

## Záverečná karta projektu

Názov projektu Evidenčné číslo projektu **APVV-0602-12****Štruktúra, vlastnosti a biotechnologický potenciál nových mikrobiálnych enzýmov degradujúcich rastlinnú hmotu**Zodpovedný riešiteľ **Mgr. Vladimír Puchart, Ph. D.**Príjemca **Chemický ústav SAV**

### Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

1. Chemický ústav SAV
2. Ústav molekulárnej biológie SAV
- 3.
- 4.
- 5.

### Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

- 1.
- 2.
- 3.

### Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu

- 1.
- 2.
- 3.

### Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uveďte aj publikácie prijaté do tlače

1. Biely P., Puchart V., Stringer M. A., Mørkeberg Krogh K. B. R.: Trichoderma reesei XYN VI – a novel appendage-dependent eukaryotic glucuronoxylan hydrolase. FEBS Journal, 2014, Volume 281, Issue 17, pp. 3894-3903; DOI: 10.1111/febs.12925
2. Biely P., Czišárová M., Agger J. W., Li X.-L., Puchart V., Vršanská M., Eijsing V. G. H., Westereng B.: Trichoderma reesei CE16 acetyl esterase and its role in enzymatic degradation of acetylated hemicellulose. Biochimica et Biophysica Acta, 2014, Volume 1840, Issue 1, pp. 516-525; DOI: 10.1016/j.bbagen.2013.10.008
3. BIELY P., Malovíková A., Hirsch J., Mørkeberg Krogh K. B. R., Ebringerová A.: The role of the glucuronoxylan carboxyl groups in the action of endoxylanases of three glycoside

hydrolase families: A study with two substrate mutants. In: *Biochimica et Biophysica Acta*, 2015, Volume 1850, Issue 11, pp. 2246-2255; DOI: 10.1016/j.bbagen.2015.07.003

4. Puchart V., Agger J. W., Berrin J.-G., Várnai A., Westereng B., Biely P.: Comparison of fungal carbohydrate esterases of family CE16 on artificial and natural substrates. In: *Journal of Biotechnology*, 2016, Volume 233, pp. 228-236; DOI: 10.1016/j.jbiotec.2016.07.003

5. Fraňová L., Puchart V., Biely P.:  $\beta$ -Glucuronidase-coupled assays of glucuronoyl esterases. In: *Analytical Biochemistry*, 2016, Volume 510, pp. 114-119; DOI: 10.1016/j.ab.2016.07.023

## **Uplatnenie výsledkov projektu**

Jednoduchá príprava chromogénnych substrátov glukuronoyl-esteráz a ich následné využitie pri hľadaní a detekcii týchto enzýmov nepochybne povedie k ich rozšíreniu. Svedčí o tom aj medzinárodný ohlas - publikovaný i nepublikovaný. Zistenie, že tieto enzýmy pôsobia aj na estery polymérneho xylánu, len potvrdzuje ich predpokladanú fyziologickú funkciu – štiepenie esterových väzieb medzi kyselinou glukurónovou v hemicelulóze glukurónoxyláne a alkoholom lignínu. Glukuronoyl-esterázy môžu byť teda významným enzýmom v biotechnologickom spracovaní a využití lignocelulózových materiálov. Podobne aj acetyl-xylán-esterázy, keďže hemicelulózy drevín sú acetylované. Na ich úplnú deacetyláciu sú však potrebné dva druhy xylán-deacetyláz – skutočné acetyl-xylán-esterázy a deacetylázy pôsobiace na neredukujúcom konci, ktoré majú navzájom doplnkovú pozičnú špecificitu. Až po deacetylácii sa acetylglukurónoxylány stávajú prístupné pre xylanázy, hlavné xylánolytické enzýmy. Pre tvorbu cielených produktov z glukurónoxylánu s vysokou hodnotou, napríklad aldourónových kyselín s prebiotickými vlastnosťami, je dôležité zistenie, že rôzne xylanázy sa medzi sebou líšia z hľadiska tolerancie modifikácie postranného reťazca kyseliny glukurónovej. Celkovo výsledky projektu prinášajú cenné poznatky využiteľné pri ekologickom zužitkovaní lignocelulózových materiálov nielen na skvasovanie a produkciu bioetanolu, ale aj iných cenných zlúčenín, napríklad oligosacharidov s mnohorakými biologickými vlastnosťami.

## **CHARAKTERISTIKA VÝSLEDKOV**

### **Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v slovenskom jazyku** (max. 20 riadkov)

Vypracovali sme jednoduchý postup na prípravu nových chromogénnych substrátov pre glukuronoyl-esterázy, ktoré sme využili na zavedenie novej metodiky na kvantifikáciu a detekciu aktivity týchto enzýmov. Zistili sme, že sú aktívne aj na estery polymérneho glukurónoxylánu, čo je ďalší krok k potvrdeniu ich predpokladanej fyziologickej funkcie – štiepeniu esterových väzieb medzi touto hemicelulózou a lignínom. Na natívne, komplikované a vysokomolekulové lignocelulózové štruktúry sú najúčinnnejšie endoxylanázy z rodiny GH30 spomedzi doteraz známych xylanáz. Je škoda, že sa nám zatiaľ nepodarilo pripraviť chromogénny substrát špecifický pre tieto enzýmy v takom množstve a výťažku, ktorý by bol synteticky zaujímavým. Aj napriek tomu sme detailne charakterizovali novú xylanázu z rodiny GH30. XYN VI sa svojimi katalytickými vlastnosťami podobá prokaryotickým enzýmom, ktorých pôsobenie je určené prítomnosťou a polohou postranných reťazcov kyseliny glukurónovej. Pochádza však z huby *Trichoderma reesei* (synonymum *Hypocrea jecorina*), čím sme rozšírili enzýmový repertoár tohto najlepšie preštudovaného (hemi)celulolytického mikroorganizmu, veľmi často využívaného na priemyselnú veľkokapacitnú produkciu (hemi)celulolytických enzýmov. Jedným z nich je tiež acetyl-esteráza z rodiny CE16, pravdepodobne serínová esteráza s klasickou katalytickou triádou Asp-His-Ser, ktorá sa vo viacerých vlastnostiach odlišuje od acetyl-xylán-esteráz z iných rodín i od xylán-deacetyláz z rodiny CE16. Dokázali sme však, že exodeacetylázy z rodiny CE16 sú popri acetyl-xylán-esterázach potrebné na úplnú deacetyláciu xylánu vďaka navzájom doplnkovej pozičnej špecificite i pomerne ľahkej a rýchlej migrácii acetylovej skupiny pozdĺž xylopyranozylového kruhu.

### **Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v anglickom jazyku** (max. 20 riadkov)

We have elaborated a simple way to prepare new chromogenic substrates for glucuronoyl esterases and used them to introduce a new method for the enzyme activity detection and quantification. We found out that the glucuronoyl esterases are active also on the esters of polymeric glucuronoxylan, thus confirming their anticipated physiological function, i.e. cleavage of ester bonds between hemicellulose, glucuronoxylan, and lignin. Among known endoxylanases those grouped to GH30 family are the most efficient towards the native, high-molecular-weight lignocellulose complexes. Unfortunately, so far we have failed to obtain a chromogenic substrate specific for these enzymes in an amount and yield, that would be interesting from synthetic point of view. Nevertheless, we have characterized in detail a new GH30 xylanase. In terms of catalytic properties it resembles prokaryotic enzymes, action of which is determined by the presence and distribution of glucuronic acid side chains. However, XYN VI is secreted by *Trichoderma reesei* (synonym: *Hypocrea jecorina*), thus broadening enzyme battery of the best studied (hemi)cellulolytic microorganism that is often exploited for industrial large scale production of various (hemi)cellulolytic enzymes. One of them is also CE16 acetyl esterase, a predicted serine esterase composed of a canonical catalytic triad Asp-His-Ser, that differs in some catalytic properties from acetylxylan esterases classified in other CE families as well as from other CE16 xylan deacetylases. However, we have demonstrated that along with the acetylxylan esterases the CE16 exodeacetylases are required for a complete deacetylation of xylan, due to their complementary regiospecificity and relatively easy and fast acetyl group migration along the xylopyranoside ring.

Svojím podpisom potvrdzujem, že údaje uvedené v záverečnej karte sú pravdivé a úplné a súhlasím s ich zverejnením.

**Zodpovedný riešiteľ**

Mhr. Vladimír Puchart, Ph. D.

V Bratislave 26. X. 2017

**Štatutárny zástupca príjemcu**

Ing. Miroslav Kooš, DrSc.

V Bratislave 26. X. 2017

.....  
podpis zodpovedného riešiteľa

.....  
podpis štatutárneho zástupcu príjemcu