

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA BIOCHEMIE



**VLASTNOSTI A POUŽITÍ NITRILAS VLÁKNITÝCH HUB
ASPERGILLUS NIGER K10 A *FUSARIUM SOLANI O1***

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vojtěch Vejvoda

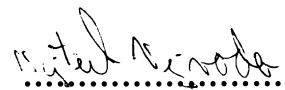
Školitel : Ing. Ludmila Martínková, CSc.

Školitel konzultant : Doc. RNDr. Karel Bezouška, CSc.

Vypracováno Laboratoři biotransformací MBÚ AV ČR.

Praha 2006

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením školitelky Ing. Ludmily Martínkové, CSc., a všechny prameny jsem řádně citoval.

A handwritten signature in cursive script, appearing to read "Petr Křivánek", written over a horizontal dotted line.

V Praze dne 2. 5. 2006

Podpis

Děkuji své školitelce Ing. Ludmile Martínkové, CSc., za obětavou pomoc a vedení při diplomové práci, Ing. Ondřeji Kaplanovi za výbornou spolupráci a Doc. RNDr. Karlu Bezouškovi, CSc., za cenné rady. Dále děkuji všem spolupracovníkům z Laboratoře biotransformací, jmenovitě Prof. Ing. Vladimíru Křenovi, DrSc., vedoucímu laboratoře, Ing. Janě Klozové, Ing. Davidu Kubáčovi a Janě Horové.

V neposlední řadě bych chtěl poděkovat své rodině za finanční a morální podporu při studiu.

Práce byla podporována z grantů :

A4020213 (GA AV ČR), 203/05/2267 (GA ČR), LC 06010, OC D25.001 (MŠMT ČR) a výzkumný záměr AV0Z50200510 (MBÚ)

Použité zkratky

AU – jednotka absorbance

BSA – hovězí sérový albumin

DMSO – dimethylsulfoxid

EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

LD₅₀ – dávka, která způsobí po jednorázovém podání úhyn 50% zkoumaných organismů

LD L₀ – nejnižší zaznamenané množství látky, které způsobilo smrt zkoumaného organismu

PEG – polyethylenglykol

PVA – polyvinylalkohol

SDS – dodecylsírán sodný

TRIS – tris(hydroxymethyl)-aminoethan

Obsah

1	ÚVOD.....	1
1.1	Výskyt nitrilů	1
1.2	Enzymy hydrolyzující nitrily	3
1.2.1	Nitrilasa (EC 3.5.5.1)	4
1.2.2	Nitrilhydratasa (EC 4.2.1.84) a amidasa (EC 3.5.1.4).....	6
1.3	Použití nitrilas, nitrhydratas a amidas.....	6
2	CÍL PRÁCE.....	10
3	MATERIÁL A METODY.....	11
3.1	Mikroorganismy	11
3.2	Kultivační a udržovací media	11
3.3	Chemikálie a materiály	14
3.3.1	Substráty enzymů	14
3.3.2	Pufry.....	16
3.3.3	Chromatografické kolony.....	18
3.4	Přístroje a zařízení.....	19
3.5	Mikrobiologické metody.....	20
3.5.1	Sterilizace.....	20
3.5.2	Kultivace na pevném mediu	20
3.5.3	Kultivace v kapalném mediu	20
3.5.4	Sklizeň mycelia	21
3.5.5	Sklizeň buněk Rhodococcus equi	21
3.6	Lyofilizace.....	22
3.7	Měření pH	22
3.8	Purifikace a charakterizace enzymů	22
3.8.1	Příprava buněčného extraktu z vláknitých hub.....	22
3.8.2	Příprava buněčného extraktu z bakterie Rhodococcus equi A4	23
3.8.3	Purifikace enzymů.....	23

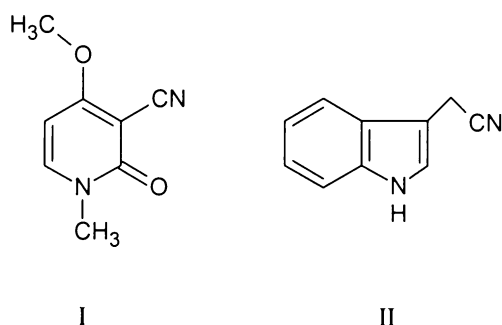
3.8.4	Stanovení bílkovin	24
3.8.5	Elektroforéza	24
3.8.6	Stanovení optimálních reakčních podmínek, stability, vlivu inhibitorů a kosolventů....	25
3.9	Imobilizace	26
3.9.1	Imobilizace celých buněk <i>F. solani</i> v gelu – technologie LentiKats®	26
3.9.2	Imobilizace nitrilasy na hydrofobních kolonách	27
3.9.3	Imobilizace nitrilasy na iontoměničových kolonách	28
3.9.4	Imobilizace amidasy a nitrilhydratasy z <i>R. equi</i>	28
3.9.5	Koimobilizace nitrilasy a amidasy	28
3.9.6	Kovalentní nosiče.....	28
3.10	Biokonverze nitrilů	29
3.10.1	Stanovení aktivity.....	29
3.10.2	Stanovení aktivity lyofilizovaného mycelia.....	29
3.10.3	Stanovení aktivity mycelia imobilizovaného v LentiKats®	29
3.10.4	Stanovení aktivity enzymu imobilizovaného na Amberzym™	30
3.10.5	Stanovení aktivity enzymu imobilizovaného na koloně	30
3.10.6	Stanovení aktivity extraktu <i>R. equi</i>	30
3.10.7	Biokonverze kyanopyridinů lyofilizovaným myceliem	31
3.10.8	Biokonverze kyanopyridinu imobilizovaným myceliem – LentiKats®	32
3.10.9	Isolace produktů biokonverze kyanopyridinů z reakčních směsí	32
3.10.10	Výpočet aktivity	33
3.11	Chromatografické metody	34
3.11.1	HPLC	34
4	VÝSLEDKY	37
4.1	Indukce nitrilasové aktivity	37
4.2	Vlastnosti nitrilas	39
4.2.1	Teplotní stabilita.....	39
4.2.2	Vliv kosolventů	43
4.2.3	Teplotní a pH optimum enzymu.....	45
4.2.4	Stabilita enzymu při lyofilizaci	45
4.3	Imobilizace	48
4.3.1	LentiKats®	48
4.3.2	Hydrofobní kolony	51
4.3.3	Iontoměničové kolony	56

4.3.4	Kovalentní nosiče.....	56
4.3.5	Koimobilizace nitrilasy a amidasy	57
4.4	Preparativní biokonverze.....	60
4.4.1	Lyofilizované mycelium	60
4.4.2	LentiKats®	64
4.5	Purifikace	65
4.5.1	A. niger.....	65
4.5.2	F. solani	66
4.5.3	Elektroforéza v prostředí SDS.....	69
4.6	Substrátová specifita	71
5	DISKUSE.....	72
5.1	Indukce aktivity	72
5.2	Stabilita nitrilas.....	73
5.3	Purifikace nitrilas	74
5.4	Substrátová specifita	75
5.5	Imobilizace	76
6	SOUHRN	78
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	79
8	SEZNAM PUBLIKACÍ A POSTERŮ.....	82

1 ÚVOD

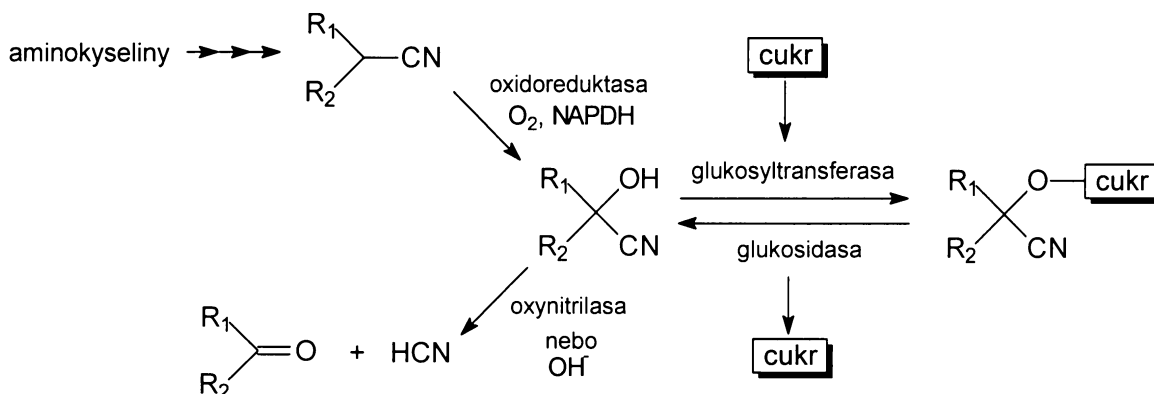
1.1 Výskyt nitrilů

V přírodě se vyskytuje významné množství nitrilů, vázaných ve složitějších látkách (kyanoglykosidech, kyanolipidech). V menší míře se v organismech nacházejí volné nitrily, mezi které patří například prekurzor rostlinného hormonu indol-3-acetonitril, nebo ricinin vyskytující se ve skočci obecném (*Ricinus communis*) (viz Obrázek 1).



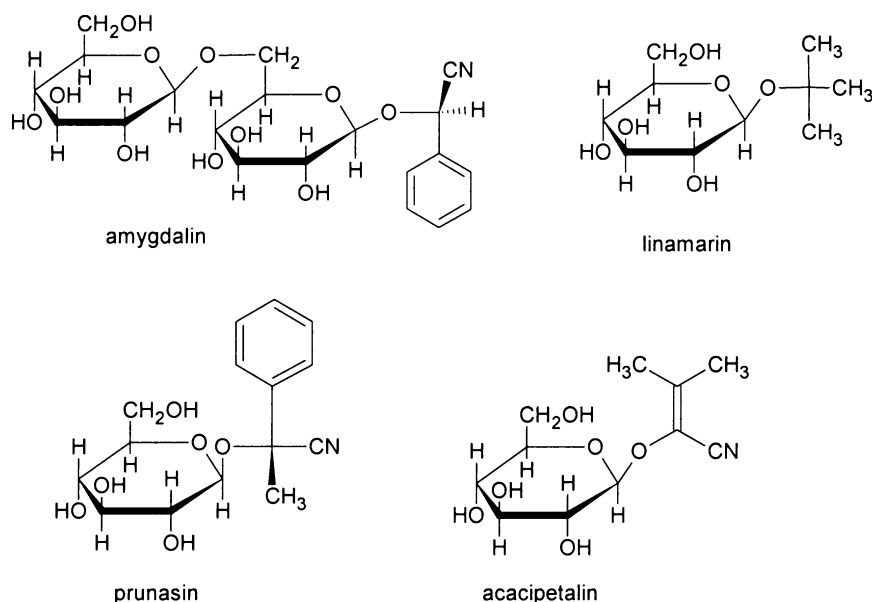
Obrázek 1. Přírodní nitrily ricinin (I) a indol-3-acetonitril (II).

Mezi nejdůležitější přírodní sloučeniny nitrilů patří kyanoglykosidy, které vznikají konjugací (katalyzovanou glukosyltransferasami) nitrilů α -hydroxykyselin a sacharidů. Reakce ovšem může probíhat i opačným směrem (v tomto případě za katalýzy glukosidasou), kdy se hydrolýzou kyanoglykosidů uvolňuje kyanohydrin, který se spontánně nebo enzymově rozkládá za vzniku kyanovodíku (viz Obrázek 2). Tato reakce je podstatou jedovatosti hořkých mandlí a dalších rostlin obsahujících kyanoglykosidy [1] (srov. s Tabulkou 1, str. 2).



Obrázek 2. Biosyntéza a biodegradace kyanoglykosidů.

Odhaduje se, že více než 800 rostlin obsahuje kyanoglykosidy; některé z těchto látek zřejmě slouží jako ochrana proti různým patogenům či býložravcům. Mezi nejznámější glykosidy (viz Obrázek 3 a Tabulka 1) patří amygdalin (zdroj: slivoň trnka – *Prunus spinosa* L.), sambunigrin (zdroj: bez černý – *Sambucus nigra*), linamarin (zdroj: len užitkový – *Linum usitatissimum* L.), prunasin (zdroj: kdouloň obecná – *Cydonia vulgaris*) a acacipetalin (zdroj: *Acacia constricta*) [1, 2]

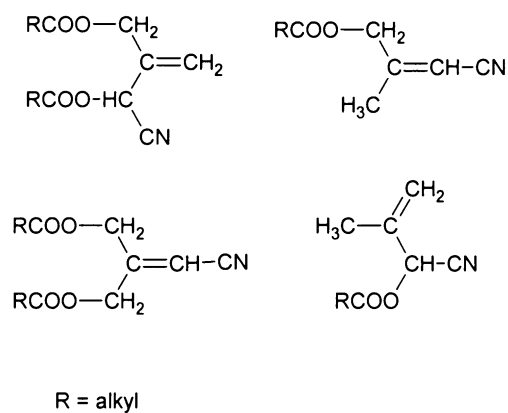


Obrázek 3. Přírodní kyanoglykosidy.

Rostlina	HCN v rostlině (mg/100g rostliny)	Kyanoglykosidy
Maniok	77-104	Linamarin a lotaustralin
Boby chinonu (dozrálá semena), Puerto Rico, černé	300-400	Linamarin a lotaustralin
Len (vrcholky rostlin)	910	Linamarin a lotaustralin
Jetel listy	3-352	Linamarin a lotaustralin
Bambus (klíčící vrcholky)	800	Taxifyllin
Mandle	290	Amygdalin
Broskev plod	160	Amygdalin
Divoká třešeň listy	90-360	Amygdalin

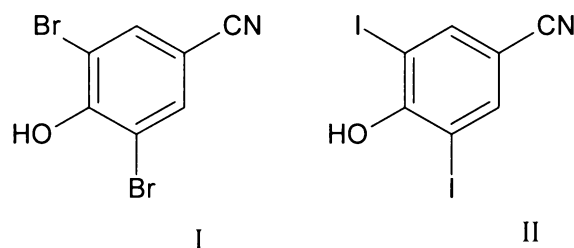
Tabulka 1. Příklad rostlin obsahujících kyanoglykosidy a výskyt HCN v některých částech rostlin [3, 4]. KCN: LD L₀ orální (člověk) = 2,86 mg/kg, LD₅₀ orální (potkan) = 5 mg/kg.

V některých čeledích rostlin (*Sapindaceae*, *Hippocestaneaceae*, *Boraginaceae*) se spolu s triacylglyceroly vyskytují v různém množství i kyanolipidy [5] (viz Obrázek 4). Hydrolýzou kyanolipidů (podobně jako kyanoglykosidů) se uvolňuje toxický kyanovodík.



Obrázek 4. Různé typy kyanolipidů vyskytujících se v přírodě.

Protože nitrily patří mezi látky oblíbené v průmyslových organických syntézách, není překvapivé, že se dostávají do prostředí jako polutanty. Dalším zdrojem syntetických nitrilů v přírodě jsou herbicidy jako například ioxynil a bromoxynil (viz Obrázek 5).

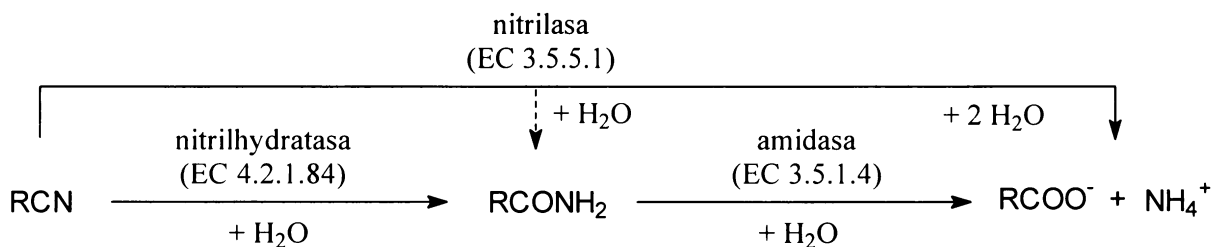


Obrázek 5. Bromoxynil (I) a ioxynil (II) (herbicidy).

1.2 Enzymy hydrolyzující nitrily

Protože se v přírodě vyskytuje velké množství nitrilů, je pochopitelné, že u řady organismů existují enzymy, schopné tyto vesměs toxické látky degradovat. Nitrily mohou být degradovány různými druhy enzymů (oxygenasami, hydrolasami). Tato práce se zaměřila na enzymy hydrolyzující nitrily, především nitrilasy. Menší pozornost byla věnována bakteriálním enzymům nitrilhydratase a amidase.

Hydrolýza nitrilů může probíhat jedнокrokově (za katalýzy nitrilasou) nebo dvoukrokově (za katalýzy nitrilhydratasou a amidasou) (viz Obrázek 6, str. 4).

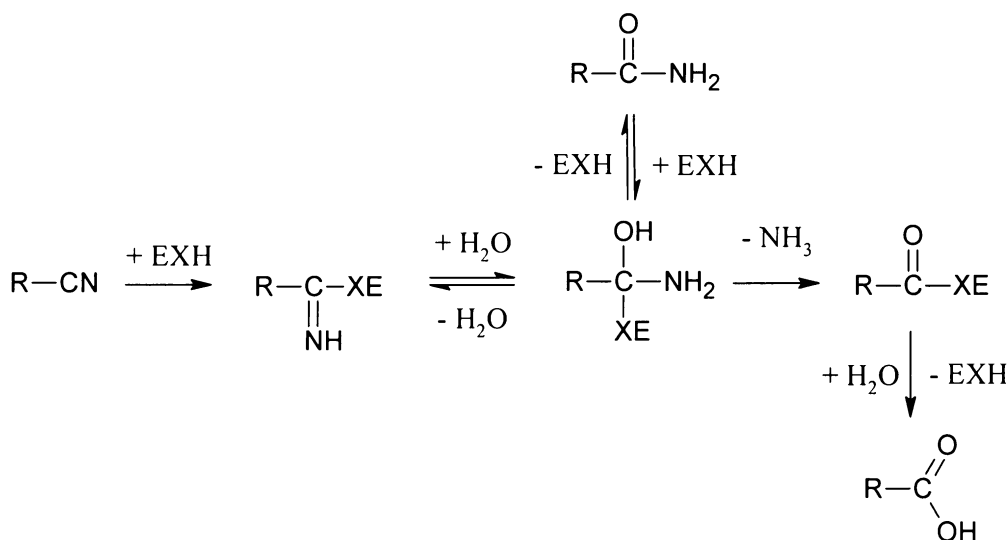


Obrázek 6. Enzymy hydrolyzující nitrily.

1.2.1 Nitrilasa (EC 3.5.5.1)

Nitrilasa je enzym, který je schopen hydrolyzovat nitrily za vzniku karboxylových kyselin a amonného kationtu. Vlivem bočných reakcí může vznikat různé množství příslušného amidu jako vedlejšího produktu (viz Obrázek 7).

Hydrolyzou uvolněný amonný kation se může stát zdrojem dusíku pro syntézu bílkovin. Nitrily tedy slouží řadě mikroorganismů jako zdroj dusíku, čehož se využívá při indukci nitrilasové aktivity, kdy se jako jediný zdroj dusíku používá nitril [6].



Obrázek 7. Pravděpodobný průběh nitrilasou katalyzované hydrolyzy nitrilů za vzniku karboxylové kyseliny a amidu jako vedlejšího produktu [7].

E = enzym, X = S

Nitrilasa neobsahuje žádný kofaktor (na rozdíl od nitrilhydratasy). Předpokládá se, že v jejím reakčním centru se vyskytují thiolové skupiny cysteinu [8, 9] Nitrilasy jsou enzymy skládající se ze 16 i více identických podjednotek [8, 9], většinou s velikostí podjednotky okolo 40 kDa (Tabulka 2).

Organismus	Substrátová specifita	Nejlepší substrát	Molekulová hmotnost nativního enzymu (podjednotky) (kDa)	pH optimum	Teplotní optimum
<i>Acinetobacter</i> sp. AK 226	akrylonitril	akrylonitril	580 (41+43)	8	50 °C
<i>Alcaligenes faecalis</i> ATCC 8750	akrylonitril	<i>p</i> -aminobenzonitril	460 (32)	7,5	40 - 45 °C
<i>Bacillus pallidus</i> Dac 521	aromatické nitrily	4-kyanopyridin	600 (41+72)	6-9	65 °C
<i>Comamonas testosteroni</i>	alifatické nitrily	adiponitril	oligomer (38)		
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>melonis</i>	aromatické nitrily	benzonitril	550 (37)	6 - 11	40 °C
<i>Fusarium solani</i> IMI 196840	aromatické nitrily	1,4-benzodinitril	620 (76)	7,8 - 9,1	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>Ozaenae</i>	halogenované 4-hydroxybenzonitrily	bromoxynil	74 (32)	9,2	35°C
<i>Nocardia (Rhodococcus)</i> NCIB 11216	aromatické nitrily	<i>m</i> -brombenzonitril	560 (45)	7 - 9,5	30 °C
<i>Pseudomonas</i> sp.(SI)	alifatické nitrily	akrylonitril	41 (41)		
<i>Rhodococcus</i> ATCC 39484	aromatické nitrily	2-furanokarbonitril	560 (40)	7,5	30 °C
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> J1	aromatické nitrily	3-chlorbenzonitril	410 (40)	7,6	45 °C

Tabulka 2. Charakteristiky vybraných nitrilas [8]

Nitrilasy byly objeveny u některých druhů rostlin (*Brassicaceae*, *Graminaceae*, *Musaceae*) [10], kde se účastní přeměny indol-3-acetonitrilu na kyselinu indol-3-octovou, která je významným rostlinným růstovým hormonem. Nitrilasa byla také objevena v rostlině *Arabidopsis thaliana* [11], které je vzhledem k sekvenovanému genomu věnována velká pozornost [12].

Nejčastěji se však nitrilasy vyskytují u bakterií (především u rodů *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Nocardia* a *Pseudomonas* [13]), kde jsou tyto enzymy v posledních dvaceti letech intenzivně zkoumány.

Fungální nitrilasy nejsou na rozdíl od svých bakteriálních protějšků prostudovány v takovém měřítku, na rozdíl od svých bakteriálních protějšků. U řady vláknitých hub (*Penicilium*, *Myrrothecium*, *Fusarium*, *Aspergillus* [14]) již byly nitrilasy objeveny, ale zatím byly purifikovány a částečně charakterizovány pouze dva enzymy, oba z rodu *Fusarium* [15, 16]. Je tedy zřejmé, že vláknité houby jsou potenciálním zdrojem mnoha dalších nitrilas.

V Tabulce 2 jsou přehledně uvedeny některé charakteristiky vybraných nitrilas a je vidět, že většina nitrilas má podobné pH optimum a velkou molekulovou hmotnost nativního enzymu.

V dnešní době se kromě přírodních enzymů stále více používají rekombinantní enzymy, exprimované nejčastěji v *E. coli*, nebo rostlinách tabáku (rekombinantní nitrilasa z *Arabidopsis thaliana*).

1.2.2 Nitrilhydratasa (EC 4.2.1.84) a amidasa (EC 3.5.1.4)

Nitrilhydratasa katalyzuje hydrataci nitrilu na amid, který je substrátem dalšího enzymu, amidasy, která vzniklý amid hydrolyzuje na karboxylovou kyselinu a amonný ion (viz Obrázek 6, str. 4).

Nitrilhydratasa je metaloenzym vyžadující ionty Fe^{III} nebo Co^{III} a vyskytující se většinou jako dimerní nebo tetramerní enzym [8].

Podobně jako nitrilasa se v celé řadě organismů vyskytují i nitrilhydratasa a amidasa, především u různých druhů bakterií (*Agrobacterium*, *Bacillus*, *Comamonas*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*) [17], ale i ve vyšších organismech (*Candida*, *Cryptococcus*) [17]. Tyto dva enzymy, podobně jako nitrilasa, produkují hydrolyzou nitrilů karboxylové kyseliny, ale poměr vzniklého amidu a kyseliny zde závisí na poměrném zastoupení obou enzymů a reakčních podmínkách, především teplotě, neboť tyto enzymy mají zpravidla různá teplotní optima [18].

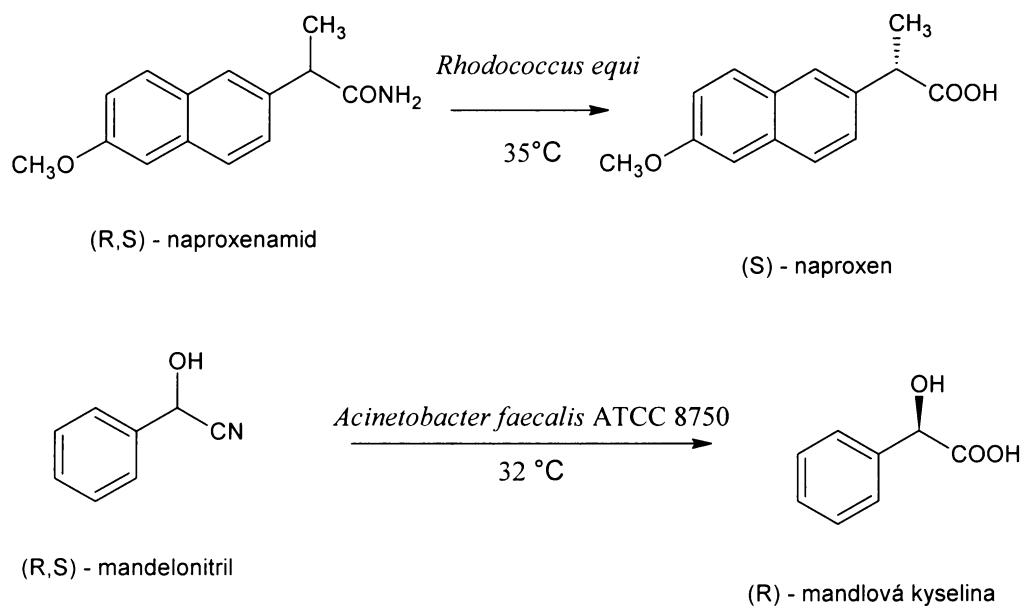
1.3 Použití nitrilas, nitrihydratas a amidas

Enzymy hydrolyzující nitrily získávají na oblibě v organických syntézách, a to především tam, kde je třeba zpracovávat tepelně labilní látky, protože klasická hydrolyza nitrilů vyžaduje extrémní hodnoty pH, vysoké teploty a tlak. Dále se využívá chemo-, stereo- a regioselektivity [19] těchto enzymů, což je nesporná výhoda.

Často je limitujícím faktorem širšího použití těchto enzymů v průmyslu jejich nízká stabilita nebo malá výtěžnost z organismů. Přesto se již enzymy z několika druhů mikroorganismů využívají v chemických výrobcích a postupně se zlepšuje komerční dostupnost těchto enzymů [20, 21].

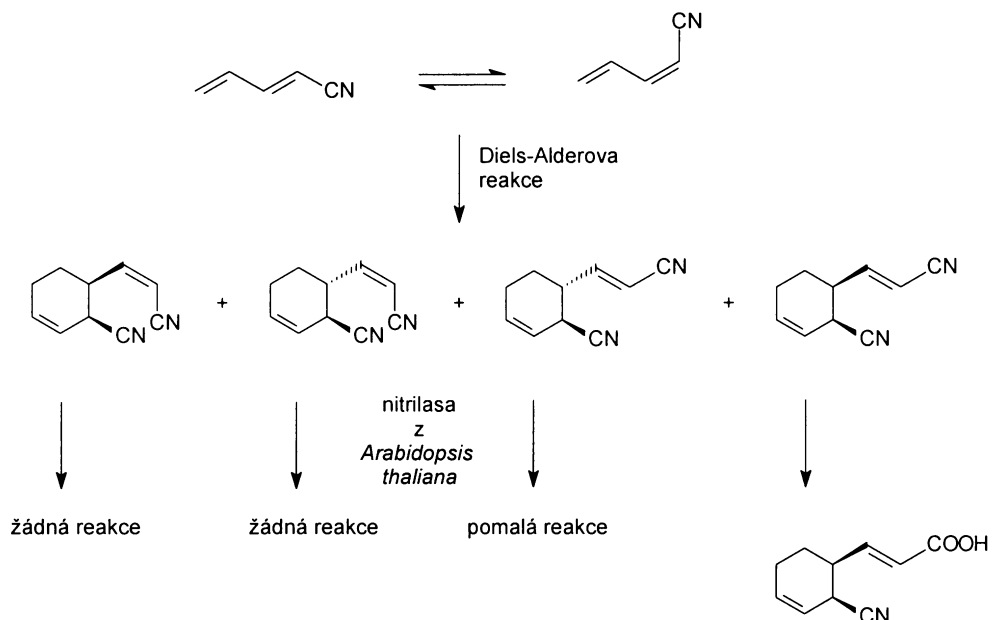
Pomocí buněk *Rhodococcus equi* (při využití jejich amidasové aktivity) se podařilo při 35 °C selektivně hydrolyzovat (*R,S*)-naproxenamid na (*S*)-naproxen (s enantiomerním přebytkem 99% [22]) (viz Obrázek 8, str. 7). (*S*)-Naproxen je nesteroidní antiflogistikum příbuzné ibuprofenu.

Pomocí enzymu z *Acinetobacter faecalis* ATCC 8750 byla z (*R,S*)-mandelonitrilu získána při 91% konverzi čistá kyselina (*R*)-mandlová [23] (viz Obrázek 8), která má významné použití ve farmaceutickém průmyslu jako výchozí surovina pro syntézu antibiotik.



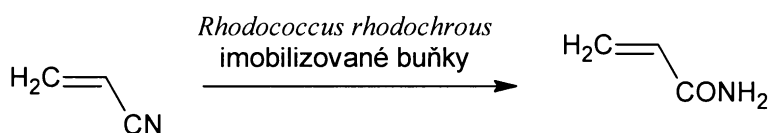
Obrázek 8. Stereoselektivní biotransformace katalyzované bakteriální amidasou a nitrilasou.

Výborně lze demonstrovat příklad (*E,Z*)-selektivity a diastereoselektivity u syntézy kyseliny (*E*)-*cis*-3-(2-kyanocyklohex-3-enyl)propenové (viz Obrázek 9, str. 8) ze směsi izomerů nitrilů pomocí rekombinantní nitrilasy z *Arabidopsis thaliana*, kdy ze čtyř možných (*E,Z*)- a diastereoizomerů má tato nitrilasa vysokou specifitu pouze pro jeden z nich [24].



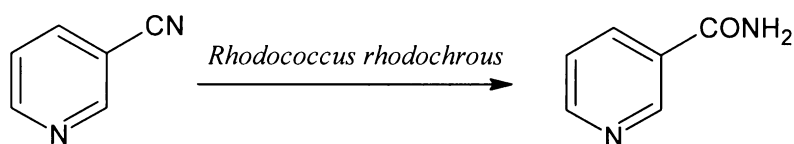
Obrázek 9. Chemoenzymatická syntéza kyseliny (*E*)-*cis*-3-(2-kyanocyklohex-3-enyl)propenové.

Nejvýznamnější průmyslové uplatnění zatím našla nitrilhydratasa (z *Rhodococcus rhodochrous*) při výrobě akrylamidu (viz Obrázek 10), kterého se enzymatickou hydratací vyrobí 30 000 tun ročně [25, 26].



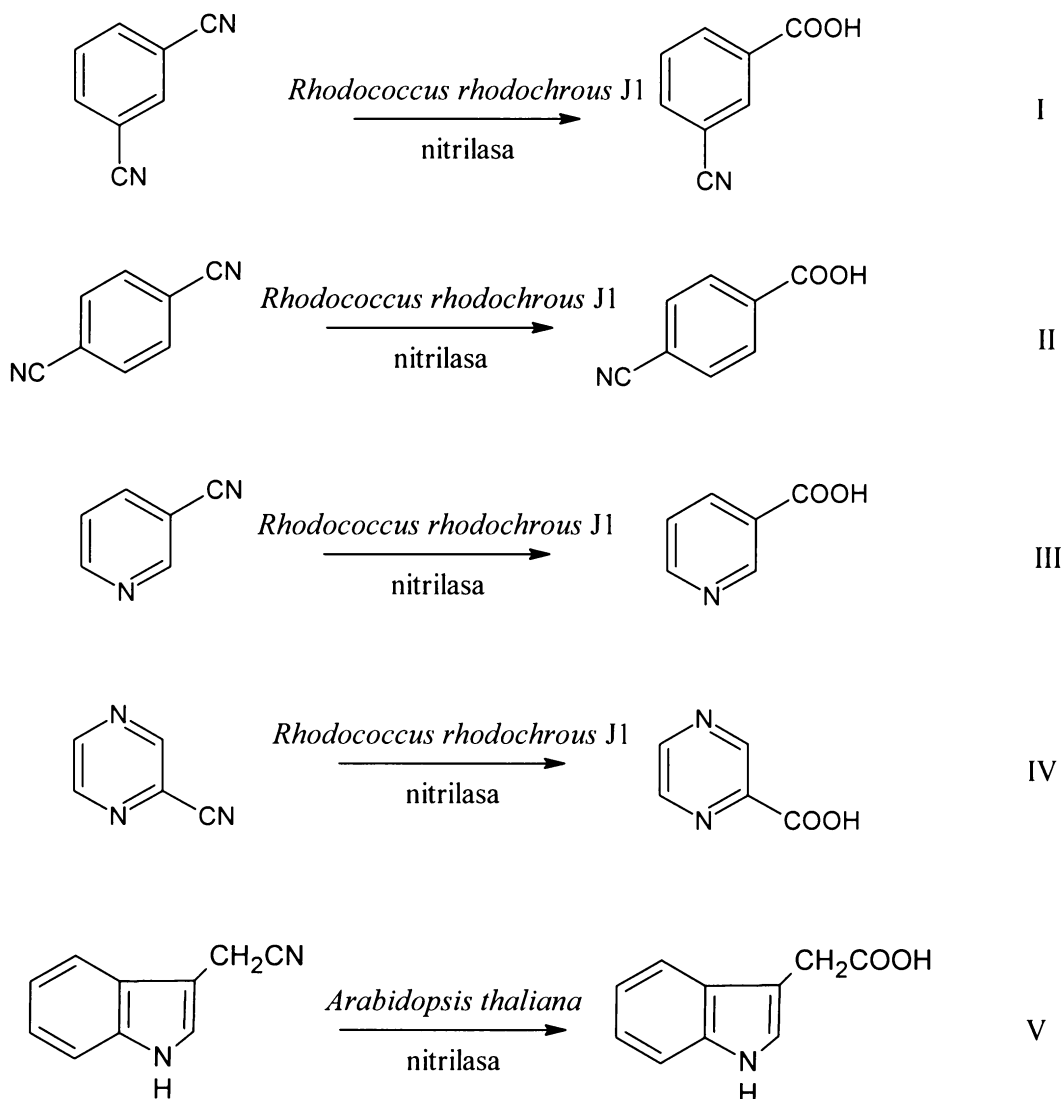
Obrázek 10. Průmyslové použití nitrilhydratasy *R. rhodochrous* při biosyntéze akrylamidu.

Dále je tento enzym průmyslově využíván při hydrataci 3-kyanopyridinu na nikotinamid (viz Obrázek 11) [27], který slouží jako nutriční doplněk.



Obrázek 11. Enzymová hydratace 3-kyanopyridinu za vzniku nikotinamidu.

Nitrilasa z *R. rhodochrous* J1 byla navržena pro výrobu 3- a 4-kyanobenzoové kyseliny a kyseliny nikotinové [28, 29, 30]. Tento enzym lze též použít pro výrobu kyseliny pyrazinové (aktivní agens proti patogenním houbám) [29] (viz Obrázek 12). Nitrilasa z *A. thaliana* zřejmě katalyzuje *in vivo* hydrolyzu indol-3-acetonitrilu. Tato reakce probíhá u většiny rostlin, kde se uplatňuje kyselina indol-3-octová jako auxin (viz Obrázek 12).



Obrázek 12. Uplatnění bakteriálních a rostlinných enzymů v biotransformacích nitrilů.

- I – 1,3-dikyanobenzenu na kyselinu 3-kyanobenzoovou
- II – 1,4-dikyanobenzenu na kyselinu 4-kyanobenzoovou
- III – 3-kyanopyridinu na kyselinu nikotinovou (nutriční doplněk)
- IV – pyrazinkarbonitrilu na kyselinu pyrazinovou (agens proti patogenním houbám)
- V – indol-3-acetonitrilu na kyselinu indol-3-octovou (auxin)

2 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo:

- 1) Získat preparát fungální nitrilasy s vysokou specifickou aktivitou, který by byl také dlouhodobě stabilní.
- 2) Pro zvýšení aktivity buněk a buněčného extraktu nalézt nové induktory, případně zlepšit způsob kultivace.
- 3) Nalézt vhodné stabilizátory enzymu a zjistit optimální podmínky pro uchovávání enzymu.
- 4) Optimalizovat způsob imobilizace enzymu pro opakované použití při biokonverzích.

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Mikroorganismy

V diplomové práci byly používány kultury mikroorganismů, které byly uchovávány v lednici při 4 °C na modifikovaném mediu podle Czapka – Doxe (viz 3.2 – medium 1; vláknité houby) nebo na masopeptonovém agaru (viz 3.2 – medium 6; bakterie).

Jednalo se o tyto mikroorganismy: *Aspergillus niger* K10, *Fusarium solani* O1, *Rhodococcus equi* A4.

A. niger byl původně užíván pro výrobu kyseliny citronové v Lachemě Kaznějov a je uložen ve Sběrce kultur hub Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy (CCF) v Praze.

R. equi A4 i *F. solani* O1 jsou izoláty z prostředí (půdy). Kmen *R. equi* [22] byl identifikován Referenční laboratoří pro korynebakteria 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a je uložen ve Sběrce mikroorganismů Masarykovy Univerzity (CCM) v Brně. Kmen *F. solani* [31] byl identifikován ve Sběrce kultur hub Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy (CCF) v Praze a je uložen tamtéž.

3.2 Kultivační a udržovací media

Všechna používaná media mají svůj základ v mediích uvedených v [32], případné modifikace jsou uvedeny níže.

Medium 1 (modifikované pevné medium podle Czapka – Doxe, pro uchovávání sbírkových mikroorganismů)

Předpis pro 1 litr výsledného media

K ₂ HPO ₄	1 g
KCl	0,5 g
Kvasničný extrakt	0,05 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01 g
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,001 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0067 g
Sacharosa	20 g
Agar	15 g

Tyto látky se rozpustí v destilované vodě tak, aby celkový objem roztoku byl 970 ml.

Po sterilizaci media se za aseptických podmínek přidají níže uvedené látky rozpuštěné v 30 ml roztoku voda : methanol (2:1), sterilizované filtrací přes filtr s velikostí pórů 0,22 μm .

3-Kyanopyridin	2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g

Medium 2 (modifikované kapalně medium podle Czapka – Doxe)

Na rozdíl od media 1 se přidává pouze 15 g sacharosy a žádný agar.

Po sterilizaci media se za aseptických podmínek přidají níže uvedené látky rozpuštěné v 30 ml roztoku voda : methanol (2:1), sterilizované filtrací přes filtr s velikostí pórů 0,22 μm (viz 3.5.3).

2-Kyanopyridin	2 g
Valeronitril	0,25 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g

Medium 3 (kultivační medium bohaté na živiny)

Navážka na 1 litr media

Sacharosa	30 g
NaNO ₃	2 g
Sladový extrakt	5 g
Kvasničný extrakt	5 g

Před sterilizací se pH upraví na hodnotu 7,3.

Medium 4 (kultivační medium pro indukci nitrilasové aktivity)

Na rozdíl od media 1 neobsahuje sacharosu a agar.

pH takto připraveného roztoku se před sterilizací upraví na pH 7,3.

Po 1 hodině kultivace v tomto mediu se přidají níže uvedené látky rozpuštěné v 30 ml roztoku voda : methanol (2:1), sterilizované filtrací přes filtr s velikostí pórů 0,22 μm (viz 3.5.3).

2-Kyanopyridin	3 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g

Medium 5 (sladinový agar)

Medium 3 s přídavkem 15 g agaru

Medium 6 (masopeptonové medium pro uchovávání *R. equi*)

Navážka na 1 litr media

Hovězí extrakt	3 g
Pepton	10 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
Vodovodní voda	dolít do 1 litru

Před sterilizací se pH upraví na hodnotu 7,1.

Medium 7 (kultivační medium pro *R. equi*)

NaCl	0,1 g
K ₂ HPO ₄	1,03 g
KH ₂ PO ₄	0,75 g
EDTA	0,015 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0067 g
MnSO ₄ .H ₂ O	0,0013 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,0015 g
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,49 mg
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,72 mg
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,45 mg
Glycerol	10 g

Doplnit do 980 ml destilovanou vodou.

pH se před sterilizací upraví na hodnotu pH 7.

Odděleně se sterilizují roztoky (každý zvlášť) MgSO₄.7H₂O (20 g/l) a CaCl₂.2H₂O (3,1 g/l). Před očkováním se za aseptických podmínek přidá do každé baňky (s 98 ml media) 1 ml z každého roztoku (viz 3.5.3).

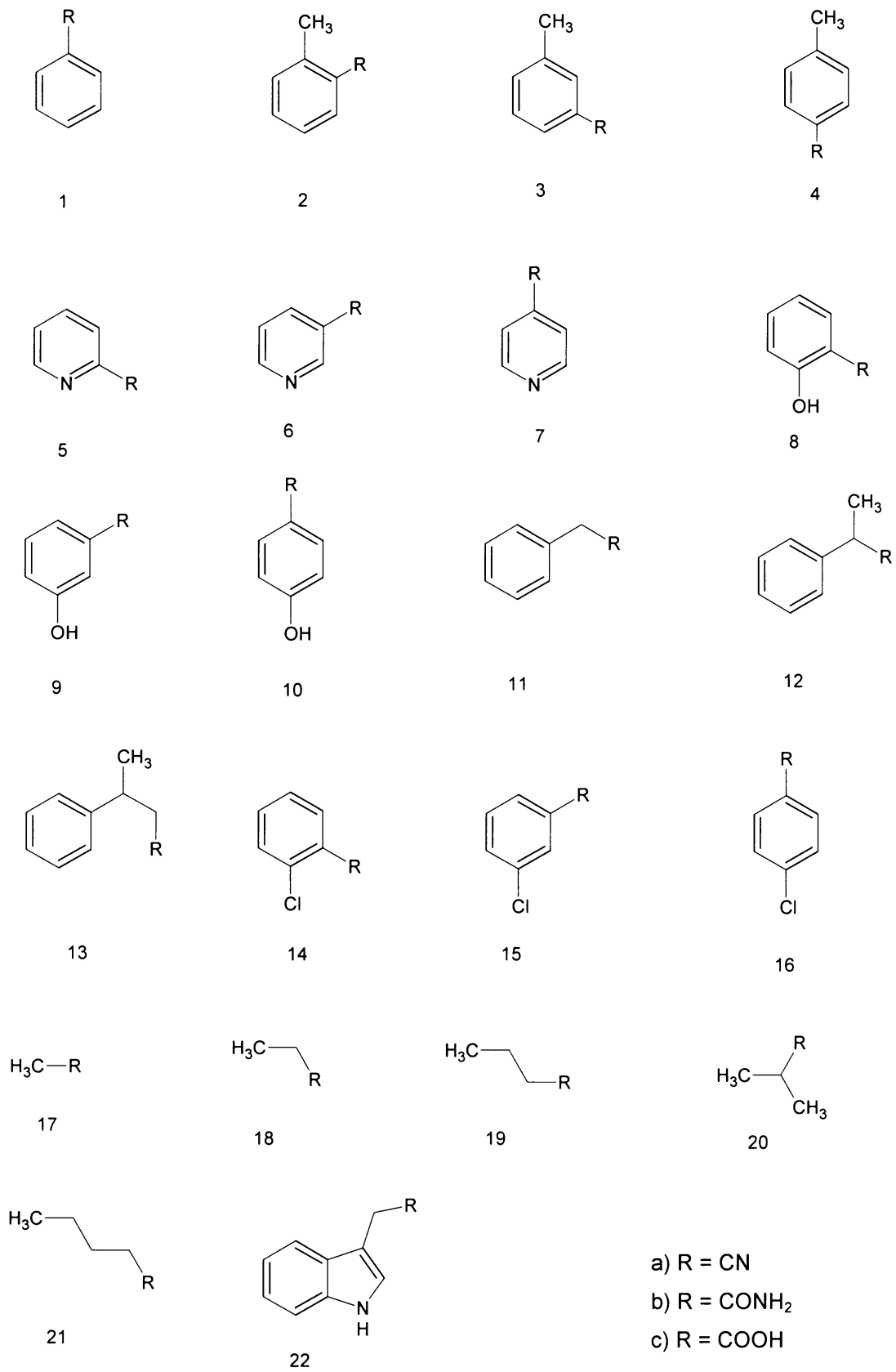
3.3 Chemikálie a materiály

3.3.1 Substráty enzymů

Označení	Substrát
1a	benzoniřil
2a	2-tolunitril
3a	3-tolunitril
4a	4-tolunitril
5a	2-kyanopyridin
6a	3-kyanopyridin
7a	4-kyanopyridin
8a	2-hydroxybenzoniřil
9a	3-hydroxybenzoniřil
10a	4-hydroxybenzoniřil
11a	2-fenylacetonitril
12a	2-fenylpropionitril
13a	3-fenylbutyronitril
14a	2-chlorbenzoniřil
15a	3-chlorbenzoniřil
16a	4-chlorbenzoniřil
17a	acetonitril
18a	propionitril
19a	butyronitril
20a	isobutyronitril
21a	valeronitril
22a	indol-3-acetonitril

Tabulka 3. Označení substrátů používaných pro biotransformace

Všechny používané substráty pocházely z komerčních zdrojů. Všechny substráty, kromě **5a – 7a**, měly analytickou čistotu. Stupeň čistoty substrátů **5a – 7a** byl nižší – jednalo se o čisté chemikálie pro syntézu (čistota > 98%).



Obrázek 13. Strukturální vzorce nitrilů, používaných jako substráty, a jejich produktů.

3.3.2 *Pufry*

50 mM, 100 mM TRIS/HCl pufr

Tris(hydroxymethyl)-aminoethan (50 mM 6,05 g/l; 100 mM 12,10 g/l)

pH upraveno na požadovanou hodnotu přidavkem koncentrované (32 – 38%) kyseliny chlorovodíkové.

50 mM fosforečnanový pufr pH 8

A: Na₂HPO₄·12H₂O 17,9 g/l

B: KH₂PO₄ 6,8 g/l

Roztoky A a B se smíchají v poměru 81:19.

Glycinový elektrodový pufr pH 8,3

Zásobní 5krát koncentrovaný roztok

TRIS 15,1 g

Glycin 94 g

10% roztok SDS 50 ml

Doplnit destilovanou vodou do 1 litru. Pro použití je třeba roztok 5krát zředit .

Dithiothreitolový pufr pH 6,8

TRIS 6,05 g/l

Dithiothreitol 15,42 g/l

SDS 20 g/l

Bromfenolová modř 1 g/l

Glycerol 100 g/l

Doplnit destilovanou vodou do 1 litru a pH upravit kyselinou chlorovodíkovou na hodnotu pH 6,8

50 mM TRIS/HCl + 0,8 M síran amonný pH 7 – 9

TRIS 6,05 g/l

(NH₄)₂SO₄ 105,71 g/l

pH se upraví koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou na požadovanou hodnotu.

50 mM TRIS/HCl + 1M síran sodný pH 8

TRIS 6,05 g/l
Na₂SO₄.10 H₂O 322,2 g/l nebo Na₂SO₄ 142,04 g/l

pH se upraví koncentrovanou kyselinou chlorovodíkové na požadovanou hodnotu.

50 mM TRIS/HCl pufr + 10mM, 150 mM, 1 M NaCl; pH 7,6; 8

TRIS 6,05 g/l
NaCl (10 mM 0,58 g/l, 150 mM 8,77 g/l, 1 M 58,44 g/l)

pH se upraví koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou na požadovanou hodnotu.

Nasycený roztok síranu amonného, 1 mM EDTA, 50 mM TRIS/HCl, pH 8

TRIS 6,05 g/l
EDTA 0,372 g/l
(NH₄)₂SO₄ 760 g/l

V 1 litru vody se rozpustí 600 g (NH₄)₂SO₄, 6,05 g TRIS a 0,372 g EDTA. Po úplném rozpuštění všech komponent se po malých dávkách (cca 10 g) přidává síran amonný. Po jeho úplném rozpuštění se přidá další dávka. Když se již další síran nerozpustí, odfiltruje se nerozpuštěný síran a pH se upraví na požadovanou hodnotu pomocí koncentrované kyseliny chlorovodíkové.

Fyziologický roztok + 0,1% Tween

NaCl 8,5 g/l
Tween 80 1 g/l

HPLC pufr

10%, 30% acetonitril, 0,1% H₃PO₄

Acetonitril (100 ml/l, 300 ml/l), 86% H₃PO₄ (1 ml/l), voda pro HPLC (dolít do 1 litru)

10%, 20% acetonitril, 5 mM fosforečnanový pufr, pH 7

Acetonitril (100 ml/l, 200 ml/l), Na₂HPO₄.12H₂O (1,79 g/l), voda pro HPLC (dolít do 1 litru), pomocí 86% H₃PO₄ upravit pH na hodnotu 7.

Univerzální pufr Brittonův – Robinsonův pH 1,8 – 11,98 [33]

Roztok A:	kyselina boritá	2,42 g/l
	kyselina octová	2,3 ml/l
	kyselina fosforečná (86%)	2,7 ml/l

Roztok B:	NaOH	8 g/l
-----------	------	-------

Roztok o požadovaném pH (v rozmezí 1,8 – 11,98) se připraví přilítím roztoku B (0 – 100 ml) ke 100 ml roztoku A viz [33].

McIlvaine – citran fosforečnanový pufr [34]

Roztok A:	kyselina citronová	21,01 g/l
-----------	--------------------	-----------

Roztok B:	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	53,65 g/l
-----------	--	-----------

pH 3: 39,8 ml roztoku A + 10,2 ml roztoku B, doplnit do 100ml

pH 4: 30,7 ml roztoku A + 19,3 ml roztoku B, doplnit do 100ml

pH 5: 24,3 ml roztoku A + 25,7 ml roztoku B, doplnit do 100ml

3.3.3 Chromatografické kolony

ACE C8, 5µm, 250 x 4 mm (Advanced Chromatography Technologies, USA)

Nova – Pak C18, 5µm, 150 x 3.9 mm (Waters Associates, USA)

Polymer IEX H⁺, 8µm, 250 x 8 mm (Watrex, ČR)

Kolony používané pro imobilizaci proteinů:

HiTrap Fast Flow kolony o objemu 1ml (Amersham Bioscience)

Butyl Sepharose

Octyl Sepharose

Phenyl Sepharose

Q Sepharose

Kolony používané pro purifikaci proteinů:

HiPrep Amersham Bioscience

Superdex 200 10/300 GL, objem kolony 24 ml

Sephacryl S-200 16/60 HR, objem kolony 120 ml

Q Sepharose 16/10 FF, objem kolony 20 ml

Phenyl Sepharose 16/10 FF, objem kolony 20 ml

3.4 Přístroje a zařízení

Mikrocentrifuga Mini Spin Plus (Eppendorf, Německo)

Thermomixer Compact a Thermomixer Comfort (Eppendorf, Německo)

Třepačka Lab-Shaker (Adolf Kühner AG, Švýcarsko)

Očkovací box MSC 9 (Jouan, Francie)

Analytické váhy (Mettler, Německo)

Váhy Scout SC6010 (Ohaus, USA)

Lyofilizátor LYOVAC GT2 (Leybold – Heraeus, Německo)

Přístroj na čištění vody pro HPLC Watrex Ultrapur (Watrex, ČR)

Autokláv Kestler (LTE Scientific, Anglie)

pH metr pH/ION 340i (WTW, Německo)

Čerpadlo s řídicí jednotkou Waters 600 Controller (Waters Associate, USA)

Detektor PDA 996 a Autosampler plus 717 (Waters, USA)

Injektor Rheodyne model 7725 (Rheodyne Inc., USA)

Vakuová pumpa DOA V130NB (Waters – Millipore, USA)

Přístroj na výrobu imobilizovaných preparátů LentiKats® (MEGA, ČR)

Pumpa Delta Chrom SDS 030 a DeltaChrom SDS 020 (Watrex, ČR)

Spektrální UV/VIS detektor, Spektra 100 (Thermo Separation Products)

Termostatický box Delta Chrom Temperature Control Unit (Watrex, ČR)

BioSys 510, BioSys 500 (Beckman, USA)

ÄKTA prime Plus (Amersham Bioscience, Švédsko)

Spektrofotometr UV-1202 (Shimadzu, Japonsko)

Centrifuga Beckman J2-21 a J-6B (Beckman, Irsko)

Centrifugační rotory Beckman JA-10, JA-20, JS-5.2 (Beckman, Irsko)

Mrazák Advantage (-70 °C)

Oscilační mlýnek MM 200 (Retsch, Německo)

Bodotávek SMP (Bibby Sterilin, Velká Británie)

Vakuová odparka Rotavapor – M (Büchi, Švýcarsko)

Software: Millennium Chromatography Manager; Microsoft Office 2000; Microsoft Windows 2000; CSW – Chromatography Station for Windows 1.7; PrimeView 5.0 (Unicorn 5.01)

3.5 Mikrobiologické metody

3.5.1 Sterilizace

Všechna kultivační media, laboratorní sklo a předměty používané při očkování byly sterilizovány v autoklávu 30 min, při 120 °C a tlaku 100 kPa. 2-Kyanopyridin, 3-kyanopyridin, valeronitril a MgSO₄·7H₂O (mimo medium 7) byly sterilizovány filtrací přes membrány s velikostí pórů 0,22 μm.

3.5.2 Kultivace na pevném mediu

Pro kultivace na pevném mediu byly používány sterilní plastové Petriho misky o průměru 9 cm.

Pevné medium 1 (viz 3.2) bylo používáno pro uchovávání kultur vláknitých hub. Po inokulaci byly kultury *F. solani* (inokulace myceliem) inkubovány 3 dny při 28 °C, kultury *A. niger* (inokulace spórami) po dobu 3 až 10 dní do vysporulování.

Kultury *R. equi* byly po inokulaci (medium 6, viz 3.2) inkubovány jeden den při 28 °C.

Poté byly všechny narostlé kultury uchovávány v lednici při 4 °C.

3.5.3 Kultivace v kapalném mediu

3.5.3.1 *Aspergillus niger*

Kultivace *A. niger* probíhala ve 100 ml kapalného media 2 (viz 3.2) (97 ml media + 3 ml odděleně sterilizovaného 2-kyanopyridinu, valeronitrilu a síranu hořečnatého) v Erlenmeyerových baňkách o objemu 500 ml na třepačce (200 otáček/min, excentricita 5 cm) při teplotě 28 °C. Kultura byla do kapalného media inokulována spórami za sterilních podmínek ze zásobní kultury na pevném mediu (viz 3.5.2).

Ke kultuře na pevném mediu bylo přidáno 10 ml fyziologického roztoku s 0,1% Tweenem. Sterilní očkovací kličkou byly spóry a mycelium opatrně uvolněny a smíchány s roztokem. Tímto roztokem bylo pomocí sterilní pipety zaočkováno 0,5 – 1 ml tohoto homogenátu do jedné baňky se 100 ml media 2. Kultivace probíhala 2 – 3 dny při teplotě 28 °C.

3.5.3.2 *Fusarium solani*

Varianta 1, Kultivace probíhala podobně jako v případě *A. niger* (k očkování se nepoužívalo spór, ale mycelia).

Varianta 2, Dvoukroková kultivace [16]: Do Erlenmeyerových baněk o objemu 500 ml s 200 ml bohatého media 3 (viz 3.2) byla zaočkována kultura *F. solani* stejně jako ve variantě 1. Po 30 – 48 hodinách bylo mycelium zfiltrováno, promyto médiem 4 (bez 2-kyanopyridinu) a ve sterilním prostředí rozděleno do 500 ml Erlenmeyerových baněk s 97 ml media 4 (do stejného počtu baněk jako v prvním kroku). Po 1 hodině kultivace při 28 °C byly do každé baňky přidány 3 ml roztoku 2-kyanopyridinu a $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ podle návodu (viz 3.2). Po 24 hodinách bylo mycelium zfiltrováno, propláchnuto 50 mM TRIS/HCl pufrem (pH 8), zmrazeno při -70 °C a poté lyofilizováno 24 hodin. Lyofilizované mycelium bylo uchováváno při -20 °C.

3.5.3.3 *Rhodococcus equi*

Ke kultuře *R. equi* na pevném mediu (3.5.2) bylo přidáno 7 ml fyziologického roztoku. Sterilní očkovací kličkou byla kultura homogenizována do roztoku. 1 – 2 ml suspenze buněk byly zaočkovány do 100 ml media 7 (viz 3.2) v Erlenmeyerově baňce o objemu 500 ml. Poté bylo do každé baňky přidáno ještě 100 µl acetonitrilu. Takto zaočkované medium bylo inkubováno při 28 °C za třepání (200 ot./min, excentricita 5 cm) 1 – 2 dny, dokud optická densita při 610 nm nedosáhla hodnoty alespoň 1 AU.

3.5.4 *Sklizeň mycelia*

Narostlá biomasa byla zfiltrována na Büchnerově nálevce za vakua a propláchnuta 50 mM TRIS/HCl pufrem (pH 8).

3.5.5 *Sklizeň buněk Rhodococcus equi*

Narostlé buňky byly odstředěny (30 min při 5 000 g a 4 °C). Poté byly resuspendovány ve fosforečnanovém pufru (50 mM, pH 8) a znovu odstředěny (30 min, 5000 g, 4 °C). Takto upravené buňky byly uchovávány při teplotě -20 °C, nebo byly okamžitě zpracovány (viz 3.8.2).

3.6 Lyofilizace

Vzorky (mycelium, enzym) určené k lyofilizaci byly umístěny do kulatých baněk (nebo byly do těchto baněk vloženy mikrozkušavky se vzorkem), zmrazeny kapalným dusíkem nebo při teplotě $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ a lyofilizovány při teplotě místnosti a tlaku přibližně 10 Pa po dobu nejméně 12 hodin.

Jako protektanty byly zkoušeny 2% roztoky sacharosy, xylitolu a trehalosy, dále 1 mM roztok EDTA.

3.7 Měření pH

pH bylo měřeno pomocí pHmetru pH/ION 340i (WTW, Německo) kalibrovaným pomocí standardních pufrů na pH 7 a pH 4.

3.8 Purifikace a charakterizace enzymů

3.8.1 Příprava buněčného extraktu z vláknitých hub

Příprava buněčného extraktu z A. niger: Zfiltrované mycelium bylo zmrazeno kapalným dusíkem a rozdrceno v třecí misce na prášek. Na 1 g takto rozdrceného mycelia byly přidány 3 ml TRIS/HCl pufru (50 mM, pH 7,6). Rozdrcené mycelium s pufrem bylo mícháno na ledové lázni 30 minut. Poté byly zbytky mycelia odděleny centrifugací při 13 000 g ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 min). Získaný extrakt byl srážen nasyceným roztokem síranu amonného do nasycení 40 – 50%. Vzniklá peleta byla resuspendována v tak malém množství TRIS/HCl pufru, ve kterém se ještě rozpustila, a tento částečně purifikovaný extrakt (dále jen síranová frakce enzymu) byl uchováván při teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro krátkodobé použití. Pro delší uchování byl rozdělen do menších objemů a zamražen při $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Příprava buněčného extraktu z F. solani: K lyofilizovanému myceliu, rozetřenému v třecí misce na prášek, byl přidán TRIS/HCl pufr (50 mM, pH 8; 3 ml na 1 mg vlhkého mycelia, tj. na 0,15 mg lyofilizovaného mycelia) a směs 30 minut míchána na ledové lázni. Poté byly zbytky mycelia odstraněny při 13 000 g ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 min). Takto získaný extrakt byl uchováván v lednici při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. V případě potřeby byl nový extrakt snadno vyroben z lyofilizovaného mycelia uskladněného při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.8.2 Příprava buněčného extraktu z bakterie *Rhodococcus equi* A4

Odstředěné buňky (2 ml velmi husté suspenze) *R. equi* byly převedeny do vymražené (při -20 °C) achátové misky oscilačního mlýnku MM 200 a byly přidány skleněné kuličky (balotiny; o průměru 0,25 – 0,50 mm) ve stejném objemu jako suspenze buněk. Poté byly buňky mlety 35 min při frekvenci 30 Hz.

K rozemletým buňkám bylo přidáno 5 ml 50 mM TRIS/HCl pufru (pH 8) a mletí v mlýnku pokračovalo 20 min při frekvenci 20 Hz.

Nakonec byly rozemleté buňky odstředěny (10 000 g, 20 min, 4 °C) a supernatant (buněčný extrakt) byl uchováván v lednici při 4 °C (1 – 2 týdny) nebo okamžitě použit k imobilizaci (viz 3.9.4).

3.8.3 Purifikace enzymů

Pro purifikaci proteinů byla používána zařízení BioSys 500, BioSys 510, ale zejména Äkta Prime Plus, která se skládala z čerpadla, UV detektoru (280 nm) a vodivostního detektoru. Tato sestava byla připojena k počítači, kde byla zaznamenávaná data zpracovávána programem PrimeView 5.0 (Unicorn 5.01).

Pro purifikaci nitrilasy z *A. niger* byla využita metoda, kterou vypracoval v rámci své doktorské práce O. Kaplan. Jako první krok bylo použito frakční srážení buněčného extraktu roztokem síranu amonného v 50 mM pufru TRIS/HCl (pH 7,6), v rozmezí 40 – 50% nasycení. Vzniklá sraženina byla odstředěna a následně resuspendována v 50 mM TRIS/HCl pufru (pH 7,6). Takto připravený hrubý extrakt byl nejprve 30 minut centrifugován při 4 °C a 13 000 g a poté aplikován na kolonu Sephacryl S-200, kde byl k eluci použit 50 mM TRIS/HCl pufr (pH 7,6) obsahující 150 mM NaCl. Eluční rychlost byla 0,5 ml/min. Aktivní frakce byly bez zahuštění aplikovány na iontoměničovou kolonu Q Sepharose 16/10 a eluovány gradientem 10 mM – 1M NaCl v 50 mM TRIS/HCl pufru (pH 7,6) po dobu 90 min. Eluční rychlost byla 1 ml/min. Aktivní frakce z tohoto kroku byly zahuštěny na molekulových sítích Centriprep YM-30 (s velikostí pórů pro molekuly do 30 kDa) při 1500 g a 4 °C. Takto zahuštěný purifikovaný enzym byl skladován v roztoku obsahujícím sorbitol (20%) při -70 °C.

Pro purifikaci *F. solani* byl použit obdobný purifikační protokol, jen srážení síranem amonným bylo vynecháno (vzhledem k nižší účinnosti) a všechny použité pufrы měly pH 8. Takto purifikovaná nitrilasa byla skladována v -70 °C v roztoku obsahujícím 5,5% sacharosy.

3.8.4 Stanovení bílkovin

Bílkoviny byly stanovovány reakcí s Coomassie Brilliant Blue R-250 (Protein Assay, Bio-Rad) [35]. Kalibrace byla prováděna na roztok hovězího sérového albuminu (BSA) v rozmezí koncentrací 0,1 – 0,6 mg bílkovin/ml.

3.8.5 Elektroforéza

SDS elektroforéza byla prováděna metodou podle Laemmliho [36]. Jako zaostřovací gel byl použit 5% polyakrylamidový gel a jako dělicí gel 12% polyakrylamidový gel.

Vzorky na elektroforézu byly nejprve 5 minut inkubovány (95 °C) s dithiothreitolovým pufrém, potom zchlazeny na ledu. Takto připravené vzorky byly nanášeny na gel. Nanášelo se 5 – 10 µl vzorku o přibližné koncentraci 0,3 mg bílkovin/ml.

Při použití dvou gelů bylo na zaostřovacím gelu napětí 80 V a proud 30 mA. Když proteiny vzorku dosáhly rozhraní gelů, bylo napětí zvýšeno na 130 V a proud na 50 mA. Jako elektrodový pufr byl používán glycinový pufr pH 8,3.

Jako standardy byly používány BSA (66 kDa) a standard Amersham Bioscience s širokým rozmezím molekulových hmotností proteinů (6 500 aprotin, 14 000 lysozym, 21 000 inhibitor trypsinu, 30 000 „carbonic anhydrasa“, 45 000 ovalbumin, 55 000 glutamát dehydrogenasa, 66 000 BSA, 80 000 transferrin, 97 000 fosforylasa b, 116 000 β-galaktosidasa, 205 000 myosin).

Gel byl barven buď pomocí Coomassie Brilliant Blue R-250 nebo pomocí dusičnanu stříbrného. Obarvený gel byl uchováván v 1% kyselině octové.

Barvení dusičnanem stříbrným

Roztok	Doba působení
30% ethanol + 10% kyselina octová	3 x 30min
20% ethanol	10 min
Voda	10 min
0,2 g/l Na ₂ S ₂ O ₃	1 min
Voda	2 x 20 s
2 g/l AgNO ₃ (čerstvý roztok)	30 min
Voda	10 s
0,7 ml/l formaldehyd, 30 g/l K ₂ CO ₃ , 10 mg/l Na ₂ S ₂ O ₃	do vybarvení proteinů 2 – 4 min
1% kyselina octová	uchovávání

3.8.6 Stanovení optimálních reakčních podmínek, stability, vlivu inhibitorů a kosolventů

3.8.6.1 Stabilita při skladování

Byly zkoušeny stability enzymu při skladování buněčného extraktu a částečně purifikovaného enzymu.

Teploty skladování byly -70 °C, -20 °C, 4 °C a laboratorní teplota (20 – 22 °C). Po různých časových intervalech byly odebírány vzorky a stanovena jejich aktivita s benzonitrilem, jak je uvedeno v 3.10.

3.8.6.2 Vliv kosolventů

Pro zjištění vlivu kosolventů byl benzonitril rozpuštěn v různých rozpouštědlech do koncentrace 500 mM. Z těchto roztoků byl přidáván do reakční směsi tak, aby přírůstek ze zásobního roztoku byl 5% objemu reakční směsi (aktivita zjišťována podobně jako v 3.10).

3.8.6.3 pH optimum

pH optimum nitrilasy bylo měřeno podobně jako aktivita extraktu (viz v 3.10). Místo 50 mM pufru TRIS/HCl (pH 8) byly však použity pufrы v rozmezí pH 3 – 12.

pH 3 – 7 McIlvaine

pH 7 – 9 TRIS/HCl

pH 9 – 12 Britton – Robinson

3.8.6.4 Teplotní optimum

Teplotní optimum se stanovovalo v 50 mM TRIS/HCl pufru (pH 8), kdy byl enzym 10 minut inkubován při dané teplotě a poté byla změřena jeho aktivita při této teplotě (viz 3.10).

3.8.6.5 Teplotní stabilita

Enzym byl ve směsi o objemu 95 µl (50 mM TRIS/HCl (pH 8) spolu enzymem), která neobsahovala substrát, třepán v Thermomixeru při teplotě 45 °C. Poté byla s takto inkubovaným roztokem provedena reakce za standardních podmínek (viz v 3.10).

Stanovení teplotní stability při 28 °C probíhalo bez třepání; roztoky byly umístěny v temperované místnosti, termoboxu. V časových intervalech byly odebírány vzorky a stanovena aktivita při 45 °C.

Stabilita mycelia a LentiKats[®] byla stanovována v reakční směsi obdobně, jak je uvedeno výše.

3.8.6.6 Stanovení substrátové specifity

Substrátová specifita byla stanovována pro částečně purifikované enzymy (viz 3.8.3). Do standardní reakční směsi (viz v 3.10) byl místo benzonitrilu přidán zkoumaný substrát z 500 mM zásobního roztoku v methanolu.

3.9 Imobilizace

3.9.1 Imobilizace celých buněk *F. solani* v gelu – technologie LentiKats®

Tento postup je původní technologií firmy geniaLab Technologie (v licenci firmy MEGA). Viz [31, 37]

Materiál pro přípravu preparátu LentiKats®:

Polyethylenglykol (PEG)

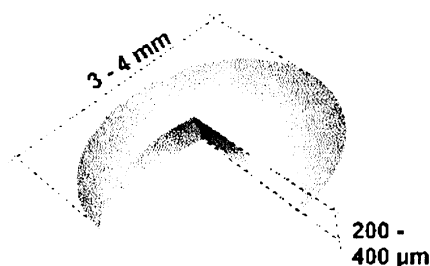
Polyvinylalkohol (PVA)

Destilovaná voda

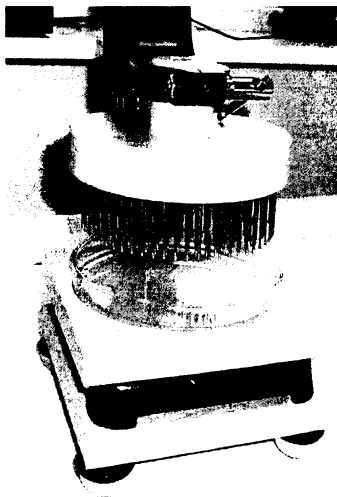
Lyofilizované mycelium

6 g PEG se rozpustí v 79 ml vody a za stálého míchání se zahřeje na teplotu 90 – 100 °C (na magnetickém míchadle s ohřevem). Po zahřátí se přidá 10 g PVA a směs se míchá do úplného rozpuštění PVA. Poté se nechá roztok zchladnout na teplotu přibližně 25 °C a přidá se lyofilizované mycelium (v našem případě 0,5 g lyofilizovaného mycelia z *F. solani*). Směs se důkladně zamíchá, aby došlo k homogennímu rozložení mycelia v gelu. Takto připravený gel se pomocí speciálního přístroje navrženého firmou geniaLab Technologie (viz Obrázek 15, str. 27) natiskl na polystyrenové podložky. Nerezové jehly přístroje se ponoří do gelu, poté se zvednou a otisknou se na polystyrenové podložky, kam se nechá stéci gel s myceliem za vzniku částic LentiKats® (Obrázek 14). Ty se suší při laboratorní teplotě, až ztratí 75% původní hmotnosti.

Takto připravený imobilizovaný biokatalyzátor se skladuje při teplotě -20 °C.



Obrázek 14. Hotový imobilizovaný preparát LentiKats®.



Pozn. Při výrobě LentiKats[®] se na rozdíl od originálního návodu nedoporučuje použití mikrovlnné trouby. Špatně se kontroluje teplota směsi a dochází k negativnímu ovlivnění polymerace.

Obrázek 15. Přístroj na přípravu imobilizovaných biokatalyzátorů LentiKats[®].

3.9.2 Imobilizace nitrilasy na hydrofobních kolonách

Pro imobilizaci na kolonách, kde dochází k vazbě proteinů pomocí hydrofobních sil, byly zvoleny kolony HiTrap firmy Amersham Bioscience o objemu 1 ml (Butyl Sepharose a Phenyl Sepharose). Imobilizace se prováděly v 50 mM TRIS/HCl pufru (pH 8) obsahujícím síran amonný (0,8 M; viz 3.3.2).

Požadované množství enzymu bylo desetkrát naředěno tímto pufrem a 30 minut centrifugováno při 10 000 g a 4 °C. Tento roztok byl nanesen na kolonu při eluční rychlosti 0,25 ml/min. Procházející pufr byl jímán, a později analyzován (změřena aktivita – viz 3.10), aby bylo možno zjistit, jaké množství biokatalyzátoru se na koloně zachytilo. Po nanesení enzymu byla kolona promyta 50 mM TRIS/HCl pufrem (10 – 20 ml) se síranem amonným (0,8 M) o požadovaném pH při rychlosti průtoku 0,25 ml/min [38].

Takto připravená kolona byla umístěna do vodní lázně o požadované teplotě.

Substrát enzymu byl rozpuštěn v síranovém pufrem a temperován spolu s kolonou na vodní lázni. Průtok byl nastaven podle požadavků v rozmezí 0,2 – 1 ml/min.

Frakce byly sbírány pomocí sběrače frakcí nebo manuálně a analyzovány pomocí HPLC.

Kolony s imobilizovaným enzymem byly uchovávány v 50 mM TRIS/HCl pufrem se síranem amonným (0,8 M) při 4 °C.

Pro odstranění enzymu byly kolony promyty 50 mM TRIS/HCl pufrem (pH 8), destilovanou vodou a nakonec 20% ethanolem, v kterém byly při 4 °C uchovávány.

3.9.3 Imobilizace nitrilasy na iontoměničových kolonách

Pro imobilizace pomocí iontových sil byla používána Q Sepharosová kolona o objemu 1 ml HiTrap, Amersham Bioscience.

Imobilizace probíhala podobně jako v případě (3.9.2), ale místo pufru se síranem amonným byl používán 50 mM TRIS/HCl pufr o požadovaném pH.

Kolony byly po použití buď promyty pufrům a uskladněny při 4 °C pro další použití jako imobilizovaný biokatalyzátor, nebo byly propláchnuty 1 M roztokem NaCl, destilovanou vodou a nakonec 20% ethanolem, uskladněny při 4 °C a případně použity pro další imobilizaci enzymu.

3.9.4 Imobilizace amidasy a nitrilhydratasy z *R. equi*

Extrakt z *R. equi* (viz 3.8.2) obsahující amidasu a nitrilhydratasu, byl imobilizován na Butyl Sepharosovou kolonu.

Požadované množství extraktu bylo desetkrát naředěno TRIS/HCl pufrům (50 mM, pH 8) obsahujícím 0,8 M (NH₄)₂SO₄ nebo 1 M Na₂SO₄ (viz 4.3.5) a odstředěno při 10 000 g a 4 °C, 30 min.

Dále se již postupovalo jako v případě 3.9.2, jen za použití výše uvedených pufrů.

3.9.5 Koimobilizace nitrilasy a amidasy

Imobilizace probíhaly na Butyl Sepharosové koloně.

Požadované množství extraktu z hub a *R. equi* bylo smícháno a desetkrát naředěno TRIS/HCl pufrům (50 mM, pH 8) obsahujícím 1 M Na₂SO₄ (nebo 0,8 M (NH₄)₂SO₄ (viz 3.3)).

Dále se již postupovalo jako v případě 3.9.2, ale za použití výše uvedených pufrů.

3.9.6 Kovalentní nosiče

Pro kovalentní imobilizaci byl jako nosič používán komerční přípravek AmberzymTM Oxirane Resin (Rohm and Haas, Philadelphia, USA), který váže proteiny pomocí kovalentní vazby volných aminoskupin lysinu na oxiranový kruh.

Pro všechny imobilizace byl používán 50 mM fosforečnanový pufr o pH 8.

Nitrilasa z *F. solani* (0,36 U) byla imobilizována v 1 ml fosforečnanového pufru na 50 mg suchého nosiče.

Imobilizace byla prováděna při 22 °C za mírného třepání v Thermomixeru (300 ot./min) v mikrozkuvkách po dobu 24, 48 a 72 hodin. Po této době byl nosič třikrát promyt pufrům a centrifugován při 1000 g 15 s. Z aktivit supernatantů bylo zjištěno množství imobilizovaného enzymu.

3.10 Biokonverze nitrilů

Pro inkubaci reakčních směsí a provádění reakcí byly použity přístroje Eppendorf Thermomixer Comfort a Eppendorf Thermomixer Compact. Inkubace i reakce probíhaly při 850 ot./min v mikrozkuvkách o objemu 1,5 ml.

3.10.1 Stanovení aktivity

Reakce byla prováděna ve 100 µl 50 mM TRIS/HCl pufru, obsahujícího 25 mM benzonitril, 5% obj. methanolu jako kosolventu a enzymový preparát (20 až 60 µg proteinů).

Reakční směs (95 µl pufru spolu s enzymem) byla preinkubována 10 minut při teplotě 45 °C a reakce byla zahájena přidáním 5 µl 500 mM benzonitrilu rozpuštěného v methanolu. Po 10 minutách byla reakce zastavena přidáním 10 µl 1 M HCl. Precipitované proteiny byly odstředěny při 13 000 g po dobu 5 minut a produkty reakce byly analyzovány pomocí HPLC.

3.10.2 Stanovení aktivity lyofilizovaného mycelia

Do mikrozkuvky bylo odváženo 3 – 6 mg lyofilizovaného mycelia a přidáno 950 µl TRIS/HCl pufru (pH 8). Tato směs byla inkubována 10 minut za míchání při 45 °C a reakce byla zahájena přidáním 50 µl 500 mM benzonitrilu rozpuštěného v methanolu. Po 10 minutách bylo odebráno 500 µl směsi a přidáno k 50 µl 1M HCl. Tento vzorek byl centrifugován 5 minut při 13 000 g. Produkty reakce byly analyzovány pomocí HPLC.

3.10.3 Stanovení aktivity mycelia imobilizovaného v LentiKats®

Aktivita se stanovovala podobně, jak je uvedeno v 3.10.2, ale navážky LentiKats® byly 30 – 60 mg.

Preparáty LentiKats® byly také používány pro opakované biotransformace, kdy po proběhnutí reakce byly částice biokatalyzátoru centrifugovány 5 s při 500 g. Roztok nad

LentiKats[®] byl odstraněn pomocí pipety, a LentiKats[®] byly propláchnuty reakčním pufrům a znovu odstředěny. Tento postup byl opakován třikrát. Poté byl biokatalyzátor použit pro další biokonverzi, a po ní opět promyt. Celkem byl jeden preparát LentiKats[®] použit pro čtyři biotransformace. Produkty reakce byly analyzovány pomocí HPLC.

3.10.4 Stanovení aktivity enzymu imobilizovaného na AmberzymTM

Aktivita imobilizovaného enzymu byla měřena se 100 mg odstředěného vlhkého nosiče při teplotě 45 °C, v 1 ml fosforečnanového pufru (50 mM, pH 8) obsahujícího 25 mM benzonitril. Po 10 minutách bylo z reakční směsi odebráno 500 µl roztoku a přidáno k 50 µl 1 M HCl. Takto upravený vzorek byl odstředěn při 13 000 g (5 min). Vzniklé produkty byly stanoveny pomocí HPLC.

3.10.5 Stanovení aktivity enzymu imobilizovaného na koloně

Kolonou s imobilizovaným enzymem protékal příslušný pufr (viz. 3.9.2), který obsahoval rozpuštěný substrát (10 nebo 25 mM benzonitril, 10, 25 nebo 40 mM 4-kyanopyridin, 3-kyanopyridin nebo 2-kyanopyridin). Jímané frakce byly analyzovány pomocí HPLC.

3.10.6 Stanovení aktivity extraktu R. equi

3.10.6.1 Stanovení nitrilhydratasové aktivity

Reakční směs (500 µl) obsahovala TRIS/HCl pufr (pH 8), 30 – 70 µg proteinů (50 µl extraktu) a 10 mM benzonitril (10 µl ze zásobního 500 mM roztoku v methanolu). Preinkubace i reakce byly prováděny při 35 °C.

Roztok byl preinkubován 5 minut a poté byla reakce zahájena přidávkem benzonitrilu a po 10 minutách zastavena přidávkem 100 µl 1 M HCl. Precipitované proteiny byly odstraněny centrifugací (13 000g, 5 min).

3.10.6.2 Stanovení amidasové aktivity

Reakční směs (500 μ l) obsahovala TRIS/HCl pufr (pH 8), 30 – 70 μ g proteinů (50 μ l extraktu) a 2,5 mM benzamid (12,5 μ l ze zásobního 100 mM roztoku v methanolu). Preinkubace i reakce byly prováděny při 45 °C.

Roztok byl preinkubován 5 minut a poté byla reakce zahájena přidavkem benzamidu a po 15 minutách zastavena přidavkem 100 μ l 1 M HCl. Precipitované proteiny byly odstraněny centrifugací (13 000 g, 5 min).

Vzniklé produkty byly u obou stanovení analyzovány pomocí HPLC.

3.10.7 Biokonverze kyanopyridinů lyofilizovaným myceliem

Lyofilizované mycelium houby *Fusarium solani* bylo použito pro preparativní biokonverze roztoků 2-, 3- a 4-kyanopyridinu.

Reakce probíhala při 28 °C v Erlenmeyerových baňkách o objemu 500 ml na třepačce s excentricitou 5 cm při 70 ot./min. Objem reakčních roztoků byl 100 ml.

Byly použity 100, 200, 350, 500 a 1000 mM roztoky 3- a 4-kyanopyridinu v destilované vodě a dále roztoky 100 mM 2-, 3- a 4-kyanopyridinu v 50 mM TRIS/HCl pufru (pH 8) nebo 50 mM fosforečnanového pufru (pH 8).

Pro biokonverze bylo odváženo 30 – 200 mg lyofilizovaného mycelia tak, aby na 100 ml 1 M roztoku 3-kyanopyridinu bylo použito asi 650 U, a na 100 ml 1 M roztoku 4-kyanopyridinu asi 250 U nitrilasy. Protože je 4-kyanopyridin lepším substrátem než 3-kyanopyridin, bylo pro jeho biokonverzi použito menší množství nitrilasy. U nižších koncentrací substrátů bylo množství použité nitrilasy úměrně menší.

Reakce probíhaly 24 – 72 hodin, poté byly reakční roztoky zfiltrány přes papírový filtr a okyseleny přidavkem 10 ml 1 M HCl. Precipitované proteiny byly odstředěny při 10 000 g (30 min, 4 °C). V průběhu reakce byly odebírány vzorky k analýze pomocí HPLC.

3.10.8 Biokonverze kyanopyridinu imobilizovaným myceliem – LentiKats®

Pomocí LentiKats® byly prováděny biokonverze 100 mM roztoků 2-, 3- a 4-kyanopyridinu v TRIS/HCl pufru (pH 8) nebo v 50 mM fosforečnanovém pufru (pH 8) podobně jako v postupu 3.10.7

3.10.9 Isolace produktů biokonverze kyanopyridinů z reakčních směsí

Reakční směs z biokonverzí kyanopyridinů (viz 3.10.7 a 3.10.8) byla po ukončení reakce zfiltrována, okyselena 1 M HCl (přídavek 10% reakčního objemu) a odstředěna při 10 000 g (30 min, 4 °C). Takto upravený supernatant byl zahuštěn na vakuové odparce a zahuštěný roztok lyofilizován.

Z roztoků, kde byla použita pufrovaná reakční směs, byly produkty extrahovány bezvodým methanolem, extrakt odpařen na vakuové odparce a odparek znovu extrahován methanolem. Tento postup byl několikrát opakován. Čistota produktů byla ověřována pomocí HPLC a pomocí stanovení teploty tání na elektrickém bodotávku.

3.10.10 Výpočet aktivity

Jednotka nitrilasové aktivity (1 U) je množství enzymu, které za 1 minutu přemění 1 μmol substrátu (podobně 1 U amidasové a nitrilhydratasové aktivity).

Specifická aktivita buněčných extraktů a částečně purifikovaných enzymů je množství nitrilasové aktivity v 1 mg proteinu.

$$A_{\text{spec.}} = \frac{C_{\text{prod.}}}{C_{\text{protein}} \times t_{\text{reakce}}}$$

Specifická aktivita lyofilizovaného mycelia a LentiKats[®] je množství nitrilasové aktivity v 1 mg sušiny mycelia, příp. v 1 mg částic LentiKats[®].

$$A_{\text{spec.}} = \frac{C_{\text{prod.}}}{m_{\text{LentiKats, mycelium}} \times t_{\text{reakce}}}$$

Pro vztah mezi celkovou a specifickou aktivitou enzymu platí tato rovnice:

$$A_{\text{celk.}} = A_{\text{spec.}} \times V \times C_{\text{protein}}$$

Specifická aktivita enzymu imobilizovaného na koloně byla vypočtena podle rovnice:

$$A_{\text{spec.}} = \frac{C_{\text{prod.}} \times v_{\text{el}}}{m_{\text{protein}}}$$

$A_{\text{celk.}}$ = celková aktivita enzymu (U)

$A_{\text{spec.}}$ = specifická aktivita (U/mg proteinu) nebo (U/mg LentiKats[®] nebo lyofilizovaného mycelia)

c_{protein} = koncentrace proteinů (mg/ml)

$c_{\text{prod.}}$ = součet koncentrací produktů reakce ($\mu\text{mol/ml}$)

t_{reakce} = čas reakce (min)

m_{protein} = množství imobilizovaných proteinů (mg)

$m_{\text{LentiKats, mycelium}}$ = hmotnost LentiKats[®] nebo lyofilizovaného mycelia (mg)

v_{el} = eluční rychlost (ml/min)

V = objem vzorku (ml)

3.11 Chromatografické metody

3.11.1 HPLC

Pro analýzu produktů reakcí byla používána vysokotlaká kapalinová chromatografie na reverzní fázi, za použití kolon C18 a C8 a iontoměničová kolona IEX H⁺ (viz 3.3). Průtok byl pro všechny analýzy na kolonách C18 a C8 shodný, tj. 0,9 ml/min [39]; v případě kolony IEX H⁺ byl průtok 0,5 ml/min.

Pro analýzu látek **1 – 4**, **8 – 16** a **22** (Tabulka 3, str. 14) byla používána kolona C18 a jako mobilní fáze používán 30% acetonitril + 0,1% kyselina fosforečná.

Pro analýzu látek **5 – 7** byla používána kolona C8 a jako mobilní fáze 10% acetonitril v 5 mM fosforečnanovém pufru (pH 7).

Pro analýzu látek **17 – 21** byla používána kolona IEX H⁺ a jako mobilní fáze 9 mM kyselina sírová.

Jako detektor bylo používáno diodové pole, v rozsahu 210 – 300 nm.

Nástřík prováděl automatický systém pomocí smyčky o objemu 20 μ l. Vzorky byly ředěny na koncentraci 0,1 – 1,5 mM zkoumané látky, zpravidla 10krát, 10% acetonitrem.

Data byla zpracovávána pomocí programu Millennium Chromatography Manager 2.0, případně programem CSW. Množství látek bylo stanovováno porovnáním ploch jejich píků s plochou píků standardů.

Všechny chemikálie používané pro chromatografii byly filtrovány přes filtr s velikostí pórů 0,47 μ m.

Retenční časy a spektrální maxima dělených látek jsou uvedeny v Tabulce 4 (str. 35; pro kolonu C18), v Tabulce 5 (str. 36; pro kolonu C8) a v Tabulce 6 (str. 36; pro kolonu IEX H⁺).

označení	látko	retenční čas (min)	absorbční maximum (nm)
1a	benzonitril	5,9	222,8
1b	benzamid	2,1	225,2
1c	benzoová kyselina	3,4	228,7
2a	2-tolunitril	9,7	227,5
3a	3-tolunitril	10,8	228,7
3b	3-toluamid	3,0	210,0
3c	3-toluová kyselina	5,1	233,4
4a	4-tolunitril	10,1	233,4
4b	4-toluamid	2,5	236,9
4c	4-toluová kyselina	5,0	239,3
8a	2-hydroxybenzonitril	3,5	210,0
9a	3-hydroxybenzonitril	3,3	213,0
9c	3-hydroxybenzoová kyselina	2,1	210,0
10a	4-hydroxybenzonitril	3,0	244,0
10c	4-hydroxybenzoová kyselina	2,0	210,0
11a	2-fenylacetonitril	6,1	210,0
11c	2-fenylacetová kyselina	3,4	210,0
12a	2-fenylpropionitril	10,1	210,0
12c	2-fenylpropionová kyselina	5,4	244,0
13a	3-fenylbutyronitril	9,6	210,0
14a	2-chlorbenzonitril	9,8	229,9
14c	2-chlorbenzoová kyselina	5,7	222,0
15a	3-chlorbenzonitril	11,8	227,5
15c	3-chlorbenzoová kyselina	6,3	229,9
16a	4-chlorbenzonitril	11,1	235,7
16b	4-chlorbenzamid	3,0	235,9
16c	4-chlorbenzoová kyselina	6,6	239,3
22a	indolylacetonitril	6	216,9

Tabulka 4. Separace látek na koloně C18 (5 μ m, 3,9 x 150 mm, Waters), a jejich absorbční maxima v rozmezí 210 – 300 nm (podmínky separace: 35 °C, průtok 0,9 ml/min, fáze 30% acetonitril + 0,1% kyselina fosforečná).

označení	látka	retenční čas (min)	absorbční maximum (nm)
5a	2-kyanopyridin	12,9	216,9
5b	pikolinamid	8,9	218,1
5c	pikolinová kyselina	3,5	210,0
6a	3-kyanopyridin	11,1	215,8
6b	nikotinamid	5,3	213,4
6c	nikotinová kyselina	3,5	210,0
7a	4-kyanopyridin	12,2	211,1
7b	isonikotinamid	5,1	212,2
7c	isonikotinová kyselina	3,5	214,6

Tabulka 5. Separace kyanopyridinů na koloně C8 (5 μ m, 4,0 x 250 mm, Advanced Chromatography Technologies Inc.) a jejich absorbční maxima v rozmezí 210 – 300 nm (podmínky separace: 35 °C, průtok 0,9 ml/min, mobilní fáze 10% acetonitril v 5 mM fosforečnanovém pufru, pH 7).

označení	látka	retenční čas (min)	absorbční maximum (nm)
17a	acetonitril	7	210
17b	kyselina octová	16,1	210
18a	propionitril	7	210
18b	kyselina propionová	20,3	210
19a	isobutyronitril	7,1	210
19b	kyselina isobutanová	24,8	210
20a	butyronitril	7,1	210
20b	kyselina butanová	27,6	210
21a	valeronitril	7,2	210
21b	kyselina valerová	45,4	210

Tabulka 6. Separace alifatických nitrilů na koloně IEX H⁺ (8 μ m, 250 x 8 mm, Watrex, ČR) a jejich absorbční maxima v rozmezí 210 – 300 nm (podmínky separace: 35 °C, průtok 0,5 ml/min, mobilní fáze 9 mM kyselina sírová).

4 VÝSLEDKY

4.1 Indukce nitrilasové aktivity

Na základě výsledků získaných během doktorské práce O. Kaplana byl jako induktor nitrilasy pro kmen *F. solani* O1 zvolen 2-kyanopyridin v kombinaci s valeronitrilem. Ve snaze získat co nejvyšší výtěžek nitrilasové aktivity na 1 litr media byly v této diplomové práci vyzkoušeny dva různé způsoby kultivace (Tabulka 7, str. 38).

V prvním pokusu byly 2-kyanopyridin (20 mM) a valeronitril (3 mM) přidány do media 2 (viz 3.2) již před jeho zaočkováním. Takto získané mycelium mělo poměrně vysokou specifickou aktivitu (ca. 0,78 U/mg lyofilizovaného mycelia), a také celková produkce nitrilasy byly uspokojivá (437 U/l media).

Ve druhém pokusu bylo nejprve v mediu, bohatém na živiny (viz medium 3, kap. 3.2), avšak neobsahujícím induktor, připraveno velké množství biomasy bez (nebo jen se stopami) nitrilasové aktivity. Tato biomasa pak byla převedena do minerálního media (viz medium 4, kap. 3.2) s induktorem 2-kyanopyridinem (30 mM) jako jediným zdrojem dusíku, a takto v buňkách indukována nitrilasová aktivita. Tato metoda se ukázala jako velice přínosná. Došlo sice ke snížení specifické aktivity lyofilizovaného mycelia o 40%, nicméně tuto skutečnost plně kompenzuje fakt, že celková produkce nitrilasy z jednoho litru se zvýšila 5krát. Při dvoukrokové kultivaci bylo používáno 200 ml bohatého media, neboť vyrostlo 2krát více mycelia než při kultivaci ve 100 ml, aniž by došlo k ovlivnění aktivity mycelia indukované při jeho inkubaci v mediu 4.

Vzhledem k těmto dobrým výsledkům byla při kultivaci *F. solani* nadále používána pouze dvoukroková kultivace.

Jak bylo zjištěno během doktorské práce O. Kaplana, u kmene *A. niger* se tato metoda neosvědčila. Pro tento kmen byla proto v této diplomové práci používána výhradně jedнокroková kultivace v mediu s 2-kyanopyridinem (20 mM) a valeronitrilem (3 mM) (viz 3.2).

	Hmotnost lyofilizovaného mycelia (g / litr media)	Specifická aktivita (U / mg lyofilizovaného mycelia)	Zisk (U / litr media)
Jednokroková kultivace	0,562	0,778	437
Dvoukroková kultivace	4,790	0,472	2260
Navýšení	8,5	0,6	5

Tabulka 7. Porovnání jednokrokové a dvoukrokové kultivace *F. solani*.

Pozn. Při jednokrokové kultivaci jsou induktory (20 mM 2-kyanopyridin, 3 mM valeronitril) přítomny v mediu 2 (viz 3.2) již od začátku kultivace. Při dvoukrokové kultivaci nejprve mycelium naroste na mediu bohatém na živiny (medium 3, viz 3.2), poté je přeočkováno do media chudého na živiny (medium 4, viz 3.2.), ale s obsahem induktoru (30 mM 2-kyanopyridinu) jako jediného zdroje dusíku.

4.2 Vlastnosti nitrilas

4.2.1 Teplotní stabilita

4.2.1.1 Stabilita při skladování

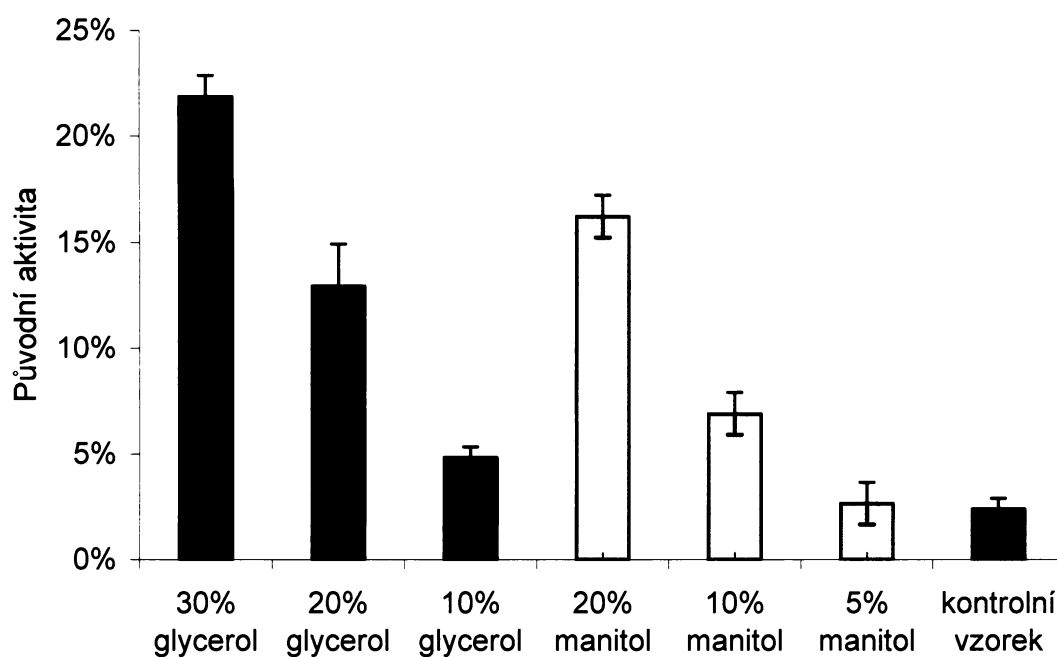
Stabilita nitrilasy z *A. niger* byla zkoumána se síranovou frakcí enzymu (jako nejčastěji používaným enzymovým preparátem) při teplotách skladování: -70 °C, -18 °C, 4 °C a 20 °C (viz Obrázek 17, str. 40)

Pro krátkodobé skladování enzymu (1 – 3 dny) bylo vhodné enzym nemrazit a skladovat ho v lednici při 4 °C, naopak při dlouhodobém uskladnění (déle než 5 dní) bylo mnohem vhodnější enzym rozdělit na menší objemy (aby se nemusel rozmrazovat celý extrakt, ale jen nezbytně nutné množství) a zmrazit ho. Mnohem lepší než zmrazení při -18 °C se ukázalo hluboké zmrazení při -70 °C, kdy byl extrakt přibližně dvakrát stabilnější (doktorská práce O. Kaplana).

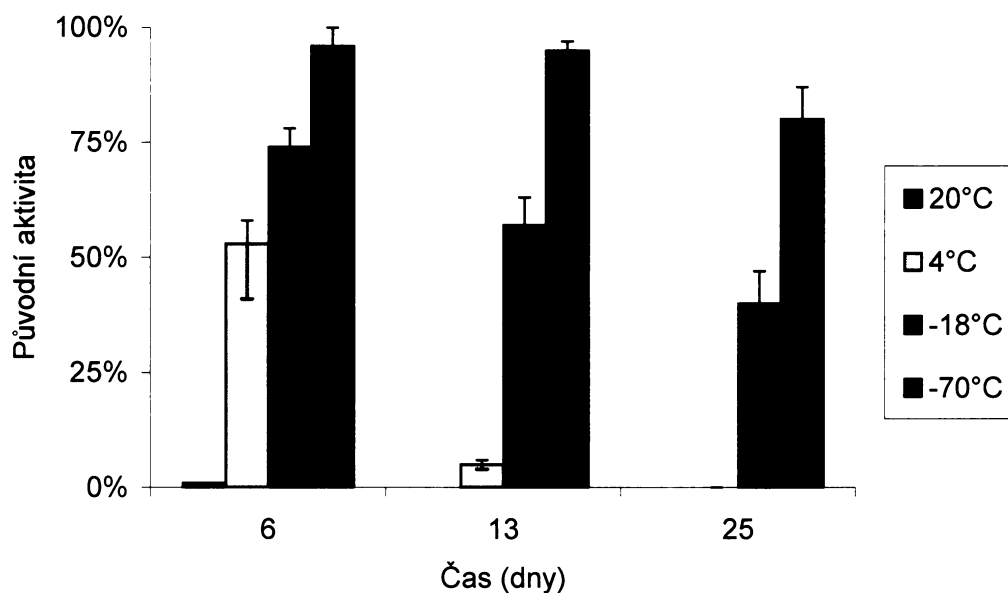
Skladování při laboratorní teplotě se ukázalo jako krajně nevhodné, protože po 2 dnech vykazoval enzym pouze 2,5% původní aktivity. Ve snaze zvýšit stabilitu enzymu při laboratorní teplotě byly zkoušeny různé potenciální protektanty, roztoky sacharidů a různých solí (viz Obrázek 16, str. 40). Ostatní protektanty (5 – 20% sacharosa, 1 – 10 mM EDTA) neměly prokazatelné stabilizační účinky na takto skladovaný enzym.

Jako nejlepší ze zkoušených protektantů se jevil 30% roztok glycerolu, ale i zde došlo po dvou dnech skladování enzymu při laboratorní teplotě k poklesu na 22% původní aktivity. Nicméně zde bylo zachováno 10krát vyšší množství aktivity než v případě nechráněného enzymu. Je tedy patrné, že pro tento enzym existují perspektivní protektanty.

Částečně purifikovaná nitrilasa z *A. niger*, inkubovaná 1 hodinu v pufru (pH 8) při 35 °C ztratila 10% své původní aktivity a při 45 °C 40% aktivity (doktorská práce O. Kaplana).



Obrázek 16. Vliv stabilizátorů na aktivitu síranové frakce enzymu z *A. niger* skladované při laboratorní teplotě po dobu 48 hodin. Původní aktivita 0,77 U/mg proteinů.



Obrázek 17. Vliv teploty skladování na aktivitu síranové frakce enzymu z *A. niger* (doktorská práce O. Kaplana). Původní aktivita 0,1 U/mg proteinů.

U *F. solani* bylo stanovení stability nitrilasy (Tabulka 8, str. 42) prováděno s buněčným extraktem, protože srážení extraktu síranem amonným nebylo na rozdíl od *A. niger* příliš účinné a buněčný extrakt byl dostatečně aktivní.

U tohoto extraktu z *F. solani* byla zjištěna vyšší stabilita než pro extrakt z *A. niger*. Skladování extraktu při 4 °C ukázalo, že aktivita klesne na polovinu původní hodnoty průměrně za 22 dní a pro částečně purifikovaný enzym skladovaný při 4 °C bylo zjištěno, že aktivita klesne na polovinu za 35 dní.

Částečně purifikovaný enzym (viz 3.8.3) skladovaný při -70 °C ztratil po 85 dnech 30% své aktivity, ale stejný enzym, který obsahoval 5,5% sacharosy jako protektantu neztratil aktivitu po 75 dní.

Velice vhodné bylo pro dlouhodobé skladování lyofilizované mycelium *F. solani*, skladované při -20 °C, které neztrácelo aktivitu po 120 dní (Tabulka 8, str. 42) a bylo z něho možno kdykoliv připravit velmi aktivní buněčný extrakt bez nutnosti kultivace. Jednou kultivací (16 baněk; 3,2 litru) bylo možno získat až 18 g lyofilizovaného mycelia.

Podobně stabilní jako lyofilizované mycelium byly preparáty LentiKats[®] (uchovávané při -20 °C), které neztratily aktivitu po 140 dní (Tabulka 8, str. 42).

Při testování stability nitrilasy v extraktu z *F. solani*, případně v myceliu (nebo myceliu imobilizovaném v LentiKats[®]) při vyšších teplotách byl enzymový preparát uchováván v pufru o pH 8. Substrát (benzonitril) byl přidán až v okamžiku měření aktivity (viz 3.8.6.5).

Nitrilasa z *F. solani* má teplotní optimum 45 °C (viz 4.2.3), ovšem žádný z enzymových preparátů není při této teplotě dlouhodobě stabilní. U všech zkoušených preparátů poklesla aktivita na polovinu původní hodnoty za přibližně 4 hodiny. Naopak při 28 °C, kdy je aktivita v porovnání s teplotním optimem přibližně poloviční, vykazovaly všechny preparáty dobrou stabilitu, nejvyšší pak lyofilizované mycelium, u kterého nebyl pozorován pokles aktivity po dobu 3 dnů (viz Tabulka 8, str. 42).

Biokatalyzátor	Aktivita (U/mg)	Poločas aktivity při dané teplotě (hod)			
		- 20 °C	4 °C	28 °C	45 °C
Lyofilizované mycelium	0,5	neklesne po 120 dní		neklesne po 3 dny	4,5
Lyofilizované mycelium imobilizované v LentiKats	0,027 ^a	neklesne po 140 dní		178	4,5
Buněčný extrakt	3,9		22 dní	90	4

Tabulka 8. Vliv teploty na stabilitu nitrilasy z *F. solani*

Pozn. Vzorke byly uchovávány v 50 mM TRIS/HCl pufru (pH 8) při 28 °C a 45 °C. Při 45 °C byly vzorky uchovávány za mírného míchání v Thermomixeru. Při 28 °C byly vzorky uskladněny v temperované místnosti (termoboxu). Vzorke při 4 °C a -20 °C byly uchovávány v lednici, resp. mrazáku.

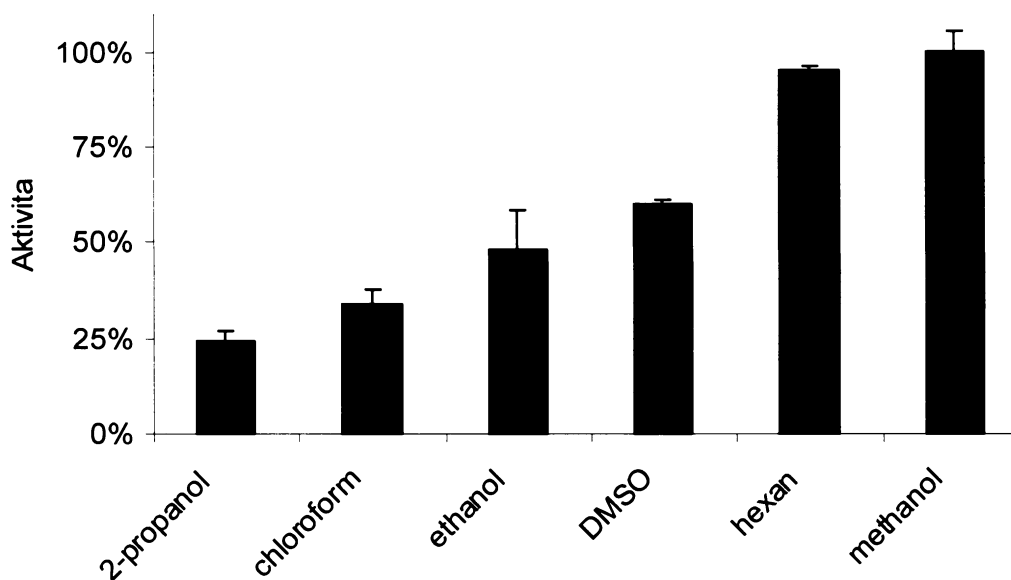
^a Aktivita na 1 mg LentiKats

4.2.2 Vliv kosolventů

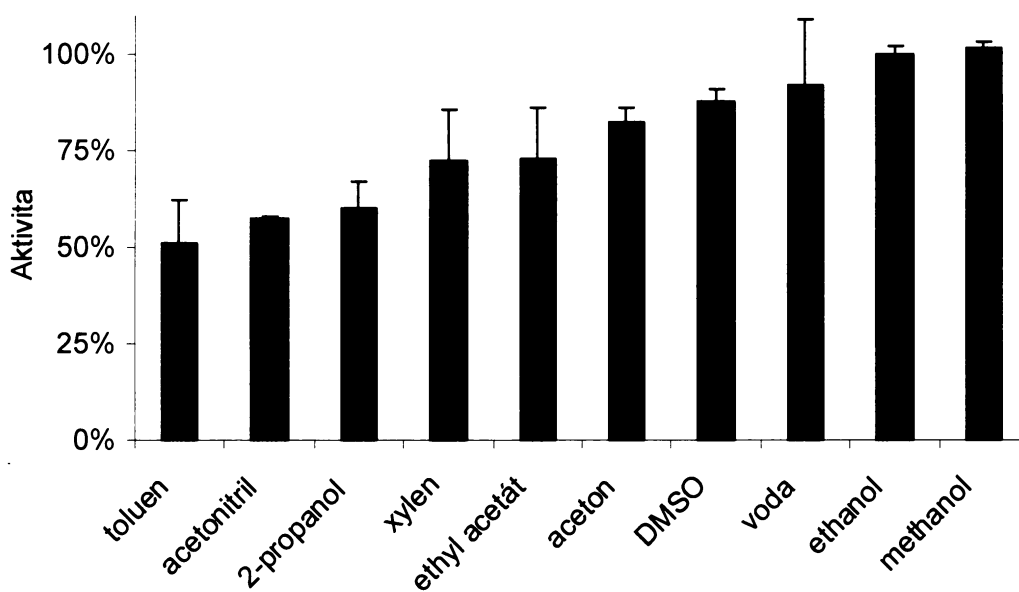
Většina nitrilů je obtížně rozpustná ve vodě či vodných pufrách, proto je třeba používat jako kosolventy organická rozpouštědla, jejichž vliv na enzym jistě není nezanedbatelný. Z tohoto důvodu jsme vyzkoušeli aktivitu enzymu s benzonitrilem, ze kterého jsme připravili základní roztoky (500 mM) v různých organických rozpouštědlech. Jako referenční vzorek jsme použili roztok benzonitrilu v methanolu. Základní roztoky byly přidávány do reakční směsi tak, aby zastoupení organických rozpouštědel bylo 5% (koncentrace benzonitrilu 25 mM).

Je zřejmé, že ne všechny solventy ovlivňují aktivitu enzymu stejně. Nejhorším ze zkoušených rozpouštědel byl 2-propanol a naopak nejvhodnějším námi běžně používaný methanol (Obrázek 18 a Obrázek 19, str. 44) [40]. Srovnání s aktivitou vůči benzonitrilu v pufru bez přídavku rozpouštědla je do určité míry skresleno tím, že se jednalo o emulzi, nikoliv o pravý roztok, protože benzonitril se ve vodných roztocích prakticky nerozpouští, podobně jsou zkresleny výsledky pro další rozpouštědla nemísitelná s vodou.

Při použití 10% roztoků alkoholů (methanolu, ethanolu, 2-propanolu) je aktivita nitrilasy z *A. niger* velmi nízká nebo žádná (0-5%), naopak u *F. solani* je inhibiční vliv těchto alkoholů málo znatelný.



Obrázek 18. Vliv kosolventů (5% reakčního objemu) na aktivitu síranové frakce enzymu z *A. niger*. Pozn. Referenční hodnota byla stanovena pro roztok benzonitrilu v methanolu (5%).



Obrázek 19. Vliv kosolventů (5% reakčního objemu) na aktivitu částečně purifikovaného enzymu z *F. solani*. Pozn. Referenční hodnota byla stanovena pro roztok benzonitrilu v methanolu (5%).

4.2.3 Teplotní a pH optimum enzymu

Nitrilasa z *F. solani* vykazovala nevýrazné teplotní optimum kolem hodnoty 7 a byla vysoce aktivní v poměrně širokém rozmezí hodnot pH (6-10; viz Obrázek 20, str. 46).

Enzym dosáhl maximální aktivity při 45 °C. Při vyšších teplotách jeho aktivita velmi rychle klesala, takže při 55 °C byla pouze asi 14% maxima (viz Obrázek 21, str. 46).

Teplotní a pH profil nitrilasové aktivity *A. niger* byl stanoven dříve (doktorská práce O. Kaplan a [40]). Tyto charakteristiky jsou u obou enzymů velmi podobné, pouze s tím rozdílem, že nitrilasa z *A. niger* (při stanovení u celých buněk) má výraznější pH optimum s maximem v okolí pH 7 a je též aktivní při pH 3. Extrakt z této houby pak vykazuje optimum při pH 8.

4.2.4 Stabilita enzymu při lyofilizaci

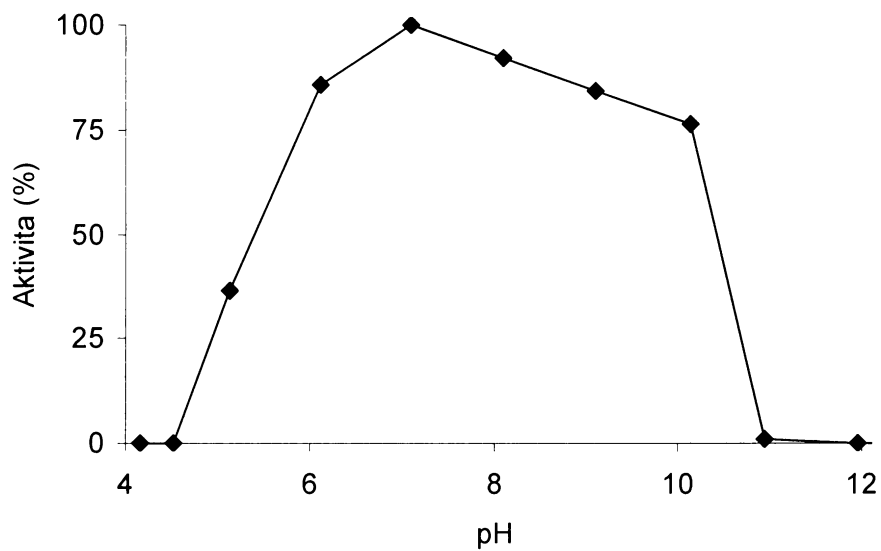
Síranová frakce enzymu z *A. niger* byla zmrazena při teplotě -70 °C nebo teplotě kapalného dusíku.

Při lyofilizaci v kapalném dusíku a po opětovném rozpuštění lyofilizovaného preparátu dochází ke ztrátě až 75% aktivity, kdežto při zmražení na -70 °C ke ztrátě 32% aktivity. Ani tato ztráta ovšem není zanedbatelná, a proto byly zkoušeny 2% roztoky různých protektantů (viz Obrázek 22 a 23, str. 47). Jak je vidět z Obrázku 22, při použití trehalosy lze ztrátu aktivity lyofilizací snížit až na necelých 10%. Takto připravené lyofilizované vzorky byly po dobu 14 dní skladovány při laboratorní teplotě. Jejich aktivita ovšem ještě dále klesala (o 15-35% původní aktivity), ale ve srovnání s nechráněným enzymem, který po této době úplně ztratil aktivitu, nebyla tato ztráta tak velká.

Jako další potenciální protektant byl zkoušen 1 mM roztok EDTA, ke které byly přidány 2% roztoky sacharosy, trehalosy a xylitolu. Nicméně EDTA spíše stabilitu lyofilizovaných preparátů snižovala (viz Obrázek 23, str. 47).

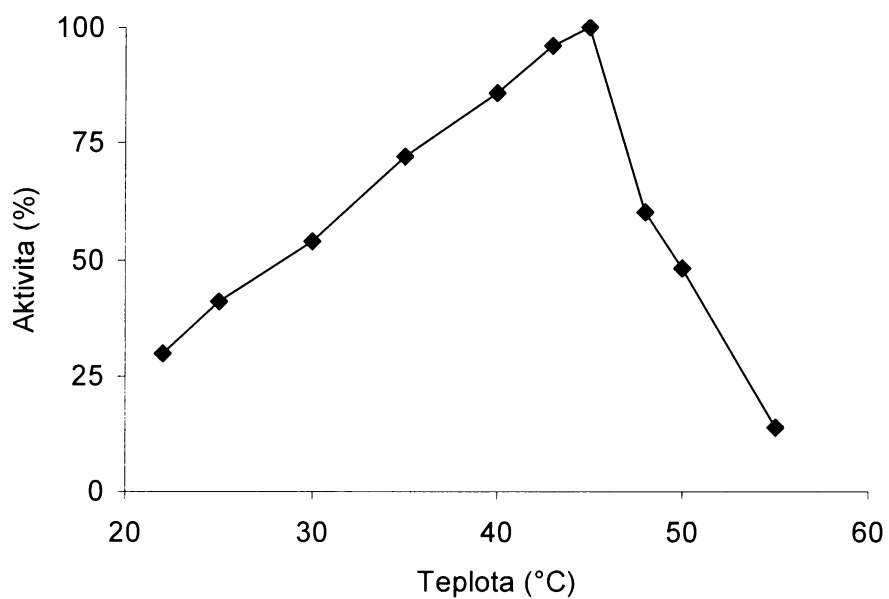
Ze vzorků připravených z *F. solani* bylo lyofilizováno pouze mycelium (po zmražení při -70 °C). Toto lyofilizované mycelium (skladované při -20 °C) si uchovalo svou původní aktivitu po dobu 120 dní (viz 4.2.1.1). Uchovávání lyofilizovaného mycelia, ze kterého lze kdykoliv připravit aktivní preparát, se proto ukázalo jako velmi užitečné.

Protože se tato metoda ukázala jako dostačující, nebyly prozatím lyofilizovány jiné preparáty.



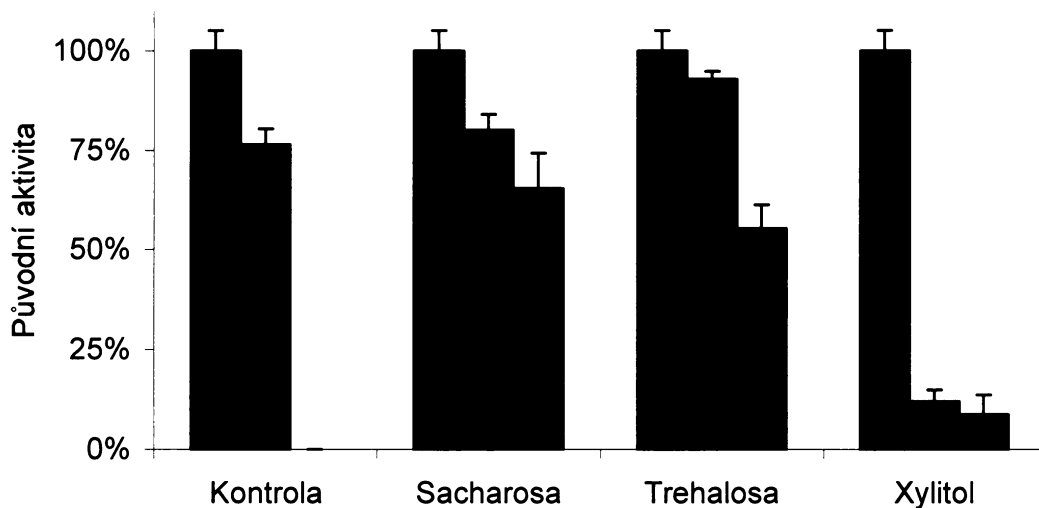
Obrázek 20. pH optimum nitrilasy z *F. solani*.

Pozn. Stanovení byla provedena s lyofilizovaným myceliem. 100% - maximální dosažená aktivita



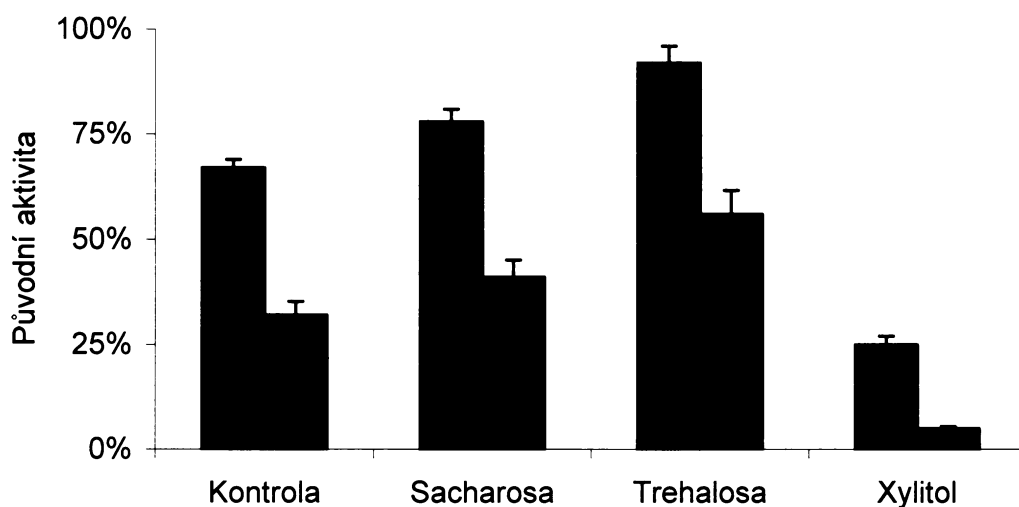
Obrázek 21. Teplotní optimum nitrilasy z *F. solani*.

Pozn. Stanovení byla provedena s buněčným extraktem. 100% - maximální dosažená aktivita



Obrázek 22. Porovnání stabilizačních vlastností 2% roztoků různých protektantů na aktivitu nitrilasy z *A. niger*. Enzym byl zmražen při $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Zeleně – původní aktivita, modře – aktivita po lyofilizaci, červeně – aktivita lyofilizovaného vzorku po 14 denním uchovávání při laboratorní teplotě.



Obrázek 23. Porovnání stabilizačních vlastností 2% roztoků různých protektantů na aktivitu nitrilasy z *A. niger*. Enzym byl zmražen při $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Modře – bez použití EDTA, červeně – s použitím 1 mM EDTA.

4.3 Imobilizace

Pro imobilizace enzymů byly voleny šetrné metody, jako zachycení celých buněk v gelu (kopolymeru PEG a PVA; LentiKats[®]), nekovalentní vazba na iontoměnič (Q Sepharosu) a hydrofobní chromatografické materiály (Phenyl Sepharosu a Butyl Sepharosu). Pro srovnání byla také vyzkoušena kovalentní vazba na nosič oxiranového typu (Amberzym[™]).

4.3.1 LentiKats[®]

Pro imobilizaci touto technikou bylo používáno výhradně lyofilizované mycelium *F. solani*, které bylo stabilnější než mycelium *A. niger* (viz 4.2).

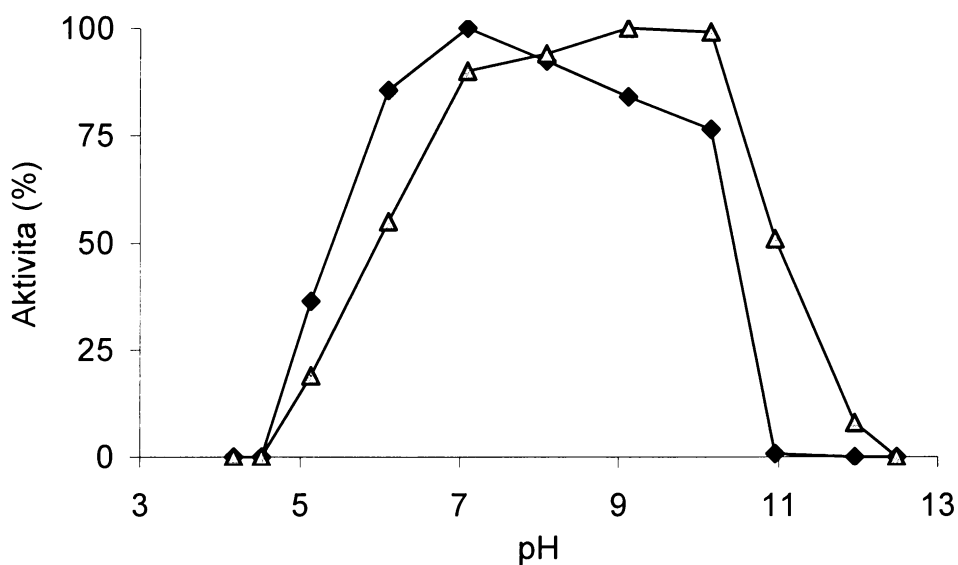
Do preparátů LentiKats[®] bylo imobilizováno 0,5 g lyofilizovaného mycelia s celkovou aktivitou 460 U a bylo získáno celkem 13 g LentiKats[®] o celkové aktivitě 350 U. Podařilo se tedy imobilizovat 76% aktivity, zbylých 24% aktivity pravděpodobně zůstalo v kopolymeru, který již nelze použít pro přípravu LentiKats[®] (pro nízkou hladinu kopolymeru v Petriho misce, ze které se LentiKats[®] tisknou), což je nevýhodou této technologie.

Volné buňky i LentiKats[®] vykazovaly vysoké nitrilasové aktivity v širokém rozmezí mezi pH 6 – 10 (viz Obrázek 24, str. 49). Optimální pH bylo nicméně u imobilizovaných buněk posunuto směrem k vyšším hodnotám. To může být způsobeno rozdíly pH v mediu a v bezprostředním okolí buněk.

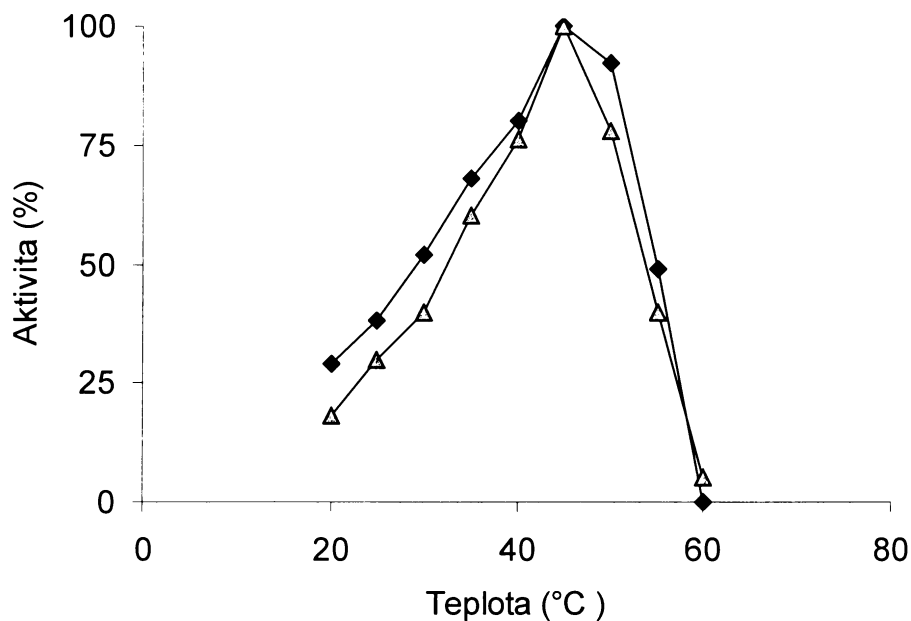
Vliv teploty byl velmi podobný jak pro volné buňky, tak i pro LentiKats[®] – oba preparáty měly nejvyšší aktivitu při 45 – 50 °C a při vyšších teplotách aktivita rychle klesala (viz Obrázek 25, str. 49).

Teplotní stabilita LentiKats[®] byla měřena v pufru (pH 8) a preparáty byly inkubovány při 28 °C, resp. 45 °C. Při 28 °C byly LentiKats[®] inkubovány v temperované místnosti, při 45 °C za mírného míchání v Thermomixeru (viz Tabulka 8, str. 42, Obrázek 26 str. 50). LentiKats[®] podobně jako ostatní enzymové preparáty *F. solani* nevykazovaly dlouhodobou stabilitu při 45 °C, ale při nižších teplotách (28 °C) byly stabilnější. Ze získaných dat bylo vypočteno, že při 45 °C klesne aktivita na polovinu za 4,5 hodin, ale při 28 °C až za 170 hodin (viz Obrázek 26, str. 50).

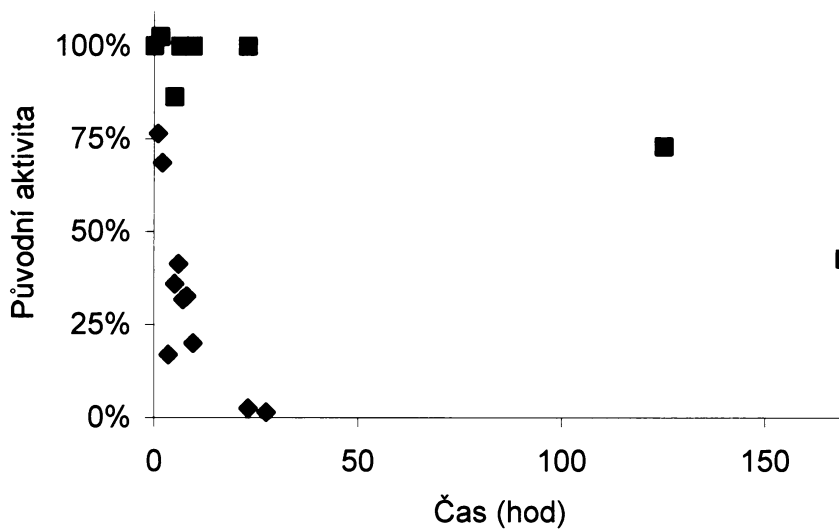
LentiKats[®] stejně jako všechny imobilizované preparáty jsou určeny pro opakované použití. Proto bylo zkoušeno opakované použití LentiKats[®] pro biokonverze benzonitrilu (10 mM) v TRIS/HCl pufru (50mM, pH 8) a 30 °C. Po čtyřech použitích preparátu pro třicetiminutové konverze došlo k poklesu aktivity pouze o 20% (viz Obrázek 27 str. 50).



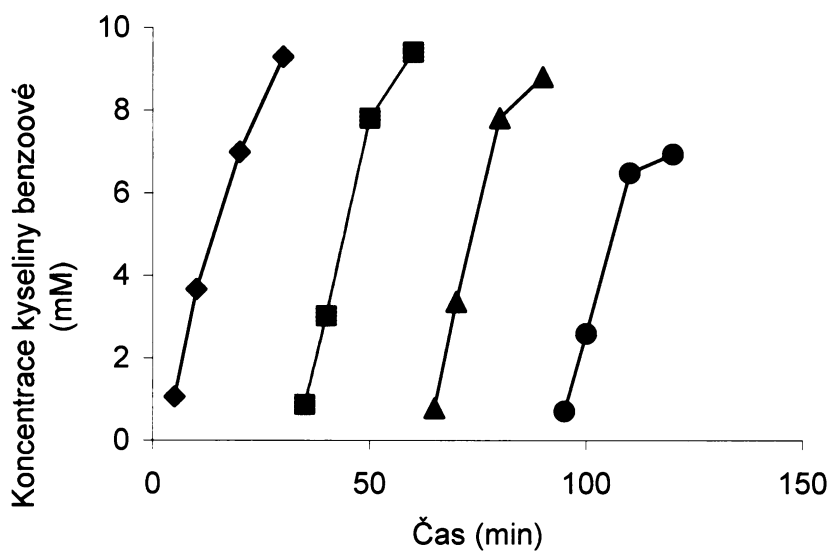
Obrázek 24. pH Optimum lyofilizovaného mycelia *F. solani* imobilizovaného v LentiKats[®]. Volné buňky (◆), buňky imobilizované v LentiKats[®] (▲).



Obrázek 25. Teplotní optimum lyofilizovaného mycelia *F. solani* imobilizovaného v LentiKats[®]. Volné buňky (◆), buňky imobilizované v LentiKats[®] (▲).



Obrázek 26. Teplotní stabilita LentiKats® při pH 8 a 45 °C (červeně) nebo 28 °C (modře).



Obrázek 27. Opakované použití LentiKats® pro biokonverze benzonitrilu (10 mM) v TRIS/HCl pufu (50mM, pH 8) při 30 °C.

4.3.2 Hydrofobní kolony

Buněčné extrakty byly imobilizovány na komerčně dostupných hydrofobních kolonách o objemu 1 ml. Tyto kolony byly používány jako kontinuální bioreaktor: pufrovaný roztok substrátu, obsahující síran amonný, protékal kolonou a pravidelně byly jímány frakce k analýze produktů.

Z těchto kolon byla nejčastěji používána Butyl Sepharosová kolona, přičemž ostatní kolony (Phenyl Sepharosa, Octyl Sepharosa) měly srovnatelné vlastnosti. Přednostní používání této kolony bylo dáno spíše dostupností materiálu v laboratoři, než cíleným výběrem; nicméně tato kolona se velmi osvědčila.

Butyl Sepharosa byla použita pro imobilizaci nitrilasy jak z *A. niger*, tak z *F. solani*. Nitrilasa z *F. solani* se opět ukázala jako stabilnější enzym než nitrilasa z *A. niger*. Další výhodou nitrilasy z *F. solani* byla produkce menšího množství amidů při dlouhodobých konverzích kyanopyridinů.

Enzym z *A. niger* imobilizovaný na Phenyl a Octyl Sepharosové kolony vykazoval při průtoku 0,5 ml/min a pH 8 podobné vlastnosti jako při imobilizaci na Butyl Sepharosu.

Na všech kolonách docházelo při použití extraktů z *F. solani* i *A. niger* k imobilizaci více než 90% nitrilasové aktivity, přičemž se na koloně nezachytilo přibližně 20% proteinů; došlo tedy k částečné purifikaci imobilizovaných extraktů.

4.3.2.1 Teplotní optimum

Předpokládalo se, že teplotní optimum imobilizovaného enzymu bude podobné jako optimum rozpustného enzymu (vzhledem ke zkušenostem s LentiKats[®]), a proto bylo zkoušeno pouze malé rozmezí teplot (20, 35 a 45 °C). Aktivita při 20 °C byla přibližně 25% maximální aktivity (dosažené při 45 °C) a při 35 °C asi 75% maximální aktivity.

4.3.2.2 pH optimum

Pro imobilizované enzymy z *A. niger* i *F. solani* byly zkoušeny 50 mM pufrы TRIS/HCl s pH 7–9. Protože pH v tomto rozmezí nemělo na nitrilasovou aktivitu výrazný vliv, byly používány pufrы o pH 8, tedy při pH optimu rozpustného enzymu.

4.3.2.3 Teplotní stabilita

Byly testovány teploty 20, 35 a 45 °C. Při teplotách 20 a 35 °C nevykazovaly imobilizované buněčné extrakty z *A. niger* nebo *F. solani* po 30 minutách žádnou pozorovatelnou ztrátu aktivity. Při 45 °C došlo za 30 minut ke ztrátě asi 15% aktivity

v případě *A. niger* a asi 10% v případě *F. solani*. Tato měření byla provedena s 5 mM benzonitrilem jako substrátem.

4.3.2.4 Použití pro hydrolýzu heterocyklických nitrilů

Imobilizované enzymy byly použity pro biokonverze 3- a 4-kyanopyridinu, kdy vznikající kyseliny a amidy mají průmyslový význam (nutriční doplňky krmiv – nikotinamid, kyselina nikotinová; tuberkulostatika – kyselina isonikotinová).

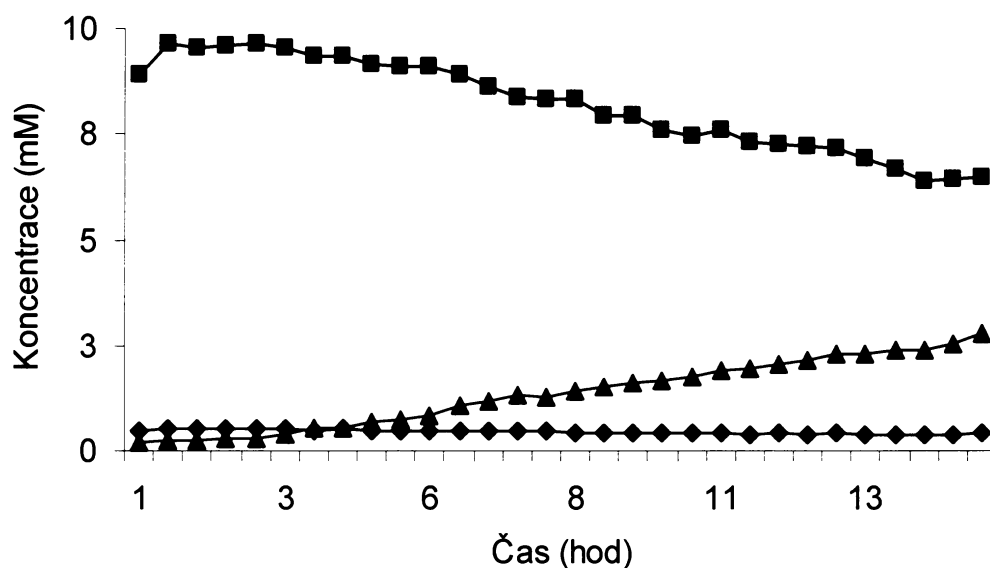
Podobně jako buněčné extrakty obou hub, tak i jejich imobilizáty vykazovaly vyšší aktivitu pro 4-kyanopyridin v porovnání s benzonitrilem (2,5x vyšší aktivitu pro *F. solani* i *A. niger*). Pro 3-kyanopyridin vykazoval *A. niger* třetinovou aktivitu v porovnání s benzonitrilem, a *F. solani* přibližně 90% aktivity pro benzonitril.

U nitrilasy z *A. niger* bylo možno pozorovat, že ke 100% konverzi dochází u 4-kyanopyridinu po delší dobu než u 3-kyanopyridinu (srov. Obrázek 28 a 29, str. 53). To bylo alespoň částečně způsobeno vyšší aktivitou enzymu pro 4-kyanopyridin. V tomto pokusu bylo pro oba substráty použito stejné množství imobilizovaného enzymu. Pro získání srovnatelného výtěžku konverzí obou substrátů je tedy v případě 3-kyanopyridinu třeba imobilizovat úměrně větší množství enzymu.

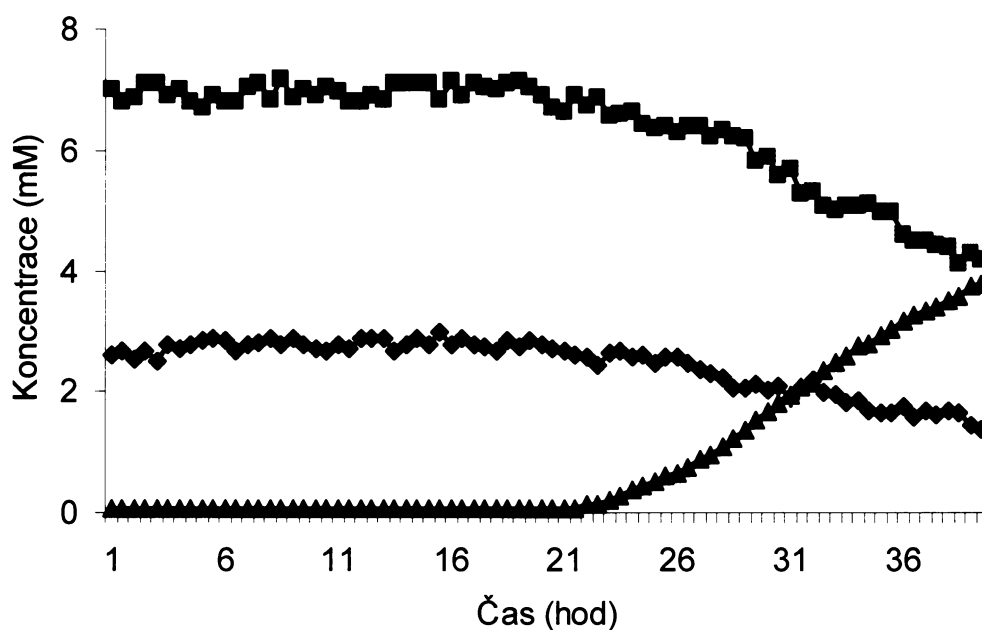
U nitrilasy z *F. solani* bylo dosaženo dlouhodobě vysokých konverzí (viz Obrázek 30 a 31, str. 54). Při konverzi 10 mM 4-kyanopyridinu pomocí tohoto enzymu bylo dokonce dosaženo 100% konverze po dobu více než 72 hodin.

Pokud byl pro biotransformace používán benzonitril, byl do reakčního pufru přidáván ze zásobního roztoku v methanolu tak, že methanol byl přítomen v 5% koncentraci. Tento fakt se nejspíše podílel na rychlém poklesu aktivity enzymu (viz Obrázek 32, str. 55). Jednak došlo nejspíše k destabilizaci vazby na nosič, a za druhé se jistě projevil vliv methanolu na samotný enzym (viz 4.2.2).

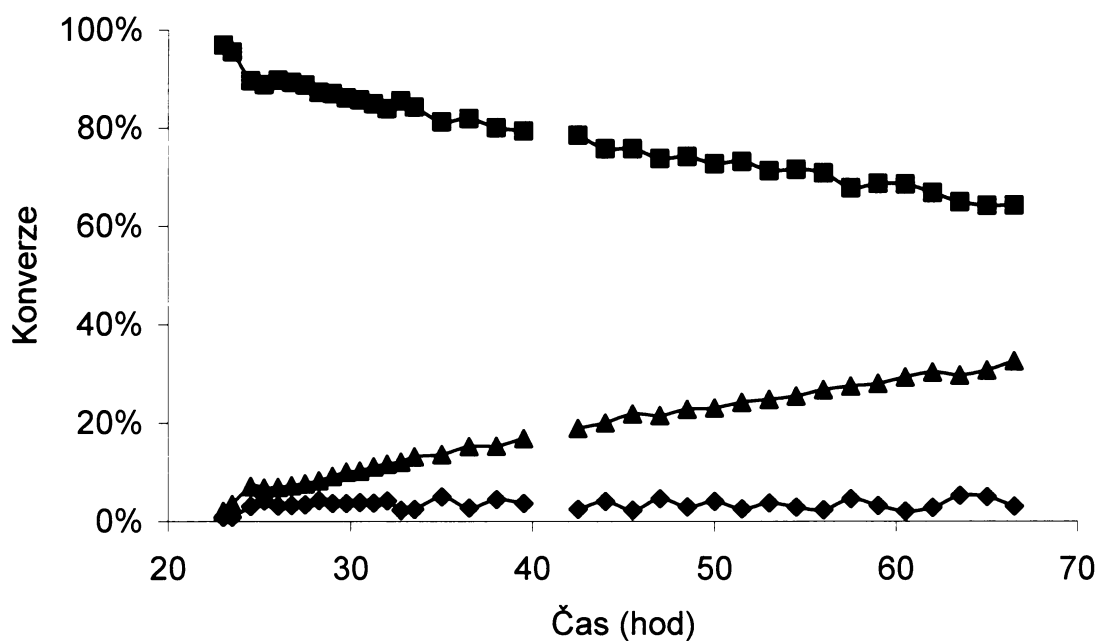
Pokud byly použité kolony s imobilizovaným enzymem skladovány při 4 °C, docházelo vlivem skladování k nevelkým ztrátám aktivity; po sedmi dnech a celkem dvou použitích došlo ke ztrátě 30% původní aktivity.



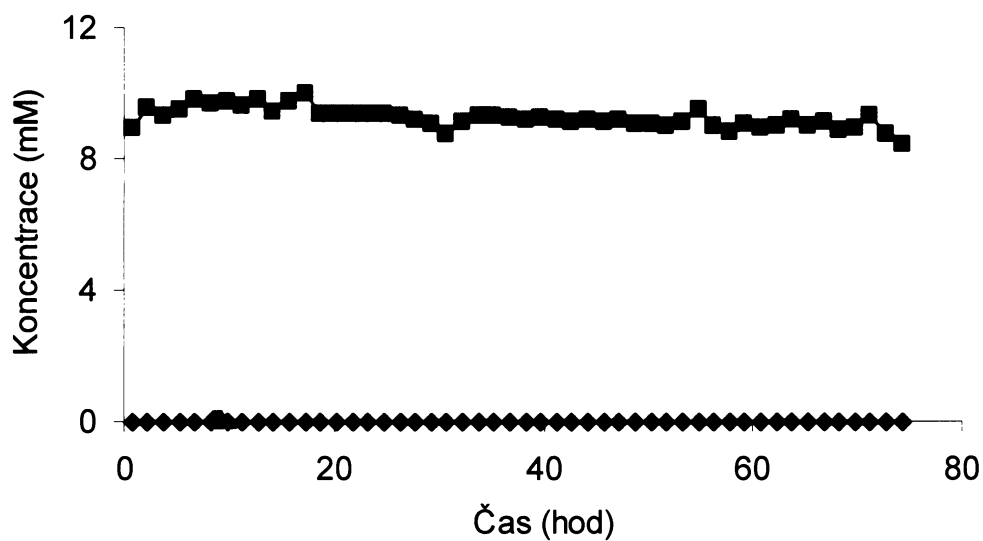
Obrázek 28. Konverze 3-kyanopyridinu (10 mM) pomocí nitrilasy z *A. niger* imobilizované na Butyl Sepharose (7,2 U, 35 °C, eluční rychlost 0,25 ml/min).
3-kyanopyridin (▲), kyselina nikotinová (■), nikotinamid (◆)



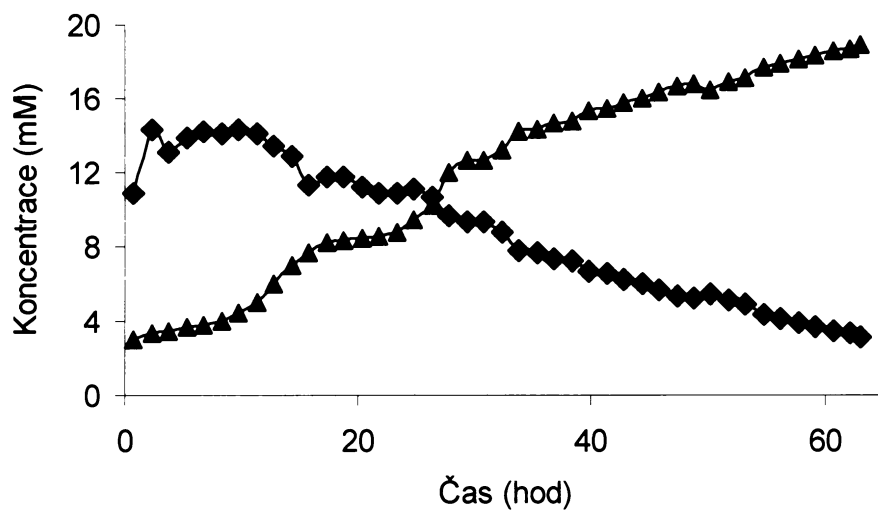
Obrázek 29. Konverze 4-kyanopyridinu (10 mM) pomocí nitrilasy z *A. niger* imobilizované na Butyl Sepharose (7,2 U, 35 °C, eluční rychlost 0,25 ml/min).
4-kyanopyridin (▲), kyselina isonikotinová (■) isonikotinamid (◆)



Obrázek 30. Konverze 3-kyanopyridinu (10 mM) pomocí nitrilasy z *F. solani* imobilizované na Butyl Sepharose (14 U, 35 °C, eluční rychlost 0,25 ml/min). 3-kyanopyridin (▲), kyselina nikotinová (■) nikotinamid (◆)



Obrázek 31. Konverze 4-kyanopyridinu (10 mM) pomocí nitrilasy z *F. solani* imobilizované na Butyl Sepharose (22 U, 35 °C, eluční rychlost 0,25 ml/min). 4-kyanopyridin (▲), kyselina isonikotinová (■) isonikotinamid (◆)

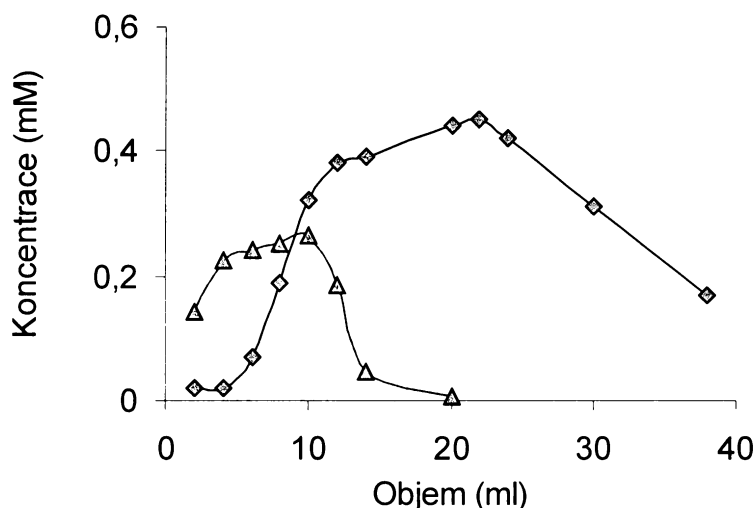


Obrázek 32. Konverze benzonitrilu (25 mM) pomocí nitrilasy z *F. solani* imobilizované na Butyl Sepharose (17 U, 35 °C, 0,25 ml/min). Reakční směs obsahovala 5% methanolu.

benzoová kyselina (◆), benzonitril (▲)

4.3.3 Iontoměničové kolony

Q Sepharosová kolona o objemu 1 ml byla používána při pH 8 a průtoku 0,5 ml/min. Imobilizovaný buněčný extrakt z *A. niger* vykazoval podobné vlastnosti jako enzym imobilizovaný na Butyl Sepharose. Rozdíl byl pozorován pouze v průběhu eluce vznikající kyseliny benzoové. Zde se projevil vliv iontových interakcí kyseliny benzoové s nosičem a eluce tohoto produktu byla na počátku pokusu zpomalena (viz Obrázek 33).

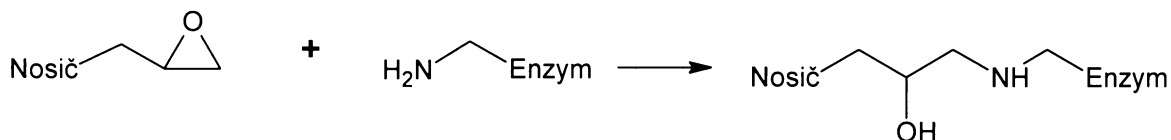


Obrázek 33. Eluce benzonitrilu a kyseliny benzoové z Q Sepharosové kolony s imobilizovanou nitrilasou. (TRIS/HCl pH 8, 35 °C, průtok 0,5 ml/min).

koncentrace kyseliny benzoové (◆), koncentrace benzonitrilu/10 (▲)

4.3.4 Kovalentní nosiče

Jako kovalentní nosič byl používán komerční preparát AmberzymTM (Rohm a Haas, USA). Nosiče tohoto typu obsahují oxiranový kruh, který se účastní kovalentní vazby enzymu (Obrázek 34).



Obrázek 34. Kovalentní imobilizace enzymu na nosič s oxiranovým kruhem (AmberzymTM).

Imobilizace byly prováděny ve fosforečnanovém pufru, protože TRIS/HCl pufr snižuje účinnost imobilizace – obsahuje aminové skupiny, které inhibují imobilizaci enzymu, ke které dochází prostřednictvím volných aminových skupin enzymu.

Pro tyto imobilizace se používal buněčný extrakt z *F. solani*.

Enzym imobilizovaný na AmberzymTM se používal pro opakované biokonverze benzonitrilu.

Jako nejvýhodnější se ukázala imobilizace probíhající 48 hodin (viz Tabulka 9).

Takto imobilizovaný enzym byl použit pro opakované biokonverze benzonitrilu, kde po třech cyklech nedošlo k poklesu aktivity, oproti ostatním imobilizacím.

Čas imobilizace (hod)	Imobilizovaná aktivita (%)	Ztráta aktivity po 3 cyklech (%)
24	51	27
48	93	0
72	92	7

Tabulka 9. Imobilizace nitrilasy z *F. solani* na nosič AmberzymTM.

Podmínky imobilizace: 22 °C, fosforečnanový pufr (pH 8), 0,36 U

Aktivita měřena při 45 °C, fosforečnanový pufr (pH 8), reakční doba 10 min.

4.3.5 Koimobilizace nitrilasy a amidasy

Při působení nitrilasy může vznikat jako vedlejší produkt amid, který při biokonverzi 4-kyanopyridinu nitrilasou z *A. niger* může tvořit až 36% celkového produktu. Naším cílem bylo co možná nejvíce snížit množství vznikajícího amidu, například použitím amidasy, která by vznikající amid převáděla na žádoucí produkt – karboxylovou kyselinu. Jako zdroj amidasy jsme použili *R. equi*, se kterým jsme v laboratoři již měli zkušenosti [18].

Zkoušeli jsme dvě metody imobilizace: první, kdy byly nitrilasa, amidasa a nitrilhydratasa koimobilizovány na jedné koloně, a druhou, kdy byly enzymy z *R. equi* a nitrilasy imobilizovány každá na zvláštní kolonu (dále jen sériová imobilizace).

Prozatím jsme jako jediný substrát používali 40 mM 4-kyanopyridin v síranovém pufru (viz Obrázek 35 a 36, str. 59), ale tato metoda bude jistě mít dobré výsledky i pro jiné substráty.

Při imobilizaci enzymů z *R. equi* je během biotransformace zpočátku patrný vliv nitrilhydratasy (zvýšení množství vznikajícího amidu). Doba, po kterou lze tento jev pozorovat, závisí na množství imobilizované nitrilhydratasy. Protože tento enzym má ale oproti amidase a nitrilase menší tepelnou stabilitu, klesá s časem její aktivita výrazněji, než aktivita ostatních dvou enzymů. Vliv nitrilhydratasy ovšem není patrný při úplných konverzích kyanopyridinů, při sériové imobilizaci.

Po prvních obtížích při imobilizaci, kdy se nedařilo snižovat množství amidu, přestože jsme věděli, že se nám daří amidasu imobilizovat (podle měření množství prošlých bílkovin), jsme provedli několik testů na inhibici amidasy různými solemi, které se běžně používají při hydrofobních chromatografiích. Zjistili jsme, že soli obsahující amonné ionty se projevují jako různě silné inhibitory amidasové aktivity (viz Tabulka 10). Proto jsme pro další imobilizace nahradili 0,8 M síran amonný 1 M síranem sodným.

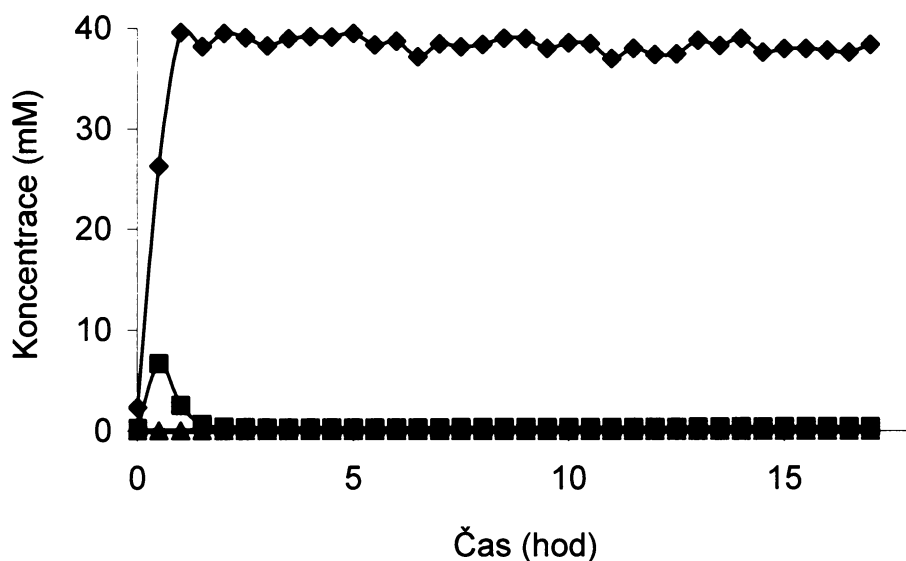
Po tomto zlepšení se nám již podařilo snížit množství vznikajícího amidu imobilizací náležitého množství amidasy. Pro *F. solani* se nám podařilo při koimobilizaci snížit množství vznikajícího isonikotinamidu pod jedno procento, a při použití stejných množství enzymů při sériové imobilizaci dokonce pod jedno promile.

U *A. niger* se nám prozatím podařilo omezit množství vznikajícího amidu na 5%, ale toto množství bude možno pravděpodobně ještě snížit.

Sůl (1M)	Aktivita
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5%
NH_4Cl	7%
Močovina	9%
$\text{CH}_3\text{COONH}_4$	41%
KCl	90%
NaCl	97%
Na_2SO_4	98%
Sacharosa	105%

Tabulka 10. Vliv roztoků solí a sacharosy (1M) v TRIS/HCl pufru (50 mM, pH 8) a 35 °C na aktivitu amidasy.

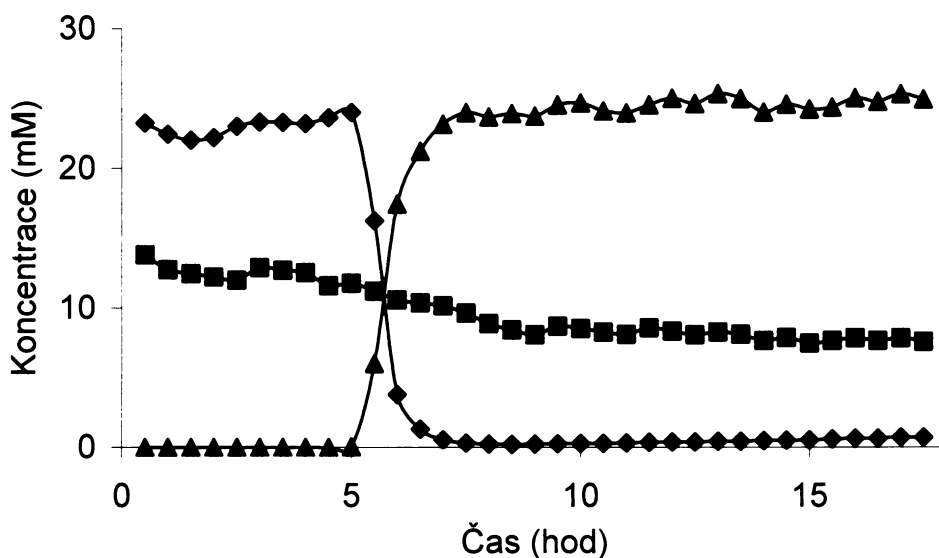
Kontrola (100%): aktivita amidasy v TRIS/HCl (50 mM, pH 8), 35 °C.



Obrázek 35. Biokonverze 40 mM 4-kyanopyridinu koimobilizovanými enzymy z *F. solani* a *R. equi*.

Podmínky reakce: TRIS/HCl (50 mM, pH 8) s 1M Na₂SO₄, 35 °C, 5 U amidasové aktivity a 23 U nitrilhydratasové a nitrilasové aktivity.

4-kyanopyridin (▲), kyselina isonikotinová (■), isonikotinamid (◆)



Obrázek 36. Biokonverze 40 mM 4-kyanopyridinu koimobilizovanými enzymy z *A. niger* a *R. equi*.

Podmínky reakce: TRIS/HCl (50 mM, pH 8) s 1M Na₂SO₄, 35 °C 19 U amidasové aktivity a 70 U nitrilhydratasové a nitrilasové aktivity.

4-kyanopyridin (▲), kyselina isonikotinová (■), isonikotinamid (◆)

4.4 Preparativní biokonverze

4.4.1 Lyofilizované mycelium

Při konverzích kyanopyridinů při 28 °C vykazovalo mycelium *F. solani* dobrou stabilitu. Menší výtěžnost některých konverzí si vysvětlujeme spíše inhibicí substrátem, než ztrátou aktivity. Je možno vyloučit vliv změny pH, neboť ani vzniklé kyseliny neposunuly hodnoty pH media příliš od optima nitrilasy. Průběh konverzí je možno sledovat na Obrázcích 37 – 41, na str. 62 – 63; výsledky jsou přehledně shrnuty v Tabulce 11.

Koncentrace 4-kyanopyridinu	Množství lyofilizovaného mycelia (U)	Amid (%)	Konverze
100mM	25	1,8	100%
200mM	52	1,8	100%
300mM	91	1,8	100%
500mM	145,6	2	100%
1000mM	260	2,1	40%

Koncentrace 3-kyanopyridinu	Množství lyofilizovaného mycelia (U)	Amid (%)	Konverze
100mM	52	<1	100%
200mM	156	<1	100%
300mM	286	<1	68%
500mM	416	<1	27%
1000mM	676	2,5	4%

Tabulka 11. Výtěžnost konverzí kyanopyridinů a množství mycelia použité pro biokonverze

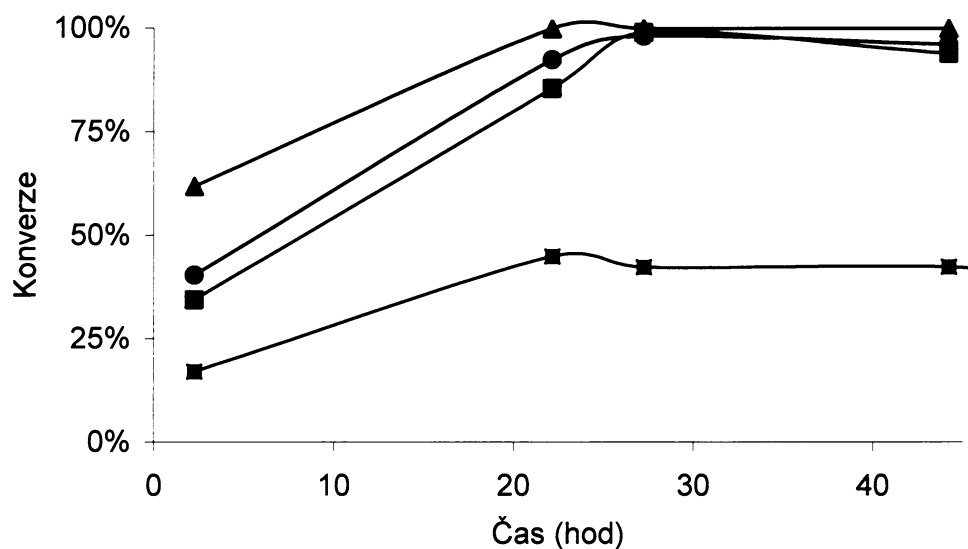
Nebyl pozorován rozdíl mezi konverzemi v TRIS/HCl pufru nebo fosforečnanovém pufru (oba pufrы při pH 8 a koncentraci 50 mM). Konverze, kde byly kyanopyridiny rozpuštěny pouze v destilované vodě, rovněž probíhaly bez výrazných změn, podobně jako při použití pufrovaných roztoků. Na konci konverze měly všechny roztoky pH v rozmezí 6,6 – 7,4, takže nebylo třeba roztoky pufrovat vzhledem k dosti širokému pH optimu enzymu (viz 4.2.3)

Z reakčních směsí byly po skončení reakce izolovány produkty. Izolace produktu z konverze 3-kyanopyridinu nebyla příliš úspěšná. Nedařilo se dostatečně vyčistit reakční

směs od substrátu, ani její opakovanou extrakcí bezvodým methanolem. Naproti tomu izolace kyseliny isonikotinové z roztoků, kde došlo ke 100% konverzím, se podařila. Jako nejlepší metoda se ukázalo částečné odpaření vzorku na vakuové odparce, kdy jsme odpařili zbytky kyseliny chlorovodíkové, která se přidávala po skončení reakce pro precipitaci proteinů. Takto mírně zahuštěný vzorek se nechal přes noc lyofilizovat. Vznikl bílý prášek, který při analýze na HPLC nevykazoval žádné zbytky kyanopyridinu, jen kontaminaci isonikotinamidem do 2%.

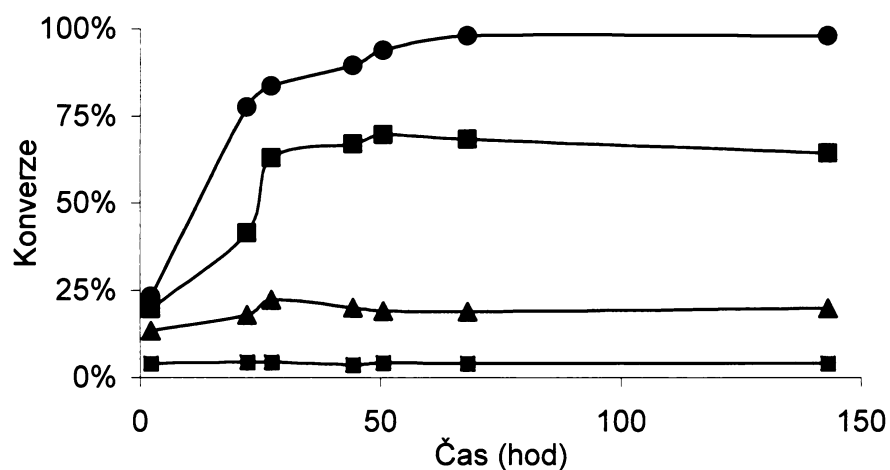
Teploty tání těchto látek byly stanoveny na bodotávku. Kyselina isonikotinová přečištěná extrakcí methanolem měla teplotu tání vyšší než 300 °C (isonikotinová kyselina má teplotu tání 311 °C), ale při extrakci došlo ke ztrátě téměř 40% produktu.

Ostatní vzorky (lyofilizované) isonikotinové kyseliny měly na bodotávku teplotu tání 270 °C.



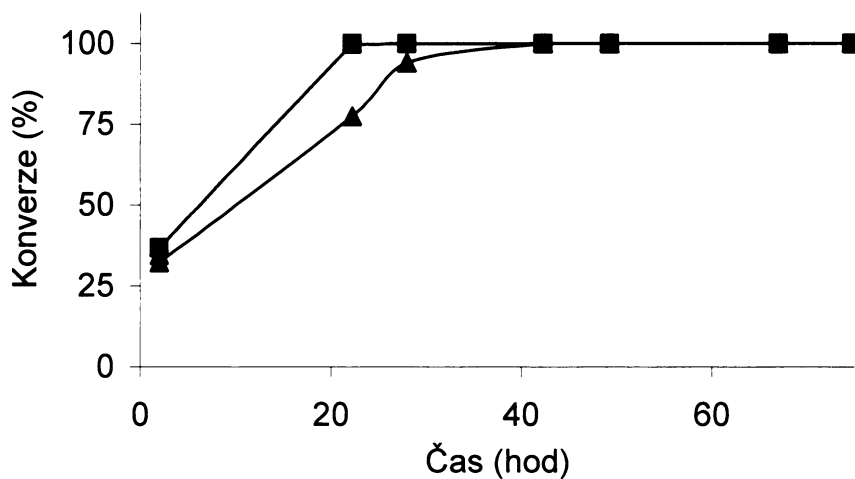
Obrázek 37. Konverze roztoků 4-kyanopyridinu lyofilizovaným myceliem *F. solani* v destilované vodě při 28 °C .

200 mM ●, 350 mM ■, 500 mM ▲, 1 M ■



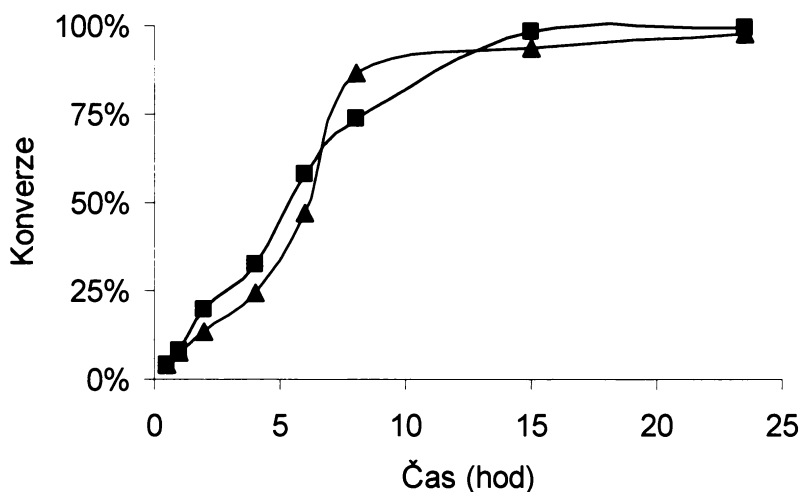
Obrázek 38. Konverze roztoků 3-kyanopyridinu lyofilizovaným myceliem *F. solani* v destilované vodě při 28 °C .

200 mM ●, 350 mM ■, 500 mM ▲, 1 M ■



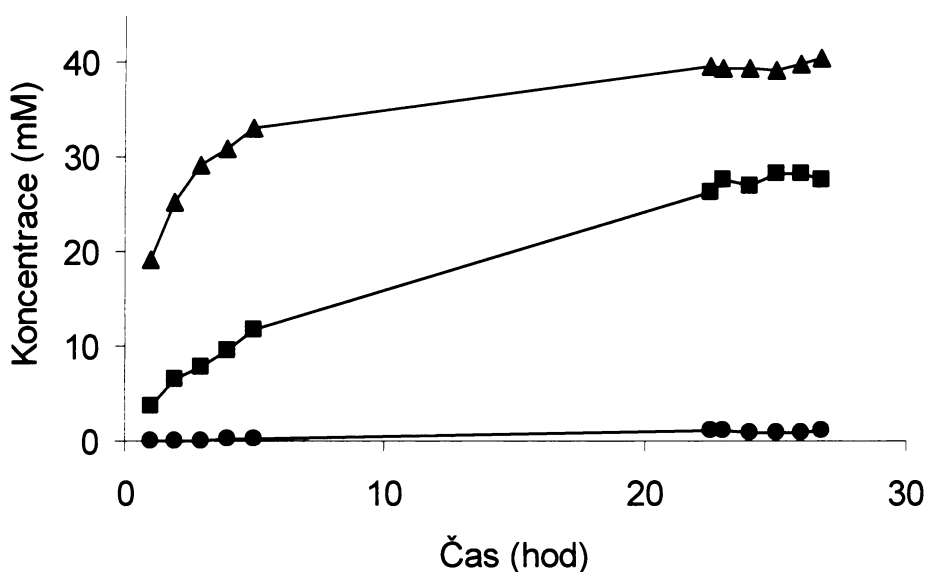
Obrázek 39. Konverze 100mM roztoků 4-kyanopyridinu nitrilasou z *F. solani* ve fosforečnanovém pufru (50 mM, pH 8) při 28 °C .

lyofilizované mycelium (11 U) ■, LentiKats® (4 U) ▲



Obrázek 40. Konverze 100mM roztoků 3-kyanopyridinu v destilované vodě nitrilasou z *F. solani* při 20 °C .

lyofilizované mycelium (26 U) ■, LentiKats® (12 U) ▲



Obrázek 41. Konverze 40mM roztoků kyanopyridinů lyofilizovaným myceliem *F. solani* (6U) v TRIS/HCl pufru (50 mM, pH8) při 28 °C.

pikolinová kyselina ●, nikotinová kyselina ■, isonikotinová kyselina ▲

4.4.2 LentiKats®

Preparáty LentiKats® byly použitelné pro biokonverze kyanopyridinů, nicméně bylo třeba přidávat velká množství těchto preparátů do reakčních směsí, vzhledem k jejich nepříliš vysoké specifické aktivitě.

Průběh konverzí pomocí LentiKats® lze sledovat na Obrázku 39 a 40 str. 63.

4.5 Purifikace

4.5.1 *A. niger*

Nalezení postupu purifikace nitrilasy z *A. niger* bylo součástí jak této diplomové práce, tak doktorské práce O. Kaplana, jejímž předmětem je mimo jiné detailní charakterizace tohoto enzymu.

Prvním krokem použitým při purifikaci bylo srážení síranem amonným, kde došlo k odstranění 80% bílkovin při zachování 50% aktivity.

Protože byla zjištěna vysoká molekulová hmotnost nativního enzymu (gelovou filtrací na Superdexu 200; hmotnost větší než 650 kDa), byla jako další krok použita gelová filtrace na Sephacrylu S-200 (viz Obrázek 42, str. 67). Touto metodou sice nebylo možno stanovit molekulovou hmotnost nativního enzymu, ale došlo k odstranění 74% bílkovin při zachování 91% aktivity oproti předchozímu kroku. Touto metodou došlo také k odsolení vzorku, takže se mohl bez dalších úprav nanést na iontoměničovou kolonu s Q Sepharosou (viz Obrázek 43, str. 67)), kde byly zachycené proteiny eluovány gradientem 1 M roztoku NaCl. Při této metodě došlo k odstranění 75% proteinů při ztrátě 42% aktivity.

Celkově došlo k přečištění enzymu 18,7krát s výtěžkem 24% původní aktivity (viz Tabulka 12).

Při předchozích pokusech byla po srážení síranem amonným použita hydrofobní kolona (Phenyl Sepharosa). Zde došlo k významnému naředění vzorku a značné ztrátě celkové aktivity. Specifická aktivita se při tom příliš nezvýšila. Proto byla tato metoda z dalších pokusů vynechána.

	Proteiny (mg)	Specifická aktivita (U/mg)	Celková aktivita (U)	Výtěžek (%)	Purifikace (násobek)
Hrubý extrakt	116,0	5,0	570,0	100,0	1,0
Síran amonný (40-50% nasycení)	23,0	11,0	263,0	46,0	2,3
Gelová filtrace	6,0	39,0	242,0	42,0	8,0
Iontoměničová chromatografie	1,5	92,0	139,0	24,0	18,7

Tabulka 12. Postup purifikace nitrilasy z *A. niger* K10.

4.5.2 *F. solani*

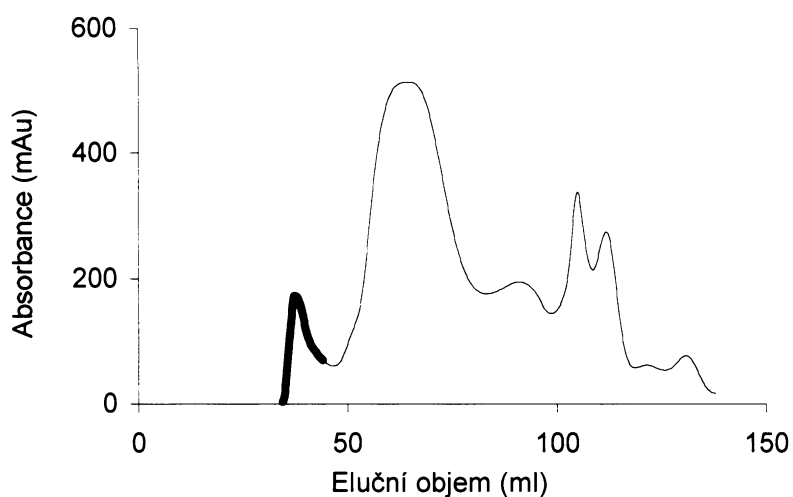
Při purifikaci *F. solani* bylo srážení síranem amonným vynecháno. V tomto kroku bylo sice odstraněno až 60% bílkovin, ale nedošlo ke zvýšení specifické aktivity, naopak ke ztrátě až tří čtvrtin celkové aktivity (při srážení v rozmezí 50 – 70% nasycení, přičemž od 50% nasycení došlo k odstranění jen části bílkovin a ztrátě jen 5% aktivity, nad 70% bylo méně než 10% aktivity).

Jinak byl postup shodný s purifikací nitrilasy z *A. niger*. I nitrilasa z *F. solani* v nativní formě vykazovala vysokou molekulovou hmotnost.

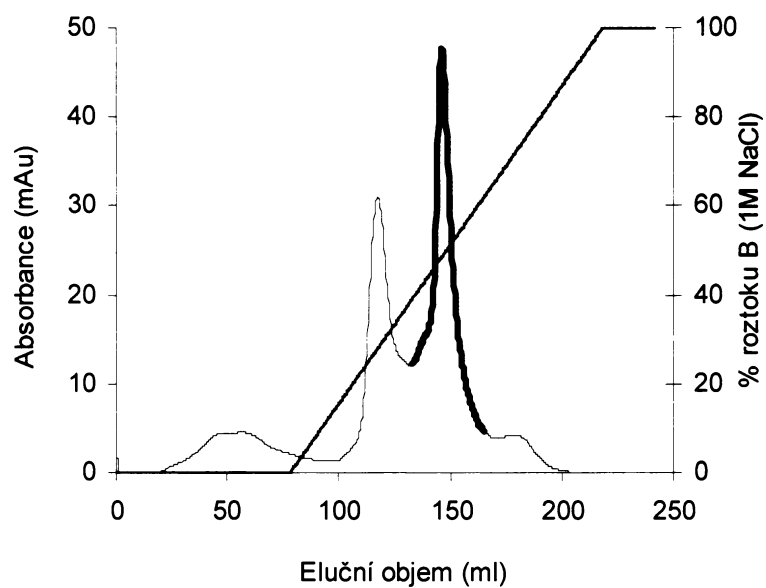
Celkově došlo k přečištění enzymu 4,8krát s výtěžkem 24% původní aktivity (viz tabulka 13). Celkové navýšení aktivity tak bylo výrazně nižší než v případě nitrilasy *A. niger*. Je však třeba vzít v úvahu, že aktivita hrubého extraktu byla u *F. solani* více než 4x vyšší než u *A. niger*.

	Proteiny (mg)	Specifická aktivita (U/mg)	Celková aktivita (U)	Výtěžek (%)	Purifikace (násobek)
Hrubý extrakt	22,0	10,5	230,1	100,0	1,0
Gelová filtrace	3,8	22,4	85,5	37,2	2,1
Iontoměničová chromatografie	1,1	50,0	55,0	23,9	4,8

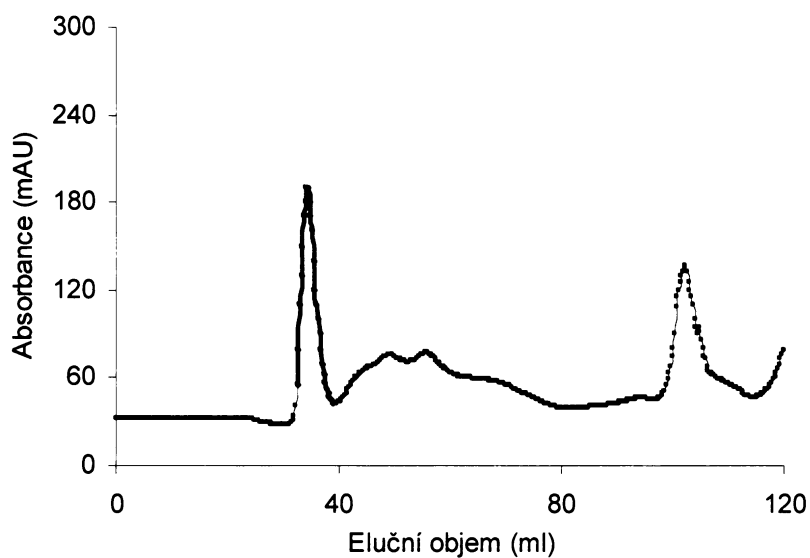
Tabulka 13. Postup purifikace nitrilasy z *F. solani*



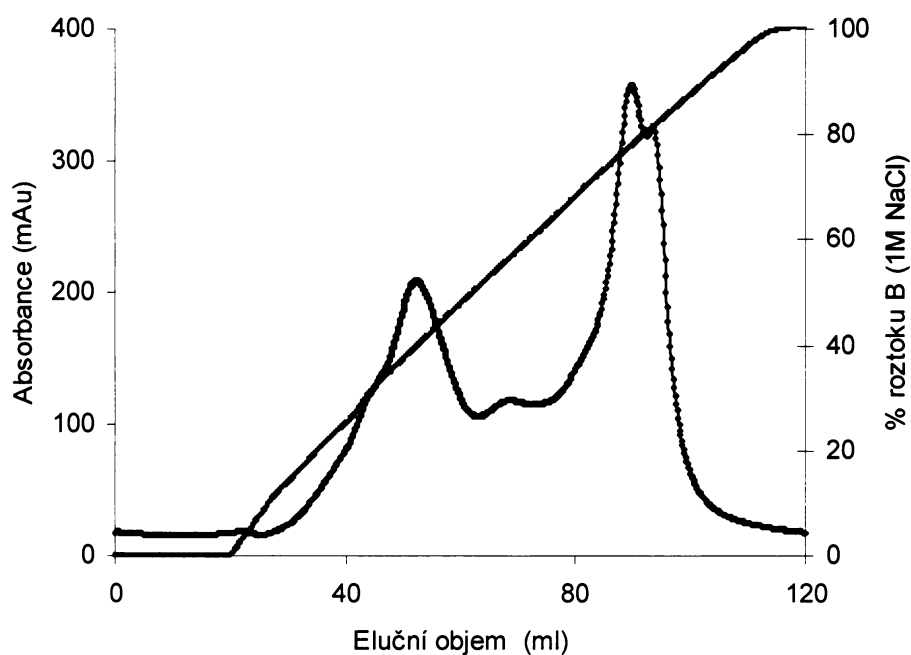
Obrázek 42. Eluční profil nitrilasy z *A. niger* při gelové filtraci na koloně Sephacryl S-200; nitrilasová aktivita zvýrazněna červeně.



Obrázek 43. Eluční profil nitrilasy z *A. niger* na Q Sepharosové koloně – eluce gradientem 10mM – 1M roztoku NaCl; nitrilasová aktivita zvýrazněna červeně, gradient NaCl modře.



Obrázek 44. Eluční profil nitrilasy z *F. solani* při gelové filtraci na koloně Sephacryl S-200; nitrilasová aktivita zvýrazněna červeně.



Obrázek 45. Eluční profil nitrilasy z *F. solani* na Q Sepharosové koloně – eluce gradientem 10mM – 1M roztoku NaCl; nitrilasová aktivita zvýrazněna červeně, gradient NaCl modře.

4.5.3 Elektroforéza v prostředí SDS

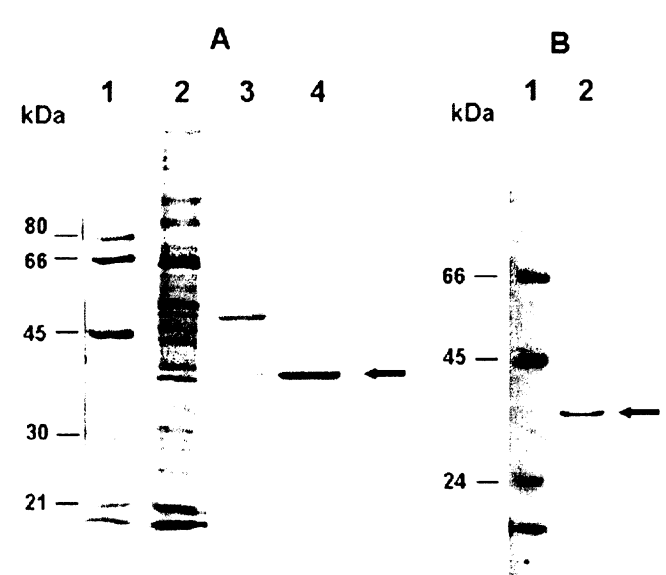
Pomocí elektroforetického dělení v prostředí SDS se nám podařilo zjistit čistotu purifikovaného enzymu a zjistit molekulové hmotnosti enzymových podjednotek.

Barvení pomocí Coomassie Blue naznačilo, že nitrilasa z *A. niger* by mohla být homogenní (byl pozorován pouze jeden proužek („band“) při 35 kDa), ovšem při barvení stříbrem se objevil ještě slabý proužek při 60 kDa (viz Obrázek 46).

Při barvení purifikované nitrilasy z *F. solani* (viz Obrázek 47, str. 70) pomocí Coomassie Blue byly detegovány dva hlavní proteiny, první s molekulovou hmotností 39 kDa a druhý 77 kDa, dále byly při barvení stříbrem pozorovány ještě další dva slabé proužky v oblasti 28 kDa a 45 kDa.

Je tedy vidět, že purifikace *F. solani* neproběhla úplně a enzym lze s největší pravděpodobností ještě dále purifikovat.

Z uvedených dat je vidět, že obě nitrilasy mají podobně velké podjednotky.



Obrázek 46. SDS-PAGE nitrilasy z *A. niger* (doktorská práce O. Kaplan).

A Barvení stříbrem
dráha

1 – standard

2 – síranová frakce enzymu

3 – gelová filtrace (Sephacryl S – 200)

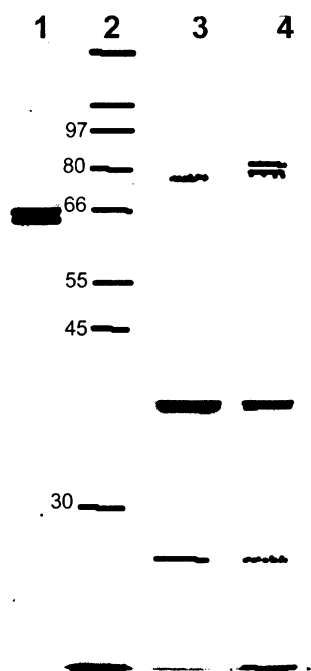
4 – iontoměničová chromatografie (Q Sepharosa)

B Barvení Coomassie Blue
dráha

1 – standard

2 – iontoměničová chromatografie

(Q Sepharose)



Obrázek 47. SDS-PAGE nitrilasy z *F. solani*.

Barvení Coomassie Blue

Dráha 1 – BSA

2 – marker

3 – iontoměničová chromatografie (Q Sepharosa)

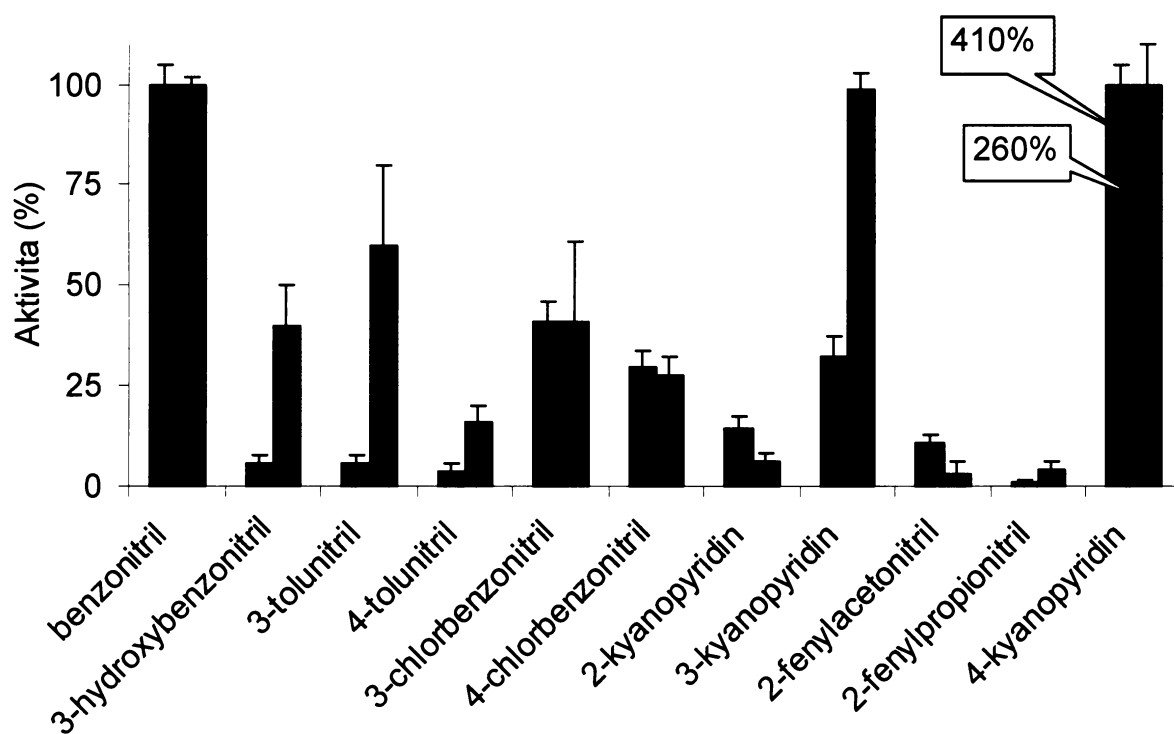
4 – gelová filtrace (Sephacryl S – 200)

4.6 Substrátová specifita

Substrátová specifita byla stanovována pro částečně purifikované enzymy, přičemž byl jako referenční substrát zvolen benzonitril. Reakční směs obsahovala 5% methanolu jako rozpouštědla pro substráty, které byly do reakční směsi přidávány z 500 mM zásobních roztoků (na konečnou koncentraci 25 mM).

Relativní aktivity nitrilasy z *A. niger* a *F. solani* pro různé substráty jsou shrnuty v Obrázku 48.

Aktivita pro *F. solani* byla stanovena jako úbytek substrátu. Substrátová specifita nitrilasy *A. niger* byla převzata z doktorské práce O. Kaplana.



Obrázek 48. Relativní substrátová specifita částečně purifikovaných nitrilas, kontrola (100%): aktivita pro benzonitril.

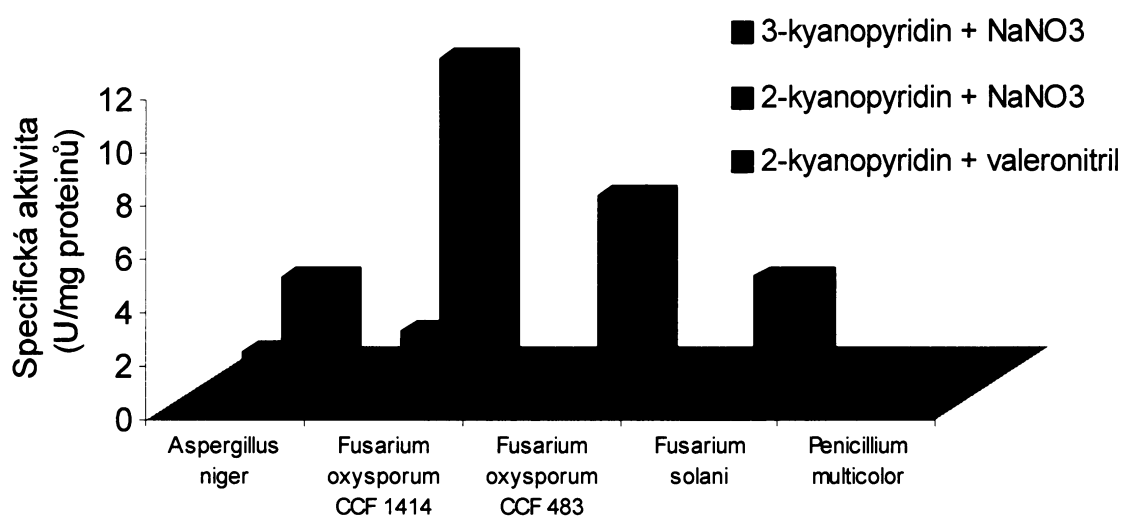
modře – *A. niger*, červeně – *F. solani*

5 DISKUSE

5.1 Indukce aktivity

Během diplomových prací K. Nikolaou a O. Kaplana byly ze sbírkových kultur a izolátů z přírody vybrány kultury s nitrilasovou aktivitou, které byly dále zkoumány. Jako induktor nitrilasové aktivity byl nejprve používán 3-kyanopyridin [41].

Při zkoumání vlastností nitrilasy z *A. niger* (během doktorské práce O. Kaplana) byly místo 3-kyanopyridinu zkoušeny jiné induktory. Z tohoto výzkumu vyšel jako nejlepší induktor 2-kyanopyridin v kombinaci s valeronitrilem. Směs těchto dvou nitrilů indukovala nitrilasovou aktivitu nejen u druhu *A. niger*, ale i jiných druhů vláknitých hub zkoumaných během doktorské práce O. Kaplana (*Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Penicillium multicolor*). Při použití těchto nitrilů došlo ke zvýšení specifické aktivity až 400x u *A. niger*, a 150x u *F. solani* (viz Obrázek 49).



Obrázek 49. Indukce nitrilasové aktivity u různých druhů vláknitých hub, doktorská práce O. Kaplan a [40].

Kombinace induktorů byla používána pro indukci nitrilasové aktivity při jednokrokových kultivacích u obou druhů vláknitých hub zkoumaných v této diplomové práci (*A. niger*, *F. solani*). Nicméně vliv valeronitrilu na zvýšení specifické aktivity nebyl

příliš významný (max 10% zvýšení), a proto nebyl tento nitril (i vzhledem ke své jedovatosti, LD50 myš = 191 mg/kg) použit při dvoukrokových kultivacích (1. krok: nárůst velkého množství biomasy, 2. krok: indukce nitrilasy v napěstované biomase).

Pomocí dvoukrokové kultivace se nám u *F. solani* podařilo zvýšit výtěžek nitrilasové aktivity, kdy z jednoho litru media bylo možno získat více než 2000 U nitrilasové aktivity.

Použitím induktoru (2-kyanopyridinu), který zvyšoval specifickou aktivitu u dvoukrokové kultivace, jsme získali velké množství aktivního preparátu, který byl vhodný k přímému použití při biokonverzích, nebo z něj bylo možno připravit extrakt, který se mohl dále využívat pro imobilizaci a purifikaci nitrilasy.

Valeronitril ani 2-kyanopyridin nebyly dosud popsány jako účinné induktory nitrilas (bakteriálních ani fungálních). Jedinou zmínkou o použití 2-kyanopyridinu k indukci nitrilasy je práce zabývající se enzymem z bakterie *Nocardia rhodochrous*, ale v tomto případě nebyl pozorován rozdíl mezi indukcí 2-kyanopyridinem a 3-kyanopyridinem [42]. Jako zvláště účinný induktor bakteriálních nitrilas byl pro kmeny *Rhodococcus rhodochrous* K22 a J1 použit isovaleronitril [43]. Nitrilasy vláknitých hub byly dosud indukovány alifatickými nitrily (acetonitrilem, propionitrilem, (iso)butyronitrilem) nebo benzenitrilem [15, 16].

Produkce nitrilasy byla již dříve popsána u jiného kmene *F. solani* [15], ale produkce tohoto enzymu kmenem zkoumaným v této diplomové práci byla mnohonásobně vyšší. V předchozí práci byla celková produkce nitrilasy jen asi 60 U přesto, že byly používány velké objemy kultivačního media (asi 15 l). Dvoukroková kultivace byla v minulosti použita pro *F. oxysporum*, které poskytlo asi 140-830 U nitrilasy na litr media [16]. V této diplomové práci byla dosažena ještě vyšší produkce nitrilasy – nejméně 2,8x vyšší ve srovnání s *F. oxysporum* [16] a asi 550x vyšší než u *F. solani* O1 [15].

5.2 Stabilita nitrilas

Stabilita enzymů je důležitým faktorem pro jejich uchování, stabilní enzym lze připravit ve větším měřítku a postupně ho spotřebovávat, naproti tomu méně stabilní enzym je třeba neustále připravovat, nebo používat stabilizátory.

Pro skladování nitrilasy z *A. niger* se nejvíce osvědčila hluboce zmražená síranová sůl enzymu, kde zbytkový síran amonný jistě sehrál roli protektantu. Pro krátkodobé uchování bylo ale praktičtější skladovat síranovou frakci v lednici při 4 °C.

Oproti tomu nitrilasa z *F. solani* neměla žádné velké nároky na skladování, neboť již skladování buněčného extraktu při 4 °C se ukázalo jako dostačující. Buněčný extrakt byl několik dní stabilní i při 28 °C.

Je tedy patrné, že extrakt z *F. solani* byl několikrát stabilnější než síranová frakce enzymu z *A. niger*.

Lyofilizace síranové frakce enzymu z *A. niger* se ukázala jako nepraktická, a to i za použití sacharidů jako protektantů. Naproti tomu lyofilizace mycelia *F. solani*, se ukázala jako velmi praktická, neboť lyofilizované mycelium zůstává aktivní po několik měsíců.

Organická rozpouštědla jako kosolventy jsou nezbytností v řadě případů, kdy se jako substrát používá ve vodě nerozpustný nitril, zároveň ale jejich přídavek negativně ovlivňuje aktivitu enzymu, takže je třeba snížit množství těchto rozpouštědel na minimum. Také rozpustnost substrátů limituje použití nitrilas pro jejich konverze. Jako substráty jsou tedy nejvhodnější ve vodě rozpustné látky.

Z uvedených dat je patrné, že nitrilasa z *F. solani* se jednoznačně ukázala stabilnější než nitrilasa z *A. niger* a to nejen při uchovávání ve formě extraktu, ale i při měření aktivity v reakční směsi v přítomnosti kosolventů.

Námi zkoumané nitrilasy patří ve srovnání s ostatními nitrilasami (bakteriálními i fungálními) mezi relativně termostabilní enzymy s teplotním optimem mezi 45-50 °C [7]. Tyto nitrilasy připomínají svou termostabilitou nitrilasu z *F. solani* [15], ale jsou při zvýšených teplotách výrazně stabilnější než enzym z *F. oxysporum* [16], který rychle ztrácí aktivitu při teplotách již nad 40 °C.

5.3 Purifikace nitrilas

Protože reakce buněčných extraktů mohou být ovlivňovány dalšími enzymy i nízkomolekulárními látkami, je pro charakterizaci enzymu vždy výhodná jeho purifikace.

U purifikovaného enzymu lze zjistit jeho substrátovou specifitu a vliv jiných látek na jeho aktivitu, aniž by tyto údaje byly zkresleny interakcemi s ostatními enzymy a nízkomolekulárními látkami. Tyto vlastnosti se mohou od buněčných extraktů lišit. V neposlední řadě lze u purifikovaného enzymu zjistit jeho aminokyselinovou sekvenci, díky které lze připravit daný enzym expresí v jiných mikroorganismech, nebo provést jeho cílené mutace.

Ačkoliv byly pro nitrilasy z obou mikroorganismů použity stejné purifikační protokoly, bylo přečištění u *A. niger* téměř 4krát účinnější než u *F. solani*, což může být způsobeno větším množstvím bílkovin, které se vyskytují v *A. niger* na rozdíl od *F. solani*. Pro *F. solani* byl získán enzym s poloviční specifickou aktivitou než pro *A. niger*. Protože byla u enzymu *A. niger* zjištěna kopurifikace s jinými bílkovinami („heat shock protein“ Hsp 60, „ubiquitin conjugating protein“; doktorská práce O. Kaplana), lze přepokládat, že specifická aktivita nitrilasy z *A. niger* bude vyšší než 92 U/mg. Můžeme tedy předpokládat, že i specifická aktivita pro nitrilasu *F. solani* bude ještě vyšší než 50 U/mg bílkovin, a to i vzhledem k tomu, že podle SDS-PAGE nebyla purifikace provedena úplně. Nicméně i tak je námi stanovená specifická aktivita tohoto enzymu mnohonásobně vyšší, než bylo zjištěno Harperem u nitrilasy z jiného kmene *F. solani* (1,66 U/mg proteinů [16]).

Elektroforetickou analýzou částečně purifikovaných enzymů se zjistilo, že podjednotky obou nitrilas (*A. niger*, *F. solani*) mají pravděpodobně velmi podobnou molekulovou hmotnost (35 resp. 39 kDa) jako většina ostatních nitrilas (kolem 37-46 kDa; srov. s Tabulkou 2, str. 5, [8]).

5.4 Substrátová specifita

Nejvyšší substrátovou specifitu mají obě nitrilasy pro 4-kyanopyridin a dále pro aromatické nitrily substituované v *para* poloze elektronegativním substituentem (halogen, hydroxylová skupina).

Tyto substituenty snižují elektronovou hustotu na kyanoskupině a zvyšují tak účinnost nukleofilního ataku (viz Obrázek 7, str. 4) sulfhydrylové skupiny aktivního centra enzymu na substrát.

Nejnižší substrátovou specifitu vykazují obě nitrilasy pro alifatické nitrily a potom pro aromatické uhlovodíky s elektronegativním substituentem v poloze *ortho*, kdy naopak dochází k deaktivaci kyanoskupiny. To je vše ve shodě s výsledky získanými pro Harperem purifikovanou nitrilasu [15].

Stereo-, chemo-, a regio-selektivita nebyla u obou nitrilas zatím dostatečně přesně stanovena.

5.5 Imobilizace

Enzym byl v této práci nejčastěji imobilizován na hydrofobních nosičích, kde se podařilo dosáhnout vysokého výtěžku imobilizace a dobré stability. Nitrilasy z *A. niger* i *F. solani* vykazovaly při teplotě 35 °C úplnou stabilitu minimálně po 24 hodin, kdy po celou dobu bylo možno dosáhnout 100% konverze 10 mM roztoku 4-kyanopyridinu. Aktivita při 35 °C je asi o třetinu nižší než při 45 °C (teplotní optimum enzymů), ale při této teplotě enzymy vykazují několikanásobně nižší stabilitu.

Obě nitrilasy produkovaly ze zkoušených substrátů jako vedlejší produkt amid. Jeho množství se díky současnému působení imobilizované amidasy z *R. equi* podařilo snížit. Amidasa se na rozdíl od nitrilhydratasy ukázala jako velice stabilní při teplotě 35 °C a pH 8. Bylo také zjištěno, že amonné soli jsou inhibitory amidasy, takže nemohl být aplikován běžně používaný síran amonný, který byl nahrazen síranem sodným, se kterým bylo dosaženo lepší aktivity amidasy a negativní vliv na nitrilasu nebyl pozorován.

Díky koimobilizaci nitrilasy společně s amidasou a nitrilhydratasou bylo dosaženo nejen 100% konverze, ale i získán čistý produkt, kyselina isonikotinová. Je tedy zřejmé, že za pomoci nitrilasy a amidasy lze získat téměř čisté karboxylové kyseliny z příslušných nitrilů.

I jiné metody imobilizace se ukázaly jako perspektivní. Mycelium imobilizované v LentiKats[®] bylo opakovaně používáno pro biokonverze benzonitrilu. Docházelo sice ke ztrátám aktivity, ale ty byly menší než kdyby byl použit neimobilizovaný enzym, nehledě na výhody snadného přenesení LentiKats[®] do nové reakční směsi, a tedy i jejich opětovné použití.

V případě LentiKats[®] sloužil kopolymer také jako protektant nitrilasy. Je to patrné například z posunu teplotního a pH optima, kdy byly LentiKats[®] stabilnější i při vyšších teplotách a při skladování (-20 °C) si i po několika měsících uchovávají původní aktivitu.

Imobilizace na kovalentní nosič se ukázala jako použitelná, ovšem vzhledem k delší době imobilizace (2 dny) vhodná spíše pro stabilnější nitrilasu *F. solani*.

Práce tak přispěla k rozšíření poznatků o možnostech imobilizace nitrilas, která je považována za obtížnou vzhledem k labilitě většiny těchto enzymů. Enzymy konvergující nitrily byly zatím imobilizovány hlavně metodou zachycení celých buněk v různých

hydrogelech a také adsorpcí buněk na Dowex 1 nebo chemickou vazbou na polysulfonové membrány [44]. Méně byla používána imobilizace buněčných extraktů nebo částečně purifikovaných enzymů. Nedávno byla představena nová metoda imobilizace nitrilas spočívající v precipitaci hydrofobním činidlem (dimethoxyethanem) a vzájemné vazbě molekul enzymu („cross-linking“) dextranpolyaldehydem jako velmi šetrným bifunkčním činidlem [45].

V této diplomové práci se zejména osvědčila hydrofobní vazba enzymu na pevné nosiče (např. Butyl Sepharosu) jako alternativní metoda pro velmi šetrnou imobilizaci nitrilas. Tento způsob imobilizace může být dále vylepšen. Bude například vyzkoušeno, zda lze snížit koncentraci síranu amonného nebo síranu sodného, aniž by byla negativně ovlivněna vazba enzymu na nosič. Při této metodě by mělo dojít k odstranění dalších kontaminujících proteinů, neboť je známo, že nitrilasy se vážou na hydrofobní nosiče větší silou než většina ostatních proteinů. Dále bude testována možnost imobilizovat částečně purifikované enzymy. Oba způsoby by měly vést ke zvýšení specifické aktivity imobilizovaného enzymového preparátu.

6 SOUHRN

Z rodů *Aspergillus niger* a *Fusarium solani* se podařilo získat díky použití nových induktorů ve vysokém výtěžku nitrilasy s dobrou specifickou aktivitou, které se ovšem značně liší svou stabilitou. Obě vykazují podobné substrátové specifity, kdy nejlepším substrátem je 4–kyanopyridin a naopak nejhoršími substráty jsou alifatické nitrily, takže se jedná o aromatické nitrilasy.

Pozorovali jsme podobné vlastnosti obou enzymů při purifikaci – jedná se o enzymy s vysokou molekulovou hmotností, které obsahují velké množství podjednotek. Molekulová hmotnost jedné podjednotky je pravděpodobně 35 kDa (*A. niger*), resp. 39 kDa (*F. solani*), a hmotnost nativního enzymu je v obou případech větší než 650 kDa.

Imobilizace enzymů byly velmi úspěšné, a to při použití různých nosičů. Tyto imobilizované enzymy byly dlouhodobě stabilní a použitelné nejen pro konverze nepříliš koncentrovaných substrátů (do 40 mM), ale byly používány i pro konverze vyšších koncentrací (až 100 mM), kdy docházelo k jejich úplné konverzi a mohly tak být získány cenné produkty ve vysoké čistotě (kyselina nikotinová a isonikotinová).

Imobilizace rozšířily možnosti použití nitrilas. Enzymy jsou při imobilizaci částečně chráněny před vlivy prostředí (pH, teplota), zvláště při imobilizaci v LentiKats®. Hlavně však lze imobilizovaný enzym použít opakovaně, čímž se více zhodnotí připravené množství enzymu.

Závěrem lze konstatovat, že tato diplomové práce přinesla nové poznatky o způsobech přípravy, vlastnostech a prakticky významných aplikacích nitrilas, které jsou v biokatalýze vysoce ceněnými enzymy.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Moravcová J.: Biologicky aktivní přírodní látky, skriptum, VŠCHT Praha, str. 50-51, (2003)
- [2] Legras J.L., Chuzel J., Arnaud A., Galzy P.: *World J. Microbiol. Biotechnol.* **6**, 83-108, (1990)
- [3] Conn E. E., Neuberger A., Jukes T. H.: *Int. Rev. Biochem. Nur. I. A* **27**, Baltimore, 21-43 (1979)
- [4] Nartey F., Venesland B., Conn E. E., Knowles C. J., Westley J., Wissing F.: v knize *Cyanide in Biology*, *Academic Press*, London, 115 (1981)
- [5] Avato P., Pesante M.A., Fanizzi F.P., Santos C.A.D.: *Lipids* **38**, 773-780 (2003).
- [6] Kaplan O., Martínková L., Způsob indukce nitrilasy u vláknitých hub. **PV 2005-345**
- [7] Kobayashi M., Goda M., Shimizu S.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **253**, 662-666 (1998)
- [8] O'Reilly C., Turner P.D.: *J. Appl. Microbiol.* **95**, 1161-1174 (2003)
- [9] Cowan D., Cramp R., Pereira R., Graham D., Almatawah O.: *Extremophiles* **2** (3), 207-216 (1998)
- [10] Bestwick L.A., Gronning L.M., James D.C., Bones A., Rossiter J.T.: *Physiol. Plant.* **89**, 611-816 (1993)
- [11] Bartling D., Seedorf M., Mithöfer A., Weiler E.W: *Eur. J. Biochem* **205**, 417-424 (1992)
- [12] Osswald S., Wajant H., Effenberger F.: *Eur. J. Biochem* **269**, 680-687 (2002)
- [13] Kobayashi M., Nagasawa T., Yamada H.: *Eur. J. Biochem.* **182** (2), 349-356 (1989)
- [14] Kato Y., Ooi R., Asano Y.: *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2290-2296 (2000)
- [15] Harper D.B.: *Biochem. J.* **167**, 685-692 (1977)
- [16] Goldlust A., Bohak Z.: *Biotechnol. Appl. Biochem.* **11**, 581-601 (1989)
- [17] Martínková L., Mylerová V.: *Curr. Org. Chem.* **7**, 1279-1295 (2003)
- [18] Přepechalová I., Martínková L., Stolz A., Ovesná M., Bezouška K., Kopecký J., Křen V.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**, 150-156 (2001)
- [19] Martínková L., Křen V.: *Biocatal. Biotransform.* **20** (2), 73-93 (2002)
- [20] Katalog firmy Jülich Chiral Solutions, www.julich.com
- [21] Katalog firmy BioCatalytics, www.biocatalytics.com/Enzymes.pdf

- [22] Martínková L., Přepechalová I., Olšovský P., Křen V.: *Biotechnol. Lett.* **17**, 1219-1222 (1995)
- [23] Yamamoto K., Oishi K., Fujimatsu I., Komatsu K., Tani Y.: *J. Ferment. Bioeng* **73**, 125-129 (1991)
- [24] Effenberger F., Osswald S.: *Tetrahedron: Asymmetry*. **12** (18), 2581-2587 (2001)
- [25] Nagasawa T., Yamada H.: *Pure Appl. Chem.* **62**, 1441-1444 (1990)
- [26] Kobayashi S., Nagasawa T., Yamada H.: *Trends. Biotechnol.* **10**, 402-408 (1992)
- [27] Shimizu S., Kobayashi M.: *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4**, 95-102 (2000)
- [28] Kobayashi S., Nagasawa T., Yamada H., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**, 231-233 (1988)
- [29] Shimizu S., Ogawa J., Kataoka M., Kobayashi M.: *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* **58**, 45-87 (1997)
- [30] Martínková L., Olšovský P., Přepechalová I., Křen V.: *Biotechnol. Lett.* **17** (11), 1219-1222 (1995)
- [31] Kaplan O.: *Biotransformace nitrilů vláknitými houbami: Diplomová práce VŠCHT Praha, Fakulta potravinářské a biochemické technologie* (2004)
- [32] *Catalogue of Cultures, Bacteria, Fungi*, 6th edition, Masaryk University Brno (1999)
- [33] Vohlídal J., kol., *Chemické tabulky*, SNTL, Praha, 264-268 (1982)
- [34] McIlvaine T.C.: *J. Biol. Chem.* **49**, 183 (1921)
- [35] Bradford M.M.: *Anal. Biochem* **72**, 248-254 (1976)
- [36] Laemmli U.K.: *Nature* **227** (259), 680-685 (1970)
- [37] Jekel M., Buhr A., Wilke T., Vorlop K.-D.: *Chem. Eng. Technol.* **21**, 275-278 (1998)
- [38] Vejvoda V., Kaplan O., Bezouška K., Martínková L.: *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **39**, 55-58 (2006)
- [39] Šnajdrová R., Kristová-Mylerová V., Crestia D., Nikolaou K., Kuzma M., Lemaire M., Gallienne E., Bolte J., Bezouška K., Křen V., Martínková L.: *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.* **29**, 227-232 (2004)
- [40] Kaplan O., Vejvoda V., Plíhal O., Pompach P., Kavan D., Fialová P., Bezouška K., Macková M., Cantarella M., Jirků V., Křen V., Martínková L.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v revizním řízení
- [41] Nikolaou K.: *Biotransformation of nitriles into amides and acids by enzymes from filamentous fungi*, Diplomová práce PřF UK Praha, Katedra genetiky a mikrobiologie (2004)

- [42] Vaughan P.A., Knowles C.J., Cheetham P.S.J.: *Enzyme Microb. Technol.* **11** (12), 815-823 (1989)
- [43] Kobayashi M., Yanaka N., Nagasawa T., Yamada H.: *FEMS Microbiol. Lett.* **77** (1), 121-123 (1991)
- [44] Colby J., Snell D., Black G.W.: *Monatsch. Chem.* **131** (6), 655-666 (2000)
- [45] Mateo C., Palomo J.M., van Langern L.M., van Rantwijk F., Sheldon R.A.: *Biotechnol Bioeng.* **86**, 273-276 (2004)

8 SEZNAM PUBLIKACÍ A POSTERŮ

Články

- 1) Vejvoda V., Kaplan O., Bezouška K., Martínková L.: Mild hydrolysis of nitriles by the immobilized nitrilase from *Aspergillus niger* K10, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 39, 55-58 (2006)
- 2) Kaplan O., Vejvoda V., Pišvejcová A., Martínková L.: Hyperinduction of nitrilase in filamentous fungi, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* v tisku
- 3) Kaplan O., Vejvoda V., Plíhal O., Pompach P., Kavan D., Fialová P., Bezouška K., Macková M., Cantarella M., Jirků V., Křen V., Martínková L.: Purification and characterization of nitrilase from *Aspergillus niger* K10, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v revizním řízení, doporučeno k publikaci
- 4) Vejvoda V., Kaplan O., Klozová J., Čejková A., Jirků V., Stloukal R., Martínková L.: Mild hydrolysis of nitriles by *Fusarium solani* strain O1, *Folia Microbiol.*, v tisku

Postery

- 1) Kaplan O., Kubáč D., Vejvoda V., Cantarella M., Cantarella L., Křen V., Martínková L.: Synthetic applications of nitrile hydratases, amidases and nitrilases: process improvement by using each enzyme at its optimum conditions, *Multistep Enzyme Catalysed Processes*, Graz, 18. – 21. 4. 2006, abstrakt str. 59
- 2) Kaplan O., Vejvoda V., Plíhal O., Pompach P., Kavan D., Bezouška K., Cantarella M., Spera A., Martínková L.: Purification and characterization of a nitrilase from *Aspergillus niger* K10, *Biotrans 2005*, Delft, 3. – 8. 7. 2005, abstrakt str. 177
- 3) Kubáč D., Vejvoda V., Slámová K., Kaplan O., Přikrylová V., Testera A. M., Liz R., Gotor V., Lemaire M., Gallienne E., Bolte J., Martínková L.: Mild conversion of nitriles by free and immobilized nitrile-converting enzymes, *Biotrans 2005*, Delft, 3. – 8. 7. 2005, abstrakt str. 195

