

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Enzymatická degradace složek barviv na vlasy  
Diplomová práce

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2024/2025

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Matyáš Češík**  
Osobní číslo: **C23262**  
Studijní program: **N0531A130030 Hodnocení a analýza potravin**  
Téma práce: **Enzymatická degradace složek barviv na vlasy**  
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

## Zásady pro vypracování

- Z odborných publikací vypracujte literární rešerši týkající se možností využití vybraných polyfenoloxidáz v biodegradaci složek barviv na vlasy, jež jsou zařazeny mezi nové polutanty životního prostředí. Zaměřte se převážně na popis katalyticky řízených oxidačních drah různě substituovaných aminofenolů a fenylaminů.
- V rámci praktické části stanovte katalytickou aktivitu tyrosinázy, lakázy a křenové peroxidázy vůči významným látkám obsažených v permanentních barvách na vlasy. Pokuste se stanovit optimální podmínky katalýzy. Získaná data statisticky zpracujte a prezentujte partičními grafy kinetiky podle Michaelise a Mentenové. Vypočtené kinetické parametry pro jednotlivé polyfenoloxidázové enzymy uveďte v přehledových tabulkách a porovnejte s údaji uvedených v literatuře či databázi enzymů BRENDA. Kriticky zhodnoťte, zda oxidační transformace takovýchto polutantů může mít význam v jejich odbourávání v odpadních vodách.

Rozsah pracovní zprávy:  
Rozsah grafických prací:  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:  
Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Milan Sýs, Ph.D.**  
Katedra analytické chemie  
Konzultant diplomové práce: **Ing. Tomáš Mikysek, Ph.D.**  
Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **7. února 2025**  
Termín odevzdání diplomové práce: **9. května 2025**

L.S.

---

**prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.**  
děkan

---

**doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2025

## **PROHLÁŠENÍ**

Práci s názvem „Enzymatická degradace složek barviv na vlasy“ jsem vypracoval zcela samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji diplomovou práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze 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, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích, dne 9. 5. 2025

Bc. Matyáš Češík

## **PODĚKOVÁNÍ**

*Rád bych zde poděkoval především vedoucímu mé diplomové práce Ing. Milanu Sýsovi, Ph.D. a konzultantovi Ing. Tomáši Mikyskovi, Ph.D. za odborné vedení, věcné připomínky, cenné rady, pomoc, ochotu a vstřícný přístup při zpracovávání této práce. Dík patří také panu doc. Ing. Petru Šimůnkovi, Ph.D., doc. Ing. Martinu Adamovi, Ph.D. a doc. Ing. Tomáši Bajerovi, Ph.D. za odborné rady a pomoc při experimentální části této diplomové práce. Velký dík bych si přál vyjádřit také své rodině a zejména babičce, která mi byla nedocenitelnou podporou po celou dobu mých studií.*

*Všem vám moc děkuji!*

# **NÁZEV**

Enzymatická degradace složek barviv na vlasy

## **ANOTACE**

Diplomová práce se zabývá problematikou přítomnosti toxických složek z permanentních vlasových barev v odpadních vodách a možnostmi jejich odstranění pomocí enzymatické degradace. Teoretická část popisuje složení a toxicitu vlasových barviv, včetně jejich vlivu na životní prostředí. Dále jsou diskutovány konvenční i moderní metody pro jejich odstranění. Experimentální část se zaměřuje na studium katalytické aktivity vybraných polyfenoloxidáz (tyrosinázy, lakázy a křenové peroxidázy) při degradaci klíčových barvivových prekurzorů. Získané výsledky ukazují na rozdílnou efektivitu jednotlivých enzymů. Jejich degradační potenciál v praktickém čištění odpadních vod lze shledat za diskutabilní.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Enzymatická degradace; permanentní barvy na vlasy; odpadní vody; spektrometrie; životní prostředí.

## **TITLE**

Enzymatic degradation of hair dye ingredients

## **ANNOTATION**

This thesis addresses the issue of toxic components from permanent hair dyes present in wastewater and explores their removal through enzymatic degradation. The theoretical section provides an overview of the composition and toxicity of hair dye formulations, with particular attention to their environmental impact. Conventional and emerging methods for their elimination are also discussed. The experimental part focuses on investigating the catalytic activity of selected polyphenol oxidases—tyrosinase, laccase, and horseradish peroxidase—in the degradation of key dye precursors. The results demonstrate varying levels of efficiency among the tested enzymes. However, their potential for practical application in wastewater treatment remains subject to critical evaluation.

## **KEYWORDS**

Enzymatic degradation; permanent hair dyes; wastewater; spectrometry; environment.

# OBSAH

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK .....	13
ÚVOD.....	15
1 TEORETICKÁ ČÁST .....	16
1.1 Barvy na vlasy.....	16
1.1.1 Stručná historie používání barev na vlasy.....	16
1.1.2 Struktura lidského vlasu.....	17
1.1.3 Klasifikace barev na vlasy .....	17
1.1.4 Princip barvení vlasů permanentními barvami.....	19
1.1.5 Složení permanentních barev na vlasy.....	20
1.1.6 Toxicita barev na vlasy .....	22
1.1.6.1 Akutní toxicita barev na vlasy.....	25
1.1.6.2 Chronická toxicita barev na vlasy.....	26
1.1.6.3 Environmentální toxicita barev na vlasy.....	26
1.2 Současné možnosti odstranění složek barev na vlasy z odpadních vod.....	27
1.2.1 Princip fungování konvenčních ČOV .....	28
1.2.2 Efektivita ČOV v odstraňování reziduí barev na vlasy.....	29
1.3 Moderní přístupy odstraňování složek barev na vlasy z odpadních vod.....	30
1.3.1 Chemické a elektrochemické metody v degradaci složek barev na vlasy.....	31
1.3.2 Rostliny a kořenové systémy v degradaci složek barev na vlasy.....	32
1.3.3 Využití mikroorganismů a enzymů k degradaci složek vlasových barev .....	33
1.3.3.1 Lakáza.....	34
1.3.3.2 Křenová peroxidáza .....	36
1.3.3.3 Tyrosináza.....	37
1.3.3.4 Fenoxazinon syntáza .....	40
1.4 Enzymová kinetika: rychlost reakcí katalyzovaných enzymy .....	43
1.4.1 Spektrofotometrické stanovení aktivity enzymů.....	44
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	46
2.1 Přístroje a pomůcky.....	46
2.2 Použité chemikálie .....	47
2.3 Syntéza standardu 2-aminofenoxazin-3-onu.....	47
2.4 Příprava pracovních roztoků .....	48
2.5 Pracovní podmínky a parametry .....	50
3 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	51
3.1 Stabilita substrátů.....	51
3.2 Katalytická aktivita enzymu tyrosinázy .....	53
3.3 Katalytická aktivita enzymu lakázy .....	54

3.4	Katalytická aktivita enzymu křenové peroxidázy .....	55
3.5	Kalibrační závislosti vzniklých produktů.....	56
3.6	Katalyticky řízená oxidační přeměna <i>p</i> -fenylendiaminu.....	58
3.7	Porovnání katalytické aktivity vybraných enzymů .....	59
3.7.1	Kinetika katalytické oxidace <i>o</i> -aminofenolu prostřednictvím tyrosinázy.....	59
3.7.2	Kinetika oxidace <i>o</i> -fenylendiaminu a <i>o</i> -aminofenolu katalyzovaná lakázou.....	60
3.7.3	Kinetika oxidace <i>o</i> -fenylendiaminu a <i>o</i> -aminofenolu katalyzovaná křen. peroxidázou ....	62
3.8	Stanovení kinetických parametrů studovaných enzymů .....	63
3.8.1	Stanovení kinetických parametrů tyrosinázy pro přeměnu <i>o</i> -aminofenolu.....	64
3.8.2	Stanovení kinetických parametrů lakázy pro oxidaci <i>o</i> -fenylendiaminu .....	65
3.8.3	Stanovení kinetických parametrů lakázy pro oxidaci <i>o</i> -aminofenolu .....	65
3.8.4	Stanovení kinetických parametrů křenové peroxidázy pro <i>o</i> -fenylendiamin.....	66
3.8.5	Stanovení kinetických parametrů křenové peroxidázy pro <i>o</i> -aminofenol.....	67
3.8.6	Porovnání získaných parametrů enzymové kinetiky.....	68
4	ZÁVĚR .....	70
	POUŽITÁ LITERATURA .....	71

## SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

<b>Obrázek 1.</b> Návod na odstranění šedin dle Ebersova papyru [4].	16
<b>Obrázek 2.</b> Struktura zdravého lidského vlasu [8].	17
<b>Obrázek 3.</b> Diagram rozdělení barev na vlasy	18
<b>Obrázek 4.</b> Ilustrace mechanismu barvení vlasového stvolu permanentními barvami [14].	20
<b>Obrázek 5.</b> Molekula <i>p</i> -fenylendiaminu a <i>p</i> -aminofenolu.	20
<b>Obrázek 6.</b> Molekula peroxidu vodíku, amoniaku a etanolaminu.	21
<b>Obrázek 7.</b> Struktury finálních barviv po reakci prekursoru PPD s kaplery: resorcinolem, <i>m</i> -aminofenolem a 2-metyl-5-aminofenolem.	21
<b>Obrázek 8.</b> Přehled jednotlivých molekul kaplerů a barev, jaké dávají po reakci s prekurzorem PPD [16].	21
<b>Obrázek 9.</b> Chemické struktury některých složek barev na vlasy [13].	23
<b>Obrázek 10.</b> Alergická reakce na PPD po barvení vlasů a pozitivní reakce na patch test (fotografie C) [21, 22].	25
<b>Obrázek 11.</b> Embrya ryby <i>D. rerio</i> 48 hodin po oplodnění – zdravé embryo kontrolní skupiny a embryo <i>D. rerio</i> vystavené roztoku připraveného z barvy na vlasy „Herbul black henna“ o koncentraci $600 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ [29].	27
<b>Obrázek 12.</b> Modelové schéma ČOV [33].	28
<b>Obrázek 13.</b> Schéma sloupcového (vertikálního) umělého mokřadu [46].	32
<b>Obrázek 14.</b> Proteinová struktura lakázy a jejího aktivního centra [56] a katalytický cyklus pro <i>meta</i> substituované fenoly [57].	35
<b>Obrázek 15.</b> Navrhovaný mechanismus oxidace PPD na BB [60].	35
<b>Obrázek 16.</b> Proteinová struktura křenové peroxidázy a její hemové aktivní místo, včetně katalytického cyklu [64].	36
<b>Obrázek 17.</b> Mechanismus oxidace PPD katalyzované pomocí HRP [66].	37
<b>Obrázek 18.</b> Proteinová struktura TYR a její aktivní místo, včetně zjednodušeného katalytického cyklu [64].	38
<b>Obrázek 19.</b> Mechanismus katalytické aktivity TYR [72].	39
<b>Obrázek 20.</b> Proteinová struktura hexamerní formy PHS a její aktivní místo, kde zelené kuličky představují atomy $\text{Cu}^{2+}$ kofaktoru obklopeného molekulami histidinu [77].	40
<b>Obrázek 21.</b> Mechanismus A vzniku 2-aminofenoxazinonu [74].	41
<b>Obrázek 22.</b> Mechanismus B vzniku 2-aminofenoxazinonu [74].	41
<b>Obrázek 23.</b> Mechanismus C vzniku 2-aminofenoxazinonu [74].	42

<b>Obrázek 24.</b> Mechanismus D vzniku 2-aminofenoxazinonu [74].....	42
<b>Obrázek 25.</b> Saturační křivka, linearizace saturační křivky dle Lineweaver-Burkovy metody a Eadie-Hofstee [82].....	44
<b>Obrázek 26.</b> Příklad superponovaných UV-Vis absorpčních spekter 3,5-di-terc-butylkatecholu (3,5-DTBC) během jeho oxidace a saturačních kinetických křivek produktu této oxidace, 3,5-di-terc-butyl-o-benzochinonu (3,5-DTBQ). Reakce byla katalyzována binukleárním komplexem mědi ( $\text{Cu}^{2+}$ ) [85].....	45
<b>Obrázek 27.</b> Měřicí přístroj Shimadzu UV-2450 UV-Vis Spektrofotometr a FTIR spektrometr iS50 Nicolet (vpravo). ....	46
<b>Obrázek 28.</b> Schéma syntézy APX.....	48
<b>Obrázek 29.</b> $^1\text{H}$ NMR spektrum APX, kde (DMSO- $d_6$ ): $\delta = 7,71$ (dd; $J = 1,4$ Hz, $7,8$ Hz; 1H); $7,51$ (dd; $J = 1,4$ Hz, $8,2$ Hz; 1H); $7,47$ (td; $J = 1,5$ Hz, $7,2$ Hz; 1H); $7,40$ (m; 1H); $6,83$ (brs, 2H); $6,37$ (s, 1H); $6,36$ (s, 1H) ppm. ....	48
<b>Obrázek 30.</b> UV-VIS absorpční spektra $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ OPD v AcKB (pH 4,5) a v prostředí pufru PB (pH 6,5) během analýzy stability OPD.....	51
<b>Obrázek 31.</b> UV-VIS absorpční spektra $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ PPD v AcKB (pH 4,5) a v prostředí PB (pH 6,5) pro analýzu stability PPD.....	52
<b>Obrázek 32.</b> UV-VIS absorpční spektra $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ OAP v AcKB (pH 4,5) a v prostředí PB (pH 6,5) pro analýzu stability OAP.....	52
<b>Obrázek 33.</b> UV-VIS absorpční spektra pro $500 \mu\text{mol l}^{-1}$ OPD, PPD a OAP v PB (pH 6,5) v přítomnosti $0,0067 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ TYR (20 U). ....	53
<b>Obrázek 34.</b> Barevná změna roztoků substrátů před a po katalyzované oxidaci tyrosinázou. ....	54
<b>Obrázek 35.</b> Záznam UV-VIS spekter obdržených pro $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ OPD, PPD a OAP v AcKB (pH 4,5) v přítomnosti $0,1333 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ Lac (20 U).....	54
<b>Obrázek 36.</b> Barevná změna roztoků substrátů před a po katalyzované oxidaci lakázou. ....	55
<b>Obrázek 37.</b> Záznam UV-VIS absorpčních spekter pro $500 \mu\text{mol l}^{-1}$ OPD, PPD a OAP v PB (pH 6,5) v přítomnosti $0,0013 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ enzymu HRP (0,6 U). ....	55
<b>Obrázek 38.</b> Barevná změna roztoků substrátů před a po katalyzované oxidaci křenovou peroxidázou. ....	56
<b>Obrázek 39.</b> UV-VIS absorpční spektra kalibračních koncentrací APX v AcKB (pH 4,5) a PB (pH 6,5) a odpovídající kalibrační přímky. ....	57
<b>Obrázek 40.</b> UV-VIS absorpční spektra kalibračních koncentrací DAP v pufru AcKB (pH 4,5) a v pufru PB (pH 6,5) a odpovídající kalibrační přímky. ....	57
<b>Obrázek 41.</b> Naměřené IČ transmitanční spektrum pro PPD a BB.....	58

<b>Obrázek 42.</b> Zreagovaný roztok PPD před vytřepáním do diethyletheru a úpravou pH, po vytřepání a úpravě pH a izolovaná organická fáze pro analýzu.....	59
<b>Obrázek 43.</b> Kinetické křivky oxidace 16,67 (oranžová), 50 (fialová), 100 (hnědá), 200 (světle modrá), 300 (purpurová), 500 (červená), 1000 (tmavě modrá) a 1500 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ OAP (zelená) v PB katalyzované pomocí 0,0067 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ TYR (20 U) snímané při $\lambda_{\text{max}}$ (APX) = 434 nm po dobu 30 min. ....	60
<b>Obrázek 44.</b> Kinetické křivky oxidace 16,67 (oranžová), 50 (fialová), 100 (hnědá), 200 (světle modrá), 300 (purpurová), 500 (červená), 1000 (tmavě modrá) a 1500 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ OPD (zelená) v AcKB katalyzované pomocí 0,1333 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ Lac (20 U) snímané při $\lambda_{\text{max}}$ (DAP) = 446 nm po dobu 30 min. ....	61
<b>Obrázek 45.</b> Kinetické křivky oxidace 16,67 (oranžová), 50 (fialová), 100 (hnědá), 200 (světle modrá), 300 (purpurová), 500 (červená), 1000 (tmavě modrá) a 1500 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ OAP (zelená) v AcKB katalyzované pomocí 0,1333 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ Lac (20 U) snímané při $\lambda_{\text{max}}$ (APX) = 440 nm po dobu 30 min. ....	61
<b>Obrázek 46.</b> Kinetické křivky oxidace 16,67 (oranžová), 50 (fialová), 100 (hnědá), 200 (světle modrá), 300 (purpurová), 500 (červená), 1000 (tmavě modrá) a 1500 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ OPD (zelená) v PB katalyzované pomocí 0,0013 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ HRP (0,6 U) snímané při $\lambda_{\text{max}}$ (DAP) = 421 nm po dobu 30 min. ....	62
<b>Obrázek 47.</b> Kinetické křivky oxidace 16,67 (oranžová), 50 (fialová), 100 (hnědá), 200 (světle modrá), 300 (purpurová), 500 (červená), 1000 (tmavě modrá) a 1500 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ OAP (zelená) v PB katalyzované pomocí 0,0013 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ HRP (0,6 U) snímané při $\lambda_{\text{max}}$ (APX) = 434 nm po dobu 30 min. ....	63
<b>Obrázek 48.</b> Saturační křivka TYR pro OAP a její linearizace dle Linweaver-Burkovy metody. ....	64
<b>Obrázek 49.</b> Saturační křivka Lac pro OPD a její linearizace dle Linweaver-Burkovy metody. ....	65
<b>Obrázek 50.</b> Saturační křivka Lac pro OAP a její linearizace dle Linweaver-Burkovy metody. ....	66
<b>Obrázek 51.</b> Saturační křivka HRP pro OPD a její linearizace dle Linweaver Burkovy metody. ....	67
<b>Obrázek 52.</b> Saturační křivka HRP pro OAP a její linearizace dle Linweaver Burkovy metody. ....	68

<b>Tabulka 1.</b> Soudobá klasifikace barev na vlasy a jejich složení [11].	18
<b>Tabulka 2.</b> Seznam prokázaných tox. účinků vybraných sloučenin barev na vlasy [13].	24
<b>Tabulka 3.</b> Validace kalibračních závislostí pro vzniklé produkty.	56
<b>Tabulka 4.</b> Stanovené parametry enzymové kinetiky TYR pro substrát OAP.	68
<b>Tabulka 5.</b> Stanovené parametry enzymové kinetiky Lac pro substráty OPD a OAP.	69
<b>Tabulka 6.</b> Stanovené parametry enzymové kinetiky HRP pro substráty OPD a OAP.	69

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

3,5-DTBC	3,5-di- <i>terc</i> -butylkatechol
3,5-DTBQ	3,5-di- <i>terc</i> -butyl- <i>o</i> -benzochinon
AOP	pokročilé oxidační procesy (anglicky <i>Advanced Oxidation Processes</i> )
APX	2-aminofenoxazin-3-on (tj. <i>Questiomycin A</i> )
BA	bulbus arteriosus, česky tepenná cibulka, je anatomická struktura, která se vyskytuje v oběhovém systému některých ryb a obojživelníků
BB	Bandrowského báze (polymerní trimer vzniklý oxidací PPD)
DAP	2,3-diaminofenazin
DAPPD	<i>N,N</i> -diacetyl- <i>p</i> -fenylendiamin
DMSO	dimetylsulfoxid
E	enzym
EM	elektromagnetický (anglicky <i>Electromagnetic</i> )
ES	komplex enzym-substrát
FTIR	infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací (anglicky <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> )
HRP	křenová peroxidáza (enzym, z anglického <i>Horseradish Peroxidase</i> )
CHSK	chemická spotřeba kyslíku
IČ	infračervený
Lac	lakáza (enzym, z anglického <i>Laccase</i> )
LC <sub>50</sub>	koncentrace látky, která způsobí smrt u 50 % testovaných organismů (anglicky <i>Lethal Concentration</i> )
MAPPD	<i>N</i> -monoacetyl- <i>p</i> -fenylendiamin
NMR	nukleární magnetická rezonance
OAP	<i>o</i> -aminofenol
OPD	<i>o</i> -fenylendiamin
P	produkt
PHS	fenoxazinon syntáza (enzym, z anglického <i>Phenoxazinone synthase</i> )
PPD	<i>p</i> -fenylendiamin
S	substrát
SV	sinus venosus, česky žilní zátoka, je anatomická struktura, která se vyskytuje v oběhovém systému některých ryb a obojživelníků

TOC	celkový organický uhlík (parametr udávající množství organických látek přítomných ve vodě, z anglického <i>Total Organic Carbon</i> )
TYR	tyrosináza (enzym, anglicky <i>Tyrosinase</i> )
UV	ultrafialová oblast elektromagnetického záření (anglicky <i>Ultra Violet</i> )
VIS	viditelná oblast elektromagnetického záření (anglicky <i>Visible Spectrum</i> )
ŽP	životní prostředí

## ÚVOD

Barvení vlasů lze dnes považovat za nedílnou součást moderní kosmetiky a jeho obliba mezi spotřebiteli každoročně roste. Ačkoli se jedná o velmi běžnou praxi, jen málo uživatelů si uvědomuje, jaké chemické látky se při barvení vlasů používají a jaký dopad mohou mít nejen na lidské zdraví, ale také na životní prostředí. Permanentní barvy na vlasy obsahují řadu chemických sloučenin, z nichž mnohé jsou známé svým toxickým, alergickým nebo dokonce karcinogenním účinkem. Tyto látky se navíc běžně dostávají do odpadních vod, kde mohou významně narušovat vodní ekosystémy. Současné čistírny odpadních vod však nejsou schopné tyto kontaminanty zcela účinně odstranit, což zvyšuje potřebu hledání nových, ekologicky šetrných metod jejich degradace.

Jednou z možností, jak snížit přítomnost toxických složek barev na vlasy v životním prostředí, je využití enzymů schopných tyto látky selektivně oxidovat. Enzymatická degradace se zdá být účinným a současně šetrným nástrojem, který může doplnit klasické čistírenské technologie. Výzkum v této oblasti se zdá být stále nedostatečný, a především v kontextu reálných matric, jako jsou směsné odpadní vody z kosmetického průmyslu, se musí ověřit praktická využitelnost tohoto přístupu.

Z výše uvedených důvodů se tato diplomová práce v teoretické části zaměřuje na složení a toxicitu permanentních barev na vlasy, dále pak na stávající i moderní možnosti jejich odstranění z odpadních vod, přičemž zvláštní pozornost je věnována enzymatické degradaci vybraných složek vlasových barev. Experimentální část zahrnuje stanovení katalytické aktivity vybraných enzymů, konkrétně tyrosinázy, lakázy a křenové peroxidázy, při oxidaci vybraných polutantů životního prostředí z permanentních barev na vlasy. Cílem bylo zhodnotit jejich účinnost pomocí kinetických parametrů, identifikovat jejich oxidační produkty, porovnat toxicitu výchozích látek a odpovídajících produktů a vyhodnotit potenciál těchto enzymů při odstraňování cílových polutantů z vodního ekosystému. Získané výsledky poukazují na skutečnost, že není možné studované enzymy univerzálně využívat pro čištění odpadních vod z důvodu rozdílných požadavků na katalytické podmínky. Navíc vzniklé oxidační produkty představují v mnoha případech větší zátěž pro životní prostředí nežli původní látky

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Barvy na vlasy

Barvami na vlasy se rozumí kosmetické přípravky používané k barvení vlasů, které mohou být dočasné nebo trvalé, a klasifikují se podle doby trvání a typu účinných látek, jenž se na barvení podílejí. Důvodem jejich obliby jsou zejména estetické důvody, zakrývání šedin a módní trendy [1]. Kromě toho, že jak samotné složky barev na vlasy, tak i finální produkty procesu barvení mohou představovat zdravotní riziko, se tyto látky běžně dostávají do odpadních vod. Tam tvoří tento koktejl chemikálií novou skupinu polutantů životního prostředí (ŽP), se kterou se bude muset „zeleně orientovaná“ evropská společnost dříve nebo později vypořádat.

### 1.1.1 Stručná historie používání barev na vlasy

Lidstvo má s barvením vlasů bohaté zkušenosti již od dob starověku. V průběhu historie lidstva se metody a motivace pro změnu barvy vlasů různě proměňovaly, a to především pod vlivem kulturního, společenského a technologického vývoje. Nejstarší známé záznamy o úpravě vlasů pocházejí ze starověkého Egypta. Ebersův papyrus, považovaný za jeden z nejstarších medicínských spisů (~1552 př. n. l.), zmiňuje prostředky, pomocí kterých se dalo zabránit šedivění a vypadávání vlasů [2–4]. Papyrus uvádí například následující postup (Obr. 1), který čtenáře nabádá k následujícímu: „*Chceš-li šedin se zbaviti, tuk hada černého a červy hnojné v oleji svař a na hlavu svou je opakovaně vpravuj* [4].“



**Obrázek 1.** Návod na odstranění šedin dle Ebersova papyru [4].

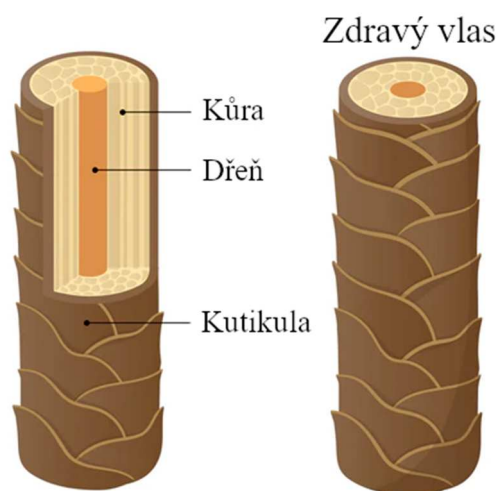
Ve středověku bylo barvení vlasů hluboce spjato s humorální teorií<sup>1</sup> a bylo předmětem velkého zájmu a studia. Věřilo se, že vlastnosti vlasů jedince souvisejí s množstvím zastoupením jednotlivých tělních tekutin. Různé rady a recepty na barvení vlasů se tak široce rozšířily, což odráží kulturní a lékařský význam péče o vlasy v tomto období [5]. K nejvýznamnějšímu pokroku v oblasti barvení vlasů však došlo až v průběhu 19. a 20. století,

<sup>1</sup> Hippokratova humoralní teorie věřila, že tělo člověka je dáno pomocí těchto 4 tělních tekutin: saquis (krev), cholé (žlč), mlacholé (černá žlč) a flagma (sliz).

což úzce souviselo s pokrokem v oblasti chemie a dermatologie. V tomto období již byly provedeny první transplantace vlasových folikulů. Díky hlubšímu porozumění struktury vlasů a vývoji syntetických barviv prošel tento obor lidského zájmu zásadní proměnou, která vedla k jeho širší dostupnosti a rozmanitějším možnostem využití [3, 6].

### 1.1.2 Struktura lidského vlasu

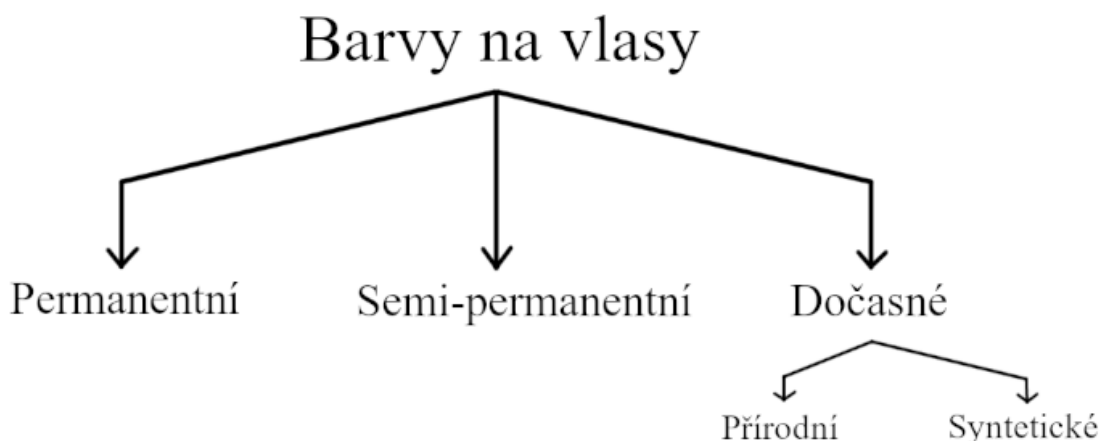
Pro pochopení chemických procesů, které zodpovídají za obarvení vlasů, je nejprve nutné pochopit strukturu vlasů. Vlasový stonek se skládá ze třech vrstev (Obr. 2). Vnitřní vrstva se nazývá dřeň, druhou vrstvu představuje kůra (kortex) a svrchní vrstva se označuje jako kutikula. Pigmenty zodpovědné za přirozenou barvu vlasů se nacházejí v kůře a ve dřeni. Z chemického hlediska obsahují lidské vlasy přibližně 85 % bílkovin, 7 % vody, 3 % lipidů, 4,7 % síry vázané na bílkoviny přes cysteinové můstky a nízké koncentrace některých minerálních látek, jako jsou zinek, měď, železo a selen [7]. Ve vlasech se nacházejí dva druhy pigmentu melaninu. Eumelanin, který zodpovídá za odstíny vlasů od černé po hnědou, a feomelanin, jenž přispívá k zrzavým odstínům vlasů. Jejich poměrové zastoupení ve vlasech určuje finální barvu. Absence melaninu vede k šedým nebo bílým vlasům [7, 9].



**Obrázek 2.** Struktura zdravého lidského vlasu [8].

### 1.1.3 Klasifikace barev na vlasy

Barvy na vlasy lze dělit podle různých kritérií. Nejčastěji se však lze setkat s dělením podle schopnosti retence barvy (Obr. 3), tedy podle toho, jak dlouho barva na vlasech vydrží. Toto dělení rozlišuje barvy permanentní, semi-permanentní a dočasné. Dočasné barvy na vlasy lze pak ještě dělit podle původu barvicí složky na přírodní a syntetické [9, 10]. Přehled jednotlivých tříd barev na vlasy, včetně jejich složení a uplatňovaných mechanismů barvení je uveden v Tab. 1.



**Obrázek 3.** Diagram rozdělení barev na vlasy.

Dočasné barvy na vlasy jsou neoxidační barvy, které pokrývají pouze povrch vlasů (kutikulu) a snadno se vymývají již po prvním umytí běžným šamponem na vlasy. Tyto barvy nepronikají do vlasové kůry a používají se jen ke krátkodobým změnám barvy vlasů. Dočasné barvy mohou být jak přírodního (např. henna nebo indigo), tak i syntetického původu. Zpravidla se jedná o velké aromatické molekuly kyselé povahy nesoucí označení podle své barvy, např. Acid Yellow 23, Acid Red 33, Acid Blue 9 apod., přičemž jde o nejméně drastickou metodu barvení vlasů [9, 10].

**Tabulka 1.** Soudobá klasifikace barev na vlasy a jejich složení [11].

Kategorie barev	Oxidace	Složení	Mechanismus barvení
Dočasné	Ne	Ve vodě rozpustná kyselá, nebo zásaditá barviva obsahující azo nebo antrachinonovou skupinu.	Navrstvení barevných molekul na povrch vlasu.
Semi-permanentní	Ne	Azokupiny, antrachinony, trifenylmetany a nitroderiváty jako chromofory.	Iontové interakce a Van der Waalsovy síly drží molekuly barviva.
Permanentní	Ano	Oxidační činidlo v alkalickém médiu, prekurzory a spojovací látky, tzv. kaplery.	Penetrace barviva hluboko do vlasové kůry.

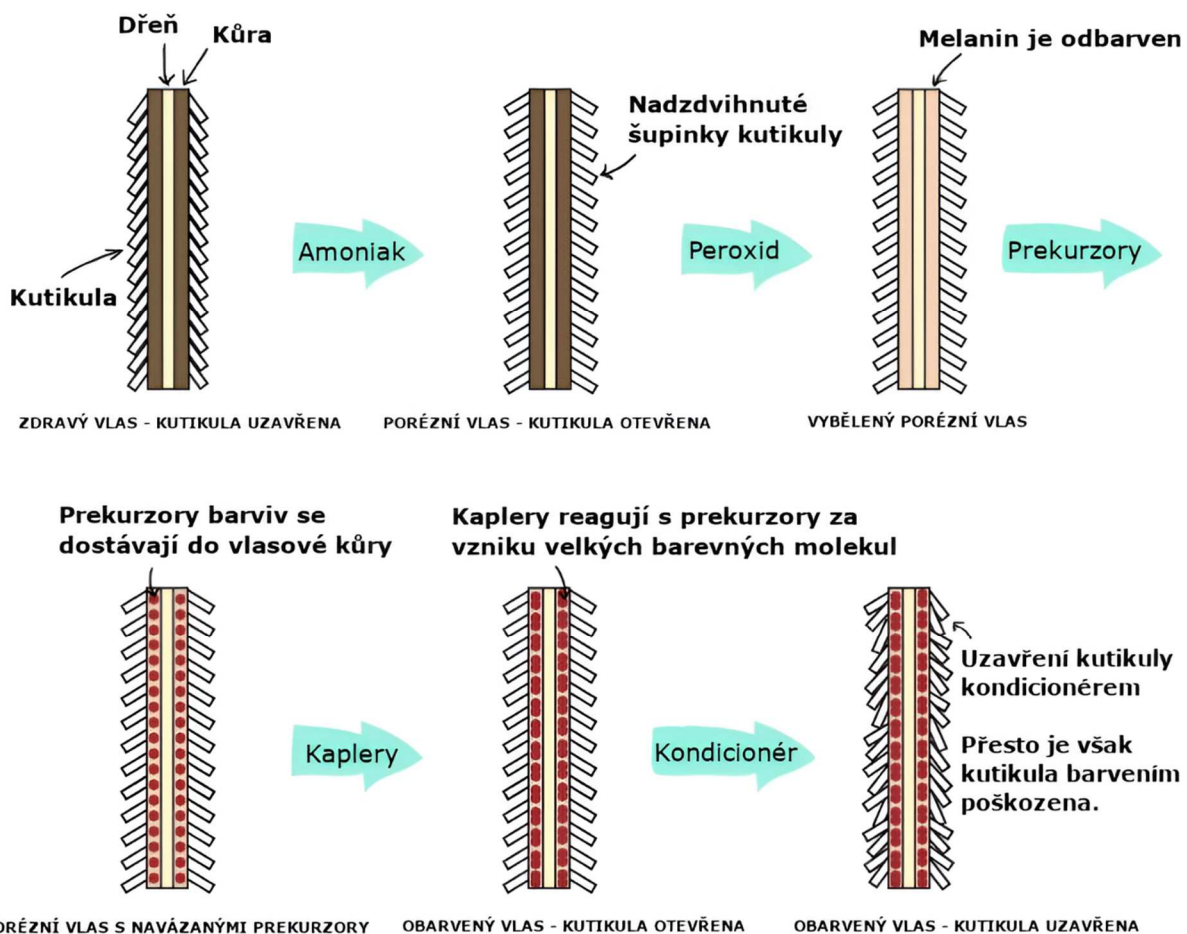
Semi-permanentní barvy na vlasy již mírně pronikají přes kutikulu do vlasové kůry a vydrží přibližně šest umytí šamponem. Většina barevných molekul je však uchycena na povrchu vlasového stvolu. Nevyžadují vyvíječe v podobě oxidačních činidel a jsou vyrobeny z předem připravených barevných molekul. Rozsah poškození kutikuly bývá obvykle menší než u barev permanentních, nicméně svým působením převyšuje barvy dočasné [9–11].

Permanentní oxidační barvy pronikají hluboko pod kutikulu do vlasové kůry. Permanentní barvení vyžaduje alkalické prostředí a oxidační činidlo. Podrobnému mechanismu tohoto typu barvení se detailněji věnuje následující podkapitola. Jedná se o nejvíce využívaný způsob barvení vlasů, avšak dochází při něm k nenávratnému poškození vlasů [9–12].

#### **1.1.4 Princip barvení vlasů permanentními barvami**

Permanentní oxidační barvy na vlasy se skládají ze tří hlavních složek: oxidačního činidla v alkalickém médiu, prekurzorových sloučenin a spojovacích látek, tzv. kaplerů [9, 11, 13, 14]. Alkalické médium ( $\text{pH} \approx 10$ ) otevře vlasovou kutikulu a umožní barvě proniknout hluboko do kůry vlasu. Oxidační činidlo proniká do vlasové kůry a oxiduje zde přítomný melanin, čímž se vlasy odbarví. Tento krok umožní finální barvě vlasů lépe vyniknout. Prekurzorové sloučeniny se následně oxidují oxidačním činidlem, a poté se spojují s kaplery za vzniku velkých barevných molekul přímo uvnitř vlasového stvolu (tento proces se v anglické odborné literatuře označuje jako „coupling“). Za výsledek celého permanentního barvení se pak považuje trvalá změna barvy vlasů, která odolává okolním vlivům prostředí, tak i opakovanému umývání šampóny. Tato stabilita spočívá v nemožnosti uvolnění velkých molekul barviva (polymeru) přes kutikulu [9, 11, 13–15].

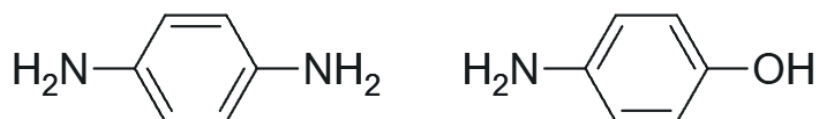
Některé přípravky na barvení vlasů obsahují rovněž kondicionér, který se aplikuje po barvení. Ten má za úkol uzavřít kutikulu a minimalizovat tak následky poškození vlasu, ke kterému při barvení permanentními oxidačními barvami dochází. Kondicionéry se skládají ze silikonů (dimetikon, polydimetylsiloxan aj.), povrchově aktivních kationtových látek (např. cetrimonium chlorid) a z hydrolyzovaného keratinu [7, 11, 14]. Schéma celého mechanismu ilustruje Obr. 4.



**Obrázek 4.** Ilustrace mechanismu barvení vlasového stvolu permanentními barvami [14].

### 1.1.5 Složení permanentních barev na vlasy

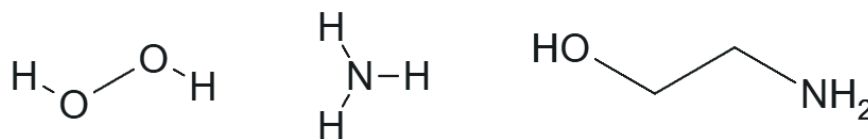
Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, permanentní oxidační barvy na vlasy musí obsahovat tři základní složky, a to oxidační činidlo v alkalickém médiu, molekuly prekurzorů a molekuly kaplerů. Za prekurzory se nejčastěji uplatňují *p*-diaminy nebo *p*-aminofenoly. Mezi typický zástupce *p*-diaminů se řadí *p*-fenylendiamin (PPD). Z *p*-aminofenolů se nejvíce uplatňuje *p*-aminofenol [12, 16]. Strukturální vzorce obou molekul znázorňuje Obr. 5.



**Obrázek 5.** Molekula *p*-fenylendiaminu (vlevo) a *p*-aminofenolu (vpravo).

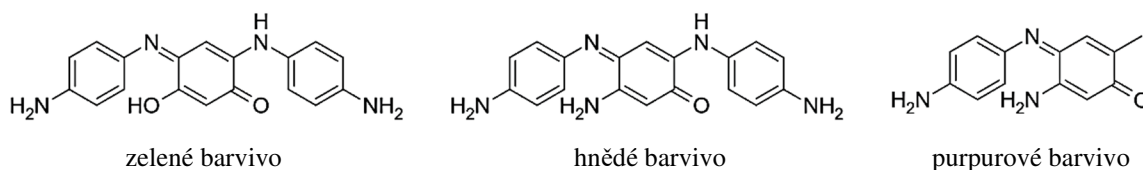
Jako alkalické médium se nejčastěji používá amoniak nebo etanolamin, přičemž amoniak se považuje za mnohem účinnější reakční prostředí, avšak více poškozuje vlasy. Zásadité prostředí není zapotřebí pouze k otevření kutikuly, ale také pro následné barvotvorné reakce. Jako oxidační činidlo zodpovědné za oxidaci prekurzorů a odbarvení přirozené barvy

vlasů se nejčastěji využívá peroxid vodíku [12, 16]. Obr. 6 prezentuje strukturální vzorce zmiňovaných látek.



**Obrázek 6.** Molekula peroxidu vodíku (vlevo), amoniaku (uprostřed) a etanolaminu (vpravo).

Kaplery reagují v prostředí oxidačního činidla v alkalickém médiu s prekurzory uvnitř vlasové kůry za vzniku konečných molekul barviv. Konečná barviva představují vysoce konjugované aromatické systémy, které velmi dobře absorbují ultrafialovou (UV) a viditelnou (VIS) složku elektromagnetického (EM) záření. Typické molekulární struktury barviv demonstruje Obr. 7. Každý kapler poskytuje po reakci s molekulou prekurzoru jinou barvu (Obr. 8). Většina permanentních barev obsahuje však více než jeden druh kapleru, proto je možné vytvořit širokou škálu barev na vlasy [12, 16].



**Obrázek 7.** Struktury finálních barviv po reakci prekurzoru PPD s kaplery: resorcinolem (vlevo), *m*-aminofenolem (uprostřed) a 2-metyl-5-aminofenolem (vpravo).

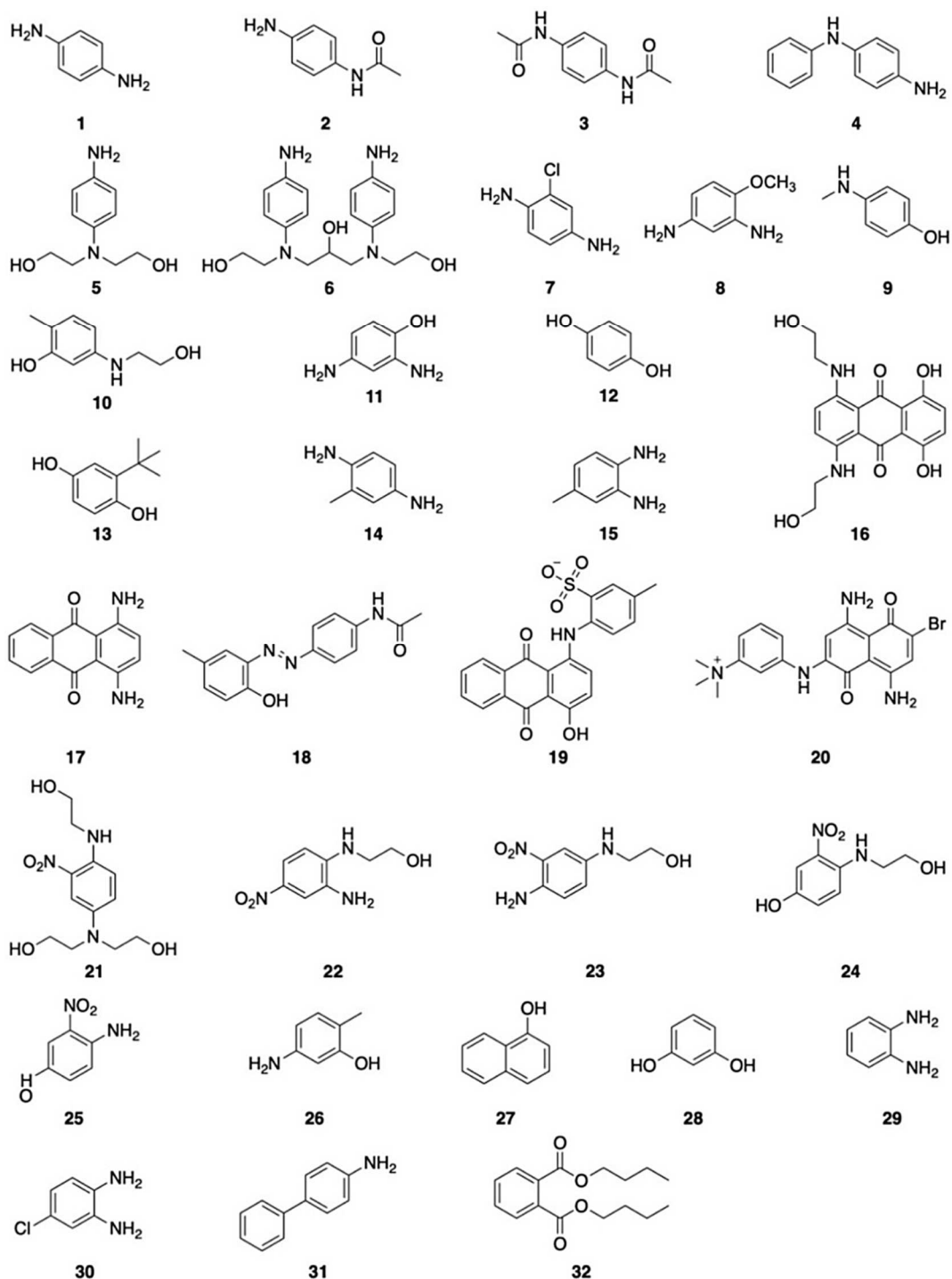


**Obrázek 8.** Přehled jednotlivých molekul kaplerů a barev, jaké dávají po reakci s prekurzorem PPD [16].

### 1.1.6 Toxicita barev na vlasy

Z důvodu rostoucího počtu uživatelů představuje barvení vlasů potenciální problém pro zdraví nejen samotných uživatelů, ale také pro veřejné zdraví a životní prostředí (ŽP). Při barvení se totiž běžně stává, že se sloučeniny barev na vlasy dostávají do odpadních vod. Soudobé toxikologické studie provedené na vodních organismech jako je *Artemia salina*, *Daphnia similis* nebo *Danio rerio* prokázaly toxicitu pro přítok odpadní vody z kosmetického salonu, kde probíhalo barvení vlasů na *A. salina* (LC<sub>50</sub> 3,87%), *D. similis* (EC<sub>50</sub> 0,54%) a *D. rerio* (LC<sub>50</sub> 7,33–8,18%). Z těchto výsledků vyplývá, že barvy na vlasy mají i při nízkých koncentracích vysokou toxicitu pro vodní biotop [17].

V odpadních vodách představují riziko zejména rezidua samotných barev na vlasy a jejich vedlejší produkty vznikající při barvení. Po chemické stránce jsou to různé hydroxylované, chlorované a nitrované deriváty fenyldiaminů, variabilně substituované aminofenoly a dihydroxybenzeny. Přehled některých polutantů pocházející z procesu barvení zobrazuje Obr. 9. Riziko mohou představovat také sloučeniny vznikající při degradaci těchto látek v ŽP [18]. Vzhledem k široké škále a různorodosti těchto chemických sloučenin se výsledky studií zaměřených na jejich toxicitu, ale také karcinogenitu v odborné literatuře často liší a nejsou jednoznačné [13]. Tab. 2 obsahuje výčet toxických účinků některých těchto sloučenin. Tato diplomová práce má za cíl svojí experimentální částí přispět k současnému výzkumu sledováním možností enzymatické degradace vybraných složek permanentních barev na vlasy.



**Obrázek 9.** Chemické struktury některých složek barev na vlasy: *p*-fenylendiamin **1**, *N*-monoacetyl-*p*-fenylendiamin **2**, *N,N*-diacetyl-*p*-fenylendiamin **3**, *N*-fenyl-*p*-fenylendiamin **4**, *N,N*-bis(hydroxyetyl)-*p*-fenylendiamin **5**, hydroxypropyl bis(*N*-hydroxyetyl-*p*-fenylendiamin) **6**, 2-chloro-*p*-fenylendiamin **7**, 4-metoxo-*m*-fenylendiamin **8**, *p*-metylaminofenol **9**, 2-metyl-5-hydroxyetylaminofenol **10**, 2,4-diaminofenol **11**, hydrochinon **12**, terc-butyl hydrochinon **13**, toluen-2,5-diamin **14**, toluen-3,4-diamin **15**, disperzní modř **7** **16**, disperzní violeť **1** **17**, disperzní žluť **3** **18**, kyselá violeť **43** **19**, bazická modř **99** **20**, HC modř **2** **21**, HC žluť č. 5 **22**, HC červeň **7** **23**, 3-nitro-*p*-hydroxyetylaminofenol **24**, 4-amino-3-nitrofenol **25**, 4-amino-2-hydroxytoluen **26**, 1-naftol **27**, resorcinol **28**, *o*-fenylendiamin **29**, 4-chloro-*o*-fenylendiamin **30**, 4-aminobifenylyl **31** a di-*n*-butyl ftalát **32** [13].

**Tabulka 2.** Seznam prokázaných toxických účinků vybraných sloučenin barev na vlasy [13].

<b>Sloučenina</b>	<b>Toxický účinek</b>	<b>Karcinogenita</b>
4	Pokles tělesné hmotnosti, degenerace semenotvorných kanálek, malformace kostry a podráždění kůže.	Neprokázána
5	Pokles tělesné hmotnosti, ztmavnutí štítné žlázy, snížený obsah železa v krevním séru a pozdní přecitlivělost	Neprokázána
6	Pokles tělesné hmotnosti, reprodukční a vývojová toxicita.	Neprokázána
7	Podráždění kůže, pokles tělesné hmotnosti a podráždění očí.	Neprokázána
8	Podráždění kůže a mutagenita.	Prokázána na zvířatech
9	Zvýšená produkce methemoglobinu a podráždění kůže.	Neprokázána
10	Podráždění kůže, mutagenita a alergická kontaktní dermatitida.	Neprokázána
11	Podráždění kůže, závažné podráždění očí a mutagenita.	Neprokázána
12	Nefrotoxicita, cytotoxicita, podráždění kůže, přecitlivělost kůže, depigmentace kůže a mutagenita.	Prokázána na zvířatech
13	Pokles tělesné hmotnosti a mutagenita.	Neprokázána
14	Podráždění kůže, přecitlivělost kůže, podráždění očí, reprodukční toxicita a malformace kostry.	Neprokázána
15	Léze na dvanáctníku, genotoxicita a přecitlivělost kůže.	Neprokázána
16	Mutagenita.	Neprokázána
17	Podráždění očí.	Neprokázána
18	Nefrotoxicita, chromozomální mutace a alergická kontaktní dermatitida.	Prokázána na zvířatech
19	Nebyl prokázán žádný významný toxický účinek.	Neprokázána
20	Podráždění kůže.	Neprokázána
21	Mutagenita.	Neprokázána
22	Podráždění kůže.	Neprokázána
23	Přecitlivělost kůže a mutagenita.	Neprokázána

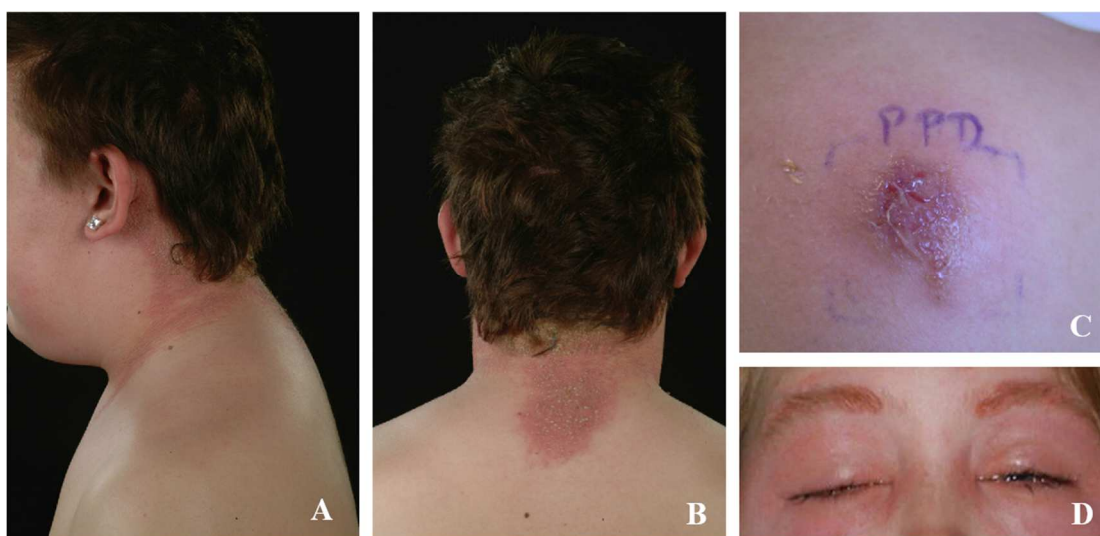
Poznámka: Strukturální vzorce a názvy uvedených sloučenin korespondují s číselným označením na Obr. 9

### 1.1.6.1 Akutní toxicita barev na vlasy

Permanentní barvy na vlasy obsahují několik chemických složek, které mohou vyvolat akutní toxické reakce. Mezi hlavní problematické látky patří toluen-2,5-diamin, resorcinol, hydrochinon a PPD [13, 19]. Akutní toxicita se spojuje zejména s PPD, který se vyskytuje téměř ve všech permanentních barvách na vlasy jako prekurzor. Za zmínku stojí, že PPD se vyskytuje také v černé henně. Největší riziko představuje pro osobu, jejíž vlasy jsou barveny, ale také pro samotné kadeřníky, neboť ti přicházejí do kontaktu s barvami na vlasy opakovaně a často. Používání rukavic značně limituje kontakt s agens způsobující akutní toxické účinky [20, 21].

Za nejčastější zdravotní problémem se považuje alergická kontaktní dermatitida, projevující se svěděním, zarudnutím, otoky a někdy i puchýři. Nebezpečí PPD se skrývá v jeho schopnosti snadno pronikat kůží a sliznicemi, což může u některých jedinců vyvolat jak lokální, tak systémové alergické reakce. U citlivých jedinců může dojít k silnému podráždění obličeje, očních víček nebo krku [21, 22]. Fotografie následků takových reakcí jsou prezentovány na Obr. 10.

Další významné riziko představují chemické popáleniny, které mohou vzniknout v důsledku působení amoniaku a peroxidu vodíku. Tyto látky poškozují kožní bariéru, zejména při opakované expozici stejného místa [23]. Navíc PPD samotné vyvolává apoptózu buněk tím, že zvyšuje množství reaktivních forem kyslíku při kontaktu s kůží [24]. Aby se těmto reakcím předešlo, tak se doporučuje provést test citlivosti před použitím barvy, tzv. patch test. Provádí se aplikací malého množství barvy za ucho nebo na záda. Následně se monitoruje reakce kůže [21], jak demonstruje fotografie v pravém horním rohu na Obr. 10.



**Obrázek 10.** Alergická reakce na PPD po barvení vlasů (fotografie A, B a D) a pozitivní reakce na patch test (fotografie C) [21, 22].

### ***1.1.6.2 Chronická toxicita barev na vlasy***

Dlouhodobé používání vlasových barev představuje potenciální riziko chronické toxicity, především v souvislosti s látkami již zmíněnými v předchozí kapitole (PPD, resorcinol, toluen-2,5-diamin a hydrochinon). Tyto látky mohou penetrovat kůži a jejich metabolity byly detekovány v moči i krevním séru uživatelů [19]. Jedním z nejdiskutovanějších rizik v současnosti je karcinogenita. Studie naznačují možnou souvislost mezi pravidelným používáním permanentních barev na vlasy a zvýšeným výskytem rakoviny močového měchýře, non-Hodgkinova lymfomu a leukémie [19]. Avšak epidemiologické studie doposud nedokázaly jasně prokázat toto riziko [20].

Genotoxické účinky se již testovaly v bakteriálním Amesově testu a dalších in vitro metodách, přičemž některé složky vykázaly mutagenní potenciál. Nicméně, výsledky in vivo studií na zvířatech neprokázaly jednoznačnou souvislost mezi užíváním některých testovaných barvicích formulací a vznikem karcinomů [25]. Dále stojí za zmínku uvést, že některé složky, jako jsou deriváty toluenediaminu, mohou ovlivnit endokrinní systém. Výsledky laboratorních studií na zvířatech naznačují možné riziko pro reprodukční orgány při jejich dlouhodobé expozici [13].

### ***1.1.6.3 Environmentální toxicita barev na vlasy***

Nejnovější studie poukazují na skutečnost, že složky permanentních barev na vlasy mohou významně kontaminovat životního prostředí, zejména vodní ekosystémy, do kterých se dostávají z odpadních vod. Jelikož se tyto látky špatně biologicky odbourávají, tak s sebou nesou jisté toxikologické riziko [17, 26], a to především z hlediska jejich potenciální perzistence. Tato skutečnost rovněž stála za vznikem této diplomové práce, která se snaží zjistit, zda běžně se vyskytující enzymy mohou katalyzovat oxidační přeměnu těchto látek na méně toxičtější produkty.

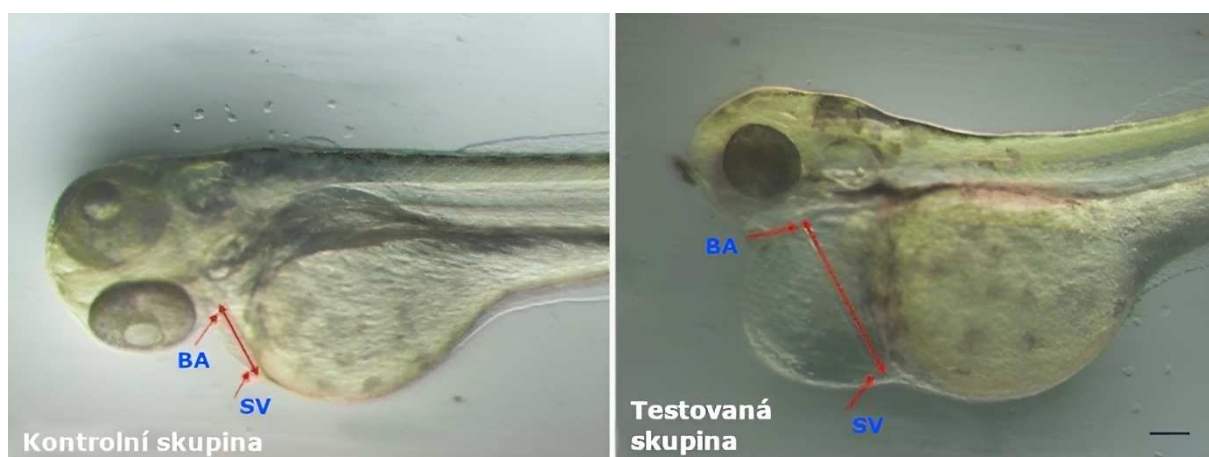
Pro vodní faunu a flóru se stávají toxické již nízké koncentrace některých látek (PPD, toluen-2,5-diaminu, resorcinolu a hydrochinonu) [13, 27]. PPD se navíc ve vodním ekosystému autooxiduje na ještě toxičtější sloučeniny, jako je Bandrowského báze (BB), která má výrazně vyšší mutagenní a karcinogenní potenciál [27]. Chemicky se jedná o polymerní trimer PPD. Tato sloučenina se vlivem silného oxidačního prostředí snadno tvoří také již během samotného procesu barvení vlasů. Při barvení dochází k jejímu částečnému odmytí do kanalizace, zatímco zbylá část zůstává na obarvených vlasech [27, 28].

Toxické účinky vlasových barev se prokázaly u korýšů, ryb a obojživelníků, kde docházelo k narušení vývoje, zpomalení růstu a zvýšené mortalitě. Experimenty na embryích

*D. rerio* odhalily vývojové vady kardiovaskulárního systému těchto ryb. Toxikologická studie B. Manjuhatha a jeho kolegů [29] pozorovala vývoj embryí ryby *D. rerio*. Po jejich vystavení do roztoku přípravku na barvení vlasů „Herbul black henna“ o koncentraci  $600 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  po dobu 48 h se zjistilo abnormální zvětšení vzdálenosti mezi srdečními strukturami sinus venosus (SV) a bulbus arteriosus (BA), což mělo vážné důsledky pro kardiovaskulární funkci a přežití organismu, oproti kontrolní skupině v embryonálním médiu bez přípravku (Obr. 11). Přípravek mimo jiné obsahoval PPD a *p*-aminofenol [29].

Toxické účinky byly zaznamenány také u korýšů *D. similis* a *A. salina*. V laboratorních testech na bakteriích *Escherichia coli* a buňkách cibule (*Allium cepa*) byla prokázána genotoxicita a cytotoxicita, což představuje potenciální riziko pro širší ekosystém [30].

Dalším problémem je nízká efektivita při odstraňování těchto látek v čistírnách odpadních vod (ČOV), což vede k jejich dlouhodobé přítomnosti ve vodním biotopu a k následné bioakumulaci v potravních řetězcích [26]. Při barvení se jen nepatrné množství barvicích látek zachytí na vlasech, zatímco většina se vyplavuje do odpadních vod a následně kontaminuje vodní prostředí [17].



**Obrázek 11.** Embrya ryby *D. rerio* 48 hodin po oplodnění – zdravé embryo kontrolní skupiny (vlevo) a embryo *D. rerio* vystavené roztoku připraveného z barvy na vlasy „Herbul black henna“ o koncentraci  $600 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (vpravo) [29].

## 1.2 Současné možnosti odstranění složek barev na vlasy z odpadních vod

Klasické ČOV využívají k čištění odpadních vod kombinaci fyzikálních, chemických a biologických procesů. ČOV odstraňují z odpadních vod nežádoucí kontaminanty vyprodukované činností člověka, tak aby se mohla přečištěná voda znovu vrátit do životního prostředí. Celý proces zahrnuje několik na sebe navazujících operací, z nichž každá má za cíl snížit množství znečišťujících látek na přijatelnou úroveň. Účinnost ČOV při odstraňování složek barev na vlasy však není dostačující [31, 32].

### 1.2.1 Princip fungování konvenčních ČOV

Proces čištění odpadních vod lze rozdělit na tři základní fáze, a to na fázi primární, sekundární a terciární. Během primární fáze se pevné látky nechají usadit a z odpadní vody se mechanicky odstraní. Primární čištění odstraňuje z odpadní vody přibližně 60 % nerozpuštěných látek. Toto čištění zahrnuje také provzdušňování odpadní vody. V sekundární fázi se již k dalšímu čištění odpadních vod používají biodegradční procesy. Sekundární čištění odstraňuje více než 90 % zbylých nerozpuštěných látek, přičemž terciární fáze čištění má za úkol odstranit zbylé biologicky nerozložitelné znečišťující látky a případně dezinfekovat přečištěnou vodu před jejím vypuštěním. Během této poslední fáze dochází k nejefektivnějšímu odstraňování látek podobných těm, které jsou v barvách na vlasy. Ne všechny ČOV však terciární čištění uskutečňují. Všechny tyto procesy zahrnují množství dílčích kroků (Obr. 12.). Některé z nich mohou kombinovat principy čištění všech zmíněných fází. Vždy záleží na přístupu jednotlivých ČOV [31–34].



Obrázek 12. Modelové schéma ČOV [33].

Odpadní voda se do čistírny dostává přirozeným spádem, nicméně v případě nutnosti může být přečerpávána (krok 1 na Obr. 12). Před samotným čištěním se musí v česlovně<sup>2</sup> mechanicky odstranit hrubé nečistoty, zahrnující kameny, dřevo či jiné pevné materiály, které mohou poškodit zařízení (krok 2 na Obr. 12). Následně voda vstupuje do sedimentačních nádrží, kde se odděluje přirozený kal – organická část odpadní vody. Ten se následně odčerpává

<sup>2</sup> Úsík ČOV, kde dochází k filtraci v tlakých mřížkových čistotách tzv. česlovny, tedy kovové mřížky nebo košty tvořící soustavu svislých kovových tyčí, mezi kterými jsou prováděné mřížky.

a dále zpracovává ve vyhnívacích nádržích (krok 3 na Obr. 12). Lehčí nečistoty, jako tuky, oleje nebo plastové částice, vyplouvají na hladinu, kde se mechanicky odstraní. Těžší nečistoty dále sedimentují ke dnu, kde dochází k jejich filtraci přes písek nebo aktivní uhlí. Tento proces snižuje obsah nežádoucích bakterií, odstraňuje zákal, pachy a eliminuje zbylé nerozpuštěné částice (krok 4 na Obr. 12).

Poté následuje provzdušňování, kdy se do vody vhání vzduch, čímž se z ní uvolňují rozpuštěné plyny, především pro ŽP nebezpečný sirovodík. Zároveň se tím podporuje rozklad organických látek mikroorganismy aktivovaného kalu<sup>3</sup> (krok 5 na Obr. 12). V závěrečné sedimentaci dochází k odstranění zbývajících pevných částic a separaci aktivovaného kalu bohatého na živiny, který lze dále využít například v zemědělství (krok 6 na Obr. 12). Dezinfekce většinou probíhá přidáním chloru, avšak před vypuštěním vody do vodních toků se musí chlor neutralizovat, aby neškodil vodním organismům. Po dokončení všech těchto kroků se voda vypustí do řeky nebo moře ve stavu, který se považuje za ekologicky nezávadný (krok 7 na Obr. 12) [32, 33].

### 1.2.2 Efektivita ČOV v odstraňování reziduí barev na vlasy

Bohužel konvenční způsoby čištění odpadních vod si neumí zcela poradit s odstraněním všech složek barev na vlasy, jenž lze ozančit za toxikologicky významná rezidua. V odpadních vodách se bohužel prokázala přítomnost PPD a jeho chinonových forem, resorcinolu a také BB. Například průzkum provedený v roce 2023 ve čtyřech hongkongských ČOV zjistil, že množství PPD v přítoku do čistírny se pohybovalo od 2,7 do 90 ng·l<sup>-1</sup> a v odtoku od 0,59 do 40 ng·l<sup>-1</sup>, zatímco množství chinonových forem PPD zaujímal 14 až 830 ng·l<sup>-1</sup> v přítoku a 2,8–140 ng·l<sup>-1</sup> v odtoku. Medián účinnosti odstranění zmíněných polutantů se v jednotlivých ČOV pohyboval mezi 53 a 91 %. To znamená, že ne všechny čistírny prováděly terciární fázi čištění [35]. Je třeba také uvažovat fakt, že velká část chinonových forem PPD se pravděpodobně zachytila v čistírenských kalech, které se následně mohou využívat např. jako hnojivo v zemědělství, tudíž se tímto způsobem vrací zpátky do ŽP [35, 36].

Podobné studie v jiných regionech tyto výsledky potvrzují. V Malajsii a na Srí Lance se při monitorování výtoky vody z čistíren odpadních vod rovněž zjišťovala přítomnost PPD a jeho chinonových forem. Efektivita odstranění těchto polutantů lze podobně jako v případě hongkongského průzkumu považovat za velmi nekonzistentní [37]. Mezi faktory,

---

<sup>3</sup> Suspendovaná směs vložkovitých mikroorganismů (zejména bakterií, prvoků a hub), která se tvoří samovolně díky přítomnosti organických látek v aktivačních nádržích. Smyslem aktivovaného kalu je biodegradace těchto látek.

kteře ovlivňují tuto efektivitu patří doba působení aktivovaného kalu na čištěnou vodu, teplota vody, ale také celkové množství organického uhlíku (TOC) obsaženého v odpadní vodě [37].

Využití adsorpčních metod, kdy se v současnosti nejvíce používá aktivní uhlí pro filtraci vody v terciární fázi čištění, představuje poměrně efektivní řešení. Velký povrch a struktura pórů aktivního uhlí účinně adsorbují sloučeniny, jako jsou aromatické aminy (včetně PPD), fenoly a jejich oxidační produkty (resorcinol a hydrochinon), ale také zbytky motorových paliv, pesticidů, surfaktantů a dalších kontaminantů ŽP [38]. Nicméně efektivita aktivního uhlí klesá s rostoucím TOC ve vodě, protože vysoké množství organických látek soutěží o adsorpční místa, což snižuje kapacitu sorbentu pro cílové znečišťující látky [38, 39].

Dále se v některých průmyslových ČOV, které se záměrně vyskytují v těsné blízkosti nebo jsou součástí textilního, chemického a nebo kosmetického průmyslu, v terciární fázi využívají iontoměničové pryskyřice k odstraňování znečišťujících látek a barviv. Jedná se zpravidla o aniontové pryskyřice zásadité povahy, které jsou účinné při zachytávání aniontových molekul barviv [34, 40]. Odpadní voda protéká kolonou pryskyřičných kuliček, které vážou cílové kontaminanty. Velkou výhodou lze spatřit v regeneraci těchto pryskyřic pomocí kyselých roztoků. Ačkoliv účinnost odstraňování barviv z odpadních vod textilního průmyslu dosahuje hodnot 80–99 %, musí se brát v potaz skutečnost, že účinnost aniontových pryskyřic závisí na chemické povaze kontaminantu. Pro aromatické aminy (PPD), představuje standardní iontová výměna méně univerzální přístup, neboť pokud má odpadní voda pH okolo hodnoty 7, má PPD slabě bazický charakter. Navíc, jak již bylo diskutováno, velký podíl PPD se během svého osudu v odpadních vodách transformuje na jiné sloučeniny, jako je např. BB, která má také v odpadních vodách alkalickou povahu. Odstranění PPD a BB pomocí zmíněných aniontových pryskyřic by tedy v takovém případě nebylo možné [40].

### **1.3 Moderní přístupy odstraňování složek barev na vlasy z odpadních vod**

Rostoucí obavy z dopadů reziduí chemických látek (včetně složek barev na vlasy) na lidské zdraví a ŽP, se kterými si čistírny odpadních vod nedokážou účinně poradit, podněcují nejen evropskou společnost v hledání nových metod k jejich účinnému odstranění co možná ekologicky nejšetrnějším způsobem.

### 1.3.1 Chemické a elektrochemické metody v degradaci složek barev na vlasy

Chemicky řízené oxidační metody se považují v současnosti za slibnou alternativu v dočišťování odpadních vod od reziduí léčiv a narkotik z ŽP. Například pokročilé oxidační procesy (AOP – z anglického *Advanced Oxidation Processes*) zahrnují v širším slova smyslu soubor chemických postupů určených k odstraňování organických i anorganických látek v odpadních vodách oxidací prostřednictvím vysoce reaktivních radikálů. Mezi běžné příklady patří ozonizace, Fentonovy reakce ( $\text{H}_2\text{O}_2$  s železnými katalyzátory), foto-Fenton/UV- $\text{H}_2\text{O}_2$  a fotokatalýza (např.  $\text{TiO}_2/\text{UV}$ ). Tyto metody dokáží mimo jiné rozložit složité aromatické aminy ve vlasových barvách až na  $\text{CO}_2$ , vodu nebo jednodušší kyseliny, čímž se výrazně zredukuje barva a chemická spotřeba kyslíku<sup>4</sup> (CHSK) znečištěné vody.

Například G. G. Bessegato a kolektiv [41] odebraly splaškovou vodu z kadeřnického salonu po provedeném barvení vlasů s počáteční hodnotou CHSK  $\sim 370 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Tento vzorek vody ošetřili různými kombinacemi AOP. Zatímco samotný ozón nebo UV záření oxidovaly polutanty ve vodě pouze částečně, kombinované procesy dosáhly snížení hodnoty CHSK až na hodnoty  $< 50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  a to za dobu 90 min. Zejména fotoelektrokatalytický proces (fotoanoda  $\text{TiO}_2 + \text{O}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$ ) dokázal zcela rozložit klíčové polutanty barev na vlasy (PPD, resorcinol a BB) za méně než 5 min, s minimální tvorbou vedlejších produktů [41].

AOP se řadí mezi univerzální, mimořádně účinné a rychlé metody při odstraňování složek vlasových barev z odpadních vod, protože mají schopnost zpracovat jinak těžko rozložitelné chemické látky na nedetekovatelné úrovni, čehož nelze dosáhnout pouhou filtrací nebo biologickým rozkladem [41]. V praxi se uvažuje jejich zařazení jako dodatečného kroku po biodegradaci nebo jako samostatnou metodu pro koncentrované odpadní vody ze salonů nebo výroben textilu. Některé oxidační metody (např. ozonizaci) lze zařadit před biodegradaci krok, neboť ozonizace rozkládá velké molekuly barviv na menší, již biologicky odbouratelné meziprodukty [42]. Hlavní nevýhody AOP představují vysoké pořizovací náklady spojené s vysokou spotřebou elektrické energie a samozřejmě zvyšování uhlíku v povrchových vodách, protože ne každý polutnat se vždy rozloží až na vodu a  $\text{CO}_2$ . Existuje také riziko vzniku vedlejších, ještě toxičtějších meziproduktů, pokud proces oxidace není doveden zcela do konce [41].

Elektrochemickou koagulaci lze rovněž zařadit mezi další potenciální strategii, pomocí které se na protektorních elektrodách Fe/Al vytvářejí vločky hydroxidu kovu, které adsorbují molekuly barviva. Metoda účinně odstraňuje barvu obvykle s účinností  $> 90 \%$ , jelikož vzniklý

---

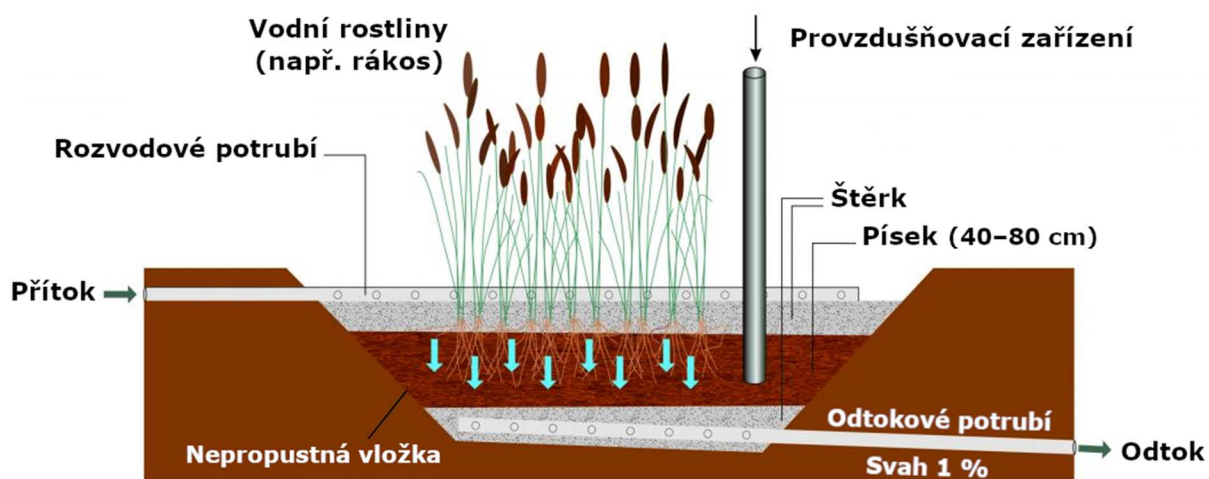
<sup>4</sup> Parametr, který udává, kolik  $\text{O}_2$  je potřeba pro oxidaci organických a anorganických látek ve vodě. Na základě tohoto údaje lze zjistit míru znečištění a kvalitu vody (čistá voda má nízkou hodnotu CHSK).

zákal srážené příslušné látky přechází do snadno oddělitelného kalu. Tento kal koncentrovaný chemikáliemi však vyžaduje řádnou likvidaci. Navíc při procesu se elektroda spotřebovává a proces přidává do vody ionty kovů, které se musí odstranit spolu s kalem [43].

### 1.3.2 Rostliny a kořenové systémy v degradaci složek barev na vlasy

Myšlenka použít vyšší rostliny k čištění vody se ukázala jako nízkonákladový, ale také udržitelný způsob čištění odpadní vody. Umělé mokřady představují typický příklad této strategie, kdy se ve speciálně upraveném podloží pěstují vodní rostliny, jako jsou rákos (*Phragmites*), orobinec (*Typha*) nebo dosna (*Canna*). V těchto mokřadech dochází k odstraňování chemických látek z vlasových barev kombinací několika procesů: sorpcí na kořeny rostlin, jejich metabolizací samotnými rostlinami, ale i mikroby přítomnými v kořenové zóně (rhizosféře). Vlákna kořenů poskytují velkou povrchovou plochu, která adsorbuje molekuly barviv a zároveň nabízí velký prostor pro vznik biofilmů bakterií, které mohou barviva enzymaticky rozkládat [44].

Mokřadní systémy zvládají kolísající zatížení odpadní vodou a často odstraňují více druhů znečištění současně. Například slovinská studie T. G. Bulce a A. Ojstršek na umělých sloupcových mokřadech, kde voda proudí ve vertikálním směru, dosáhla přibližně 90% účinnosti odstranění barviv a 84% snížení CHSK u odpadní vody z textilního průmyslu za dobu 60 dní [45]. Schéma takového mokřadu demonstruje Obr. 13.



**Obrázek 13.** Schéma sloupcového (vertikálního) umělého mokřadu [46].

Za další výhodu umělých mokřadů lze považovat jejich schopnost snižovat množství živin obsažených ve vodě, a to především dusík a fosfor, čímž významně snižují riziko eutrofizace. Turecký výzkum A. Yalçuk a G. Doğdu uvádí 95% odstranění dusičnanů a 94% odstranění fosforečnanů spolu s odstraněním barviv pomocí experimentálních umělých mokřadů s orobincem a dosnami [47].

Účinnost umělých mokřadů je však omezena časem a prostorem kvůli velmi pomalému procesu adsorpce barviv (řádově se jedná o dny až týdny). To znamená, že pro velké objemy odpadní vody se musí použít adekvátně velká plocha mokřadu, což nemusí být pro městské ČOV proveditelné. Proměnlivá účinnost této strategie v závislosti na ročním období rovněž omezuje jejich praktickou použitelnost. Největší účinnost se očekává v letním období, kdy rostliny a mikroorganismy dosahují svého maximalního vegetačního růstu. Kromě toho i samotné podloží mokřadu má omezenou kapacitu a není schopné kontinuálně adsorbovat všechny nečistoty. Při dlouhodobém provozu se mohou polutanty nebo jejich rozkladné produkty hromadit, což vyžaduje pravidelnou regeneraci (např. odpočinek mokřadu nebo výměnu substrátu), tak aby se zachovala účinnost mokřadu [44, 46].

### 1.3.3 Využití mikroorganismů a enzymů k degradaci složek vlasových barev

Určité mikroby mohou využít aromatické aminy a fenolické látky jako zdroj organického dusíku a energie. Například studie S. Maity a kolektivu [48] izolovala z odpadní vody kadeřnických salonů v Indii bakterii *Enterobacter cloacae* (DDB I). Tato bakterie během 18 hodin zcela odbarvila modelový roztok vlasové barvy o koncentraci  $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , kdy se jako substrát použilo minimální živné médium obsahující  $30 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  prášku z bagasy<sup>5</sup> cukrové třtiny. Studie zároveň poukazuje na to, že ačkoliv biodegradace probíhá efektivněji, pokud se bakteriím poskytuje více živin ve formě prášku z bagasy, nadbytek nerozložených živin může následně vést k eutrofizaci<sup>6</sup> vody. Další nevýhodu tohoto přístupu lze spatřovat v nízké rychlosti biodegradace [48].

Místo celých buněk lze k rozkladu chemických látek na barvení vlasů použít izolované enzymy. Výhodnost využití enzymů k biodegradaci složek barev na vlasy spočívá v tom, že selektivně rozkládají cílové polutanty, aniž by měnily ostatní složky vody, fungují rychle a dokáží rozložit i velmi komplexní chemické látky [49]. Mezi hlavní nevýhody používání enzymů k biodegradaci složek barev na vlasy z odpadních vod patří finanční náklady na pořízení enzymů a jejich proměnlivá stabilita v jednotlivých ročních obdobích. Bohužel volné enzymy se snadno a rychle inaktivují v důsledku výkyvů pH, teploty nebo přítomnosti různých inhibitorů v odpadní vodě. Ačkoliv se vyizolovaly enzymy se zvýšenou katalytickou aktivitou, tak v reálných odpadních vodách často vykazovaly nestabilitu, jelikož ztrácely svou aktivitu. Některé studie poukazují na možnost, jak efektivně zvýšit stabilitu enzymů, tím že se imobilizují na pevných nosičích. Kromě toho se tímto způsobem zásadně

---

<sup>5</sup> Suchý vláknitý materiál, který zůstává jako po rozdrcení a vylisování šťávy ze stébel cukrové třtiny.

<sup>6</sup> Proces nadbytečného obohacování vod živinami (hlavně fosforem a dusíkem). Tento jev vede nekontrolovanému růstu řas a sinic (tj. vodní květ), což způsobuje zhoršení kvality vody a narušení rovnováhy vodního ekosystému.

prodlužuje doba použitelnosti enzymu. Imobilizované enzymy se pro praktické aplikace čištění vody zdají být ve všech ohledech výhodnější ve srovnání s volnou formou [49, 50]. Protože v rámci experimentální části této diplomové práce se stanovuje katalytická aktivita enzymů Lac, křenové peroxidázy (HRP), tyrosinázy (TYR) a fenoxazinon syntázy (PHS) vůči významným látkám obsaženým v permanentních barvách na vlasy, pojednávají následující podkapitoly detailněji o těchto klíčových enzimech.

### 1.3.3.1 Lakáza

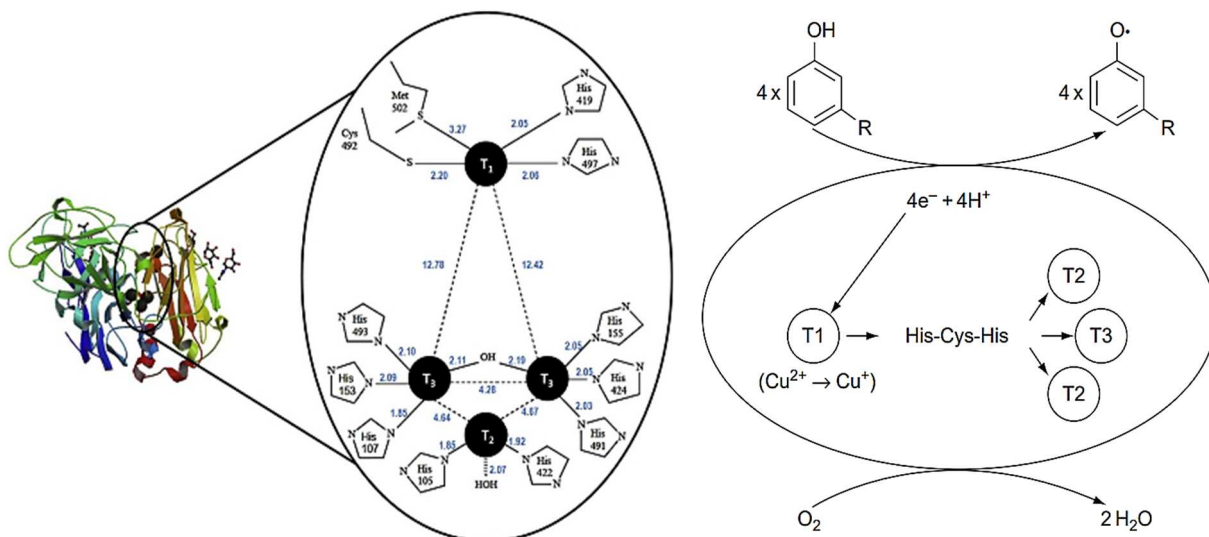
Oxidoreduktázy, zejména lakázy (Lac) a peroxidázy získávané z ligninových dřevokazných hub<sup>7</sup>, jakými jsou např. hlíva ústříčná (*Pleurotus ostreatus*), hlíva plicní (*Pleurotus pulmonarius*) a outkovka pestrá (*Trametes versicolor*), nebo z mikroskopických vláknitých hub *Aspergillus nidulans* (EC 1.10.3.2), prokázaly vysokou účinnost při odbourávání vlasových, ale také textilních barev [51–53]. Během experimentální úpravy vody s vysokým obsahem barviva indigokarmínu, kterou, prováděl R. M. F. Bento a kolektiv [52], bylo pomocí Lac dosaženo až 90% odstranění tohoto barviva.

Většina dostupných studií o Lac uvádí, že se jedná o monomerní glykoprotein, jehož sacharidová složka tvoří přibližně 1–15 % celkové hmotnosti enzymu. Tato složka se skládá především ze zbytků manózy a *N*-acetylglukosaminu [54]. Aktivita lakázy závisí na jejím měděném kofaktoru a na přítomnosti kyslíku. Molekula Lac izolovaná z ligninových hub obsahuje čtyři atomy mědi, všechny ve dvoumocném oxidačním stavu ( $\text{Cu}^{2+}$ ). Tyto atomy se vyskytují ve třech odlišných vazebných místech (T1, T2 a T3) a zásadním způsobem se podílejí na katalytických vlastnostech enzymu [55]. Proteinovou strukturu Lac včetně zmíněných vazebných míst ilustruje Obr. 14, vlevo. Lac vykazují schopnost katalyzovat čtyřelektronovou oxidaci aromatických aminů (včetně PPD), fenylendiaminu a fenolů za vzniku odpovídajících radikálů, aniž by potřebovaly peroxid vodíku [51]. Jako akceptor elektronů využívají kyslík, přičemž vzniká voda (Obr. 14, vpravo).

Jelikož vzniklé radikály terminují za vzniku produktů, které dále podléhají další katalytické oxidaci, nelze vyloučit vznik polymerních sloučenin, které jsou ve výsledku toxickejší nežli původní polutant. Za typický příklad lze považovat přeměnu PPD pomocí Lac, kdy vzniká BB (Obr. 15). Stručně řečeno, Lac transformuje PPD a resorcinol prostřednictvím oxidační polymerace. Vznikají větší, méně rozpustné molekuly o vyšší molekulové hmotnosti, jako je BB (z PPD) a polyresorcinol (z resorcinolu), což může usnadnit jejich odstranění z odpadních vod například filtrací nebo adsorpcí.

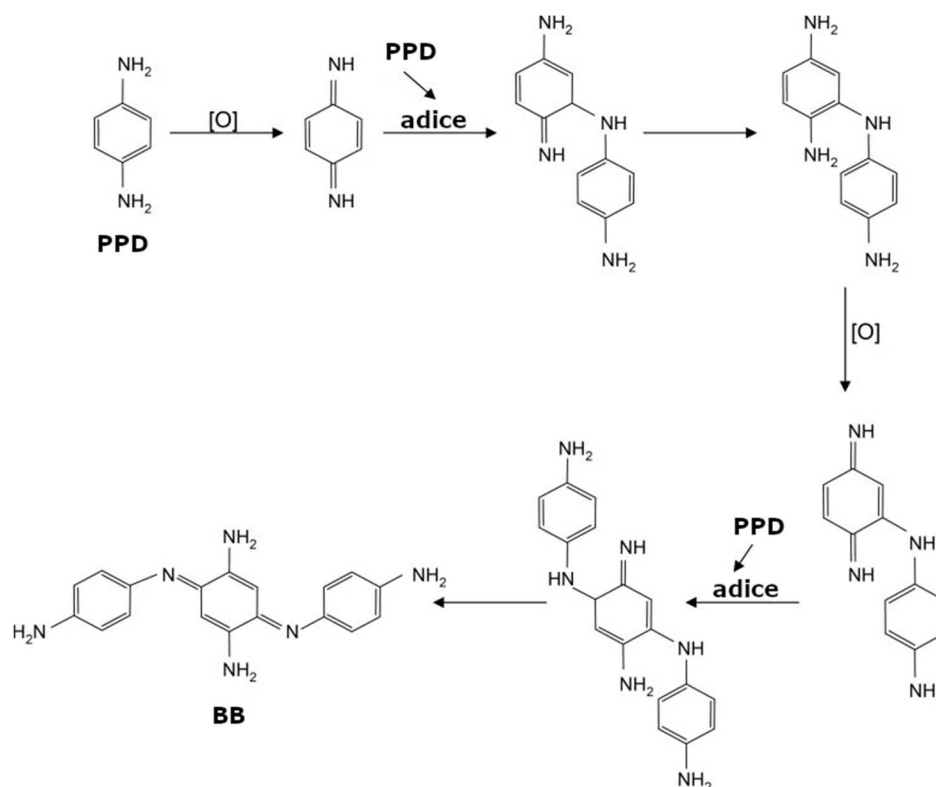
---

<sup>7</sup> Houby způsobující tzv. bílou hnilobu, při které se rozkládá jak celulóza, tak lignin ve dřevě. Dřevo postižené bílou hnilobou získává bílou nebo světlou barvu.



**Obrázek 14.** Proteinová struktura lakázy a jejího aktivního centra [56] a katalytický cyklus pro *meta* substituované fenoly [57].

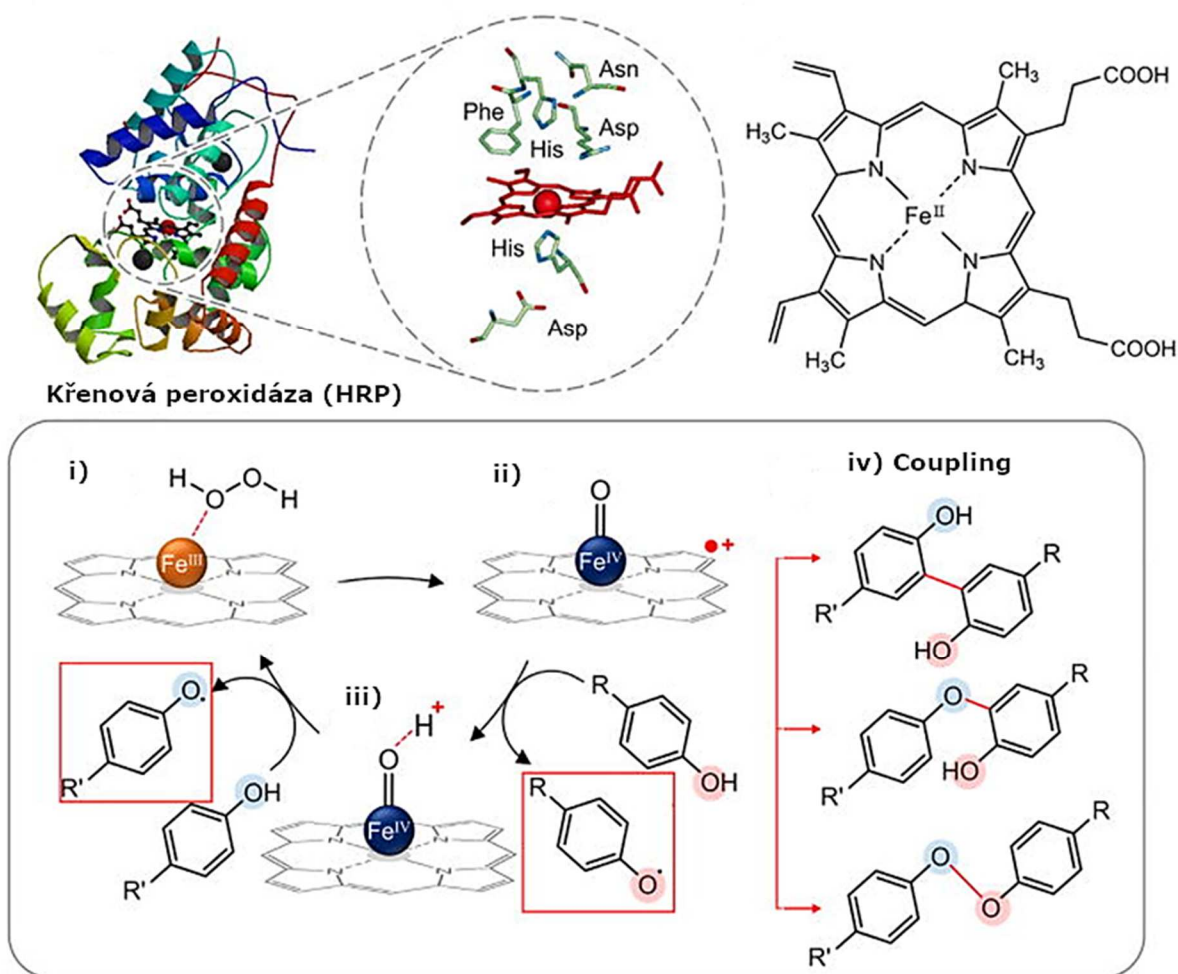
Lac mají různé optimální reakční podmínky v závislosti zdroji, ze kterého se izolují. Lac získávané z dřevokazných hub fungují při hodnotě pH 3–5, a při teplotách od 40 do 60 °C. Již v mírně alkalickém pH svoji aktivitu ztrácejí. Na druhé straně alkalická Lac izolovaná z bakterie *Bacillus subtilis* má optimum při pH 8,5 a zůstává aktivní až do 55 °C [58, 59].



**Obrázek 15.** Navrhovaný mechanismus oxidace PPD na BB [60].

### 1.3.3.2 Křenová peroxidáza

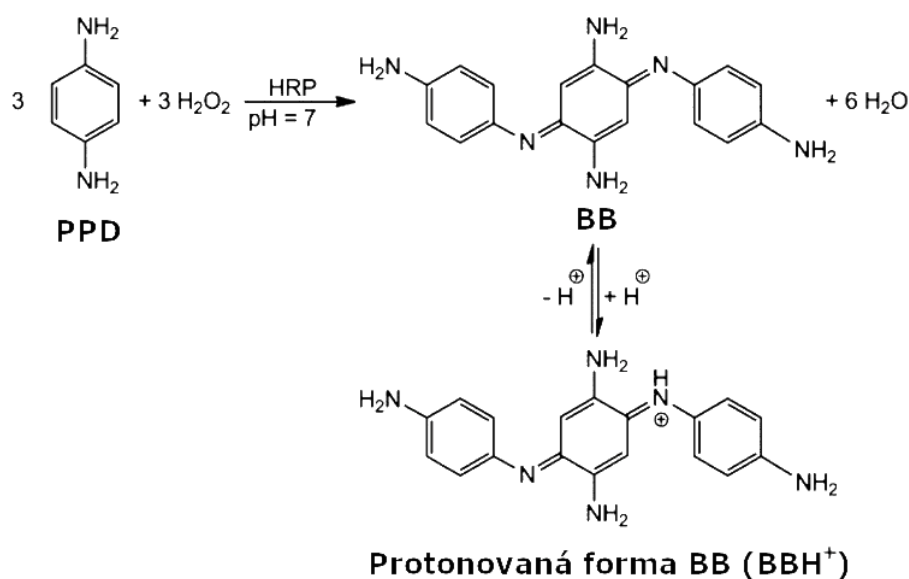
Tradiční výroba křenové peroxidázy (HRP) (EC 1.11.1.7) spočívá v její extrakci z kořenů křenu selského (*Armoracia rusticana*). Enzym se z křenu extrahuje nejprve pomocí ultrazvuku, aby došlo k narušení rostlinných buněk. Poté se roztok sráží síranem amonným, čímž dojde k izolaci proteinů z křenu. Izolované proteiny se následně přečišťují chromatograficky, aby se získala HRP o vysoké čistotě [61]. HRP lze také vyrábět pomocí geneticky modifikovaných bakterií *Escherichia coli*, do jejichž DNA se záměrně vložil gen, který umožňuje této bakterii enzym produkovat. Tato metoda umožňuje lépe kontrolovatelný a škálovatelný výrobní proces, který poskytuje vysoce čistý a homogenní enzym [62]. Enzym má za kofaktor hem, který využívá peroxid vodíku k dvouelektronové oxidaci organických sloučenin. Při čištění odpadních vod se peroxidázy podílejí na katalytické oxidaci toxických fenolů a aromatických aminů na reaktivní radikály, které se podobně jako v případě použití Lac polymerují a srážejí [63]. Obr. 16 zachycuje proteinovou strukturu a katalytický cyklus enzymu.



**Obrázek 16.** Proteinová struktura křenové peroxidázy a její hemové aktivní místo (nahore), včetně katalytického cyklu (dole) [64].

Při reakci PPD s HRP se nejprve pomocí peroxidu vodíku oxiduje v hemu obsažené  $\text{Fe}^{3+}$  na  $\text{Fe}^{4+}$ . Oxidovaný hem následně odebírá elektrony z PPD za vzniku BB jako hlavního produktu reakce [65, 66]. Schéma mechanismu ukazuje Obr. 17. HRP má schopnost katalyzovat oxidaci resorcinolu a dalších fenolických látek. Enzym přeměňuje fenoly na fenoxylradikály, které spontánně tvoří dimery, polymery nebo chinony [67].

HRP představuje poměrně stabilní enzym, ale i tak se musí přizpůsobit reakční podmínky. Optimum aktivity enzymu se obvykle pohybuje kolem pH 5–7 pro fenolické substráty, přičemž katalytická aktivita HRP klesá především v silně kyselých nebo zásaditých podmínkách. Aktivita HRP má optimum při teplotách 25–40 °C. Při teplotách nad 50 °C již HRP podléhá denaturaci. Jeden z největších problémů při průmyslovém využívání HRP spočívá v inaktivaci enzymu nadbytkem peroxidu vodíku. Peroxid slouží jako nezbytná složka reakce HRP, nicméně jeho nadměrná dávka může nevratně oxidovat hem, čímž se enzym stane neaktivním. Pro zmírnění tohoto jevu se proto v praxi často peroxid dává pomalu, nebo se využívají tzv. „lapače radikálů“, což jsou látky (např. polyetylen glykol), které chrání enzym před inaktivací tím, že přednostně reagují se vznikajícími radikály [68].



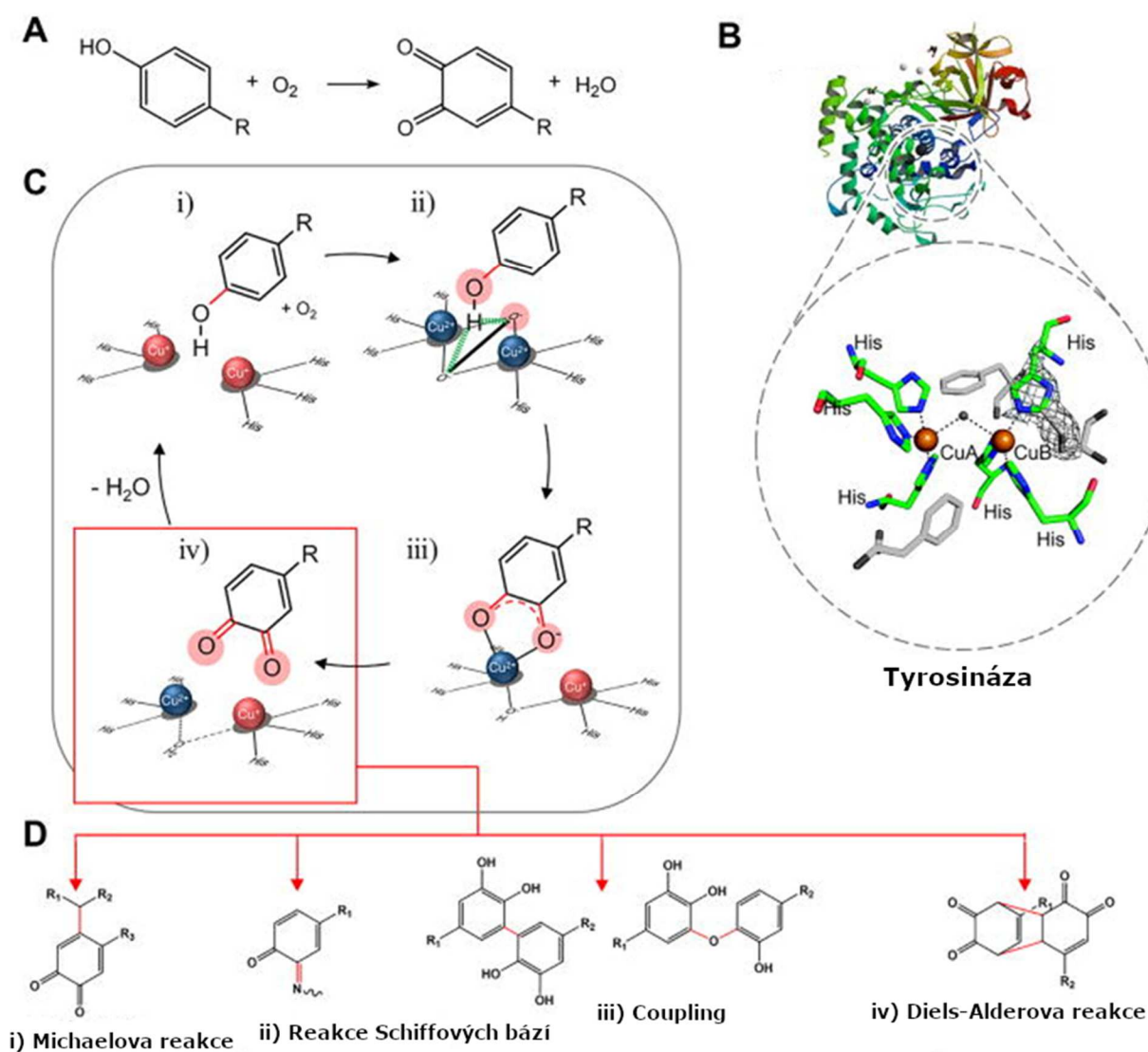
**Obrázek 17.** Mechanismus oxidace PPD katalyzované pomocí HRP [66].

### 1.3.3.3 Tyrosináza

Tyrosinázy (TYR) lze v přírodě nalézt u řady živočichů, hub, rostlin a mikroorganismů. Nejčastěji se však izoluje z plodnic makroskopických hub jako je např. žampion dvouvýtrusný (*Agaricus bisporus*) (EC 1.14.18.1), a to z důvodu relativně snadné dostupnosti a nízké ceny těchto hub. Mikroskopické vláknité houby se řadí mezi další vhodné zdroje TYR. Tento enzym se často izoluje z některých zástupců rodu *Aspergillus*. TYR produkuje také řada bakterií, např. *Streptomyces sp.*, *Vibrio sp.*, *Bacillus megaterium* a *Ralstonia solanacearum*, které lze

kultivovat za účelem získání enzymu. Živočichové produkují tyrosinázové enzymy v melanocytech, ovšem pro svoji nepraktičnost a etické důvody se z živočichů běžně neizolují [69–71].

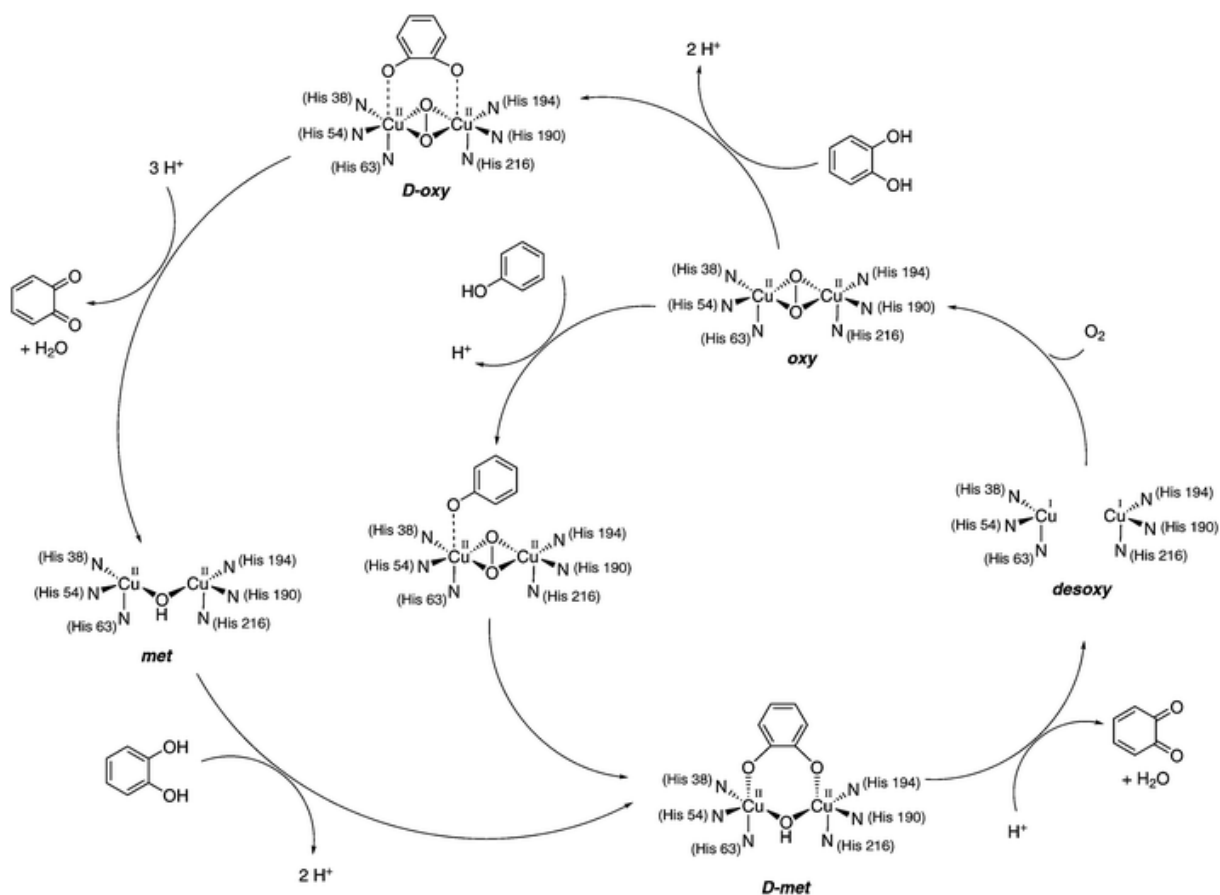
TYR patří mezi oxidoreduktázy obsahující měděný kofaktor. Ve svém aktivním místě obsahuje dva atomy mědi ( $\text{Cu}^{2+}$ ) spojené kyslíkovými můstky, které jsou zároveň koordinovány 6 až 7 histidinovými (His) zbytky. Ke své katalytické aktivitě vyžaduje pouze substrát a molekulární kyslík, kdy při každém katalytickém cyklu se spotřebuje  $\text{O}_2$  za produkce  $\text{H}_2\text{O}$ , jakožto konečného akceptora elektronů. Grafické znázornění struktury enzymu lze pozorovat na Obr. 18.



**Obrázek 18.** Proteinová struktura TYR a její aktivní místo (B), včetně zjednodušeného katalytického cyklu (A, C a D) [64].

Enzym využívá kyslík k hydroxylaci monofenolů na *o*-difenoly (kresolásová aktivita) a k následné oxidaci vzniklých *o*-difenolů na *o*-chinony (katecholásová aktivita). V případě

vlasových barev TYR oxiduje zejména kaple fenolické povahy, tudíž v odbourávání PPD a jiných aromatických aminů není příliš efektivní [69]. Podrobný mechanismus katalytické aktivity TYR znázorňuje Obr. 19.



**Obrázek 19.** Mechanismus katalytické aktivity TYR [72].

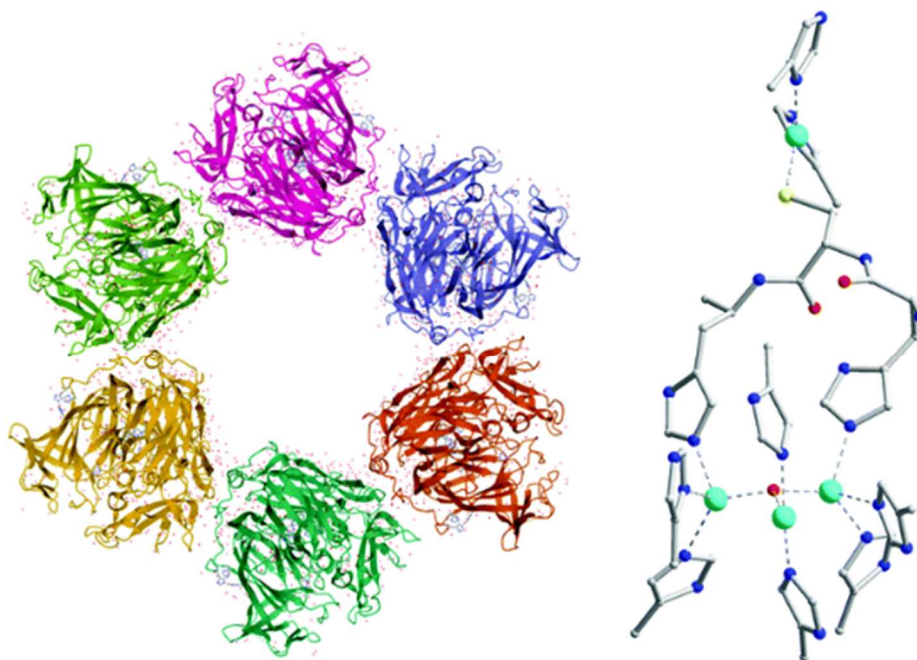
Vzniklé *o*-chinony pak polymerují na huminové nebo melaninové pigmenty, což má za následek změnu barvy roztoku na tmavě hnědou. Tohoto mechanismu se již v praxi využívá k čištění odpadních vod bohatých na fenoly. V průmyslových aplikacích se používají běžně imobilizované TYR [69, 73]. S. Wada a kolektiv [73] uvádí, že vzniklé tmavě hnědé produkty lze z roztoku s výhodou odstranit adsorpcí na chitin a chitosan, které se hojně vyskytují jako odpad z průmyslového zpracování měkkýšů. Kromě toho se zjistilo, že rychlost transformace fenolů se v přítomnosti chitosanu zvyšuje. Při použití imobilizované TYR se ze vzorku odpadní vody po 2 h procedury odstranilo 100 % fenolů, zatímco aktivita se snížila jen velmi málo, a to dokonce i po 10 opakovaných procedurách [73].

Optimální reakční podmínky TYR se liší podle zdroje, ze kterého enzym pochází. TYR izolovaná z houby *Agaricus bisporus* nejlépe katalyzuje v rozmezí hodnot pH 6–7, přičemž nejvhodnější teplota se uvádí 27 °C [71]. TYR izolované z mikroskopických vláknitých hub jako *Aspergillus nidulans* vykazují optimální aktivitu okolo hodnoty pH 5–6,

při teplotě 40 °C. Mnoho „houbových“ TYR začíná ztrácet aktivitu již při teplotách převyšujících 45 °C a při teplotě 70 °C se považují za inaktivní [70].

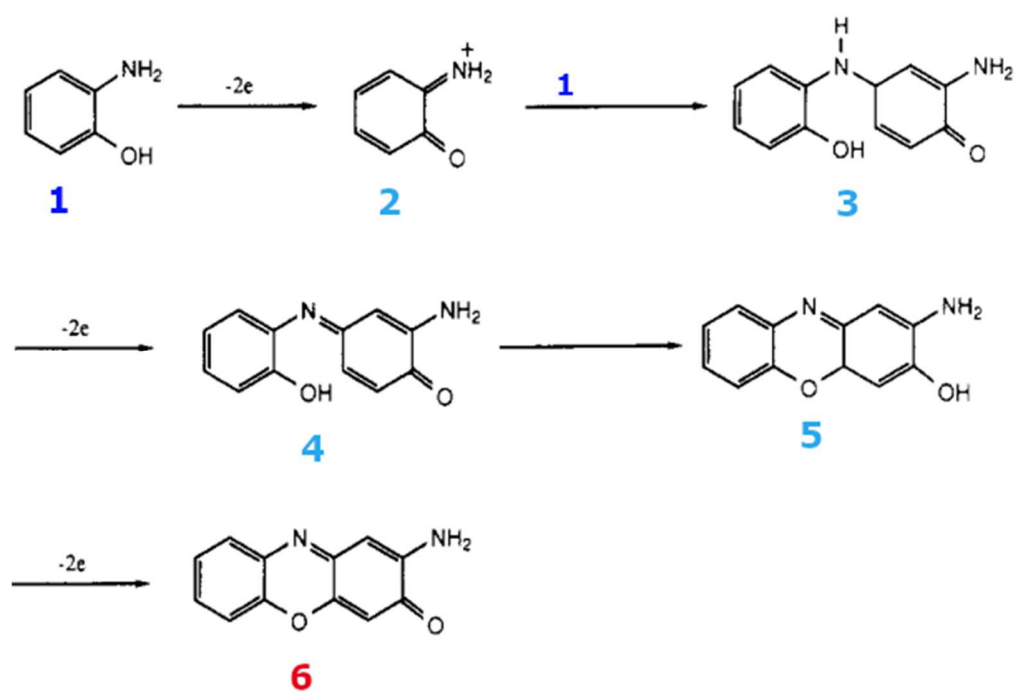
#### 1.3.3.4 Fenoxazinon syntáza

Fenoxazinon syntázy (PHS) (EC 1.10.3.4) zná lidstvo především jako enzym vláknitých bakterií rodu *Streptomyces*. Konkrétně se spojuje s bakterií *Streptomyces antibioticus*. Tento zástupce produkuje antibiotickou látku aktinomycin D, pro jejíž závěrečný biosyntetický krok potřebuje právě PHS. Během syntézy aktinomycinu se PHS vylučuje do živného média, nejčastěji bujónu [74, 75]. Po fermentaci lze enzym z bujónu přečistit. Výtěžnost enzymu úzce souvisí s výtěžností aktinomycinu, která bohužel není příliš vysoká. Proto představuje výroba velkého množství PHS nativní fermentací poměrně nákladnou záležitost [75]. Vyšší produkce enzymu se dosahuje pomocí geneticky upravených bakterií, do jejichž DNA se pomocí rekombinantních plazmidů vpraví gen pro syntézu PHS z *S. antibioticus*. Nejčastěji se pro tento účel používá bakterie *Streptomyces lividans* [76]. PHS se řadí rovněž mezi oxidoreduktázy obsahující měděné kofaktory ( $\text{Cu}^{2+}$ ), která v přítomnosti molekulárního kyslíku katalyzuje spojování *o*-aminofenolů za vzniku fenoxazinonových struktur. PHS existuje ve dvou oligomerních formách: dimerní a hexamerní. Ve starších bakteriálních kulturách produkujících aktinomycin převažuje hexamerní forma, jejíž strukturu a aktivní místo demonstruje Obr. 20.

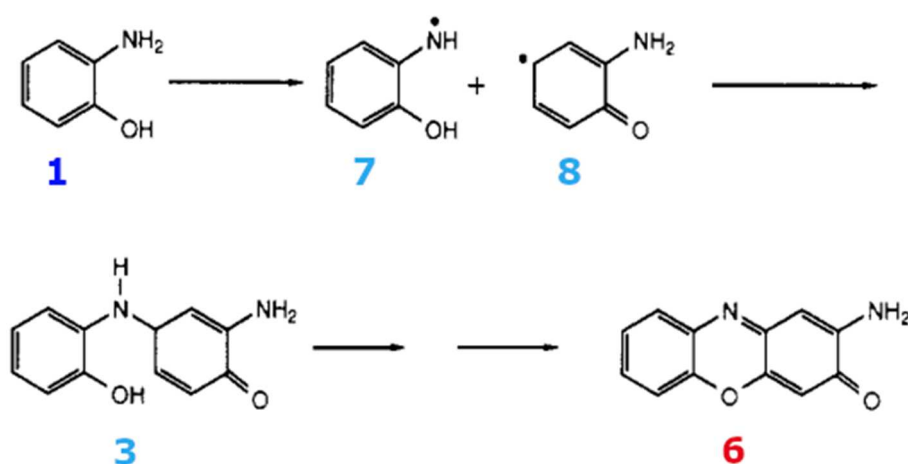


**Obrázek 20.** Proteinová struktura hexamerní formy PHS a její aktivní místo, kde zelené kuličky představují atomy  $\text{Cu}^{2+}$  kofaktoru obklopeného molekulami histidinu [77].

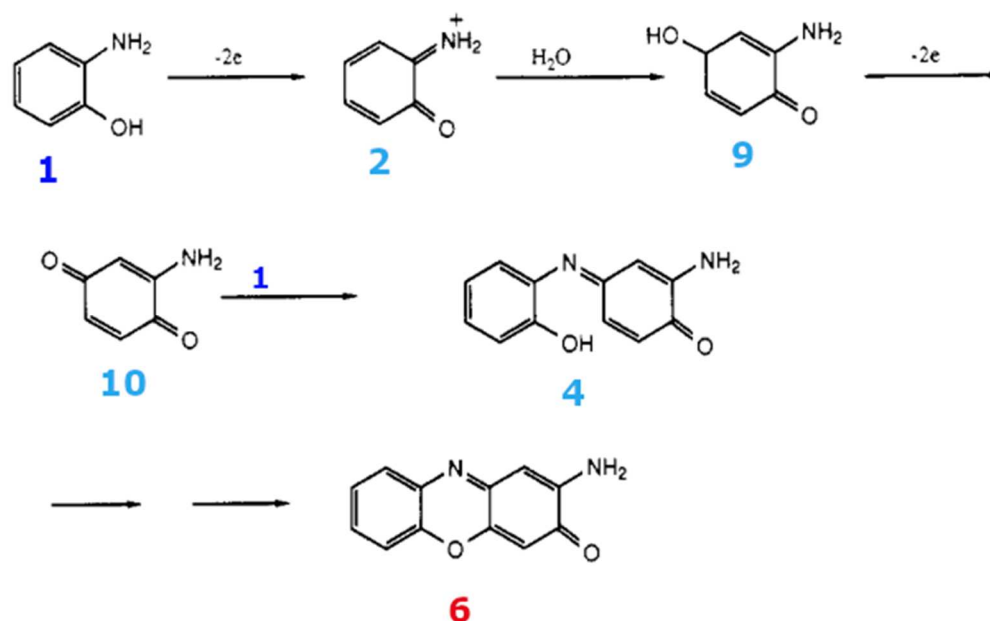
Při bakteriální syntéze aktinomycinu D katalyzuje PHS spojení dvou molekul kyseliny 3-hydroxyantranilové složitým mechanismem šestielektronové oxidace za vzniku tricyklického červeně zbarveného produktu 2-aminofenoxazinonu [74]. Pokud si odmyslíme karboxylovou skupinu u této kyseliny, jedná se vlastně o *o*-aminofenol. Jedna z publikací C. Barry a kolektivu [74] uvádí čtyři možné mechanismy oxidace *o*-aminofenolu na 2-aminofenoxazinon, které graficky znázorňují Obr. 21–24, kde *o*-aminofenol nese tmavě modré označení číslicí 1. Finální produkt 2-aminofenoxazinon je označen vždy červenou číslicí 6. Meziprodukty mají značení modrými číslicemi.



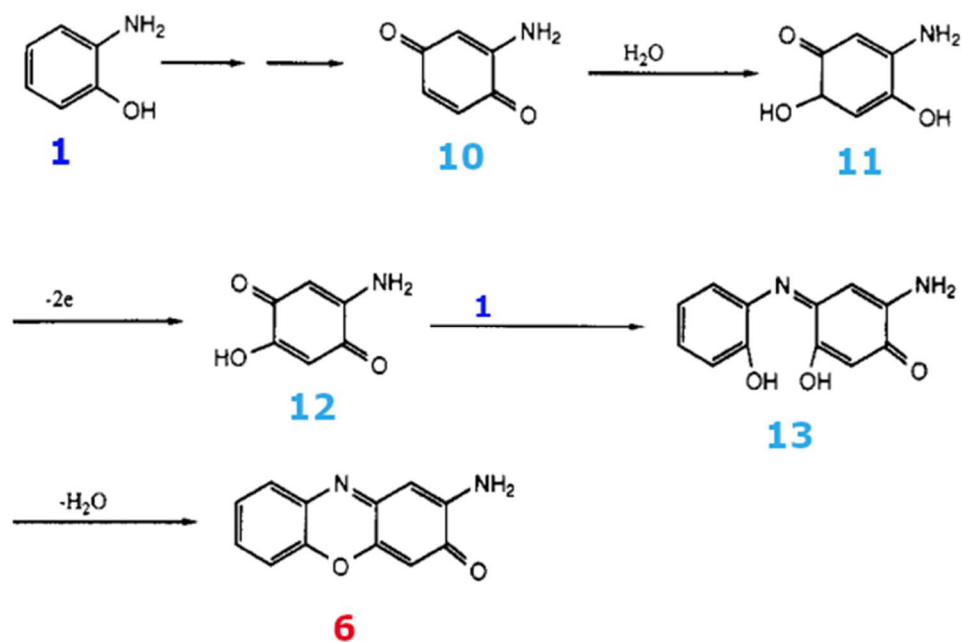
**Obrázek 21.** Mechanismus A vzniku 2-aminofenoxazinonu [74].



**Obrázek 22.** Mechanismus B vzniku 2-aminofenoxazinonu [74].



**Obrázek 23.** Mechanismus C vzniku 2-aminofenoxazinonu [74].



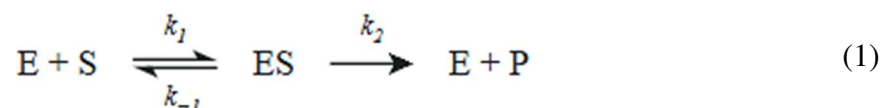
**Obrázek 24.** Mechanismus D vzniku 2-aminofenoxazinonu [74].

Ačkoliv není PHS běžně používána při čištění odpadních vod, tak teoreticky se pro tento účel hodí. Molekuly barev na vlasy a jejich vedlejší produkty, které disponují současně amino i hydroxyskupinou (variabilně substituované aminofenoly), představují vhodné substráty pro PHS. Vzniklý fenoxazinonový produkt má nižší rozpustnost ve vodě, což usnadňuje jeho následné odstranění pomocí adsorpčních metod. Pro dobře prostudovanou PHS bakterie *Streptomyces antibioticus* se v literatuře uvádí optimální pH v kyselém rozmezí okolo hodnoty pH 4,5 a optimální teplota kolem 40–50 °C. Velká nevýhoda enzymu spočívá v jeho stabilitě. Již při teplotě 50 °C enzym velmi rychle ztrácí svoji aktivitu, kdy během pouhých ~12 min

dochází k úbytku aktivity na polovinu. Imobilizací enzymu do nanogelu se však dá stabilita výrazně zlepšit [78].

#### 1.4 Enzymová kinetika: rychlost reakcí katalyzovaných enzymy

Enzymová kinetika zkoumá rychlost enzymatických reakcí a platí pro ní obecné zákony chemické kinetiky. Vyjadřuje se pomocí tzv. saturační křivky (Obr. 25), která představuje závislost rychlosti enzymové reakce ( $V$ ) na koncentraci substrátu ( $S$ ). Tuto závislost lze popsat matematickým modelem dle Michaelise a Mentenové, který vychází z předpokladu, že během reakce enzymu ( $E$ ) se substrátem na produkt ( $P$ ) vzniká pouze jeden meziprodukt, a to komplex enzym-substrát ( $ES$ ). Rychlost jednotlivých reakcí pak udávají příslušné rychlostní konstanty ( $k$ ). Tento model vyjadřuje rovnice (1). Pro konstantní koncentraci enzymu lze potom Michaelis-Mentenovu rovnici vyjádřit vztahem (2). Model však nezohledňuje některé realně možné skutečnosti, a to že reakce může probíhat v několika stupních s více meziproducty, přičemž může docházet i ke zpětné přeměně produktu [79].



$$V_0 = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (2)$$

V rovnici (2) představuje  $V_0$  [ $mol \cdot l^{-1} \cdot s^{-1}$ ] počáteční rychlost reakce,  $V_{max}$  [ $mol \cdot l^{-1} \cdot s^{-1}$ ] maximální (mezní) reakční rychlost dosaženou při úplném nasycení enzymu substrátem,  $[S]$  [ $mol \cdot l^{-1}$ ] rovnovážnou koncentraci substrátu a  $K_M$  [ $mol \cdot l^{-1}$ ] tzv. Michaelisovu konstantu, kterou lze definovat podle rovnice (3). Michaelisova konstanta udává koncentraci substrátu, při níž se reakční rychlost rovná polovině maximální rychlosti reakce. Závisí na veličinách ovlivňujících aktivitu enzymů, tedy na pH, teplotě a potenciální přítomnosti inhibitorů. Vyjadřuje také afinitu enzymu k substrátu [79].

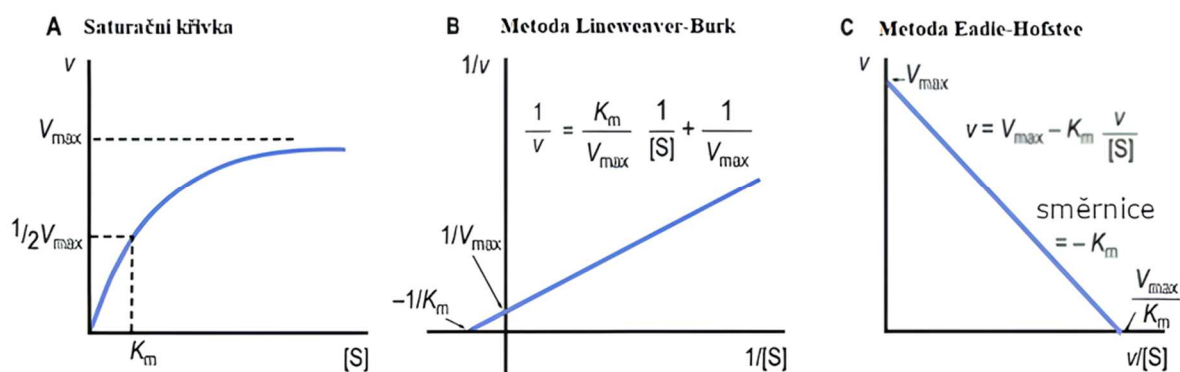
$$K_M = (k_{-1} + k_2) / k_1 \quad (3)$$

Při úplném nasycení enzymu substrátem dosahuje reakční rychlost své maximální hodnoty a jediným limitujícím faktorem reakce je právě mezní rychlost. V tomto stavu lze zavést další důležitý parametr enzymové aktivity  $k_{cat}$  [ $s^{-1}$ ] číslo přeměny, který udává počet molekul substrátu přeměněných prostřednictvím jedné molekuly enzymu za sekundu. Matematicky se tento vztah popisuje rovnicí (4). Na základě této rovnice se dá nepřímými experimentálními metodami určit celková koncentrace enzymu  $[E_t]$  [ $mol \cdot l^{-1}$ ] v reakčním systému [79, 80]. Další významný ukazatel enzymové aktivity charakterizuje katalytická

účinnost enzymu, vyjádřená jako poměr  $k_{cat} / K_M [l \cdot s^{-1} \cdot mol^{-1}]$ . Tento parametr kombinuje dva důležité aspekty enzymové aktivity do jedné hodnoty, a proto se běžně používá ke srovnání katalytické efektivity různých enzymů [80].

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E_t]} \quad (4)$$

Z matematického vyjádření Michaelis-Mentenovy rovnice a z grafické podoby saturační křivky (Obr. 25) vyplývá, že vztah mezi rychlostí reakce a koncentrací substrátu má hyperbolický průběh. Pro linearizaci Michaelis-Mentenovy rovnice se využívají dvě základní metody, konkrétně metoda Lineweaver-Burkova a metoda dle Eadie-Hofstee. Jsou oblíbené zejména díky své jednoduchosti a schopnosti vizuálně interpretovat experimentální data. Tyto metody umožňují snadno určit hodnoty  $V_{max}$  a  $K_M$  [81]. Jejich matematické vyjádření a grafickou podobu ukazuje Obr. 25.



**Obrázek 25.** Saturační křivka (vlevo), linearizace saturační křivky dle Lineweaver-Burkovy metody (uprostřed) a Eadie-Hofstee (vpravo) [82].

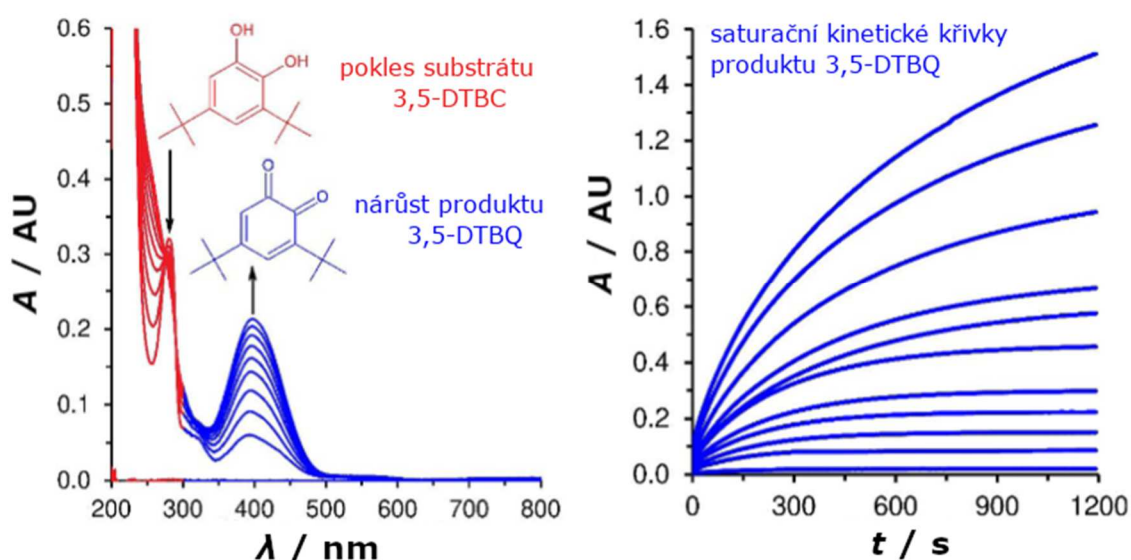
#### 1.4.1 Spektrofotometrické stanovení aktivity enzymů

Jednu z nejpoužívanějších instrumentálních metod pro stanovení enzymové aktivity představuje spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné oblasti (UV-Vis). Roztok obsahuje enzym a substrát jenž je umístěný v kyvetě, která se následně vystaví zvolenému úseku elektromagnetického záření. Toto záření molekuly substrátu (nebo produktu) v roztoku absorbují. Intenzita světla, které není roztokem v kyvetě absorbována, se rovněž zaznamenává detektorem. Množství sledované látky lze snadno zjistit pomocí Lambert-Beerova zákona (5), kde absorpce části světelné energie, tzv. absorbance  $A$  [AU], je úměrná koncentraci analyzované látky v roztoku  $c$  [ $mol \cdot l^{-1}$ ], při použité délce kyvety  $l$  [cm] a molárnímu absorpčnímu koeficientu látky  $\varepsilon$  [ $l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ ] [83, 84].

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (5)$$

Jak již bylo výše uvedeno, během enzymaticky katalyzovaných reakcí dochází k přeměně substrátu na produkt, přičemž substrát i produkt vykazují specifickou  $A$  při určité vlnové délce  $\lambda$  [nm]. Stanovení aktivity enzymů sleduje, kolik substrátu bylo spotřebováno a/nebo kolik produktu se za danou dobu vytvořilo. Z naměřené změny absorbance ( $\Delta A$ ) v čase lze tedy vypočítat změnu koncentrací produktu a/nebo substrátu ( $\Delta c$ ), a tím i reakční rychlost.

Před vlastním vyšetřováním enzymové kinetiky se určí vlnová délka absorpčního maxima ( $\lambda_{\max}$ ) substrátu, tak i vzniklých produktů (Obr. 26, vlevo). Vynesením hodnot  $A$  na čase  $t$  [s] se získávají typické, saturační kinetické křivky, jejichž strmost roste v případě vzniku produktu (Obr. 26, vpravo), nebo klesá při spotřebovávání substrátu. Pokud se dá stanovit z hodnot absorbancí konkrétní koncentrace, lze vypočítat rychlostní konstantu ( $V$ ) pro každou koncentraci substrátu či produktu při konstantní koncentraci enzymu.



**Obrázek 26.** Příklad superponovaných UV-Vis absorpčních spekter 3,5-di-*tert*-butylcatecholu (3,5-DTBC) během jeho oxidace (vlevo) a saturačních kinetických křivek produktu této oxidace, 3,5-di-*tert*-butyl-*o*-benzochinonu (3,5-DTBQ) (vpravo).

Reakce byla katalyzována binukleárním komplexem mědi ( $\text{Cu}^{2+}$ ) [85].

## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Tato kapitola uvádí seznam použitých chemikálií, laboratorního vybavení a stručný popis metodiky potřebné k dosažení stanovených cílů, tedy určení katalytické aktivity TYR, Lac a HRP vůči vybraným významným polutantům z permanentních barev na vlasy, jmenovitě *o*-fenylendiaminu (OPD), *p*-fenylendiaminu (PPD) a *o*-aminofenolu (OAP). Získaná data prezentují partiční grafy enzymové kinetiky dle Michaelise a Mentenové. Vypočtené kinetické parametry pro uvedené enzymy jsou prezentovány pomocí přehledových tabulek.

### 2.1 Přístroje a pomůcky

Analytické váhy KERN 770-12 (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo), FTIR spektrometr iS50 Nicolet (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) (Obr. 27), KBr krystal pro FTIR spektrometrii (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), křemenná kyveta High Precision Cell, 10 mm (Hellma Analytics GmbH & Co. KG, Müllheim, Německo), mikropipeta Biohit Proline 100–1000  $\mu$ l (Sartorius Biohit Liquid Handling Oy, Helsinky, Finsko), mikropipeta Biohit Proline 10–100  $\mu$ l (Sartorius Biohit Liquid Handling Oy, Helsinky, Finsko), mikropipeta Finnpipette F1 Thermo Scientific 1–10  $\mu$ l (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), NMR spektrometr Bruker Ascend 500 MHz (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Německo), pH metr WTW inoLab pH 720 s elektrodou WTW SenTix 81 (Xylem Analytics Germany GmbH, Weilheim in Oberbayern, Německo), předvážky laboratorní Kern EMB 220-1 (KERN & SOHN GmbH, Balingen, Německo), software OMNIC 9 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), software UVProbe 2.3 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japonsko), ultrazvuková lázeň BANDELIN Sonorex Super RK 52 H (BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlín, Německo) a UV-VIS spektrometr Shimadzu UV-2600 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japonsko) (Obr. 27) představovaly potřebné přístrojové vybavení a pomůcky.



**Obrázek 27.** Měřící přístroj Shimadzu UV-2450 UV-Vis Spektrofotometr (vlevo) a FTIR spektrometr iS50 Nicolet (vpravo).

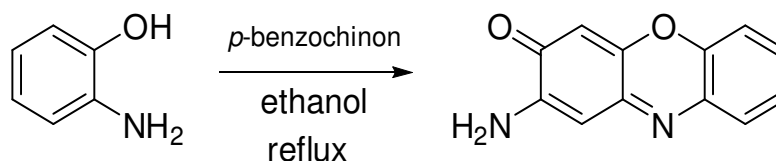
## 2.2 Použité chemikálie

2,3-diaminofenazin (DAP), 90% (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), 2-aminofenoxazin-3-on (APX),  $\geq 99,0\%$  (Ústav organické chemie a technologie Univerzity Pardubice, Pardubice, Česká republika), destilovaná voda (Univerzita Pardubice, Pardubice, Česká republika), diethylether, p.a., (Lach-Ner s.r.o., Neratovice, Česká republika), dihydrogenfosforečnan sodný, p.a., monohydrát,  $\geq 99,0\%$  (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), dichlormetan,  $\geq 99,8\%$  (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), dimetylsulfoxid (DMSO), 99,8% (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), etanol,  $\geq 99,0\%$  (Honeywell International Inc., Charlotte, NC, USA), ethylacetát,  $\geq 99,8\%$  (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), hydrogenfosforečnan sodný, p.a., bezvodý,  $\geq 99,0\%$  (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), hydroxid sodný, p.a. (J. T. Baker, Deventer, Nizozemsko), křenová peroxidáza (HRP) izolovaná z *Armoracia rusticana* (EC 1.11.1.7), lyofilizovaný prášek,  $150 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$  (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), kyselina octová ledová, p.a., 99,8% (PENTA s.r.o., Praha, Česká republika), lakáza (Lac) izolovaná z *Aspergillus sp.* (EC 1.10.3.2),  $50 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  roztok,  $2500 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$  (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), metanol,  $\geq 99,0\%$  (Honeywell International Inc., Charlotte, NC, USA), *o*-aminofenol (OAP), 99% (Lachema a.s., Brno, Česká republika), octan draselný, BioXtra,  $\geq 99,0\%$  (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), *o*-fenylendiamin (OPD), 98% (VWR International LLC, Radnor, PA, USA), *p*-benzochinon, 99,8% (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), peroxid vodíku, p.a., 30% (PENTA s.r.o., Praha, Česká republika), *p*-fenylendiamin (PPD), 99% (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), silikagel „60 extra pure“ pro sloupcovou chromatografii, (Merck KGaA, Darmstadt, Německo), tyrosináza (TYR) izolovaná z *Agaricus bisporus* (EC 1.14.18.1) a lyofilizovaný prášek,  $1000 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) zahrnují veškeré použité chemikálie.

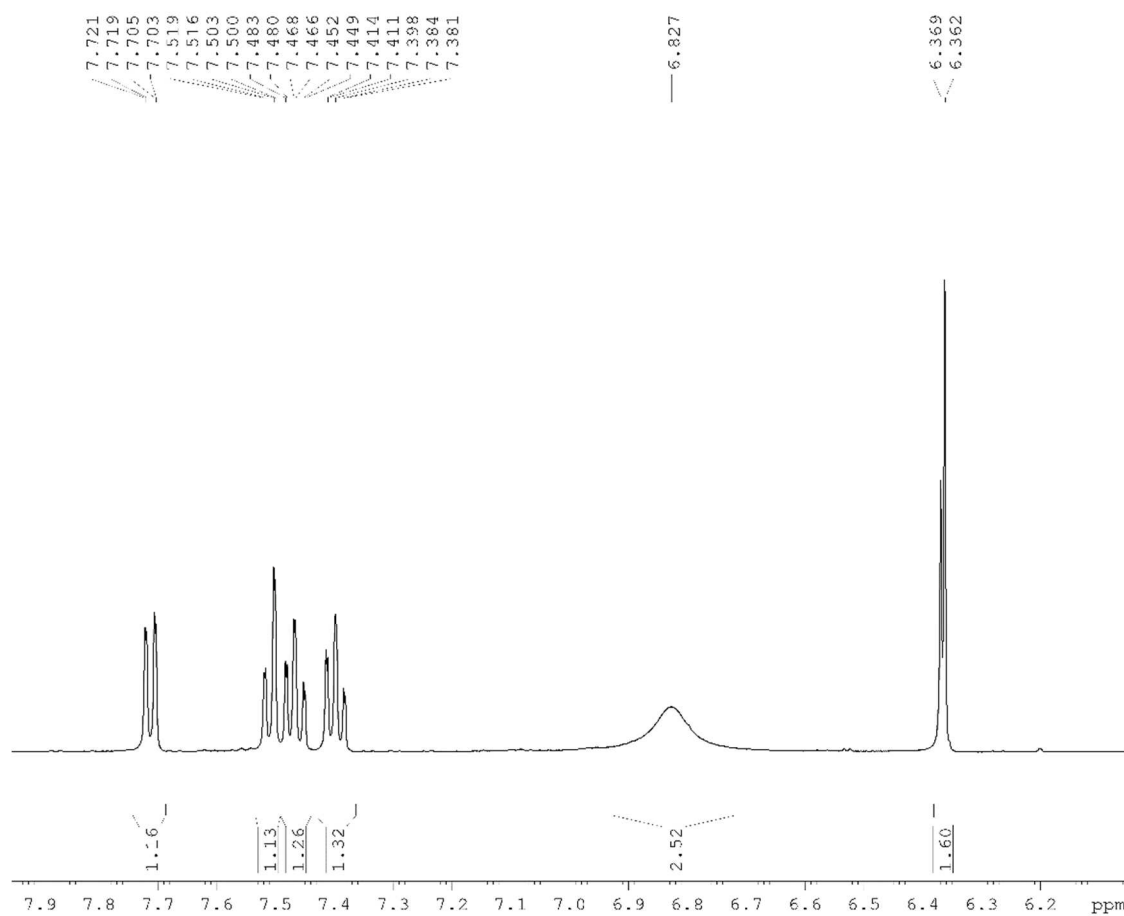
## 2.3 Syntéza standardu 2-aminofenoxazin-3-onu

Pro syntézu 2-aminofenoxazin-3-onu (APX) se do baňky o objemu 250 ml opatřené zpětným chladičem a magnetickým míchadlem přidal roztok *o*-aminofenolu ( $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) v 50 ml ethanolu. Následně se ke směsi přidalo 50 ml etanolického roztoku *p*-benzochinonu ( $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Vzniklý etanolický roztok se promíchával pod refluxem po dobu 20 min. Poté se přešlo k zakoncetrování na vakuové rotační odparce na poloviční objem. Ochlazením se vyloučil pevný podíl, který se odsál a promyl etanolem. Surový produkt se musel přechistit sloupcovou chromatografií (silikagel/DCM-EtOAc 4:1 v/v), přičemž se získalo 440 mg (4,5 %) temně fialového produktu ( $R_f$  0,53). Zjednodušené schéma syntézy

ukazuje Obr. 28. To, zda se opravdu jedná o APX se ověřilo pomocí  $^1\text{H}$  NMR analýzy. Získané spektrum názorně demonstruje Obr. 29 a jeho záznam koresponduje se spektrem, které získal J. Zhou a kolektiv [86].



**Obrázek 28.** Schéma syntézy APX.



**Obrázek 29.**  $^1\text{H}$  NMR spektrum APX, kde (DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 7,71$  (dd;  $J = 1,4$  Hz,  $7,8$  Hz;  $1\text{H}$ );  $7,51$  (dd;  $J = 1,4$  Hz,  $8,2$  Hz;  $1\text{H}$ );  $7,47$  (td;  $J = 1,5$  Hz,  $7,2$  Hz;  $1\text{H}$ );  $7,40$  (m;  $1\text{H}$ );  $6,83$  (brs,  $2\text{H}$ );  $6,37$  (s,  $1\text{H}$ );  $6,36$  (s,  $1\text{H}$ ) ppm.

## 2.4 Příprava pracovních roztoků

Pro kalibrační měření se roztoky produktů DAP a APX připravily v čistém metanolu z důvodu nízké rozpustnosti těchto látek ve vodě. Pro každý produkt tak vznikl zásobní roztok v 10ml odměrné baňce s výslednou koncentrací  $0,002 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Vzhledem k velmi nízké teoretické navážce se nejprve připravil koncentrovanější roztok o koncentraci  $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , a to navážením

0,0234 g pevného standardu DAP o čistotě 90 % do 10ml odměrné baňky. Baňka se následně doplnila po rysku metanolem. Z takto připraveného roztoku se potom odpipetovaly 2 ml do další 10ml odměrné baňky, čímž vznikl roztok o požadované koncentraci  $0,002 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Analogický postup se aplikoval také při přípravě zásobního roztoku APX, avšak počáteční navážka činila 0,0212 g. Také zde se z koncentrovanějšího roztoku odpipetovaly 2 ml do nové 10ml odměrné baňky pro dosažení koncentrace  $0,002 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Připravené zásobní roztoky produktů se uchovávaly v chladničce při teplotě  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Roztoky substrátů OPD, PPD a OAP se připravovaly do odměrných baněk o objemu 10 ml a následně se převedly do světlu nepřístupných plastových zkumavek. Všechny roztoky substrátů se musely připravit před analýzou vždy čerstvé o koncentraci  $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , a to v příslušných pufrech. Ke každému substrátu vznikly vždy dva zásobní roztoky, jeden s draselno-octanovým pufrem (AcKB, pH 4,5) a druhý s fosfátovým pufrem (PB, pH 6,5). Oba pufrы byly voleny vzhledem k optimální aktivitě a stabilitě používaných enzymů na základě odborné literatury a předchozích experimentů. Namísto sodného acetátového pufru byl zvolen draselný acetátový pufr, z důvodu mírného inhibičního účinku sodné soli na enzym Lac [87–89]. Navážka OPD i PPD činila 0,0108 g, zatímco pro OAP se navážilo 0,0109 g.

Příprava PB o objemu 600 ml a koncentraci  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  s výsledným pH 6,5 probíhala smísením  $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  roztoků hydrogenfosforečnanu sodného a dihydrogenfosforečnanu sodného. Draselno-acetátový pufr o koncentraci  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a pH 4,5 smícháním zásobních roztoků kyseliny octové a octanu draselného o koncentraci  $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Objem připraveného acetátového pufru činil rovněž 600 ml. Požadované hodnoty pH obou pufrů se ověřovaly pomocí pH metru WTW inoLab pH 720 vybaveného elektrodou WTW SenTix 81. Připravené pufrы se uchovávaly při laboratorních podmínkách.

Výchozí roztoky enzymů TYR a HRP se připravily zvlášť, zatímco výchozí roztok enzymu Lac se připravovat nemusel, neboť Lac ( $2500 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) dorazila již v podobě roztoku o koncentraci  $50 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  přímo od dodavatele. Zásobní roztok enzymu TYR se zhotovil navážením 0,7 mg lyofilizovaného prášku ( $1000 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) do tmavé vialky, kam se přidalo 350  $\mu\text{l}$  PB. Výsledná koncentrace zásobního roztoku TYR tak měla hodnotu  $2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Podobný postup se použil pro přípravu zásobního roztoku enzymu HRP. Do vialky z tmavého skla se navážily 2 mg HRP ( $150 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) a následně se pipetou přidal objem 1 ml PB. Pro správnou funkci enzymu HRP se připravil také 0,3% roztok peroxidu vodíku. Tento roztok vznikl odpipetováním 1 ml 30% peroxidu vodíku do 10ml odměrné baňky a doplněním destilovanou vodou po rysku. Připravené zásobní roztoky enzymů se uchovávaly v mrazničce při teplotě  $-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## 2.5 Pracovní podmínky a parametry

Veškerá měření probíhala při laboratorních podmínkách. Všechny roztoky analyzované pomocí UV-VIS spektrometru se snímaly v křemenné kyvetě s délkou optické dráhy 1 cm. Šířka štěrbinu spektrometru se nastavila na 1 nm. UV-VIS spektra pro kalibrační řadu a měření stability substrátů na vzdušném kyslíku se snímala v rozsahu vlnových délek od 200 do 800 nm při rychlosti 0,5 nm za sekundu. Pro získání kinetických křivek nárůstu produktu se v softwaru UVProbe zvolil režim „kinetics“, kde se nastavil celkový čas snímání enzymové kinetiky na 1800 s a hodnoty absorbance se zaznamenávaly každých 10 s. Pro měření s enzymy TYR a HRP byl použit pufr PB (pH 6,5), zatímco pro měření s Lac se používal pufr AcKB (pH 4,5). Příslušné pufrы byly také vždy využity jako blank.

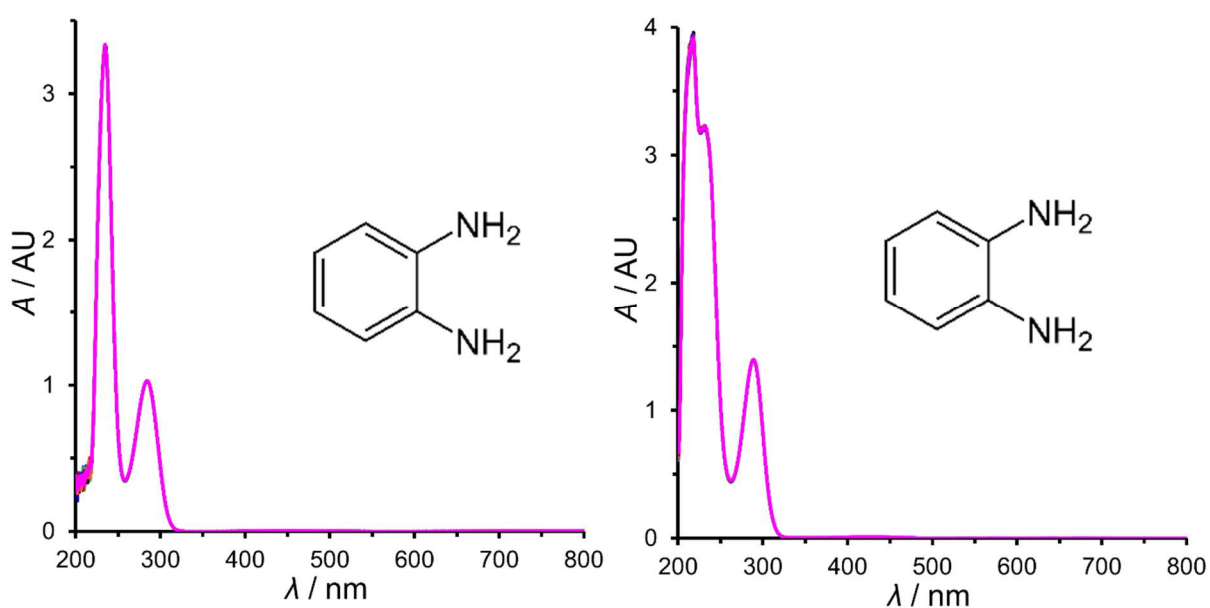
Pro snímání spekter polymerního produktu vzniklého oxidací PPD (Bandrowského báze) se na FTIR spektrometru použila metoda „Transmission Lab.“. Oblast snímání spektra pokrývala interval v rozmezí  $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$  při rozlišení  $4\text{ cm}^{-1}$  a s celkovým počtem 25 skenů na jednu analýzu. Zkoumaný roztok se aplikoval na krystal z bromidu draselného (KBr).  $^1\text{H}$  NMR spektrum pro ověření struktury vysyntetizovaného APX bylo měřeno na přístroji Bruker Ascend při frekvenci 500,13 MHz. Spektrum bylo měřeno v DMSO- $d_6$  a kalibrováno na střed multipletu rozpouštědla ( $\delta = 2,50\text{ ppm}$ ).

### 3 VÝSLEDKY A DISKUZE

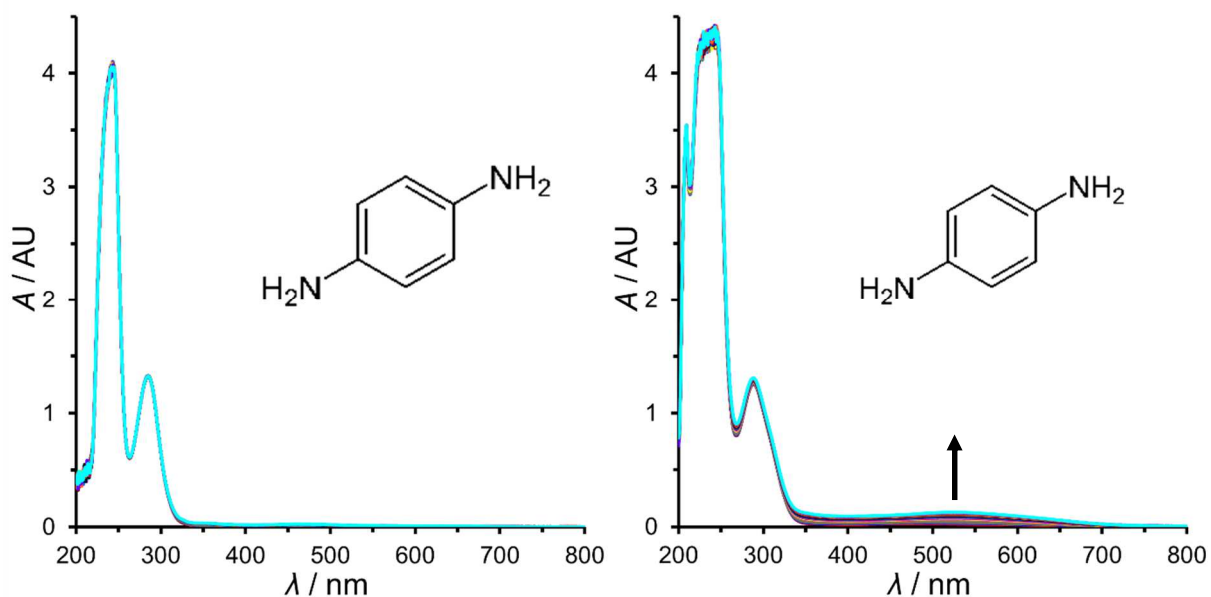
V této kapitole se diskutuje stabilita a chování zkoumaných substrátů, jak v přítomnosti testovaných enzymů, tak i bez nich (snaha zjistit, zda substráty samotné podléhají oxidaci vlivem kyslíku obsaženému ve vzduchu). Dále kapitola uvádí kalibrační závislosti nutné pro následný výpočet nárůstu koncentrace produktů, včetně jejich UV-VIS spekter. Detailně je také diskutována katalyticky řízená oxidační přeměna PPD na BB. V závěru kapitoly se popisuje katalytická aktivita testovaných enzymů vůči zkoumaným substrátům včetně výpočtu vybraných parametrů enzymové kinetiky. Přehledové tabulky na konci kapitoly tyto parametry pro jednotlivé enzymy srovnávají.

#### 3.1 Stabilita substrátů

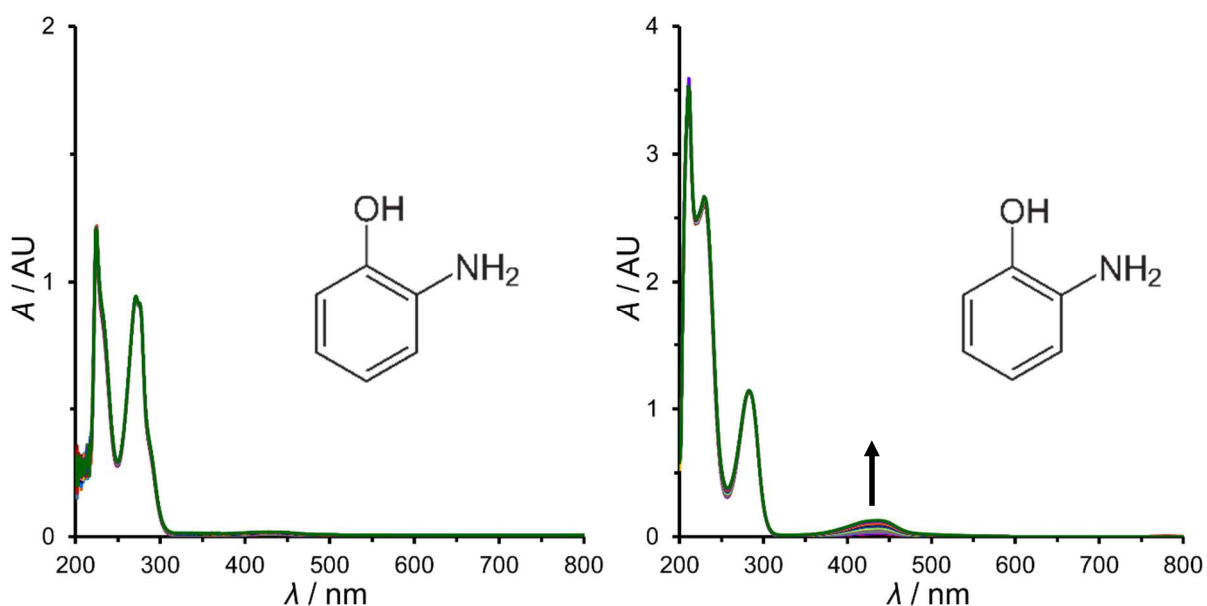
Jelikož jsou všechny zmíněné polutantů z permanentních vlasových barev v odpadních vodách přirozeně vystaveny vzdušnému kyslíku, je důležité experimentálně ověřit, zda se samovolně vzdušným kyslíkem neoxidují. Pokud by vzdušný kyslík tyto látky významně oxidoval, musela by se tato skutečnost brát v potaz při studiu enzymové kinetiky. Pro účel měření stability substrátů OPD a OAP na vzdušném kyslíku se do kyvety napipetovaly 3 ml roztoku daného substrátu o koncentraci  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Stabilita se proměřovala jak v AcKB pufru, tak v PB pufru. Spektra byla snímána každých 5 min po celkovou dobu 100 min, bylo tak obdrženo celkem 20 spekter pro každý substrát a pufr. Obdržená UV-VIS spektra se následně superponovala a jsou ilustrována na Obr. 30 (OPD), Obr. 31 (PPD) a Obr. 32 (OAP).



**Obrázek 30.** UV-VIS absorpční spektra  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  OPD v AcKB (pH 4,5; vlevo) a v prostředí pufru PB (pH 6,5; vpravo) během analýzy stability OPD.



**Obrázek 31.** UV-VIS absorpční spektra  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  PPD v AcKB (pH 4,5; vlevo) a v prostředí PB (6,5; vpravo) pro analýzu stability PPD.



**Obrázek 32.** UV-VIS absorpční spektra  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  OAP v AcKB (pH 4,5; vlevo) a v prostředí PB (pH 6,5; vpravo) pro analýzu stability OAP.

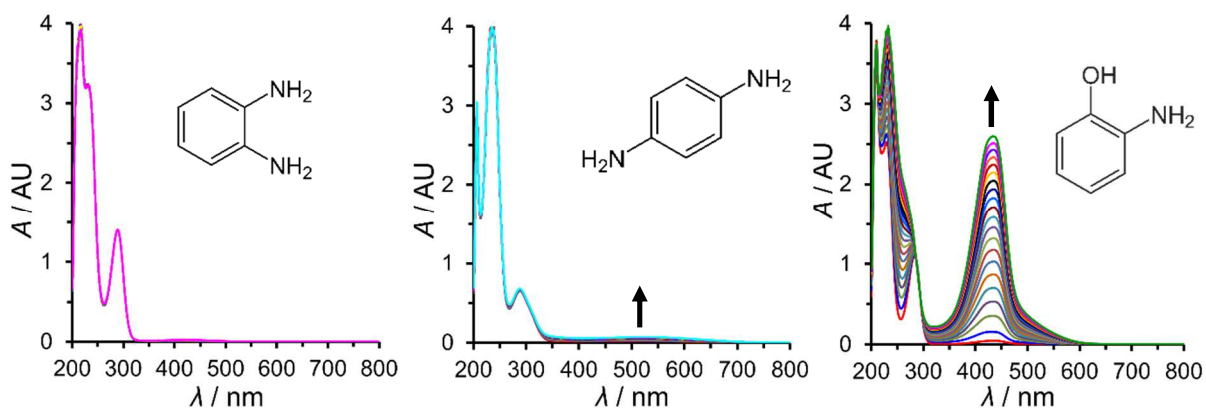
Z naměřených spekter stability zkoumaných látek lze usoudit, že OPD vykazuje nejvyšší stabilitu, a to v obou pufracích prostředích. Tudíž nepodléhá autooxidaci rozpuštěným vzdušným kyslíkem. PPD je zcela stabilní v prostředí AcKB, zatímco v prostředí PB již dochází k mírné samovolné oxidaci, jenž se projevila širokým pásem vzniklého polymerního produktu PPD, zejména pak tzv. Bandrowského báze [27]. Pro odhad, kolik procent původního PPD podleho přeměně na produkty oxidace byla využita změna absorbance

mezi prvním a posledním zaznamenaným spektrem (časový rozestup 100 min), která byla odečtena pro  $\lambda$  poklesu substrátu při 270 nm. Absorbance PPD při 270 nm pro první měření činila 0,816, zatímco absorbance posledního měření 0,913. Tento rozdíl odpovídá 10,6 %, což ukazuje na významnou nestabilitu PPD v neutrálním prostředí.

Pro substrát OAP lze konstatovat podobný závěr jako v případě PPD. Tedy, že v prostředí kyselějšího AcKB je OAP na vzduchu stabilní, ale v prostředí PB pufru se již autooxiduje. Produktem této oxidace je s vysokou pravděpodobností 2-aminofenoxazin-3-on (APX), jehož  $\lambda_{\max}$  odpovídala 421 nm. Výpočtem procentuálního rozdílu mezi absorbancí prvního měření ( $A = 0,021$ ) a posledního měření ( $A = 0,119$ ) se odhadla míra přeměny OAP na APX za 100 min na vzdušném kyslíku na 17,6 %.

### 3.2 Katalytická aktivita enzymu tyrosinázy

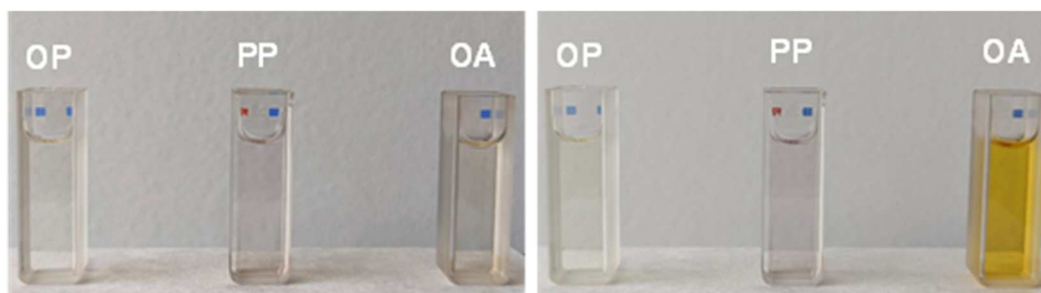
Pufrované roztoky všech tří vybraných zástupců polutantů (OPD, PPD a OAP) se spektrofotometricky proměřili v přítomnosti enzymu tyrosinázy (TYR), aby se zjistilo, který ze substrátů podléhá oxidační katalýze tímto enzymem. Do kyvety se napipetovaly 3 ml  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  příslušného substrátu a  $0,0067 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  enzymu TYR, což odpovídá aktivitě enzymu v kyvetě 20 U. Z důvodu ideálních katalytických podmínek se UV-VIS spektra proměřovala pouze v PB o pH 6,5. Jednotlivá absorpční spektra se snímala každé 2 min po celkovou dobu 40 min, což vedlo k obdržení celkem 20 spekter pro každý substrát. Obr. 33 demonstruje získaná spektra, ze kterých je zřejmé že, TYR výrazně katalyzuje oxidaci pouze OAP na výsledný produkt 2-aminofenoxazin-3-on (APX) s  $\lambda_{\max} = 434 \text{ nm}$ .



**Obrázek 33.** UV-VIS absorpční spektra pro  $500 \mu\text{mol l}^{-1}$  OPD, PPD a OAP v PB (pH 6,5) v přítomnosti  $0,0067 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  TYR (20 U).

Obr. 34 zachycuje barevnou změnu jednotlivých substrátů před nadávkováním enzymu a po 40 min probíhající enzymatické reakce. Ze zbarvení pracovních roztoků v křemených

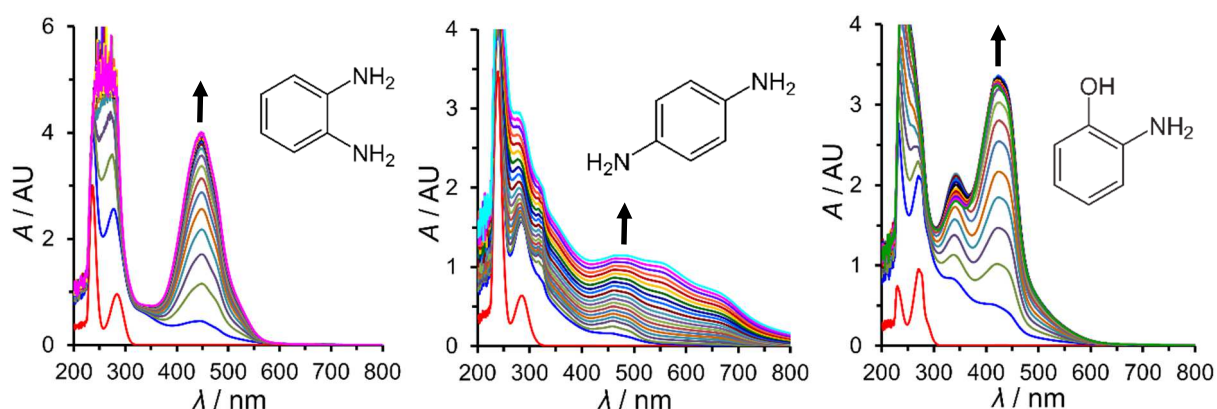
kyvetách lze jednoznačně konstatovat, že oxidace OPD a PPD vzdušným kyslíkem není tyrosinázou katalyzována.



**Obrázek 34.** Barevná změna roztoků substrátů před a po katalyzované oxidaci tyrosinázou.

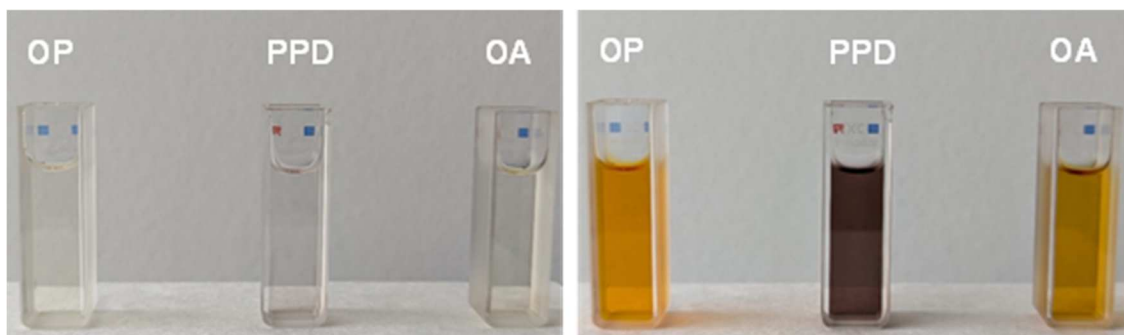
### 3.3 Katalytická aktivita enzymu lakázy

Ve srovnání s předchozím enzymem vykazuje lakáza (Lac) mnohem vyšší enzymatickou aktivitu, což dokazují obdržená UV-VIS spektra na Obr. 35. Postup měření byl totožný jako v předchozím případě, jen s rozdílem, že v kyvetě byla přítomna Lac o koncentraci  $0,1333 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  (odpovídá aktivitě 20 U v kyvetě) přičemž se katalytická aktivita proměřovala pouze v AcKB (pH 4,5), neboť tento pufr představuje pro aktivitu Lac optimální prostředí z hlediska pH a přítomnosti draselných kationtů namísto inhibující sodné soli.



**Obrázek 35.** Záznam UV-VIS spekter obdržných pro  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  OPD, PPD a OAP v AcKB (pH 4,5) v přítomnosti  $0,1333 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  Lac (20 U).

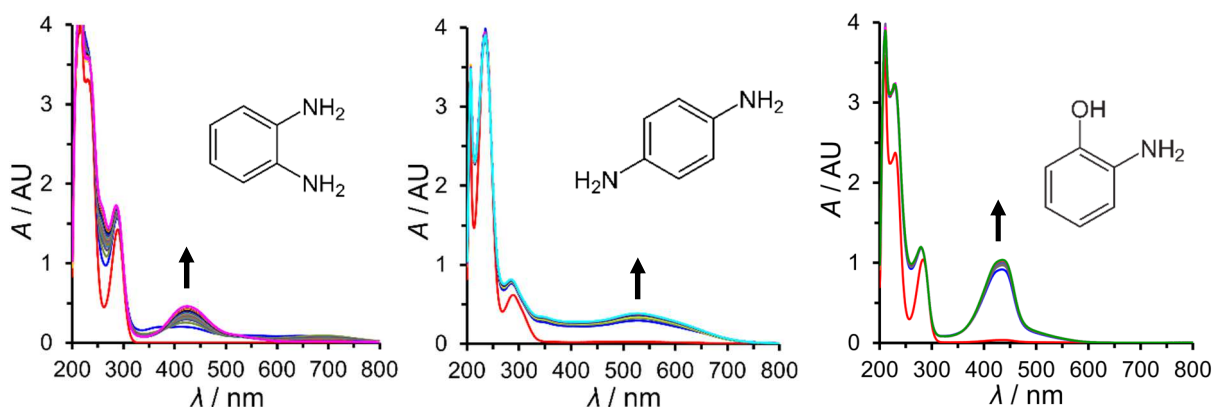
V případě OPD došlo k tvorbě intenzivního pásu produktu 2,3-diaminofenazinu (DAP) při  $\lambda_{\text{max}} = 446 \text{ nm}$ . Pro PPD lze pozorovat široký pás s několika maximy. Substrát OAP se enzymaticky oxidoval primárně na produkt 2-aminofenoxazin-3-on (APX), při  $\lambda_{\text{max}} = 440 \text{ nm}$ . Obr. 36 zachycuje barevnou změnu jednotlivých substrátů před nadávkováním enzymu a po 40 min probíhající katalýzy. Výrazná barevná změna všech roztoků substrátů je v souladu s výraznými absorpčními pásy, a dokazuje všestranné použití Lac v oxidativní přeměně studovaných polutantů.



**Obrázek 36.** Barevná změna roztoků substrátů před a po katalyzované oxidaci lakázou.

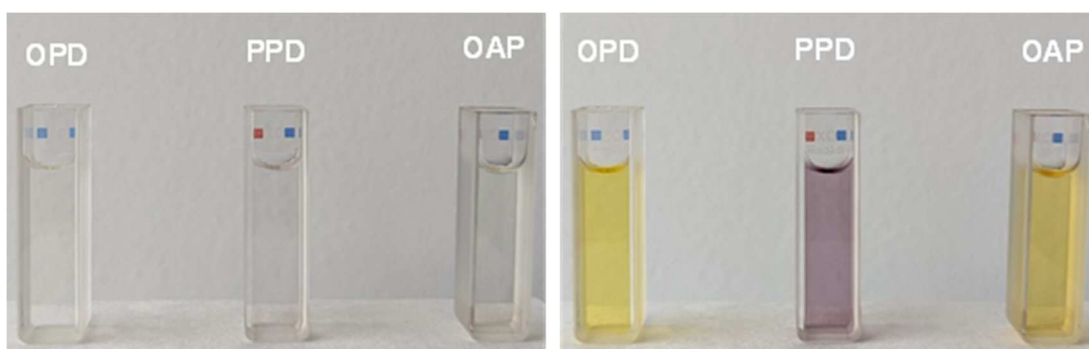
### 3.4 Katalytická aktivita enzymu křenové peroxidázy

Postup měření katalytické aktivity křenové peroxidázy (HRP) vůči vybraným polutantům z permanentních barev na vlasy byl podobný jako v předchozích dvou případech, kdy koncentrace přítomné HRP byla  $0,0013 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  (odpovídá aktivitě 0,6 U na objem kyvety). PB (pH 6,5) se využil jako vhodné pufrční prostředí. Aby použitý enzym oxidaci substrátů katalyzoval, bylo nezbytné přidat do kyvety 2  $\mu\text{l}$  0,3% peroxidu vodíku. Obr. 37 ukazuje obdržaná UV-VIS spektra, na základě kterých lze konstatovat, že HRP katalyzuje oxidaci všech tří substrátů.



**Obrázek 37.** Záznam UV-VIS absorpčních spekter pro  $500 \mu\text{mol l}^{-1}$  OPD, PPD a OAP v PB (pH 6,5) v přítomnosti  $0,0013 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  enzymu HRP (0,6 U).

Katalyzovaná oxidace OPD dala vzniknout absorpčnímu pás produktu DAP při  $\lambda_{\max} = 421$  nm. Pro PPD lze pozorovat vznik širokého pásu od 450 do 700 nm. Substrát OAP se oxidoval na jasně definovaný pás produktu APX pozorovatelný při  $\lambda_{\max} = 434$  nm. Obr. 38 zachycuje barevnou změnu jednotlivých substrátů před nadávkováním enzymu a po 40 min probíhající enzymatické reakce s HRP. Fotografie kyvet názorně zachycuje skutečnost, že HRP katalyzuje oxidaci všech testovaných substrátů obdobně jako předchozí Lac, což kopíruje podobu získaných absorpčních pásů substrátů. Ovšem na rozdíl od Lac je pro funkčnost HRP vyžadována přítomnost peroxidu vodíku. Tato skutečnost výrazně omezuje možnosti praktického nasazení daného enzymu při degradaci sledovaných polutantů v odpadních vodách.



**Obrázek 38.** Barevná změna roztoků substrátů před a po katalyzované oxidaci křenovou peroxidázou.

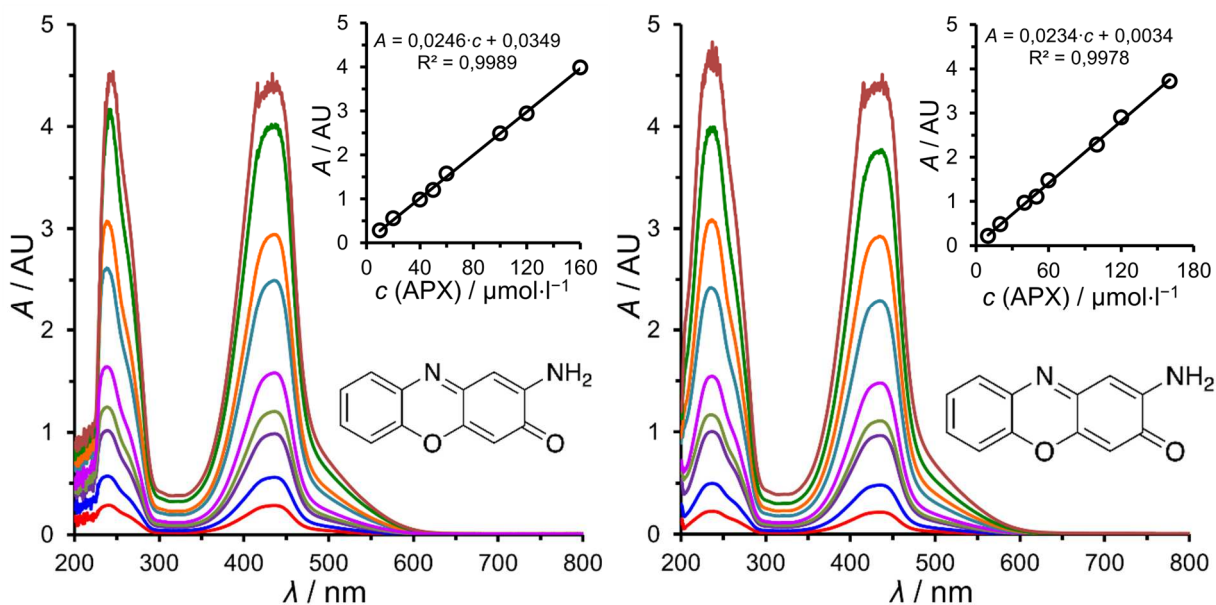
### 3.5 Kalibrační závislosti vzniklých produktů

Jedním z cílů této diplomové práce bylo kriticky zhodnotit účinnost enzymatické degradace zmíněných polutantů z barev na vlasy. Z tohoto důvodu se musel zaznamenat nárůst koncentrace vznikajících produktů nebo pokles koncentrace výchozích substrátů. Pro účely této vědecké práce se zvolila první zmíněná možnost. Ze substrátu OPD vzniká oxidativní transformací 2,3-diaminofenazin (DAP), z PPD polymerní Bandrowského báze (BB) a z OAP vzniká 2-aminofenoxazin-3-on (APX). Bohužel pro BB se nepodařilo pořídit chemicky čistou základní látku, tudíž v práci není hodnocena enzymová kinetika pro substrát PPD. Tab. 3 uvádí analytické parametry kalibračních závislostí.

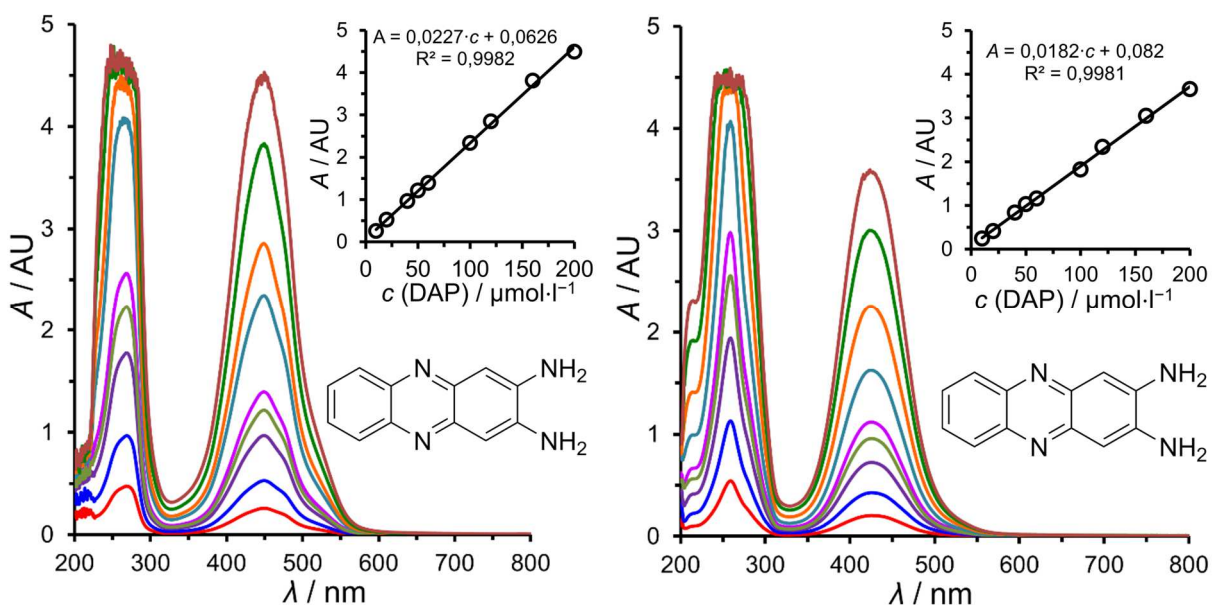
**Tabulka 3.** Validace kalibračních závislostí pro vzniklé produkty.

Produkt	$\lambda_{\max}$ / nm	$c$ / $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	$k$ / AU	$R^2$
APX v AcKB	440	10–160	0,0246	$R^2 = 0,9989$
APX v PB	434	10–160	0,0234	$R^2 = 0,9978$
DAP v AcKB	446	10–200	0,0227	$R^2 = 0,9982$
DAP v PB	421	10–200	0,0182	$R^2 = 0,9981$

Na Obr. 39 a 40 jsou graficky znázorněny kalibrační přímky pro produkt APX a DAP v obou používaných pufrch. Na následujících obrázcích jsou vedle kalibračních křivek demonstrována také UV-VIS absorpční spektra těchto „kalibračních“ koncentrací pro obě kalibrované látky. Červená odpovídá koncentraci měřené látky v kvetě  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , modrá  $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , fialová  $40 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , olivově zelená  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , purpurová  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , azurová  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , oranžová  $120 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , tmavě zelená  $160 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a hnědá  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .



**Obrázek 39.** UV-VIS absorpční spektra kalibračních koncentrací APX v AcKB (pH 4,5; vlevo) a PB (pH 6,5; vpravo) a odpovídající kalibrační přímky.

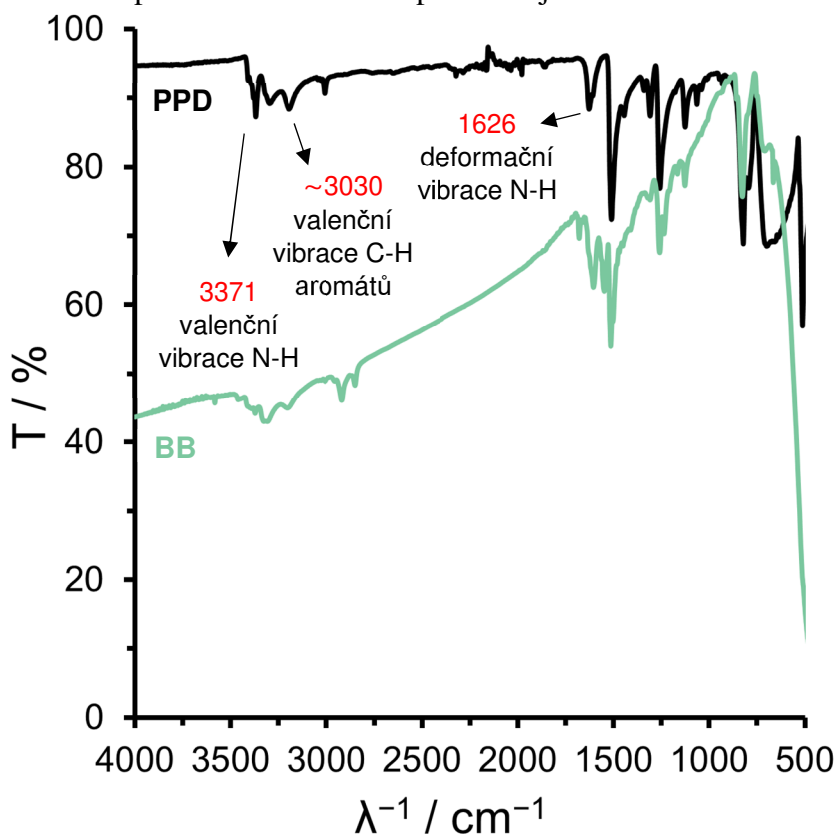


**Obrázek 40.** UV-VIS absorpční spektra kalibračních koncentrací DAP v pufru AcKB (pH 4,5; vlevo) a v pufru PB (pH 6,5; vpravo) a odpovídající kalibrační přímky.

### 3.6 Katalyticky řízená oxidační přeměna *p*-fenylendiaminu

Ačkoliv nebyl pro účely diplomové práce k dispozici čistý standard Bandrowského báze (BB), jakožto produktu oxidace PPD, byla alespoň přítomnost tohoto produktu ověřena kvalitativně, a to pomocí infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR). Obr. 41 zobrazuje naměřené infračervené (IČ) spektrum pro nezreagovaný substrát PPD a spektrum pro extrahovanou BB. Ten se připravil z výchozího zásobního roztoku PPD, který měl koncentraci  $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , tak že 10 ml se nechalo reagovat s 25  $\mu\text{l}$  výchozího roztoku lakázy o koncentraci  $50 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  ( $2500 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) po 30 min.

Zreagovaný roztok se převedl do dělicí nálevky a přidaly se k němu 2 ml diethyletheru. Protože je BB nejstabilnější v zásaditém prostředí [90], upravilo se pH roztoku na hodnotu 9 pomocí pevného hydroxidu sodného, přičemž došlo ke změně barvy roztoku z hnědofialové na červený odstín. Následným vytřepáváním došlo k zabarvení organické fáze intenzivně červenou barvou, zatímco vodná fáze získala světlejší odstín v důsledku zakoncentrování BB v organické fázi. Tato organická vrstva se následně převedla do malé skleněné vialky a použila se pro vlastní spektroskopickou analýzu v infračervené oblasti. Vnější podoba upravovaného roztoku v různých fázích přípravy je na Obr. 42. Vzhledem k charakteristickému chování BB při různých hodnotách pH a typickému IČ spektru [66, 91], lze bezpečně konstatovat, že hlavní produkt oxidace PPD představuje BB.



**Obrázek 41.** Naměřené IČ transmittanční spektrum pro PPD (černá) a BB (zelená).



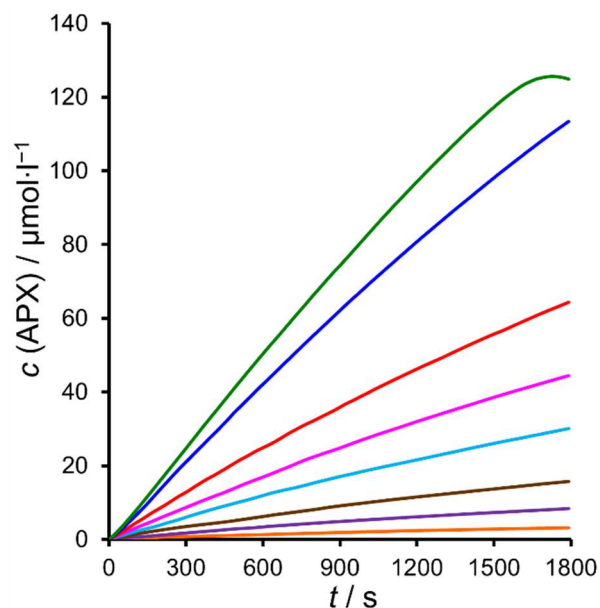
**Obrázek 42.** Zreagovaný roztok PPD před vytřepáním do diethyletheru a úpravou pH (vlevo), po vytřepání a úpravě pH (uprostřed) a izolovaná organická fáze pro analýzu (vpravo).

### 3.7 Porovnání katalytické aktivity vybraných enzymů

Jelikož Bandrowského báze vzniká polymerací tří molekul PPD, přičemž nelze vyloučit, že obdržené UV-VIS spektrum neodráží reakční směs, ve které je přítomen jak původní PPD, vznikající meziprodukt (dimer), tak i finální produkt BB, nebylo možné porovnat aktivitu všech tří polyfenoloxidázových enzymů vůči PPD. Z rychlosti barevné přeměny výchozího roztoku PPD bylo pouze možné usoudit, který z nich je nejefektivnější, a to HRP. Tudíž následující kapitola se věnuje pouze hodnocení katalytické aktivity studovaných enzymů vůči substrátům OPD a OAP.

#### 3.7.1 Kinetika katalytické oxidace *o*-aminofenolu prostřednictvím tyrosinázy

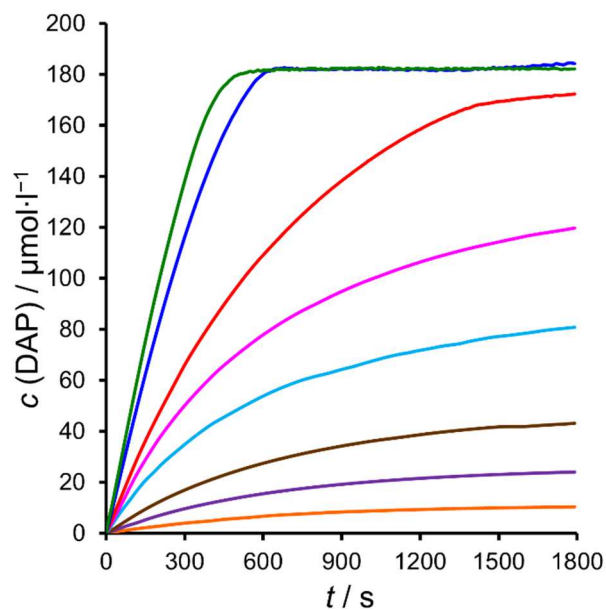
Substrát OAP se oxidoval na produkt APX s absorpčním maximem při  $\lambda_{\max} = 434 \text{ nm}$ . Tato hodnota vlnové délky se použila pro stanovení kinetiky odpovídající katalytické reakce. Z hlediska stability a optimální aktivity TYR, se veškerá kinetická měření prováděla v prostředí PB (pH 6,5). Celkem se proměřilo osm různých koncentrací OAP s konstantním množstvím enzymu  $0,0067 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  TYR, což odpovídá aktivitě 20 U v kyvetě. Kinetika oxidační přeměny OAP se vždy měřila po celkovou dobu 30 min. Získané hodnoty absorbancí na čase se následně přepočety na hodnoty koncentrací narůstajícího množství produktu APX na čase. Naměřené kinetické křivky graficky znázorňuje Obr. 43.



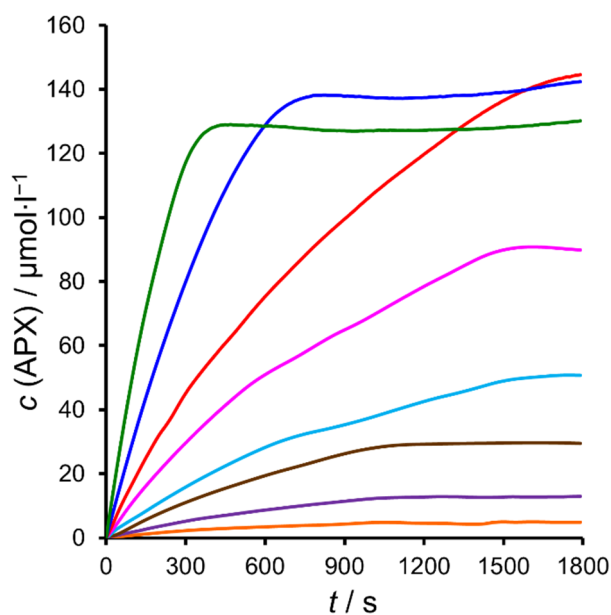
**Obrázek 43.** Kinetické křivky oxidace 16,67 (oranžová), 50 (fialová), 100 (hnědá), 200 (světle modrá), 300 (purpurová), 500 (červená), 1000 (tmavě modrá) a 1500  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  OAP (zelená) v PB (pH 6,5) katalyzované pomocí 0,0067  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  TYR (20 U) snímané při  $\lambda_{\text{max}}(\text{APX}) = 434 \text{ nm}$  po dobu 30 min.

### 3.7.2 Kinetika oxidace *o*-fenylendiaminu a *o*-aminofenolu katalyzovaná lakázou

Substrát OPD se oxidoval na produkt DAP s absorpčním maximem při  $\lambda_{\text{max}} = 446 \text{ nm}$ . Oproti tomu substrát OAP se oxiduje na produkt APX s absorpčním maximem při  $\lambda_{\text{max}} = 440 \text{ nm}$ . Uvedené hodnoty vlnových délek se použily pro stanovení kinetiky odpovídajících katalytických reakcí. Z hlediska stability a optimální aktivity Lac, se veškerá kinetická měření prováděla v prostředí AcKB (pH 4,5). Pro každý substrát se proměřilo celkem osm různých koncentrací, vždy s konstantním množstvím enzymu 0,1333  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , což odpovídá aktivitě enzymu 20 U v objemu kvety. Kinetika oxidační přeměny se vždy měřila po celkovou dobu 30 min. Získané hodnoty absorbancí na čase se následně přepočety na hodnoty koncentrací narůstajícího množství odpovídajícího produktu na čase. Naměřené kinetické křivky pro substrát OPD graficky znázorňuje Obr. 43, zatímco Obr. 44 zachycuje naměřené kinetické křivky pro substrát OAP.



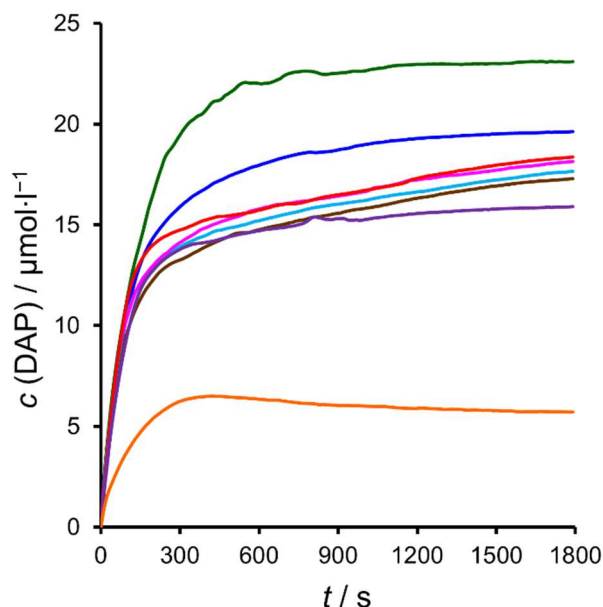
**Obrázek 44.** Kinetické křivky oxidace 16,67 (oranžová), 50 (fialová), 100 (hnědá), 200 (světle modrá), 300 (purpurová), 500 (červená), 1000 (tmavě modrá) a 1500  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  OPD (zelená) v AcKB (pH 4,5) katalyzované pomocí 0,1333  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  Lac (20 U) snímané při  $\lambda_{\text{max}}$  (DAP) = 446 nm po dobu 30 min.



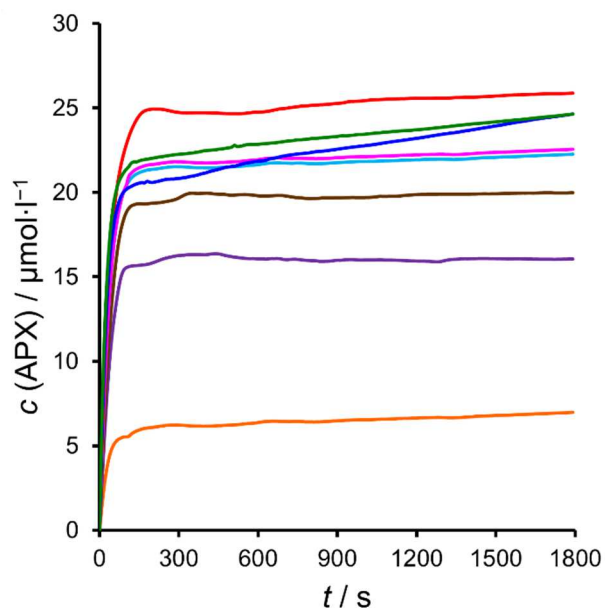
**Obrázek 45.** Kinetické křivky oxidace 16,67 (oranžová), 50 (fialová), 100 (hnědá), 200 (světle modrá), 300 (purpurová), 500 (červená), 1000 (tmavě modrá) a 1500  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  OAP (zelená) v AcKB (pH 4,5) katalyzované pomocí 0,1333  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  Lac (20 U) snímané při  $\lambda_{\text{max}}$  (APX) = 440 nm po dobu 30 min.

### 3.7.3 Kinetika oxidace *o*-fenylendiaminu a *o*-aminofenolu katalyzovaná křenovou peroxidázou

Substrát OPD se oxidoval na produkt DAP s absorpčním maximem  $\lambda_{\max}(\text{DAP}) = 421 \text{ nm}$ , zatímco substrát OAP se oxidoval na produkt APX s absorpčním maximem  $\lambda_{\max}(\text{APX}) = 434 \text{ nm}$ . Uvedené hodnoty vlnových délek se použily pro stanovení kinetiky odpovídajících katalytických reakcí. Z hlediska stability a optimální aktivity HRP se veškerá kinetická měření prováděla v prostředí PB (pH 6,5). Pro každý substrát se proměřilo celkem osm různých koncentrací, vždy s konstantním množstvím enzymu  $0,0013 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  HRP, což odpovídá aktivitě 0,6 U v objemu kyvety. Kinetika oxidační přeměny se měřila po celkovou dobu 30 min. Získané hodnoty absorbancí na čase se následně přepočely na hodnoty koncentrací narůstajícího množství odpovídajícího produktu na čase. Naměřené kinetické křivky pro substrát OPD graficky znázorňuje Obr. 46, zatímco Obr. 47 zachycuje naměřené kinetické křivky pro substrát OAP.



**Obrázek 46.** Kinetické křivky oxidace 16,67 (oranžová), 50 (fialová), 100 (hnědá), 200 (světle modrá), 300 (purpurová), 500 (červená), 1000 (tmavě modrá) a 1500  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  OPD (zelená) v PB (pH 6,5) katalyzované pomocí  $0,0013 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  HRP (0,6 U) snímané při  $\lambda_{\max}(\text{DAP}) = 421 \text{ nm}$  po dobu 30 min.



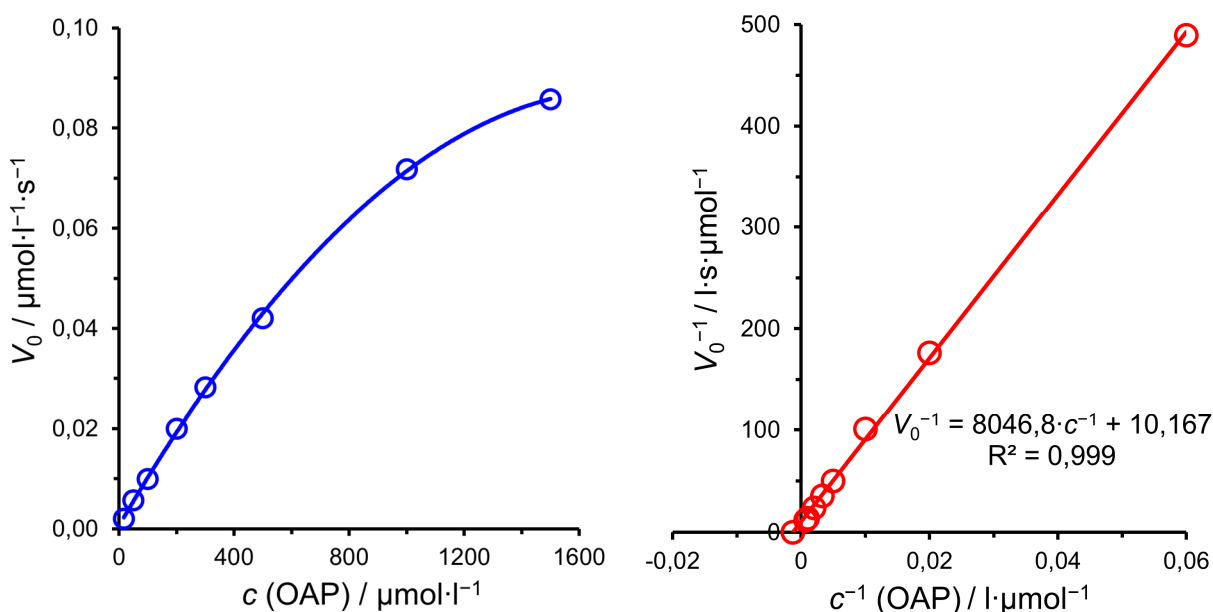
**Obrázek 47.** Kinetické křivky oxidace 16,67 (oranžová), 50 (fialová), 100 (hnědá), 200 (světle modrá), 300 (purpurová), 500 (červená), 1000 (tmavě modrá) a 1500  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  OAP (zelená) v PB (pH 6,5) katalyzované pomocí 0,0013  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  HRP (0,6 U) snímané při  $\lambda_{\text{max}}(\text{APX}) = 434 \text{ nm}$  po dobu 30 min.

### 3.8 Stanovení kinetických parametrů studovaných enzymů

Následující strany detailně popisují postup stanovení parametrů reakční kinetiky  $K_M$ ,  $V_{\text{max}}$  a  $k_{\text{cat}}$  jednotlivých enzymů pro dané substráty, včetně grafického zobrazení saturačních křivek a jejich linearizací, ze kterých se tyto parametry vypočítaly. Získané parametry se měly následně porovnat s parametry reakční kinetiky v databázi enzymů BRENDA nebo s parametry v odborné literatuře, nicméně ani zmíněná databáze, ani odborná literatura pro testované kombinace enzymů a substrátů tyto hodnoty neuvádí, tudíž lze předpokládat, že dosud nebyly stanoveny. Tato diplomová práce pokusila tyto parametry experimentálně stanovit, čímž rozšiřuje dosavadní poznatky v této oblasti a může posloužit jako základ pro další výzkum nebo praktické aplikace.

### 3.8.1 Stanovení kinetických parametrů tyrosinázy pro přeměnu *o*-aminofenolu

Naměřené hodnoty absorbancí vznikajícího produktu APX se pře počítaly na hodnoty koncentrací. Vzniklé kinetické křivky se poté proložily pro interval 0–600 s lineární funkcí, přičemž se dbalo na to, aby hodnota spolehlivosti  $R^2$  převyšovala hodnotu 0,99. Počáteční rychlost reakce  $V_0$  se pro každou koncentraci zjistila z hodnoty směrnice přímky  $k$ . Získané hodnoty  $V_0$  se následně vynesly vůči hodnotám příslušných koncentrací substrátu  $c$  (OAP), čímž se získala typická saturační křivka (Obr. 49). Poté se hodnoty  $V_0$  a  $c$  (OAP) transformovaly na jejich reciproké hodnoty, aby se využila linearizace podle Lineweaver-Burkovy metody. V tomto linearizovaném grafu se hodnoty, které měly vhodnou přímou závislost, proložily lineární funkcí. Dále se přidala hodnota mající souřadnice  $y = 0$ ;  $x = -q/k$ , která slouží pro určení  $K_M$ . Obr. 49 znázorňuje výše popsanou linearizaci, ze které se vypočítaly kinetické parametry  $K_M$ ,  $V_{max}$  a  $k_{cat}$  enzymu TYR pro substrát OAP. Výpočet zachycují rovnice (6), (7), (8), (9) a (10).



**Obrázek 48.** Saturační křivka TYR pro OAP a její linearizace dle Lineweaver-Burkovy metody.

$$y = kx + q \quad (6)$$

$$\frac{1}{V_0} = 8046,8 \cdot \frac{1}{c(\text{OAP})} + 10,167 \quad (7)$$

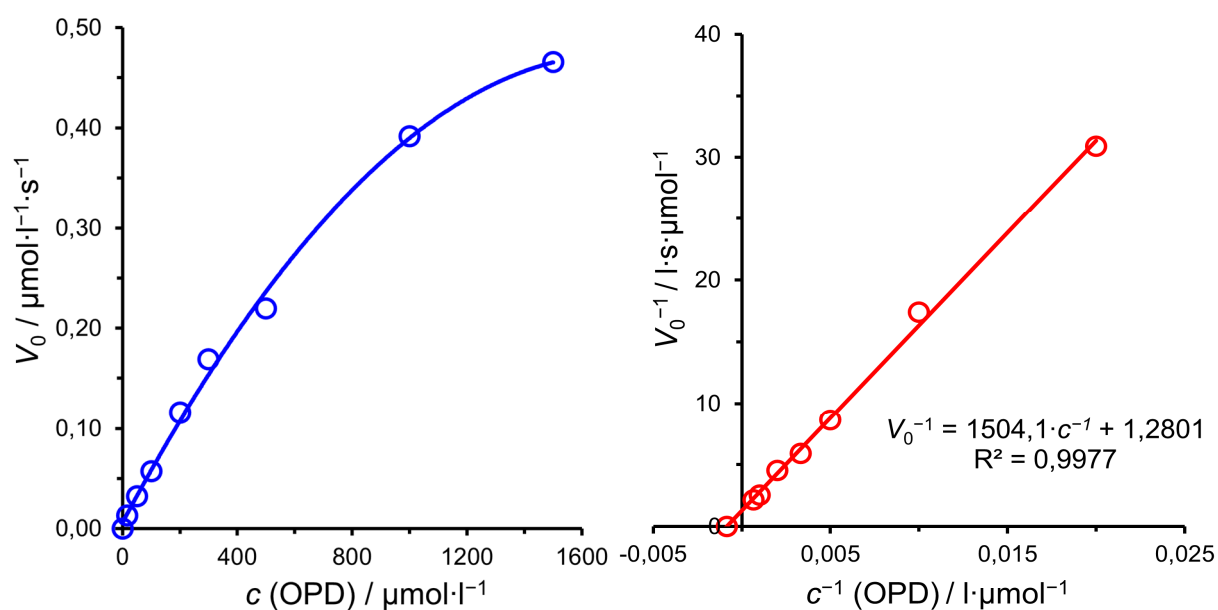
$$K_M = \frac{-1}{\frac{-1}{k}} = \frac{-1}{\frac{10,167}{8046,8}} \cong 791 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \quad (8)$$

$$V_{max} = \frac{1}{q} = \frac{1}{10,167} \cong 0,0984 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \quad (9)$$

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E_t]} = \frac{V_{max} [\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}]}{\frac{c_{TYR} [\text{g} \cdot \text{l}^{-1}]}{M_{TYR} [\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}]}} = \frac{9,84 \cdot 10^{-8}}{\frac{0,0067}{133\,000}} \cong 1,95 \text{ s}^{-1} \quad (10)$$

### 3.8.2 Stanovení kinetických parametrů lakázy pro oxidaci *o*-fenylendiaminu

Naměřené hodnoty absorbancí vznikajícího produktu DAP se pře počítaly na hodnoty koncentrací. Vzniklé kinetické křivky se poté proložily pro interval 0–300 s lineární funkcí, přičemž se dbalo na to, aby hodnota spolehlivosti  $R^2$  převyšovala hodnotu 0,99. Počáteční rychlost reakce  $V_0$  se pro každou koncentraci určila z hodnoty směrnice přímky  $k$ . Získané hodnoty  $V_0$  se následně vynesly vůči hodnotám příslušných koncentrací substrátu  $c$  (OPD), čímž se získala saturační křivka (Obr. 50). Poté se hodnoty  $V_0$  a  $c$  (OPD) transformovaly na jejich reciproké hodnoty, aby se dala využít linearizace podle Lineweaver-Burkovy metody. V tomto linearizovaném grafu se hodnoty, které měly vhodnou přímou závislost, proložily lineární funkcí. Dále se přidala hodnota mající souřadnice  $y = 0$ ;  $x = -q/k$ , která slouží pro určení  $K_M$ . Obr. 50 znázorňuje výše popsanou linearizaci, ze které se vypočítaly kinetické parametry  $K_M$ ,  $V_{max}$  a  $k_{cat}$  enzymu Lac pro substrát OPD. Postup výpočtu zmíněných parametrů je analogický s postupem v podkapitole 3.8.1.

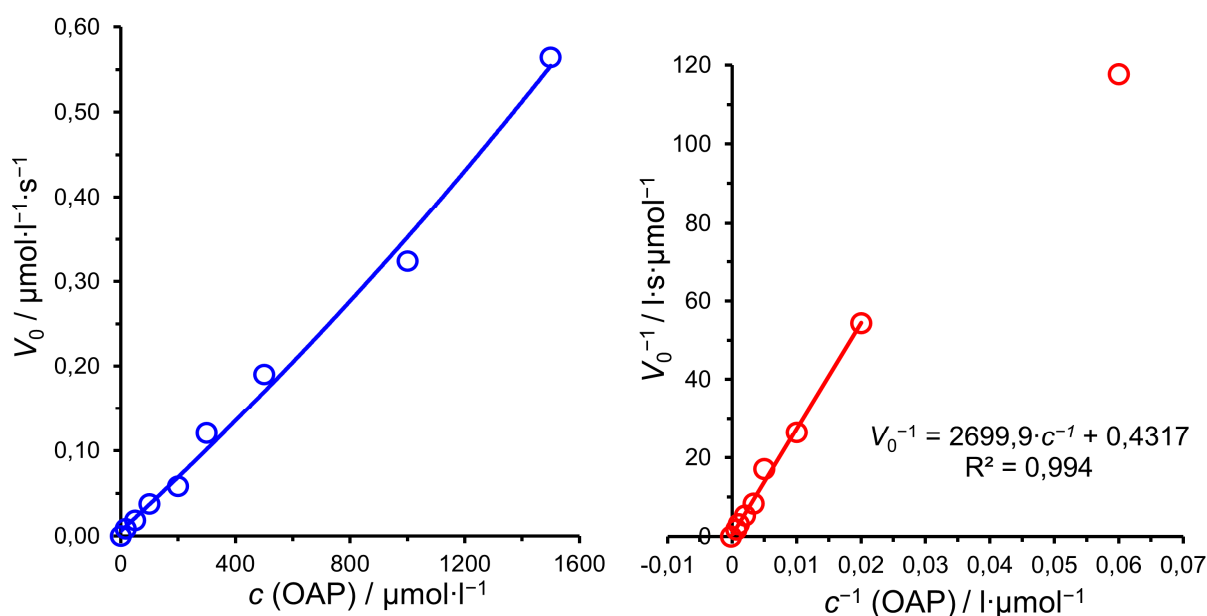


**Obrázek 49.** Saturační křivka Lac pro OPD a její linearizace dle Lineweaver-Burkovy metody.

### 3.8.3 Stanovení kinetických parametrů lakázy pro oxidaci *o*-aminofenolu

Naměřené hodnoty absorbancí vznikajícího produktu APX se pře počítaly na hodnoty koncentrací. Vzniklé kinetické křivky se poté proložily pro interval 0–250 s polynomem 2. stupně, přičemž se dbalo na to, aby hodnota spolehlivosti  $R^2$  byla vyšší než 0,99. Hodnota  $V_0$  se pro každou koncentraci určila z hodnoty lineárního koeficientu předpisu polynomu 2. stupně. Získané hodnoty  $V_0$  se následně vynesly vůči hodnotám příslušných koncentrací substrátu  $c$  (OAP), čímž se získala saturační křivka (Obr. 51). Poté se hodnoty

$V_0$  a  $c$  (OAP) transformovaly na jejich reciproké hodnoty, aby mohla být použita linearizace podle Lineweaver-Burkovy metody. V tomto linearizovaném grafu se hodnoty, které měly vhodnou přímou závislost, proložily lineární funkcí. Dále se přidala hodnota mající souřadnice  $y = 0$ ;  $x = -q/k$ , která slouží pro určení  $K_M$ . Obr. 51 znázorňuje výše popsanou linearizaci, ze které se vypočítaly kinetické parametry  $K_M$ ,  $V_{\max}$  a  $k_{\text{cat}}$  enzymu Lac pro substrát OAP. Postup výpočtu zmíněných parametrů se shoduje s postupem v podkapitole 3.8.1.

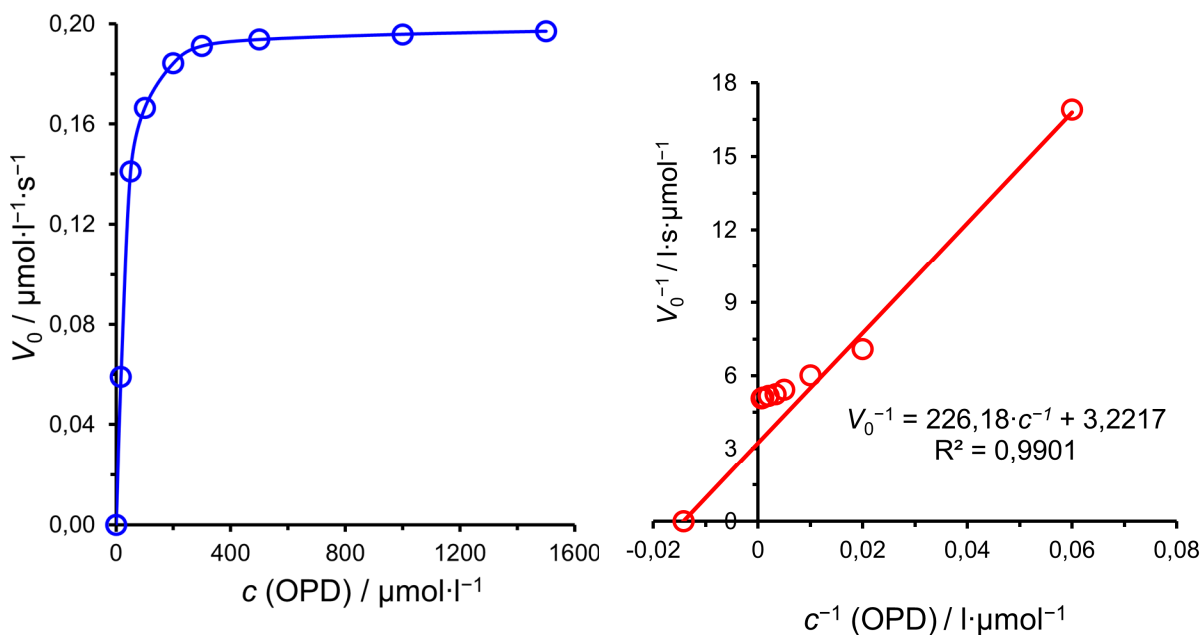


**Obrázek 50.** Saturační křivka Lac pro OAP a její linearizace dle Lineweaver-Burkovy metody.

### 3.8.4 Stanovení kinetických parametrů křenové peroxidázy pro *o*-fenylendiamin

Naměřené hodnoty absorbancí vznikajícího produktu DAP se přepočítaly na hodnoty koncentrací. Vzniklé kinetické křivky se poté proložily pro interval 0–200 s polynomem 4. stupně, přičemž se dbalo na to, aby hodnota spolehlivosti  $R^2$  byla vyšší než 0,99. Hodnota  $V_0$  se pro každou koncentraci určila z hodnoty lineárního koeficientu předpisu polynomu 4. stupně. Získané hodnoty  $V_0$  se následně vynesly vůči hodnotám příslušných koncentrací substrátu  $c$  (OPD), čímž se získala saturační křivka (Obr. 52). Poté se hodnoty  $V_0$  a  $c$  (OPD) transformovaly na jejich reciproké hodnoty, aby se využila linearizace podle Lineweaver-Burkovy metody. V tomto linearizovaném grafu se hodnoty, které měly vhodnou přímou závislost, proložily lineární funkcí. Dále se přidala hodnota mající souřadnice  $y = 0$ ;  $x = -q/k$ , která slouží pro určení  $K_M$ . Obr. 52 znázorňuje výše popsanou

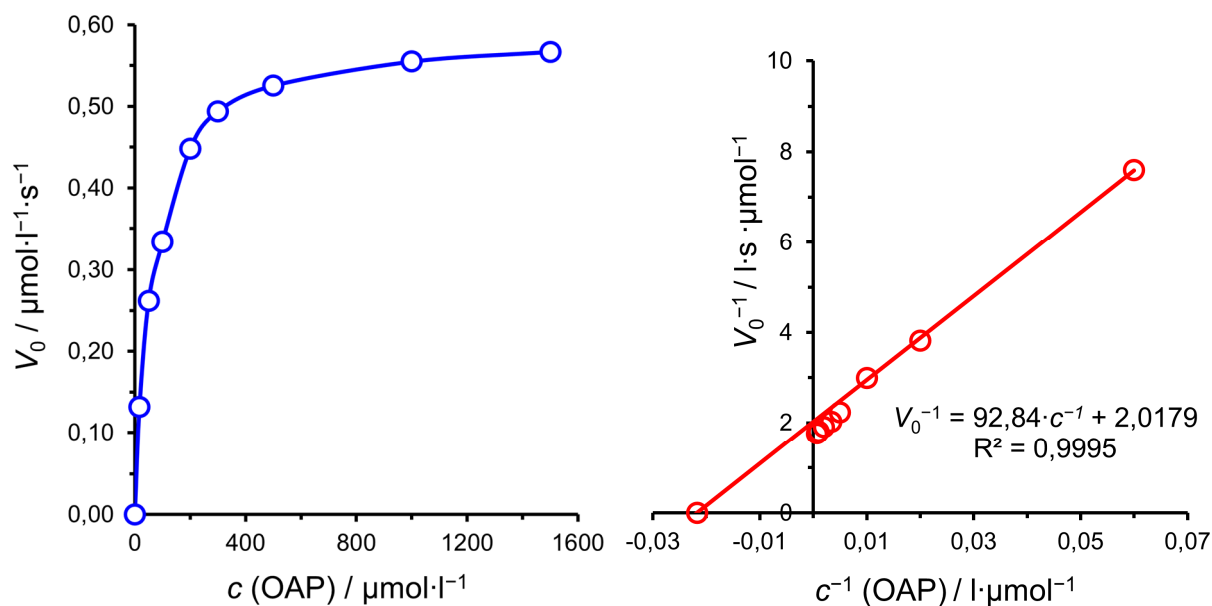
linearizaci, ze které se vypočítaly kinetické parametry  $K_M$ ,  $V_{\max}$  a  $k_{\text{cat}}$  enzymu HRP pro substrát OPD. Postup výpočtu zmíněných parametrů se shoduje s postupem v podkapitole 3.8.1.



**Obrázek 51.** Saturační křivka HRP pro OPD a její linearizace dle Lineweaver Burkovy metody.

### 3.8.5 Stanovení kinetických parametrů křénové peroxidázy pro *o*-aminofenol

Naměřené hodnoty absorbancí vznikajícího produktu APX se přepočítaly na hodnoty koncentrací. Vzniklé kinetické křivky se poté proložily pro interval 0–100 s polynomem 4. stupně, přičemž se dbalo na to, aby hodnota spolehlivosti  $R^2$  převyšovala alespoň 0,99. Hodnota  $V_0$  se určila z hodnoty lineárního koeficientu předpisu polynomu 4. stupně. Obdržené hodnoty  $V_0$  se následně vynesly vůči hodnotám příslušných koncentrací substrátu  $c$  (OAP), čímž se získala saturační křivka (Obr. 53). Poté se hodnoty  $V_0$  a  $c$  (OAP) transformovaly na jejich reciproké hodnoty, aby bylo možné využít linearizaci podle Lineweaver-Burkovy metody. V tomto linearizovaném grafu se hodnoty, které měly vhodnou přímou závislost, proložily lineární funkcí. Dále se přidala hodnota mající souřadnice  $y = 0$ ;  $x = -q/k$ , která slouží pro určení  $K_M$ . Obr. 53 znázorňuje výše popsanou linearizaci, ze které se vypočítaly kinetické parametry  $K_M$ ,  $V_{\max}$  a  $k_{\text{cat}}$  enzymu HRP pro substrát OAP. Postup výpočtu zmíněných parametrů se shoduje s postupem v podkapitole 3.8.1.



**Obrázek 52.** Saturační křivka HRP pro OAP a její linearizace dle Lineweaver Burkovy metody.

### 3.8.6 Porovnání získaných parametrů enzymové kinetiky

Experimentálně získané kinetické parametry, jejichž postup získávání se diskutoval na předešlých stranách prezentují následující Tab. 4, 5 a 6. Pokud se porovná parametr  $k_{\text{cat}}$  jednotlivých enzymů, lze konstatovat, že katalyticky neúčinnější je křenová peroxidáza (HRP), a to pro oba testované substráty. Hlavní nevýhoda HRP oproti ostatním studovaným enzymům však spočívá v tom, že pro funkci enzymu se vyžaduje přítomnost peroxidu vodíku, což praktické využití tohoto enzymu v odbourávání studovaných polutantů z odpadních vod značně komplikuje. Naopak velkou výhodou HRP je její relativně nízká tržní cena, na kterou má vliv především velká dostupnost HRP (získává se z kořenů křenu selského). Lakáza (Lac) katalyzovala oxidaci všech studovaných substrátů, nicméně rychlost přeměny OAP na produkt APX byla v porovnání s HRP přibližně 15× pomalejší, a v případě přeměny OPD na produkt DAP dokonce 17× pomalejší. Ze všech testovaných enzymů se ukázala jako nejméně univerzální tyrosináza (TYR), neboť katalyzovala reakci pouze pro substrát OAP. Rychlost přeměny na produkt byla přibližně o 60 % vyšší ve srovnání s lakázou (Lac), avšak přibližně 9× nižší než v případě peroxidázy HRP.

**Tabulka 4.** Stanovené parametry enzymové kinetiky TYR pro substrát OAP.

Substrát	$K_M / \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	$V_{\text{max}} / \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$	$k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$
OAP	791	0,0984	1,95

**Tabulka 5.** Stanovené parametry enzymové kinetiky Lac pro substráty OPD a OAP.

Substrát	$K_M / \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	$V_{max} / \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$	$k_{cat} / \text{s}^{-1}$
OPD	1175	0,7812	0,39
OAP	6254	2,3166	1,16

**Tabulka 6.** Stanovené parametry enzymové kinetiky HRP pro substráty OPD a OAP.

Substrát	$K_M / \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	$V_{max} / \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$	$k_{cat} / \text{s}^{-1}$
OPD	70	0,2241	6,73
OAP	46	0,5671	17,02

## 4 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo posoudit možnosti využití vybraných polyfenoloxidáz, jmenovitě tyrosinázy (TYR), lakázy (Lac) a křenové peroxidázy (HRP), při enzymatické degradaci vybraných polutantů ŽP z permanentních vlasových barev. V rámci této práce byla provedena experimentální srovnání jejich katalytické účinnosti na modelových substrátech *o*-aminofenolu (OAP), *o*-fenylendiaminu (OPD) a *p*-fenylendiaminu (PPD). Stanovily se hodnoty základních kinetických parametrů  $K_M$ ,  $V_{max}$  a  $k_{cat}$ , které dosud pro jmenované kombinace enzymů a substrátů nelze dohledat, díky čemuž tato diplomová práce rozšiřuje dosavadní poznatky v této oblasti a lze ji využít jako základ pro další výzkum nebo praktické aplikace, čímž splňuje podmínky základního výzkumu.

Parametr  $k_{cat}$  umožnil kvantitativní porovnání rychlosti přeměny studovaných substrátů na produkty. Z tohoto hlediska se nejvyšší katalytická aktivita pozorovala u HRP. Tento enzym však vyžaduje ke své funkci přítomnost peroxidu vodíku, což výrazně komplikuje jeho reálné použití pro čištění odpadních vod. Lac se ukázala jako nejuniverzálnější biokatalyzátor, neboť umožnila oxidaci všech sledovaných substrátů bez nutnosti přidání externího činidla, avšak s nižší rychlostí reakce. Tyrosináza vykazovala nejnižší univerzálnost, protože katalyzovala pouze přeměnu OAP, nicméně s vyšší rychlostí než Lac.

Výsledky naznačují potenciál enzymů při degradaci toxických složek vlasových barev, nicméně zároveň poukazují na některá omezení. Kromě technických výzev, jako je nízká stabilita enzymů nebo potřeba přesného řízení reakčních podmínek, je zásadním problémem skutečnost, že některé produkty vznikající enzymatickou oxidací mají vyšší toxicitu než původní látky. Typickým příkladem je vznik Bandrowského báze z PPD, která má výrazný mutagenní a karcinogenní potenciál.

Z tohoto důvodu nelze bez dalšího výzkumu a optimalizace takového postupy jednoznačně označovat za zcela „zelené“, a tudíž ekologicky šetrné. Přínos této vědecké práce spočívá v detailním porovnání kinetických parametrů jednotlivých enzymů a v upozornění na potenciální rizika spojená s tvorbou vedlejších produktů. Do budoucna by bylo žádoucí zaměřit se na kombinaci enzymatických a adsorpčních metod, které by umožnily nejen degradaci, ale i eliminaci vzniklých toxických produktů z ŽP.

## POUŽITÁ LITERATURA

- [1] CHISVERT, A., P. MIRALLES a A. SALVADOR. Hair dyes in cosmetics. In: *Analysis of Cosmetic Products* [online]. B.m.: Elsevier, 2018, s. 159–173. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-63508-2.00008-4.
- [2] ZUZARTE, L., HUNJAN, M. a S. OrpinH15: Lessons from Sushruta revealing the ayurvedic ancestry of dermatology. *British Journal of Dermatology* [online]. 2021, **185**(S1), 167–167. ISSN 0007-0963. Dostupné z: doi:10.1111/bjd.20348.
- [3] DWIVEDI, A., A. B. PANT, A. TRIPATHI, S. POOJAN a M. KOTAK. Hair throughout history—a timeline of its transformative journey. *Hair Care Products* [online]. Singapore: Springer Nature Singapore, 2024, s. 1–3. Dostupné z: doi:10.1007/978-981-97-6740-3\_1.
- [4] KANDIL, H. a M. EL-MOHAMDY. Role of the hair in ancient Egypt. *International Journal of Tourism and Hospitality Management* [online]. 2018, **1**(1), 77–95. ISSN 2535-2318. Dostupné z: doi:10.21608/ijthm.2018.29001.
- [5] LISOWSKA, K. Hair care in the light of selected medieval medical treatises. *Respectus Philologicus* [online]. 2023, (43 (48)), 165–173. ISSN 2335-2388. Dostupné z: doi:10.15388/RESPECTUS.2023.43.48.117.
- [6] SHIELL, R. C. Modern hair restoration surgery. *Clinics in Dermatology* [online]. 2001, **19**(2), 179–187. ISSN 0738081X. Dostupné z: doi:10.1016/S0738-081X(00)00129-2.
- [7] *Hair Dyes and Hair Treatments – Chemistry Encyclopedia – structure, reaction, water, proteins, metal, number, salt* [online]. [vid. 2025-02-21]. Dostupné z: <https://www.chemistryexplained.com/Ge-Hy/Hair-Dyes-and-Hair-Treatments.html>.
- [8] *The Science of Hair Structure: How It Impacts Your Styling Strategies – Ocean Salon Systems* [online]. [vid. 2025-02-21]. Dostupné z: <https://oceansalonsystems.com/blogs/news-1/the-science-of-hair-structure-how-it-impacts-your-styling-strategies>.
- [9] DA FRANÇA, S., M. DARIO, V. ESTEVES, A. BABY a M. VELASCO. Types of hair dye and their mechanisms of action. *Cosmetics* [online]. 2015, **2**(2), 110–126. ISSN 2079-9284. Dostupné z: doi:10.3390/cosmetics2020110.
- [10] SANKAR, J., S. SAWARKAR, J. MALANKAR, B. S. RAWAT a M. A. ALI. Review: Mechanism of hair dying and their safety aspects. *Research Journal of Topical and Cosmetic Sciences* [online]. 2017, **8**(2), 72. ISSN 0976-2981. Dostupné z: doi:10.5958/2321-5844.2017.00009.7.
- [11] YILDIRIM, A., N. B. DEMİR, B. AK İZGİ, B. N. ERKOL, Ç. ÖZSU, G. EŞLİK AYDEMİR, M. MUSTAFAOĞLU, M. KIZIL, N. AYHAN a S. EMEN. The Chemistry mechanism of hair dyes. *Middle East Journal of Science* [online]. 2022, **8**(2), 173–193. ISSN 2618-6136. Dostupné z: doi:10.51477/mejs.1172246.

- [12] MOREL, O. J. X. a R. M. CHRISTIE. Current trends in the chemistry of permanent hair dyeing. *Chemical Reviews* [online]. 2011, **111**(4), 2537–2561. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/cr1000145.
- [13] HE, L., F. MICHAILEDIOU, H. L. GAHLON a W. ZENG. Hair dye ingredients and potential health risks from exposure to hair dyeing. *Chemical Research in Toxicology* [online]. 2022, **35**(6), 901–915. ISSN 0893-228X. Dostupné z: doi:10.1021/acs.chemrestox.1c00427.
- [14] *How Do Different Types of Hair Dye Work? The Science | Lab Muffin Beauty Science* [online]. [vid. 2025-02-22]. Dostupné z: <https://labmuffin.com/how-does-hair-dye-work/>.
- [15] PEDRIALI MORAES, C. A. Evaluation of efficacy of permanent hair dyes – intense red. *Journal of Dermatology & Cosmetology* [online]. 2018, **2**(6). ISSN 25749943. Dostupné z: doi:10.15406/jdc.2018.02.00099.
- [16] *Compound Interest: The Chemistry of Permanent Hair Dyes* [online]. [vid. 2025-02-23]. Dostupné z: <https://www.compoundchem.com/2015/05/14/hair-dyes/>.
- [17] GONÇALVES, L. C., M. M. ROBERTO, P. V. L. PEIXOTO, C. VIRIATO, A. F. C. DA SILVA, V. J. A. DE OLIVEIRA, M. C. C. NARDI, L. C. PEREIRA, D. F. ANGELIS a M. A. MARIN-MORALES. Toxicity of beauty salon effluents contaminated with hair dye on aquatic organisms. *Toxics* [online]. 2023, **11**(11), 911. ISSN 2305-6304. Dostupné z: doi:10.3390/toxics11110911.
- [18] SOUZA, J. C., B. F. SILVA, D. A. MORALES, G. A. UMBUZEIRO a M. V. B. ZANONI. Assessment of the autoxidation mechanism of *p*-toluenediamine by air and hydrogen peroxide and determination of mutagenic environmental contaminant in beauty salon effluent. *Science of The Total Environment* [online]. 2019, **685**, 911–922. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2019.06.252.
- [19] CHONG, H. P., K. REENA, N. KY, K. RY a S. M. CHYE. *p*-phenylenediamine containing hair dye: an overview of mutagenicity, carcinogenicity and toxicity. *Journal of Environmental & Analytical Toxicology* [online]. 2016, **6**(5). ISSN 21610525. Dostupné z: doi:10.4172/2161-0525.1000403.
- [20] NOHYNEK, G. J., R. FAUTZ, F. BENECH-KIEFFER a H. TOUTAIN. Toxicity and human health risk of hair dyes. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2004, **42**(4), 517–543. ISSN 02786915. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2003.11.003.
- [21] MUKKANNA, K. S., N. M. STONE a J. R. INGRAM. *p*-phenylenediamine allergy: current perspectives on diagnosis and management. *Journal of Asthma and Allergy* [online]. 2017, **10**, 9–15. ISSN 1178-6965. Dostupné z: doi:10.2147/JAA.S90265.
- [22] SCHWENSEN, J. F. a J. D. JOHANSEN. *p*-Phenylenediamine and risk of sensitization in children. *Current Treatment Options in Allergy* [online]. 2014, **1**(3), 299–309. ISSN 2196-3053. Dostupné z: doi:10.1007/s40521-014-0024-y.

- [23] SEO, J. A., I. H. BAE, W. H. JANG, J. H. KIM, S. Y. BAK, S. H. HAN, Y. H. PARK a K. M. LIM. Hydrogen peroxide and monoethanolamine are the key causative ingredients for hair dye-induced dermatitis and hair loss. *Journal of Dermatological Science* [online]. 2012, **66**(1), 12–19. ISSN 09231811. Dostupné z: doi:10.1016/j.jdermsci.2011.12.015.
- [24] CHYE, S. M., Y. L. TIONG, W. K. YIP, R. Y. KOH, Y. W. LEN, H. F. SEOW, K. Y. NG, D. A. RANJIT a S. C. CHEN. Apoptosis induced by *p*-phenylenediamine involves formation of ROS and activation of p38 and JNK in chang liver cells. *Environmental Toxicology* [online]. 2014, **29**(9), 981–990. ISSN 1520-4081. Dostupné z: doi:10.1002/tox.21828.
- [25] BURNETT, C. M. a E. I. GOLDENTHAL. Multigeneration reproduction and carcinogenicity studies in Sprague-Dawley rats exposed topically to oxidative hair-colouring formulations containing *p*-phenylenediamine and other aromatic amines. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 1988, **26**(5), 467–474. ISSN 02786915. Dostupné z: doi:10.1016/0278-6915(88)90059-2.
- [26] TKACZYK, A., K. MITROWSKA a A. POSYNIK. Synthetic organic dyes as contaminants of the aquatic environment and their implications for ecosystems: a review. *Science of The Total Environment* [online]. 2020, **717**, 137222. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2020.137222.
- [27] MISHRA, V., U. SHARMA, D. RAWAT, D. BENSON, M. SINGH a R. S. SHARMA. Fast-changing life-styles and ecotoxicity of hair dyes drive the emergence of hidden toxicants threatening environmental sustainability in Asia. *Environmental Research* [online]. 2020, **184**, 109253. ISSN 00139351. Dostupné z: doi:10.1016/j.envres.2020.109253.
- [28] ZANONI, T. B., F. HUDARI, A. MUNNIA, M. PELUSO, R. W. GODSCHALK, M. V. B. ZANONI, G. J. M. HARTOG, A. BAST, S. B. M. BARROS, S. S. MARIA-ENGLER, Geja J. HAGEMAN a Danielle Palma DE OLIVEIRA. The oxidation of *p*-phenylenediamine, an ingredient used for permanent hair dyeing purposes, leads to the formation of hydroxyl radicals: Oxidative stress and DNA damage in human immortalized keratinocytes. *Toxicology Letters* [online]. 2015, **239**(3), 194–204. ISSN 03784274. Dostupné z: doi:10.1016/j.toxlet.2015.09.026.
- [29] MANJUNATHA, B., L. HAN, R. R. KUNDAPUR, K. LIU a S. J. LEE. Herbul black henna (hair dye) causes cardiovascular defects in zebrafish (*Danio rerio*) embryo model. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. 2020, **27**(12), 14150–14159. ISSN 0944-1344. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-020-07762-z.
- [30] MAITI, S., K. SASMAL, S. S. SINHA a M. SINGH. Analysis of cytotoxicity and genotoxicity on *E. coli*, human blood cells and *Allium cepa* suggests a greater toxic potential of hair dye. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 2016, **124**, 248–254. ISSN 01476513. Dostupné z: doi:10.1016/j.ecoenv.2015.10.028.

- [31] KATHERESAN, V., J. KANSEDO a S. Y. LAU. Efficiency of various recent wastewater dye removal methods: a review. *Journal of Environmental Chemical Engineering* [online]. 2018, **6**(4), 4676–4697. ISSN 22133437. Dostupné z: doi:10.1016/j.jece.2018.06.060.
- [32] U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, Office of water. *How Wastewater Treatment Works...The Basics (EPA 833-F-98-002)*. [online]. [Washington, D.C.]: United States Environmental Protection Agency, 1998 [vid. 2025-03-03]. Dostupné z: <https://catalogue.nla.gov.au/catalog/3834658>.
- [33] *Steps of a Wastewater Treatment Plant | SafeRack Installations* [online]. [vid. 2025-03-02]. Dostupné z: <https://www.saferack.com/wastewater-treatment-plant/wastewater-treatment-process-illustrationv2/>.
- [34] SENTHIL KUMAR, P. a A. SARAVANAN. Sustainable wastewater treatments in textile sector. In: *Sustainable Fibres and Textiles* [online]. B.m.: Elsevier, 2017, s. 323–346. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-102041-8.00011-1.
- [35] CAO, G., W. WANG, J. ZHANG, P. WU, H. QIAO, H. LI, G. HUANG, Z. YANG a Z. CAI. Occurrence and fate of substituted *p*-phenylenediamine-derived quinones in Hong Kong wastewater treatment plants. *Environmental Science & Technology* [online]. 2023, **57**(41), 15635–15643. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/acs.est.3c03758.
- [36] FINI, E. H., M. KAZEMI, L. POULIKAKOS, G. LAZORENKO, V. AKBARZADE, A. LAMANNA a P. LAMMERS. Perspectives on innovative non-fertilizer applications of sewage sludge for mitigating environmental and health hazards. *Communications Engineering* [online]. 2024, **3**(1), 178. ISSN 2731-3395. Dostupné z: doi:10.1038/s44172-024-00298-x.
- [37] ZHANG, R., S. ZHAO, X. LIU, M. W. THOMES, C. W. BONG, D. N. D. SAMARAWEERA, T. PRIYADARSHANA, G. ZHONG, J. LI a G. ZHANG. Fates of benzotriazoles, benzothiazoles, and *p*-phenylenediamines in wastewater treatment plants in Malaysia and Sri Lanka. *ACS ES&T Water* [online]. 2023, **3**(6), 1630–1640. ISSN 2690-0637. Dostupné z: doi:10.1021/acsestwater.2c00410.
- [38] U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, Office of water. *Wastewater technology fact sheet granular activated carbon adsorption and regeneration*. [online]. [Washington, D.C.]: United States Environmental Protection Agency, Office of Water, 2000 [vid. 2025-03-06]. Dostupné z: <https://catalogue.nla.gov.au/catalog/3834713>.
- [39] GIDSTEDT, S., A. BETSHOLTZ, M. CIMBRITZ, Å. DAVIDSSON, M. HAGMAN, S. KARLSSON, M. TAKMAN, O. SVAHN a F. MICOLUCCI. Chemically enhanced primary treatment, microsieving, direct membrane filtration and GAC filtration of municipal wastewater: a pilot-scale study. *Environmental Technology* [online]. 2024, **45**(1), 28–39. ISSN 0959-3330. Dostupné z: doi:10.1080/09593330.2022.2099307.

- [40] KARCHER, S., A. KORNMÜLLER a M. JEKEL. Anion exchange resins for removal of reactive dyes from textile wastewaters. *Water Research* [online]. 2002, **36**(19), 4717–4724. ISSN 00431354. Dostupné z: doi:10.1016/S0043-1354(02)00195-1.
- [41] BESSEGATO, G. G., J. C. DE SOUZA, J. C. CARDOSO a M. V. B. ZANONI. Assessment of several advanced oxidation processes applied in the treatment of environmental concern constituents from a real hair dye wastewater. *Journal of Environmental Chemical Engineering* [online]. 2018, **6**(2), 2794–2802. ISSN 22133437. Dostupné z: doi:10.1016/j.jece.2018.04.041.
- [42] SHINDHAL, T., P. RAKHOLIYA, S. VARJANI, A. PANDEY, H. H. NGO, W. GUO, H. Y. NG a M. J. TAHERZADEH. A critical review on advances in the practices and perspectives for the treatment of dye industry wastewater. *Bioengineered* [online]. 2021, **12**(1), 70–87. ISSN 2165-5979. Dostupné z: doi:10.1080/21655979.2020.1863034.
- [43] HASHEM, S. A. M., G. A. GABER, W. A. HUSSEIN a A. S. I. AHMED. Electrocoagulation process with Fe/Al electrodes to eliminate pollutants from real and synthetic wastewater. *Results in Materials* [online]. 2024, **23**, 100606. ISSN 2590048X. Dostupné z: doi:10.1016/j.rinma.2024.100606.
- [44] HUSSEIN, A. a M. SCHOLZ. Treatment of artificial wastewater containing two azo textile dyes by vertical-flow constructed wetlands. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. 2018, **25**(7), 6870–6889. ISSN 0944-1344. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-017-0992-0.
- [45] BULC, T. G. a A. OJSTRŠEK. The use of constructed wetland for dye-rich textile wastewater treatment. *Journal of Hazardous Materials* [online]. 2008, **155**(1–2), 76–82. ISSN 03043894. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhazmat.2007.11.068.
- [46] *Aerobic constructed wetlands – Mine Closure* [online]. [vid. 2025-03-09]. Dostupné z: <https://mineclosure.gtk.fi/aerobic-constructed-wetlands/>.
- [47] YALÇUK, A. a G. DOĞDU. Treatment of azo dye Acid Yellow 2G by using lab-scale vertical-flow intermittent feeding constructed wetlands. *Journal of Selçuk University Natural and Applied Science*. 2014, 355–368. Dostupné z: <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:106428737>.
- [48] MAITI, S., S. S. SINHA a M. SINGH. Microbial decolorization and detoxification of emerging environmental pollutant: Cosmetic hair dyes. *Journal of Hazardous Materials* [online]. 2017, **338**, 356–363. ISSN 03043894. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhazmat.2017.05.034.
- [49] ALSUKAIBI, A. K. D. Various approaches for the detoxification of toxic dyes in wastewater. *Processes* [online]. 2022, **10**(10), 1968. ISSN 2227-9717. Dostupné z: doi:10.3390/pr10101968.
- [50] ZHOU, W., W. ZHANG a Y. CAI. Laccase immobilization for water purification: a comprehensive review. *Chemical Engineering Journal* [online]. 2021, **403**, 126–272. ISSN 13858947. Dostupné z: doi:10.1016/j.cej.2020.126272.

- [51] PERIYASAMY, A. P. Recent advances in the remediation of textile-dye-containing wastewater: prioritizing human health and sustainable wastewater treatment. *Sustainability* [online]. 2024, **16**(2), 495. ISSN 2071-1050. Dostupné z: doi:10.3390/su16020495.
- [52] BENTO, R. M. F., M. R. ALMEIDA, P. BHARMORIA, M. G. FREIRE a A. P. M. TAVARES. Improvements in the enzymatic degradation of textile dyes using ionic-liquid-based surfactants. *Separation and Purification Technology* [online]. 2020, **235**, 116–191. ISSN 13835866. Dostupné z: doi:10.1016/j.seppur.2019.116191.
- [53] RODRÍGUEZ-COUTO, S. Solid-state fermentation for laccases production and their applications. In: *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* [online]. B.m.: Elsevier, 2018, s. 211–234. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-63990-5.00011-6.
- [54] KADIMALIEV, D., V. REVIN, N. ATYKIAN a V. ŠUTOVÁ. *Фундаментальные и прикладные основы биотехнологии экологически безопасных композиционных материалов*. 2004.
- [55] ŠUŠLA, M. a K. SVOBODOVÁ. Ligninolytické enzymy jako účinné nástroje pro biodegradaci obtížně rozložitelných organopolutantů. *Chemické listy*. 2006, **100**(10), 889–895. ISSN 0009-2770.
- [56] RIVERA-HOYOS, C. M., E. D. MORALES-ÁLVAREZ, R. A. POUTOU-PIÑALES, A. M. PEDROZA-RODRÍGUEZ, R. RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ a J. M. DELGADO-BOADA. Fungal laccases. *Fungal Biology Reviews* [online]. 2013, **27**(3–4), 67–82. ISSN 17494613. Dostupné z: doi:10.1016/j.fbr.2013.07.001.
- [57] SINGH NEE' NIGAM, P. a A. PANDEY. *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, 2009. ISBN 978-1-4020-9941-0. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4020-9942-7.
- [58] RENFELD, Z. V., A. M. CHERNYKH, B. P. BASKUNOV, A. S. GAIDINA, N. M. MYASOEDOVA, A. D. EGOROVA, O. V. MOISEEVA, S. Y. GORINA a M. P. KOLOMYTSEVA. Unusual oligomeric laccase-like oxidases from ascomycete *Curvularia geniculata* VKM F-3561 polymerizing phenylpropanoids and phenolic compounds under neutral environmental conditions. *Microorganisms* [online]. 2023, **11**(11), 2698. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms11112698.
- [59] KUMAR, D., A. KUMAR, S. SONDHI, P. SHARMA a N. GUPTA. An alkaline bacterial laccase for polymerization of natural precursors for hair dye synthesis. *3 Biotech* [online]. 2018, **8**(3), 182. ISSN 2190-572X. Dostupné z: doi:10.1007/s13205-018-1181-7.
- [60] COULTER, E. M., J. FARRELL, K. L. MATHEWS, J. L. MAGGS, C. K. PEASE, D. J. LOCKLEY, D. A. BASKETTER, B. K. PARK a D. J. NAISBITT. Activation of human dendritic cells by *p*-phenylenediamine. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* [online]. 2007, **320**(2), 885–892. ISSN 00223565. Dostupné z: doi:10.1124/jpet.106.113803.

- [61] LAVERY, C. B., Morgan C. MACINNIS, M. J. MACDONALD, J. B. WILLIAMS, C. A. SPENCER, A. A. BURKE, D. J. G. IRWIN a G. B. D’CUNHA. Purification of peroxidase from horseradish (*Armoracia rusticana*) roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2010, **58**(15), 8471–8476. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf100786h.
- [62] HUMER, D., J. EBNER a O. SPADIUT. Scalable high-performance production of recombinant horseradish peroxidase from *E. coli* inclusion bodies. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2020, **21**(13), 4625. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21134625.
- [63] BUCHANAN, I. D., J. A. NICELL a M. WAGNER. Reactor models for horseradish peroxidase–catalyzed aromatic removal. *Journal of Environmental Engineering* [online]. 1998, **124**(9), 794–802. ISSN 0733-9372. Dostupné z: doi:10.1061/(ASCE)0733-9372(1998)124:9(794).
- [64] SONG, W., J. KO, Y. H. CHOI a N. S. HWANG. Recent advancements in enzyme-mediated crosslinkable hydrogels: In vivo – mimicking strategies. *APL Bioengineering* [online]. 2021, **5**(2). ISSN 2473-2877. Dostupné z: doi:10.1063/5.0037793.
- [65] ĆIRIĆ-MARJANOVIĆ, G., M. MILOJEVIĆ-RAKIĆ, A. JANOŠEVIĆ-LEŽAIĆ, S. LUGINBÜHL a P. WALDE. Enzymatic oligomerization and polymerization of arylamines: state of the art and perspectives. *Chemical Papers* [online]. 2017, **71**(2), 199–242. ISSN 2585-7290. Dostupné z: doi:10.1007/s11696-016-0094-3.
- [66] ZHANG, Y., Y. R. F. SCHMID, S. LUGINBÜHL, Q. WANG, P. S. DITTRICH a P. WALDE. Spectrophotometric quantification of peroxidase with *p*-phenylene-diamine for analyzing peroxidase-encapsulating lipid vesicles. *Analytical Chemistry* [online]. 2017, **89**(10), 5484–5493. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.7b00423.
- [67] BUCHANAN, I. D., J. A. NICELL a M. WAGNER. Reactor models for horseradish peroxidase–catalyzed aromatic removal. *Journal of Environmental Engineering* [online]. 1998, **124**(9), 794–802. ISSN 0733-9372. Dostupné z: doi:10.1061/(ASCE)0733-9372(1998)124:9(794).
- [68] MAO, L., S. LUO, Q. HUANG a J. LU. Horseradish peroxidase inactivation: heme destruction and influence of polyethylene glycol. *Scientific Reports* [online]. 2013, **3**(1), 3126. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep03126.
- [69] ZAIDI, K. U., A. S. ALI, S. A. ALI a I. NAAZ. Microbial tyrosinases: promising enzymes for pharmaceutical, food bioprocessing, and environmental industry. *Biochemistry Research International* [online]. 2014, **2014**, 1–16. ISSN 2090-2247. Dostupné z: doi:10.1155/2014/854687.
- [70] INAMDAR, S., S. JOSHI, V. BAPAT a J. JADHAV. Purification and characterization of RNA allied extracellular tyrosinase from *Aspergillus* species. *Applied Biochemistry and Biotechnology* [online]. 2014, **172**(3), 1183–1193. ISSN 0273-2289. Dostupné z: doi:10.1007/s12010-013-0555-x.

- [71] ZHEN, Y. a F. WU. Catalytic properties of tyrosinase from potato and edible fungi. *Biotechnology(Faisalabad)* [online]. 2006, **5**(3), 344–348. ISSN 1682296X. Dostupné z: doi:10.3923/biotech.2006.344.348.
- [72] ROLFF, M., J. SCHOTTENHEIM, H. DECKER a F. TUCZEK. Copper–O<sub>2</sub> reactivity of tyrosinase models towards external monophenolic substrates: molecular mechanism and comparison with the enzyme. *Chemical Society Reviews* [online]. 2011, **40**(7), 4077. ISSN 0306-0012. Dostupné z: doi:10.1039/c0cs00202j.
- [73] WADA, S., H. ICHIKAWA a K. TATSUMI. Removal of phenols from wastewater by soluble and immobilized tyrosinase. *Biotechnology and Bioengineering* [online]. 1993, **42**(7), 854–858. ISSN 0006-3592. Dostupné z: doi:10.1002/bit.260420710.
- [74] BARRY, C. E., P. G. NAYAR a T. P. BEGLEY. Phenoxazinone synthase: mechanism for the formation of the phenoxazinone chromophore of actinomycin. *Biochemistry* [online]. 1989, **28**(15), 6323–6333. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi00441a026.
- [75] GALLO, M. a E. KATZ. Regulation of secondary metabolite biosynthesis: catabolite repression of phenoxazinone synthase and actinomycin formation by glucose. *Journal of Bacteriology* [online]. 1972, **109**(2), 659–667. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/jb.109.2.659-667.1972.
- [76] JONES, G. H. a D. A. HOPWOOD. Molecular cloning and expression of the phenoxazinone synthase gene from *Streptomyces antibioticus*. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 1984, **259**(22), 14151–14157 [vid. 2025-03-16]. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9258(18)89869-6.
- [77] NESTEROVA, O. V., O. E. BONDARENKO, A. J. L. POMBEIRO a D. S. NESTEROV. Phenoxazinone synthase-like catalytic activity of novel mono and tetranuclear copper(II) complexes with 2-benzylaminoethanol. *Dalton Transactions* [online]. 2020, **49**(15), 4710–4724. ISSN 1477-9226. Dostupné z: doi:10.1039/D0DT00222D.
- [78] JIA, H., Z. GAO, Y. MA, C. ZHONG, C. WANG, H. ZHOU a P. WEI. Preparation and characterization of a highly stable phenoxazinone synthase nanogel. *Chemistry Central Journal* [online]. 2016, **10**(1), 34. ISSN 1752-153X. Dostupné z: doi:10.1186/s13065-016-0178-8
- [79] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. opr. vyd. Praha: Academia, 2007. ISBN 978-80-200-0600-4.
- [80] VOET, D., J. VOET a C. PRATT. *Principles of biochemistry*. 3. vyd. Praha: Wiley, 2008. ISBN 978-0470233962.
- [81] HAMES, D. a N. HOOPER. *Instant Notes Biochemistry* [online]. 3. vyd. New York: Taylor & Francis Group, 2005 [vid. 2025-03-18]. ISBN 0-4153-6778-6. Dostupné z: <http://ndl.ethernet.edu.et/bitstream/123456789/2909/1/325.pdf.pdf>.
- [82] BAYNES, J. W. a M. H. DOMINICZAK. *Medical Biochemistry*. 5. vyd. London: Elsevier, 2018. ISBN 9780702072994.

- [83] NINFA, A. J., D. P. BALLOU a M. BENOIRE. *Fundamental Laboratory Approaches for Biochemistry and Biotechnology*. 2. vyd. Hoboken: Wiley & Sons, 2010. ISBN 9780470087664.
- [84] IUPAC. Beer–Lambert law. In: *The IUPAC Compendium of Chemical Terminology* [online]. Research Triangle Park, NC: International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), 2014. Dostupné z: doi:10.1351/goldbook.B00626.
- [85] BÁRTOVÁ, M., A. LIŠKA, V. STUDENÁ, P. VOJTÍŠEK, M. KAŠPAR, T. MIKYSEK, L. ČESLOVÁ, I. ŠVANCARA a M. SÝS. Dinuclear copper(II) complexes of 2,6-Bis[(N-methylpiperazine-1-yl)methyl]-4-formyl phenol ligand: promising biomimetic catalysts for dye residue degradation and drug synthesis. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2025, **26**(4), 1603. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms26041603.
- [86] ZHOU, J., Z. Y. MA, C. SHONHE, S. H. JI a Y. R. CAI. Supporting information tempo-catalyzed electrochemical dehydrogenative cyclocondensation of *o*-aminophenols: synthesis of aminophenoxazinones as antiproliferative agents. *Green Chemistry*. 2021, **23**(21), 8566-8570. Dostupné z: doi: 10.1039/d1gc02908h.
- [87] MAI, C., W. SCHORMANN, O. MILSTEIN a A. HÜTTERMANN. Enhanced stability of laccase in the presence of phenolic compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2000, **54**(4), 510–514. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s002530000452.
- [88] TRIPATHI, R. K., C. CHAYA DEVI a A. RAMAIAH. pH-dependent interconversion of two forms of tyrosinase in human skin. *Biochemical Journal* [online]. 1988, **252**(2), 481–487. ISSN 0264-6021. Dostupné z: doi:10.1042/bj2520481.
- [89] ASAD, S., S. F. TORABI, M. FATHI-ROUDSARI, N. GHAEMI a K. KHAJEH. Phosphate buffer effects on thermal stability and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resistance of horseradish peroxidase. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2011, **48**(4), 566–570. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2011.01.021.
- [90] UPADHYAY, D., J. SHAH a U. GUPTA. Development and validation of analytical method for the determination of Bandrowski Base content in hair colour cosmetics products by HPLC [online]. *International Research Journal of Modernization in Engineering Technology and Science*. 2025, **7**(3), 12290–12300. ISSN 2582-5208. Dostupné z: www.irjmets.com.
- [91] MEYER, A. a K. FISCHER. Oxidative transformation processes and products of *p*-phenylenediamine (PPD) and *p*-toluenediamine (PTD)—a review. *Environmental Sciences Europe* [online]. 2015, **27**(1), 11. ISSN 2190-4707. Dostupné z: doi:10.1186/s12302-015-0044-7.