

# UNIVERZITA KARLOVA

v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Diplomová práce

---

**Epoxidhydrolasy získané z environmentální DNA:  
vlastnosti rozpustné a imobilizované formy enzymu**

**Epoxide hydrolases expressed from environmental DNA:  
characteristics of soluble and immobilized enzyme forms**

---

Michal Grulich

Praha 2010

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

Odborný konzultant: RNDr. Pavel Kyslík, CSc.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením mého školitele Prof. RNDr. Karla Bezoušky, DSc. a odborného konzultanta RNDr. Pavla Kyslíka, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze dne 23. dubna 2010

.....  
Michal Grulich

## Obsah

Seznam zkratek.....	5
Cíl práce.....	6
Abstrakt.....	7
<b>1. Úvod.....</b>	<b>9</b>
1.1. Epoxidhydrolasy a jejich dělení.....	9
1.2. Funkce rozpustné epoxidhydrolasy.....	11
1.3. Struktura enzymu.....	12
1.4. Mechanismus katalýzy rozpustné epoxidhydrolasy.....	15
1.5. Enantioselektivita EH.....	17
1.6. Regioselektivita EH.....	17
1.7. Epoxidhydrolasa jako terapeutický cíl.....	18
1.8. Syntetické a bioremediační aplikace rozpustné formy epoxidhydrolasy ...	19
1.9. Inhibitory rozpustné epoxidhydrolasy.....	20
1.10. Environmentální genomika.....	22
1.11. Stabilizace molekul enzymu cestou imobilizace.....	23
<b>2. Materiál.....</b>	<b>26</b>
2.1. Chemikálie.....	26
2.2. Použité přístroje.....	27
<b>3. Metody.....</b>	<b>29</b>
3.1. Mikroorganismy.....	29
3.2. Kultivační média a roztoky.....	29
3.3. Plynová chromatografie-teplotní programy analýz.....	34
3.4. Příprava hrubého extraktu EH.....	35
3.5. Stanovení aktivity, enantioselektivity, regioselektivity rozpustné a imobilizované formy EH.....	35
3.6. Stanovení koncentrace bílkovin.....	36
3.7. Výpočet specifické aktivity EH.....	37
3.8. Výpočet parametrů charakterizujících enantioselektivitu a regioselektivitu EH.....	37
3.9. Stanovení teplotní stability EH.....	38
3.10. Stanovení teplotního optima EH.....	39
3.11. Stanovení pH stability EH.....	39

3.12.	Stanovení pH optima EH.....	39
3.13.	Dlouhodobé stability EH při uchovávání v teplotě 0°C.....	40
3.14.	Kultivace v míchaném bioreaktoru.....	40
3.15.	Měření optické density kultury (OD <sub>600</sub> ).....	42
3.16.	Měření suché hmotnosti biomasy.....	42
3.17.	Měření aktivity EH.....	42
3.18.	Purifikace EH.....	42
3.18.1.	Postup izolace 1.....	42
3.18.2.	Postup izolace 2.....	43
3.18.3.	Určení parametrů Ke, Kp, PF, SF a Yt.....	44
3.19.	Polyakrylamidová gelová elektroforéza v prostředí SDS.....	45
3.20.	Imobilizace EH.....	45
3.20.1.	Imobilizace na polyakrylamidové nosiče Eupergit C a Eupergit C250L.....	45
3.20.2.	Imobilizace na polyakrylamidový nosič Sepabeads EC-EP.....	46
3.20.3.	Imobilizace na modifikované nosiče Cu <sup>2+</sup> ionty.....	46
3.20.4.	Příprava zesíťovaných enzymových agregátů.....	47
<b>4.</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>48</b>
4.1.	Charakterizace EH Kau2 a Kau8.....	48
4.1.1.	Substrát <i>terc</i> -butylglycidylether.....	48
4.1.2.	Substráty <i>para</i> -chlorostyrenoxid a <i>para</i> -nitrostyrenoxid.....	49
4.1.3.	Substrát $\alpha$ -methylstyrenoxid.....	50
4.2.	Teplotní stabilita EH Kau2 a Kau8.....	51
4.3.	Teplotní optimum EH Kau2.....	52
4.4.	pH stabilita a pH optimum EH Kau2.....	52
4.5.	Stabilita EH Kau2 a Kau8 v přítomnosti ethanolu.....	53
4.6.	Stabilita EH Kau2.....	53
4.7.	Expresse EH v rekombinantních bakteriích kultivovaných v míchaném bioreaktoru.....	54
4.7.1.	Jednorázová kultivace rekombinantních kmenů TOP10 a indukce exprese EH.....	54
4.7.2.	Jednorázová kultivace RE3(pSEKau2) a indukce exprese enzymu...55	
4.7.3.	Přítokovaná kultivace kmene <i>E. coli</i> RE3(pSEKau2) s indukcí syntézy.....	56

4.8.	Purifikace EH.....	58
4.8.1.	Optimalizace purifikace EH obsažené v supernatantu homogenizátu biomasy přítokované kultivace.....	58
4.9.	Imobilizace EH.....	59
4.10.	Teplotní a pH stabilita Kau2 imobilizované na Eupergit C, Eupergit C250L a Sepabeads EC-EP.....	61
4.11.	Porovnání enantioselektivit, regioselektivit a specifických aktivit imobilizované a rozpustné formy EH .....	64
4.12.	Průkaznost nadprodukce EH.....	65
<b>5.</b>	<b>Diskuze.....</b>	<b>66</b>
<b>6.</b>	<b>Souhrn.....</b>	<b>71</b>
<b>7.</b>	<b>Seznam použité literatury.....</b>	<b>73</b>

## Seznam zkratk

EH	epoxidhydrolasa
PDB	proteinová databáze – <u>P</u> rotein <u>D</u> ata <u>B</u> ank
Sepabeads EC-EP	Sepabeads <u>E</u> nzyme <u>C</u> arrier – <u>E</u> poxide groups
Kau	pracovní označení epoxidhydrolas
CLEA	zesíťené enzymové agregáty – <u>C</u> rossl <u>i</u> nk <u>e</u> d <u>E</u> nzyme <u>A</u> ggregates
CCM	sbírka kultur mikroorganismů – <u>C</u> ulture <u>C</u> ollection of <u>M</u> icroorganism
PGA	penicilin <u>G</u> -acylase
ATPS	dvoufázový vodný systém – <u>A</u> queous <u>T</u> wo <u>P</u> hase <u>S</u> ystem
PEG	polyethylenglykol
OD	optická <u>d</u> ensita

## **Cíl práce**

Cílem této práce je navrhnout vhodnou imobilizační techniku pro enantioselektivní enzym, rozpustnou epoxidhydrolasu, která katalyzuje konverzi epoxidů na odpovídající vicinální dioly ve vodném prostředí. Význam epoxidů a jejich odpovídajících vicinálních diolů jako syntetických intermediátů pro syntézu opticky aktivních látek zdůrazňuje potřebu dosažení této sloučeniny ve vysokém měřítku enantiomerní čistoty.

Smyslem imobilizace je zlepšit ty vlastnosti enzymu, které limitují jeho využití v průmyslovém měřítku, zejména se jedná o teplotní stabilitu a pH stabilitu.

Diplomová práce byla vypracována v Laboratoři enzymových technologií na Mikrobiologickém ústavu Akademie věd České republiky, v.v.i.

## 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,  $\alpha$ -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 ( $A_{\text{spec}}$ ) 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  $A_{\text{spec}}$  na suchou hmotnost 4,4 U/g.

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



## Abstract

Epoxide hydrolases (EHs) demonstrating high degree of enantioselectivity or enantioconvergence are useful biocatalysts for the production of optically active epoxides and vicinal diols, which can serve as chiral building blocks for syntheses of biologically active drugs.

EHS can play an important role also in degradations of xenobiotics.

Genes encoding EHs Kau2 and Kau8 were expressed in *E. coli* host strains TOP10 and RE3. Enantioselectivities and regioselectivities of Kau2 and Kau8 in supernatants of desintegrated cells were determined for four substrates: *tert*-butylglycidyl ether, *para*-chlorostyrene oxide, *para*-nitrostyrene oxide,  $\alpha$ -methylstyrene oxide.

The highest values of enantioselectivity and regioselectivity were achieved with Kau2 and *para*-nitrostyrene oxide as a substrate. The Kau2 was chosen for further experiments on the basis of these results.

Kau2 was overexpressed in the recombinant strain RE3(pSEKau2). We performed two batch cultures and one fed-batch culture in stirred bioreactor. The highest volumetric activity of 4500 U/l was obtained in the case of fed-batch culture.

Two phase system consisting of polyethylenglycole 6000 and sodium citrate (pH 7.7) was used for Kau2 purification from the supernatant of desintegrated cells. Purification factor 2.6 +/- 0.3 was achieved and specific activity ( $A_{\text{spec.}}$ ) of Kau2 equalled 2.85 U/mg of protein.

Two immobilization methods were applied for purified Kau2: 1) crosslinking enzyme aggregates and 2) enzyme covalent binding to epoxy groups of polyacrylamide carriers. Three commercially available carriers were used: Eupergit C, Eupergit C250L, and Sepabeads EC-EP.

In the first case, negative results we obtained and after optimization of the second method the best results were achieved with Eupergit C250L.

Catalytic efficiency of immobilized Kau2 of 37.1 % and  $A_{\text{spec.}}$  of 4.4 U/g (dry weight). Yield of activity after immobilization was 3.1 % (ratio carrier : protein = 20 : 1)

(In Czech)

# 1. Úvod

## 1.1. Epoxidhydrolasy a jejich dělení

Epoxidhydrolasy (EH, EC 3.3.2.3) jsou od nedávné doby až doposud hojně studovány, za což mohou vděčit mnoha svým schopnostem, zejména v současné době co se týče potenciální dekontaminace životního prostředí a potřebě získávání opticky aktivních látek coby syntetických intermediátů.

Ačkoliv byly tyto enzymy nejdříve rozsáhle studovány z hlediska jejich možného působení při degradaci a detoxikaci mutagenních xenobiotik, zdá se že minimálně rozpustná forma EH je stěžejní enzym pro udržování hladiny epoxyeikosatrienových kyselin, a to vzhledem k jejich schopnosti katalyzovat degradaci epoxyeikosatrienových kyselin na příslušné dioly (1). Vzhledem k vasoaktivním účinkům epoxyeikosatrienových kyselin, je tato forma EH studována s výhledem na možné klinické využití v regulaci krevního tlaku (2).

Většina EH, u nichž byl sekvenován strukturní gen, jsou členy rodiny  $\alpha/\beta$ -hydrolas, do níž vzpadají také lipasy, esterasy a haloalkandehalogenasy (3).

I když EH katalyzují tutéž chemickou reakci, vzájemná podobnost na úrovni aminokyselinových sekvencí je nízká.

Fylogenetickou analýzou bylo identifikováno 12 rodin těchto enzymů, které tvoří dvě superrodiny, jednak mikrosomální a jednak cytosolovou superrodinu. Mikrosomální superrodina zahrnuje homologní rodiny savčích, hmyzích, bakteriálních a plísňových EH.

Cytosolová superrodina zahrnuje savčí, rostlinné a bakteriální EH. Bakteriální EH obecně vykazují vysokou rozmanitost aminokyselinových sekvencí.

Mikrosomální superrodina se skládá celkem ze 4 homologních rodin. Obdobná situace vznikla také u cytosolové superrodiny, kde analogickým způsobem vzniklo 8 homologních rodin (4).

Protože všechny mikrosomální EH vyšších organismů jsou zakotveny v membráně, tak obsahují na svém N-konci kotvu. Naproti tomu, mikrobiální enzymy téže superrodiny jsou rozpustné proteiny, a tak kotvu postrádají (5). Všechny cytosolové EH jsou rovněž rozpustné enzymy (4), tj. takové které katalyzují konverzi epoxidů na odpovídající dioly ve vodném prostředí (6).

Epoxidy jsou cyklické ethery, jejichž kruh se skládá ze tří atomů. V organismu vznikají z metabolismu jak endogenních látek, tak xenobiotických sloučenin chemickou či enzymatickou oxidací zahrnující monooxygenasový systém cytochrom P450. Výsledné epoxidy jsou obecně nestálé ve vodném prostředí a velmi reaktivní. V případě xenobiotik a určitých endogenních sloučenin se epoxidové intermediáty vyznačují coby hlavní mutageny a karcinogeny (7).

Obecně tyto hydratace vedou k více stabilním a méně reaktivním intermediátům. Jednoduché epoxidy jsou hydrolyzovány na své odpovídající vicinální dihydrodioly a arenoxidy na *trans*-dihydrodioly (7).

Význam epoxidů a jejich odpovídajících vicinálních diolů, jako syntetické intermediáty pro syntézu opticky aktivních látek, zdůrazňuje potřebu dosažení této sloučeniny ve vysokém měřítku enantiomerní čistoty. Obecný rys většiny, tímto enzymem katalyzovaných reakcí, je enantioselektivita (8), odkud plyne užitečnost tohoto enzymu pro farmaceutický průmysl. U EH, které byly kódovány DNA získanou z metagenomového vzorku průmyslového biofiltru, byla prokázána vysoká enantioselektivita vůči aromatickým epoxidům, jako například styrenoxidu či *para*-nitrostyrenoxidu, v případě druhého jmenovaného substrátu byla dokonce prokázána enantiokonvergence (9). Nicméně v případech EH katalyzovaných hydrolyz se zdá, že je situace komplikovanější, protože epoxid může být atakován na obou atomech uhlíku epoxidového kruhu, a to ještě v různých procentuálních poměrech, což mimo jiné závisí i na použitém substrátu (8).

U monosubstituovaných epoxidů bylo pozorováno, že regioselektivita je silně závislá na původu enzymu, stejně tak jako na typu substituentů epoxidového kruhu.

U mikrobiálních EH je situace komplikovanější v tom smyslu, že v současnosti je jen minimum dostupných výsledků, ale zdá se že bakteriální EH obecně vykazují regioselektivitu porovnatelnou s jednou savčí mikrosomální EH (8).

Zatímco EH pocházející z hub by mohly vykazovat rozdílnou regioselektivitu, v závislosti na tom, z jakého druhu hub pocházejí. Zajímavý je také fakt, že u disubstituovaných epoxidů bylo prokázáno, že regioselektivita se může dokonce lišit pro každý enantiomerní substrát, je také závislá na relativní konfiguraci substituentů v případě *cis-trans* izomerie. Několik případů enantiokonvergence bylo v nedávné době popsáno pro *cis*-substituované epoxidy hydrolyzované EH pocházejícími z bakterií (10), hub (11), rostlin (12), ale i savců (13).

## 1.2. Funkce rozpustné EH

Je známa celkem pětice různých druhů savčích EH, přičemž čtyři z nich jsou rozpustné formy. Cholesteroxidhydrolasa, která katalyzuje hydrataci cholesterol-5,6 $\alpha$ -oxidu a cholesterol-5,6 $\beta$ -oxidu na cholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol. Je hojně distribuována ve všech tkáních, avšak nejvyšší aktivita byla prokázána v jaterní tkáni (14). V případě druhé formy se jedná o hepoxilin A3 hydrolasu, jejíž gen či cDNA dosud nebyla charakterizována ani klonována. Hepoxilin A3 hydrolasa je cytosolový enzym, který vykazuje vysokou substrátovou specifiku vůči leukotrienům, což jsou důležité metabolity kyseliny arachidonové, které sprostředkovávají odpovědi imunitního systému na alergické a zánětlivé reakce (15).

Třetí je leukotrien A4 hydrolasa, což je cytosolový, bifunkční enzym, obsahující zinečnatý iont. Enzym vykazuje jak hydrolasovou, tak i aminopeptidasovou aktivitu (16).

A poslední ze čtveřice je rozpustná EH, což je enzym, který metabolizuje xenobiotika a také se účastní metabolismu endogenně derivovaných epoxidů mastných kyselin (17). Přítomnost byla prostřednictvím aktivity prokázána ve všech tkáních (18).

Poslední typ savčího enzymu je mikrosomální EH, která byla charakterizována z těchto pěti savčích forem coby první. Hlavní činnost této formy savčí EH je adice vody do polohy *trans* na širokou skupinu epoxidů. Jedná se o velmi zajímavý enzym z hlediska možnosti participace na bioaktivaci karcinogenních PAU (19).

Pomocí substrátů androstenoxidu, estroxidu a benzo(a)pyren-4,5-oxidu byla prokázána přítomnost mikrosomální formy EH v krysích samčích i samičích orgánech. Byly testovány orgány produkující androgen a estrogen, tedy varlata, vaječníky a nadledvinky a orgány podílející se hlavní měrou na metabolismu cizorodých sloučenin, tedy játra a ledviny.

Oba steroidní epoxidy byly hydrolyzovány rychleji, nežli benzo(a)pyren-4,5-oxid a to mikrosomální frakcí všech testovaných orgánů. Jednotlivé orgány se lišily ve specifické aktivitě příslušných enzymů, nebyly prokázány však už rozdíly v hodnotách  $A_{\text{spec}}$  při použití jednotlivých substrátů (20).

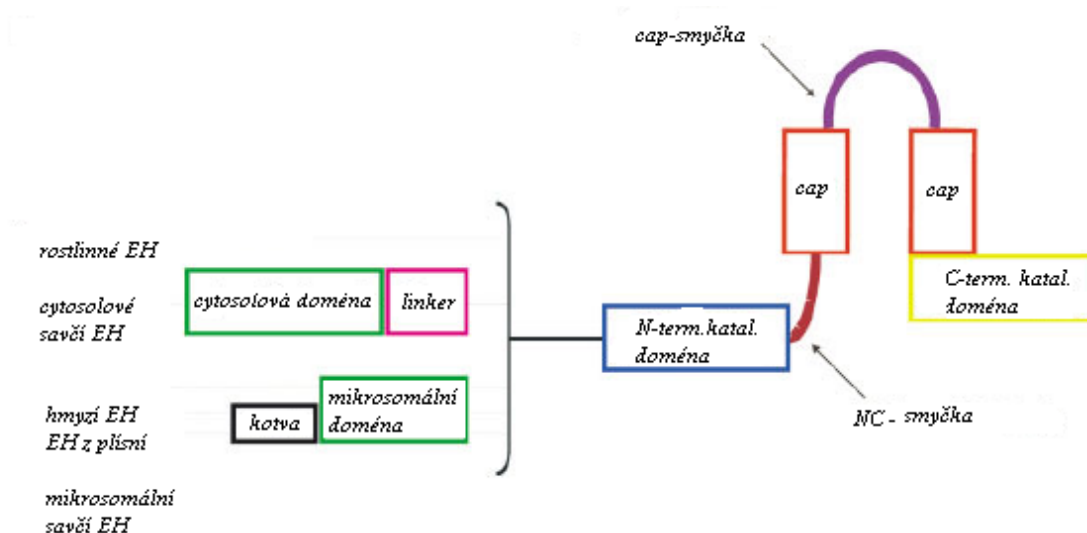
Role rostlinných rozpustných EH byla *in vivo* prokázána v syntéze kutinu, založené na relativně vysoké aktivitě vůči epoxystearátu, kdy produktem této reakce je prekurzor kutinu (21). Kutin funguje jako bariéra pro patogenní invazi a pokrývá celý povrch rostliny (22).

Rostlinné rozpustné EH vykazují vysokou teplotní stabilitu v porovnání se savčími rozpustnými EH (21).

EH z vyšších organismů jsou indukovány různými syntetickými sloučeninami, toxikanty, fytochemikáliemi atd. a mohou tak být považovány za součást detoxikačního systému a obranný mechanismus těchto organismů. Naproti tomu z mikrobiálních zdrojů jsou některé rozpustné EH obvykle přítomny konstitutivně a jejich fyziologická role doposud stále není plně objasněna, některé jsou však inducibilní a jsou součástí metabolických pochodů určitých sloučenin (23).

### 1.3. Struktura enzymu

Již bylo identifikováno přes 300 rozpustných EH a u některých z nich byly stanoveny trojrozměrné krystalové struktury. Analýzy tří známých skruktur z *Agrobacterium radiobacter ADI*(24), z *Aspergillus niger* (25) a z *Mus musculus* (26) vedly k vytvoření modulární struktury a jejího rozdělení na N-terminální katalytickou doménu, N-terminální doménu, dále na doménu tvaru „čepičky“, C-katalytickou doménu, cap smyčku a NC smyčku (4) (obr. 1).



Obr. 1. Modulární struktura homologních rodin EH (4)

Jiný pohled na strukturu umožňuje rozdělení EH na hlavní doménu, která je složena z centrální  $\beta$ -otáčky obklopené  $\alpha$ -helixy a variabilní doménou ve tvaru "čepičky" umístěnou na tom konci, kde se nachází i doména s vazebným místem pro substrát,

kteřá využívá katalytický mechanismus zahrnující katalytickou triádu Asp/Ser/Cys-His-Asp/Glu (nukleofil-histidin-kyselina), jenž je umístěna na vrcholu smyčky hlavní domény. Pozice těchto zbytků jsou strukturálně konzervované v pořadí nukleofil-histidin-kyselina, ale v primární aminokyselinové sekvenci je pořadí nukleofil-kyselina-histidin, s kyselinou umístěnou buď před doménou ve tvaru čepičky, nebo za ní (27).

Jako jedna z prvních struktura EH byla získána z *Aspergillus niger*, přičemž bylo zjištěno, že disponuje značnou podobností k lidské mikrosomální EH z hlediska aminokyselinových sekvencí (25). V protikladu s tímto tvrzením však postrádá enzym z *Aspergillus niger* N-terminální membránovou kotvu, což je ale v souladu se skutečností, že tento enzym je ve svém nativním prostředí skutečně rozpustný (28).

Struktura EH z *Aspergillus niger* (obr. 2, str. 14) byla určena pomocí rentgenostrukturální analýzy a bylo zjištěno, že se jedná o asymetrický dimer skládající se ze dvou 44kDa podjednotek. Každá podjednotka obsahuje jak hlavní doménu, tak i helikální doménu tvaru čepičky nad aktivním místem. Spojení obou podjednotek zahrnuje interakce mezi aminokyselinovými sekvencemi, připomínající tvar víka, každé z podjednotek. Aktivní místo obsahuje katalytickou triádu a dva zbytky od tyrosinu a zbytek glutamové kyseliny asistující při katalýze. Katalytická triáda je zde ve složení Asp-His-Asp. Rozdíly v aktivních místech, obzvláště pak komponenty, které asistují na otevírání epoxidového kruhu, by mohly vysvětlovat, proč EH pocházející z plísně dosahuje vyšší rychlosti katalýzy, než jeho lidský protějšek (25).

Právě přítomnost zbytku kyseliny asparagové namísto zbytku kyseliny glutamové, která je součástí katalytické triády u všech mikrosomálních EH, se považuje za možnou příčinu vyšší rychlosti katalýzy v porovnání se savcím protějškem (29).



Obr. 2. Krystalová struktura EH z *Aspergillus niger* (www.pdb.org, PDB ID 1qo7)

Další známá struktura EH, která pochází z *Agrobacterium radiobacter* AD1 je poněkud odlišná, zejména tím, že se jedná o monomerní enzym. Tento enzym se skládá obdobně jako enzym pocházející z *Aspergillus niger* ze dvou domén. 1. hlavní domény, která vykazuje typické rysy rodiny  $\alpha/\beta$ -hydrolas a obsahuje centrální  $\beta$ -otáčku, obklopenou  $\alpha$ -helixy. Z jedné strany čtyřmi helikálními a z druhé dvěma helikálními úseky. 2. doménu, která leží jako „čepička“ na horní části hlavní domény a má  $\alpha$ -helikální charakter. Doména ve tvaru „čepičky“ obsahuje pět helikálních úseků, které tvoří rozsáhlé vybočení mezi úseky hlavní domény tvořenými  $\beta$ -skládaným listem. Má jakousi dvojvrstvou strukturu s dvěma helikálními úseky lokalizovanými mezi hlavní doménou a plochou tvořenou zbylými třemi helikálními úseky (30).

Z hlediska struktury vykazují EH obecně značnou diverzitu, což je dáno jejich původem.

Starší porovnání homologních sekvencí aminokyselin dalo najevo, že savčí rozpustná EH se skládá ze dvou hlavních částí: 1. C-terminální domény homologní s C-terminální doménou bakteriální haloalkandehalogenasy, mikrosomální EH a rostlinné rozpustné EH. 2. N-terminální domény homologní k N-doméně haloaciddehalogenasy rodu *Pseudomonas* (31). Celkově si jsou struktury myší a lidské EH z pohledu terciární a kvarterní struktury velice podobné, až na některé rozdíly nacházející se ve smyčkách proteinů stejně tak jako posunutí dvou podjednotek od sebe (32).

Postupem času byly rozlušřeny i další struktury EH pocházejících z různých organismů. Zajímavý je fakt, že rostlinné rozpustné EH postrádají N-terminální doménu proteinu (31).

C-terminální doména rozpustné EH patří do rodiny  $\alpha/\beta$ -hydrolas (27) a vykazuje epoxidhydrolasovou aktivitu. Její katalytické místo je lokalizováno na 25 Å dlouhém hydrofobním tunelu do tvaru písmene L a katalytická residua se nacházejí v ohybu, což se prokázalo u obou, jak u myšího tak i lidského enzymu (33).

U N-terminální domény rozpustné EH bylo prokázáno, že vykazuje  $Mg^{2+}$  dependentní fosfatasovou aktivitu (34). Tu získala díky homologii s bakteriální haloaciddehalogenasou, která mohla být evolučním předchůdcem. Štěrbina v aktivním místě této domény ukazuje způsob spojení s  $Mg^{2+}$  vazebným místem na 15 Å vzdáleném dně, negativně nabitě kapsy. Navíc byl nalezen 14 Å dlouhý hydrofobní tunel, tvořený konzervativní sekvencí aminokyselin, který by mohl být dostatečně dlouhý na to, aby vázal alifatický substrát (32).

Biologická funkce N-terminální domény je stále nejasná. Nicméně přinejmenším hraje důležitou roli ve stabilizaci kvarterní struktury (33).

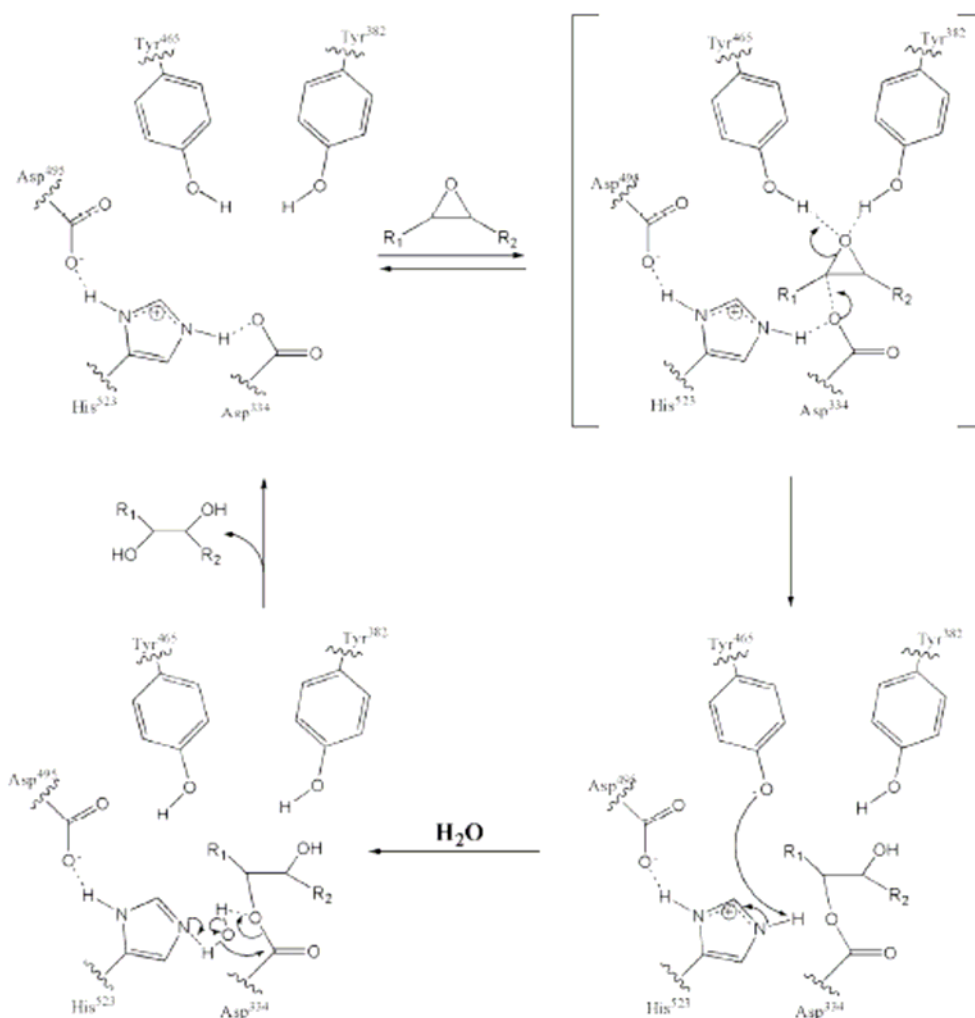
#### 1.4 Mechanismus katalýzy rozpustné EH

Pro  $\alpha/\beta$ -hydrolasy je typická přítomnost katalytické triády nukleofil-histidin-kyselina, a dvoukrokový reakční mechanismus (obr. 3, str. 16) zahrnující vznik kovalentně vázaného intermediátu (27), taktéž i jejich podobnost s bakteriálními EH (35). Katalýza začíná rychlým navázáním epoxidu na aktivní místo enzymu v jeho L-zahnutém hydrofobním tunelu. Aktivní místo lidského (myšího) enzymu je složeno z Asp<sup>334</sup> (Asp<sup>333</sup>) coby nukleofilní kyselina, His<sup>523</sup> (His<sup>523</sup>) coby basický histidin, Asp<sup>495</sup> (Asp<sup>495</sup>) jako orientovaná kyselina a Tyr<sup>382</sup> popřípadě Tyr<sup>465</sup> (Tyr<sup>381</sup> a Tyr<sup>465</sup>) jako polarizované tyrosiny (27).

Epoxidová skupina je polarizována dvojicí tyrosinových zbytků (36), které tvoří vodíkové vazby s epoxidovým kyslíkem a tím působí jako obecné kyselé katalyzátory. V tom samém čase Asp<sup>334</sup>, lokalizovaná naproti histidinovým zbytkům, atakuje epoxid na reaktivnějším a zpravidla stéricky nejméně stíněném uhlíku, což vede k otevření epoxidového kruhu a vytvoření esterové vazby mezi karboxylovou kyselinou enzymu a jedné funkční skupiny diolu. Tato přechodná sloučenina je nazývána hydroxyl-alkyl-enzym-intermediát.



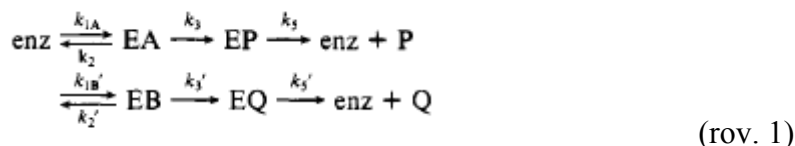
His<sup>523</sup>, Asp<sup>495</sup> a další možné aminokyseliny v katalytickém místě lidského enzymu aktivují a orientují nukleofilní kyselinu Asp<sup>334</sup>. Jakmile je meziproduct mezi enzymem a substrátem vytvořen, histidin se uvolňuje ze vzniklého esteru, aby umožnil molekulám vody, aby byly aktivovány ester-histidinovými páry. Aktivace molekul vody může proběhnout pouze, když není histidin protonovaný (37). Bazické molekuly vody nyní mohou atakovat karbonyl esteru s tím, že se uvolní diolový produkt a původní enzym (38).



Obr. 3. Mechanismus katalýzy EH. Čísla aminokyselinových zbytků odpovídají lidské rozpustné EH (38).

## 1.5 Enantioselektivita EH

Vychází se z předpokladu, že enzym má rozdílnou afinitu ke každému z izomerů. Dále se předpokládalo, že se reakce sestávají ze tří jednoduchých reakčních kroků s tím, že neexistuje žádný inhibiční produkt a že celý reakční mechanismus je prakticky nezvratný.



, kde A a B představují jednotlivé enantiomery, P a Q pak produkty jednotlivých reakcí.

Poměr výtěžků dvou parciálních reakcí lze za předpokladu vzniku ustáleného stavu, vyjádřit takto:

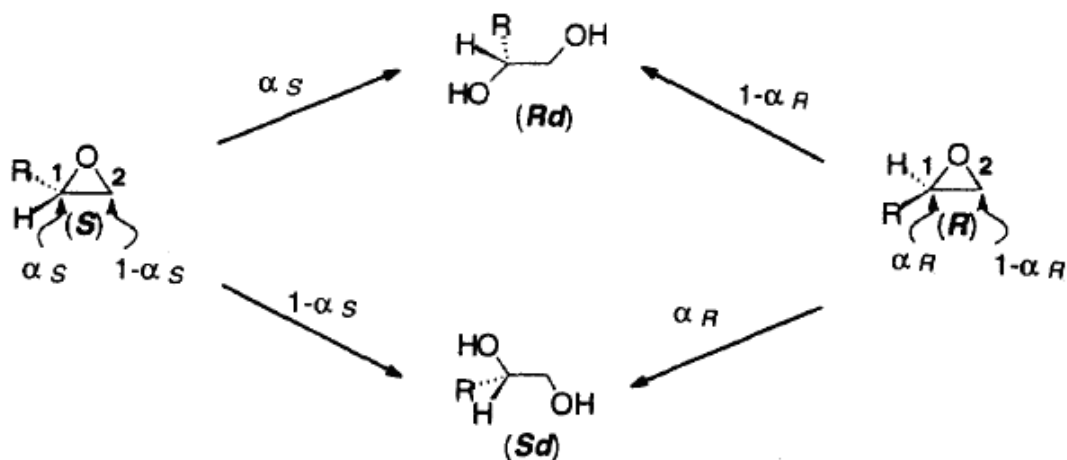
$$\frac{v_A}{v_B} = \frac{V_A}{V_B} \frac{K_B}{K_A} \frac{A}{B} \quad (\text{rov. 2})$$

, kde  $V_a$  a  $V_b$  jsou představují maximální rychlost reakcí,  $K_b$  a  $K_a$  představují Michaelisovy konstanty pro jednotlivé reakce, A a B představují koncentrace enantiomerů v jednotlivých reakcích.

Enantioselektivita enzymu je vyjádřena jako poměr konstant specifity  $V_{\max}/K_m$  (39).

## 1.6 Regioselektivita EH

Na obr. 4 je prezentována taková hydrolýza, která může vést ke vzniku obou enantiomerů produktu, v případě že biohydrolýza není regioselektivní.



Obr.4. Vznik dvojice enantiomerních produktů v případě neregioselektivní enzymové hydrolýzy (8).

Na obr. 4 (str. 17) je regioselektivita hydrolyzy definována parametry  $\alpha_S$  a  $\alpha_R$ , které se nazývají koeficienty regioselektivity.  $\alpha_S$  reprezentuje případ, kdy je (1S)-epoxid atakován na uhlíku číslo 1, a hydrolyzou (1S)-epoxidu vzniká (1R)-diol (Rd).

Obdobně  $\alpha_R$  reprezentuje případ, kdy je (1R)-epoxid atakován na uhlíku číslo 1, a vzniká hydrolyzou (1R)-epoxidu vzniká (1S)-diol (Sd).

Je užitečné zdůraznit, že případy, kdy je  $\alpha = 0,5$  znamenají, že není pozorována žádná regioselektivita, na druhou stranu pokud je regioselektivita enzymu absolutní,  $\alpha$  nabývá hodnoty 0 nebo 1 (8).

### 1.7. EH jako terapeutický cíl

Hlavní metabolickou drahou pro epoxyeikosatrienové kyseliny je v mnoha tkáních hydratace epoxidové skupiny a vznik odpovídající dihydroxyeikosatetraenové kyseliny (40). Tato reakce je katalyzována enzymem EH.

Značný zájem byl nedávno soustředěn na rozpustnou formu EH vzhledem k výsledkům naznačujícím, že by se mohlo jednat o potenciální terapeutický cíl v případě ochrany před hypertenzí (41).

Narušení genu kódující rozpustnou EH vedlo ke zjištění, že dochází ke snížení systolického krevního tlaku (42), rovněž N,N'-dicyklourea (DCU), nedávno objevený selektivní inhibitor rozpustné EH, snižoval krevní tlak (43). U obou těchto studií bylo zřejmé, že antihypertonický efekt je spojen s redukcí konverze epoxyeikosatrienových kyselin na dihydroxyeikosatetraenové (42, 43).

Působení EH je dále spojováno i s rizikem vzniku onemocnění věnčitých tepen a to ve spojení s genetickými variacemi v genu EPHX2, který kóduje rozpustnou EH. Prokazatelně byla doložena souvislost mezi genetickými změnami v tomto genu a rizikem vzniku onemocnění věnčitých tepen u bělošského etnika skupinou vedenou Craigem R. Leeem. Konkrétně přítomnost polymorfismu označeného jako K55R vede ke zvýšenému riziku vzniku koronárních onemocnění, ke kterému navíc ještě přispívají další faktory, jaké představují kouření, hypertenze, vznik diabetu, pohlaví a věk (44).

Obě dvě formy EH, jak rozpustná tak mikrosomální, byly detekovány ve varlatech. Nadvarlata jsou orgán, ve kterých spermie podstupují finální stádium dozrávání, získávají motilitu a schopnost oplodnit vajíčko (45).

Dále mohou také nadvarlata hrát roli i při ochraně spermií během průchodu nadvarlaty.

Dřívější studie ukázaly, že nadvarlata obsahují glutathion-S-transferasu cytochrom P450 2E1 a alkoholdehydrogenasu (46). Přítomnost těchto enzymů podporuje domněnku, že nadvarlata mohou hrát roli při detoxikaci xenobiotických sloučenin (45).

Epoxidy, které vznikají metabolismem xenobiotik a endogenních sloučenin a mnoho z nich může být mutagenními, karcinogenními a toxickými (47) může být transformována či detoxikována dvěma hlavními pochody. Jednak glutathion-S-transferasou řízenou

konjugací epoxidů s glutathionem (48) a jednak EH katalyzovanou adicí vody na epoxid za vzniku odpovídajícího diolu (49). Vzniklé produkty jsou zpravidla méně reaktivní, ve vodě více rozpustné a snadněji exkretovány z těla (50). Druhý uvedený způsob je obecně považován jako protektivní (51).

Jeden z oxidů kyseliny linoleové vznikající působením cytochromu P-450 monooxygenasy je *cis*-9,10-epoxydec-12(Z)-enová kyselina, obecně nazývaná leukotoxin (52). Tyto látky jsou toxické při intravenózním vpravení do zvířecího organismu, odkud pramení název leukotoxin. Leukotoxin je toxický pouze v přítomnosti EH, protože právě produkt této reakce působí toxicky na alveoly plicního epitelu, nikoliv samotný leukotoxin (53).

Biologický význam leukotoxinů je velice významný u těžce popálených pacientů, kde se tvoří v popálené tkáni z důvodu zamezení zanesení infekce. Právě u pacientů s těžkými popáleninami je vysoké riziko poškození mnoha orgánů, včetně ARDS (54). Krom toho, leukotoxiny podobně jako další epoxidy nenasycených mastných kyselin a také jejich metabolity vzniklé působením EH byly identifikovány v srdeční tkáni postižené infarktem. Tyto látky však ve zdravé srdeční tkáni přítomny nebyly. Předpokládá se, že enzymy jsou aktivovány poškozením buněk během infarktu (55).

### **1.8. Syntetické a bioremediační aplikace rozpustné formy EH**

Vzhledem ke své chemické univerzálnosti jsou epoxidy vyhledávány jako důležité synthony pro syntézu vybraných organických sloučenin. Mimoto, vzhledem k nutnosti poskytovat bezpečnější léky, je nyní cílem příprava vstupních chemikálií v enantiomerní čistotě.

Navržené metodiky pro získávání chemikálií v enantiomerní čistotě využívají jednak chemické katalyzátory nebo biologické katalyzátory. Oba mají své výhody i nevýhody (56). Jedna z metodik, od níž je obecně mnoho očekáváno, je hydrolýza racemické směsi epoxidů enzymem EH (57).

Tyto enzymy byly nyní detekovány v mnoha mikroorganismech. Závisějící na mikrobiologickém zdroji vykazují různé substrátové specifity a enantioselektivity (58).

Opticky čisté epoxidy jsou čím dál tím více atraktivní a je jim věnována pozornost jako vysoce ceněných chirálních intermediátům obzvláště v syntéze bioaktivních sloučenin. Mezi opticky čisté epoxidy produkované *Nocardia carollina* B-276 jsou arylglycidylethery používané pro syntézy  $\beta$ -blokátorů (58). Některé další nedávné příklady použití opticky čistých epoxidů v produkci chirálních sloučenin jsou např. inhibitory HIV proteasy (59).

Velmi zajímavá je i možnost syntézy obou enantiomerů tzv. Bowerovy sloučeniny (60), tedy sloučeniny, jejíž základ tvoří terpen. O vzniklé látce je známo, že je potenciálním analogem juvenilního hormonu u hmyzu (61).

Nejen jako uplatnění při organických syntézách nabízí rozpustná EH možné využití, ale také při potenciální environmentální bioremediaci. Analýzou vzorků půdy z těžarsky významných oblastí byly izolovány rozpustné formy tohoto enzymu patřící čtyřem různým mikroorganismům, které hydrolyzují glycidylované deriváty (62).

### 1.9. Inhibitory rozpustné EH

Znalost potenciálních inhibitorů hraje klíčovou roli zejména s ohledem na biologické účinky EH.

Je třeba zmínit objev substituované močoviny a substituovaného karbamátu jako možných inhibitorů rozpustné formy EH. Některé z těchto selektivních, kompetitivních a pevně se vázajících inhibitorů interagovali stechiometricky s molekulou enzymu. Tyto inhibitory zvyšovali toxicitu *trans*-stilbenoxidu, epoxidu působícího toxicky, ale zároveň redukovali cytotoxicitu těch metabolitů leukotoxinů, na jejichž vzniku se podílí EH. Také bylo prokázáno, že redukuje toxicitu metabolitů leukotoxinu *in vivo* u myši, kde se tak předešlo symptomům připomínající ARDS (63). U N-cyklohexyl-N'-(3-fenyl)propylmočoviny, (CPU), jednoho z derivátů močoviny se v komplexu enzym - inhibitor vyskytuje vodíková vazba mezi hydroxylovou skupinou

tyrosinu a atomem dusíku močoviny, která je v *cis*-isomerii. Cyklohexylová skupina inhibitoru se váže hluboko v hydrofobní kapse a fenyl-propylový vazebný partner pocházející od CPU se natahuje směrem k ústí dutiny aktivního centra a také se účastní mnoha Van der Waalsových interakcí s alifatickými a aromatickými zbytky aktivního centra. Tyto vazebné interakce vysvětlují strukturální preference pro mnoho substituovaných inhibitorů močoviny, které vykazují komplementaritu v oblasti velikosti a tvaru vůči hydrofóbní kapse enzymu (33).

Krystalografickými metodami byly určeny komplexy dvojice inhibitorů alkylmočoviny s myší rozpustnou EH. Alkylové substituenty inhibitoru vytváří extensivní hydrofóbní vazby v aktivním centru enzymu a každý atom kyslíku karbonylové skupiny močoviny vytváří vodíkovou vazbu s hydroxylovou skupinou tyrosinu, charakter navázání inhibitoru je podobný vzniku intermediátu během katalyzovaného otevírání kruhu epoxidů (64).

Velmi významný inhibitor vzpadající do skupiny substituované močoviny je 1-cyklohexyl-3-dodecylmočovina (CDU), která v konečném důsledku inhibuje buněčnou proliferaci hladkého cévního epitelu, počátek vzniku aterosklerózy, a to tak že nepřímě snižuje hodnotu hladiny cyklinu D1, který proliferaci ovlivňuje (65).

Ireversibilní inhibice rozpustné EH chalkonoxidem je zapříčiněna vznikem kovalentních vazeb mezi inhibitorem a aktivním místem enzymu a pomalé enzymové reaktivaci transformující inhibitor na inaktivní produkt. Navíc, rychlé vyčerpání inhibitoru přítomného ve stechiometrickém množství vzhledem k enzymu naznačuje, že se inhibitor váže velmi pevně (66).

Vliv inhibice na rozpustnou formu EH byl pozorován u pacientů trpících epileptickými záchvaty dostávajících karbamazepin. Kyselina valproová, které je podávána s některými antiepileptickými léčivy prokazatelněji snižuje odstranění volných epoxidů vznikajících metabolismem těchto léčiv, což je *in vivo* ukazatel epoxidhydrolasové aktivity (67).

Inhibice může také nastat vlivem iontů kovů, např.  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  vykazují silný inhibiční účinek, ale  $\text{Al}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  a  $\text{Mn}^{2+}$  jsou pouze slabými inhibitory, zatímco šestice anionů  $\text{Br}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  a  $\text{CH}_3\text{COO}^-$  nenavozují žádný inhibiční efekt (68).

Nedávno byl prokázán inhibiční účinek vůči rozpustné formě EH u sloučenin vzniklých na základě močoviny a esteru kyseliny salicylové. Tyto inhibitory vykazují

vysokou metabolickou a chemickou stabilitu (69).

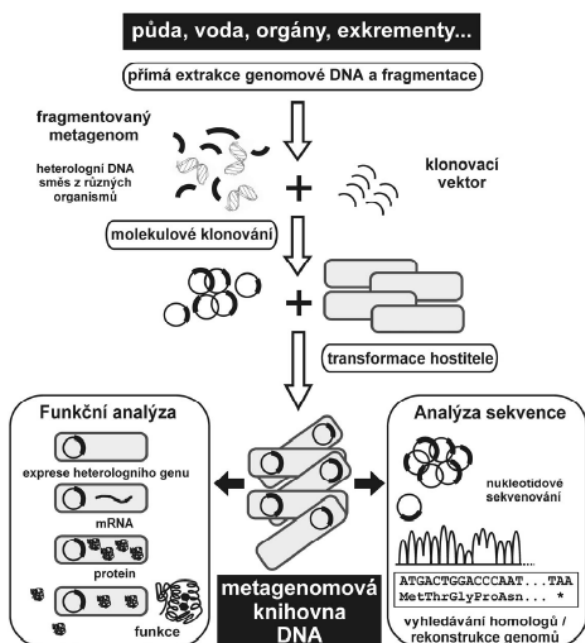
Podobné vlastnosti by měl vykazovat i inhibitor uměle sestavený na základě dvou známých účinných inhibitorů a sice derivátů močoviny a derivátů nikotinamidu. Před dvěma lety byla zahájena 1. fáze klinického testování na vzorku jedinců trpících hypertenzí (70).

### 1.10. Environmentální genomika

Klonování genů pocházejících z mikroorganismů z environmentálního prostředí je překvapivě relativně poměrně stará idea. Strategie klonování sahá do poloviny 80. let minulého století, kdy byla použita pro získání genu 16S rRNA z matrice environmentálních vzorků. Tedy ještě do doby před příchodem PCR (71).

Technologie PCR s primery umožňujícími amplifikovat takřka kompletní geny 16S rRNA pak vedla od poloviny 90.let k expanzi molekulárně genetické klasifikace mikroorganismů.

Zájem o „neviditelnou většinu“ mikroorganismů je dán také praktickými důvody a poznatky o fyziologii a genetice nekultivovatelných mikroorganismů mají významný potenciál uplatnění v oblasti medicíny, ekologie e biotechnologií (72).



Obr. 5.: Grafické znázornění izolace a následného zacházení s celkovou DNA populace obsažené v environmentálním vzorku (72).

Mezi metodami navrženými ke studiu fyziologie a genetiky nekultivovatelných mikroorganismů si získal vedoucí pozici nový technologický přístup, tzv. metagenomika, zahrnující izolaci celkové DNA dané populace, jejich fragmentaci, molekulové klonování fragmentů DNA (72), jak je znázorněno na obr. 5 (str. 22). Velikost vkládaných fragmentů se pohybuje do 150 tisíc párů bazí (73), stanovení a interpretaci jejich nukleotidové sekvence poskytující informace o genetickém potenciálu i diverzitě populace i funkční analýze genů vedoucí k cílené identifikaci aktivit jejich produktů (72). Mikrobiální komunity se sestávají ze směsi archebakterií, bakterií a eukaryot s rozdílnými charakteristikami buněčných stěn, jež výrazně ovlivňují jejich náchylnost k lýzy, která představuje první krok izolace DNA (72). Knihovny velkých fragmentů metagenomů jsou vytvářeny s použitím kosmidů (74), umělých bakteriálních chromosomů (75) nebo fosmidů (76). Knihovny krátkých fragmentů jsou spíše než pro funkční analýzu vhodné jako zdroj informací o sekvenci DNA metagenomu (77).

### **1.11. Stabilizace molekul enzymu cestou imobilizace**

Od druhé poloviny 20. století bylo vynaloženo na vyvinutí nerozpustných imobilizovaných enzymů využitelných v mnoha odvětvích mnoho úsilí (78). Což bylo zapříčiněno rostoucím zájmem o používání enzymů jako industriálních katalyzátorů (79). A to z toho důvodu, že enzymy obecně disponují několika výhodami v porovnání s konvenčními katalyzátory. Jsou schopny katalyzovat velmi selektivně a specificky a to za velmi mírných reakčních podmínek. Z toho důvodu se enzymy zdají být "téměř ideální" pro reakce, v nichž komplexy chirálních a labilních sloučenin, jako např. při modifikace látek určených pro farmaceutický průmysl (80).

Používání imobilizovaných enzymů s sebou přináší ještě několik dalších výhod, a sice možnost jeho opětovného použití, s čímž přímo souvisí i ekonomické náklady na používání imobilizovaných enzymů (78).

Jedna z vlastností, která je obecně považovaná za tu, jíž je třeba imobilizaci vylepšit, je stabilita, zejména pak teplotní stabilita (81). Stabilizovat enzym imobilizací je možno několika základními způsoby.

Za prvé se jedná o stabilizaci enzymu imobilizací na porézní nosiče, kdy imobilizace enzymu uvnitř porézních struktur takového nosiče umožňuje molekuly enzymu rozptýlit tak, aby se eliminovala možnost interakce enzymu s vnějším okolím,



čímž se enzym stabilizuje proti interakcím s jinými molekulami enzymového extraktu, které by mohli mít za důsledek agregaci, autolýzu či proteolýzu zapříčiněnou proteasami, které mohou být také imobilizovány. Molekuly enzymu jsou taktéž chráněny před vzduchovými bublinkami vzniklými za silného míchání při případném dodávání pomocného plynu (82).

Druhá hojně rozšířená technika je vícebodová kovalentní imobilizace. Vícebodové kovalentní navázání molekul enzymu na prvotně aktivovaný nosič přes krátká raménka se řadí z hlediska proveditelnosti mezi náročnější techniky (82). Je třeba vybrat takový nosič, reaktivní skupiny a imobilizační podmínky, aby bylo možné docílit maximálního množství funkčních skupin enzymu účastnících se imobilizace. V průběhu tvorby kovalentních vazeb musí být zachována relativní vzdálenost mezi všemi zbytky účastnícími se tvorby těchto vazeb, navzdory konformačním změnám vyvolaných deformačními činidly. V důsledku konformačních změn se očekává částečný pokles enzymové aktivity, ale výrazný vzestup stability enzymu (82).

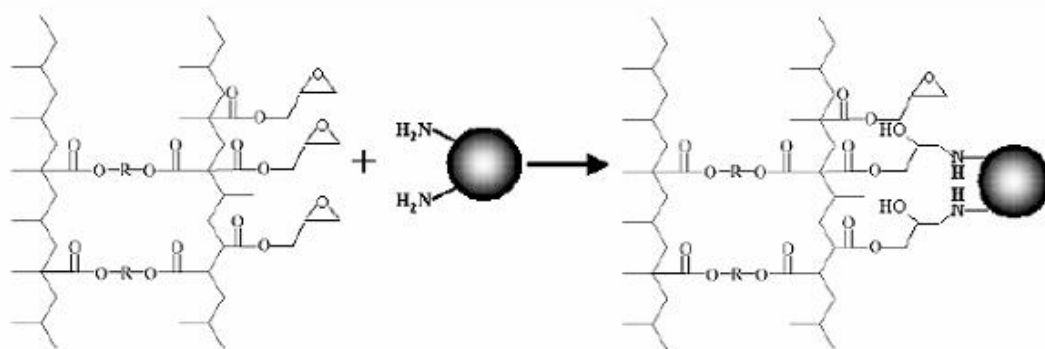
Mezi imobilizačními protokoly popsanými v literatuře jsou některé, které mohou splňovat většinu těchto požadavků. Nosiče jako agarosové kuličky, zeolity, porézní sklo, nosiče obsahující epoxidové skupiny jako Sepabeads EC-EP (obr. 6, str. 25) či Eupergit, nabízejí velkou plochu pro reakce enzym-nosič (82).

Ačkoliv imobilizace na pevné nosiče byla vyvíjena od 50.let minulého století, stále neexistují obecná pravidla pro výběr nosiče nejpešího pro dané použití. Komerční výrobky Eupergit C a Eupergit C250L patří mezi nejintenzivněji studované matrice pro enzymovou imobilizaci (83).

Třetí technika je stabilizace enzymů vícepodjednotkovou imobilizací. Jeden specifický problém při navrhování biokatalyzátoru je, že se může jednat o multimerní enzym. Inaktivace těchto enzymů začíná v mnoha případech disociací enzymu na samotné podjednotky (84). Pakliže to není důležité pro stabilitu enzymu, rozdělení enzymu na podjednotky zpravidla kontaminuje finální produkt (82).

Vědecká skupina vedená J. Guisanem navrhla dvoukrokový vazebný mechanismus pro průběh imobilizace na tento druh nosičů (85). Předpokládá se, že v 1. kroku dochází k fyzikální adsorpci enzymu na nosič díky hydrofóbním interakcím, v důsledku čehož se  $\text{NH}_2$  a thiolové skupiny přítomné na povrchu enzymu ocitnou v těsné blízkosti oxiranových skupin nosiče. V druhém kroku dochází k interakcím mezi těmito skupinami tak, že dochází k nukleofilnímu ataku na oxiranové skupiny.

Tímto způsobem vznikají velmi stabilní C-N a C-S vazby (83). Vysoká hustota oxiranových skupin na povrchu nosiče předpokládá "vícebodové navázání" (83). Má se za to, že takovéto vícebodové upevnění enzymu na strukturu nosiče vede k nárůstu konformační stability a tudíž se tak zvyšuje teplotní stabilita enzymu (86). Další výhody kovalentního navázání na Eupergit je odolnost proti aldehydům (87), a zvýšení stability vůči denaturačním polárním organickým rozpouštědlům (83). Eupergit je populární způsob metody pro přípravu velkého množství biokatalyzátoru pro průmyslové využití (biotransformace) (88). Vzhledem k jeho kompatibilitě s širokou škálou enzymů je také používám k imobilizacím i na akademických půdách (83).



Obr. 6.: Imobilizace na nosič Sepabeads EC-EP navázáním na epoxidové skupiny nosiče přes volné  $\text{NH}_2$  skupiny enzymu (89).

## 2. Materiál

### 2.1. Chemikálie

NaCl.....	Lach-Ner, ČR
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	Lachema, N.P. Brno, Československo
Epoxycyklooktan.....	POCH SA, Polsko
Ethylacetát.....	POCH SA, Polsko
pentan-1-ol.....	POCH SA, Polsko
styrenoxid.....	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Švýcarsko
<i>terc</i> -butylglycidylether.....	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Švýcarsko
<i>para</i> -nitrostyrenoxid.....	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Švýcarsko
<i>para</i> -chlorostyrenoxid.....	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Švýcarsko
$\alpha$ -methystyrenoxid.....	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Švýcarsko
Ampicilin.....	Léčiva, a.s.
Kvasničný autolyzát.....	Bionis MF, Biorigin
Trypton.....	Imuna Pharm, a.s.
BCA kit pro stanovení konc. bílkovin.....	Pierce Chemical Company, USA
Polyethylenglykol.....	Serva Feinbiochemica, Německo
Citronan sodný.....	Lachema, N.P. Brno, Československo
Fosforečnan sodný.....	Merck, Německo
2-merkaptoethanol.....	Fluka, BioChemica
EDTA.....	Lachema, N.P. Brno, Československo
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	Merck, Německo
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	Merck, Německo
HCl.....	Lachema, N.P. Brno, Československo
NaOH.....	Lachema, N.P. Brno, Československo
MgSO <sub>4</sub> .....	Lachema, N.P. Brno, Československo
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Švýcarsko
CaCl <sub>2</sub> .....	MERCI s.r.o., ČR
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> .....	Lach-Ner, ČR
Glycin.....	Lachema, N.P. Brno, Československo
Methanol.....	Lach-Ner, ČR
Ethanol.....	Lach-Ner, ČR
Glycerol.....	Lach-Ner, ČR

CH <sub>3</sub> COOH.....	Lach-Ner, ČR
Boritan sodný.....	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Švýcarsko
Iminodiocetová kyselina.....	Fluka Analytical
Glyceralddehyd.....	Carl Roth GmbH CO, Německo
NaHCO <sub>3</sub> .....	Lach-Ner, ČR
Peroxodisíran amonný.....	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Švýcarsko
TEMED.....	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Švýcarsko
SDS.....	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Švýcarsko
Bromfenolová modř.....	Merck, Německo
Coomasie brilliant Blue R-250.....	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Švýcarsko
Kyselina citronová.....	Lachema, N.P. Brno, Československo

Veškeré použité chemikálie byly čistoty p.a.

## 2.2. Použité přístroje

Předvážky.....	AND, Japonsko
Centrifuga.....	Eppendorf, Německo Hettich Zentrifugen, Německo
Plynový chromatograf.....	Hewlett Packard, Velká Británie
Automatické pipety.....	Eppendorf, Německo
Mikrozkumavky.....	Eppendorf, Německo
Laboratorní varné sklo .....	Simax, Československo
Vortex.....	IKA-WERKE GmbH, Německo
Bioreaktor.....	Biostat MD, B. Braun Biotech International, Německo
Analytické váhy.....	Mettler Instrumente AG, Švýcarsko
Umělohmotné zkumavky 10 ml.....	Eppendorf, Německo
Ultrazvuk.....	Microson, Misonix USA
Achirální kolona.....	Agilent JW, USA
Chirální kolona.....	Agilent JW, USA
Chirální kolona.....	Machery-Nagel, USA
Nosiče Eupergit C a C250L.....	Fluka Chemie AG, Německo
Nosič Sepabeads EC-EP.....	Resindion Sr.L., Itálie
DIAION DH 25L.....	Mitsubishi Chemical Corp., Japonsko

Aparatura pro SDS-PAGE.....Bio-Rad Laboratories, USA  
Spektrofotometr.....Shimatsu, Japonsko

### 3. Metody

#### 3.1. Mikroorganismy

<b>Kmen</b>	<b>Genotyp</b>
<i>E.coli</i> TOP10	F <sup>-</sup> mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 deoR recA1 araD139Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL(Str <sup>R</sup> ) endA1 nupG (90)
<i>E.coli</i> RE3	(CCM 4228), prototrofní PGA-produkční kmen odvozený od průmyslového kmene <i>Escherichia coli</i> RE2 (CCM3759) odstraněním plazmidu pRK2 (91)

#### 3.2. Kultivační média a roztoky

##### **Fosfátový pufr**

4mM 2-merkptoethanol

1mM EDTA

40mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

pH upraveno na hodnotu 7,5 1M HCl

##### **Fosfátový pufr pro promytí biomasy po kultivacích**

100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

1 mM EDTA

2 mM 2-merkptoethanol

154 mM NaCl

pH upraveno na hodnotu 7,5 1M HCl

Doplněno deionizovanou vodou do celkového objemu 1000 ml

##### **Zásobní roztok TRIS pufu**

1mM EDTA

1M TRIS

Doplněno deionizovanou vodou do celkového objemu 1000 ml

pH upraveno na hodnotu 8,5 1M HCl.

### **Dialyzační pufr:**

1mM EDTA

100 mM TRIS

Doplněno deionizovanou vodou do celkového objemu 1000 ml

pH upraveno na hodnotu 7,5 1M HCl.

### **Médium I: Složení a příprava**

10g sacharosy

13,6g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

4g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

3g NaOH

2g MgSO<sub>4</sub>

0,05g CaCl<sub>2</sub>

0,01g Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>

40 g kvasničného autolyzátu

Doplněno deionizovanou vodou do celkového objemu 1000ml

Sterilizace probíhala v autoklávu při teplotě 120°C po dobu 30 minut, přičemž

sacharosa, MgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> byly sterilizovány separátně a do média byly

přidány až po sterilizaci. Poté pokud bylo třeba upravovat pH, byl použit 0,5M roztok

KOH nebo 1M HCl.

### **Médium II: Složení a příprava**

10g sacharosy

13,6g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

4g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

3g NaOH

2g MgSO<sub>4</sub>

0,05g CaCl<sub>2</sub>

0,01g Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>

Doplněno deionizovanou vodou do celkového objemu 1000ml

Příprava probíhala totožným postupem jako v případě Média I.

### **Glycerinová suspenze**

TRIS pufr o upraveném pH=7,5 a 100% glycerol v poměru 1:1

### **10% roztok SDS**

3g SDS

Doplněno deionizovanou vodou do celkového objemu 30 ml

### **Dělicí gel pro SDS-PAGE**

1,25 ml 1,5 M Tris pufru (pH 8,8)

1,65 ml 30% směsi akrylamidu

2,0 ml deionizované vody

50  $\mu$ l 10% vodného roztoku persíranu amonného

2  $\mu$ l TEMED

50  $\mu$ l 10% SDS

### **Zaostřovací gel pro SDS-PAGE**

0,125 ml 1M Tris pufru u něhož bylo upraveno pH na hodnotu 6,8

0,17 ml 30% směsi akrylamidu

0,675 ml deionizované vody

10  $\mu$ l 10% vodného roztoku persíranu amonného

2  $\mu$ l TEMED

10  $\mu$ l 10% SDS

### **30% směs akrylamidu**

29,9g akrylamidu

0,8g bisakrylamidu

Doplněno deionizovanou vodou do celkového objemu 70 ml

### **1,5M Tris pufr pro dělicí gel**

18,2g Tris

Doplněno deionizovanou vodou do celkového objemu 80 ml

pH upraveno na hodnotu 8,8 1M HCl.

Doplněno deionizovanou vodou do celkového objemu 100 ml



### **0,5M Tris pufr pro zaostřovací gel**

6,1g Tris

Doplněno deionizovanou vodou do celkového objemu 80 ml

pH upraveno na hodnotu 6,8 1M HCl.

Doplněno deionizovanou vodou do celkového objemu 100 ml

### **Pufr pro SDS-PAGE**

3g TRIS

14g glycinu

10ml 10% vodného roztoku SDS

Doplněno deionizovanou vodou do celkového objemu 1000 ml

### **Vzorkový pufr**

4ml deionizované vody

1ml 0,5M TRIS-HCl pufru u něhož bylo upraveno pH na hodnotu 6,8

0,8ml 100% glycerolu

1,6ml 10% vodného roztoku SDS

0,4ml 100% 2-merkptoethanolu

0,2ml 0,5% vodného roztoku bromfenolové modře

### **Barvicí roztok**

0,25g Coomassie Brilliant Blue R-250

45ml methanolu

10ml CH<sub>3</sub>COOH

Doplněno deionizovanou vodou do celkového objemu 100 ml

### **Sušící roztok**

25ml methanolu

2ml 100% glycerolu

Doplněno deionizovanou vodou do celkového objemu 100 ml

### **Odbarvovací lázeň**

25ml methanolu

10ml CH<sub>3</sub>COOH

Doplněno deionizovanou vodou do celkového objemu 100ml

Jako substráty enzymové reakce byly použity: *tert*-butylglycidylether, *para*-nitrostyrenoxid, *para*-chlorostyrenoxid a  $\alpha$ -methylstyrenoxid.

Zásobní roztoky byly připravovány tak, aby molární koncentrace substrátu činila 2,75 mM a aby roztok obsahoval 5 % (obj.) ethanolu.

### **LB médium**

15g tryptonu

7,5g NaCl

7,5g kvasničného autolyzátu

Doplněno deionizovanou vodou do celkového objemu 1,5 litru.

pH = 7 (upraveno před sterilizací)

### **Příprava LB média**

Pokud bylo třeba upravovat pH, byl použit 0,5M roztok KOH nebo 1M HCl. Médium bylo po přípravě sterilizováno v autoklávu při teplotě 120°C po dobu 30 minut.

### **Zásobní roztok PEGu**

50g PEGu 3000/6000/1000 bylo doplněno deionizovanou vodou do celkové hmotnosti 100 g.

### **Zásobní roztoky citronanu sodného**

35g citronanu sodného bylo doplněno deionizovanou vodou do celkové hmotnosti 100 g. pH upraveno na hodnotu 6,3, 7,7 a 8,5 0,5M KOH nebo 1M HCl.

### **Zásobní roztok NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>**

30g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> bylo doplněno deionizovanou vodou do celkové hmotnosti 100 g. pH upraveno na hodnotu 6, 7,2 a 8,5 0,5M KOH nebo 1M HCl.

### 3.3. Plynová chromatografie

Měření byla prováděna na přístroji HP 5890A. V tab. 1 a 2 jsou uvedeny kolony, použité teplotní programy (tab. 1) a použité interní standardy a retenční časy standardů a detekovaných epoxidů a diolů (tab. 2).

Tab. 1. Použité kolony a podmínky měření pro jednotlivá stanovení

Enzym +substrát	Teplotní režim experimentu	Použitá kolona
1. KAU8,KAU2 +substrát 1	50°C (50min.), poté do 100°C (5°C/min.)	Cyclosil B
2. KAU8,KAU2 + substrát 2	90°C	BetaDex 225
	125°C (10min.), poté do 180°C (5°C/min.)	Cyclosil B
3. KAU8,KAU2 + substrát 3	80°C (0min.), poté do 170°C (3°C/2min.)	Cyclosil B
4. KAU8 + substrát 4	115°C (10min.)	Cyclosil B
	125°C (17min.)	CP Chirasil Dex-CB
5. KAU2 +substrát 5	130°C (2min), poté do 220°C (5°C/min), poté 220°C (12 min)	Cyclosil B

Poznámky: substrát 1 = *tert*-butylglycidylether, substrát 2 =  $\alpha$ -methylstyrenoxid  
 substrát 3 = styrenoxid, substrát 4 = *para*-chlorostyrenoxid  
 substrát 5 = *para*-nitrostyrenoxid

Tab. 2. Interní standardy a retenční časy standardů (IS), epoxidů (Re, Se) a diolů (Rd, Sd)

Interní standard	Retenční časy (min.)
1. Pentan-1-ol	IS = 10,5 , Re = 14,4 , Se = 14,6
2. Pentan-1-ol	IS = 2,37, Re = 10 , Se = 9,7
	Rd = 19,3 , Sd = 19,1
3. Pentan-1-ol	IS = 2,37, Re = 10 , Se = 9,7
	Rd = 19,3 , Sd = 19,1
4. Epoxycyklooktan	IS = 5,19 , Re = 7,9 , Se = 8,5
	Rd = 13,95 , Sd = 15,99
5. Epoxycyklooktan	IS = 4,8 , Re = 14,46 , Se = 14,61
	IS = 4,8 Rd = 29,1 , Sd = 28,7

### **3.4. Příprava hrubého extraktu EH**

#### **Rozbití buněk ultrazvukem**

Kyveta se vzorkem biomasy byla umístěna do ledové lázně.

Sonikace byla prováděna opakovaně desetkrát a probíhala vždy po dobu 30 vteřin s dvouminutovými intervaly.

Teplota vzorku se mezi jednotlivými sonifikacemi byla udržována přibližně na 20°C.

Po rozbití byly odděleny zbytky buněk centrifugací (centrifuga Eppendorf 5403, rotor 16F6-38, 15 min., 11000 ot./min., T=8°C ). Supernatant byl následně použit pro izolaci EH.

#### **Frakční srážení hrubého extraktu enzymu roztokem síranu amonného**

Na srážení EH z 1 ml roztoku síranem amonným je třeba 4 ml nasyceného roztoku síranu amonného.

Kádinka s roztokem bílkovin a s magnetickým míchadlem byla umístěna na míchačku.

Intenzita míchání byla nastavena tak, aby nedocházelo k pění míchaného roztoku.

Roztok síranu amonného byl přidáván pipetou po malých objemech. Srážený roztok byl míchán dalších 15 minut. Po dobu srážení byla kádinka chlazena ledovou tříští.

Hrubý proteinový extrakt získaný rozbitím buněk ultrazvukem byl srážen nasyceným roztokem síranu amonného nejprve do 40% nasycení supernatantu. Poté byl hrubý proteinový extrakt centrifugován (centrifuga Eppendorf 5403, rotor 16F6-38, 10000 ot./min., 5 min., T = 8°C) a supernatant použit pro srážení tímže roztokem až do 75% nasycení. Po následném zcentrifugování byl takto připravený precipitát uchováván při +4°C.

### **3.5. Stanovení aktivity, enantioselektivity a regioselektivity rozpustné a imobilizované formy EH**

#### **Stanovení aktivity EH**

Aktivita enzymu byla stanovována analýzou vzorku reakční směsi na plynovém chromatografu a výpočtem z naměřené hodnoty vzniklého příslušného diolu.

Při znalosti počáteční koncentrace substrátu a doby potřebné k proběhnutí reakce lze vypočítat aktivitu enzymu. 50 µl supernatantu sonikovaných buněk bylo přidáno k 900 µl 40 mM fosfátového pufr o pH 7,5. Následně bylo do směsi přidáno 50 µl substrátu.

Finální koncentrace substrátu v reakční směsi obsahující 5% (obj.) ethanolu byla 2,75 mM. Reakce probíhala při teplotě 28°C po dobu 45 minut za konstantního třepání 200 ot./min. Po ukončení reakce byly odebírány vzorky pro stanovení aktivity na plynovém chromatografu.

### **Reakce pro stanovení enantioselektivity a regioselektivity precipitovaného a imobilizovaného enzymu**

Enzymová reakce probíhala za následujících podmínek: K 8,1 ml 40mM fosfátového pufru o pH 7,5 bylo přidáno 450 µl substrátu a 0,5 g enzymu ve formě síranového precipitátu, resp. 0,4 g, popř. 0,1g imobilizovaného enzymu (v případě *cis*-1-fenylpropenuoxidu 0,4g, v případě *trans*-1-fenylpropenuoxidu a styrenoxidu 0,1g). Reakce probíhala za konstantní teploty 28°C a konstantního třepání po dobu 180 min. Finální koncentrace substrátu v reakční směsi činila 2,75 mM a reakční směs obsahovala 5% (obj.) ethanolu.

### **Příprava vorků pro GC analýzu**

V časových intervalech byly z reakční směsi odebírány 450 µl vzorky a přidávány do mikrozkušavek s 0,1g NaCl. Ke 450 µl odebraného vzorku bylo přidáno 450 µl směsi ethylacetátu s pentan-1-olem v poměru 1:1 a dále byla směs krátce promíchána. Po odstředění byla horní organická fáze odebrána, smíchána s Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a krátce protřepána. Ze vzorku bylo odebráno 450 µl, které byly pipetou přeneseny do skleněného insertu. Takto připravený vzorek byl připraven pro analýzu na plynovém chromatografu.

### **3.6. Stanovení koncentrace bílkovin**

Koncentrace proteinu byla stanovena chromogenní reakcí pomocí kitu BCA.

Stanovení kombinuje Biuretovu reakci a vysoce citlivou a selektivní kolorimetrickou detekci Cu<sup>+1</sup> pomocí činidla obsahujícího bicinchonynovou kyselinu.

Slepý vzorek: 80 µl destilované H<sub>2</sub>O + 1,6 ml činidla

Vzorek: 80 µl vzorku (v případě neředěných vzorků) + 1,6 ml činidla. Po protřepání byl vzorek ponechán 30 minut při teplotě 37°C a na spektrofotometru byla změřena absorbance při vlnové délce  $\lambda = 562$  nm.

### 3.7. Výpočet $A_{\text{spec.}}$ enzymu

$A_{\text{spec.}}$  enzymu byla stanovena dle následujícího vztahu:

$$A_{\text{spec.}} = \frac{(C_{T0} - C_{TX}) / t}{C} \quad [\text{U/mg proteinu}] \quad (\text{rov.3})$$

, kde  $C_{T0}$  je koncentrace substrátu ( $\mu\text{mol/ml}$ ) v čase  $t = 0$

$C_{TX}$  je koncentrace substrátu ( $\mu\text{mol/ml}$ ) v čase  $t = x$ ,

$t$  (min.) je čas uplynulý od počátku reakce do měření  $C_{TX}$

a  $C$  je koncentrace enzymu v  $\text{mg/ml}$

Jednotka specifické aktivity ( $U$ ) je definována jako množství enzymu, které přemění  $1 \mu\text{mol}$  substrátu za 1 minutu

### 3.8. Výpočet parametrů charakterizujících enantioselektivitu a regioselektivitu EH

#### Výpočet enantioselektivity

Integrací rov. 2 (str. 17), uvedené v oddíle 1.4. se pro výpočet enantioselektivity získá vztah:

$$\frac{\ln(A/A_0)}{\ln(B/B_0)} = \frac{V_A/K_A}{V_B/K_B} = E \quad (\text{rov. 4})$$

, kde  $A_0$  resp.  $B_0$  představují koncentraci rychleji, resp. pomaleji reagujícího enantiomeru ( $\mu\text{mol/ml}$ ) v čase zahájení reakce  $t = 0$

$A$  resp.  $B$  představují koncentrace rychleji, resp. pomaleji reagujícího enantiomeru ( $\mu\text{mol/ml}$ ) v čase  $t$  (doba od zahájení reakce)

$V_A$  a  $V_B$  představují maximální rychlosti reakcí jednotlivých enantiomerů

$K_A$  a  $K_B$  představují Michaelisovy konstanty reakcí jednotlivých enantiomerů

### Výpočet $\alpha_R$ a $\alpha_S$ metodou lineární regrese

Regioselektivita hydrolyzy je definována regioselektivními koeficienty, které jsou vypočítávány z následující rovnice:

$$ee_p = \alpha_S - \alpha_R + (1 - \alpha_S - \alpha_R) * ee_s * (1-c) * c^{-1} \quad (\text{rov. 5})$$

,kde  $ee_p$ .....algebraická hodnota enantiomerního nadbytku vzniklého produktu (diolu)

$ee_s$ .....algebraická hodnota enantiomerního nadbytku substrátu (epoxidu)

$c$ .....stupeň konverze

$\alpha_S$  a  $\alpha_R$ .....regioselektivní koeficienty

Rov. 5. lze zjednodušeně přepsat do následujícího tvaru

$$Y = m * W + q \quad (\text{rov. 6})$$

, kde..... $q = \alpha_S + \alpha_R$

$$m = 1 - \alpha_S - \alpha_R$$

$$Y = ee_p$$

$$W = ee_s * (1 - c) / c$$

Vynesení Y proti W byl získán člen q (posun na ose y). Ze získaných hodnot pro člen q a m (směrnice přímky lineární regrese) bylo možno vypočítat regioselektivní koeficient  $\alpha_R$  dle následující vztahu:

$$\alpha_R = (1-m-q) / 2 \quad (\text{rov. 7})$$

### 3.9. Stanovení teplotní stability EH

0,175g enzymového precipitátu bylo rozpuštěno v 1,25 ml fosfátového pufru. Směs byla následně rozdělena do 5 mikrozkušavek po 250  $\mu$ l. Po 30 minutách kultivace při vybrané teplotě v rozmezí od 25°C do 50°C bylo z inkubovaných vzorků odebráno 200  $\mu$ l enzymové suspenze, která byla smíchána se 750  $\mu$ l 40 mM fosfátového pufru o pH 7,5 a 50  $\mu$ l substrátu. Reakce probíhala při 28°C po dobu 45 minut a konstantním

třepání na třepačce (200 ot./min.) Po proběhnutí reakce byly odebrány vzorky pro stanovení aktivity na plynovém chromatografu dle 3.5.

### **3.10. Stanovení teplotního optima EH**

Do mikrozkušavek bylo k 900 µl fosfátového pufru o pH 7,5 přidáno 50 µl substrátu a 50 µl supernatantu desintegrovaných buněk. Takto připravené reakční směsi byly inkubovány 45 minut při různých teplotách na vodní lázni. Po proběhnutí enzymové reakce byly z jednotlivých mikrozkušavek odebrány vzorky pro stanovení aktivity na plynovém chromatografu dle 3.5.

### **3.11. Stanovení pH stability EH**

Pro určení pH stability enzymu byl připraven univerzální pufr, skládající se z kyseliny citrónové a  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , u něhož byla měněna pouze hodnota pH a to v rozmezí 3-8. Pro určení pH stability enzymu při hodnotě pH 9 byl použit 0,1M TRIS pufr. Do jednotlivých mikrozkušavek bylo k 700 µl pufru o daném pH přidáno ještě 300 µl hrubého enzymového extraktu. Takto připravené roztoky byly po dobu 30 minut inkubovány při 28°C na třepačce (100 ot./min). Následně bylo odebráno z jednotlivých mikrozkušavek 50 µl, které byly přidány do reakční směsi složené z 900 µl 40 mM fosfátového pufru o pH 7,5 a 50 µl substrátu. Po proběhnutí enzymové reakce, která probíhala při 28°C po dobu 45 minut a konstantním třepáním na třepačce při 200 ot./min., byly odebrány vzorky pro stanovení aktivity na plynovém chromatografu dle 3.5.

### **3.12. Stanovení pH optima**

Pro stanovení pH optima byly použity pufrы o totožném složení i hodnot pH jako v případě stanovení pH stability.

Do jednotlivých zkumavek k 900 µl daného pufru přidáno ještě 50 µl hrubého enzymového extraktu a 50 µl substrátu. Takto připravené reakční směsi byly třepány na třepačce při 200 ot./min. při 28°C po dobu 45 minut. Po proběhnutí enzymové reakce byly z jednotlivých mikrozkušavek odebrány vzorky pro stanovení aktivity na plynovém chromatografu dle 3.5.



### 3.13. Dlouhodobá stabilita hrubého enzymového extraktu EH

Hrubý enzymový extrakt byl po dobu 10 dnů uchováván v polystyrénovém boxu naplněném ledovou tříští a to v místnosti temperované na +6°C. V průběhu 10 dnů byly průběžně odebírány 50 µl alikvotní vzorky. Alikvot byl vždy přidán do reakční směsi, tedy k 900 µl 40 mM fosfátového pufru o pH 7,5 a 50 µl substrátu. Po proběhnutí enzymové reakce, která trvala 45 minut a probíhala při 28°C a za konstantního třepání na třepačce (200 ot./min.), byl z reakční směsi odebrán vzorek pro stanovení aktivity dle 3.5.

### 3.14. Kultivace v míchaném bioreaktoru

**Inokulum:** Baňky s příslušným médiem o objemu 100 ml byly zaočkovány kulturou *E. coli* TOP10(pSEKau2), TOP10(pSEKau8), resp. *E. coli* RE3(pSEKau2) ve formě glycerinové suspenze a takto zaočkované médium bylo třepáno při 31°C po dobu 12 hodin a 190 ot./min. Kultivace probíhaly v 10 litrovém míchaném bioreaktoru v médiu o objemu 8l. Byly použity tři typy růstového média: Luria-Bertani (LB) médium pro kmen TOP 10, a pro kmen RE3 média označená jako médium I a II.

Během kultivací byly každou hodinu odebírány vzorky kultury pro měření optické density, suché hmotnosti biomasy a  $A_{\text{spec}}$ .

#### **Analýzy a zpracování vzorku:**

Po 24 hodinách kultivace byla celková biomasa oddělena centrifugací a následně rozsuspendována ve fosfátovém pufru o pH 7,5. Suspenze biomasy byla opět zcentrifugována a promytá biomasa byla vložena do polyethylenových sáčků a uchovávána při -70°C.

#### **Podmínky jednorázové kultivací v míchaném bioreaktoru:**

Bioreaktor s 8 l příslušného sterilního média byl inokulován 100 ml narostlé kultury na LB médiu a kultivace probíhaly za následujících podmínek. Pro kultivaci kmene TOP10(pSEKau2) a TOP10(pSEKau8) bylo použito LB médium o objemu 8l, pH média před započítím kultivace mělo hodnotu 7,2 a v průběhu kultivace nebylo jakkoliv regulováno. Počáteční teplota byla nastavena na 31°C a po 13. hodině kultivace byla snížena na 25°C. Koncentrace rozpuštěného O<sub>2</sub> v médiu (pO<sub>2</sub>) byla udržována na 20% hodnoty saturace média kyslíkem.

Rychlost míchání se pohybovala v rozmezí 300-840 ot./min. Kultivace probíhala po dobu 24 hodin s tím, že v 13. hodině byl přidán induktor IPTG a také 30 ml 45% vodného roztoku glukosy. Před zahájením samotné kultivace byl do média přidán ampicilin (100 µg/ml) a činidlo proti pění. Pro kultivaci kmene RE3(pSEKau2) byla použita Médium I a Médium II taktéž o objemu 8l. Hodnota pH médií před započítím kultivace mělo hodnotu 6,5 a na této hodnotě bylo udržováno v průběhu celé kultivační doby pomocí NH<sub>4</sub>OH. Počáteční teplota byla nastavena na 28°C a po 12. hodině kultivace byla snížena na 25°C. Koncentrace rozpuštěného O<sub>2</sub> v médiu (pO<sub>2</sub>) byla udržována na 20% hodnoty saturace média kyslíkem. Rychlost míchání se pohybovala v rozmezí 300-840 ot./min. shodně jako v případě kmene TOP10. Kultivace probíhala po dobu 24 hodin s tím, že v 12. hodině byl přidán induktor IPTG. Před zahájením samotné kultivace byl do média přidán ampicilin (100µg/ml) a činidlo proti pění.

#### **Indukce syntézy EH:**

Při kultivacích kmenů TOP10(pSEKau2), TOP10(pSEKau8), RE3(pSEKau2) byl do bioreaktoru jednorázově přidán induktor IPTG (finální koncentrace 0,45mM) v průběhu exponenciální růstové fáze.

#### **Podmínky přítokované kultivací v míchaném bioreaktoru:**

Bioreaktor s 8 l sterilního Média II byl inokulován 100 ml narostlé kultury na LB médiu a kultivace probíhala za následujících podmínek. Pro kultivaci kmene RE3(pSEKau2) bylo použito Médium II o objemu 8 l, pH média před započítím kultivace mělo hodnotu 7,4 a v průběhu kultivace bylo udržováno na hodnotě 6,7 NH<sub>4</sub>OH. Počáteční teplota byla nastavena na 28°C a po 13. hodině kultivace byla snížena na 25°C. Koncentrace rozpuštěného O<sub>2</sub> v médiu (pO<sub>2</sub>) byla udržována na 20% hodnoty saturace média kyslíkem. Rychlost míchání se pohybovala v rozmezí 300-840 ot./min. Kultivace probíhala po dobu 48 hodin s tím, že ve 12. a 25. hodině byl přidán induktor IPTG. Před zahájením samotné kultivace byl do média přidán ampicilin (100 µg/ml) a činidlo proti pění.

### **3.15. Měření optické density kultury (OD<sub>600</sub>)**

200 µl vzorku kultury bylo doplněno do objemu 2 ml deionizovanou vodou. Suspenze byla následně protřepána a optická densita byla změřena na přístroji Shimatsu UV 120-02 při vlnové délce  $\lambda = 600$  nm.

### **3.16. Měření suché hmotnosti biomasy**

2 ml vzorku odebraných do mikrozkuřavky byly centrifugovány (centrifuga Hettich Universal 16R, rotor Hettich 1614, 10000 ot./min.,  $t = 7$  min.,  $T = 9$  °C). Po supernatantu byl k peletě přidán 1 ml deionizované vody, peleta byla resuspendována a opět centrifugována. Takto připravený vzorek biomasy byl resuspendován v 200 µl deionizované vody a přenesen na předem zvažovanou hliníkovou misku. Po vysušení do konstantní hmotnosti ( $T = 105$  °C, 3 hod.) byla gravimetricky změřena suchá hmotnost.

### **3.17. Měření aktivity EH v průběhu kultivací**

2 ml vzorku byly centrifugovány (centrifuga Hettich Universal 16R, rotor Hettich 1614, 10000 ot./min.,  $t = 7$  min.,  $T = 9$  °C). Po odlití supernatantu byl k peletě přidán 1 ml 100 mM fosfátového pufru (pH 7,5). Poté byla peleta resuspendována a opět centrifugována. Po odlití supernatantu byl k peletě přidán tentýž objem 40 mM fosfátového pufru (pH 7,5). Po rozbití buněk ultrazvukem, přidáním 50 µl substrátu a proběhnutí enzymové reakce, byla u takto připravených vzorků stanovována aktivita na plynovém chromatografu, viz. 3. 5. .

### **3.18. Purifikace EH**

Pro purifikaci EH z hrubého enzymového extraktu byly použity 2 následující postupy:

- 1) - dialýza
  - ionexová chromatografie
- 2) rozdělovací rovnováha

Hrubý extrakt EH byl připraven dle 3.4. srážením  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

#### **3.18.1. Postup izolace 1:**

##### **Příprava dialyzačních střívek**

Nastříhané dialyzační střívko bylo nejdříve povařeno po dobu 10 minut v 2% roztoku

NaHCO<sub>3</sub> a 1mM roztoku EDTA. Poté byla střívka dvakrát promyta deionizovanou vodou s 1mM koncentrací EDTA, a v posledním kroku byla střívka povařena v 1mM roztoku EDTA po dobu 10 minut a po vychladnutí byla uchovávána ve 20% roztoku ethanolu. Před použitím byla dialyzační střívka propláchnuta deionizovanou vodou.

### **Dialýza**

Enzymová peleta získaná frakčním srážením byla rozpuštěna v 5 ml deionizované vody a suspenze byla přelita do dialyzačního střívka dlouhého 10-15 cm. Dialyzační střívko bylo vloženo do 1l TRIS pufru o pH 7,5 a dialýza probíhala za stálého míchání přes noc při +6°C.

Takto dialyzovaný enzymový roztok byl následující den přelit do nádobky s uzávěrem a uchováván v ledové tříšti.

### **Purifikace EH ionexovou chromatografií**

Byl zvolen anex s obchodním názvem Diaion DH25 L. Do zkumavek s uzávěrem bylo naváženo určité množství anexu, který byl ekvilibrován dvojnásobným množstvím TRIS pufru (pH 8,5) po dobu 12 hodin. Poté byl pufr odstraněn a dále bylo k anexu přidáno stejné množství enzymu a TRIS pufru (pH 8,5).

Takto připravená směs byla třepána při teplotě 23°C po dobu 1 hodiny.

Suspenze byla centrifugována na centrifuze Eppendorf a ze slitého supernatantu byly odebrány vzorky pro stanovení aktivity a koncentrace bílkovin.

K anexu byl přidán opět TRIS pufr a to ve stejném množství jako v prvním kroku. Suspenze byla opět třepána při 23°C, tentokrát po dobu 30 minut.

Po centrifugaci, odběru vzorků a odstranění supernatantu (viz. výše), byl k anexu přidán 1M fosfátový pufr (pH 5,5) ve stejném množství jako v předchozích krocích a směs byla třepána 30 minut při 23°C.

Tento krok byl proveden celkem dvakrát. Supernatanty z obou kroků obsahující EH byly uchovávány při 4°C.

### **3.18.2. Postup izolace 2:**

#### **Purifikace EH za použití dvoufázového vodného systému**

Pro purifikaci enzymu byl zvolen vodný dvoufázový systém typu polymer-sůl využívající PEG a citronan nebo fosforečnan (92).

Před použitím byla tato metoda následujícím způsobem optimalizována:

Optimalizace probíhala s PEG o třech různých molekulových hmotnostech ( $M_r = 1000, 3000, 6000$ ). Jako druhé hydrofilní rozpouštědlo byly použity citronan a fosforečnan s několika různými hodnotami pH. U nejperspektivnějšího složení byl proveden ještě experiment pro zjištění vlivu přítomnosti různých koncentrací NaCl.

Do zkumavek byla navážena vždy příslušná množství PEGu, citronanu, fosforečnanu, případně NaCl. K naváženým substancím bylo přidáno vždy určité množství deionizované vody, tak aby celková hmotnost obsahu zkumavky dosáhla 5,5g. V posledním kroku bylo do zkumavek přidáno 0,5g supernatantu suspenze buněk desintegrované ultrazvukem. Po důkladném promíchání obsahů zkumavek následovala centrifugace (centrifuga Universal Hettich 16R, rotor Hettich 1615, 12°C, 10000ot./min., 10 minut).

Z vytvořených fází byly dále odebrány vzorky pro stanovení koncentrace proteinů a přípravu vzorků pro stanovení enzymové aktivity plynovou chromatografií.

Na základě optimalizace bylo vybráno následné složení dvoufázového vodného systému: PEG 6000-citronan sodný (pH 7,7). Hmotnostní zlomek PEG v systému byl 14% a citronanu 13,5%.

### 3.18.3. Určení parametrů separace $K_E$ , $K_P$ a $PF$ , $SF$ , $Y_t$

Pro to, aby se dosáhlo efektivní separace enzymu, je za pomoci níže uvedených parametrů vyhodnocováno distribuční chování mezi jednotlivými fázemi.

Rozdělovací koeficient  $K_E$  je vypočítáván podle následující rovnice:

$$K_E = A_t/A_b \quad (\text{rov. 8})$$

, kde  $A_t$  značí enzymovou aktivitu v horní fázi a  $A_b$  představuje aktivitu enzymu v dolní fázi.

Obdobný rozdělovací koeficient pro koncentraci proteinu je vyjádřen následujícím vztahem:

$$K_P = P_t/P_b \quad (\text{rov. 9})$$

, kde  $P_t$  představuje koncentraci proteinu v horní a  $P_b$  v dolní fázi.

Faktor selektivity se vypočítává podle následujícího vztahu:

$$SF = K_E/K_P \quad (\text{rov. 10})$$

, kde  $K_E$  a  $K_P$  jsou rozdělovací koeficienty pro enzym a celkovou koncentraci proteinů.

Purifikační faktor (PF) je vypočítáván jako poměr mezi  $A_{\text{spec.}}$  enzymu v horní fázi a  $A_{\text{spec.}}$  enzymu v supernatantu sonikovaných buněk.

Výtěžek enzymu obsaženého v horní fázi ( $Y_t$ ) je vypočítáván podle následujícího vztahu:

$$Y_t = 100 * V_t * K_E / V_t * K_E + V_b \quad (\text{rov. 11})$$

, kde  $V_t$  a  $V_b$  představují objemy horní, resp. dolní fáze.

### **3.19. Polyakrylamidová gelová elektroforéza v prostředí SDS (SDS-PAGE)**

Ke 12  $\mu$ l vzorkům supernatantu desintegrovaných buněk byly přidány 3  $\mu$ l vzorkového pufru. Obdobně ke 12  $\mu$ l roztoku standardu byly taktéž přidány 3  $\mu$ l vzorkového pufru. Připravené roztoky byly krátce centrifugovány, povařeny ve vodní lázni po dobu 5 minut a přeneseny do jamek v elektroforetickém gelu (složení gelu viz. 3.2.) mikropipetou.

Elektroforéza probíhala při vloženém napětí 200 V.

Po ukončení elektroforézy (2 hodiny) byl gel na 1 hodinu vložen do barvicí lázně, a poté přenesen na 30 minut do odbarvovacího roztoku, který byl celkem čtyřikrát vyměněn. V konečné fázi byl gel ponořen do sušicího roztoku, překryt z obou stran folií a vysušen při laboratorní teplotě.

### **3.20. Imobilizace EH**

#### **3.20.1. Imobilizace EH na polyakrylamidové nosiče Eupergit C a C250L**

Do 10 ml zkumavky bylo postupně přidáno: 1 ml roztoku EH připraveného dvoufázovým vodním systémem, 1 ml fosfátového pufru (2M, pH 7,7) a nosič Eupergit C nebo C 250L v množství odpovídající dvacetinásobnému množství použitého proteinu. Množství nosiče a iontová síla fosfátového pufru byla optimalizována. Perspektivněji se jevil Eupergit C250L s nímž byly získány následující výsledky: Výtěžek imobilizace EH činil cca 19% , katalytická účinnost

měla hodnotu 37% katalytické účinnosti rozpustné EH Kau2 a aktivita vztažena na suchou váhu činila 4,4 U/g proteinu.

Následně byly zkumavky krátce protřepány, umístěny na třepačku v horizontální poloze a třepány při 50 ot./min. po dobu 24 hodin v klimatizované místnosti při 25°C.

Po 24 hodinách byly odebrány vzorky z obou fází pro stanovení aktivity EH a koncentrace bílkovin. Eupergit s navázaným enzymem byl dvakrát promyt 1 ml 40mM fosfátového pufru (pH 7,5). Zbylé epoxidové skupiny nosiče byly redukovány v přítomnosti 0,1M roztoku  $\beta$ -merkptoethanolu (po dobu 4 hod. při 4°C).

Takto imobilizovaný enzym byl použit pro stanovení parametrů katalyzátoru.

### **3.20.2. Imobilizace na polyakrylamidový nosič Sepabeads EC-EP**

Do 10 ml zkumavky bylo postupně přidáno: 1 ml roztoku EH připraveného dvoufázovým vodným systémem, 1 ml fosfátového pufru (2M, pH 7,5) a nosič Sepabeads EC-EP v množství odpovídající stonásobnému množství použitého proteinu.

Následně byly zkumavky krátce protřepány, umístěny na třepačku v horizontální poloze a třepány při 50 ot./min. po dobu 24 hodin v klimatizované místnosti při 25°C.

Po 24 hodinách byly odebrány vzorky z obou fází pro stanovení aktivity EH a koncentrace bílkovin. Sepabeads EC-EP s navázaným enzymem byl dvakrát promyt 1 ml 40mM fosfátovým pufrům (pH 7,5). Zbylé epoxidové skupiny nosiče byly redukovány v přítomnosti 0,1M roztoku  $\beta$ -merkptoethanolu (po dobu 4 hod. při 4°C).

Takto imobilizovaný enzym byl použit pro stanovení parametrů katalyzátoru.

### **3.20.3. Imobilizace na modifikované nosiče $\text{Cu}^{2+}$ ionty**

Modifikace epoxidových skupin nosičů  $\text{Cu}^{2+}$  ionty byla provedena následujícím způsobem: 5g navážky suchého nosiče bylo inkubováno v 9 ml roztoku 0,1M boritanu sodného/2M iminodioctové kyseliny (pH 9) při 25°C za velmi mírného míchání po dobu 3,6,12 a 15 hodin.

Takto ošetřený nosič byl dále inkubován v 30 ml deionizované  $\text{H}_2\text{O}$  obsahující 1g  $\text{CuSO}_4$ , a to za mírného míchání. Po 2 hodinách byl nosič pětkrát promyt nadbytkem deionizované  $\text{H}_2\text{O}$ .

Při použití modifikovaných nosičů je postup imobilizace shodný jako v případě nemodifikovaných nosičů, jen s tím rozdílem, že je třeba použít takovou koncentraci fosfátového pufru, aby výsledná koncentrace činila 10mM.

#### **3.20.4. Příprava zesíťných enzymových agregátů**

Supernatant po desintegraci buněk byl nejdříve v 60 ml kyvetě vysrážen do 90% nasycení pevným  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Centrifugací oddělená peleta (Eppendorf 5403, rotor 16F6-38, 10 min., 10000 ot./min.) byla resuspendována ve 20 ml připraveného 100 mM fosfátového pufru (pH 7,5). Po následné centrifugaci (15min., 7500 ot./min.) byl tento krok opakován ještě jednou. Poté byl k peletě přidán připravený fosfátový pufr do celkového objemu 10ml.

Po následné resuspendaci byl odebrán vzorek pro stanovení aktivity EH a koncentrace proteinů.

Do 2 ml mikrokumavky byl dán 1 ml sraženého a resuspendovaného hrubého extraktu a příslušné množství 25% vodného roztoku GDA ve dvojnásobném množství vůči použitému množství proteinu. Hodnota pH směsi byla upravena na 7,5 (20% KOH).



## 4. Výsledky

V 1. experimentální sérii měření enantioselektivity EH byl jako substrát enzymové reakce použit *tert*-butylglycidylether. Tento substrát byl použit pro srovnání vlastností našeho enzymu s jinými v literatuře popsányi EH. V dalších experimentech byla provedena měření s *para*-chlorostyrenoxidem, *para*-nitrostyrenoxidem a  $\alpha$ -methylstyrenoxidem.

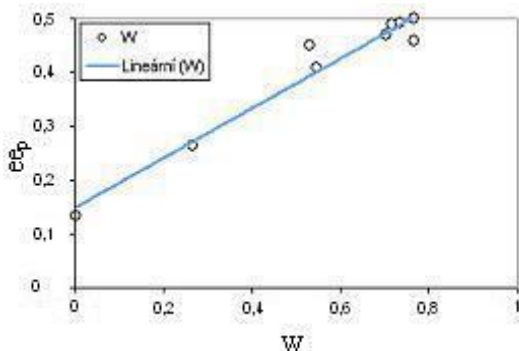
### 4.1. Charakterizace EH Kau8 a Kau2

Rekombinantní mikroorganismy *E.coli* TOP10(pSEKau2) a TOP10(pSEKau8) byly nakultivovány na LB médiu, biomasa desintegrována ultrazvukem a z 8 ml supernatantu byla EH vysrážena  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Takto připravený roztok obou enzymů byl použit pro charakterizaci enantioselektivních a regioselektivních vlastností EH. Charakterizace byla provedena s následujícími substráty: *tert*-butylglycidyletherem (Kau8 a Kau2), *para*-chlorostyrenoxidem (Kau8), *para*-nitrostyrenoxidem (Kau2),  $\alpha$ -methylstyrenoxidem (Kau8 a Kau2).

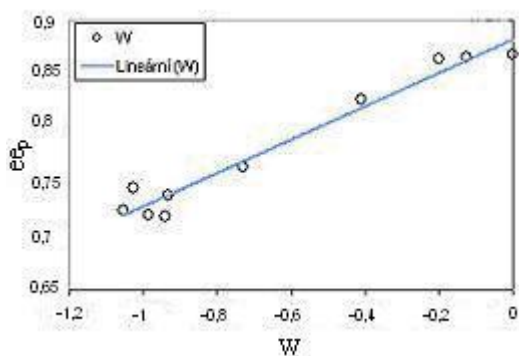
#### 4.1.1. Substrát *tert*-butylglycidylether

Pro Kau8 platí, že enantioselektivita enzymu vůči *tert*-butylglycidyletheru se pohybuje v blízkosti hodnoty 8, z čehož je patrné, že enantioselektivita enzymu vůči tomuto substrátu je nízká. Ještě nižší selektivita vůči enantiomerům substrátu byla pozorována u Kau2. Zde činila hodnota enantioselektivity přibližně 1,18.  $A_{\text{spec}}$  pro Kau8 činila 0,65 U/mg proteinu. Kau2 má  $A_{\text{spec}}$  0,475 U/mg proteinu.

#### 4.1.2. Substráty *para*-chlorostyrenoxid a *para*-nitrostyrenoxid



Obr. 7. Závislost enantiomerního nadbytku produktu ( $ee_p$ ) na parciálním enantiomerním nadbytku substrátu ( $W$ ), který je ovlivněn stupněm konverze. Rovnice přímky je  $y = 0,4625x + 0,1475$  při použití substrátu *para*-chlorostyrenoxidu a Kau8

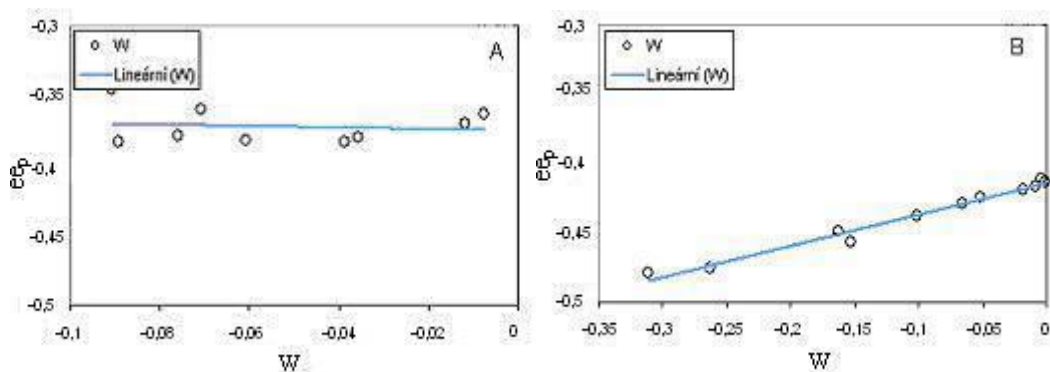


Obr. 8. Závislost enantiomerního nadbytku produktu ( $ee_p$ ) na parciálním enantiomerním nadbytku substrátu ( $W$ ), který je ovlivněn stupněm konverze. Rovnice přímky je  $y = 0,154x + 0,8816$  při použití substrátu *para*-nitrostyrenoxidu a Kau2

Pro Kau8 platí, že enantiosektivita enzymu vůči substrátu *para*-chlorostyrenoxidu se pohybuje v blízkosti hodnoty 14, což je více jak 75% nárůst nežli v případě *tert*-butylglycidyletheru. Koeficienty regioselektivity pro Kau8 vypočítané ze směrnice rovnice přímky (obr. 7) nabývaly hodnot 0,20 v případě  $\alpha_R$  a 0,34 v případě  $\alpha_S$ .  $A_{spec.}$  činila 0,55 U/mg proteinu.

Pro Kau2 platí, že enantiosektivita enzymu vůči substrátu *para*-nitrostyrenoxidu se pohybuje v blízkosti hodnoty 60. Koeficienty regioselektivity pro Kau2 vypočítané ze směrnice rovnice přímky (obr. 8) nabývaly hodnoty 0 v případě  $\alpha_R$  a v případě 0,86  $\alpha_S$ .  $A_{spec.}$  nabývala hodnoty 4,55 U/mg proteinu.

### 4.1.3. Substrát $\alpha$ -methylstyrenoxid



Obr. 9. Závislost enantiomerního nadbytku produktu ( $ee_p$ ) na parciálním enantiomerním nadbytku substrátu ( $W$ ) pro Kau8 (A), který je ovlivněn stupněm konverze. Rovnice přímky je  $y = -0,0513x - 0,3744$  (A) a pro Kau2 (B). Rovnice přímky je  $y = 0,2271x - 0,4138$ .

Pro Kau8 platí, že enantiosektivita enzymu vůči  $\alpha$ -methylstyrenoxidu se pohybuje v blízkosti hodnoty 1,5, a tak enantiosektivita enzymu vůči tomuto substrátu je velice nízká.  $A_{spec.}$  činí 0,27 U/mg proteinu. Koeficienty regioselektivity pro Kau8 vypočítané ze směrnice rovnice přímky (obr. 9A) nabývaly hodnot 0,71 v případě  $\alpha_R$  a 0,34 v případě  $\alpha_S$ . Pro tentýž substrát u Kau2 byla pozorována hodnota enantioselektivity přibližně 2,3. Pro Kau2 pak  $\alpha_R$  nabývala hodnot 0,59 a  $\alpha_S$  0,18 (obr. 9B).  $A_{spec.}$  nabývá hodnot 0,95 U/mg proteinu.

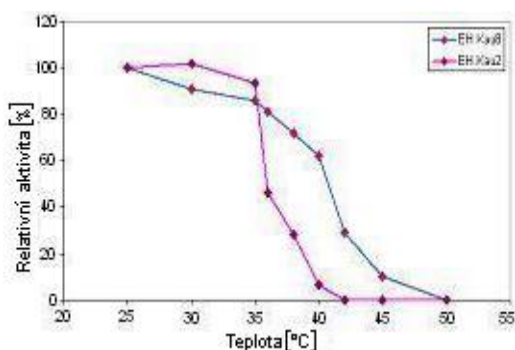
Experimentální měření pro EH Kau8 a substrát *para*-nitrostyrenoxid a EH Kau2 a *para*-chlorostyrenoxid probíhaly ve spolupráci s francouzskou laboratoří a jsou uvedeny v tab. 3 na následující straně, pohromadě s výsledky našimi.

Tab. 3. Hodnoty pro enantioselektivitu, specifickou aktivitu a regioselektivní koeficienty

	Enantioselektivita	$\alpha_R$	$\alpha_S$	$A_{\text{spec.}}$ [U/mg proteinu]
Kau8 + <i>para</i> -chlorostyrenoxid	14	0,2	0,34	0,55
Kau2 + <i>para</i> -chlorostyrenoxid	30	0,1	0,95	6,25
Kau8 + <i>para</i> -nitrostyrenoxid	60	0,04	0,24	0,48
Kau2 + <i>para</i> -nitrostyrenoxid	60	0	0,86	4,55
Kau8 + <i>tert</i> -butylglycidylether	8	0,65		
Kau2 + <i>tert</i> -butylglycidylether	1,18	0,475		
Kau8 + $\alpha$ -methylstyrenoxid	1,5	0,71	0,34	0,27
Kau2 + $\alpha$ -methylstyrenoxid	2,3	0,59	0,18	0,95

Po porovnání enantioselektivních a regioselektivních vlastností obou EH byla pro další práci zvolena Kau2.

#### 4.2. Teplotní stabilita Kau8 a Kau2



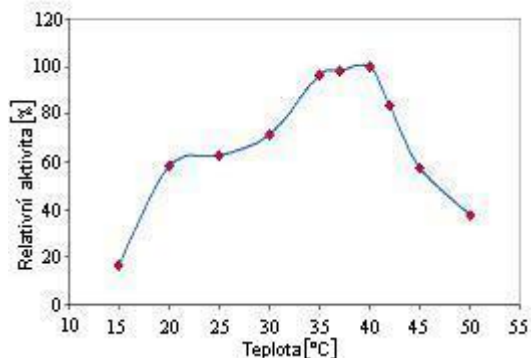
Obr. 10. Teplotní stabilita Kau2 a Kau8. Aktivita je uvedena jako relativní zbytková aktivita.

Stabilita aktivity byla pro oba enzymy sledována v teplotním rozmezí 25 – 50 °C, kdy enzym byl zvolené teplotě vystaven po dobu 30 minut.

U Kau2 v intervalu od 25 do 35 °C téměř k žádnému poklesu aktivity nedochází, nicméně v intervalu od 35 do 36 °C však dochází k prudkému poklesu aktivity přibližně o 60% (obr. 10). Se zvyšující se teplotou aktivita dále klesá. K úplné tepelné denaturaci enzymu docházelo při 42 °C.

Odlíšný průběh stability aktivity je patrný pro Kau8. V rozmezí teplot 25 – 40 °C je pokles aktivity plynulý oproti Kau2 a k úplné tepelné denaturaci dochází až při teplotě 50°C.

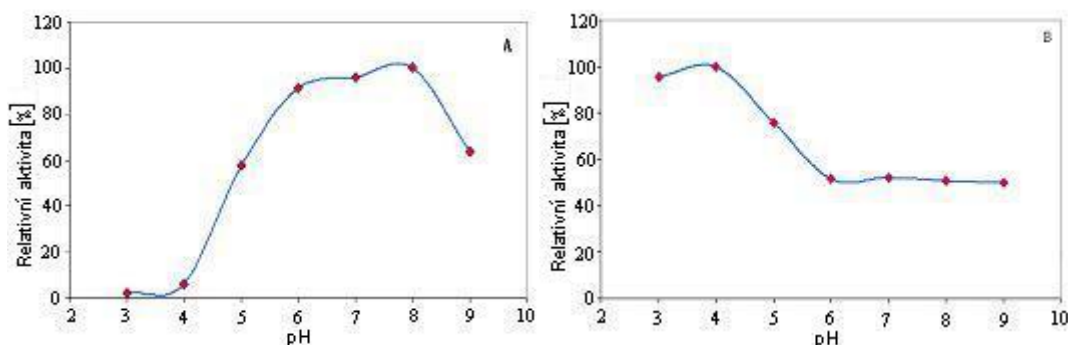
#### 4.3. Teplotní optimum Kau2



Obr. 11. Závislost aktivity Kau2 na reakční teplotě. Aktivita je uvedena jako relativní aktivita.

Teplotní optimum aktivity bylo pro enzym sledováno v teplotním rozmezí 15-50 °C. Aktivita narůstá v intervalu teplot 15-32°C. Z obr. 11 je patrné, že teplotní optimum Kau2 se nachází v rozmezí 32-40°C. Po překročení 40°C začíná aktivita prudce klesat.

#### 4.4. pH stabilita a pH optimum Kau2



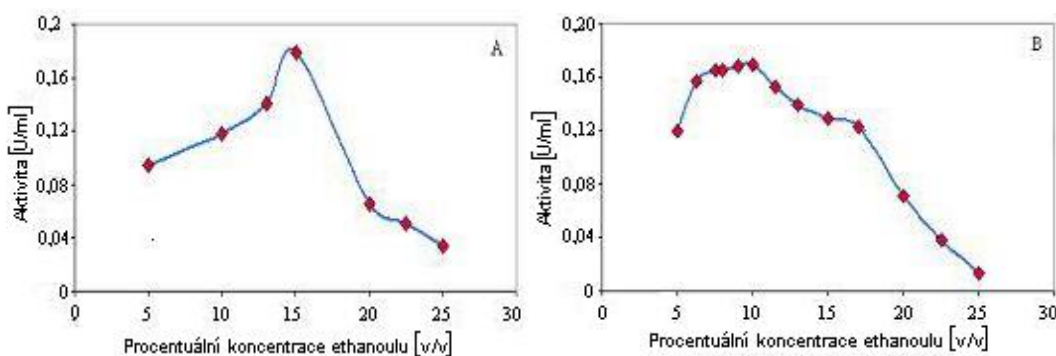
Obr. 12. Závislost enzymové aktivity Kau2 na pH: pH stabilita (A) a pH optimum (B).

Stabilita aktivity i pH optimum byla sledována v rozmezí pH 3-9. Z grafu pro pH stabilitu (obr. 12A) je zřejmé, že zbytková enzymová aktivita vzrůstá od hodnoty pH 4. V rozmezí pH 6-8 je aktivita Kau2 relativně stabilní, zatímco po překročení pH 8 již dochází ke značnému poklesu enzymové aktivity.

Z obr. 12B (str. 51) znázorňující pH optimum je patrná vysoká hodnota aktivity již při hodnotě pH 3-4. Po překročení pH 4 následně dochází k poklesu aktivity a mezi hodnotami pH 6-9 je aktivita konstantní. pH optimum se nachází v okolí pH 4.

#### 4.5. Stabilita Kau8 a Kau2 v přítomnosti ethanolu

Přítomnost organického rozpouštědla, v tomto případě ethanolu, v reakční směsi může pozitivně ovlivňovat aktivitu enzymu. V malých množstvích může ethanol plnit funkci ko-solventu.



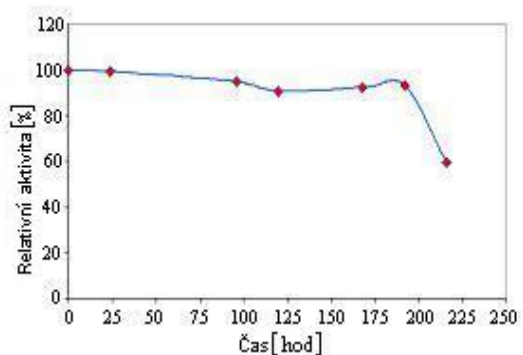
Obr. 13. Koncentrační efekt ethanolu na aktivitu Kau2 (A) a Kau8 (B) ve fosfátovém pufru (40mM, pH 7,5, 28°C, 5% ethanol) se styrenoxidem jako substrátem reakce.

Jak je znázorněno na obr. 13A, aktivita Kau2 prochází úzkým maximem při koncentraci ethanolu 15 % (obj.). Při této koncentraci ethanolu vzroste aktivita o 100%.

Z křivky popisující koncentrační efekt ethanolu na aktivitu Kau8 (obr. 13B) vyplývá, že při 7 % koncentraci ethanolu se zvýší aktivita enzymu o 25% a až do koncentrace 10% zůstává konstantní. Se zvyšující se koncentrací ethanolu pak dochází k lineárnímu poklesu enzymové aktivity. V momentě kdy reakční směs obsahuje 25 % ethanolu, činí enzymová aktivita přibližně pouze desetinu počáteční hodnoty aktivity enzymu.

#### 4.6. Dlouhodobá stability Kau2 při teplotě 0°C

Údaje o dlouhodobé stabilitě enzymu v podmínkách jeho uchovávání jsou velmi důležité pro studie zabývající se charakterizací vlastností enzymu. Supernatant desintegrovaných buněk byl uchováván v polystyrenovém boxu naplněném ledovou tříští při teplotě 0°C.



Obr. 14. Relativní aktivita Kau2 uchovávané při 0°C. Jako substrát pro stanovení aktivity byl použit styrenoxid.

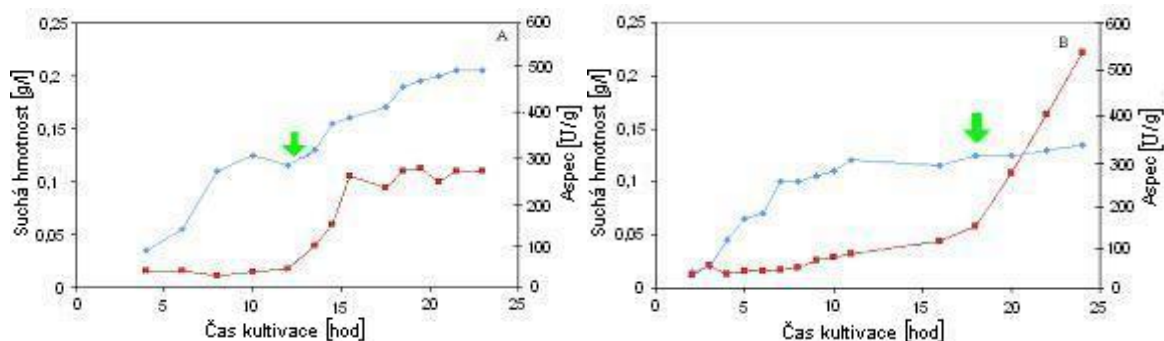
Z průběhu křivky charakterizující dlouhodobou stabilitu enzymu (obr. 14) je patrné, že Kau2 je za uvedených podmínek stabilní po dobu 8 dní. Mezi 8. a 9. dnem však již došlo k výraznému poklesu aktivity a to přibližně o 35%.

#### 4.7. Exprese EH v rekombinantních bakteriích kultivovaných v míchaném bioreaktoru

Kultivace v bioreaktorech byly prováděny za účelem získání dostatečného množství biomasy, které by postačovalo k izolaci EH v množstvích potřebných pro imobilizaci. V bioreaktoru byly kultivovány rekombinantní kmeny TOP10(pSEKau2), TOP10(pSEKau8) a RE3(pSEKau2) a syntéza enzymů byla indukována IPTG s cílem dosáhnout vysoké  $A_{spec}$ .

##### 4.7.1. Jednorázová kultivace rekombinantních kmenů TOP10 a indukce exprese EH

Kmen *E. coli* TOP10 je auxotrofní, a proto kultivace probíhaly v LB médiu. Oba kmeny byly kultivovány za identických podmínek s tím rozdílem, že induktor byl přidán do kultury TOP10(pSEKau2) ve 13. a do TOP10(pSEKau8) v 16. hodině. V obou případech bylo OD kultur kolem hodnoty 2,8.



Obr. 15. Časový průběh hodnot suché hmotnosti buněk (modrá křivka) a specifické aktivity EH vztažené na množství proteinu (červená křivka,  $A_{\text{spec}}$ ) během kultivace kmene *E. coli* TOP10(pSEKau2) (A) a TOP10(pSEKau8) (B) v míchaném bioreaktoru v LB médiu. Zelená šipka označuje přidání IPTG.

Z obr. 15A patřící Kau2 je patrný prudký nárůst  $A_{\text{spec}}$  až po 13. hodině, tedy v momentě, kdž byl do bioreaktoru přidán induktor IPTG. Ve 24. hodině kultivace bylo dosaženo  $A_{\text{spec}}$  300 U/g proteinu a suchá hmotnost buněk byla cca 1,4 g.

Tato kultivace byla dále zpracována: Kultivační kapalina byla centrifugována a oddělená biomasa promyta 6 l 100 mM fosfátovým pufrům (pH 7,5). Celkem bylo získáno 40g vlhké hmotnosti biomasy z celkového objemu kultury, který činil 6,97 l.

Z obr. pro Kau8 (obr.15B) je zřejmé, že po indukce IPTG v 16. hodině bylo dosaženo vyšší exprese EH:  $A_{\text{spec}}$ . Dosáhla hodnoty 550 U/g proteinu a suchá hmotnost buněk byla 0,945 g.

Biomasa byla z kultivační kapaliny oddělena odstředěním a po promytí a opětovném odstředění bylo získáno celkem 26g vlhké hmotnosti biomasy z celkového objemu kultury, který činil 6,92 l.

Z předchozí charakterizace Kau2 a Kau8 vyplynulo, že vhodnější vlastnosti vykazuje Kau2. Kromě toho, nárůst auxotrofního kmene TOP10 byl nízký. Proto další kultivace v bioreaktoru byly prováděny s prototrofním hostitelem *E. coli* RE3.

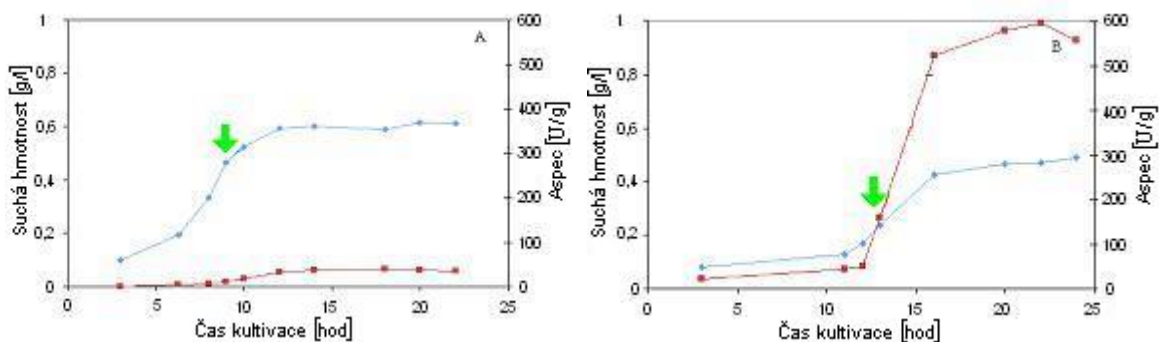
#### 4.7.2. Jednorázová kultivace kmene RE3(pSEKau2) a indukce exprese enzymu

Prototrofní hostitel *E. coli* RE3 roste na minerálním médiu doplněném sacharosou jako zdrojem C a energie.

Abychom získali maximální množství biomasy, kmen byl kultivován v minerálním Médium I (obr. 16B), které bylo navíc doplněno kvasničným autolyzátem (40 g/l, obr.



16A). Indukce syntézy EH byla provedena jednorázově, přidáním IPTG v 8., resp. 13. hodině kultivace.



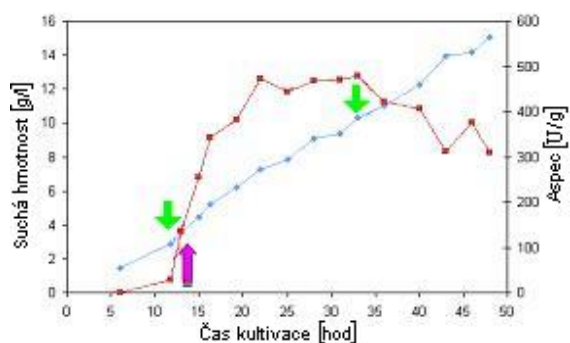
Obr. 16. Časový průběh hodnot suché hmotnosti buněk (modrá křivka) a specifické aktivity EH vztažené na množství proteinu (červená křivka,  $A_{\text{spec}}$ ) během kultivace kmene *E. coli* RE3(pSEKau2). Obr. A znázorňuje průběh kultivace v médiu doplněném kvasničným autolyzátem a obr. B kultivaci v médiu bez kvasničného autolyzátu. Zelená šipka označuje přidání IPTG.

Po zpracování kultury (viz. 4.7.1.) činila vlhká hmotnost biomasy narostlé v médiu s kvasničným autolyzátem 175 g. V případě kultury narostlé v médiu bez kvasničného autolyzátu činila vlhká hmotnost biomasy 141 g. V porovnání s předchozí kultivací rekombinantní *E. coli* TOP10 produkující Kau2, bylo získáno v obou kultivacích 3,5-4,5 krát více biomasy.

Doplnění média kvasničným autolyzátem zvýšilo nárůst biomasy, avšak výrazně snížilo produkci Kau2. V dalších experimentech jsme proto použili médium bez přídavku kvasničného autolyzátu.

#### 4.7.3. Přítokovaná kultivace kmene *E. coli* RE3(pSEKau2) s indukcí syntézy

Další kultivace kmene *E. coli* RE3(pSEKau2), jejíž průběh je zaznamenán na obr. 18 se od předchozích kultivací liší v provedení, neboť v tomto případě byl v průběhu kultivace dodáván zdroj uhlíku průběžně a doba kultivace byla prodloužena na 48 hodin.



Obr. 17. Časový průběh hodnot suché hmotnosti buněk (modrá křivka) a specifické aktivity EH vztažené na množství proteinu (červená křivka,  $A_{\text{spec.}}$ ) během kultivace kmene *E. coli* RE3(pSEKau2). Růžová šipka označuje čas spuštění přítoku, zelená šipka označuje přidání IPTG.

Z kultivace (obr. 17) je patrný prudký nárůst  $A_{\text{spec.}}$ , kdy byl přidán induktor do exponenciálně rostoucí kultury (12.hod.).  $A_{\text{spec.}}$  dále rostla po dobu 10 hodin, a poté zůstává 10 hodin konstantní. Ve 32. hod. kultivace bylo přidáno IPTG podruhé, zde však již k žádnému nárůstu nedošlo. Naopak, až do 48. hod. kultivace je patrný pokles  $A_{\text{spec.}}$  EH cca o 25%. Křivka znázorňující časový průběh suché hmotnosti buněk má od okamžiku zahájení přítoku lineární závislost. Po ukončení kultivace byla biomasa oddělena od média centrifugací a po promytí činila vlhká hmotnost biomasy 503 g. Oproti kultuře TOP10(pSEKau2) byl nárůst biomasy v této kultuře zvýšen přibližně 12 krát a objemová aktivita Kau2 dosahovala hodnoty 4500 U/l fermentační kapaliny. Souhrn kultivací použitých pro nadprodukcí Kau2 je uveden v tab. 4.

Tab. 4. Kultivace s *E. coli* TOP10(pSEKau2) a *E. coli* RE3(pSEKau2) použitými pro nadprodukcí Kau2

Typ kultivace	Hostitelský organismus	Použité kultivační médium	Aspec. [U/g]*	Doba kultivace od přidání IPTG	Vlhká hmotnost biomasy v době ukončení kultivace [g/l]
Jednorázová	TOP10	LB	280	11	2,1
Jednorázová	RE3	Médium I	40	13	6
Jednorázová	RE3	Médium II	580	13	5,1
Přítokovaná	RE3	Médium II	480	36	15,1

Poznámky:  $A_{\text{spec.}}$  Kau2 vztažená na vlhkou hmotnost biomasy v době ukončení kultivace

## 4.8 Purifikace EH

Jako purifikační metoda byl zvolen dvoufázový vodný systém ve složení polymer-sůl. Složení tohoto systému vycházelo z požadavku na široké aplikační využití a také na jeho ekonomickou dostupnost.

Volbě použití tohoto systému pro purifikaci předcházelo testování 2 jiných purifikačních systémů (viz. 3.18.1.), kterými se však EH nepodařilo purifikovat. Pro optimalizaci byla použita biomasa z přítokované kultivace kmene *E. coli* RE3(pSEKau2) v míchaném bioreaktoru s indukcí jeho syntézy (viz. 4.7.3, str. 55).

### 4.8.1. Optimalizace purifikace EH obsažené v supernatantu homogenizátu biomasy získané přítokovanou kultivací

Biomasa (13 g) byla homogenizována ultrazvukem v 11,5 ml 100 mM fosfátovým pufru (pH 7,5).

$A_{\text{spec.}}$  enzymu obsaženého v supernatantu homogenizátu biomasy po ukončení kultivace činila 480 U/g proteinu a  $A_{\text{spec.}}$  enzymu obsaženého v supernatantu biomasy po zmražení na  $-70^{\circ}\text{C}$  činila 1096 U/g proteinu.

Optimalizovanými parametry byly: Rozdělovací koeficienty ( $K_e$ ,  $K_p$ ), a purifikační faktor (PF) a aktivita Kau2 byla stanovena se substrátem styrenoxidem.

Nejlepších výsledků purifikace je dosaženo při následujícím složení: roztok PEGu o molekulové hmotnosti 6000 a roztok citronanu sodného o pH 7,7. Hmotnostní zlomek PEGu 6000 činí 14% celkové hmotnosti systému a hmotnostní zlomek citronanu sodného 13,5%. Purifikační faktor v tomto případě dosahuje hodnoty 2,6  $\pm$  0,3 a faktor  $K_e$  hodnoty 41,1 a faktor  $K_p$  hodnoty 0,42.  $A_{\text{spec.}}$  purifikovaného enzymu činila 2,85 U/mg proteinu. Výtěžek purifikace je uveden v tab. 5.

Takto přečištěný enzym byl použit pro imobilizaci.

Tab. 5. Výsledky purifikace supernatantu desintegrovaných buněk Kau2 při použití optimalizovaného dvoufázového systému

Vzorek	Celkový protein [mg]	Celková aktivita [U]	$A_{\text{spec}}$ [U/mg]	PF	Výtěžek [%]
SDB	20	22	1,1		100
ATPS	2,2 $\pm$ 0,1	6,27 $\pm$ 0,45	2,85 $\pm$ 0,3	2,6 $\pm$ 0,3	28,5 $\pm$ 2

Poznámky: SDB-supernatant desintegrovaných buněk, PUR-částečně purifikovaná EH dvoufázovým vodným systémem

Aktivita měřena se substrátem styrenoxidem

$A_{\text{spec.}}$  byla určována při teplotě  $28^{\circ}\text{C}$  a je vyjádřena jako U/mg proteinu

#### 4.9. Imobilizace EH

V této práci byly použity dvě imobilizační techniky: 1) zesílení enzymových agregátů pomocí činidla glutaraldehydu, který reaguje s NH<sub>2</sub> skupiny enzymu, a 2) kovalentní navázání molekul enzymu na epoxidové skupiny polyakrylamidových porézních nosičů, taktéž přes NH<sub>2</sub> skupiny enzymu.

První imobilizační technika žádné výsledky nepřinesla, neboť enzymová aktivita zesílených enzymových agregátů byla prakticky nulová.

Výsledky získané použitím druhé imobilizační techniky jsou uvedeny v tab. 6-9.

Byly použity tři různé komerčně dostupné nosiče, jmenovitě Eupergit C, Eupergit C250L a Sepabeads EC-EP. Rozdíly mezi jednotlivými nosiči spočívají zejména ve velikosti pórů polyakrylamidových kuliček. Nosič Sepabeads EC-EP byl navíc modifikován ionty Cu<sup>2+</sup> s cílem zvýšení hydrofobních interakcí.

Tab. 6. Výsledky imobilizace pro nosič Eupergit C

Název vzorku	Výtěžek imobilizace [%]	Katalytická účinnost Kau2 po imobilizaci [%]	Aspec. na vlhkou hmotnost [U/g]*	Aspec. na suchou hmotnost [U/g]*	Celkové proteiny [mg]	Imobilizované proteiny [%]
EUP1_0,5M(20x)	13,3±3,1	30,74	1,03±0,23	2,30	1,99	35,18
EUP1_0,5M(40x)	14,29±4	40,00	0,8±0,2	1,73	1,99	40,2
EUP1_0,5M(60x)	28,1±6,2	29,00	0,825±0,2	1,82	1,65	56,44
EUP1_0,5M(80x)	43,33±8,1	10,19	0,42±0,2	0,83	1,53	58,82
<b>EUP1_1M(20x)</b>	<b>15,39±5,1</b>	<b>31,00</b>	<b>1,18±0,2</b>	<b>2,73</b>	<b>1,99</b>	<b>37,69</b>
EUP1_1M(40x)	21,73±4,3	29,36	1,1±0,4	2,30	1,66	38,22
EUP1_1M(60x)	29,34±8	38,00	1,14±0,21	2,10	1,61	58,26

Poznámky: EUP1 je označován Eupergit C

1M a 0,5M je označení pro výslednou koncentraci použitých pufrů v imobilizační suspenzi

Čísla v závorkách označují násobně množství nosiče oproti vloženému množství proteinu

Katalytická účinnost je vyjádřena jako poměr mezi aktivitou imobilizovaného enzymu za použití substrátu styrenoxidu a aktivitou téhož množství rozpustné formy enzymu získaného po přečištění technikou ATPS.

Výtěžek imobilizace je vypočítáván jako rozdíl mezi celkovou aktivitou EH použité pro imobilizaci a aktivitou EH získanou po imobilizaci ze supernatantu po promytí.

\* A<sub>spec.</sub> byla určována při teplotě 28°C a je vyjádřena jako U/g proteinu

Tab. 7. Výsledky imobilizace pro nosič Eupergit C250L

Název vzorku	Výtěžek imobilizace [%]	Katalytická účinnost Kau2 po imobilizaci [%]	Aspec. na vlhkou hmotnost [U/g]*	Aspec. na suchou hmotnost [U/g]*	Celkové proteiny [mg]	Imobilizované proteiny [%]
EUP2_0,5M(20x)	18±4	31,08	1,48±0,290	3,40	1,99	35,18
EUP2_0,5M(40x)	26,31±6,2	37,43	1,4±0,2	3,10	2	55
EUP2_0,5M(60x)	33±6	44,19	1,3±0,19	2,70	2	58
EUP2_0,5M(80x)	45,61±8,13	45,62	1,332±0,24	2,65	1,53	58,82
<b>EUP2_1M(20x)</b>	<b>19±5</b>	<b>37,09</b>	<b>1,88±0,29</b>	<b>4,40</b>	<b>2,07</b>	<b>29,2</b>
EUP2_1M(40x)	29,88±7,2	21,96	1,2±0,2	2,50	1,57	54,01
EUP2_1M(60x)	31±6	35,02	1,14±0,21	2,50	1,58	57,73

Poznámky: EUP2 je označován Eupergit C250L

1M a 0,5M je označení pro výslednou koncentraci použitých pufrů v imobilizační suspenzi

Čísla v závorkách označují násobně množství nosiče oproti vloženému množství proteinu

\*  $A_{\text{spec.}}$  byla určována při teplotě 28°C a je vyjádřena jako U/g proteinu

V případě nosičů Eupergit C (tab. 6, str. 58) a Eupergit C250L (tab. 7) byla zkoušena různá množství navážky nosiče vzhledem k množství vloženého proteinu a molaritě použitého fosfátového pufru. Byly použity dva různě silné pufrы tak, aby výsledná imobilizační suspenze měla koncentraci 1M a 0,5M.

Nejvyšší  $A_{\text{spec.}}$  katalyzátorů obou typů nosičů bylo dosaženo při použití fosfátového pufru (pH 7,7) o výsledné koncentraci 1M při poměru nosič : proteiny = 20 : 1.

Výtěžek aktivity po imobilizaci v případě použití optimalizovaných podmínek a nosiče Eupergit C činí přibližně 1,93 %, v případě použití nosiče Eupergit C250L 3,1%.

Tab. 8. Výsledky imobilizace Kau2 na nosič Sepabeads EC-EP (SEPA) a  $\text{Cu}^{2+}$  aktivovaný Sepabeads EC-EP (SEPAM)

Název vzorku	Výtěžek imobilizace [%]	Katalytická účinnost Kau2 po imobilizaci [%]	Aspec. na vlhkou hmotnost [U/g]*	Aspec. na suchou hmotnost [U/g]*	Celkové proteiny [mg]	Imobilizované proteiny [%]
SEPA	23±6	26,00	0,34±0,1	0,81	2,1	42,55
SEPA 3x	15,71±4,1	18,56	0,0668±0,1	0,13	1,99	49,25
<b>SEPAM 6h.</b>	<b>82,18±11,2</b>	<b>13,10</b>	<b>0,57±0,19</b>	<b>1,30</b>	<b>1,99</b>	<b>32,78</b>
SEPAM 12h.	86,37±9	5,88	0,32±0,1	0,70	1,99	41,14
SEPAM 15h.	87,1±9	8,57	0,432±0,2	0,92	2,14	51,4

Poznámky: SEPA je označován nosič Sepabeads EC-EP

SEPAM xh. Je označován nosič Sepabeads EC-EP, jež byl aktivován po dobu x hodin

\*  $A_{\text{spec.}}$  byla určována při teplotě 28°C a je vyjádřena jako U/g proteinu

V případě nosiče Sepabeads EC-EP (tab. 8) se jako nejperspektivnější varianta jevila ta, kdy byl nosič ještě před samotnou imobilizací modifikován v přítomnosti  $\text{CuSO}_4$  po

dobu 6 hodin. Při imobilizaci byl použit 20mM fosfátový pufr o pH 7,7, a navážka nosiče vzhledem k množství proteinu byla 100 : 1 .

Výtěžek aktivity po imobilizaci v případě použití takto aktivovaného nosiče byl 4,6%.

Tab. 9. Výsledky imobilizace Kau2 na Eupergit C aktivovaný Cu<sup>2+</sup> ionty (EUP1M)

Název vzorku	Výtěžek imobilizace [%]	Katalytická účinnost Kau2 po imobilizaci [%]	Aspec. na vlhkou hmotnost [U/g]*	Aspec. na suchou hmotnost [U/g]*	Celkové proteiny [mg]	Imobilizované proteiny [%]
EUP1M 6h.	80,35±7,8	4,00	0,78±0,28	1,51	2	32,5
EUP1M 12h.	84,56±7,12	2,49	0,6±0,2	1,28	2	0,4

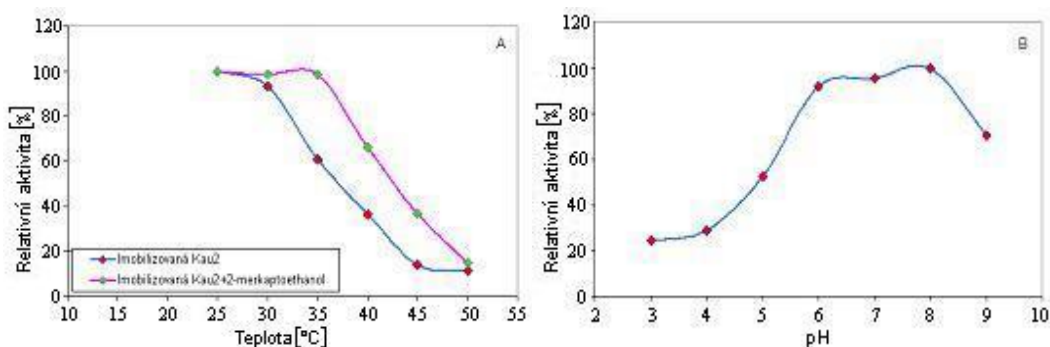
Poznámky: EUP1M xh. Je označován nosič Eupergit C, jež byl aktivován po dobu x hodin

\* A<sub>spec.</sub> byla určována při teplotě 28°C a je vyjádřena jako U/g proteinu

Obdobně jako nosič Sepabeads EC-EP, byl i Eupergit C aktivován Cu<sup>2+</sup> ionty (tab. 9) stejným způsobem. Imobilizace probíhala za totožných podmínek jako v případě nosiče Sepabeads EC-EP. I v experimentech s aktivovanými nosiči Cu<sup>2+</sup> ionty bylo dosaženo lepších výsledků s nosičem Eupergit C. Červeně je v tabulce vyznačena nejlepší varianta. Výtěžek aktivity po imobilizaci v případě použití takto aktivovaného nosiče a poměru nosič : protein = 20 : 1 byl 1,06%.

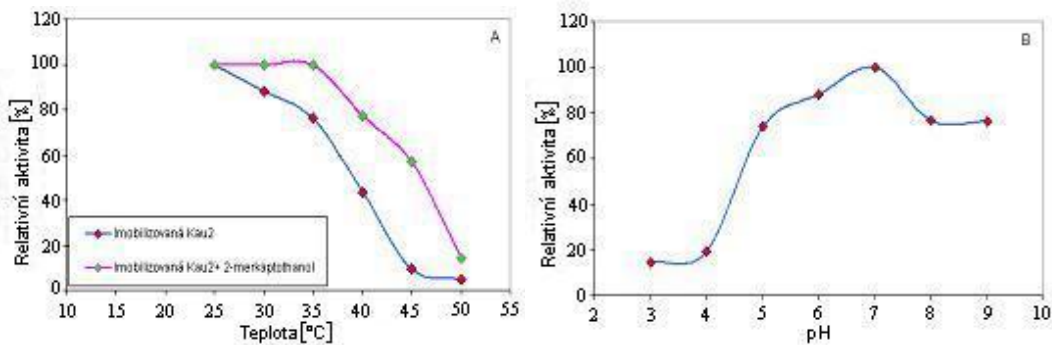
#### 4.10. Teplotní a pH stabilita Kau2 imobilizované na Eupergit C, Eupergit C250L a Sepabeads EC-EP

Teplotní stabilita imobilizované Kau2 byla sledována v pufru bez a po doplnění 2-merkapt ethanolu. Protože přídavek 2-merkapt ethanolu neovlivnil pH stabilitu imobilizované EH, je zde znázorněna jen jedna charakteristická křivka (viz. obr. 18B).



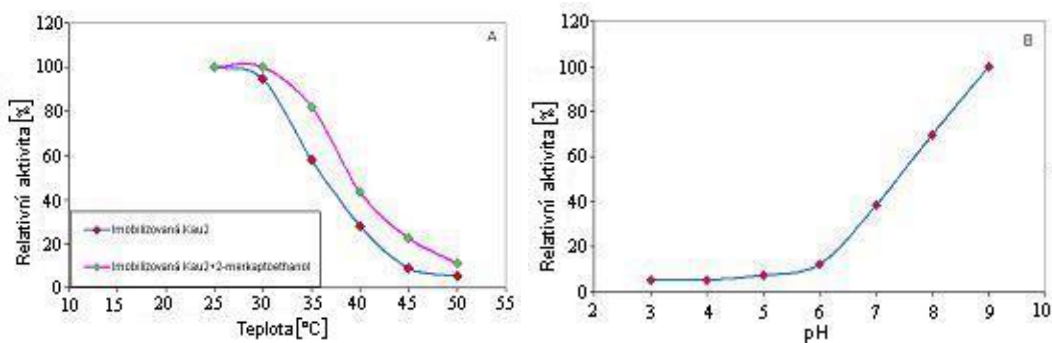
Obr. 18. Teplotní (A) a pH (B) stabilita. Aktivita je uvedena jako relativní zbytková aktivita stanovená za standardních podmínek se styrenoxidem jako substrátem.

Z výše uvedených obrázků je patrné, že při porovnání vlastností enzymu imobilizovaného na nosiči Eupergit C a rozpustného enzymu (viz. obr. 10, str.50) vzrůstá teplotní stabilita enzymu: enzym je stabilní do teploty 37°C v pufru doplněném 2-merkptoethanolem. pH stabilita imobilizovaného enzymu není významně ovlivněna (viz. obr. 12A, str.51).



Obr. 19. Teplotní (A) a pH (B) stabilita. Aktivita je uvedena jako relativní zbytková aktivita stanovená za standardních podmínek se styrenoxidem jako substrátem.

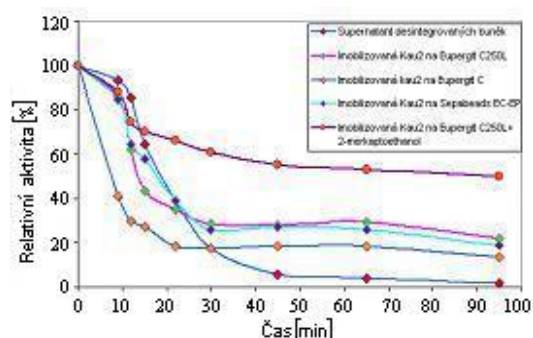
Při porovnávání vlastností rozpustného (viz. obr. 10, str.50) a imobilizovaného enzymu na nosiči Eupergit C250L (obr. 19A, 19B) je patrný rozdíl v teplotní stabilitě: zbytková aktivita imobilizovaného enzymu je rovna 100% až do teploty 37°C, poté následuje pokles enzymové aktivity podobně jako v případě imobilizace na Eupergit C. I v tomto případě přítomnost 2-merkptoethanolu zvyšuje stabilitu Kau2. pH stabilita imobilizovaného enzymu je menší, než u rozpustné formy: k poklesu enzymové aktivity dochází již za hodnotou pH 7, zatímco u rozpustné formy až za hodnotou pH 8 (viz. obr. 12A str.51)



Obr. 20. Teplotní (A) a pH (B) stabilita. Aktivita je uvedena jako relativní zbytková aktivita stanovená za standardních podmínek se styrenoxidem jako substrátem.

Charakteristiky enzymu imobilizovaného na nosiči Sepabeads EC-EP (obr. 20A, 20B) se v porovnání s rozpustnou formou enzymu (viz. obr. 10, str.50 a 12A, str.51 ) liší zejména v pH stabilitě: v rozmezí hodnot pH 3 – 6 je aktivita EH velmi nízká. K prudkému a téměř lineárnímu nárůstu enzymové aktivity však dochází v rozmezí hodnot pH 6 – 9. Z pohledu teplotní stability je křivka charakterizující tuto vlastnost velice podobná křivce rozpustné formy enzymu (viz.obr. 10, str.50 ), jen s tím rozdílem, že k poklesu enzymové aktivity dochází již od 30°C: při 45°C je aktivita v rozmezí 5-10%. V porovnání s rozpustnou formou enzymu je pokles enzymové aktivity imobilizované Kau2 pozvolnější. Kau2 imobilizovaná na Sepabeads EC-EP má nejnižší teplotní stabilitu ze všech sledovaných biokatalyzátorů.

Byla také testována stabilita imobilizovaného enzymu na všech nosičích z hlediska 95 minutové inkubace při teplotě 40°C. Nejvyšší stabilitu vykazoval enzym imobilizovaný na Eupergit C250L (obr. 21) .



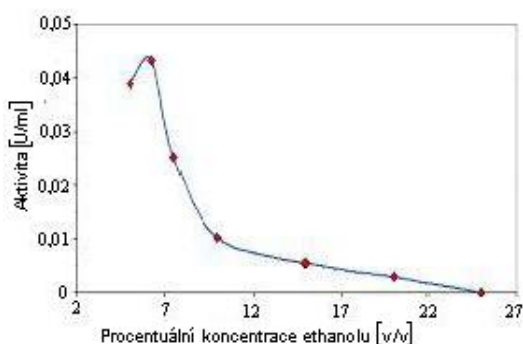
Obr. 21. Stabilita imobilizované Kau2 na jednotlivých nosičích při 95 minutové inkubaci při teplotě 40°C. Jako substrát enzymové reakce byl použit styrenoxid.

U enzymu navázaném na tomto typu nosiče dochází po 15 minutách inkubace k poklesu enzymové aktivity o 35 %, dále již docházelo jen k mírnému poklesu a enzym vykazoval poloviční aktivitu. Enzymová aktivita hrubého extraktu klesá a v 50. minutě je zbytková aktivita Kau2 rovna 5%.

Byla také sledována stabilita jak rozpustné, tak imobilizované formy EH v prostředí obsahujícím ethanol v množství 5-25 obj. % (obr. 22). Složení reakční směsi pro stanovení aktivity se styrenoxidem již ethanol v množství 5 obj. % obsahuje. Jak je patrné z obr. 22, reakční směsi dochází k lehkému nárůstu enzymové aktivity až do 6,5 obj. % ethanolu v reakční směsi. Při 7 obj. % ethanolu v reakční směsi dosahuje enzymová aktivita 65 % původní enzymové aktivity. Od 10 obj. % ethanolu v reakční



směsi, kdy enzymová aktivita je čtvrtinová, aktivita enzymu lineárně klesá až do 25 obj.% ethanolu. Při tomto množství již enzym nevykazuje žádnou aktivitu.



Obr. 22. Závislost enzymové aktivity imobilizované Kau2 na Eupergit C250L na koncentraci ethanolu v reakční směsi. Aktivita byla stanovena se substrátem styrenoxidem.

#### 4.11. Porovnávání enantioselektivit, regioselektivit a $A_{\text{spec}}$ imobilizované a rozpustné formy Kau2

Pro tato porovnání byl vybrán enzym Kau2 imobilizovaný na nosiči Eupergit C250L. Dále byla vybrána následující trojice substrátů: styrenoxid, *trans*-1-fenylpropen-oxid a *cis*-1-fenylpropen-oxid. Porovnávané hodnoty jsou shrnuty v tab. 10.

Tab. 10. Enantioselektivita, regioselektivita a  $A_{\text{spec}}$  rozpustné a imobilizované Kau2 na Eupergit C250L.

	styrenoxid			<i>trans</i> -1-fenylpropenoxid			<i>cis</i> -1-fenylstyrenoxid		
	Aspec. <sup>a</sup>	Enantioselektivita	ee <sub>p</sub> [%] <sup>b</sup>	Aspec.	Enantioselektivita	ee <sub>p</sub> [%]	Aspec.	Enantioselektivita	ee <sub>p</sub> [%]
rozpustná forma <sup>c</sup>	2,85	65±5	77	28	>200	65	1,48	10±1	>99
imobilizovaná forma	1,9	30±3	84	19	65±5	73	1	10±1	99

Poznámky: <sup>a</sup>  $A_{\text{spec}}$  byla určována při teplotě 28°C a je vyjádřena jako U/g proteinu (vlhké váhy)

<sup>b</sup> enantiomerní nadbytek produktu (ee<sub>p</sub>) byl určen při 100% konverzi reakce

<sup>c</sup> po purifikačním kroku dvoufázovým vodným systémem

V případě použití styrenoxidu byla hodnota enantioselektivity imobilizovaného enzymu dvakrát nižší v porovnání s rozpustnou formou enzymu.

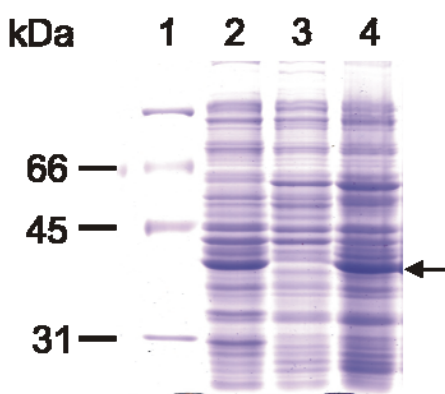
Procentuální hodnota enantiomerního nadbytku produktu je u imobilizovaného enzymu nepatrně vyšší, dosahuje hodnoty 84% oproti 77% a  $A_{\text{spec}}$  imobilizovaného enzymu činila 1,9 U/mg proteinu oproti 2,85 U/mg proteinu v případě rozpustné formy.

S *trans*-1-fenylpropenoxidem vykazoval imobilizovaný enzym třetinovou enantioselektivitu, procentuální hodnota enantiomerního nadbytku produktu u imobilizované formy činí 73% oproti 65% u rozpustné formy a  $A_{\text{spec.}}$  u imobilizovaného enzymu činí 19 U/mg proteinu, což je o 9 U/mg proteinu méně oproti rozpustné formě enzymu.

Při použití *cis*-1-fenylpropenoxidu, byla enantioselektivita imobilizovaného enzymu totožná s enantioselektivitou rozpustné formy enzymu. Procentuální hodnota enantiomerního nadbytku produktu činí 99%, a je shodná s hodnotou rozpustného enzymu. Hodnota  $A_{\text{spec.}}$  imobilizovaného enzymu činí 1U/mg proteinu oproti 1,45 U/mg proteinu v případě rozpustné formy enzymu.

#### 4.12. Expresse EH v hostiteli *E. coli* RE3

Důkaz nadprodukce EH v rekombinantních buňkách *E. coli* RE3 transformovaných plastidem pSEKau2 nebo pSEKau8 byl proveden SDS-PAGE. Na připravený gel byly nanášeny příslušné hrubé enzymové extrakty, které byly připraveny z biomas, jenž byly získány kultivacemi v bioreaktoru. Na obr. 23 je zobrazen výřez z elektroforetického gelu: přítomnost exprimovaného enzymu je patrná v drahách 2 (Kau8) a 4 (Kau2), zatímco v dráze 3 (samotný hostitel) zóna odpovídající EH chybí. Velikost enzymu EH je cca 40 kDa.



Obr. 23. SDS-PAGE extraktů obsahujících Kau2 a Kau8. Dráha 1-molekulová hmotnost standardu, dráha 2-RE3(pSEKau8), dráha 3-hostitel RE3 a dráha 4-RE3(pSEKau2). Šipka ukazuje na protein enzymu epoxidhydrolas o molekulové hmotnosti 40 kDa

## 5. Diskuze

Na základě již publikovaných prací je zřejmé, že enzym EH má jednak široké spektrum biologických funkcí a jednak je velice zajímavý i z hlediska přípravy opticky aktivních a chirálně selektivních látek.

Geny kódující EH Kau2 a Kau8 byly získány z environmentální DNA v laboratoři enzymových technologií v Mikrobiologickém ústavu Akademie věd České republiky, v.v.i.

Cílem této práce bylo porovnat a charakterizovat vlastnosti rozpustné a imobilizované formy tohoto enzymu.

Pro získání dostatečného množství EH, kterého bylo k experimentům zapotřebí, bylo třeba provést kultivace v míchaném bioreaktoru, kde bylo možno připravit dostatečné množství biomasy rekombinantních mikroorganismů, ve kterých je EH exprimována.

Byly použity 2 kmeny *E. coli*, a sice TOP10(pSEKau2) a *E. coli* RE3(pSEKau2). Hostitel TOP10 je auxotrof, zatímco hostitel RE3 je prototrof schopný růst v minerálním médiu doplněném zdrojem C a energie.

Jako médium pro kultivaci auxotrofního kmene *E. coli* TOP10 bylo zvoleno LB médium a to z toho důvodu, že se jedná o standardní bohaté médium pro kultivace rekombinantních auxotrofních mikroorganismů.

V míchaném bioreaktoru s pracovním objemem 8l kultury byly nejprve provedeny jednorázové kultivace rekombinantních mikroorganismů *E. coli* TOP10(pSEKau8), TOP10(pSEKau2).

V supernatantu desintegrovaných buněk z obou kultivací, který obsahoval enzym, byla stanovena enantioselektivita a regioselektivita EH Kau2 nebo Kau8. Pro charakterizaci enantioselektivity a regioselektivity rozpustných forem obou enzymů byly provedeny celkem 4 série měření a použity 4 různé substráty. V 1. sérii měření byl použit *tert*-butylglycidylether, a to pro porovnání vlastností enzymů s jinými v literatuře popsány EH (62). Ve 2. sérii byl použit *para*-chlorostyrenoxid, ve 3. sérii *para*-nitrostyrenoxid a v poslední sérii  $\alpha$ -metylstyrenoxid. Pro obě dvě EH byl vhodným substrátem *para*-nitrostyrenoxid (hodnoty charakteristických vlastností enzymů viz. odstavec 4.2).

Na základě porovnání získaných výsledků se jako zajímavější z hlediska enantioselektivity a regioselektivity jevil enzym Kau2: v porovnání s Kau8 vykazoval

Kau2 vyšší hodnoty  $A_{\text{spec.}}$  vůči všem zvoleným substrátům a v případě *para*-nitrostyrenoxidu byla pozorována enantiokonvergence, tedy úplná preference jednoho z enantiomerů racemické směsi substrátu. Z tohoto z toho důvodu byly veškeré další experimenty prováděny s tímto enzymem.

Vzhledem k nízké koncentraci biomasy, kterou bylo možno v bioreaktoru připravit v případě použití hostitele TOP10, byly provedeny kultivace prototrofního kmene RE3(pSEKau2). Byla zvolena modifikovaná zvolená média označená Médium I a II. (podmínky kultivací viz. odstavec 3.14) a v míchaném bioreaktoru byly provedeny dvě jednorázové a jedna přítokovaná kultivace. V přítokované kultivaci bylo dosaženo 12násobného množství biomasy a objemová aktivita EH se rovnala 4500 U/l fermentační kapaliny. Takto připravená biomasa byla použita pro izolaci EH Kau2 pro přípravu biokatalyzátoru.

Pro purifikaci byla vybrána ionexová chromatografie, kde jako ionex byl použit Diaion DH25L. Vzhledem ke skutečnosti, že bylo potřeba značné množství přečištěného enzymu, byla zvolena vsádková metoda. Bylo zjištěno, že tato metoda není pro purifikaci enzymu vhodná a EH se nepodařilo purifikovat. Ionex Diaion DH25L byl vybrán s ohledem na možnost rychlého získání potenciálního imobilizovaného biokatalyzátoru v případě, že by enzym po zachycení na ionexu vykazoval vysokou míru relativní aktivity.

Jako druhá purifikační metoda byl zvolen dvoufázový vodný systém, který vzniká smísením dvojice hydrofilních, vzájemně nemísitelných látek. V literatuře jsou popsány celkem 3 typy těchto systémů a to podle substancí, které byly použity při jejich přípravě: typ polymer-polymer, polymer-sůl a sůl-sůl. V našem případě byl zvolen typ polymer-sůl (92). Jako polymer byl vybrán PEG, který byl kombinován s fosfátem sodným nebo citronanem sodným. Složení systému bylo nejprve optimalizováno pro molekulovou hmotnost PEGu (1000, 3000, 6000) kDa, vhodnou hodnotu pH roztoku soli a v poslední řadě i pro procentuální zastoupení jednotlivých substancí. Optimalizace metody vycházela z literatury (93, 94, 95, 96).

Jak pro optimalizaci, tak pro samotnou purifikaci byla použita biomasa z přítokované kultivace kmene RE3(pSEKau2) (tab.4, str.55).

Jako nejvhodnější složení dvoufázového vodného systému se jevil roztok PEGu o molekulové hmotnosti 6000 a roztok citronanu sodného (pH 7,7). Hmotnostní zlomek polyethylenglykolu 6000 činil 14% celkové hmotnosti systému a hmotnostní zlomek citronanu 13,5% celkové hmotnosti systému. Při použití systému o tomto složení, byl

při purifikaci Kau2 ze supernatantu desintegrovaných buněk biomasy pocházející z přítokované kultivace docílen purifikační faktor 2,6 +/- 0,3 a výtěžek aktivity po purifikačním kroku činil 28,5%.  $A_{\text{spec.}}$  purifikovaného enzymu v případě použití biomasy z přítokované kultivace činila 2,85 U/mg proteinu. Rozdílné hodnoty  $A_{\text{spec.}}$  enzymu obsaženého v supernatantu homogenizátu po ukončení kultivace a v supernatantu biomasy uchovávané při  $-70^{\circ}\text{C}$  je možno vysvětlit skutečností, že takto nízká teplota napomáhá efektivnější desintegraci buněk.

Srovnání Kau2 s jinými takto přečištěnými EH však nebylo možné z důvodu, že takto byla purifikována EH poprvé.

Z hlediska využití enzymů je nutné enzym stabilizovat a zlepšit tak vlastnosti enzymu, jako např. teplotní a pH stabilitu. Pro stabilizaci EH byly použity dvě imobilizační techniky. První technikou bylo zesítnění enzymových agregátů prostřednictvím glutaraldehydu přes  $\text{NH}_2$  skupiny enzymu. Enzymové agregáty byly připraveny precipitací síranem amonným.

Tato technika nicméně nebyla vhodná, jelikož aktivita zesítněných enzymových agregátů byla nulová. Při srážení proteinů síranem amonným vznikaly agregáty enzymu, ale po přidání glutaraldehydu pro jejich zesítnění se agregáty rozpadly. Případná inhibice aktivity EH glutaraldehydem nebyla studována.

V důsledku negativních výsledků této imobilizační techniky byla zvolena druhá imobilizační technika, která spočívala na kovalentním navázání molekul enzymu přes  $\text{NH}_2$  skupiny aminokyselin na epoxidové skupiny polyakrylamidového nosiče.

Byla použita trojice komerčně dostupných nosičů: Eupergit C, Eupergit C250L a Sepabeads EC-EP. Rozdíl mezi jednotlivými nosiči spočíval především ve velikosti pórů jednotlivých nosičů.

Na základě literárních údajů (97) byla zkoušena různá množství navážky nosiče vzhledem k množství vkládaného proteinu a byly použity dva různě koncentrované fosfátové pufrы, tak aby výsledné imobilizační suspenze měly koncentraci 1M a 0,5M.

Jako nejvhodnější varianta pro přípravu biokatalyzátoru se jevil nosič Eupergit C250L, fosfátový pufr o výsledné koncentraci 1M a navážka nosiče vzhledem k množství proteinu v poměru byla 20:1 .

Výtěžek aktivity v tomto případě činil 3,1 % a katalytická účinnost cca 37,1 %.

$A_{\text{spec.}}$  na suchou hmotnost činila 4,4 U/g proteinu.

Podle literatury bylo ještě možné část epoxidových skupin aktivovat  $\text{Cu}^{2+}$  ionty a tím zvýšit vazebnou kapacitu ionexu pro protein. Aktivaci provedli C. Mateo a spol.

(85) a týkala se nosičů Sepabeads EC-EP a Eupergit C. Cílem této aktivace bylo zvýšit hydrofóbní charakter interakce mezi epoxidovými skupinami nosiče a  $\text{NH}_2$  skupinami EH. U takto aktivovaného nosiče byl pro imobilizaci použit 10mM fosfátový pufr, tedy pufr o podstatně nižší koncentraci nežli u neaktivovaných nosičů.

Nosič Sepabeads EC-EP byl aktivován po dobu 3, 6, 12 a 15 hodin. Nejúspěšnější imobilizace byla zjištěna po aktivaci nosiče po dobu 6 hodin. Oproti neaktivovanému nosiči Sepabeads EC-EP, u aktivovaného Sepabeads EC-EP (15 hodin aktivace) vzrostla vazebná kapacita pro protein o 22%. Stejná aktivace byla uskutečněna také s nosičem Eupergit C. V porovnání s neaktivovaným Eupergit C byla však  $A_{\text{spec}}$  (vztaženo na suchou hmotnost) biokatalyzátoru 55%. Z tohoto důvodu již aktivace nosiče Eupergit C 250L prováděny nebyly.

Podmínky pro imobilizaci Kau2 na Sepabeads EC-EP a jeho aktivovanou formu byly zvoleny na základě literárních údajů (98) a liší se od podmínek pro nosiče na bázi Eupergitu. Z tohoto důvodu je  $A_{\text{spec}}$  biokatalyzátorů typu Sepabeads EC-EP maximálně třetinová. Pro studium stability aktivity EH byl zvolen imobilizovaný enzym na nosiči Eupergit C250L a  $A_{\text{spec}}$  4,4 U/g proteinu.

U připravených biokatalyzátorů byla zjišťována zejména teplotní a pH stabilita. Dle literatury byl pro určení pH stability byl použit univerzální pufr v rozmezí pH 3-8 (99). Oba parametry byly porovnávány se stabilitami rozpustné formy Kau2.

Při porovnání zjištěných parametrů v případě imobilizace na nosič Eupergit C bylo zjištěno, že imobilizovaný enzym ztrácí aktivitu již při 35°C a aktivita zvolna klesá až k teplotě 45°C, kdy se relativní aktivita rovná 40 % původní hodnoty. Rozpustná forma enzymu ztrácí aktivitu prudce v teplotním intervalu 35-36°C a to skokově. Rozdíly v pH stabilitě jsou minimální.

Po imobilizaci na nosič Eupergit C250L dochází k poklesu aktivity na poloviční aktivitu v intervalu teplot 37-42°C, dále enzymová aktivity klesá jen pozvolna. Imobilizací na tento nosič je teplotní stabilita výrazně zvýšena.

Co se týče enzymu imobilizovaném na nosiči Sepabeads EC-EP, který je modifikován  $\text{Cu}^{2+}$  ionty, teplotní stabilita imobilizovaného enzymu není vyšší ve srovnání s rozpustnou formou enzymu. Je však patrný rozdíl v pH stabilitě imobilizované a rozpustné formy EH: aktivita rozpustné formy enzymu vykazuje vyšší stabilitu v oblasti hodnot pH 3-6.

Z pohledu dlouhodobé stability biokatalyzátoru a volného enzymu při 95 minutové inkubace imobilizované při teplotě 40°C se jako nejlepší jevil nosič Eupergit

C250L: po počátečním poklesu enzymové aktivity o 35 % (do 15. minuty) aktivita dále klesá již pozvolna. Relativní aktivita rozpustné EH činí po 50 minutách inkubace 5 % původní enzymové aktivity. zatímco aktivita rozpustné formy enzymu po 15. minutě také klesá, ale v 50. minutě inkubace činí relativní aktivita 5% původní enzymové aktivity.

Taktéž byla zjišťována stabilita aktivity jak rozpustné, tak imobilizované formy enzymu vzhledem k přítomnosti organického rozpouštědla, v tomto případě ethanolu, v reakční směsi.

Aktivita rozpustné formy enzymu vzrůstá až do momentu, kdy reakční směs obsahuje 15 obj. % ethanolu. Při dalším zvyšování koncentrace ethanolu dochází již k poklesu enzymové aktivity, a v 25 obj.% ethanolu činí enzymová aktivita pouze 25% počáteční hodnoty.

Oproti tomu u imobilizované formy enzymu je patrná konstantní enzymová aktivita až do 6,5 obj. % ethanolu. Po přidání dalšího množství ethanolu však dochází k razantnímu poklesu aktivity enzymu: při 25 obj. % ethanolu v reakční směsi dochází k úplné ztrátě enzymové aktivity. Studium stability aktivity EH v přítomnosti ethanolu nebylo v literatuře popsáno.

Pro porovnání enantioselektivních vlastností rozpustné a imobilizované formy enzymu byla zvolena trojice substrátů: styrenoxid, *trans*-1-fenylpropenoxid a *cis*-1-fenylpropenoxid. Enantioselektivity imobilizovaného a rozpustného enzymu se mění v závislosti na studované racemické směsi substrátu: při použití styrenoxidu je poloviční v porovnání s rozpustnou formou enzymu, u *trans*-1-fenylpropenu je třetinová a u *cis*-1-fenylpropenu je shodná.

Enantiokonvergence, tedy úplná preference jednoho z enantiomerů z racemické směsi, se imobilizací příliš nemění.

Následující kombinaci, použití dvoufázového vodného systému pro purifikaci enzymu a následná imobilizace takto purifikovaného enzymu, nebyla dosud publikována v žádné literatuře. Vzhledem ke skutečnosti, že první imobilizační technika přinesla negativní výsledky, byla zvolena druhá imobilizační technika, nicméně se nepodařilo kvantitativně vyvázat veškerý vložený protein, resp. enzym, a to ani v případě mnohonásobného nadbytku nosiče vůči vloženému proteinu. Je zde proto s výhledem do blízké budoucnosti na místě uvažovat, jakým způsobem se pokusit izolovat purifikovaný enzym od PEGu a imobilizační postupy zopakovat s tímto izolovaným enzymem.

## 6. Souhrn

- V míchaném bioreaktoru byly provedeny kultivace rekombinantních mikroorganismů *E. coli* TOP10(pSEKau8), TOP10(pSEKau2) – v obou případech se jednalo o jednorázovou kultivaci a RE3(pSEKau2) – provedena dvakrát jednorázová a jedenkrát přítokovaná kultivace. Syntéza enzymů byla indukována IPTG a nejvyšší objemové EH aktivity 4500 U/l bylo dosaženo v přítokované kultivaci rekombinantního kmene RE3(pSEKau2).
- V supernatantu desintegrovaných buněk z kultivací v bioreaktoru byla stanovena enantiosektivita a regiosektivita dvojice EH (Kau2 a Kau8) pro substráty: *tert*-butylglycidylether, *para*-chlorostyrenoxid, *para*-nitrostyrenoxid,  $\alpha$ -methylstyrenoxid. Nejvyšších hodnot enantiosektivity a regiosektivních koeficientů bylo dosaženo s enzymem Kau2 a substrátem *para*-nitrostyrenoxidem. Další experimenty byly prováděny s enzymem Kau2.
- Pro purifikaci enzymu Kau2 ze supernatantu desintegrovaných buněk byla optimalizována metoda zakládající se na vytvoření dvoufázového vodného systému, který vzniká smísením dvojice hydrofilních, vzájemně nemísitelných látek: systém PEG6000-citronan sodný (pH 7,7). V tomto systému bylo dosaženo hodnoty purifikačního faktoru 2,6 +/- 0,3.
- Purifikovaný enzym byl imobilizován následujícími způsoby:
  - 1) vytvořením zesíťovaných enzymových agregátů pomocí glutaraldehydu
  - 2) kovalentním navázáním enzymu na epoxidové skupiny polyakrylamidového nosiče přes NH<sub>2</sub> skupiny enzymu.Katalyzátor připravený technikou č. 1 měl aktivitu nulovou.
- Pro kovalentní vazbu Kau2 byly použity komerční nosiče Eupergit C, Eupergit C250L a Sepabeads EC-EP, lišící se zejména velikostí pórů částic nosičů. Nejvyšší A<sub>spec.</sub> bylo dosaženo při použití nosiče Eupergit C250L. Po optimalizaci imobilizačních podmínek byly získány následující hodnoty: Katalytická účinnost 37,1 % a A<sub>spec.</sub> na suchou



hmotnost 4,4 U/g proteinu. Výtěžek aktivity po imobilizaci činil 3,1 % (poměr nosič : protein = 20 : 1)

- Katalyzátor Kau2 na nosič Eupergit C250L vykazoval zvýšenou teplotní stabilitu: Po 95 minutách inkubace při teplotě 40°C činí relativní aktivita 50 %, zatímco u rozpustné formy enzymu již v 50. minutě inkubace docházelo ke ztrátě 95 % počáteční enzymové aktivity.

## 7. Seznam použité literatury:

- 1) Chacos, N., Capdevilla, J., Falck, J.R., Manna, S., Martin-Wixtrom, C., Gill, S.S., Hammock, B.D., Estabrook, R.W.: *Arch. Biochem. Biophys.* 223, 639 – 648 (1983)
- 2) Davis, B.B., Thompson, D.A., Howard, L.L., Morisseau, Ch., Hammock, B.D., Weiss, R.H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 2222-2227 (2002)
- 3) Van Loo, B., Kingma, J., Arand, M., Wubboltz, M.G., Janssen, D.B.: *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 2905-2917 (2006)
- 4) Barth, S., Fischer, M., Schmid, R.D., Pleiss, J.: *Proteins* 55, 846-855 (2004)
- 5) Arand, M., Hemmer, H., Durk, H., Baratti, J., Archelas, A., Furstoss, R., Oesch, F.: *Biochem. J.* 344, 273 – 280 (1999)
- 6) Arand, M., Grant, D.F., Beetham, J.K., Friedberg, T., Oesch, F., Hammock, B.D.: *FEBS Lett.* 338, 251-256 (1994)
- 7) Adams, J.D., Jr., Yagi, H., Lewin, W., Jerina, D.M.: *Chem. Biol. Interact.* 95, 57-77 (1995)
- 8) Moussou, P., Archelas, A., Baratti, J., Furstoss, R.: *Tetrahedron Asymmetry* 9, 1539-1547 (1998)
- 9) Kotík, M., Štěpánek, V., Grulich, M., Kyslík, P., Archelas, A.: *J. Mol. Catal., B Enzym.*(2010). doi 10.1016/j.molcatb.2010.01.016
- 10) Kroutil, W., Mischitz, M., Plachota, P., Faber, K.: *Tetrahedron Lett.* 37, 8379-8382 (1996)
- 11) Pedragosa-Moreau, S., Archelas, A., Furstoss, R.: *Tetrahedron* 52, 4593-4606 (1996)
- 12) Blée, E., Schuber, F.: *Eur. J. Biochem.* 230, 229-234 (1995)
- 13) Bellucci, G., Chiappe, C., Cordoni, A., Marioni, F.: *Tetrahedron Lett.* 35, 4219-4222 (1994)
- 14) Astrom, A., Eriksson, M., Eriksson, L.C., Birberg, W., Pilotti, A., DePierre, J.W.: *Biochim. Biophys. Acta* 882, 359 – 366 (1986)
- 15) Pace-Asciak, C., Lee, W.-S.: *J. Biol. Chem.* 264, 9310-9313 (1989)
- 16) Haeggstrom, J.Z., Wetterholm, A., Medina, J.F., Samuelsson, B.: *Adv. Prostaglandin. Thromboxane Leukot. Res.* 22, 3-12 (1994)
- 17) Meijer, J., DePierre, J.W.: *Chem. Biol. Interact.* 64, 207–249 (1988)
- 18) Thomas, H., Schladt, L., Doehmer, J., Knehr, M., Oesch, F.: *Environ. Health Perspect.* 88, 49–55 (1990)

- 19) Shou, M., Gonzalez, F.J., Gelboin, H.V.: *Biochemistry* 35, 15807–15813 (1996)
- 20) Vogel-Bindell, U., Bentley, P., Oesch, F.: *Eur. J. Biochem.* 126, 425-431 (1982)
- 21) Morisseau, Ch., Beetham, J.K., Pinot, F., Debernard, S., Newman, J.W.,  
Hammock, B.D.: *Arch. Biochem. Biophys.* 378, 321-332 (2000)
- 22) Kollattukudy, P.E.: *Annu. Rev. Plant Physiol.* 32, 539-567 (1981)
- 23) Weijers, C.A.G.M., de Bont, J.A.M.: *J. Mol. Catal., B Enzym.* 6, 199-214 (1999)
- 24) Nardini, M., Ridder, I.S., Rozeboom, H.J., Halk, K.H., Rink, R., Janssen, D.B.,  
Dijkstra, B.W.: *J. Biol. Chem.* 274, 14579–14586 (1999)
- 25) Zou, J., Hallberg, B.M., Bergfors, T., Oesch, F., Arand, M., Mowbray, S.L., Jones,  
T.A.: *Structure* 8, 111–122 (2000)
- 26) Argiriadi, M.A., Morriseau, C., Hammock, B.D., Chritianson, D.W.: *Proc. Natl.  
Acad. Sci. U. S. A.* 96, 10637–10642 (1999)
- 27) Ollis, D.L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S.M., Harel,  
M., Remington, S.J., Silman, I., Schrag, J., Sussman, J.L., Verscheuren, K.H.G.,  
Goldman, A.: *Protein Eng.* 5, 197–211 (1992)
- 28) Arand, M., Hemmer, H., Durk, H., Baratti, J., Archelas, A., Furstoss, R., Oesch,  
F.: *Biochem. J.* 344, 37-43 (1999)
- 29) Arand, M., Cronin, A., Adamska, M., Oesch, F.: *Meth. Enzymol.* 400, 569-588  
(2005)
- 30) Nardini, M., Rink, R., Janssen, D.B., Dijkstra, B.W.: *J. Mol. Catal., B Enzym.* 11,  
1035 - 1042 (2001)
- 31) Beetham, J.K, Grant, D, Arand, M., Garbarino, J., Kiyosuke, T., Pinot, F., Oesch,  
Belknap, W.R., Schinozaki, K., Hammock, B.D.: *DNA Cell Biol.* 14, 61-71 (1995)
- 32) Gomez, G.A., Morisseau, Ch., Hammock, B.D., Christiansson, D.W.,  
*Biochemistry* 43, 4716-4723 (2004)
- 33) Argiriadi, M.A., Morisseau, Ch., Hammock, B.D., a Christiansson, D.W.: *Proc.  
Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 10637-10642 (1999)
- 34) Cronin, A., Mowbray, S., Durk, H, Homburg, S., Fleming, I., Fissthaler, B.,  
Oesch, F., Arand, M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.* 100, 1552-1557 (2003)
- 35) Verschueren, K.H.G., Seijeé, F., Rozeboom, H.J., Dijkstra, B.W.: cit dle 38
- 36) Arand, M., Wagner, H., Oesch, F.:cit dle 38
- 37) Schiott, B., Bruice, T.C.: cit dle 38
- 38) Morisseau, Ch., a Hammock, B.D.: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 311-333  
(2005)

- 39) Chen, Ch.-S., Fujimoto, Y., Girdankas, G., Sih, Ch.J.: *J. Am. Chem. Soc.* 104, 7294-7299 (1982)
- 40) Pfister, S.L., Falck, J.R., Campbell, W.B.: cit dle 41
- 41) Fang, X., Kaduce, T.L., Weintraub, N.L., Harmon, S., Teesch, L.M., Morisseau, Ch., Thompson, D.A., Hammock, B.D., Spector, A.A.: *J. Biol. Chem.* 276, 14867-14874 (2001)
- 42) Sinal, C.J., Miyata, M., Tohkin, M., Nagata, K., Bend, J.R., Gonzalez, F.J.: *J. Biol. Chem.* 275, 40504–40510 (2000)
- 43) Yu, Z., Xu, F., Huse, C.M., Morisseau, C., Draper, A.J., Newman, J.W., Parker, C., Graham, L., Engler, M.M., Hammock, B.D., Zeldin, D.C., Kroetz, D.L.: *Circ. Res.* 87, 992–998 (2000)
- 44) Lee, C.R., North, K.E., Bray, M.S., Fornage, M., Seubert, J.M., Newmann, J.W., Hammock, B.D., Couper, D.J., Heiss, G., Zeldin, D.C.: *Hum. Mol. Genet.* 15, 1640-1649 (2006)
- 45) DuTeaux, S.B., Newmann, J.W., Morisseau, Ch., Fairbairn, E.A., Jelks, K., Hammock, B.D., Miller, M.G.: *Toxicol. Sci.* 78, 187-195 (2004)
- 46) DuTeaux, S.B., Hengel, M.J., DeGroot, D.E., Jelks, K.A., Miller, M.G.: *Biol. Reprod.* 69, 771–779 (2003)
- 47) Hammock, B.D., Ota, K.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 71, 254-265 (1983)
- 48) Chasseaud, L.F.: *Adv. Cancer. Res.* 29, 185-274 (1979)
- 49) Lu, A.Y., Miwa, G.T.: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 20, 513-531 (1980)
- 50) Guengerich, F.P.: *Arch. Biochem. Biophys.* 409, 59-71 (2003)
- 51) Gill, S.S., Ota, K., Hammock, B.D.: *Anal. Biochem.* 131, 273-282 (1983)
- 52) Hayakawa, M., Sugiyama, S., Takamura, T., Yokoo, K., Iwata, M., Suzuki, K., Taki, F., Takahashi, S., Ozawa, T.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 137, 424–430 (1986)
- 53) Moghaddan, M.F., Grant, D.F., Cheek, J.M., Green, J.F., Williamson, K.C., Hammock, B.D.: *Nat. Med.* 3, 562-566 (1997)
- 54) Fukushima, A., Hayakawa, M., Sugiyama, S., Ajioka, M., Ito, T., Satake, T., Ozawa, T.: *Carsiovasc. Res.* 22, 213–218 (1988)
- 55) Dudda, A., Spiteller, G., Kobeet, F.: *Chem. Phys. Lipids* 82, 39-51 (1996)
- 56) Finney, N.S.: cit dle 53
- 57) Archelas, A., Furstoss R.: *Curr Opin Chem Biol* 5, 112-119 (2001)
- 58) Swaving, J., DeBont, J.A.M.: *Enzyme Microb. Technol.* 22, 19-26 (1998)

- 59) Ng, J.S., Przybyla, C.A., Liu, C., Yen, J.C., Muellner, F.W., Weyker, C.L.:  
Tetrahedron 51, 6397 – 6410 (1995)
- 60) Archelas, A.: J. Mol. Catal., B Enzym. 5, 79-85 (1998)
- 61) Archelas A., Delbecque, J.-P., Furstoss, R.: Tetrahedron Asymmetry 4, 2445-2446  
(1993)
- 62) Kotík, M., Břicháč, J., Kyslík, P.: J. Biotechnol. 120, 364-375 (2005)
- 63) Morisseau, Ch., Goodrow, M.H., Dondy, D., Zheng, J., Greene, J.F., Sanborn, J.R.,  
Hammock, B.D.: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96, 8849-8854 (1999)
- 64) Argiriadi, M.A., Morisseau, Ch., Goodrow, M.H., Dondy, D.L., Hammock, B.D.,  
Christianson, D.W.: J. Biol. Chem. 275, 15265-15270 (2000)
- 65) Davis, B.B., Thompson, D.A., Howard, L.L., Morisseau, Ch., Hammock, B.D.,  
Weiss, R.H.: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99, 2222-2227 (2002)
- 66) Morisseau, Ch., Du, G., Newmann, J.W., Hammock, B.D.: Arch. Biochem.  
Biophys. 356, 214-228 (1998)
- 67) Robbins, D.K., Wedlung, P.J., Kuhn, R., Baumann, R.J., Levy, R.H., Chang, S.-  
L.: Br J Clin Pharmacol 29, 759-762, (1990)
- 68) Draper, A.J., Hammock, B.D.: Toxicol. Sci. 52, 26-32 (1999)
- 69) Kasagami, T., Kim, I.-H., Tsai, H.-J., Nishi, K., Hammock, B.D., Morisseau, Ch.:  
Bioorg. Med. Chem. Lett. 19, 1784-1789 (2009)
- 70) Taylor, S.J., Soleymanzadeh, F., Eldrup, A.B., Farrow, N.A., Muegge, I.,  
Kukulka, A., Kabcenell, A.K., DeKombaert, S.: Bioorg. Med. Chem. Lett. 19,  
5864-5868 (2009)
- 71) Rodríguez-Valera, F.: FEMS Microbiol. Lett. 231, 153-158 (2004)
- 72) Kotrba, P., Uhlík, O., Ječná, K., Macková, M., Macek, T.: Chem. Listy 102, 960-  
968 (2008)
- 73) Pace, N.R., Stahl, D.A., Lane, D.J., Olsen, G.J.: Adv. Microb. Ecol. 9, 1 (1986)
- 74) Courtois, S., Cappellano, C.M., Ball, M., Francou, F.X., Normand, P., Helynck,  
G., Martinez, A., Kolvek, S.J., Hopke, J., Osburne, M.S., August, P.R., Nalin, R.,  
Guérineau, M., Jeannin, P., Simonet, P., Pernodet, J.L.: Appl. Environ. Microbiol.  
69, 49-55 (2003)
- 75) Rondon, M.R., August, P.R., Bettermann, A.D., Brady, S.F., Grossman, T.H.,  
Liles, M.R., Loiacono, K.A., Lynch, B.A., MacNeil, I.A., Minor, C., Tiong, C.L.,  
Gilman, M., Osburne, M.S., Clardy, J., Handelsman, J., Goodman, R.M.: App.  
Environ. Microbiol. 66, 2541-2547 (2000)

- 76) Treusch, A.H., Kletzin, A., Raddatz, G., Ochsenreiter, T., Quaiser, A., Meurer, G., Schuster, S.C., Schleper, C.: *Environ. Microbiol.* 6, 970-980 (2004)
- 77) Venter, J.C., Remington, K., Heidelberg, J.F., Halpern, A.L., Rusch, D., Eisen, J.A., Wu, D., Paulsen, D., Nelson, K.E., Nelson, W., Fouts, D.E., Levy, S., Knap, A.H., Lomas, M.W., Nealson, K., White, O., Peterson, J., Hoffman, J., Parsons, R., Baden – Tillson, H., Pfannkoch, C., Rogers, Y.H., Smith, H.O.: *Science* 304, 66-74 (2004)
- 78) Cao, L.: *Curr. Opin. Chem. Biol.* 9, 217-226 (2005)
- 79) Faber, K., Franssen, M.C.R.: *Trends Biotechnol.* 11, 461–478 (1993)
- 80) Bes, M.T., Gomez-Moreno, C., Guisan, J.M., Fernandez-Lafuente, R.: *J. Mol. Catal., A Chem.* 98, 161-169 (1995)
- 81) Klivanov, A.M.: *Adv. Appl. Microbiol.* 29, 1–28 (1982) cit. dle 82
- 82) Mateo, C., Palomo, J.M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J.M., Fernandez-Lafuente, R.: *Enzyme Microb. Technol.* 40, 1451-1463 (2007)
- 83) Boller, T., Meier, Ch., Menzler, S.: *Org Process Res Dev* 6, 509-519 (2002)
- 84) Poltorak, O.M., Chukhray, E.S., Torskin, I.Y.: cit dle 82
- 85) Mateo, C., Fernandez – Lorente, G., Abian, O., Fernandez – Lafuente, R., Guisan, J.M.: *Biomacromolecules* 1, 739-745 (2000)
- 86) Mateo, C., Abian, O., Fernandez – Lafuente, R., Guisan, J.M.: *Enzyme Microb. Technol.* 26, 509-515 (2000)
- 87) Berger, B., Faber, K.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1198-1200 (1991)
- 88) Katchalski – Katzir, E., Kramer, D.M.: *J. Mol. Catal. B., Enzym.* 10, 157-176 (2000)
- 89) Kněževic-Jugovic, Z.D., Damnjanovic, J.J., Bezdradica, D.I., Mijin, D.Ž.: *Chem. Industr. Chem. Eng. Quart.* 14, 245-249 (2008)
- 90) Grant, S.G.N., Jessee, J., Bloom, F.R., Hanahan, D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 4645-4649 (1990)
- 91) Sobotková, L., Grafková, J., Štěpánek, V., Vacík, T., Marešová, H., Kyslík, P.: *Folia Microbiol.* 44, 263-266 (1999)
- 92) Albertsson, P.A.: cit dle Benavides, J., Aguilar, O., Lapizco-Encinas, B.H., Rito-Palomares, M.: *Chem. Eng. Technol.* 31, 838-845 (2008)
- 93) Chouyyok, W., Wongmongkol, N., Siwarungson, N., Prichanont, S.: *Process Biochem* 40, 3514-3518 (2005)
- 94) Marcos, J.C., Fonseca, L.P., Ramalho, M.T., Cabral, J.M.S.: *J. Chromatogr. B*

- 734, 15-22 (1999)
- 95) Tubío, G., Pellegrini, L., Nerli, B.B., Picó, G.A.: J Eng Chem Data 51, 209-212 (2006)
- 96) Haghtalab, A., Mokhtarani, B.: Fluid Phase Equilib 215, 151-161 (2004)
- 97) Hernaiz, M.J., Crout, D.H.G.: Enz. Microb. Technol. 27, 26-32 (2000)
- 98) Mateo, C., Fernandez-Lafuente, R., Archelas, A., Guisan, J.M., Furstoss, R.: Tetrahedron Asymmetry 18, 1233-1238 (2007)
- 99) McIlvaine, T.C.: J. Biol. Chem. 49, 183-186 (1921)

