

Ing. Irena Hacková roz. Přepchalová
Školitel:

Studijní program:
Studijní obor:
Datum obhajoby:

Mikrobiální biotransformace nitrilů
Ing. Jan Masák, CSc.
Ing. Ludmila Martínková, CSc.
Biochemie a biotechnologie
Biotechnologie
10.10.2001

SOUHRN

Byla provedena purifikace nitrilhydratasy z bakteriálního kmene *Rhodococcus equi* A4, které předcházela optimalizace kultivačních, desintegračních a chromatografických metod. Purifikační specifická aktivita enzymu zvýšila téměř 9x a výtěžek celkové aktivity byl 12%. Byla zjištěna optimální reakční teplota (32 - 35 °C) a pH (7,5) nitrilhydratasy. Nitrilhydratasa byla úplně inhibována Ag^+ ionty, H_2O_2 , dithiothreitem a fenylhydrazinem.

Nitrilhydratasa byla úspěšně testována jako biokatalyzátor při transformaci širokého spektra aromatických, heterocyklických a arylalifatických nitrilů na příslušné amidy. Souhrnem lze konstatovat, že nepatrně vhodnějšími substráty jsou alifatické nitrily oproti aromatickým, ale u všech typů substrátů závisela aktivita enzymu výrazně na typu a poloze substituentu (např. *meta*- lepší než *ortho*-deriváty benzonitrilu nebo tolunitrilu; methoxyl-lepší než chloro-substituent u derivátů 2-fenylpropionitrilu).

Byla zjištěna schopnost purifikované nitrilhydratasy hydratovat 2-arylpropionitrily s *S*-enantioselektivitou. Hodnota enantiomerního poměru v případě enzymu ($E \approx 19$) se však oproti očekávání nezvýšila v porovnání s dříve naměřenou hodnotou při konverzi pomocí celých buněk ($E \approx 81$).

Byl vyhodnocen vliv dvoufázového reakčního media (pufr/hydrofobní solvent nasycený pufrém nebo pufr/hydrofilní solvent) na funkčnost nitrilhydratasy. Konverze 2-fenylpropionitrilu probíhala v 5 - 98% (obj.) rozpouštědel nemísitelných s vodou a zvyšovala se s rostoucí hydrofobicitou solventu. V přítomnosti rozpouštědel mísitelných s vodou byla tato aktivita srovnatelná s vodou až do 20% obj. ethanolu nebo methanolu, ale ostatní rozpouštědla snižovala aktivitu už při 5% obj. Byl rovněž zaznamenán vliv přídatku 5% (obj.) různých uhlovodíků nebo methanolu na enantioselektivitu konverze 2-(6-methoxynaftyl)propionitrilu, enantiomerní poměr byl zvýšen z $E \approx 14$ na $E > 30$.

Enzymový preparát byl imobilizován několika způsoby (zachycením v hydrogelech, příp. s glutaraldehydem, solubilizací, imobilizací na nosiči) a lyofilizován v nebo bez přítomnosti lyoprotektantu. Nejúčinnější se jevila imobilizace na DEAE-celulose (až 100% aktivity volného enzymu) a lyofilizace s přídatkem sacharosy (až 100% aktivity volného enzymu).

Byla určena molekulární hmotnost nativního enzymu (≈ 74 kDa) a dvou typů jeho podjednotek mírně se ve velikosti lišících (α - a β -; obě přibližně 25 kDa). Rozpor mezi velikostí holoenzymu a předpokládanou kvartérní strukturou je vysvětlován rovnováhou mezi dimerem a tetramerem v roztoku enzymu.

Bylo stanoveno 26 aminokyselin z *N*-koncových aminokyselinových sekvencí α - i β -podjednotky a srovnána míra jejich homologie se sekvencemi známých nitrilhydratas. Nejvyšší homologie příslušných sekvencí podjednotek byla shledána mezi nitrilhydratase z *Rhodococcus equi* A4 a z *Rhodococcus* sp. N-774.

Ing. Irena Hacková roz. Přepchalová
Supervisor:

Study programme:
Study subprogramme:
Date of defence:

Microbial biotransformation of nitriles
Ing. Jan Masák, CSc.
Ing. Ludmila Martínková, CSc.
Biochemistry and Biotechnology
Biotechnology
10.10.2001

SUMMARY

The nitrile hydratase from *Rhodococcus equi* A4 was purified after the optimization of cultivation, desintegration and enzyme purification methods. The specific activity of the nitrile hydratase increased nearly ninefold by purification at 12% yield. The temperature optimum of the enzyme was 32 - 35 °C, the enzyme showed maximal activity at pH 7,5. The nitrile hydratase was completely inhibited by Ag⁺, H₂O₂, dithiothreitol and phenylhydrazine.

The nitrile hydratase hydrated a broad range of aromatic, heterocyclic and arylaliphatic nitriles into the corresponding amides. Generally, aliphatic nitriles were slightly better substrates than the aromatic ones, but - in each case - the activity of the enzyme depends on the type and the position of substituents (*e.g.*, *meta*-derivatives of benzonitriles or tolunitriles were better substrates compared to *ortho*-ones; methoxyl-substituted 2-phenylpropionitrile was better substrates compared to chloro-substituted ones).

The purified nitrile hydratase transformed preferentially the *S*-enantiomers of 2-arylpropionitriles. Despite the expectation, the value of *E* for the enzyme (*E* ≈ 19) did not increased compared to the value of *E* for the conversion by whole cells (*E* ≈ 81).

The nitrile hydratase is functional in biphasic reaction mixtures composed of buffer and the hydrophobic solvent saturated of buffer or the hydrophilic solvent. The enzyme activity for 2-phenylpropionitrile was found in the presence of 5 - 98% (v/v) of water-immiscible cosolvents and it increased with increasing solvent hydrophobicity. As concerns hydrophilic solvents, the nitrile hydratase activity was comparable to that in water up to 20% (v/v) of ethanol and methanol, but other solvents suppressed the activity even at a low concentration (5% v/v). The addition of 5% (v/v) of different hydrocarbons or methanol increased the enantioselectivity for the conversion of 2-(6-methoxynaphtyl)propionitrile from moderate to good (*E* ≈ 14 to *E* > 30).

The purified nitrile hydratase was immobilized by several methods (by entrapment into hydrogels with or without glutaraldehyde, by solubilization, by immobilization on carriers) and it was lyophilized with or without lyoprotectants. The immobilization on DEAE-cellulose appears to be the most effective method (activity up to 100% of that of the free enzyme) and a comparably powerful biocatalyst was also obtained by the lyophilization with sucrose.

The apparent molecular mass of the native nitrile hydratase was estimated to be approximately 74 kDa, the molecular weight of both subunits (α - and β -) was approximately 25 kDa. The discrepancy between the apparent molecular weight of the holoenzyme and its presumed quaternary structure was explained by the equilibrium between the dimer and the tetramer in the enzyme solution.

26 amino acids residues in the NH₂-terminal amino acids sequences of each α - and β -subunits were identified and the extent of their homology was compared among 4 nitrile hydratases. The highest similarity was found between the nitrile hydratase from *Rhodococcus equi* A4 and from *Rhodococcus* sp. N-774.
