

Záverečná karta projektu

Názov projektu Evidenčné číslo projektu **APVV-14-0375**

Syntetická biológia a produkcia peroxidáz de novo

Zodpovedný riešiteľ **prof. RNDr. Ján Turňa, CSc.**

Príjemca **Univerzita Komenského v Bratislave - Prírodovedecká fakulta**

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Šafárikovo námestie 6, 81499 Bratislava
Ústav molekulárnej biológie SAV, Dúbravská cesta 21, 84551 Bratislava

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

Katedra molekulárnej evolúcie a vývoja, Univerzita Viedeň, Rakúsko

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

Patentová prihláška PP50015-2019: "Spôsob efektívnej produkcie a purifikácie termostabilnej katalázy/peroxidázy AfKatG." podaná dňa 15.3.2019 na ÚPV SR s označením M18108.

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

1. M. Zámocký, H. Tafer, K. Chovanová, K. Lopandic, A. Kamlárová, Ch. Obinger. Genome sequence of the filamentous soil fungus *Chaetomium cochliodes* reveals abundance of genes for heme enzymes from all peroxidase and catalase superfamilies. *BMC Genomics* 17:763, 2016
2. K. Chovanová, M. Zámocký. Detection of the antibacterial effect of *Chaetomium cochliodes* Palliser CCM F-232 based on agar plugs and unprocessed fungal substances from cultivation media. *Biologia* 71/11: 1204—1211, 2016
3. M. Zámocký, Š. Janeček, C. Obinger. Fungal Hybrid B heme peroxidases – unique fusions of a heme peroxidase domain with a carbohydrate-binding domain. *Scientific Reports* 7: 9393, DOI:10.1038/s41598-017-09581-8, 2017
4. Kamlarova, A., Chovanova, K., Zamocky, M. Peculiar genes for thermostable bifunctional catalase-peroxidases in *Chaetomium thermophilum* and their molecular evolution. *Gene* 666: 83-91, 2018
5. Struhárňanská, E., Chovanová, M., Rybecká, S., Mikulášová, M., Levarski, Z., Zámocký, Z., Turňa, J., Stuchlík, S.. Evaluation of thermostable catalase-peroxidase AfKatG supplementation on toxicity of residual hydrogen peroxide in cultivation media of lactic acid bacteria from starter cultures. *General Physiology and Biophysics* - akceptovaný manuskript v CC casopise - jun 2019
6. Struhárňanská, E., Levarski, Z., Stuchlík, S., Bírová, S., Zámocký, M., Turňa, J. New strategies in production of thermophilic catalase-peroxidase AfKatG in *Escheria coli*. In:

- FEBS Journal. - Roč. 284, Suppl. 1 (2017), s. 105. - ISSN 1742-464X, [FEBS Congress - From Molecules to Cells and Back. 42nd, Jerusalem, 10.-14.9.2017]
7. Zámocký, M., Kamlárová, A., Harichová, J., Semešová, K., Obinger, C. Sugar binding and peroxide bond cleavage – a concerted action of fungal Hybrid B heme peroxidases. In: FEBS Journal. - Roč. 284, Suppl. 1 (2017), s. 230. - ISSN 1742-464X, [FEBS Congress - From Molecules to Cells and Back. 42nd, Jerusalem, 10.-14.9.2017]
8. Struhárňanská, E., Levarski, Z., Stuchlík, S., Bírová, S., Harichová, J., Semešová, K., Zámocký, M., Turňa, J. The effect of different culture media on production of the thermophilic catalase in *Escherichia coli*. In: 9th Conference on Recombinant Protein Production (RPP9). - Dubrovnik : [s.n.], 2017. - S. 105-106
9. Struhárňanská, E., Levarski, Z., Bírová, S., Stuchlík, S., Turňa, J., Zámocký, M. Effect of recombinant catalase AfKatG as an additive in growth media of food strains. European Biotechnology Congress 2018 - Athens, 26.04.2018 - 28.04.2018. GR, ISSN (print) 0168-1656 ISSN (online) 1873-4863. Journal of Biotechnology. - Roč. 280 (2018), s. [S60-S60]
10. Struhárňanská, E., Levarski, Z., Bírová, S., Stuchlík, S., Turňa, J., Zámocký, M. Purification and characterisation of thermostable catalase AfKatG produced in *E. coli*. European Congress on Biotechnology [18] - Geneva, 01.07.2018 - 04.07.2018. CH, ISSN (print) 1871-6784 ISSN (online) 1876-4347, New Biotechnology. - Roč. 44 (2018), s. [S58-S58]
11. Struhárňanská E., Levarski Z., Stuchlík, S., Zámocký M., Turňa J. Produkcia a purifikácia termostabilnej katalázy-peroxidázy v *Escherichia coli*. XXV. biochemický sjezd. Sborník přednášek a posterů Praha: ČSBMB, 2016. S. 142, ISBN 978-80-270-0331-0, 13.-16.9.2016 Praha, ČR
12. Zámocký M., Kamlárová, A., Obinger Ch. Lessons from the ancient evolutionary history of the peroxidase-catalase superfamily.. XXV. biochemický sjezd. Sborník přednášek a posterů Praha: ČSBMB, 2016. S. 118, ISBN 978-80-270-0331-0, 13.-16.9.2016 Praha, ČR
13. Kamlárová, A., Zámocký, M. (2016) Expresia fungálnych hybridných peroxidáz indukovaná oxidačným stresom. XXV. Biochemický sjezd. Sborník přednášek a posterů Praha: ČSBMB, 2016. Praha 13.-16.9.2016 Praha, str.193, ISBN 978-80-270-0331-0, 13.-16.9.2016 Praha, ČR
14. Struhárňanská E., Levarski Z., Stuchlík S., Rybecká S., Chovanová M., Zámocký M., Turňa J. Production of mutated thermostable catalase-peroxidase in *E. coli*. In: 10th Conference on Recombinant Protein Production (RPP9), 24.4-27.4.2019 Kréta, GR, S.103, 2019

Uplatnenie výsledkov projektu

Budúci odberateľ výsledkov projektu a pripravenej technológie - rekombinantných kmeňov na produkciu kataláz-peroxidáz, firma Slovgen, s.r.o., bude oslovená podľa Zmluvy o budúcej zmluve zo dňa 07.11.2014.

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

V rámci riešenia projektu sme v jednotlivých etapách uskutočnili nasledovné experimenty: 1. Dizajn rekomb. kmeňov a pilotné purifikačné kroky a enzýmové charakteristiky, 2. Stanovenie úrovne heterológ. expresie AfKatG katalázy-peroxidázy v rôznych kultivačných médiách a podmienkach, 3. Efektívna purifikácia AfKatG, 4. Stanovenie pH a teplot. optima AfKatG katalázovej aktivity, 5. Stanovenie pH a teplot. optima AfKatG peroxidázovej aktivity, 6. Stanovenie špecif. aktivít AfKatG v závislosti od kult. média, 7. Stanovenie čistoty purif. AfKatG pomocou UV/VIS spektrofotometrie, 8. Analýza sek. štruktúry AfKatG pomocou CD spektrofotometrie, 9. Analýza terc. štruktúry AfKatG pomocou SEC-MALS, 10. Optimalizácia solubilnej expresie mut. AfKatG, 11. Expresia mut. AfKatG s využitím chaperónov, 12. Expresia a purifikácia termostabil. enzýmu CthedisKatG, 13. Štúdium účinku AfKatG ako suplementu v rastových médiách potr. kmeňov. Pripravili sme komplexný *E. coli* expresný systém, ktorý umožňuje efektívnu produkciu rek. proteínov ako aj efektívny spôsob ochrany výstupov projektu formou podania patent. prihlášky. Etablovali sme princípy a metodiky synt. biológie pre rozvoj priem. biotechnológií v slovenskom priemysle a jeho prepojenie na biotech. odvetvia v rámci EÚ. Získaným výsledkom riešenia projektu je pripravená technológia produkcie de novo syntetických rek. enzýmov: kataláz-peroxidáz, a poznatky a postupy, ktoré umožnia vývoj a realizáciu biotech. výroby rek. enzýmov potenciálnym

odberateľom - firmou Slovgen, s.r.o. Uvedené enzýmy majú potenciál pre rôzne aplikácie (napr. pri tzv. „clean room monitoring“, oxido-red. biotransformáciách, ako suplement do médií pri štarterových potr. kmeňoch, a pod.).

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

As part of the project, we conducted the following experiments in particular stages: 1. Design of rec. strains and pilot purification steps and enzyme characteristics, 2. Determination of heterologous expression of AfKatG catalase-peroxidase in various culture media and conditions; 3. Effective AfKatG purification; 4. pH and temperature optimum determination of AfKatG catalase activity, 5. Determination of pH and temperature optimum of AfKatG peroxidase activity, 6. Determination of AfKatG specific. activities depending on cult. media, 7. Determination of AfKatG purity by UV/VIS spectrophotometry, 8. Analysis of sec. structure of AfKatG by CD spectrophotometry, 9. Analysis of tert. structure of AfKatG by SEC-MALS, 10. Optimization of mut. AfKatG soluble expression, 11. Expression of mut. AfKatG using chaperones, 12. Expression and purification of the thermostab. enzyme CthedisKatG, 13. Study of the effect of AfKatG as a supplement in growth media of strains. We have prepared a complex E. coli expression system that allows efficient rec. protein production as well as an effective way of project outputs protection by filing of patent application. The main goal of the project was to establish the principles and methodology of synth. biology for the development of industrial biotech in the Slovak industry and its connection to biotech within the EU. Obtained result of the project solution is prepared technology of production of de novo synthetic rec. enzymes: catalase-peroxidases, and knowledge and procedures that will allow the development and realization of biotech production of rec. enzymes to potential customer - Slovgen, s.r.o. These enzymes have potential for various applications (e.g., clean room monitoring, oxido-reduction biotransformation, as media supplementation for food starter strains, etc.).