

**Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biochemie  
Studijní obor: Biochemie



**Bc. Alicja Barbara Veselá**

**Nové možnosti aplikace nitrilas v biokatalýze  
a bioremediaci**

**New possibilities of nitrilases in biocatalysis  
and bioremediation**

Diplomová práce

Vedoucí práce: Prof. RNDr. Karel Bezouška, DSc.

Školitel: Ing. Ludmila Martínková, CSc.

Praha, 2011

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Tato práce byla vypracována od února 2009 do dubna 2011 v Laboratoři biotransformací, MBÚ, AVČR, v. v. i.

V Praze dne 3. 5. 2011

Podpis:

## **Poděkování**

Děkuji Ing. Ludmile Martínkové, CSc., Prof. RNDr. Karlu Bezouškovi, DSc., Prof. Vladimíru Křenovi, Ing. Ondřeji Kaplanovi, RNDr. Vojtěchu Vejvodovi, PhD., Anně Rinágelové, Mgr. Aleně Petříčkové, Drahomíře Dobiášové a všem pracovníkům Laboratoře biotransformací za pomoc a odborné vedení; své rodině za podporu a pochopení.

## Abstrakt

Nitrilasy jsou enzymy, jež katalyzují hydrolyzu nitrilů na karboxylové kyseliny. Pro svou chemo- a enantioselektivitu mají tyto enzymy velký potenciál pro využití v biokatalýze, např. při syntéze kyseliny mandlové a mandelamidu, nebo bioremediaci míst kontaminovaných organickými nitrily. V této práci byla studována nitrilasová aktivita rekombinantních kmenů *E. coli* exprimujících hypotetické fungální nitrilasy z hub *Giberella moniliformis* a *Nectria haematococca* mpVI 77-13-4 a schopnost bakterií rodu *Rhodococcus* a *Nocardia* hydrolyzovat benzonitrilové herbicidy dichlobenil (2,6-dichlorbenzonitril), ioxynil (3,5-dijod-4-hydroxybenzonitril) a bromoxynil (3,5-dibrom-4-hydroxybenzonitril). Hypotetické fungální nitrilasy byly exprimovány jako funkční enzymy. Nitrilasa z *G. moniliformis* vykazovala nejvyšší aktivitu k benzonitrilu (30,9 U/mg proteinu); při kultivaci byla získána aktivita 2560 U/l buněčné suspenze. Preferovaným substrátem enzymu z *N. haematococca* byl fenylacetonitril (12,3 U/mg prot.), celkem bylo získáno 28050 U/l buněčné suspenze. Nitrilasa z *N. haematococca* byla schopna hydrolyzovat mandelonitril (5,9 U/mg prot.). Půdní bakterie *Rhodococcus rhodochrous* PA-34, *Nocardia globerula* NHB-2 a *Rhodococcus* sp. NDB 1165 hydrolyzovaly herbicidy ioxynil, bromoxynil a chlorovaný analog 3,5-dichlor-4-hydroxybenzonitril (chloroxynil) (0,5 mM). Produkty reakce byly izolovány a identifikovány jako příslušné substituované benzoové kyseliny. Reakční rychlost klesala v pořadí benzonitril > chloroxynil > bromoxynil > ioxynil. Po 20 h inkubace byla pozorována téměř kompletní konverze chloroxynilu a bromoxynilu; ioxynil byl transformován jen cca z 60 %. Žádný z kmenů *Rhodococcus* a *Nocardia* nehydrolyzoval dichlobenil.

Klíčová slova: Nitrilasa, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Gibberella moniliformis*, *Nectria haematococca*

## Abstract

Nitrilases are enzymes which catalyze the hydrolysis of nitriles to corresponding carboxylic acids. These enzymes have a great potential in biocatalysis, for example in the synthesis of mandelic acid and mandelamide, because of their chemo- and enantioselectivity. As bioremediation agents they are also applicable to sites contaminated with organic nitriles. In this work, activities of recombinant strains of *E. coli* expressing hypothetical nitrilases from fungi *Giberella moniliformis* and *Nectria haematococca* mpVI 77-13-4 were studied, as well as the biodegradation potential of bacteria from *Rhodococcus* and *Nocardia* genera towards benzonitrile herbicides dichlobenil (2,6-dichlorobenzonitrile), ioxynil (3,5-diiodo-4-hydroxybenzonitrile) and bromoxynil (3,5-dibromo-4-hydroxybenzonitrile). The hypothetical fungal nitrilases were expressed as functional enzymes. Nitrilase from *G. moniliformis* showed highest activity towards benzonitrile (30.9 U/mg protein), total activity yield was 2,560 U/l cell culture. The preferred substrate of the nitrilase from *N. haematococca* was phenylacetoneitrile (12.3 U/mg prot.), total activity yield was 28,050 U/l cell culture. Nitrilase from *N. haematococca* was also able to hydrolyze mandelonitrile (5.9 U/mg prot.). Soil bacteria *Rhodococcus rhodochrous* PA-34, *Nocardia globerula* NHB-2 and *Rhodococcus* sp. NDB 1165 hydrolyzed ioxynil, bromoxynil and a chlorinated analogue 3,5-dichloro-4-hydroxybenzonitrile (chloroxynil) (0.5 mM each). The reaction products were isolated and identified as the corresponding substituted benzoic acids. The reaction rate decreased in order benzonitrile > chloroxynil > bromoxynil > ioxynil. After 20 h of incubation almost complete conversion of chloroxynil and bromoxynil was observed in all strains, while only about 60 % of ioxynil was converted. None of the strains hydrolyzed dichlobenil. (In Czech)

Key words: Nitrilase, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Gibberella moniliformis*, *Nectria haematococca*

## Obsah

Úvod .....	8
Cíl práce.....	10
Přehled literatury .....	11
<b>Metabolismus nitrilů</b> .....	11
Nitrilhydratasy .....	12
Amidasy.....	15
Nitrilasy.....	17
Bakteriální nitrilasy .....	22
Fungální nitrilasy .....	23
Využití nitrilas pro biokatalýzu a bioremediaci .....	25
Materiál a metody .....	27
Chemikálie .....	27
Mikroorganismy .....	27
Kultivace .....	27
Stanovení enzymové aktivity .....	28
Biotransformace.....	29
Isolace produktů biotransformace .....	29
Rekombinantní nitrilasy.....	30
Proteinové databáze a porovnávání sekvencí.....	30
Vektory .....	30
Transformace.....	31
Purifikace enzymů .....	32
Stanovení enzymové aktivity .....	32
Stanovení proteinů .....	33
SDS-PAGE .....	33
Analýza HPLC .....	33
Přístroje a kolony.....	33
Mobilní fáze .....	34
Výsledky .....	35
Nitrilasy kmenů <i>Rhodococcus rhodochrous</i> a <i>Nocardia globerula</i> .....	35

<b>Aktivita nitrilas</b> .....	35
<b>Biodegradační testy</b> .....	36
<b>Rekombinantní nitrilasy</b> .....	41
<b>Purifikace a charakterizace nitrilas</b> .....	41
<b>Diskuse</b> .....	54
<b>Závěr</b> .....	60
<b>Seznam použité literatury</b> .....	61
<b>Příloha 1</b> .....	72
<b>Příloha 2</b> .....	73
<b>Příloha 3</b> .....	74

## Úvod

Nitrilasy jsou enzymy, jež transformují organické nitrily na příslušné karboxylové kyseliny. Tvoří skupinu blízké příbuzných enzymů s často odlišnými biochemickými vlastnostmi. Řada těchto enzymů se vyznačuje širokou substrátovou specifikou, další nitrilasy mají vysokou specifikitu pouze pro několik sloučenin. Význam těchto enzymů v biologických procesech dosud nebyl plně objasněn; jejich přirozené substráty rovněž nejsou známy. Dobře prostudovaná aktivita nitrilas k řadě průmyslově a farmaceuticky významným substrátům však tyto enzymy předurčuje k širokému využití v biokatalýze procesů chemické výroby či remediaci míst kontaminovaných nitrilovými sloučeninami [1, 2].

Výhodou nitrilasou katalyzovaných reakcí oproti klasické organické syntéze jsou mírné podmínky reakce (neutrální pH, laboratorní teplota), minimalizace vzniku vedlejších produktů a vysoká chemo- a enantiosektivita [3, 4, 5].

Možnosti případných aplikací nitrilas jako biokatalyzátorů se v současné době neustále rozšiřují, jednak jako čistě enzymové procesy, jednak v kombinaci s chemickou katalýzou. Příkladem může být syntéza opticky čisté kyseliny mandlové, mandelamidu či kyseliny glykolové. Pro praktickou aplikaci v průmyslové výrobě je však třeba optimalizovat reakční podmínky a vlastnosti biokatalyzátoru [6].

Nitrilasy s vhodnou substrátovou specifikou mají také vysoký potenciál pro použití v bioremediaci míst znečištěných nitrilovými sloučeninami, jako např. imobilizované buňky bakterie *Rhodococcus ruber*, jež jsou schopny degradovat toxické páry akrylonitrilu na akrylát amonný [7].

K polutantům životního prostředí patří také organické pesticidy, jež tvoří jednu z největších skupin chemických látek rozšiřovaných do životního prostředí. Tyto látky jsou aktivními substancemi různých přípravků na hubení škůdců, které se používají po celém světě v zemědělství a k ošetření parků, sadů a dalších veřejných prostranství [8]. Z nitrilových sloučenin jsou to benzonitrilové herbicidy dichlobenil, bromoxynil a ioxynil. Metabolity těchto látek se vyznačují vyšší rozpustností ve vodě a v oblastech ošetřovaných zmíněnými herbicidními substancemi bývají často detegovány ve spodních vodách. Komplexnější data o toxicitě těchto sloučenin a jejich metabolitů však zatím chybějí.

Negativní vliv na organismy spočívá zejména v dlouhodobé expozici nízkým koncentracím těchto látek. Jako v případě dalších pesticidů, kontaminované půdy a voda představují nebezpečí pro organismy v dané oblasti a zdraví lidí, zejména pak jedná-li se o látky s dobrou rozpustností ve vodě, u nichž se tímto navíc zvyšuje riziko migrace. Tento problém je třeba řešit postupným odstraňováním zmíněných polutantů ze životního prostředí. Jako nejlepší řešení z ekologického a ekonomického hlediska se jeví biodegradace *in situ*. Rozklad těchto xenobiotik v kontaminovaných půdách a sedimentech probíhá přirozeně působením přítomných mikroorganismů [9, 10]. Cílem dalších studií je tedy zejména nalezení vhodných kmenů mikroorganismů a podmínek, které povedou k požadovanému navýšení intenzity a efektivity biodegradačních procesů. Prvním krokem degradace benzonitrilových sloučenin je hydrolyza nitrilové skupiny. Z tohoto hlediska mají značný potenciál již zmíněné bakterie rodu *Rhodococcus*, v jejichž rozsáhlém genomu byla prokázána přítomnost genů kódujících nitrilasy a další enzymy schopné transformovat nitrilové sloučeniny.

## Cíl práce

Cíle této práce jsou shrnuty v následujících bodech:

1. Prostudovat význam půdních aktinobakterií při transformaci benzonitrilových herbicidů dichlobenilu, ioxynilu a bromoxynilu a případně zhodnotit jejich biodegradační potenciál. K tomu účelu byly vybrány tři půdní izoláty z rodu *Rhodococcus* a *Nocardia*, zástupci běžně se vyskytujících půdních bakterií.
2. S použitím sekvencí známých nitrilas jako templátů najít v internetových databázích nové fungální nitrilasy s vlastnostmi využitelnými v biokatalýze a ověřit jejich aktivitu pomocí exprese v *E. coli*. Provést purifikaci a charakterizaci těchto enzymů.

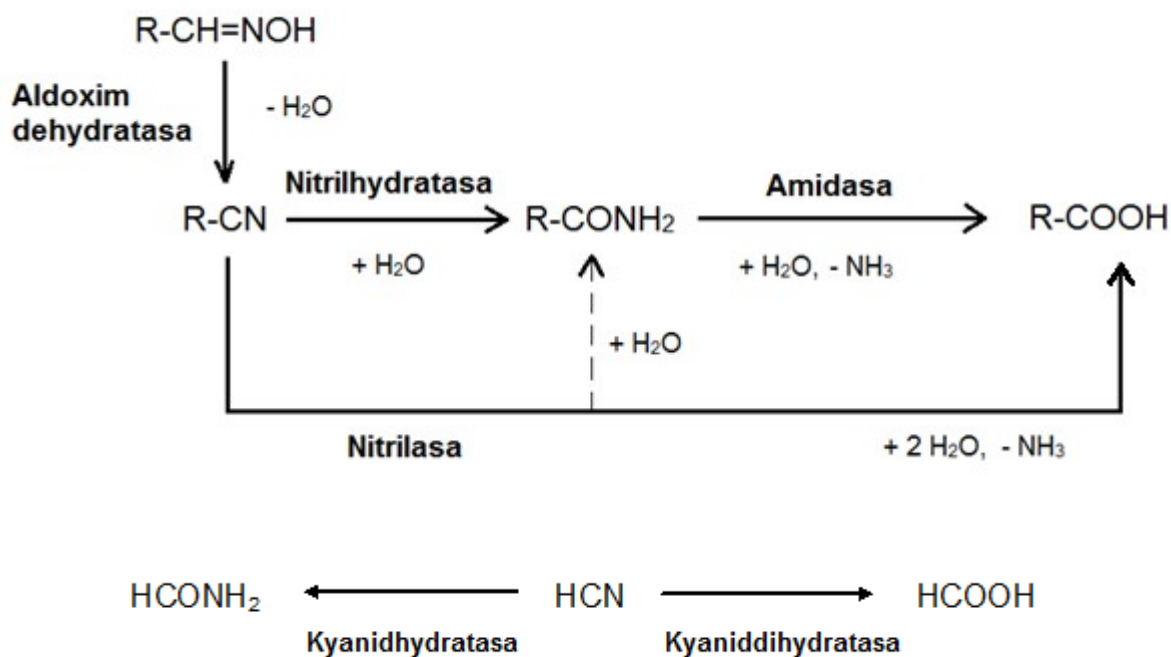
## Přehled literatury

### Metabolismus nitrilů

Bakteriální nitrilasy daly název početné nitrilasové superrodině, jež má své zastoupení v rostlinách, živočiších i houbách. Patří sem enzymy účastníci se mnoha biologicky důležitých procesů, jako jsou syntéza signálních molekul, metabolismus vitaminů a koenzymů, detoxikace nízkomolekulárních xenobiotik a posttranslační modifikace proteinů [11, 12, 13, 14, 15, 16]. Nitrilasovou superrodinu tvoří třináct hlavních skupin enzymů: mikrobiální nitrilasy (nitrilasy, kyanidhydratasy, kyanidhydratasy), alifatické amidasy, amino-terminální amidasy, biotinidasy,  $\beta$ -ureidopropionasy, karbamoylasy, prokaryotní NAD syntetasy, eukaryotní NAD syntetasy, apolipoprotein N-acyltransferasy, Nit a NitFhit, NB11, NB12 a skupina nezařazených enzymů. Tuto superrodinu proteinů charakterizuje typické  $\alpha\beta\alpha$ - $\alpha\beta\alpha$  uspořádání polypeptidových podjednotek a konzervovaná skupina aminokyselin Cys, Glu, Glu, Lys v aktivním místě enzymu. Enzymy, jež hydrolyzují kyanid a organické nitrily byly studovány u rostlin i řady mikrobiálních druhů [2, 5, 16, 17].

Nitrilasy, kyanidhydratasy a kyanidhydratasy tvoří skupinu blízce příbuzných enzymů. Jsou si relativně podobné v jak v sekvencích aminokyselin, tak v celkové struktuře proteinu, avšak jejich katalytické vlastnosti se výrazně liší. Nitrilasy přijímají jako substráty organické nitrily, přičemž jejich substrátová specifita je často poměrně široká. Naproti tomu kyanidhydratasy a kyanidhydratasy mají vysokou specifitu pouze pro HCN (**Obr. 1**, následující strana), k nitrilům je aktivita velice nízká [1].

Reakce, jíž se tato práce především zabývá, je hydrolýza nitrilové skupiny. Ta může být katalyzována jednak přímo nitrilasou, nebo ve dvou krocích, enzymy nitrilhydratasou a amidasou (**Obr. 1**, následující strana). Tyto enzymy jsou spolu s aldoximdehydratasami a oxynitrilasami součástí kaskádové metabolické dráhy konverze aldoximů na karboxylové kyseliny [3].



**Obr.1:** Biotransformace nitrilů a kyanidu [1, 3]

## Nitrilhydratasy

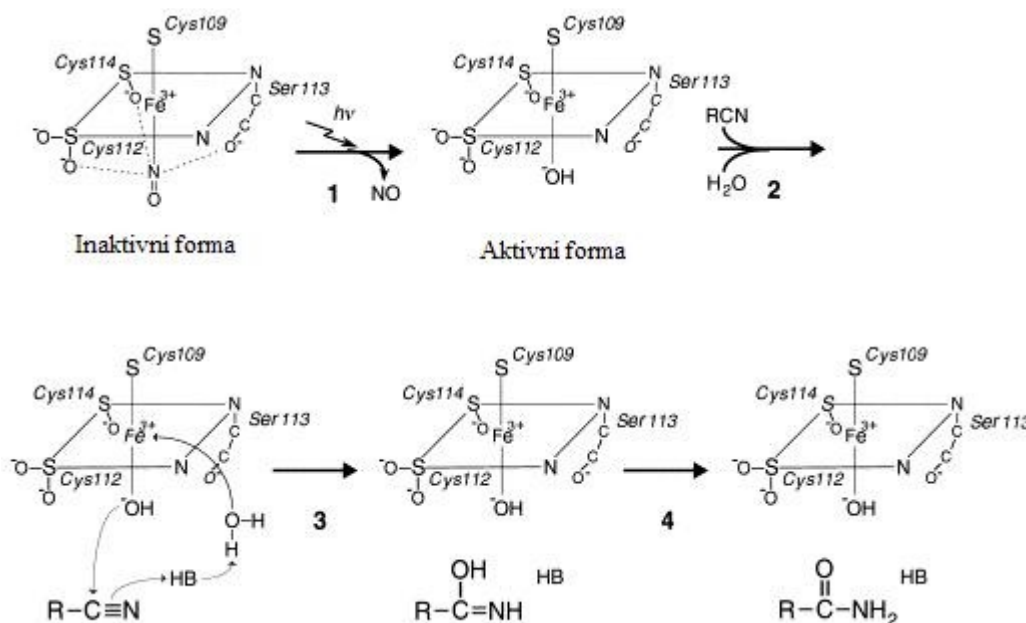
Nitrilhydratasy (NHasy, EC 4.2.1.84) na rozdíl od nitrilas a amidas nepatří do nitrilasové superrodiny a svou funkcí spadají do skupiny lyas [4, 5]. Katalyzují přeměnu nitrilů na amidy. V dnešní době nacházejí tyto enzymy významné uplatnění při výrobě akrylamidu, nikotinamidu a 5-kyanovaleramidu [18]. Při experimentech s kulturami *Arthrobacter* sp. J-1 je na začátku osmdesátých let objevili Asano a kol. [19]. Od té doby byla izolována řada mikroorganismů s NHasovou aktivitou, jejichž enzymy byly purifikovány a charakterizovány [20].

Velký význam má tento enzym pro organickou syntézu. U bakterie *R. rhodochrous* J1 byla přítomností močoviny v živném médiu indukována ve velkém množství (až 50% z celkové rozpustné proteinové frakce) NHasa přeměňující akrylonitril na akrylamid. Od roku 1991 se imobilizované buňky *R. rhodochrous* J1 využívají k výrobě akrylamidu (později také nikotinamidu) průmyslově; akrylamidu se touto biokatalytickou cestou nyní vyrobí zhruba 25% z celosvětové produkce (95 000 tun ročně) [18, 21, 22, 23, 24].

Bakteriální NHasy se skládají ze dvou druhů podjednotek ( $\alpha$ ,  $\beta$ ). Holoenzymy jsou heterooligomery, jež obvykle obsahují dvě nebo čtyři, ale někdy také dvacet těchto podjednotek [4]. V aktivním centru bakteriálních nitrilhydratas se nacházejí železité nebo kobaltité ionty [23], u houby *Myrrothecium verrucaria* byl v aktivním centru prokázán ion  $Zn^{2+}$  [25].

Struktura aktivního centra  $Fe^{3+}$  NHasy byla dobře popsána u enzymů skládajících se ze dvou podjednotek, exprimovaných bakteriálními kmeny *R. rhodochrous* R312 a N-771. NHasa kmene R312 byla prvním objeveným případem enzymu obsahujícího nehemový železitý ion v nízkospinovém stavu [26]. V případě R312 bylo dále zjištěno, že všechny ligandy železitého iontu jsou lokalizovány v podjednotce  $\alpha$ . Jsou jimi tři cysteinové thioláty a dva dusíkové atomy, jež jsou součástí proteinového řetězce. Šestá ligandová pozice železa je volná. Ligandy jsou rozmístěny na pěti vrcholech osmistěnu obklopujícího železitý ion. Motiv CXXCSC vázající ion kovu se zdá být konzervován ve všech sekvenovaných NHasách. Rentgenová krystalografická analýza NHasy *R. rhodochrous* N-771 ukázala, že dva cysteinové ligandy jsou posttranslačně modifikovány na cystein-sulfinylovou kyselinu (Cys-SOOH) a cystein-sulfenylovou kyselinu (Cys-SOH), což zřejmě přispívá k výjimečné stabilitě  $Fe^{3+}$  centra [21, 27, 28].

Enzymatická aktivita NHasy se dá rovněž ovlivnit světlem (viz **Obr. 2** na následující straně). Fotoreaktivní mechanismus nitrilhydratasy popsali Endo a kol. [29]. Světelné záření zde způsobuje konformační změnu podjednotky a tím uvolnění endogenní molekuly NO, jež je v klidovém stavu navázána na železitý komplex jako ligand. Uvolněním NO se enzym dostává do aktivovaného stavu (**1**).



**Obr. 2:** Reakční mechanismus NHasy katalyzované reakce [21]

Ve srovnání s nitrilasou je specifická aktivita NHasy výrazně vyšší, což je připisováno zcela odlišnému reakčnímu mechanismu tohoto enzymu. Přesný reakční mechanismus není dosud zcela objasněn, avšak bylo navrženo již několik pravděpodobných mechanismů [18]. Narozdíl od nitrilas zde hydratace nitrilové skupiny probíhá na iontu kovu, jež umožňuje účinnější katalýzu tohoto typu reakce. Ta může být podle Kobayashi a Shimizu [21] rozdělena do tří kroků (**Obr. 2**). Nejdříve dochází k vazbě přeměňovaného nitrilu blízko OH skupiny nebo molekuly vody ligované na ion železa (**2**). Ve druhé fázi OH skupina nebo molekula vody aktivovaná bází atakuje nitrilový uhlík a vzniká imidát R-C(-OH)=NH (**3**). Imidát ve třetím kroku tautomerizuje na amid (**4**).

Jako u nitrilasy může mezi substráty nitrilhydratas patřit řada alifatických, alicyklických, (hetero)aromatických a arylalifatických nitrilů. Většinou se však jedná o spíše menší molekuly (cca 228 Å<sup>3</sup>) o vyhovujícím tvaru, jež je ještě vazné místo enzymu schopno pojmout, ačkoli u nitrilhydratas se zdá být problém geometrie molekuly menší než je tomu u amidas [4].

Komeda a kol. [30] zjistili, že při kultivaci v přítomnosti iontů kobaltu exprimuje *R. rhodochrous* J1 dva typy nitrilhydratas. V médiu obsahujícím močovinu je u tohoto kmene indukována NHasa o molekulové hmotnosti 520 kDa. S cyklohexankarboxamidem

dochází k indukci lehčí (130 kDa) NHasy [23]. Těžší enzymy zpracovávají především alifatické nitrily [31], zatímco substráty lehčích nitrilhydratas jsou aromatické nitrilové sloučeniny [30]. Oba popsané typy NHas ve své molekule obsahují kobaltitý ion v nízkospinovém stavu uložený v osmistěnném ligandovém poli, přičemž zastoupení aminokyselin v okolí  $\text{Co}^{3+}$  je podobné jako v případě železa; konzervovaná sekvence má pořadí aminokyselin VCTLCSC [32]. Těžší NHasa rovněž stojí za výše popsanou průmyslovou výrobou akrylamidu a nikotinamidu s využitím buněk *R. rhodochrous* J1 [20].

## Amidasy

Enzymy s amidasovou aktivitou katalyzují hydrolyzu amidů za vzniku karboxylové kyseliny a amonného iontu. U prokaryot i eukaryot se amidasy účastní metabolismu dusíkatých látek. Podle katalytické aktivity se dělí do dvou hlavních skupin: 77 zástupců spadá do kategorie EC 3.5.1 (EC 3.5.1.1 – 3.5.1.77), 14 zástupců tvoří kategorii EC 3.5.2. [33]. Některé se specializují na alifatické amidy, jiné katalyzují přeměnu amidů aromatických kyselin a další hydrolyzují amidy  $\alpha$ - nebo  $\omega$ -aminokyselin [20]. Amidasy mají za určitých podmínek rovněž acyltransferázovou aktivitu. Z této kategorie byly dobře charakterizovány zejména bakteriální acylamid amidohydrolasy metabolizující alifatické acylamidy [33].

Alifatickou amidasu ve své práci popsali Asano a kol. [34]. Amidasa byla purifikována z buněčného extraktu kmene *Arthrobacter* sp. J-1 kultivovaného v médiu obsahujícím acetonitril. Diskovou gelovou elektroforézou byly zjištěny dva proteiny o velikosti 300 a 320 kDa skládající se zřejmě z osmi identických podjednotek o velikosti 39 kDa. Amidasa katalyzovala stechiometrickou hydrolyzu acetamidu na kyselinu octovou a amonné ionty; stejnou enzymatickou aktivitu vykazovala i u akrylamidu a propionamidu. Rovněž byla pozorována acyltransferázová aktivita – přesun acylové skupiny amidu na hydroxylamin.

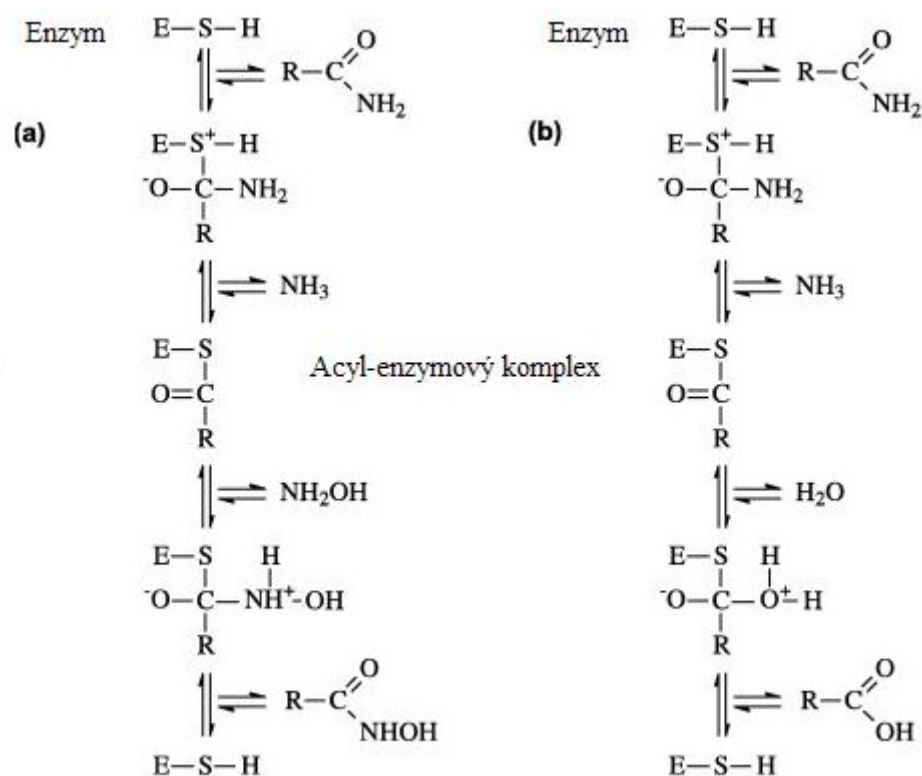
Aktivitu amidasy přeměňující amidy aromatických kyselin studovali Hirrlinger a kol. [35] – z bakteriálního kmene *Rhodococcus erythropolis* MP50 byla izolována a purifikována homogenní enantiosektivní amidasa o velikosti asi 480 kDa složená z 61 kDa podjednotek. Enzym selektivně hydrolyzoval řadu enantiomerů alifatických a

aromatických amidů z příslušných racemických směsí, zejména pak těch, které v molekulách obsahovaly hydrofobní substituenty. Docházelo rovněž k hydrolyze  $\alpha$ -amino amidů, avšak bez enantioselektivního účinku.

Stelkes-Ritter a kol. [36] ve své studii popisují peptidovou amidasu exprimovanou mikrobiálním kmenem *Stenotrophomonas maltophilia*, kdy byl izolován enzym o molekulové hmotnosti asi 38 kDa, hydrolyzující C-terminální amidové skupiny peptidových řetězců, přičemž vnitřní peptidové vazby zůstávají zachovány, stejně jako amidové skupiny bočních řetězců, jednalo se tedy rovněž o enantioselektivní enzym hydrolyzující jen L-enantiomery v C-terminální pozici.

Některé organismy produkují amidasy se širší substrátovou specifitou. Např. Bhalla a Kumar [37] ve své práci popisují amidasu kmene *Nocardia globerula* NHB-2, jež kromě tohoto enzymu exprimuje též nitrilas a NHasu. Bakterie vykazovala nitrilhydratasovou-amidasovou aktivitu vůči nasyceným alifatickým nitrilům, resp. amidům. Po přidavku acetonitrilu do živného média byla zmíněná aktivita pozorována také u aromatických amidů. Široké spektrum přeměňovaných substrátů bylo popsáno rovněž u amidas bakterií *Rhodococcus* sp. R312, jež hydrolyzují L- $\alpha$ -amino amidy, alifatické amidy [38], aryloxyamidy [39] nebo aryloxypropionamidy [40].

V aminokyselinové sekvenci amidas je vysoce konzervován motiv GGSS, jež má pravděpodobně svou úlohu v katalytickém cyklu [33]. Amidasy s tímto motivem ve svém aktivním centru obsahují asparagin a serin [41]. Přítomnost iontu kovu, konkrétně kobaltu nebo železa je u amidas zdokumentována jen v případě bakterií *Klebsiella pneumoniae* [42]. Jelikož byla u amidasy bakterie *R. rhodochrous* J1 pozorována schopnost stechiometricky přeměnit nitrilovou skupinu na karboxylovou za uvolnění amonného iontu [43], předpokládá se, že reakční mechanismus je zde velmi podobný jako u nitrilas [20].



**Obr. 3:** Reakční mechanismus amidasou katalyzované reakce **a)** přenos acylu na hydroxylamin; **b)** hydrolyza [44, 31]

Karboxylová skupina amidu rovněž podléhá nukleofilnímu ataku (**Obr. 3**) a vzniká tetrahedrání intermediát a acyl-enzymový komplex, ze kterého je posléze uvolněn amonný ion a dochází k hydrolyze na kyselinu. Pokud je přítomen hydroxylamin, dochází ke druhé variantě reakce, kdy se uplatňuje acyltransferázová aktivita [45].

## Nitrilasy

Nitrilasy jsou dnes již velmi dobře charakterizovanou skupinou enzymů (EC 3.5.5.1) hydrolyzujících nepeptidové C-N vazby. V nitrilasové superrodině patří do první větve enzymů. Jejich široká substrátová specifita, v některých případech i výborná chemo- a enantiosektivita a schopnost hydrolyzy nitrilů při laboratorních podmínkách má kromě biodegradace velký význam pro produkci mnoha syntetických organických látek a léčiv [5, 20].

Prvními objevenými enzymy svého druhu byly rostlinná nitrilasa katalyzující přeměnu indol-3-acetonitrilu na indol-3-octovou kyselinu, jež patří mezi významné auxinové hormony [46], a nitrilasa z rodu *Pseudomonas* hydrolyzující ricinin (N-methyl-3-kyano-4-methoxy-2-pyridon) [47]. Později byla rovněž izolována řada zejména půdních mikroorganismů vykazujících nitrilasovou aktivitu, schopných metabolizovat některé přírodní i syntetické nitrily [20].

Obecně jsou nitrilasy inducibilními enzymy skládajícími se nejčastěji z jednoho, výjimečně dvou typů podjednotek, jež mohou být různé velikosti a počtu. Většinou je pro aktivaci nitrilasy potřeba asociace několika těchto podjednotek [11].

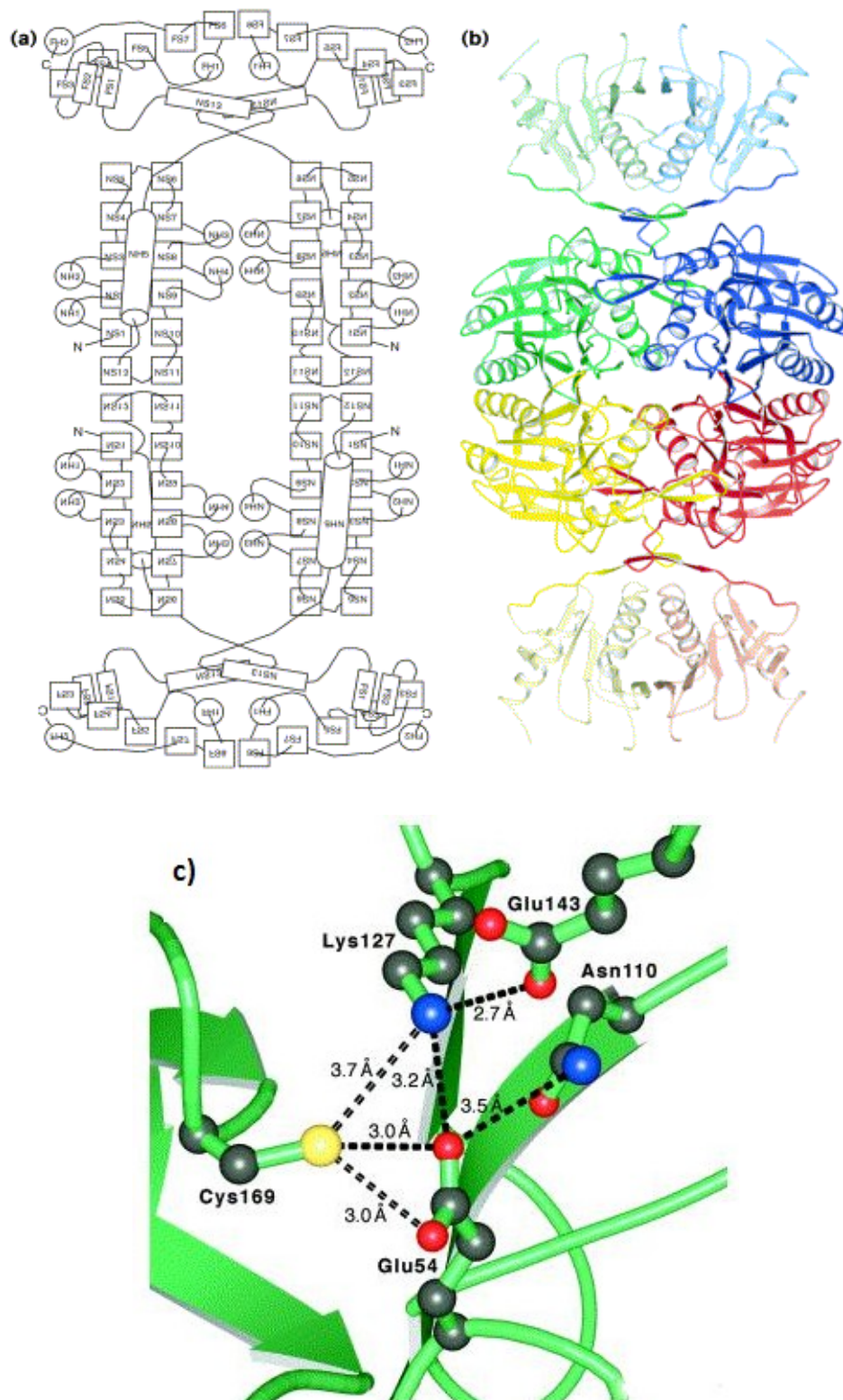
Nitrilasy jednotlivých druhů mikroorganismů se pak mohou výrazně lišit svou molekulovou hmotností, jež závisí na velikosti a počtu podjednotek. Většina popsaných nitrilas se skládá z polypeptidů o molekulové hmotnosti cca 40 kDa (32 – 45 kDa), jež mají schopnost agregace za účelem vytvoření aktivní formy enzymu. Zdá se, že nejběžnější formou enzymu je agregát 6 – 26 podjednotek, přičemž nejmenší možný počet podjednotek aktivní nitrilasy je 4. Enzymové agregáty byly popsány také u vláknitých hub, kde se navíc nitrilasy podobně jako kyanidhydratasy formují do vyšších helikálních filamentárních struktur (48). Nitrilasa z *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* se při nenedenaturující elektroforéze v polyakrylamidovém gelu dělí na mnoho frakcí o velikostech od 170 – 880 kDa, z nichž všechny jsou aktivní [1, 49].

Podle substrátové specifity jsou rozlišovány tři základní skupiny nitrilas. Jedny jsou schopné hydrolyzy aromatických a heterocyklických nitrilů, další enzymy hydrolyzují spíše alifatické nitrily, do třetí skupiny se řadí nitrilasy přeměňující arylacetonitrily [50].

Do první jmenované skupiny enzymů patří několik rostlinných nitrilas katalyzujících hydrolyzu heterocyklických nitrilů, např. ricininu (viz výše) a nudiflorinu (N-methyl-5-cyano-2-pyridon) [51]. Nitrilasy metabolizující aromatické nitrily jako benzonitril a *p*-hydroxybenzonitril byly nejprve studovány u houby *Fusarium solani* a bakteriálních kmenů *Nocardia* NCIB 11216 a NCIB 11215 [11, 12, 52].

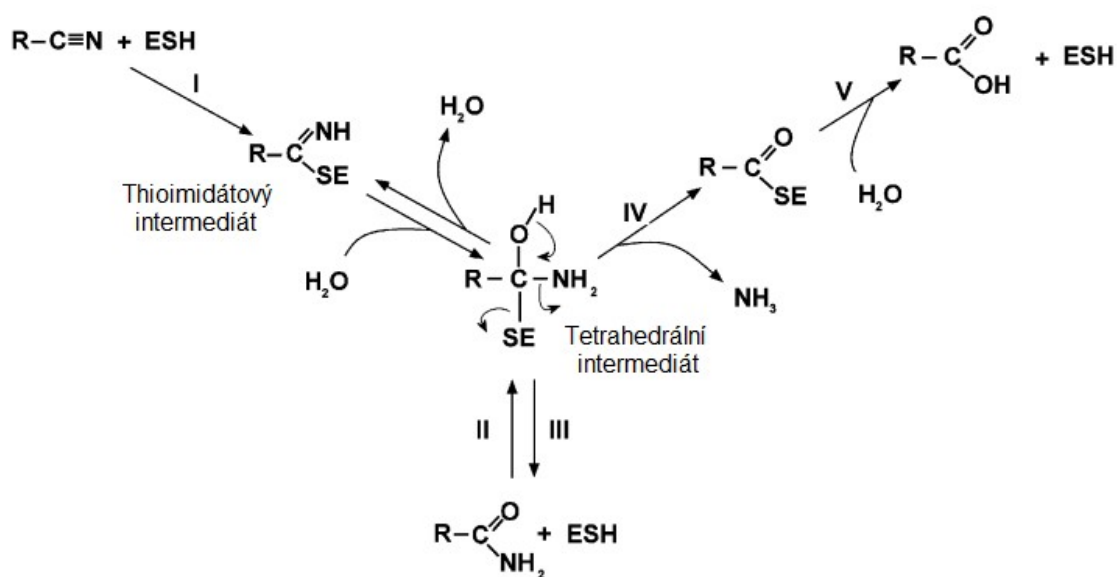
V aktivním místě těchto enzymů zatím nebyla prokázána přítomnost iontu kovu nebo prosthetické skupiny. Dosud popsané nitrilasy byly vždy inaktivovány činidly reagujícími s thiolovou skupinou, což potvrzuje předpoklad, že se jedná o sulfhydrolýzový enzym [50].

Kobayashi a kol. [53] zjistili v sekvenci aminokyselin nitrilasy *R. rhodochrous* J1 čtyři cysteinylová residua. Katalyticky aktivním se ukázal být Cys-165, jehož záměnou za alanin nebo serin došlo ke ztrátě nitrilasové aktivity [53]. Později byl u alifatické nitrilasy bakteriálního kmene *R. rhodochrous* K22 sekvenováním prokázán v aktivním centru také cystein (Cys-170), jehož mutace rovněž znamenala ztrátu nitrilasové aktivity. Sekvence aminokyselin obou kmenů byly porovnány s nitrilasou kmene *Klebsiella ozaenae*. Ukázalo se, že ve všech třech enzimech je na příslušné pozici aktivní cystein striktně konzervován [53]. Později krystalografická analýza Nit a Fhit proteinů hlístice *Caenorhabditis elegans* a D-karbamoylasy bakterií kmene *Agrobacterium* prokázala  $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ - $\alpha$  uspořádání podjednotek a přítomnost katalytické triády Glu-Lys-Cys v aktivním centru enzymů nitrilasové superrodiny (**Obr. 4**, následující strana) [54, 55].



**Obr. 4:** Dvouřozměrná (a) a trojřozměrná (b) struktura NitFhit tetrametru a uspořádnání katalytické triády Glu-Lys-Cys v aktivním centru (c) [54]

Reakční mechanismus hydrolýzy katalyzované nitrilasou popsali Harper [11, 52], Stevenson a kol. [56] a Kobayashi a kol. [57]. První reakční krok spočívá v nukleofilnímu útoku nitrilového uhlíku thiolovou skupinou enzymu za současné protonace dusíku a vzniku tetrahedrálního thioimidátového intermediátu (**Obr. 5**). Následují reakce se dvěma molekulami vody a další protonace dusíku, který je poté uvolněn z aktivního centra ve formě amoniaku. V některých případech, pravděpodobně kvůli přítomnosti rozměrných nebo výrazněji elektronegativních substituentů v molekule substrátu, dochází k uvolnění tetrahedrálního intermediátu za vzniku amidu [47, 56, 58, 59, 60, 61].



**Obr. 5:** Reakční mechanismus nitrilasou katalyzované hydrolýzy [1, 57]

## Bakteriální nitrilasy

Kobayashi a kol. [62] popsali nitrilasu specificky hydrolyzující nitrilové skupiny navázané na benzenový nebo heteroaromatický kruh u bakterie *Rhodococcus rhodochrous* J1. Produkce enzymu byla indukována isovaleronitrilem; nitrilasu se pak podařilo purifikovat z buněčného extraktu a charakterizovat. Byla zjištěna schopnost stechiometrické hydrolýzy benzonitrilu na kyselinu benzoovou a amonné ionty; vznik benzamidu nebyl detekován. Maximální katalytická aktivita byla pozorována v přítomnosti sloučenin obsahujících thiolovou skupinu – dithiothreitolu, L-cysteinu a redukovaného GSH.

Nagasawa a kol. [63] u výše zmíněného bakteriálního kmene porovnali indukční schopnost isovaleronitrilu a benzonitrilu a dosáhli dvou kvantitativně odlišných výsledků. Nitrilasová aktivita vyvolaná přítomností isovaleronitrilu v živném médiu byla asi 3160krát vyšší než po kultivaci s benzonitrilem, přičemž 35% z rozpustné proteinové frakce bylo tvořeno právě nitrilasou. Podobného výsledku bylo později dosaženo za použití  $\epsilon$ -kaprolaktamu [64]. Purifikovaný enzym poté vykazoval vysokou afinitu k heterocyklickým a aromatickým nitrilům, po přidání glycerolu nebo síranu amonného do reakční směsi došlo navíc k přeměně některých alifatických nitrilů [65].

Bakteriální nitrilasy hydrolyzující aromatické nebo heterocyklické nitrily většinou nejsou schopny přijmout alifatický nitril jako substrát. Dochází-li tedy k degradaci alifatických nitrilů, děje se tak často prostřednictvím nitrilhydratasy a amidasy [50]. Výjimku tvoří kmeny *R. rhodochrous* J1 a zejména K22, u jehož purifikované nitrilasy byla pozorována široká substrátová specifita vůči nenasyceným alifatickým nitrilům. Dále docházelo rovněž k hydrolýze některých nasycených alifatických nitrilů; vyšší afinita zde byla zjištěna pro nevětvené molekuly [66].

Arylacetonitrilasy jsou obecně enantioselektivní enzymy, jež mohou mít aktivitu rovněž k benzonitrilu a někdy také k alifatickým nitrilům. Například nitrilasa z *Pseudomonas fluorescens* EBC191 přeměňuje 2-acetoxybutennitril na příslušnou karboxylovou kyselinu s vyšší specifitou než alifatická nitrilasa kmene *Synechocystis* spp. 6803 [67]. Na druhé straně nitrilasa bakteriálního kmene *Alcaligenes faecalis* JM3 s výjimkou acetonitrilu nebyla schopna zpracovávat alifatické ani aromatické nitrily. Hydrolýza probíhala pouze u arylacetonitrilů obsahujících indolylové, fenylové nebo thiofenylové substituenty [50, 68].

Arylacetonitrilasy z *Alcaligenes faecalis* a *P. fluorescens* jsou schopny konverze (*R*, *S*)-mandelonitrilu na (*R*)-mandlovou kyselinu, významný intermediát ve farmaceutickém průmyslu používaný pro výrobu semisyntetických penicilinů, cefalosporinů, léčiv proti obezitě a kancerostatik [69]. Ačkoli většina arylacetonitrilas hydrolyzuje mandelonitril v menší míře než fenylacetonitril, enzym označovaný jako mandelonitril hydrolasa z *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 má vysokou specifitu pro mandelonitril [70, 71]. Geny kódující tyto enzymy byly nalezeny ve stejném operonu jako geny pro enzymy metabolismu kyseliny mandlové. Z toho je možné usuzovat, že arylacetonitrilasy se mohou podílet na detoxikaci nitrilů při biotransformaci kyanogenních glykosidů [2, 61]

### Fungální nitrilasy

Prestože genové databáze obsahují řadu záznamů o hypotetických fungálních enzimech s nitrilasovou aktivitou, pouze několik těchto enzymů bylo purifikováno a charakterizováno. První zmínku o fungálních nitrilasách můžeme najít už v prvních publikacích na toto téma. Už dříve citovaní Thimann a Mahadevan [46] se kromě rostlinné nitrilasy zabývali schopností vláknitých hub z rodů *Aspergillus*, *Penicillium*, *Gibberella* a *Fusarium* produkovat 3-indolactovou kyselinu z 3-indolacetonitrilu. Kromě prací o bazidiomycetě hydrolyzující 2-aminopropionitril a kyselinu 4-amino-4-kyanomáseľnou [72, 73] a o nitrilase z *Fusarium solani* IMI 196840 [52] nebyly do nedávna publikovány žádné další zmínky o fungálních nitrilasách. Studie o nitrilase z *F. solani* IMI se objevila v souvislosti s rostoucím zájmem o bakteriální nitrilasy z hlediska jejich využitelnosti v biokatalýze. Zde byl použit benzonitril jako jediný zdroj dusíku i uhlíku pro obohacení kultury z bromoxynilem ošetřované půdy. Po purifikaci enzymu na DEAE-celulose a Sephadexu G-200 bylo dosaženo specifické aktivity 1,66 U/mg proteinu [52]. Další o deset let později charakterizovanou nitrilasou byl enzym z houby *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* [74] se specifickou aktivitou 143 U/mg proteinu pro benzonitril.

O mnoho let později vedly další pokusy s obohacováním eukaryotních půdních kultur k izolaci houby *Fusarium solani* [75]. Částečná sekvenace této nitrilasy poukázala na vysokou podobnost s hypotetickou nitrilasou houby *Gibberella moniliformis* [76]. Další purifikovanou a charakterizovanou nitrilasou byl enzym z kmene *Aspergillus niger* K10. Sekvence aminokyselin tohoto enzymu je velmi podobná kyanidhydratasám [77].

Vhodným substrátem k obohacování fungálních kultur se ukázal být 3-kyanopyridin, díky němuž bylo možné snadno rozlišit skupinu vláknitých hub s nitrilasovou aktivitou díky jejich rychlému růstu na Czapek-Doxovu agaru s touto látkou jako jediným zdrojem dusíku. Tato metoda byla použita k obohacování půdních kultur i k výběru hub dostupných ve sbírkách. Vybrané kmeny byly poté kultivovány submerzně v přítomnosti 2-kyanopyridinu a valeronitrilu, jež se ukázaly být lepšími induktory nitrilasové aktivity než 3-kyanopyridin. Navýšení specifické aktivity enzymu bylo v případě 2-kyanopyridinu o 2-3 řády vyšší v porovnání s kontrolními kulturami kultivovanými s 3-kyanopyridinem [78]. Nejvyšší celkové aktivity s takto kultivovanými organismy bylo dosaženo u houby *Fusarium solani* O1, a to více než 3000 U/l kultury (Vejvoda a kol 2008). Specifické aktivity těchto enzymů pro benzonitril byly 156 U/mg proteinu v případě *F. solani* O1 [79] a 91,6 U/mg proteinu v případě *A. niger* K10 [77].

Fungální nitrilasy byly do poslední doby považovány obecně za aromatické díky jejich vysokým relativním aktivitám k (hetero) aromatickým nitrilům. Jako své substráty však mohou přijímat i řadu alifatických a alicyklických sloučenin, jako acetonitril, propionitril, isovaleronitril,  $\epsilon$ -kaprolaktam a další [3].

Nenovější výsledky s heterologní expresí hypotetických enzymů z *A. niger* CBS 513.88 a *N. crassa* OR74A poukazují také na výskyt arylacetonitrilas mezi fungálními enzymy; celkové aktivity pro fenylacetonitril byly 2500 a 2700 U/l kultury [80].

## Využití nitrilas pro biokatalýzu a bioremediaci

Při chemické hydrolyze nitrilů je třeba použít silných bází či kyselin a často dochází ke vzniku nežádoucích vedlejších produktů. Nitrilasy jako biokatalyzátory mohou díky své chemoselektivitě a přispět k vyšší čistotě produktu [4].

Použití nitrilas v biokatalýze může být rozšířeno rovněž jejich kombinací s dalšími enzymy či chemickými katalyzátory, jež pomohou předejít hromadění a izolaci případných meziproductů [6]. Příkladem takového procesu může být syntéza (*S*)-mandlové kyseliny a (*S*)-mandelamidu rekombinantním kmenem *E. coli* koexprimujícím (*S*)-oxynitrilasou a různé varianty nitrilas [81]. Aplikací nitrilasy v kombinaci s chemickou katalýzou je chemoenzymatická syntéza glykolové kyseliny o vysoké čistotě. Prvním krokem reakce byla syntéza glykolnitrilu z formaldehydu a HCN, jež byl následně reakcí s nitrilasou z *Acidovorax facilis* 72W transformován na glykolát amonný [82].

Nitrilasy s vhodnou substrátovou specifitou mohou mít význam rovněž při bioremediaci míst kontaminovaných aromatickými či alifatickými nitrily [3].

Značný biodegradační potenciál zde mají půdní bakterie rodu *Rhodococcus*. Tyto bakterie se vyznačují vysokou odolností k nepříznivým podmínkám, jejich rozsáhlý genom kóduje řadu variant katabolických drah, včetně hydrolyzy a hydratace nitrilů. Jejich buněčná stěna je propustná jak pro nitrily, tak pro jejich metabolity. Bioremediace s využitím nitrilasy má význam zejména při degradaci akrylonitrilu, důležité průmyslové látky, jež se při transportu a zpracování může uvolňovat v podobě toxických par [3, 83]. Reakcí s nitrilasou navíc může vznikat další průmyslově významná látka, akrylát. Tato biotransformace byla převedena do praxe s využitím imobilizovaných buněk *Rhodococcus ruber*, jež transformovaly páry acetonitrilu na akrylát amonný s kapacitou  $4 \text{ kg m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  [7].

Mezi aromatické nitrily patří další kontaminanty životního prostředí, zejména podzemních vod. Jedná se o benzonitrilové herbicidy, dichlobenil (2,6-dichlorbenzonitril), bromoxynil (3,5-dibrom-4-hydroxybenzonitril) a ioxynil (3,5-dijod-4-hydroxybenzonitril). Dichlobenil patří mezi širokospektrální kontaktní herbicidy vhodné pro použití v zahradách, sadech, lesních školkách a k ošetření chodníků. Bromoxynil a ioxynil představují selektivní kontaktní herbicidy používané především k ničení širokolistých plevelů rostoucích mezi obilninami [8]. Studie zabývající se problematikou degradace benzonitrilových herbicidů

se nejčastěji zabývají substituovanými benzamidy jako hlavními metabolity, zejména pro jejich značnou perzistenci a na některých územích častému výskytu v podzemní vodě. Ve všech případech je příslušný benzamid ve vodě značně lépe rozpustný než původní sloučenina. V odborných publikacích o degradaci benzonitrilových herbicidů bylo zatím nejvíce pozornosti věnováno metabolitu dichlobenilu, tj. 2,6-dichlorbenzamid, jehož poločas rozpadu se pohybuje mezi 106 až 2079 dny. Akutní toxicita této látky je nízká až střední (LD50 1144 až 2330 mg/kg u myši a potkanů), avšak její karcinogenicita a reprodukční toxicita nebyly zatím dostatečně prostudovány. Ze zástupců rodu *Rhodococcus* byly na schopnost degradace dichlobenilu testovány kmeny *R. erythropolis* DSM 9674 and *R. erythropolis* DSM 9675. U obou kmenů, stejně jako u několika dalších testovaných druhů bakterií však proběhla pouze hydrolýza na amid jako konečný produkt [84]. Mineralizace dichlobenilu, stejně jako dalších chlorovaných analog benzonitrilu, byla pozorována u bakterií *Aminobacter* spp. ASI1 a MSH1 [85, 86].

Nitrilasa hydrolyzující bromoxynil na příslušnou kyselinu byla rovněž charakterizována u kmene *Klebsiella ozaenae* – byl purifikován dvoupodjednotkový enzym s vysokou afinitou k bromoxynilu a dalším aromatickým nitrilovým sloučeninám obsahujícím dva halogeny v *meta*-pozicích. Příslušný gen byl jako první nitrilasový gen klonován v buňkách *E. coli*; později byl použit pro vypěstování transgenních rostlin nesoucích resistenci na bromoxynil [87, 88, 89].

Degradace ioxynilu byla pozorována u vláknité houby *Fusarium solani*; během experimentu byly identifikovány 3,5-dijod-4-hydroxybenzamid a 3,5-dijod-4-hydroxybenzoová kyselina [90].

Nitrilasa produkovaná houbou *Fusarium solani*, studovaná v dříve citované práci [52], byla schopna degradace ioxynilu a bromoxynilu, avšak s velmi nízkou relativní aktivitou v porovnání s benzonitrilem (3,9; resp. 2,2 %).

## Materiál a metody

### Chemikálie

Substráty: benzonitril, 3,5-dichlor-4-hydroxybenzonitril (chloroxynil), 3,5-dibrom-4-hydroxybenzonitril (bromoxynil), 3,5-dijod-4-hydroxybenzonitril (ioxynil), 2,6-dichlorbenzonitril (dichlobenil), fenylacetonitril, (*R,S*)-2-fenylpropionitril, (*R,S*)-mandelonitril, 2-kyanopyridin, 3-kyanopyridin, 4-kyanopyridin, 3-chlorbenzonitril a 4-chlorbenzonitril byly zakoupeny u firem Sigma, Alfa Aesar nebo Merck, Německo, v p. a. kvalitě.

Standardy metabolitů: benzamid, benzoová kyselina, 3,5-dichlor-4-hydroxybenzoová kyselina, 3,5-dibrom-4-hydroxybenzoová kyselina, 3,5-dijod-4-hydroxybenzoová kyselina, 2,6-dichlorbenzamid a 2,6-dichlorbenzoová kyselina, fenylacetamid, fenylactová kyselina, (*R,S*)-2-fenylpropionamid, (*R,S*)-2-fenylpropionová kyselina, (*R,S*)-mandelamid, kyselina mandlová, pyridin-2-karboxamid, pyridin-2-karboxylová kyselina, nikotinamid, kyselina nikotinová, isonikotinamid, isonikotinová kyselina, 3-chlorbenzamid, 3-chlorbenzoová kyselina, 4-chlorbenzamid, 4-chlorbenzoová kyselina byly zakoupeny u firem Sigma, Alfa Aesar nebo Merck, Německo, v p. a. kvalitě.

### Mikroorganismy

#### Kultivace

*Rhodococcus rhodochrous* PA-34 [91], *Nocardia globerula* NHB-2 [37] (dříve klasifikována jako *Rhodococcus rhodochrous*, [92]) a *Rhodococcus* sp. NDB 1165 [93] byly kultivovány na masopeptonovém agaru: (g/l) hovězí extrakt 3, pepton 10, NaCl 5, agar 15 g (pH 7,5), a průběžně přeočkovávány. Submerzní kultivace probíhala v 500 ml Erlenmeyerových baňkách se 100 ml minerálního média (pH 7,5) obsahujícího: (g/l)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2,5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2,0,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,03,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0,06, kvasničný autolyzát 0,1, glukosa 10, isobutyronitril 3,85 (55 mM). Toto kultivační médium bylo zaočkováno 8 % (v/v) inokula obsahujícího: (g/l) hovězí extrakt 10, pepton 10, NaCl 5, glukosu 10, kvasničný autolyzát 1 (pH 7,5; kultivace 24 h při 30°C). Kultura byla inkubována při 28°C na rotační třepačce (200 ot./min) 24 h, poté byla sklizena centrifugací, promyta a resuspendována pufrům Tris/HCl (50 mM, pH 8,0). Buňky byly ihned použity pro stanovení enzymové aktivity a pro biodegradační testy. Pro stanovení biodegradačního potenciálu rostoucích buněk bylo místo isobutyronitrilu do kultivačního média přidávány také chloroxynil, bromoxynil, nebo ioxynil (0,5 mM); kultivace v tomto případě trvala 6 dní za výše zmíněných podmínek.

### Stanovení enzymové aktivity

Pro stanovení nitrilasové aktivity byly buněčné suspenze testovaných bakterií (475  $\mu$ l  $OD_{610} \approx 1$ , což odpovídá cca 0,28 mg sušiny/ml) preinkubovány při 30°C 5 min na třepačce Thermomixer (850 ot./min). Poté bylo přidáno 25  $\mu$ l 500 mM benzonitrilu (zásobní roztok v methanolu), výsledná koncentrace substrátu v reakční směsi byla tedy 25 mM. Po 10 min byla reakce zastavena 100  $\mu$ l 1 M HCl. Reakční směsi byly centrifugovány (14000 ot./min, 5 min) a produkt reakce (benzoová kyselina) byl stanoven pomocí HPLC. Jednotka nitrilasové aktivity byla definována jako množství enzymu, jež vytvoří 1  $\mu$ mol benzoové kyseliny za minutu při výše uvedených podmínkách.

Pro stanovení amidasové aktivity byly buněčné suspenze (585  $\mu$ l;  $OD_{610} \approx 1$ ) preinkubovány při 30 nebo 45°C po dobu 5 min, 850 ot./min. Poté byl přidán benzamid (15  $\mu$ l 100 mM zásobního roztoku v methanolu) tak, aby výsledná koncentrace v reakční směsi byla 2,5 mM. Po 10 min byly reakce zastaveny přidávkem 100  $\mu$ l 1 M HCl. Další postup byl stejný jako u nitrilasové aktivity. Jednotka amidasové aktivity byla definována jako množství enzymu, jež vytvoří 1  $\mu$ mol benzoové kyseliny za minutu při výše uvedených podmínkách.

## Biotransformace

Analytické provedení: Biotransformační experimenty probíhaly při 30°C, 850 ot./min, v 1,5-ml mikrozkušavkách s 1200 µl reakční směsí. Reakční směs obsahovala 1140 µl buněčné suspenze ( $OD_{610} \approx 2$ ) a substráty (chloroxynil, bromoxynil, ioxynil, nebo dichlobenil – struktury uvedeny v **Tab. 1**; 60 µl z 10 mM zásobního roztoku v methanolu; výsledná koncentrace 0,5 mM). Experimenty s abiotickými kontrolami byly provedeny stejným způsobem v pufru bez testovaných buněk. Buňky sklizené z inokulačního média byly použity pro kontrolní pokus s neindukovanými buňkami.

Odebrané vzorky z reakčních směsí (150 µl) byly smíseny se 150 µl metanolu pro zastavení reakce, centrifugovány a naředěny mobilní fází pro HPLC. Vzorky reakčních směsí byly odebírány v časech: 0, 10, 30 min, 1, 2, 5, 24, 72 h.

Preparativní provedení: Biotransformační experimenty probíhaly při 30°C, 200 ot./min, v 250-ml Erlenmeyerových baňkách s 50 ml reakční směsí. Chloroxynil, bromoxynil, nebo ioxynil (0,1 mmol každý) byly rozpuštěny v 2,5 ml metanolu a přelity 47,5 ml buněčné suspenze ( $OD_{610} \approx 2$ ). Průběh reakce byl sledován tenkovrstvou chromatografií (TLC) na destičkách silikagelu (silica gel 60 GF254, Merck) vyvíjených v mobilní fázi dichloromethan : metanol : 25% amoniak (vodný roztok) 15:5:1.

## Isolace produktů biotransformace

Po dokončení preparativních biotransformací byly reakční směsi centrifugovány (6000 ot./min, 30 min, 4°C). Následně bylo pH supernatantu upraveno na 2 – 2,5 pomocí 1 M HCl. Produkt byl extahován v děličce třikrát 50 ml ethylacetátu. Přítomnost produktu v organické a vodné fázi byla porovnána na TLC (silica gel 60 GF254, Merck), mobilní fáze: dichloromethan-methanol-25% amoniak (vodný roztok) 15:5:1). Spojené organické frakce byly vysušeny pomocí  $Na_2SO_4$  a poté zfiltrvány. Rozpouštědlo bylo odpařeno na vakuové odparce.

## Rekombinantní nitrilasy

### Proteinové databáze a porovnávání sekvencí

Prohledávání proteinových databází a porovnání sekvencí bylo provedeno pomocí programů BLASTX a BLASTP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>), resp. COBALT: Constraint-based Multiple Alignment Tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/cobalt.cgi>).

### Vektory

Sekvence hypotetických *nit* genů z *Gibberella moniliformis* [80] a *Nectria haematococca* mpVI 77-13-4 získané při prohledávání databází na základě podobnosti s genem z *Aspergillus niger* K10 [77] (**Příloha 1**) resp. *Neurospora crassa* OR74A [80] (**Příloha 1**) byly zaslány firmě GeneArt, Regensburg, Německo. Zde byla pomocí vlastního softwaru upravena frekvence kodonů pro expresi v *E. coli* (**Přílohy 2 a 3**). Výsledné geny byly zaligovány do plasmidu pET30a(+) mezi restrikční místa *Nde*I a *Hind*III. Vzniklé plasmidy byly pojmenovány pOK104 (*nit* gen *G. moniliformis*) a pOK108 (*nit* gen *N. haematococca*)

Výsledné vektory byly v naší laboratoři transformovány do *E. coli* BL21-Gold (DE3) (Agilent Technologies – Stratagene Products). V případě genu z *G. moniliformis* byla rovněž provedena ko-transformace s chaperoninovým vektorem pGro7 (Takara). Výsledné klony byly označeny jako J10 (gen z *G. moniliformis*) a J50 (gen z *N. haematococca*).

## Transformace

Kompetentní buňky *E. coli* BL21-Gold (DE3) byly uchovávány v  $-80^{\circ}\text{C}$ ; před transformací byly buňky pozvolna rozmrazeny na ledu (cca 20 min).

Nejdříve byly připraveny roztoky vektorů: 20 ng pOK104 nebo pOK108 (+ 20 ng pGro7 – v případě J10), celkový objem 4  $\mu\text{l}$ . Do mikrozkušavky s vektory bylo opatrně napipetováno 50  $\mu\text{l}$  suspenze rozmražených kompetentních buněk. Směs byla pomalu a opatrně promíchána a inkubována na ledu dalších cca 20 min. Poté byl proveden „heat-shock“: směs byla inkubována 5 min při  $37^{\circ}\text{C}$  a 400 ot./min na třepačce (Thermomixer, Eppendorf) a hned poté vložena na 2 min do ledu. Buňky byly resuscitovány přidáním 0,25 ml sterilního LB media (g/l: Trypton 10, kvasničný autolyzát 5, NaCl 5) bez antibiotik a inkubovány 1,5 hodiny při  $37^{\circ}\text{C}$ .

Suspenze resuscitovaných transformovaných buněk (100  $\mu\text{l}$ ) byla pak rozetřena na Petriho miskách (1 transformace: 2 misky) s LB agarem obsahujícím antibiotika: chloramfenikol - jen J10 - (20 mg/l) a kanamycin - J10 i J50 - (50 mg/l). Misky byly inkubovány přes noc při  $37^{\circ}\text{C}$ . Poté byla vybrána vždy jedna kolonie ze středu misky k zaočkování tekutého media. Kultivace probíhala přes noc při  $28^{\circ}\text{C}$  v 50 ml plastových uzavíratelných zkumavkách s 10 ml LB media s příslušnými antibiotiky: chloramfenikol - jen J10 - (20 mg/l) a kanamycin - J10 i J50 - (50 mg/l). Poté byly z narostlých kultur připraveny kryokonzervy: 400  $\mu\text{l}$  kultury bylo asepticky smíseno se 100  $\mu\text{l}$  sterilního LB media s 50 % glycerolu a zamraženo na  $-80^{\circ}\text{C}$ . K zaočkování kultivace (viz výše) bylo použito 100  $\mu\text{l}$  obsahu kryokonzervy. Následovala inkubace při  $25^{\circ}\text{C}$  200 ot./min 3,5 hodiny. Po nárůstu na  $\text{OD}_{610}$  cca 0,6 byla indukována produkce chaperoninů L-arabinosou (2 g/l) a produkce nitrilas IPTG (0,5 mM). Před indukcí a po indukci byly odebírány vzorky kultury pro stanovení enzymové aktivity a exprese proteinů. Kultury byly inkubovány přes noc.

Pro následnou purifikaci enzymů byly rekombinantní kmeny kultivovány na LB-medium obsahujícím: chloramfenikol - jen J10 - (20 mg/l) a kanamycin - J10 i J50 - (50 mg/l). Kultivace probíhala v 0,5 l Erlenmeyerových baňkách s 0,2 l média. Médium bylo zaočkováno 90  $\mu\text{l}$  obsahu kryokonzervy na počáteční  $\text{OD}_{610}$  cca 0,02; následovala inkubace při  $37^{\circ}\text{C}$  200 ot./min 3,5 – 4 hodiny. Po nárůstu na  $\text{OD}_{610}$  cca 0,6 byla snížena teplota kultivace na  $25^{\circ}\text{C}$ . Nejdříve byla indukována produkce chaperoninů L-arabinosou

(2 g/l). Po 20 min byla indukována produkce nitrilasy pomocí IPTG (0,5 mM). Kultury byly takto inkubovány dalších 17 hodin.

### Purifikace enzymů

Buňky byly sklizeny centrifugací při 4000 ot./min, 8°C, 20 min. Pelety byly resuspendovány v 7,5 ml pufru Tris/HCl 50 mM, pH 8,0, s 150 mM NaCl a sonikovány. Buněčné zbytky byly odstraněny centrifugací při 13 000 g, 4°C, 20 min. Buněčné extrakty byly naředěny pufrům na 50 ml a nanášeny na iontoměničovou kolonu Hi-Prep 16/10 Q FF (GE Healthcare) při průtoku 2 ml/min. Po eluci nezachycených proteinů byl nastaven lineární gradient NaCl (0,150 - 1 M) v Tris/HCl pufru (50 mM, pH 8) na 180 ml (viz **Obr. 9 a 10**, str. 42 a 43). Aktivní frakce byly spojeny a zakonzentrovány na membráně Amicon Ultra-4 (cut-off 30 kDa; Milipore) na 500  $\mu$ l. Následovala gelová filtrace na koloně Superdex 200 HR 10/300 GL (GE Healthcare) v pufru Tris/HCl 50 mM NaCl 150 mM pH 8,0 při průtoku 0,4 ml/min (viz **Obr. 9 a 10**, str. 42 a 43). Aktivní frakce byly spojeny a zakonzentrovány stejným způsobem.

### Stanovení enzymové aktivity

Aktivita rekombinantních nitrilas byla stanovena pro buněčné suspenze a roztoky enzymu (obojí v pufru Tris/HCl 50 mM NaCl 150 mM pH 8,0). Peleta z 0,5 ml kultury transformovaných buněk *E. coli* byla resuspendována v 475  $\mu$ l pufru, preinkubována 5 min při 30°C a 850 ot./min. Poté bylo přidáno 25  $\mu$ l 500 mM benzonitrilu (J10), nebo 25  $\mu$ l 500 mM fenylacetonitrilu (J50).

Po vhodném naředění roztoků enzymů do objemu 190  $\mu$ l pufru a preinkubaci při 30° a 850 ot./min bylo přidáno 10  $\mu$ l 500 mM benzonitrilu (J10), nebo 10  $\mu$ l 500 mM fenylacetonitrilu (J50). V případě buněk i enzymů byla reakce po 5 min zastavena 50  $\mu$ l resp. 20  $\mu$ l 1 M HCl, vzorky byly centrifugovány a analyzovány pomocí HPLC.

Substrátová specifita byla s roztoky enzymů naměřena pro fenylacetonitril, (*R,S*)-2-fenylpropionitril, (*R,S*)-mandelonitril, 2-kyanopyridin, 3-kyanopyridin, 4-kyanopyridin, 3-chlorbenzonitril a 4-chlorbenzonitril (každý 25 mM) za výše uvedených podmínek.

Teplotní a pH optimum byly určeny podle výše uvedeného postupu při teplotách 15 – 60°C resp. pH 4 – 12 (škála pH vytvořena pomocí Britton – Robinsonova pufru; 40 mM octová kyselina, 40 mM kyselina boritá a 40 mM kyselina fosforečná – do roztoku kyselin postupně přidáván 120 mM NaOH)

Teplotní a pH stability byly stanoveny podle standardního postupu, jemuž předcházela inkubace při teplotách 5 – 60°C 1h resp. při pH 4 – 12 2h.

### **Stanovení proteinů**

Koncentrace proteinů byla stanovena pomocí Bradford Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, USA) s BSA jako standardem [94].

### **SDS-PAGE**

Analýza proteinů byla provedena na 12% SDS – polyakryamidovém gelu barveném v Coomassie.

### **Analýza HPLC**

#### **Přístroje a kolony**

Všechny látky byly analyzovány na přístroji Waters HPLC system (čerpadlo Waters 600, autosampler Waters 717 plus a detektor Waters PDA 996).

Benzonitril, 3,5-dichlor-4-hydroxybenzonitril (chloroxynil), 3,5-dibrom-4-hydroxybenzonitril (bromoxynil), 3,5-dijod-4-hydroxybenzonitril (ioxynil), 2,6-dichlorbenzonitril (dichlobenil), fenylacetonitril, (*R,S*)-2-fenylpropionitril, (*R,S*)-mandelonitril, 3-chlorbenzonitril, 4-chlorbenzonitril a příslušné metabolity byly eluovány na koloně Chromolith Flash RP-18 Merck monolithic column (25 mm x 4,6 mm) za průtoku 2 ml/min při 35°C.

2-Kyanopyridin, 3-kyanopyridin, 4-kyanopyridin a jejich metabolity byly eluovány na koloně ACE C8, 5 µm, 250 x 4 mm (Advanced Chromatography Technologies, USA).

### Mobilní fáze

Acetonitril : voda : H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 200 : 799 : 1 (benzonitril, fenylacetonitril, (*R,S*)-2-fenylpropionitril, 3-chlorbenzonitril, 4-chlorbenzonitril), 250 : 749 : 1 (chloroxynil, bromoxynil, dichlobenil), 350 : 649 : 1 (ioxynil).

Methanol : voda : H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 100 : 899 : 1 (*R,S*)-madelonitril

Acetonitril 100 ml, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> .12 H<sub>2</sub>O 1,79 g, doplněno vodou na 1 l a pH upraveno pomocí 86 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> na 7,2 - 2-kyanopyridin, 3-kyanopyridin, 4-kyanopyridin.

Všechny mobilní fáze byly před použitím filtrovány přes nylonovou membránu (průměr pórů 0,45 µm, Whatman).

Koncentrace jednotlivých látek byly stanoveny pomocí kalibračních metod vytvořených s roztoky komerčních standardů.

## Výsledky

### Nitrilasy kmenů *Rhodococcus rhodochrous* a *Nocardia globerula*

#### Aktivita nitrilas

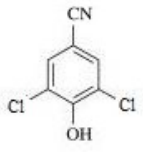
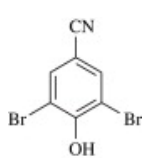
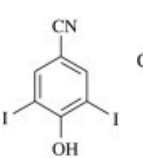
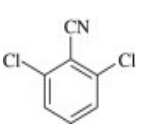
Všechny tři testované bakteriální kmeny produkovaly enzymy s nitrilasovou aktivitou po indukci isobutyronitrilem během kultivace. Benzoová kyselina byla jediným detegovaným produktem při reakci buněk s benzonitrilem; vznik benzamidu nebyl pozorován. Z toho lze usuzovat, že na konverzi benzonitrilu se nepodílely žádné nitrilhydratasy, ale pouze nitrilasy. Abychom mohli vyloučit vznik benzamidu (případného produktu nitrilhydratasy nebo vedlejšího produktu nitrilasy), který by mohl být následně přeměněn na kyselinu amidasou, byly buňky testovány na tuto aktivitu (viz předchozí kapitolu). Při obou testovaných teplotách byly amidasové aktivity o dva řády nižší než aktivity indukovaných nitrilas. Případný vznikající benzamid by tedy z velké části nestačil zreagovat a byl by patrný při analýze reakční směsi.

V případě benzonitrilových herbicidů byly nitrilasové aktivity všech tří kmenů o 2 až 3 řády nižší než pro benzonitril (**Tab. 1**, následující strana). Během inkubace s buněčnými suspenzemi byl však pozorován pokles koncentrace chloroxynilu, bromoxynilu a ioxynilu a zároveň nárůst koncentrace reakčního produktu (**Obr. 6 – 8**, str. 39 a 40). Pro dichlobenil nebyla pozorována žádná reakce.

Pokles koncentrací testovaných sloučenin nebyl pozorován v abiotických kontrolách a v kontrolách s neindukovanými buňkami.

Jelikož reakce s benzonitrilovými herbicidy probíhaly výrazně pomaleji než s benzonitrilem, byly aktivity pro tyto sloučeniny stanoveny pro reakční čas 30 min. Aktivity pro testované sloučeniny jsou uvedeny v **Tab. 1** na následující straně.

**Tab. 1.:** Aktivity enzymů bakterií kmenů *Rhodococcus* a *Nocardia* (U/mg sušiny)

Kmen	Benzonitril		Chloroxynil	Bromoxynil	Ioxynil	Dichlobenil
	Nitrilasa	Amidasa				
<i>Rhodococcus</i> sp. NDB 1165	1,1	0,004	0,016	0,010	0,004	0
<i>R.</i> <i>rhodochrous</i> PA-34	1,4	0,014	0,015	0,008	0,001	0
<i>N. globerula</i> NHB-2	1,9	0,011	0,007	0,004	0,001	0

Bakterie kultivované v přítomnosti chloroxynilu, bromoxynilu, nebo ioxynilu (všechny 0,5 mM) namísto isobutyronitrilu jako induktoru nebyly schopny transformovat ani jeden z testovaných herbicidů. Jejich koncentrace v kultivačním médiu zůstala nezměněna i po šesti dnech kultivace. Za těchto podmínek tedy nedošlo k indukci nitrilasové aktivity.

### Biodegradační testy

Koncentrace testovaných látek byly průběžně sledovány na HPLC. Během transformace chloroxynilu, bromoxynilu a ioxynilu HPLC analýza prokázala vznik produktů se stejným retenčním časem a UV spektrem jako komerční standardy příslušných substituovaných benzoových kyselin (**Tab. 2**, následující strana; dichlobenil, 2,6-dichlorbenzamid a 2,6-dichlorbenzoová kyselina detegovány a kvantifikovány při 210 nm). Při preparativních provedeních biodegradačních pokusů bylo připraveno dostatečné množství reakčních produktů pro NMR a MS analýzu (Helena Pelantová a Miroslav Šulc, Laboratoř

charakterizace molekulární struktury, MBÚ AVČR, v.v.i.). Ve všech případech byly jako produkty reakcí prokázány příslušné substituované benzoové kyseliny.

Chloroxynil a bromoxynil byly transformovány téměř stechiometricky na příslušné halogenované benzoové kyseliny. Vznik dalších produktů nebyl pozorován. Naměřené koncentrace bromoxynilu a ioxynilu byly nižší než očekávané, nejspíše kvůli horší rozpustnosti.

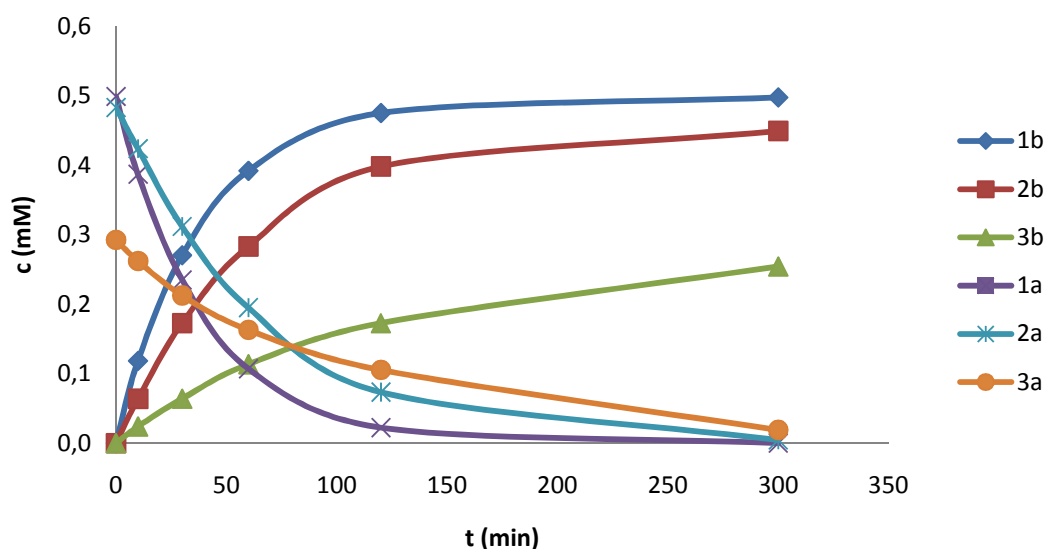
**Tab. 2:** Retenční časy a UV absorpční maxima substrátů a produktů biodegradačních reakcí s bakteriemi *Rhodococcus* a *Nocardia*

Sloučenina	Retenční čas (min)	Absorpční maximum (nm)
3,5-Dichlor-4-hydroxybenzonnitril	1,6	215,8 <sup>a</sup> – 255,8
3,5-Dichlor-4-hydroxybenzoová kyselina	0,8	215,8 <sup>a</sup> – 251
3,5-Dibrom-4-hydroxybenzonnitril	2,3	216,9 <sup>a</sup> – 256,9
3,5-Dibrom-4-hydroxybenzoová kyselina	1,0	216,9 <sup>a</sup> – 256,9
3,5-Dijod-4-hydroxybenzonnitril	4,0	235,7 <sup>a</sup>
3,5-Dijod-4-hydroxybenzoová kyselina	1,5	235,7 <sup>a</sup>
2,6-Dichlorbenzonnitril	4,0	–
2,6-Dichlorbenzamid	0,5	–
2,6-Dichlorbenzoová kyselina	0,8	–
Benzonnitril	1,3	222,8 <sup>a</sup>
Benzamid	0,5	225,2 <sup>a</sup>
Benzoová kyselina	0,8	228,7 <sup>a</sup>

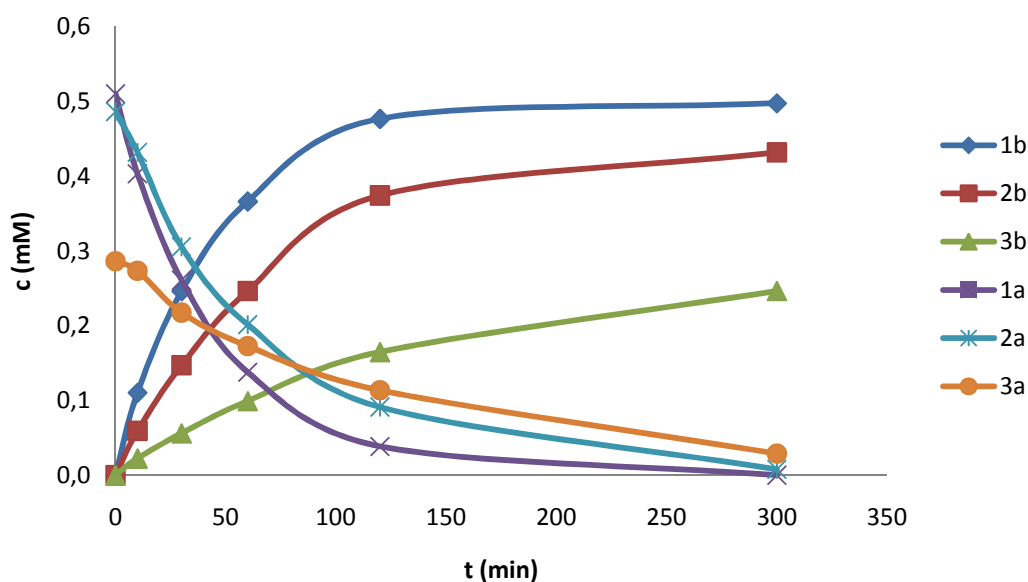
<sup>a</sup> vlnová délka detekce a kvantifikace dané sloučeniny

Chloroxynil byl u všech tří kmenů bakterií téměř zcela transformován na 3,5-dichlor-4-hydroxybenzoovou kyselinu během 5 hodin reakce. Bromoxynil byl za stejný čas hydrolyzován ze 70–90 %. Transformace ioxynilu probíhala ještě pomaleji, za 5 h došlo k hydrolyze 30–51 % substrátu. Reakční rychlost tedy klesá v pořadí: chloroxynil > bromoxynil > ioxynil. Po 20 hodinách inkubace došlo v případě chloroxynilu a bromoxynilu u všech kmenů k úplné konverzi. Ioxynil však nebyl plně hydrolyzován ani po třech dnech inkubace; nejvyšší dosažená konverze byla 60 % u všech tří kmenů bakterií.

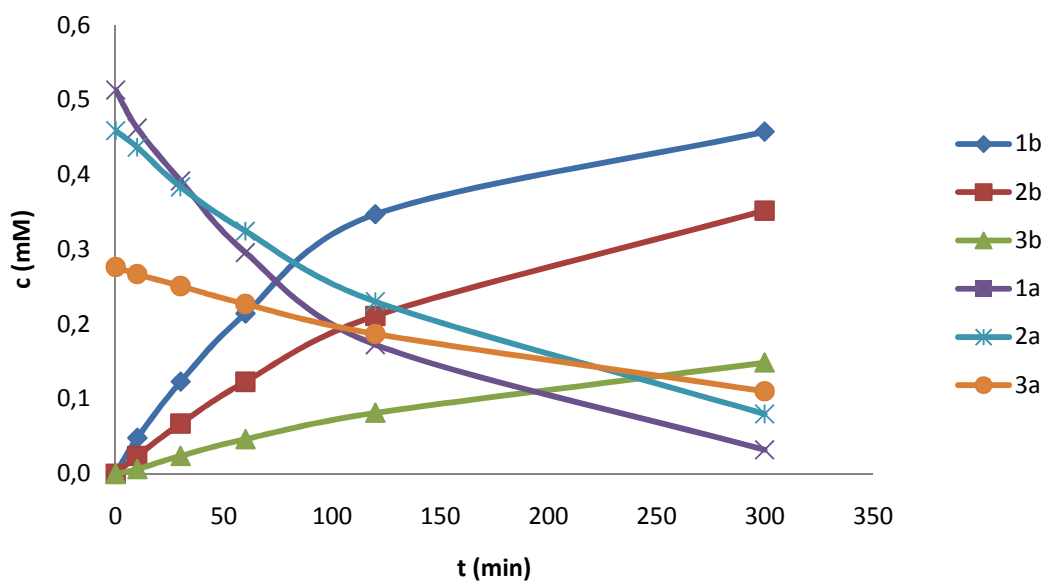
Mezi prvním a třetím dnem inkubace byl rovněž pozorován slabý pokles v koncentracích vzniklých karboxylových kyselin, a to v případě chloroxynilu a bromoxynilu v reakčních směsích s bakteriemi *R. rhodochrous* PA-34 a *N. globerula*. Celkem došlo k poklesu o 25 % u 3,5-dichlor-4-hydroxybenzoové kyseliny a o 18 % u 3,5-dibrom-4-hydroxybenzoové kyseliny u obou kmenů. Píky potenciálních produktů tohoto rozpadu však na chromatogramech nebyly nalezeny. 3,5-Dijod-4-hydroxybenzoová kyselina vznikající z ioxynilu nebyla dále transformována. Rovněž v měřeném čase nebyl pozorován pokles koncentrací příslušných karboxylových kyselin v abiotických kontrolách.



**Obr. 6:** Průběh transformace benzonitrilových herbicidů (**1a** – chloroxynil, **2a** – bromoxynil, **3a** – ioxynil) na substituované benzoové kyseliny (**1b** – 3,5-dichlor-4-hydroxybenzoová kys., **2b** – 3,5-dibrom-4-hydroxybenzoová kys., **3b** – 3,5dijod-4-hydroxybenzoová kys.) bakterií *Rhodococcus* sp. NDB 1165 ( $OD_{610} = 2$ )



**Obr. 7:** Průběh transformace benzonitrilových herbicidů (**1a** – chloroxynil, **2a** – bromoxynil, **3a** – ioxynil) na substituované benzoové kyseliny (**1b** – 3,5-dichlor-4-hydroxybenzoová kys., **2b** – 3,5-dibrom-4-hydroxybenzoová kys., **3b** – 3,5dijod-4-hydroxybenzoová kys.) bakterií *Rhodococcus rhodochrous* PA-34 ( $OD_{610} = 2$ )



**Obr. 8:** Průběh transformace benzonitrilových herbicidů (**1a** – chloroxynil, **2a** – bromoxynil, **3a** – ioxynil) na substituované benzoové kyseliny (**1b** – 3,5-dichlor-4-hydroxybenzoová kys., **2b** – 3,5-dibrom-4-hydroxybenzoová kys., **3b** – 3,5-dijod-4-hydroxybenzoová kys.) bakterií *Nocardia globberula* NHB-2 ( $OD_{610} = 2$ )

## Rekombinantní nitrilasy

### Purifikace a charakterizace nitrilas

Expresí dvou genů syntetizovaných podle sekvencí hypotetických nitrilas byly získány funkční enzymy s odlišnými vlastnostmi. Pokud jde o aminokyselinové sekvence, jsou si enzymy z *G. moniliformis* a *N. haematococca* vzájemně podobné jen vzdáleně (viz **Přílohu 1**), a jsou poměrně odlišné také od známých bakteriálních nitrilas (< 40 % identických aminokyselin). Vzájemně se od sebe liší i svou substrátovou specifitou. Zatímco rekombinantní enzym z *G. moniliformis* preferuje benzonitril a jedná se tedy o aromatickou nitrilasu, enzym z *N. haematococca* upřednostňuje fenylacetonitril, což jej řadí mezi arylalifatické nitrilasy.

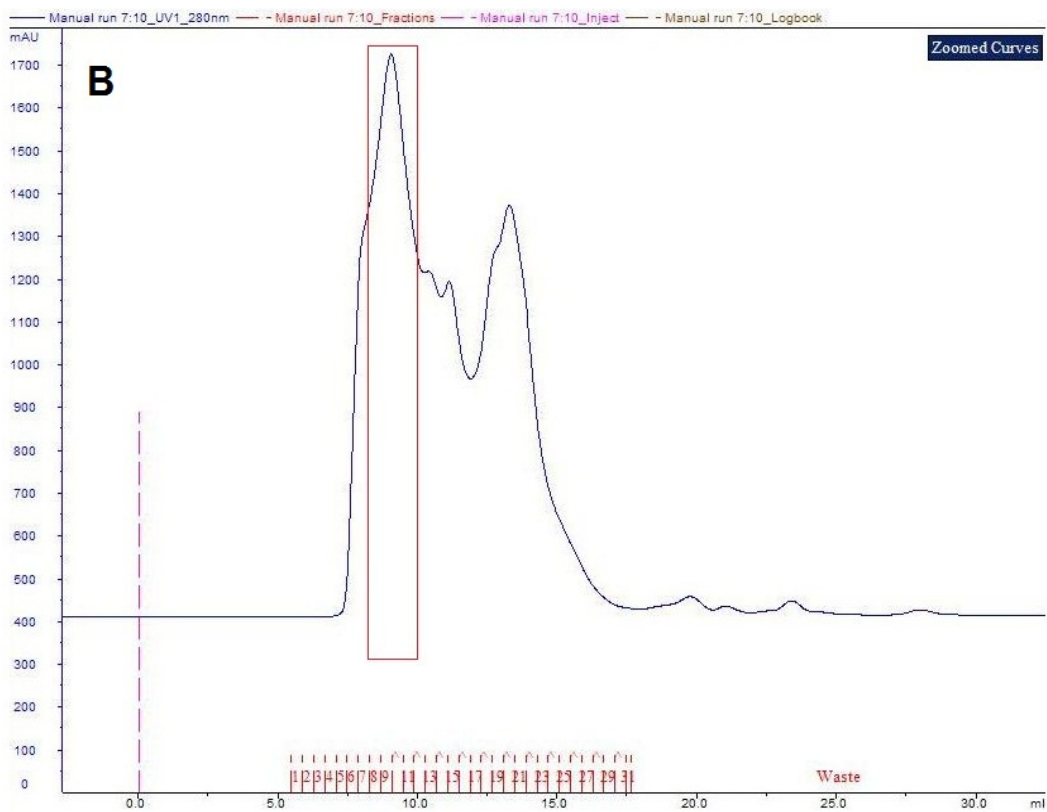
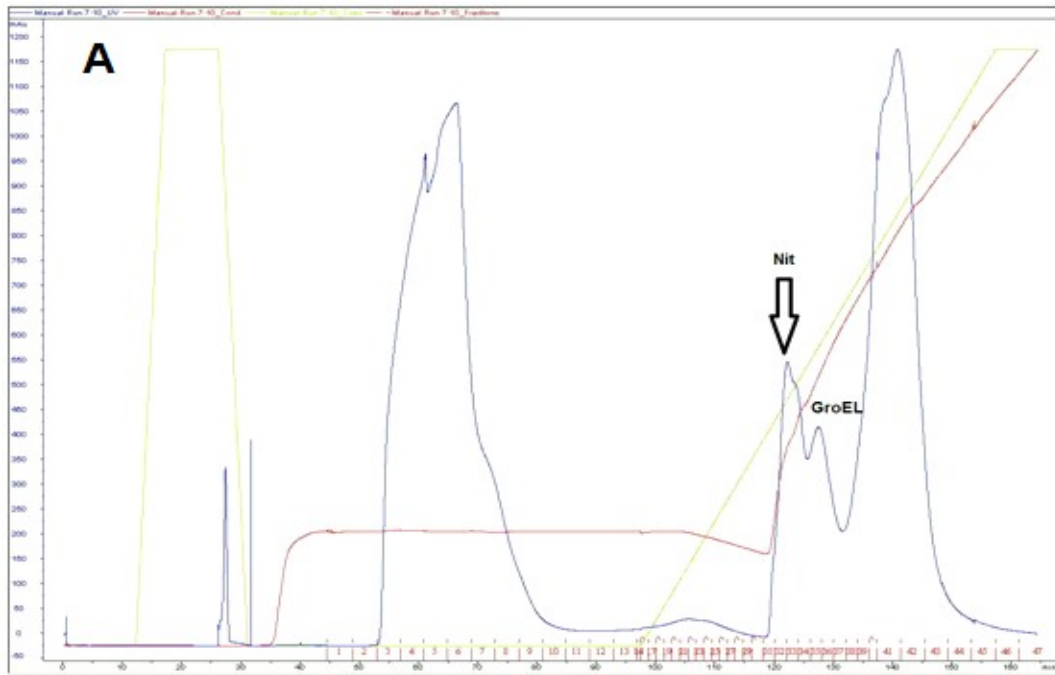
V případě klonu J10 byla exprese rekombinantního enzymu značně nižší než u klonu J50 (viz **Obr. 11 a 12**, str. 46 a 47).

U klonu J10 bylo celkem získáno 2560 U/l buněčné suspenze, během purifikace se specifická aktivita zvýšila téměř 9 x (viz **Tab. 3**, str. 44). Jak je patrné z SDS-PAGE gelu (**Obr. 11**, str. 46), byla rekombinantní nitrilasa z *G. moniliformis* purifikována spolu s chaperonem GroEL.

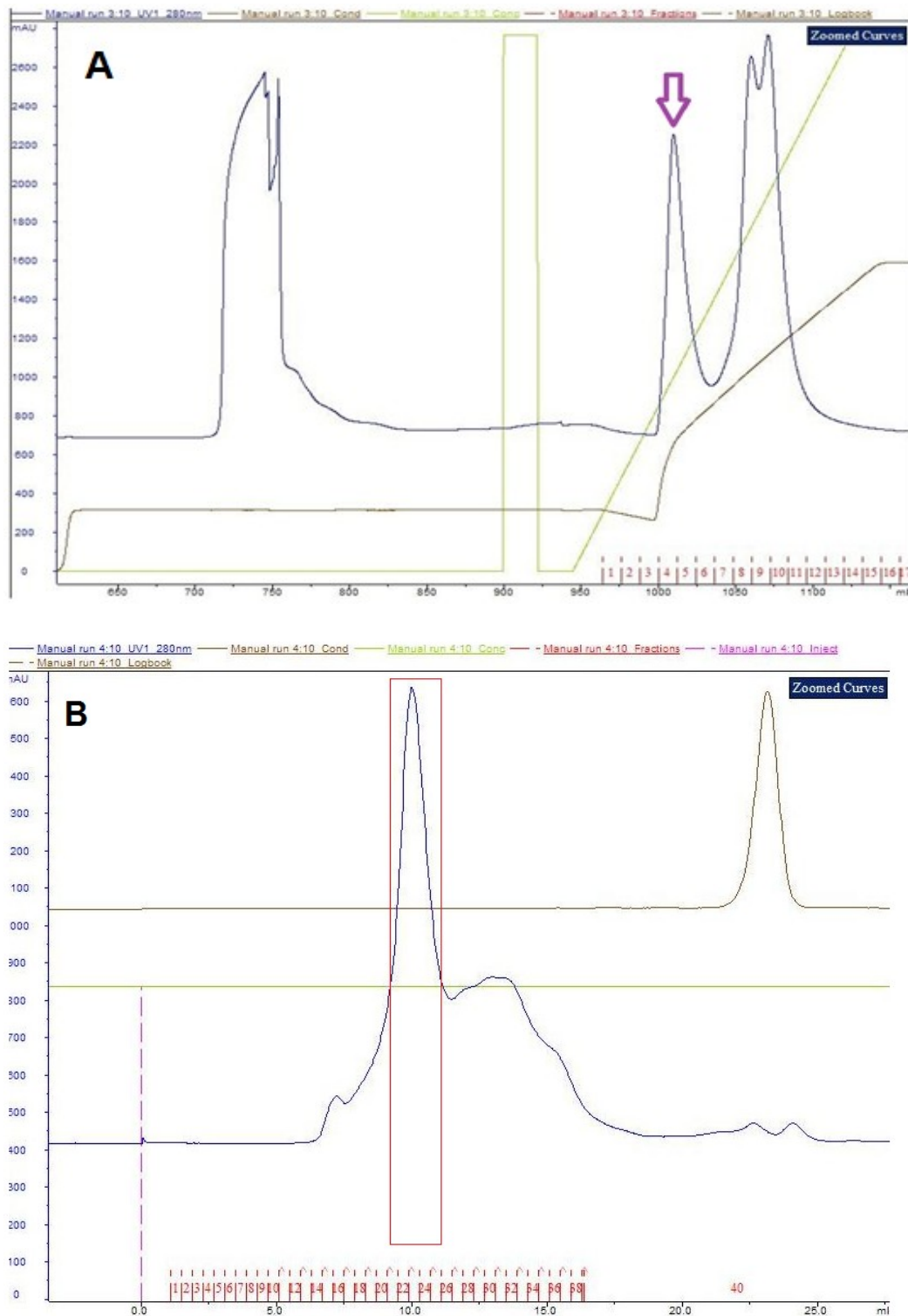
Kultivací klonu J50 bylo získáno celkem 28 050 U/l buněčné suspenze a při purifikaci bylo dosaženo 1,5 násobného zvýšení specifické aktivity enzymu (**Tab. 4 a Obr 12**, str. 45 a 47).

Rekombinantní nitrilasa z *G. moniliformis* vykazovala vyšší teplotní optimum a teplotní stabilitu než rekombinantní enzym z *N. haematococca*. Rovněž byla aktivní v širším spektru hodnot pH (**Obr. 13 až 20**, str. 48 až 51).

Dalšími preferovanými substráty byla v případě klonu J10 chlorovaná analoga benzonitrilu a 3- a 4-kyanopyridin, fenylacetonitril byl transformován pouze minimálně. V případě klonu J50 byly preferovanými substráty fenylacetonitril, mandelonitril a v menší míře také 4-kyanopyridin. (viz **Tab. 5**, str. 52). Kromě kyselin vznikaly v menší či větší míře také amidy jako vedlejší reakční produkty. Jejich procentuální zastoupení v reakčním produktu je uvedeno v **Tab. 6**, str. 53.



**Obř. 9:** Purifikace rekombinantní nitrilasy z *G.moniliformis* pomocí anexu (A, kolona Hi-Prep 16/10 Q FF, průtok 2 ml/min, lineární gradient NaCl 0,150 - 1 M v Tris/HCl pufru 50 mM, pH 8, 180 ml) a gelové filtrace (B, Superdex 200 HR 10/300 GL v pufru Tris/HCl 50 mM NaCl 150 mM pH 8,0 při průtoku 0,4 ml/min). Šipka a rámeček označují aktivní frakce.



**Obr. 10:** Purifikace rekombinantní nitrilasy z *N. haematococca* pomocí anexu (**A**, kolona Hi-Prep 16/10 Q FF, průtok 2 ml/min, lineární gradient NaCl 0,150 - 1 M v Tris/HCl pufru 50 mM, pH 8, 180 ml) a gelové filtrace (**B**, Superdex 200 HR 10/300 GL v pufru Tris/HCl 50 mM NaCl 150 mM pH 8,0 při průtoku 0,4 ml/min). Šipka a rámeček označují aktivní frakce.

**Tab. 3:** Purifikační protokol pro rekombinantní nitrilasu z *G. moniliformis* (klon J10)

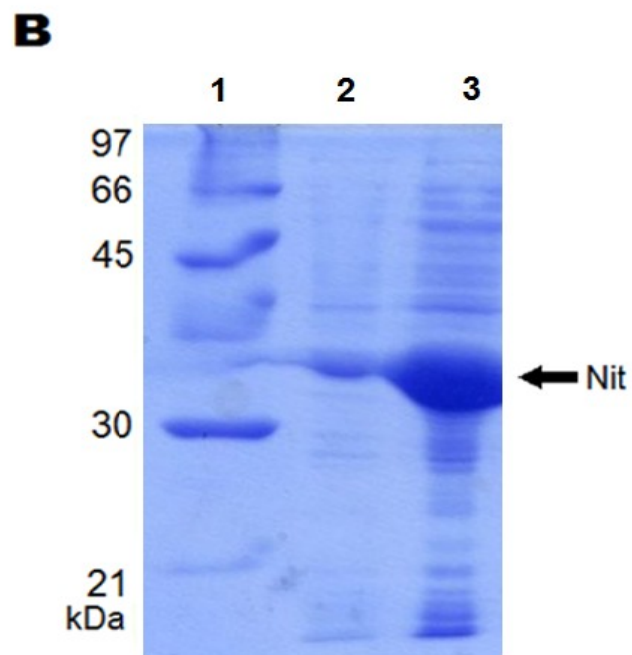
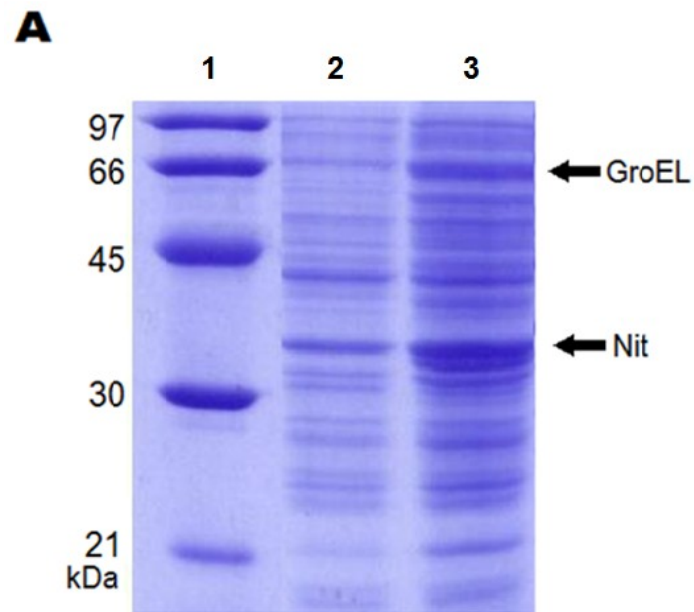
Purifikační krok	Protein celkem (mg)	Specifická aktivita (U/mg)	Celková aktivita (U)	Výtěžek (%)	Purifikační faktor (násobek)
Buněčný extrakt	163	3,5	569	100	1
Ionexová chromatografie (Q-Sepharosa)	34,9	7,0	246	43,2	2,0
Gelová filtrace (Superdex S-200)	6,6	30,9	204	35,8	8,8

Aktivita enzymu byla stanovena pro 25 mM benzonitril při 30°C (viz kapitolu Materiál a metody).

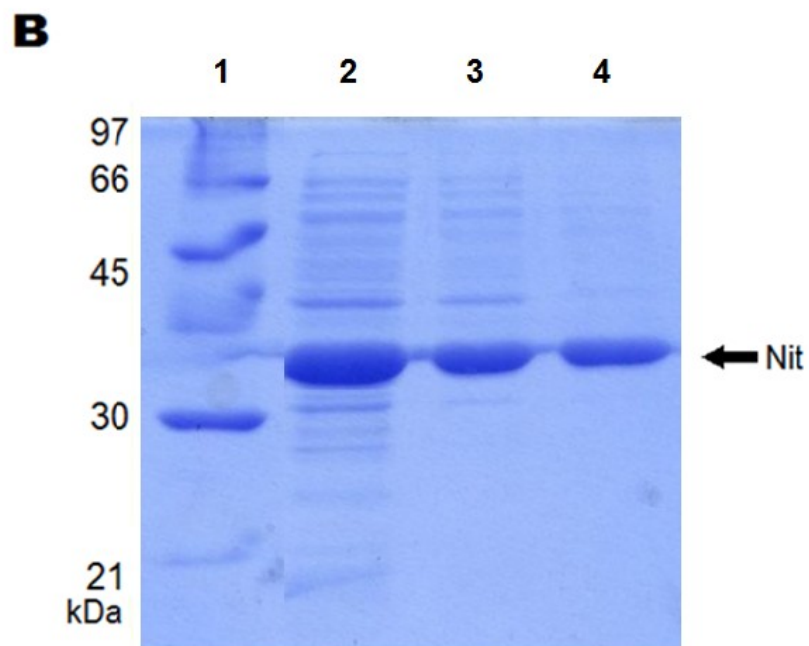
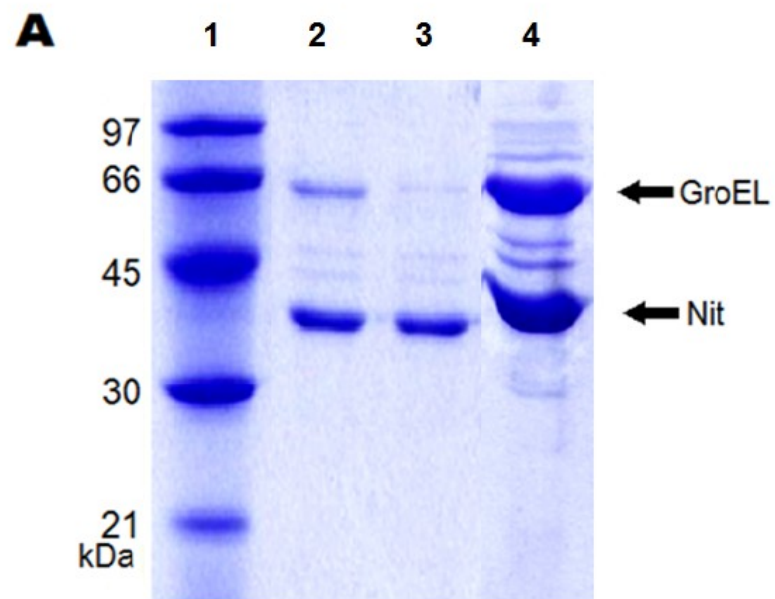
**Tab. 4:** Purifikační protokol pro rekombinantní nitrilasu z *N. haematococca* (klon J50)

Purifikační krok	Protein celkem (mg)	Specifická aktivita (U/mg)	Celková aktivita (U)	Výtěžek (%)	Purifikační faktor (násobek)
Buněčný extrakt	73	8,3	602	100	1
Ionexová chromatografie (Q-Sepharosa)	47	11,1	519	86	1,3
Gelová filtrace (Superdex S-200)	7,6	12,3	93	15	1,5

Aktivita enzymu byla stanovena pro 25 mM fenylacetonitril při 30°C (viz kapitulu Materiál a metody).

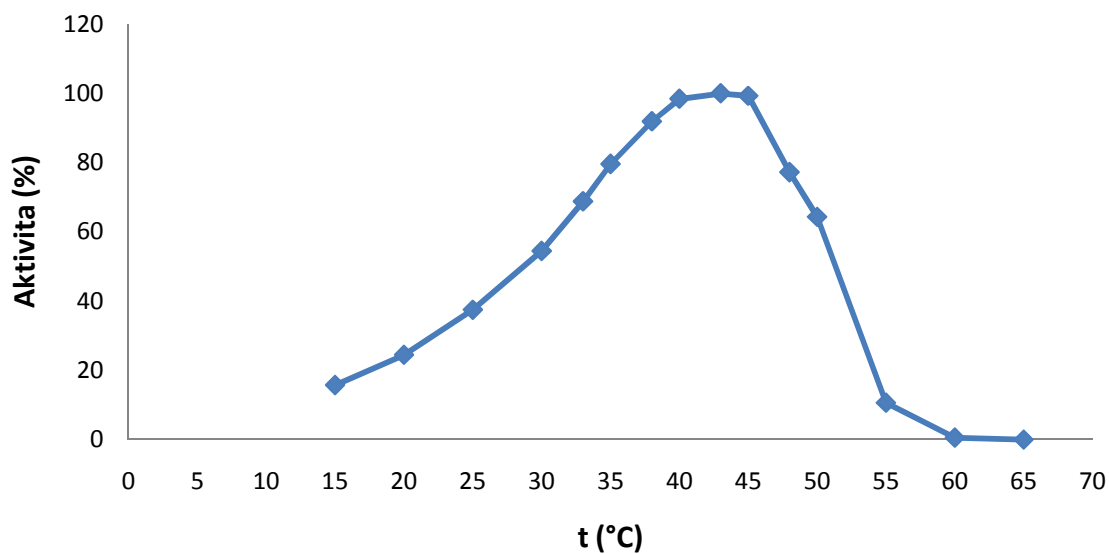


**Obr. 11:** Průběh kultivace transformovaných buněk (12% SDS – polyakryamidový gel).  
**A:** Klon J10 – dráha 1 – marker, dráha 2 – neindukované buňky, dráha 3 – indukované buňky;  
**B:** Klon J50 – 1 – marker, dráha 2 – neindukované buňky, dráha 3 – indukované buňky



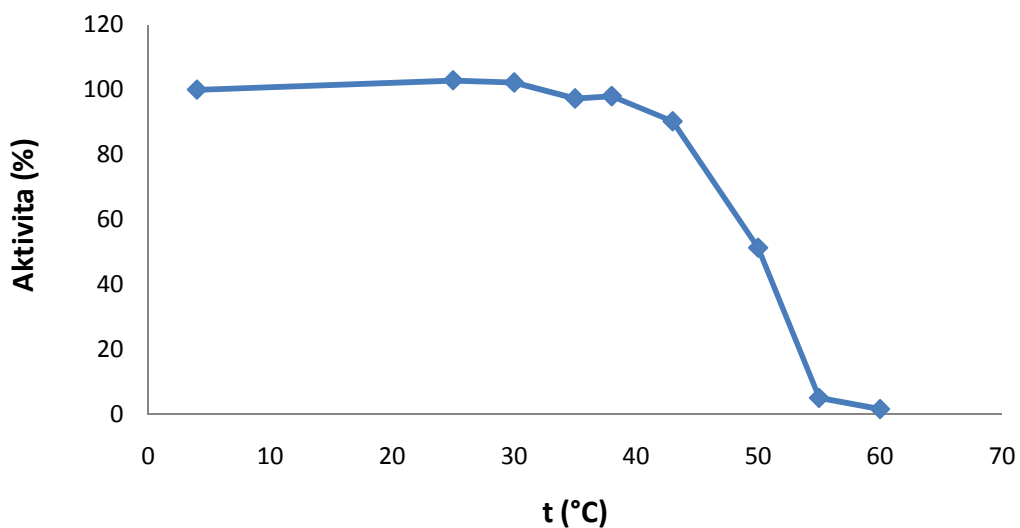
**Obr. 12:** Průběh purifikace rekombinantních nitrilas (12% SDS – polyakryamidový gel). **A:** Klon J10 – dráha 1 – marker, dráha 2 – buněčný extrakt, dráha 3 – enzym po ionexové chromatografii, dráha 4 – zahuštěný enzym po gelové filtraci; **B:** Klon J50 – dráha 1 – marker, dráha 2 – buněčný extrakt, dráha 3 – enzym po ionexové chromatografii, dráha 4 – enzym po gelové filtraci

### Teplotní optimum - *G. moniliformis*



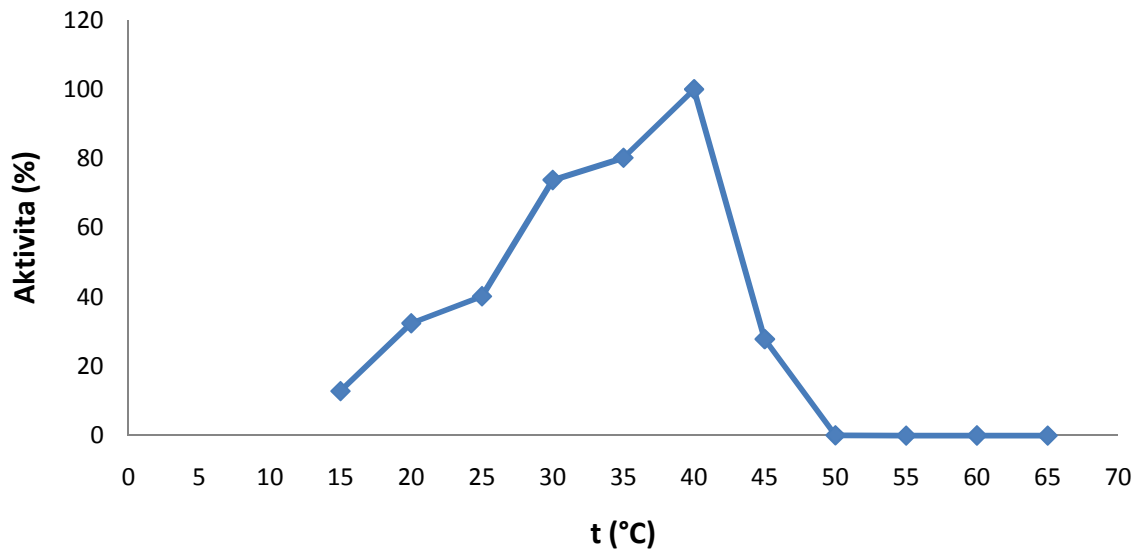
Obr. 13: Vliv teploty na aktivitu purifikované rekombinantní nitrilasy z *G. moniliformis*

### Teplotní stabilita - *G. moniliformis*



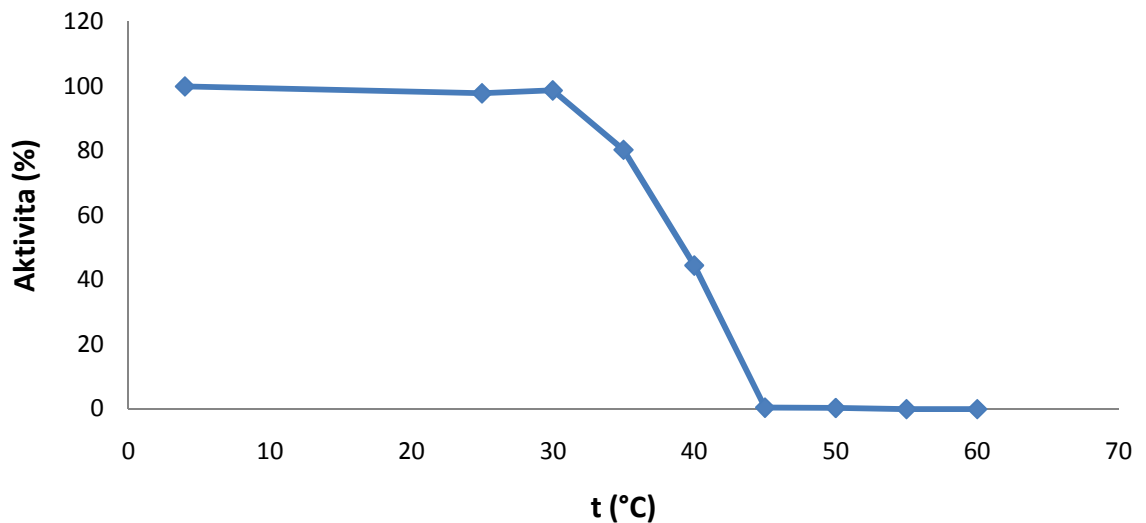
Obr. 14: Vliv teploty na stabilitu purifikované rekombinantní nitrilasy z *G. moniliformis*

### Teplotní optimum - *N. haematococca*

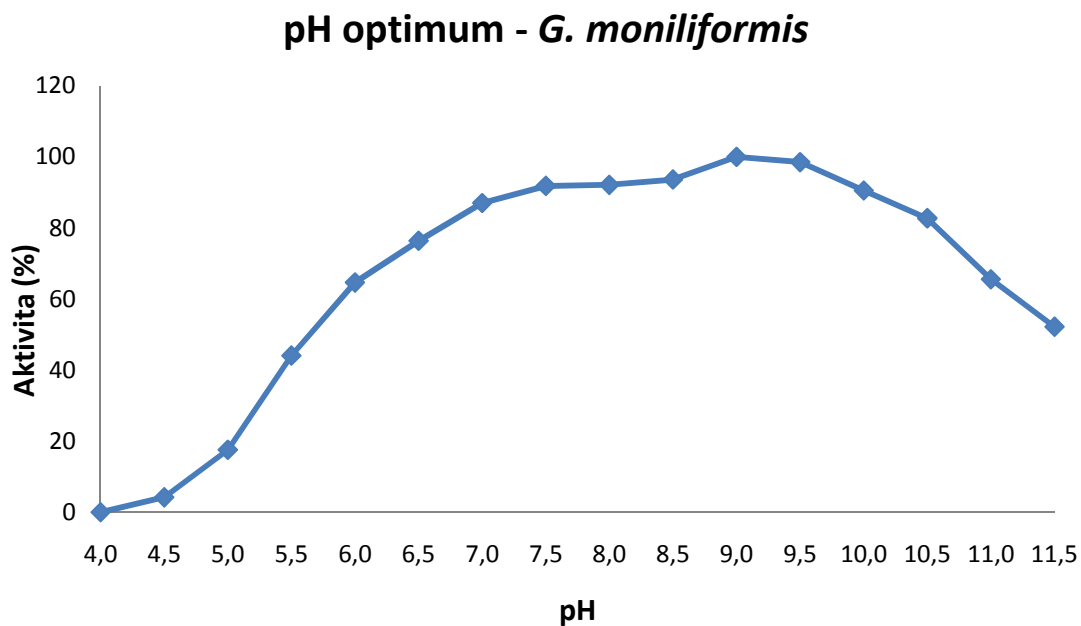


Obr. 15: Vliv teploty na aktivitu purifikované rekombinantní nitrilasy z *N. haematococca*

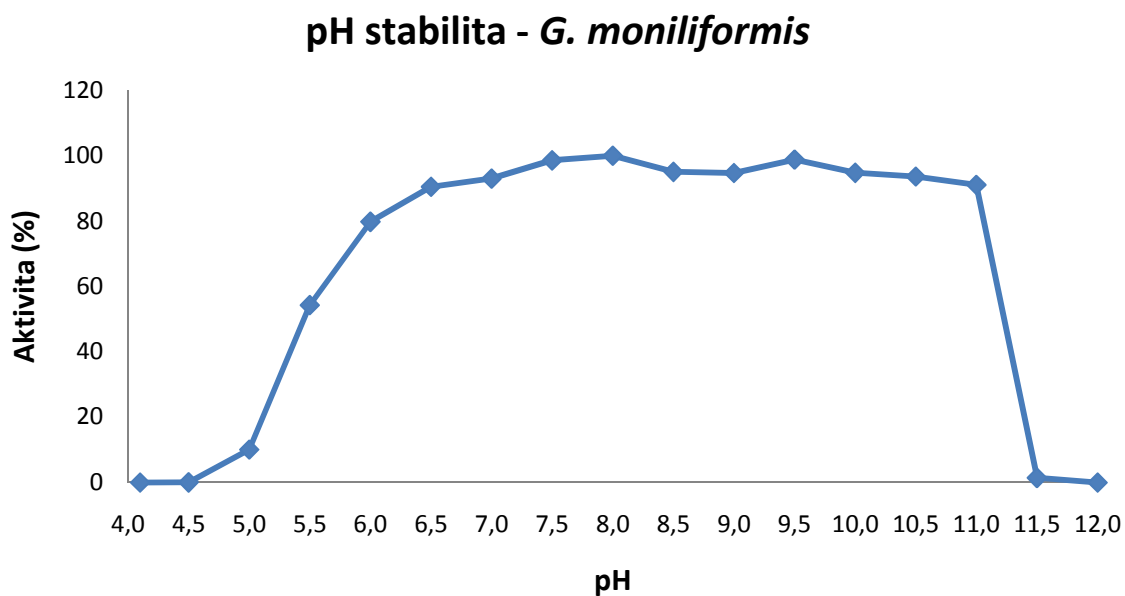
### Teplotní stabilita - *N. haematococca*



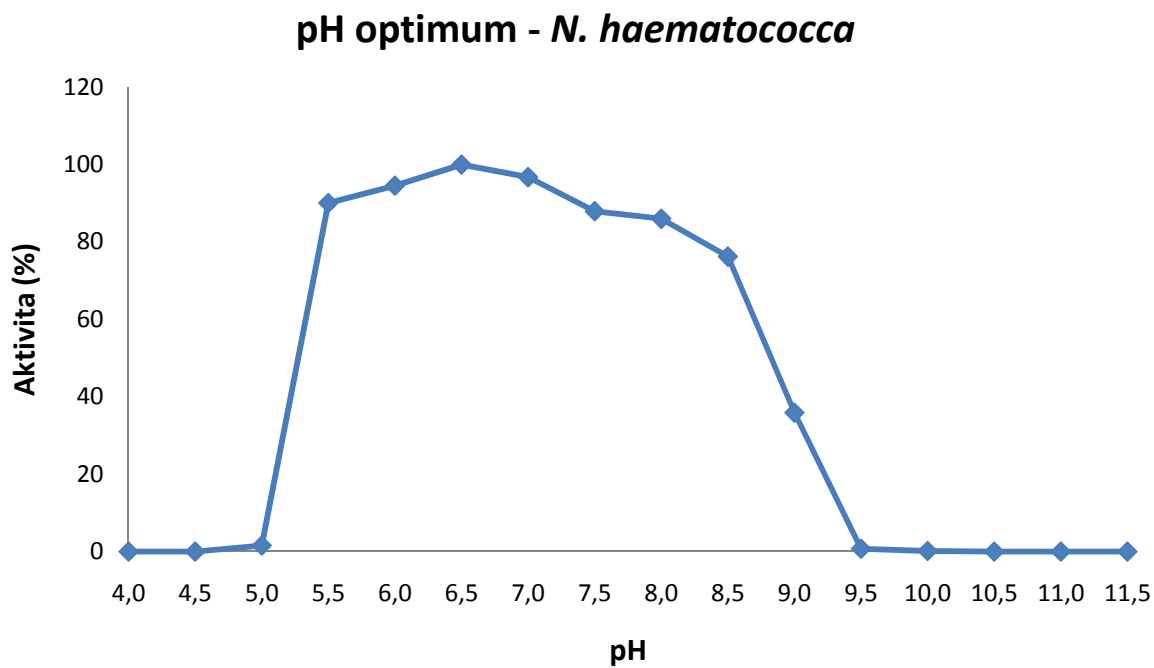
Obr. 16: Vliv teploty na stabilitu purifikované rekombinantní nitrilasy z *N. haematococca*



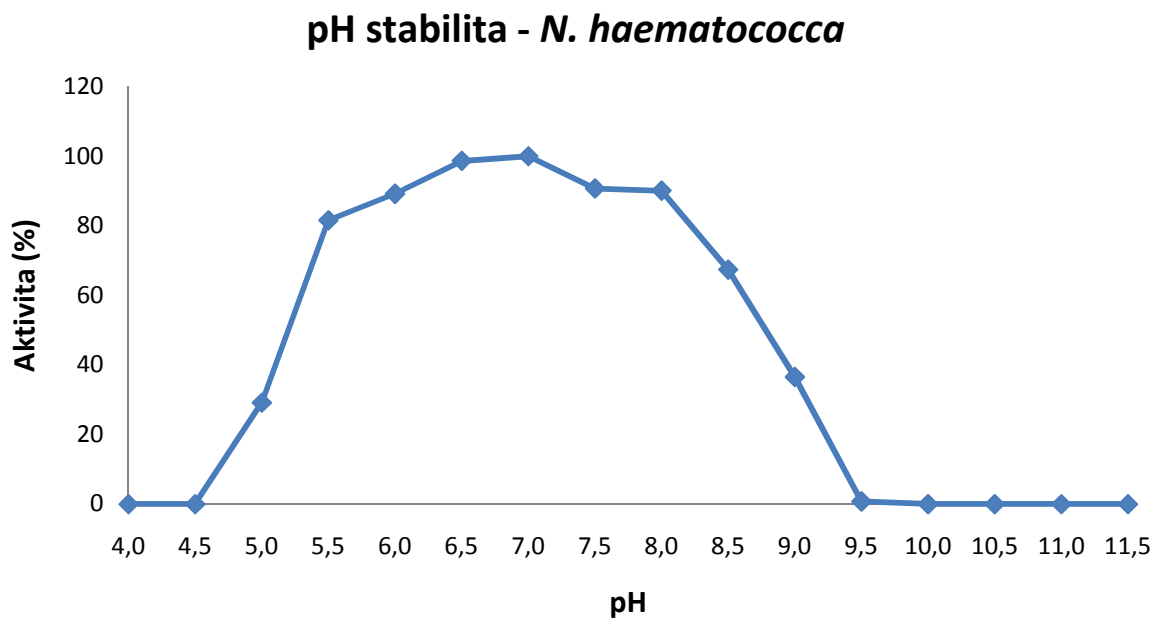
**Obr. 17:** Vliv pH na aktivitu purifikované rekombinantní nitrilasy z *G. moniliformis*



**Obr. 18:** Vliv pH na stabilitu purifikované rekombinantní nitrilasy z *G. moniliformis*



**Obr. 19:** Vliv pH na aktivitu purifikované rekombinantní nitrilasy z *N. haematococca*



**Obr. 20:** Vliv pH na stabilitu purifikované rekombinantní nitrilasy z *N. haematococca*

**Tab. 5:** Srovnání substrátové specifity purifikovaných rekombinantních enzymů

Substrát	Relativní aktivita (%)	
	<i>Gibberella moniliformis</i>	<i>N. haematococca</i>
Benzonitril	100,0	0,1
3-Chlorbenzonitril	32,6	0,1
4-Chlorbenzonitril	10,5	0,3
2-Kyanopyridin	nereaguje	1,9
3-Kyanopyridin	28,2	2,7
4-Kyanopyridin	90,4	7,5
Fenylacetonitril	7,3	100,0
( <i>R,S</i> )-2-Fenylpropionitril	3,5	0,1
( <i>R,S</i> )-Mandelonitril	nereaguje	20,8

**Tab. 6:** Podíl amidu na složení produktů reakcí katalyzovaných purifikovanými rekombinantními enzymy

Substrát	Podíl amidu v reakčním produktu (%)	
	<i>Gibberella moniliformis</i>	<i>N. haematococca</i>
Benzonitril	6,0	0,0
3-Chlorbenzonitril	0,7	0,0
4-Chlorbenzonitril	3,2	0,0
2-Kyanopyridin	nereaguje	11,0
3-Kyanopyridin	0,0	0,0
4-Kyanopyridin	54,3	0,5
Fenylacetonitril	42,2	7,5
( <i>R,S</i> )-2-Fenylpropionitril	37,5	0,0
( <i>R,S</i> )-Mandelonitril	nereaguje	8,5

## Diskuse

Nitrilasy jsou dnes dobře charakterizovanou skupinou enzymů hydrolyzujících nitrily na karboxylové kyseliny. Za určitých okolností může vznikat amid jako vedlejší reakční produkt. Z hlediska preference substrátů se nitrilasy rozdělují na alifatické, aromatické a arylacetonitrilasy. Bakteriálním a v posledních letech také fungálním nitrilasám je věnována řada studií zaměřených na jejich strukturu a funkci, reakční mechanismy, substrátovou specifitu, stabilitu a další vlastnosti [3, 5, 6]. Zájem o tyto enzymy pramení zejména z jejich katalytických vlastností, jež je předurčují k použití v biokatalýze v chemických a farmaceutických výrobcích, popř. k remediaci oblastí kontaminovaných organickými látkami, jež obsahují nitrilové skupiny.

Bakterie obou kmenů *Rhodococcus* a kmene *Nocardia* použité v této studii byly schopné degradovat 3,5-halogenované benzonitrilové herbicidy. Rychlost degradace se u jednotlivých látek výrazně lišila; v případě nesubstituovaného benzonitrilu probíhala reakce o dva řády rychleji. Porovnání specifických aktivit bakterií pro všechny tyto látky nebylo tedy možno provést, protože nebylo možné zachovat stejné reakční podmínky pro všechny substráty. Koncentrace produktů vznikajících ze substituovaných benzonitrilových derivátů byly po 10 minutách reakce příliš nízké pro měření HPLC ve srovnání s benzonitrilem. Podobné výsledky jsou uvedeny též pro purifikovanou nitrilasu z bakterie *Rhodococcus rhodochrous* NCIB 11215, izolát z bromoxynilem ošetřovaných půd (dříve klasifikována jako *Nocardia* sp. [12]). Tento enzym transformoval benzonitril, bromoxynil a ioxynil na příslušné benzoové kyseliny. Pro bromoxynil, resp. ioxynil dosahovala  $V_{\max}$  1,0 a 1,6 % hodnoty  $V_{\max}$  naměřené pro benzonitril. Rovněž hodnoty Michaelisovy konstanty pro bromoxynil (8,18 mM) a ioxynil (11,88 mM) byly řádově vyšší než v případě benzonitrilu (0,62 mM) [12]. V další studii dosahovala aktivita této nitrilasy pro bromoxynil méně než 0,3 % aktivity pro benzonitril [95].

Přesné stanovení aktivity pro benzonitrilové herbicidy rovněž ztěžovala jejich nízká rozpustnost ve vodě (cca 0,47 a 0,13 mM pro bromoxynil, resp. ioxynil).

Pokles rychlosti reakce v pořadí chloroxynil > bromoxynil > ioxynil je pravděpodobně způsoben sterickým i elektronovým efektem (zvětšující se rozměry molekul a klesající záporný indukční efekt substituentů).

Nitrilasa z *R. rhodochrous* PA-34 patří mezi aromatické, jejím preferenčním substrátem je benzonitril (24 U/mg prot.) [91]. Ve specifické aktivitě pro tento substrát se tedy významně liší od výše zmíněné nitrilasy z *R. rhodochrous* NCIMB11215 (1,74 U/mg prot.) [12]. Sekvence aminokyselin nitrilasy z *R. rhodochrous* PA-34 vykazuje vysokou shodu (97,5 %) se sekvencí dobře prostudované nitrilasy z *R. rhodochrous* J1. Tato nitrilasa patří rovněž mezi aromatické; jejími preferovanými substráty jsou benzonitril (15,9 U/mg prot.), 3- a 4-tolunitril, 3- a 4-chlorbenzonitril, 2-furonitril, 2-thiofenkarbonitril a 3-nitrobenzonitril. Nižší aktivita byla pozorována zejména pro 2-substituované aromatické substráty. Autoři u těchto substrátů diskutují možnost sterických zábran, jež přímo ovlivňují rychlost hydrolýzy nitrilové skupiny [62]. Z tohoto důvodu zřejmě nedošlo k hydrolýze dichlobenilu, jež je substituován v pozicích 2 a 6.

S enzymem degradujícím bromoxynil z *Klebsiella pneumoniae* ssp. *ozaenae* se nitrilasa z *R. rhodochrous* PA-34 shoduje pouze z 44%. Substrátová specifita těchto enzymů je také značně odlišná, pro porovnání  $V_{\max}$  nitrilasy z *Klebsielly* jsou pro chloroxynil, bromoxynil a ioxynil 18, 15 a 12,2 U/mg proteinu, avšak na rozdíl od *R. rhodochrous* PA-34 tento enzym nereaguje s benzonitrem.

V případě bakteriálního kmene *Rhodococcus* sp. NDB 1165 byla naměřená aktivita buněk pro benzonitril (1,1 U/mg sušiny) srovnatelná s dříve naměřenými daty (1,17 U/mg sušiny [93]). Tento enzym preferuje převážně aromatické substráty jako 3- a 4-kyanopyridin, benzonitril, ale také akrylonitril [93].

Bakterie *Nocardia globerula* NHB-2 disponuje třemi enzymy schopnými hydratovat či hydrolyzovat nitrilovou skupinu – nitrilhydratasou, amidasou a nitrilasou; produkce jednotlivých enzymů je závislá na druhu induktoru v kultivačním mediu. Nitrilasa byla v původní práci indukována propionitrem a jejími preferenčními substráty byly aromatické a nenasycené alifatické nitrily [37]. Aktivita pro benzonitril byla v původní práci naměřena téměř čtyřikrát vyšší než zde (7,1 vs. 1,9 U/mg sušiny), propionitril je tedy pravděpodobně lepším induktorem nitrilasové aktivity v případě tohoto kmene.

Na základě biodegradačních studií s bakteriálním kmenem *Klebsiella pneumoniae* ssp. *ozaenae* se obecně předpokládalo, že schopnost přímé hydrolýzy benzonitrilových herbicidů bude rozšířena hlavně mezi bakteriemi rodu *Klebsiella*. Z této skupiny bakterií

byl na schopnost degradace benzonitrilových herbicidů detailně studován jen jeden zástupce, tento předpoklad tedy nelze s jistotou potvrdit.

V této práci se potvrdila schopnost degradace těchto herbicidů u náhodně vybraných zástupců rodu *Rhodococcus* a *Nocardia*, což poukazuje na možnost, že tato schopnost je rozšířena mezi půdními aktinobakteriemi. Stejně jako u kmene *Nocardia globerula* NHB-2 je i v případě *R. rhodochrous* PA-34 možné indukovat nitrilhydratasovou aktivitu [96]. Tento enzym je rovněž schopen hydratovat benzonitrilové herbicidy, včetně dichlobenilu. Bakterie produkuje také enzym amidasu, jež je s výjimkou 2,6-dichlorbenzamidů schopna hydrolyzovat příslušné substituované benzamidy na benzoové kyseliny. Tyto reakce byly pozorovány rovněž u bakterie *Rhodococcus erythropolis* A4. Na rozdíl od ostatních zde uvedených bakterií byl v tomto případě nejrychleji hydrolyzovaným substrátem dichlobenil, jež byl amidasou dále hydrolyzován na 2,6-dichlorbenzoovou kyselinu [97].

Půdní bakterie studované v této práci metabolizují bromoxynil na méně toxický metabolit – 3,5-dibrom-4-hydroxybenzoovou kyselinu [98], jež může být dále metabolizován dalšími půdními mikroorganismy. Možnost bioaugmentace bakteriálními kmeny s nitrilasovou aktivitou a následné bioremediace kontaminovaných míst je tedy třeba dále studovat.

Fungální nitrilasy popisované v této práci s benzonitrilovými herbicidy nereagují, jsou však schopny transformovat řadu jiných substrátů.

Substrátové specifity rekombinantních nitrilas z *G. moniliformis* a *N. haematococca* se značně liší. Enzym z *G. moniliformis* jednoznačně preferuje aromatické substráty jako benzonitril, 4-kyanopyridin a 3-chlorbenzonitril, přičemž aktivity pro zmíněné substráty se liší v řádu několika desítek procent. Enzym z *N. haematococca* má vysokou substrátovou specifitu pouze pro fenylacetonitril, s ostatními testovanými substráty s výjimkou mandelonitrilu probíhala reakce o dva až tři řády pomaleji nebo vůbec ne. V tomto se tato nitrilasa shoduje s dalšími purifikovanými a charakterizovanými rekombinantními enzymy (viz **Přílohu 1**) z houby *N. crassa* OR74A, *Aspergillus niger* CBS 513.88 a *Arthroderma benhamiae* CBS 112371 [80, 99 – nepublikované výsledky] a bakteriálními nitrilasami z *Pseudomonas fluorescens* EBC 191 [61, 100, 101] a *Pseudomonas fluorescens* DSM 7155 [102]. Arylacetonitrilasa z *P. fluorescens* DSM 7155 byla schopna hydrolyzovat fenylacetonitril a v menší míře také 2-methoxymandelonitril a 2-fenylpropionitril [102]. Naproti tomu enzymy z *Alcaligenes faecalis* JM3 a ATCC 8750 známé jako

arylacetonitrilasy reagují s vysokou specifitou také s dalšími substráty, pro kmen JM3 jsou to akrylonitril, mandelonitril, *p*-chlorobenzylkyanid, 2-thiofenacetonitril, 3-pyridinacetonitril a 2-fenoxypropionitril, pro kmen ATCC 8750 mandelonitril, *p*-chlorobenzylkyanid, *p*-fluorobenzylkyanid, *p*-nitrobenzylkyanid, *p*-aminobenzylkyanid a *p*-chlorobenzylkyanid [103, 104].

Zmíněné fungální enzymy jsou si navzájem podobné z cca 60 až 70 %, s nitrilasou bakterie *P. fluorescens* sdílejí cca 40 % podobnost. V sekvencích tří fungálních nitrilas (*N. crassa*, *N. haematococca*, *A. benhamiae*) je patrný hexapeptid se dvěma až třemi konzervovanými residui, který aromatickým nitrilasám chybí (viz **Přílohu 1**). Je možné, že tento úsek je zodpovědný za vysokou aktivitu fungálních nitrilas k fenylacetonitrilu a mandelonitrilu [105]. Není však jisté, nakolik je tato vlastnost mezi fungálními nitrilasami rozšířena a zda je arylacetonitrilasová aktivita podmíněna přítomností této sekvence aminokyselin. Již zmíněná rekombinantní nitrilasa z *A. niger* CBS 513.88 má rovněž vysokou aktivitu pro fenylacetonitril a mandelonitril, avšak zmíněný hexapeptid se v její sekvenci nevyskytuje, stejně jako chybí v sekvencích bakteriálních arylacetonitrilas.

Vedle značných rozdílů v substrátové specifitě se enzymy z *G. moniliformis* a *N. haematococca* vzájemně shodují ve schopnosti produkovat amid jako vedlejší produkt reakce. U preferovaného substrátu nitrilasy *G. moniliformis*, benzonitrilu, vzniká 6 % amidu, u 4-kyanopyridinu, fenylacetonitrilu a 2-fenylpropionitrilu tvořil amid 37 – 55 % produktu. Tímto se rekombinantní enzym z *G. moniliformis* značně odlišuje od sekvenčně podobné nitrilasy z *Fusarium solani* O1, jež za optimálních podmínek produkovala méně než 1 % amidu u benzonitrilu a 1 – 3 % amidu u 3- a 4-kyanopyridinu [79]. Procentuálním zastoupením amidu v reakčním produktu se nitrilasa z *G. moniliformis* podobá spíše enzymům z hub *Aspergillus niger* K10 a *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*, jež produkují 10, resp. 4 – 6 % benzamidu. U nitrilasy z *A. niger* K10 pak docházelo u 4-kyanopyridinu k tvorbě 33,8 % amidu, u 3-chlorobenzonitrilu k tvorbě 51,6 % amidu a u 2-kyanopyridinu vznikalo až 84 % amidu [77]. Tato skutečnost se dá přisoudit blízké evoluční příbuznosti enzymu k fungálním kyanidhydratasám, jejichž jediným reakčním produktem při hydrolýze HCN je formamid [106]. U enzymu z *N. haematococca* vznikalo při hydrolýze fenylacetonitrilu a mandelonitrilu přibližně 8 % amidu. To je v porovnání s rekombinantní arylacetonitrilasou z *N. crassa* OR74A cca dvakrát více [80]. Mutant *N. crassa* W168A však při pH 5,5 produkoval až 85 % amidu [107]. Studie rekombinantní arylacetonitrilasy

z *Pseudomonas fluorescens* EBC 191 ukazuje, že poměr kyseliny a amidu v reakčním produktu je ovlivněn jednak elektronovým efektem, jednak absolutní konfigurací substituentu na  $\alpha$ -pozici. Hypotetický mechanismus vzniku amidu předpokládá destabilizaci pozitivního náboje na atomu dusíku v nitrilové skupině, jež je kritický pro interakci s glutamátovým zbytkem katalytické triády Glu-Lys-Cys. Z porovnání různých charakterizovaných nitrilas je také zřejmé, že kromě struktury substrátu je pro mechanismus hydrolyzy nitrilů důležitá také struktura enzymu [79, 108].

Při porovnání pH a teplotních profilů obou enzymů je zřejmé, že nitrilasa z *G. moniliformis* si uchovává aktivitu při širším rozsahu hodnot pH i teploty. Tato vlastnost může souviset se stabilizujícím efektem chaperonu GroEL, se kterým byl enzym purifikován [1]. V odborné literatuře bylo ve spojitosti s nitrilasami a dalšími proteiny popsáno několik podobných případů asociace chaperoninu s purifikovaným proteinem. Nitrilasa z *Pseudomonas fluorescens* DSM 7155 byla purifikována s polypeptidem z 97% podobným chaperoninu CPN60 (GroEL). Autoři studie se domnívají, že CPN60 se zde podílí na agregaci jednotlivých heterodimerů do větších struktur [102]. Dalšími nitrilasami purifikovanými s GroEL jsou enzym z *Bacillus pallidus* Dac521 [109] a fungální nitrilasa z *Aspergillus niger* (purifikace s proteinem hsp60, eukaryotním analogem GroEL) [77].

Obecně chaperoniny napomáhají skládání nově vznikajících proteinů [110]. Chaperoniny GroEL/ES se váží na dosud neposkládané polypeptidy a vytvářejí ochranné prostředí, v němž může proběhnout správné poskládání proteinového řetězce bez interakce s dalšími proteiny [111]. Tato vlastnost GroES/EL vedla k pokusům s ko-expresí enzymů v *E. coli* za účelem získání aktivnějšího enzymu a navýšení podílu rozpustné frakce proteinu. Například ko-exprese nitrilasy z *Comamonas testosteroni* s chaperony GroEL/ES v *E. coli* zvýšila až 5x specifickou aktivitu buněk; rovněž zastoupení rozpustné frakce proteinu vzrostlo z 10 na 58% [112]. Podobný efekt ko-exprese s chaperoniny byl pozorován také při expresi D-karbamoylasy v *E. coli* [113, 114]. Stejně tak v případě zde studovaného rekombinantního enzymu z *G. moniliformis* bylo při ko-expresi s chaperoniny GroEL/ES pozorováno zvýšení specifické aktivity buněk i enzymu a zvýšení podílu rozpustné frakce exprimovaného proteinu [99] (viz **Tab. 7** na následující straně).

**Tab. 7:** Porovnání aktivit buněk a buněčných extraktů *E. coli* exprimujících nitrilasu z *G. moniliformis* (plasmid pOK104) a nitrilasu z *G. moniliformis* společně s chaperoninovým týmem GroEL/ES (plasmid pGro7) [99]

Plasmid	Specifická aktivita (U/l kultury, OD <sub>610</sub> = 1)	Specifická aktivita (U/mg bun. extraktu)	% aktivity v	
			Rozpustné frakci	Ner rozpustné frakci
pOK104	76±7	0,28±0,12	57±3	43±3
pOK104 a pGro7	335±87	0,64±0,03	70±4	30±4

Z hlediska dalšího použití studovaných enzymů má potenciál pro využití v biokatalýze zejména enzym z *N. haematococca* pro svou schopnost hydrolyzovat mandelonitril, průmyslově významnou sloučeninu. Zbývá však zjistit, nakolik je v tomto případě enzym enantioselektivní a zda by se úpravou reakčních podmínek či mutací enzymu dal snížit či zcela odstranit podíl amidu v reakční směsi. Dosud popsané arylacetonitrilasy jsou v různé míře většinou selektivní pro (*R*)-mandelonitril [102, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121]. Lze tedy očekávat, že i v případě enzymu z *N. haematococca* bude vznikat převážně (*R*)-mandlová kyselina. Produkce amidu jako vedlejšího produktu hydrolýzy mandelonitrilu by se teoreticky dala rovněž biokatalyticky využít pokud by bylo možné připravit mutanty, jež produkují výhradně amid.

## Závěr

Bakteriální kmeny *R. rhodochrous* PA-34, *Rhodococcus* sp. NDB 1165 a *Nocardia globberula* NHB-2 studované v této práci byly schopny hydrolyzovat benzonitrilové herbicidy ioxynil, bromoxynil a chlorovaný analog 3,5-dichlor-4-hydroxybenzonitril na příslušné benzoové kyseliny. U žádného z kmenů nebyla pozorována transformace dichlobenilu. Reakce byla katalyzována enzymem nitrilasou, jež byla v bakteriích indukována isobutyronitrilem; vliv nitrilhydratasy a amidasy nebyl potvrzen. Metabolity vzniklé touto reakcí mohou být dále transformovány konsorcií půdních bakterií; biodegradační potenciál rodu *Rhodococcus* a *Nocardia* je tedy třeba dále prostudovat z hlediska možnosti využití v bioremediaci.

Hypotetické nitrilasy z hub *Giberella moniliformis* a *Nectria haematococca* byly exprimovány v bakterii *E. coli* jako funkční enzymy a částečně charakterizovány. Preferovanými substráty enzymu z *G. moniliformis* byly benzonitril, 4- a 3-kyanopyridin a 3-chlobenzonitril, u enzymu z *N. haematococca* to byly fenylacetonitril a mandelonitril. První z enzymů tedy patří mezi aromatické nitrilasy, druhý pak mezi arylalifatické. Z pH a teplotních profilů vyplývá, že nitrilasa z *G. moniliformis* je stabilnější, enzym z *N. haematococca* má však vyšší potenciál pro využití v biotechnologii díky své schopnosti transformovat mandelonitril na kyselinu mandlovou. Při této reakci však vzniká cca 8 % amidu, je tedy třeba zjistit, zda se jeho podíl v reakčním produktu dá snížit optimalizací podmínek reakce nebo mutací enzymu. V případě tohoto substrátu bude předmětem dalšího studia rovněž enantioselektivita enzymu.

## Seznam použité literatury

1. O'Reilly, C., Turner, P.D.: The nitrilase family of CN hydrolysing enzymes - A comparative study. *J. Appl. Microbiol.* 95, 1161-1174 (2003)
2. Thuku, R.N., Brady, D., Benedik, M.J., Sewell, B.T.: Microbial nitrilases: Versatile, spiral forming, industrial enzymes. *J. Appl. Microbiol.* 106, 703-727 (2009)
3. Martínková, L., Vejvoda, V., Kaplan, O., Kubáč, D., Malandra, A., Cantarella, M., Bezouška, K., Křen, V.: Fungal nitrilases as biocatalysts: Recent developments. *Biotechnol. Adv.* 27, 661-670 (2009)
4. Martínková, L., Mylerová, V.: Synthetic applications of nitrile-converting enzymes. *Curr. Org. Chem.* 7, 1279-1295 (2003)
5. Singh, R., Sharma, R., Tewari, N., Geetanjali, Rawat, D.S.: Nitrilase and its application as a 'green' catalyst. *Chem. Biodivers.* 3, 1279-1287 (2006)
6. Martínková, L., Křen, V.: Biotransformations with nitrilases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 14, 130-137 (2010)
7. Roach, P.C.J., Ramsden, D.K., Hughes, J., Williams, P.: Biocatalytic Scrubbing of Gaseous Acrylonitrile Using *Rhodococcus ruber* Immobilized in Synthetic Silicone Polymer (ImmobaSil™) Rings. *Biotechnol. Bioeng.* 85, 450-455 (2004)
8. Holtze, M.S., Sørensen, S.R., Sørensen, J., Aamand, J.: Microbial degradation of the benzonitrile herbicides dichlobenil, bromoxynil and ioxynil in soil and subsurface environments - Insights into degradation pathways, persistent metabolites and involved degrader organisms. *Environ. Pollut.* 154, 155-168 (2008)
9. Cupples, A.M., Sanford, R.A., Sims, G.K.: Dehalogenation of the herbicides bromoxynil (3,5-dibromo-4-hydroxybenzonitrile) and ioxynil (3,5-diiodo-4-hydroxybenzonitrile) by *Desulfitobacterium chlororespirans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3741-3746 (2005)
10. Nielsen, M.K.K., Holtze, M.S., Svensmark, B., Juhler, R.K.: Demonstrating formation of potentially persistent transformation products from the herbicides bromoxynil and ioxynil using liquid chromatography – tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Pest Manag. Sci.* 63, 141-149 (2007)
11. Harper, D.B.: Microbial metabolism of aromatic nitriles. Enzymology of C-N cleavage by *Nocardia* sp. (*Rhodochrous* group) N.C.I.B. 11216. *Biochem. J.* 165, 309-319 (1977)
12. Harper, D.B.: Characterization of a nitrilase from *Nocardia* sp. (*Rhodochrous* group) N.C.I.B. 11215, Using *p*-hydroxybenzonitrile as sole carbon source. *Int. J. Biochem.* 17, 677-683 (1985)

13. Amber, R.P., Auffret, A.D., Clarke, P.H.: The amino acid sequence of the aliphatic amidase from *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett.* 215, 285-290 (1987)
14. Novo, C., Tata, R., Clemente, A., Brown, P.R.: *Pseudomonas aeruginosa* aliphatic amidase is related to the nitrilase/cyanide hydratase enzyme family and Cys166 is predicted to be the active site nucleophile of the catalytic mechanism. *FEBS Lett.* 367, 275-279 (1995)
15. Robertson, D.E., Chaplin, J.A., DeSantis, G., Podar, M., Madden, M., Chi, E., Richardson, T., Milan, A., Miller, M., Weiner, D.P., Wong, K., McQuaid, J., Farwell, B., Preston, L.A., Tan, X., Snead, M.A., Keller, M., Mathur, E., Kretz, P.L., Burk, M.J., Short, M.J.: Exploring Nitrilase Sequence Space for Enantioselective Catalysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2429-2436 (2004)
16. Brenner, C.: Catalysis in the nitrilase superfamily. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12, 775-782 (2002)
17. Pace, H.C., Brenner, C.: The nitrilase superfamily: Classification, structure and function. *Genome Biol* 2, 1.1.-1.9. (2001)
18. Prasad, S., Bhalla, T.C.: Nitrile hydratases (NHases): At the interface of academia and industry. *Biotechnol. Adv.* 28, 725-741 (2010)
19. Asano, Y., Tani, Y., Yamada, H.: A new enzyme "nitrile hydratase" which degrades acetonitrile in combination with amidase. *Agric. Biol. Chem.* 44, 2251-2252 (1980)
20. Banerjee, A., Sharma, R., Banerjee, U.C.: The nitrile-degrading enzymes: current status and future prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60, 33-44 (2002)
21. Kobayashi, M., Shimizu, S.: Nitrile Hydrolases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4, 95-102 (2000)
22. Kobayashi, M., Nagasawa, T., Yamada, H.: Enzymatic synthesis of acrylamide: a success story not yet over. *Trends Biotechnol.* 10, 402-408 (1992)
23. Yamada, H., Kobayashi, M.: Nitrile hydratase and its application to industrial production of acrylamide. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60, 1391-1400 (1996)
24. Kobayashi, M., Shimizu, S.: Metalloenzyme nitrile hydratase: structure, regulation and application to biotechnology, *Nat. Biotechnol.* 16, 733-736 (1998)
25. Maier-Greiner, U.H., Obermaier-Skobranek, B.M.M., Estermaier, L.M., Kammerloher, W., Freund, C., Wülfing, C., Burkert, U.I., Matern, D.H., Breuer, M., Eulitz, M., Küfrevioglu, Ö.I., Hartmann G.R.: Isolation and properties of a nitrile hydratase from the soil fungus *Myrothecium verrucaria* that is highly specific for the fertilizer cyanamide and cloning of its gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 4260-4264 (1991)

26. Sugiura, Y., Kuwahara, J., Nagasawa, T., Yamada, H.: Nitrile hydratase: the first non-heme iron enzyme with a typical low spin Fe(III) active centre. *J. Am. Chem. Soc.* 109, 5848-5850 (1987)
27. Tsujimura, M., Dohmae, N., Odaka, M., Chijimatsu, M., Takio, K., Yohda, M., Hoshino, M., Nagashima, S., Endo, I.: Structure of the photoreactive iron center of the nitrile hydratase from *Rhodococcus* sp. N-771: evidence of a novel post-translational modification in the cysteine ligand. *J. Biol. Chem.* 272, 29454-29459 (1997)
28. Tsujimura, M., Odaka, M., Nagashima, S., Yohda, M., Endo, I.: Photoreactive nitrile hydratase: The photoreaction site is located on the  $\alpha$  subunit. *J. Biol. Chem.* 119, 407-413 (1996)
29. Endo, I., Odaka, M., Yohda, M.: An enzyme controlled by light: the molecular mechanism of photoreactivity in nitrile hydratase. *Trends Biotechnol.* 17, 244-248 (1999)
30. Komeda, H., Kobayashi, M., Shimizu, S.: A novel gene cluster including the *Rhodococcus rhodochrous* J1 nhlBA genes encoding a low molecular mass nitrile hydratase (L-NHase) induced by its reaction product. *J. Biol. Chem.* 271, 15796-15802 (1996)
31. Nagasawa, T., Takeuchi, K., Yamada, H.: Characterization of a new cobalt containing nitrile hydratase purified from urea induced cells of *R. rhodochrous* J1. *Eur. J. Biochem.* 196, 581-589 (1991)
32. Payne, M., Wu, S., Fallon, R., Tudor, G., Turner, I., Steglitz, B., Nelson, M.: A stereoselective cobalt containing nitrile hydratase. *Biochemistry* 36, 5447-5454 (1997)
33. Fournand, D., Arnaud, A.: Aliphatic and enantioselective amidases: from hydrolysis to acyl transfer activity. *J. Appl. Microbiol.* 91, 381-393 (2001)
34. Asano, Y., Tachibana, M, Tani, Y., Yamada, Y.: Purification and characterization of amidase which participates in nitrile degradation. 46, 1175-1181 (1982)
35. Hirrlinger, B., Stolz, A., Knackmuss, H.: Purification and characterization of an amidase from *Rhodococcus erythropolis* MP 50 which enantioselectively hydrolyzes 2-arylpropionamides. *J. Bacteriol.* 178, 3501-3507 (1996)
36. Stelkes-Ritter, U., Wyzgol, K., Kula, M.: Purification and characterization of a newly screened microbial peptide amidase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44, 393-398 (1995)
37. Bhalla, T.C., Kumar, H.: *Nocardia globerula* NHB-2: a versatile nitrile-degrading organism. *Can. J. Microbiol.* 51, 705-708 (2005)
38. Kieny-L'Homme, M., Arnaud, A., Glazy, P.: Elude d'une L- $\alpha$ -aminoamidase particulaire de *Brevibacterium* sp. en vue de l'obtention d'acids alfa-amines optiquement actifs. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 27, 307-311 (1981)

39. Mayaux, J., Cerbelaud, E., Soubrier, F., Faucher, D., Petre, D.: Purification, cloning, and primary structure of an enantiomer selective amidase from *Brevibacterium* sp. R312: structural evidence for genetic coupling with nitrile hydratase. *J. Bacteriol.* 172, 6764-6773 (1990)
40. Moreau, J.L., Bernet, N., arnaud, A., Glazy, P.: Isolation of *Brevibacterium* sp. R312 mutant potentially useful for the enzymatic production of adipic acid. *Can. J. Microbiol.* 39, 524-528 (1993)
41. Kobayashi, M., Fujiwara, Y., Goda, M., Komeda, H., Shimizu, S.: Identification of active sites in amidase: Evolutionary relationship between amide bond- and peptide bond-cleaving enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 11986-11991 (1997)
42. Nawaz, M., Khan, A., Bhattacharya, D., Sittoneu, P., Cerniglia, C.: Physical, biochemical, and immunological characterization of a thermostable amidase from *Klebsiella pneumoniae* NCTR 1. *J. Bacteriol.* 178, 2397-2401 (1996)
43. Kobayashi, M., Goda, M., Shimizu, S.: The catalytic mechanism of amidase also involves nitrile hydrolysis. *FEBS Lett.* 439, 325-328 (1998)
44. Maestracci, M., Thiéry, A., Arnaud, A., Glazy, P.: A study of the mechanism of the reactions catalyzed by the amidase from *Brevibacterium* sp. R312. *Agric. Biol. Chem.* 50, 2237-2241(1986)
45. Fournand, D., Bigey, F., Ratomahenina, R., Arnaud, A., Galzy, P.: Acyl transfer activity of an amidase from *Rhodococcus* sp. R312: Formation of a wide range of hydroxamic acids, *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2844-2852 (1998)
46. Thimann, K., Mahadevan, S.: Nitrilase II, its substrate specificity and possible mode of action. *Arch. Biochem. Biophys.* 107, 62-68 (1964)
47. Hook, R.H., Robinson, W.G.: Ricinine Nitrilase II. Purification and Properties. *J. Biol. Chem.* 239, 4263-4267 (1964)
48. Vejvoda, V., Kaplan, O., Bezouška, K., Pompach, P., Šulc, M., Cantarella, M., Benada, O., Uhnáková, B., Rinágelová, A., Lutz-Wahl, S., Fischer, L., Křen, V., Martínková, L.: Purification and characterization of a nitrilase from *Fusarium Solani* O1. *J. Mol. Catal., B Enzym.* 50, 99-106 (2008)
49. Goldhust, A., Bohak, Z.: Induction, purification and characterization of the nitrilase of *Fusarium oxysporum*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 11, 581-601 (1989)
50. Kobayashi, M., Shimizu, S.: Versatile nitrilases: Nitrile-hydrolysing enzymes. *FEMS Microbiol. Lett.* 120, 217-224 (1994)
51. Mukherjee, R., Chatterjee, A.: Structure and synthesis of nudiflorine: A new pyridine alkaloid. *Tetrahedron* 22, 1461-1466 (1966)

52. Harper, D.B.: Fungal degradation of aromatic nitriles. Enzymology of C-N cleavage by *Fusarium solani*. *Biochem. J.* 167, 685-692 (1977)
53. Kobayashi, M., Yanaka, N., Nagasawa, T., Yamada, H.: Primary structure of an aliphatic nitrile-degrading enzyme, aliphatic nitrilase, from *Rhodococcus rhodochrous* K22 and expression of its gene and identification of its active site residue. *Biochemistry* 31, 9000-9007 (1992)
54. Pace, H.C., Hodawakear, S.C., Draganescu, A., Huang, J., Bieganowski, P., Pekarsky, Y., Croce, C.M., Brenner, C.: Crystal structure of the worm NitFhit Rosseta stone protein reveals a Nit tetramer binding two Fhit dimers. *Curr. Biol.* 10, 907-917 (2000)
55. Nakai, T., Hasegawa, T., Yamashita, E., Yamamoto, M., Kumasaka, T., Ueki, T., Nanba, H., Ikenaka, Y., Takahashi, S., Sato, M., Tsukihara, T.: Crystal structure of *N*-carbamyl-amino acid amidohydrolase with a novel catalytic framework common to amidohydrolases. *Structure* 8, 729-738 (2000)
56. Stevenson, D., Feng, R., Dumas, F., Groleau, D., Mihot, A., Storer, A.: Mechanistic and structural studies on *Rhodococcus* ATCC 39484 nitrilase. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 15, 283-302 (1992)
57. Kobayashi, M., Goda, M., Shimizu, S.: Nitrilase catalyzes amide hydrolysis as well as nitrile hydrolysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253, 662-666 (1998)
58. Effenberger, F., Oßwald, S.: Enantioselective hydrolysis of (*RS*)-2-fluoroarylacetonitriles using nitrilase from *Arabidopsis thaliana*. *Tetrahedron: Asymmetry* 12, 279-285 (2001)
59. Oßwald, S., Wajant, H., Efenberger, F.: Characterization and synthetic applications of recombinant AtNIT1 from *Arabidopsis thaliana*. *Eur. J. Biochem.* 269, 680-687 (2002)
60. Piotrowski, M., Schönfelder, S., Weiler, W.E.: The *Arabidopsis thaliana* isogene NIT4 and its orthologs in tobacco encode  $\beta$ -cyano-L-alanine hydratase/nitrilase. *J. Biol. Chem.* 276, 2616-2621 (2001)
61. Kiziak, C., Conradt, D., Stolz, A., Mattes, R., Klein, J.: Nitrilase from *Pseudomonas fluorescens* EBC191: cloning and heterologous expression of the gene and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Microbiology* 151, 3639-3648 (2005)
62. Kobayashi, M., Nagasawa, T., Yamada, H.: Nitrilase of *Rhodococcus rhodochrous* J1: Purification and characterization. *Eur. J. Biochem.* 182, 349-356 (1989)
63. Nagasawa, T., Kobayashi, M., Yamada, H.: Optimum culture conditions for the production of benzonitrilase by *Rhodococcus rhodochrous* J1. *Arch. Microbiol.* 150, 89-94 (1988)

64. Nagasawa, T., Nakamura, T., Yamada, H.:  $\epsilon$ -Caprolactam, a new powerful inducer for the formation of *Rhodococcus rhodochrous* J1 nitrilase. *Arch. Microbiol.* 155, 13-17 (1990)
65. Kobayashi, M., Komeda, H., Yanaka, N., Nagasawa, T., Yamada, H.: Nitrilase from *Rhodococcus rhodochrous* J1: Sequencing and overexpression of the gene and identification of an essential cysteine residue. *J. Biol. Chem.* 267, 20746-20751 (1992)
66. Kobayashi, M., Yanaka, N., Nagasawa, T., Yamada, H.: Purification and characterization of a novel nitrilase of *Rhodococcus rhodochrous* K22 that acts on aliphatic nitriles. *J. Bacteriol.* 172, 4807-4815 (1990)
67. Heinemann, U., Engels, D., Bürger, S., Kiziak, C., Mattes, R., Stolz, A.: Cloning of a nitrilase gene from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803 and heterologous expression and characterization of the encoded protein. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4359-4366 (2003)
68. Nagasawa, T., Mauger, J., Yamada, H.: Novel nitrilase, arylacetonitrilase, of *Alcaligenes faecalis* JM3, purification and characterization. *Biochemistry* 194, 765-772 (1990)
69. Zhang, Z.-J., Pan, J., Liu, J.-F., Xu, J.-H., He, Y.-C., Liu, Y.-Y.: Significant enhancement of (R)-mandelic acid production by relieving substrate inhibition of recombinant nitrilase in toluene-water biphasic system. *J. Biotechnol.* 152, 24-29 (2011)
70. Zhu, D., Murkherjee, C., Biehl, E.R., Hua, L.: Discovery of a mandelonitrile hydrolase from *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 by rational genome mining. *J. Biotechnol.* 129, 645-650 (2007)
71. Zhu, D., Murkherjee, C., Yang, Y., Rios, B.E., Gallagher, D.T., Smith, N.N., Biehl, E.R., Hua, L.: A new nitrilase from *Bradyrhizopium japonicum* USDA 110: Gene cloning, biochemical characterization and substrate specificity. *J. Biotechnol.* 133, 327-333 (2008)
72. Strobel G.A.: The fixation of hydrocyanic acid by a psychrophilic basidiomycete. *J. Biol. Chem.* 241, 2618-21 (1966)
73. Strobel G.A.: 4-Amino-4-cyanobutyric acid as an intermediate in glutamate synthesis. *J. Biol. Chem.* 242, 3265-9 (1967)
74. Goldlust, A., Bohak, Z.: Induction, purification, and characterization of the nitrilase of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 11, 581-601 (1989)
75. Kaplan, O., Nikolaou, K., Pišvejcová, A., Martínková, L.: Hydrolysis of nitriles and amides by filamentous fungi. *Enzyme. Microb. Technol.* 38, 260-4 (2006)

76. Vejvoda, V., Kubáč, D., Davidová, A., Kaplan, O., Šulc, M., Šveda, O., Chaloupková, R., Martínková Ludmila, L.: Purification and characterization of nitrilase from *Fusarium solani* IMI196840. *Process. Biochem.* 45, 1115-1120 (2010)
77. Kaplan, O., Vejvoda, V., Plíhal, O., Pompach, P., Kavan, D., Bojarová, P., Bezouška, K., Macková, M., Cantarella, M., Jirků, V., Křen, V., Martínková, L.: Purification and characterization of a nitrilase from *Aspergillus niger* K10. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73, 567–75 (2006)
78. Kaplan, O., Vejvoda, V., Charvátová-Pišvejcová, A., Martínková, L.: Hyperinduction of nitrilases in filamentous fungi. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33, 891–6 (2006)
79. Vejvoda, V., Kaplan, O., Bezouška, K., Pompach, P., Šulc, M., Cantarella, M., Benada, O., Uhnáková, B., Rinágelová, A., Lutz-Wahl, S., Fischer, L., Křen, V., Martínková L.: Purification and characterization of a nitrilase from *Fusarium solani* O1. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 50, 99-106 (2008)
80. Kaplan, O., Bezouška, K., Malandra, A., Veselá, A.B., Petříčková, A., Felsberg, J., Rinágelová, A., Křen, V., Martínková, L.: Genome mining for the discovery of new nitrilases in filamentous fungi. *Biotechnol. Lett.* 33, 309-312 (2011)
81. Sosedov, O., Matzer, K., Bürger, S., Kiziak, C., Baum, S., Altenbuchner, J., Chmura, A., Van Rantwijk, F., Stolz, A.: Construction of Recombinant *Escherichia coli* catalysts which simultaneously express an (S)-oxynitrilase and different nitrilase variants for the synthesis of (S)-mandelic acid and (S)-mandelic amide from benzaldehyde and cyanide. *Adv. Synth. Catal.* 351, 1531-1538 (2009)
82. Panova, A., Mersinger, L.J., Liu, Q., Foo, T., Roe, D.C., Spillan, W.L., Sigmund, A.E., Ben-Bassat, A., Wagner, L.W., O'Keefe, D.P., Wu, S., Petrillo, K.L., Payne, M.S., Breske, S.T., Gallagher, F.G., DiCosimo, R.: Chemoenzymatic synthesis of glycolic acid. *Adv. Synth. Catal.* 349, 1462-1474 (2007)
83. Baxter, J., Garton, N.J., Cummings, S.P.: The impact of acrylonitrile and bioaugmentation on the biodegradation activity and bacterial community structure of a topsoil. *Folia Microbiol.* 51, 591-597 (2006)
84. Holtze, M.S., Sørensen, J., Hansen, H.C.B., Aamand, J.: Transformation of the herbicide 2,6-dichlorobenzonitrile to the persistent metabolite 2,6-dichlorobenzamide (BAM) by soil bacteria known to harbour nitrile hydratase or nitrilase. *Biodegradation* 17, 503-510 (2006)
85. Simonsen, A., Holtze, M.S., Sørensen, S.J., Aamand, J.: Mineralisation of 2,6-dichlorobenzamide (BAM) in dichlobenil-exposed soils and isolation of a BAM-mineralising *Aminobacter* sp. *Environ. Pollut.* 144, 289-295 (2006)

86. Sørensen, S.R., Holtze, M.S., Simonsen, A., Aamand, J.: Degradation and mineralization of nano-molar concentrations of the herbicide dichlobenil and its persistent metabolite 2,6-dichlorobenzamide by *Aminobacter* spp. Isolated from dichlobenil-treated soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 399-406 (2007)
87. Stalker, D.M., McBride, K.E.: Cloning and expression in *Escherichia coli* of a *Klebsiella ozaenae* plasmid-borne gene encoding a nitrilase specific for the herbicide bromoxynil. *J. Bacteriol.* 169, 955-960 (1987)
88. Stalker, D., Malyj, L., McBride, K.E.: Purification and properties of a nitrilase specific for the herbicide bromoxynil and corresponding nucleotide sequence analysis of the *bxn* gene. *J. Biol. Chem.* 263, 6310-6314 (1988)
89. Stalker, D., McBride K.E., Malyj, L.: Herbicide resistance in transgenic plants expressing a bacterial detoxification gene. *Science* 242, 419-423 (1988)
90. Hsu, J.C., Camper, N.D.: Degradation of ioxynil by soil fungus, *Fusarium Solani*. *Soil. Biol. Biochem.* 11, 19-22 (1979)
91. Bhalla, T., Miura, A., Wakamoto, A., Ohba, Y., Furuhashi, K.: Asymmetric hydrolysis of alpha aminonitriles to optically active amino acids by a nitrilase of *Rhodococcus rhodochrous* PA-34. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37, 184-190 (1992)
92. Sankhian, U.D., Kumar, H., Chand, D., Kumar, D., Bhalla, T.C.: Nitrile hydratase of *Rhodococcus rhodochrous* NHB-2: optimisation of conditions for production of enzyme and conversion of acrylonitrile to acrylamide. *Asian J. Microbiol. Biotechnol. Environ. Sci.* 5, 217-223 (2003)
93. Prasad, S., Misra, A., Jangir, V.P., Awasthi, A., Raj, J., Bhalla, T.C.: A propionitrile-induced nitrilase of *Rhodococcus* sp. NDB 1165 and its application in nicotinic acid synthesis. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 345-353 (2007)
94. Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254 (1976)
95. McBride, K.E., Kenny, J.W., Stalker, D.M.: Metabolism of the herbicide bromoxynil by *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 325-330 (1986)
96. Prasad, S., Raj, J., Bhalla, T.C.: Optimisation of culture conditions for hyper production of nitrile hydratase by *Rhodococcus rhodochrous* PA-34. *Indian J. Microbiol.* 44, 251-256 (2004)
97. Veselá, A.B., Pelantová, H., Šulc, M., Macková, M., Lovecká, P., Thimová, M., Bhalla, T.C., Martínková, L.: Biotransformation of benzonitrile herbicides via the nitrile hydratase-amidase pathway in rhodococci. (Publikace v přípravě)

98. Veselá, A.B., Franc, M., Pelantová, H., Kubáč, D., Vejvoda, V., Šulc, M., Bhalla, T.C., Macková, M., Lovecká, P., Janů, P., Demnerová, K., Martínková, L.: Hydrolysis of benzonitrile herbicides by soil actinobacteria and metabolite toxicity. *Biodegradation* 21, 761-770 (2010)
99. Petříčková, A., Veselá, A.B., Kaplan, O., Kubáč, D., Uhnáková, B., Malandra, A., Felsberg, J., Rinágelová, A., Weyrauch, P., Křen, V., Bezouška, K., Martinkova, L.: Purification and characterization of heterologously expressed nitrilases from filamentous fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (Publikace v přípravě)
100. Kiziak, C., Klein, J., Stolz, A.: Influence of different carboxy-terminal mutations on the substrate-, reaction- and enantiospecificity of the arylacetonitrilase from *Pseudomonas fluorescens* EBC191. *Protein Eng. Des. Sel.* 20, 385-396 (2007)
101. Kiziak, C., Stolz, A.: Identification of amino acid residues responsible for the enantioselectivity and amide formation capacity of the arylacetonitrilase from *Pseudomonas fluorescens* EBC191. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 5592-5599 (2009)
102. Layh, N., Parratt, J., Willetts, A.: Characterization and partial purification of an enantioselective arylacetonitrilase from *Pseudomonas fluorescens* DSM 7155. *J. Mol. Catal., B Enzym.* 5, 467-474 (1998)
103. Nagasawa, T., Mauger, J., Yamada, H.: A novel nitrilase, arylacetonitrilase, of *Alcaligenes faecalis* JM3. Purification and characterization. *Eur. J. Biochem.* 194, 765-772 (1990)
104. Yamamoto, K., Fujimatsu, I., Komatsu, K.: Purification and characterization of the nitrilase from *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750 responsible for enantioselective hydrolysis of mandelonitrile. *J. Ferment. Bioeng.* 73, 425-430 (1992)
105. Stolz, A.: Osobní sdělení
106. Kaplan, O., Bezouška, K., Plíhal, O., Etrich, R., Kulik, N., Vaněk, O., Kavan, D., Benada, O., Malandra, A., Šveda, O., Veselá, A.B., Rinágelová, A., Slámová, K., Cantarella, M., Felsberg, J., Dušková, J., Dohnálek, J., Kotik, M., Křen, V., Martínková, L.: Heterologous expression, purification and characterization of nitrilase from *Aspergillus niger* K10. *BMC Biotechnol.* 11, 2 (2011)
107. Petříčková, A., Sosedov, O., Veselá, A.B., Rinágelová, A., Křen, V., Bezouška, K., Stolz, A., Martínková, L.: Influence of point mutations near the active site on catalytic properties of fungal arylacetonitrilases from *Aspergillus niger* and *Neurospora crassa*. (Publikace v přípravě)
108. Fernandes, B.C.M., Mateo, C., Kiziak, C., Chmura, A., Wacker, J., Van Rantwijk, F., Stolz, A., Sheldon, R.A.: Nitrile hydratase activity of a recombinant nitrilase. *Adv. Synth. Catal.* 348, 2597-2603 (2006)

109. Almatawah, Q.A., Cramp, R., Cowan, D.A.: Characterization of an inducible nitrilase from a thermophilic bacillus. *Extremophiles* 3, 283-291 (1999)
110. Sabate, R., De Groot, N.S., Ventura, S.: Protein folding and aggregation in bacteria. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 2695-2715 (2010)
111. Lund, P.A.: Multiple chaperonins in bacteria - Why so many?: Review article. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 785-800 (2009)
112. Lévy-Schil, S.: Aliphatic nitrilase from a soil-isolated *Comamonas testosteroni* sp.: Gene cloning and overexpression, purification and primary structure. *Gene* 161, 15-20 (1995)
113. Chao, Y.-P., Chiang, C.-J., Lo, T.-E., Fu, H.: Overproduction of D-hydantoinase and carbamoylase in a soluble form in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54, 348-353 (2000)
114. Sareen, D., Sharma, R., Vohra, R.M.: Chaperone-assisted overexpression of an active D-carbamoylase from *Agrobacterium tumefaciens* AM 10. *Protein Expr. Purif.* 23, 374-379 (2001)
115. Kiziak, C., Stolz, A.: Identification of amino acid residues responsible for the enantioselectivity and amide formation capacity of the arylacetone nitrilase from *Pseudomonas fluorescens* EBC191. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 5592-5599 (2009)
116. Banerjee, A., Dubey, S., Kaul, P., Barse, B., Piotrowski, M., Banerjee, U.C.: Enantioselective nitrilase from *Pseudomonas putida*: Cloning, heterologous expression, and bioreactor studies. *Mol. Biotechnol.* 41, 35-41 (2009)
117. Yamamoto, K., Oishi, K., Fujimatsu, I., Komatsu, K.-I.: Production of R-(-)-mandelic acid from mandelonitrile by *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 3028-3032 (1991)
118. Han, S., Chen, P., Lin, G., Huang, H., Li, Z.: (R)-Oxynitrilase-catalyzed hydrocyanation: The first synthesis of optically active fluorinated mandelonitriles. *Tetrahedron Asymmetry* 12, 843-846 (2001)
119. Kaul, P., Banerjee, A., Mayilraj, S., Banerjee, U.C.: Screening for enantioselective nitrilases: Kinetic resolution of racemic mandelonitrile to (R)-(-)-mandelic acid by new bacterial isolates. *Tetrahedron Asymmetry* 15, 207-211 (2004)
120. He, Y.-C., Zhang, Z.-J., Xu, J.-H., Liu, Y.-Y.: Biocatalytic synthesis of (R)-(2)-mandelic acid from racemic mandelonitrile by cetyltrimethylammonium bromide permeabilized cells of *Alcaligenes faecalis* ECU0401. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37, 741-750 (2010)

121. Xue, Y.-P., Xu, S.-Z., Liu, Z.-Q., Zheng, Y.-G., Shen, Y.-C.: Enantioselective biocatalytic hydrolysis of (R,S)-mandelonitrile for production of (R)-(-)-mandelic acid by a newly isolated mutant strain. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38, 337-345 (2011)

# Příloha 1

Porovnání sekvencí nitrilas kmenů *Neurospora crassa* OR74A, *Nectria haematococca* mpVI 77-13-4, *Arthroderma benhamiae* CBS 112371, *Aspergillus niger* CBS 513.88, *Gibberella moniliformis* a *Aspergillus niger* K10 pomocí webového nástroje ClustalW2: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/> (Katalyticky aktivní residua vyznačena žlutě).

NeCra	---MATTIKVAVTQAEPIWLDLQASIQKAVSLVHEAASNGAKIVAFSE	57
NecHa	---MACPIRVAVTQAEFVYLDLAASVKKACGLIAEAAQNGAKLVAFSE	57
ArtBen	--MSGPALKVAITQAQPKWLDLQAGSVEKTVNLIAEAAKGDARLVAFPE	58
AsNigCBS	-MTASTKVRVAVTQHEFVWLDLHATVDKTCRLIAEAAAGNAGLITTFPE	59
GiMon	---MSKSLKVAIQAEFVWNDLQGGVKNKSIQLIQEAAKEGANVIGYPE	57
AsNigK10	MAPVLKKYKAAAVNAEPGWFNLEESVRRTIHWIDEAGKAGCKFIAPPE	60
:.*	: :* : :* : *	
NeCra	RP--VDPALNTKYAYNSLTANSPEMELQQAAKEDSIAVVIGFSERSSSGSLYIGQAIIS	115
NecHa	RP--VDFELQTRYIYNSLPIESEAMELVKATAKEHSIAVALGFSEQSPSHSIYISQAIIS	115
ArtBen	RP--VDPIINTKYIQNSLSVNSAEMNTIKSAAKENNIAVVLGFVEAIDTHSVYIAQAIIS	116
AsNigCBS	RP--VDMGLFTTYLKNLSYDSEHMRRICNAAAQHKITVVLGLSER-DGNLSYIGQCTID	116
GiMon	NSPTENAPWINNEYFKNSMEKESPEMDQIRAAVREAGVFVVLGYSER-YRGTLYIAQSFID	116
AsNigK10	VNYQESLPLLLKKYRENSLPSDSEMRIRNAARANKIYVSLGYSEV-DLASLYTTQVMIS	119
.	. * ** : * * : . : * * * : * * *	
NeCra	PQGEVALQRRKIKPPTHMERTIFGDGSGPDLNCVAELDFGSELGSIKVGTLNCWEHAQPLL	175
NecHa	PQGEVVMHRRKIKPPTHMERTLFGDGSADLNNVVEVDFGAEHCKIKVGCFAWEHTQPLL	175
ArtBen	PKGELLMHRRKIKPPTHMERTVFGDGSDDLNVADVDFGSDIGVVKVGTLACWEHALPLL	176
AsNigCBS	STGKIVMRRRKMKPTHMERTVFGESSGRSLNVDLPIG-----KVGALACWEHIQPLL	170
GiMon	ETGTIVLHRRKIKPTHVERAIYGDGQGESLTVADTKFG-----RVAGLNCWEHTQTLL	170
AsNigK10	PSGDILNHRRKIRATHVERLVFGDGTGDTTESVIQTDIG-----RVGHLNCWENMNPFM	173
*	: :***:..**:* :*:.. * * : : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
NeCra	KFHEIQQGVVIHIAMWPPIDPYPGVEFPGPGLWSMTADG-CQNLSQTFAVESGAFVLHCTAV	234
NecHa	KYHSISQGEAIIHISMWPPIDPSAGVDHPGLWSMTADG-CQNLSQTYAIESTAYVLHSTSV	234
ArtBen	KYHTYSQKEAIIHIAMWPPIDPHPGVDAPALWMSAEG-CQNLSQTHAIEGGAYVLHCTAV	235
AsNigCBS	KYHTMIQGEIHSVSAWPVLHHPHMGES--LWGMSEQE-GTGASQVYALESASFVLLTTAV	227
GiMon	RYEYXQDVIDHVSWSWPSIFPQNVPPEW--YHITPEC-CKAFSHVVSMEGACFVLLASQI	227
AsNigK10	KAYAASLGEQVHVAAWPLYPKETLKYDPDFTNVAEANADLVTPAYAIETGTYTLPWQT	233
:	: : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
NeCra	CNESGIEAMDTRNGMVFREPGG-GHSCVIGPDGRRLTQPLAD-KPSAEGIVYADLDLTRV	292
NecHa	CTQKGIETLKTQDGLSCRQPGG-GHSCVIGPDGRRLTAPLGDGSPDAEGIVYADLDLTKV	293
ArtBen	CNEEGIEGMKTKGGLLFQEPGG-GHSAIAPDGRRLTKPLADGNPAAEGIVYADLDMARV	294
AsNigCBS	LGPTCVKMNLSP--PWDTLGG-GASAVIAPDGRRLTEPLPA---NEEGFVYADLDLDMI	281
GiMon	MTEENHKKANVDGYDYTKKSGG-GFSMIFSPFGEELVKPLAP---NEEGILYADINLEEK	283
AsNigK10	ITAEGIKLNTPPGKDLEDPHIYNGHGRIFGPDGQNLVPHPKD---DFEGLLFVDIDLDEC	290
:	* . : * * . * . * * : * : * : * : * : * : * : * : *	
NeCra	VTNKSFDIVGHYSRPDLLWLSYDKEKKDAAVHRN-----	327
NecHa	VATRGFLDIVGHYSRPDLLWLGVDREQKENIIAKQHKAQEAVQG-----	339
ArtBen	VMNKGFDIVGHYSRPDLLWLGVDKAQKGCVPKREPEQDV-----	335
AsNigCBS	LTCRHFDVACGHYSRPDLLWLGVDTRKQHRPEGQADNAAYGLDVPSPGLVEEEGA----	337
GiMon	YKAKQNLDIVGHYSRPDQLSLRVNKHAAKPVFFANDL-----	320
AsNigK10	HLKSLADFGGHYMRPDLIRLLVDTNRKDLVVREDRVNGGVEYTRTVDRVGLSTPLDIAN	350
:	: * * * * * : * :	
NeCra	-----	
NecHa	-----	
ArtBen	-----	
AsNigCBS	-----	
GiMon	-----	
AsNigK10	TVDSEN 356	

## Příloha 2

Sekvence nukleotidů genu nitrilasy z *G. moniliformis* s upravenou frekvencí kodonů pro expresi v *E. coli*.

```
ATGAGCAAAAAGCCTGAAAGTTGCAGCAATTCAGGCAGAACCGGTTTGGGAATGATCTGCAGG
GTGGTGTGAATAAAAAGCATTGGCCTGATTCAGGAAGCAGCAAAAAGAAGGCGCAAACGTCAT
TGGTTATCCGGAAGTTTTTATTCCGGGTTATCCGTGGAGCATTTGGGCAAATAGCCCGACC
GAAAATGCACCGTGGATTAATGAATATTTTAAAAATAGCATGGAAAAAGAATCTCCGGAAA
TGGATCAGATTCGTGCAGCAGTTCGTGAAGCAGGTGTTTTTGTGTTCTGGGTATAGCGA
ACGTTATCGTGGCACCCTGTATATTGCACAGAGCTTTATTGATGAAACCGGCACCATTGTT
CTGCATCGTCGCAAAATTAACCGACCCATGTTGAACGTGCAATTTATGGTGATGGTCAGG
GCGAAAGCCTGACCAATGTTGCCGATACCAAATTCGGTCGTGTTGCAGGTCTGAATTGTTG
GGAACATAACCAGACCCTGCTGCGCTATTATGAATATAGCCAGGATGTGGATATTCATGTT
TCTAGCTGGCCGAGCATTTTTCCGCAGAATGTTCCGGAATGGCCGTATCACATTACACCGG
AATGCTGTAAAGCATTTAGCCATGTGGTTAGCATGGAAGGTGCATGTTTTGTTCTGCTGGC
CTCTCAGATTATGACCGAAGAAAATCATAAAAAAGCCAATGTGGATGGCTATGATTATACC
AAAAAAGCGGTGGTGGCTTTAGCATGATTTTTAGCCCGTTTGGTGAAGAAGTGGTTAAAC
CGCTGGCTCCGAATGAAGAAGGTATTCTGTACGCCGATATTAATCTGGAAGAAAAATATAA
AGCCAAACAGAATCTGGATATTGTGGGTCATTATAGCCGTCCGGATCAGCTGTCTCTGCGT
GTTAATAAACATGCAGCCAAACCGGTTTTTTTTTGCCAATGATCTG
```

### Příloha 3

Sekvence nukleotidů genu nitrilasy z *N.haematococca* mpVI 77-13-4 s upravenou frekvencí kodonů pro expresi v *E. coli*.

```
ATGGCATGTCCGATTCGTGTTGCAGTTACCCAGGCAGAACCGGTTTATCTGGATCTGGCAG
CAAGCGTTAAAAAAGCATGTGGTCTGATTGCCGAAGCAGCACAGAATGGTGCAAAACTGGT
TGCATTTAGCGAATGTTGGCTGCCTGGTTATCCGGCATGGATTTGGGCACGTCGGTTGAT
TTTGAAGTGCAGACCCGTTATATCTATAATAGCCTGCCGATTGAAAGCGAAGCAATGGAAC
TGGTTAAAGCAACCGCAAAAGAACATAGCATTGCAGTTGCACTGGGTTTTAGCGAACAGAG
CCCGAGCCATAGCATTATATCAGCCAGGCAATTATTAGTCCGCAGGGTGAAGTTGTTATG
CATCGTCGTAAAATCAAACCGACCCACATGGAACGTACCCTGTTTGGTGATGGTAGCGGTG
CAGATCTGAATAATGTTGTTGAAGTTGATTTTGGTGCCGAACACGGTAAAATCAAAGTTGG
TTGTTTTGCCTGTTGGGAACATAACCCAGCCGCTGCTGAAATATCATAGCATTAGCCAGGGT
GAAGCCATTCATATTAGCATGTGGCCTCCGATTGATCCGAGTGCCGGTGTGATCATCCGG
GTCTGTGGTCAATGACAGCAGATGGTTGTCAGAATCTGAGCCAGACCTATGCAATTGAAAG
CACCGCCTATGTTCTGCATAGCACCAGCGTTTGTACCCAGAAAGGTATTGAAACCCTGAAA
ACCCAGGATGGTCTGAGCTGTCGTCAGCCTGGTGGTGGTCATAGCTGTGTTATTGGTCCGG
ATGGTCGTCTGCTGACCGCACCGCTGGGTGATGGTAGTCCGGATGCCGAAGGTATTGTTTA
TGCAGATCTGGATCTGACCAAAGTTGTTGCAACCCGTGGTTTTCTGGATATTGTTGGTCAT
TATAGCCGTCGGATCTGCTGTGGCTGGGTGTTGATCGTGAACAGAAAGAAAACATTATCG
CCAAACAGCATAAAGCAGCAGAACAAGAAGCAGTTCAGGGC
```

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka
S adresou			