

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Autoreferát disertační práce

**Studium funkce a molekulární architektury  
fungálních nitrilas využitelných v biokatalýze**

**Mgr. Alicja Barbara Veselá**

Školitel: Ing. Ludmila Martínková, CSc.

Praha 2015

## Abstrakt

Nitrilasy jsou enzymy katalyzující hydrolyzu nitrilů na příslušné karboxylové kyseliny a amonné ionty. Tyto enzymy mohou nalézt využití v biokatalýze a bioremediaci pro vyšší nenáročnost, bezpečnost a jednoduchost takto katalyzovaných reakcí před konvenčními metodami hydrolyzy nitrilů.

V této práci byly pomocí metody prohledávání databází vybrány sekvence hypotetických fungálních nitrilas. Jako templáty posloužily aminokyselinové sekvence fungálních nitrilas již dříve charakterizovaných v naší laboratoři. Následně byly nové syntetické geny spolu se zbylými geny z naší nitrilasové knihovny exprimovány v *E. coli* a poté byly porovnány jejich substrátové specificity a podobnost sekvencí.

Arylacetonitrilasy z hub *Arthroderma benhamiae* (NitAb) a *Nectria haematococca* (NitNh) byly purifikovány a charakterizovány; byly stanoveny jejich substrátové specificity, kinetické parametry, pH a teplotní profily a velikost podjednotek.

NitAb a NitNh spolu s dalšími rekombinantními fungálními nitrilasami byly použity pro hydrolyzu vysokých koncentrací (*R,S*)-mandelonitrilu v jedné dávce nebo s postupným dávkováním substrátu. Ze studovaných enzymů nitrilasa z *Aspergillus niger* vykázala nejlepší enantioselektivitu (e.e. pro (*R*)-mandlovou kyselinu až 97,6 %) a produktivitu enzymu v sušině (až 40 g g<sub>suš</sub><sup>-1</sup>).

NitAb byla pouze mírně enantioselektivní, čehož se však dá v kombinaci s její stabilitou při nízkém pH využít pro produkci (*S*)-mandlové kyseliny.

Soubor našich rekombinantních fungálních arylacetonitrilas byl rovněž testován na schopnost hydrolyzovat ( $\pm$ )-*trans*-2,4-difenyl-4,5-dihydrooxazol-5-karbonitril (příslušná karboxylová kyselina je prekurzorem taxolu, jež se používá jako protinádorové léčivo). Všechny enzymy dosáhly plné konverze 1 mM substrátu během 1 nebo

22 hodin. Nitrilasa z houby *Neurospora crassa* byla nejvíce aktivní a byla použita při preparativní přípravě  $(\pm)$ -*trans*-2,4-difenyl-4,5-dihydrooxazol-5-karboxylové kyseliny.

## Abstract

Nitrilases are enzymes which catalyze the hydrolysis of a nitrile into the corresponding carboxylic acid and ammonia. These enzymes are potentially applicable in biocatalysis and bioremediation because of their advantages over the conventional (chemical) methods of nitrile hydrolysis (lower demand for energy, safety, simplicity, high yields, selectivity).

In this work, genome mining was used to search for the sequences of hypothetical nitrilases from filamentous fungi. The amino acid sequences of previously characterized fungal nitrilases were used as the templates. Then the new synthetic genes together with other genes from our nitrilase library were expressed in *E. coli* and the substrate specificities of the enzymes thus produced were compared. Significant attention was focused on the relationships between the sequence of the enzyme and its substrate specificity.

The arylacetonitrilases from *Arthroderma benhamiae* (NitAb) and *Nectria haematococca* (NitNh) were purified and characterized. Their substrate specificities, kinetic parameters, pH and temperature profiles and subunit and holoenzyme size were assessed.

NitAb and NitNh together with other recombinant fungal nitrilases were employed in the hydrolysis of high concentrations of (*R,S*)-mandelonitrile in a batch or fed-batch mode. Nitrilase from *Aspergillus niger* displayed the best results in enantioselectivity, enabling to prepare (*R*)-mandelic acid with 97.6 % e.e., and in catalyst productivity of 40 g of the product per g of dry cell weight. NitAb displayed a moderate enantioselectivity, which, together with its stability at low pH, make it applicable in the production of (*S*)-mandelic acid from (*S*)-mandelonitrile.

A set of recombinant fungal arylacetonitrilases was tested in hydrolysis of ( $\pm$ )-*trans*-2,4-diphenyl-4,5-dihydrooxazole-5-carbonitrile. The corresponding carboxylic acid is a precursor of taxol, an anti-cancer drug. All tested enzymes displayed a complete conversion of 1

mM substrate within 1-22 hours. Nitrilase from *Neurospora crassa* was the most active and was thus used for the preparative-scale synthesis of ( $\pm$ )-*trans*-2,4-diphenyl-4,5-dihydrooxazole-5-carboxylic acid.

# 1 Úvod

Anorganické kyanidy a nitrilové sloučeniny jsou rozšířené v životním prostředí, buďto v přírodní formě nebo jako následek lidské činnosti. Hlavním zdrojem těchto sloučenin v půdě a vodě je vypouštění odpadních vod (Baxter a Cummings, 2006). Přírodní kyanidy a nitrily byly nalezeny v cca. 3 000 druhů mikroorganismů, hub, rostlin a živočichů, a to převážně ve formě kyanogenních glykosidů (Gupta a kol., 2010).

V živých organismech se kyanidy a nitrily degradují několika cestami, tj. oxidací, redukcí, substitucí nebo hydrolýzou (Legras a kol., 1990; Ebbs, 2004).

Enzymová hydrolýza je nejvíce prozkoumanou drahou degradace nitrilů. Může k ní dojít v jednom kroku, katalyzovaném nitrilasou, nebo ve dvou krocích, katalyzovaných nitrilhydratasou a amidasou (Banerjee a kol., 2002). Kyanid je transformován kyanidhydratasami (KHT) na formamid nebo kyaniddihydratasami (KDH) na kyselinu mravenčí.

Nitrilasy spolu s KHT a KDH mají v aktivním centru stejnou katalytickou triádu Glu-Lys-Cys a patří do 1. větve nitrilasové superrodiny enzymů (O'Reilly a Turner, 2003; Pace a Brenner, 2001). Další společnou vlastností těchto enzymů je terciární struktura podjednotky a tendence tvořit helikální oligomery (Thuku a kol., 2009).

Nitrilasy (EC 3.5.5.1) katalyzují hydrolýzu nitrilů na příslušné karboxylové kyseliny a amoniak. Tyto enzymy se hojně vyskytují jak v prokaryotech, tak v eukaryotech (Thuku a kol., 2009). V závislosti na preferované struktuře substrátu se nitrilasy dělí na alifatické, aromatické a arylalifatické. Poslední skupina je zvláště zajímavá pro případné využití v biokatalýze a to zejména kvůli své schopnosti hydrolyzovat  $\alpha$ -substituované arylalifatické nitrily stereoselektivně (Kobayashi and Shimizu, 1994; Martínková and Křen, 2010).

Při reakcích katalyzovaných nitrilasami někdy dochází k tvorbě amidu jako vedlejšího produktu. To se zdá být způsobeno přítomností substituentu odebírajícího elektrony na  $\alpha$ -uhlíku, nízkou teplotou, vysokým pH nebo reakcí s méně preferovaným enantiomerem substrátu (Fernandes a kol., 2006). Avšak mutanty nitrilas se zvýšenou schopností tvořit amid mohou být využity k produkci opticky čistých amidů (Kiziak a Stoltz, 2009).

Nitrilasy byly zatím nejvíce studovány v bakteriích. Zde je nejčastějsím bakteriálním zdrojem aromatických nitrilas řád *Rhodococcus* (Banerjee a kol., 2002). Alifatické nitrilasy byly nalezeny u bakterií z řádu *Pseudomonas*, *Alcaligenes* a *Halomonas* (Martíková a Křen, 2010). řada těchto enzymů byla použita k produkci kys. nikotinové, opticky čité kys. (R)- nebo (S)-mandlové, kys. glykolové a dalších sloučenin v laboratorním měřítku (Gong a kol., 2012).

Nitrilasy z hub *Aspergillus niger* a *Fusarium solani* byly rovněž použity k biokatalytické produkci kys. nikotinové a isonikotinové (Kaplan a kol., 2006; Vejvoda a kol., 2006a; Vejvoda a kol., 2006b, Malandra a kol., 2009).

Později byly další fungální nitrilasy (z hub *Gibberella moniliformis*, *Penicillium marneffei*, *Aspergillus niger* a *Neurospora crassa*) exprimovány ze syntetických genů v *E. coli*, purifikovány a charakterizovány (Kaplan a kol., 2011; Petříčková a kol., 2012). Takto získané nitrilasy z hub *A. niger* a *N. crassa* byly navíc identifikovány jako arylacetonitrilasy schopné hydrolyzovat (R,S)-mandelonitril se selektivitou pro (R)-enantiomer, a tudíž případně použitelné pro produkci kys. (R)-mandlové.

## 2 Cíle práce

- nalezení sekvencí nových nitrilas v genomech vláknitých hub a bakterií
- exprese těchto genů v *E. coli* a purifikace proteinů
- charakterizace purifikovaných enzymů: určení substrátové specificity, kinetických parametrů a velikostí podjednotky a holoenzymu
- příprava vzorků pro strukturní analýzu (analytická ultracentrifugace, elektronová mikroskopie) a spolupráce na strukturní analýze a homologním modelování
- aplikace nových nitrilas v hydrolýze průmyslově významných substrátů, jako jsou (*R,S*)-mandelonitril nebo prekurzory taxolu; optimalizace procesu produkce (*R*)-mandlové kyseliny v laboratorním měřítku

### **3 Materiál a metodika**

V této práci byly použity následující metody (detailej jednotlivých experimentů jsou popsány v příslušných publikacích):

- transformace buněk *E. coli* BL 21 (DE3) Gold
- kultivace bakterií
- stanovení proteinů podle Bradfordové
- elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného
- stanovení enzymových aktivit
- biotransformační reakce (v jedné dávce, s postupným dávkováním, preparativní)
- analytická vysokoúčinná kapalinová chromatografie
- chirální analýza enantiomerů produktů nitrilasových reakcí
- iontově výměnná chromatografie
- gelová permeační chromatografie
- měření kinetiky Michaelis-Mentenové
- extrakce z pufru do dichlormethanu
- čištění produktů reakce na silikagelu (kolonová chromatografie)
- homologní modelování (Oddělení struktury a funkce proteinů, Ústav nanobiologie a strukturní biologie, AV ČR)
- analytická ultracentrifugace (Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze)
- elektronová mikroskopie (Laboratoř charakterizace molekulární struktury, Mikrobiologický ústav, AV ČR)

Zdroje použitých chemikalií, enzymů a mikroorganismů jsou detailně popsány v příslušných publikacích.

## 4 Výsledky a diskuse

Řada nitrilas z archeí, bakterií a rostlin již byla v minulosti úspěšně heterologně exprimována (Gong a kol., 2013; Gong a kol., 2012; Piotrowski 2008). V poslední době bylo také několik genů fungálních nitrilas exprimováno v *E. coli* v naší laboratoři (Kaplan a kol., 2011; Petříčková a kol., 2012). Tyto geny byly získány prohledáváním databází s cílem najít sekvence hypotetických nitrilas podobných již dříve charakterizovaným.

Exprese genů fungálních arylacetonitrilas v původních organismech může být značně obtížná kvůli specifickým podmínkám růstu a indukce. Rychlá ztráta aktivity po sklizni a narušení tkání dělá izolaci enzymu velmi složitou až nemožnou (Petříčková, 2013). Naproti tomu exprese těchto genů v *E. coli* tyto problémy eliminuje. Genové a proteinové databáze jsou dnes bohatým zdrojem nitrilasových sekvencí a v kombinaci s možností přípravy syntetických genů a optimalizace frekvence kodonů se stala exprese v *E. coli* snadnou a vhodnou metodou k produkci a purifikaci nových nitrilas (Seffernick a kol., 2009).

V této práci byly sekvence nových hypotetických nitrilas vybrány z databází na základě jejich podobnosti s již dříve studovanými enzymy. Společně s našimi dříve charakterizovanými fungálními nitrilasami byly exprimovány v *E. coli* a ve formě buněčných suspenzí byly otestovány na aktivitu k souboru aromatických, alifatických a arylalifatických nitrilů.

V této skupině celkem 12 rekombinantních fungálních nitrilas byly nalezeny 3 aromatické nitrilasy, 6 arylalifatických nitrilas, 1 nitrilasa se směsnou substrátovou specifitou a 2 kyanidhydratasy. Rovněž byly potvrzeny souvislosti mezi aminokyselinovými sekvencemi jednotlivých enzymů a jejich substrátovými specifitami, jak jsme dříve předpokládali.

Rekombinantní fungální nitrilasy z hub *Arthroderma benhamiae* (NitAb) a *Nectria haematococca* (NitNh) byly izovány z *E. coli* a charakterizovány.

Preferovanými substráty obou enzymů byly fenylacetonitril a (*R,S*)-mandelonitril, avšak relativní aktivity pro tyto substráty se lišily.  $V_{max}$  byly u NitAb podobné pro oba substráty, ale hodnota  $K_m$  byla 4x vyšší pro (*R,S*)-mandelonitril. Hodnoty  $K_m$  u NitNh byly téměř shodné pro oba substráty, avšak  $V_{max}$  pro fenylacetonitril byla 3,6x vyšší. V tomto ohledu jsou NitAb a NitNh podobné dříve charakterizovaným arylacetonitrilasám z *A. niger* (NitAn2) a *N. crassa* (NitNc) (Petříčková et al., 2012).

Produkce amidu byla u obou enzymů také rozdílná. NitNh v reakcích obecně produkovala více amidu než NitAb.

Oba enzymy hydrolyzovaly 25 mM (*R,S*)-mandelonitril se selektivitou pro (*R*)-enantiomer. Při pH 8,0 dosahovaly hodnoty e.e. 63 % u NitAb a 89 % u NitNh. Vysoce (*R*)-selektivní arylacetonitrilasy byly dříve nalezeny u bakterií rodu *Alcaligenes* (Nagasawa a kol., 1990; Yamamoto a kol., 1992; Liu a kol., 2011) a byly použity k produkci vysokých koncentrací kys. (*R*)-mandlové. Naproti tomu mírně enantioselektivní bakteriální arylacetonitrilasa z *Pseudomonas fluorescens* (Kiziak a kol., 2005) byla použita při enantioresentivní biotransformaci (*S*)-mandelonitrilu na kys. (*S*)-mandlovou nebo (*S*)-mandelamid (Chmura a kol., 2013).

Podle výsledků homologního modelování, analytické centrifugace a elektronové mikroskopie vykazovaly podjednotky obou enzymů typické nitrilasové  $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ - $\alpha$  sendvičové uspořádání. Podjednotky pak vykazovaly tendenci se skládat do oligomerů různé délky.

NitAb a NitNh byly testovány při hydrolýze vysokých koncentrací (*R,S*)-mandelonitrilu (100-500 mM). Při experimentech byl sledován vliv pH a přítomnosti toluenu na enantioselektivitu enzymů a produkci amidu. NitAb obecně neprodukovala téměř žádný mandelamid. Produkce mandelamidu u NitNh byla snížena při vyšším pH (9,0), a přítomnosti 10 % toluenu v reakční směsi. NitAb byla

pouze mírně enantioselektivní při všech studovaných podmírkách a byla schopna transformovat 100 mM substrát při pH 5,0, což ji předurčuje k možnému použití při enantioresistentivní hydrolýze (*S*)-mandelonitrilu na kys. (*S*)-mandlovou.

NitAb a NitNh spolu s NitAn2 a NitNc byly testovány při biotransformacích vysokých koncentrací (*R,S*)-mandelonitrilu s postupným dávkováním substrátu. Nejlepších výsledků bylo dosaženo s NitAn2, a proto byl tento enzym použit v dalším experimentu s vyššími dávkami substrátu. Výsledky obou experimentů jsou shrnuty v Tab. 1.

**Tabulka 1: Hydrolýza (*R,S*)-mandelonitrilu na kys. (*R*)-mandlovou nitrilasou NitAn2 s postupným dávkováním substrátu**

Množství substrátu (mmol)	Konverze (%)	Konc. produktu (g L <sup>-1</sup> ) / e.e. (%)	Objemová produktivita (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Produktivita enzymu (g g <sub>suš</sub> <sup>-1</sup> )
12,5	90	16,7 / 97,6	16,7	18,6
60	90	77 / 95,6	60	40

Enzymová produktivita NitAn2 při dávkování 12 x 5 mmol byla až 5-10 x vyšší než produktivita některých bakteriálních arylacetonitrilas použitých při tomto typu reakce (Zhang a kol., 2010; Liu a kol., 2014).

V dalším experimentu byl soubor našich rekombinantních fungálních nitrilas použit při biotransformaci prekurzoru taxolu – sloučeniny sloužící jako protinádorové léčivo (Lorusso *et al.*, 2014). Toto byl první případ použití nitrilas k této reakci.

1.0 mM ( $\pm$ )-*trans*-2,4-difenyl-4,5-dihydrooxazol-5-carbonitril (( $\pm$ )-*trans*-1) byl akceptován jako substrát všemi testovanými nitrilasami. 30-100 % konverze byly pozorovány již po první hodině reakce, kompletních konverzí bylo dosaženo u všech enzymů po 22 h. Hodnoty e.e. hlavního produktu reakce (příslušné karboxylové kyseliny) nepřesahovaly 80 %.

Podíl amidu se pohyboval mezi 10-30 %. Nejnižší produkci amidu vykazovala NitAb. U NitAn2 byla produkce amidu zpočátku nízká, avšak na konci reakce jedna z nejvyšších.

NitNc vykazovala ze souboru nitrilas nejvyšší aktivitu k  $(\pm)$ -*trans*-1, a byla tudíž použita k přípravě příslušné karboxylové kyseliny v preparativním měřítku.

## 5 Závěry

Nitrilasy představují vhodné biokatalyzatory využitelné k šetrné hydrolýze nitrilových sloučenin. Jsou zde však stále překážky bránící širšímu použití těchto enzymů v průmyslové výrobě, jako např. jejich nízká stabilita a nedostatečná aktivita. Z toho důvodu hledání a výzkum nových ntilas pokračuje.

Nové enzymy mohou být získány pomocí několika metod, zde byl aplikován přístup vyhledávání v genových a proteinových databázích.

Aminokyselinové sekvence fungálních ntrilas diskutovaných v této práci byly vybrány z databáze na základě podobnosti s již dříve charakterizovanými ntrilasami. Podle podobnosti v sekvencích a přítomnosti specifických sekvenčních motivů v blízkosti katalytického cysteinu mohou být predikovány typy subtrátových specifit těchto nových enzymů.

S jednou výjimkou byly předpokládané substrátové specificity nových ntrilas experimentálně potvrzeny.

Rekombinantní fungální ntrilasy NitAb a NitNh byly purifikovány a charakterizovány. Oba enzymy výrazně preferovaly fenylacetonitril a *(R,S)*-mandelonitril jako substráty. U obou enzymů byly stanoveny kinetické parametry. U *(R,S)*-mandelonitrilu byl přednostně hydrolyzován *(R)*-enantiomer; NitNh byla vysoce enantioselektivní, NitAb pouze mírně. NitNh obecně vykazovala vyšší tendenci ke tvorbě amidu než NitAb.

NitAb a NitNh byly použity při hydrolýze vysokých koncentrací *(R,S)*-mandelonitrilu (100-500 mM). Vyšší pH a přítomnost toluenu měly pozitivní vliv na enantioselektivitu obou enzymů, i když u NitAb nedošlo k výraznému zlepšení.

NitAb, NitNh spolu s NitAn2 a NitNc byly testovány při biotransformacích vysokých koncentrací *(R,S)*-mandelonitrilu s postupným dávkováním substrátu. NitAn2 vykazovala jednu

z nejvyšších konverzí (90 %), nejlepší enantioselektivitu (e.e. až 96,7 %) a produktivitu enzymu (až 40 g g<sub>suš</sub><sup>-1</sup>), zatímco produkce amidu byla nejnižší.

NitAb a NitAn2 byly shledány potenciálně použitelnými pro aplikaci v produkci opticky čisté (*S*)- nebo (*R*)-mandlové kyseliny, jelikož oba enzymy tvoří jen zanedbatelné procento amidu a jsou stabilní i při vysokých (500 mM) koncentracích substrátu.

Soubor našich rekombinantních fungálních nitrilas byl použit při biotransformaci prekurzoru taxolu – sloučeniny sloužící jako protinádorové léčivo. Všechny testované enzymy plně transformovaly 1 mM substrát a NitNc byla dostatečně aktivní k přípravě reakčního produktu v preparativním měřítku.

Tato práce tedy potvrdila, že vyhledávání sekvencí genů v databazích a jejich exprese v *E. coli* je vhodnou metodou pro získávání nových fungálních nitrilas. Expresi fungálních nitrilas v *E. coli* je navíc účinná, jelikož nitrilasa zde tvoří vetšinovou část buněčných proteinů a může být snadno izolována. Rovněž byla potvrzena schopnost nových nitrilas transformovat průmyslově významné substráty.

## 6 Použitá literatura

- Banerjee, A.**, Sharma, R., Banerjee, U. C.: *Appl Microbiol Biotechnol* **60**, 33-44 (2002)
- Baxter J.**, Cummings S.P.: *Antonie Van Leeuwenhoek*, **1**, 1-17 (2006)
- Chmura, A.**, Rustler, S., Paravidino, M., van Rantwijk, F., Stoltz, A., Sheldon, R. A.: *Tetrahedron: Asymmetry*, **24**, 1225-1232 (2013)
- Ebbs, S.**: *Curr Opin Biotech*, **15**, 231-236 (2004)
- Fernandes, B. C. M.**, Mateo, C., Kiziak, C., Chmura, A., Wacker, J., Rantwijk, F., Stoltz, A., Sheldon, R. A.: *Adv Synth Catal* **348**, 2597-2603 (2006)
- Gong, J.-S.**, Lu, Z.-M., Li, H., Shi, J.-S., Zhou, Z.-M., Xu, Z.-H.: *Microb Cell Fact* **11** (2012)
- Gong, J. S.**, Lu, Z. M., Li, H., Zhou, Z. M., Shi, J. S., & Xu, Z. H.: *Appl Microbiol Biotechnol*, **97**, 6603-6611 (2013)
- Gupta, N.**, Balomajumder, C., Agarwal, V. K.: *J Hazard Mater* **176**, 1-13 (2010)
- Kaplan, O.**, Nikolaou, K., Pišvejcová, A., Martínková, L.: *Enzyme Microb Technol*, **38**, 260–4 (2006)
- Kaplan, O.**, Bezouška, K., Malandra, A., Veselá, A. B., Petříčková, A., Felsberg, J., Rinágelová, A., Křen, V., Martínková, L.: *Biotechnol Lett* **33**, 309-312 (2011)
- Kobayashi, M.**, Shimizu, S.: *FEMS Microbiol Lett*, **120**, 217-224 (1994)

**Kiziak, C.**, Stolz, A.: *Appl Environ Microbiol*, **75**, 5592-5599 (2009)

**Kiziak, C.**, Conradt, D., Stolz, A., Mattes, R., Klein, J.: *Microbiology*, **151**, 3639-3648 (2005)

**Legras, J. L.**, Chuzel, G., Arnaud, A., Galzy, P.: Natural nitriles and their metabolism. *World J Microb Biot* **6**, 83-108 (1990)

**Liu, Z. Q.**, Dong, L. Z., Cheng, F., Xue, Y. P., Wang, Y. S., Ding, J. N., Zheng, Y. G., Shen, Y. C.: *J Agric Food Chem*, **59**, 11560-11570 (2011)

**Liu, Z.-Q.**, Zhang, X.-H., Xue, Y.-P., Xu, M., Zheng, Y.-G.: *J Agric Food Chem*, **6**, 4685–4694 (2014)

**Lorusso, D.**, Petrelli, F., Coinu, A., Raspagliesi, F., Barni, S.: *Gynecol Oncol*, **133**, 117-123 (2014)

**Malandra, A.**, Cantarella, M., Kaplan, O., Vejvoda, V., Uhnáková, B., Štěpánková, B., Kubáč, D., Martínková, L.: *Appl Microbiol Biotechnol*, **85**, 277-284 (2009)

**Martínková, L.**, Křen, V.: *Curr Opin Chem Biol* **14**, 130-137 (2010)

**Nagasawa, T.**, Mauger, J., Yamada, H.: *Eur J Biochem*, **194**, 765-772 (1990)

**O'Reilly, C.**, Turner, P. D.: *J Appl Microbiol* **95**, 1161-1174 (2003)

**Pace, H., C.**, Brenner, C.: *Genome biology* **2** (2001)

**Petříčková, A.**, Veselá, A. B., Kaplan, O., Kubáč, D., Uhnáková, B., Malandra, A., Felsberg, J., Rinágelová, A., Weyrauch, P., Křen, V., Bezouška, K., Martínková, L.: *Appl Microbiol Biotechnol* **93**, 1553-1561 (2012)

**Petříčková, A.**: Struktura a biokatalytické vlastnosti nitrilas z vláknitých hub. Disertační práce, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, pp 30-37 (2013)

**Piotrowski, M.**: *Phytochemistry* **69**, 2655-2667 (2008)

**Seffernick, J. L.**, Samanta, S. K., Louie, T. M., Wackett, L. P., Subramanian, M.: *J Biotechnol* **143**, 17-26 (2009)

**Thuku, R. N.**, Brady, S., Benedik, M. J., Sewell, B. T.: *J Appl Microbiol* **106**, 703-727 (2009)

**Vejvoda, V.**, Kaplan, O., Klozova, J., Masák, J., Čejková, A., Jirků, V., Stloukal, R., Martínková, L.: *Folia Microbiol*, **51**, 251-256 (2006a)

**Vejvoda, V.**, Kaplan, O., Bezouška, K., Martínková, L.: *J Mol Catal B: Enzym*, **39**, 55-8 (2006b)

**Vejvoda, V.**, Kaplan, O., Bezouška, K., Pompach, P., Šulc, M., Cantarella, M., Benada, O., Uhnáková, B., Rinágelová, A., Lutz-Wahl, S., Fischer, L., Křen, V., Martínková, L.: *J Mol Catal B: Enzym* **50**, 99-106 (2008)

**Yamamoto, K.**, Fujimatsu, I., Komatsu, K. I.: *J Ferment Bioeng*, **73**, 425-430 (1992).

**Zhang, Z. J.**, Xu, J. H., He, Y. C., Ouyang, L. M., Liu, Y. Y., Imanaka, T.: *Process Biochem*, **45**, 887-891 (2010)

**Charles University in Prague**  
**Faculty of Science**

Study program: Biochemistry

Field of study: Biochemistry



Summary of the Ph.D. Thesis

**Study of function and molecular architecture of  
fungal nitrilases applicable in biocatalysis**

**Mgr. Alicja Barbara Veselá**

Supervisor: Ing. Ludmila Martínková, CSc.

Prague 2015

## 7 Introduction

Inorganic cyanide and nitrile compounds are widespread in the environment, either as naturally occurring or as a result of human activity. The major source of these compounds in soil and water is the discharge of wastewaters (Baxter and Cummings, 2006). Natural cyanide and nitrile compounds have been detected in about 3, 000 species of microorganisms, fungi, plants and animals, mostly in the form of cyanogenic glycosides (Gupta *et al.*, 2010).

In living organisms, cyanide and nitriles can be degraded through several pathways, including oxidative, reductive, substitution/transfer or hydrolytic pathway (Legras *et al.*, 1990; Ebbs, 2004).

Enzymatic hydrolysis is the most explored of the nitrile biodegradation routes. It can be achieved in one step, catalyzed by nitrilase, or in a two-step reaction, catalyzed by nitrile hydratase and amidase (Banerjee *et al.*, 2002). Cyanide is transformed by cyanide hydratases (CHTs) to formamide or by cyanide dihydratases (CDHs) to formic acid.

Nitrilases, together with CHTs and CDHs share the same Glu-Lys-Cys catalytic triade and belong to the Branch 1 of the nitrilase superfamily (O'Reilly and Turner, 2003; Pace and Brenner, 2001). Another common feature of these enzymes is the tertiary structure of the subunit and the tendency to form helical oligomers (Thuku *et al.*, 2009).

Nitrilases (EC 3.5.5.1) catalyze the hydrolysis of nitriles into the corresponding carboxylic acid and ammonia. They are abundant in nature and occur in both prokaryotes and eukaryotes (Thuku *et al.*, 2009). Depending on the preferred substrate structure, nitrilases can be divided into aliphatic, aromatic and arylaliphatic type. The last group is especially promising in biocatalysis and chemo-enzymatic synthesis because of the ability to hydrolyze  $\alpha$ -substituted

arylaliphatic nitriles stereoselectively (Kobayashi and Shimizu, 1994; Martíková and Křen, 2010).

Sometimes, amide can be formed as a side-product of the nitrilase-catalyzed reactions. This seems to be affected by the electron-deficient substituents on the  $\alpha$ -carbon, low temperature and high pH, or reactions with the less-preferred substrate enantiomers (Fernandes *et al.*, 2006). On the other hand, nitrilase mutants with enhanced amide-formation ability may be utilized in a biocatalytic production of optically pure amides (Kiziak and Stoltz, 2009).

So far, nitrilases have been most extensively studied in bacteria. The most abundant source of aromatic nitrilases is the genus *Rhodococcus* (Banerjee *et al.*, 2002). Aliphatic nitrilases were found in *Acidovorax*, *Comamonas*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. Arylaliphatic nitrilases have been studied in *Pseudomonas*, *Alcaligenes* and *Halomonas* (Martíková and Křen, 2010). A number of these enzymes were used in biocatalytic production of nicotinic acid, optically pure (*R*)-or (*S*)-mandelic acid, glycolic acid and other processes on laboratory scale (Gong *et al.*, 2012).

Nitrilases from the fungi *Aspergillus niger* and *Fusarium solani* were also employed in biocatalytic processes such as nicotinic or isonicotinic acid production (Kaplan *et al.*, 2006; Vejvoda *et al.*, 2006a; Vejvoda *et al.*, 2006b, Malandra *et al.*, 2009).

Later on, new fungal nitrilases (from *Gibberella moniliformis*, *Penicillium marneffei*, *Aspergillus niger* and *Neurospora crassa*) were expressed from the synthetic genes in *E. coli*, purified and characterized (Kaplan *et al.*, 2011; Petříčková *et al.*, 2012). Furthermore, the nitrilases from *A. niger* and *N. crassa* were identified as arylacetonitrilases able to hydrolyze (*R,S*)-mandelonitrile with the (*R*)-selectivity, and thus potentially applicable in the production of (*R*)-mandelic acid.

## **8 Aims of the study**

- to select the sequences of new nitrilases in genomes of filamentous fungi and bacteria
- to express the genes of hypothetical nitrilases in *Escherichia coli* and to purify them
- to characterize the purified enzymes in terms of substrate specificity, kinetics and size of subunit and holoenzyme
- to prepare samples for structural analyses (analytical ultracentrifugation, electron microscopy) and cooperate on structural analysis and homologous modeling
- to apply the new nitrilases in the hydrolysis of substrates with industrial impact such as (*R,S*)-mandelonitrile and precursors of the taxol sidechain; to optimize the process of (*R*)-mandelic acid production on laboratory scale

## 9 Materials and methods

In this thesis, following methods were used; the details of the individual experiments are described in the research publications:

- transformation of *E. coli* BL 21 (DE3) Gold cells
- bacteria cultivation and sonication
- Bradford protein assay
- sodium dodecyl sulphate – polyacrylamide gel electrophoresis
- enzyme activity assay
- biotransformation reactions (batch, fed-batch, preparative scale)
- analytical high performance liquid chromatography
- chiral analysis of nitrilase product enantiomers
- ion exchange chromatography
- gel permeation chromatography
- Michaelis-Menten kinetics measurements
- extraction from buffer to dichloromethane
- reaction product purification by silicagel column chromatography
- vacuum reduction
- homology modelling (Department of Structure and Function of Proteins, Institute of Nanobiology and Structural Biology, AS CR)
- analytical ultracentrifugation (Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague)
- electron microscopy (Laboratory of Molecular Structure Characterization, Institute of Microbiology, AS CR)

The source of used chemicals, enzymes and microorganisms is described in detail in the research publications.

## 10 Results and discussion

Nitrilases from archaea, bacteria and plants have been previously produced in heterologous hosts (for reviews see Gong *et al.*, 2013; Gong *et al.*, 2012; Piotrowski 2008). Recently, expression of a number of fungal nitrilase genes in *E. coli* was performed by our research group (Kaplan *et al.*, 2011; Petříčková *et al.*, 2012). The genes were obtained by mining the databases for sequences of putative nitrilases similar to the previously produced, partially purified and characterized fungal nitrilases.

Expression of fungal arylacetonitrilase genes in the native organisms poses several drawbacks such as specific conditions of growth and induction. Rapid activity loss after harvest and tissue disruption makes the enzyme purification difficult or impossible (Petříčková, 2013). In contrast, the expression of the corresponding genes in *E. coli* eliminates these problems. The gene and protein databases have become a rich source of nitrilase sequences, and the subsequent gene synthesis – including the option of codon frequency optimization – and expression in *E. coli* has become a convenient method for nitrilase production and purification (Seffernick *et al.*, 2009).

In the present work, new putative nitrilase sequences were selected according to their similarity to the previously studied enzymes. Together with our previously characterized nitrilases (Petříčková *et al.*, 2012), they were produced in *E. coli* and tested, in the form of whole-cell catalyst, against a set of different substrates, consisting of aromatic, arylaliphatic and aliphatic nitriles.

In the group of 12 heterologously produced fungal enzymes, we confirmed 3 aromatic nitrilases, 6 arylaliphatic nitrilases, 1 nitrilase with a mixed substrate preference and 2 cyanide hydratases. The results showed us that there were correlations between the

amino acid sequences of the enzymes and their substrate specificities, as we previously hypothesized.

Recombinant fungal arylacetonitrilases from *Arthroderma benhamiae* (NitAb) and *Nectria haematococca* (NitNh) were purified from *E. coli* and characterized.

The preferred substrates of NitAb and NitNh were phenylacetonitrile and (*R,S*)-mandelonitrile, but the relative activities for these substrates differed.  $V_{max}$  was similar for both substrates in NitAb, but the  $K_m$  value for mandelonitrile was nearly 4 times higher. NitNh exhibited almost the same  $K_m$  values for both substrates, however,  $V_{max}$  for phenylacetonitrile was 3.6 times higher. In this aspect, NitAb and NitNh are similar to the previously characterized fungal arylacetonitrilases from *A. niger* (NitAn2) and *N. crassa* (NitNc), respectively (Petříčková *et al.*, 2012).

The amide production was also different for each enzyme. NitNh generally produced more amide than NitAb.

Both enzymes hydrolyzed 25 mM (*R,S*)-mandelonitrile with selectivity for its (*R*)-enantiomer. At pH 8.0, the e.e. values were 63 and 89 % for NitAb and NitNh, respectively. The highly (*R*)-selective arylacetonitrilases were found in the *Alcaligenes* genus (Nagasawa *et al.*, 1990; Yamamoto *et al.*, 1992; Liu *et al.* 2011) and were used for the production of high concentrations of (*R*)-mandelic acid (Zhang *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2014). On the other hand, a moderately enantioselective bacterial arylacetonitrilase from *Pseudomonas fluorescens* (Kiziak *et al.*, 2005) was employed in an enantioresponsive biotransformation of (*S*)-mandelonitrile into (*S*)-mandelic acid or (*S*)-mandelamide (Chmura *et al.*, 2013).

Homology modeling, analytical centrifugation and electron microscopy revealed that both enzymes displayed the typical nitrilase  $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ - $\alpha$  sandwich fold of the enzyme subunit. The subunits tend to form oligomeric structures.

NitAb and NitNh were tested in hydrolysis of high concentrations of (*R,S*)-mandelonitrile (100-500 mM). The effect of pH and presence of toluene as a co-solvent on the e.e. values and

amide production were monitored. NitAb generally displayed almost no amide production. The amide formation in case of NitNh could be lowered by pH 9.0 and 10 % toluene in the reaction mixture. NitAb displayed only moderate enantioselectivity at all conditions, and was able to transform 100 mM substrate at pH 5.0, which makes it applicable in enantioresponsive hydrolysis of (*S*)-mandelonitrile to (*S*)-mandelic acid.

NitAb and NitNh, together with NitAn2 and NitNc were tested in fed-batch biotransformations of high concentrations of (*R,S*)-mandelonitrile. The best results were achieved with NitAn2, and therefore this enzyme was used in another experiment with higher doses of the substrate in the feeds. Outcomes of both experiments are summarized in Tab. 1.

**Table 1: Fed-batch hydrolysis of (*R,S*)-mandelonitrile into (*R*)-mandelic acid by NitAn2**

Substrate amount (mmol)	Conversion (%)	Product concentration (g L <sup>-1</sup> ) / e.e. (%)	Volumetric productivity (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Catalyst productivity (g g <sub>dcw</sub> <sup>-1</sup> )
12.5	90.0	16.7 / 97.6	16.7	18.6
60	90.0	77 / 95.6	60	40

The catalyst productivity of NitAn2 in the 12 x 5 mmol fed-batch was even 5-10 times higher than that of some of the bacterial arylacetonitrilases used in the similar conversions of high concentrations of (*R,S*)-mandelonitrile (Zhang *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2014).

In another experiment, a set of our recombinant fungal arylacetonitrilases was employed in the biotransformation of a precursor of taxol, a compound that is used as anti-cancer drug (Lorusso *et al.*, 2014). This was the first time nitrilases were used in this type of reaction.

1.0 mM ( $\pm$ )-*trans*-2,4-diphenyl-4,5-dihydrooxazole-5-carbonitrile (( $\pm$ )-*trans*-1) was accepted as substrate by all the tested

nitrilases. Conversions of 30-100 % were already observed within the first hour and complete conversions were achieved after 22 hours in all cases. The e.e. values of the acid product were in the moderate region (below 80 %).

The share of amide by-product was between 10-30 %, the lowest amount observed for NitAb. NitAn2, on the other hand, produced a minor portion of amide at the reaction beginning, but gave the one of the highest portions of amide after the complete conversion.

NitNc displayed the highest activity for  $(\pm)$ -*trans*-1 of all the enzymes tested, and was used for the preparative scale production of the corresponding carboxylic acid.

## 11 Conclusions

Nitrilases represent useful tools for the mild nitrile hydrolysis applicable in biotechnology. However, there are several hindrances that prevent their extensive use in chemical industry, such as their low stability and insufficient activity. Therefore, the search for new enzymes with improved properties is continued.

Novel enzymes can be obtained by several methods. Here, the genome mining approach was applied.

The amino acid sequences of fungal nitrilases discussed in this work were selected from the database using the sequences of previously studied enzymes as templates. According to the sequence similarities and presence of specific motifs in the vicinity of the catalytic cysteine, predictions could be made as to which substrate(s) the new recombinant enzymes prefer.

With one exception, the hypothesized substrate specificities of the new nitrilases were experimentally confirmed.

Recombinant fungal nitrilases NitAb and NitNh were purified and characterized. Both enzymes exhibited a strong preference for phenylacetonitrile and (*R,S*)-mandelonitrile. Their kinetic parameters for these substrates were assessed. (*R,S*)-Mandelonitrile was hydrolyzed with (*R*)-selectivity in both cases; NitNh was highly enantioselective, whereas the enantioselectivity of NitAb was moderate. NitNh displayed a generally higher tendency to form amide as the reaction side-product than NitAb.

NitAb and NitNh were employed in the conversion of high concentrations (100-500 mM) of (*R,S*)-mandelonitrile. The effects of pH and toluene on the nitrilase activity, stability and enantioselectivity were studied. The presence of toluene and higher pH values had a positive effect on enantioselectivity of both enzymes, although that of NitAb still remained in the moderate region.

In the next set of experiments, NitAb and NitNh together with NitAn2 and NitNc were tested in the conversion of (*R,S*)-mandelonitrile in a fed-batch mode. Of the four nitrilases tested, NitAn2 exhibited one of the highest conversions (90 %), and the highest e.e. values (up to 96.7 %) and catalyst productivity (up to 40 g g<sub>dcw</sub><sup>-1</sup>), whereas its amide production was the lowest.

Thus, NitAb and NitAn2 were found potentially suitable for the application in enantiopure (*S*)- or (*R*)-mandelic acid production as both enzymes form only a negligible portion of the amide by-product and are stable at high (500 mM) concentrations of the substrate.

NitAb, NitAn2, NitNc, NitNh and our other recombinant fungal arylacetonitrilases were used in the production of a precursor of taxol, which is a well-known anti-cancer drug. To our knowledge, this was the first time nitrilases were employed in this reaction. All the nitrilases tested were able to fully convert 1.0 mM substrate and NitNc was sufficiently active to convert the substrate to the corresponding acid on a preparative scale.

In conclusion, this work confirmed that the genome mining and expression in *E. coli* is a suitable method for obtaining new fungal nitrilases. The expression of fungal nitrilase genes in *E. coli* is effective, as the nitrilase forms a major part of the cell protein and can be easily purified. Moreover, the ability of the new nitrilases to transform industrially important compounds was verified.

## 12 References

- Banerjee, A.**, Sharma, R., Banerjee, U. C.: *Appl Microbiol Biotechnol* **60**, 33-44 (2002)
- Baxter J.**, Cummings S.P.: *Antonie Van Leeuwenhoek*, **1**, 1-17 (2006)
- Chmura, A.**, Rustler, S., Paravidino, M., van Rantwijk, F., Stoltz, A., Sheldon, R. A.: *Tetrahedron: Asymmetry*, **24**, 1225-1232 (2013)
- Ebbs, S.**: *Curr Opin Biotech*, **15**, 231-236 (2004)
- Fernandes, B. C. M.**, Mateo, C., Kiziak, C., Chmura, A., Wacker, J., Rantwijk, F., Stoltz, A., Sheldon, R. A.: *Adv Synth Catal* **348**, 2597-2603 (2006)
- Gong, J.-S.**, Lu, Z.-M., Li, H., Shi, J.-S., Zhou, Z.-M., Xu, Z.-H.: *Microb Cell Fact* **11** (2012)
- Gong, J. S.**, Lu, Z. M., Li, H., Zhou, Z. M., Shi, J. S., & Xu, Z. H.: *Appl Microbiol Biotechnol*, **97**, 6603-6611 (2013)
- Gupta, N.**, Balomajumder, C., Agarwal, V. K.: *J Hazard Mater* **176**, 1-13 (2010)
- Kaplan, O.**, Nikolaou, K., Pišvejcová, A., Martínková, L.: *Enzyme Microb Technol*, **38**, 260–4 (2006)
- Kaplan, O.**, Bezouška, K., Malandra, A., Veselá, A. B., Petříčková, A., Felsberg, J., Rinágelová, A., Křen, V., Martínková, L.: *Biotechnol Lett* **33**, 309-312 (2011)
- Kobayashi, M.**, Shimizu, S.: *FEMS Microbiol Lett*, **120**, 217-224 (1994)

**Kiziak, C.**, Stolz, A.: *Appl Environ Microbiol*, **75**, 5592-5599 (2009)

**Kiziak, C.**, Conradt, D., Stolz, A., Mattes, R., Klein, J.: *Microbiology*, **151**, 3639-3648 (2005)

**Legras, J. L.**, Chuzel, G., Arnaud, A., Galzy, P.: Natural nitriles and their metabolism. *World J Microb Biot* **6**, 83-108 (1990)

**Liu, Z. Q.**, Dong, L. Z., Cheng, F., Xue, Y. P., Wang, Y. S., Ding, J. N., Zheng, Y. G., Shen, Y. C.: *J Agric Food Chem*, **59**, 11560-11570 (2011)

**Liu, Z.-Q.**, Zhang, X.-H., Xue, Y.-P., Xu, M., Zheng, Y.-G.: *J Agric Food Chem*, **6**, 4685–4694 (2014)

**Lorusso, D.**, Petrelli, F., Coinu, A., Raspagliesi, F., Barni, S.: *Gynecol Oncol*, **133**, 117-123 (2014)

**Malandra, A.**, Cantarella, M., Kaplan, O., Vejvoda, V., Uhnáková, B., Štěpánková, B., Kubáč, D., Martínková, L.: *Appl Microbiol Biotechnol*, **85**, 277-284 (2009)

**Martínková, L.**, Křen, V.: *Curr Opin Chem Biol* **14**, 130-137 (2010)

**Nagasawa, T.**, Mauger, J., Yamada, H.: *Eur J Biochem*, **194**, 765-772 (1990)

**O'Reilly, C.**, Turner, P. D.: *J Appl Microbiol* **95**, 1161-1174 (2003)

**Pace, H., C.**, Brenner, C.: *Genome biology* **2** (2001)

**Petříčková, A.**, Veselá, A. B., Kaplan, O., Kubáč, D., Uhnáková, B., Malandra, A., Felsberg, J., Rinágelová, A., Weyrauch, P., Křen, V., Bezouška, K., Martínková, L.: *Appl Microbiol Biotechnol* **93**, 1553-1561 (2012)

**Petříčková, A.**: Structure and biocatalytic properties of nitrilases from filamentous fungi. Dissertation, Faculty of Science, Charles University in Prague, pp 30-37 (2013)

**Piotrowski, M.**: *Phytochemistry* **69**, 2655-2667 (2008)

**Seffernick, J. L.**, Samanta, S. K., Louie, T. M., Wackett, L. P., Subramanian, M.: *J Biotechnol* **143**, 17-26 (2009)

**Thuku, R. N.**, Brady, S., Benedik, M. J., Sewell, B. T.: *J Appl Microbiol* **106**, 703-727 (2009)

**Vejvoda, V.**, Kaplan, O., Klozova, J., Masák, J., Čejková, A., Jirků, V., Stloukal, R., Martínková, L.: *Folia Microbiol*, **51**, 251-256 (2006a)

**Vejvoda, V.**, Kaplan, O., Bezouška, K., Martínková, L.: *J Mol Catal B: Enzym*, **39**, 55-8 (2006b)

**Vejvoda, V.**, Kaplan, O., Bezouška, K., Pompach, P., Šulc, M., Cantarella, M., Benada, O., Uhnáková, B., Rinágelová, A., Lutz-Wahl, S., Fischer, L., Křen, V., Martínková, L.: *J Mol Catal B: Enzym* **50**, 99-106 (2008)

**Yamamoto, K.**, Fujimatsu, I., Komatsu, K. I.: *J Ferment Bioeng*, **73**, 425-430 (1992).

**Zhang, Z. J.**, Xu, J. H., He, Y. C., Ouyang, L. M., Liu, Y. Y., Imanaka, T.: *Process Biochem*, **45**, 887-891 (2010)

# **Curriculum vitae**

## **Personal**

Name: Veselá Alicja Barbara, Mgr.

Date and place of birth: 3.12.1985, Bytom, Poland

## **Work experiences**

- 2008 – present Laboratory of Biotransformation,  
Institute of Microbiology AS CR, Vídeňská 1083, Praha 4, 142 00  
projects: Expression and characterization of nitrilases from  
filamentous fungi; Biological elimination of cyanides from industrial  
wastewaters with complex pollution; Characterization and application  
of fungal non-heme oxidases
- 2009 – 2011 Laboratory of Biotransformation,  
Institute of Microbiology AS CR, Vídeňská 1083, Praha 4, 142 00  
project: New possibilities of nitrilases in biocatalysis and  
bioremediation (diploma thesis)

## **Education**

- 2011 Mgr. in Biochemistry, Charles University in  
Prague, Faculty of Science
- 2008 Bc. in Biochemistry, Charles University in  
Prague, Faculty of Science
- 2005 Graduation exam

## **Language skills**

- czech (native)
- polish (intermediate)

- english (fluent), certificate FCE (2013)
- german (intermediate)

## **Computer skills**

- word, excel, powerpoint (advanced)
- common user software (advanced)

## List of publications

### Articles related to the presented thesis

Kaplan, O., **Veselá, A. B.**, Petříčková, A., Pasquarelli, F., Pičmanová, M., Rinágelová, A., Bhalla, T. C., Pátek, M., Martíková, L.: A comparative study of nitrilases identified by genome mining. *Mol Biotechnol* **54**, 996-1003 (2013)

**Veselá, A. B.**, Petříčková, A., Weyrauch, P., Martíková, L.: Heterologous expression, purification and characterization of arylacetonitrilases from *Nectria haematococca* and *Arthroderma benhamiae*. *Biocatal Biotransform* **31**, 49-56 (2013)

**Veselá, A. B.**, Křenková, A., Martíková, L.: Exploring the Potential of Fungal Arylacetonitrilases in Mandelic Acid Synthesis. *Mol Biotechnol*, **57**, 466-474 (2015)

Wilding, B., **Veselá, A. B.**, Perry, J. J., Black, G. W., Zhang, M., Martíková, L., Klempier, N.: An investigation of nitrile transforming enzymes in the chemo-enzymatic synthesis of the taxol sidechain. *Org Biomol Chem*, **13**, 7803-7812 (2015)

### Other research articles

Martíková, L., Pátek, M., **Veselá, A. B.**, Kaplan, O., Uhnáková, B., Nešvera, J.: Catabolism of nitriles in *Rhodococcus*. In: Biology of *Rhodococcus*, (Alvarez, H. M. ed.) Springer Berlin Heidelberg, pp. 171-206 (2010)

**Veselá, A. B.**, Franc, M., Pelantová, H., Kubáč, D., Vejvoda, V., Šulc, M., Bhalla, T. C., Macková, M., Lovecká, P., Janů, P., Demnerová, K., Martínková, L.: Hydrolysis of benzonitrile herbicides by soil actinobacteria and metabolite toxicity. *Biodegradation*, **21**, 761-770 (2010)

Kaplan, O., Bezouška, K., Plíhal, O., Ettrich, R., Kulik, N., Vaněk, O., Kavan, D., Benada, O., Malandra, A., Šveda, O., **Veselá, A. B.**, Rinágelová, A., Slámová, K., Cantarella, M., Felsberg, J., Dušková, J., Dohnálek, J., Kotik, M., Křen, V., Martínková, L.: Heterologous expression, purification and characterization of nitrilase from *Aspergillus niger* K10. *BMC Biotechnol.* **11**, 2 (2011)

Kaplan, O., Bezouška, K., Malandra, A., **Veselá, A. B.**, Petříčková, A., Felsberg, J., Rinágelová, A., Křen, V., Martínková, L.: Genome mining for the discovery of new nitrilases in filamentous fungi. *Biotechnol. Lett.* **33**, 309-312 (2011)

Vejvoda, V., Martínková, L., **Veselá, A. B.**, Kaplan, O., Lutz-Wahl, S., Fischer, L., Uhnáková, B.: Biotransformation of nitriles to hydroxamic acids via a nitrile hydratase–amidase cascade reaction. *J Mol Catal B: Enzym.* **71**, 51-55 (2011)

Petříčková, A., **Veselá, A. B.**, Kaplan, O., Kubáč, D., Uhnáková, B., Malandra, A., Felsberg, J., Rinágelová, A., Weyrauch, P., Křen, V., Bezouška, K., Martínková, L.: Purification and characterization of heterologously expressed nitrilases from filamentous fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* **93**, 1553-1561 (2012)

**Veselá, A. B.**, Pelantová, H., Šulc, M., Macková, M., Lovecká, P., Thimová, M., Pasquarelli, F., Pičmanová, M., Pátek, M., Bhalla, T. C., Martínková, L.: Biotransformation of benzonitrile herbicides via the nitrile hydratase–amidase pathway in rhodococci. *J Ind Microbiol Biot*, **39**, 1811-1819 (2012)

Rinágelová, A., Kaplan, O., **Veselá, A. B.**, Chmátal, M., Křenková, A., Plíhal, O., Pasquarelli, F., Cantarella, M., Martínková, L.: Cyanide hydratase from *Aspergillus niger* K10: Overproduction in *Escherichia coli*, purification, characterization and use in continuous cyanide degradation. *Process Biochem*, **49**, 445-450 (2014)

Martínková, L., **Veselá, A. B.**, Rinágelová, A., Chmátal, M.: Cyanide hydratases and cyanide dihydratases: emerging tools in the biodegradation and biodetection of cyanide. *Appl Microbiol Biotechnol*, DOI: 10.1007/s00253-015-6899-0 (2015)