

VILNIAUS UNIVERSITETAS

RENATA GUDIUKAITĖ

GEOBACILLUS GENTIES BAKTERIJŲ SINTETINAMŲ
LIPAZIŲ IR ESTERAZIŲ INŽINERIJA IR
BIOKATALIZINIŲ SAVYBIŲ ĮVERTINIMAS

Daktaro disertacija,
Biomedicinos mokslai, Biologija (01 B)

Vilnius, 2016

Disertacija rengta 2012–2016 metais Vilniaus universiteto Gamtos mokslų fakulteto Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedroje.

Moksliniai vadovai:

Prof. dr. Donaldas Jonas Čitavičius (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01 B); Laikotarpis: 2012-10-01–2016-01-31;

Prof. dr. Nomeda Kuisienė (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01 B); Laikotarpis: 2016-02-01–2016-09-30.

Turinys

Santrumpos	7
Įvadas	9
1. Literatūros apžvalga.....	14
1.1 Tikrųjų lipazių ir karboksilesterazių palyginimas.....	14
1.2 Bakterijų lipoliziniu ir esteraziniu aktyvumu pasižyminčių fermentų klasifikacija	15
1.3 <i>Geobacillus</i> genties bakterijų sintetinės lipazės	16
1.3 Lipoliziniu aktyvumu pasižyminčių fermentų struktūra.....	18
1.3.1 Lipazių ir esterazių erdvinė struktūra.....	18
1.3.2 Substratą prisijungiančio kanalo ypatybės	20
1.3.3 Konservatyvūs <i>Geobacillus</i> lipazių struktūros elementai	21
1.4 Esterazių ir lipazių katalizuojamos reakcijos ir jų mechanizmas	25
1.5 Baltymų inžinerija – fermentų savybių gerinimo priemonė	27
1.5.1 Baltymų inžinerijos metodų skirstymas	27
1.5.2 Racionalus baltymų kūrimas ir alanino skenuojanti mutagenezė ...	29
1.5.3 Tiesioginė evoliucija	30
1.5.3.1 Klaidingoji PGR (angl. <i>Error-prone PCR</i> (epPCR)).....	31
1.5.3.2 DNR maišymas (angl. <i>DNA shuffling</i>).....	32
1.5.4 Sulietų chimerinių baltymų kūrimo principai ir svarba	37
1.5.5 Lipazių ir esterazių C-galinių domenų įtakos fermentų veiklai tyrimai	39
1.6 Praktinis lipazių ir esterazių pritaikymas.....	40
1.6.1 Lipazių pritaikymas optiškai grynų junginių gavybai.....	41
1.6.2 Detergentų gamyba.....	42
1.6.3 Lipazių taikymas maisto pramonėje.....	42
1.6.4 Biodyzelino sintezė	43
1.6.5 Lipazės kosmetikoje ir parfumerijoje.....	44
2. Medžiagos ir metodai.....	47
2.1 Naudoti bakterijų kamienai, vektoriai, terpės bei substratai.....	47

2.2 Darbe naudoti pradmenys	48
2.3 Polimerazės grandininės reakcijos taikymas lipazių ir (ar) esterazių genų paieškai bei sulietų biokatalizatorių kūrimui	50
2.4 Genų ir baltymų inžinerija	51
2.4.1 Genominės DNR skyrimas	51
2.4.2 DNR elektroforezė agarozės gelyje.....	51
2.4.3 Tiriamų genų klonavimas į pTZ57R/T klonavimo vektorių	52
2.4.4 Gautų genų perklonavimas į pET-21c(+) raiškos vektorių	52
2.4.5 Rekombinantinės DNR perkėlimas į <i>E. coli</i> DH5 α ir (ar) <i>E. coli</i> BL21 (DE3) elektrokompentines ląsteles.....	53
2.4.6 Teigiamų transformantų atranka	54
2.4.6.1 Baltų / mėlynų kolonijų atrankos sistema ir terpė su substratu tributirinu.....	54
2.4.6.2 Karpymas restrikcijos endonukleazėmis.....	54
2.4.6.3 Kolonijų PGR	55
2.4.7 GD-95-10 Ala mutantų kūrimas.....	55
2.4.8 Sulietų chimerinių biokatalizatorių kūrimas	56
2.4.9 DNR maišymas.....	57
2.4.9.1 PGR produktų karpymas DNaze I ir sąlygų optimizavimas	57
2.4.9.2 Savaiminis fragmentų susirinkimas taikant PGR.....	57
2.4.9.3 Hibridinio geno pagausinimas PGR metu naudojant pradmenis .	58
2.4.10 Klaidingoji PGR.....	58
2.5 Rekombinantinių baltymų sintezė, gryninimas ir analizė.....	58
2.5.1 Optimalių sąlygų tikslinių fermentų sintezei nustatymas	58
2.5.2 Tiriamų fermentų gryninimas naudojant imobilizuotų nikelio jonų giminingumo chromatografiją	59
2.5.2.1 Fermentų gryninimas nedematūruojančiomis sąlygomis	60
2.5.2.2 Fermentų gryninimas dematūruojančiomis sąlygomis.....	60
2.5.3 GDlip43 ir GDlip30 lipazių gryninimas iš NDS-PAGE.....	61
2.6 Lipolizinio aktyvumo įvertinimas.....	62
2.6.1 Kokybinis lipolizinio aktyvumo įvertinimas taikant zimografiją ...	62

2.6.2 Kiekybinis lipolizinio aktyvumo nustatymas spektrofotometriniu būdu	62
2.7 Tikslinių lipoliziniu aktyvumu pasižyminčių fermentų fizikinių ir cheminių savybių analizė	63
2.7.1 Temperatūros įtaka tikslinių fermentų aktyvumui ir stabilumui	63
2.7.2 pH įtaka tikslinių fermentų aktyvumui	64
2.7.3 Substratinio savitumo įvertinimas	64
2.7.4 Detergentų įtakos tikslinių fermentų aktyvumui nustatymas	64
2.7.5 Organinių tirpiklių įtakos tikslinių fermentų aktyvumui nustatymas	65
2.8 Tikslinių lipoliziniu aktyvumu pasižyminčių fermentų kinetinių savybių įvertinimas	65
2.8.1 K_m ir V_{max} konstantų nustatymas	65
2.8.2 K_{kat} ir katalizinio efektyvumo įvertinimas	66
2.8.3 Aktyvacijos energijos E_a nustatymas	66
2.9 Statistiniai metodai	67
2.10 Analizė <i>in silico</i>	68
3. Rezultatai ir jų aptarimas	69
3.1 Asp371, Phe375 ir Tyr376 įtakos GD-95-10 lipazės funkcionalumui nustatymas naudojant Ala skenuojančią mutagenezę	69
3.1.1 GD-95-10 ir GD-95-20 lipazių analizė	69
3.1.2 GD-95-10 lipazės taškinių mutantų kūrimas ir klonavimas	71
3.1.3 GD-95-10 lipazės taškinių mutantų sintezė ir gryninimas	73
3.1.4 Asp371, Phe375 ir Tyr376 įtaka GD-95-10 lipazės aktyvumui bei kinetinėms savybėms	75
3.1.5 Asp371, Phe375 ir Tyr376 įtaka GD-95-10 lipazės aktyvumui ir stabilumui aukštose temperatūrose	78
3.1.6 Asp371, Phe375 ir Tyr376 įtaka GD-95-10 lipazės struktūrai	81
3.2 GDEst-lip, GDEst-est ir GDLip-lip naujų biokatalizatorių kūrimas	85
3.2.1 GDEst-95 esterazės klonavimas ir gryninimas	86
3.2.2 GDEst-95 esterazės fizikinės bei cheminės savybės	89

3.2.3 GDEst-lip bei GDLip-lip ir GDEst-est sulietų fermentų kūrimas, klonavimas ir gryninimas	93
3.2.4 Sulietų GDEst-est ir GDLip-lip lipoliziniu aktyvumu pasižyminčių fermentų fizikinės bei cheminės savybės	96
3.2.5 GDEst-est, GDLip-lip bei GDEst-lip sulietų fermentų kinetinės savybės	101
3.2.6 GDEst-lip sulieto biokatalizatoriaus pagrindinės fizikinės bei cheminės savybės	105
3.3 Naujų lipazių kūrimas taikant DNR maišymo bei klaidingosios PGR metodus	107
3.3.1 GD-66, GD-76 ir GD-28 lipazių klonavimas ir gryninimas	108
3.3.2 GD-66, GD-76 ir GD-28 lipazių aktyvumas ir stabilumas aukštose temperatūrose bei optimalus veiklai pH.....	109
3.3.3 Naujų lipoliziniu aktyvumu pasižyminčių fermentų kūrimas taikant DNR maišymo metodiką.....	112
3.3.4 GDlip43 fermento geno modifikavimas naudojant klaidingą PGR, gauto produkto klonavimas, baltymo sintezė ir gryninimas	115
3.3.5 GDlip30 ir GDlip43 lipazių fizikinės, cheminės bei katalizinės savybės	118
3.3.5.1 Pagrindinių katalizinių konstantų įvertinimas.....	118
3.3.5.2 Temperatūros įtaka GDlip30 ir GDlip43 lipazių aktyvumui ir stabilumui bei pH įtaka fermentų veiklai	120
3.3.5.3 Substratinis savitumas ir organinių tirpiklių įtaka GDlip30 ir GDlip43 lipazių funkcionalumui.....	123
Apibendrinimas.....	127
Išvados	133
Mokslinių darbų sąrašas.....	134
Finansinė parama	135
Gyvenimo aprašymas.....	136
Padėka	138
Naudota literatūra	139

Santrumpos

a.r. – aminorūgštys

ASR – atviras skaitymo rėmelis

Å – angstromas, nesisteminis ilgio matavimo vienetas, lygus 10^{-10} m (0,1 nm)

CAD-score – kontaktų plotų skirtumo rezultatas (angl. *Contact area difference score*)

Da – nesisteminis baltymų molekulinės masės vienetas, lygus $1.66 \cdot 10^{-27}$ kg

DAGs – diacilgliceroliai

DMF – dimetilformamidas

DMSO – dimetilsulfoksidas

DNazė I – deoksiribonukleazė I (angl. *Deoxyribonuclease I*)

dNTP – deoksinukleotidtrifosfatai

dUTP – deoksiuridintrifosfatai

EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis

EMS – fermentais modifikuotas sūris (angl. *Enzyme modified cheeses*)

epPGR – klaidingoji PGR (angl. *Error-prone PCR*)

IPTG – izopropil β-D-1-tiogalaktopiranozidas

IMAC – imobilizuotų metalų giminingumo chromatografija (angl. *Immobilized metal affinity chromatography*)

IPG – 1,2-O-izopropilideno glicerolis

ITCHY – hibridinių fermentų kūrimas, paremtas pavieniais trumpinimais (angl. *Incremental truncation for the creation of hybrid enzymes*)

LB – Luria-Bertani mitybinė terpė

MAGs – monoacilgliceroliai

NCBI – Nacionalinis biotechnologinės informacijos centras (angl. *National Center for Biotechnology Information*)

NDS – natrio dodecilsulfatas

NDS-PAGE – elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje denatūruojančiomis (NDS) sąlygomis

OT – optinis tankis

PAF – trombocitų agregacijos faktorius (angl. *Platelet - aggregation factor*)

PEG – polietileno glikolis

PGR – polimerazės grandininė reakcija

p-NP – para-nitrofenolis

Pre-GD-95 – GD-95 lipazės pradininkė, turinti 28 a.r. signalinį peptidą

RID – atsitiktinių intarpų / iškritų mutagenezė (angl. *Random insertion / deletion mutagenesis*)

SCRATHY – hibridinių fermentų kūrimui skirtas metodas, sudarytas iš DNR maišymo ir ITCHY metodikų

SeSaM – sekai įsotinta mutagenezė (angl. *Sequence saturation mutagenesis*)

StEP – išskirstyto pratęsimo procesas (angl. *Staggered extension process*)

TAE buferinis tirpalas – buferinis tirpalas, sudarytas iš Tris, acto rūgšties ir EDTA

TRIS – 2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiolis

TB – tributirinas

X-gal – 5-bromo-4-chloro-3-indolil-β-D-galaktopiranozidas

UV – ultravioletiniai spinduliai

Įvadas

Fermentai – baltyminiai katalizatoriai, kuriais susidomėjimas vis neblėsta. Šiomis dienomis jų žinoma virš 4000. 200 iš jų yra mikrobiologinės kilmės ir naudojami komerciškai, tačiau tik apie 20 iš pastarųjų yra gaminami dideliais mastais. 75 % visų pramonėje naudojamų fermentų priklauso hidrolazių klasei. Prekyboje ir pritaikyme dominuoja karbohidrazės, proteazės ir lipazės (Li ir kt., 2012b).

Lipazės (triacilglicerolių acilhidrolazės, EC.3.1.1.3) – hidrolazių klasės fermentai, kurie gali katalizuoti tiek esterinių ryšių skilimą (hidrolizę), tiek susidarymą (esterinimo reakciją), vykdo acidolizę, peresterinimo reakciją, alkoholizę ir aminolizę. Dauguma lipazių pasižymi plačiu substratų tolerantiškumu, regio- ir stereoatrankumu, jų veiklai nereikalingi kofaktoriai, jos išlieka stabilios ir išsaugo savo aktyvumą organiniuose tirpikliuose (Jaeger ir Reetz, 1998; Schmid ir Verger, 1998; Bornscheuer, 2000; Bornscheuer, 2002). Esterazės (EC 3.1.1.1.), skirtingai nei lipazės, katalizuoja reakcijas, kuriose dalyvauja mažiau anglies atomų savo sudėtyje turintys esteriai ($C < 10$), tačiau šie substratai gali ir persidengti (Arpigny ir Jaeger, 1999). Tai lemia, kad lipazės ir esterazės vis plačiau naudojamos pramoninėje biotechnologijoje. Jos svarbios organinės chemijos ir maisto pramonėje, farmacijoje, naujų paviršiaus aktyviųjų medžiagų ir vaistų sintezėje, aliejų ir riebalų biovirsmuose, detergentų gamyboje. Lipazių pagalba gaunami esteriai naudojami kosmetikoje ir parfumerijoje. Taip pat šie fermentai vaidina svarbų vaidmenį pramonės teršalų degradacijoje, naudojami gaminant pesticidus, insekticidus ar kaip biojutikliai (Jaeger ir kt., 1999; Gupta ir kt., 2004; Sangeetha ir kt., 2011). Lipazių ir esterazių panaudojimas pramonėje padeda išspręsti dalį aplinkosaugos problemų. Šių fermentų katalizuojamos reakcijos artimos konstruktyviesiems pakitimams, kuriuos vykdo gyvos būtybės, todėl į procesus, kurie yra susiję su lipazių ir esterazių veikla, galima žiūrėti kaip į mažiau kenkiančius aplinkai lyginant su reakcijomis, kurias vykdo cheminiai katalizatoriai. Didžiausią pritaikymo potencialą turi lipazės, išskirtos iš įvairių

grybų ir bakterijų (Lotti ir Alberghina, 2007). Kelios iš jų gaminamos pramoniniu mastu: *Rhizomucor miehei* lipazė (Lipozyme RM IM), *Thermomyces lanuginosa* lipazė (Lipozyme TL IM), *Candida antarctica* B tipo lipazė (Novozyme 435, CAL-B) ar *Pseudomonas cepacia* lipazė (Amano PS) (Bornsheuer, 2008). 2010 m. duomenimis pramonėje naudojamų fermentų rinka siekė apie 3 mlrd. dolerių. Remiantis mokslininkų prognozėmis, 2015 m. šis skaičius turėjo pasiekti 8 mlrd. dolerių. Lipazių taikymas bei paklausa yra vienas greičiausiai augančių sektorių (Gupta ir kt., 2015).

Kitas svarbus aspektas – fermentai, gebantys veikti aukštose temperatūrose ir išliekantys jose stabilūs. Kadangi dauguma pramonės procesų vyksta aukštesnėje nei 45 °C temperatūroje, vis svarbesni tampa biokatalizatoriai (lipazės, esterazės ir kt. fermentai), kurie tenkintų šią sąlygą ir išliktų funkcionalūs (Haki ir Rakshit, 2003). Nepamainomas tokių fermentų šaltinis yra termofiliniai mikroorganizmai. Pagrindiniai tokių fermentų privalumai – gebėjimas katalizuoti biochemines reakcijas aukštesnėje temperatūroje, atsparumas šilumos poveikiui, denatūracijai ir proteolizei (Haki ir Rakshit, 2003; Van den Burg, 2003).

Visgi komercinį lipazių taikymą riboja jų gamybos kaštai. Tad svarbu surasti lengvai išgaunamas, dideliu aktyvumu ir stabilumu pasižyminčias lipazes ir (ar) esterazes, kurias būtų galima taikyti keliose skirtingose pramonės srityse ar sukurti kiekvienam procesui savitus fermentus, taip gaunant idealiomis savybėmis pasižyminčius baltymus. Tokiu atveju nepamainoma priemonė yra baltymų inžinerija (Anobom ir kt., 2014). Per pastarąjį dešimtmetį ištobulėjus baltymų inžinerijos metodams (įvairūs mutagenzės metodai, DNR maišymas ar nehomologinių sekų rekombinacijai skirti metodai), atsirado galimybė keisti tokių tikslinių fermentų savybes ir sukurti geresnėmis, naudingesnėmis savybėmis pasižyminčius biokatalizatorius, kurie sumažintų įvairių pramoninių procesų finansines sąnaudas. Vienas iš potencialių tokių tyrimų objektų – termofilinių *Geobacillus* genties bakterijų išskiriamos lipazės ir esterazės.

Darbo tikslas

Taikant baltymų inžinerijos metodus nustatyti naujas, svarbias *Geobacillus* lipazių aktyvumui sritis, sukurti naujus, didesniu temperatūriniu aktyvumu ir stabilumu pasižyminčius lipolizinius ir (ar) esterazinius fermentus bei įvertinti jų fizikines, chemines ir katalizines savybes.

Uždaviniai

1. Įvertinti C-galinių aminorūgščių Asp371, Phe375 ir Tyr376 įtaką GD-95-10 lipazės funkcionalumui.
2. Atlikti *Geobacillus* genties bakterijų išskiriamų esterazių genų paiešką, jų klonavimą, rekombinantinių baltymų sintezę, gryninimą ir katalizinių, fizikinių bei cheminių savybių analizę.
3. Įvertinti papildomo domeno įtaką *Geobacillus* sp. 95 kamieno sintetamos esterazės ir (ar) lipazės aktyvumui bei savybėms, sukuriant šių fermentų sulietus variantus, sudarytus iš dviejų vienodų domenų.
4. Sukurti chimerinį, iš *Geobacillus* sp. 95 kamieno sintetamų esterazės ir lipazės domenų sudarytą, naują sulietą fermentą ir įvertinti jo biokatalizinį potencialą, atliekant aktyvumo, katalizinių, fizikinių ir cheminių savybių analizę.
5. Pritaikius DNR maišymo ir klaidingosios PGR metodus sukurti naujus lipoliziniu aktyvumu pasižyminčius fermentus ir įvertinti jų aktyvumą, katalizines, fizikines bei chemines savybes.

Mokslinis naujumas ir praktinė darbo reikšmė

Geobacillus genties bakterijų išskiriamų lipazių tyrimai – perspektyvi, tiek fundamentinę, tiek praktinę reikšmę turinti sritis. Šiame darbe atliktas C-galinių aminorūgščių įtakos lipoliziniu aktyvumu pasižyminčių fermentų veiklai įvertinimas – viena pirmųjų analizių, rodančių, kad baltymo C-

galiniame regione išsidėsčiusios aminorūgštys yra reikšmingos palaikant fermentų (šiuo atveju *Geobacillus* lipazių) aktyvumą, temperatūrinį stabilumą bei tinkamą erdvinę baltymo struktūrą ir taip užtikrinant sąveikas tarp aminorūgščių, dalyvaujančių katalizėje ar lemiančių tinkamą substrato prijungimą. Tyrimų metu pirmą kartą nustatyta, kad Asp371, Phe375 ir Tyr376 yra svarbios palaikant efektyvią *Geobacillus* lipazių veiklą.

Šiame darbe taip pat aptikta, klonuota, išgryninta ir išanalizuota *Geobacillus* sp. 95 kamieno esterazė GDEst-95 yra viena pirmųjų taip plačiai išnagrinėtų 55 kDa dydžio *Geobacillus* esterazė, kuri dėl savo savybių turi puikų pramoninio taikymo potencialą. Egzistuoja vos kelios publikacijos, susijusios su tokių fermentų savybėmis ir struktūra. Daroma prielaida, kad ši karboksilesterazė gali priklausyti VII lipoliziniu aktyvumu pasižyminčių fermentų šeimai.

Tolesniuose darbų etapuose GDEst-95 esterazė panaudota kuriant sulietą lipoliziniu aktyvumu pasižymintį GDEst-lip fermentą, sudarytą iš *Geobacillus* sp. 95 kamieno sintetinamų GD-95 lipazės ir GDEst-95 esterazės domenų. Šis sulietas fermentas savo savybėmis pranašesnis už pradinius fermentus ir gali būti puiki alternatyva egzistuojantiems pramoniniams lipazių preparatams. Sulieti baltymai – nauja ir tik besivystanti baltymų inžinerijos dalis, todėl ir tokių baltymų pavyzdžių nėra daug. Šiame darbe pateikti rezultatai rodo ne tik galimybę taikant baltymų inžineriją sukurti pranašesnius, geresnėmis savybėmis pasižyminčius biokatalizatorius, bet ir suteikia naujos informacijos apie papildomo domeno įtaką GDEst-95 esterazės ir GD-95 lipazės veiklai.

Rengiant disertaciją papildomai buvo nustatytos ir iširtos trys *Geobacillus* genties bakterijų sintetintos lipazės, taip praplečiant turimą informaciją apie šių fermentų savybes. Po atliktų DNR maišymo ir klaidingosios PGR eksperimentų buvo gauti du nauji, lipoliziniu aktyvumu pasižymintys fermentai. Vienas jų, GDlip43, pasižymi gebėjimu geriau veikti

ir didesniu stabilumu aukštesnėse temperatūrose nei pradiniai atitinkami tėviniai baltymai ir yra naujas, baltymų inžinerijos būdu gautas lipoliziniu aktyvumu pasižyminčių fermentų variantas. Tuo tarpu kitas – GDlip30 – leidžia kelti minimalios veiklai reikalingos struktūros klausimą ir yra puikus ateities tyrimų objektas.

Ginamieji teiginiai

1. C-galiniame regione išsidėsčiusios aminorūgštys yra reikšmingos *Geobacillus* genties bakterijų išskiriamų lipazių aktyvumui bei funkcionalumui.
2. Papildomo to paties domeno prijungimas keičia *Geobacillus* sp. 95 kamieno sintetinamų GD-95 lipazės ir GDEst-95 esterazės temperatūrinį aktyvumą bei stabilumą.
3. *Geobacillus* sintetinamų lipazių ir karboksilesterazių suliejimas – strategija, leidžianti sukurti naujus aukštose temperatūrose aktyvius ir stabilius lipolizinius biokatalizatorius.
4. Net ir nedidelė *Geobacillus* genties bakterijų lipazių aminorūgščių sekų įvairovė gali lemti skirtingas šių fermentų fizikines bei chemines savybes.

1. Literatūros apžvalga

1.1 Tikrųjų lipazių ir karboksilesterazių palyginimas

Lipoliziniu ir esteraziniu aktyvumu pasižymintys fermentai plačiai paplitę gamtoje (Bornscheuer, 2002). Prokariotai išskiria skirtingų klasių lipoliziniu aktyvumu pasižyminčius fermentus, įskaitant ir karboksilesterazes, kurios hidrolizuoja esterius, turinčius savo sudėtyje mažiau nei dvylika anglies atomų (Eggert ir kt., 2000). Pagal K. E. Jaeger (1999) esterazės hidrolizuoja junginius, kur $C < 10$ ir šie substratai pasižymi didesniu tirpumu lyginant su tikrųjų lipazių substratais. Pastarosios efektyviausios hidrolizuodamos vandenyje netirpius, ilgos grandinės trigliceridus, savo sudėtyje turinčius daugiau nei dešimt anglies atomų (Jaeger ir kt., 1999; Elleuche ir kt., 2015).

Dar vienas ryškus lipazių ir karboksilesterazių skirtumas – „aktyvacija fazių sąlyčio paviršiuje“ (angl. *Interfacial activation*), kuri labiau priskirtina lipazėms, tačiau mažiau būdinga esterazėms. Įprastinėmis sąlygomis lipazių aktyvus centras nuo tirpiklių yra apsaugotas lanksčios struktūros, vadinamos „stogeliu“ (angl. *Lid*). Įvykus sąveikai ties substrato / vandens paviršiumi, ši struktūra persitvarko fermentui įgaunant aktyvią konformaciją ir katalizinis centras tampa prieinamas substratui. Kai kuriose lipazėse „stogelio“ atsidarymas yra atsakingas už „oksianijono kišenės“ (angl. *Oxyanion hole*), kuri dalyvauja stabilizuojant tarpinius reakcijos junginius, susidarymą (Lotti ir Alberghina, 2007).

Esminis esterazių ir lipazių skirtumas yra ir jų reakcijų kinetika. Esterazių atveju ji gali būti aprašoma remiantis Michaelis-Menten lygtimis, tuo tarpu lipazių reakcijų kinetika aprašoma riestine kreive. Lipazių atveju esant mažai substrato koncentracijai, fermento aktyvumas taip pat yra mažas, tuo tarpu koncentracijai didėjant – aktyvumas irgi didėja. Substrato koncentracijai didėjant substratas pradeda formuoti agregatus (kritinė micelių koncentracija) ir šiame taške fermento aktyvumas stipriai išauga (Hausmann ir Jaeger, 2010).

Visgi atliekant tyrimus paprastai daroma prielaida, kad lipazės tenkina Michaelis-Menten keliamas sąlygas. Taip pat svarbu paminėti, kad tiek lipazės, tiek esterazės dažnai geba katalizuoti tiek natūralių, gamtoje egzistuojančių, tiek sintetinių esterių hidrolizę (Bornscheuer ir Kazlauskas, 2006).

Lipazių ir esterazių klasifikacija remiasi jų erdvine struktūra bei aminorūgščių sekų homologija. Visi šie fermentai pasižymi ta pačia erdvine struktūra (priskiriamos α/β -hidrolazėms), kuri svarbi atpažįstant substratą ir užtikrina fermentų funkcijas (Arpigny ir Jaeger, 1999). Katalizinę šių fermentų triadą dažniausiai formuoja Ser, His ir Asp aminorūgščių liekanos (Arpigny ir Jaeger, 1999). Kai kuriose lipazėse vietoj Asp yra Glu (Bornscheuer, 2002). Serino liekanos dažniausiai randamos konservatyviuose pentapeptiduose Gly-X-Ser-X-Gly, kurie taip pat yra bendri abiemis fermentų grupėms (Arpigny ir Jaeger, 1999; Jaeger ir kt., 1999; Nardini ir Dijkstra, 1999). Galimas ir Gly-X-X-Leu motyvas, kuris rodo kai kurių esterazių didelę homologiją C klasės β -laktamazėms (Bornscheuer, 2002). Plačiau bakterijų lipazių ir esterazių klasifikacija bus aptarta 1.2 skyriuje.

1.2 Bakterijų lipoliziniu ir esteraziniu aktyvumu pasižyminčių fermentų klasifikacija

Prokariotų išskiriamų lipazių ir esterazių klasifikaciją pirmą kartą pasiūlė J. L. Arpigny ir K. E. Jaeger (1999). Jie remdamiesi 53 lipazių ir esterazių sekų homologija bei savybėmis suskirstė mikroorganizmų išskiriamas lipazes ir karboksilesterazes į aštuonias šeimas. Per pastarąjį dešimtmetį išskirtų lipazių ir esterazių skaičius stipriai išaugo, todėl klasifikacija keitėsi (Hausmann ir Jaeger, 2010).

Pirmajai, tikrųjų lipazių šeimai priskiriamos tik lipazės, tuo tarpu kitoms šeimoms priklauso ir esteraziniu aktyvumu pasižymintys fermentai. 1999 m. J. L. Arpigny ir K. E. Jaeger bei 2002 m. U. Bornscheuer savo straipsniuose pirmojoje tikrųjų lipazių šeimoje išskyrė šešis pošeimius (Arpigny ir Jaeger, 1999; Bornscheuer, 2002). Dabar ši šeima dalinama į

aštuonis pošeimius ir jai daugiausia priklauso *Pseudomonas*, *Bacillus* ir *Staphylococcus* bakterijų sintetinės lipazės (Hausmann ir Jaeger, 2010; Sangeetha ir kt., 2011). Kitų šeimų klasifikacija irgi keitėsi, priskiriant joms naujų narių arba vienas lipazes perklasifikuojant į kitas šeimas ar pošeimius (Hausmann ir Jaeger, 2010). R. Sangeetha su bendraautoriais (2011) užsimena, kad keletas naujų išskirtų lipazių negali būti grupuojamos į J. L. Arpigny ir K. E. Jaeger (1999) pateiktas aštuonias šeimas ir turi sudaryti atskirą devintą ir dešimtą lipazių šeimą. Viena iš tokių lipazių yra D. de Pascale ir kolegų (2008) aprašyta, žemoje temperatūroje aktyvi *Pseudoalteromonas* haloplanktono Lip1 lipazė. *Geobacillus stearothermophilus* Est30 esterazę siūloma priskirti XIII šeimai (Ewis ir kt., 2004; Liu ir kt., 2004), *Thermoanaerobacter tengcongensis* esterazę – XIV šeimai (Rao ir kt., 2011), o 2016 m. išskirtą ir aprašytą *Geobacillus thermoleovorans* CCR11 kamieno karboksilesterazę CaesCCR11 – XV lipazių / esterazių šeimai (Espinosa-Luna ir kt., 2016).

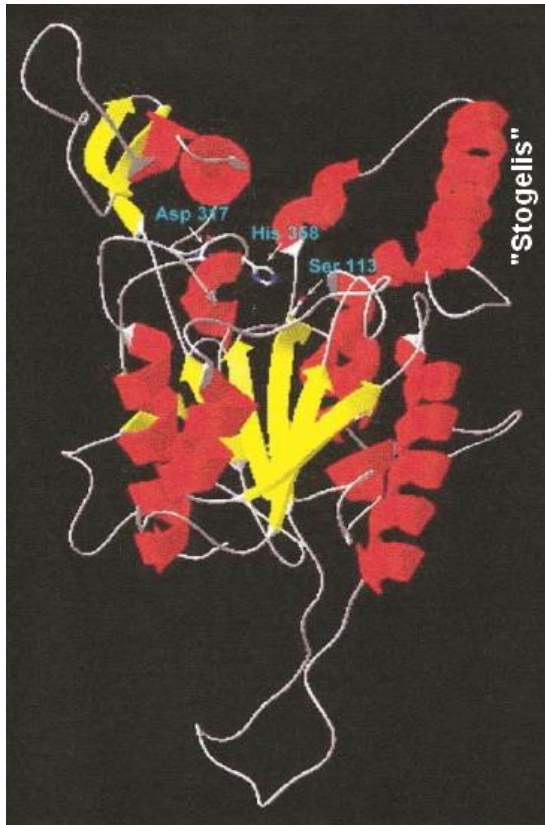
Literatūros duomenys teigia, jog *Geobacillus* genties bakterijos sintetina 2 dydžių karboksilesterazes (30 ir 55 kDa) (Liu ir kt., 2007). 55 kDa esterazės dėl savo dydžio galėtų būti priskirtos VII bakterijų lipazių / esterazių šeimai. Šiai šeimai priklausančios esterazės pasižymi dideliu panašumu į acetilcholino esterazes (Arpigny ir Jaeger, 1999; Hausmann ir Jaeger, 2010) bei 32 % panašumu į žmonių karboksilesterazę CE1 (hCE1) ir 31 % panašumu į triušių kepenų karboksilesterazę (rCE) (Liu ir kt., 2007). Visgi informacijos apie 55 kDa *Geobacillus* karboksilesterazes yra nedaug.

1.3 *Geobacillus* genties bakterijų sintetinės lipazės

2001 m. keletas termofilinių aerobinių bakterijų rūšių buvo priskirtos *Geobacillus* genčiai (Nazina ir kt., 2001). Dėl išskirtinių šių mikroorganizmų lipazių savybių (gebėjimas veikti aukštos temperatūrose ir šarminėmis sąlygomis) *G. stearothermophilus*, *Geobacillus thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans* ir *Geobacillus* sp. TP10A sintetinės lipazės priskirtos atskiram I.5 pošeimiui (Carrasco-Lopez ir kt., 2009). Anksčiau šių bakterijų

lipazės buvo grupuojamos kartu su *Staphylococcus* lipazėmis dėl jų sekų panašumo, tačiau vėliau, nustatius *G. stearotherophilus* L1 kristalinę struktūrą, šios lipazės buvo atskirtos į du I.5 ir I.6 pošeimius (Jeong ir kt., 2002). *Bacillus* lipazės, priskiriamos šiam pošeimiui, pasižymi tik 15 % panašumu į *Bacillus* lipazes, priklausančias I.4 pošeimiui. *Geobacillus* genties bakterijų sintetinės lipazės nuo kitų *Bacillus* lipazių skiriasi ir savo molekuline mase (40–45 kDa). Kitų lipazių nustatyta molekulinė – mažesnė nei 35 kDa (Jeong ir kt., 2002).

Nustatius *G. thermocatenulatus* išskiriamų lipazių kristalinę struktūrą, paaiškėjo, kad *G. thermocatenulatus* BTL2 lipazė yra pirmoji I.5 pošeimio lipazė su nustatyta ir iširta atvira fermento konformacija (Carrasco-Lopez ir kt., 2009). Tuo tarpu *G. stearotherophilus* (L1 ir P1) lipazės ir *Geobacillus zalihae* (T1) lipazė turi nustatytą uždara konformaciją, kur aktyviąją fermentų sritį dengia ilgas „stogelis“ (Jeong ir kt., 2002; Carrasco-Lopez ir kt., 2009). Pusiausvyra tarp atviros ir uždaros fermento konformacijos, o kartu ir fermento aktyvumas priklauso nuo aplinkos sąlygų. Aplinkos sąlygos lemia savitus lipazių struktūros persitvarkymus, kurie vyksta „aktyvacijos fazių sąlyčio paviršiuje“ metu. Šiuose persitvarkymuose ir dalyvauja 70 aminorūgščių liekanų, išsidėsčiusių $\alpha 6$ ir $\alpha 7$ spiralėse, fragmentas („stogelis“) (1.1 pav.). Stambios hidrofobinių aminorūgščių liekanos, esančios N- gale, susidarant erdvinei struktūrai perkeliamos ant $\alpha 6$ spiralės ir trumpa aminorūgščių grandinė įsiterpia $\alpha 6$ spiralės C-galinėje srityje. Šiuos struktūrinius pasikeitimus stabilizuoja šeimai charakteringas cinką prisijungiantis domenas (Carrasco-Lopez ir kt., 2009; López-Gallego ir kt., 2012). Neįprastai ilgą *Geobacillus* lipazių „stogelį“ formuoja aminorūgštys, kurių liekanos sudaro stiprią hidrofobinę sąveiką su kaimyninių aminorūgščių liekanomis (Jeong ir kt., 2002; Carrasco-Lopez ir kt., 2009), o cinką prisijungiantis domenas, manoma, prisideda prie šio pošeimio lipazių temperatūrinio stabilumo (Tyndall ir kt., 2002).



1.1 pav. *G. stearothermophilus* P1 lipazės struktūra su pažymėtomis katalizinėmis Ser113, Asp317 ir His358 aminorūgštimis bei „stogelio“ domenu (Sinchaikul ir kt., 2001).

I.5 pošeimio lipazės taip pat turi konservatyvų pentapeptidą Ala-His-Ser-Gln-Gly, didžiausiu aktyvumu pasižymi esant pH 8–10 ir aukštai temperatūrai 60–75 °C (Jeong ir kt., 2002; Guncheva ir Zhiryakova, 2011), o katalizinę triadą formuoja Ser113, Asp317 ir His358 aminorūgščių liekanos (1.1 pav.) (Sinchaikul ir kt., 2001; Carasco-Lopez ir kt., 2009; Abd Rahman ir kt., 2012).

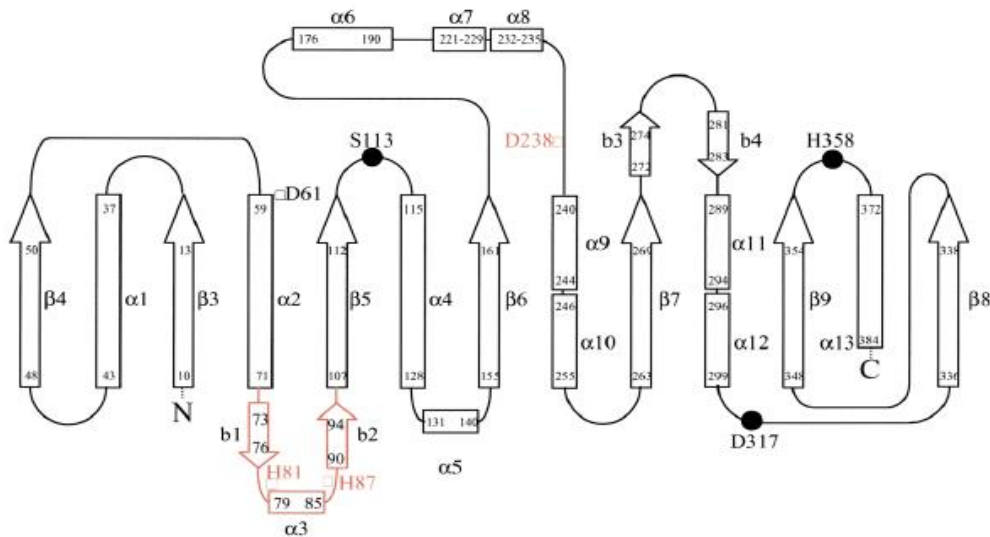
1.3 Lipoliziniu aktyvumu pasižyminčių fermentų struktūra

1.3.1 Lipazių ir esterazių erdvinė struktūra

Lipoliziniai fermentai pasižymi α/β -hidrolazėms būdingu susilankstymu. α/β -hidrolazių susilankstymą charakterizuoja centrinė β klostė, kurią sudaro aštuonios vijos su $\beta 2$ antiparalelia vija (Ollis ir kt., 1992; Jaeger ir kt., 1999). Lygiagrečias vijas nuo $\beta 3$ iki $\beta 8$ jungia α spirалės. Jos išsidėsto abiejose centrinės β klostės pusėse. β klostė pasižymi kairiuoju superspiraliniu

susisukimu, kuris lemia, kad klostės paviršius užkloja apie pusę sudaromo cilindro. Pirmoji ir antroji vijos kertasi 90° kampu (Nardini ir Dijkstra, 1999; Jaeger ir kt., 1999). Skirtingų fermentų β klostės išsilankstymas, α spiralių padėtis ir skaičius gali varijuoti (Jaeger ir kt., 1999).

Peptidinė grandinė C-gale, β klostės pusėje, iš gijų formuoja α/β -hidrolazių struktūros tipo baltyminius subdomenus, kurie gali skirtis ilgiu ir sandara. Daugumai žinomų lipazių būdingas būtent toks α/β erdvinis susilankstymas, tačiau yra ir išimčių. Lipazių, išskirtų iš *Pseudomonas glumae* ir *P. cepacia*, centrinę β klostę formuoja šešios lygiagrečios β vijos. Išimtis yra ir *Pseudomonas fluorescens* karboksilesterazė, kuri turi septynias gijas atitinkamai nuo $\beta 2$ iki $\beta 8$ vijų kanoninėje α/β -hidrolazių struktūroje (Jaeger ir kt., 1999). Ištyrus *Geobacillus* išskiriamų lipazių susilankstymą, buvo nustatyta, kad *G. thermoleovorans* CCR11 kamieno išskiriamą lipazę LipCCR11 sudaro 12 α spiralių ir 11 β vijų (Quintana-Castro ir kt., 2009). 1.2 pav. iliustruoja *G. stearotherophilus* P1 lipazės (Tyndall ir kt., 2002) antrinę struktūrą su α spiralių ir β klosčių išsidėstymu.



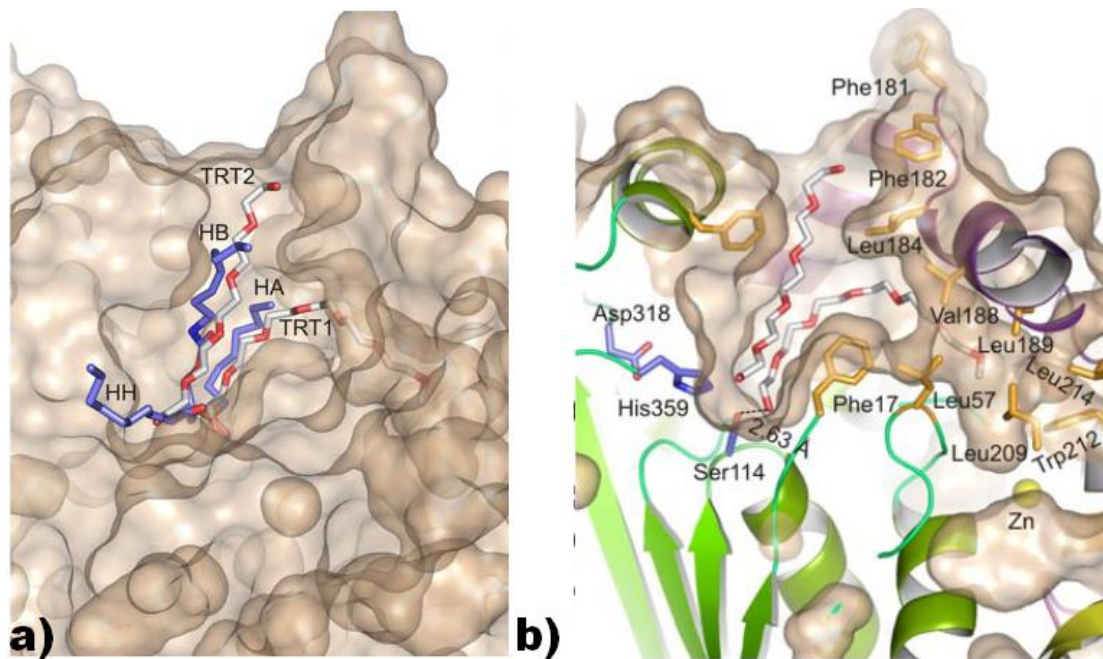
1.2 pav. α spiralių ir β klosčių išsidėstymas *G. stearotherophilus* P1 lipazės antrinėje struktūroje (Tyndall ir kt., 2002). Juodi skrituliai žymi katalizinės triados padėtis, raudonai įrašytos cinką prisijungiančių aminorūgščių liekanos, rodyklės žymi β klostes, stačiakampiai – α spirales, raudonas stačiakampis ir rodyklės – naujos struktūros, kurių nėra kanoninėje α/β hidrolazių struktūroje, bet jas turi P1 lipazė ($\beta 1$ ir $\beta 2$ klostės ir $\alpha 3$ spiralė).

Kaip jau minėta, informacijos apie *Geobacillus* genties bakterijų sintetinamų 55 kDa dydžio karboksilesterazių struktūrą nėra daug. Literatūros duomenimis šiuos fermentus sudaro trys domenai: katalizinis, α/β ir reguliacinis. Katalizinis domenas pasižymi įprastu α/β hidrolazėms būdingu susilankstymu (centrinė antiparaleli β klostė apsupta α spiralių) (Liu ir kt., 2007).

1.3.2 Substratą prisijungiančio kanalo ypatybės

Fermentų, tarp jų ir lipazių, aktyvumą ir substratinį savitumą nulemia ir kanalo, kuriame prijungiamas substratas, geometrija. Nors visos lipazės pasižymi konservatyvia ketvirtine struktūra, katalizine triada ir reakcijų mechanizmu, visgi substratą prijungiančio kanalo geometrija varijuoja, taip nulemiant ir skirtingą fermentų substratinį savitumą. Tiriant, kokiam substratui tikslinė lipazė teiks pirmenybę, svarbu yra ne tik substratą prijungiančio kanalo forma ir ilgis, bet ir hidrofobiškumas, kuris priklauso nuo ši kanalą sudarančių aminorūgščių liekanų (Lotti ir Alberghina, 2007; Kingsley ir Lill, 2015). Pvz., žmogaus kasos lipazei būdingas platus substratą prijungiantis kanalas ir ji prisijungia substratus, kurių riebalų rūgščių grandinės ilgis yra vidutiniškai aštuoni anglies atomai. Tuo tarpu *Candida rugosa* lipazės (CRL) substrato prijungimo sritis yra 22 Å ilgio kanalas, kuris prijungia iki 17 anglies atomų riebalų rūgščių grandinėje turinčius substratus (Kingsley ir Lill, 2015).

Pagal substratą prijungiančio kanalo geometriją lipazes siūloma skirti į 3 grupes. I grupei priskiriamos *Rhizomucor meihei* lipazės, kurių riebalų rūgščių prisijungimo vieta yra siaura. Antra grupė – *Pseudomonas* lipazės ir *Candida antarctica* lipazė B, kurios pasižymi piltuvo formos substratą prijungiančiu kanalu, ir trečioji grupė – *Candida rugosa* lipazės, kurių riebalų rūgščių prisijungimo vieta primena tunelį (Schmidt-Dannert, 1999). 1.3 pav. pateiktas triacilglicerolio molekulės prijungimas *G. thermocatenulatus* BTL2 lipazėje.



1.3 pav. Triacilglicerolio molekūlės prijungimas *G. thermocatenulatus* BTL2 lipazėje (Carrasco-Lopez ir kt., 2009). TRT1 ir TRT2 – dvi Triton X-100 molekūlės, pažymėtos baltomis / raudonomis lazdelėmis (a, b); slopiklis, savo struktūra primenantis trigliceridus – mėlynos lazdelės (a); HA, HB ir HC – „kišenės“, kuriose prijungiama riebalų rūgščių grandinė (a); katalizinės Ser114, Asp318 ir His359 a.r. – mėlynos lazdelės (b); svarbios substrato prijungimui aminorūgštys – geltonos lazdelės (b).

Geobacillus sp. T1 lipazės substrato prisijungimo kanalas yra piltuvo formos ($18 \times 25 \text{ \AA}$), jo paviršiaus plotas – $901,6 \text{ \AA}^2$, o tūris – $1110,4 \text{ \AA}^3$ (Qin ir kt., 2014b). *G. thermocatenulatus* BTL2 lipazės tyrimai parodė, kad jos substratą prijungiantis kanalas yra 14 \AA gylio ir kiaušinio formos. Jo matmenys – $18 \times 25 \text{ \AA}$ (kaip ir anksčiau minėtos T1 lipazės), plotas – $847,9 \text{ \AA}^2$, o tūris – $1183,1 \text{ \AA}^3$ (Carrasco-Lopez ir kt., 2009).

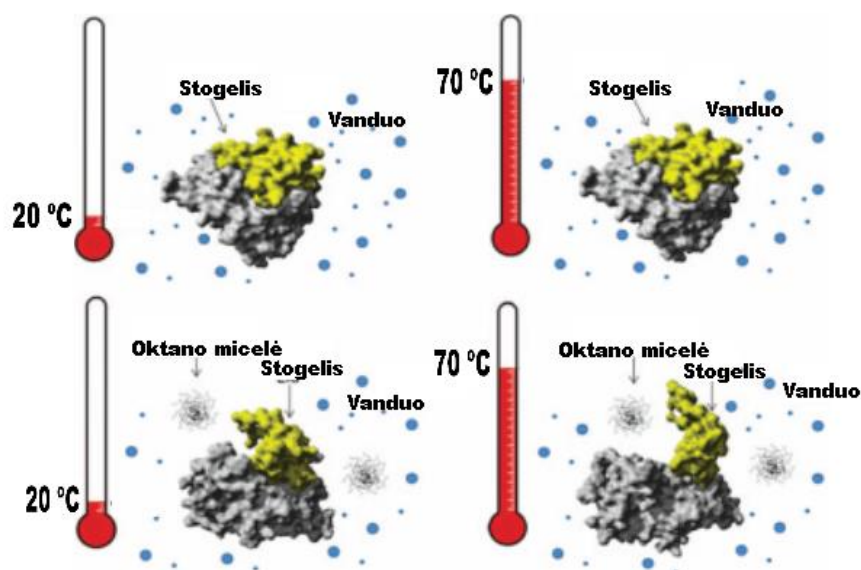
1.3.3 Konservatyvūs *Geobacillus* lipazių struktūros elementai

Aktyviają α/β -hidrolazių sritį sudaro trijų aminorūgščių liekanos: nukleofilinė liekana (Ser, Cys arba Asp), katalizinės aminorūgštys (Asp arba Glu) ir His liekanos. Šios aminorūgštys sekoje visada yra išsidėsčiusios būtent tokia tvarka. Nukleofilinė serino liekana yra lokalizuota konservatyviame Gly-X-Ser-X-Gly pentapeptide, kuris formuoja γ formos kilpą tarp $\alpha 4$ spiralės ir kanoninės centrinės α/β -hidrolazių β klostės $\beta 5$ padėties. $\beta 5$, γ kilpa ir α spiralė – konservatyviausios struktūrinės dalys α/β -hidrolazių struktūroje.

Glaudūs ryšiai egzistuoja tarp aminorūgščių liekanų, esančių antroje pozicijoje prieš ir už serino liekanos. Dažniausiai šioje vietoje yra lokalizuotas glicinas. Kartais jis gali būti pakeistas alaninu, valinu, serinu ar treoninu. *Geobacillus* lipazių atveju šioje padėtyje visada yra alaninas. Erdvinis katalizinės triados išsidėstymas yra vadinamas „nukleofiline alkūne“ (Jaeger ir Reetz, 1998; Arpigny ir Jaeger, 1999; Jaeger ir kt., 1999). Erdvinėje struktūroje katalizinės triados aminorūgštys išsidėsto taip: Ser tarp $\beta 5$ vijos ir $\alpha 4$ spiralės, Asp – tarp $\alpha 12$ spiralės ir $\beta 9$ vijos ir His – tarp $\beta 9$ vijos ir $\alpha 13$ spiralės (Tyndall ir kt., 2002).

Be katalizinės triados ne mažiau svarbi *Geobacillus* lipazių dalis – jau anksčiau minėtas „stogelis“, kurį paprastai sudaro FFDLQKAVLKAAAVASNV (180–197) aminorūgščių liekanos (Chakravorty ir kt., 2011). Kitų autorių nuomone „stogelį“ formuoja Asp175–Lys229 aminorūgštys (Abdul Rahman ir kt., 2012). Kaip jau minėta, šios aminorūgštys yra išsidėsčiusios $\alpha 6$ ir $\alpha 7$ spiralėse, sujungtose kilpa. Formuojamas spiralė-kilpa-spiralė motyvas, kuris savo ruožtu dalyvauja aktyvacijoje fazių sąlyčio paviršiumi. Vykstant šiam reiškiniui Asp205–Arg214 ir Asp209–Arg214 formuojamos sąveikos palaiko „stogelio“ domeno stabilumą (Carasco-Lopez ir kt., 2009; Abdul Rahman ir kt., 2012). 1.4 pav. pateiktas „stogelio“ atsidarymas vykstant lipazių vykdomai hidrolizės reakcijai.

Informaciją apie „stogelio“ vaidmenį vykstant substrato prijungimui papildė ir F. López-Gallego su kolegomis tyrimai (2012). Jie parodė, kad *G. thermocatenolatus* BTL2 lipazėje didžiausi struktūriniai pokyčiai prijungus substratą vyksta regione tarp 176 ir 240 padėtyse esančių aminorūgščių.



1.4 pav. *Geobacillus* sp. T1 lipazės aktyvacija (Abdul Rahman ir kt., 2012). Geltona spalva – „stogelio“ domenai, kuris atsidero esant oktano molekulių. Ši atsidarymą skatina temperatūra. Žemesnėje temperatūroje esant oktano micelių „stogelis“ atsidero nežymiai. Nesant oktano molekulių, „stogelis“ neatsidero.

Kitos nustatytos konservatyvios *Geobacillus* lipazių struktūrinės dalys (Nardini ir Dijkstra, 1999; Chakravorty ir kt., 2011):

- P-kilpos motyvas (GHKRYGRT), skirtas prisijungti ATP arba GTP;
- cinką prisijungiantis domenai (GAAHAAKH);
- „oksianijono kišenė“ (PIVLLHGFTG), stabilizuojanti neigiamo krūvio pernešimą vykstant hidrolizei.

Vykstant reakcijai „oksianijoninė kišenė“ yra svarbi poliarizuojant dvigubą ryšį esteriniame substrate. Susidaro karbonilinė anglis, jautri nukleofilinei atakai, kurią vykdo katalizinės triados serinas. Jei serinas pašalinamas mutacijų pagalba, „oksianijoninė kišenė“ gali dalyvauti aktyvuojant kitas funkcijas (Hult ir Berglund, 2007; Gupta ir kt., 2015). Yra parodyta, kad Ser105Ala mutantinė *Candida antarctica* lipazė katalizuoja tiolinių ir amino grupių pridėjimą α , β -nesočiuosiuose aldehiduose, ketonuose ir metilo esteruose, kai reakcijos aplinka – cikloheksanas, toluenas ar dietilo esteris (Hult ir Berglund, 2007).

Per pastaruosius dešimt metų buvo gauta naujos informacijos apie aminorūgštis ir regionus, dalyvaujančius užtikrinant tinkamą *Geobacillus* lipazių substratų prijungimą, temperatūrinį aktyvumą ir (ar) stabilumą (1.1 lentelė).

1.1 lentelė. *Geobacillus* genties bakterijų išskiriamų lipazių veiklai svarbios aminorūgštys ir jų nustatymui naudoti baltymų inžinerijos metodai.

Tirta <i>Geobacillus</i> lipazė	Tyrimų taikiny (aminorūgštis ar domenai)	Naudotas baltymų inžinerijos metodas	Svarba	Autorius
<i>G. stearothermophilus</i> L1	His87; Asp61; His81; Asp238	Ala mutagenezė	A.r. dalyvaujančios prijungiant Zn ²⁺ jonus	Choi ir kt., 2005
<i>G. thermocatenolatus</i> BTL2 lipazė	Asp365, Glu360, Gly286, Pro366	Analizė <i>in silico</i>	A.r., dalyvaujančios prijungiant Ca ²⁺ jonus	Carasco-Lopez ir kt., 2009
<i>G. thermocatenulatus</i>	Phe181 ir Phe182	Ala mutagenezė	Phe181Ala mutacija padidina atstumą tarp Phe181 ir katalizinio Ser114 bei lipazės aktyvumą hidrolizuojant C8 substratus. Phe181Ala-Phe182Ala mutacijos reikšmingai sumažino lipazės aktyvumą	Karkhane ir kt., 2009
<i>Geobacillus</i> RD-2 lipazė	Tyr224	Taikiniui specifinė mutagenezė	Svarbi temperatūriniam stabilumui, išsidėsčiusi netoli „stogelio“ domeno	Wu ir kt., 2010
<i>Geobacillus</i> sp. NTU 03	Asp189	Taikiniui specifinė mutagenezė	Temperatūriniam stabilumui svarbi a.r.	Shih ir Pan, 2011
<i>Geobacillus</i> sp. T1	Gln114	Taikiniui specifinė mutagenezė	Svarbi fermento enantioatrankumui	Wahab ir kt., 2012
<i>Geobacillus</i> sp. T1	Phe16Lys	Taikiniui specifinė mutagenezė	Fizikinių ir cheminių savybių skirtumai	Ali ir kt., 2012
<i>G. thermocatenolatus</i> BTL2 lipazė	Phe17, Leu245 ir Ile320	Taikiniui specifinė mutagenezė ir cheminės modifikacijos	Apsupa katalizines a.r., prijungus substratą; mutantų aktyvinimas detergentais	López-Gallego ir kt., 2012
<i>G. zalihae</i> T1 lipazė	Asp311Glu ir Lys344Arg	Taikiniui specifinė mutagenezė	Padidėja temperatūrinis stabilumas	Ruslan ir kt., 2012
<i>Geobacillus</i> sp. ARM	Arg157Ser	Taikiniui specifinė mutagenezė	Pagerėja ARM lipazės stabilumas ir kompaktiškumas	Salleh ir kt., 2012
<i>Metagenominė lipazė, pasižyminti panašumu į Geobacillus lipazes</i>	Glu315 ir Asn355	Taikiniui specifinė mutagenezė	Mutacijos šiose padėtyse gali padidinti temperatūrinį stabilumą	Sharma ir kt., 2014

Nors *Geobacillus* lipazės plačiai tiriamos vis dėlto trūksta informacijos apie C-galiniame regione išsidėsčiusių aminorūgščių vaidmenį šių fermentų aktyvumui ir funkcionalumui.

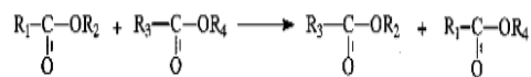
1.4 Esterazių ir lipazių katalizuojamos reakcijos ir jų mechanizmas

Vandeniniuose tirpaluose esterazės ir lipazės veikia acilglicerolių karboksilesterinius ryšius, vyksta hidrolizė ir susidaro laisvos riebalų rūgštys, di- ir mono-acilgliceroliai ir glicerolis (Villeneuve ir kt., 2000). Esant mažam vandens kiekiui šie fermentai gali katalizuoti ir atvirkštinę reakciją – esterinimą. Esterazės ir lipazės taip pat gali vykdyti acidolizę, kada vyksta pasikeitimas acilo grupėmis tarp esterio ir rūgšties; peresterinimą, kai pasikeičiama acilo grupėmis tarp dviejų esterių; alkoholizės reakciją, kurios metu pasikeičiama radikalais tarp esterio ir alkoholio; ir aminolizę organiniuose tirpikliuose (Villeneuve ir kt., 2000; Paiva ir kt., 2000) (1.5 pav.).

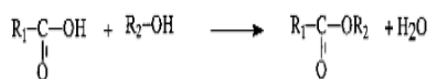
HIDROLIZĖ



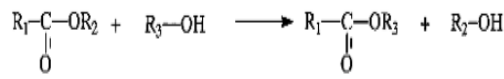
PERESTERINIMAS



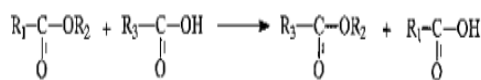
ESTERIŲ SINTEZĖ



ALKOHOLIZĖ



ACIDOLIZĖ



AMINOLIZĖ



1.5 pav. Esterazių ir lipazių katalizuojamų reakcijų schema (Villeneuve ir kt., 2000).

Visiška esterinių ryšių hidrolizė, riebalų rūgščių gamyba, esterių sintezė ir substratų modifikacijos (peresterinimo reakcijos) labai priklauso ne tik nuo reakcijos aplinkos (vandeninė aplinka ar organinis tirpiklis), bet ir nuo temperatūros bei slėgio (reakcijos gali vykti esant garų) (Villeneuve ir kt., 2000). Visas šias aptartas reakcijas gali katalizuoti ir įvairūs baziniai ar

rūgštiniai cheminiai katalizatoriai, tačiau biokatalizatorių (tokių kaip lipazės ar esterazės) naudojimas leidžia šiuos procesus vykdyti švelnesnėmis sąlygomis. Tai sumažina nepageidaujamų atliekų kiekį, reakcijos yra savitesnės ir procesai tampa draugiškesni aplinkai (Villeneuve ir kt., 2000).

Pagrindinė karboksilesterazių ir lipazių katalizuojama reakcija – karboksilesterių ryšių hidrolizė į riebalų rūgštis ir glicerolį. Aktyvųjų fermentų centrą, kaip jau minėta, sudaro Ser-His-Asp/Glu katalizinė triada. Ji panaši į serino proteazių triadą, todėl manoma, kad esterazių ir lipazių vykdoma karboksilesterinių ryšių hidrolizė savo mechanizmu yra panaši į serino proteazių vykdomą katalizę (Jaeger ir kt., 1999).

Substrato hidrolizės reakcija susideda iš dviejų etapų (Lotti ir Alberghina, 2007). Pirmoje stadijoje nukleofilinio serino hidroksilo grupės deguonies atomas atakuoja karbonilinį karboksilesterinio ryšio anglies atomą ir susiformuoja trumpalaikė tetraedrinė struktūra. Taip pat susidaro vandeniliniai ryšiai su aminorūgščių, įeinančių į „oksidanijoninę kišenę“ azoto atomais. Tai stabilizuoja neigiamo krūvio pernešimą vykstant hidrolizei. Po to Ser atakuoja katalizinį His, kuriam iš serino hidroksilo grupės yra pernešamas protonas. Šio protono pernešimą palengvina katalizinė aminorūgštis (Asp ar Glu), kuri tiksliai orientuoja histidino imidazolo žiedą ir taip dalinai neutralizuoja įgytą neigiamą krūvį. Šioje stadijoje vyksta substrato rūgšties komponento esterinimas, kurį atlieka nukleofilinis serinas, atsikyla alkoholis ir lieka acil-lipazės kompleksas. Kita stadija – deacilinimas. Jos metu vandens molekulė atakuoja kompleksą (vėl vyksta nukleofilinė ataka). Šią vandens molekulę aktyvuoja katalizinės triados His, kuris atima iš jos protoną. Dėl to OH⁻ jonai aktyvuoja karbonilinį anglies atomą, esantį acilo grupėje, kovalentiškai prijungtoje prie Ser. Vėl suformuojama neigiamą krūvį turinti tarpinė tetraedrinė struktūra. Tolesnėje stadijoje His atiduoda protoną aktyvaus Ser deguonies atomui, kurio dėka atsipalaiduoja acilo komponentas, ir fermentas yra pasirengęs naujai katalizės reakcijai (Jaeger ir kt., 1999; Lotti ir Alberghina, 2007; Anobom ir kt., 2014).

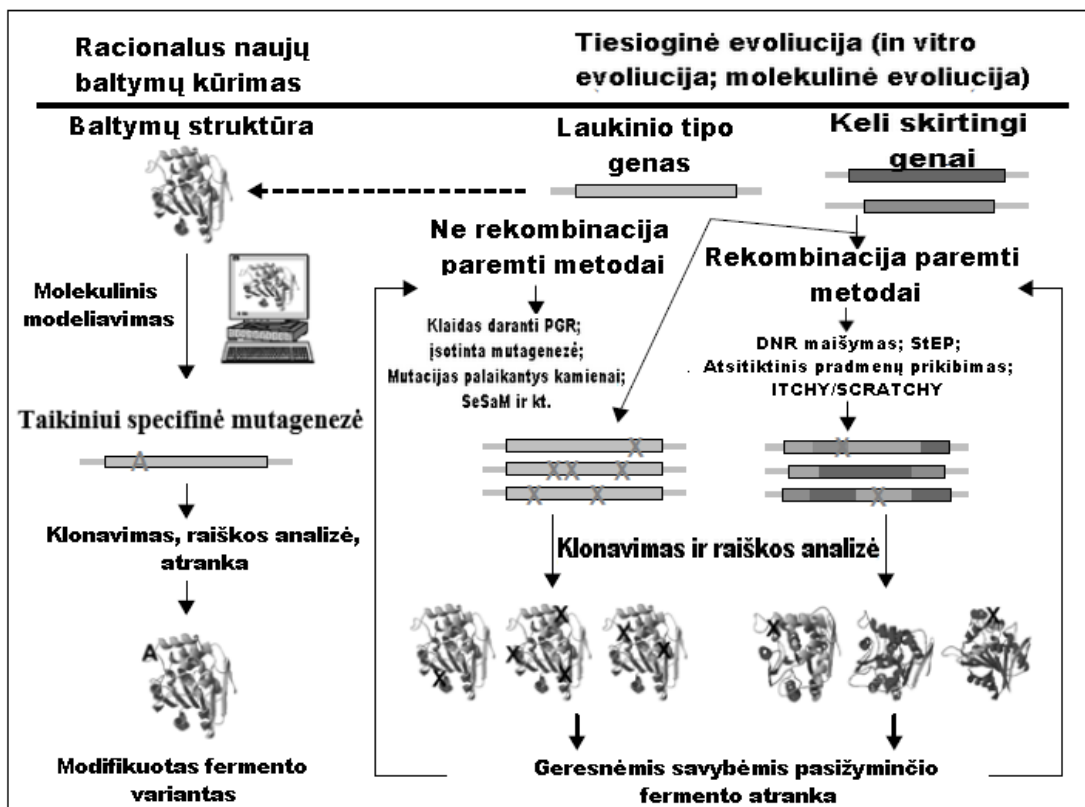
Detali informacija apie tikslių fermentų struktūrą, vykdomų reakcijų mechanizmus yra svarbi baltymų inžinerijoje, kada taikant racionalų baltymų tobulinimą galima gauti geresnėmis savybėmis pasižyminčius fermentus bei tirti tikslių fermentų struktūros ir funkcijos ryšį.

1.5 Baltymų inžinerija – fermentų savybių gerinimo priemonė

Baltymų inžinerija – dvidešimtmetį skaičiuojanti genų inžinerijos atšaka (Kapoor ir kt., 2015). Ji leidžia „apeiti“ natūralių, gamtoje egzistuojančių biokatalizatorių trūkumus ir sukurti naujus savitus fermentus. Taikant baltymų inžinerijos strategijas galima sukurti fermentus, kurie geba išlikti aktyvūs paveikus aukšta temperatūra, stipriai bazinėmis ar rūgštinėmis medžiagomis, kas paprastai gali slopinti įprastus natūralius fermentus. Naudojant tiesioginės evoliucijos metodus galima ne tik patobulinti egzistuojančių baltymų savybes, bet ir suteikti jiems naujas funkcijas, kurios paprastai nėra būdingos. Dažniausiai gerinamos savybės yra stabilumas aukštose temperatūrose, enantio- ar stereo- atrankumas, atsparumas organinių tirpiklių poveikiui bei savitasis ar katalizinis fermentų aktyvumas. Tokie pagerinti fermentai yra labiau tinkami taikyti pramonėje, kadangi padidinamas procesų efektyvumas, ekonomiškumas ir ekologiškumas (Chirumamilla ir kt., 2001; Turner, 2003; Kaur ir Sharma, 2006; Joshi ir Satyaarayana, 2014; Denard ir kt., 2015). Vieni iš tokių tyrimų objektų – lipoliziniu aktyvumu pasižymintys fermentai.

1.5.1 Baltymų inžinerijos metodų skirstymas

Baltymų inžineriją galima skirti į dvi pagrindines kryptis: racionalųjį baltymų kūrimą (angl. *Rational design*) ir tiesioginę evoliuciją (molekulinė evoliucija, evoliucija „*in vitro*“) (angl. *Directed evolution*) (1.6 pav.).



1.6 pav. Baltymų inžinerijos strategijos ir kai kurie joms priskirtini metodai (Bornscheuer, 2008).

Taikant racionalų baltymų kūrimą ir gerinimą turi būti žinoma tiriamo ar jam artimo baltymo struktūra. Geresni rezultatai gaunami ir tuo atveju, kai žinomas fermento veiklos mechanizmas ar funkcija. Modifikacijos dažniausiai įvykdomos naudojant taikiniui specifinės mutagenezės metodus (angl. *Site directed mutagenesis*) ir pokyčiai žinomi iš anksto. Tuo tarpu tiesioginėje evoliucijoje informacija apie fermento struktūrą, funkciją ir veiklos mechanizmą nėra tokia svarbi, kadangi naujų variantų paieška remiasi atsitiktinai vykstančiais baltymo sekos pokyčiais. Tiesioginė evoliucija imituoja gamtinę atranką ir sumažina laiką (kelios savaitės ar mėnesiai), reikalingą natūraliai evoliucijai vykti (keletas milijonų metų). Tiesioginėje evoliucijoje atrankos slėgis sukuriamas naudojant didelės gebos atrankos sistemas, o pokyčiai gaunami taikant mutagenezės ar rekombinacijos metodus (Chen, 2001; Valetti ir Gilardi, 2004; Kaur ir Sharma, 2006; Joshi ir Satyaarayana, 2014).

Baltymų inžinerijai vystantis, naudojamų metodų skaičius vis didėja. Tolesniuose skyreliuose plačiau bus aptarti kai kurie iš jų, didesnę dėmesį skiriant toms strategijoms, kurios literatūros duomenimis naudojamos dažniausiai. Pateikiant baltymų inžinerijos pritaikymo pavyzdžius didžiausias dėmesys skirtas mikroorganizmų lipazėms ir esterazėms.

1.5.2 Racionalus baltymų kūrimas ir alanino skenuojanti mutagenezė

Kaip jau minėta anksčiau, racionalus naujų baltymų kūrimas prasideda nuo žinomos tikslinio baltymo struktūros (ar homologinio baltymo modelio). Remiantis ja, nustatomos svarbiausios baltymo veiklai aminorūgštys. Vėliau, naudojant taikiniui specifinę mutagenezę, galima sukurti mutantus ir eksperimentiškai patvirtinti ar paneigti tokios identifikuotos aminorūgšties svarbą (Bornscheuer, 2008). Taikant racionalų baltymų kūrimą – svarbios žinios apie determinantus, kurie yra atsakingi už tiriamo fermento substratinį atrankumą ar katalizinį mechanizmą (Antikainen ir Martin, 2005). Viena iš racionalaus baltymų kūrimo ir analizės strategijų – alanino skenuojanti mutagenezė (angl. *Alanine-scanning mutagenesis*), leidžianti suprasti baltymų struktūros ir funkcijos ar baltymų tarpusavio ryšį (Thorn ir Bogan, 2001). Kartu tai ir taikiniui specifinės mutagenezės pavyzdys, kai tikslinės aminorūgštys yra pakeičiamos į alaniną.

Tikslinių aminorūgščių keitimas į alaniną gali būti naudojamas norint greitai identifikuoti aminorūgščių liekanas, kurios yra svarbios baltymų funkcijoms užtikrinti (dalyvauja atpažįstant substratą) (Gibbs ir Zoller, 1991), stabilumui (Blaber ir kt., 1995) ar palaikant tinkamą erdvinę struktūrą. Kiekvienas pakeitimas į Ala nagrinėja kiekvienos individualios aminorūgšties šoninės grandinės indėlį, užtikrinant tiriamo baltymo funkcionalumą (Morrison ir Weiss, 2001). Skenuojančios mutagenezės strategija yra puiki priemonė, leidžianti išaiškinti ir tirti fermento struktūros ir funkcijos ryšį bei atlikti baltymų evoliucijos tyrimus (Maynard ir kt., 2002; Moreira ir kt., 2007). Vienas iš Ala skenuojančios mutagenezės privalumų – ją naudojant nėra

veikiama pagrindinės grandinės konformacija, kas gali vykti naudojant gliciną ar proliną. Alaninas – nedidelė, cheminiu požiūriu inertinė, turinti metilo grupę aminorūgštis. Metilo grupė imituoja antrinę struktūrą, ko kitos aminorūgštys negali padaryti (Lefevre ir kt., 1997). Kai kuriais atvejais (kai reikia išlaikyti konservatyvių aminorūgščių dydį) gali būti naudojamos didelės aminorūgštys, tokios kaip valinas ar leucinas. Taip pat skiriama ir cisteino skenuojanti mutagenezė, kai tikslinė aminorūgštis yra pakeičiama į cisteiną. Ši aminorūgštis sudaro sąveikas su baltymus modifikuojančiomis medžiagomis, tokiomis kaip N-etilmaleimidas. Pastaroji strategija naudinga, kai siekiama įvertinti transmembraninių baltymų topologiją.

Alanino skenuojanti mutagenezė sėkmingai buvo pritaikyta *Alicyclobacillus acidocaldarius* esterazės 2 analizei (Pezzullo ir kt., 2013); tiriant Phe181 ir Phe182 svarbą *G. thermocatenulatus* lipazės aktyvumui bei užtikrinant jos savitumą substratui (Karkhane ir kt., 2009), įvertinant Asp131–Ser138 regiono aminorūgščių įtaką *Fervidobacterium changbaicum* lipazės aktyvumui ir stabilumui (Li ir kt., 2012a). Naudojant alanino skenuojančią mutagenezę E. Timucin su bendraautorais (Timucin ir Sezerman, 2013; Timucin ir kt., 2016) įrodė, kad Trp211, Trp234, Trp61 ir Trp212 yra svarbios *G. thermocatenulatus* (BTL2) lipazės temperatūriniam stabilumui. Pakaitos į alaniną padėjo nustatyti aminorūgštis, dalyvaujančias *G. stearothermophilus* L1 lipazei prijungiant cinką (Choi ir kt., 2005) ar katalizinių Asp ir His padėtis I.3 lipazių šeimai priklausančioje *Pseudomonas* sp. MIS38 (PML) lipazėje (Hyun-Ju ir kt., 2000).

1.5.3 Tiesioginė evoliucija

Tiesioginę evoliuciją galima skirstyti į dvi šakas: nerekombinantiniai metodai ir rekombinacija paremti metodai (Antikainen ir Martin, 2005). Pirmajai šakai priklauso nemažai įvairių atsitiktinės mutagenezės metodų: klaidingoji PGR (angl. *Error-prone PCR*) (Pritchard ir kt., 2005); įsotinta mutagenezė (SeSaM (angl. *Sequence saturation mutagenesis*) (Chen ir kt.,

2012)); mutacijas palaikantys kamienai (angl. *Mutator strains*), kurių pagrindas – *Escherichia coli* XL1-red kamienas, neturintis DNR pažaidų taisymo sistemos (Greener ir kt., 1997; Labrou, 2010); RID (angl. *Random insertion / deletion mutagenesis*) (Murakami ir kt., 2002; Murakami ir kt., 2003; Neylon, 2004), taip pat cheminė ar spinduliuote paremta mutagenezė (Nannemann ir kt., 2011). Šiame darbe plačiau bus aptarta klaidingoji PGR, kadangi būtent ji naudota eksperimentinėje dalyje (1.5.3.1 skyrelis).

Antroji šaka apima metodus, paremtus homologinių ar nehomologinių sekų rekombinacija. Dėl jų įvairovės ir metodikos subtilybių tolimesniuose skyreliuose bus aptarti plačiausiai taikomi šios krypties metodai, didesnę dėmesį skiriant DNR maišymui. Visų šių metodų pagrindinis tikslas – pagerinti egzistuojančių baltymų savybes ir sukurti biokatalizatorius naujoms biosintezės reakcijoms ar naujas medikamentines priemones bei vakcinas (Nannemann ir kt., 2011).

1.5.3.1 Klaidingoji PGR (angl. *Error-prone PCR (epPCR)*)

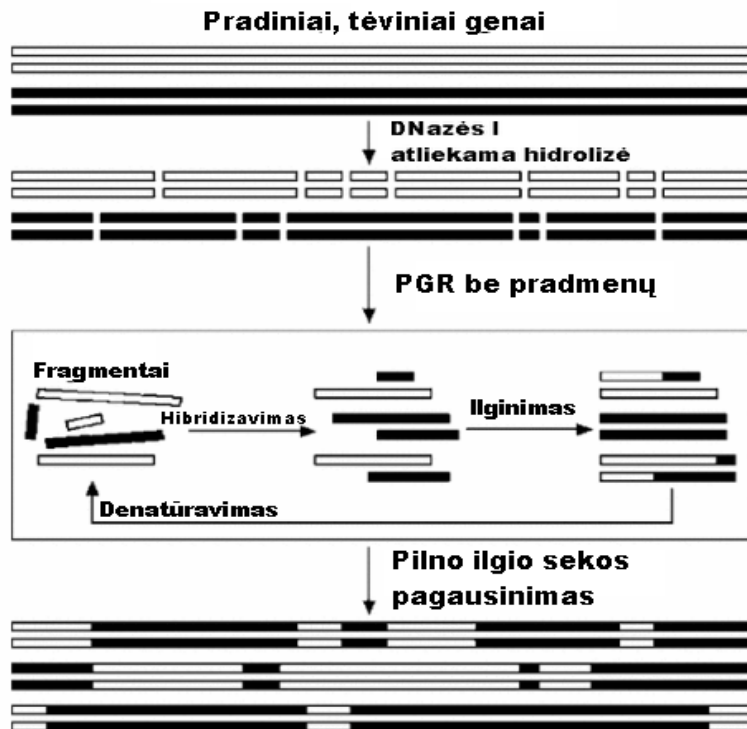
Vienas iš plačiausiai naudojamų nerekombinantinių, atsitiktinių metodų, siekiant padidinti molekulinę įvairovę – klaidingoji PGR (Pritchard ir kt., 2005; Nannemann ir kt., 2011). Jos metu naudojamos ne optimalios PGR sąlygos, siekiant sukurti mutantų biblioteką. Viena iš esminių tokios PGR sąlygų – polimerazės, neturinčios klaidų taisymo aktyvumo, naudojimas. Tokia yra plačiai eksperimentuose taikoma *Thermus aquaticus* (*Taq*) polimerazė. Įprastu atveju *Taq* polimerazė daro klaidas dažniu $0,1 \cdot 10^{-4} - 2 \cdot 10^{-4}$ (Kaur ir Sharma, 2006). Jos daromų klaidų dažnį galima padidinti naudojant didesnę Mg^{2+} koncentraciją (7 mM vietoje įprastos 1,5 mM (Cirino ir kt., 2003)), papildomai į reakcijos mišinį įdėjus Mn^{2+} jonų ar naudojant nevienodą įvairių dNTP koncentraciją (Kaur ir Sharma, 2006; Bornscheuer, 2008). Taip pat galima į reakcijos mišinį įdėti skruzdžių rūgšties, hidrazino (Nannemann ir kt., 2011), karbamido, izopropanolio, butanolio (Kaur ir Sharma, 2006). Esant 7–8 % (v/v) propanolio, mutacijų dažnis yra didesnis nei $9,8 \cdot 10^{-3}$ mutacijų/bp

(Kaur ir Sharma, 2006). Klaidas darančios PGR metodas vis tobulinamas. Vienas iš naujausių pasiūlymų – naudoti sunkųjį D₂O vandenį vietoje įprasto H₂O. Naudojant tokias sąlygas bei Mn²⁺ jonus, pavyko gauti 1,8*10⁻³ klaidų dažnį (Minamoto ir kt., 2012). Klaidingosios PGR metodo privalumas – paprastumas, o trūkumai – gali kauptis nepageidaujamos mutacijos, jas gali riboti aminorūgščių išsidėstymas, naudojamos polimerazės šališkumas. Šio metodo pritaikymo pavyzdžių pateikta 1. 3 lentelėje.

1.5.3.2 DNR maišymas (angl. *DNA shuffling*)

Baltymų inžinerijos vystymuisi didžiulę įtaką padarė DNR maišymo (angl. *DNA shuffling*) metodikos sukūrimas. DNR maišymas – homologinių genų rekombinacijai *in vitro* skirtas metodas, kurį pirmą kartą 1994 m. aprašė W.P.C. Stemmer (Stemmer, 1994ab). Šis metodas ir jo modifikacijos sėkmingai naudojami norint pagerinti fermentų aktyvumą, stabilumą ir susilankstymą, siekiant pakeisti substratinį savitumą (Zhao ir kt., 2002).

Metodo principas gana paprastas. Genai, kurie rekombinuos tarpusavyje, atsitiktinai sukarpomi naudojant deoksiribonukleazę I (DNazę I). Po to 50–100 bp fragmentai išvalomi iš agarozės gelio ir surenkami naudojant PGR. Fragmentai šios reakcijos metu vieni kitiems tarnauja ir kaip matrica, ir kaip pradmenys. Rekombinacija vyksta, kai skirtingų tėvinių genų fragmentai vykstant PGR prilijdomi vienas prie kito vietose, kurios pasižymi dideliu sekų panašumu. Kitas proceso etapas – PGR, kuri atliekama naudojant pradmenis, kurių dėka galima pagausinti pirminius tėvinius genus (Bornsheuer, 2008) (1.7 pav.). Kuriami ir šio metodo pagerinimai, pvz., vietoje DNazės I siūloma naudoti restrikcijos endonukleazes (Kikuchi ir kt., 1999). Pastaruoju atveju gaunamas didesnis hibridinių produktų dažnis.



1.7 pav. DNR maišymo metodo schema (Joern, 2003). Du tėviniai genai (baltos ir juodos juostelės) yra atsitiktinai sukarpomi naudojant DNazę I, siekiant sukurti fragmentų įvairovę. Gauti fragmentai rekombinuoja tarpusavyje PGR metu. Vėliau pilno ilgio geno seka (dydis atitinkantis pradinių, tėvinių genų dydį) yra pagausinama naudojant pradmenis, skirtus tėvinių genų pagausinimui.

DNR maišymo metodika turi ganą platą pritaikymą. Literatūroje pateikiama nemažai pavyzdžių, kai DNR maišymo strategija taikoma vaistų ir vakcinų kūrimui (Patten ir kt., 1997). Tačiau DNR maišymas turi ne tik privalumų (sąlyginai lankstus, pašalinamos neesminės mutacijos), bet ir trūkumų. Vienas iš jų – rekombinacijai gali būti naudojami tik genai, pasižymintys dideliu sekų panašumu (70 % (Valetti ir Gilardi, 2004)). Tačiau baltymams, kurie atlieka panašias funkcijas ir pasižymi didele savo struktūrų homologija, dažnai būdingas labai mažas sekų panašumas. Kiti trūkumai – didelis tėvinių sekų dažnis galutinėje naujų variantų bibliotekoje bei reikalingas gana didelis DNR kiekis (Stemmer, 1994ab; Valetti ir Gilardi, 2004).

Baltymų inžinerijos pavyzdžių literatūroje galima rasti nemažai. Didelė dalis jų susijusi būtent su mikroorganizmų lipazių ir esterazių inžinerija (1.2 lentelė).

1.2 lentelė. Mikroorganizmų lipazių ir esterazių, modifikuotų taikant įvairius baltymų inžinerijos metodus, pavyzdžiai.

Fermentas	Taikytas baltymų inžinerijos metodas	Rezultatas	Autorius
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> lipazė	Klaidingoji PGR; įsotinta mutagenezė	Padidintas enantioatrankumas; 2 kartus padidėjęs amidazinis aktyvumas	Liebeton ir kt., 2000; Fujii ir kt., 2005; Nakagawa ir kt., 2007
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> ir <i>Archaeoglobus fulgidus</i> karboksilesterazės	Klaidingoji PGR	Padidintas enantioatrankumas	Manco ir kt., 2002
<i>Rhizopus oryzae</i> lipazė	Įsotinta mutagenezė	Pakitęs gebėjimas hidrolizuoti įvairius substratus; svarbių veiklai aminorūgščių identifikavimas	Joerger ir Haas, 1994; Klein ir kt., 1997
<i>Rhizopus arrhizus</i> lipazė	Klaidingoji PGR; DNR maišymas	Pagerintas temperatūrinis stabilumas ir padidėjusi optimali veiklos temperatūra	Bornscheuer, 2008
<i>Candida antarctica</i> lipazė B	Klaidingoji PGR, įsotinta mutagenezė	20 kartų pagerintas stabilumas 70 °C temperatūroje	Zhang ir kt., 2003
<i>Pseudomonas marginata</i> cefalosporino esterazė EstB	Klaidingoji PGR	100 kartų pagerintas aktyvumas 35 % DMF	Valinger ir kt., 2007
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> lipazė	Klaidingoji PGR		Reetz, 2000
Metagenominiu būdu gauta lipazė	Klaidingoji PGR ir Taikiniui specifinė mutagenezė	Kai kurių mutantų padidėjęs temperatūrinis stabilumas	Sharma ir kt., 2014
Karboksilesterazė R.34	Atsitiktinė mutagenezė	Virtimas į lipazę	Reyes-Duarte ir kt., 2005
<i>Candida rugosa</i> lipazė Trx-LIP4	Kepurėlių domenų sukeitimas ir DNR maišymas	Hidrolizinio aktyvumo pokyčiai, pakitęs enantioatrankumas	Akoh ir kt., 2004

1.2 lentelė (tęsinys (1)). Mikroorganizmų lipazių ir esterazių, modifikuotų taikant įvairius baltymų inžinerijos metodus, pavyzdžiai.

Fermentas	Taikytas baltymų inžinerijos metodas	Rezultatas	Autorius
<i>Candida rugosa</i> lipazė LIP1	Kepurėlių domenų sukeitimas ir DNR maišymas	200 kartų padidėjęs aktyvumas hidrolizuojant cholesterolio esterius, sumažėjęs enantioatrankumas ir aktyvumas organiniuose tirpikliuose	Brocca ir kt., 2003; Secundo ir kt., 2004
<i>Bacillus subtilis</i> lipA	Klaidingoji PGR	4,5 karto padidintas lipolizinis aktyvumas po L102V, K70N mutacijų	Zhao ir kt., 2009
<i>Bacillus pumilus</i> lipazė	Klaidingoji PGR	6 kartus padidėjęs aktyvumas po S21P, R112G, L124H mutacijų	Huang ir kt., 2008
<i>Proteus vulgaris</i> lipazė	Klaidingoji PGR ir DNR maišymas	3,5 kartus padidėjęs aktyvumas po V102I, G197S, R229H mutacijų	Fang ir kt., 2009
<i>Pseudomonas fluorescens</i> lipazė	Klaidingoji PGR	29 kartus padidėjęs aktyvumas po N8S, S14G ir W72R mutacijų	Jung ir kt., 2003
<i>Rhizopus chinensis</i> lipazė	Klaidingoji PGR	4 kartus padidėjęs aktyvumas po A129S, K161R, A230T, K322R mutacijų	Wang ir kt., 2009
<i>Rhizopus oryzae</i> lipazė	Klaidingoji PGR	5,9 karto padidėjęs aktyvumas po Q128H, Q197L mutacijų	Shibamoto ir kt., 2004
<i>Rhizopus arrhizus</i> lipazė	Klaidingoji PGR ir DNR maišymas	12 kartų padidėjęs temperatūrinis stabilumas 50 °C temperatūroje po A9T, E190V ir M225I mutacijų	Niu ir kt., 2006
<i>Yarrowia lipolytica</i> Lip2	Klaidingoji PGR	127 padidėjęs temperatūrinis stabilumas 60 °C temperatūroje po C244A mutacijos	Bordes ir kt., 2011
<i>Bacillus subtilis</i> lipA	Klaidingoji PGR	Padidėjęs temperatūrinis stabilumas po A15S, F17S, A20E, N89Y, G111D, L14P, A132D, I157M ir N166Y mutacijų	Ahmad ir kt., 2008

1.2 lentelė (tęsinys (2)). Mikroorganizmų lipazių ir esterazių, modifikuotų taikant įvairius baltymų inžinerijos metodus, pavyzdžiai.

Fermentas	Taikytas baltymų inžinerijos metodas	Rezultatas	Autorius
<i>Bacillus subtilis</i> lipA	Klaidingoji PGR ir taikiniui specifinė mutagenėzė	300 kartų padidėjęs stabilumas 55 °C po N66Y, A132D, L114P mutacijų	Acharya ir kt., 2004
<i>Geobacillus thermocatenulatus</i> lipazė	Klaidingoji PGR	Padidėjęs aktyvumas skaidant ilgos grandinės riebalų rūgščių substratus; lipazės virtimas į fosfolipazę	Kaufmann ir Schmidt-Dannert, 2001
<i>Staphylococcus aureus</i> lipazė	Klaidingoji PGR ir DNR maišymas	Padidintas lipazės fosfolipolizinis aktyvumas (6 aminor. mutacijos lėmė 11,6 karto padidėjusį fosfolipolizinį aktyvumą)	Van Kampen ir Egmond, 2000
<i>Bacillus subtilis</i> lipazė	Klaidingoji PGR ir vienos bei kelių vietų įsotinta mutagenėzė	Mezo-1,4-diacetoksi-2 – ciklopenteno hidrolizė susidarant alkoholiams. Pagerintas enantioatrankumas	Funke ir kt., 2003
<i>Bacillus</i> sp. lipazė	Klaidingoji PGR	Padidintas savitasis aktyvumas ir stabilumas	Khurana ir kt., 2011
<i>Pseudomonas</i> sp. lipazė Lip I.3	Sekai įsotinta mutagenėzė	Substratinio savitumo ir aktyvumo pokyčiai	Panizza ir kt., 2014
<i>Pseudomonas fluorescens</i> esterazė	Mutacijas palaikantys kamienai; klaidingoji PGR	Padidintas stereoaatrankumas	Henke ir Bornscheuer, 1999
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LST-03 lipazė	Taikiniui specifinė mutagenėzė	Pagerintas stabilumas organiniuose tirpikliuose	Kawata ir Ogino, 2010
<i>Pseudomonas fragi</i> lipazė	Klaidingoji PGR	5 kartus padidėjęs stabilumas 42 °C temperatūroje po R127G, R152H, D2Y, H30N mutacijų	Lafranconi ir kt., 2008
<i>Candida antarctica</i> lipazė	DNR maišymas	11 kartų pagerėjęs stabilumas 45 °C temperatūroje po A281E, V221D mutacijų	Suen ir kt., 2004

Pateikti pavyzdžiai rodo, kad mikroorganizmų lipazių ir esterazių tyrimai – vis dar perspektyvi ir mokslininkų dėmesio neprarandanti sritis.

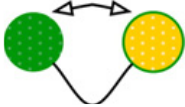
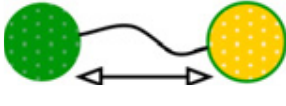


1.5.4 Sulietų chimerinių baltymų kūrimo principai ir svarba

Viena naujausių kryptų baltymų inžinerijoje – daugiafunkcinių chimerinių baltymų kūrimas (George ir Heringa, 2002). Dviejų ar daugiau baltymų domenų suliejimas gali padidinti fermento bioaktyvumą ar sukurti naujas funkcijų kombinacijas. Tai svarbu tiek biotechnologiniu, tiek biofarmaciniu požiūriu (Ostermeier ir Benkovic, 2000; Yu ir kt., 2015). Kuriant sulietus baltymų variantus gali būti pagerinamas tikslinių fermentų katalizinis aktyvumas bei gebėjimas prisijungti substratus, didinamas stabilumas, sintezės efektyvumas, sumažinamos gamybos procesų finansinės sąnaudos. Sulieti baltymai gali būti kuriami taikant dvi strategijas: arba genetiškai suliejamas atviras skaitymo rėmelis (ASR) ir nuskaitomas chimerinis baltymas, arba baltymai suliejami vykstant potransliaciniam procesams. Dažniausiai du baltymai suliejami sujungiant du ASR genetiniame lygmenyje (vieno baltymo C-galas sujungiamas su kito baltymo N- galu) ir susidaro vienas bendras iRNR transkriptas, koduojantis vieną polipeptidą. Tokios konstrukcijos polipeptidą galima sukurti dviem būdais. Vienas jų – naudojant persidengiančius pradmenis ir PGR, kada galutinis polipeptidas neturi jokių papildomų aminorūgščių. Kitas – taikyti tradicinę strategiją, paremtą dviejų genų kirpimu ta pačia restrikcijos endonukleaze ir ligavimu (Elleuche, 2015).

Kuriant sulietus baltymus galima ir trečia strategija, kada du, tarpusavyje jungiami baltymai, yra atskiriami peptidu, vadinamu jungtuku (George ir Heringa, 2002; Arai ir kt., 2004). Jungtukai padeda užtikrinti sujungtų baltymų lankstumą ir sumažina erdvinius trikdžius (Gokhale ir Khosla, 2000). Naudojami ilgi jungtukai lemia didesnę sujungtų baltymų lankstumą, tačiau tokie regionai gali būti jautresni proteazių poveikiui. Taigi jungtukų ilgį kiekvienu atveju reikia optimizuoti. Jungtukai teigiamai veikia baltymo stabilumą ir domeno-domeno sąveikas (George ir Heringa, 2002).

Jungtukų, naudojamų dviejų skirtingų baltymų sujungimui tarpusavyje, tyrimų pradžia – 1990 m. (Argos, 1990). Yra skiriami du jungtukų tipai: spiraliniai ir nespiraliniai jungtukai. Spiraliniai jungtukai, manoma, veikia kaip griežti dviejų domenų erdviniai skyrikliai. Nespiraliniai jungtukai yra turtingi Pro aminorūgštimi. Tai lemia struktūrinį nelankstumą ir jungtuko izoliaciją nuo prijungtų domenų. Abiejų tipų jungtukai veikia kaip pastoliai, neleidžiantys susidaryti nepageidaujamoms sąveikoms, lankstantis keliems skirtingiems domenams (George ir Heringa, 2002). Jungtukų tipai ir jų savybės pateiktos 1.3 lentelėje, o ryškiausi chimerinių sulietų fermentų pavyzdžiai – 1.4 lentelėje. Svarbu paminėti, kad yra tik keli literatūros šaltiniai, aprašantys chimerinius sulietus lipoliziniu aktyvumu pasižyminčius fermentus.

1.3lentelė. Jungtukų skirstymas ir pagrindinės būdingos savybės (Sabourin ir kt., 2007; Chen ir kt., 2013).

Jungtukas	Jungtuko grafinis išsidėstymas	Taikymas-privalumai	Būdingos savybės	Pavyzdžiai
Lankstus		Sąveika tarp domenų; efektyviai veikia reikalingas domenų judėjimas erdvėje	Turtingi mažomis ar hidrofilinėmis a.r.	„GS“ jungtukai: (GGGS) _n , (G) _n , (G) ₈
		Padidina erdvinį atstumą tarp domenų ir leidžia veiksmingą jų erdvinį atskyrimą		
Nelankstus		Palaiko atstumą tarp dviejų domenų	Spiralinės struktūros arba turtingi Pro	(EAAAK) _n , (XP) _n
Kerpami <i>in vivo</i>		Leidžia <i>in vivo</i> atskirti kelis domenų	Redukuojami arba fermentiškai kerpami	Formuojami disulfidiniai tilteliai arba proteazėms jautri seka; - LEAGCKNF FPR↓SFTSC GSLE

1.4 lentelė. Sulietų fermentų pavyzdžiai.

Sulietas fermentas	Mikroorganizmas, kurio baltymai sulieti	Naudotas jungtukas	Autorius
Fermentai, skirti hemiceliuliozės skaidymui			
Arabinofuranozidazė/ ksilanazė/ksilozidazė	Komposto metagenomas/ <i>Clostridium thermocellum</i> / <i>Thermoanaerobacter</i> sp.	ALNNSIGVLGVSPSAKLAIGPMYN QVYQYPN ALNNSIGVLGVSPSAGGGGADPA IGPMYNQVYQYPN	Fan ir kt., 2009
Feruloil esterazė- endoksilanazė	<i>Aspergillus niger</i>	GSTYSSGSSSGSGSSSSSTTKATS TTLKTTSTSSGSSSTAA	Levasseur ir kt., 2005
Sulieti fermentai, skirti celiuliozės skaidymui			
Celiuliazė-β- gliukozidazė	<i>Thermotoga maritima</i>	-	Hong ir kt., 2007
β-1,4- endogliukanazė-β- 1,4-gliukozidazė ir atvirkščiai	<i>Paenibacillus</i> sp. MTCC 5639	GS jungtukai: GGGGSGGGGS, pavadintas (G4S) ₂ ir GGGGSGGGGSGGGGS, pavadintas (G4S) ₃	Adlakha ir kt., 2012
Celiulosominė endogliukanazė- celiulosominė egzogliukanazė arba ne celiulosominė egzogliukanazė	<i>Clostridium thermocellum</i> / <i>Clostridium cellulovorans</i> ir atvirkščiai	-	Lee ir kt., 2011
Sulieti fermentai, dalyvaujantys hemiceliuliozės ir celiuliozės skaidyme			
Celiuliazė-ksilanazė ir atvirkščiai	<i>Paenibacillus</i> sp. MTCC 5639	GS jungtukas: GGGGSGGGGS	Adlakha ir kt., 2011
Endogliukanazė- endoksilanazė ir atvirkščiai	<i>Fervidobacterium gondwanense</i> /metagenominis mikroorganizmas ir atvirkštinis darinys	VDKTKYTAS	Rizk ir kt., 2015
Celiuliazė-ksilanazė ir atvirkščiai	<i>Thermotoga maritima</i>	-	Hong ir kt., 2006
β-gliukanazė- ksilanazė	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> / <i>Bacillus subtilis</i>	-	Lu ir kt., 2006
β-gliukanazė- ksilanazė	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> / <i>Bacillus subtilis</i>	(GGGGS) _n ; (EAAAK) _n ; geriausias variantas - (GGGGS) ₂	Lu ir kt., 2008
GH11 endo-1,4-β- ksilanazė - GH43 β- ksilozidazė	<i>Bacillus subtilis</i>	-	Diogo ir kt., 2014
Kiti sulieti baltymai, turintys lipazės domeną			
Celiuliazė A ir lipazė B	<i>Neocallimastix patriciarum</i> ir <i>Candida antarctica</i>	Jungtukai, sudaryti iš 4-44 aminorūgščių liekanų	Gustavsson ir kt., 2001
Lipazė ir celiuliozės prijungiantis domenas	<i>Geobacillus</i> sp. T1	-	Qin ir kt., 2014a

Pateikti pavyzdžiai rodo, kad duomenų apie sulietus lipoliziniu aktyvumu pasižyminčius fermentus yra labai nedaug. Tai suteikia pagrindo tokių biokatalizatorių kūrimui bei analizei.

1.5.5 Lipazių ir esterazių C-galinių domenų įtakos fermentų veiklai tyrimai

Svarbu aptarti ir fermentų C-galinių domenų tyrimus. 2015 m. J. Kamoun su bendraautoriais parodė, kad *Yarrowia lipolytica* LIP8 lipazė po sekrecijos į aplinką netenka ne tik N- signalinio peptido, bet ir 33

aminorūgščių C-galinėje dalyje. Taip pat buvo įvertinta C-galinio regiono, kurį sudaro dvi lygiagrečiai išsidėsčiusios β klostės, įtaka *Serratia marcescens* lipazės (SML) veiklai (Mohammadi ir kt., 2015). Dar keli darbai, susiję su C-galinio regiono svarba mikroorganizmų lipazių veiklai – *Staphylococcus epidermidis* AT2 lipazės analizė (Kamarudin ir kt., 2014), *Saccharomyces cerevisiae* lipazės Tg13p tyrimai, kurie parodė, kad šios lipazės C-galiniame regione yra išsidėsčiusios septynios aminorūgštys, kurios yra kritinės baltymo stabilumui ir funkcionalumui (Koch ir kt., 2014) bei K. S. Hung ir bendraautorių darbas (2011), parodęs, kad C-galinis regionas yra svarbus *Candida rugosa* lipazės aktyvacijai. Svarbu paminėti, kad didžioji dalis tokio pobūdžio darbų, yra paskelbti 2014–2015 m., taigi šioje disertacijoje nagrinėjama C-galinių aminorūgščių įtaka *Geobacillus* sp. 95 kamieno lipazės veiklai yra vienas iš tokių darbų pionierių.

1.6 Praktinis lipazių ir esterazių pritaikymas

Termofilinių mikroorganizmų sintetinami fermentai vis dažniau naudojami pramonėje (Van den Burg, 2003; Haki ir Rakshit, 2003). Vienos svarbiausių pramoninėje biotechnologijoje naudojamų fermentų grupių – lipazės ir esterazės (Houde ir kt., 2004). Jos naudojamos maisto, pieno, ploviklių gamyboje, raceminių mišinių skaidyme, naujų paviršiaus aktyviųjų medžiagų ir vaistų sintezėje, aliejų ir riebalų biokonversijoje, detergentų gamyboje, biokatalizėje, organinėje sintezėje (Villeneuve ir kt., 2000; Drauz ir Waldmann, 2002; Gupta ir kt. 2004; Bornscheuer ir Kazlauskas, 2006). Aukštas regio- ir enantiosavitumas, stabilumas organiniuose tirpikliuose, nereiklumas kofaktoriams lėmė, kad lipazės tapo svarbios stereosavimų biokatalizatorių gamyboje, organinės chemijos pramonėje (Jaeger, 1998; Jaeger ir kt., 1999; Bornscheuer ir Kazlauskas, 2006; Lotti ir Alberghina, 2007). Lipazės ir esterazės atlieka svarbų vaidmenį natūralių medžiagų ar pramoninių teršalų degradacijoje. Jos dalyvauja grūdų likučių, plastiko, toksinių chemikalų perdirbime. Agrochemijos srityje esterazės ir lipazės naudojamos insekticidų, pesticidų gamyboje (Gupta ir kt., 2004). Be to,

esterazės ir lipazės naudojamos kvėpalų ir antioksidantų sintezėje (Jaeger ir Reatz, 1998; Gupta ir kt., 2004; Panda ir Gowrishankar, 2005).

Populiariausi pramoninių lipazių producentai yra *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. coagulans*, *G. stearothermophilus*, *B. alcalophilus*, *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas multivorans*, *P. cepacia*, *Staphylococcus caseolyticus*. Svarbios ir kitų organizmų išskiriamos lipazės: *Rhizopus* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Geotrichum* sp., *Mucor* sp., *Rhizomucor* sp., *C. rugosa*, *Candida tropicalis*, *C. antarctica* ir kt. lipazės (Treichel ir kt., 2010). Žymiausi pramoninių lipazių gamintojai pasaulyje – „Novozymes“ (Danija), „Amano Enzyme Inc“ (Japonija), „Biocatalysts“ (Jungtinė karalystė), „Unilever“ (Nyderlandai) ir „Genencor“ (JAV). Nors lipazių ir (ar) esterazių producentų paklausa didelė, pramonei augant naujų efektyvių biokatalizatorių paieška, kūrimas ir tobulinimas išlieka mokslininkų tyrimų objektu.

1.6.1 Lipazių pritaikymas optiškai grynų junginių gavybai

Lipazės ir esterazės svarbios optiškai grynų junginių sintezėje. Jas bandoma pritaikyti 1,2-*O*-izopropilideno glicerolio (IPG;) gamyboje. IPG yra svarbi pradinė medžiaga tokių junginių kaip glicerolfosfolipidų, prostaglandinų, PAF (trombocitų agregacijos faktorius) sintezei (Araujo ir kt., 2009). Apie bakterijų lipazių pritaikymą IPG gamybai jau rašyta 1997 metais (Jaeger ir kt., 1997). Taip pat aprašytas *Pseudomonas* sp. *GXU56* lipazės gebėjimas enantioatrankiai skaidyti (R,S)-metilmigdolų rūgšties esterius į R-migdolų rūgštį. Migdolų rūgštis ir jos enantiomerai yra vertingi junginiai, naudojami įvairių medikamentų sintezėje. Migdolų rūgštis gali būti β-laktaminių antibiotikų (pusiau sintetinių penicilinų, cefalosporinų) gamybos pirmtakas (Wei ir Wu, 2008).

Lipazės taip pat yra naudojamos enantiomeriškai gryno (*S*)-indanofano gamyboje, kuris naudojamas kaip herbicidas ryžių laukuose. Tik (*S*)-enantiomeras pasižymi herbicidiniu aktyvumu (Jaeger ir Eggert, 2002). Taip

pat lipazės taikomos atskiriant priešūždegiminį preparatą (S)-naprokseną. Tuo tarpu naprokseno (R)-enantiomeras pasižymi toksiškumu (Zhang ir kt., 2002).

1.6.2 Detergentų gamyba

Detergentų gamyba – viena iš pagrindinių lipazių taikymo sričių (Anobom ir kt., 2014). Lipazių pritaikymas detergentų gamyboje susijęs su riebalų likučių pašalinimu skalbiant, plaunant indus ar valant paviršius. Tam reikalingos lipazės, kurios pasižymėtų mažu savitumu substratams ir taip galėtų pašalinti įvairios prigimties riebalus. Kitas reikalavimas – atsparumas griežtoms skalbimo sąlygoms (pH 10–11 ir 30 °C–60 °C). Be to, naudojami fermentai turi būti stabilūs, kadangi įvairūs ploviklių priedai, tokie kaip natrio perborato tetrahidratas (angl. *Sodium perborate tetrahydrate*), natrio karboksimetil-celiuliozė, NaOH, linijinis šarminis benzeno sulfonatas ar proteazės sukelia cheminę denatūraciją ar proteolizinį skilimą (Hasan ir kt., 2010; Niyonzima ir More, 2015). Lipazių į buitinių ploviklių sudėtį dedama siekiant sumažinti sintetinių cheminių ploviklių naudojimą, kadangi jie sukelia daug aplinkosaugos problemų (Hasan ir kt., 2010; Paiva ir kt., 2000). Detergentų gamyboje naudojami „Lipolase“ (*Humicola lanuginosa*; Novozymes), „Lumafast“ (*Pseudomonas mendocina* lipazė) ir „Lipomax“ (*Pseudomonas alcaligenes*; Gist-Brocades), „Lipofast“ (Advanced Biochemicals, Indija) produktai (Hasan ir kt., 2010; Anobom ir kt., 2014).

1.6.3 Lipazių taikymas maisto pramonėje

Esterazės ir lipazės pritaikomos vadinamoje aliejaus chemijoje (riebalų ir aliejų hidrolizė); naudojamos atliekant riebalų modifikacijas (sintetinant kakavos sviesto pakaitalus); sviesto riebalų lipolizei (riebalų tirpinimui); norint pagerinti sūrio skonį, paspartinti jo brendimą; sūrio pakaitalų (sūrio miltelių, produktų, turinčių sūrio skonį) ir fermentais modifikuoto sūrio (EMS) gamybai. EMS suteikia produktams koncentruotą skonį, padidindamas jo intensyvumą 15–30 kartų, todėl yra naudojamas kaip prieskonis gaminant įvairius padažus, sriubas, užkandžius (Saxena ir kt., 1999; Houde ir kt., 2004).

Reguliuojant sūrio gamybos procesą pieno riebalai yra hidrolizuojami lipolizės metu išlaisvinant laisvas riebalų rūgštis. Per didelę lipolizę daro įtaką sūrio tekstūrai ir gali suteikti nepageidaujamą skonį. Inkapsuliuotos lipazės reguliuoja fermento/substrato komplekso susidarymo greitį ir padeda išvengti šios problemos (Houde ir kt., 2004).

Svarbus asimetrinių triacilglicerolių mišinys – kakavos sviestas. Jį galima gauti iš palmių aliejaus pasinaudojant lipazių katalizuojama peresterinimo reakcija. Pramonėje kakavos sviesto gamybai naudojamos 1,3-regiosavitumu pasižyminčios lipazės. Lipazės naudojamos ir kitų, dietinių savybių turinčių, struktūrinių triacilglicerolių sintezei. Juos gaminant naudojama lipazių katalizuojama acidolizės reakcija (Saxena ir kt., 1999).

2-feniletanolheksanoatas ir 2-feniletanoloktanoatas – esteriai, plačiai naudojami gaminant kakavos kremą, romą, vyną. Šiuos junginius taip pat galima gauti lipazių vykdomų reakcijų pagalba (Tan ir kt., 2011).

1.6.4 Biodyzelino sintezė

Lipoliziniu ir esteraziniu aktyvumu pasižymintys fermentai yra puiki alternatyva rūgštiniais ir baziniais cheminiais katalizatoriams, naudojamiems biokuro sintezei. Viena iš biokuro rūšių – biodyzelinas. Terminas „biodyzelinas“ nurodo ilgos grandinės riebalų rūgščių monoalkil-esterius, kurie savo fizikinėmis ir cheminėmis savybėmis yra panašūs į tradicinį dyzeliną. Toks biodyzelinas yra gaunamas vykstant peresterinimo reakcijoms, kuriose dalyvauja triacilgliceroliai (daugiausia augalinės kilmės riebalai) ir trumpos grandinės alkoholiai (plačiausiai naudojamas metanolis), o lipazės yra šių reakcijų biokatalizatoriai. Fermentais paremtas peresterinimas reikalauja mažiau energijos sąnaudų lyginat su chemine katalize. Taip pat, priešingai nei bazinės cheminės katalizės metu, gali būti naudojami substratai, turintys laisvų riebalų rūgščių (Dror ir kt., 2015; Canet ir kt., 2016).

Viena iš pagrindinių problemų, susijusių su lipazių naudojimu biokuro gamyboje, yra didelė metanolio koncentracija, kuri gali nulemti fermento slopinimą. Dėl šios priežasties svarbios metanolyje stabilios lipazės. Taikant baltymų inžinerijos strategijas buvo sukurtas *G. stearotherophilus* T6 lipazės mutantas H86Y/A269T/R374W, kuris išliko stabilus 70 % metanolyje 324 min. ir pasižymėjo 87 kartus didesniu stabilumu nei pradinė lipazė. Taip pat tokia lipazė pademonstravo didesnę biodyzelino išeią lyginant su komercinėmis Lipolase100L ir Novozyme CALB lipazėmis (Dror ir kt., 2014; Dror ir kt., 2015).

Peresterinimo reakcijos, kuriose dalyvauja lipazės, yra tinkamos biodyzelino gamybai ir dėl galimybės lengviau atskirti glicerolį, kuris yra biokuro gamybos proceso pagrindinis šalutinis produktas (Anobom ir kt., 2014). Pagrindinė kliūtis, norint pritaikyti šią sistemą dideliais mastais, yra lipazių gamybos kaina. Norint sumažinti sąnaudas, galima imobilizuoti ląstelinius biokatalizatorius ar panaudoti genų bei baltymų inžinerijos technologijas (Fukuda ir kt., 2001). Šiuo metu lipazių imobilizavimo tyrimai, kaip ir fermentų savybių gerinimas taikant baltymų inžinerijos metodus, yra vienas iš objektų, siekiant pagerinti biokuro gamybos efektyvumą (Lima ir kt., 2015; Lopresto ir kt., 2015; Manoel ir kt., 2015; Raita ir kt., 2015).

Biolubrikantai – dar viena pramonės sritis, kurioje galima sėkmingai taikyti lipoliziniu ir (ar) esteraziniu aktyvumu pasižyminčius fermentus. Biolubrikantus galima gauti iš metil-ricinoleato (ricinos aliejaus biodyzelis) bei iš metil-oleato ir linoleato mišinio (Anobom ir kt., 2014).

1.6.5 Lipazės kosmetikoje ir parfumerijoje

Kosmetikos priemonių gamyboje lipazių taikymas remiasi trumpo grandinės riebalų rūgščių esterų sinteze ar peresterinimo reakcijomis. Tokie esteriai įeina į valymo, minkštinimo priemonių sudėtį, suteikia produktams kvapą ar spalvą. Tokių esterų pramoninė vertė siekia 200 mlrd. eurų, tad ir efektyvūs jų gavybos procesai yra labai svarbūs (Gupta ir kt., 2015). Tokių

trumpagrاندžių kosmetikos pramonėje taikomų esterių pavyzdžiai gali būti geranilacetatas, izoamilacetatas (bananų kvapas) ir izoamilbutiratas, benzilpropionatas, butilacetatas (ananasų kvapas) ir butilbutiratas. Butiloleatas ir butyllaureatas gali būti naudojami kaip lubrikantai (Anobom ir kt., 2014; Gupta ir kt., 2015). *C. rugosa* lipazė sėkmingai pritaikyta rožių kvapą suteikiančių esterių – 2-feniletilacetato sintezei (Kuo ir kt., 2014).

Monoacilgliceroliai (MAGs) ir diacilgliceroliai (DAGs) – paviršiaus aktyviosios medžiagos, kurios maisto, vaistų ir kūno priežiūros produktuose naudojamos kaip emulsikliai (Sharma ir kt., 2011). Fermentinė glicerolizė padeda išvengti cheminės glicerolizės sukeliama neigiamo poveikio, tokio, kaip tamsi nepageidaujama spalva ir kvapas. Taip pat aukštoje temperatūroje, kurioje vykdoma cheminė glicerolizė, gali degraduoti naudingos medžiagos (Anobom ir kt., 2014; Sangeetha ir kt., 2011).

Dar vienas lipazių privalumas – gebėjimas skirti raceminius reakcijų tarpininkus. *P. cepacia* yra naudojama skaidyti raceminį rožių oksidą, kuris gaminamas vykstant bromo metoksilinimo reakcijai iš raceminio ir neraceminio terpeno alkoholio – citronelolo (Sangeetha ir kt., 2011). Citronelilacetatas ir citronelilpropionatas naudojami parfumerijoje, norint suteikti rožių kvapą (Athawale ir kt., 2003). Kitas lipazių pagalba gaunamo produkto pavyzdys – hidrocina mono rūgšties esteriai, naudojami kvėpalų ir preparatų, saugančių nuo odos nudegimų saulėje, gamyboje. Burnos higienos priemonės ir skutimosi kremai turi mentolio, kuris suteikia pipirmėčių aromatą ir šaldantį pojūtį. Mentolis gali būti gaunamas esterinimo reakcijos metu trūkstam natūralaus mentolio. 2006 m. patentuotas procesas, kurio metu yra gaunamas mentolio esteris ir kiti panašūs produktai, naudojant *P. fluorescens* ir *P. cepacia* lipazes (Sangeetha ir kt., 2011).

Kosmetikoje ir farmacijoje taip pat svarbi yra lipazių vykdoma riebalų rūgščių fruktozės esterių sintezė. Riebalų rūgščių cukraus esteriai yra nejoninės paviršiaus aktyviosios medžiagos, kurių galima rasti dantų pastose, losjonuose,

šampūnuose ir lūpų dažuose. Fruktozės esteriai gali būti naudojami kaip antibakterinės medžiagos, kurios stabdo *Streptococcus mutans* (pagrindinė dantų karieso priežastis) augimą (Sabeder ir kt., 2006). Lipazės yra svarbios gaminant izopropilmiristatą, izopropilpalmitatą ir 2-etilheksilpalmitatą, kurie naudojami kaip minkštinančios, raminančios medžiagos asmens priežiūros produktuose (saulės įdegio kremai, prausimosi aliejai ir kt.). Retinoidai taip pat turi platų pramoninį taikymą odos priežiūros priemonių gamyboje. Vandenyje tirpus retinolio junginiai yra gaunami reakcijos, kurią katalizuoja imobilizuotos lipazės, metu. Kosmetikoje lipazės taip pat įeina į vietinio poveikio anticeliulitinius kremus bei geriamuosius vaistus (Hasan ir kt., 2010).

Apibendrinant galima teigti, kad lipazių ir esterazių pritaikymo spektras vis plečiasi: jos taikomos nuo organinės chemijos iki kosmetikos, parfumerijos ir maisto pramonės, todėl labai svarbu surasti efektyvius lipoliziniu aktyvumu pasižyminčių fermentų producentus. Šie fermentai turėtų pasižymėti tam tikromis pH, aktyvumo ir stabilumo tikslinėse temperatūrose, substratinėmis ir kt. savybėmis, kurios leistų juos pritaikyti pramoninėje biotechnologijoje. Vienas iš tokių fermentų šaltinių – *Geobacillus* genties bakterijos, o baltymų inžinerija – didelį potencialą turinti sritis, galinti padėti sukurti idealiomis savybėmis (didesniu temperatūriniu aktyvumu, stabilumu, atsparumu organiniams tirpikliams ar slopikliams, paprastesniu gryninimu, didesne išeiga ir t.t.) pasižyminčius baltymus.

2. Medžiagos ir metodai

2.1 Naudoti bakterijų kamienai, vektoriai, terpės bei substratai

- **Kamienai, darbe naudoti kaip lipazių ir / ar esterazių genų donorai:**
Geobacillus sp. 28, 66, 76 ir 95 kamienai (VU GMF Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedros kolekcija).
- **Kamienai, darbe naudoti kaip lipazių ir / ar esterazių genų recipientai:**
 - a) *Escherichia coli* DH5 α : ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA*-argF) U169 *recA1 endA1 hsdR17 phoA supE44 gyrA96 λ -thi-1 relA1* (Invitrogen)
 - b) *E. coli* BL21 (DE3): *hsdD gal (λ cIts857 indl Sam7 nin5 lacUV-T7* *genas I* (Novagen).
- **Darbe naudoti vektoriai:**
 - a) Klonavimo vektorius pTZ57R/T (InsTAclone PCR Cloning Kit, Thermo Fisher Scientific);
 - b) Raiškos vektorius pET-21c(+) (Novagen).
- **Darbe naudotos kultivavimo terpės:**
 - a) *Geobacillus* sp. 28, 66, 76 ir 95 kamienai genomines DNR skyrimui auginti Luria-Bertani (LB) terpėje: 1 % triptono arba peptono (Merck); 0,5 % mielių ekstrakto (Merck); 0,5 % NaCl (Applichem) (Sambrook ir Rusell, 2001), esant 55–60 °C temperatūrai ir 180 aps./min.
 - b) *E. coli* DH5 α ir *E. coli* BL21 (DE3) transformantai, turintys savyje vektorius su įterptais genais, auginti LB terpėje su ampicilinu (100 μ g/ml; Applichem), esant 30–37 °C 150–180 aps./min.

- c) Vykdamas teigiamų transformantų atranką naudota LB terpė su ampicilinu (100 µg/ml), agaru (1,5 %) (Merck) ir emulguotu tributirinu (0,5 % (tūris/tūryje). Emulguojama ultragarsu 3 min., taikant intervalą 30 sek.:30 sek. (ardymas:šaldymas).
- **Darbe naudoti substratai:**
 - a) Sintetiniai *p*-NP esteriai (Sigma-Aldrich). Pateikiamas anglies atomų skaičius riebalų rūgščių grandinėje bei sisteminis ir nesisteminis pavadinimai: C2 (*p*-NP acetatas;-); C4 (*p*-NP butiratas;-); C6 (*p*-NP heksanoatas; *p*-NP kaproatas); C8 (*p*-NP oktanoatas; *p*-NP kaprilatas); C10 (*p*-NP dekanooatas; *p*-NP kapratas); C12 (*p*-NP dodekanoatas; *p*-NP lauratas); C14 (*p*-NP tetradekanoatas; *p*-NP myristatas); C16 (*p*-NP heksadekanoatas; *p*-NP palmitatas); C18 (*p*-NP oktadekanoatas; *p*-NP stearatas).
 - b) Natūralūs substratai (TCI Europe): C4 (1,3-di (butanoiloksi) propan-2-ilbutanoatas; tributirinas).

2.2 Darbe naudoti pradmenys

Siekiant aptikti genomines DNR vietas, kuriose lokalizuoti esterazių ir (ar) lipazių genai, buvo sukurti GelipF-59, GelipR+179, GSLE-F-41 ir GSLE-R+64 pradmenys (2.1 lentelė). Pradmenys kurti pagal konservatyvias homologines žinomų *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus* ir *G. stearothermophilus* lipazių ir (ar) esterazių genų sekas. Pagausus tikslių genų produktus, atlikus jų sekoskaitą ir analizę *in silico*, buvo sukurti pradmenys Gelip95-43F, Gelip95R, GESTp-31F ir GESTp-23R, su įterptomis *NotI*, *NdeI* ir *SalI* (priklausomai nuo geno) restrikcijos endonukleazių kirpimo vietomis. Šie pradmenys leido tikslinius genus klonuoti tiek į klonavimo (pTZ57R/T), tiek į raiškos (pET-21c(+)) vektorius. Išsami informacija apie darbe naudotus pradmenis pateikta 2.1 lentelėje.

2.1 lentelė. Darbe atitinkamų genų aptikimui ir (ar) naujų genų variantų kūrimui naudoti pradmenys. Restrikcijos endonukleazų kirpimo vietos pabrauktos brūkšneliu; mutacijų į alaniną vietos pažymėtos stačiakampiu. Pradmenys sintetinti Metabion (Vokietija).

Pagausinto geno/ sukurto baltymo pavadinimas	Naudoto pradmens pavadinimas	Naudoto pradmens seka	Įterpta restrikcijos endonukleazės kirpimo vieta	Tikslinio produkto dydis (bp)	Pradmenų T _m (°C)
Lipazių genų paieška	GelipF-59	5'- TTG CCG GGA TTG AAT AGC CTG AT-3'	-	1200	63
	GelipR+179	5'-CTC CCA CCG TCC GTC CCA CTT G-3'	-		70
GD lipazių klonavimas į raiškos vektorių	Gelip95-43-F	5'-TGA AGC <u>GCA TAT</u> GGC AGT TTC ACG CGC CAA-3'	<i>NdeI</i>	1200	73
	Gelip95R	5'-TAG CCG CCG CAG GCC GCA AAC TCG C-3'	<i>NotI</i>		76
R1	Gelip95-43-F	5'-TGA AGC <u>GCA TAT</u> GGC AGT TTC ACG CGC CAA-3'	<i>NdeI</i>	1200	73
	Rev-10-Tyr376Ala+Asp371Ala	5'-TAG CCG CCG CCC GCA <u>AAG</u> <u>CAA</u> AGG CGC GAA <u>TAG</u> CAA ATG-3'	<i>NotI</i>		82
R2	Gelip95-43-F	5'-TGA AGC <u>GCA TAT</u> GGC AGT TTC ACG CGC CAA-3'	<i>NdeI</i>	1200	73
	Rev-10-Tyr376Ala+Phe375Ala	5'-TAG CCG CCG CCC GCA <u>AAG</u> <u>CAG</u> CCG CG-3'	<i>NotI</i>		79
R3	Gelip95-43-F	5'-TGA AGC <u>GCA TAT</u> GGC AGT TTC ACG CGC CAA-3'	<i>NdeI</i>	1200	73
	Rev-10-Asp371Ala	5'-TAG CCG CCG CCC GCA AAT AAA AGG CGC GAA <u>TAG</u> CAA ATG 3'	<i>NotI</i>		80
R4	Gelip95-43-F	5'-TGA AGC <u>GCA TAT</u> GGC AGT TTC ACG CGC CAA-3'	<i>NdeI</i>	1200	73
	Rev-10-Phe375Ala	5'-TAG CCG CCG CCC GCA AAT <u>AAG</u> CCG CGC GAA T 3'	<i>NotI</i>		79
R5	Gelip95-43-F	5'-TGA AGC <u>GCA TAT</u> GGC AGT TTC ACG CGC CAA-3'	<i>NdeI</i>	1200	73
	Rev-10-Tyr376Ala	5'-TAG CCG CCG CCC GCA <u>AAG</u> <u>CAA</u> AGG CGC G-3'	<i>NotI</i>		79
R6	Gelip95-43-F	5'-TGA AGC <u>GCA TAT</u> GGC AGT TTC ACG CGC CAA-3'	<i>NdeI</i>	1200	73
	Rev-10-Phe375Ala+Asp371Ala	5'-TAG CCG CCG CCC GCA AAT <u>AAG</u> CCG CGC GAA <u>TAG</u> CAA ATG-3'	<i>NotI</i>		82
Esterazių genų paieška	GSLE-F-41	5'-GAC GTG GGA GGG GTG GTG GTT TAT-3'	-		69
	GSLE-R+64	5'-TTG GCC GTT CCT TTG TTG GTT TAG-3'	-	1500	64
GDE st-95 klonavimas į raiško vektorių	GE STp-31F	5'-GGG ATA AAG CAT ATG GAA CAA ACC GAT GTT G-3'	<i>NdeI</i>		70
	GE STp-23R	5'-TAG TCG ACG CGT CCT TGC CAT GC-3'	<i>Sall</i>	1500	68
GDE st-est liejinio kūrimas	GE STp-31F	5'-GGG ATA AAG CAT ATG GAA CAA ACC GAT GTT G-3'	<i>NdeI</i>		70
	E st95-Rev-SacI	5'-TAC GAG CTC GCG TCC TTG CCA TGC-3'	<i>SacI</i>		70
	E st95-Forv+SacI	5'-TAG CGA GCT CAT GGA ACA AAC CGA TGT TG-3'	<i>SacI</i>	3000	70
	GE STp-23R	5'-TAG TCG ACG CGT CCT TGC CAT GC-3'	<i>Sall</i>		68
GDLip-lip liejinio kūrimas	Gelip95-43-F	5'-TGA AGC <u>GCA TAT</u> GGC AGT TTC ACG CGC CAA-3'	<i>NdeI</i>		73
	Lip95-Rev+SacI	5'-TAG AGC TCA GGC CGC AAA CTC GC-3'	<i>SacI</i>		68
	Lip95-Forv-SacI	5'-TAG GAG CTC ATG GCA GTT TCA CGC GC-3'	<i>SacI</i>	2400	71
	Gelip95R	5'-TAG CCG CCG CAG GCC GCA AAC TCG C-3'	<i>NotI</i>		76
GDE st-lip liejinio kūrimas	GE STp-31F	5'-GGG ATA AAG CAT ATG GAA CAA ACC GAT GTT G-3'	<i>NdeI</i>		70
	E st95-Rev-SacI	5'-TAC GAG CTC GCG TCC TTG CCA TGC-3'	<i>SacI</i>		70
	Lip95-Forv-SacI	5'-TAG GAG CTC ATG GCA GTT TCA CGC GC-3'	<i>SacI</i>	2700	71
	Gelip95R	5'-TAG CCG CCG CAG GCC GCA AAC TCG C-3'	<i>NotI</i>		76

Kituose darbų etapuose derinant Gelip95-43F tiesioginį pradmenį su atvirkštiniais pradmenimis, leidžiančiais pagausinti GD-95 lipazės geną be 10 C-galinių aminorūgščių ir turinčius Ala mutantinius kodonus tikslinėse vietose,

buvo sukurti R1–R6 mutantai. Kuriant GDEst-lip, GDEst-est ir GDLip-lip fermentus, sulieti genų variantai gauti derinant tarpusavyje įprastus, klonavimui į raiškos vektorių skirtus pradmenis su pradmenimis, turinčiais įterptas *SacI* atpažinimo sritis. DNR maišymo eksperimentuose vykdant PGR su pradmenimis bei klaidingoje PGR naudoti įprasti Gelip95-43-F ir Gelip95R pradmenys. Taip pat norint pagausinti į klonavimo pTZ57R/T ir (ar) raiškos pET-21c(+) vektorius įterptus genus naudoti M13 bei T7 pradmenys (susintetinti Metabion).

2.3 Polimerazės grandininės reakcijos taikymas lipazių ir (ar) esterazių genų paieškai bei sulietų biokatalizatorių kūrimui

Paruošus PGR mišinį (1X *Taq* polimerazės buferinis tirpalas (Thermo Fisher Scientific); po 0,5 μM tiesioginio ir atvirkštinio pradmens; 2 mM dNTP mišinio (po 0,2 mM kiekvieno dNTP); 1,5 mM MgCl₂; 2,5 aktyvumo vnt. rekombinantinės *Taq* polimerazės (Thermo Fisher Scientific) / 100 μl reakcijos tūriui bei vandens iki galutinio reakcijos tūrio), į jį dedama 10 ng tiriamo kamieno išskirtos genomines DNR, plazmidines DNR ar vieno transformanto kolonijos biomasės, jei vykdoma kolonijų PGR. Eksperimentuose naudotos PGR sąlygos: 1) pirminė denatūracija – 95 °C 1–5 min.; 2) denatūracija – 95 °C 1 min.; 3) pradmenų prilydymas – 48–65 °C (priklausomai nuo naudojamų pradmenų; 2.1 lentelė) 2 min.; 4) DNR sintezė – 72 °C 3–4 min.; 5) galutinė polimerizacija – 72 °C 7 min. 2–4 stadijos kartotos 29–49 kartus, priklausomai nuo eksperimento.

Pagausinto produkto detekcijai, švarumo įvertinimui ir koncentracijos nustatymui naudota elektroforezė agarozės gelyje (2.4.2). Kolonijų PGR (2.4.6.3), PGR etapas DNR maišymo eksperimentuose (2.4.9.3 ir 2.4.9.4) bei klaidingoji PGR (2.4.10) išsamiau bus aptarti tolimesniuose skyreliuose.

Gauti PGR produktai valyti naudojant PGR valymo rinkinį GeneJET™ PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) ir pateikti sekoskaitai. Sekoskaita atlikta VU Biotechnologijos institute, DNR Sekoskaitos centre.

Vėliau gautos sekos analizuotos naudojant NCBI BLAST ("Basic Local Alignment Search Tool"; National Centre for Biotechnology Information (NCBI)) algoritmą (2.10).

2.4 Genų ir baltymų inžinerija

2.4.1 Genominės DNR skyrimas

Genominės DNR skyrimui *Geobacillus* sp. 28, 66, 76 ir 95 kamienų kultūros augintos skystoje LB terpėje 6–7 val., esant 55 °C temperatūrai ir 180 aps./min. Skyrimas atliktas naudojant genominės DNR skyrimo rinkinį GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) pagal pateiktą standartinį gamintojo protokolą. Genominės DNR švarumas ir kiekis analizuotas taikant elektroforezę agarozės gelyje (2.4.2).

2.4.2 DNR elektroforezė agarozės gelyje

Darbe skirtos genominės DNR (2.4.1), plazmidinės DNR (2.4.6.2), taip pat restrikcinei (2.4.6.2) bei pagausintų PGR produktų (2.3) analizei taikyta elektroforezė agarozės gelyje (0,8 %). Šiam tikslui reikalingas kiekis agarozės (Agarose NEEO Ultra-Qualitat, ROTH) užpilamas 1x TAE (40 mM Tris (Applichem); 20 mM acto rūgšties (Merck); 1 mM EDTA (Applichem)) buferiniu tirpalu ir virinama keletą minučių, kol tirpalas tampa skaidrus ir homogeniškas. Tirpalas vėsinamas iki 40–50 °C temperatūros ir įpilama etidžio bromido (Sigma-Aldrich) iki galutinės 0,5 µg/ml koncentracijos. Tirpalas supilamas į gelio formavimo sistemą, jam sustingus į šulinėlius užnešamas DNR ilgio žymuo ir tiriami mėginiai. Elektroforezė atliekama esant 100 V įtampai apie 30–40 min. Pasibaigus elektroforezei gelis apšviečiamas UV šviesa, analizuojamas bei fotografuojamas (Sambrook ir Rusell, 2001).

DNR dydžio standartais naudoti MassRuler DNA ladder mix, GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific) ir SORPOsize™ DNA Ladder (SORPO).

2.4.3 Tiriamų genų klonavimas į pTZ57R/T klonavimo vektorių

Lipazes ir esterazes koduojančių genų PGR produktų bei kitų šiame darbe sukurtų genetinių konstrukčių pirminiam klonavimui pasirinktas pTZ57R/T vektorius, kuris pasižymi 3'dT ir yra pritaikytas tiesioginiam PGR produktų klonavimui, jei PGR atlikta naudojant *Taq* polimerazę (sukuria 3'-dA gausinamų genų galuose). Klonuojamų genų ir vektoriaus ligavimo sąlygos parinktos pagal gamintojo rekomendacijas (Thermo Fisher Scientific). Prieš transformaciją ligavimo mišinys valomas GeneJET™ PCR Purification Kit rinkiniu pagal pateiktą gamintojo protokolą (Thermo Fisher Scientific).

2.4.4 Gautų genų perklonavimas į pET-21c(+) raiškos vektorių

Po dvigubo pTZ57R/T vektoriaus su įterptu tiriamu genu (ar kelių sulietų genų variantų) karpymo su *NdeI* ir *NotI* restrikcijos endonukleazėmis (Thermo Fisher Scientific) (lipazėms), *NdeI* ir *SalI* (Thermo Fisher Scientific) (esterazei) bei taikant atitinkamus restrikcijos fermentus sulietų fermentų kūrimo atveju (2.1 lentelė), gauti genų fragmentai valomi iš agarozės gelio naudojant GeneJET™ Gel Extraction Kit rinkinį (Thermo Fisher Scientific) ir liguojami į pET-21c(+) vektorių pagal gamintojo rekomendacijas (Novagen). Prieš tai pET-21c(+) vektorius paruošiamas ligavimui: a) vektorius padauginamas *E. coli* DH5α ląstelėse naudojant elektroporacijos metodą (2.4.5 skyrelis); b) atliekamas dvigubas karpymas naudojant *NdeI* ir *NotI* arba *NdeI* ir *SalI* restrikcijos endonukleazes (2.4.6.2); c) defosforilinama veršiuko žarnyno šarminė fosfataze pagal gamintojo rekomendacijas (Thermo Fisher Scientific); d) sukirptas ir defosforilintas vektoriaus fragmentas valomas iš agarozės gelio naudojant GeneJET™ Gel Extraction Kit rinkinį.

Paruoštas pET-21c(+) vektorius ir atitinkamo geno intarpas liguojami 12 val. 4 °C temperatūroje naudojant T4 ligazę. Sąlygos ligavimui parinktos pagal gamintojo rekomendacijas (Thermo Fisher Scientific).

Ligavimo reakcija stabdoma paveikiant ligavimo mišinį 10 min. 65 °C temperatūra ir taip inaktyvuojant T4 ligazę (Thermo Fisher Scientific), o paruoštas vektorius su įterptu genu įvedamas į *E. coli* BL21 (DE3) ląsteles elektroporacijos būdu (2.4.5).

2.4.5 Rekombinantinės DNR perkėlimas į *E. coli* DH5α ir (ar) *E. coli* BL21 (DE3) elektrokompetentines ląsteles

Įklonuoti į pTZ57R/T ar pET-21c(+) vektorius tiriamų lipazių, esterazių, bei jų sulieti genų variantai bei genai, gauti po DNR maišymo ir klaidas darančios PGR eksperimentų, buvo įkeliami į elektrokompetentines *E. coli* DH5α ar *E. coli* BL21 (DE3) ląsteles naudojant elektroporacijos metodą. Jo metu mišinys, susidedantis iš elektrokompetentinių ląstelių ir mišinio, kuriuo bus vykdoma transformacija, paveikiamas trumpu (5 ms), bet stipriu (1500–1800 V) elektros lauku. Poveikio metu padidėja ląstelės membranos laidumas ir svetimos DNR molekulės gali patekti į ląstelę (Li ir Lin, 2011). Į 40 μl elektrokompetentinių ląstelių dedama 2 μl DNR mišinio. Ląstelės perkeliama į atšaldytą ir paruoštą elektroporacijai kiuvetę, kuri statoma į elektroporacijos aparatą. Po poveikio į kiuvetę pilama iki 1 ml SOC terpės (2 % peptono; 0,5 % mielių ekstrakto; 0,05 % NaCl; 2,5 mM KCl (Merck); 20 mM gliukozės (ROTH); 10 mM MgCl₂ (Merck); 10 mM MgSO₄ (Merck)). Gautas po transformacijos mišinys perkeliama į mėgintuvėlį ir inkubuojamas 1 val 37 °C temperatūroje (Sambrook ir Rusell, 2001). Po inkubacijos transformantų ląstelės glaistymo metodu paskirstomos ant teigiamų transformantų atrankai skirtos terpės (2.4.6.1).

Elektrokompetentinės *E. coli* DH5α ir BL21 (DE3) ląstelės ruoštos pagal Sambrook ir Rusell (2001) metodiką.

2.4.6 Teigiamų transformantų atranka

2.4.6.1 Baltų / mėlynų kolonijų atrankos sistema ir terpė su substratu tributirinu

Po elektroporacijos (2.4.5) *E. coli* DH5 α ląstelės glaistymo metodu išsėjamos ant agarizuotos LB terpės, turinčios 100 $\mu\text{g/ml}$ ampicilino, emulsinto tributirino (0,5 %), IPTG (200 $\mu\text{g/ml}$; Thermo Fisher Scientific) ir X-gal (20 $\mu\text{g/ml}$; Thermo Fisher Scientific). IPTG aktyvuoja į pTZ57R/T vektoriaus sudėtį įeinančio *lac* promotoriaus veiklą, kuris lemia *lacZ*, koduojančio β -galaktozidazę, raišką. Į vektorių įsistačius reikiamai DNR sekai, β -galaktozidazės genas sugadinamas ir gaunamos baltos rekombinantinių *E. coli* ląstelių kolonijos. DNR neįsiterpus, užauga mėlynos spalvos kolonijos (Sambrook ir Rusell, 2001). Lėkštelės inkubuojamos 37 °C temperatūroje iki 24 val. Teigiami transformantai identifikuojami, remiantis užaugusiomis baltomis kolonijomis ir skaidrių zonų susidarymu aplink jas (jei įsiterpęs lipazės ir (ar) esterazės genas ir jo koduojamas fermentas yra sintetinamas, vyksta substrato hidrolizė). Skaidrių zonų susidarymas rodo pakankamą lipazių genų raišką ir baltymo sekreciją į aplinką (Quintana-Castro ir kt., 2009).

E. coli BL21 (DE3) ląstelių ir pET-21c(+) vektoriaus sistemos atveju teigiami transformantai atrenkami naudojant LB terpę su ampicilinu ir tributirinu, kaip nurodyta anksčiau.

2.4.6.2 Karpymas restrikcijos endonukleazėmis

Norint patikrinti, ar atrinkti teigiami transformantai turi transformuotą į juos vektorių su klonuojamu genu, iš jų skirtos plazmidės naudojant plazmidžių skyrimo rinkinius GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific) arba Zippy™ Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research). Skyrimas atliktas pagal gamintojų rekomendacijas. Išskirtos plazmidės analizuotos verčiant jas į linijinę formą karpant su *Xba*I (Thermo Fisher

Scientific) restrikcijos endonukleaze (37 °C, 1 val.) bei atliekant dvigubą karpymą su *NdeI* ir *NotI* fermentais (lipazėms bei GDEst-lip sulietam variantui) (37 °C, 1–16 val.) ir su *NdeI* bei *SalI* fermentais (esterazėms ir sulietam dviejų esterazių variantui). Toks dvigubas karpymas naudotas ir perklonuojant tikslinius genus iš pTZ57R/T vektoriaus į pET-21c(+) plazmidę. Karpymas restrikcijos endonukleazėmis atliktas remiantis gamintojų nurodymais. Po karpymo gauti profiliai analizuoti elektroforezės agarozės gelyje būdu (2.4.2 metodas).

2.4.6.3 Kolonijų PGR

Tikrinant užaugusius transformantus kolonijų PGR metodu (aktualiausias atrenkant transformantus, turinčius reikiamo dydžio insertus DNR maišymo eksperimentuose (2.4.9)), paruošiamas PGR mišinys, kaip nurodyta 2.3 skyriuje, tik vietoj genominės ar plazmidinės DNR įnešama atskirų užaugusių transformantų kolonijų biomasės. PGR atliekama naudojant pradmenis, skirtus tikslinio fragmento pagausinimui (2.1 lentelė), arba pradmenis, leidžiančius pagausinti bet kurią į naudojamą plazmidę įterptą geną (M13 arba T7 pradmenys). PGR sąlygos parenkamos, remiantis pradmenų lydymosi temperatūra ir gausinamo geno dydžiu. Kolonijų PGR metu taip pat atliekama ilgesnė pirminė denatūracija (5 min.).

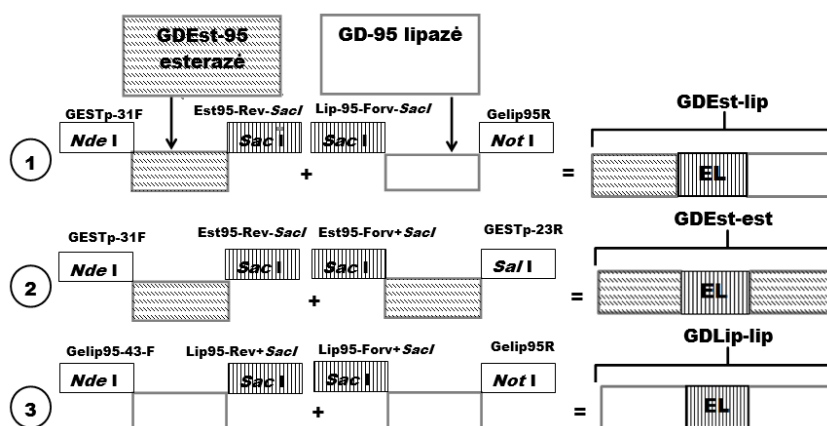
2.4.7 GD-95-10 Ala mutantų kūrimas

Mutantiniai GD-95-10 lipazės R1–R6 variantai sukurti naudojant atitinkamus pradmenis (2.1 lentelė), sukonstruotus, remiantis GD-95-10 lipazės geno seka. Kadangi į Ala keičiamos aminorūgštys yra išsidėsčiusios arti GD-95-10 lipazės C-galo, pakanka vieno pradmens su įvesta mutacija (-omis), kad PGR metu naudojant tiesioginį pradmenį (skirtą pagausinti *Geobacillus* lipazių genams) ir atvirkštinį pradmenį (Asp371, Phe375 ir Tyr376 koduojantys kodonai pakeisti į GCT (koduoja alaniną)) būtų pagausinamas pilnas GD-95-10 lipazės genas su atitinkamomis pakaitomis. pET-21c(+) plazmidė, turinti įterptą GD-95-10 lipazės geną, naudota kaip matrica PGR metu. Po mutantinių

genų pagausinimo kiekvieno naujo mutantinio geno seka pateikta sekoskaitai. R1–R6 genų klonavimo į pTZ57R/T ir į pET-21c(+) darbai bei perkėlimas į *E. coli* DH5α ir *E. coli* BL21 (DE3) ląsteles atlikti kaip aprašyta 2.4 skyriuje. Teigiamų transformantų atrankai ir įvertinimui taikyti 2.4.6 pateikti metodai, o tikslinių naujų fermentų sintezės analizė ir gryninimas atlikti, kaip nurodyta 2.5.1 ir 2.5.2 skyriuose, atitinkamai. Savybių analizė atlikta, kaip pateikta 2.7.

2.4.8 Sulietų chimerinių biokatalizatorių kūrimas

Chimeriniai sulieti biokatalizatoriai kurti remiantis GD-95 lipazės ir GDEst-95 esterazės genų sekomis. Pirmiausia GD-95 lipazę koduojantis genas pagausintas PGR būdu naudojant Lip-95-Forv-*SacI* ir Gelip95R pradmenis, o GDEst-95 esterazę – GESTp-31F ir Est95-Rev-*SacI*. Kuriant GD_{Lip-lip} sulietą fermentą GD-95 lipazės genai pagausinti naudojant Gelip95-43-F ir Lip95-Rev+*SacI* bei Lip95-Forv-*SacI* ir Gelip95R pradmenų poras. Konstruojant GDEst-est liejinį naudotos GESTp-31F ir Est-Rev-*SacI* bei Est-Forv+*SacI* ir GESTp-23R pradmenų poros (2.1 pav.).



2.1 pav. Sulietų lipazių ir (ar) esterazių kūrimo schema. EL – jungtukas, atsirandantis *Sac I* restrikcijos endonukleazės kirpimo vietoje. Sekos virš laukelių su nurodytomis restrikcijos endonukleazėmis žymi atitinkamus pradmenis.

Vėliau sukirpus pagausintus genų produktus su atitinkamomis restrikcijos endonukleazėmis ir sujungus genus tarpusavyje, gauti sulieti genų variantai.

2.4.9 DNR maišymas

DNR maišymo strategija susideda iš kelių pagrindinių etapų: homologinių genų sekų karpymo DNaze I, fragmentų išskirstymo taikant elektroforezę agarozės gelyje, atrinktų 50–200 bp dydžio fragmentų valymo, savaiminio PGR ir PGR, naudojant pradmenis, kurios metu yra pagausinamas tėvinio geno dydžio produktas.

2.4.9.1 PGR produktų karpymas DNaze I ir sąlygų optimizavimas

Vykdamas DNR maišymo eksperimentus vienas svarbiausių etapų yra karpymo su DNaze I (Thermo Fisher Scientific) optimizavimas. Kaip matrica naudoti GD-95, GD-66 ir GD-28 lipazių genų PGR produktai. Po PGR pagausinti šių genų produktai išvalyti naudojant GeneJET™ PCR Purification Kit, produktai sumaišyti lygiu santykiu ir naudoti karpymui DNaze I. Reakcijos tirpalas susideda iš 1x buferinio tirpalo (100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 2,5 mM MgCl₂, 0,1 mM CaCl₂) (Thermo Fisher Scientific); 10 mM MnCl₂ (Thermo Fisher Scientific); varijuojantis kiekis DNazės I ir PGR mišinio iki pasirinkto reakcijos tūrio (10–50 µl). Šiame darbe buvo optimizuotas vykdomos reakcijos laikas ir tūris, temperatūra, naudojami DNazės I aktyvumo vienetai, reakcijos stabdymo sąlygos. Kiekvienu atveju gautas rezultatas vertintas vykdant elektroforezę agarozės gelyje (2.4.2). Tikslas – gauti 50–200 bp dydžio fragmentus. Po karpymo DNaze I gauti 50–200 bp dydžio fragmentai valomi iš 2 % agarozės gelio naudojant GeneJET™ Gel Extraction Kit rinkinį.

2.4.9.2 Savaiminis fragmentų susirinkimas taikant PGR

2.4.9.2 etape išvalyti 50–200 bp dydžio fragmentai naudoti kaip matrica ir pradmenys savaiminėje PGR. Reakcijos mišinys susideda iš 10x *Taq* polimerazės buferinio tirpalo; 2 mM dNTP mišinio; 1 mM MgCl₂; 1,25 U *Taq* polimerazės / 50 µl reakcijos tūriui; 20 µl išvalytų fragmentų ir vandens iki galutinio tūrio. Naudotos PGR sąlygos pateiktos 2.3 skyrelyje (fragmentų

prilydymui parinkta 50 °C temperatūra, 2–4 etapai atlikti 45 kartus). Produkto susidarymas nustatomas atliekant elektroforezę 0,8 % agarozės gelyje (2.4.2).

2.4.9.3 Hibridinio geno pagausinimas PGR metu naudojant pradmenis

Po savaiminio PGR (2.4.9.3) pagausinti produktai naudoti antrojoje PGR. Reakcijos mišinio sudėtis tokia pati, kaip pateikta 2.3, tik vietoje genomines ar plazmidines DNR naudojamas po savaiminio PGR gautas produktas (apie 20 µl). Vandens kiekis reakcijos mišinyje koreguojamas priklausomai nuo naudojamo PGR produkto kiekio. Pilno ilgio geno pagausinimui naudoti Gelip95-43-F ir Gelip95R pradmenys. Rezultatai analizuoti taikant elektroforezę agarozės gelyje (2.4.2). Pagausintas tėvinio dydžio geno produktas klonuojamas į pTZ57R/T klonavimo (2.4.3), o vėliau į pET-21c(+) raiškos (2.4.4) vektorius ir analizuojamas jo koduojamas naujas baltymas.

2.4.10 Klaidingoji PGR

Klaidingosios PGR mišinio sudėtis analogiška įprastinės PGR mišinio sudėčiai (2.3), išskyrus didesnę Mg^{2+} koncentraciją (4 mM vietoje 2 mM pirmojoje klaidingojoje PGR ir 6 mM – antrojoje). Įdėjus $MgCl_2$, galutinis reakcijos tūris palaikomas įnešant mažesnę tūrį dist. H_2O . Tokiu pačiu būdu galutinis reakcijos tūris palaikomas ir į reakcijos mišinį papildomai pridėjus $MnCl_2$ (2 mM).

2.5 Rekombinantinių baltymų sintezė, gryninimas ir analizė

2.5.1 Optimalių sąlygų tikslinių fermentų sintezei nustatymas

E. coli BL21 (DE3) transformantai, turintys pET-21c(+) plazmidę su įterptu lipazės ir (ar) esterazės genu bei sulietais jų genų variantais auginti LB terpėje su ampicilinu (100 µg/ml) per naktį 37 °C 180 aps./min. Šviežia terpė, turinti tokią pačią ampicilino koncentraciją, inokuliuojama 1 % naktinės

kultūros. Pradinis OT_{595} turi būti 0,02–0,03. Kultūra auginama tokiomis pačiomis sąlygomis kaip prieš tai, kol OT_{595} pasiekia 0,4. Tuo metu įdedama IPTG induktoriaus taip, kad galutinė jo koncentracija būtų 0,5–1 mM. Kas valandą nuo indukcijos pradžios vertinamas augančios kultūros optinio tankio pokytis ir imami indukuotų ir neindukuotų kultūrų pavyzdžiai taip, kad ląstelių kiekis laiko momentu, kada įpilama IPTG, ir analizuojamą valandą (1–8 val. nuo indukcijos pradžios) būtų vienodas. Ląstelės surenkamos centrifuguojant maksimaliu greičiu 30 sek. ir užpilama 100 μ l 4x neredukuojančio užnešimo buferinio tirpalo (50 mM Tris-HCl pH 6,8; 10 % glicerolio (Applichem), 2 % NDS (ROTH); 0,02 % bromfenolio mėlynojo (Sigma-Aldrich)), naudojamo NDS-PAGE. Kaip neigiama kontrolė naudojama kultūra, nepaveikta IPTG. Surinkti mėginiai analizuojami 12 % Tris-glicino NDS-PAGE lyginant baltymų profilius indukcijos ir įprastomis sąlygomis (Shi ir kt., 2010). Tirpalai elektroforezei parinkti pagal Laemmli buferinių tirpalų ir gelių sistemą (Laemmli, 1970). Baltymų molekulinės masės standartais naudoti PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific) arba Pierce Unstained Protein MW Marker (Thermo Fisher Scientific). Elektroforezė vykdoma esant 15 mA srovės stipriui. Kai bromfenolio dažas pereina koncentruojantį gelį įtampa padidinama iki 30 mA. Elektroforezei pasibaigus, baltymų gelis vizualizuojamas dažant PageBlue™ baltymų dažymo tirpalu pagal gamintojų rekomendacijas (Thermo Fisher Scientific).

Lyginant gautus baltymų profilius parenkama optimali IPTG koncentracija (0,5 ar 1 mM) ir indukcijos laikas (1–8 val.), kada vyksta intensyviausia tiriamų fermentų sintezė.

2.5.2 Tiriamų fermentų gryninimas naudojant imobilizuotų nikelio jonų giminingumo chromatografiją

Visi šiame darbe tiriami (natyvūs ar baltymų inžinerijos metodais sukurti) fermentai buvo klonuoti taip, jog C-gale turėtų prikabintą šešių His liekanų seką. Ši seka leidžia išgryninti klonuojamus baltymus jau per vieną

gryninimo etapą, taikant imobilizuotų metalų jonų giminingumo chromatografiją. Šiame darbe buvo taikyta imobilizuotų nikelio jonų giminingumo chromatografija, naudojant Profinity™ IMAC (BIO-RAD) dervą, kuria užpildyta Econo-Pac (BIO-RAD) chromatografinė kolonėlė.

2.5.2.1 Fermentų gryninimas nedematūruojančiomis sąlygomis

Gryninimui *E. coli* BL21 (DE3) transformantai, turintys pET-21c(+) plazmidę su įterptu tiksliniu genu, auginti LB terpėje su ampicilinu (100 µg/ml) (2.5.1 skyrelis). Sintezės indukcija vykdoma nustatytais optimaliomis sąlygomis (parinktas laikas ir IPTG koncentracija) (2.5.1). Ląstelės surenkamos tuo laiko momentu, kada nustatytas didžiausias tikslinio baltymo kiekis. Vėliau jos centrifuguojamos 15 min., 8000 x g, plaunamos 50 mM Tris-HCl buferiniame tirpale (pH 8), vėl nucentrifuguojamos, suspenduojamos anksčiau minėtame buferiniame tirpale ir ardomos ultragarsu 15 min. naudojant 10 sek. : 20 sek. (ardymas : šaldymas) intervalą. Po ardymo mėginys centrifuguojamas 15 min., 20000 x g. Gautas tirpalas filtruojamas ir naudojamas gryninimui. Gryninimas atliekamas pagal gamintojo rekomendacijas (BIO-RAD) su nežymiais pakeitimais, gryninimui naudojant 50 mM Tris-HCl buferinį tirpalą (pH 8), kuriame varijuoja imidazolo (Sigma-Aldrich) koncentracija. Imidazolo koncentracija plovimo buferyje – 10 mM, eliacijos – 250 mM. Chromatografijos metu gautose frakcijose esančių baltymų homogeniškumas analizuojamas naudojant 12 % NDS-PAGE ir zimografijos metodus (2.5.1 ir 2.6.1 metodai). Baltymų koncentracija nustatyta matuojant biofotometru OT₂₈₀ (Eppendorf). Lipolizinis aktyvumas frakcijose įvertintas spektrofotometriniu būdu (2.6.2 metodas).

2.5.2.2 Fermentų gryninimas demetatūruojančiomis sąlygomis

Gryninimui demetatūruojančiomis sąlygomis, *E. coli* BL21 (DE3) transformantai, turintys pET-21c(+) plazmidę su įterptu tiksliniu genu auginti LB terpėje su ampicilinu (100 µg/ml) kaip aprašyta 2.5.1 skyrelyje. Po ląstelių surinkimo centrifuguojant ir ardymo ultragarsu, kaip nurodyta 2.5.2.1,

baltyminis preparatas centrifuguojamas 15 min., 20000 x g. Ant gautų nuosėdų (įterptiniai netirpūs kūneliai ir ląstelių nuolaužos) užpilama 200 µl 50 mM Tris-HCl buferinio tirpalo (pH 8), turinčio 6M karbamido (Applichem). Preparatas inkubuojamas kambario temperatūroje vieną valandą. Vėliau baltyminis preparatas centrifuguojamas 10 min., 20000 x g, filtruojamas ir naudojamas tikslinių fermentų gryninimui nikelio giminingumo chromatografija denatūruojančiomis sąlygomis. Plovimo ir eliacijos etapuose taikytos tos pačios sąlygos kaip pateikta 2.5.2.1, naudojamus buferinius tirpalus papildžius 6M karbamido. Chromatografijos metu gautose frakcijose esančių baltymų homogeniškumas, koncentracija ir aktyvumas analizuoti kaip nurodyta 2.5.2.1 ir 2.6.2 skyreliuose. Atliekant savybių analizę, mėginiai, kuriuose nustatytas lipolizinis aktyvumas, dializuoti 24 val. 50 mM Tris-HCl buferiniame tirpale (pH 8) tris kartus jį pakeičiant, ir koncentruojami naudojant PEG 35000 (Sigma-Aldrich), taip renatūruojant tikslinius fermentus.

2.5.3 GDlip43 ir GDlip30 lipazių gryninimas iš NDS-PAGE

Norint atskirti po DNR maišymo ir klaidingosios PGR gautas lipazes, naudota eliacija iš NDS-PAGE. Atlikus fermentų gryninimą denatūruojančiomis sąlygomis (2.5.2.2), fermentų frakcijos analizuojamos NDS-PAGE (2.5.1). Po NDS-PAGE vizualizavus baltymų molekulinės masės žymenis ir takelį su tikslinių baltymų mėginiu, iš likusios gelio dalies išpjaunamos atitinkamos horizontalios juostelės, kuriose išsidėstę tiksliniai baltymai. Gelio juostelės dedamos į atskirus mėgintuvėlius, susmulkinamos naudojant stiklinę lazdelę ir užpilama 0,7–1 ml eliacijos buferinio tirpalo (50 mM Tris-HCl, pH 8 / 20 °C; 150 mM NaCl; 0,1 mM EDTA, pH 8). Mėgintuvėliai inkubuojami 24–48 val., 20 °C, purtant. Po to baltyminis tirpalas perkeliamas į naujus mėgintuvėlius ir vertinamas lipolizinis aktyvumas (2.6.2), baltymų koncentracija (2.5.2.1), fermentų grynumas NDS-PAGE ir zimogramoje (2.6.1).

2.6 Lipolizinio aktyvumo įvertinimas

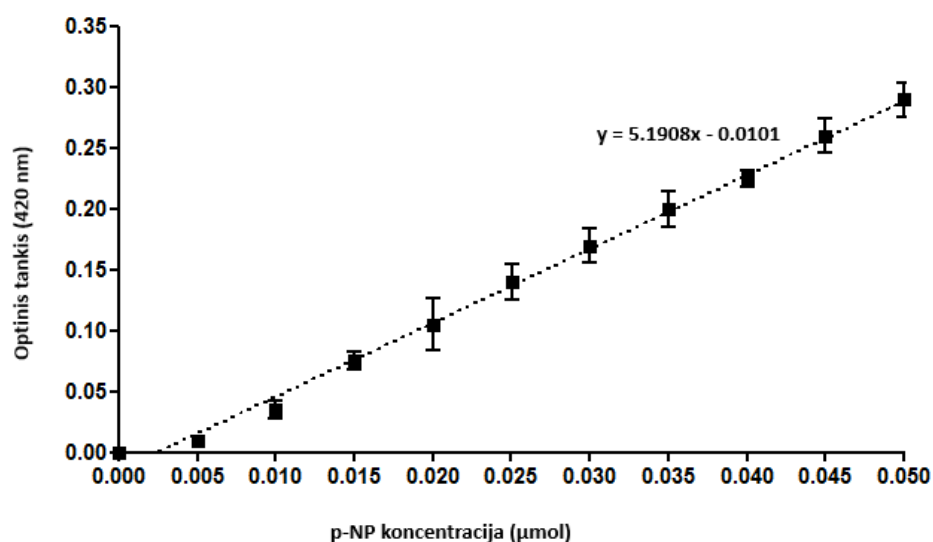
2.6.1 Kokybinis lipolizinio aktyvumo įvertinimas taikant zimografiją

Norint nustatyti, ar po nikelio giminingumo chromatografijos išgryninti baltymai (2.5.2) yra tiksliniai klonuoti fermentai, taikytas zimografijos metodas, tributiriną naudojant kaip lipazių / esterazių substratą. Po 12 % NDS-PAGE gautas gelis dalijamas į dvi dalis. Viena dalis naudojama baltymų dažymui PageBlue™ tirpalu, kita – zimogramai. Zimogramai naudojama gelio dalis plaunama du kartus po 15 min. 50 mM Tris-HCl buferiniu tirpalu (pH 7,8 / 60 °C), turinčiu 20 % izopropanolio (ROTH) ir pakartotinai tris kartus po 15 min. tuo pačiu buferiniu tirpalu, tačiau be izopropanolio (Lewisson ir kt., 2007). Vėliau gelis dedamas į sterilią Petri lėkštelę ir užpilamas agarizuota TB terpe (0,5 % TB; 1,5 % agaru; iki 100 ml Tris-HCl buferinis tirpalas (pH 9 / 60 °C)). Lėkštelė inkubuojama 55–60 °C temperatūroje, kol išryškėja skaidrios zonos, reiškiančios lipolizinį baltymo aktyvumą. Vėliau tokį gelį sulyginus su PageBlue™ dažyta gelio dalimi, galima įvertinti fermento molekulinę masę ir nustatyti, ar po chromatografijos gautas baltymas tikrai yra tikslinis klonuotas lipolizinį ir (ar) esterazinį aktyvumą turintis fermentas.

2.6.2 Kiekybinis lipolizinio aktyvumo nustatymas spektrofotometriiniu būdu

Lipolizinis tiriamų fermentų aktyvumas vertintas spektrofotometriškai (Winkler ir Stuckmann, 1979) substratu naudojant *p*-NP dodekanoatą. Vienas lipazės aktyvumo vienetas apibrėžiamas kaip baltymo kiekis, reikalingas susidaryti 1 μmol *p*-nitrofenolio per 1 min. pasirinktomis reakcijos sąlygomis (Charbonneau ir kt., 2010; Jiang ir kt., 2010). Reakcijos tirpalą sudaro 890 μl glicino (Applichem)-NaOH (Barta a CIHLAR) buferinio tirpalo (50 mM, pH 9), 100 μl *p*-NP dodekanoato (2,5 mM, tirpinta DMSO (Merck)) tirpalo ir 10 μl fermento tirpalo. Sąlygos parinktos ir modifikuotos pagal Charbonneau ir kt.

(2010) ir Zuo ir kt. (2010). Reakcija vykdoma 55 °C temperatūroje 5 min. Toks laikas pasirinktas įvertinus pradinę reakcijos greitį, kai atpalaiduojamo *p*-NP greitis yra linijinis. Reakcija stabdoma įpilant 1 ml 96 % etanolio (Tayyab ir kt., 2011). Prieš įpilant fermentinio tirpalo, reakcijos mišinys inkubuojamas 55 °C 10 min. *p*-NP susidarymas įvertinamas matuojant OT₄₂₀, o kiekis μM apskaičiuojamas pagal standartinę kreivę, gautą naudojant žinomas *p*-NP koncentracijas (2.2 pav.) (Alfa Aesar) (Charbonneau ir kt., 2010).



2.2 pav. *p*-NP standartinė kreivė. Kvadratai žymi eksperimentinius duomenis, taškinė linija – krypties linija. Taip pat grafike nurodyta krypties linijos lygtis.

Visi matavimai pakartoti ne mažiau kaip tris kartus, norint gauti statistiškai patikimus įverčius.

2.7 Tikslinių lipoliziniu aktyvumu pasižyminčių fermentų fizikinių ir cheminių savybių analizė

2.7.1 Temperatūros įtaka tikslinių fermentų aktyvumui ir stabilumui

Temperatūrinis veiklos diapazonas bei optimali tiriamų tikslinių fermentų veiklai temperatūra nustatyta vykdant reakciją, aprašytą 2.6.2 skyrelyje, įvairiose temperatūrose nuo 5 °C iki 90 °C. Prieš įpilant fermento tirpalo, reakcijos mišinys (sudėtis pateikta 2.6.2) inkubuojamas tiriamoje temperatūroje 10 min. Atsižvelgiant į naudojamų substratų mažėjantį stabilumą

didėjant temperatūrai, kontrolinis mėginys (reakcijos mišinys be fermentinio tirpalo) inkubuojamas lygiagrečiai kiekvieno eksperimento atveju.

Tiriamų fermentų stabilumas įvairiose temperatūrose nustatytas vertinant liekamąjį aktyvumą. Fermentinis tirpalas inkubuojamas tiriamoje temperatūroje (30–80 °C) 30 min. (Jiang ir kt., 2010; Kim ir kt., 1998). Vėliau vykdoma įprastinė reakcija sąlygomis, pateiktomis 2.6.2 skyrelyje.

2.7.2 pH įtaka tikslinių fermentų aktyvumui

pH veiklos diapazonas bei optimalus tiriamų fermentų veiklai pH nustatytas vykdant reakciją, aprašytą 2.6.2 skyrelyje, naudojant skirtingo pH buferinius tirpalus (pH 5–12). Dėl naudojamų substratų didėjančio nestabilumo, kylant pH vertėms, lygiagrečiai visų eksperimentų atveju inkubuotas kontrolinis mėginys be fermento tirpalo. Naudoti šie buferiniai tirpalai: 50 mM acetatinis buferis (pH 4–6 / 55 °C) (natrio acetatas; Merck); 50 mM fosfatinis buferis (pH 7 / 55 °C) (KH₂PO₄; AnalaR); 50 mM Tris-HCl (pH 8 / 55 °C); 50 mM glicino-NaOH buferis (pH 9–11 / 55 °C) ir 50 mM Na₂HPO₄ (Merck)/NaOH buferis (pH 11–12 / 55 °C).

2.7.3 Substratinio savitumo įvertinimas

Optimalus tiriamų fermentų veiklai substrato ilgis nustatytas vykdant reakciją, aprašytą 2.6.2 skyrelyje, tačiau kitų eksperimentų atveju naudotas glicino-NaOH (50 mM, pH 9) buferinis tirpalas šiuo atveju buvo pakeistas į fosfatinį buferį (50 mM, pH 7), siekiant sumažinti trumpagrandžių substratų savaiminį skilimą. Matavimai atlikti naudojant skirtingo ilgio *p*-NP esterius, pateiktus 2.1 skyrelyje. Kaip kontrolė naudotas reakcijos mišinys be fermento tirpalo.

2.7.4 Detergentų įtakos tikslinių fermentų aktyvumui nustatymas

Norint nustatyti detergentų (Tween 20, 40, 60 ir 80 (Merck), Triton X-100, karbamidas) įtaką tiriamų fermentų aktyvumui fermento tirpalas

inkubuojamas 30 min. kambario temperatūroje su 0,1 % kiekvienos medžiagos (Li ir Zhang, 2005; Bisht ir kt., 2014). Po inkubacijos liekamasis fermentinis aktyvumas įvertinamas įvykdant 2.6.2 aprašytą reakciją. Kontrolinė reakcija vykdyta su baltymo, nepaveikto detergentu, mėginiu.

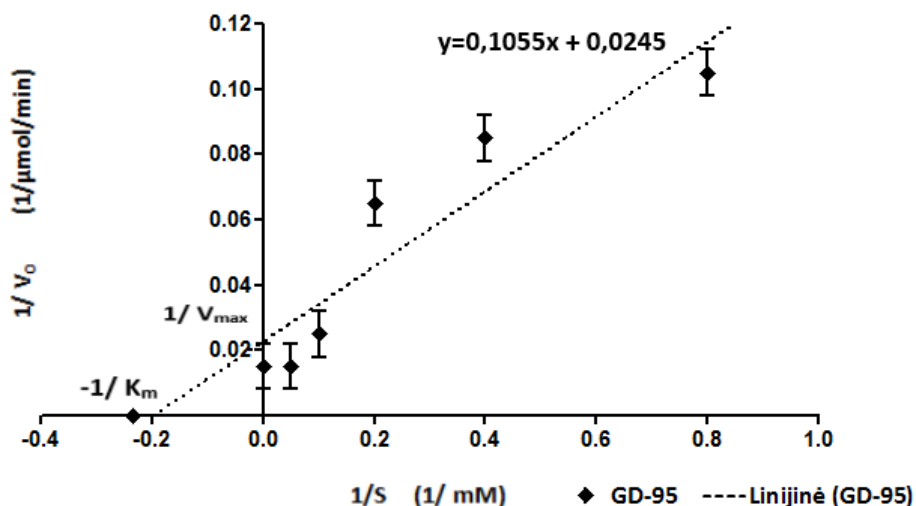
2.7.5 Organinių tirpiklių įtakos tikslinių fermentų aktyvumui nustatymas

Siekiant nustatyti organinių tirpiklių (DMF (ROTH); DMSO; izopropanolis; etanolis; metanolis (Merck); acetonas (Merck); *n*-butanolis (ROTH)) įtaką tiriamų fermentų aktyvumui fermento tirpalas inkubuojamas 30 min. kambario temperatūroje su 25 % (tūris/tūryje) kiekvienos medžiagos (Ebrahimpour ir kt., 2011). Tokią organinių tirpiklių koncentraciją savo darbuose naudoja ir kiti autoriai (Bisht ir kt., 2014; Masomian ir kt., 2016). Kambario temperatūra pasirinkta norint išvengti papildomo temperatūros poveikio tiriamam preparatui. Po inkubacijos liekamasis fermentinis aktyvumas įvertinamas įvykdant 2.6.2 skyrelyje aprašytą reakciją. Kontrolinė reakcija vykdyta su baltymo, nepaveikto organiniu tirpikliu, mėginiu.

2.8 Tikslinių lipoliziniu aktyvumu pasižyminčių fermentų kinetinių savybių įvertinimas

2.8.1 K_m ir V_{max} konstantų nustatymas

Be fizikinių ir cheminių savybių buvo nustatytos ir tiriamų fermentų pagrindinės kinetinės konstantos K_m ir V_{max} , naudojant skirtingas *p*-NP dodekanoato koncentracijas (1,25–50 mM). Reakcijos sąlygos išlaikytos tokios, kaip aprašyta 2.6.2 skyrelyje. K_m ir V_{max} vertės nustatytos remiantis Lineweaver-Burke grafiku ($1/V_o$ priklausomybė nuo $1/S$) ir darant prielaidą, kad reakcijoms galioja įprasti Michaelis-Menten kinetikos dėsniai (Soliman ir kt., 2007). 2.3 pav. pateiktas grafiko pavyzdys GD-95 lipazės atveju.



2.3 pav. GD-95 lipazės K_m ir V_{max} konstantų nustatymas, remiantis Lineweaver-Burke grafiku. Naudotas substratas – *p*-NP dodekanoatas.

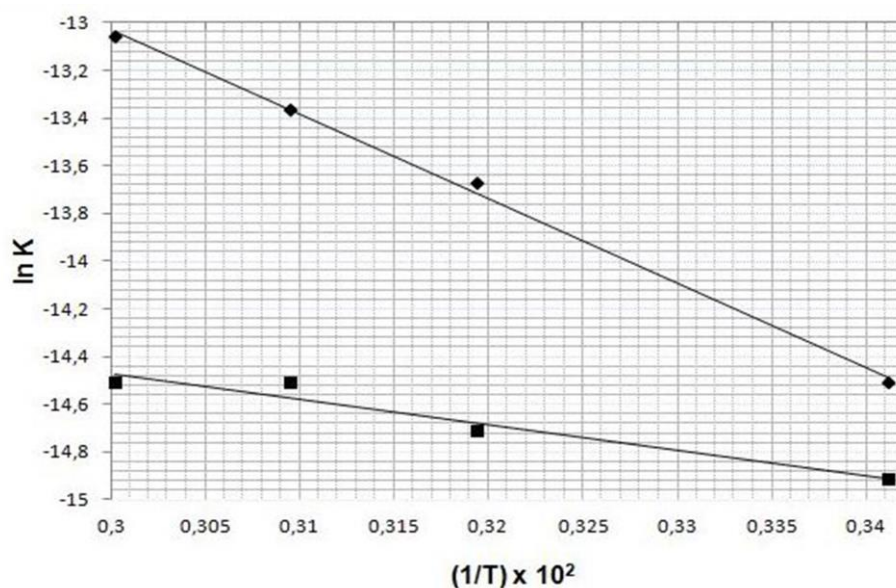
2.8.2 K_{kat} ir katalizinio efektyvumo įvertinimas

Nustačius darbe tiriamų fermentų K_m ir V_{max} vertes, buvo apskaičiuoti K_{kat} ir katalizinio efektyvumo įverčiai. Katalizinė konstanta (K_{kat}) yra lygi V_{max} padalintam iš fermento aktyvių centrų koncentracijos arba substrato molekulių skaičius, kurį viena fermento molekulė paverčia produktu per vieną minutę ar sekundę. Katalizinė konstanta yra fermento veikimo efektyvumo matas. Atsižvelgiant į ją galima spręsti, koku greičiu fermentas katalizuoja reakciją. Apskaičiuojant K_{kat} , taikyta formulė: $K_{kat} = V_{max} / [E]$. Jei tikslinio fermento molekulinė masė 43 kDa, $[E]$ apskaičiuojamas mol iš 1 μ g fermento = 10^{-6} g / $4,3 \cdot 10^4$ g/mol. Katalizinis efektyvumas įvertinamas taikant formulę K_{kat} / K_m (Eisenthal ir kt., 2007).

2.8.3 Aktyvacijos energijos E_a nustatymas

Aktyvacijos energija – minimali energija, reikalinga cheminei reakcijai vykti. Ji paskaičiuojama naudojant Arenijaus lygtį: $k = Ae^{-E_a/RT}$ (k – reakcijos greičio konstanta; Ae – preeksponecinis faktorius, parodantis empirinį ryšį tarp temperatūros ir greičio koeficiento; E_a – aktyvacijos energija; T – temperatūra kelvinais ir R – universali dujų konstanta, lygi $8,314 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$) ar išreiškiant Arenijaus grafiku. Lygtis parodo reakcijos greičio konstantos (k) priklausomybę nuo absoliučios temperatūros (T), o grafike atidedama kinetinės

greičio konstantos (k) logaritmo $\ln(k)$ priklausomybė nuo $1/T$. Nustatant šiame darbe tirtų fermentų aktyvacijos energiją, buvo įvertintas fermentų vykdomų reakcijų greičio konstantos esant 20 °C, 40 °C, 50 °C ir 60 °C temperatūrai, paskaičiuotos $\ln(k)$ vertės, įvertintas gautų tiesių nuolydis ir apskaičiuota E_a . 2.4 pav. pateiktas Arenijaus grafiko pavyzdys GD-95 ir Pre-GD-95 lipazių atveju (Gudiukaitė ir kt., 2014).



2.4 pav. Arenijaus grafikas, skirtas aktyvacijos energijos nustatymui. Grafike pateikti Pre-GD-95 (tamsūs kvadratai) ir GD-95 (rombai) lipazių duomenys; T – temperatūra kelvinais.

2.9 Statistiniai metodai

Vertinant fizikines, chemines bei katalizines tiriamų fermentų savybes eksperimentai kartoti bent tris kartus ir išvesti vidurkiai. 3.4; 3.5; 3.8 ir 3.9 lentelėse bei 3.1; 3.6; 3.9; 3.12; 3.14 ir 3.20 grafikuose pateikiami standartiniai nuokrypiai nuo vidurkio, kurie apskaičiuoti naudojant laisvos prieigos programą <https://www.easycalculation.com/statistics/standard-deviation.php>. Reikšmingi skirtumai tarp tiriamų fermentų apskaičiuoti naudojant dviejų nepriklausomų imčių tarpusavio lyginimui skirtą T-testą (<http://in-silico.net/tools/statistics/ttest>; $\alpha=0.05$; <http://www.socscistatistics.com/tests/studentttest/Default2.aspx>; $\alpha=0.05$). α T-teste nurodo, kelių procentų paklaida galima interpretuojant rezultatus, kada iš tikrųjų skirtumų tarp dviejų imčių

nėra (šiam darbe tokia galima paklaida – 5%). Šiuo atveju, kuo gauta p -vertė mažesnė už 0,05, tuo skirtumas yra reikšmingesnis tarp dviejų lyginamų imčių. Šiame darbe pasirinkta pateikti tik tas p -vertes, kurios yra lygios ar mažesnės už 0,02.

2.10 Analizė *in silico*

Po sekoskaitos gautos genų ir vėliau baltymų sekos analizuotos naudojant Lasergene v7.1 (DNASTAR, JAV) programų paketą, NCBI BLAST algoritmą (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) bei Mega 4.0.2 programą. Signalinio peptido buvimas GD-95 lipazėje ir GDEst-95 esterazėje tikrintas naudojant SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) ir PrediSi (<http://www.predisi.de/predisi/start>) laisvos prieigos programas. Tiriamų fermentų erdvinė struktūra nustatyta naudojant I-TASSER serverį (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) (Zhang 2008), matrica naudojant *G. thermocatenulatus* (2W22) lipazės struktūrą (Carrasco-Lopez ir kt., 2009). Šis serveris plačiai taikomas tretinių struktūrų nustatymui (Yang ir Zhang, 2015; Mukherjee ir kt., 2015; Shamriz ir Ofoghi, 2016; Kanwal ir kt., 2016). Struktūrų vizualizavimui naudota Pymol (DeLano Scientific, Palo Alto, CA, JAV). Galimos sąveikos tarp C-galinių aminorūgščių bei kitų svarbių aminorūgščių nustatytos taikant CAD-score (<http://bioinformatics.ibt.lt/cad-score/>) (Olechnovic ir kt. 2013) įrankį bei CMA (<http://ligin.weizmann.ac.il/cgi-bin/cma/contacts.pl>) (Vehlow ir kt., 2011) serverį. Atstumai Ala mutantuose tarp analizuotų katalizinių aminorūgščių ir kitų *Geobacillus* lipazių veiklai svarbių aminorūgščių nustatyti ir vizualizuoti naudojant RasMol (<http://rasmol.org/>) programą.

3. Rezultatai ir jų aptarimas

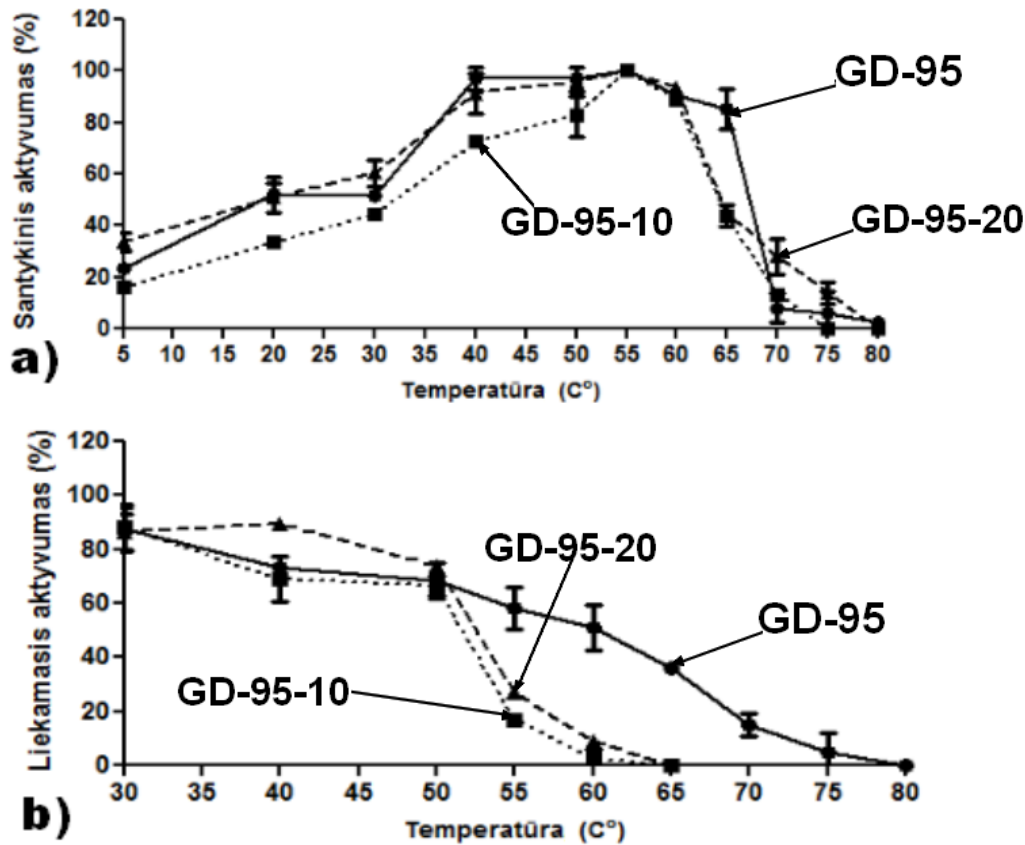
3.1 Asp371, Phe375 ir Tyr376 įtakos GD-95-10 lipazės funkcionalumui nustatymas naudojant Ala skenuojančią mutagenezę

Nors *Geobacillus* genties bakterijų išskiriamos lipazės tiriamos jau seniai, C-galinis regionas ir jame išsidėsčiusių aminorūgščių vaidmuo šių fermentų aktyvumui, teisingam susilankstymui ir gebėjimui vykdyti fermentines reakcijas, iki šiol nebuvo tirtas. Todėl vienas iš disertacijos uždavinių buvo įvertinti C-galinio regiono ir jį sudarančių aminorūgščių įtaką *Geobacillus* lipazių funkcionalumui, modeliu naudojant rekombinantinę *Geobacillus* sp. 95 kamieno lipazę (subrendusio baltymo dydis – 388 a.r. (43 kDa); suteiktas genų banko numeris KC609753; optimalios veikimo sąlygos: 55 °C, pH 9). Nauja informacija, susijusi su *Geobacillus* išskiriamų lipazių struktūros ir funkcijos ryšio nustatymu yra svarbi, kalbant apie vis populiarėjančią sintetinės biologijos mokslo šaką, fermentų kūrimą *de novo* ir galimybę sukurti naujus, geresnėmis savybėmis pasižyminčius biokatalizatorius, kuriuos būtų galima naudoti įvairiose pramonės šakose vietoje cheminių junginių ir taip padaryti pramoninius procesus draugiškesnius aplinkai.

3.1.1 GD-95-10 ir GD-95-20 lipazių analizė

Pirmoji darbų kryptis – *Geobacillus* sp. 95 kamieno išskiriamos GD-95 lipazės ir jos variantų be 10 ir 20 C-galinių aminorūgščių analizė. Buvo iškelta hipotezė, jog C-galiniame regione esančios a.r. gali būti svarbios užtikrinant tinkamą fermento veiklą. Tyrimai parodė, kad GD-95 lipazė, neturinti 10 C-galinių aminorūgščių (GD-95-10) ne tik išlieka funkcionali, bet ir pasižymi panašiu savituoju lipoliziniu aktyvumu (415 U/mg) kaip ir pradinė GD-95 lipazė (400 U/mg). Tuo tarpu GD-95 lipazės be 20 C-galinių aminorūgščių

aktyvumas stipriai krenta (14 U/mg). Didelę įtaką C-galinių aminorūgščių praradimas daro ir baltymo stabilumui aukštose temperatūrose (3.1b pav.), tuo tarpu temperatūrinis veiklos profilis išlieka panašus (3.1a pav.).

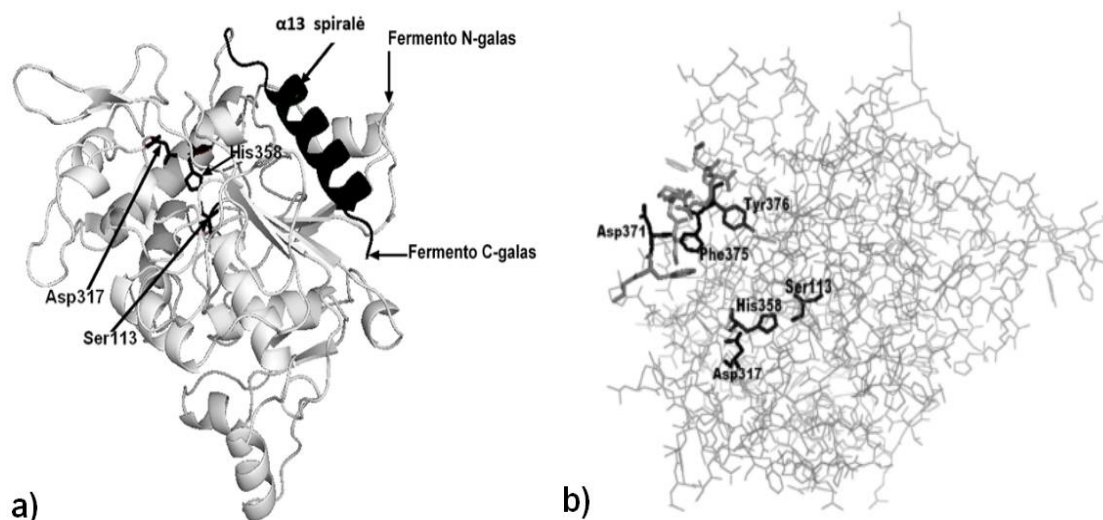


3.1 pav. Temperatūros įtakos GD-95, GD-95-10 ir GD-95-20 lipazių aktyvumui (a) ir stabilumui (b) įvertinimas. GD-95 – tiesi linija su užpildytu apskritimu; GD-95-10 – taškinė linija su užpildytu kvadratu; GD-95-20 – punktyrinė linija su užpildytu trikampiu.

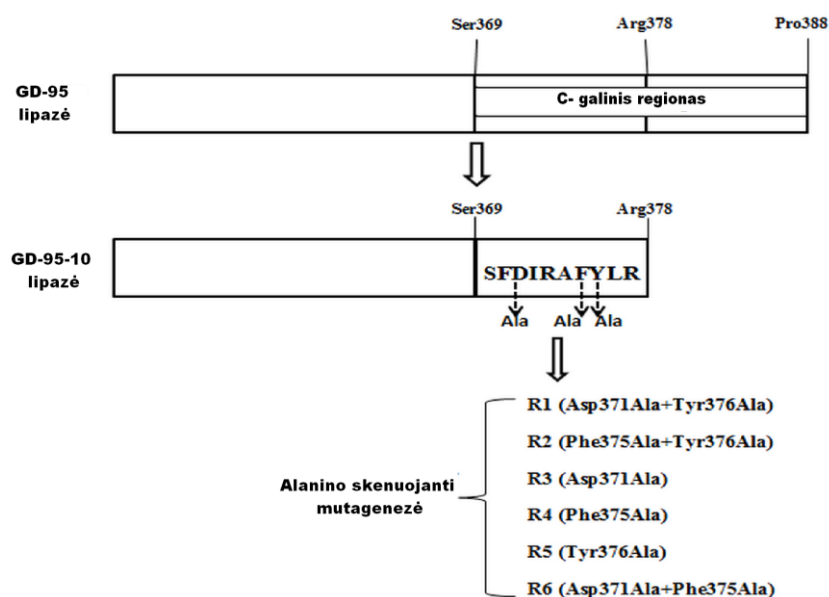
Jau po 30 min. inkubacijos 65 °C temperatūroje GD-95-10 ir GD-95-20 lipazės praranda savo lipolizinį aktyvumą (3.1b pav.). Nors GD-95-20 demonstruoja panašų temperatūrinį veiklos profilį į GD-95 lipazę (3.1a pav.), tačiau, kaip jau buvo minėta anksčiau, šio fermento lipolizinis aktyvumas yra keliasdešimt kartų mažesnis.

Kaip parodė C-galinių aminorūgščių, kurios formuoja α 13 spirale, analizė *in silico*, šiame regione egzistuoja 6 konservatyvios aminorūgštys: Asp371, Phe375, Tyr376, Leu377, Ala378 ir Leu383. Buvo nuspręsta pritaikius vietai savitą mutagenezę pakeisti aromatinės Phe375 ir Tyr376 bei Asp371 aminorūgštis, jų vietoje įterpiant Ala. Pastarosios aminorūgštys yra

mutantai, turintys šias mutacijas: Tyr376Ala+Asp371Ala (R1), Tyr376Ala+Phe375Ala (R2), Asp371Ala (R3), Phe375Ala (R4), Tyr376Ala (R5) ir Phe375Ala+Asp371Ala (R6). Naudoti pradmenys pateikti 2.1 lentelėje, GD-95 lipazės struktūra su pažymėtu C-galiniu regionu bei GD-95-10 lipazės struktūra su a.r., kurios bus keičiamos į Ala, padėtimis pateiktos 3.3 pav. Mutantų kūrimą iliustruoja 3.4 pav.



3.3 pav. GD-95 (a) ir GD-95-10 (b) lipazių struktūra. Struktūros nustatytos naudojant I-TASSER įrankį, vizualizavimui naudota Pymol programa. Juodai (a) pažymėta $\alpha 13$ spiralė, kuri sudaro GD-95 lipazės C-galinę sritį; rodyklės (a) žymi katalizines a.r.; juodos lazdelės (b) žymi Asp371, Phe375 ir Tyr376 a.r., kurios buvo keičiamos į Ala bei katalizines Ser113, Asp317 ir His358 aminorūgštis.



3.4 pav. GD-95-10 lipazės mutantų kūrimo schema.

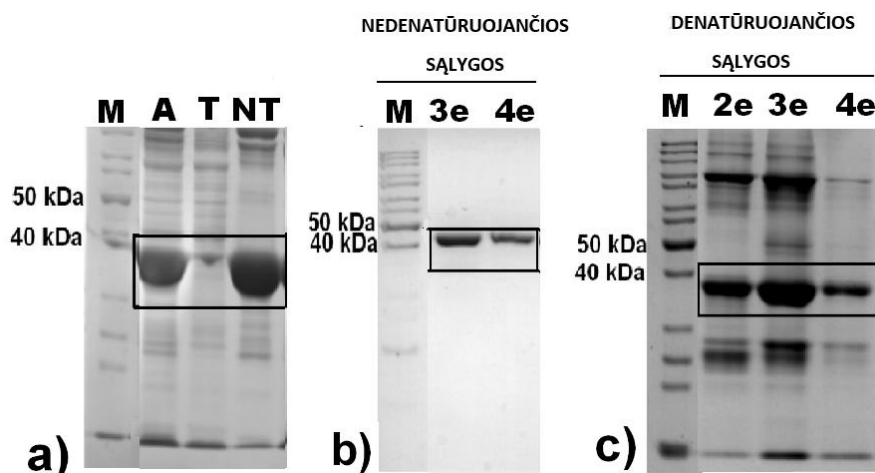
Visi sukurti mutacijas turintys genai pirmiausia klonuoti į pTZ57R/T klonavimo vektorių, vėliau perklonuoti į pET-21c(+) raiškos vektorių, o koduojamų mutantinių lipazių sintezė vykdyta *E. coli* BL21 (DE3) ląstelėse.

3.1.3 GD-95-10 lipazės taškinių mutantų sintezė ir gryninimas

R1–R6 lipazių sintezė *E. coli* BL21(DE3) ląstelėse bei baltymo švarumas po gryninimo naudojant Ni²⁺ jonų giminingumo chromatografiją vertinti naudojant NDS-PAGE ir zimografijos metodus. NDS-PAGE analizė parodė, kad praėjus 2 val. nuo indukcijos pradžios, ląstelėse, kurios buvo paveiktos IPTG, atsiranda didelis ~43 kDa baltymo kiekis. Naujai susidariusių baltymų molekulinė masė sutampa su klonuojamų lipazių molekuline mase. Visų klonuotų lipazių optimalus sintezei laikas nustatytas praėjus 2–3 val. nuo indukcijos pradžios, naudojant 1,0 mM IPTG. Kitų šiame darbe tiriamų baltymų sintezė taip pat geriausiai vyko naudojant 1,0 mM IPTG. Toks pat optimalus sintezės laikas (2–3 val.) ir IPTG koncentracija (1,0 mM) nustatyti tiriant *Bacillus* sp. L2 (Shariff ir kt., 2010), *G. stearothermophilus* P1 (Sinchaikul ir kt., 2001), *Geobacillus* sp. T1 (Leow ir kt., 2004) bei JC (Jiang ir kt., 2010) lipazes. Didesnę IPTG koncentraciją naudoti nerekomenduojama, kadangi ji gali sulėtinti ląstelių augimą ir sumažinti baltymo išeią (Shariff ir kt., 2011).

Visi GD-95-10 lipazės mutantai, taip pat GD-95 lipazė ir jos variantai be 10 ir 20 C-galinių aminorūgščių bei kituose skyreliuose analizuojami baltymai buvo klonuoti be signalinio peptido. Tiek ankstesni rezultatai, gauti tiriant GD-95 lipazę (Gudiukaitė ir kt., 2014), tiek literatūros duomenys (Leow ir kt., 2007; Jiang ir kt., 2010) rodo, kad N- signalinio peptido pašalinimas reikšmingai padidina rekombinantinių *Geobacillus* genties bakterijų lipazių išeią ir aktyvumą. GD-95 lipazės šios vertės pakito nuo 200 U/mg ir 7,5 mg baltymo iš 200 ml kultūros (Pre-GD-95) iki 400 U/mg ir 44,16 mg baltymo iš to paties auginamo kultūros kiekio.

Įvertinus laiko momentą, kada gaunama didžiausia tiriamų baltymų išeiga, *E. coli* BL21 (DE3) ląstelės, turinčios pET-21-lip-mut plazmidės (pET-21c(+)) vektorius + mutuotas GD-95-10 lipazės genas), buvo surenkamos, ardomos paveikiant ultragarsu ir analizuojamos tirpių ir netirpių baltymų frakcijos (3.5a pav.). Tokių frakcijų analizė yra svarbi, norint nustatyti, kokiomis sąlygomis bus atliekamas tolimesnis tyrimų etapas – baltymų gryninimas. 3.5 pav. pateikiama R3 mutanto analizė. Kitų mutantų atveju buvo gauti panašūs rezultatai, todėl jie nepateikiami.



3.5 pav. R3 mutanto tirpumo (a) bei gryninimo nedenatūruojančiomis (b) ir denatūruojančiomis (c) sąlygomis analizė NDS-PAGE. M – baltymų molekulinės masės standartai PageRuler™ Unstained Protein Ladder; A – *E. coli* BL21 (DE3) transformantų, po indukcijos sintetinančių mutantinę R3 lipazę, ląstelės, ardytos ultragarsu; T – tirpių baltymų frakcija; NT – netirpių baltymų frakcija; 2e–4e – atitinkamos elucijos etapo frakcijos. Juodi stačiakampiai žymi tikslinio baltymo lokalizacijos vietą.

NDS-PAGE analizė parodė, kad R1–R6 mutantai yra linkę formuoti įterptinius kūnelius ir didžioji baltymų dalis yra lokalizuota netirpioje baltymų frakcijoje. Šie rezultatai rodo, kad Asp371, Phe375 ir Tyr376 pakaitos į Ala padidina *Geobacillus* lipazių polinkį formuoti įterptinius kūnelius. Kadangi po gryninimo taikant imobilizuotų Ni²⁺ jonų giminingumo chromatografiją denatūruojančiomis sąlygomis tirti baltymai pasižymėjo labai mažu lipoliziniu aktyvumu (apie 0,12 U/mg), taip pat tiriami baltymai buvo paveikti detergentu karbamidu (tai gali turėti neigiamos įtakos fermentų aktyvumui), tolimesniems eksperimentams baltymai buvo gryninti nedenatūruojančiomis sąlygomis naudojant tirpių baltymų frakciją (3.5b pav.). Baltymų grynumas taip pat

vertintas taikant zimografijos metodą, tačiau dėl mažo lipolizinio aktyvumo skaidrias zonas (leidžia identifikuoti lipolizinį aktyvumą) formavo ne visi baltymai. Mutacijų įtaka GD-95-10 lipazės aktyvumui, išeigai bei kinetinėms savybėms išsamiau bus aptarta 3.1.4 skyrelyje.

3.1.4 Asp371, Phe375 ir Tyr376 įtaka GD-95-10 lipazės aktyvumui bei kinetinėms savybėms

Atliekant R1–R6 mutantų aktyvumo ir kinetinių įverčių analizę taikytas spektrofotometrinis metodas substratu naudojant *p*-NP dodekanoatą. Rezultatai parodė, kad Asp371, Phe375 ir Tyr376 mutacijos į Ala stipriai sumažino mutuotų fermentų išeigą bei lipolizinį aktyvumą (3.1 lentelė).

3.1 lentelė. GD-95-10 lipazės ir sukurtų jos C-galinių aminorūgščių mutantų bei GD-95-20 lipazės aktyvumo ir išeigos palyginimas. Savitasis aktyvumas vertintas rekombinantiniams baltymams, išgrynintiems nedenaūruojančiomis sąlygomis iš tirpių baltymų frakcijos. Grynimui taikyta Ni²⁺ jonų giminingumo chromatografija.

Baltymas	Sintetinamo baltymo išeiga (mg) iš 200 ml kultūros (tirpi frakcija)	Savitasis aktyvumas (U/mg)
GD-95-10	9,52	415,00
GD-95-20	3,95	14,00
R1 (Asp371Ala+ Tyr376Ala)	3,20	12,52
R2 (Phe375Ala +Tyr376Ala)	5,33	11,67
R3 (Asp371Ala)	9,79	15,50
R4 (Phe375Ala)	5,43	42,50
R5 (Tyr376Ala)	6,05	32,50
R6 (Asp371Ala +Phe375Ala)	2,93	20,00

Tiek viengubos Asp371Ala, Phe375Ala, Tyr376Ala mutacijos, tiek dvigubi jų deriniai stipriai sumažino GD-95-10 lipazės išeigą ir (ar) lipolizinį aktyvumą (3.1 lentelė). Tai galima paaiškinti atstumų pokyčiu tretinėje tiriamų lipazių struktūroje tarp aminorūgščių, kurios yra atsakingos už katalizinį aktyvumą ir substrato prijungimą. Išsami atstumų pokyčių analizė tarp katalizinių aminorūgščių (Ser113, Asp317 ir His358) pateikta 3.6 pav.

Reikšmingiausi išeigos ir lipolizinio aktyvumo pokyčiai nustatyti variantams, turintiems dvigubas Asp371Ala+Tyr376Ala (R1 lipazė) bei

Phe375Ala+Asp371Ala (R6 lipazė) mutacijas (3.1 lentelė). Šių mutantų išeiga yra panaši į GD-95-20 lipazės išeigą ir tris kartus mažesnė nei GD-95-10 lipazės. R1 ir R6 mutantai išlaiko tik 3 ir 5 % GD-95-10 lipazės aktyvumo. Kadangi mažiausiu aktyvumu iš viengubų mutantų pasižymėjo R3 mutantas, daroma prielaida, kad lemiamą įtaką tarp dvigubų mutantų turėjo Asp371Ala mutacija. R3 mutantas, turintis tik Asp371Ala mutaciją, išlaiko vos 4 % GD-95-10 lipazės aktyvumo.

Kaip parodė analizė *in silico* (3.2 pav.) Tyr376 iš trijų mutuotų aminorūgščių išskiria tuo, kad palaiko tiesioginius ar netiesioginius ryšius su aminorūgštimis, kurios yra svarbios užtikrinant *Geobacillus* genties bakterijų išskiriamų lipazių funkcionalumą. Visgi Tyr376Ala mutanto aktyvumas buvo 32,5 U/mg ir šis aktyvumas didesnis nei visų šiame darbe analizuojamų dvigubų mutantų bei Asp371Ala mutanto (3.1 lentelė). Taigi daroma išvada, kad užtikrinant GD-95-10 lipazės aktyvumą ir kartu nulemiant GD-95-20 inaktyvaciją svarbų vaidmenį atlieka abi (Asp371 ir Tyr376) aminorūgštys. Viengubos Phe375Ala ir Tyr376Ala mutacijos sumažino GD-95-10 lipazės savitąjį aktyvumą 85 ir 89 %, atitinkamai.

Asp371 ir Tyr376 aminorūgščių svarbą patvirtina ir sukurtų mutantų katalizinio efektyvumo matavimai (3.2 lentelė). Kuo didesnės katalizinio efektyvumo vertė (K_{kat}/K_m), tuo geriau tiriamas fermentas hidrolizuoja naudojamą substratą. Mažiausiu kataliziniu efektyvumu pasižymėjo R1 (Asp371Ala) ir R5 (Tyr376Ala) mutantai, o didžiausiu – pradinė GD-95-10 lipazė (3.2 lentelė). Šie duomenys rodo, kad Asp371 ir Tyr376 aminorūgštys yra svarbios užtikrinant GD-95-10 lipazės funkcionalumą.

3.2 lentelė. GD-95-10 lipazės bei jos mutantų ir GD-95-20 lipazės pagrindinių katalizinių konstantų įvertinimas. Matavimai atlikti naudojant *p*-NP dodekanoatą, pH 9, 55 °C temperatūroje. ND – įverčio nustatyti nepavyko.

Kinetinė konstanta Baltymas	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min mg}$ baltymo)	K_m (mM)	K_{kat} (min^{-1})	Katalizinis efektyvumas K_{kat}/K_m $\text{min}^{-1} \text{mM}^{-1}$
GD-95-10	50,00	8,33	$2,83 \cdot 10^3$	$3,40 \cdot 10^2$
GD-95-20	40,00	7,70	$1,67 \cdot 10^2$	$2,16 \cdot 10$
R1 (Asp371Ala+ Tyr376Ala)	3,03	16,67	$1,26 \cdot 10^2$	8,00
R2 (Phe375Ala +Tyr376Ala)	5,26	12,50	$2,08 \cdot 10^2$	16,64
R3 (Asp371Ala)	5,61	6,67	$2,34 \cdot 10^2$	35,00
R4 (Phe375Ala)	20,00	25,00	$8,33 \cdot 10^2$	33,00
R5 (Tyr376Ala)	1,43	8,33	60,00	7,20
R6 (Asp371Ala +Phe375Ala)	ND	ND	ND	ND

Darbe taip pat buvo įvertintos GD-95-10, GD-95-20 ir GD-95-10 lipazės R1–R6 mutantų V_{max} , K_{kat} , K_m vertės. Kaip rodo gauti rezultatai (3.2 lentelė) R1–R6 mutantai pasižymi labai mažu V_{max} , lyginant su GD-95-10 lipaze. Mažiausiomis vertėmis išsiskiria R1 ir R5 mutantai, turintys Asp371Ala ir (ar) Tyr376Ala mutacijas, kas patvirtina šių aminorūgščių svarbą palaikant GD-95-10 lipazės aktyvumą. Šių mutantų V_{max} vertės yra tik 3,03 ir 1,43 $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ baltymo. R6 mutanto atveju dėl mažos išeigos, mažo aktyvumo ir efektyvumo, katalizinių konstantų apskaičiuoti nepavyko (3.2 lentelė).

Kita svarbi katalizinė konstanta – Michaelis konstanta (K_m), kuri parodo substrato koncentraciją, kuriai esant pasiekama pusė maksimalaus reakcijos greičio (V_{max}). Kuo K_m vertė mažesnė, tuo didesniu giminingumu jungiasi fermentas su substratu (mažesnė substrato koncentracija yra reikalinga, norint pasiekti maksimalų reakcijos greitį). Didelėmis K_m vertėmis išsiskyrė R1, R2 ir R4 mutantai, kai *p*-NP dodekanoatas buvo naudojamas kaip substratas. Svarbu paminėti, kad R2 ir R4 mutantai turi Phe375Ala mutaciją. Tai rodo, kad ne tik Asp371 ir Tyr376 yra reikšmingos užtikrinant tinkamą *Geobacillus* lipazių veiklą, bet ir Phe375 yra svarbi šių fermentų

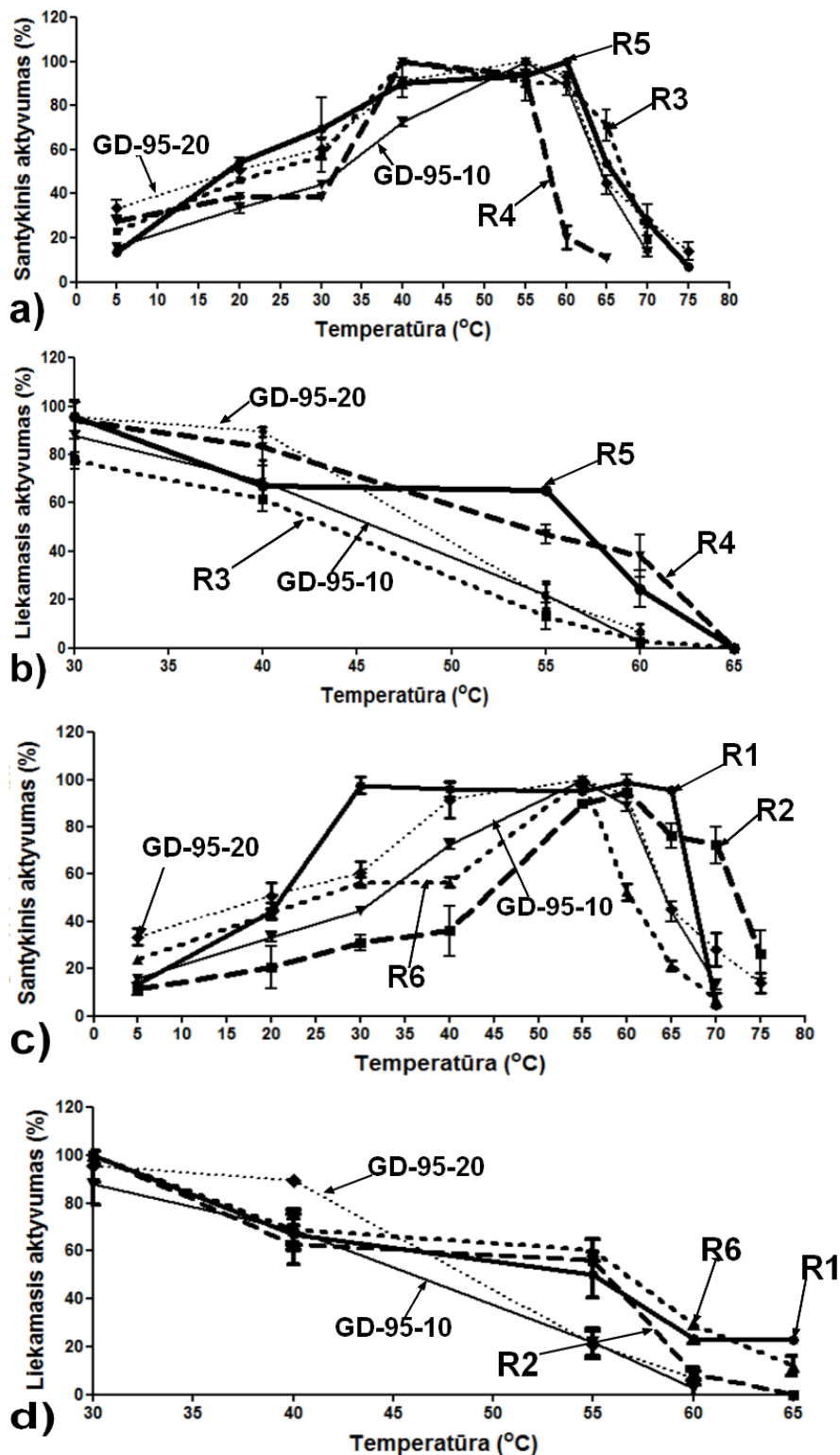
funkcionalumui. Nors R3 mutantas išsiskyrė mažu lipoliziniu aktyvumu (15,50 U/mg), jis pasižymėjo mažiausia K_m verte, kas rodo jo didelį giminingumą prijungiamam substratui. Taigi galima teigti, kad R3 mutantas prijungia *p*-NP dodekanoatą, tačiau hidrolizės reakcija nėra efektyvi.

Mažiausia K_{kat} verte pasižymėjo R5 mutantas (60 min^{-1}). K_{kat} parodo, kiek daug substrato yra paverčiama į produktą per vieną sekundę ar minutę. Kaip jau minėta, šiam mutantui buvo nustatytas ir mažas katalizinis efektyvumas (7,2 min/mM) (3.2 lentelė). Tokie rezultatai dar kartą parodo, kad Tyr376 yra reikšminga užtikrinant GD-95-10 lipazės funkcionalumą.

Atlikta analizė patvirtina iškeltą hipotezę, kad Asp371, Phe375 ir Tyr376 yra svarbios GD-95-10 lipazės veiklai ir kartu gali būti priežastis, kodėl jas pašalinus GD-95-20 lipazės savitasis aktyvumas krenta.

3.1.5 Asp371, Phe375 ir Tyr376 įtaka GD-95-10 lipazės aktyvumui ir stabilumui aukštose temperatūrose

Nagrinėjant *Geobacillus* genties bakterijų išskiriamus fermentus, svarbios savybės yra jų gebėjimas veikti aukštose temperatūrose ir stabilumas jose. Todėl šiame darbe taip pat buvo įvertinta temperatūros įtaka sukurtų R1–R6 mutantų lipoliziniui aktyvumui ir stabilumui (3.6 pav.). Viengubų mutacijų įtaka fermentų stabilumui ir aktyvumui aukštose temperatūrose vertinta analizuojant R3–R5 mutantus (3.6a ir 3.6b pav.).



3.6 pav. Temperatūros įtakos GD-95-10 lipazės bei jos mutantinių variantų ir GD-95-20 lipazės aktyvumui (a, c) ir stabilumui (b, d) įvertinimas. GD-95-10 lipazė – plona tiesi linija su trikampiu (a–d); GD-95-20 – plona taškinė linija su rombu (a–d); R1 – stora tiesi linija su užpildytu apskritimu (c, d); R2 – stora punktyrinė linija su užpildytu kvadratu (c, d); R3 – stora taškinė linija su užpildytu kvadratu (a, b); R4 – punktyrinė linija su užpildytu trikampiu (a, b); R5 – stora tiesi linija su užpildytu apskritimu (a, b); R6 – stora taškinė linija su trikampiu (c, d).

Gauti rezultatai parodė, kad Asp371Ala mutantas (R3) pasižymi panašiu temperatūriniu profiliu kaip ir GD-95-10 ir GD-95-20 lipazės, tačiau optimali šio fermento veiklai temperatūra – 40 °C (3.6a pav.). Šis mutantas išsiskiria ir gebėjimu išlaikyti savo aktyvumą iki 70 °C. R4 lipazė (Phe375Ala mutacija) pasižymi tokia pačia optimalia veiklai temperatūra kaip ir R3 mutantas (40 °C), tačiau šio fermento lipolizinis aktyvumas stipriai krenta, kai aplinkos temperatūra pakeliama iki 60 °C (apie 20 % santykinio lipolizinio aktyvumo). R4 lipazės skirtumai nuo kitų lipazių ties 60 °C temperatūra yra reikšmingi su p -verte 0,02. R5 mutantas reikšmingų skirtumų neparodė.

Vertinant stabilumą aukštose temperatūrose iš viengubą mutaciją turinčių GD-95-10 lipazės variantų išsiskyrė R3 lipazė, kuri pasižymėjo mažiausiu stabilumu lyginant tiek su GD-95-10 ir GD-95-20 lipazėmis, tiek su kitais R mutantais (3.6b pav.). Šie rezultatai papildo ankstesnę R mutantų analizę ir leidžia teigti, kad Asp371 yra svarbi GD-95-10 lipazės stabilumui, tuo tarpu Phe375 gali būti atsakinga už sėkmingą lipazės veiklą aukštose temperatūrose. Taip pat nustatyta, kad lipazės, gebančios veikti aukštose temperatūrose pasižymi mažesniu stabilumu lyginant su lipazėmis, kurios veikia siauresnėse temperatūrų ribose. Ši savybė būdinga R3 ir R4 mutantams. Tokia pat tendencija nustatyta ir analizuojant kelias *Geobacillus* genties bakterijų išskiriamas lipazes (3.3 skyrelis).

Atvirkštinė koreliacija tarp temperatūrinio veiklos spektro ir stabilumo aukštose temperatūrose nustatyta ir tarp dvi mutacijas turinčių R2 ir R6 mutantų (3.6c ir 3.6d pav.). R2 lipazė pasižymi 20 % didesniu lipoliziniu aktyvumu 75 °C temperatūroje lyginant su GD-95-10 lipaze, tačiau jau po 30 min. inkubacijos 60 °C temperatūroje visiškai praranda savo aktyvumą. R2 ir R6 mutantai pasižymi priešingomis savybėmis: R6 lipazė pasižymi mažu santykiniu lipoliziniu aktyvumu lyginant su kitais mutantais 60–65 °C temperatūrose. Tuo tarpu R2 mutantas geriau veikia 70–75 °C temperatūrų intervale lyginant su pradinėmis GD-95-10 ir GD-95-20 lipazėmis bei kitais GD-95-10 mutantais. R6 lipazės skirtumai nuo GD-95-10 ir GD-95-20 lipazių

yra reikšmingi su p -verte 0,01, esant 40 °C ir 60 °C ir p -verte 0,005, esant 65 °C temperatūroms.

R1 mutantas išsiskyrė gebėjimu išlaikyti 100 % fermentinį aktyvumą temperatūrų ribose 30–65 °C (3.6c pav.). Šie rezultatai yra reikšmingi 30 °C temperatūroje (p -vertė 0,02 GD-95-10 ir 0,01 GD-95-20 lipazėms); 40 °C temperatūroje (p -vertė 0,01 tik su GD-95-10 lipaze) ir 65 °C temperatūroje (p -vertė 0,001 su GD-95-10 ir GD-95-20 lipazėmis).

Gauti rezultatai leidžia daryti išvadą, kad už GD-95-10 funkcionalumą ir kartu GD-95-20 slopinimą yra atsakinga ne viena konkreti aminorūgštis, o tai yra pasekmė visos tretinės struktūros pokyčių, kuriuos nulemia visos trys (Asp371, Phe375 ir Tyr376) aminorūgštys kartu.

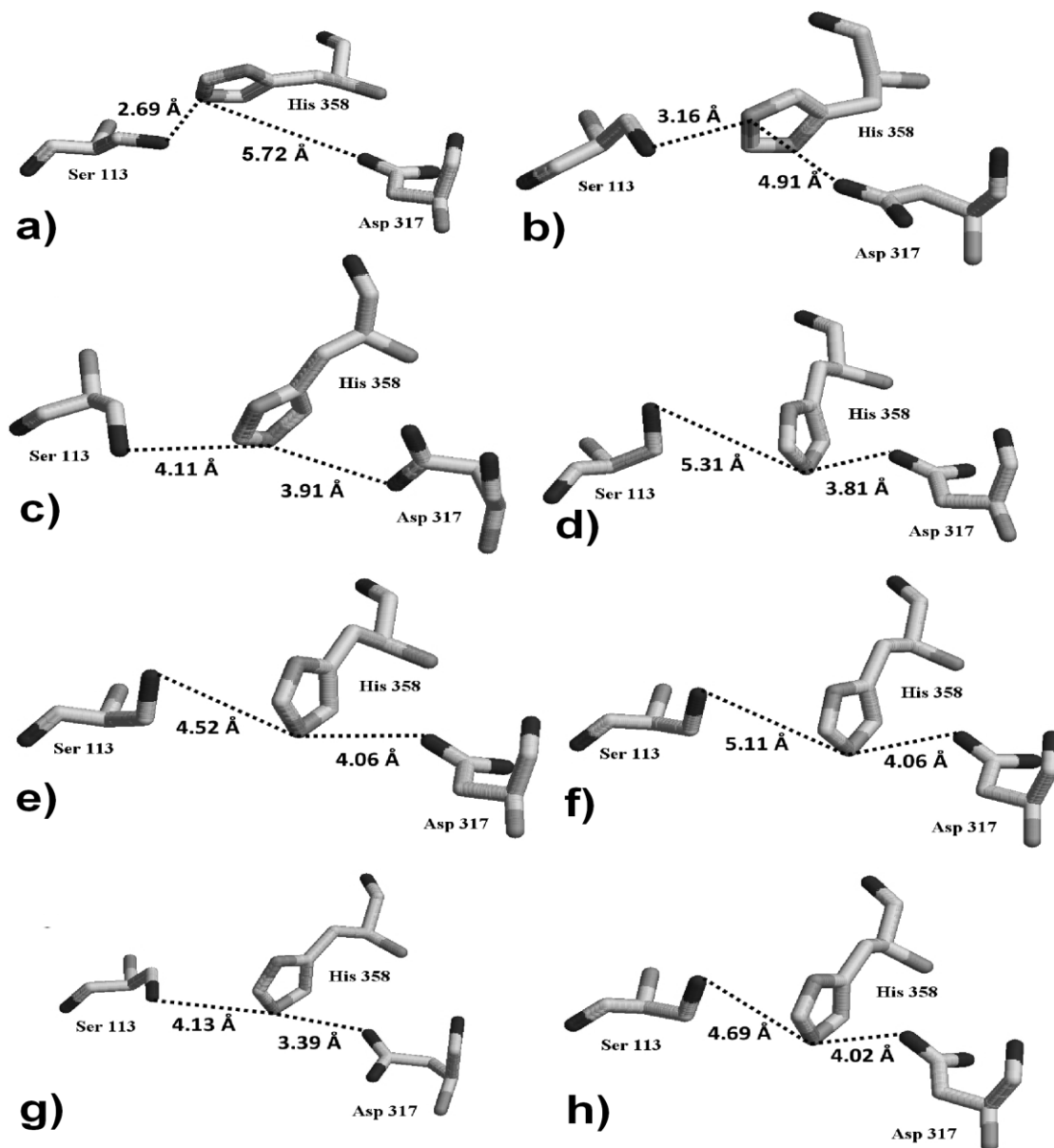
3.1.6 Asp371, Phe375 ir Tyr376 įtaka GD-95-10 lipazės struktūrai

Norint nustatyti, kokią įtaką tretinei lipazių struktūrai gali daryti C-galinių aminorūgščių mutacijos, buvo įvertinti katalizinių aminorūgščių (Ser113, Asp317 ir His358), taip pat aminorūgščių, kurios svarbios prijungiant substratą ar užtikrinant katalizinių aminorūgščių veiklą, formuojamų kontaktų pokyčiai GD-95-10, GD-95-20 lipazėse bei šešiuose GD-95-10 lipazės mutantuose. Rezultatai parodė, kad net vienos aminorūgšties pokyčiai gali daryti įtaką visai *Geobacillus* genties bakterijų išskiriamų lipazių tretinei struktūrai ir tuo pačiu lemti jos aktyvumą ir funkcionalumą. Kaip jau buvo minėta anksčiau, analizė *in silico* parodė, kad daugiausia kontaktų su svarbiomis lipazių funkcionalumui aminorūgštimis formuoja Tyr376. GD-95-10 lipazėje ši aminorūgštis palaiko tiesioginius kontaktus su Leu12 (įeina į „oksianijono kišenę“ (Chakravorty ir kt., 2011)); His112 (aminorūgštis, įeinanti į konservatyvaus AHSQG pentapeptido sudėtį, padeda koordinuoti katalizinį seriną vykstant substratų hidrolizei (Carrasco-Lopez ir kt., 2009)); ir Ile362 (dalyvauja prijungiant substratą (Carrasco-Lopez ir kt., 2009)). Po Tyr376 mutacijos į Ala visi šie ryšiai yra prarandami. Tai gali paaiškinti aktyvumo skirtumus tarp R1 ir R3 mutantų, kadangi R1 lipazėje trūksta ryšių

tarp aminorūgščių, kurios įeina į „oksidanijoninės kišenės“ sudėtį ir dalyvauja prijungiant substratą. Kaip jau buvo aptarta literatūrinėje dalyje, „oksidanijoninė kišenė“ yra svarbi stabilizuojant tetraedrinį tarpinį junginį hidrolizės metu (Carrasco-Lopez ir kt., 2009). R2 mutanto atveju nustatyta tokia pati situacija. R1 ir R2 mutantuose taip pat trūksta kontaktų su Arg34, kuris sudaro sąveiką su Leu33, o šis savo ruožtu dalyvauja formuojant substratą prijungiantį kanalą.

Formuojamų kontaktų analizė taip pat gali paaiškinti mažą R2 mutanto stabilumą. Šiame mutante trūksta kontaktų tarp Ala240, kuri dalyvauja užtikrinant tinkamą katalizinių aminorūgščių veiklą, ir Arg62, kuri svarbi palaikant stabilumą, vykstant „stogelio“ atsidarymui.

Aptarti tretinės struktūros persitvarkymai ir pokyčiai daro įtaką substrato prijungimui ir lipazių aktyvumui bei stabilumui. Taigi C-galiniame regione išsidėsčiusios aminorūgštys yra svarbios užtikrinant efektyvią *Geobacillus* lipazių veiklą. Norint patvirtinti iškeltas hipotezes apie C-galinių aminorūgščių reikšmę katalizės procese, taip pat buvo įvertinti atstumai tarp katalizinių aminorūgščių (3.7 pav.). Analizė atlikta naudojant kiekvienam baltymui sumodeliuotą tretinės struktūros modelį.



3.7 pav. Katalizinių *Geobacillus* genties bakterijų lipazių aminorūgščių (Ser113, Asp317 ir His358) išsidėstymas GD-95-10 lipazėje (a), jos mutantuose R1 (c), R2 (d), R3 (e), R4 (f), R5 (g) ir R6 (h) bei GD-95-20 lipazėje (b). Iliustracija parengta naudojant RasMol programą.

Gauti rezultatai parodė, kad Asp371Ala, Phe375Ala ir Tyr376Ala mutacijos keičia atstumus tarp katalizinio Ser113, Asp317 ir His 358. Atstumai tarp šių aminorūgščių yra be galo svarbūs užtikrinant *Geobacillus* lipazių katalizinį efektyvumą (Abdul Rahman ir kt., 2012). N. Goodarzi su kolegomis (2014) parodė, kad atstumas tarp katalizinių Asp317-His358 ir His358-Ser113 yra 5,31 Å ir 1,85 Å, atitinkamai. Kiti autoriai teigia, kad aktyvioje būsenoje Ser113 išorinės grandinės O γ atomas yra 2,96 Å nutolęs nuo katalizinio His358

Nε2 atomo, o atstumas tarp His358 ir Asp317 yra 2,68 ir 2,81 Å uždaroje ir atviroje konformacijose, atitinkamai (Carrasco-Lopez ir kt., 2009). GD-95-10 lipazėje atstumas tarp katalizinių aminorūgščių Asp317-His358 ir His358-Ser113 yra 5,72 ir 2,69 Å, atitinkamai (3.7a pav.). Šios vertės yra artimos literatūros duomenims.

R1–R6 mutantų analizė parodė, kad visuose mutantuose atstumas tarp katalizinių Ser113 ir His358 aminorūgščių yra padidėjęs beveik du kartus (3.7c–3.7h pav.). Didžiausi skirtumai nustatyti R2 ir R4 mutantuose, kurie turi Phe375Ala mutaciją. Atstumas šiuose mutantuose tarp Ser113 ir His358 yra 5,31 ir 5,11 Å (3.7d ir 3.7f pav.). Šie rezultatai koreliuoja su eksperimentiniais duomenimis, kurie teigia, kad R4 lipazės lipolizinis aktyvumas reikšmingai mažėja, aplinkos temperatūrą pakėlus iki 60 °C. Taip pat šis mutantas pasižymėjo didžiausia K_m verte. Atstumų analizė *in silico* patvirtina iškeltą hipotezę, kad Phe375 yra svarbus užtikrinant lipazės aktyvumą aukštose temperatūrose. M. Z. Abdul Rahman su kolegomis (2012) parodė, kad katalizės proceso efektyvumas stipriai priklauso nuo atstumo tarp Ser113 ir His358 ir šis atstumas kinta keliant temperatūrą. Esant 80 °C temperatūrai atstumas tarp šių aminorūgščių yra 5,75 Å (lyginant su 2,62 Å, kurie buvo nustatyti aplinkos temperatūrai esant 70 °C (optimali veiklos temperatūra T1 lipazei)) (Abdul Rahman ir kt., 2012). Panaši atstumų tarp katalizinių aminorūgščių pokyčių tendencija nustatyta ir šiame darbe po Asp371, Phe375 ir Tyr376 mutacijų į alaniną. Tik šiuo atveju pokyčius lemiantis veiksnys yra ne temperatūra, bet įvestos mutacijos.

Apibendrinant gautus aktyvumo, kinetinių savybių, temperatūrinio aktyvumo ir stabilumo bei analizės *in silico* rezultatus galima teigti, kad C-galiniame regione išsidėsčiusios aminorūgštys (Asp371, Phe375 ir Tyr376) yra svarbios *Geobacillus* genties bakterijų išskiriamų lipazių veiklai. Net vienos aminorūgšties pokytis gali lemti atstumo tarp katalizinių aminorūgščių pokyčius bei pakitimus tarp kaimyninių aminorūgščių, kurios dalyvauja prijungiant substratą ir (ar) stabilizuojant tarpinį junginį vykstant substrato

hidrolizei bei užtikrinant efektyvią katalizinių aminorūgščių veiklą. Taigi net minimalūs pokyčiai gali turėti reikšmingos įtakos tiriamų fermentų funkcionalumui. Gauti rezultatai parodė, kad didžiausią vaidmenį užtikrinant GD-95-10 lipazės aktyvumą ir stabilumą atlieka Asp371 ir Tyr376, tačiau Phe375 yra svarbi palaikant fermento gebėjimą veikti aukštose temperatūrose.

Šiame skyriuje aptarti rezultatai praplečia žinias apie *Geobacillus* genties bakterijų išskiriamų lipazių struktūrą ir atitinkamų aminorūgščių svarbą, užtikrinant šių fermentų funkcionalumą. Informacija apie atitinkamo domeno ar kiekvienos individualios aminorūgšties svarbą lemiant tikslingo fermento veiklą gali padėti modeliuoti idealiomis savybėmis (didesnis lipolizinis aktyvumas, temperatūrinis stabilumas, išeiga, galimybė keisti substratinį savitumą) pasižyminčius biokatalizatorius.

3.2 GDEst-lip, GDEst-est ir GDLip-lip naujų biokatalizatorių kūrimas

Dar viena šiame darbe naudota baltymų inžinerijos strategija – chimerinių sulietų baltymų kūrimas. Šio etapo tikslas – sukurti biokatalizatorius, kurie pasižymėtų naujomis, geresnėmis savybėmis, lyginant su pradiniais fermentais. Norint įgyvendinti šį tikslą buvo nuspręsta sujungti dviejų, skirtingais aktyvumais pasižyminčių baltymų domenų. Baltymų jungimui pasirinktas variantas, kai du genai gali būti sujungti per atitinkamą restrikcijos endonukleazės kirpimo vietą. Šiame darbe pasirinkta *SacI* restrikcijos endonukleazė, kadangi ji nekerpa genų sekų, kurios koduoja tiriamus fermentus. *SacI* kirpimo vietoje aminorūgščių sekoje susidaro dvi papildomos aminorūgštys Glu-Lys, kurios atlieka jungtuko vaidmenį. Konstravimui buvo pasirinktos *Geobacillus* sp. 95 kamieno išskiriama GD-95 lipazė, kuri buvo ankstesniame skyriuje aptartų GD-95-10 ir GD-95-20 variantų pradininkė, bei to paties kamieno sintetinama GDEst-95 esterazė.

3.2.1 GDEst-95 esterazės klonavimas ir gryninimas

Norint sukurti chimerinį baltymą, sudarytą iš kelių skirtingų baltymų domenu, pirmiausia buvo atlikta esterazių genų paieška. Esterazės pasirinktos dėl jų gebėjimo hidrolizuoti trumpos grandinės substratus. Kadangi lipazių substratai – daugiau nei dešimt anglies atomų rūgščių grandinėje turintys junginiai, sujungus tokius du fermentus, galima būtų gauti naujus fermentus, kurie pasižymėtų gebėjimu hidrolizuoti tiek trumpus, tiek ilgus substratus. Naudojant *Geobacillus* genties bakterijų sintetinamų esterazių paieškai skirtus pradmenis GSLE-F-41 ir GSLE-R+64, *Geobacillus* sp. 95 kamiene pavyko pagausinti vieną 1,5 kb dydžio produktą. Atlikus jo sekoskaitą ir palyginamąją analizę duomenų bazėse paaiškėjo, kad genas koduoja 498 aminorūgščių baltymą – karboksilesterazę, kurios molekulinė masė yra 55 kDa. Atliekant sekos palyginimą NCBI svetainėje buvo nustatytas 94–98 % panašumas į kitas *Geobacillus* genties bakterijų karboksilesterazes: *Geobacillus* sp. karboksilesterazę (WP_033015113 – 97 % panašumas; WP_014196713 – 95 %; WP_033026229 – 94 %), *G. stearothermophilus* karboksilesterazę (WP_033008934 – 98 %; WP_04962599 – 97 %; Est55 esterazę (pdbI2OGSIA, (Liu ir kt., 2007)) – 97 %), *Geobacillus* sp. LC300 karboksilesterazę (WP_050367782 – 97 %), *Geobacillus* sp. 12AMOR1 (WP_047818974 – 97 %) ir kt. Nepaisant sekų gausos, išsamių tyrimų, kuriuose būtų analizuotos būtent 55 kDa esterazių, išskirtų iš *Geobacillus* genties bakterijų, struktūra ir savybės, yra vos keli. 2004 m. H. E. Ewis su bendraautoriais aprašė dvi iš *G. stearothermophilus* išskirtas esterazes – Est30 ir Est55 (molekulinė masė – 30 ir 55 kDa, atitinkamai). Kitas darbas – P. Liu ir bendraautorių (2007) darbas, kuriame pagrindinis dėmesys skiriamas esterazių struktūrai. Jo dėka galima identifikuoti katalizines *Geobacillus* esterazių, kurių dydis 55 kDa, aminorūgštis bei kelių aminorūgščių, dalyvaujančių prijungiant substratą, padėtis. 2010 m. N. A. Soliman ir A. A. Gaballa aprašė *G. thermoleovorans* YN kamieno EstB esterazę, kurios dydis 54,7 kDa, ir ji turi tipinį lipazėms / esterazėms būdingą motyvą GX SXG. Lyginamoji GDEst-95

esterazės ir GD-95 lipazės šiai dienai žinomų svarbių struktūrų analizė pateikta 3.3 lentelėje. GDEst-95 esterazės geno ir aminorūgščių seka pateikta Genų bankui (suteiktas numeris KX013768).

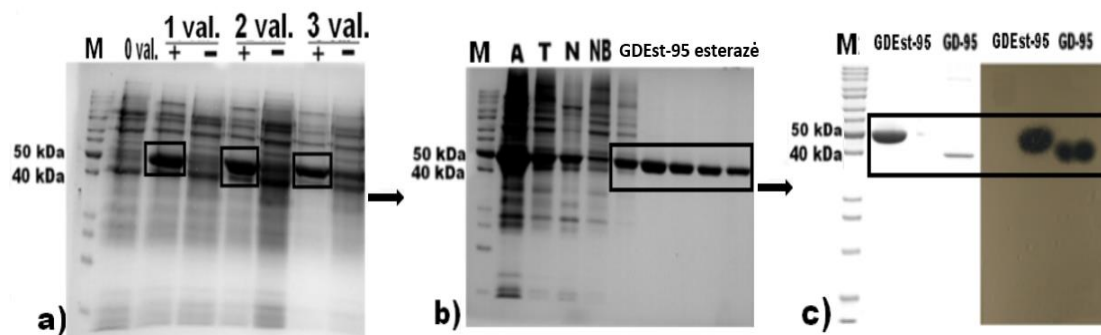
3.3 lentelė. GD-95 lipazės ir GDEst-95 esterazės palyginamoji analizė *in silico*, nurodant svarbių šių fermentų funkcionalumui domenų ir aminorūgščių padėtis. Padėčių palyginimas atliktas remiantis Sinchaikul ir kt., 2001; Tyndall ir kt., 2002; Leow ir kt., 2004, 2007; Ewis ir kt., 2004; Liu ir kt., 2007; Carrasco-Lopez ir kt., 2009; Wu ir kt., 2010; Jiang ir kt., 2010; Chakravorty ir kt., 2011; Shih ir Pan 2011; Ebrahimpour ir kt., 2011; Wahab ir kt., 2012; Salleh ir kt., 2012; Wahab ir kt., 2015 ir GD-95 bei GDEst-95 nukleotidų ir aminorūgščių sekomis.

STRUKTŪRA	FERMENTAS	
	GD-95 lipazė	GDEst-95 esterazė
3D struktūra	α/β domenas	Susilanksto į 3 domenus: katalizinis, α/β domenas ir reguliacinis domenas.
ASR dydis ir jo koduojamo baltymo molekulinė masė	1251 bp.; koduojamos 416 a.r. (28 a.r. signalinis peptidas ir 388 a.r. subrendęs baltymas); molekulinė masė – 3 kDa signalinis peptidas ir 43,18 kDa subrendęs baltymas.	1497 bp.; koduojamos 498 a.r.; molekulinė masė: 55 kDa
Katalizinės triados aminorūgščių padėtys (subrendusiame baltyme)	Ser113-Asp317-His358	Ser194-Glu310-His409
Signalinis peptidas	28 a.r. MKCCRVMFVLLGLWVFV GLSVPGGRAEA	Nenustatytas
Kiti baltymo veiklai svarbūs domenai ir aminorūgščių padėtys (padėtys pateikiamos subrendusiame baltyme)	Konservatyvus peptidas AHSQG, kuriame išsidėstęs katalizinis Ser113. „Stogelio“ domenas; „oksidanijoninė kišenė“; P-kilpos seka: kaip aptarta literatūroje Svarbu termostabilumui: Tyr224; Asp189 Daro įtaka substratiniam savitumui: Gln114 Svarbu fermento stabilumui: Arg157 Substrato prijungimą koordinuojančios aminorūgštys: Phe16, Tyr29, Leu56, Pro164, Leu170, Val171, Met173, Val174, Phe181, Leu183, Val187, Leu188, Leu208, Val233, Ala240, Leu244, Phe290, Val294, Ile319, Val320, Leu359, Ile362, Val364.	Konservatyvus peptidas Gly-X-Ser-X-Gly su lokalizuotu kataliziniu Ser: GESAG. Substrato prijungimą koordinuojančios aminorūgštys: Phe112, Trp119, Leu225, Leu226, Met274, Leu313, Phe314, Leu316, Val370, Phe371, Leu411.

Nors abu fermentai priklauso hidrolazių klasei, savo struktūra ir aminorūgštėmis jie skiriasi (3.3 lentelė). Kol kas trūksta informacijos apie *Geobacillus* esterazių savybes ir potencialų pritaikymą baltosios biotechnologijos srityse. Taigi GDEst-95 esterazę galima vadinti pirmąją taip

plačiai išnagrinėta 55 kDa dydžio *Geobacillus* genties bakterijų esteraze, kuri panaudota ir baltymų inžinerijos eksperimentuose.

Atlikus GDEst-95 esterazės analizę *in silico* buvo sukurti pradmenys GESTp-23R ir GESTp-31F su įterptais *NdeI* ir *SalI* restrikcijos endonukleazių taikiniai, leidžiančiais tiriamą esterazę klonuoti į raiškos vektorių. Taip esterazės genas buvo pagausintas PGR būdu, klonuotas į klonavimo (pTZ57R/T) ir raiškos (pET-21c(+)) vektorius, rekombinantinės esterazės sintezė vykdyta *E. coli* BL21 (DE3) ląstelėse (3.8a pav.), o fermentas išgrynintas taikant imobilizuotų Ni²⁺ jonų giminingumo chromatografiją (3.8b pav.) nedenatūruojančiomis sąlygomis iš tirpių baltymų frakcijos naudojant Tris-HCl buferinį tirpalą (50 mM pH 8 / 20 °C) su 10 mM imidazolo. GD-95 lipazė išgryninama naudojant tą patį buferinį tirpalą, tačiau su 250 mM imidazolo.



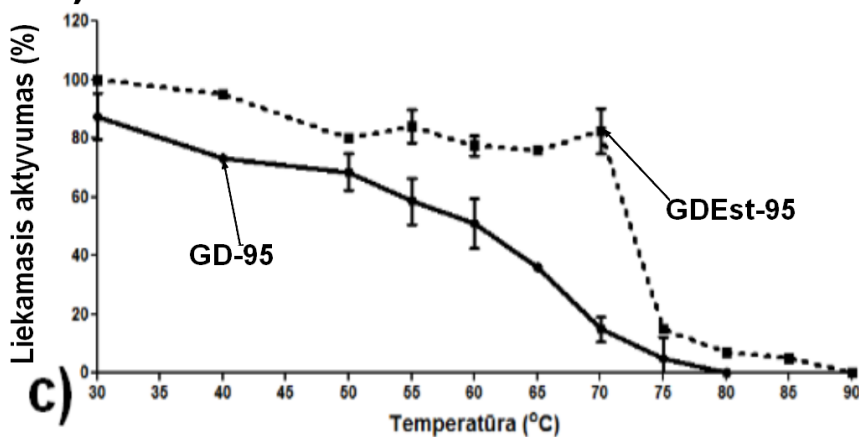
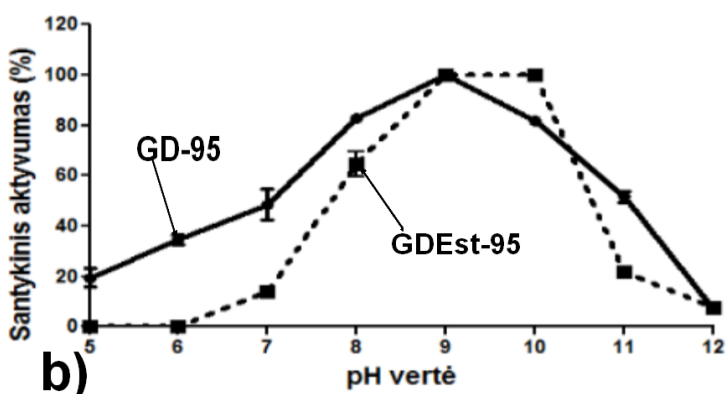
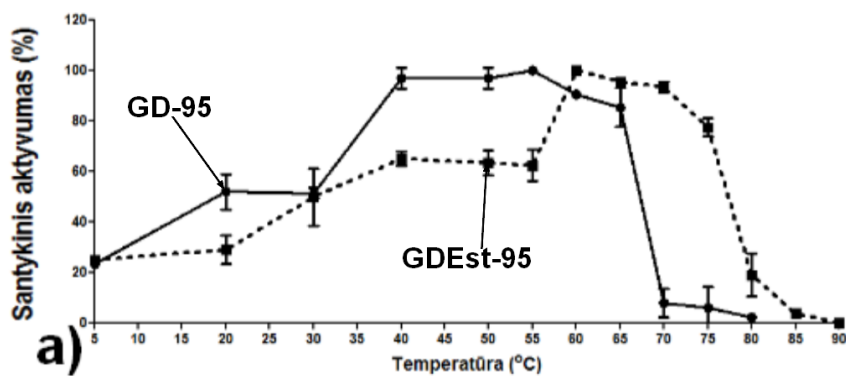
3.8 pav. GDEst-95 esterazės sintezės (a) ir gryninimo (b–c) analizė. GDEst-95 sintezės *E. coli* BL21 (DE3) ląstelėse, turinčiose pET-21c(+) plazmidę su įterptu *gdest-95* genu analizė (a): M – baltymų molekulinės masės standartai PageRuler Unstained Protein Ladder; + – ląstelės paveiktoms 1mM IPTG; - – nepaveiktos 1mM IPTG. Kvadratai žymi tikslinį baltymą. GDEst-95 esterazės gryninimo analizė (b): A – *E. coli* BL21 (DE3) transformantų, po indukcijos sintetinančių rekombinantinę GDEst-95 esterazę, ląstelės, ardytos ultragarsu; T – tirpių baltymų frakcija; N – netirpių baltymų frakcija; NB – neprikibusių baltymų frakcija; GDEst-95 esterazė - GDEst-95 esterazė išgryninta naudojant Tris-HCl buferinį tirpalą (50 mM pH 8 / 20 °C) su 10 mM imidazolo. GD-95 lipazės ir GDEst-95 esterazės išsidėstymas NDS-PAGE (kairėje) ir zimogramoje (dešinėje) (c). Kartu pateikiama ir GD-95 lipazė, kadangi kuriant sulietus baltymus bus svarbūs abu šie fermentai. Zimografija atlikta tributirina naudojant kaip substratą.

Zimografijos rezultatai (3.8c pav.) patvirtino, kad po gryninimo gautas baltymas yra tikslinė *Geobacillus* sp. 95 kamieno esterazė.

3.2.2 GDEst-95 esterazės fizikinės bei cheminės savybės

Išgryninus GDEst-95 esterazę, buvo įvertintos pagrindinės fizikinės ir cheminės savybės, tokios kaip temperatūros įtaka fermento aktyvumui ir stabilumui (3.9a ir 3.9c pav.), pH įtaka fermento aktyvumui (3.9b pav.), substratinis fermento savitumas (3.4 lentelė), detergentų bei organinių tirpiklių (3.5 lentelė) įtaka fermento funkcionalumui. Kartu pateikiama ir GD-95 lipazė, siekiant palyginti šių fermentų savybes ir išryškinti jų skirtumus. Taip pat buvo įvertintas GDEst-95 esterazės lipolizinis aktyvumas, išeiga bei pagrindinės katalizinės konstantos, kurios pateikiamos 3.6 lentelėje ir bus išsamiau aptartos nagrinėjant sulietus baltymus.

Tirtų savybių analizė (3.9 pav.) parodė, kad GDEst-95 esterazė pasižymi geresniu gebėjimu veikti aukštesnėse temperatūrose nei GD-95 lipazė. GDEst-95 70–75 °C temperatūroje išlaiko 80 % ir didesnę santykinę aktyvumą, kai tuo tarpu GD-95 lipazės aktyvumas šiose temperatūrose stipriai krenta (mažiau nei 20 % lipolizinio aktyvumo) (3.9a pav.). Rezultatai patikimai skiriasi su p -verte 0,002.



3.9 pav. Temperatūros įtakos GDEst-95 esterazės ir GD-95 lipazės aktyvumui (a) ir stabilumui (c) bei pH įtakos (b) tiriamų fermentų veiklai įvertinimas. GD-95 lipazė – tiesi linija su užpildytu apskritimu (a–c); GDEst-95 – taškinė linija su užpildytu kvadratu (a–c).

GDEst-95 esterazė taip pat geriau veikia esant 60 °C temperatūrai, kuri yra optimali jos veiklai bei išlaiko savo lipolizinį aktyvumą iki 85 °C. Tuo tarpu GD-95 lipazė jau esant 80 °C visiškai praranda savo aktyvumą (3.9a pav.). GDEst-95 esterazė pasižymi ir didesniu stabilumu aukštose temperatūrose lyginant su GD-95 lipaze (3.9c pav.). Po inkubacijos 50–70 °C temperatūrose GDEst-95 išlaiko didesnę nei 80 % aktyvumą, kai GD-95 lipazės ši vertė krenta iki 70 % (50 °C) ir 20 % (70 °C), atitinkamai. Rezultatai

reikšmingai skiriasi 65 °C (p -vertė 0,006) ir 70 °C (p -vertė 0,009) temperatūrose.

Aptariant pH veiklos spektrą (3.9b pav.), reiktų paminėti, kad GDEst-95 esterazė 100 % lipoliziniu aktyvumu pasižymi, kai pH 9–10, tačiau ji išlaiko aktyvumą siauresnėse pH ribose lyginant su GD-95 lipaze. GDEst-95 didesnei nei 50 % aktyvumą išlaiko esant pH reikšmėms tarp 8 ir 10. GD-95 lipazė didesniu nei 50 % lipoliziniu aktyvumu pasižymi, kai aplinkos pH yra 7–11. Reikšmingi skirtumai tarp šių fermentų nustatyti pH vertėms 7 (p -vertė 0,02), 10 (0,001) ir 11 (0,01).

Remiantis literatūros duomenimis, *G. thermodenitrificans* esterazės EstGtA2 optimalus veiklai pH buvo 8, o temperatūra – 50 °C (Charbonneau ir kt., 2010), *G. kaustophilus* HTA426 esterazės – 8 ir 60 °C (Montoro-García ir kt., 2009), *Geobacillus* sp. esterazių Est1, Est2, Est3 – 9,5–10 ir 65 °C (Tekedar ir Sanli-Mohamed, 2011) ir *G. stearothermophilus* Est55 esterazės – pH 8–9 ir 60 °C (Ewis ir kt., 2004), tačiau tik pastarosios esterazės molekulinis dydis yra 55 kDa, kaip ir šiame darbe tiriamo GDEst-95 fermento. *G. thermoleovorans* YN kamieno EstB esterazės, kurios dydis taip pat 55 kDa, optimali veiklai temperatūra nustatyta 65 °C, o pH 8–9 (Soliman ir Gaballa, 2010).

Yra žinoma, kad esterazės geriau hidrolizuoja trumpos grandinės substratus (Eggert ir kt., 2000). Analizė parodė, kad GDEst-95 esterazė geriau hidrolizuoja C2–C8 atomus rūgščių grandinėje turinčius substratus nei C10–C18, pirmenybę teikdama p -NP butiratai (C4) ir p -NP heksanoatui (C6). Hidrolizuojant C12–C16 substratus fermento santykinis lipolizinis aktyvumas krenta iki 20 % ir mažiau, tuo tarpu GD-95 lipazė išlaiko apie 40 % savo aktyvumo hidrolizuodama šiuos substratus (3.4 lentelė).

Est55 esterazė 100 % savituoju aktyvumu pasižymėjo hidrolizuodama p -NP butirata, o gebėjimas hidrolizuoti C16–C18 ilgio junginius nebuvo nustatytas (Ewis ir kt., 2004). GDEst-95 esterazė geriau hidrolizuoja p -NP

acetatą, *p*-NP oktanoatą ir *p*-NP dekanatą nei aprašytoji esterazė. GDEst-95 esterazės gebėjimas hidrolizuoti šiuos substratus lygus 83 %, 82 % ir 27 %, atitinkamai, tuo tarpu Est55 šis aktyvumas – 30 %, 13 % ir 1,6 % (Ewis ir kt., 2004).

Kitas GDEst-95 privalumas – būti aktyvinamai izopropanoliu, *n*-butanoliu bei įvairiais detergentais (Tween 20, 40, 60 ir 80) (3.6 lentelė). Pastarieji junginiai GD-95 lipazę visiškai slopina. Didžiausiu aktyvinamu poveikiu GDEst-95 esterazės veiklai pasižymėjo izopropanolis (129 %) ir Tween 60 (136 %).

Organinių tirpiklių ir detergentų įtakos lipazių ir esterazių veiklai įvertinimas svarbus, norint šiuos fermentus taikyti kosmetikos ar biokuro gamybos srityse, kuriose esterijų sintezės reakcijos vyksta aplinkoje esant metanolio, izopropanolio ar įvairių detergentų (Bajaj ir kt., 2010; Syaima ir kt., 2015). Lipazių ir esterazių jautrumas organiniams tirpikliams priklauso nuo tirpiklių poliškumo, kadangi poliniai tirpikliai labiau destabilizuoja fermentus nei nepoliniai (Sangeetha ir kt., 2011). Tuo tarpu paviršiaus aktyviosios medžiagos (Tween, Triton X-100) naudojamos reakcijų metu padidina vandens – lipidų sąveikos paviršiaus plotą, pagerina substratų tirpumą, gali padėti stabilizuoti atvirą fermento konformaciją, neleidžia jam agreguoti taip pagerinant lipazių ir (ar) esterazių aktyvumą ir katalizines savybes (Guncheva ir Zhiryakova, 2011).

Remiantis literatūros duomenimis, tų pačių organinių tirpiklių, slopiklių ar detergentų poveikis net ir dideliu struktūriniu ir aminorūgščių panašumu pasižymintiems fermentams gali skirtis. To pavyzdys galėtų būti izopropanolis. Izopropanolis neturėjo poveikio ar nežymiai slopino *G. stearothermophilus* JC (Jiang ir kt., 2010) ir *G. thermoleovorans* YN lipazes (Soliman ir kt., 2007), tačiau stipriai slopino *Geobacillus* sp. ARM lipazės veiklą (Ebrahimpour ir kt., 2011). Varijuojantys rezultatai gaunami ir paveikus šiuos fermentus etanoliu (Jiang ir kt., 2010; Soliman ir kt., 2007; Ebrahimpour

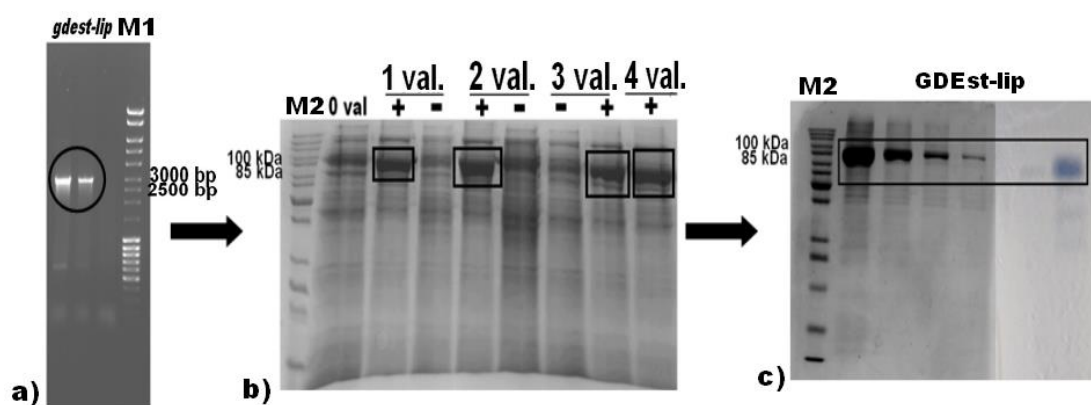
ir kt., 2011). Tai rodo, kad net vienos aminorūgšties pokytis, šaltinis, iš kurio buvo išskirtas tikslinio fermento producentas, ar individualios fermento ypatybės, gali lemti visiškai kitokias tiriamo baltymo fizikines ir chemines savybes.

3.2.3 GDEst-lip bei GDLip-lip ir GDEst-est sulietų fermentų kūrimas, klonavimas ir gryninimas

Literatūros duomenų apie skirtingomis struktūromis ir funkcijomis pasižyminčių fermentų sujungimą nėra daug. Tokių baltymų kūrimo viršūnėje jau daugelį metų sėkmingai karaliauja baltymų inžinerija, paremta imunoglobulinų Fc domenu. Dar 1989 m. aprašyta pirma sulieta struktūra – CD4-Fc sulietas antagonistas, kuris slopina ŽIV patekimą į T ląsteles. Su Fc domenu sulietų baltymų kūrimas remiasi imunoglobulinų Fc domeno tiesioginiu sujungimu su kitu peptidu (Czajkowsky ir kt., 2012). Taip pat literatūrinėje dalyje buvo aptarti pavyzdžiai, susiję su bifunkcinių fermentų kūrimu. Bifunkciniai baltymai gali būti laikomi atskira nauja biotechnologijų šaka. Baltymų suliejimas su kito baltymo domenu dažniau remiasi siekiu palengvinti tikslinio baltymo gryninimą ar padidinti jo sintezę (pvz., *C. antarctica* lipazės B tirpumo ir sekrecijos padidinimas *E. coli* ląstelėse suliejus šią lipazę su Skp šaperonu (Hong ir kt., 2012)), o ne tikimybe, kad du skirtingi fermentai pilnavertiškai vykdys savo funkcijas. Taigi šiame darbe aprašomi sulieti baltymai, sudaryti iš *Geobacillus* genties bakterijų sintetinių lipazių ir esterazių domenų, yra vieni pirmųjų baltymų inžinerijos pagalba gauti nauji biokatalizatoriai, kuriuos būtų galima taikyti įvairiose pramonės srityse (riebalų hidrolizė atliekų tvarkymo ar odos perdirbimo procesuose; esterų sintezė kosmetikos priemonių ar biokuro gamyboje) vietoje daug ekologinių problemų sukeliančių cheminių junginių.

Įvertinus GD-95 ir GDEst-95 savybes, buvo nuspręsta sujungti būtent šių fermentų domenų, taip patobulinant GD-95 lipazę ir paverčiant ją stabilesne ir aktyvesne aukštose temperatūrose bei atsparesne detergentų

poveikiui. GDEst-95 pagerinimas – hidrolizuojami daugiau nei 12 anglies atomų rūgšties grandinėje turintys substratai, taip pat siekis – gauti fermentą, kuris pasižymėtų didesniu lipoliziniu ir (ar) esteraziniu aktyvumu, lyginant su GD-95 lipaze ir GDEst-95 esteraze. Naujam, iš *Geobacillus* sp. 95 kamieno esterazės ir lipazės baltymų domenu sudarytam fermentui, suteiktas GDEst-lip vardas. Taip pat siekiant įvertinti, kokią įtaką papildomas domenai turės atitinkamų tiriamų fermentų veiklai, buvo sukurti GDEst-est ir GDLip-lip sulieti baltymų variantai. GDEst-lip klonavimo, sintezės didinimo ir gryninimo rezultatai pateikti 3.10 pav.



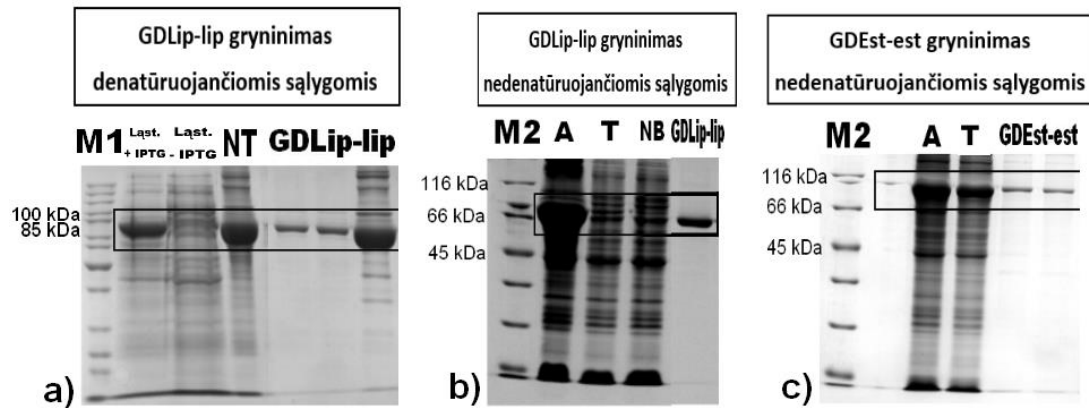
3.10 pav. GDEst-lip fermento klonavimo (a), sintezės (b) ir gryninimo (c) analizė. Po PGR gautas ir klonavimui į pTZ57R/T vektorių naudotas *gdest-lip* geno produktas (a): M1 – DNR fragmentų ilgio žymuo MassRuler DNA ladder mix. Apskritimas žymi tikslinį PGR produktą. Baltymų sintezės analizė *E.coli* BL21 (DE3) ląstelėse, turinčiose pET-21c(+) plazmidę su įterptu genu liejiniu *gdest-lip* (b): M2 – baltymų molekulinės masės standartai PageRuler Unstained Protein Ladder; + – ląstelės paveiktos 1mM IPTG; - – ląstelės nepaveiktos 1mM IPTG; 0 val. – ląstelių mėginys laiko momentu, kai pridedama IPTG. Kvadratai žymi tikslinį baltymą. GDEst-lip gryninimo analizė NDS-PAGE (kairėje) ir zimografijoje (dešinėje) (c). Zimografija atlikta substratu naudojant tributiriną. Fermentas išgrynintas naudojant Tris-HCl buferinį tirpalą (50 mM, pH 8 / 20 °C) su 10 mM imidazolo.

Pagausintas chimerinis *gdest-lip* genas (3.10a pav.) buvo sėkmingai klonuotas į raiškos vektorių, o jo koduojamo baltymo sintezė vykdyta *E. coli* BL21 (DE3) ląstelėse (3.10b pav.). Kaip rodo NDS-PAGE analizė, didžiausias GDEst-lip kiekis gaunamas 2–4 val. praėjus nuo indukcijos pradžios. Taigi *E.coli* ląstelės, turinčios plazmidę su įterptu chimeriniu *gdest-lip* genu, baltymo gryninimui augintos 3 val. po sintezės indukcijos 1mM IPTG. Tiriant GDEst-

est ir GD Lip-lip fermentus gauti identiškai rezultatai, todėl sintezės indukcijos rezultatai nėra pateikti.

GDEst-lip baltymą sėkmingai pavyko išgryninti naudojant Tris-HCl buferį (50 mM, pH 8 / 20 °C) su 10 mM imidazolo (3.10c pav.). Šie rezultatai sutampa su rezultatais, gautais GDEst-95 esterazės atveju (3.8b ir 3.8c pav.). Taigi, GDEst-lip chimerinis baltymas kaip ir GDEst-95 esterazė yra pranašesnis prieš monomerinę GD-95 lipazę, kadangi šio fermento gryninimui reikia mažiau finansinių sąnaudų, o tai svarbu norint taikyti tiriamus fermentus pramoniniuose procesuose.

Tie patys darbų etapai (klonavimas, baltymų sintezė ir gryninimas taikant imobilizuotų Ni²⁺ jonų giminingumo chromatografiją) vykdyti ir tiriant GD Lip-lip bei GDEst-est baltymus. Šių fermentų gryninimo analizė NDS-PAGE pateikta 3.11 pav.

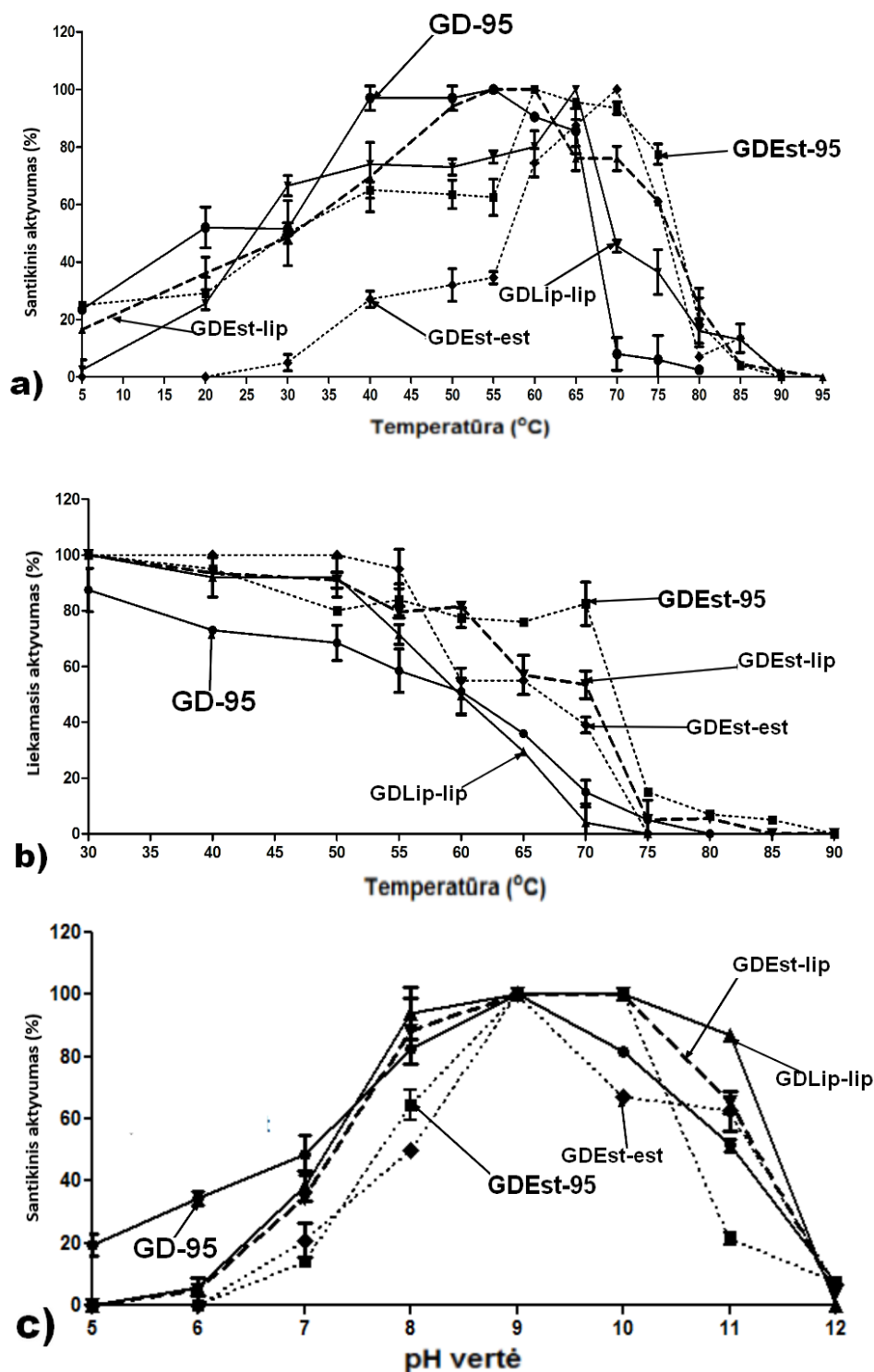


3.11 pav. GDEst-est ir GD Lip-lip gryninimo analizė NDS-PAGE (12 %). GD Lip-lip gryninimo denatūruojančiomis sąlygomis analizė (a): M1 – baltymų molekulinės masės standartai PageRuler Unstained Protein Ladder; NT – netirpių baltymų frakcija; ląst. + IPTG/ ląst.-IPTG – ląstelės paveiktos / nepaveiktos 1mM IPTG. GD Lip-lip gryninimo nedematūruojančiomis sąlygomis analizė (b): M2 – baltymų molekulinės masės žymuo Pierce Unstained Protein MW Marker; A – *E. coli* BL21 (DE3) transformantų, po indukcijos sintetinančių rekombinantinę GD Lip-lip lipazę, ląstelės, ardytos ultragarsu; T – tirpių baltymų frakcija; NB – neprikibusių baltymų frakcija; GD Lip-lip – išgryninta GD Lip-lip lipazė. GDEst-est esterazės gryninimo nedematūruojančiomis sąlygomis analizė (c): A – *E. coli* BL21 (DE3) transformantų, sintetinančių rekombinantinę GDEst-est esterazę, ląstelės, ardytos ultragarsu; T – tirpių baltymų frakcija; GDEst-est – išgryninta GDEst-est esterazė. GD Lip-lip išgryninta naudojant Tris-HCl buferinį tirpalą (50 mM, pH 8 / 20 °C) su 250 mM imidazolo, GDEst-est esterazė – 10 mM imidazolo.

Remiantis NDS-PAGE (3.11a pav.) galima teigti, kad GDLip-lip baltyminis variantas formuoja įterptinius kūnelius ir nemaža dalis naujo sukurto baltymo lieka netirpioje frakcijoje. Vis dėlto tolimesniam fizikinių ir cheminių savybių bei katalizinių parametrų nustatymui GDLip-lip lipazė buvo gryninta nedenatūruojančiomis sąlygomis (tirpi frakcija), siekiant sukelti fermentui kuo mažesnę papildomą poveikį kitomis medžiagomis, pvz., karbamidu, kuris naudojamas atliekant baltymų gryninimą denatūruojančiomis sąlygomis. Taip pat taikant tokį gryninimo būdą, priešingai nei vykdant tikslinio baltymo gryninimą denatūruojančiomis sąlygomis, GDLip-lip fermentas gaunamas be papildomų priemaišų (3.11b pav.). GDEst-est esterazės gryninimo nedenatūruojančiomis sąlygomis rezultatai pateikti 3.11c pav. GDEst-est baltymo atveju vėlgi didesni baltymo kiekiai gaunami naudojant 50 mM Tris-HCl buferinį tirpalą su 10 mM imidazolo. GDlip-lip sulietas fermentas išgryninamas naudojant tą patį buferinį tirpalą, bet su 250 mM imidazolo.

3.2.4 Sulietų GDEst-est ir GDLip-lip lipoliziniu aktyvumu pasižyminčių fermentų fizikinės bei cheminės savybės

GDEst-est ir GDLip-lip sulietiams fermentams buvo įvertinta optimali veiklai temperatūra (3.12a pav.), temperatūros įtaka baltymo stabilumui (3.12c pav.) bei nustatytas optimalus veiklai pH (3.12b pav.).



3.12 pav. Temperatūros įtakos GDEst-95, GDEst-est, GD-95, GDLip-lip bei GDEst-lip sulietų fermentų aktyvumui (a) ir stabilumui (b) bei pH įtakos tiriamų fermentų veiklai (c) įvertinimas. GDEst-95 – taškinė linija su užpildytu kvadratu; GDEst-est – taškinė linija su užpildytu rombu; GD-95 lipazė – tiesi linija su užpildytu apskritimu; GDLip-lip – tiesi linija su užpildytu trikampiu; GDEst-lip – punktyrinė linija su užpildytu trikampiu.

Gauti rezultatai parodė, kad GDLip-lip sulietas baltymas išsiskyrė savo optimalia veiklos temperatūra, kuri yra 65 °C. Papildomo esterazės domeno pridėjimas (GDEst-est esterazė) taip pat pakeitė optimalią GDEst-95 esterazės veiklos temperatūrą iš 60 °C į 70 °C (3.12a pav.). Taigi papildomas to paties domeno pridėjimas padidino abiejų fermentų optimalią temperatūrą ir pagerino jų potencialą būti taikomiems procesuose, kuriuose yra reikalinga aukšta temperatūra. Po dviejų GD-95 domenų suliejimo pagerėjo ir GD-95 lipazės gebėjimas veikti aukštose temperatūrose (70–85 °C). Rezultatai reikšmingai skiriasi 70 °C (*p*-vertė 0,012) ir 85 °C (0,00001), kur monomerinė GD-95 lipazė yra visiškai praradusi savo lipolizinį aktyvumą, o GDLip-lip sulietas baltymas išlaiko 13 % aktyvumo. Tuo tarpu GDEst-est šiame temperatūrų intervale pasižymi panašiu veiklos profiliu į monomerinę GDEst-95 esterazę. Skirtingą abiejų monomerinių fermentų atsaką į to paties domeno prijungimą galėjo nulemti skirtingas fermentų aminorūgščių erdvinis išsidėstymas ir skirtingos aminorūgščių sekos.

Nagrinėjant GDEst-est ir GDLip-lip sulietų baltymų temperatūrinį stabilumą matyti, kad GDEst-est stabilumas stipriai mažėja lyginant su monomerine GDEst-95 (3.12b pav.). Esant 70 °C GDEst-est fermentas praranda daugiau nei 50 % savo aktyvumo (3.12b pav.). GDEst-95 esterazės liekamasis savitasis aktyvumas po inkubacijos šioje temperatūroje artimas 100 % (3.12b pav.). Papildomo lipazės domeno prijungimas padidino GD-95 lipazės stabilumą mezofilinių temperatūrų intervale, tačiau 60–75 °C temperatūrose jis yra artimas monomerinei GD-95 lipazei (3.12b pav.).

Analizuojant gebėjimą veikti skirtingose pH vertėse reikšmingi skirtumai nustatyti tik stipriai šarminėje aplinkoje. GDEst-est geriau veikia, kai aplinkos pH 11 (*p*-vertė 0,013), o GDLip-lip, kai pH 10–11 (pH 10 atveju reikšmingumo lygmuo – 0,001 ir 0,002, kai pH 11). Taigi GDLip-lip ir GDEst-est fermentai yra tinkami taikyti pramonės srityse, kurios reikalauja silpnai rūgštinių, neutralių ar stipriai šarminių aplinkos sąlygų (pH 5,5–10). Tokios srities pavyzdys – odos apdirbimas (mirkymo etapas), kurio metu pašalinami

riebalinės prigimties teršalai, galintys apsunkti kitus odos ir kailių perdirbimo proceso etapus (rauginimą ar dažymą) (Choudhary ir kt., 2004).

Kitos tirtos sukurtų fermentų savybės – substratinis savitumas ir organinių tirpiklių bei detergentų poveikis (3.4 ir 3.5 lentelės).

3.4 lentelė. GD-95 lipazės ir GDEst-95 esterazės bei jų sulietų variantų gebėjimo hidrolizuoti įvairius sintetinius substratus įvertinimas. Matavimai atlikti esant pH 7, 55 °C temperatūroje, kiekvieno fermento aktyvumą ir savitumą vertinant individualiai.

SUBSTRATAS	TIRIAMO FERMENTO SANTYKINIS LIPOLIZINIS AKTYVUMAS (%)				
	GD-95	GDEst-95	GDEst-lip	GDLip-lip	GDEst-est
<i>p</i> -NP acetatas (C2)	87 ±1,41	83 ±1,41	100	53 ±4,24	49 ±7,07
<i>p</i> -NP butyratas (C4)	100	100	97 ±2,24	75 ±1,41	100
<i>p</i> -NP heksanoatas (C6)	95 ±4,07	96 ±3,66	100	80 ±12,02	52 ±0,71
<i>p</i> -NP oktanoatas (C8)	88 ±4,95	82 ±3,54	62 ±4,24	100	52 ±4,95
<i>p</i> -NP dekanooatas (C10)	49 ±9,19	27 ±2,83	31 ±2,12	26 ±1,04	44 ±3,54
<i>p</i> -NP dodekanoatas (C12)	80 ±1,41	18 ±0,71	52 ±1,41	40 ±4,95	34 ±3,54
<i>p</i> -NP tetradekanoatas (C14)	43 ±7,78	7 ±1,41	24 ±0,71	16 ±2,12	17 ±1,41
<i>p</i> -NP heksadekanoatas (C16)	35 ±2,83	3 ±2,12	22±1,41	14 ±2,12	11 ±2,12
<i>p</i> -NP oktadekanoatas (C18)	26 ±2,12	ND	25 ±1,41	7 ±1,41	ND

Kaip rodo gauti rezultatai, papildomo to paties domeno pridėjimas sumažino GDEst-95 gebėjimą hidrolizuoti trumpos grandinės substratus, tačiau 10 % padidino gebą hidrolizuoti C14–C16 junginius (3.4 lentelė). Tai galėjo nulemti pakitęs baltymo susilankstymas erdvėje ir aminorūgščių, susijusių su substratų prijungimu, prieinamumas substratui. Prijungus lipazės domeną (GDLip-lip) fermentas pasižymi lipoliziniu savitumu ilgesnės grandinės substratui: geriausias hidrolizuojamas substratas – *p*-NP oktanoatas, tačiau santykinis lipolizinis aktyvumas hidrolizuojant ilgos grandinės substratus (C12–C18) sumažėjo 2–3 kartus. Visus šiuos pokyčius galima paaiškinti konformaciniais baltymo pakitimais, atsiradusiais prijungus papildomą domeną.

Kaip jau buvo minėta anksčiau, organiniais tirpikliai ir detergentai yra svarbūs pramonėje ir dažnai naudojami reakcijų metu ar įeina į galutinių

produktų sudėtį, todėl svarbu įvertinti, kokį poveikį jie gali turėti naudojamo biokatalizatoriaus veiklai (3.5 lentelė).

3.5 lentelė. Organinių tirpiklių (25 %) bei detergentų (0,1 %) įtakos GD-95 lipazės ir GDEst-95 esterazės bei jų sulietų variantų lipoliziniui aktyvumui įvertinimas. 100 % - fermentų aktyvumas nepaveikus organiniu tirpikliu ar detergentu. Matavimai ir palyginimas atlikti kiekvieno individualaus fermento ribose. Reakcijos sąlygos: pH 9, 55 °C, substratas – *p*-NP dodekanoatas.

POVEIKIS	TIRIAMO FERMENTO SANTYKINIS LIPOLIZINIS AKTYVUMAS (%)				
	GD-95	GDEst-95	GDEst-lip	GDLip-lip	GDEst-est
ORGANINIAI TIRPIKLIAI					
DMSO	60±4,4	39±2,12	92±4,24	71±1,32	31±7,78
DMF	113±6,8	81±8,49	63±1,41	82±9,90	86±0,71
Etanolis	122±6,5	67±3,54	70±7,78	78	69±2,12
Metanolis	80±2,6	82±12,02	81±0,71	90±9,90	11±4,24
Acetonas	90±1,8	87±9,90	70	59±12,02	99±0,71
Izopropanolis	104±3,5	129±12,02	105±0,71	74±2,12	85±2,12
<i>n</i> -butanolis	104±4,3	114±2,12	113±4,24	111	128±2,12
DETERGENTAI					
Triton X-100	ND	113±2,12	63±6,36	12±0,71	123±2,83
Tween 20	ND	90±4,24	26±7,78	ND	111±5,66
Tween 40	ND	126±7,07	46±2,12	ND	164±7,07
Tween 60	ND	136±6,36	59±1,41	ND	100
Tween 80	ND	111±5,66	38±8,49	ND	100
Karbamidas	110±3,3	89±1,41	100	74±2,12	124±4,24

GDEst-est būdingas panašus atsakas į naudotus organinius tirpiklius kaip ir GDEst-95 (išskyrus metanolį) (3.5 lentelė). Šio organinio tirpiklio atveju GDEst-95 esterazės aktyvumas drastiškai sumažėjo nuo 82 iki 11 %. Rezultatai yra reikšmingi su *p*-verte 0,02. Taip pat GDEst-est neaktyvina izopropanolis (85 % liekamojo aktyvumo), kai GDEst-95 šis organinis tirpiklis aktyvino 29 %.

Detergentų atveju po papildomo esterazės domeno prijungimo išliko aktyvinimas Triton X-100, Tween 40, o Tween 60 ir Tween 80 neturėjo reikšmingos įtakos esterazės aktyvumui. Tween 20 ir karbamidas aktyvino GDEst-est fermentą 11 ir 24 %, atitinkamai, lyginant su GDEst-95 esteraze

(3.5 lentelė). Kaip jau buvo minėta, organinių tirpiklių atveju tie patys junginiai gali daryti skirtingą poveikį tos pačios grupės fermentams. Ta pati tendencija būdinga ir detergentams. Yra parodyta, kad Tween 20–80 skatina *G. zalihae* T1 lipazės veiklą (Leow ir kt., 2007), tačiau Tween 80 stipriai slopina *G. stearothermophilus* JC lipazę (Jiang ir kt., 2010). Manoma, kad aktyvinimas yra susijęs su „stogelio“ atsidarymu ar substrato emulsijos stabilizavimu (Leow ir kt., 2007).

GDLip-lip atveju pasikeitė DMF, etanolio ir izopropanolio poveikis fermento veiklai (3.5 lentelė). Rezultatai reikšmingi su p -vertėmis 0,02 (etanoliui) ir 0,01 (izopropanoliui). Svarbu atkreipti dėmesį, kad prijungus papildomą domeną, GD-95 lipazė gebėjo išlaikyti 12 % lipolizinio aktyvumo po poveikio Triton X-100.

Šiame poskyryje pateikti rezultatai atskleidžia, jog baltymų inžinerijos pagalba jungiant du, tų pačių fermentų domenų, galima gauti baltymus, pasižyminčius naujomis savybėmis: keisti fermentų stabilumą, temperatūrinį aktyvumą, substratinį savitumą, jautrumą organiniams tirpikliams ir kitiems aplinkos poveikiams, taip šiuos fermentus paverčiant geresniais biokatalizatoriais.

3.2.5 GDEst-est, GDLip-lip bei GDEst-lip sulietų fermentų kinetinės savybės

Sėkmingai išgryninus tikslinius fermentus buvo įvertintos jų pagrindinės cheminės ir fizikinės savybės, savitasis aktyvumas, išeiga bei katalizinės konstantos (3.6 lentelė), kas yra be galo svarbu norint apibrėžti fermentų funkcionalumą ir pritaikymo potencialą. Analizei naudotas substratas p -NP dodekanoatas, kadangi šį substratą hidrolizuoja visi tiriami fermentai, jis išlieka stabilus aukštesnėse temperatūrose ir aukštesniame pH, todėl yra tinkamas naudoti optimaliomis fermentų veikimo sąlygomis ir gali padėti atspindėti skirtumus ne tik tarp lipazės ir esterazės, bet ir tarp naujų sukurtų baltymų variantų.

3.6 lentelė. GD-95 ir GDEst-95 bei sukurtų chimerinių baltymų pagrindinių katalizinių konstantų įvertinimas. Matavimai atlikti naudojant *p*-NP dodekanoatą, pH – 9, 55 °C temperatūroje.

Baltymas	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}$ mg baltymo)	K_m (mM)	K_{kat} (min^{-1})	Katalizinis efektyvumas K_{kat}/K_m ($\text{Min}^{-1} \text{mM}^{-1}$)	Aktyvacijos energija (kJ/mol)	Aktyvumas (U/mg baltymo)
GD-95	40,82	4,35	$1,78 \cdot 10^6$	$4,10 \cdot 10^5$	24	400
GDEst-95	5,88	5,88	$3,27 \cdot 10^5$	$5,60 \cdot 10^4$	50,30	100
GDEst-lip	20,00	14,29	$2 \cdot 10^6$	$1,40 \cdot 10^5$	68,34	600
GDEst-est	6,32	5,88	$7,02 \cdot 10^6$	$1,19 \cdot 10^6$	46,05	74,29
GDLip-lip	10	16,67	$8,33 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^5$	32,16	200

Didžiausia V_{max} verte pasižymėjo GD-95 lipazė, mažiausia – GDEst-95 ir GDEst-est (3.6 lentelė). Tai nestebina, kadangi, kaip jau minėta, naudojamas labiau lipazėms tinkamas substratas. Svarbu paminėti, kad GDEst-lip fermento V_{max} hidrolizuojant *p*-NP dodekanoatą padidėja daugiau nei tris kartus lyginant su GDEst-95 esteraze. Visgi ši vertė sumažėja lyginant su GD-95 lipaze. Tai patvirtina eksperimentų pradžioje iškeltą hipotezę, kad GDEst-lip baltymas turėtų pasižymėti tarpinėmis savybėmis tarp GDEst-95 esterazės ir GD-95 lipazės. Visgi GDEst-lip fermento V_{max} vertė yra antra pagal dydį vertė lyginant visus penkis baltymus tarpusavyje.

Vertinant K_m reikšmes, mažiausiomis K_m vertėmis ir tuo pačiu didžiausiu giminingumu substratui pasižymėjo GD-95 lipazė, GDEst-95 ir šio baltymo liejinys iš dviejų GDEst-95 domenų, nors tai ir nėra optimalus pastarųjų fermentų veiklai substratas. GDEst-lip ir GDLip-lip, deja, pasižymi mažiausiu giminingumu, tai gali lemti naujų fermentų konformaciniai pokyčiai atsiradę sujungus kelis domenus ir substrato prieinamumas prie aminorūgščių, dalyvaujančių substrato prijungime. Nors substratas nepasižymi didžiausiu giminingumu, tačiau GDEst-lip fermentas jį sėkmingai prisijungia ir vykdo efektyvią hidrolizę. Norint tiksliai prognozuoti tretinę GDEst-lip struktūrą reikalingi tokio ar panašaus baltymo kristalografiniai tyrimai.

Didžiausiu kataliziniu efektyvumu bei K_{kat} vertėmis išsiskyrė pradinė GD-95 lipazė, naujas šiame darbe sukurtas GDEst-lip fermentas bei sulieti, iš dviejų tų pačių domenų sudaryti fermentų variantai. GDEst-lip fermento variantas dešimt kartų pagerino GDEst-95 esterazės katalizines vertes, tačiau GDEst-lip buvo nustatyta didžiausia aktyvacijos energija. Maža aktyvacijos energija nurodo stiprų ryšį tarp fermento ir substrato (Ghori ir kt., 2011). GD-95 lipazė pasižymi mažiausia aktyvacijos energija (24 kJ/mol) iš visų tirtų šiame etape baltymų (3.6 lentelė). Panašią aktyvacijos energijos vertę turi ir *Bacillus* sp. FH5 lipazė (Ghori ir kt., 2011). Nustatyta, kad esant mažesnei aktyvacijos energijai, baltymai geriau veikia žemesnėse temperatūrose (Gudiukaitė ir kt., 2014). Tokius rezultatus patvirtina ir GD-95 lipazė bei GDLip-lip lipazių tyrimai. Šie fermentai iš šiame darbe tirtų baltymų pasižymi geriausiu lipoliziniu aktyvumu žemoje ir vidutinėje temperatūrose (3.10a pav.). Monomerinės GDEst-95 aktyvacijos energija – 50,30 kJ/mol. Plačiau literatūroje aprašytos Est55 esterazės ši vertė buvo 35,7 kJ/mol *p*-NP heksanoatą naudojant kaip substratą, tuo tarpu Est30 esterazės – 101,9 kJ/mol (Ewis ir kt., 2004).

Svarbu aptarti ir savitąjį lipolizinį ir (ar) esterazinį fermentų aktyvumą. GDEst-lip fermentas pasižymi didžiausiu savituoju aktyvumu, kas ir buvo vienas iš chimerinių baltymų kūrimo tikslų (3.6 lentelė). Šio baltymo aktyvumas 1,5 karto didesnis nei pradinės GD-95 lipazės ir šešis kartus nei GDEst-95 esterazės. Papildomo to paties domeno pridėjimas (GDEst-est ir GDLip-lip sulieti baltymai) abiejų pradinių fermentų aktyvumą sumažino beveik du kartus, tačiau, kaip bus aptarta kituose skyreliuose, tokie baltymų variantai pasižymėjo pranašesnėmis fizikinėmis bei cheminėmis savybėmis lyginant su monomerais.

GDEst-lip pasižymi 600 U/mg baltymo savituoju lipoliziniu aktyvumu, kai substratu naudojamas *p*-NP dodekanoatas, reakcija vykdoma 5 min., 55 °C temperatūroje. Palyginimui, komercinės *R. oryzae* lipazės (Sigma-Aldrich) aktyvumas 10 ir 30 U/mg, *C. rugosa* (Sigma-Aldrich) varijuoja nuo 2 U/mg iki

40000 U/mg baltymo, tačiau palyginti šias vertes yra gana sudėtinga, kadangi skiriasi metodikos, naudojamos aktyvumo įvertinimui. *C. rugosa* lipazės, kurios aktyvumas 2 U/mg atveju, 1 aktyvumo vienetas apskaičiuotas vertinant baltymo kiekį, kuris atpalaiduoja 1 μ mol oleino rūgšties per 1 min., esant pH 8 ir 40 °C temperatūrai, kaip substratą naudojant trioleiną. Lipazės, išskirtos iš *P. fluorescens* (Sigma-Aldrich), aktyvumas siekia 160 ir 40 U/mg. *Aspergillus niger* komercinės lipazės (komercinis pavadinimas Lipase AP6, Sigma-Aldrich) atveju, gamintojų duomenimis aktyvumas yra apie 200 U/g ir 1U apibrėžiamas kaip fermento kiekis, kuriam hidrolizuojant triacetiną 1 min. susidaro 1 μ mol acto rūgšties. Reakcija vykdoma, kai aplinkos pH 7,4 ir esant 40 °C temperatūrai. Tokia parametru įvairovė apsunkina objektyvų fermentų aktyvumų lyginimą.

Norint pritaikyti fermentus pramonėje ne mažiau svarbus parametras yra jų išeiga. GD-95, GDLip-lip lipazių, GDEst-95 ir GDEst-est esterazių bei GDEst-lip chimerinio baltymo išeigos buvo atitinkamai 44,16; 13,26; 24,18; 10,35 ir 38,56 mg baltymo (tirpios frakcijos) iš 200 ml auginamos kultūros. Kaip matyti iš pateiktų rezultatų, papildomo to paties domeno prijungimas sumažina gaunamą tiriamų fermentų išeigą, tuo tarpu GDEst-lip baltymo atveju gaunamas kiekis, kurio vertė yra tarpinė tarp GD-95 lipazės ir GDEst-95 esterazės.

Apibendrinant aptartus rezultatus galima teigti, kad GDEst-lip chimerinis baltymas demonstruoja ne tik didelę išeigą bei paprastesnį gryninimo būdą, reikalaujantį mažiau finansinių išlaidų, bet ir didžiausią lipolizinį aktyvumą bei vienas geriausių katalizinių verčių iš visų šiame darbe analizuojamų baltymų. Taip pat šis fermentas galėtų būti puikus konkurentas ir komerciniams lipazių ir (ar) esterazių preparatams.

3.2.6 GDEst-lip sulieto biokatalizatoriaus pagrindinės fizikinės bei cheminės savybės

GDEst-lip – sulietas baltyminis variantas, kuris pasižymi tiek abiejų, jį sudarančių fermentų, savybėmis, tiek turi išskirtines, tik jam būdingas ypatybes. 5–40 °C intervale GDEst-lip heterodimero veiklos profilis yra artimas GDEst-95 veiklos profiliui. 50–55 °C temperatūrose jis imituoja GD-95 lipazę, 60 °C – aktyvumas lygus 100 % kaip ir GDEst-95, o 65–75 °C temperatūrų intervale šiai lipazei būdingi reikšmingi skirtumai nuo abiejų fermentų: 65 °C (p -vertė 0,02 su GDEst-95), 70 °C (0,005 su GD-95 ir 0,02 su GDEst-95) ir 75 °C (0,011 su GD-95 ir 0,02 su GDEst-95). 80–85 °C intervale ji vėl atitinka GDEst-95, o esant 90 °C išlaiko 2 % savo lipolizinio aktyvumo, kai tiek GDEst-95, tiek GD-95 šioje temperatūroje visiškai praranda savo aktyvumą (3.11a pav.). Taigi, šiame darbe sukurtas GDEst-lip lipoliziniu ir (ar) esteraziniu aktyvumu pasižymintis fermentas išlaiko aktyvumą plačiame temperatūrų spektre (5–90 °C) ir pateisina baltymų inžinerijos svarbą keičiant natyvių fermentų savybes.

Kuriant GDEst-lip sulietą biokatalizatorių vienas iš tikslų buvo padidinti GD-95 lipazės stabilumą. Kaip rodo savybių analizė, GDEst-lip fermentas savo aktyvumą visiškai praranda po 30 min. inkubacijos 85 °C temperatūroje. Tai 5 °C aukštesnė temperatūra nei buvo nustatyta GD-95 lipazei. Po inkubacijos 40 °C temperatūroje GDEst-lip liekamasis aktyvumas yra artimas GDEst-95, 50 °C – ji demonstruoja didesnę stabilumą lyginant tiek su GD-95, tiek su GDEst-95 esteraze, 55–60 °C jos liekamasis aktyvumas yra artimas GDEst-95, o 65–70 °C – vertės vėl reikšmingai skiriasi nuo abiejų išeitinių pradinių baltymų: 65 °C (0,02 su GDEst-95 ir GD-95 lipaze); 70 °C (0,01 tik su GD-95 lipaze). 75–85 °C temperatūrų intervale GDEst-lip fermento stabilumas vėl artimas GDEst-95 esterazei (3.12b pav.). Taigi apibendrinant galima teigti, kad sujungus GD-95 lipazės ir GDEst-95 esterazės domenus gaunamas naujas, didesniu temperatūriniu stabilumu pasižymintis biokatalizatorius.

Naujas heterodimerinis GD-95 lipazės ir GDEst-95 esterazės variantas 100 % lipoliziniu aktyvumu pasižymi intervale 9–10, o savo aktyvumą išlaiko pH spektre nuo 6 iki 12 (3.12c pav.). Tokios GDEst-lip savybės daro šį fermentą nauju potencialiu biokatalizatoriumi pramonės procesams, kuriuose reikalingos silpnai rūgštinės, neutralios ar stipriai šarminės sąlygos.

Gauti rezultatai rodo, kad GD-95 lipazė geba hidrolizuoti tiek trumpagrandžius, tiek ilgagrandžius substratus, o GDEst-95 esterazė geriausiai hidrolizuoja C2–C8 substratus (3.4 lentelė). GDEst-lip siekiamybė – kompensuoti GDEst-95 esterazės negebėjimą hidrolizuoti ilgus substratus ir pagerinti GD-95 lipazės gebėjimą hidrolizuoti trumpos grandinės substratus. Kaip matyti iš gautų rezultatų, naujasis GDEst-lip variantas pasižymi 100 % aktyvumu hidrolizuodamas C2–C6 junginius. Taip pat pagerėja gebėjimas skaidyti C12–C18 ilgio substratus lyginant su GDEst-95, tačiau procentinis santykinis lipolizinis GDEst-lip fermento aktyvumas yra šiek tiek mažesnis nei monomerinės GD-95 lipazės. Skirtumai yra reikšmingi substratais naudojant *p*-NP dodekanoatą (*p*-vertė 0,0006 su GDEst-95 ir 0,003 su GD-95), *p*-NP tetradekanoatą (0,005 su GDEst-95 ir 0,01 su GD-95 lipaze), *p*-NP heksadekanoatą (0,02 su GD-95 lipaze ir GDEst-95 esteraze) ir *p*-NP oktadekanoatą (0,002 su GDEst-95).

Vienas esminių skirtumų tarp GD-95 lipazės ir GDEst-95 esterazės buvo jų jautrumas detergentų poveikiui. Šio darbo siekis – sukurti fermentą, kuris būtų tolerantiškas detergentų poveikiui. Kaip rodo gauti rezultatai, GDEst-lip sulietas biokatalizatorius išlaiko 20–70 % lipolizinio aktyvumo po inkubacijos 30 min. su įvairiais Tween ir Triton X-100 (3.5 lentelė). Nors aktyvinimo reiškinio nebelieka (GDEst-95 atvejis), tačiau fermentas nebėra slopinamas (GD-95 lipazės atvejis). Reikšmingi skirtumai nustatyti Triton X-100 (*p*-vertė 0,01 su GD-95 lipaze ir GDEst-95 esteraze), Tween 20 (0,01 su GDEst-95), Tween 40 (0,001 su GD-95 ir 0,004 su GDEst-95), Tween 60 (0,004 su GDEst-95 ir 0,0003 su GD-95) ir Tween 80 (0,02 su GD-95 ir 0,001 su GDEst-95).

Analizuojant organinių tirpiklių poveikį GDEst-lip fermentui nustatyta, kad GDEst-lip fermentą aktyvina tik izopropanolis ir *n*-butanolis (105 ir 113 %, atitinkamai). Kiti organiniai tirpikliai šį fermentą nežymiai slopina, kadangi po inkubacijos išlaikoma 60–90 % santykinio lipolizinio aktyvumo (3.5 lentelė).

Apibendrinant galima teigti, kad papildomo domeno pridėjimas gali padėti modeliuoti fermentų savybes, keičiant jų pH optimumą, temperatūrinį aktyvumą ir stabilumą. Geriausias poveikis nustatytas modifikuojant GD-95 lipazę prie jos prijungus GDEst-95 domeną. Gautas fermentas pasižymi abiejų fermentų savybėmis ir gali būti puikus naujas biokatalizatorius, taikomas aukštose temperatūrose ir (ar) labai šarminėje aplinkoje. Taip pat šis naujas sintetinis baltymas pasižymi dideliu lipoliziniu aktyvumu (600 U/mg) bei gebėjimu hidrolizuoti tiek trumpagrandžius, tiek ilgagrandžius substratus. Jo privalumas yra ir paprastesnės gryninimo sąlygos – nedematūruojančios sąlygos ir 10 mM imidazolo.

3.3 Naujų lipazių kūrimas taikant DNR maišymo bei klaidingosios PGR metodus

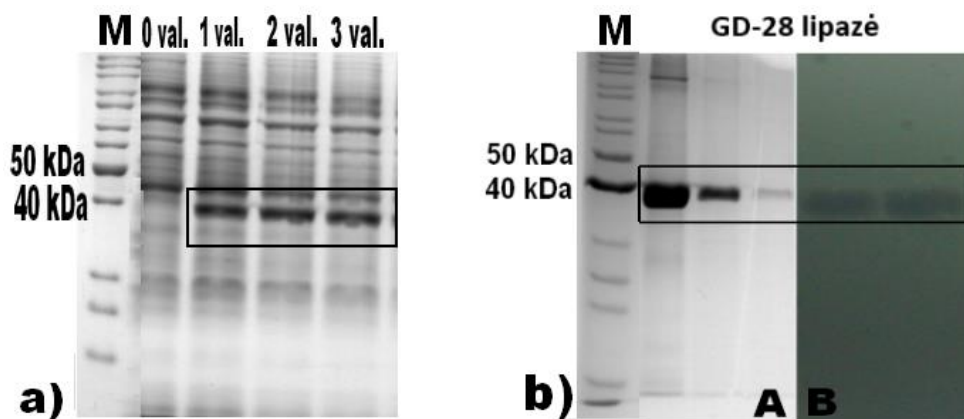
DNR maišymo metodika pasaulyje plačiai taikoma naujų baltymų kūrimui (Patten ir kt., 1997; Li ir kt., 2012bc), tačiau tokio pobūdžio eksperimentų atliktų būtent su *Geobacillus* genties bakterijų išskiriamomis lipazėmis ar esterazėmis iki šiol nėra. Vienas artimiausių ir naujausių tokių tyrimų pavyzdžių – *B. pumilus* lipazė, kurios aktyvumas ir temperatūrinis stabilumas buvo padidinti taikant DNR maišymo metodiką. Mutantinės *B. pumilus* L3-3 lipazės savitasis aktyvumas padidėjo 6,4 ir 8,2 karto lyginant su darbe naudotomis tėvinėmis lipazėmis (Akbulut ir kt., 2013).

Norint taikyti DNR maišymo metodą būtinos dvi ar daugiau homologinės genų sekos. Todėl naudojant *Geobacillus* genties bakterijų lipazių paieškai skirtus pradmenis GelipF-59 ir GelipR+179 buvo pagausinti dar trijų

Geobacillus genties bakterijų išskiriamų lipazių genai. Šie genai klonuoti, įvertinta koduojamų baltymų sintezė, jie išgryninti ir atlikta pagrindinių fizikinių bei cheminių savybių (temperatūros įtaka fermentų aktyvumui ir stabilumui, optimalus veiklai pH, substratinis savitumas) analizė, siekiant atrinkti baltymus, kuriuos koduojantys genai bus naudojami DNR maišymo ir kituose šio etapo baltymų inžinerijos eksperimentuose.

3.3.1 GD-66, GD-76 ir GD-28 lipazių klonavimas ir gryninimas

Pirmuosiuose darbų etapuose buvo pagausintos trijų *Geobacillus* sp. kamienų išskiriamos lipazės, pavadintos GD-28, GD-66 ir GD-76, priklausomai nuo kamieno, kuris jas sintetina. GD-28, GD-66 ir GD-76 lipazių bei ankstesnių darbų metu tirtos GD-95 lipazės sekų analizė *in silico* parodė, kad šių fermentų panašumas aminorūgščių lygmenyje siekia 96–98 %. Aminorūgščių įvairovė tam tikrose padėtyse leido iškelti hipotezę, jog šios lipazės gali pasižymėti ir skirtingomis fizikinėmis bei cheminėmis savybėmis. GD lipazių sintezės, gryninimo ir žimografinės analizės pavyzdys pateiktas 3.13 pav. Pavyzdžiu naudota GD-28 lipazė, kadangi ją koduojantis genas buvo atrinktas tolimesniems eksperimentams.



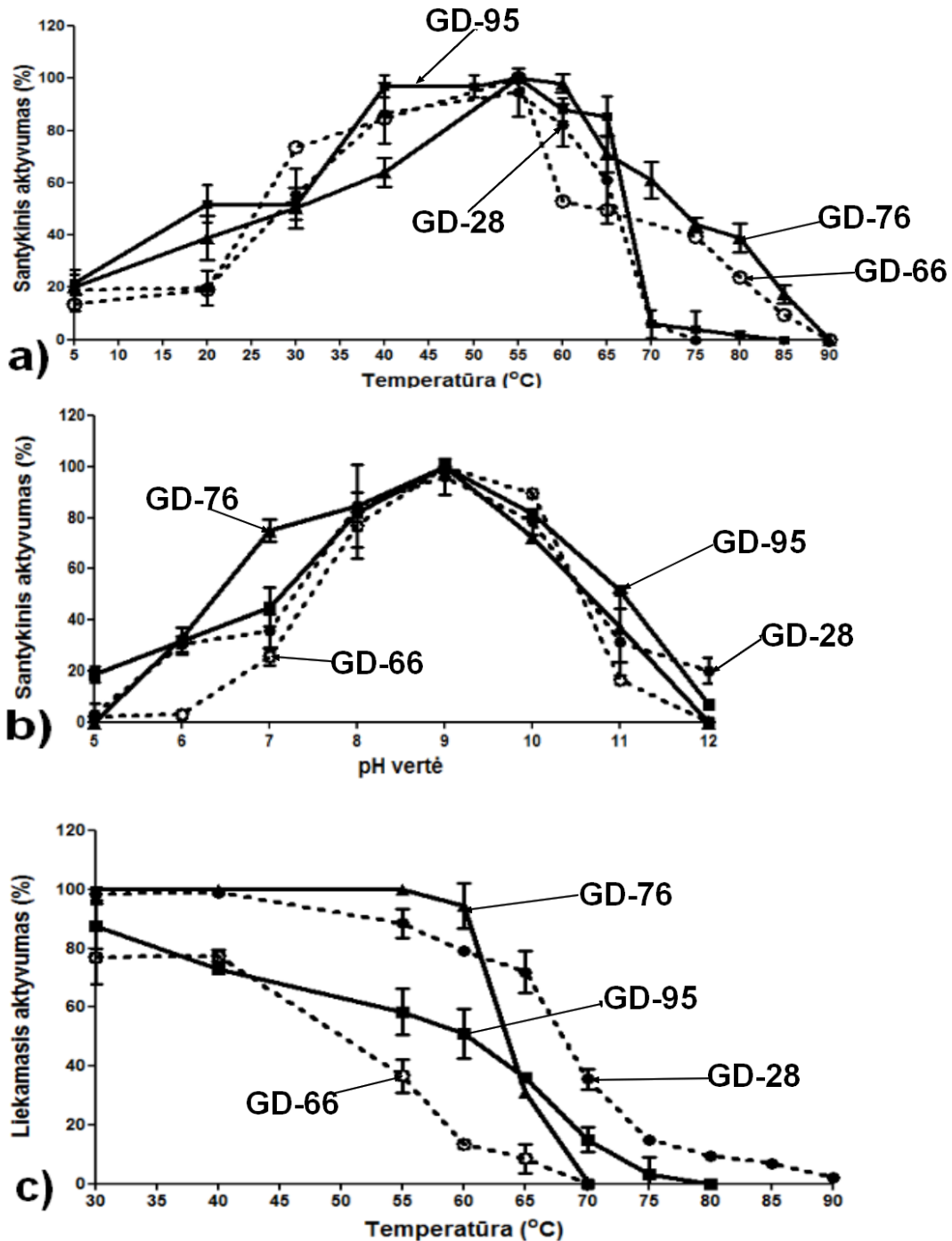
3.13 pav. GD-28 lipazės sintezės (a) ir gryninimo analizė NDS-PAGE bei žimogramoje (b). M – baltymų molekulinės masės žymuo PageRuler Unstained Protein Ladder; 0 val. – mėginys, prieš paveikiant 1 mM IPTG; 1 val.–3 val. – mėginiai, praėjus atitinkamam valandų skaičiui nuo indukcijos pradžios ir paveikti 1 mM IPTG. GD-28 lipazės gryninimo analizė NDS-PAGE (A) ir žimogramoje (B) (b). GD-28 lipazė išgryninta naudojant Tris-HCl buferinį tirpalą (50 mM, pH 8 / 20 °C) su 250 mM imidazolo nedenatūruojančiomis sąlygomis (tirpi baltymų frakcija). Žimografija atlikta substratu naudojant tributiriną.

Iš 3.13a pav. matyti, kad jau po pirmos valandos nuo sintezės indukcijos pradžios gaunamas didelis kiekis baltymo, kurio dydis atitinka tikslinių lipazių dydį (43 kDa). Kadangi 1–3 val. baltymo kiekis išlieka panašus, *E. coli* BL21 (DE3) ląstelės, turinčios plazmidę su įterptu atitinkamu lipazių genu, augintos 2–3 val. nuo indukcijos pradžios ir vėliau naudotos gryninimui taikant imobilizuotų Ni²⁺ jonų giminingumo chromatografiją nedematūruojančiomis sąlygomis. Tiek GD-28 lipazė (3.13b pav.), tiek kitos GD grupės lipazės (GD-66 ir GD-76) išgrynintos naudojant Tris-HCl buferinį tirpalą (50 mM, pH 8 / 20 °C) su 250 mM imidazolo. Zimografinė analizė patvirtino, kad išgryninti baltymai yra tikslinės GD-28, GD-66 ir GD-76 lipazės.

3.3.2 GD-66, GD-76 ir GD-28 lipazių aktyvumas ir stabilumas aukštesiose temperatūrose bei optimalus veiklai pH

Išgryninus GD-66, GD-28, GD-76 lipazes buvo įvertinta veiklai optimali temperatūra (3.14a pav.), optimalus pH (3.14b pav.) bei nustatyta temperatūros įtaka baltymų stabilumui (3.14c pav.). Kartu pateikiama ir ankstesnių tyrimų etapų metu išskirta, klonuota ir išgryninta GD-95 lipazė, siekiant palyginti visas turimas keturias *Geobacillus* genties bakterijų lipazes ir parinkti labiausiai aktyvumu bei temperatūriniais profiliais besiskiriančius fermentus kitam darbų etapui – DNR maišymo eksperimentams.

Tyrimai parodė, kad nors visos lipazės geriausiai veikia, kai aplinkos pH 9, jos skiriasi savo gebėjimu veikti žemesnėse pH reikšmėse, kai pH 5–7. Šiame intervale išsiskiria GD-66 lipazė, demonstruojanti mažiausią lipolizinį aktyvumą lyginant su kitomis GD lipazėmis. Didžiausią aktyvumą demonstruoja GD-95 ir GD-76 lipazės (3.14b pav.).



3.14 pav. Temperatūros įtakos GD-95, GD-76, GD-28 ir GD-66 lipazių aktyvumui (a) ir stabilumui (c) bei pH įtakos tiriamų fermentų veiklai (b) įvertinimas. GD-28 – taškinė linija su užpildytu apskritimu; GD-66 – taškinė linija su tuščiu apskritimu; GD-76 – tiesi linija su trikampiui; GD-95 – tiesi linija su kvadratu.

Lyginant veiklai optimalią temperatūrą, GD-28 ir GD-66 lipazės 100 % lipoliziniu aktyvumu pasižymėjo esant 55 °C (kaip ir ankstesniuose darbuose analizuota GD-95 lipazė). GD-76 lipazė 100 % aktyvumą parodė, kai

aplinkos temperatūra – 60 °C (3.14a pav.). Vertinant gebėjimą veikti aukštose temperatūrose keturios *Geobacillus* genties bakterijų lipazės pasiskirstė į dvi grupes, kur GD-28 lipazė pasižymi panašumu į GD-95 lipazę, o GD-66 lipazė į GD-76 lipazę. GD-28 lipazė kaip ir GD-95 jau esant 70 °C praranda 90 % savo aktyvumo, tuo tarpu GD-66 ir GD-76 lipazių santykinis aktyvumas yra didesnis nei 50 % (3.14a pav.). Rezultatai reikšmingai skiriasi 70 °C (GD-28 lipazė su *p*-vertėmis 0,0003 ir 0,002 GD-66 ir GD-76 lipazėms); 75 °C (GD-28 lipazė su *p*-vertėmis 0,006 ir 0,005 GD-66 ir GD-76 lipazėms, atitinkamai; reikšmingų skirtumų tarp GD-66 ir GD-76 lipazių nenustatyta); 80 °C (GD-28 lipazė su *p*-vertėmis 0,0003 ir 0,001 GD-66 ir GD-76 lipazėms, atitinkamai); 85 °C (GD-28 lipazė su *p*-vertėmis 0,0001 ir 0,003 GD-66 ir GD-76 lipazėms, atitinkamai).

GD-95, GD-28 ir GD-66 lipazių veiklai optimali temperatūra (55 °C) sutampa su *G. stearothermophilus* JC (Jiang ir kt., 2010), *G. stearothermophilus* P1 (Sinchaikul ir kt., 2001) ir *Geobacillus* sp. RD-2 (Wu ir kt., 2010), *Geobacillus* sp. EPT9 (Zhu ir kt., 2015) kamienų lipazių veiklai optimalia temperatūra. Tuo tarpu 60 °C veiklai optimali temperatūra būdinga *G. stearothermophilus* L1 (Kim ir kt., 1998), *G. thermoleovorans* Toshki (Abdel-Fattah ir Gaballa, 2008), *Geobacillus* sp. SBS-4S (Tayyab ir kt., 2011), *Bacillus* sp. Tp10A.1 LipA (Sunna ir kt., 2002) lipazėms. Galimi ir kiti variantai: *Geobacillus* sp. T1 (Leow ir kt., 2007) bei *Bacillus* sp. L2 (Sabri ir kt., 2009; Shariff ir kt., 2011) lipazių optimali veiklai temperatūra – 70 °C; *G. thermoleovorans* ID-1 lipazės – 70–75 °C (Lee ir kt., 1999; Cho ir kt., 2000), o *Geobacillus* sp. TW1 lipazės – 40 °C (Li ir Zhang, 2005). Šios visos, jau aprašytos lipazės, taip pat geriausiai veikia šarminėje aplinkoje ir jų optimalios veiklai pH vertės varijuoja tarp 7,5–10.

Stabilumo aukštose temperatūrose tyrimai parodė, kad GD-28 ir GD-95 lipazės išlaiko didesnę stabilumą aukštesnėse temperatūrose lyginant su GD-66 ir GD-76 lipazėmis (3.14c pav.). Stabiliausia iš jų buvo GD-28, o mažiausiu stabilumu pasižymėjo GD-66 lipazė. Šie rezultatai parodė tendenciją, kad

lipazės, pasižyminčios didesniu santykinu aktyvumu aukštesnėse temperatūrose vis dėlto pasižymi mažesniu temperatūriniu stabilumu. Tokia pati tendencija jau buvo aptarta 3.1.5 skyrelyje apie R grupės mutantus. GD-28 lipazės temperatūrinis stabilumas reikšmingai skiriasi nuo kitų GD lipazių 65–85 °C temperatūrų intervale. Skirtumai yra reikšmingi 65 °C (p -vertė 0,01 GD-66 ir GD-76 lipazėms, ir 0,02 GD-95 lipazei); 70 °C (p -vertė 0,005 GD-66 ir GD-76 lipazėms ir 0,02 GD-95 lipazei); 75 °C (p -vertė 0,004 GD-66, GD-76 ir GD-95 lipazėms). Po inkubacijos 80–90 °C GD-28 lipazė išlaiko apie 10 % lipolizinio aktyvumo, kai tuo tarpu kitos lipazės po inkubacijos šiose temperatūrose visiškai praranda aktyvumą.

Gauta temperatūrinio aktyvumo ir stabilumo analizė suteikė pagrindą skirtingų GD lipazių genų taikymui tolimesniuose baltymų inžinerijos eksperimentuose, naudojant DNR maišymo ar kitą homologinių sekų rekombinacijai skirtą metodą, siekiant gauti geresnėmis savybėmis pasižyminčius fermentus. Siekiamybė – sukurti fermentą, kuris pasižymėtų didesniu stabilumu bei gebėjimu veikti aukštesnėse temperatūrose (>55 °C), todėl DNR maišymo eksperimentams pasirinktos GD-95, GD-66 ir GD-28 lipazės.

3.3.3 Naujų lipoliziniu aktyvumu pasižyminčių fermentų kūrimas taikant DNR maišymo metodiką

Atrinkus *Geobacillus* bakterijų lipazių genus, tinkamus baltymų inžinerijos eksperimentams, kitas etapas buvo DNR maišymo metodikos optimizavimas. Taikant šį metodą svarbu atrasti balansą tarp naudojamų DNazės I aktyvumo vienetų; temperatūros, kurioje vykdoma reakcija; reakcijos laiko; reakcijos tūrio; taip pat svarbu parinkti tinkamą reakcijos stabdymui metodą. Ne mažiau svarbus yra Mn^{2+} ir Mg^{2+} jonų naudojimas, kadangi nuo jų priklauso DNazės I vykdomos reakcijos pobūdis. Jei reakcijos mišinyje yra Mg^{2+} jonų, DNazė I kerpa kiekvieną dvigrandinę DNR grandinę nepriklausomai ir susidaro fragmentai, turintys iškišų. Jei į reakcijos mišinį įdedama Mn^{2+} jonų, DNazė I kiekvieną grandinę kerpa apytikriai toje pačioje

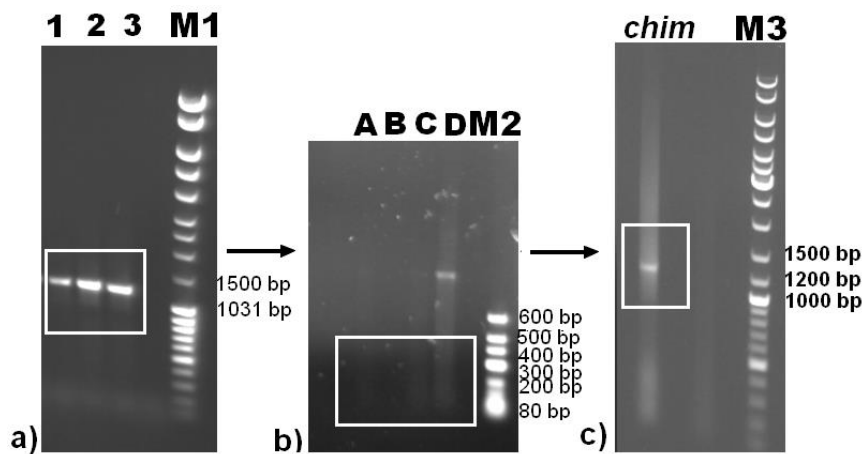
vietoje ir susidaro fragmentai, kuriems būdingi buki galai (Malek ir kt., 2000). Šiame darbe visų reakcijų atveju naudoti buferiniai tirpalai su abiejų metalų jonais. Kadangi 37 °C temperatūroje vyko pilna fragmentų hidrolizė, kitos reakcijos sąlygos optimizuotos kambario temperatūroje (20–22 °C). Kiekvienu atveju, norint įvertinti gautą rezultatą, atlikta DNR fragmentų elektroforezė agarozės gelyje. Tikslas – po hidrolizės gauti 50–200 bp dydžio fragmentus. Teigiamą atsikartojantį rezultatą pavyko gauti naudojant 0,04U DNazės I, reakciją vykdant 20 µl tūryje 5 min. kambario temperatūroje (3.15 pav.).

DNazės I aktyvumo vienetai (U) reakcijos mišinyje	Reakcijos laikas (min)	Reakcijos tūris (µl)	Metodas, naudotas reakcijos stabdymui	Rezultatas		
0,01	10	10	Elektroforezė agarozės gelyje	Visiška hidrolizė		
0,1						
0,2	2	50	90 °C 10 min.			
	4	50	90 °C 10 min.			
	6					
	8					
0,1	10	10	90 °C 5 min.			
0,01						
0,1	2	50	EDTA (7 mM reakcijos tūriui)		Neefektyvi hidrolizė	
	4					
	8					
	10					
0,3	1			5		Visiška hidrolizė
	2					
	5					
0,12	5					
	10					
	15					
	20					
0,02	5	20		Neefektyvi hidrolizė		
0,12	2	50		Tinkama dalinė hidrolizė		
	3					
	5					
	7					
0,04	5	20				
0,06						
0,08						
0,1						

3.15 pav. DNR maišymo sąlygų optimizavimas.

Po hidrolizės 50–400 bp dydžio fragmentai (didesni fragmentai nei rekomenduoja literatūros šaltiniai naudoti iškeliant hipotezę apie minimalios veiklios struktūros egzistavimą) išvalyti iš agarozės gelio ir naudoti PGR,

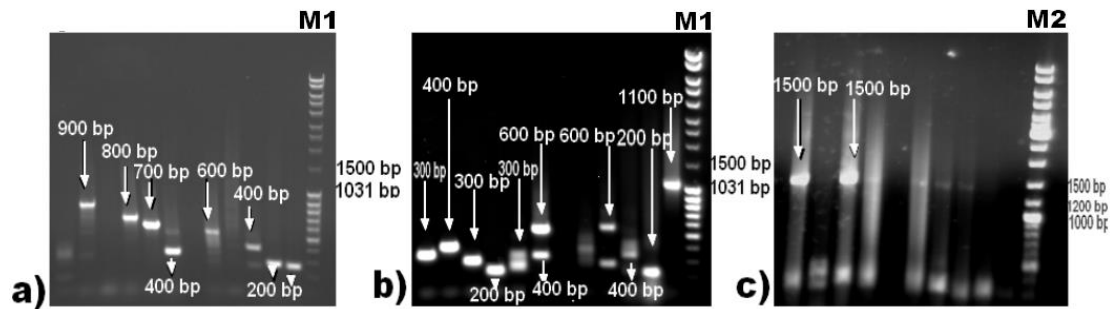
kurioje vieni kitiems atlieka ir pradmenų, ir matricos vaidmenį. Kadangi gautų produktų koncentracija labai maža, atliekant tokios DNR analizę agarozės gelyje, aiškių produktų gali ir nesimatyti. Gautas PGR produktas naudotas kaip matrica antrojoje PGR, kurioje jau naudojami pradmenys, leidžiantys pagausinti tėvinį geną (Gelip95-43-F ir Gelip95R). 3.15 pav. pateikti pradiniai hidrolizei naudojami PGR produktai (3.16a pav.), DNazės I atlikta hidrolizė (3.16b pav.) ir gautas PGR produktas po PGR su pradmenimis (3.16c pav.).



3.16 pav. DNR maišymo eksperimentuose naudoti *Geobacillus* genties bakterijų lipazių genų produktai, pagausinti PGR metu (a), po dalinės PGR produktų hidrolizės naudojant DNazę I gauti fragmentai (b) bei po PGR su pradmenimis gautas chimerinis lipazių genų produktas, atitinkantis tėvinių genų dydį (c). M1 – MassRuler DNA Ladder Mix; 1 – *lip66*, 2 – *lip28*, 3 – *lip95* genų produktai; M2 – SORPOsize™ DNA Ladder; A – hidrolizės profilis reakcijos mišinyje naudojant 0,1U DNazės I; B – hidrolizės profilis reakcijos mišinyje naudojant 0,08U DNazės I; C – hidrolizės profilis reakcijos mišinyje naudojant 0,04U DNazės I; D – hidrolizės profilis reakcijos mišinyje naudojant 0,02U DNazės I; M3 – GeneRuler DNA Ladder Mix; *chim* – produktas, gautas po PGR su pradmenimis. Balti stačiakampiai žymi tikslinius produktus.

Po antrosios PGR gauti produktai buvo liguojami į klonavimui skirtą pTZ57R/T vektorių ir transformuoti į *E. coli* DH5α ląsteles. Tinkamų transformantų atrankai taikyta baltų / mėlynų kolonijų atrankos sistema, taip pat remtasi jų gebėjimu hidrolizuoti terpėje esantį substratą – tributiriną bei atlikta kolonijų kokybinė PGR. Atliekant DNR maišymo eksperimentus kolonijų PGR metodu iš viso buvo patikrinta 300 transformantų. Tarp jų pavyko aptikti kelis transformantus, turinčius 400, 600 ir 1000 bp dydžio

fragmentus (3.17a ir 3.17b pav.), tačiau įvykdžius sekoskaitą, atviro skaitymo rėmelio nustatyti nepavyko.



3.17 pav. *E. coli* DH5 α ląstelių transformantų, turinčių pTZ57R/T plazmidę su įterptu po DNR maišymo eksperimentų gautu PGR produktu, analizė. M1 – MassRuler DNA Ladder Mix (a ir b); M2 – GeneRuler DNA Ladder Mix (c); kiti takeliai – produktai, gauti kolonijų PGR metodu tikrinant skirtingas transformantų kolonijas.

Tęsiant eksperimentus galiausiai pavyko pagausinti DNR fragmentą, savo dydžiu atitinkantį tėvinių lipazių genų dydį – ~1,2 kb (3.17c pav.).

3.3.4 GDlip43 fermento geno modifikavimas naudojant klaidingą PGR, gauto produkto klonavimas, baltymo sintezė ir gryninimas

Po DNR maišymo eksperimentų pagausintas *chim* genas sekvenuotas ir gauta seka palyginta su tėvinių genų sekomis. Analizė parodė, kad naujos lipazės genas pasižymi dideliu panašumu į tėvinių lipazių genus (3.18 pav.). Dėl šios priežasties naujos sintetinės lipazės įvairovę bandyta padidinti naudojant kitą, plačiai taikomą baltymų inžinerijos metodą – klaidingą PGR.

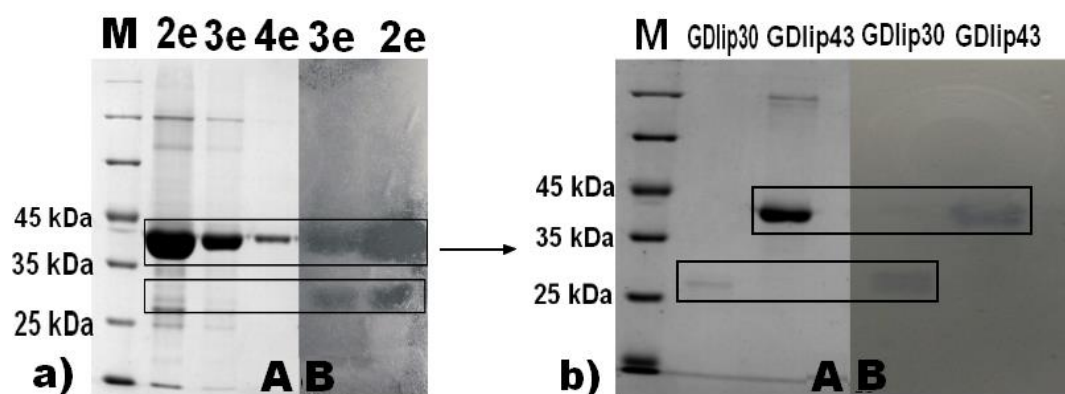
Po dviejų klaidingųjų PGR gautas 1,2 kb dydžio produktas klonuotas į klonavimo vektorių ir vykdyta įterpto geno sekoskaita. Atlikus gauto produkto sekoskaitą buvo nustatytas 1 atviro skaitymo rėmelis (jo koduojamas baltymas pavadintas GDlip43), kuris pasižymėjo 98 % (su GD-95), 96 % (su GD-66) ir 97 % (su GD-28) panašumu su pradinuose etapuose naudotais lipazių genais (3.18 pav.). Toks didelis panašumas nestebina, kadangi vienas pagrindinių literatūroje aprašomų pasirinktų metodų trūkumų – didelis naujų produktų aminorūgščių panašumas į tėvinius baltymus. Visgi, kaip jau parodė GD

lipazių analizė, šių skirtumų gali pakakti, kad gautas fermentas pasižymėtų naujomis savybėmis.

Chim	1	-----FGFKYWGGVVRGDIEQWLNDNGYQAYTLAVGPLSSNWD	77
GDlip43		AVSRANDAPIVLLHGFTGWGREEMFGFKYWGGVVRGDIEQWLNDNGYQAYTLAVGPLSSNWD	
GD-95		AVSRANDAPIVLLHGFTGWGREEMFGFKYWGGVVRGDIEQWLNDNGYQAYTLAVGPLSSNWD	
GD-28		AVSRANDAPIVLLHGFTGWGREEMFGFKYWGGVVRGDIEQWLNDNGYQAYTLAVGPLSSNWD	
GD-66		AVSRANDAPIVLLHGFTGWGREEMFGFKYWGGVVRGDIEQWLNDNGYRTYTLAVGPLSSNWD	
Chim	78	GAAHAAKHGHRFGRTPGLLPELKRGGRIHIIAHSQGGQTARMLVSLLENGSQEEREYAKAHNVLSPLFEGGHHV	154
GDlip43		GAAHAAKHGHRFGRTPGLLPELKRGGRIHIIAHSQGGQTARMLVSLLENGSQEEREYAKAHNVLSPLFEGGHHV	
GD-95		GAAHAAKHGHRFGRTPGLLPELKRGGRIHIIAHSQGGQTARMLVSLLENGSQEEREYAKAHNVLSPLFEGGHRF	
GD-28		GAAHAAKHGHRFGRTPGLLPELKRGGRIHIIAHSQGGQTARMLVSLLENGSQEEREYAKAHNVLSPLFEGGHHV	
GD-66		GAAHAAKHGHRFGRTPGLLPELKRGGRIHIIAHSQGGQTARMLVSLLENGSQEEREYAKAHNVLSPLFEGGHHV	
Chim	155	VLSVTTIATPHDGTTLVNMVDFDRFFDLQKAVLEAAAVASNAPYTSEIYDFKLDQWGLRREPGESEFDHYFERLKR	231
GDlip43		VLSVTTIATPHDGTTLVNMVDFDRFFDLQKAVLEAAAVASNAPYTSEIYDFKLDQWGLRREPGESEFDHYFERLKR	
GD-95		VLSVTTIATPHDGTTLVNMVDFDRFFDLQKAVLEAAAVASNAPYTSEIYDFKLDQWGLRREPGESEFDHYFERLKR	
GD-28		VLSVTTIATPHDGTTLVNMVDFDRFFDLQKAVLEAAAVASNAPYTSEIYDFKLDQWGLRREPGESEFDHYFERLKR	
GD-66		VLSVTTIATPHDGTTLVNMVDFDRFFDLQKAVLEAAAVASNVPYTSQVYDFKLDQWGLRREPGESEFDHYFERLKR	
Chim	232	PVWTSTDTARYDLSVLSAEKLNQWVQASPNYYLSFSFSTERTYRGALTGNYYPELGMNAFSAVVCAPFLGSRNPTLG	308
GDlip43		PVWTSTDTARYDLSVLSAEKLNQWVQASPNYYLSFSFSTERTYRGALTGNYYPELGMNAFSAVVCAPFLGSRNPTLG	
GD-95		PVWTSTDTARYDLSVLSAEKLNQWVQASPNYYLSFSFSTERTYRGALTGNYYPELGMNAFSAVVCAPFLGSRNPTLG	
GD-28		PVWTSTDTARYDLSVLSAEKLNQWVQASPNYYLSFSFSTERTYRGALTGNYYPELGMNAFSAVVCAPFLGSRNPTLG	
GD-66		PVWTSTDTARYDLSVLSAEKLNQWVQASPNYYLSFAFERTYRGALTGNYYPELGMNAFSAVVCAPFLGSRNPTLG	
Chim	309	IDDRWLENDGIVNTVSMNGPKRGSSDRIVPDGALK-----	388
GDlip43		IDDRWLENDGIVNTVSMNGPKRGSSDRIVPYDALKRQVWVNDMGTYNVDHLEIIGVDPNPSFDIRAFYLR	
GD-95		IDDRWLENDGIVNTVSMNGPKRGSSDRIVPYDALKRQVWVNDMGTYNVDHLEIIGVDPNPSFDIRAFYLR	
GD-28		IDSHWLENDGIVNTVSMNGPKRGSSDRIVPYDALKRQVWVNDMGTYNVDHLEIIGVDPNPSFDIRAFYLR	
GD-66		IDDRWLENDGIVNTVSMNGPKRGSSDRIVPYDALKRQVWVNDMGTYNVDHLEIIGVDPNPSFDIRAFYLR	

3.18 pav. GD-95, GD-66, GD-28 lipazių ir po DNR maišymo eksperimentų (Chim) bei po pakartotinių klaidingųjų PGR (GDlip43) gautų lipazių aminorūgščių sekų palyginimas. Skirtumai sekose pažymėti juodais stačiakampiais. Brūkšneliai žymi sekos vietas, kurių nuskaityti nepavyko. Palyginimas sukurtas naudojant MEGA 4.0.2 programą.

Toliau naujas GD grupės (GD-95, GD-76, GD-66 ir GD-28) lipazių genų variantas buvo perklonuotas į raiškos vektorių pET-21c(+) ir vykdyta koduojamo fermento sintezė *E. coli* BL21 (DE3) ląstelėse. Vėliau baltymas grynintas, taikant imobilizuotų Ni²⁺ jonų giminingumo chromatografiją, kaip ir visi kiti ankstesniuose skyreliuose aptarti baltymai. Po gryninimo gautų eliucijos frakcijų NDS-PAGE ir zimografinė analizė pateikta 3.19a pav.



3.19 pav. Po tiesioginės evoliucijos eksperimentų gautos lipazės (a) bei vėliau atskirtų GDlip30 ir GDlip43 lipoliziniu aktyvumu pasižyminčių fermentų gryninimo analizė NDS-PAGE ir zimogramose. Po tiesioginės evoliucijos eksperimentų sukurtos lipazės gryninimas (a): M – baltymų molekulinės masės žymuo Pierce Unstained Protein MW Marker; 2e–4e – atitinkamos eliucijos etapo frakcijos. GDlip30 ir GDlip43 baltymai po eliucijos iš gelio ir pakartotinos analizės NDS-PAGE (A) ir zimogramoje (B) (b). Zimografijai naudotas substratas – tributirinas.

Kaip matyti iš pateiktos NDS-PAGE ir zimografinės analizės (3.19 pav.) po tiesioginės evoliucijos eksperimentų sukurta lipazė po gryninimo nėra homogeniška (3.19a A pav.) ir zimogramoje (3.19a B pav.) matomos 2 skaidrios zonos (43 kDa ir apie 30 kDa), kurios žymi lipolizinį aktyvumą. Baltymai pavadinti GDlip43 ir GDlip30 pagal jų molekulinę masę. Įdomu tai, kad šie du baltymai gaunami vykdant vienos sekos transliaciją. Keliamą prielaidą, kad transliacijos metu ribosoma startiniu kodonu traktuoja kitą, sekoje esantį metioniną. Analizė *in silico* leido nustatyti kelis potencialius ASR, po kurių transliacijos galėtų susidaryti 30 kDa baltymai, tačiau norint tai patvirtinti reikalingi tolimesni šios sekos ir GDlip30 baltymo tyrimai. 2016 m. paskelbti M. J. Jennings su bendraautoriais rezultatai, susiję su mielių Gcn5 baltymu rodo, kad vykstant rekombinantinių baltymų sintezei *E. coli* ląstelėse iš tiesų yra galima sutrumpintų tikslinių baltymų sintezė, kuri priklauso tik nuo to, kad *E. coli* Šaino-Dalgarno seka gali varijuoti, o start kodonu gali būti traktuojama ir ATG seka esanti rekombinantinio heterologinio baltymo sekos viduryje. Atliekant eksperimentus ir vykdant tokių baltymų gryninimą, visais chromatografijos metodų atvejais yra gaunamas tikslinis baltymas kartu su sutrumpintu jo variantu (Jennings ir kt., 2016). Dėl šių priežasčių GDlip43 ir

GDlip30 lipazės viena nuo kitos buvo atskirtos taikant eliuciją iš NDS-PAGE gelio. Sutrumpinto varianto susidarymo priežastis gali būti ir dalinė naujojo fermento proteolizė.

Taikant eliuciją iš NDS-PAGE GDlip30 ir GDlip43 baltymai buvo sėkmingai atskirti, tačiau, reikia paminėti, kad šių baltymų išėiga sąlyginai buvo maža (kokybinis vertinimas taikant NDS-PAGE). Pavykus identifikuoti GDlip30 fermento aminorūgščių seką, galima būtų apibrėžti minimalią *Geobacillus* lipazių struktūrą, kuri dar geba išlaikyti lipolizinį aktyvumą ir tarnauti kaip pilnavertis biokatalizatorius. Šiame darbe buvo susikoncentruota į šio baltymo atskyrimą nuo GDlip43 lipazės ir šių naujų baltymų savybių analizę.

3.3.5 GDlip30 ir GDlip43 lipazių fizikinės, cheminės bei katalizinės savybės

3.3.5.1 Pagrindinių katalizinių konstantų įvertinimas

Tolesniuose darbų etapuose buvo įvertintas GDlip30 ir GDlip43 lipazių savitasis aktyvumas bei pagrindinės katalizinės konstantos ir gautos vertės palygintos su tėvinėmis lipazėmis. Rezultatai pateikti 3.7 lentelėje.

3.7 lentelė. GD grupės lipazių bei po baltymų inžinerijos eksperimentų gautų GDlip30 ir GDlip43 lipazių pagrindinių katalizinių konstantų įvertinimas. Matavimai atlikti naudojant *p*-NP dodekanoatą, pH 9, 55 °C.

Baltymas	Savitasis aktyvumas (U/mg)	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}$ mg baltymo)	K_m (mM)	K_{kat} (min^{-1})	Katalizinis efektyvumas K_{kat}/K_m ($\text{min}^{-1} \text{mM}^{-1}$)
GD-95	400	40,82	4,35	$1,78 \cdot 10^6$	$4,10 \cdot 10^5$
GD-66	22	9,05	14,29	$3,93 \cdot 10^5$	$2,75 \cdot 10^4$
GD-28	60	28,01	11,74	$1,22 \cdot 10^6$	$1,04 \cdot 10^5$
GDlip30	40	11,15	7,14	$3,38 \cdot 10^5$	$4,73 \cdot 10^4$
GDlip43	40	8,65	6,67	$3,76 \cdot 10^5$	$5,64 \cdot 10^4$

Atlikus gautų baltymų aktyvumo ir katalizinių konstantų palyginimą buvo nustatyta, kad abiejų naujų fermentų lipolizinis aktyvumas yra 40 U/mg. Šios vertės 10 kartų mažesnės už GD-95 lipazės, bet 2 kartus didesnės už GD-66 lipazės aktyvumą. V_{\max} vertėmis GDlip43 ir GDlip30 lipazės artimiausios GD-66 lipazei, tuo tarpu K_m reikšmės artimesnės GD-95 lipazei. Tai rodo, kad naujieji baltymai pasižymi didesniu savitumu *p*-NP dodekanoatui, kuris buvo naudojamas šiuose matavimuose, lyginant su GD-66 ir GD-28 lipazėmis.

Informacijos apie *Geobacillus* išskiriamų lipazių katalizines konstantas nėra daug. Literatūroje galima rasti informacijos apie kelias *Geobacillus* lipazes, kurių pagrindinės katalizinės konstantos buvo nustatytos substratu naudojant *p*-NP palmitatą. N. A. Soliman su bendraautoriais (2007) nustatė *G. thermoleovorans* YN lipazės K_m ir V_{\max} konstantas, kurios buvo atitinkamai 1,1 mM ir 25,2 $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ baltymo. *G. stearothermophilus* HU1 lipazės K_m ir V_{\max} vertės – atitinkamai 0,23 mM ir 0,161 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ (Massadeh ir kt., 2012). *G. stearothermophilus* MC-7 lipazės – 0,33 mM ir 188 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ baltymo (Kambourova ir kt., 2003), o *Bacillus* sp. termostabilios lipazės – 0,0016 mM ir 0,885 $\text{mM}/\text{min}/\text{ml}$ (Saeed ir kt., 2005). Kaip matyti iš pateiktų duomenų, katalizinių konstantų vertės varijuoja ir tai priklauso nuo kiekvieno konkretaus baltymo.

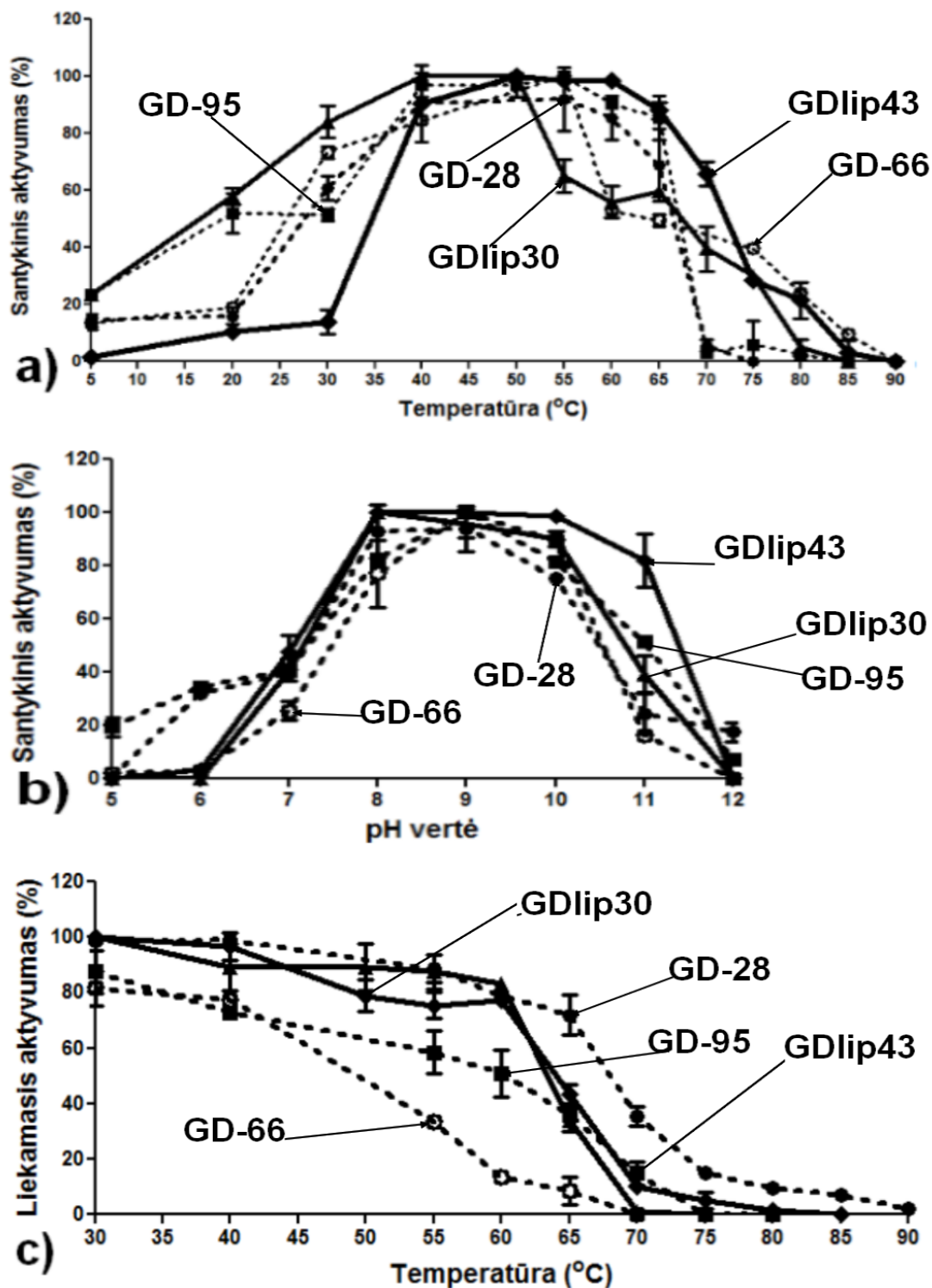
Naujų GDlip30 ir GDlip43 lipazių katalizinės konstantos K_{kat} ir katalizinio efektyvumo nustatyti įverčiai taip pat artimesni GD-66 lipazei. GDlip30 ir GDlip43 lipazių katalizinis efektyvumas – $4,73 \cdot 10^4 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ ir $5,64 \cdot 10^4 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$, atitinkamai. Šios vertės 10 kartų mažesnės už GD-28 ir GD-95 lipazės vertes. Taigi, aktyvumu bei pagrindinių katalizinių konstantų įverčiais naujos, po baltymų inžinerijos eksperimentų gautos lipazės artimiausios GD-66 lipazei, nors šių fermentų savitasis aktyvumas pagerėjo du kartus, lyginant su GD-66 tėvine lipaze.

GD-95 ir GD-66 lipazės pasižymi didžiausiu lipolizinio aktyvumo skirtumu (3.7 lentelė). GDlip43 variantas artimesnis GD-66 lipazei, todėl

galima daryti prielaidą, kad aminorūgštys, kuriomis skiriasi šios trys lipazės, gali būti reikšmingos *Geobacillus* lipazių lipoliziniam aktyvumui. Keliama hipotezė, kad šios aminorūgštys galėtų būti Arg153 ir Phe154, kurios yra GD-95 lipazėje, tačiau visose kitose tiriamose lipazėse jos yra pakeistos į His153 ir Val154 (3.11 pav.). Kita aminorūgštis kandidatė – Leu247, kurią šioje padėtyje turi GDlip43. GD-66 lipazėje šioje padėtyje lokalizuota Ser, o GD-95 lipazėje – Pro aminorūgštis. Šalia šios padėties yra išsidėsčiusios aminorūgštys, dalyvaujančios sudarant sąveiką su substratu (Trp234, Ala240, Leu244 (Carrasco-Lopez ir kt., 2009)). Kaip bus parodyta tolimesniuose skyreliuose, GD-66 lipazė pasižymi mažesniu gebėjimu hidrolizuoti ilgagrاندžius substratus lyginant su GD-95 ar hibridine GDlip43 lipaze. Todėl neatmetama galimybė, kad 153, 154 ir 247 padėtyse išsidėsčiusios aminorūgštys gali daryti įtaką ir fermento substratiniam savitumui. Aminorūgščių skirtumai sekoje gali lemti pokyčius tretinėje struktūroje ir tuo pačiu skirtingą gebėjimą prisijungti ir hidrolizuoti naudojamą substratą. Šių aminorūgščių vaidmens užtikrinant lipolizinį aktyvumą įvertinimas bei svarba lemiant substratinį fermentų savitumą – ateities tyrimų uždavinys.

3.3.5.2 Temperatūros įtaka GDlip30 ir GDlip43 lipazių aktyvumui ir stabilumui bei pH įtaka fermentų veiklai

GDlip30 ir GDlip43 lipazių veiklai optimalaus pH įvertinimas bei temperatūros įtaka fermentų aktyvumui ir stabilumui pateikti 3.20 pav. Kartu pateikiami ir tėviniai GD-95, GD-28 ir GD-66 fermentai, siekiant išryškinti panašumus ir skirtumus tarp pradinių ir naujų baltymų (3.20 pav.).



3.20 pav. Temperatūros įtakos GD-95, GD-66, GD-28 ir naujų GDlip30 bei GDlip43 lipazių aktyvumui (a) ir stabilumui (c) bei pH įtakos tiriamų fermentų veiklai (b) įvertinimas. GD-28 – taškinė linija su užpildytu apskritimu; GD-66 – taškinė linija su tuščiu apskritimu; GD-95 – taškinė linija su užpildytu kvadratu; GDlip43 – tiesi linija su užpildytu rombu; GDlip30 – tiesi linija su užpildytu trikampiui.

Idealiu atveju naujos sukurtos lipazės turėtų pasižymėti tiek geresniu aktyvumu aukštose temperatūrose, tiek didesniu stabilumu jose. GDlip43 lipazės nustatyta optimali veiklai temperatūra – 50 °C, tačiau 99% aktyvumu šis fermentas pasižymi ir 55–60 °C temperatūroje. 50–65 °C temperatūrų intervale reikšmingų skirtumų nuo kitų GD grupės lipazių išskirti nepavyko, kadangi šiose temperatūrose visos GD grupės lipazės pasižymi aukštu savituoju lipoliziniu aktyvumu. Tuo tarpu 70 °C temperatūroje GDlip43 lipazė pasižymi reikšmingais skirtumais nuo visų kitų tirtų fermentų. GD-28 ir GD-95 lipazės šioje temperatūroje išlaiko tik 4 % savo aktyvumo, o GD-66 – 45 %. Naujasis po baltymų inžinerijos eksperimentų gautas fermentas šioje temperatūroje demonstruoja 66 % savitojo lipolizinio aktyvumo. Skirtumai reikšmingi su *p*-verte 0,003 (su GD-28 ir GD-95 lipazėmis) bei 0,02 (GD-66 lipazė). 75–85 °C intervale GDlip43 lipazė vėl panašiausia į GD-66 tėvinę lipazę ir 85 °C temperatūroje geba išlaikyti 3 % savo aktyvumo (3.20a pav.).

Vertinant naujojo fermento temperatūrinį stabilumą GDlip43 lipazė pasižymėjo reikšmingais skirtumais nuo GD-66 ir GD-95 lipazių. Po 30 min. inkubacijos 65 °C GDlip43 lipazė išlaiko apie 50 % savo lipolizinio aktyvumo, kai GD-95 lipazės ši vertė yra 36 %, o GD-66 lipazės – vos 9 %. Reikšmingas skirtumas (*p*-vertė 0,01) nustatytas tik GD-66 lipazės atveju. Nors savo aktyvumu ir anksčiau aptartu temperatūriniu profiliu GDlip43 lipazė buvo panašiausia į GD-66 lipazę, visgi šiam lipolizinį aktyvumą turinčiam baltymui būdingas didesnis stabilumas aukštose temperatūrose nei tėvinei GD-66 lipazei. GDlip43 lipazė po inkubacijos 80 °C temperatūroje išlaiko 3 % savo aktyvumo. Šia savybe GDlip43 lipazė pasižymi panašumu į GD-28 lipazę, kuri išsiskyrė didžiausiu stabilumu aukštose temperatūrose ir po poveikio 80 °C išlaikė 10 % savo aktyvumo (3.20c pav.).

pH įtakos fermentų veiklai analizė reikšmingą skirtumą parodė tik ties pH verte 11, kur GDlip43 lipazė rodo 80 % santykinio aktyvumo. Kitų lipazių aktyvumas tokio pH aplinkoje yra kelis kartus mažesnis (3.20b pav.).

Skirtumai yra reikšmingi su GD-28, GD-95 lipazėmis (p -vertė 0,02) ir GD-66 (0,01) lipazėmis.

Antroji po DNR maišymo ir klaidingosios PGR gauta lipazė GDlip30 nuo kitų GD grupės lipazių skiriasi savo optimalia veiklos temperatūra, kuri yra 40–50 °C, o didesnę nei 25 % santykinę lipolizinę aktyvumą ji išlaiko iki 75 °C (3.20a pav.). Pastarąją savybę ji panaši į GDlip43 bei tėvinę GD-66 lipazę, tačiau reikšmingai skiriasi nuo GD-28 lipazės. Skirtumas reikšmingas su p -verte 0,001. Temperatūrinio stabilumo profiliu ji taip pat artimiausia GD-66 lipazei (jau po 30 min. inkubacijos 70 °C fermentas visiškai inaktyvinamas).

Vertinant pH įtaką naujų lipazių lipoliziniam aktyvumui, reikšmingų skirtumų nuo tėvinių GD lipazių nebuvo nustatyta (3.20b pav.).

Po DNR maišymo ir klaidingosios PGR gauta GDlip43 lipazė demonstruoja geresnę lipolizinę aktyvumą aukštesiose temperatūrose nei GD-95 ir GD-28 lipazės, o 70 °C temperatūroje ji geriau veikia ir už GD-66 lipazę. Taip pat šis sintetinis *Geobacillus* lipazių variantas pasižymi didesniu temperatūriniu stabilumu lyginant su GD-66 ir GD-95 lipazėmis. Tuo tarpu GDlip30 lipazė reikšmingų teigiamų pokyčių neparodė.

3.3.5.3 Substratinis savitumas ir organinių tirpiklių įtaka GDlip30 ir GDlip43 lipazių funkcionalumui

Įvertinus lipazių aktyvumą ir stabilumą skirtingose temperatūrose, buvo nustatytas GDlip30 ir GDlip43 lipazių substratinis savitumas (3.8 lentelė) bei kai kurių organinių tirpiklių įtaka šių fermentų veiklai (3.9 lentelė).

3.8 lentelė. GD-95, GD-66, GD-28 ir naujų GDlip30 bei GDlip43 fermentų substratinio savitumo įvertinimas. Vertinant substratinį savitumą, reakcija vykdyta pH 7, 55 °C temperatūroje. Substratinis savitumas vertintas kiekvienam fermentui individualiai.

SUBSTRATAS	TIRIAMO FERMENTO SANTYKINIS LIPOLIZINIS AKTYVUMAS (%)				
	GD-95	GD-66	GD-28	GDlip43	GDlip30
<i>p</i> -NP acetatas (C2)	87 ±1,41	50 ±1,41	81±1,41	87±6,36	15±0,71
<i>p</i> -NP butyratas (C4)	100	100	100	61±1,41	100
<i>p</i> -NP heksanoatas (C6)	95 ±4,07	57 ±2,66	45±1,41	47±4,24	63±2,12
<i>p</i> -NP oktanoatas (C8)	88 ±4,95	21 ±1,41	65±1,41	78±0,71	54±5,66
<i>p</i> -NP dodekanoatas (C12)	80 ±1,41	4±1,41	76±0,71	92±2,12	33±2,12
<i>p</i> -NP tetradekanoatas (C14)	43 ±7,78	4±1,41	71±1,41	39±1,41	26±0,71
<i>p</i> -NP heksadekanoatas (C16)	35 ±2,83	4±1,41	5±2,12	37±1,41	0
<i>p</i> -NP oktadekanoatas (C18)	26 ±2,12	0	0	18	0

3.9 lentelė. Organinių tirpiklių (25 %) įtakos GD-95, GD-28, GD-66 ir GDlip30 bei GDlip43 lipazių aktyvumui įvertinimas. 100 % – fermentų aktyvumas nepaveikus organiniu tirpikliu. Lyginimas atliktas kiekvieno individualaus fermento ribose. Reakcijos sąlygos: pH 9, 55 °C, substratas – *p*-NP dodekanoatas.

POVEIKIS	TIRIAMO FERMENTO SANTYKINIS LIPOLIZINIS AKTYVUMAS (%)				
	GD-95	GD-66	GD-28	GDlip43	GDlip30
DMSO	60±4,4	90±3,54	97	134±7,07	110±3,43
DMF	113±6,8	106±4,95	98±1,82	117±4,95	123±5,65
Etanolis	122±6,5	87±6,26	103±0,71	115±3,5	96±6,36
Metanolis	80±2,6	88±2,12	98±2,12	147±4,95	139±3,54
Acetonas	90±1,8	100±0,71	96±1,41	147±4,95	62±3,54
Izopropanolis	104±3,5	91±2,83	94±2,82	76±1,41	78±5,66
<i>n</i> -butanolis	104±4,3	90	100±2,82	107±9,90	62±3,54

GDlip43 lipazės geriausiai hidrolizuojami substratai – *p*-NP acetatas ir *p*-NP dodekanoatas (3.8 lentelė). Vertinant santykinį aktyvumą šio baltymo gebėjimas hidrolizuoti *p*-NP acetatą, *p*-NP oktanoatą, *p*-NP dodekanoatą, *p*-NP tetradekanoatą ir *p*-NP heksadekanoatą yra artimas GD-95 lipazei. Reikšmingai skiriasi tik GDlip43 lipazės gebėjimas hidrolizuoti *p*-NP butiratą. GDlip43 lipazė pasižymėjo 61 % lipoliziniu aktyvumu hidrolizuodama šį substratą. Kitos šiame etape analizuotos lipazės pasižymi 100 % lipoliziniu aktyvumu hidrolizuodamos *p*-NP butiratą. Skirtumai yra reikšmingi su *p*-verte 0,0006 visoms tėvinėms lipazėms.

GD-28 ir GD-66 lipazės pademonstravo labiau esterazėms būdingą elgesį naudotomis reakcijos sąlygomis (aplinkos pH 7). Tokiomis sąlygomis GD-28 ir GD-66 lipazės negali hidrolizuoti C18 ilgio substratų. GDlip30 fermentas taip pat demonstruoja esterazinį aktyvumą: 100 % lipolizinis savitasis aktyvumas nustatytas substratu naudojant *p*-NP butirata, o ilgesni nei 14 anglies atomų substratai apskritai nėra hidrolizuojami, kai reakcija atliekama pH esant 7, 55 °C temperatūroje.

Organinių tirpiklių įtakos fermentų aktyvumui analizė (3.9 lentelė) parodė, kad GDlip43 lipazę aktyvuoja visi naudoti organiniai tirpikliai, išskyrus izopropanolį (lipolizinis aktyvumas sumažėja 24 % po 30 min. inkubacijos su šiuo alkoholiu). Slopinant GDlip43 lipazę izopropanoliu skirtumas nuo kitų lipazių reikšmingas su *p*-verte 0,02. Reikšmingi skirtumai nuo tėvinių lipazių aktyvinant GDlip43 lipazę nustatyti DMSO, metanolio ir acetono atvejais. DMSO atveju skirtumai reikšmingi su GD-95 (*p*-vertė 0,006), GD-28 ir GD-66 lipazėmis (0,02). Naudojant metanolį skirtumai reikšmingi su *p*-vertėmis 0,004 (GD-95 lipazė), 0,006 (GD-28 lipazė) ir 0,004 (GD-66 lipazė). Acetono atveju reikšmingumo lygmuo siekia 0,004 (GD-95 lipazė), 0,005 (GD-28 lipazė) ir 0,006 (GD-66 lipazė).

Nors GDlip43 lipazės savitasis aktyvumas keliasdešimt kartų mažesnis nei GD-95 lipazės, ji pasižymi geromis temperatūrinio aktyvumo bei stabilumo charakteristikomis bei savybe būti aktyvinamai įvairiais organiniais tirpikliais, kas, kaip jau ne kartą buvo minėta, yra be galo svarbu norint lipoliziniu aktyvumu pasižyminčius baltymus taikyti kaip biokatalizatorius įvairiose pramonės srityse. Visgi šios lipazės aktyvumo ir išėigos gerinimas – potencialus ateities tyrimų uždavinys.

GDlip30 lipazė didesniu lipoliziniu aktyvumu pasižymi po poveikio DMSO, DMF ir metanolio (3.9 lentelė), o slopinimas izopropanoliu yra artimas GDlip43 lipazei. Reikšmingi skirtumai tarp dviejų naujų lipazių

(GDlip30 ir GDlip43) nustatyti acetono ir *n*-butanolio atvejais. Skirtumai yra reikšmingi su *p*-vertėmis 0,003 ir 0,02, atitinkamai.

Po DNR maišymo ir klaidingosios PGR gautos GDlip43 ir GDlip30 lipazės – nauji lipoliziniu aktyvumu pasižymintys fermentai, praplečiantys natūraliai egzistuojančių *Geobacillus* lipazių įvairovę. Šių fermentų analizė – ne tik šio darbo, bet ir ateities tyrimų uždavinys.

Apibendrinimas

Šiame darbe sujungus bioinformatinę analizę, genų inžinerijos, enzimologijos ir biochemijos principus bei pritaikius baltymų inžinerijos metodus, tokius kaip dviejų skirtingais aktyvumais pasižyminčių baltymų jungimas, taikiniui specifinė mutagenezė, kuri persipynė su Ala skenuojančia mutageneze bei DNR maišymo ir klaidingosios PGR metodikas, pavyko aptikti ar naujai sukurti, klonuoti, išgryninti bei išanalizuoti aštuoniolika baltymų. Vykdytus eksperimentus galima skirti į tris kryptis: pirmoji – Ala skenuojanti mutagenezė, kuri buvo skirta GD-95-10 lipazės išsamesnei analizei ir Asp371, Phe375 ir Tyr376 vaidmens užtikrinant *Geobacillus* lipazių funkcionalumą nustatymui; antroji – naujo sulieto baltymo kūrimas, naudojant du skirtingais aktyvumais pasižyminčius fermentus; ir trečioji – DNR maišymo ir klaidingosios PGR eksperimentai, kurių dėka buvo gautos dvi naujomis savybėmis pasižyminčios lipazės.

Pirmajame eksperimentinio darbo etape didžiausias dėmesys buvo skiriamas *Geobacillus* sp. 95 kamieno sintetinamai lipazei GD-95 ir jos variantams be 10 (GD-95-10) ir 20 (GD-95-20) C-galinių aminorūgščių. Kaip parodė tyrimų rezultatai, GD-95-10 lipazė išlieka aktyvi ir funkcionali, tuo tarpu GD-95-20 lipazės aktyvumas reikšmingai sumažėja. C-galinių aminorūgščių analizė *in silico* atskleidė, kad C-galiniame regione išsidėsčiusios aminorūgštys formuoja α 13 spiralę. Šioje spiralyje išsidėsčiusių aminorūgščių tarpe nustatytos kelios konservatyvios aminorūgštys, kurios būdingos daugelio mikroorganizmų išskiriamoms lipazėms. Kelios iš jų (Asp371, Phe375 ir Tyr376) buvo pakeistos į Ala, iškelus hipotezę, kad būtent jų praradimas yra vienas iš veiksnių, kodėl GD-95-20 lipazės aktyvumas ir funkcionalumas drastiškai sumažėja, o GD-95-10 lipazė išlieka aktyvi. Tuo remiantis buvo sukurti šeši GD-95-10 lipazės mutantai. Aktyvumo ir baltymų išėigos analizė parodė, kad mutacijos stipriai sumažino GD-95-10 lipazės aktyvumą ir išėigą. Reikšmingiausiais lipolizinio aktyvumo pokyčiais viengubų mutantų tarpe pasižymėjo Asp371Ala mutantas. Šis mutantas

pasižymėjo ir mažiausiu temperatūriniu stabilumu. Tuo tarpu didžiausi temperatūrinio veiklos profilio pokyčiai nustatyti po Phe375Ala mutacijos. Tai leido daryti išvadą, kad Asp371 yra svarbesnė užtikrinant *Geobacillus* lipazių stabilumą aukštose temperatūrose, o Phe375 užtikrina lipolizinį aktyvumą jose.

Analizė *in silico* parodė, kad daugiausiai tiesioginių ar netiesioginių ryšių su aminorūgštimis, kurios įeina į „oksidanijoninės kišenės“ sudėtį, dalyvauja prijungiant substratą ar stabilizuoja tarpinį produktą, formuoja Tyr376. Dvigubi Tyr376Ala ir Asp371Ala ar Phe375Ala mutantai pademonstravo mažiausias katalizinio efektyvumo reikšmes. Šie rezultatai rodo, kad visos trys šiame darbe tirtos aminorūgštys yra svarbios užtikrinant *Geobacillus* lipazių funkcionalumą. Šią išvadą pagrindė ir mutantų tretinių struktūrų analizė. Bioinformatinė analizė parodė, kad po Asp371Ala, Phe375Ala ar Tyr376Ala viengubų ar dvigubų mutacijų pakinta atstumas tarp katalizinių aminorūgščių Ser113, Asp317 ir His 358. Visuose mutantuose atstumas tarp katalizinių Ser113 ir His358 aminorūgščių yra padidėjęs beveik du kartus. Didžiausi skirtumai nustatyti mutantuose, kurie turi Phe375Ala pakaitą. Tai dar kartą patvirtino iškeltą hipotezę, kad Phe375 yra svarbus moduluojant lipazės aktyvumą aukštose temperatūrose.

Taigi, Asp371, Phe375 ir Tyr376 yra svarbios palaikant GD-95-10 lipazės aktyvumą ir gali būti viena svarbiausių priežasčių, kodėl jų netekus GD-95-20 lipazės aktyvumas stipriai sumažėja. Šiame darbe atlikta analizė pirmą kartą parodė ne tik Asp371, Phe375 ir Tyr376 aminorūgščių vaidmenį ir svarbą užtikrinant *Geobacillus* lipazių tinkamą veiklą, bet ir tai, kad net vienos aminorūgšties mutacija gali sukelti drastiškus pokyčius tretinėje fermento struktūroje ir taip nulemti sumažėjusį (ar padidėjusį) aktyvumą bei pakitusį funkcionalumą.

Antroji darbų kryptis – skirtingu substratiniu savitumu, temperatūriniu aktyvumu bei stabilumu pasižyminčių dviejų fermentų jungimas. Šių eksperimentų tikslas – sukurti naują sulietą fermentą, kuris

pasižymėtų geresnėmis savybėmis, lyginant su pirminiais fermentais, ir galėtų konkuruoti su jau egzistuojančiais biokatalizatoriais. Šiems eksperimentams buvo pasirinktos *Geobacillus* sp. 95 kamieno sintetinės GD-95 lipazės bei GDEst-95 esterazės. Nors abu fermentai, remiantis jų struktūra, priklauso α/β hidrolazių klasei, reikšmingų aminorūgščių sekų panašumų nebuvo nustatyta. Svarbu paminėti, kad iki šiol duomenų apie *Geobacillus* genties bakterijų išskiriamas 55 kDa esterazės buvo labai nedaug. Egzistuoja tik kelios su jomis susijusios publikacijos.

Kaip parodė eksperimentiniai rezultatai, GDEst-95 esterazė pasižymi geresniu aktyvumu ir stabilumu aukštesnėse temperatūrose lyginant su GD-95 lipaze, ją aktyvuoja izopropanolis, *n*-butanolis bei įvairūs detergentai. Pastarieji junginiai GD-95 lipazės veiklą slopina. Taip pat GDEst-95 esterazei būdingas paprastesnis gryninimas. GD-95 lipazės privalumai – gebėjimas hidrolizuoti ilgų grandinių substratus, ją aktyvuoja etanolis ir DMF, ir ji pasižymi didesniu savituoju lipoliziniu aktyvumu nei GDEst-95 esterazė. Šios savybės lėmė, kodėl pirmojo lipolizinio sulieto biokatalizatoriaus GDEst-lip kūrimui buvo pasirinkti būtent šie du fermentai. Taip pat buvo sukonstruoti sulieti GDLip-lip ir GDEst-est fermentų variantai, siekiant įvertinti, kokią įtaką šių baltymų funkcionalumui turės papildomo to paties domeno prijungimas.

Jungiant du skirtingus baltymus tarpusavyje buvo iškelta hipotezė, kad naujasis fermentas turėtų pasižymėti abiejų baltymų savybėmis arba demonstruoti tarpinį variantą, jei pirminių tėvinių fermentų atitinkamos savybės reikšmingai skiriasi. Įvertinus naujų sukurtų fermentų savitąjį lipolizinį aktyvumą, pagrindines katalizines konstantas bei chemines ir fizikines savybes buvo nustatyta, kad GDEst-lip fermentinis liejinys pasižymi didžiausiu lipoliziniu aktyvumu iš visų šiame darbe tirtų, lipoliziniu aktyvumu pasižymintį baltymų ir gali konkuruoti su komerciniais lipazių / esterazių preparatais. Pagrindinių kinetinių konstantų vertės taip pat pagerėja lyginant su GDEst-95 esteraze, bet yra mažesnės už GD-95 lipazės vertes, kas patvirtina hipotezę apie demonstruojamas tarpines savybes.

Fizikinių ir cheminių savybių analizė parodė, kad GDEst-lip lipazė / esterazė pasižymi tiek abiejų, jį sudarančių fermentų savybėmis, tiek demonstruoja išskirtines, tik jam būdingas ypatybes ir geba veikti plačiame temperatūriniame (5–90 °C) bei pH (6–12) spektre. Taip pat pagerėja gebėjimas skaidyti ilgos riebalų rūgščių grandinės substratus, lyginant su GDEst-95. Įvairių detergentų poveikio fermentų veiklai tyrimai atskleidė, kad GDEst-lip sulietas fermentas išlaiko didelį santykinį aktyvumą po inkubacijos su įvairiais Tween'ais ir Triton X-100. Tai pranašumas prieš monomerinę GD-95 lipazę, kurią šios medžiagos visiškai slopino.

Papildomo to paties domeno pridėjimas, nors ir sumažino fermentų lipolizinį aktyvumą, tačiau pakeitė optimalią jų temperatūrą į didesnę pusę. Taip pat papildomas domenai pagerino GD-95 lipazės gebėjimą veikti aukštose temperatūrose bei jos atsparumą detergentų poveikiui. Papildomo GDEst-95 esterazės domeno pridėjimas padidino fermento gebą hidrolizuoti C14–C16 junginius. Tai galėjo nulemti pakitęs baltymo susilankstymas erdvėje ir aminorūgščių, susijusių su substratų prijungimu, prieinamumas substratui.

Apibendrinant galima teigti, kad papildomo domeno pridėjimas gali padėti moduluoti fermentų savybes, keičiant jų veiklai optimalų pH, temperatūrinį aktyvumą ir stabilumą. Geriausiomis savybėmis pasižymėjo sulietas GDEst-lip variantas. Gautas fermentas turi abiejų fermentų savybes ir gali būti puikus naujas biokatalizatorius, taikomas pramonės procesuose, kurie reikalauja aukštos temperatūros, šarminės aplinkos ir / ar poveikio organiniais tirpikliais (pvz. pramoninių esterų sintezė).

Kuriant naujus biokatalizatorius taip pat pritaikytas DNR maišymas bei klaidingoji PGR. Šiame darbe išanalizavus keturių *Geobacillus* sp. kamienų išskiriamų lipazių GD-95, GD-76, GD-66 ir GD-28 savybes, buvo pasirinktos trys (GD-95, GD-66 ir GD-28), kurios naudotos tolimesniuose tiesioginės evoliucijos eksperimentuose. Kadangi GD-66 lipazė pasižymi gebėjimu veikti aukštose temperatūrose, GD-28 lipazė rodo didžiausią

temperatūrinį stabilumą, o GD-95 demonstruoja didžiausią lipolizinį aktyvumą, būtent jas koduojantys genai pasirinkti DNR maišymo eksperimentams. Optimizavus proceso sąlygas pavyko pagausinti fragmentą, atitinkantį tėvinių lipazių genų dydį. Kadangi po DNR maišymo eksperimentų gautas genų variantas pasižymėjo dideliu panašumu į pradines lipazes, jo variabilumas buvo didinamas taikant klaidingą PGR. Po šių eksperimentų gautas genas, koduojantis vieną ASR. Įvykdžius jo koduojamo baltymo sintezės analizę, paaiškėjo, kad po transliacijos yra gaunamos 2 naujos lipazės (43 kDa – GDlip43 lipazė ir 30 kDa – GDlip30 lipazė). Keliama prielaida, kad transliacijos metu ribosoma startiniu kodonu traktuoja kitą sekoje esantį ATG kodoną. Analizė *in silico* leido nustatyti kelis potencialius ASR, po kurių transliacijos galėtų susidaryti 30 kDa baltymai, tačiau norint tai patvirtinti reikalingi tolimesni šios sekos ir GDlip30 baltymo tyrimai.

Fizikinių, cheminių bei katalizinių savybių analizė parodė, kad tiek GDlip30, tiek GDlip43 lipazės savitasis aktyvumas yra 40 U/mg. Tai dešimt kartų mažesnė vertė nei GD-95 lipazės, tačiau du kartus didesnė nei GD-66 lipazės. GDlip43 lipazė savo V_{max} bei katalizinio efektyvumo vertėmis artimesnė GD-66 lipazei; K_m reikšme bei gebėjimu hidrolizuoti *p*-NP esterius – GD-95 lipazei, o gebėjimas išlaikyti savo lipolizinį aktyvumą po inkubacijos aukštose temperatūrose artimas tėvinei GD-28 lipazei. Visgi kai kuriose vietose ji reikšmingai skiriasi nuo visų pradinių lipazių. Kadangi daugeliu atveju GDlip43 variantas artimas GD-66 lipazei, galima daryti prielaidą, kad aminorūgštys, kuriomis skiriasi GD-95, GD-66 ir GDlip43 lipazės, gali būti reikšmingos *Geobacillus* lipazių lipoliziniam aktyvumui. Keliama hipotezė, kad šios aminorūgštys galėtų būti Arg153 ir Phe154, kurios yra GD-95 lipazėje, tačiau visose kitose tiriamose lipazėse jos yra pakeistos į His153 ir Val154. Kita aminorūgštis kandidatė – Leu247, kurią šioje padėtyje turi GDlip43. GD-66 lipazėje šioje padėtyje lokalizuota Ser, o GD-95 lipazėje – Pro aminorūgštis. Šie aminorūgščių skirtumai sekoje gali lemti pokyčius tretinėje struktūroje ir tuo pačiu gebėjimą prisijungti ir hidrolizuoti naudojamą

substratą. Šių aminorūgščių vaidmens užtikrinant lipolizinį aktyvumą įvertinimas – ateities tyrimų uždavinys.

Antroji po DNR maišymo ir klaidas darančios PGR gauta lipazė GDlip30 nuo kitų GD grupės lipazių skiriasi savo žemesne optimalia veiklos temperatūra bei geba išlaikyti savo lipolizinį aktyvumą iki 75 °C. Šiuo atžvilgiu ji panaši į GDlip43 bei tėvinę GD-66 lipazes, tačiau reikšmingai skiriasi nuo GD-28 ir GD-95 lipazių. Temperatūrinio stabilumo profiliu ji taip pat artimiausia GD-66 lipazei. Reikšmingi skirtumai tarp dviejų naujų lipazių (GDlip30 ir GDlip43) nustatyti kai kurių organinių tirpiklių atveju. Vertinant substratinį savitumą, GDlip30 lipazė demonstruoja labiau esterazėms būdingą elgesį. Nauja gauta mažesnio dydžio GDlip30 lipazė leidžia kelti ir minimalios veiklios struktūros idėją, kadangi iki šiol visų identifikuotų aktyvių *Geobacillus* lipazių dydis buvo 43 kDa.

Aptarti rezultatai rodo, kad baltymų inžinerijos metodai yra puiki priemonė tiriant fermentų struktūros ir funkcijos ryšį, modifikuojant jau turimų fermentų savybes ar kuriant naujus baltymus, kurie papildo natūralius, gamtoje egzistuojančius fermentus. Nauji chimeriniai ar hibridiniai fermentai (baltymai, sukurti jungiant du domenų ar gauti po DNR maišymo ir klaidas darančios PGR metodų) yra puikus naujas biokatalizatorių šaltinis. Tokie biokatalizatoriai efektyviai gali pakeisti įvairius, pramonėje naudojamus cheminius katalizatorius ar būti geresnė alternatyva jau žinomiems komerciniams fermentų preparatams. Šiame darbe aptarti rezultatai ne tik praplečia žinias apie *Geobacillus* lipazių ir esterazių struktūrą, funkcijas ir pritaikymo potencialą, bet ir suteikia pagrindą tolimesniems šių fermentų tyrimams.

Išvados

1. C-galiniame regione išsidėsčiusios aminorūgštys yra svarbios *Geobacillus* lipazių veiklai: Asp371 a.r. liekana svarbi palaikant *Geobacillus* sintetinamų lipazių stabilumą, Phe375 atsakinga už gebėjimą veikti aukštose temperatūrose, o Tyr376 užtikrina svarbių ryšių susidarymą tretinėje baltymo struktūroje.
2. *Geobacillus* sp. 95 kamiene identifikuota nauja 55 kDa dydžio esterazė (GDEst-95), pasižyminti gebėjimu veikti plačiame temperatūrų ir pH intervale, termostabilumu, išlaikanti aktyvumą po poveikio įvairiais organiniais tirpikliais ir detergentais. Dėl šių savybių GDEst-95 esterazė yra naujas pramonei patrauklus biokatalizatorius.
3. Papildomo to paties domeno prijungimas padidino GDEst-95 esterazės ir GD-95 lipazės optimalią veiklai temperatūrą bei modifikavo šių fermentų temperatūrinį stabilumą. Taip pat pakito fermentų gebėjimas hidrolizuoti įvairius *p*-NP esterius. Tokia strategija gali būti taikoma tikslinių fermentų savybių modeliavimui.
4. Naujas sulietas GDEst-lip fermentas pasižymi dideliu savituoju aktyvumu (600 U/mg), gebėjimu veikti plačiame temperatūrų ir pH intervale, termostabilumu, hidrolizuoja įvairaus ilgio *p*-NP esterius, jį gali aktyvuoti organiniai tirpikliai ir jis išlaiko aktyvumą po poveikio įvairiais detergentais. Šios savybės rodo naujojo biokatalizatoriaus potencialą būti taikomam įvairiuose pramonės procesuose.
5. Taikant tiesioginę evoliuciją gauti du nauji *Geobacillus* lipazių variantai, iš kurių pirmas (GDlip43 lipazė) pasižymi didesniu aktyvumu ir stabilumu aukštose temperatūrose, tuo tarpu antrasis (GDlip30) – naujas ir vienintelis *Geobacillus* lipazių variantas, pasižymintis mažesne molekuline mase nei įprasta šių mikroorganizmų lipazėms ir potencialus ateities tyrimų objektas, siekiant identifikuoti minimalią *Geobacillus* lipazių veiklai reikalingą struktūrą.

Mokslinių darbų sąrašas

Remiantis disertacijos rezultatais paskelbti straipsniai

1. **Gudiukaitė R.**, Gegeckas A., Kazlauskas D., Citavicius D. Influence of N- and/or C-terminal regions on activity, expression, characteristics and structure of lipase from *Geobacillus* sp. 95. *Extremophiles*, 2014, 18, 131–145
2. **Gudiukaitė R.**, Gegeckas A., Sadauskas M., Citavičius D. Detection of Asp371, Phe375 and Tyr376 influence on GD-95-10 lipase using alanine scanning mutagenesis. *Appl Biochem Biotechnol*, 2016, 178(4), 654–69.

Pranešimų disertacijos tema sąrašas

1. **Gudiukaite R.**, Gegeckas A., Čitavičius D. Cloning, purification and esterification capability determination of lipase produced by *Geobacillus* sp. 76 (stendinis pranešimas). FEMS 2013 : 5th Congress of European Microbiologists, Leipzig, Germany, 2013 07 21–25.
2. **Gudiukaitė R.**, Gegeckas A., Čitavičius D.J. Variability evaluation of physicochemical properties of recombinant lipases from *Geobacillus* spp. strains (stendinis pranešimas). VIII Gamtos mokslų fakulteto konferencija "Mokslas Gamtos Mokslų Fakultete", Vilnius, Lietuva, 2014 10 03.
3. **Gudiukaitė R.**, Gegeckas A., Čitavičius D. GD-95 lipase – new biocatalyst in wide industry areas (stendinis pranešimas). 2nd Congress of Baltic Microbiologists, Tartu, Estonia, 2014 10 16–19.
4. **Gudiukaitė R.**, Gegeckas A., Malūnavičius V., Čitavičius D. Functionality analysis of structural domains from GD-95 lipase by site specific and random mutagenesis (stendinis pranešimas). FEMS 2015: 6th Congress of European Microbiologists, Maastricht, The Netherlands, 2015 06 07–11.

Finansinė parama

Disertacijos darbas buvo remiamas Mokslo, inovacijų ir technologijų agentūros (MITA) Pramoninės biotechnologijos plėtros Lietuvoje 2011–2013 m. programos projekto COSMETIZYM – Inovatyvios priemonės kosmetikos pramonei (MITA 31V-18).

Lietuvos mokslo tarybos (LMT) stipendija už akademinis pasiekimus 2014–2016 m.

Lietuvos mokslo tarybos (LMT) stipendija mokslinėms išvykoms (2015 m.).

Gyvenimo aprašymas

Vardas, Pavardė	Renata Gudiukaitė
Gimimo data	1987 03 04
Darbo adresas	Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedra, Gamtos mokslų fakultetas, Jungtinis Gyvybės mokslų centras, Vilniaus universitetas; Saulėtekio alėja 7; Vilnius LT-10257
El. pašto adresas	renata.gudiukaite@gmail.com
Tel. Nr.	+370 609 90189

Išsilavinimas

2006–2010 Biologijos bakalauras (Vilniaus universiteto Gamtos mokslų fakultetas; Molekulinės biologijos bakalauro studijų programa)

2010–2012 Mikrobiologijos magistras (Vilniaus universiteto Gamtos mokslų fakultetas; Mikrobiologijos magistro studijų programa)

2012–2016 Biologijos krypties doktorantūros studijos (Vilniaus universiteto Gamtos mokslų fakultetas)

Darbo patirtis

2016 09 01–dabar Jaunesnioji mokslo darbuotoja (Vilniaus universiteto Gamtos mokslų fakulteto Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedroje)

2014 09 01–dabar Lektorė (Vilniaus universiteto Gamtos mokslų fakulteto Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedroje)

2014 03 14–2015 12 31 Specialistė (tyrėja) (Vilniaus universiteto Gamtos mokslų fakulteto Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedroje)

2014 07 01–2015 03 31 Jaunesnioji mokslo darbuotoja (Vilniaus universiteto Gamtos mokslų fakulteto Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedroje)

2011 09–2013 12 27 m. Specialistė (Vilniaus universiteto Gamtos mokslų fakulteto Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedroje)

2010 07–2010 10 m. Specialistė (Vilniaus universiteto Gamtos mokslų fakulteto Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedroje)

Padėka

Didžiausią ir nuoširdžiausią AČIŪ, pirmiausia, norėčiau tarti savo ilgamečiui (2008–2016 m.) vadovui **prof. dr. Donaldui Jonui Čitavičiui**, kurio, deja, mūsų tarpe jau nebėra. Jūs buvote ir atmintyje visada liksite auksiniu vadovu ir žmogumi iš didžiosios raidės. Dėkoju už patarimus, idėjas, palaikymą, tikėjimą ir pasitikėjimą visuos šiuos metus, už galimybę tobulėti, augti ir tapti mokslo pasaulio dalimi. Džiaugiuosi ir didžiuojuosi galėjusi būti Jūsų komandos dalimi.

Dėkoju **prof. dr. N. Kuisienei** už geranoriškumą, palaikymą, pagalbą ir patarimus rengiant ir ginantis disertaciją bei katedros vedėjai **prof. dr. L. Kalėdienei**. Taip pat ačiū tariau **dr. I. Matijošytei** už vertingus patarimus, pasiūlymus ir palaikymą.

Ačiū norėčiau ištartį visam Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedros buvusiam ir esamam kolektyvui, su kuriuo išgyvenome daug gražių ir įsimintinų akimirkų. Ypač norėčiau padėkoti savo kolegoms, draugams ir straipsnių bendraautoriams **M. Sadauskui** ir **A. Gegeckui**, kurie prisidėjo darbinėmis kūrybinėmis idėjomis, vertingomis diskusijomis, patarimais ar tiesiog geru žodžiu ir palaikymu, kai to labiausiai reikėjo.

Taip pat dėkoju **dr. D. Kazlauskui** už bioinformatinę pagalbą bei savo studentams **V. Malūnavičiui** ir **N. Bičkovui**, kurie prisideda įgyvendinant mano mokslines idėjas.

Taip pat norėčiau padėkoti savo šeimai, kuri visada palaikė ir tikėjo bei draugams už katedros sienų, kurie džiaugėsi ir liūdėjo kartu su manimi, klausėsi kalbų apie *Geobacillus* lipazes ir būdami šalia, nebūdami mikrobiologais virto mikrobiologais.

Dėkoju visiems, kurie visus šiuos metus žengiant mokslo keliu, buvote, esate ir, tikiuosi, toliau būsite mano gyvenimo dalimi. Visiems jums yra skirta dalelė mano širdies. Be jūsų „*Geobacillus* lipazės“ nebūtų tokios, kokios yra.

Naudota literatūra

1. Abd Rahman RN, Shariff FM, Basri M, Salleh AB. 2012. 3D Structure elucidation of thermostable L2 lipase from thermophilic *Bacillus* sp L2. *Int J Mol Sci* 13:9207–17
2. Abdel-Fattah YR, Gaballa AA. 2008. Identification and over-expression of a thermostable lipase from *Geobacillus thermoleovorans* Toshki in *Escherichia coli*. *Microbiol Res* 163:13–20
3. Abdul Rahman MZ, Salleh AB, Abdul Rahman RN, Abdul Rahman MB, Basri M, Leow TC. 2012. Unlocking the mystery behind the activation phenomenon of T1 lipase: a molecular dynamics simulations approach. *Protein Sci* 21:1210–21
4. Acharya P, Rajakumara E, Sankaranarayanan R, Rao NM. 2004. Structural basis of selection and thermostability of laboratory evolved *Bacillus subtilis* lipase. *J Mol Biol* 341:1271–81
5. Adlakha N, Rajagopal R, Kumar S, Reddy VS, Yazdani SS. 2011. Synthesis and characterization of chimeric proteins based on cellulase and xylanase from an insect gut bacterium. *Appl Environ Microbiol* 77:4859–66
6. Adlakha N, Sawant S, Anil A, Lali A, Yazdani SS. 2012. Specific fusion of beta-1,4-endoglucanase and beta-1,4-glucosidase enhances cellulolytic activity and helps in channeling of intermediates. *Appl Environ Microbiol* 78:7447–54
7. Ahmad S, Kamal MZ, Sankaranarayanan R, Rao NM. 2008. Thermostable *Bacillus subtilis* lipases: in vitro evolution and structural insight. *J Mol Biol* 381:324–40
8. Akbulut N, Tuzlakoglu Ozturk M, Pijning T, Issever Ozturk S, Gumusel F. 2013. Improved activity and thermostability of *Bacillus pumilus* lipase by directed evolution. *J Biotechnol* 164:123–9
9. Akoh CC, Lee GC, Shaw JF. 2004. Protein engineering and applications of *Candida rugosa* lipase isoforms. *Lipids* 39:513–26
10. Ali MS, Yun CC, Chor AL, Rahman RN, Basri M, Salleh AB. 2012. Purification and characterisation of an F16L mutant of a thermostable lipase. *Protein J* 31:229–37
11. Anobom CD, Pinheiro AS, De-Andrade RA, Aguiéiras ECG, Andrade GC, Moura MV, Almeida RV, Freire DM. 2014. From structure to catalysis: recent developments in the biotechnological applications of lipases. *BioMed Res Int* doi: 10.1155/2014/684506
12. Antikainen NM, Martin SF. 2005. Altering protein specificity: techniques and applications. *Bioorg Med Chem* 13:2701–16

13. Arai R, Wriggers W, Nishikawa Y, Nagamune T, Fujisawa T. 2004. Conformations of variably linked chimeric proteins evaluated by synchrotron X-ray small-angle scattering. *Proteins* 57:829–38
14. Araujo YJK, de Lima DP, Beatriz A. 2009. Preliminary study on enzymatic kinetic resolution of isopropylidene glycerol. *Orbital* 3:251–4
15. Argos P. 1990. An investigation of oligopeptides linking domains in protein tertiary structures and possible candidates for general gene fusion. *J Mol Biol* 211:943–58
16. Arpigny JL, Jaeger KE. 1999. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem J* 343:177–83
17. Athawale V, Manjrekar N, Athawale M. 2003. Effect of reaction parameters on synthesis of citronellyl methacrylate by lipase-catalyzed transesterification. *Biotechnol Prog* 19:298–302
18. Bajaj A, Lohan P, Jha PN, Mehrotra R. 2010. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: an overview. *J Mol Catal B-Enzym* 62:9–14
19. Bisht D, Yadav SK, Darmwal NS. 2014. An oxidant and organic solvent tolerant alkaline lipase by *P. aeruginosa* mutant: downstream processing and biochemical characterization. *Braz J Microbiol* 44:1305-14
20. Blaber M, Baase WA, Gassner N, Matthews BW. 1995. Alanine scanning mutagenesis of the alpha-helix 115-123 of phage-T4 lysozyme: effects on structure, stability and the binding of solvent. *J Mol Biol* 246:317–30
21. Bordes F, Tarquis L, Nicaud JM, Marty A. 2011. Isolation of a thermostable variant of Lip2 lipase from *Yarrowia lipolytica* by directed evolution and deeper insight into the denaturation mechanisms involved. *J Biotechnol* 156:117–24
22. Bornscheuer UT. 2000. *Enzymes in lipid modification*. Weinheimas: Wiley-VCH
23. Bornscheuer UT. 2002. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiol Rev* 26:73–81
24. Bornscheuer UT. 2008. Alteration of lipase properties by protein engineering methods. *OCL* 15:184–188
25. Bornscheuer UT, Kazlauskas RJ. 2006. *Hydrolases in organic synthesis regio- and stereoselective biotransformations*. Weinheimas: WILEY-VCH
26. Brocca S, Secundo F, Ossola M, Alberghina L, Carrea G, Lotti M. 2003. Sequence of the lid affects activity and specificity of *Candida rugosa* lipase isoenzymes. *Protein Sci* 12:2312–9

27. Canet A, Bonet-Ragel K, Benaiges MD, Valero F. 2016. Lipase-catalysed transesterification: viewpoint of the mechanism and influence of free fatty acids. *Biomass and Bioenergy* 85:94–9
28. Carrasco-Lopez C, Godoy C, de las Rivas B, Fernandez-Lorente G, Palomo JM, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R, Martinez-Ripoll M, Hermoso JA. 2009. Activation of bacterial thermoalkalophilic lipases is spurred by dramatic structural rearrangements. *J Biol Chem* 284:4365–72
29. Chakravorty D, Parameswaran S, Dubey VK, Patra S. 2011. In silico characterization of thermostable lipases. *Extremophiles* 15:89–103
30. Charbonneau DM, Meddeb-Mouelhi F, Beauregard M. 2010. A novel thermostable carboxylesterase from *Geobacillus thermodenitrificans*: evidence for a new carboxylesterase family. *J Biochem* 148:299–308
31. Chen KK, Liu S, Ma JL, Zhang DX, Shi ZP, Du GC, Chen J. 2012. Deletion combined with saturation mutagenesis of N-terminal residues in transglutaminase from *Streptomyces hygroscopicus* results in enhanced activity and thermostability. *Process Biochem* 47:2329–34
32. Chen RD. 2001. Enzyme engineering: rational redesign versus directed evolution. *Trends Biotechnol* 19:13–4
33. Chen XY, Zaro JL, Shen WC. 2013. Fusion protein linkers: property, design and functionality. *Adv Drug Deliver Rev* 65:1357–69
34. Chirumamilla RR, Muralidhar R, Marchant R, Nigam P. 2001. Improving the quality of industrially important enzymes by directed evolution. *Mol Cell Biochem* 224:159–68
35. Cho AR, Yoo SK, Kim EJ. 2000. Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *FEMS Microbiol Lett* 186:235–8
36. Choi WC, Kim MH, Ro HS, Ryu SR, Oh TK, Lee JK. 2005. Zinc in lipase L1 from *Geobacillus stearothermophilus* L1 and structural implications on thermal stability. *FEBS Lett* 579:3461–6
37. Choudhary RB, Jana AK, Jha MK. 2004. Enzyme technology application in leather processing. *Indian J Chem Technol* 11:659–71
38. Cirino PC, Mayer KM, Umeno D. 2003. Generating mutant libraries using error-prone PCR. In *Directed evolution library creation: methods and protocols*, ed. Arnold FH; Georgiou G. Humana Press Inc., 231
39. Czajkowsky DM, Hu J, Shao ZF, Pleass RJ. 2012. Fc-fusion proteins: new developments and future perspectives. *Embo Mol Med* 4:1015–28
40. de Pascale D, Cusano AM, Autore F, Parrilli E, di Prisco G, Marino G, Tutino ML. 2008. The cold-active Lip1 lipase from the Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 is a member of a new bacterial lipolytic enzyme family. *Extremophiles* 12:311–23

41. Denard CA, Ren H, Zhao H. 2015. Improving and repurposing biocatalysts via directed evolution. *Curr Opin Chem Biol* 25:55–64
42. Diogo JA, Hoffmam ZB, Zanphorlin LM, Cota J, Machado C, Wolf LD, Squina F, Damasio AR, Murakami MT, Ruller R. 2014. Development of a chimeric hemicellulase to enhance the xylose production and thermotolerance. *Enzyme Microb Technol* 69:31–7
43. Drauz K, Waldmann H. 2002. *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*. Weinheim: Wiley-VCH
44. Dror A, Kanteev M, Kagan I, Gihaz S, Shahar A, Fishman A. 2015. Structural insights into methanol-stable variants of lipase T6 from *Geobacillus stearothermophilus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:9449–61
45. Dror A, Shemesh E, Dayan N, Fishman A. 2014. Protein engineering by random mutagenesis and structure-guided consensus of *Geobacillus stearothermophilus* lipase T6 for enhanced stability in methanol. *Appl Environ Microbiol* 80:1515–27
46. Ebrahimpour A, Rahman RNZRA, Basri M, Salleh AB. 2011. High level expression and characterization of a novel thermostable, organic solvent tolerant, 1,3-regioselective lipase from *Geobacillus* sp. strain ARM. *Bioresour Technol* 102:6972–81
47. Eggert T, Pencreac'h G, Douchet I, Verger R, Jaeger KE. 2000. A novel extracellular esterase from *Bacillus subtilis* and its conversion to a monoacylglycerol hydrolase. *Eur J Biochem* 267:6459–69
48. Eisenthal R, Danson MJ, Hough DW. 2007. Catalytic efficiency and k_{cat}/K_M : a useful comparator. *Trends Biotechnol* 25:247–9
49. Elleuche S. 2015. Bringing functions together with fusion enzymes-from nature's inventions to biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:1545–56
50. Elleuche S, Schafers C, Blank S, Schroder C, Antranikian G. 2015. Exploration of extremophiles for high temperature biotechnological processes. *Curr Opin Microbiol* 25:113–9
51. Espinosa-Luna G, Sanchez-Otero MG, Quintana-Castro R, Matus-Toledo RE, Oliart-Ros RM. 2016. Gene cloning and characterization of the *Geobacillus thermoleovorans* CCR11 carboxylesterase CaesCCR11, a new member of family XV. *Mol Biotechnol* 58:37–46
52. Ewis HE, Abdelal AT, Lu CD. 2004. Molecular cloning and characterization of two thermostable carboxyl esterases from *Geobacillus stearothermophilus*. *Gene* 329:187–95
53. Fan ZM, Wagschal K, Chen W, Montross MD, Lee CC, Yuan L. 2009. Multimeric hemicellulases facilitate biomass conversion. *Appl Environ Microbiol* 75:1754–7

54. Fang YW, Lu YJ, Lv FX, Bie XM, Zhao HZ, Wang Y, Lu ZX. 2009. Improvement of alkaline lipase from *Proteus vulgaris* T6 by directed evolution. *Enzyme and microbial technology* 44:84–8
55. Fujii R, Nakagawa Y, Hiratake J, Sogabe A, Sakata K. 2005. Directed evolution of *Pseudomonas aeruginosa* lipase for improved amide-hydrolyzing activity. *Protein Eng Des Sel* 18:93–101
56. Fukuda H, Kondo A, Noda H. 2001. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *J Biosci Bioeng* 92:405–16
57. Funke SA, Eipper A, Reetz MT, Otte N, Thiel W, Van Pouderoyen G, Dijkstra BW, Jaeger KE, Eggert T. 2003. Directed evolution of an enantioselective *Bacillus subtilis* lipase. *Biocatal Biotransfor* 21:67–73
58. Gatti-Lafranconi P, Caldarazzo SM, Villa A, Alberghina L, Lotti M. 2008. Unscrambling thermal stability and temperature adaptation in evolved variants of a cold-active lipase. *FEBS Lett* 582:2313–8
59. George RA, Heringa J. 2002. An analysis of protein domain linkers: their classification and role in protein folding. *Protein Eng* 15:871–9
60. Ghorri MI, Iqbal MJ, Hameed A. 2011. Characterization of a novel lipase from *Bacillus* sp. isolated from tannery wastes. *Braz J Microbiol* 42:22–9
61. Gibbs CS, Zoller MJ. 1991. Identification of electrostatic interaction that determine the phosphorylation site specificity of the cAMP-dependent protein kinase. *Biochemistry* 30:5329–34
62. Gokhale RS, Khosla C. 2000. Role of linkers in communication between protein modules. *Curr Opin Chem Biol* 4:22–7
63. Goodarzi N, Karkhane AA, Mirlohi A, Tabandeh F, Torktas I, Aminzadeh S, Yakhchali B, Shamsara M, Ghafouri MA. 2014. Protein engineering of *Bacillus thermocatenuatus* lipase via deletion of the $\alpha 5$ helix. *Appl Biochem Biotechnol* 174:339–51
64. Greener A, Callahan M, Jerpseth B. 1997. An efficient random mutagenesis technique using an *E. coli* mutator strain. *Mol Biotechnol* 7:189–95
65. Gudiukaite R, Gegeckas A, Kazlauskas D, Citavicius D. 2014. Influence of N- and/or C-terminal regions on activity, expression, characteristics and structure of lipase from *Geobacillus* sp. 95. *Extremophiles* 18:131–45
66. Gudiukaite R, Gegeckas A, Sadauskas M, Citavicius D. 2016. Detection of Asp371, Phe375, and Tyr376 influence on GD-95-10 lipase using alanine scanning mutagenesis. *Appl Biochem Biotechnol* 178:654–69
67. Guncheva M, Zhiryakova D. 2011. Catalytic properties and potential applications of *Bacillus* lipases. *J Mol Catal B-Enzym* 68:1–21

68. Gupta R, Gupta N, Rathi P. 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl Microbiol Biotechnol* 64:763–81
69. Gupta R, Kumari A, Syal P, Singh Y. 2015. Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: their role in biotechnology and cellular physiology. *Prog Lipid Res* 57:40–54
70. Gustavsson M, Lehtio J, Denman S, Teeri TT, Hult K, Martinelle M. 2001. Stable linker peptides for a cellulose-binding domain-lipase fusion protein expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Eng* 14:711–5
71. Haki GD, Rakshit SK. 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresour Technol* 89:17–34
72. Hasan F, Shah AA, Javed S, Hameed A. 2010. Enzymes used in detergents: lipases. *Afr J Biotechnol* 9:4836–44
73. Hausmann S, Jaeger KE. 2010. Lipolytic enzymes from bacteria. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, ed. Timmis KN. Berlin Heidelberg: Springer, 1100–1126
74. Henke E, Bornscheuer UT. 1999. Directed evolution of an esterase from *Pseudomonas fluorescens*. Random mutagenesis by error prone PCR or a mutator strain and identification of mutants showing enhanced enantioselectivity by a resorufin-based fluorescence assay. *Biol Chem* 380:1029–33
75. Hong SY, Jung EJ, Joo JC, Yoo YJ. 2012. Soluble expression of *Candida antarctica* lipase B in *Escherichia coli* by fusion with Skp chaperone. *Biotechnol Bioproc E* 17:687–92
76. Hong SY, Lee JS, Cho KM, Math RK, Kim YH, Hong SJ, Cho YU, Cho SJ, Kim H, Yun HD. 2007. Construction of the bifunctional enzyme cellulase-beta-glucosidase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Biotechnol Lett* 29:931–6
77. Hong SY, Lee JS, Cho KM, Math RK, Kim YH, Hong SJ, Cho YU, Kim H, Yun HD. 2006. Assembling a novel bifunctional cellulase-xylanase from *Thermotoga maritima* by end-to-end fusion. *Biotechnol Lett* 28:1857–62
78. Houde A, Kademi A, Leblanc D. 2004. Lipases and their industrial applications: an overview. *Appl Biochem Biotechnol* 118:155–70
79. Huang Y, Cai Y, Yang J, Yan Y. 2008. Directed evolution of lipase of *Bacillus pumilus* YZ02 by error-prone PCR. *Chin J Biotechnol* 24:445–51
80. Hult K, Berglund P. 2007. Enzyme promiscuity: mechanism and applications. *Trends Biotechnol* 25:231–8

81. Hung KS, Chen SY, Liu HF, Tsai BR, Chen HW, Huang CY, Liao JL, Sun KH, Tang SJ. 2011. C-terminal region of *Candida rugosa* lipases affects enzyme activity and interfacial activation. *J Agric Food Chem* 59:5396–401
82. Hyun-Ju K, Amada K, Haruki M, Morikawa M, Kanaya S. 2000. Identification of the histidine and aspartic acid residues essential for enzymatic activity of a family I.3 lipase by site-directed mutagenesis. *FEBS Lett* 483:139–42
83. Jaeger KE, Reetz MT. 1998. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol* 16:396–403
84. Jaeger KE, Schneidinger B, Rosenau F, Werner M, Lang D, Dijkstra BW, Schimossek K, Zonta A, Reetz MT. 1997. Bacterial lipases for biotechnological applications. *J Mol Catal B-Enzym* 3:3–12
85. Jaeger KE, Dijkstra BW, Reetz, MT. 1999. Bacterial biocatalyst: molecular biology, three- dimensional structures and biotechnological applications of lipases. *Annu Rev Microbiol* 53:315–51
86. Jennings MJ, Barrios AF, Tan S. 2016. Elimination of truncated recombinant protein expressed in *Escherichia coli* by removing cryptic translation initiation site. *Protein Expr Purif* 121:17–21
87. Jeong ST, Kim HK, Kim SJ, Chi SW, Pan JG, Oh TK, Ryu SE. 2002. Novel zinc-binding center and a temperature switch in the *Bacillus stearothermophilus* L1 lipase. *J Biol Chem* 277:17041–7
88. Jiang Y, Zhou XY, Chen ZM. 2010. Cloning, expression, and biochemical characterization of a thermostable lipase from *Geobacillus stearothermophilus* JC. *World J Microbiol Biotechnol* 26:747–51
89. Joerger RD, Haas MJ. 1994. Alteration of chain-length selectivity of a *Rhizopus delemar* lipase through site-directed mutagenesis. *Lipids* 29:377–84
90. Joern JM. 2003. DNA shuffling. In *Directed evolution library creation: methods and protocols*, ed. Arnold FH; Georgiou G. Humana Press Inc., 85–86
91. Joshi S, Satyanarayana T. 2015. In vitro engineering of microbial enzymes with multifarious applications: prospects and perspectives. *Bioresour Technol* 176:273–83
92. Jung HC, Ko S, Ju SJ, Kim EJ, Kim MK, Pan JG. 2003. Bacterial cell surface display of lipase and its randomly mutated library facilitates high-throughput screening of mutants showing higher specific activities. *J Mol Catal B-Enzym* 26:177–84
93. Kamarudin NHA, Abd Rahman RNZR, Ali MSM, Leow TC, Basri M, Salleh A. 2014. Unscrambling the effect of C-terminal tail deletion on the

- stability of a cold-adapted, organic solvent stable lipase from *Staphylococcus epidermidis* AT2. *Mol Biotechnol* 56:747–57
94. Kambourova M, Kirilova N, Mandeva R, Derekova A. 2003. Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus* MC 7. *J Mol Catal B-Enzym* 22:307–13
 95. Kamoun J, Schue M, Messaoud W, Baignol J, Point V, Mateos-Diaz E, Mansuelle P. 2015. Biochemical characterization of *Yarrowia lipolytica* LIP8, a secreted lipase with a cleavable C-terminal region. *Biochim Biophys Acta* 1851:129–40
 96. Kanwal S, Jamil F, Ali A, Sehgal SA. 2016. Comparative modeling, molecular docking, and revealing of potential binding pockets of RASSF2; a candidate cancer gene. *Interdiscip Sci* DOI: 10.1007/s12539-016-0145-z
 97. Kapoor S, Rafiq A, Sharma S. 2015. Protein engineering and its applications in food industry. *Crit Rev Food Sci Nutr* DOI: 10.1080/10408398.2014.1000481
 98. Karkhane AA, Yakhchali B, Jazii FR, Bambai B. 2009. The effect of substitution of Phe(181) and Phe(182) with Ala on activity, substrate specificity and stabilization of substrate at the active site of *Bacillus thermocatenulatus* lipase. *J Mol Catal B-Enzym* 61:162–7
 99. Kauffmann I, Schmidt-Dannert C. 2001. Conversion of *Bacillus thermocatenulatus* lipase into an efficient phospholipase with increased activity towards long-chain fatty acyl substrates by directed evolution and rational design. *Protein Eng* 14:919–28
 100. Kaur J, Sharma R. 2006. Directed evolution: an approach to engineer enzymes. *Crit Rev Biotechnol* 26:165–99
 101. Kawata T, Ogino H. 2010. Amino acid residues involved in organic solvent-stability of the LST-03 lipase. *Biochem Biophys Res Commun* 400:384–8
 102. Khurana J, Singh R, Kaur J. 2011. Engineering of *Bacillus* lipase by directed evolution for enhanced thermal stability: effect of isoleucine to threonine mutation at protein surface. *Mol Biol Rep* 38:2919–26
 103. Kikuchi M, Ohnishi K, Harayama S. 1999. Novel family shuffling methods for the in vitro evolution of enzymes. *Gene* 236:159–67
 104. Kim HK, Park SY, Lee JK, Oh TK. 1998. Gene cloning and characterization of thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* L1. *Biosci Biotech Bioch* 62:66–71
 105. Kingsley LJ, Lill MA. 2015. Substrate tunnels in enzymes: structure-function relationships and computational methodology. *Proteins* 83:599–611

106. Klein RR, King G, Moreau RA, Haas MJ. 1997. Altered acyl chain length specificity of *Rhizopus delemar* lipase through mutagenesis and molecular modeling. *Lipids* 32:123–30
107. Koch B, Schmidt C, Ploier B, Daum G. 2014. Modifications of the C terminus affect functionality and stability of yeast triacylglycerol lipase Tgl3p. *J Biol Chem* 289:19306–16
108. Kuo CH, Chen GJ, Chen CI, Liu YC, Shieh CJ. 2014. Kinetics and optimization of lipase-catalyzed synthesis of rose fragrance 2-phenylethyl acetate through transesterification. *Process Biochem* 49:437–44
109. Labrou NE. 2010. Random mutagenesis methods for in vitro directed enzyme evolution. *Curr Protein Pept Sc* 11:91–100
110. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–5
111. Lee D, Koh Y, Kim K, Kim B, Choi H, Kim D, Suhartono MT, Pyun Y. 1999. Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *FEMS Microbiol Lett* 179:393–400
112. Lee HL, Chang CK, Teng KH, Liang PH. 2011. Construction and characterization of different fusion proteins between cellulases and beta-glucosidase to improve glucose production and thermostability. *Bioresour Technol* 102:3973–6
113. Lefevre F, Remy MH, Masson JM. 1997. Alanine-stretch scanning mutagenesis: a simple and efficient method to probe protein structure and function. *Nucleic Acids Res* 25:447–8
114. Leow TC, Abd Rahman RNZR, Basri M, Salleh AB. 2007. A thermoalkaliphilic lipase of *Geobacillus* sp. T1. *Extremophiles* 11:527–35
115. Leow TC, Rahman RNZRA, Basri M, Salleh A. 2004. High level expression of thermostable lipase from *Geobacillus* sp. strain T1. *Biosci Biotech Bioch* 68:96–103
116. Levasseur A, Navarro D, Punt PJ, Belaich JP, Asther M, Record E. 2005. Construction of engineered bifunctional enzymes and their overproduction in *Aspergillus niger* for improved enzymatic tools to degrade agricultural by-products. *Appl Environ Microbiol* 71:8132–40
117. Levisson M, van der Oost J, Kengen SWM. 2007. Characterization and structural modeling of a new type of thermostable esterase from *Thermotoga maritima*. *Febs J* 274:2832–42
118. Li BC, Yang GY, Wu L, Feng Y. 2012. Role of the NC-loop in catalytic activity and stability in lipase from *Fervidobacterium changbaicum*. *PLoS One* DOI: 10.1371/journal.pone.0046881 (a)
119. Li H, Zhang X. 2005. Characterization of thermostable lipase from thermophilic *Geobacillus* sp. TW1. *Protein Expr Purif* 42:153–9

120. Li J, Chen SJ, Li L, Yu YP, Fei ZA, Qiao D, Cao Y. 2012. Approach of directed evolution of microbial lipases and biodiesel catalysis. *Afr J Microbiol Res* 6:637–42 (c)
121. Li J, Lin H. 2011. Numerical simulation of molecular uptake via electroporation. *Bioelectrochemistry* 82:10–21
122. Li S, Yang X, Yang S, Zhu M, Wang X. 2012. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. *Comput Struct Biotechnol J* 2:e201209017 (b)
123. Liebeton K, Zonta A, Schimossek K, Nardini M, Lang D, Dijkstra BW, Reetz MT, Jaeger KE. 2000. Directed evolution of an enantioselective lipase. *Chem Biol* 7:709–18
124. Lima LN, Oliveira GC, Rojas MJ, Castro HF, Da Ros PCM, Mendes AA, Giordano RLC, Tardioli PW. 2015. Immobilization of *Pseudomonas fluorescens* lipase on hydrophobic supports and application in biodiesel synthesis by transesterification of vegetable oils in solvent-free systems. *J Ind Microbiol Biotechnol* 42:523–35
125. Liu P, Ewis HE, Tai PC, Lu CD, Weber IT. 2007. Crystal structure of the *Geobacillus stearothermophilus* carboxylesterase Est55 and its activation of prodrug CPT-11. *J Mol Biol* 367:212–23
126. Liu P, Wang YF, Ewis HE, Abdelal AT, Lu CD, Harrison RW, Weber IT. 2004. Covalent reaction intermediate revealed in crystal structure of the *Geobacillus stearothermophilus* carboxylesterase Est30. *J Mol Biol* 342:551–61
127. Lopez-Gallego F, Abian O, Guisan JM. 2012. Altering the interfacial activation mechanism of a lipase by solid-phase selective chemical modification. *Biochemistry* 51:7028–36
128. Lopresto CG, Naccarato S, Albo L, De Paola MG, Chakraborty S, Curcio S, Calabro V. 2015. Enzymatic transesterification of waste vegetable oil to produce biodiesel. *Ecotox Environ Safe* 121:229–35
129. Lotti M, Alberghina L. 2007. Lipases: molecular structure and function. In *Industrial enzymes: structure, function and applications*, ed. Polaina J; MacCabe AP. Springer, 263–81
130. Lu P, Feng MG. 2008. Bifunctional enhancement of a beta-glucanase-xylanase fusion enzyme by optimization of peptide linkers. *Appl Microbiol Biotechnol* 79:579–87
131. Lu P, Feng MG, Li WF, Hu CX. 2006. Construction and characterization of a bifunctional fusion enzyme of *Bacillus*-sourced beta-glucanase and xylanase expressed in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 261:224–30

132. Malek JA, Shatsman SY, Akinretoy BA, Gill JE. 2000. Irreversible heat inactivation of DNase I without RNA degradation. *BioTechniques* 29:252–6
133. Manco G, Carrea G, Giosue E, Ottolina G, Adamo G, Rossi M. 2002. Modification of the enantioselectivity of two homologous thermophilic carboxylesterases from *Alicyclobacillus acidocaldarius* and *Archaeoglobus fulgidus* by random mutagenesis and screening. *Extremophiles* 6:325–31
134. Manoel EA, dos Santos JCS, Freire DMG, Rueda N, Fernandez-Lafuente R. 2015. Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme. *Enzyme Microbiol Technol* 71:53–7
135. Massadeh M, Sabra F, Dajani R, Arafat A. 2012. Purification of lipase enzyme produced by *Bacillus stearothermophilus* HU1. In *International Conference on EcoSystems and Biological Sciences*. Hashemite University, Al-Zarqa, Jordan
136. Masomian M., Rahman RNZRA, Salleh AB, Basri M. 2016. Analysis of comparative sequence and genomic data to verify phylogenetic relationship and explore a new subfamily of bacterial lipases. *PloS ONE* 11(3):1-20
137. Maynard JA, Chen G, Georgiou G, Iverson BL. 2002. In vitro scanning-saturation mutagenesis. *Methods Mol Biol* 182:149–63
138. Minamoto T, Wada E, Shimizu I. 2012. A new method for random mutagenesis by error-prone polymerase chain reaction using heavy water. *J Biotechnol* 157:71–4
139. Mohammadi M, Sepehrizadeh Z, Ebrahim-Habibi A, Shahverdi AR, Faramarzi MA, Setayesh N. 2015. Bacterial expression and characterization of an active recombinant lipase A from *Serratia marcescens* with truncated C-terminal region. *J Mol Catal B-Enzym* 120:84–92
140. Montoro-Garcia S, Martinez-Martinez I, Navarro-Fernandez J, Takami H, Garcia-Carmona F, Sanchez-Ferrer A. 2009. Characterization of a novel thermostable carboxylesterase from *Geobacillus kaustophilus* HTA426 shows the existence of a new carboxylesterase family. *J Bacteriol* 191:3076–85
141. Moreira IS, Fernandes PA, Ramos MJ. 2007. Computational alanine scanning mutagenesis: an improved methodological approach. *J Comput Chem* 28:644–54
142. Morrison KL, Weiss GA. 2001. Combinatorial alanine-scanning. *Curr Opin Chem Biol* 5:302–7

143. Mukherjee K, Pandey DM, Vidyarthi AS. 2015. *In silico* characterization and analysis of RTBP1 and NgTRF1 protein through MD simulation and molecular docking: a comparative study. *Interdiscip Sci* 7:275–86
144. Murakami H, Hohsaka T, Sisido M. 2002. Random insertion and deletion of arbitrary number of bases for codon-based random mutation of DNAs. *Nat Biotechnol* 20:76–81
145. Murakami H, Hohsaka T, Sisido M. 2003. Random insertion and deletion mutagenesis. *Methods Mol Biol* 231:53–64
146. Nakagawa Y, Hasegawa A, Hiratake J, Sakata K. 2007. Engineering of *Pseudomonas aeruginosa* lipase by directed evolution for enhanced amidase activity: mechanistic implication for amide hydrolysis by serine hydrolases. *Protein Eng Des Sel* 20:339–46
147. Nannemann DP, Birmingham WR, Scism RA, Bachmann BO. 2011. Assessing directed evolution methods for the generation of biosynthetic enzymes with potential in drug biosynthesis. *Future Med Chem* 3:809–19
148. Nardini M, Dijkstra BW. 1999. Alpha/beta hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Curr Opin Struc Biol* 9:732–7
149. Nazina TN, Tourova TP, Poltarauk AB, Novikova EV, Grigoryan AA, Ivanova AE, Lysenko AM, Petrunyaka VV, Osipov GA et al. 2001. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp nov and *Geobacillus uzenensis* sp nov from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. *Int J Syst Evol Micr* 51:433–46
150. Neylon C. 2004. Chemical and biochemical strategies for the randomization of protein encoding DNA sequences: library construction methods for directed evolution. *Nucleic Acids Res* 32:1448–59
151. Niu WN, Li ZP, Zhang DW, Yu MR, Tan TW. 2006. Improved thermostability and the optimum temperature of *Rhizopus arrhizus* lipase by directed evolution. *J Mol Catal B-Enzym* 43:33–9
152. Niyonzima FN, More S. 2015. Detergent-compatible proteases: microbial production, properties, and stain removal analysis. *Prep Biochem Biotechnol* 45:233–58
153. Olechnovic K, Kulberkyte E, Venclovas C. 2013. CAD-score: a new contact area difference-based function for evaluation of protein structural models. *Proteins* 81:149–62

154. Ollis DL, Cheah E, Cygler M, Dijkstra B, Frolow F, Franken SM, Harel M, Remington SJ, Silman I, Schrag J ir kt. 1992. The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng* 5:197–211
155. Ostermeier M, Benkovic SJ. 2000. Evolution of protein function by domain swapping. *Adv Protein Chem* 55:29–77
156. Paiva AL, Balcao VM, Malcata FX. 2000. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. *Enzyme Microb Technol* 27:187–204
157. Panda T, Gowrishankar BS. 2005. Production and applications of esterases. *Appl Microbiol Biotechnol* 67:160–9
158. Panizza P, Cesarini S, Diaz P, Giordano SR. 2015. Saturation mutagenesis in selected amino acids to shift *Pseudomonas* sp. acidic lipase Lip I.3 substrate specificity and activity. *Chem Commun* 51:1330–3
159. Patten PA, Howard RJ, Stemmer WP. 1997. Applications of DNA shuffling to pharmaceuticals and vaccines. *Curr Opin Biotech* 8:724–33
160. Pezzullo M, Del Vecchio P, Mandrich L, Nucci R, Rossi M, Manco G. 2013. Comprehensive analysis of surface charged residues involved in thermal stability in *Alicyclobacillus acidocaldarius* esterase 2. *Protein Eng Des Sel* 26:47–58
161. Pritchard L, Corne D, Kell D, Rowland J, Winson M. 2005. A general model of error-prone PCR. *J Theor Biol* 234:497–509
162. Qin XL, Huang HH, Lan DM, Wang YH, Yang B. 2014. Typoselectivity of crude *Geobacillus* sp. T1 lipase fused with a cellulose-binding domain and its use in the synthesis of structured lipids. *J Am Oil Chem Soc* 91:55–62 (a)
163. Qin XL, Lan DM, Zhong JF, Liu L, Wang YH, Yang B. 2014. Fatty acid specificity of T1 lipase and its potential in acylglycerol synthesis. *J Sci Food Agric* 94:1614–21 (b)
164. Quintana-Castro R, Diaz P, Valerio-Alfaro G, Garcia HS, Oliart-Ros R. 2009. Gene cloning, expression, and characterization of the *Geobacillus Thermoleovorans* CCR11 thermoalkaliphilic lipase. *Mol Biotechnol* 42:75–83
165. Raita M, Arnthong J, Champreda V, Laosiripojana N. 2015. Modification of magnetic nanoparticle lipase designs for biodiesel production from palm oil. *Fuel Process Technol* 134:189–97
166. Rao L, Xue YF, Zhou C, Tao J, Li G, Lu JR, Ma YH. 2011. A thermostable esterase from *Thermoanaerobacter tengcongensis* opening up a new family of bacterial lipolytic enzymes. *Bba-Proteins Proteom* 1814:1695–702

167. Reetz MT. 2000. Evolution in the test tube as a means to create enantioselective enzymes for use in organic synthesis. *Sci Prog* 83:157–72
168. Reyes-Duarte D, Polaina J, Lopez-Cortes N, Alcalde M, Plou FJ, Elborough K., Ballesteros A., Timmis KN, Golyshin PN, Ferrer M. 2005. Conversion of a carboxylesterase into a triacylglycerol lipase by a random mutation. *Angew Chem Int Ed Engl* 44:7553–7
169. Rizk M, Elleuche S, Antranikian G. 2015. Generating bifunctional fusion enzymes composed of heat-active endoglucanase (Cel5A) and endoxylanase (XylT). *Biotechnol Lett* 37:139–45
170. Ruslan R, Abd Rahman RNZR, Leow TC, Ali MSM, Basri M, Salleh A. 2012. Improvement of thermal stability via outer-loop ion pair interaction of mutated T1 lipase from *Geobacillus zalihae* strain T1. *Int J Mol Sci* 13:943–60
171. Sabeder S, Habulin M, Knez Z. 2006. Lipase-catalyzed synthesis of fatty acid fructose esters. *J Food Eng* 77:880–6
172. Sabourin M, Tuzon CT, Fisher TS, Zakian VA. 2007. A flexible protein linker improves the function of epitope-tagged proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 24:39–45
173. Sabri S, Rahman RNZRA, Leow TC, Basri M, Salleh AB. 2009. Secretory expression and characterization of a highly Ca²⁺-activated thermostable L2 lipase. *Protein Expr Purif* 68:161–6
174. Saeed HM, Soliman NA, Abdel-Fattah YR. 2005. Production, purification and characterization of thermostable lipase enzyme from a thermophilic *Bacillus* sp. *J. Medical Res Inst* 26:149–54
175. Salleh AB, Rahim ASMA, Rahman RNZRA, Leow TC, Basri M. 2012. The role of Arg157Ser in improving the compactness and stability of ARM lipase. *J Comput Sci Syst Biol* 5:39–46
176. Sambrook J, Russel DW. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY
177. Sangeetha R, Arulpandi I, Geetha A. 2011. Bacterial lipases as potential industrial biocatalysts: an overview. *Res J Microbiol* 6:1–24
178. Saxena RK, Ghosh PK, Gupta R, Davidson WS, Bradoo S, Gulati R. 1999. Microbial lipases: potential biocatalysts for the future industry. *Curr Sci India* 77:101–15
179. Schmid RD, Verger, R. 1998. Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. *Angew Chem Int Ed Engl* 37:1608–33
180. Schmidt-Dannert C. 1999. Recombinant microbial lipases for biotechnological applications. *Bioorg Med Chem* 7:2123–30

181. Secundo F, Carrea G, Tarabiono C, Brocca S, Lotti M. 2004. Activity and enantioselectivity of wildtype and lid mutated *Candida rugosa* lipase isoform 1 in organic solvents. *Biotechnol Bioeng* 86:236–40
182. Shamriz S, Ofoghi H. 2016. Design, structure prediction and molecular dynamics simulation of a fusion construct containing malaria pre-erythrocytic vaccine candidate, PfCelTOS, and human interleukin 2 as adjuvant. *BMC Bioinformatics* 17:71
183. Shariff FM, Abd Rahman RNZR, Basri M, Salleh AB. 2011. A newly isolated thermostable lipase from *Bacillus* sp. *Int J Mol Sci* 12:2917–34
184. Sharma D, Sharma B, Shukla AK. 2011. Biotechnological approach of microbial lipase: a review. *Biotechnol* 10:23–40
185. Sharma PK, Kumar R, Garg P, Kaur J. 2014. Insights into controlling role of substitution mutation, E315G on thermostability of a lipase cloned from metagenome of hot spring soil. *3 Biotech* 4:189–96
186. Shi BH, Wu WB, Wen JX, Shi QQ, Wu SG. 2010. Cloning and expression of a lipase gene from *Bacillus subtilis* FS1403 in *Escherichia coli*. *Ann Microbiol* 60:399–404
187. Shibamoto H, Matsumoto T, Fukuda H, Kondo A. 2004. Molecular engineering of *Rhizopus oryzae* lipase using a combinatorial protein library constructed on the yeast cell surface. *J Mol Catal B-Enzym* 28:235–9
188. Shih TW, Pan TM. 2011. Substitution of Asp189 residue alters the activity and thermostability of *Geobacillus* sp NTU 03 lipase. *Biotechnol Lett* 33:1841–6
189. Sinchaikul S, Sookkheo B, Phutrakul S, Pan FM, Chen ST. 2001. Optimization of a thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1: overexpression, purification, and characterization. *Protein Expr Purif* 22:388–98
190. Soliman NA, Knoll M, Abdel-Fattah YR, Schmid RD, Lange S. 2007. Molecular cloning and characterization of thermostable esterase and lipase from *Geobacillus thermoleovorans* YN isolated from desert soil in Egypt. *Process Biochem* 42:1090–100
191. Soliman NA, Gaballa AA. 2010. Molecular studies on a thermostable carboxyl esterase and dual function acylaminoacyl-peptidase from *Geobacillus thermoleovorans* YN. *J Biotechnol* 150:390
192. Stemmer WP. 1994. Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature* 370:389–91 (a)
193. Stemmer WP. 1994. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:10747–51 (b)

194. Suen WC, Zhang NY, Xiao L, Madison V, Zaks A. 2004. Improved activity and thermostability of *Candida antarctica* lipase B by DNA family shuffling. *Protein Eng Des Sel* 17:133–40
195. Sunna A, Hunter L, Hutton CA, Bergquist PL. 2002. Biochemical characterization of a recombinant thermoalkalophilic lipase and assessment of its substrate enantioselectivity. *Enzyme and microbial technology* 31:472–6
196. Syaima MTS, Ong KH, Noor IM, Zamratul MIM, Brahim SA, Hafizul MM. 2015. The synthesis of bio-lubricant based oil by hydrolysis and non-catalytic of palm oil mill effluent (POME) using lipase. *Renew Sust Energ Rev* 44:669–75
197. Tan HSG, Yu B, Curran P, Liu SQ. 2011. Lipase-catalysed synthesis of natural aroma-active 2-phenylethyl esters in coconut cream. *Food Chem* 124:80–4
198. Tayyab M, Rashid N, Akhtar M. 2011. Isolation and identification of lipase producing thermophilic *Geobacillus* sp. SBS-4S: cloning and characterization of the lipase. *J Biosci Bioeng* 111:272–8
199. Tekedar HC, Sanli-Mohamed G. 2011. Molecular cloning, over expression and characterization of thermoalkalophilic esterases isolated from *Geobacillus* sp. *Extremophiles* 15:203–11
200. Thorn KS, Bogan AA. 2001. ASEdb: a database of alanine mutations and their effects on the free energy of binding in protein interactions. *Bioinformatics* 17:284–5
201. Timucin E, Cousido-Siah A, Mitschler A, Podjarny A, Sezerman OU. 2016. Probing the roles of two tryptophans surrounding the unique zinc coordination site in lipase family I.5. *Proteins* 84:129–42
202. Timucin E, Sezerman OU. 2013. The conserved lid tryptophan, W211, potentiates thermostability and thermoactivity in bacterial thermoalkalophilic lipases. *PloS One* DOI: 10.1371/journal.pone.0085186
203. Treichel H, de Oliveira D, Mazutti MA, Di Luccio M, Oliveira JV. 2010. A review on microbial lipases production. *Food Bioprocess Tech* 3:182–96
204. Turner NJ. 2003. Directed evolution of enzymes for applied biocatalysis. *Trends Biotechnol* 21:474–8
205. Tyndall JDA, Sinchaikul S, Fothergill-Gilmore LA, Taylor P, Walkinshaw MD. 2002. Crystal structure of a thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1. *J Mol Biol* 323:859–69
206. Valetti F, Gilardi G. 2004. Directed evolution of enzymes for product chemistry. *Nat Prod Rep* 21:490–511

207. Valinger G, Hermann M, Wagner UG, Schwab H. 2007. Stability and activity improvement of cephalosporin esterase EstB from *Burkholderia gladioli* by directed evolution and structural interpretation of muteins. *J Biotechnol* 129:98–108
208. Van den Burg B. 2003. Extremophiles as a source for novel enzymes. *Curr Opin Microbiol* 6:213–8
209. van Kampen MD, Egmond MR. 2000. Directed evolution: from a staphylococcal lipase to a phospholipase. *Eur J Lipid Sci Tech* 102:717–26
210. Vehlow C, Stehr H, Winkelmann M, Duarte JM, Petzold I, Dinse J, Lappe M. 2011. CMView: interactive contact map visualization and analysis. *Bioinformatics* 27(11):1573-1574
211. Villeneuve P, Muderhwa JM, Graille J, Haas MJ. 2000. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *J Mol Catal B-Enzym* 9:113–48
212. Wahab RA, Basri M, Rahman MBA, Rahman RNZRA, Salleh A, Leow TC. 2012. Combination of oxyanion Gln114 mutation and medium engineering to influence the enantioselectivity of thermophilic lipase from *Geobacillus zalihae*. *Int J Mol Sci* 13:11666–80
213. Wahab RA, Basri M, Rahman RNZRA, Salleh AB, Rahman MBA, Leow TC. 2015. Development of a catalytically stable and efficient lipase through an increase in hydrophobicity of the oxyanion residue. *J Mol Catal B-Enzym* 122:282–8
214. Wang R, Yu X, Sha C, Xu Y. 2009. Increasing activity of *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021 lipase by directed evolution-error prone PCR. *Chinese J Biotechnol* 25:1892–9
215. Wei HN, Wu B. 2008. Screening and immobilization *Burkholderia* sp. GXU56 lipase for enantioselective resolution of (R,S)-methyl mandelate. *Appl Biochem Biotechnol* 149:79–88
216. Winkler UK, Stuckmann M. 1979. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *J Bacteriol* 138:663–70
217. Wu L, Liu B, Hong Y, Sheng DH, Shen YL, Ni JF. 2010. Residue Tyr224 is critical for the thermostability of *Geobacillus* sp RD-2 lipase. *Biotechnol Lett* 32:107–12
218. Yang J, Zhang Y. 2015. Protein structure and function prediction using I-TASSER. *Curr Protoc Bioinformatics* DOI: 10.1002/0471250953.bi0508s52
219. Yu K, Liu CC, Kim BG, Lee DY. 2015. Synthetic fusion protein design and applications. *Biotechnol Adv* 33:155–64

220. Zhang JH, Hou ZB, Yao CY, Yu YT. 2002. Purification and properties of lipase from a *Bacillus* strain for catalytic resolution of (R)-Naproxen. *J Mol Catal B-Enzym* 18:205–10
221. Zhang NY, Suen WC, Windsor W, Xiao L, Madison V, Zaks A. 2003. Improving tolerance of *Candida antarctica* lipase B towards irreversible thermal inactivation through directed evolution. *Protein Eng* 16:599–605
222. Zhang Y. 2008. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* 9:40
223. Zhao B, Tao J, Ma JS, Lian H, Wang Y, Chang L, Gao R, Cao S. 2009. Increasing activity of lipase from *Bacillus subtilis* by directed evolution. *Chinese J Catal* 30:291–6
224. Zhao HM, Chockalingam K, Chen ZL. 2002. Directed evolution of enzymes and pathways for industrial biocatalysis. *Curr Opin Biotech* 13:104–10
225. Zhu YB, Li HB, Ni H, Xiao AF, Li LJ, Cai HN. 2015. Molecular cloning and characterization of a thermostable lipase from deep-sea thermophile *Geobacillus* sp. EPT9. *World J Microbiol Biotechnol* 31:295–306
226. Zuo K, Zhang L, Yao H, Wang J. 2010. Isolation and functional expression of a novel lipase gene isolated directly from oil-contaminated soil. *Acta Biochim Pol* 7:305-11