

Olga MARCHUT-MIKOŁAJCZYK, Ewa KWAPISZ, Tadeusz ANTCZAK

Politechnika Łódzka, Instytut Biochemii Technicznej, ul. Stefanowskiego 4/10, 90-924 Łódź

## Enzymatyczna bioremediacja ksenobiotyków

Wciąż wzrastające zanieczyszczenie środowiska związane z częstym przedostawaniem się do środowiska toksycznych substancji jest jednym z największych problemów ekologicznych współczesnego świata. Wzrasta więc zainteresowanie nowymi, ekologicznymi technologiami remediacji, niewymagającymi dużych nakładów finansowych, pozwalającymi na całkowite lub częściowe oczyszczenie środowiska. Technologie bioremediacji, wykorzystujące potencjał mikroorganizmów, mogą być z powodzeniem wykorzystywane do usuwania ze środowiska zanieczyszczeń alifatycznymi bądź aromatycznymi związkami pochodzenia naftowego. Jednakże, w przypadku substancji o charakterze ksenobiotyków efektywność mikrobiologicznego rozkładu może ulec ograniczeniu. Wśród czynników biologicznych enzymy posiadają wysoki potencjał do efektywnego przekształcania i detoksykacji zanieczyszczeń i potencjalnie mogą one zostać wykorzystane do oczyszczania zanieczyszczonego środowiska. Celem pracy było przedstawienie, na podstawie literatury, niektórych grup enzymów zdolnych do przekształcania ksenobiotyków w nieszkodliwe związki. Znaczna uwaga została poświęcona enzymom pochodzącym z grzybów białej zgnilizny, charakteryzujących się wysokim potencjałem do efektywnego rozkładu ksenobiotyków. W artykule zestawiono zarówno zalety, jak i wady stosowania enzymów w bioremediacji zanieczyszczonego środowiska, a także perspektywy aplikacji *in situ* bioremediacji z wykorzystaniem enzymów.

**Keywords:** biodegradacja, ksenobiotyki, enzym, grzyby

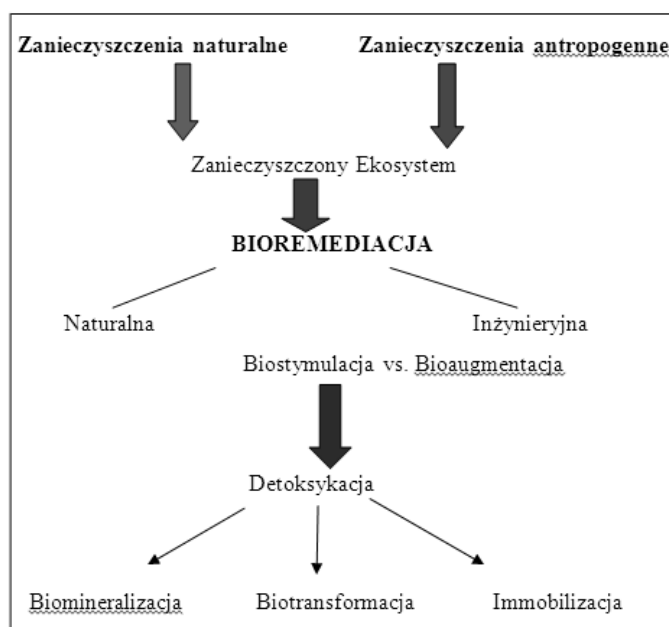
### Wprowadzenie

Zanieczyszczenie środowiska niebezpiecznymi odpadami zawierającymi odporne na degradację związki stanowi jeden z najpoważniejszych problemów ekologicznych współczesnego świata. Szybki rozwój przemysłu chemicznego spowodował produkcję różnorodnych związków chemicznych mogących stanowić zagrożenie dla środowiska, w tym pestycydów, rozpuszczalników, farb, tworzyw sztucznych i paliw, będących mieszaniną różnego typu węglowodorów (alkanów, związków cyklicznych i aromatycznych). Niektóre z tych związków charakteryzują się wysoką toksycznością, trwałością oraz zdolnością do akumulacji, a w konsekwencji opornością na biodegradację.

Stan zanieczyszczenia środowiska naturalnego związkami organicznymi skłania do poszukiwania rozwiązań ograniczających drastyczne i długotrwałe zmiany zachodzące w ekosystemach, pozwalających jednocześnie na ich skuteczną utylizację. Jednym z głównych celów biotechnologii środowiska jest opracowanie wysoce efektywnych procesów biologicznych wykorzystujących występujący naturalnie potencjał kataboliczny mikroorganizmów do eliminowania i detoksykacji polutan-

tów [1]. Efektywną strategię oczyszczania środowiska stanowią technologie bioremediacji.

Po raz pierwszy pojęcie bioremediacji pojawiło się w literaturze naukowej w 1987 roku. Oznacza ono metodę biologicznego usuwania skażeń różnego typu substancjami chemicznymi ze środowiska naturalnego, głównie przy udziale drobnoustrojów, do poziomu bezpiecznego dla życia organizmów. Technologia ta polega na wykorzystaniu występujących w zanieczyszczonym środowisku mikroorganizmów autochtonicznych (bioremediacja naturalna, biostymulacja) oraz wyselekcjonowanych pod kątem danego skażenia drobnoustrojów (bioaugmentacja), których systemy enzymatyczne wykazują właściwość przekształcania toksycznych związków organicznych w substancje prostsze, nieszkodliwe dla środowiska. Techniki bioremediacji mogą być wykorzystywane zarówno do usuwania zanieczyszczeń substancjami naturalnymi, jak i tymi pochodzenia antropogenicznego, w tym ksenobiotykami (rys. 1).



Rys. 1. Schemat włączenia bioremediacji w usuwanie zanieczyszczeń z ekosystemu

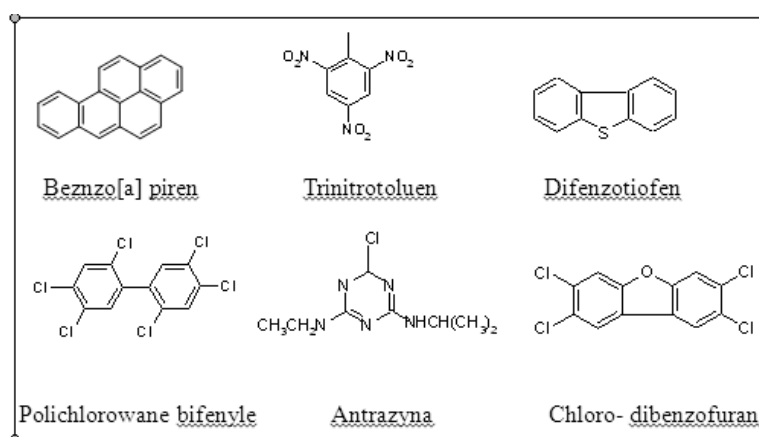
Fig. 1. Bioremediation in removal of contaminants from ecosystem

Głównym problemem technologii bioremediacji jest usuwanie ze środowiska najtrudniej degradowanych komponentów zanieczyszczeń oraz sprawne przeprowadzenie ostatniego etapu procesu biodegradacji, czyli usunięcie tak zwanych zanieczyszczeń resztkowych. Ciągła akumulacja w środowisku silnie toksycznych polutantów wskazuje, iż mikroorganizmy same jako takie nie są w pełni skuteczne w ochronie biosfery przed zanieczyszczeniami antropogenicznymi. Ponadto, uwzględniając złożoność systemów, jakimi są zanieczyszczone grunty czy zasoby

wodne, należy wziąć również pod uwagę to, że mikroorganizmy nie są jedynym narzędziem biologicznym biorącym udział w procesie oczyszczania. Ważną funkcję pomocniczą mogą tu spełniać enzymy, głównie pozakomórkowe, wydzielane przez różnego typu drobnoustroje. Celem bioremediacji enzymatycznej jest wykorzystanie potencjału katalitycznego enzymów do usuwania ze środowiska toksycznych, trudno degradowalnych związków. Ponieważ enzymy stanowią prostsze systemy niż całe komórki mikroorganizmów, bioremediacja enzymatyczna wydaje się atrakcyjnym narzędziem wspierania obecnie stosowanych technologii, szczególnie do usuwania ze środowiska opornych na degradację polutantów. Badania prowadzone w ostatnich latach wskazują na możliwość modyfikowania technik biooczyszczania poprzez wprowadzanie do skażonych miejsc wybranych preparatów enzymatycznych wspomagających przekształcenie trudno degradowalnych związków chemicznych w mniej toksyczne lub całkowicie nieszkodliwe [2-6].

## 1. Ksenobiotyki

Wśród zanieczyszczeń środowiska dużą grupę stanowią ksenobiotyki. Są one postrzegane jako związki niewystępujące bądź rzadko występujące w naturze lub zawierające w swej budowie elementy, które nie mogą być syntetyzowane na drodze biochemicznej [1]. W szerszym znaczeniu za ksenobiotyki uważane są również związki syntetyczne, które poprzez liczbę i orientację przestrzenną grup funkcyjnych różnią się od związków naturalnie występujących w środowisku. Należą do nich niektóre wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, chlorofenole, dioksyny czy polichlorowane bifenyle, trichloroetylen, perchloroetylen, trinitrotoluen itp. (rys. 2) [7]. W przeciwieństwie do naturalnie występujących substancji organicznych, które stosunkowo łatwo podlegają rozkładowi w środowisku naturalnym, niektóre z syntetycznych związków organicznych są odporne na biodegradację [8, 9].



Rys. 2. Przykłady ulegających enzymatycznej biodegradacji ksenobiotyków [6]

Fig. 2. Examples of xenobiotics amenable to enzymatic bioremediation [6]

Podatność polutanta na rozkład mikrobiologiczny zależy od budowy chemicznej, własności związku oraz jego stężenia, jak również od warunków środowiskowych. Suthersan [11] definiuje ksenobiotyk jako syntetyczny związek chemiczny, który nie jest produktem biosyntezy i ulegnie degradacji tylko wtedy, gdy enzym lub system enzymatyczny jest zdolny do jego przekształcenia w substancję, która może być włączona do funkcjonującego szlaku metabolicznego. Według Gianfreda i współpracowników [10], im większa różnica w budowie ksenobiotyku i formie tego związku występującego w naturze, tym mniejsze prawdopodobieństwo jego biodegradacji. Związek organiczny uznawany jest za oporny na degradację, gdy jego rozkład prowadzony przez mikroflorę obecną w miejscu skażenia trwa o wiele dłużej niż w przypadku większości naturalnych substratów. Związki te nazwano ksenobiotykami, gdyż są one nowe bądź nieznane dla mikroflory autochtonicznej.

## **2. Wykorzystanie preparatów enzymatycznych jako elementu technologii bioremediacji**

Wciąż wzrastająca ilość silnie toksycznych związków w środowisku wskazuje, iż mimo ewolucji drobnoustroje w obecności dużej ilości różnych ksenobiotyków nie mają możliwości wykształcić tak wielu szlaków metabolicznych umożliwiających szerokie wykorzystywanie tych substancji jako źródła węgla i energii. Ponadto, choć mikroorganizmy mogą wspomagać transformacje polutantów, prowadząc do powstawania produktów o mniejszej toksyczności, bardziej podatnych na biodegradację, to w czasie tych procesów następuje nagromadzenie znacznych ilości [10].

W związku z potrzebą ciągłego doskonalenia technik bioremediacji badania prowadzone w ostatnich latach wskazują na możliwość wykorzystania w procesach biodegradacji nie tylko potencjału metabolicznego mikroorganizmów, ale i samych enzymów (w formie preparatów), zarówno tych wydzielanych poza komórkę, jak i enzymów wewnątrzkomórkowych. Preparaty te mogą zawierać kompleksy enzymatyczne bądź pojedyncze biokatalizatory zdolne do modyfikacji struktury, zniesienia toksycznego charakteru zanieczyszczeń lub, w szczególnych przypadkach, do przeprowadzenia całkowitej mineralizacji molekuł organicznych do nieszkodliwych, nieorganicznych produktów końcowych. Z uwagi na to, iż enzymy stanowią prostsze systemy niż całe organizmy, bioremediacja enzymatyczna staje się atrakcyjnym narzędziem w biotechnologii środowiska.

Bioremediacja enzymatyczna (jako uzupełnienie procesów mikrobiologicznych) daje najlepsze efekty, gdy warunki panujące w oczyszczanym środowisku są bliskie parametrom optymalnym dla zastosowanych enzymów [6, 12-14]. Zapewnienie takich warunków (pH, temperatura) jest stosunkowo łatwe w przypadku bioremediacji *ex situ*, ale może nastroczać wielu trudności w prowadzeniu procesu w miejscu skażenia [15]. Ponadto, detoksykacja enzymatyczna wymaga ścisłego kontrolowania procesu biodegradacji odbywającego się z udziałem mikroorganizmów.

Wdrożenie technologii enzymatycznej bioremediacji wymaga rozwoju metod produkcji odpowiednich preparatów enzymatycznych przeznaczonych specjalnie do tych celów. Najważniejszymi wymogami, których spełnienie umożliwia zastosowanie tej technologii oczyszczania, są [16]:

1. Wybór odpowiedniego enzymu (kompleksu enzymatycznego), dokładnie zbadanego pod względem zarówno specyfikacji substratowej, jak i powstających produktów. Selekcja enzymów pod względem oporności na działanie czynników zewnętrznych i niskiej zależności od kofaktorów, jak np. NAD(P)H [6, 13].
2. Dysponowanie odpowiednią technologią produkcji preparatu enzymatycznego, otrzymanego z wykorzystaniem szczepów łatwych do namnażania, stabilnych genetycznie i niepatogennych.
3. Dobór optymalnych warunków hodowli mikroorganizmów produkujących enzym w celu zwiększenia wydajności produkcji enzymu.
4. Opracowanie odpowiedniej formy preparatu enzymatycznego (w formie komórek spoczynkowych lub oczyszczonego preparatu) utrzymującego wysoką aktywność i stabilność w zanieczyszczonym środowisku, zachowującego przy tym odpowiednią selektywność substratową i pozwalającego uniknąć w maksymalnym stopniu reakcji ubocznych.
5. Optymalizacja technologii produkcji enzymów pod kątem nakładów finansowych.
6. Ewentualna stabilizacja biokatalizatora (np. na drodze immobilizacji), pozwalająca na zachowanie aktywności w trudnych warunkach panujących w zanieczyszczonym miejscu.

Większość ksenobiotyków, jak na przykład policykliczne węglowodory aromatyczne [6, 17], farby syntetyczne, konserwanty do drewna [6, 18], może podlegać enzymatycznej biotransformacji. Jednakże wymaga to uprzedniego wyselekcjonowania mikroorganizmu zdolnego do wzrostu w obecności konkretnego polutanta i zidentyfikowania enzymów odpowiedzialnych za jego degradację.

Dotychczas najlepiej opisanymi enzymami biorącymi udział w procesach biodegradacji zanieczyszczeń są bakteryjne mono- i dioksygenazy, reduktazy, dehalogenazy czy monooksygenaza cytochromu P-450. Jednakże bakteryjne oksygenazy nie mogą być użyte w procesach biodegradacji w formie wyizolowanej, gdyż są niestabilne, trudne do oczyszczenia, wymagają obecności kosubstratów, co w konsekwencji powodowałoby znaczne zwiększenie nakładów finansowych na proces bioremediacji prowadzony w dużej skali [19].

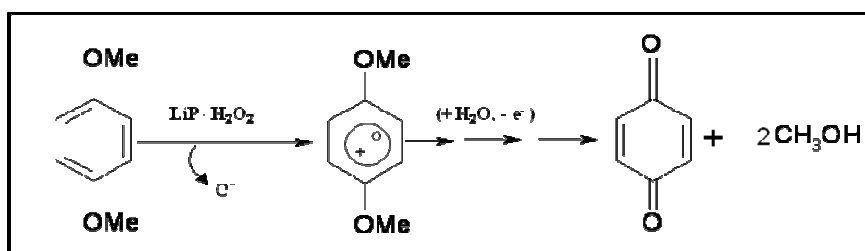
Z tych względów w ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowania grzybowymi enzymami związanymi z rozkładem lignin oraz enzymami grzybowymi z klasy hydrolaz biorącymi udział w degradacji związków tłuszczowych [6, 14]. Szczególnie przydatne do tych celów wydają się być enzymy pozyskiwane z grzybów białej zgnilizny, które w naturze odpowiadają za degradację lignin w martwej tkance roślinnej.

## 2.1. Enzymy grzybowe

Wzrost popularności enzymów pozyskiwanych z grzybów białej zgnilizny (np. *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*) związany jest z posiadaniem przez te organizmy kompleksem enzymatycznym zawierającym enzymy ligninolityczne, umożliwiającym wykorzystanie ich do utylizacji związków trudno degradowalnych. Enzymy te wykazują niską specyficzność substratową i jednocześnie silne własności utleniające, związane z degradacją lignin [19, 20]. Mogą one również oddziaływać na szeroką grupę związków organicznych, zawierających łańcuchy węglowe podobne do tych obecnych w polimerach lignin, a więc na przykład podstawionych fenolach [19, 21]. Posiadany przez grzyby białej zgnilizny aparat enzymatyczny sprawia, że enzymy te są również zdolne do rozkładu wiązań węglowych w pierścieniach aromatycznych ksenobiotyków [22], takich jak np. policykliczne węglowodory aromatyczne, chlorowane fenole, polichlorowane bifenyle, dioksyny, związki fosfoorganiczne, nitrotoluen, chloroaniliny, inne zanieczyszczenia obecne w ściekach [23, 24]. Możliwość ta związana jest z produkcją zewnątrzkomórkowych enzymów, takich jak: peroksydaza ligninowa, Mn-peroksydaza i lakkaza.

### 2.1.1. Peroksydaza ligninowa (LiP, EC 1.11.1.14)

Peroksydaza ligninowa (LiP), szczególnie pochodząca z *Phanerochaete chrysosporium*, jest dość dobrze poznanym enzymem [25]. Jest to zewnątrzkomórkowa hemoproteina, zależna od  $H_2O_2$ , o bardzo wysokim potencjale redox i niskim optymalnym pH [26-28]. Enzym ten wykazuje niską specyficzność substratową, reagując z dużą ilością związków o strukturze zbliżonej do lignin, jak również w stosunku do związków o strukturze od nich odmiennej [29-31]. LiP wykazuje zdolność do utleniania metoksylovanego pierścienia aromatycznego, nieposiadającego wolnych grup fenolowych (rys. 3), generując dodatkowo rodniki, które następnie mogą brać udział w wielu reakcjach, włączając rozerwanie wiązań  $C_\alpha-C_\beta$ , otwarcie pierścienia, demetylację i dimeryzację fenoli.



Rys. 3. Reakcja utleniania metoksylovanego pierścienia aromatycznego katalizowana przez peroksydazę ligninową (LiP) [31]

Fig. 3. Methoxylated aromatic rings oxidation catalyzed by the lignin peroxidase (LIP) [31]

LiP pochodzące z różnych źródeł mogą prowadzić do mineralizowania wielu różnych związków aromatycznych i utleniania znaczącej ilości policyklicznych

węglowodorów aromatycznych oraz pochodnych fenolu, np. chlorofenoli, nitrofenoli [10, 32-34].

### 2.1.2. Mn-zależna peroksydaza (MnP, EC 1.11.1.13)

Mn-zależna peroksydaza jest enzymem nieco mniej poznanym od LiP. Należy do grupy glikoprotein wydzielanych poza komórkę. Enzym ten wykazuje preferencje względem jonów manganu Mn(II) jako substratu do redukcji. Produkt reakcji - Mn(III) tworzy kompleks z kwasami organicznymi i dyfunduje od enzymu, by utleniać inne związki, jak np. ligniny.

Sądzone, że potencjał redox peroksydazy Mn-Mn jest niższy niż w przypadku peroksydazy ligninowej i wykazuje jedynie zdolność do utleniania substratów fenolowych *in vitro* [35]. Substraty fenolowe są utleniane przez fenoksy rodniki, które dalej mogą reagować w reakcjach demetylacji, utlenianiu C<sub>α</sub> czy rozerwania wiązań C<sub>α</sub>-C<sub>β</sub> [36]. Dane literaturowe wskazywały, że enzym ten katalizuje utlenianie kilku monoaromatycznych fenoli, jednakże jego działanie zależy nie tylko od obecności manganu, ale również od odpowiedniego buforu [2, 27]. Badania prowadzone przez Mestera i Tiena wykazały jednak, że MnP posiada szersze spektrum substratowe. Enzym ten katalizuje reakcje utleniania niefenolowych związków ligninowych i WWA. Mn-peroksydaza z *Nematoloma frowardii* utlenia antracen, piren, benzo(a)piren i fenantren w obecności glutationu [37, 38] oraz w obecności nienasyconych kwasów tłuszczowych [37, 39]. Rola i mechanizm działania tych substancji w reakcjach katalizowanych przez MnP nie zostały jeszcze w pełni wyjaśnione.

### 2.1.3. Lakkaza

Lakkazy (1.10.3.2) są zewnątrzkomórkowymi glikoproteinami zawierającymi 4 atomy miedzi. Enzymy te wykazują szerokie spektrum substratowe, co czyni je przydatnymi w procesach bioremediacji. W wielu pracach [2-5, 40-45] wykazano, że enzymy produkowane przez niektóre grzyby białej zgnilizny mają zdolność do efektywnego utleniania policyklicznych węglowodorów aromatycznych. Badania prowadzone przez Bollaga i innych (1988) oraz przez Gianfreda i innych [2, 10, 46] dowiodły, że lakkazy pochodzące z różnych grzybów wykazywały zdolność do usuwania wysokich stężeń fenoli. Wyizolowane oksydazy grzybowe mogą być z powodzeniem wykorzystywane w procesach biokonwersji, gdyż są stabilne w różnych warunkach, i, w szczególności lakkazy, nie wymagają obecności kosztownych kosubstratów, jedynie molekularnego tlenu [19, 48].

Lakkaza jest enzymem biorącym udział w utlenianiu wielu związków aromatycznych do produktów mniej toksycznych dla środowiska. Dlatego wydaje się, że enzym ten powinien mieć szerokie zastosowanie w procesach oczyszczania środowiska. Lakkaza może być wykorzystywana w procesach detoksyfikacji środowiska zanieczyszczonego fenolem, trichlorofenolem, pestycydami oraz wielopierścieniowymi związkami aromatycznymi, takimi jak benzo(a)piren, a więc związkami mającymi właściwości mutagenne i kancerogenne, szeroko rozpowszechnionymi w środowisku [6, 49, 50].

Dzikie bądź modyfikowane lakkazy mogą być wykorzystywane w celu usprawnienia procesu bioremediacji miejsc zanieczyszczonych związkami organicznymi. W technologii tej mogą być wykorzystywane komórki grzybów produkujących pożądane enzymy bądź też wyizolowane wolne lub immobilizowane na różnych nośnikach enzymy.

Lakkazy mogą katalizować bezpośrednie utlenianie innych ksenobiotyków. Na przykład surfaktant - nonylfenol jest efektywnie przekształcany w środowisku wodnym do polimerycznych związków [51]. Lakkazy mogą też katalizować pośrednie utlenianie związków niebędących fenolami czy aminami. W tych przypadkach wymagają one obecności pośredników redox, naturalnych bądź syntetycznych. Ten rodzaj reakcji jest obserwowany w przypadku WWA [44].

Usuwanie związków fenolowych i innych ksenobiotyków z użyciem lakkazy może zachodzić z użyciem wolnego, oczyszczonego enzymu; enzymu immobilizowanego bądź przy wykorzystaniu enzymu otrzymanego bezpośrednio z płynu hodowlanego [52].

Z uwagi na hydrofobowość i niską rozpuszczalność w wodzie ksenobiotyków, takich jak wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, utlenianie enzymatyczne, na przykład przez lakkazę, może zachodzić w obecności organicznego rozpuszczalnika, gdyż zmniejsza to limitację przepływu masy. Jednak lakkaza w obecności rozpuszczalników organicznych jest dość niestabilna i często ulega denaturacji lub/i inhibicji [6, 33]. W związku z tym Alcade i inni [6, 53] zaprojektowali na drodze ewolucji *in vitro* termofilną lakkazę, która wykazuje wysoką aktywność i stabilność w obecności dużych stężeń acetonitrylu i etanolu. By jednak zwiększyć działanie lakkazy względem wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych oraz pochodnych lignin, w reakcji muszą być dostępne syntetyczne lub naturalne pośredniki redox [6, 54]. Dlatego dalsze badania powinny zmierzać w kierunku otrzymania lakkazy, która byłaby mniej zależna od obecności tego typu pośredników, by mogła być szeroko stosowana w bioremediacji.

#### **2.1.4. Wykorzystanie lipaz w biodegradacji**

Enzymy lipolityczne znajdują szerokie zastosowanie w ochronie środowiska, choć ich wykorzystanie jako czynników wspomagających proces biodegradacji ksenobiotyków nie zostało dotychczas opisane w literaturze. Pośród enzymów lipolitycznych niezwykle ważną grupę stanowią lipazy. Cechą charakterystyczną tych enzymów jest to, że ich substratami są związki hydrofobowe, nierozpuszczalne w wodzie, a one same wykazują stosunkowo niską specyficzność substratową. Lipazy, głównie z uwagi na ogromną różnorodność zastosowań, stanowią niezwykle ważną, z praktycznego punktu widzenia, grupę enzymów. Z powodzeniem wykorzystywane są w wielu gałęziach przemysłu, służąc jako katalizatory do wytwarzania modyfikowanej żywności, farmaceutyków, kosmetyków, biodegradowalnych polimerów, środków piorących, surfaktantów i innych. Enzymy te do tej pory były głównie wykorzystywane w procesach utylizacji odpadów tłuszczowych.



Jednym z wariantów wykorzystania możliwości aplikacyjnych lipaz jest ich zastosowanie do monitorowania procesów bioremediacji. Enzymy znajdujące się w skażonej związkami organicznymi glebie są katalizatorami wielu ważnych procesów metabolicznych, w tym również dekompozycji związków powodujących skażenie, a także detoksykacji ksenobiotyków. Margesin i inni wykorzystali lipazę obecną w skażonej glebie jako narzędzie monitoringu procesu biodegradacji oleju w glebie. Wykazali oni, że wraz ze spadkiem stężenia węglowodorów w skażonej glebie wzrastała aktywność lipazy, co może wskazywać na to, iż systemy enzymatyczne związane z degradacją tłuszczu mogą być bardzo zbliżone do tych związanych z biodegradacją oleju. Zatem aktywność lipazy w skażonej glebie może służyć jako wartościowy indyktor stopnia biodegradacji oleju [55-57]. Wyniki otrzymane w ostatnich latach, przez Mitę i innych [58] wskazują na możliwość wykorzystania lipazy w procesach biodegradacji ftalanów w celu podniesienia wydajności procesu bioremediacji wód zanieczyszczonych tego typu związkami. Ponadto immobilizowana lipaza z *Candida rugosa* została wykorzystana w procesie bioremediacji wód zanieczyszczonych dimetyloftalanami.

Wydaje się więc, że możliwości wykorzystania lipaz w procesach bioremediacji są znacznie większe i zagadnienie to wymaga dalszych badań.

### 3. Enzymy izolowane z komórek - zastosowanie w bioremediacji

Dotychczas istnieje stosunkowo niewiele doniesień literaturowych na temat oczyszczania gruntów prowadzonych z wykorzystaniem enzymów wyizolowanych z komórek mikroorganizmów [4, 59].

Kilku autorów [59, 60] opisało pozytywne i negatywne aspekty zastosowania wyizolowanych enzymów w stosunku do bioremediacji prowadzonej z użyciem aktywnych komórek.

Jedną z najważniejszych korzyści stosowania wolnych enzymów jest fakt, iż posiadają one unikalną specyficzność substratową i wysoką siłę katalityczną. Mogą one funkcjonować w obecności wielu toksycznych substancji oraz w szerszym zakresie zmian warunków środowiska (temperatura, pH, wysokie bądź niskie stężenie związków zanieczyszczających środowisko), w przeciwieństwie do procesów, w których stosuje się aktywne komórki drobnoustrojów. Enzymy te mają również niską wrażliwość na obecność inhibitorów metabolizmu komórkowego i drastyczne zmiany stężeń polutantów [10].

Wiele związków o charakterze ksenobiotyków, jak asfaltyny, polichlorowane bifenyle, polichlorofenole, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, ulega przekształceniu przez enzymy z klasy oksydoreduktaz i hydrolaz wyizolowanych z bakterii, grzybów czy roślin [10]. Trzy- lub czteropierścieniowe węglowodory, jak antracen, fenantren, fluoranten, ulegają utlenieniu przez peroksydazę ligninową, Mn-zależną peroksydazę i lakkazę wyizolowane z *Nematoloma frowardii* [10, 42].

Enzymy wyizolowane z komórek mogą również znaleźć zastosowanie w degradacji związków nitrylowych [10, 61]. Związki te są szeroko rozpowszechnione

w przemyśle chemicznym, gdzie wykorzystywane są do produkcji wielu polimerów, jak również rozpuszczalników, pestycydów lub jako związki pośrednie w syntezach organicznych takich związków, jak aminy, amidy, kwasy karboksylowe, eter, aldehydy, ketony. Większość z nich ma silne właściwości toksyczne: kancerogenne i mutagenne [10, 62]. Banerjee i inni [10, 61] donoszą, że istnieje kilka gatunków bakterii i grzybów, które posiadają enzymatyczną zdolność metabolizowania naturalnych i syntetycznych nitryli. Są to nitrylazy, hydrolazy nitrylowe i amidazy.

#### 4. Zalety i wady enzymatycznej biodegradacji

Wykorzystanie enzymów w procesach bioremediacji z punktu widzenia ochrony środowiska niesie wiele korzyści [6]:

- biotransformacja ta nie powoduje gromadzenia toksycznych produktów ubocznych, co często ma miejsce w przypadku chemicznych i niektórych mikrobiologicznych procesów, a enzymy zostają po zakończeniu procesu strawione *in situ* przez mikroorganizmy bytujące w miejscu skażenia;
- zwiększenie biodostępności poprzez wprowadzenie organicznych rozpuszczalników lub surfaktantów jest znacznie łatwiej osiągalne w przypadku użycia enzymów niż w przypadku użycia całych komórek;
- do produkcji na dużą skalę enzymów o zwiększonej stabilności i/ lub aktywności przy niskich nakładach finansowych można wykorzystać metody rekombinacji genetycznej.

Ponadto enzymy wyizolowane z komórek drobnoustrojów mogą charakteryzować się wyjątkową, unikalną specyficznością substratową i wysoką aktywnością w obecności wielu toksycznych, nawet opornych na biodegradację substancji i/lub w różnorodnych warunkach środowiska, często nieprzyjaznych dla drobnoustrojów.

Głównymi zaletami enzymatycznej bioremediacji, w porównaniu z typową remediacją mikrobiologiczną, są: wysoka aktywność względem opornych na degradację polutantów, niska wrażliwość na zmiany ich stężeń kontaminantów oraz łatwa kontrola miejsca aplikacji.

Jednakże w środowisku naturalnym istnieją pewne czynniki mogące zakłócić lub zmniejszyć potencjał katalityczny enzymatycznych katalizatorów, a trudności w zastosowaniu enzymów w biotransformacji ksenobiotyków mogą wynikać zarówno z własności enzymu, jak i polutanta.

Główne ograniczenia wykorzystania enzymów w procesie biodegradacji dotyczą:

- braku zdolności enzymów do samoreprodukowania się, co oznacza, że każde zwiększenie stężenia enzymu w środowisku musi pochodzić z zewnątrz;
- możliwości utraty części aktywności przez enzym przy kontakcie z polutantem, a w konsekwencji mogą ją całkowicie utracić [10];
- konieczności monitorowania stężenia enzymu przez cały okres trwania procesu w celu optymalizacji kinetyki reakcji;

- braku zdolności enzymów do adaptowania się (którą z kolei wykazują drobnoustroje poprzez mutacje) z uwagi na brak zdolności do reprodukcji [63-65].

Główną wadą wykorzystywania enzymów w procesach bioremediacji są wysokie koszty enzymów samych w sobie. Jednakże szacuje się, że koszty te mogą ulec obniżeniu dzięki udoskonaleniu technologii i wykorzystywaniu tańszych substratów do produkcji enzymów [10, 66, 67].

## 5. Perspektywy

Usuwanie szeroko rozpowszechnionych, organicznych zanieczyszczeń pochodzenia antropogenicznego uważane jest za jeden z najpoważniejszych problemów zrównoważonego i ciągłego rozwoju Ziemi w XXI wieku [6]. Problem dotyczy zarówno krajów słabo, jak i dobrze rozwiniętych i związany jest z toksycznym oddziaływaniem tych substancji na biocenozę i funkcjonowanie ekosystemów [68, 69].

Do usuwania zanieczyszczeń ze środowiska wykorzystuje się różne techniki remediacji, które w różnym stopniu bazują na procesach biodegradacji [69]. Celem technologii bioremediacji jest racjonalne wykorzystanie potencjału metabolicznego mikroorganizmów do asymilacji i rozkładu zanieczyszczeń. Technologie te, w przeciwieństwie do metod konwencjonalnych, fizycznych lub/i chemicznych, wykorzystują naturalną zdolność środowiska przyrodniczego do samooczyszczania [70, 71], a bioremediacja stanowi najbezpieczniejszą, najmniej inwazyjną i najbardziej ekonomiczną [6, 13, 72]. Metoda ta wykorzystuje naturalnie istniejący potencjał kataboliczny mikroorganizmów bytujących w skażonym środowisku lub do niego wprowadzonych, a także wyizolowanych enzymów, do oczyszczania środowiska z zarówno prostych alifatycznych związków, jak i związków aromatycznych czy ksenobiotyków, charakteryzujących się wysoką toksycznością i własnościami kancerogennymi.

Głównym problemem technologii bioremediacji jest usuwanie najtrudniej degradalnych ksenobiotyków, często zalegających przez długi okres w środowisku, oraz przeprowadzenie ostatniego etapu procesu biodegradacji, czyli usunięcie tzw. zanieczyszczeń reszkowych. Ciągła akumulacja w środowisku silnie toksycznych polutantów wskazuje, iż mikroorganizmy bytujące w środowisku nie są w stanie w pełni skutecznie chronić biosferę przed zanieczyszczeniami antropogenicznymi. Dlatego w ostatnich latach zwrócono uwagę na możliwość zastosowania enzymów w procesach biodegradacji. Celem bioremediacji enzymatycznej jest wykorzystanie potencjału katalitycznego enzymów do usuwania ze środowiska toksycznych, trudno degradalnych związków. Jako że enzymy stanowią prostsze systemy niż całe komórki mikroorganizmów, bioremediacja enzymatyczna stała się atrakcyjnym narzędziem wspierania obecnie stosowanych biotechnologii, szczególnie do usuwania ze środowiska konkretnych, opornych na degradację polutantów [6, 13, 14]. Ponadto enzymy zostają strawione *in situ* przez autochtoniczną

mikroflorę po zakończeniu procesu oczyszczania, zastosowanie rozpuszczalników lub surfaktantów w celu zwiększenia biodostępności zanieczyszczenia jest znacznie łatwiejsze przy zastosowaniu enzymów niż w przypadku użycia mikroorganizmów [73]. Wyniki dotychczas przeprowadzonych badań wskazują, iż enzymy zewnątrzkomórkowe okazują się być efektywne w bioremediacji środowiska zanieczyszczonego takimi związkami, jak np. WWA, PCB i fenole. Szczególnie efektywne w ich degradacji są MNP, LiP i lakkaza, wytwarzane przez wiele gatunków grzybów białej zgnilizny.

Jednak zastosowanie enzymatycznej biokatalizy stwarza wiele trudności. Jednoczesna obecność kilku substancji toksycznych w środowisku często negatywnie wpływa na efektywność procesu bioremediacji. Wyizolowanie i oczyszczenie enzymu może zwiększyć jego specyficzność substratową i aktywność, ale jednocześnie podnosi koszty procesu. Wszystkie te aspekty ograniczają możliwość zastosowania bioremediacji enzymatycznej. Dlatego też wydaje się, że najefektywniejszym rozwiązaniem byłoby zastosowanie technik bioremediacji wiążących potencjał mikroorganizmów z wykorzystaniem enzymów.

Ponadto potencjał wykorzystania enzymów do celów bioremediacji może zostać zwiększony poprzez zastosowanie enzymów uzyskanych z mikroorganizmów pochodzących ze środowisk ekstremalnych. Enzymy zarówno z termofilnych, jak i psychrofilnych drobnoustrojów często wykazują unikalne własności, które mogą wskazywać na możliwość wykorzystania ich w degradacji związków chemicznych. Odkrycie nowych enzymów znajdujących zastosowanie w biologicznej remediacji stanowi jedno z kluczowych wyzwań biotechnologicznych.

Zanim jednak technologia enzymów będzie mogła być wykorzystywana w procesach bioremediacji na szeroką skalę, muszą zostać przeprowadzone dalsze badania. Większość dotychczas przeprowadzonych doświadczeń dotyczyła wykorzystania jednego konkretnego enzymu do utylizacji określonego zanieczyszczenia. Należy przeprowadzić badania dotyczące wykorzystania wielu enzymów do konkurencyjnego degradowania różnych związków. Autorzy publikacji dotyczącej wykorzystania kompleksu zewnątrzkomórkowych enzymów, otrzymanych w hodowli mikroorganizmów degradujących węglowodory, w procesie bioremediacji gleby zanieczyszczonej olejem napędowym nie wskazują na to, jakie enzymy zostały zastosowane, a jedynie podkreślają, że wprowadzenie kompleksu enzymów zwiększa efektywność biodegradacji zanieczyszczenia [74].

Ponadto należy przeprowadzić więcej prób „polowych” w celu oszacowania skali efektywności enzymów jako środków zwiększających efektywność bioremediacji. W ten sposób można sprawdzić, czy bioremediacja enzymatyczna jest efektywną i pożądaną alternatywą dla współczesnej remediacji.

Bioremediacja enzymatyczna jest wciąż nowym obszarem nauki i opublikowano niewiele prac na ten temat. Jej narzędzia znajdują już zastosowanie w monitoringu procesów biodegradacji oraz identyfikacji zanieczyszczeń obecnych w środowisku. Wyzwanie stanowi natomiast dobór odpowiednich enzymów pod kątem degradacji konkretnego typu zanieczyszczeń. W dobie ciągłego rozwoju przemysłu do środowiska naturalnego coraz częściej przedostają się złożone, odporne na de-

gradację zanieczyszczenia. Ciekawym rozwiązaniem wydaje się zastosowanie nie tyle pojedynczych enzymów, których otrzymanie jest trudne i kosztowne, ale kompleksów enzymów, które mogą być zastosowane do wspomaganie bioremediacji środowiska zanieczyszczonego mieszaninami związków organicznych.

Mimo iż bioremediacja enzymatyczna jest nowym działem biotechnologii środowiska, dotychczas opisane w literaturze wyniki sugerują, że może ona być niezmiernie efektywnym środkiem udoskonalenia technologii bioremediacji.

## Literatura

- [1] Rieger P.G., Meier H-M., Gerle M., Vogt U., Groth T., Knackmuss H-J., Xenobiotics in the environment: present and future strategies to obviate the problem of biological persistence, *J. of Biotechnol.* 2002, 94, 101-123.
- [2] Gianfreda L., Sannino F., Filazzola M.T., Leonowicz A., Catalytic behaviour and detoxifying ability of a laccase from the fungal strain *Cerrena unicolor*, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 1998, 14, 13-23.
- [3] Nicell J.A., Environmental applications of enzymes, *Interdisci. Environ. Rev.* 2001, 3, 14-41.
- [4] Gianfreda L., Bollag J.M., Isolated enzymes for the transformation and detoxification of organic pollutants, [in:] R.G. Burns, R. Dick. *Enzymes in the Environment: Activity, Ecology and Applications*, Merceel Dekker, New York 2002.
- [5] Keum Y.S., Li Q. X., Fungal laccase-catalysed degradation of hydroxyl polychlorinated biphenyls, *Chemosphere* 2004, 56, 23-30.
- [6] Alcade M., Ferrer M., Plou F.J., Ballesteros A., Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes, *Trends in Biotechnol.* 2006, 24, 281-287.
- [7] Iwamoto T., Nasu M., Current bioremediation practice and perspective, *J. of Bioscience& Bioengineering* 2001, 92, 1-8.
- [8] Fernando T., Aust S.D., Biodegradation of toxic chemicals by white-rot fungi, [in:] G.R. Chaudhry GR (ed), *Biological Degradation and Bioremediation of Toxic Chemicals*, Chapman & Hall, London 1994, 386-402.
- [9] Novotny C., Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate, *Soil Biology & Biochemistry* 2004, 36, 1545-1551.
- [10] Gianfreda L., Rao M.A., Potential of extracellular enzymes in remediation of polluted soils a review, *Enzyme and Microbial Technology*, 2004, 35, 339 -354.
- [11] Suthersan S.S., *Remediation engineering: design concepts*, Ed S.S. Suthersan CRC Press, Boca Raton 1999.
- [12] Whiteley C.G., Lee D.J., Enzyme technology and biological remediation, *Enzyme and Microbial Technol.*, 2006, 38, 291-316.
- [13] Sutherland T.D., Horne I., Weir K.M., Coppin C.W., Williams M.R., Selleck M., Russel R.J., Oakeshott J.G., *Enzymatic bioremediation: from enzyme discovery to applications*, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 2004, 31, .817-821.
- [14] Pieper D.H., Martins dos Santos V.A., Golyshin P.N., Genomic and mechanistic insight into the biodegradation of organic pollutants, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2004,15, .215-224.
- [15] Ruggaber T.P., Talley J.W., *Enhancing Bioremediation with Enzymatic Processes: A Review*, *Practice Periodical of Hazardous, Toxic, And Radioactive Waste Management ASCE*, 2006, 10, 73-85.
- [16] Burton S.G., *Development of bioreactors for application of biocatalysis in biotransformation and bioremediation*, *Pure and Applied Chemistry*, 2001, 73, 77-83.
- [17] Scow K.M., Hicks K.A., Natural attenuation and enhanced bioremediation of organic contaminants in groundwater, *Curr. Opin. Biotechnol.* 2005, 16, 246-253.

- [18] Bajpai P., Biological bleaching of chemical pulps, *Crit. Rev. Biotechnol.* 2004, 24, 1-58.
- [19] Gullo A., Branciamore S., Duchi I., Cano M.F.P., Randazzo D., Tilli S., Giardina S., Sannia G., Scozzafava A., Briganti F., Combined action of a bacterial monooxygenase and a fungal laccase for the biodegradation of mono- and poly-aromatic hydrocarbons, *Bioresource Technology* 2008, 99, 8353-8359.
- [20] Levin L., Forchiassin F., Ligninolytic enzymes of the white rot basidiomycete *Trametes trogii*, *Acta Biotechnol.* 2001, 21, 179-186.
- [21] Field J.A., Dejong E., Feijoo Costa G., Debont J.A.M., Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics, *Trends Biotechnol.* 1993, 11, 44-49.
- [22] Cremonesi P., Cavalieri E.L., Rogan E.G., One-electron oxidation of 6-substituted benzo[a]pyrene by manganic acetate: a model for metabolic activation, *J. Org. Chem.* 1989, 54, 3561-3570.
- [23] Pointing S.B., Feasibility of bioremediation by white-rot fungi, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2001, 57, 20-32.
- [24] Torres-Duarte C., Roman R., Tinoco R., Vazquez-Duhalt R., Halogenated pesticide transformation by a laccase-mediator system, *Chemosphere* 2009, 77, 687-692.
- [25] Duran N., Esposito E., Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review, *App. Catal. B: Environ.* 2000, 28, 83-89.
- [26] Gold M.H., Alic M., Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, *Microbiol Rev.* 1993, 57, 605-622.
- [27] Haglund Ch., Biodegradation of xenobiotic compounds by the white-rot fungus *Trametes trogii*, Master's degree project, University of Buenos Aires, Argentina 1999.
- [28] Johjima T., Itoh N., Kabuto M., Tokimura F., Nakagawa T., Wariishi H., Tanaka H., Direct interaction of lignin and lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1999, 96, 1989-1994.
- [29] Barr D.P., Aust S.D., Mechanisms white-rot fungi use to degrade pollutants, *Environ. Sci. Technol.* 1994, 28, 78A-87A.
- [30] Gelpke M.D.S., Mayfield-Gambill M., Cereghino G.P.L., Gold M.H., Homologous expression of recombinant lignin peroxidase in *Phanerochaete chrysosporium*, *Appl. Environ. Microbiol.* 1999, 65, 1670-1674.
- [31] Banci L., Ciofi-Baffoni S., Tien M., Lignin and Mn peroxidase-catalyzed oxidation of phenolic lignin oligomers, *Biochemistry* 1999, 38, 3205-3210.
- [32] Casella L., Poli S., Gullotti M., Selvaggini C., Berinelli T., Marchesini A., The chloroperoxidase-catalyzed oxidation of phenols, Mechanism selectivity and characterization of enzyme-substrate complexes, *Biochemistry* 1994, 33, 6377- 6386.
- [33] Torres E., Bustos-Jaimes I., Le Borgne S., Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants, *Appl. Catal. B. Environ.* 2003, 46, 1-15.
- [34] Shrivastava R., Christian V., Vyas B.R.M., Enzyme decolorization of sulfonphthalein dyes, *Enzyme Microbiology and Technology* 2005, 36, 333-337.
- [35] Vares T., PhD Thesis. Department of Applied Chemistry and Microbiology, Division of Microbiology, University of Helsinki, Finland 1996.
- [36] Tuor U., Wariishi H., Schoemaker H.E., Gold M.H., Oxidation of phenolic arylglycerol  $\beta$ -aryl ether lignin model compounds by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*: oxidative cleavage of an  $\alpha$ -carbonyl model compound, *Biochemistry* 1992, 31, 4986-4995.
- [37] Mester T., Tien M., Oxidation mechanism of ligninolytic enzymes involved in the degradation of environmental pollutants, *Inter Biodeterioration & Biodegradation* 2000, 46, 51-59.
- [38] Sack U., Hofrichter M., Fritsche W., Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by manganese peroxidase of *Nematoloma frowardii*, *FEMS Microbiol. Lett.* 1994, 152, 227-234.
- [39] Kapich A., Hofrichter M., Vares T., Hatakka A., Coupling of manganese peroxidase-mediated lipid peroxidation with destruction of nonphenolic lignin model compounds and  $^{14}\text{C}$ -labeled lignins, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1999, 259, 212-219.

- [40] Bogan B.W., Lamar R.T., Polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading capabilities of *Phanerochaete laevis* HHB-1625 and its extra cellular ligninolytic enzymes, *Appl. Environ. Microbiol.* 1996, 62, 1597-1603.
- [41] Novotny C., Vyas B.R., Erbanova P., Kubatova A., Sasek V., Removal of various PCB's by various white-rot fungi in liquid cultures; *Folia Microbiol.* 1997, 42, 136-140.
- [42] Guenther T., Sack U., Hofrichter M., Laetz M., Oxidation of PAH and PAH- derivatives by fungal and plant oxidoreductases, *J. Basic Microbiol.* 1998, 38, 113-122.
- [43] Dodor E.D., Hwang H-M., Ekunwe S.I.N., Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by immobilized laccase from *Trametes versicolor*, *Enzyme and Microbial Technol.* 2004, 35, 210-217.
- [44] Mougín Ch., Jolivalt C., Briozzo P., Madzak C., Fungal laccases: from structure - activity studies to environmental applications, *Environ. Chem. Lett.* 2003, 1, 145-148.
- [45] Wu Y., Teng Y., Li Z., Liao X., Luo Y., Potential role of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) oxidation by fungal laccase in the remediation of an aged contaminated soil, *Soil Biol&Biochem.* 2008, 40, 789-796.
- [46] Bollag J.M., Shuttlesworth K.L., Anderson D.H., Laccase-mediated detoxification of phenolic compounds, *Applied Environmental Microbiology* 1988, 54, 3086-3091.
- [47] Gianfreda L., Xu F., Bollag J-M., Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes, *Bioremediat. J.* 1999, 3, 1-26.
- [48] Gianfreda L., Iamarino G., Scelza R., Rao M.A., Oxidative catalyst for the transformation of phenolic pollutants: a brief review, *Biocatal. Biotransform.* 2006, 24, 177-187.
- [49] Samanta S.K., Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation, *Trends Biotechnol.* 2002, 20, 243-248.
- [50] Bautista L.F., Morales G., Sanz R., Immobilization strategies for laccase from *Trametes versicolor* on mesostructured silica materials and the application to the degradation of naphthalene, *Bioresource Technology* 2010, 101, 8541-8548.
- [51] Dubroca J., Brault A., Kollmann A., Touton I., Jolivalt C., Kerhoas L., Mougín C., Biotransformation of Nonylphenol Surfactants in Soils Amended with Contaminated Sewage Sludges, *Environmental Chemistry*, Springer, Berlin - Heidelberg New-York 2005, 305-315.
- [52] Majeau J.A., Stinder K., Brar S.K., Tyagi R.D., Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants, *Bioresource Technology* 2010, 101, 2331-2350.
- [53] Alcalde M., Bulter T., Zumarraga M., Garcia-Arellano H., Mencia M., Plou F.J., Ballesteros A., Screening mutant libraries of fungal laccases in the presence of organic solvents, *J. Biomol. Screen.* 2005, 10, 624-631.
- [54] Camarero S., Ibarra D., Martínez M.J., Martínez A.T., Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes, *Appl. Environ. Microbiol.* 2005, 71, 1775-1784.
- [55] Margesin R., Zimmerbauer A., Schinner F., Soil lipase activity - a useful indicator of oil biodegradation, *Biotechnol. Techniques* 1999, 13, 859- 863.
- [56] Margesin R., Zimmerbauer A., Schinner F., Monitoring of bioremediation by soil biological activities, *Chemosphere* 2000, 40, 339-346.
- [57] Lee S-H., Oh B-I., Kim J-G., Effect of various amendments on heavy mineral oil bioremediation and soil microbial activity, *Bioresource Technology* 2008, 99, 2578- 2587.
- [58] Mita L., Sica V., Guida M., Nicolucci C., Grimaldi T., Caputo L., Bianco M., Rossi S., Bencivenga U., Eldin M.S.M., Tufano M.A., Diano N., Employment of immobilised lipase from *Candida rugosa* for the bioremediation of waters polluted by dimethylphthalate, as a model of endocrine disruptors, *J. Molec. Catal. B: Enzym.* 2010, 62, 133-141.
- [59] Nannipieri P., Bollag J.-M., Use of enzymes to detoxify pesticide- contaminated soils and waters, *J. Environ. Qual.* 1991, 20, 510-517.
- [60] Karam J., Nicell J.A., Potential application of enzymes in waste treatment, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 1997, 69, 141-153.

- [61] Banerjee A., Sharma R., Banerjee U.C., The nitrile-degrading enzymes: current status and future prospects, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002, 60, 33-44.
- [62] Pollak P., Romender G., Hagedorn F., Gelbke H.P., [in:] Elvers B., Hawikins S., Schulz G. (eds), *Ullman's encyclopedia of industrial chemistry*, vol. A17. 5th Ed. Wiley/VCH, Weinheim 1991, 363-376.
- [63] Heitkamp M.A., Freeman J.P., Miller D.W., Cerniglia C.E., Pyrene degradation by a *Mycobacterium sp.*: identification of ring oxidation and ring fission products, *Appl. Environ. Microbiol.* 1988, 54, 2556-2565.
- [64] Somero G.N., Adaptation of enzymes to temperature: searching for basic "strategies", *Comp. Biochem. Physiol., Part B* 2004, 139, 321-333.
- [65] Singer A.C., Thompson I.P., Bailez M.J., The tritrophic trinity: a source of pollutant-degrading enzymes and its implications for phytoremediation, *Curr. Opin. Microbiol.* 2004, 7, 239-244.
- [66] Ahuja S.K., Ferreira G.M., Moreira A.R., Utilization of enzymes for environmental applications, *Critic. Rev. Biotechnol.* 2004, 24, 125-154.
- [67] Ikehata K., Buchanan I.D., Smith D.W., Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment, *Environ Eng. Sci.* 2004, 3, 1-19.
- [68] Jacobuci F.C., Kelly V.C., Beatriz M.A., Andre F.F., Lucia R.D., Degradation of diesel oil by biosurfactant-producing bacterial strains, *The First International Congress on Petroleum Contaminated Soils, Sediments and Water*, London 2001.
- [69] Petrovic O., Knezevic P., Markovic J., Roncevic S., Screening method for detection of hydrocarbon-oxidizing bacteria in oil-contaminated water and soil specimens, *Journal of Microbiological Methods* 2008, 74, 110-113.
- [70] Leeson A., Honchee R.E., *Soil Bioventing, Principles and Practice*, CRC Lewis, Boca Raton 1997, 120-167.
- [71] Scherr K., Aichberger H., Braun R., Loibner A.P., Influence of soil fractions on microbial degradation behavior of mineral hydrocarbons, *European Journal of Soil Biology* 2007, 43, 341-350.
- [72] Paul D., Pandey G., Pandey J., Jain R.K., Accessing microbial diversity for bioremediation and environmental restoration, *Trends Biotechnol.* 2005, 23, 135-142.
- [73] Rao M.A., Scelza R., Scotti R., Gianfreda L., Role of enzymes in the remediation of polluted environments, *J. Soil Sci. Plant Nurt.* 2010, 10, 333-353.
- [74] Gómez Jiménez-TR., Moliterni E., Rodríguez L., Fernández F.J., Villaseñor J., Feasibility of mixed enzymatic complexes to enhanced soil bioremediation processes, *Procedia Environ. Sciences* 2011, 9, 54-59.

## Enzymatic Bioremediation of Xenobiotics

Environmental pollution is growing more and more due to the frequently deliberate release of hazardous, toxic substances into the environment and it has become one of the biggest ecological problems of the world. Therefore, a growing interest is being devoted to develop new, cost-effective and eco-friendly remediation technology capable of partial or total recovery of polluted environment. Bioremediation that uses naturally existing catabolic potential of microorganisms can be efficiently used to clean up certain pollutants such as aliphatic or aromatic hydrocarbons. However, for chemicals exhibiting high xenobiotic character, like polyaromatic hydrocarbons, chlorophenols, dioxines, PCBs, etc., microorganisms can turn out to be ineffective. Among biological agents, enzymes have a great potential to effectively transform and detoxify pollutants and are potentially suitable to restore polluted environments. Moreover, the use of enzymatic proteins may represent a good alternative for overcoming most disadvantages related to the use of microorganisms. They are active in the presence of microbial predators and antagonists, can be used under extreme conditions limiting microbial activity and are effective at low pollutant concentrations. This work will examine the possibility of using enzyme preparations as an element of bioremediation technology. The main terms which must be fulfilled while using this type of technology



will be presented. This review will also examine some class of enzymes, mainly oxidoreductases and hydrolases, that are capable of transforming xenobiotics effectively into innocuous products. Particular attention will be devoted to enzymes from white-rot fungi, such as Mn-peroxidase, lignin peroxidase and laccase, which have a great potential towards xenobiotic compounds transformation. Also the use of lipase in biodegradation of phthalanes and as an agent for monitoring of bioremediation progress will be discussed. The main advantages as well as disadvantages that are present in the application of enzymes in the bioremediation of polluted environments will be examined in details. The future perspective for the *in situ* application of enzymatic bioremediation of polluted with xenobiotics environments will be discussed.

**Keywords:** biodegradation, xenobiotics, enzyme, fungi