

Abstrakt

Epoxidhydrólasy (EH), vykazující vysokou míru enantioselektivity nebo enantiokonvergence, jsou důležité katalyzátory pro výrobu opticky aktivních epoxidů a diolů, které mohou sloužit jako chirální stavební prvky při syntéze biologicky aktivních látek. EH mohou mít důležitou roli i při degradacích xenobiotik.

Geny kódující EH Kau2 a Kau8 byly exprimovány v *E. coli* TOP10 a RE3. V supernatantu desintegrovaných buněk byla stanovena enantioselektivita a regioselektivita dvojice Kau8 a Kau2 pro čtveřici substrátů: *tert*-butylglycidylether, *para*-chlorostyrenoxid, *para*-nitrostyrenoxid, α -methylstyrenoxid. Nejvyšších hodnot enantioselektivity a regioselektivity byla dosaženo s enzymem Kau2 a substrátem *para*-nitrostyrenoxidem.

Na základě získaných dat byl vybrán pro další experimenty enzym Kau2.

Nadprodukce Kau2 byla provedena v rekombinantním kmenu RE3(pSEKau2). Byly provedeny dvě jednorázové kultivace a jedna přítokovaná kultivace v míchaném bioreaktoru a nejvyšší objemové aktivity 4500 U/l bylo dosaženo u přítokované kultivace.

Pro purifikaci enzymu Kau2 ze supernatantu desintegrovaných buněk byl použit dvoufázový vodný systém složený z polyethylenglykolu 6000 a citronanu sodného (pH 7,7). Bylo dosaženo purifikačního faktoru 2,6 +/- 0,3 a Kau2 měla specifickou aktivitu (A_{spec}) 2,85 U/mg proteinu.

Následně byly použity dvě imobilizační techniky: 1) tvorba zesíťovaných enzymových agregátů, 2) kovalentní navázání enzymu na epoxidové skupiny polyakrylamidového nosiče. Byla použita trojice komerčně dostupných nosičů: Eupergit C, Eupergit C250L a Sepabeads EC-EP. V prvním případě byly výsledky negativní a po optimalizaci metody druhé bylo dosaženo nejlepších výsledků při použití nosiče Eupergit C250L: katalytická účinnost imobilizované Kau2 je 37,1 % a A_{spec} na suchou hmotnost 4,4 U/g.

Výtěžek aktivity po imobilizaci činil 3,1 % (poměr nosič : protein = 20 : 1)