FIELD, J.A. & DE BONT, J.A.M. (1994). Aryl alcohols in the physiology of ligninolytic fungi, *FEMS Microbi. Rew.*, 153–175.
- EGGER, K.N. (1987). The taxonomic value of phenoloxidase tests for separating *Peziza* and *Plicaria* (Pezizales), *Mycotaxon* **29**, 183–188.
- GOLD, M.H., GLENN, J.K. & ALIC, M. (1988). Use of polymeric dyes in lignin biodegradation assays, *Methods in Enzymology* **161**, 75–78.
- GRAMSS, G., GUNTER, T. & FRITSCH, W. (1998). Spot tests for oxidative enzymes in ectomycorrhizal, wood and litter decaying fungi, *Mycol. Res.* **102** (I), 67–72.
- HARKIN, J.M., LARSEN, M.J. & OBST, J.R. (1974). Use of syringaldazine for detection of laccase in sporophores of wood rotting fungi, *Mycologia* **66**, 469–476.
- HUTCHISON, L.J. (1990). Studies on the systematic of ectomycorrhizal fungi in axenic culture: III. Patterns of polyphenol oxidase activity, *Mycologia* **82** (4), 424–435.
- JÜLICH, W. (1984). *Aphylophorales, Heterobasidiomycetes, Gastromycetes*, Fischer Verlag, Stuttgart.
- KÄÄRIK, A. (1965). The identification of the mycelia of wood-decay fungi by their oxidation

reactions with phenolic compounds, *Stud. Forest. Suec.* **31**, 1-81.

KIRK, T.K. & FARRELL, R.L. (1987). Enzymatic combustion: The microbial degradation of lignin, *Ann. Rev. Microbiol.* **41**, 466-467.

KLÁN, J. (1989). *Co víme o houbách?*, Státní pedagogické nakladatelství, Praha.

KRČMÁŘ, P. & MARAIS, M.F. (1996). *Production of ligninolytic enzymes and characterization of the polysaccharide secreted by Plebia radiata in liquid culture*. In: Mini symposium on biosorption and microbial degradations, 58-59.

LINDEBERG, G. (1948). On the occurrence of polyphenol oxidases in soil - inhabiting Basidiomycetes, *Physiologia Plantarum* **1**, 196-205.

MARR, C.D. (1979). Laccase and tyrosinase oxidation of spot test reagents, *Mycotaxon* **9** (1), 244-276.

MILLER, O.K. & MILLER, S.L. (1983). Description and identification of selected mycorrhizal fungi in pure culture, *Mycotaxon* **18** (2), 457-481.

MOSER, M. (1983). *Die Röhrlinge und Blätterpilze*, Fischer Verlag, Stuttgart.

NOBLES, K.M. (1965). Identification of cultures of wood-inhabiting hymenomycetes, *Can. J. Bot.* **43**, 1097-1139.

PANTIDOU, M.E. (1961). Cultural studies of *Boletaceae*: *Gyrodon merulioides* and four species of *Boletinus*, *Can. J. Bot.* **39**, 1149-1166.

PANTIDOU, M.E. & GROVES, J.W. (1966). Cultural studies of *Boletaceae*: Some species of *Suillus* and *Fuscoboletinus*, *Can. J. Bot.* **44**, 1371-1392.

RAMSTEDT, M. & SÖDERHÄLL, K. (1983). Protease phenoloxidase and pectinase activities in mycorrhizal fungi, *Trans. Br. Mycol. Soc.* **81** (1), 157-161.

READ, D.J. (1990). Mycorrhizas in ecosystems - nature's response to the "law of the minimum". In: Hawksworth, D.L. (eds), *Frontiers in Mycology*, United Kingdom, 101-130.

REYNER, A.D.M. & BODDY, L. (1988). *Fungal decomposition of wood. Its biology and ecology*, John Wiley and Sons, Chichester, 25–248.

RYPÁČEK, V. (1957). *Biologie dřevokazných hub*, Československá akademie věd, Praha.

STALPÉRS, J.A. (1978) Identification of wood-inhabiting fungi in pure culture, *Studies in Mycology* **16**, 1–24.

TURNER, W.B. & ALDRIDGE, D.C. (1983). *Fungal metabolites II: secondary metabolites derived without the intervention of acetate*, Academic Press Inc., London .

TYLER, G. (1984). *Macrofungi of Swedish beech forest*, Department of Plant Ecology University of Lund, Sweden.

VESELÝ, R., KOTLABA, F. & POUZAR, Z. (1972). *Přehled československých hub*, Academia Praha.

8. PŘÍLOHY

8.1. Vědecké názvy hub

- Amanita rubescens* (PERS. EX FR.) GRAY - **Muchomůrka růžovka**
Armillaria borealis MARXMÜLLER ET ROMAGNESI - **Václavka severní**
Bjerkandera adusta (WILLD. EX FR.) P. KARST. - **Šedopórka osmahlá**
Boletus aestivalis PAULET EX FR. - **Hřib dubový**
Daeadalea quercina (L.) EX FR. - **Sít'kovec dubový**
Fomes fomentarius (L. EX FR.) KICKX - **Troudinatec kopytovitý**
Fomitopsis pinicola (SW. EX FR.) P. KARST - **Troudinatec páskovaný**
Gymnopilus junonius (FR.) P.D. ORTON (= *Pholiota spectabilis* (FR.) KUMM) - **Šupinovka nádherná**
Hericium clathroides (PALLAS EX FR.) PERS. - **Korálovec bukový**
Heterobasidion annosus (FR.) BREF. - **Kořenovník vrstevnatý**
Hygrophorus olivaceoalbus (FR. EX FR.) FR. - **Šťavnatka olivově bílá**
Hygrophorus pustulatus (PERS. EX FR.) FR. - **Šťavnatka tečkovaná**
Hypoxylon coccineum BULL.
Ischnoderma resinosum (FR.) P. KARST - **Smolokorka buková**
Lactarius deliciosus FR. - **Ryzec pravý**
Lactarius necator (BULL. EM PERS. EX FR.) KARST (= *L. turpis* (WEINM.) FR.) - **Ryzec šeredný**
Lactarius piperatus (L. EX FR.) S.F. GRAY - **Ryzec peprný**
Lactarius torminosus (SCHFF. EX FR.) S.F. GRAY - **Ryzek kravský**
Laetiporus sulphureus (BULL. EX FR.) MURRILL - **Sírovec žlutooranžový**
Leccinum griseum (QUEL.) SING. (= *Bolletus pseudoscaber* KBCH.) - **Hřib nachovýtrusný**
Lycoperdon pyriforme SCHAEFF. EX PERS. - **Pýchavka hruškovitá**
Oudemansiella mucida (SCHRAD. EX FR.) - **Slizečka porcelánová**
Phanerochaete chrysosporium (BURDSALL ET ESLYN)
Phellinus igniarius (L. EX FR.) QUÉL. - **Ohňovec obecný**
Phellinus robustus (P. KARST.) BOURD. ET GALZ. - **Ohňovec statný**
Phlebia radiata FR
Pholiota aurivella (BATSCH EX FR.) KUMMER - **Šupinovka zlatozávojná**
Piptoporus betulinus (BULL. EX FR.) P. KARST - **Březovník obecný**
Pleurotus dryirus (PERS. EX FR.) KUMMER - **Hlíva dubová**
Pleurotus eryngii (DC. EX FR.) QUEL - **Hlíva máčková**
Pleurotus ostreatus (JACQ. EX FR.) KUMMER - **Hlíva ústříčná**
Postia fragilis (FR.) JULICH - **Bělochoroš křehký**
Psilocybe cyanescens WAKEFIELD
Russula ochroleuca (PERS.) FR. - **Holubinka hlínožlutá**
Chondrostereum purpureum (PERS. EX FR.) POUZ. (= *Stereum purpureum* FR.) - **Pevník nachový**
Suillus bovinus (L. EX FR.) O. KUNTZE - **Klouzek kravský**
Suillus grevillei (KLOTZSCH) SING. - **Klouzek sličný**
Trametes hirsuta (WULF. EX FR.) LLOYD - **Outkovka chlupatá**
Trametes serialis FR. - **Outkovka řadová**
Trametes versicolor (L. EX FR.) LLOYD - **Outkovka pestrá**
Xerocomus badius (FR.) KÜHL. EX GILB. - **Hřib hnědý**
Xerocomus subtomentosus (L. EX FR.) QUÉL. - **Hřib plstnatý**
Xylaria hypoxylon (L. EX HOOK.) GREV. - **Dřevnatka parohatá**

8.2. Fotografie

8.2.1. Pěstované kultury vybraných druhů hub



1. Kultura druhu *Psilocybe bohemica* pěstovaná na BaF médiu

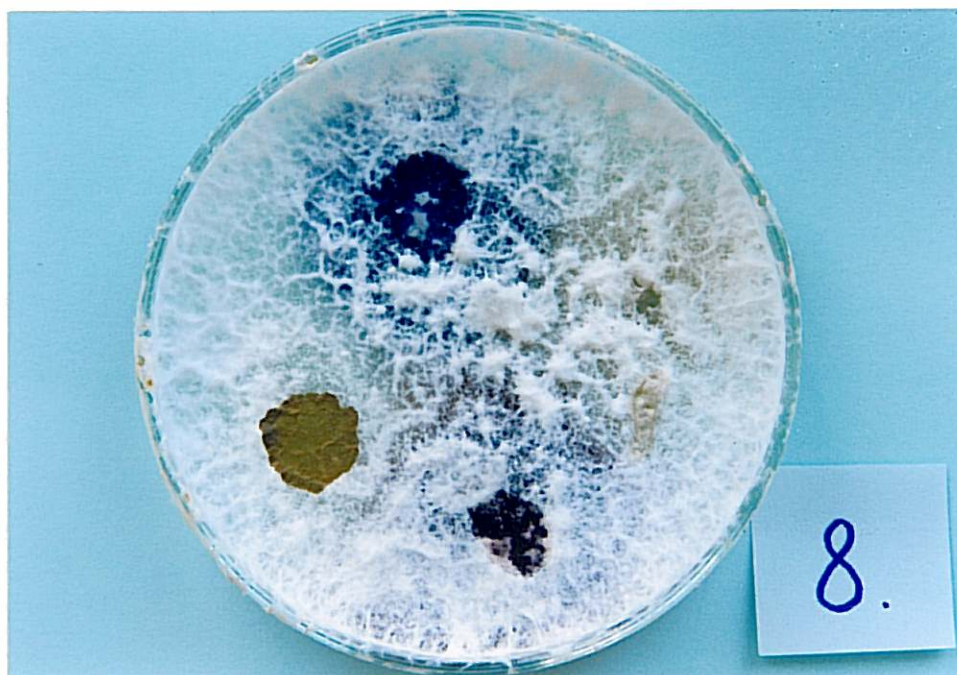


2. Kultura druhu *Boletus aestivalis* pěstovaná na KHO médiu

8.2.2. Barevné reakce



1. Barevná změna po přidání testovacích činidel – *Pleurotus ostreatus*



2. Barevná změna po přidání testovacích činidel – *Ischnoderma resinatum*