

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.646>

<https://orcid.org/0000-0002-9187-3952>

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Vilius Malūnavičius

Geobacillus lipoliziniai fermentai:
struktūros-funkcijos tyrimai ir
pritaikymas polikaprolaktonų
perdirbimui

DAKTARO DISERTACIJA

Gamtos mokslai,
Biologija (N 010)

VILNIUS 2024

Disertacija rengta 2019–2023 metais Vilniaus universitete, Gyvybės mokslų centre

Mokslinė vadovė – doc. dr. Renata Gudiukaitė (Vilniaus universitetas, Gyvybės mokslų centras, gamtos mokslai, biologija, N 010).

Gynimo taryba:

Pirmininkas – prof. dr. Rolandas Meškys (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N 004).

Nariai:

Doc. dr. Julija Armalytė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010),

Prof. dr. Romas J. Kazlauskas (Minesotos Tvain Sičio universitetas, Biologijos mokslų koledžas, JAV, gamtos mokslai, biologija – N 010);

Doc. dr. Jolanta Sereikaitė (Vilniaus Gedimino technikos universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija – T 005);

Prof. dr. Elena Servienė (Gamtos tyrimų centras, gamtos mokslai, biologija – N 010).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2024 m. rugpjūčio mėn. 27 d. 15:00 val. Gyvybės mokslų centre R401 auditorijoje. Adresas: Saulėtekio al. 7, R401 auditorija, Vilnius, Lietuva.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje ir VU interneto svetainėje adresu:

<https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.646>

<https://orcid.org/0000-0002-9187-3952>

VILNIUS UNIVERSITY

Vilius Malūnavičius

Geobacillus Lipolytic Enzymes:
Structure-Function Research and
Application in Polycaprolactone
Recycling

DOCTORAL DISSERTATION

Natural Sciences,
Biology (N 010)

VILNIUS 2024

The dissertation was prepared between 2019 and 2023 at Vilnius University, Life Sciences Center.

Academic supervisor –

Assoc. Prof. Dr. Renata Gudiukaitė (Vilnius University, Natural Sciences, Biology N 010).

This doctoral dissertation will be defended in a public meeting of the Dissertation Defence Panel:

Chairman – Prof. Dr. Rolandas Meškys (Vilnius university, Natural Sciences, Biochemistry – N 004).

Members:

Assoc. Prof. Dr. Julija Armalytė (Vilnius University, Natural Sciences, Biology – N 010),

Prof. Dr. Romas J. Kazlauskas (University of Minnesota Twin Cities, College of Biological Sciences, USA, Natural Sciences, Biology – N 010),

Assoc. Prof. Dr. Jolanta Sereikaitė (Vilnius Gediminas Technical University, Technological Sciences, Chemical engineering – T 005),

Prof. Dr. Elena Servienė (Nature research center, Natural Sciences, Biology – N 010),

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 15:00 on 27th August 2024 in Auditorium R401 of the Life Sciences Center.

Address: Saulėtekio al. 7, R401, Vilnius, Lithuania

The text of this dissertation can be accessed at the libraries of Vilnius University, as well as on the website of Vilnius University:

www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

SANTRUMPOS

6HHA – 6-hidroksiheksoninė rūgštis

Å – angstromas (nesisteminis ilgio matas, atitinkantis 0,1 nm (10^{-10} m))

APS – amonio peroksidisulfatas

BVP – bendrasis vidaus produktas

Da – daltonas (nesisteminis masės vienetas $1 \text{ Da} = 1,66054 \times 10^{-24} \text{ g}$)

DES – eutektinis tirpiklis (angl. *deep eutectic solvent*)

DMSO – dimetilsulfoksidas

d. H₂O – dejonizuotas vanduo

ESTHER – esterazių, alfa/beta hidrolazių ir susijusių fermentų duomenų bazė (angl. *ESTerases and alpha/beta-Hydrolase Enzymes and Relatives*)

G – laisvojo kritimo pagreitis ($1 \text{ g} = 9,80665 \text{ m/s}^2$)

GDSL – antrosios lipolizinių fermentų šeimos pavadinimas (sinonimas SGNH), nurodantis konservatyvų motyvą, kuriame lokalizuota katalizinė aminorūgštis. G – glicinas, D – asparto rūgštis, S – serinas, L – leucinas

HPLC-MS – didelio našumo skysčių chromatografija su tandemine masių spektrometrija (angl. *high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry*)

IMAC – imobilizuotų metalo jonų giminingumo chromatografija (angl. *immobilised metal ion affinity chromatography*)

IPTG – Izopropilo β-D-1-tiogalaktopiranozidas

IUBMB – Tarptautinė biotechnologijos ir molekulinės biologijos draugija (angl. *International Union of Biochemistry and Molecular biology*)

K_{cat} – katalizinė konstanta

K_m – Michaelis-Menten konstanta

LB – lizogeninis buljonas (angl. *lysogeny broth*)

LED – lipazių inžinerijos duomenų bazė (angl. *lipase engineering database*)

m/z – masės/krūvio santykis

MHET – mono-(2-hidroksietil) teraftalatas

Mn – vidutinė molekulinė masė (angl. *molar mass distribution*)

Mw – molekulinė masė (angl. *molecular mass*)

MWCO – molekulinės masės pralaidumo riba (angl. *molecular weight cut-off*)

NADES – natūralus eutektinis tirpiklis (angl. *natural deep eutectic solvent*)

NCBI – nacionalinis biotechnologijos informacijos centras (angl. *National Center for Biotechnology Information*)

NDS – natrio dodecilsulfatas

NDS-PAGE – elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje su natrio dodecilsulfatu

OECD – ekonominio bendradarbiavimo ir vystymosi organizacija (angl. *The Organisation for Economic Co-operation and Development*)

OT₆₀₀ – optinis tankis, matuojamas esant 600 nm bangos ilgiui

PCL – polikaprolaktonas (angl. *polycaprolactone*)

PET – polietileno tereftalatas

PGR – polimerazės grandininė reakcija

PLA – polilaktinė rūgštis (angl. *polylactic acid*)

pLDDT – baltymo modelyje esančių aminorūgščių pozicijų patikimumo įvertis (angl. *predicted local distance difference test*)

p-NP – *para*-nitrofenolis

aps./min – apsisukimai per minutę

SEM – skenuojanti elektronų mikroskopija (angl. *scanning electron microscopy*)

SOC – super optimalus buljonas, pasižymintis kataboline represija (angl. *super optimal broth with catabolite repression*)

SPD – standartiniai PCL degradacijos vienetai (angl. *standardized PCL degradation units*)

T_d – tetraedrinis junginys

TEMED – N,N,N',N'-tetrametiletilendiaminas

T_{lyd} – lydymosi temperatūra

TM – šablono modeliavimo įvertis (angl. *template modeling score*)

Tris – tris (hidroksimetil) aminometanas

v/v – tūris tūryje

V_{\max} – maksimalus reakcijos greitis

w/v – svoris tūryje

λ – bangos ilgis

AMINORŪGŠČIŲ SANTRUMPOS

Arg, R – argininas

Asn, N – asparaginas

Asp, D – asparto rūgštis

Gly, G – glicinas

His, H – histidinas

Leu, L – leucinas

Lys, K – lizinas

Ser, S – serinas

Sm – bet kokia maža aminorūgštis

X – bet kokia aminorūgštis

TURINYS

ĮVADAS	10
1. LITERATŪRINĖ ANALIZĖ	16
1.1 Lipolizinių fermentų struktūra.....	16
1.2 Lipolizinių fermentų skirstymas.....	21
1.3 Lipolizinių fermentų katalizuojamos reakcijos ir jų veikimo mechanizmas	24
1.4 Lipolizinių fermentų katalizinis įvairumas.....	26
1.5 Lipolizinių fermentų pramoninis ir mokslinis pritaikymas	31
1.6 Poliesteriai ir jų skaidymas taikant lipolizinius fermentus.....	34
2. METODIKA.....	40
2.1 Darbe naudotos medžiagos, reagentai	40
2.2 Darbe naudotos rekombinantinės plazmidės, bakterijų kamienai, kultivavimo sąlygos.....	40
2.3 Darbe naudoti pradmenys	42
2.4 GDEst-95 esterazę koduojančio geno tikslinė mutagenezė taikant taikiniui persidengiančio ilginimo strategiją	43
2.5 GDEst-95 esterazę koduojančio geno atsitiktinė mutagenezė taikant kladingą PGR	44
2.6 Modifikuotų GDEst-95 genų klonavimas	45
2.7 Rekombinantinių baltymų sintezė.....	46
2.8 Tikslinių baltymų gryninimas taikant imobilizuotų metalo jonų giminingumo chromatografiją.....	47
2.9 Fermentų aktyvumo įvertinimas	48
2.10 Fermentų fizikinių ir cheminių savybių įvertinimas	48
2.11 Fermentų kinetinių parametų įvertinimas	49
2.12 Bioinformatinė analizė.....	49
2.13 Lipolizinių fermentų gebėjimo skaidyti polikaprolaktoną įvertinimas	50
2.14 Organinių tirpiklių poveikio PCL plėvelės skaidymo efektyvumui nustatymas.....	51

2.15 PCL skaidymo ir esterių sintezės produktų analizė taikant didelio našumo skysčių chromatografijos ir tandeminės masių spektrometrijos metodą (HPLC-MS)	51
2.16 PCL plėvelių po poveikio fermentais analizė, taikant skenuojančią elektronų mikroskopiją (SEM)	52
2.17 Statistinė analizė	53
3. REZULTATAI	54
3.1 GDEst-95 esterazės naujų fenotipų kūrimas ir charakterizavimas	55
3.1.1 GDEst-95 mutantų kūrimas ir klonavimas	55
3.1.2 Mutuotų GDEst-95 baltymų sintezė ir gryninimas	58
3.1.3 Gly108Arg, Ala410Arg, Leu226Arg ir Leu411Ala mutantų charakterizavimas	59
3.1.4 GDEst-RM1, GDEst-RM2 ir GDEst-RM3 mutantų charakterizavimas	62
3.1.5 Struktūrinė GDEst-95 mutantų analizė	65
3.2. GDEst-lip, GD-95RM ir GDEst-95 lipolizinių fermentų pritaikymas poliesterių skaidymui	68
3.2.1 Optimalių PCL hidrolizės sąlygų nustatymas	68
3.2.2. Alkoholių poveikis GD-95RM ir GDEst-lip fermentų vykdomai PCL plėvelių degradacijai	74
3.2.3. PCL plėvelių skaidymo dinamikos analizė	76
3.2.4. PCL hidrolizės produktų ir gautų esterių nustatymas	79
4. APTARIMAS	82
IŠVADOS	92
SUMMARY OF DOCTORAL DISSERTATION	93
PRIEDAI	133
PADĖKA	134
PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS	135
CURRICULUM VITAE	136
LITERATŪROS SĄRAŠAS	138

ĮVADAS

Nuo pat pramonės revoliucijos pradžios žmonija padarė didžiulį progresą technologijų, medicinos, ekonomikos srityse. Visgi XXI amžiuje esame priversti pažvelgti į neigiamus šio progreso padarinius Žemei. Neigiami antropogeniniai veiksniai (oro ir vandens tarša, miškų kirtimas, didelis neyrančių išmetamų atliekų kiekis) kenkia pasaulio klimatui, gyvagai gamtai ir žmogaus gerovei. Tai ne tik ekologinė, tačiau ir ekonominė problema. Remiantis ekonominio bendradarbiavimo ir vystymosi organizacijos (angl. *The Organisation for Economic Co-operation and Development*) (OECD) duomenimis, vien dėl oro taršos, pasaulis patiria nuostolius, lygius 3,5 % pasaulinio BVP (1768 mlrd. JAV dolerių) (Roy ir Braathen, 2017). Nors ši tarša kyla būtent dėl pramoninės gamybos, ji yra būtina norint patenkinti didėjančius žmonijos poreikius ir užtikrinant geresnę gyvenimo kokybę kiek galima didesniai skaičiai gyventojų. Taigi, yra būtina ieškoti naujų inovatyvių sprendimų, leidžiančių išlaikyti didelius gamybos tempus, tačiau turinčius mažesnę žalingą poveikį aplinkai.

Vienas galimų būdų pagerinti gamybos efektyvumą, nedarant žalos gamtai – platesnis fermentų taikymas pramonėje. Fermentai – tai gyvų organizmų sintetiniai baltyminiai katalizatoriai, kurių funkcija – pagreitinti organizmo vykdomas chemines reakcijas. Lyginant su kitais katalizatoriais fermentai pasižymi trejomis naudingomis savybėmis: efektyviai greitina reakcijas (kai kurias daugiau negu 10^{17} kartų) (Radzicka ir Wolfenden, 1995), specifiškumu (priklausomai nuo fermento funkcijos gali sintetinti arba skaidyti platų arba siaurą junginių spektrą ar specifinius stereoizomerus) ir reguliacija (kai kurių fermentų funkcionalumas gali būti kontroliuojamas papildomomis molekulėmis, pavyzdžiui kofaktoriais, arba sintezės produktais, kurie slopina kitų metabolinių kelių fermentus) (Price et al., 1999). Kadangi dažnu atveju fermentai nekenkia aplinkai, yra bioskaidūs ir gali būti naudojami kelis kartus, didelis dėmesys yra skiriamas šių katalizatorių pritaikymui pramonėje, aplinkos apsaugoje ar medicinoje. Fermentų taikymas yra vienas perspektyviausių, ekologiškai draugiškų dabartinių ir ateities problemų sprendimo būdų.

Lipoliziniai fermentai – tai hidrolazių, skeliančių karboksilesterinius ryšius lipiduose, grupė, gerai žinoma dėl savo gebėjimo hidrolizuoti arba formuoti esterinius ryšius (dažniausiai tarp alkoholių ir karboksirūgščių). Dėl savo patrauklių savybių, tokių kaip didelio aktyvumo, stabilumo, gebėjimo veikti organinių tirpiklių aplinkoje, gebėjimo skaidyti įvairius substratus ar formuoti įvairius produktus – nuo surfaktantų iki biodyzelino – lipoliziniai fermentai ilgą laiką taikomi pramonėje. Pastaruoju metu susidomėta plastikų, turinčių

esterines jungtis (poliesterių), skaidymu naudojant lipolizinius fermentus. Gebėjimas efektyviai pašalinti šiuos plastikus ne tik reikšmingai prisidėtų prie antropogeninės taršos mažinimo, bet ir leistų panaudoti susidarančias atliekas naujų, pridėtinę vertę turinčių junginių sintezėje. Apjungus plastikų biodegradacijos reakciją kartu su esterių sintezės reakcijomis būtų galima supaprastinti šiuos procesus.

Polikaprolaktonas (PCL) – sintetinis, tačiau biodegradabilus poliesteris, kuris šiuo metu susilaukia vis didesnio dėmesio. Jis taikomas vaistų pernašai, dirbtinių audinių karkasų kūrimui ar 3D spausdinimo technologijose. Šis polimeras ne tik pasižymi naudingomis savybėmis medicinos pramonėje, tačiau taip pat yra plačiai tiriamas, kaip komponentas plastikų kompozitų, kurie galėtų pakeisti kitus, dažniau naudojamus ir taršius polimerus, tokius kaip PET (polietileno tereftalatas), PE (polietilenas) ir kt. Vis dėlto esama įspėjimų, jog neturint bioskaidžių plastikų kompozitų utilizavimui pritaikytos efektyvios infrastruktūros, galime susidurti su identiška plastikų taršos problema. Lipoliziniai fermentai yra ne tik idealūs kandidatai šių polimerų skaidymui, tačiau dėl gebėjimo vykdyti esterinimo reakcijas, alkoholių aplinkoje, jie galėtų efektyviai pasitarnauti atliekų utilizavime ir pridėtinės vertės produktų kūrimu.

Didelis dėmesys skiriamas ne tik naujų lipolizinių fermentų paieškai ar esamų fermentų pritaikymui, tačiau ir jų modifikavimui ir gerinimui, norint užtikrinti pramoninių procesų efektyvumą, įskaitant ir poliesterių utilizavimą. Taikant baltymų inžinerijos strategijas galima atlikti norimas baltymų modifikacijas ir pagerinti fermentų aktyvumą, temperatūrinį stabilumą, substratinį savitumą ar kitas savybes, svarbias norimai funkcijai atlikti. Tokios modifikacijos leidžia apeiti natūralias fermentų ribas ir kurti tikslinėms problemoms spręsti skirtus biokatalizatorius. Fermentai paprastai gali būti modifikuojami atliekant konkrečius norimus aminorūgščių pakeitimus, arba kuriant atsitiktinių mutantų bibliotekas, kurios atrenkamos pagal tikslią požymį ieškant norimomis savybėmis pasižyminčio lipolizinio fermento. Pastarasis procesas, dėl savo panašumo į gamtoje vykstančią evoliuciją, vadinamas kryptingąja evoliucija (angl. *directed evolution*).

Nepaisant pasirinktos baltymų inžinerijos strategijos, galimi tiek geresniu, tiek prastesniu aktyvumu pasižymintys fermentai. Net ir sumažėjęs fermento aktyvumas gali mokslininkams suteikti svarbios informacijos apie fermento struktūros-funkcijos ryšį. Aminorūgštys, kurių pozicijas pakeitus, fermento aktyvumas ar temperatūrinis stabilumas krenta arba pasikeičia substratinis savitumas leidžia identifikuoti iki tol nežinomus struktūrinius elementus, ar ryšius, atsakingus už sėkmingą baltymo funkcionavimą. Apjungus gautas

žinias mokslininkai gali tiksliau planuoti modifikacijas ir kurti specifiniams tikslams įgyvendinti skirtus biokatalizatorius.

Kryptingosios evoliucijos sąvoka ne tik pasiskolino savo antrąjį žodį iš biologinės evoliucijos srities. Didėjant biologijos mokslų tarpdiscipliniškumui sąvokos ir koncepcijos iš evoliucijos mokslų srities pradėtos plačiau taikyti ir baltymų inžinerijoje. Vienas iš pavyzdžių – evoliucijoje minimos genotipo-fenotipo erdvės ir prisitaikymo reljefų sąvokos. Šios koncepcijos – tai naujas būdas pažvelgti į baltymų inžineriją ir mūsų taikomus atrankos kriterijus, kuriant geresnėmis savybėmis pasižyminčius fermentus. Klausimai tokie kaip – kodėl tam tikri požymiai yra išsaugomi, koks epistazių (šiam kontekste – kelių mutacijų bendras poveikis, kuris nėra tapatus numanomam jų sudėtiniam poveikiui) poveikis ir kokie atrankos kriterijai turėtų būti taikomi – gali būti naudojami ne tik organizmų, tačiau ir biomolekulių, tarp jų ir baltymų kaitos analizėje.

Šioje disertacijoje dėmesys skiriamas *Geobacillus* genties sintetiniams lipoliziniams fermentams (lipazės ir karboksilesterazės). Dėl savo gebėjimo veikti aukštesnėse temperatūrose, stabilumo, aktyvumo organinių tirpiklių aplinkoje, gebėjimo katalizuoti tiek hidrolizės, tiek esterių sintezės ir peresterinimo reakcijas jie yra patrauklus fundamentinių ir pritaikymo pramonėje tyrimų objektas. Vis dėl to apie kai kuriuos iš jų kol kas žinoma gana nedaug, todėl šiuo darbu siekiama praplėsti struktūros-funkcijos žinias apie mažiau aprašytas, 55 kDa dydžio *Geobacillus* karboksilesterazes bei įvertinti galimybę pritaikyti *Geobacillus* lipolizinius fermentus poliesterių perdirbimui.

Darbo tikslas: sukurti ir charakterizuoti naujus *Geobacillus* sp. 95 kamieno karboksilesterazės GDEst-95 variantus bei pritaikyti lipolizinius fermentus (GDEst-lip, GD-95RM) kombinuotai polikaprolaktonų hidrolizei ir esterių sintezei.

Darbo uždaviniai:

1. Taikant taikiniui specifinę mutagenęzę modifikuoti *Geobacillus* sp. 95 karboksilesterazę (GDEst-95) ir nustatyti naujas fermento funkcionalumui svarbias aminorūgštis;
2. Taikant kryptingosios evoliucijos metodus sukurti didesniu aktyvumu ir/ar pakitusiu substratiniu savitumu pasižyminčius *Geobacillus* sp. 95 karboksilesterazės (GDEst-95) variantus;
3. Įvertinti *Geobacillus* sp. 95 sintetinamų lipolizinių fermentų pagrindu sukurtų GD-95RM ir GDEst-lip fermentų gebėjimą skaidyti polikaprolaktoną;
4. Įvertinti organinių tirpiklių įtaką fermentinei polikaprolaktonų hidrolizei ir identifikuoti susidarancius esterius.

Mokslinis darbo naujumas ir praktinė reikšmė

Pastaruoju metu didelis dėmesys skiriamas antropogeninės taršos mažinimui bei žiedinės ekonomikos principams. Vienas didžiausių taršos sukėlėjų, kurio poveikis jaučiamas visame pasaulyje, yra plastikai ir šiuo metu intensyviai ieškoma būdų kaip perdirbti arba kitaip utilizuoti plastiko atliekas. Perspektyvi ir daug dėmesio sulaukianti sritis yra mikroorganizmų išskiriami fermentai, kurie, tikimasi, galėtų ne tik padėti suskaidyti plastiko atliekas iki nekenksmingų produktų, tačiau taip pat leistų jas panaudoti pridėtinės vertės produktų gamyboje. *Geobacillus* genties mikroorganizmų išskiriami fermentai turi didelį potencialą pasitarnauti tokiose pramonės šakose. Šie fermentai pasižymi dideliu aktyvumu aukštose temperatūrose, yra stabilūs organinių tirpiklių aplinkoje – savybėmis, kurios labai svarbios atliekant cheminės katalizės reakcijas, ypač kalbant apie esterių sintezę.

Šiame darbe buvo atlikta ankstesnių darbų metu *Geobacillus* sp. 95 kamieno sintetinamų lipolizinių fermentų pagrindu sukurtų modifikuotų GD-95RM lipazės (Druteika et al., 2020) ir GDEst-lip sulieto fermento (Gudiukaite et al., 2017) gebėjimo hidrolizuoti PCL analizė. Rezultatai parodė, jog abu fermentai geba efektyviai skaidyti PCL. Darbe taip pat pirmą kartą parodyta, kad poliesterio skaidymo efektyvumas reikšmingai padidėja reakcijos tirpalą papildžius organiniais tirpikliais: etanoliu ar metanoliu. Taip pat nustatyta, jog skaidymo mišinį papildžius šiais organiniais tirpikliais, fermentai atlieka 6-hidroksiheksoninės rūgšties (6-HHA) esterių sintezę. Tai ne tik pirmą kartą parodė galimą *Geobacillus* genties bakterijų lipolizinių fermentų panaudojimą poliesterinių plastikų degradacijai, tačiau taip pat galimybę juos pritaikyti kuriant pridėtinės vertės produktus kaip pradinę žaliavą panaudojant poliesterines atliekas. Remiantis gautais rezultatais ir literatūros analize modifikuoti *Geobacillus* genties mikroorganizmų lipoliziniai fermentai yra vieni efektyviausių aprašytų PCL skaidančių fermentų.

Šio darbo metu taikant tikslinės mutagenezės ir kryptingosios evoliucijos metodus taip pat plačiau buvo tiriama *Geobacillus* sp. 95 sintetinama 55 kDa karboksilesterazė (GDEst-95) (Gudiukaite et al., 2017), siekiant praplėsti turimą informaciją apie šio fermento genotipo-fenotipo erdvę. Nors *Geobacillus* spp. karboksilesterazės yra aprašytos literatūroje, didžioji tyrimų dalis koncentruojasi į mažesnio dydžio (30-35 kDa) karboksilesterazes, tuo tarpu 55 kDa dydžio *Geobacillus* spp. sintetinamų karboksilesterazių tyrimų kiekis yra ribotas. Šiuo metu pasaulyje paskelbtos tik kelios publikacijos apie šias esterazes. Dvi išsamiausios joms skirtos publikacijos paskelbtos prieš daugiau negu 15 metų. Buvo parodyta, kad vienas artimiausių šiai esterazei

fermentų – Est55 karboksilesterazė gali būti panaudojama priešvėžinių vaistų gamyboje. Platesnis šių fermentų suvokimas leistų ne tik geriau suprasti *Geobacillus* lipolizinius fermentus, tačiau kartu praplėstų biotechnologijoje taikomų fermentinių įrankių sąrašą.

Remiantis ankstesnių darbų metu atlikta analize, numanomai aktyvumui svarbios aminorūgštys pakeistos naudojant tikslią mutagenezę ir sukurti keturi nauji mutantiniai GDEst-95 variantai: Gly108Arg, Ala410Arg, Leu226Arg, Leu411Ala. Gauti aktyvumo rezultatai patvirtino hipotezę, kad Gly108 ir Ala410 yra šio fermento aktyvumui svarbios aminorūgštys, tuo tarpu Leu226Arg mutantas pasižymėjo didesniu reakcijos greičiu, tačiau mažesniu afiniškumu substratui. Leu411Ala mutantas pasižymėjo didesniu bendruoju aktyvumu ir geresnėmis katalizinėmis charakteristikomis.

Taikant klaidingą polimerazės grandininę reakciją (PGR) gauti 3 nauji GDEst-95 variantai: GDEst-RM1, GDEst-RM2, GDEst-RM3. Visi trys variantai pasižymėjo didesniu savituoju aktyvumu, geresnėmis katalizinėmis savybėmis ir yra nauji efektyvesni biokatalizatoriai lyginant su pradine GDEst-95 karboksilesteraze. Didžiausiu aktyvumu pasižymintys variantai GDEst-RM1 (Arg75Gln) ir GDEst-RM2 (Gly20Ser ir Arg75Gln) turėjo ne tik vieną bendrą mutaciją, tačiau abi pakeistos aminorūgštys, remiantis numanoma baltymo struktūra, yra lokalizuotos toliau nuo katalizinio centro, ant baltymo paviršiaus. Tai leidžia teigti, jog GDEst-95 esterazės veikimui svarbios aminorūgštys yra lokalizuotos ne tik netoli fermento aktyviojo centro. Tolimesnis šio fermento paviršiaus aminorūgščių modifikavimas gali leisti gauti naujomis, geresnėmis savybėmis pasižyminčius biokatalizatorius. Ligando-baltymo santykio analizė, lyginant GDEst-95 ir GDEst-RM2 esterazes, parodė, jog dvi įvykusios mutacijos turėjo poveikį ir kitoms aminorūgštims, dalyvaujančioms sudarant kontaktą su substratu. Mutacijos atveju nustatytos dvi papildomos sąveikos formuojamos tarp fermento ir substrato, o bendrai abu fermentai skiraisi penkiomis sąveikomis. Remiantis LigPlot+ analize, Tyr311 ir Leu413 aminorūgštys yra nauji taikiniai tolimesniems GDEst-95 esterazės ir kitų jai artimų karboksilesterazių tyrimams, siekiant išsiaiškinti šių fermentų aktyvumui ir substrato prijungimui svarbias aminorūgštis.

Šio darbo rezultatai suteikia tiek teorinių įžvalgų apie mažai tirtas *Geobacillus* spp. karboksilesterazes, liudija apie paviršinių aminorūgščių svarbą fermentų aktyvumui, tiek rodo potencialų *Geobacillus* bakterijų lipolizinių fermentų panaudojimą poliesterinių plastikų utilizavime žiedinės ekonomikos principais.

Ginamieji teiginiai:

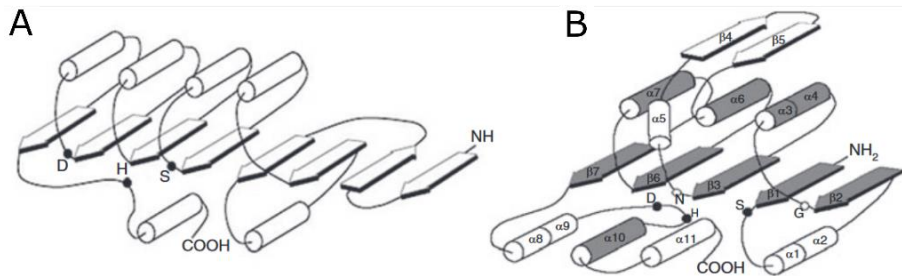
1. Gly108, Ala410, Leu226 ir Leu411 aminorūgštys yra svarbios GDEst-95 karboksilesterazės aktyvumui, o modifikacijos šiose padėtyse gali lemti reikšmingus fermento aktyvumo pokyčius.
2. Nuo aktyviojo centro toliau lokalizuotų aminorūgščių mutacijos gali lemti geresnes GDEst-95 karboksilesterazės katalizines ir fizikines/chemines savybes.
3. Modifikuoti *Geobacillus* genties lipoliziniai fermentai GD-95RM ir GDEst-lip – konkurencingos poliesterazės, galinčios efektyviai skaidyti polikaprolaktoną.
4. GD-95RM ir GDEst-lip geba vykdyti kombinuotą skirtingos vidutinės molekulinės masės polikaprolaktonų hidrolizę ir gautų produktų metil-, etil- esterių sintezę.

1. LITERATŪRINĖ ANALIZĖ

1.1 Lipolizinių fermentų struktūra

Dauguma lipolizinių fermentų priklauso α/β hidrolazių superšeimai (Bornscheuer, 2002), tačiau esama išimčių: kai kurios lipazės pasižymi $\alpha/\beta/\alpha$ superšeimai arba β -laktamazių superšeimai būdingu erdviu susilankstymu (Bashiri et al., 2022). Tuo tarpu α/β superšeimai taip pat priskiriami ir kiti fermentai: acetilcholino esterazės, acil-transferazės, amidazės, dehalogenazės, dienelktono hidrolazės, epoksido hidrolazės, hidroksinitrilo liazės, peroksidazės, proteazės, tioesterazės, peptidazės, pektinazės ir kiti fermentai (Bauer et al., 2020). Nors tarpusavyje lipolizinių fermentų sekų panašumas gali būti labai žemas (kartais žemesnis negu 20 %) didžioji jų dalis pasižymi įprastais lipolizinių fermentų struktūros elementais (Kovacic et al., 2018). Atsižvelgiant į tai, jog remiantis aminorūgščių sekomis nemažai negiminingų baltymų formuoja labai panašias erdvinės struktūras, kai kurie autoriai teigia, jog struktūrų erdvė yra tęstinė – yra daug kelių, kuriais baltymai gali evoliucionuoti nuo vienos erdvinės struktūros iki kitos (Bauer et al., 2020). Pagrindiniai lipolizinių fermentų struktūriniai elementai yra α/β klostė (arba $\alpha/\beta/\alpha$ klostė), katalizinės aminorūgštys, nukleofilinė alkūnė, joje lokalizuotas katalizinis pentapeptidas (GDSL lipazėse ir VIII šeimos lipazės šios struktūros nerandamos), oksianijoninė ertmė, dangtelio arba kepurėlės struktūros, N- arba C- galo struktūros.

Tiek lipazės, tiek esterazės turi α/β klostės struktūrą (1.1A pav.) arba $\alpha/\beta/\alpha$ klostės struktūrą (1.1B pav.) (nustatoma GDSL šeimos lipazėse, kurios priskiriamos II lipolizinių fermentų šeimai, pagal Arpigny ir Jaeger klasifikaciją) (Arpigny ir Jaeger, 1999; Kovacic et al., 2018). Lipoliziniai fermentai pasižymi centrine hidrofobine β -klostyta struktūra, sudaryta iš 8 β -klosčių, iš kurių antroji yra antilygiagreti, o bendra β klosčių tvarka yra 12435678 (Lenfant et al., 2013b; Kovacic et al., 2018). Visos β -klostės, nuo trečiosios iki aštuntosios, tarpusavyje sujungtos α -spirale-kilpa struktūromis, išdėstytomis abejuose β -lakšto pusėse. Ši struktūra yra gana plastiška ir atskiri domenai gali būti įvedami į šią struktūrą jos nepaveikiant (Kovacic et al., 2018). Manoma, jog dėl šio plastiškumo α/β hidrolazės pasižymi tokia didele biocheminių reakcijų įvairove.



1.1 pav. Klasikinis lipolizinių fermentų α/β susilankstymas (A) ir GDSL (SGNH) lipolizinių fermentų $\alpha/\beta/\alpha$ susilankstymas (B). Juodi taškai žymi katalizines aminorūgštis, balti – oksianijoninę ertmę formuojančias aminorūgštis, pagal (Kovacic et al., 2018).

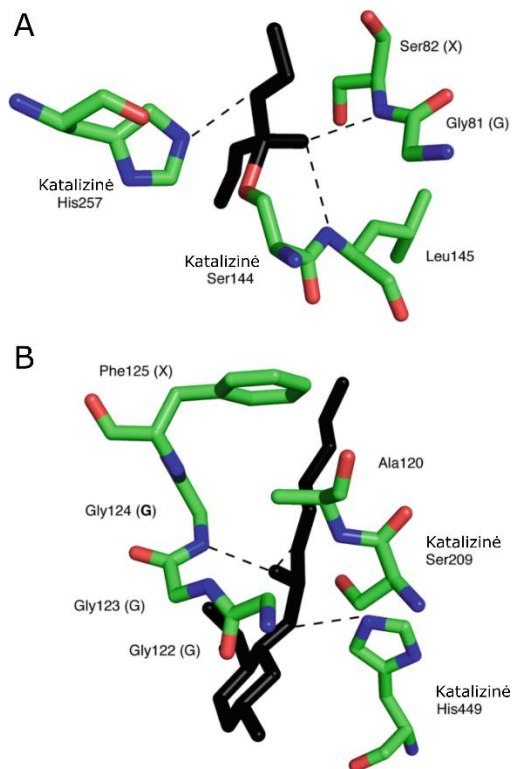
Lipolizinių fermentų katalizinę triadą sudaro: nukleofilinis serinas, glutamatas (arba aspartatas) ir histidinas. Šios aminorūgštys visada išdėstomos ta pačia tvarka, dėl savo funkcijų atliekant katalizę (plačiau aptariama 1.1.3 skyriuje). Nukleofilinis serinas paprastai lokalizuojamas konservatyviame pentapeptide: G-X-S-X-G, kur G – glicinas, X – bet kokia aminorūgštis ir S – nukleofilinis serinas. Šis pentapeptidas yra lokalizuotas ties staigiu posūkiu, tarp penktos β klostės ir α -spiralės (Pleiss et al., 2000; Kovacic et al., 2018). Kai kuriais atvejais glicinas gali būti pakeistas alaninu, arba kita maža aminorūgštimi, todėl dažnai katalizinis pentapeptidas pateikiamas kaip: Sm-X-S-X-Sm, kur Sm – maža aminorūgštis (Kovacic et al., 2018).

Standartinę $\alpha/\beta/\alpha$ hidrolazės klostę sudaro penkių β -klostių hidrofobinė šerdis ir mažiausiai keturios α -spiralės (Akoh et al., 2004). Ši šeima taip pat dažnai vadinama SGNH šeima (arba GDSL šeima), pagal katalizinių (S – serino, H – histidino, D – asparto rūgšties) ir oksianijoninės ertmės (G – glicino, H – histidino) aminorūgščių išsidėstymą (Kovacic et al., 2018). Priešingai nei α/β hidrolazėse, šios šeimos fermentai neturi nukleofilinės alkūnės, o klasikinė pentapeptido seka yra pakeista į GDSL seką, lokalizuotą netoli fermento N- galo (Kovacic et al., 2018). Katalizinis histidinas ir aspartatas taip pat lokalizuoti DXXH motyve (Kovacic et al., 2018). Šios grupės lipazės, dėka papildomų antrinių struktūrinių elementų, pasižymi didesne funkcine įvairove ir gali katalizuoti glikoesterių, arilesterių, vaškinių lipidų, fosfolipidų, lizofosfolipidų, acetil kofermento A tioesterių, peptidų ar triacilglicerolių hidrolizę (Kovacic et al., 2018).

Reikšmingi struktūriniai skirtumai nustatomi lipoliziniuose fermentuose priskiriamuose VIII šeimai. Šie fermentai reikšmingai skiriasi nuo tradicinių α/β hidrolazių ir yra panašesni į β -laktamazės arba DD-peptidazės. Šių fermentų šerdį taip pat formuoja β -klostės, kurios dažniausiai lokalizuojamos antilygiagrečiai (Kovacic et al., 2018). Šių lipazių katalizinis serinas taip pat

lokalizuotas ne GX SXG motyve, tačiau SXXK motyve (visgi ties C- galu šios lipazės turi ir GX SXG motyvą) (Wagner et al., 2002; Kovacic et al., 2018). Nepaisant didelio panašumo į β -laktamazės, šie fermentai nepasižymi aktyvumu prieš β -laktaminius antibiotikus, daugiausiai dėl erdvinių trukdžių (Wagner et al., 2002).

Kitas svarbus lipolizinių fermentų struktūrinis elementas – oksianijoninė ertmė. Ši struktūra reikalinga stabilizuoti tarpinį junginį, susidarantį substrato hidrolizės metu (plačiau aprašoma skyriuje 1.3). Oksianijoninėje ertmėje esančios aminorūgštys suformuoja vandenilinį ryšį su karbonilo deguonies atomu, taip stabilizuodamos tetraedrinį tarpinį junginį (plačiau aptariama 1.3 skyriuje) (Rauwerdink ir Kazlauskas, 2015). Paprastai oksianijoninę ertmę sudaro aminorūgštis peptidinės jungties amino grupė (-NH), turinti laisvą vandenilio atomą. Dažniausiai tai atlieka glicinas. Oksianijoninės ertmės gali būti skirstomos į tris pagrindinius tipus: GX (1.2A pav.), GGGX (1.2B pav.) ir Y (Casas-Godoy et al., 2018; Bauer et al., 2020). GX tipo oksianijoninėse ertmėse pirmoji oksianijoninės ertmės ryšį suformuoja X aminorūgštis peptidinio ryšio -NH grupė; GGGX tipo oksianijoninėse ertmėse ši ryšį formuoja trečio glicino -NH grupė; Y oksianijoninėse ertmėse ryšį formuoja didelės aminorūgštis (dažniausiai tirozino, arba aspartato) šoninės grandinės (Bauer et al., 2020). Manoma, jog oksianijoninių ertmių įvairovė gali būti ir didesnė: esama numanomų α/β hidrolazių, kurių oksianijoninės ertmės struktūros nuspėjamos kaip EX (glutamo rūgštis ir bet kokia aminorūgštis) arba SI (serino ir isoleucino aminorūgštys) ir negali būti priskirtos jokiai dabartinei klasifikacijai (Bauer et al., 2020).

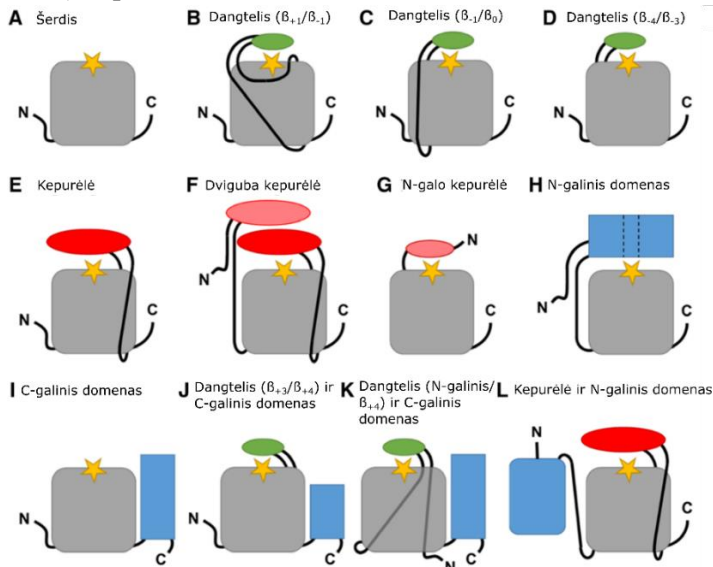


1.2 pav. Oksianijoninių ertmių struktūros pavyzdžiai. A) *Rhizomucor miehei* lipazės GX tipo oksianijoninė ertmė (Ser82 ir Leu145) stabilizuoja fosfonatą; B) *Candida rugosa* lipazės GGGX tipo oksianijoninė ertmė (Gly124 ir Ala120) stabilizuoja (1R)-mentil heksil fosfonatą. Juoda spalva žymi substratą, punktyrinė linija – vandenilinį ryšį, pagal (Casas-Godoy et al., 2018).

Lipolizinių fermentų (dažniausiai priskiriamų tikrosioms lipazėms) aktyvusis centras gali būti blokuojamas specialaus dangtelio domeno. Ši struktūra – mobilus elementas, skirtas izoliuoti aktyvųjį centrą nuo aplinkoje esančio tirpiklio (Gupta et al., 2015; Casas-Godoy et al., 2018). Ties vandens-substrato sąlyčio tašku dangtelis pereina į atvirą konformaciją ir aktyvusis centras tampa prieinamas substratui. Dėl šios priežasties lipazės, turinčios dangtelį, pasižymi tarpfazine aktyvacija – jų aktyvumas priklauso nuo substrato koncentracijos – matomas didelis aktyvumo padidėjimas substratui pasiekus micles formuojančią koncentraciją, o aktyvumo kreivės neatitinka klasikinių Michaelis-Menten kreivių ir yra sigmoidinės (Casas-Godoy et al., 2018). Svarbu paminėti, jog nors kanoniškai lipazės buvo priskiriamos kaip turinčios dangtelius ir pasižyminčios tarpfazine aktyvacija, esama lipazių, kurios neturi dangtelio domeno (pvz.: *Bacillus subtilis* lipazė LipA) (Jaeger et al., 1993; Lesuisse et al., 1993), arba turinčių dangtelio domeną, tačiau nepasižyminčių tarpfazine aktyvacija (*Pseudomonas aeruginosa* lipazė LipA)

(Kovacic et al., 2018). Dangtelio domenas taip pat gali būti pašalinamas arba pakeičiamas kito organizmo lipazės dangtelį koduojančių aminorūgščių seka. Pavyzdžiui, pakeitus *Actinoalloteichus* genties bakterijos lipazės dangtelį *Rhizopus delemar* lipazės dangteliu, fermento aktyvumas skaidant ilgesnio anglies atomų grandinės ilgio trigliceridus padidėjo (Fernandez-Lopez et al., 2023). Kito tyrimo rezultatai parodė, jog pašalinus *Candida antarctica* lipazės A numanomą dangtelio domeną fermentas išlaiko savo aktyvumą ir substratinį savitumą, tačiau praranda tarpfazinę aktyvaciją (Wikmark et al., 2016). Esama lipazių, pasižyminčių atskiru, nejudriu domenu, dengiančiu aktyvųjį centrą – vadinamu kepurėle (angl. *cap*). Ši struktūra skiriasi nuo dangtelio – paprastai ji didesnė ir nėra mobili. Ši struktūra matoma *C. antarctica* lipazėje A (Widmann et al., 2010; Monteiro et al., 2021) arba *Alicyclobacillus acidocaldarius* lipazėse (Wang et al., 2005; Kovacic et al., 2018). Manoma, jog šios struktūros svarbios substratiniam savitumui ir padeda suformuoti substrato patekimo tunelį (Widmann et al., 2010). Kai kuriais atvejais jos būtinos fermento aktyvumui palaikyti (Wang et al., 2005).

Kai kurios lipazės gali turėti papildomus domenus, lokalizuotus fermento N- arba C- galuose (1.3 pav. H, I, J, K, L). Šie domenai (β -sumuštiniai arba β -propeleriai) paprastai yra formuojami iš β -klosčių. Šie elementai gali būti kombinuojami su kitais moduliniiais hidrolazių elementais – dangteliais arba kepurėlėmis (1.3 pav.) (Bauer et al., 2020).



1.3 pav. Skirtingų α/β hidrolazių struktūros. Šerdinis domenas pažymėtas pilka spalva. Baltymo N- ir C- galai pažymėti dešinėje ir kairėje atitinkamomis raidėmis. Aktyvusis centras pažymėtas geltona žvaigždute. Dangteliai pažymėti žaliai. Kepurėlės pažymėtos raudonai. Kiti moduliniai domenai pažymėti mėlynu stačiakampiu. Struktūros, kuriose daugiau α -spiralių žymimos ovalu, o β -klosčių – stačiakampiais, pagal Bauer et al., 2020.

Nors šios struktūros (β -sumuštiniai arba β -propeleriai) rečiau nustatomos lipoliziniuose fermentuose, tačiau yra randamos žmogaus kasos lipazėje (Gunn ir Neher, 2023), arba *Pseudomonas* sp. MIS38 lipazėje (Angkawidjaja et al., 2007). Manoma, jog lipoproteininės lipazės, atsakingos už riebalų skaidymą lipoproteinuose (struktūros, atsakingos už riebalų pernešimą kraujyje), C- gale esantys motyvai yra atsakingi už šio fermento dimerizavimąsi (Gunn ir Neher, 2023).

1.2 Lipolizinių fermentų skirstymas

Lipoliziniai fermentai – tai didelė fermentų grupė, kuriai priskiriami fermentai, skaidantys karboksilesterinį ryšį turinčius junginius vandeninėje aplinkoje (EC. 3.1.1) (Ollis et al., 1992; Bornscheuer, 2002; Rauwerdink ir Kazlauskas, 2015; Gricajeva et al., 2019). Šie fermentai taip pat gali atlikti ir sintezės reakcijas (plačiau aprašoma 1.3 skyriuje): esterių sintezės, peresterinimo (alkoholizę, acidolizę ar aminolizę) arba interesterinimo (Lotti ir Alberghina, 2007; Chandra et al., 2020). Esant vandens pertekliui hidrolizės reakcijos pusiausvyra yra nukreipta į produktų pusę, todėl fiziologinėmis sąlygomis jos yra negrįžtamos (Kovacic et al., 2018). Dvi pagrindinės fermentų klasės, kurioms priskiriami lipoliziniai fermentai yra karboksilesterazės (EC 3.1.1.1) ir tikrosios lipazės (EC 3.1.1.3) (Chahinian et al., 2002; Lotti ir Alberghina, 2007). Kadangi daugeliu atveju šie fermentai atlieka identišką reakciją, atskirti juos tarpusavyje yra sudėtinga. Paprastai yra laikoma, jog karboksilesterazės hidrolizuoja vandenyje tirpius karboksilesterius. Tuo tarpu lipazėms priskiriami fermentai, galintys skaidyti vandenyje netirpių junginių triacilglicerolių esterines jungtis (Lotti ir Alberghina, 2007; Hitch ir Clavel, 2019). Kadangi lipiduose esančių riebalų rūgščių grandinės anglies atomų ilgis atvirkščiai proporcingas jų tirpumui, ilgos riebalų rūgšties grandinės ilgio junginius ($>16/18$ anglies atomų ilgio) skaidantys fermentai dažniau priskiriami lipazėms, o trumpos grandinės (<10 anglies atomų ilgio) – esterazėms (Kovacic et al., 2018; Alejaldre et al., 2022). Vis dėl to, riebalų rūgščių anglies atomų grandinės ilgis, kuris būtų laikomas ilgu arba trumpu, varijuoja ir paprastai nėra pakankama priežastis priskirti fermentą vienai arba kitai klasei (Bashiri et al., 2022). Papildomas skirstymas gali būti įterpiamas atskiriant lipazes nuo vadinamų „tikrųjų lipazių“: lipazės gebės skaidyti trigliceridus, tačiau tik tikrosios lipazės teiks pirmenybę ilgos grandinės trigliceridams (Sorokin ir Jones, 2009; Hitch ir Clavel, 2019).

Kita ypatybė dažnai naudojama atskirti lipazes ir esterazes – tarpfazinis aktyvumas, kuris dažniau priskiriamas lipazėms (Bornscheuer, 2002; Lotti ir Alberghina, 2007; Kovacic et al., 2018). Tarpfazinis aktyvumas – tai fermento

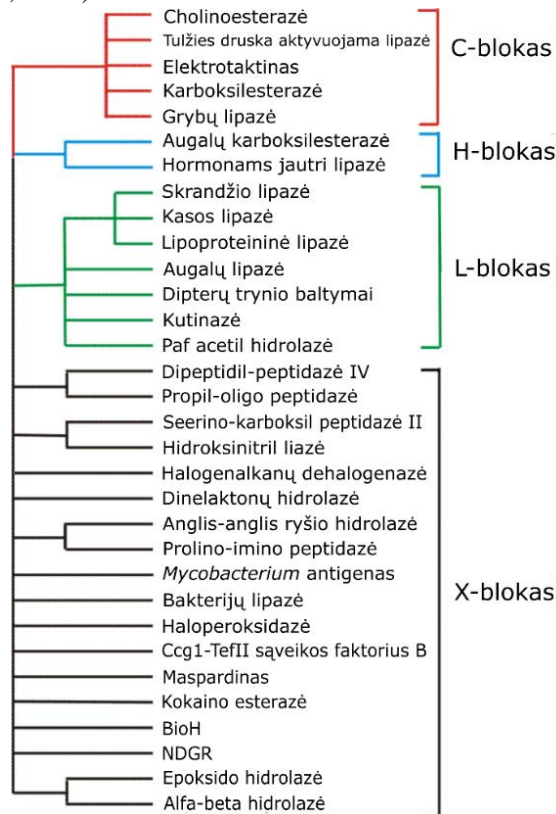
aktyvumo didėjimas didėjant substrato koncentracijai. Kadangi lipazių substratai yra netirpūs vandeninėje aplinkoje, susiformuoja lipidų micelės. Ties skirtingomis fazėmis lipazės dangtelio domeno (plačiau aprašomas skyriuje 1.1) erdvinis susilankstymas pasikeičia ir fermento aktyvusis centras tampa prieinamas substratui. Dėl šių priežasčių lipazių kinetinės kreivės yra sigmoidinės, tuo tarpu esterazių – linijinės, atitinkančios klasikinius Michaelis-Menten dėsnius (Kovacic et al., 2018). Visgi, tarpfazinis aktyvumas taip pat nėra pakankama priežastis identifikuoti fermentą kaip lipazę ar esterazę (Verger, 1997; Lotti ir Alberghina, 2007; Kovacic et al., 2018). Pavyzdžiui, *B. subtilis* lipazė A (LipA) neturi dangtelio struktūros, o *P. aeruginosa* LipA turi lankstų dangtelį, tačiau nepasižymi tarpfazine aktyvacija (Jaeger et al., 1993; Lesuisse et al., 1993; Kovacic et al., 2018).

Lipolizinių fermentų klasifikavimas pirmą kartą atliktas 1999 metais remiantis tuo metu žinomomis 53 lipolizinių fermentų sekomis (Arpigny ir Jaeger, 1999). Pagal šią klasifikaciją lipoliziniai fermentai suskirstyti į 8 šeimas, o pirmoji šeima (tikrosios lipazės) papildomai išskirstyta į 6 pošeimius (Arpigny ir Jaeger, 1999). Technologijoms tobulėjant ir didėjant duomenų kiekiui, didėjo ir kiekis publikacijų, teigiančių, jog buvo atrasti naujos lipolizinių fermentų šeimos atstovai. 2018 metais ši klasifikacija buvo praplėsta iki 19 šeimų, pirmoji šeima suskirstyta į 8 pošeimius (Kovacic et al., 2018). Po metų pasiūlyta šią klasifikaciją praplėsti iki 35 šeimų, o pirmąją šeimą išskaidyti į 11 pošeimius (Hitch ir Clavel, 2019). Autoriai taip pat sutiko, jog dėl bendros klasifikacijos trūkumo nemažai lipolizinių fermentų klaidingai priskiriami naujoms šeimoms (Hitch ir Clavel, 2019). Nemaža dalis šių šeimų atstovų turi tik vieną eksperimentiškai patvirtintą atstovą (Kovacic et al., 2018). Šios lipolizinių fermentų klasifikacijos sistemos yra paremtos sekų homologiiniu panašumu (Arpigny ir Jaeger, 1999), konservatyvių sekų motyvais ir biologine funkcija (Kovacic et al., 2018; Hitch ir Clavel, 2019).

Esama ir kitų klasifikacijos sistemų, kurios remiasi ne tik sekos, bet ir struktūriniais skirtumais. Dvi duomenų bazės, susijusios su lipolizinių fermentų klasifikavimui, yra ESTHER (angl. *ESTerases and alpha/beta-Hydrolase Enzymes and Relatives*) (Lenfant et al., 2013b) ir Lipazių inžinerinė duomenų bazė (angl. *Lipase engineering database (LED)*) (Fischer ir Pleiss, 2003; Bauer et al., 2020). Nepaisant savo pavadinimų, abi šios bazės apima ne tik lipolizinius fermentus, bet ir visus kitus fermentus, priklausančius α/β hidrolazių superšeimai.

ESTHER duomenų bazė sukurta 1992 metais (Cousin et al., 1996) ir yra reguliariai atnaujinama (Cousin et al., 1997, 1998; Chatonnet, 2001; Renault et al., 2005; Lenfant et al., 2013a, 2013b; Chatonnet et al., 2023). ESTHER duomenų bazėje α/β superšeimoms hidrolazės yra skirstomos į 4 pošeimius

(vadinamus blokus): C, L, H, X (1.4 pav.). Šie blokai sukurti remiantis Prosite duomenų bazėje randamomis konsensuso sekomis (Hotelier et al., 2004). Lipazės ESTER duomenų bazėje daugiausiai priskiriamos L blokui (tačiau gali būti randamos ir kituose blokuose). Dvi šeimos, tradicinėje bakterijų lipolizinių fermentų sistemoje priskiriamos II ir VIII šeimai, neturi priskyrimo ESTHER duomenų bazėje. II lipazių šeimos atstovai, priskiriami SGNH (dar vadinamoms GDSL) hidrolazėms, turinčioms $\alpha/\beta/\alpha$ susilankstymą (plačiau aprašoma 1.1 skyriuje). Tuo tarpu VIII lipazių šeimos atstovai priskiriami β -laktamazijų klasei (Lenfant et al., 2013b). ESTHER duomenų bazė taip pat pateikia lentelę, rodančią, kurios lipolizinių fermentų šeimos atitinka pirminę pasiūlytą Arpigny ir Jaeger klasifikaciją. Šiuo metu lipoliziniai fermentai priskirti 19 šeimų, remiantis Filip Kovacic ir kolegų pasiūlyta klasifikacija (Kovacic et al., 2018).



1.4 pav. ESTHER duomenų bazėje esantis supaprastintas scheminis medis, iliustruojantis cholinesterazių, karboksilesterazių, lipazių bei kitų baltymų, kurių nefermentiniai domenai turi α/β susilankstymą, giminingumą, pagal Lenfant ir kt. (Lenfant et al., 2013b).

Kita duomenų bazė svarbi lipolizinių fermentų klasifikavimui – LED. Ši duomenų bazė integruoja lipazių, esterazių ir giminingų baltymų struktūras,

funkcijos ir sekų informaciją (Fischer ir Pleiss, 2003). Ši duomenų bazė sukurta, siekiant sistematiškai analizuoti sekos-struktūros-funkcijos ryšį tarp lipolizinių fermentų (Fischer ir Pleiss, 2003). Šioje duomenų bazėje α/β hidrolazės skirstomos į 13 superšeimų, priklausomai nuo modulinės jų struktūros (dangtelių, kepurėlių, N- ir C- galinių domenų ir šių struktūrų tarpusavio išsidėstymo) (1.3 pav.) (Bauer et al., 2020). Lipoliziniai fermentai šioje duomenų bazėje taip pat klasifikuojami remiantis oksianijoninę ertmę sudarančiomis aminorūgštimis į GX, GGGX ir Y tipus (plačiau aptariami 1.1 skyriuje) (Fischer ir Pleiss, 2003). LED duomenų bazė turi sąsają su ESTHER duomenų baze – pastarojoje pateikiami atitikmenys tarp šių dviejų duomenų bazių (Lenfant et al., 2013b).

Suvokimas apie fermentus, jų struktūros ir funkcijos ryšį vis tobulėja, ypač pastaruoju metu atsiradus galimybei pasitelkti dirbtinį intelektą. Viena naujausių duomenų bazių – AlphaFold baltymų struktūrų duomenų bazė (angl. *AlphaFold protein structure database (AlphaFold DB)*), kurioje kaupiamos numanomos baltymų struktūros, įskaitant ir lipolizinių baltymų struktūras, gautas naudojant AlphaFold.

Nepaisant didelio skirtingų duomenų bazių kiekio ir juose esančių įrankių, leidžiančių priskirti lipolizinius fermentus pagal skirtingas klasifikavimo sistemas, vis dar esama sunkumų nustatant naujus necharakterizuotus lipolizinius fermentus. Bashiri ir kolegos atliko tyrimą naudodami 78 numanomas psichrofilinių lipazių sekas ir nustatė, jog nei vienas išbandytas įrankis negalėjo tiksliai identifikuoti lipazėms įprastų domenų (Bashiri et al., 2022). Lipolizinių fermentų skirstymas nėra vienareikšmis ir nekintantis. Tikėtina, jog daugėjant informacijos kiekiui apie šiuos fermentus dabartinės naudojamos klasifikacijos sistemos taip pat keisis. Dėl šių priežasčių svarbu ir toliau tobulinti turimus bioinformatinius įrankius, bei plėsti turimą eksperimentinių duomenų apie lipolizinius fermentus kiekį, norint geriau suvokti jų funkcinę ir struktūrinę įvairovę.

1.3 Lipolizinių fermentų katalizuojamos reakcijos ir jų veikimo mechanizmas

Lipoliziniai fermentai veikia laikantis Ping-Pong Bi-Bi mechanizmo. Toks mechanizmo pavadinimas nurodo, jog fermentas pirmiausiai reaguoja su pirmuoju substratu suformuodamas produktą, kuris disocijuoja nuo fermento, ir tik tuomet antrasis substratas prisijungia prie fermento aktyviojo centro. Įprasta lipolizinių fermentų katalizuojamos reakcijos eiga (1.5 pav.): katalizinis histidinas tarnauja kaip bazė ir deprotonuoja seriną, kuris tarnauja kaip nukleofilas ir atakuoja substrato karbonilo atomą – susidaro pirmasis

substratai, tarp kurių suformuojamas esterinis ryšys. Galutiniai reakcijos produktai – esteris ir vanduo.

Tioesterinimas ir amidinimas – sintezės reakcijos, kurias gali vykdyti lipoliziniai fermentai dėl savo substratinio įvairumo (angl. *substrate promiscuity*) (Aranda et al., 2014; Müller et al., 2021). Tai – fermento galimybė katalizuoti papildomas reakcijas, kurios nepriklauso pagrindinėms jo fiziologinėms funkcijoms (kaip pagrindinę funkciją tioesterinimą atlieka tioesterazės; tioesteriai – esteriai, suformuojami tarp tiolio (R-SH) ir karboksirūgšties (R'-COOH)).

Jeigu aplinkoje yra kitų tirpiklių nei vanduo, lipoliziniai fermentai gali vykdyti peresterinimo reakcijas. Peresterinimo reakcijų metu vandenį, kaip nukleofilą, pakeičia: alkoholis (alkoholizė), rūgštis (acidolizė), esteris (interesterinimas), aminos (aminolizė) (van Rantwijk et al., 2000; Adlercreutz, 2017).

1.4 Lipolizinių fermentų katalizinis įvairumas

Lipoliziniai fermentai pasižymi dideliu kataliziniu įvairumu (angl. *catalytic promiscuity*). Kaip minėta anksčiau, tai – savybė vykdyti chemines reakcijas, kurios nėra tiesiogiai susijusios su fermento fiziologine funkcija. Karl Hult ir Per Berglund įvardijo 3 pagrindinius fermentų katalizinio įvairumo tipus: a) sąlygų įvairumas; b) substrato įvairumas; c) reakcijos įvairumas (gali būti netyčinis, arba indukuotas) (Hult ir Berglund, 2007). Skirtingi autoriai skirtingai naudoja fermentinio įvairumo sąvoką: vieni fermentinį įvairumą tapatina su plačiu substratiniu spektru arba papildomomis fiziologinėmis funkcijomis (angl. *moonlighting*), tuo tarpu kiti labiau akcentuoja fiziologiškai nesvarbių reakcijų katalizavimą (Tawfik, 2010; Copley, 2017). Fiziologiškai nesvarbi reakcija – tai reakcija, kurios katalizavimas nėra fermento funkcija organizme; fermentinė katalizė yra daugiau atsitiktinis padarinys (Copley, 2017). Nepaisant to, fermentų, pasižymintį keliomis atliekamomis fiziologinėmis funkcijomis, dauguma autorių nepriskiria fermentams, pasižymintiems kataliziniu įvairumu (Copley, 2017). Keli tokių fermentų pavyzdžiai: leukotrieno A4 hidrolazė/aminopeptidazė, albaflavanono monooksigenazė/terpeno sintetazė arba mitochondrijų amidoksimo reduktazės komponentas (Copley, 2017).

1.4.1 Sąlygų įvairumas

Sąlygų įvairumas gali būti įvardijamas kaip fermento gebėjimas veikti ne fiziologinėmis sąlygomis: aukštesnėse temperatūrose, organiniuose

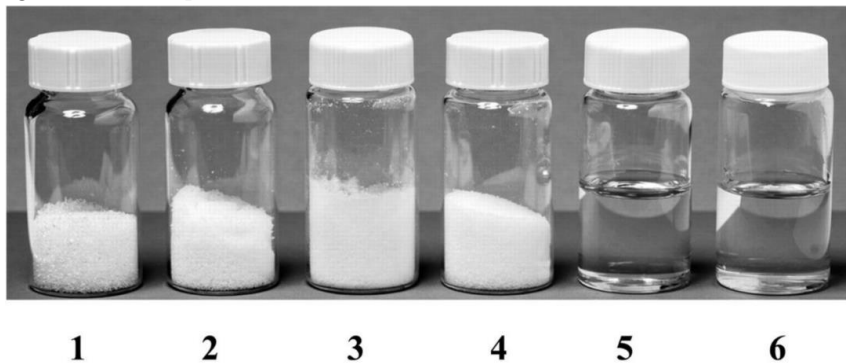
tirpikliuose, aplinkoje neesant tirpiklių, esant aukštam ar žemam pH (Hult ir Berglund, 2007). Klasikinis sąlygų įvairumo pavyzdys – lipolizinių fermentų gebėjimas veikti organiniuose tirpikliuose (Zaks ir Klibanov, 1985; Patti ir Sanfilippo, 2022). Yra parodyta, kad *Bacillus* spp. lipazės yra labai stabilios hidrofobiniuose organiniuose tirpikliuose, o jų aktyvumas gali būti padidinamas aplinkoje esant mažos koncentracijos (10-50 %) trumpos grandinės alkanų, tolueno ar benzeno. Esama daugybės faktorių, kurie gali turėti poveikį fermento aktyvumui organiniuose tirpikliuose: pasiskirstymo koeficientas, dielektrinė konstanta, vandeniliniai ryšiai, poliariškumas ir kita). Visgi kol kas nėra galimybių tiksliai nuspėti, kaip skirtingi fermentai elgsis skirtinguose organiniuose tirpikliuose (Kumar et al., 2016). Nors modeliuojant lipazių struktūrą organiniuose tirpikliuose nėra nustatyta aiškių pokyčių (Sharma and Kanwar, 2014), yra manoma, jog organinių tirpiklių aplinkoje lipazių dangtelis (plačiau aprašomas skyriuje 1.1) išlieka atviroje, arba dalinai-atviroje konformacijoje, priešingai nuo vandeninės aplinkos, kurioje dangtelis išlieka uždaras. Tai leidžia substratui lengviau pakliūti į fermento aktyvųjį centrą taip užtikrinant efektyvią katalizę (Khan et al., 2017). Taip pat organiniai tirpikliai gali padaryti fermento struktūrą mažiau lanksčią, o tai gali leisti valdyti kai kurias fermento katalizines savybes (substratinį specifiškumą, chemo-, regio- arba enantio- atrankumą) varijuojant tirpikliu (Speranza and Alves Macedo, 2013). Reakcijų vykdymas organinių tirpiklių aplinkoje suteikia kelis naudingus pranašumus: termodinaminė reakcijos pusiausvyra pasislenka į produktų sintezės pusę, padidinamas nepolinių substratų tirpumas, vyksta mažiau pašalinių reakcijų, fermento temperatūrinis stabilumas yra padidinamas. Nepaisant šių pranašumų, efektyviam lipazių veikimui organiniuose tirpikliuose, svarbu išlaikyti aktyvumui reikalingą vandens kiekį fermento paviršiuje. Lipazės organiniuose tirpikliuose taip pat gali netekti aktyvumo dėl fizinių ar cheminių pokyčių (deamininimo, disulfidinių tiltelių trūkio) (Sharma and Kanwar, 2014).

Pastaruoju metu taip pat susidomėta lipolizinių fermentų aktyvumu joniniuose skysčiuose (Itoh, 2017; Elgharbawy et al., 2018) arba eutektiniuose tirpikliuose (Tan ir Dou, 2020; Patti ir Sanfilippo, 2022). Fermentų veikimas tokiose sistemose ne tik praplečia jų panaudojimo spektrą, tačiau taip pat gali pakeisti jų vykdomas reakcijas – lipolizinių fermentų atveju jie gali atlikti sintezės reakcijas (Trodler ir Pleiss, 2008; Anobom et al., 2014).

Joniniai skysčiai (angl. *ionic liquids*) – tai skysčiai, sudaryti tik iš žemos lydymosi temperatūros (<100 °C) joninių medžiagų (Itoh, 2017; Elgharbawy et al., 2018). Kambario temperatūroje šie tirpikliai yra skysčiai, jų lydymosi temperatūra yra žema dėl juos sudarančių jonų asimetrijos ir silpnų tarp molekulinė ryšių. Joniniai skysčiai gali būti derinami pagal norimą

paskirtį, juos paprastai sudaro organiniai katijonai (imidazolo, piridino, pyrolidino, cholino, amonio, morfolino, fosfonio arba jų darinių jonai) ir organiniai arba neorganiniai anijonai (*bis*(trifluorometilsulfonil)imidai, chloro-, bromo-, heksafluorofosfatai, trifluorometilsulfatai, dicianamidai, tetraborofluoratai) (Sivapragasam et al., 2016; Nasirpour et al., 2020). Joniniai skysčiai pasižymi labai naudingomis savybėmis vykdyti katalizės reakcijas – jie yra mažiau lakūs, mažiau degūs, mažiau toksiški ir tinkami įvairių organinių ar neorganinių medžiagų tirpinimui (Itoh, 2017). Nors didelės koncentracijos vandeniniuose druskos tirpaluose fermentų aktyvumas mažėja, joniniai skysčiai gali reikšmingai padidinti baltymų, DNR ar fermentų stabilumą (Sivapragasam et al., 2016; Itoh, 2017).

Eutektiniai tirpikliai (angl. *deep eutectic solvents (DES)*) – tai tirpikliai, kurie yra sudaryti iš medžiagų, sudarančių eutektinę sistemą – mišinio lydymosi temperatūra yra žemesnė, negu ją sudarančių medžiagų lydymosi temperatūra (1.6 pav.). Tokios sistemos pavyzdys galėtų būti cholino chlorido ($T_{lyd.} = 302\text{ }^{\circ}\text{C}$) ir karbamido ($T_{lyd.} = 133\text{ }^{\circ}\text{C}$) mišinys. Šių medžiagų mišinio (moliniu santykiu 1:2) $T_{lyd.} = 12\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Hansen et al., 2021). Viena medžiaga, sudaranti šį mišinį tarnauja kaip vandenilio jonų donoras, kita – kaip akceptorius. Paprastai naudojama ketvirtinio amonio druska ir alkoholiai, amidai, karboksirūgšys, arba polioliai (Tan ir Dou, 2020). Jeigu abi medžiagos yra natūralūs pirminiai metabolitai (cukrai, aminorūgštys, cholina, alkoholiai, organinės rūgštys), toks tirpiklis vadinamas natūraliu eutektiniu tirpikliu (angl. *natural deep eutectic solvent (NADES)*).



1.6 pav. Natūralių eutektinių tirpiklių pavyzdžiai. 1 – sacharozė; 2 – fruktozė; 3 -gliukozė; 4 – obuolių rūgštis; 5 – sacharozė:fruktozė:gliukozė (molinis santykis 1:1:1); 6 – sacharozė:obuolių rūgštis (molinis santykis 1:1), pagal (Choi et al., 2011)

Eutektinės sistemos yra svarbios gyvų organizmų metabolizmui ir gali būti kuriamos iš gamtoje sintetinamų organinių medžiagų (Choi et al., 2011). Lyginant su joniniais skysčiais eutektiniai tirpikliai pasižymi mažesniu toksiškumu, biodegradabilumu, lengvesniu paruošimu, mažesne gamybos

kaina ir lengvesniu prieinamumu (Tan ir Dou, 2020; Hansen et al., 2021). Šiai dienai yra parodyta sėkminga butil-acetato sintezė naudojant *C. antarctica* lipazę B ir eutektinių tirpiklių sistemą (Cvjetko Bubalo et al., 2015; Tan ir Dou, 2020), eutektinių tirpiklių sistema panaudota fermentinei cukraus esterių sintezei taikant *C. rugosa* lipazę arba kiaulių kasos lipazę (Noro et al., 2023), taip pat cholino chlorido:etileno glikolio sistemoje *Burkholderia cepacia* lipazė pasižymėjo aukščiausiu hidroliziniu aktyvumu skaidant *p*-NP palmitatą (Juneidi et al., 2017). Įvairių lipolizinių fermentų testavimas reakcijas vykdamas tokioje aplinkoje – viena iš naujausių lipolizinių fermentų tyrimo sričių.

1.4.2 Substratinis įvairumas

Substratinis įvairumas – tai fermento gebėjimas skaidyti skirtingus substratus. Kai kurie fermentai natūraliai pasižymi plačiu atpažįstamų substratų spektru, kiti fermentai skaido tik labai specifinius substratus. Lipoliziniai fermentai pasižymi plačiu hidrolizuojamų ar sintetinių esterinių junginių spektru ir dažnai yra naudojami enantiomerų atskyrimui raceminiuose mišiniuose. Teikiama pirmenybė skirtingam substratui gali priklausyti tiek nuo riebalų rūgšties, tiek ir nuo alkoholio grupės (Kapoor ir Gupta, 2012). *Aspergillus flavus* lipazė teikia pirmenybę trikaprinui labiau nei trioleinui (Long et al., 1998); *C. rugosa* ir *Rhizomucor miehei* lipazės teikia pirmenybę oleino rūgščiai nei jos trans-izomerui – elaidinei rūgščiai; tuo tarpu *C. antarctica* lipazė pirmenybę kaip tik teikia elaidinei rūgščiai, o ne oleino rūgščiai (Borgdorf ir Warwel, 1999). Lipoliziniai fermentai gali pasižymėti atrankumu esterinio ryšio pozicijai (regioatrankumas), substratui, arba stereoizomerizacijai.

Regioatrankumas nurodo, jog fermentas katalizuos atitinkamą reakciją prie tam tikros, specifinės grupės. Pavyzdžiui lipazės, pagal trigliceridų hidrolizę, gali būti skirstomos į: nespecifines (skaido triglicerido grupes nepriklausomai nuo jo pozicijos, mono- ir digliceridai yra formuojami tik kaip tarpiniai produktai, tačiau jų skaidymas vyksta greičiau negu nesuskaidytų trigliceridų); 1,3-specifines lipazes (skaido šonines triglicerido esterines jungtis, susidaro 1,2- ir 2,3-digliceridai bei 2-monogliceridai) ir riebalų rūgštims specifines (lipazės, kurios hidrolizuoja substratus, kurių riebalų rūgštys turi dvigubą jungtį tarp C-9 ir C-10 anglies atomų) (Kapoor ir Gupta, 2012).

1.4.3 Reakcijos įvairumas

Reakcijos įvairumas – fermento gebėjimas katalizuoti daugiau negu vieno tipo cheminę transformaciją. Tokios transformacijos laikytinos skirtingomis, jeigu skeliami (arba sudaromi) kitokie cheminiai ryšiai bei reakcijos pereinamosios stadijos yra skirtingos (Hult ir Berglund, 2007; Kazlauskas, 2005). Vienas iš tokių pavyzdžių – modifikuotos *C. antarctica* lipazės B (CALB) panaudojimas aldolių sintezėje (Branneby et al., 2003; Patti ir Sanfilippo, 2022). Be šios reakcijos lipazės taip pat gali dalyvauti vykdant ir kitus virsmus:

a) Hantzsch-tipo reakcijoje (angl. *Hantzsch-type reaction*) – piridinių sintezės reakcijoje naudojant aldehidą, 1,3-dikarbonil junginius ir acetamidą pavyko gauti 1,4-dihidropiridiną (Wang et al., 2011);

b) Cannizzaro reakcijoje (angl. *Cannizzaro reaction*) – aldehidų redukcijoje iki karboksirūgščių ir pirminių alkoholių (*p*-nitrobenzaldehydas buvo paverstas į *p*-nitrobenzil alkoholį ir *p*-nitrobenzoinę rūgštį) (Arora et al., 2014b);

c) Mannich reakcijose (angl. *Mannich reaction*) – rūgštinio protono, esančio netoli karbonilo grupės, aminoalkilinimas (ketonas, aldehidai ir aminos buvo panaudoti kartu su *Mucor miehei* lipaze sintetinant β-amino ketonus) (Li et al., 2009);

d) Morita-Baylis-Hillman reakcija (angl. *Morita-Baylis-Hillman reaction*) – anglis-anglis ryšio sukūrimas tarp alkeno α pozicijos ir elektrofilo (pvz.: aldehido) (Reetz et al., 2007; Tian et al., 2016);

e) Knoevenagel kondensacija (angl. *Knoevenagel condensation*) – nukleofilinis aktyvuoto vandenilį turinčio junginio prijungimas prie aldehido arba ketono, suformuojant nesočiuosius junginius (Lai et al., 2010);

f) Michaelio pridėjimo reakcija (angl. *Michael addition reaction*) – ryšio tarp anglies atomų sukūrimas tarp anglies nukleofilo ir α,β-nesočiojo karbonilo (CALB gali katalizuoti 1,4-benzoksazinono darinių sintezę, naudojant chalkoną) (Bavandi et al., 2022));

g) oksidacijos reakcijose (Dwivedee et al., 2018).

Taip pat buvo vertinta, ar lipoliziniai fermentai gali atlikti daugiakomponentę Ugi reakciją (angl. *Ugi reaction*). Išskiriama 4 komponentų Ugi reakcija: jos metu iš pirminio amino, karbonilo, izocianido ir karboksirūgšties suformuojamas α-acilamino amidas. Kitas reakcijos tipas yra trikomponentė Ugi reakcija, kurios metu iš aldehido, izocianido ir pirminio amino susiformuoja α-amino amidai. Nors buvo kilę abejonių, ar lipoliziniai fermentai atlieka Ugi reakciją dėl reakcijos įvairumo, ar tiesiog vykdo susidarancio esterio hidrolizės reakciją (Evitt ir Bornscheuer, 2011),

Wilk et al. nustatė, jog šias reakcijas gali atlikti lipoliziniai fermentai, o taip pat, jog naudojamas izocianoesteris nulemia, kokia reakcija bus vykdoma (Wilk et al., 2019). Nors platus vykdomų reakcijų spektras pradžioje buvo laikomas neigiama fermentų ypatybe – nepageidaujamas šalutinis poveikis, prastas katalizinis efektyvumas ir klaidos, atliekant biologines funkcijas, ilgainiui ši fermentų savybė tapo matoma, kaip reikšmingai pagerinanti fermentų panaudojimo galimybes pramonėje (Arora et al., 2014a). Parodyta, kad lipazės gali būti vieni svarbiausių biokatalizatorių tokioms naujoms reakcijoms vykdyti (Angajala et al., 2016).

1.5 Lipolizinių fermentų pramoninis ir mokslinis pritaikymas

Dėka plataus substratų spektro, regio ir stereo- atrankumo, efektyvaus veikimo organiniuose tirpikliuose ir vykdomų reakcijų įvairovės lipoliziniai fermentai yra plačiai taikomi pramonėje.

Pramoninis odos apdirbimas yra sudėtingas ir didelę ekologinę taršą sukkeliantis procesas. Šis procesas gali būti išskaidytas į odos paruošimą rauginimui, rauginimą ir apdirbimo etapus po rauginimo (Ben Rejeb et al., 2022). Odos apdirbimo metu naudojama daug cheminių junginių, paviršiaus aktyviųjų medžiagų ir organinių tirpiklių, ypač pirmojo, paruošiamojo, etapo metu. Jo metu sugeneruojama 80-90 % visų odos apdirbimo metu gaunamų atliekų (Saran et al., 2013; Sujitha et al., 2018). Nors šį etapą sudaro keletas žingsnių, svarbiausi iš jų yra plaukų/kailio/šerių ir riebalų pašalinimas (Ben Rejeb et al., 2022). Riebalų pašalinimas nėra taikomas visų tipų odai apdirbti (pvz.: galvijų), tačiau tam tikrų gyvulių odos (pvz. avių) 30-40 % sauso svorio gali sudaryti riebalai. Šių riebalų pašalinimas yra būtinas, norint gauti tinkamos kokybės galutinį produktą (Ben Rejeb et al., 2022). Lipoliziniai fermentai leidžia efektyviai ir ekologiškai išvalyti riebalingą odą ir sumažinti odos pramonės sukeltą taršą (Saran et al., 2013; Ben Rejeb et al., 2022). Saran ir kt. optimizavo *B. subtilis* lipazės sintezę 300 litrų bioreaktoriuje, siekiant ją pritaikyti odos riebalų pašalinimui. Gauti rezultatai parodė, jog gautas 5-10 % (w/v) lipazės preparatas gali pilnai pašalinti odos riebalus per 8-12 val. nenaudojant papildomų cheminių medžiagų, taip pat sumažino biologinio ir cheminio deguonies poreikį (Saran et al., 2013).

Tekstilės pramonėje lipoliziniai fermentai gali būti naudojami, norint pašalinti riebalus, apsaugines medžiagas, kuriomis gali būti padengiamos verpiamos medžiagos arba biologiniam vilnos paruošimui – šveitimui (angl. *scouring*) (Nerurkar et al., 2015; Taleb et al., 2022; Ali et al., 2023). Tiek vilna, tiek medvilnė gali būti padengtos įvairiais lipidais ar vaškais, kurie turi

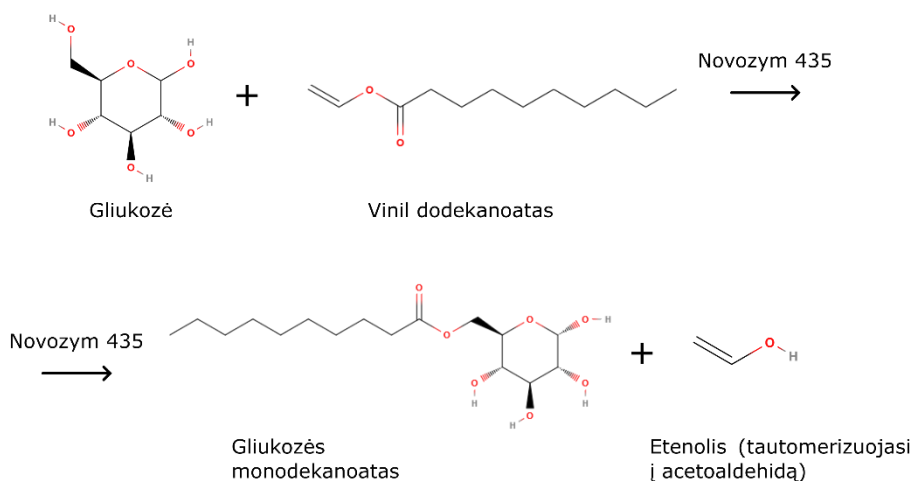
būti pašalinti, norint padidinti audino hidrofiliškumą, svarbų tolimesniuose apdirbimo procesuose (pvz.: dažyme) (Nerurkar et al., 2015; Taleb et al., 2022). Vilnos šveitimas taip pat leidžia pasiekti įvairias baltymų funkcines grupes, o tai leidžia kovalentiškai prijungti funkcines molekules, ar nanodaleles ir suteikti audiniui naujų savybių (Taleb et al., 2022). Šveitimas gali būti atliekamas naudojant šarmus (pvz.: sodos pelenus, koncentruotą natrio hidroksidą, paviršiaus aktyvius medžiagas, chelatorius), taip pat procesui reikalinga aukšta temperatūra. Tokios sąlygos padaro odos perdirbimo procesą labiau taršų, ypač vandens ekosistemoms (Nerurkar et al., 2015). Fermentinių procesų naudojimas ne tik sumažina šarminių junginių ir aukštos temperatūros poreikį, bet ir audinių pažeidimą apdirbimo metu (Ali et al., 2023). Taleb ir kt. panaudojo ant sericino (šilko baltymo) imobilizuotas *Bacillus aryabhatai* termofilines lipazes vilnos šveitimui ir nustatė, jog toks vilnos paruošimas ją padaro giminingesnę katijoniniams, anijoniniams ar reaktyviems dažams lyginant su įprastais metodais šveista vilna (Taleb et al., 2022).

Lipoliziniai fermentai (lipazės ir sterolių esterazės) yra svarbūs popieriaus pramonėje. Medienos apdirbimo metu natūralios, netirpios augalo dervos, sudarytos daugiausiai iš vašku ir trigliceridų turi būti pašalinamos (Ali et al., 2023). „Jujo paper Co.“ popieriaus kompanija (vėliau pervadinta „Nippon Paper“) sukūrė fermentinį metodą šių dervų pašalinimui, kuris vėliau buvo pradėtas naudoti plačiu mastu (Hata et al., 1996; Kumar et al., 2020; Ali et al., 2023). Dervų pašalinimui naudojami fermentų mišiniai, į kuriuos įeina lipazės, lakazės, lipooksigenazės ir sterolių esterazės (Kumar et al., 2020). Šių dervų pašalinimas yra svarbus, kadangi jų likučiai gali kenkti galutinei popieriaus kokybei ir popieriaus gamybos arba perdirbimo staklėms. Taip pat kai kurie rašalai gali būti augalinių aliejų kilmės, kuriuos perdirbimo metu gali suskaidyti lipoliziniai fermentai (Ramnath et al., 2016). Zhang ir kt. nustatė, jog kombinuojant amilazę, pektinazę ir *Thermus thermophilus* esterazę galima pašalinti iki 76,5 % lipnių medžiagų ir gauti geresnės kokybės popieriaus masę (Zhang et al., 2017).

Lipoliziniai fermentai gali būti naudojami kaip priedai detergentų produktuose (Bajpai ir Tyagi, 2007; Ali et al., 2023). Lyginant su sintetiniais detergentais tokie produktai pasižymi aktyvumu žemesnėse temperatūrose, yra draugiškesni aplinkai, gali būti naudojami pakartotinai (Ali et al., 2023). Lipoliziniai fermentai gali būti atsparūs organiniams tirpikliams arba paviršiaus aktyviosioms medžiagoms, kurios dažnai randamos detergentų sudėtyje (Ali et al., 2023). Žemose temperatūrose veikiantys fermentai gali būti naudojami, siekiant sumažinti skalbimo kainą, kartu sumažinant ir pažeidimus padaromas audiniams skalbiant juos aukštesnėse temperatūrose.

Tokie produktai taip pat gali pasitarnauti, siekiant sumažinti klimato kaitą, kadangi kartu galima sumažinti ir energetinius plovimo kaštus (Sahay ir Chouhan, 2018).

Biosurfaktantai – tai tvarūs, bekvapiai, beskoniai ir netoksiški junginiai, galintys tarnauti kaip paviršiaus aktyviosios medžiagos (Hollenbach et al., 2022). Didelis dėmesys teikiamas glikolipidams (dar vadinamiems cukraus esteriams) – biosurfaktantams, sudarytiems iš mono-, di- arba oligosacharidų hidrofiliinės galvutės ir vienos ar kelių alkil grandinių (Hollenbach et al., 2022). Šios funkcinės grupės sujungiamos esteriniais ryšiais, kurių suformavimą gali atlikti lipoliziniai fermentai, taip sumažinant produkcijos kaštus ir gamybos proceso daromą įtaką aplinkai (1.7 pav.).



1.7 pav. Gliukozės monodekanoato gamybos schema. Sukurta remiantis (Hollenbach et al., 2022).

Glikolipidai yra biodegradabilūs, nesikaupia aplinkoje ir nedaro žalos gamtai, taip pat pasižymi geromis savybėmis: efektyviai sumažina paviršiaus įtempimą, pasižymi maža kritine micelių koncentracija, gerai stabilizuoja putas (Hollenbach et al., 2022). Kai kurie iš šių junginių pasižymi ir bioaktyviomis savybėmis: mažina tinimą, gerina žaizdų gijimą žiurkių modelinėse sistemose, slopina bioplėvelių formavimąsi, gali veikti prieš tam tikrus virusinius, grybelinius biologinius veiksnius, ar net auglius (Hollenbach et al., 2022). Taikant fermentus gali būti atliekama efektyvi, pigi ir aplinkai draugiška glikolipidų sintezė.

Lipolizinais fermentais susidomėta dėl jų tribologinio panaudojimo (tribologija – tai mokslas apie trintį, susidėvėjimą ir mechaninių procesų sutepimą (lubrikavimą)) (Monteiro et al., 2023). Trinties mažinimui pramonėje ilgą laiką naudojami mineraliniai aliejai daugiausiai yra gaunami

naftos apdirbimo metu. Tokie produktai pasižymi toksiškumu žmogui ir yra kenksmingi aplinkai (Monteiro et al., 2023). Biolubrikantas – tai bet kokia biologiškai skaidi medžiaga, kuri gali sumažinti mechaninę trintį (Cecilia et al., 2020). Pramonei tinkamus biolubrikantus galima gauti modifikuojant jau naudojamus augalinius aliejus (arba siekiant sumažinti gamybos kaštus – jų atliekas), atliekant esterinimo arba peresterinimo reakcijas, epoksidavimą, hidrogenavimą ar estolidų formavimą (Cecilia et al., 2020; Monteiro et al., 2023). Kleinaitė ir kt. atliko sėkmingą biolubrikanto (2-etil-1-heksil oleato) sintezę atliekant biodyzelio peresterinimą (Kleinaitė et al., 2014).

Kita svarbi lipolizinių fermentų panaudojimo sintezei sritis yra biodyzelio gamyba. Biodyzelis – tai kuras, sudarytas iš riebalų rūgščių esterių, tinkamas dyzelinio variklio darbui. Ši medžiaga yra vienas pagrindinių alternatyvaus kuro šaltinių, siekiant sumažinti priklausomybę nuo iškastinio kuro (Borrelli ir Trono, 2015). Šiuo metu beveik visas biodyzelis yra gaminamas vykdant šarminių medžiagų katalize parentą esterinimą. Nors proceso išeiga yra gera, procesas yra ribojamas substratinės priklausomybės (substratas negali turėti vandens, fosfatidų ar laisvųjų riebalų rūgščių), susidarantių priemaišų (muilų) ir nuotekų valymo (Borrelli ir Trono, 2015). Didelis lipolizinių fermentų aktyvumas, trumpas reakcijos laikas, mažesnis slopinimas dėl susidariusių produktų, gebėjimas atlikti tiek triacilglicerolių, tiek laisvų riebalų rūgščių esterinimą, temperatūrinis stabilumas ir lengvas katalizatoriaus pašalinimas (taikant imobilizavimą) leistų padidinti šio proceso efektyvumą (Borrelli ir Trono, 2015; Ali et al., 2023). He ir kt. nustatė, jog *Yarrowia lipolytica* lipazė 2 gali efektyviai vykdyti biodyzelio (metilo esterio sintezę iš sojų pupelių aliejaus) gamybą (iki 97,9 % išeigos) reakcijos mišinį papildant cholino chlorido ir gliukozės eutektiniu tirpalu (He et al., 2022).

1.6 Poliesteriai ir jų skaidymas taikant lipolizinius fermentus

Nauja, šiuo metu plačiai tiriama lipolizinių fermentų pritaikymo sritis yra poliesterių skaidymas. Poliesteriai – tai polimerai, kurių monomerai sujungti esterine jungtimi, nors šis terminas kartais naudojamas kalbant išskirtinai apie polietileno tereftalatą (PET), ypač tekstilės gaminių kontekste (Tournier et al., 2023; Williams et al., 2023). Pagrindiniai pramonėje naudojami poliesteriai yra: PET, polibutileno tereftalatas (PBT) ir polilaktinė rūgštis (PLA) (Williams et al., 2023). Kiti pramonėje taikomi poliesteriai: politrimetileno tereftalatas (PTT), PCL, polietileno naftalatas (PEN), polibutileno adipato tereftalatas (PBAT), polibutileno sukcinatas (PBS), poliglikolinė rūgštis (PGA), polihidroksialkanoatai (PHA) (Williams et al., 2023). Poliesteriai sudaro reikšmingą dalį visų pagaminamų plastikų – 2021 metais PET sudarė

18 % visų pagamintų plastikų (maždaug 98 milijonų tonų) (Tournier et al., 2023). Toks platus panaudojamas yra sąlygojamas naudingų šio plastiko savybių: modulinio mechaninio tvirtumo (gali būti standus arba pusiau standus), atsparumo smūgiams, mažu laidumu skysčiams ar dujoms, lengvumo (Biundo et al., 2018; Tournier et al., 2023). Vis dėlto dėl didelio patvarumo ir mažo bioskaidumo plastikai ilgai išlieka biosferoje ir tapo viena didžiausių modernaus pasaulio problemų (Geyer et al., 2017; Williams et al., 2023). Manoma, kad apie du trečdaliai visų plastiko atliekų patenka į sąvartynus ir mus supančią aplinką (Williams et al., 2023). Dėl šių priežasčių didelis dėmesys skiriamas naujų bioskaidžių plastikų kūrimui ir esamų plastiko atliekų utilizavimui (Tournier et al., 2023).

Dėl turimos esterinės jungties poliesteriniai plastikai laikomi lengviau skaidomais, o kai kurie (PCL, PLA, PHA) net priskiriami bioskaidiems, kompostuojamiems plastikams (Mouhoubi et al., 2022). Nepaisant to, gamtoje šie plastikai gali irti ilgiau negu numatyta tokioje klasifikacijoje, o kai kuriais atvejais net neirti. Bagheri ir kt. atliko tyrimą, kurio metu tyrė skirtingų bioskaidžių plastikų yrimą laboratorinėmis sąlygomis, ir nustatė, jog jūros ar gėlo vandens paviršiuje esančio PLA, PCL ir PHA masė reikšmingai nesumažėjo (Bagheri et al., 2017). 2021 metų Europos komisijos vyriausių mokslinių patarėjų grupės ataskaitoje taip pat minima rekomendacija įvardinti biodegradabilumą kaip sisteminę savybę – t.y ne tik savybę, susijusią su medžiaga, bet ir su aplinkos sąlygomis, užtikrinančiomis plastiko skaidumą (Directorate-General for Research and Innovation (European Commission), 2020). Didelis dėmesys bioskaidiems polimerams skiriamas ne tik dėl mažesnio jų toksiškumo aplinkai, bet ir dėl paprastesnio jų atliekų utilizavimo, skaidant esterines jungtis (Lai et al., 2023).

PCL yra vienas pirmųjų dirbtinių polimerų, pirmą kartą susintetintas 1934 metais (Natta et al., 1934; Woodruff ir Hutmacher, 2010). Tai hidrofobiškas, dalinai kristališkas polimeras, pasižymintis žema stiklėjimo (nuo -65 – -60 °C) ir lydymosi (55-60 °C) temperatūromis (Baptista et al., 2020). Viena istoriškai svarbiausių PCL taikymo sričių – vaistų pristatymo sistemos, kurios remiasi šio polimero biologiniu suderinamumu ir galimybėmis pritaikyti jo degradacijos kinetiką, lengvą formavimą, norimo dydžio porų formavimą ir kontroliuojamą vaistų išskyrimą į matriksą. Nepaisant šių pranašumų, dėl lėtos degradacijos, šis polimeras gana greitai buvo pakeistas kitomis alternatyvomis (daugiausiai polilaktidais ir poliglikolidais) (Woodruff ir Hutmacher, 2010). Nors PCL kurį laiką buvo primirštas, pastaruoju metu didelis dėmesys skiriamas PCL naudojimui audinių karkasuose (Backes et al., 2022). PCL taip pat gali būti naudojamas kaip kopolimeras ir maišomas su PLA, norint gauti dideliu tvirtumu pasižyminčias medžiagas. Taip pat jis gali

kuriame tyrė, kaip 11 komercinių lipazių (dvi komercinės lipazės sintetinės *Pseudomonas* genties atstovų; *Rhizopus niveus* bei *Rhizopus oryzae* lipazė F-AP 15; *C. antarctica* lipazė, išskirta iš rekombinantinių *Aspergillus oryzae*; *Candida* sp. lipazė NZ CALB L išskirta iš rekombinantinių *A. niger*; *C. rugosa* VII tipo lipazė; *Candida cylindracea* lipazė; šerno kasos lipazė; *Alcaligenes* sp. lipazė QML), 1 kutinazė (kutinazė NZ 51032) ir 1 proteazė (*Tritirachium album* sintetinama proteinazė K) veikia skirtingus biodegradabilius plastikus (tarp jų ir PCL). Gauti rezultatai parodė, jog tik dalis lipazių galėjo efektyviai skaidyti PCL (abi *Pseudomonas* lipazės, *C. antarctica* lipazė, *Candida* sp. lipazė ir *Alcaligenes* sp. lipazė, bei kutinazė galėjo efektyviai suskaidyti PCL plėveles). Įdomu tai, jog šios lipazės efektyviai skaidė tik vienos rūšies vidutinės molekulinės masės (Mn_{50000}) PCL. Tuo tarpu *Candida* ir *Alcaligenes* sp. lipazės bei kutinazė galėjo efektyviai skaidyti didesnės molekulinės masės (Mn_{80000}) PCL (Rosato et al., 2022). Skaidant mažesnės molekulinės masės (Mn_{10000}) PCL, naudojant *A. niger* lipazę, nustatyta, jog grynintas natyvus fermentas veikia geriau (suskaido ~75 % PCL emulsijos per 72 val.) lyginant su rekombinantiniu fermento variantu (suskaido ~25 % PCL emulsijos per 72 val.) (Nakajima-Kambe et al., 2012). Ma su kolegomis taip pat tyrė *C. antarctica* lipazę B ir nustatė, jog fermentas gali suskaidyti 80 % PCL plėvelės, nepriklausomai nuo vidutinės molekulinės PCL masės (Ma et al., 2020).

Lipazės ir esterazės taip pat gali skaidyti ir kitus anksčiau minėtus poliesterius. Poliuretanai – polimerai, sintetiniai iš poliesterinių ar polieterinių poliolių, plačiai naudojami parolono, izoliacinių medžiagų, tekstilės dangalų ar antikoroziųjų dažų gamyboje (Danso et al., 2019). Vieni pirmųjų fermentų galinčių skaidyti poliuretaną – *Pseudomonas chlororaphis* lipazė pueB (Howard et al., 2001) ir *P. fluorescens* proteazė (Howard ir Blake, 1998). Vėliau atrasta bakterija *Comamonas acidovorans* TB-35, galinti naudoti poliuretaną kaip vienintelį anglies šaltinį. Nustatyta, jog šios bakterijos sintetina dvi esterazes: viduląstelinę ir sekretuojamą, iš kurių būtent viduląstelinė esterazė gali skaidyti poliesterinį poliuretaną (Akutsu et al., 1998). *C. rugosa* lipazė taip pat identifikuota, kaip galinti efektyviai hidrolizuoti poliesterinį poliuretaną. Tyrėjai pritaikę matematinį modelį heterogeninei reakcijai tarp netirpių poliuretano dalelių ir fermento nustatė, jog reakciją kontroliuoja fermento rišimasis prie poliuretano paviršiaus (Gautam et al., 2007). Nepaisant šių pasiekimų, kol kas visi rasti fermentai gali skaidyti tik poliesterinį poliuretaną; polieterinį poliuretaną skaidančių fermentų nėra rasta (Danso et al., 2019).

Plačiausiai šiuo metu tiriami, ieškomi ir tobulinami fermentai, galintys skaidyti sintetinį poliesterį – PET (Danso et al., 2019). Pirmieji PET

modifikuojantys fermentai analizuoti jau prieš 20 metų (Alisch et al., 2004; Müller et al., 2005; Arnal et al., 2023); vėliau Stefan Liebminger ir kt. išskyrė *Penicillium citrum* poliesterazę (Liebminger et al., 2007). Įvertinus šios poliesteražės aktyvumą nustatyta, jog fermentas gali skaidyti PET, tačiau tik į tarpinius junginius: bis-(2-hidroksietil) tereftalatą (BHET) ir mono-(2-hidroksietil) tereftalatą (MHET) (Liebminger et al., 2007). Åsa M. Ronkvist ir kt. analizavo *Humicola insolens*, *Pseudomonas mendocina* ir *Fusarium solani* kutinazes ir nustatė, jog *H. insolens* kutinazė pasižymi geriausia mažo kristališkumo PET hidrolize (Ronkvist et al., 2009). Anita Eberl ir kt. analizavo *Thermomyces lanuginosus* lipazės ir *Thermobifida fusca* bei *Fusarium solani* kutinazių gebėjimą skaidyti PET atitikmenį – bis(benzoiloksietil) tereftalatą (3PET) ir PET audinio pluoštus ir nustatė, kad nejoninis detergentas tritonas X-100 padidina *T. lanuginosus* lipazės aktyvumą ir sukuria daugiau poliesterių degradacijos fragmentų lyginant su kutinazėmis (Eberl et al., 2009). Enrique Herrero Acero ir kt. palygino dvi *Thermobifida cellulositytica* ir vieną *T. fusca* kutinazes ir nustatė, jog, nors šios kutinazės ir pasižymi labai dideliu aminorūgščių sekų panašumu, jų aktyvumas skaidant PET labai skiriasi (Herrero Acero et al., 2011).

Galima teigti, jog vienas svarbiausių proveržių šioje tyrimų srityje buvo bakterijos *Ideonella sakaiensis* – mikroorganizmo, hidrolizuojančio ir įsisavinančio PET, atradimas (Yoshida et al., 2016). Šios bakterijos geba prisitvirtinti prie PET plėvelės ir fermentiniu būdu suskaidyti ją iki PET sudedamųjų dalių – tereftalio rūgšties ir etileno glikolio (tarpinio PET skaidymo produkto MHET nustatyti tik nedideli kiekiai). Atlikus genomo analizę rastas vienas atviro skaitymo rėmelis ir susintetinta rekombinantinė PET skaidanti hidrolazė (Yoshida et al., 2016). Remiantis fermento dideliu gimingumu plastikui, jis pavadintas polietileno tereftalato hidrolaze – PET-aze, o Tarptautinė biotechnologijos ir molekulinės biologijos draugija (angl. *International Union of Biochemistry and Molecular biology (IUBMB)*) priskyrė fermentų komisijos numerį: EC 3.1.1.101. Tų pačių tyrimų metu išskirtas ir kitas fermentas, kuris skaido etileno tereftalatą į tereftalio rūgštį ir etilenglikolį, kuris pavadintas MHET-aze (EC 3.1.1.102). Taikant baltymų inžinerijos strategijas PETazės yra toliau tobulinamos – viena tobulinta *Ideonella sakaiensis* PETazės charakteristika – termostabilumas, kadangi PET skaidymas geriausiai vyksta aukštesnėje temperatūroje, ties PET stiklėjimo temperatūros (69 – 81 °C) (Arnal et al., 2023). Tokie pavyzdžiai: FAST-PETase (Bell et al., 2022) arba HotPETase (Lu et al., 2022), sukurti veikti aukštesnėse temperatūrose.

Lipazės taip pat gali būti naudojamos PET hidrolizėje, tačiau gerokai mažesniu pajėgumu. Carniel ir kolegos įvertino sinergistinį *C. antarctica*

lipazės B ir *Humicola insolens* kutinazės veikimą. Pastaroji kutinazė galėjo hidrolizuoti PET iki tereftalio rūgštis – galutinio skaidymo produkto, tačiau reakciją ribojantis žingsnis yra BHET suskaidymas iki tereftalio rūgštis. Taikant abu fermentus gautas sinergistinis poveikis ir 7,7 karto padidėjęs PET vertimas į tereftalio rūgštį (Carniel et al., 2017). Taip pat yra pavykę į PET panašius vandenyje tirpius ftalato rūgštis esterius suskaidyti naudojant *Pseudomonas* lipazes. Autoriai siekė nustatyti, ar vandens valymo įrenginiuose esantys mikroorganizmai galėtų pasižymėti gebėjimu skaidyti tirpius poliesterius. Susintetinti skirtingos sandaros ir molekulinės masės ftalato rūgštis esteriai buvo testuoti naudojant skirtingus *Pseudomonas* genties bakterijų išskiriamus fermentus, tarp jų ir *P. pelagia* lipazę (Haernvall et al., 2017). Karboksilesterazės taip pat gali būti taikomos PET hidrolizėje, tačiau dažniausiai tik trumpų jų fragmentų degradacijai. *T. fusca* KW3 kamieno sintetinama karboksilesterazė buvo sėkmingai panaudota PET trimerų skaidymui, nors pagrindinis produktas buvo 1,2-etilen-mono-tereftalatas-mono (2-hidroksietil tereftalatas) (Billig et al., 2010).

2. METODIKA

2.1 Darbe naudotos medžiagos, reagentai

Acetonitrilas, *para*-nitrofenolis, *p*-nitrophenil (*p*-NP) acetatas, *p*-NP butiratas, *p*-NP heksanoatas, *p*-NP oktanoatas, *p*-NP dodekanoatas, *p*-NP miristratas, *p*-NP palmitatas ir *p*-NP steratas, polikaprolaktonas (Mn₄₅₀₀₀), polikaprolaktonas (Mn₈₀₀₀₀), skruzdžių rūgštis ir vinilo lauratas, įsigyti iš Sigma-Aldrich, Vokietija.

Agarozė, baltymų molekulinės masės žymuo Pierce™ Unstained Protein MW Marker, PageBlue™ baltymų dažas, SnakeSkin (3500 MWCO) dializės membrana, tributirinas buvo įsigyti iš Thermo Fisher Scientific, JAV.

DreamTaq DNR polimerazė; CloneJET PGR klonavimo rinkinys; DNR masės žymuo GeneRuler™ 1kb DNA ladder; InsTAclone PGR produkto klonavimo rinkinys; PGR gryninimo rinkinys GeneJET PCR Purification Kit; DNR fragmentų išskyrimo iš gelio rinkinys GeneJET Gel Extraction kit; Phusion High-Fidelity DNR polimerazė; plazmidžių išskyrimo rinkinys GeneJET Plasmid Miniprep Kit; restrikcijos endonukleazės FastDigest NdeI ir FastDigest Sall; ir kiti reagentai reikalingi genų klonavimo eksperimentams buvo įsigyti iš Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva.

Akrilamido ir Bis-akrilamino (santykis 29:1) tirpalas, tetrametiletilendiaminas (TEMED) įsigytas iš Bio-Rad, JAV;

6-hidroksiheksoninė rūgštis (6-HHA) įsigyta iš BLD Pharmatech Ltd, Kinija.

Baltymų sintezei indukuoti naudotas pieno permeatas MPP85 buvo gautas iš BaltMilk (Įmonė „Pienas LT“, Kaunas, Lietuva).

2-amino-2-(hidroksimetil)propan-1,3-diolis (TRIS), agar-agaras, ampicilino natrio druska, butanolis (99 %), dimetil sulfoksidas (DMSO), druskos rūgštis (37 %), etanolis (99 %), etidžio bromidas, glicinas, imidazolas, izopropanolis (99 %), metanolis (99 %), mielių ekstraktas, NaCl, peptonas, ROTI®Garose-His/Ni baltymų gryninimo derva; ir visi kiti reagentai ir cheminės medžiagos buvo įsigytos iš Carl Roth GmbH & Co. Kg, Vokietija, nebent nurodyta kitaip.

2.2 Darbe naudotos rekombinantinės plazmidės, bakterijų kamienai, kultivavimo sąlygos

Rekombinantinės plazmidės pET-21c(+) su *Geobacillus* sp. 95 kamieno koduojamais modifikuotos lipazės GD-95RM (Druteika et al., 2020), esterazės GDEst-95 (GeneBank numeris: KX013768.1) arba sulieto baltymo

(GDEst-lip) (Gudiukaite et al., 2017) genais buvo sukurtos ankstesnių darbų metu.

Darbe naudoti bakterijų kamienai:

Escherichia coli DH5 α : ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 phoA supE44 gyrA96 λ -thi-1 relA1 (Thermo Fisher Scientific, JAV);

E. coli BL21 (DE3): hsdD gal (λ cIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV-T7 genas 1 (Thermo Fisher Scientific, JAV).

Darbe naudotos kultivavimo sąlygos:

Visi darbe naudoti mikroorganizmai kultivuoti Lizogeninio buljono (LB) terpėje (Bertani, 1951). Terpė sudaryta iš: 1 % peptono; 0,5 % mielių ekstrakto; 0,5 % NaCl. Terpės sterilintos autoklavuojant: 121 °C, 1 atm, 20 min. Po autoklavavimo terpės papildytos ampicilinu (galutinė koncentracija 100 μ g/mL). Gaminant agarizuotą terpę, ji prieš autoklavavimą papildoma 1,5 % agaro; po autoklavavimo terpė išpilstoma į sterilias Petri lėkštėles. Rekombinantinių mikroorganizmų kolonijų atrankai agarizuota terpė papildyta emulguotu tributirinu arba vinilo lauratu (galutinė atitinkamos medžiagos koncentracija 1 % (v/v)).

Darbe naudoti vektoriai:

Tiesioginiam PGR produktų klonavimui naudoti klonavimo vektoriai pJET1.2/blunt (iš CloneJET PGR klonavimo rinkinio) ir pTZ57R/T (iš InsTAclone PGR klonavimo rinkinio).

Tikslinio baltymo sintezei genai įsiuti į pET-21c(+) vektorių (Novagen).

2.3 Darbe naudoti pradmenys

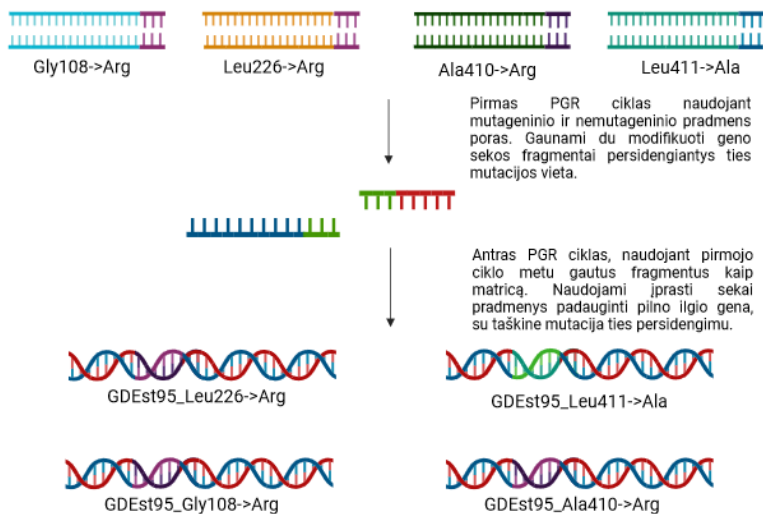
Visi darbe naudoti pradmenys susintetinti Metabion (Vokietija) ir pateikti 2.1 lentelėje.

2.1 lentelė. Darbe naudoti pradmenys. Raudona spalva žymi nukleotidų pakaitus. Mėlyna spalva žymi sekas, kerpamas nurodytomis restrikcijos endonukleazėmis.

Pradmenis pavadinimas	Nukleotidų seka	T _m (°C)	Restrikcijos endonukleazė
GESTp-31F	5'-GGG ATA AAG CAT ATG GAA CAA ACC GAT GTT G-3'	65,7	<i>NdeI</i>
GESTp-23R	5'-TAG TCG ACG CGT CCT TGC CAT GC-3'	68,7	<i>SalI</i>
Gly108ArgF	5'-ATT CAT GGC CGC GCC TTT TTG -3'	67,8	-
Gly108ArgR	5'-CAA AAA GGC GCG GCC ATG AAT -3'	67,8	-
Ala410ArgF	5'-GCA TGC CAC CGG CTC GAG CTG -3'	73,1	-
Ala410ArgR	5'-CAG CTC GAG CCG GTG GCA TGC -3'	73,1	-
Leu226ArgF	5'-GGA GCG CTT GGC CTC CGT TCG CCG -3'	75,3	-
Leu226ArgR	5'-CGG CGA ACG GAG GCC AAG CGC TCC -3'	75,0	-
Leu411AlaF	5'-ATG CCA CGC GGC CGA GCT GCC GTT -3'	77,1	-
Leu411AlaR	5'-AAC GGC AGC TCG GCC GCG TGG CAT -3'	77,1	-
T7F	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3'	51,0	-
T7R	5'-GCT AGT TAT TGC TCA GCG G -3'	51,0	-
M13F	5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT -3'	54,0	-
M13R	5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'	51,0	-

2.4 GDEst-95 esterazę koduojančio geno tikslinę mutagenęzę taikant taikiniui persidengiančio ilginimo strategiją

Tikslinę GDEst-95 mutagenęzę buvo atlikta taikant persidengiančio ilginimo strategiją (2.1 pav.). Persidengiančio ilginimo mutagenęzės metu, naudojant specifinius modifikuotus pradmenis, sukuriama mutacija persidengimo vietoje (Ho et al., 1989). Mutacijos įvedimas atliekamas dviem etapais. Pirmojo etapo metu atliekamos dvi PGR, kuriose naudojama įprasto geną dauginančio pradmens ir mutaciją koduojančio pradmens kombinacija. Po šių reakcijų sugeneruojami du persidengiantys fragmentai, abu fragmentai turi mutaciją persidengimo vietoje. Tokie sukurti fragmentai naudojami kaip matrica antro etapo metu ir PGR atliekama naudojant įprastą, geną padauginančių pradmenų porą.



2.1 pav. Persidengiančio ilginimo mutagenęzės taikymas GDEst-95 karboksilesterazės modifikavimui. Sukurta naudojant BioRender.com

Darbe naudotos pradmenų poros ir teoriniai PGR produkto dydžiai pateikti 2.2 lentelėje. Pradmenų sekos pateiktos 2.1 lentelėje.

2.2 lentelė. Pradmenų poros naudotos sukurti GDEst-95 geno fragmentus su mutacijomis persidengimo vietoje.

Tiesioginis pradmuo	Atvirkštinis pradmuo	Amplikono dydis (bp)	Taikymas
Gly108F	GESTp-23R	~1176	GDEst-95 Gly108Arg mutacijos kūrimas
GESTp-31F	Gly108ArgR	~324	
Ala410ArgF	GESTp-23R	~270	GDEst-95 Ala410Arg mutacijos kūrimas
GESTp-31F	Ala410ArgR	~1230	
Leu226ArgF	GESTp-23R	~678	GDEst-95 Leu226Arg mutacijos kūrimas
GESTp-31F	Leu226ArgR	~822	
Leu411AlaF	GESTp-23R	~267	GDEst-95 Leu411Ala mutacijos kūrimas
GESTp-31F	Leu411AlaR	~1233	
GESTp-31F	GESTp-23R	~1500	Pilno ilgio GDEst-95 geno padauginimas, atliekant tikslinę mutagenezę arba atsitiktinę mutagenezę

Pirmojo etapo PGR mišinį sudarė: 0,5 μM tiesioginio ir atvirkštinio pradmens; 1X Phusion High-Fidelity PCR Master Mix; 1 μg plazmidinės DNR; d. H_2O iki galutinio tūrio. Kaip kontrolė naudotas mišinys, į kurį nebuvo įdėta plazmidinės DNR. Reakcijos sąlygos: 1) pirminis DNR grandinių išlydymas – 98 $^{\circ}\text{C}$, 30 sek.; 2) antrinis DNR grandinių išlydymas – 98 $^{\circ}\text{C}$, 10 sek.; 3) pradmenų prilydymas – 65-70 $^{\circ}\text{C}$ (priklausomai nuo naudojamos pradmenų poros), 30 sek.; 4) ilginimas – 72 $^{\circ}\text{C}$, 40 sek.; 5) galutinis ilginimas – 72 $^{\circ}\text{C}$, 10 min. 2-4 žingsniai kartoti 35 kartus.

Po pirmojo etapo gauti PGR produktai analizuoti agarozės gelyje (0,8 %) taikant DNR elektroforezę. DNR elektroforezės sąlygos: 6 V/cm, naudotas 1X TAE buferinis tirpalas (40 mM Tris; 20 mM acto rūgštis; 1 mM EDTA). Vizualizavimui gelis papildytas 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ etidžio bromidu. Tikslinių produktų dydį atitinkantys fragmentai išpjauti ir išgryninti naudojant GeneJET Gel Extraction Kit, pagal gamintojo rekomendacijas. Išgryninti fragmentai naudoti kaip matrica antrojoje PGR. Naudota įprasta tiesioginio ir atvirkštinio pradmenų pora reikalinga padauginti viso ilgio geną. Kiti reakcijos mišinio komponentai ir jų koncentracijos nekeisti. Reakcijos parametrai nekeisti, išskyrus pradmenų prilydymo temperatūrą (62 $^{\circ}\text{C}$).

2.5 GDEst-95 esterazę koduojančio geno atsitiktinė mutagenezė taikant klaidingą PGR

Šiame darbe klaidingajai PGR buvo naudojama DreamTaq polimerazė reakcijos mišinyje padidinus MgCl_2 kiekį. Reakcijos mišinio sudėtis: 1X DreamTaq™ buferinis tirpalas; 1,25 U DreamTaq polimerazės; 4 μM MgCl_2 ; dNTP mišinys (0,2 mM kiekvieno nukleotido); 1 μg plazmidinės DNR.

Reakcijos sąlygos: 1) pirminis DNR grandinių išlydimas – 95 °C, 2 min.; 2) antrinis DNR grandinių išlydimas – 95 °C, 30 sek.; 3) pradmenų prilydimas – 63 °C, 30 sek.; 4) ilginimas – 72 °C, 3 min.; 5) galutinis ilginimas – 72 °C, 7 min. 2-4 žingsniai kartoti 35 kartus. Gauti PGR produktai analizuoti taikant DNR elektroforezę agarozės gelyje ir išgryninti, kaip aptarta 2.4 skyriuje.

2.6 Modifikuotų GDEst-95 genų klonavimas

Po tikslinės mutagenezės (skyrius 2.4) gauti pilno ilgio genai, buvo įsiūti į pJET1.2/blunt klonavimo vektorių pagal gamintojo rekomendacijas. Reakcijos mišinį sudarė: 1X Reakcijos buferinio tirpalo; pJET1.2/blunt vektorius ir PGR mišinys moliniu santykiu 1:4; 1 U T4 DNR ligazės; d. H₂O iki galutinio tūrio.

PGR produktai gauti po klaidingosios PGR (skyrius 2.5) buvo įsiūti į pTZ57R/T vektorių naudojant TA klonavimo sistemą. Šis vektorius turi ddT iškišas, o PGR produktai susintetinti naudojant Taq polimerazes turi komplementarias adenino iškišas. Reakcijos mišinį sudarė 1X T4 DNR ligazės buferinis tirpalas; pTZ57R/T vektorius ir PGR produktas moliniu santykiu 1:4; 1 U T4 DNR ligazės; d. H₂O iki reikiamo tūrio. Abi tikslių genų įsiuvimo į vektorius reakcijos vykdytos ~16 val., 4 °C temperatūroje.

Visos darbe naudotos elektrokompetentinės *E. coli* ląstelės paruoštos pagal Sambrook ir Russell metodiką (Sambrook and Russell, 2001). Rekombinantinių konstrukto transformacijai į *E. coli* DH5α ląsteles taikyta elektroporacija. Prieš transformaciją T4 DNR ligazė reakcijos mišiniuose inaktyvuota 5 min. kaitinant 70 °C temperatūroje. Transformacijos eiga: į 40 µL paruoštų elektrokompetentinių ląstelių įpilama 4 µL ligavimo mišinio. Tuomet ląstelės paveikiamos elektriniu lauku (1500-1700 V, 5 ms). Iš karto po elektroporacijos ląstelės užpilamos 460 µL super optimalaus buljono mitybine terpė, kuri pasižymi ir katabolinės represijos savybe (angl. *super optimal broth with catabolite repression* (SOC) terpės (2 % peptono; 0,5 % mielių ekstrakto; 0,05 % NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄; 20 mM gliukozės) ir 1 val. inkubuojamos 37 °C temperatūroje. Po inkubacijos ląstelės išglaištos ant agarizuotos LB terpės, papildytos ampicilinu (100 µg/mL) ir atrankos substratu (tributirinu) (paruošta kaip aprašyta 2.2 skyriuje). Lėkštelės inkubuojamos 37 °C temperatūroje iki 24 val. Transformantų ląstelės atrinktos pagal tributirino hidrolizės zonų formavimąsi.

Atrinktos transformantų kolonijos papildomai tikrintos taikant kolonijų PGR, naudojant DreamTaq polimerazę. Kolonijų PGR atliktas analogiškai (skyrius 2.5) su modifikacijomis: reakcijos mišinys nebuvo papildytas MgCl₂,

vietoje plazmidinės DNR įnešta vienos bakterijų kolonijos biomasės ir pradinis denatūravimo laikas prailgintas iki 5 min.

Teigiamų transformantų kolonijos užsėtos į 5 mL skystos LB terpės, papildytos ampicilinu (100 µg/mL); augintos per naktį ir po to išskirta plazmidinė DNR, naudojant GeneJET plasmid miniprep rinkinį, pagal gamintojo rekomendacijas. Įsiūtų genų sekos patvirtintos sekoskaita. Sekoskaita atlikta Azenta Life Sciences, Vokietija.

Tolimesniame etape tiksliniai genai buvo iškirpti naudojant FastDigest NdeI ir FastDigest SalI restrikcijos endonukleazes. Reakcijos mišinį sudarė: plazmidinė DNR, 1 µg; FastDigest SalI, 1 U; FastDigest NdeI, 1 U; 1X FastDigest Green buferinis tirpalas; d. H₂O iki norimo tūrio. Restrikcijos produktai analizuoti agarozės gelyje taikant DNR elektroforezę ir tiksliniai genai išskirti, kaip aprašyta anksčiau (skyrius 2.4). Gauti produktai įsiūti į pET-21c(+) raiškos vektorių, kuris prieš tai buvo sukirptas su FasDigest NdeI ir FastDigest SalI restrikcijos endonukleazėmis. Ligavimo mišinį sudarė: T4 DNR ligazė, 1,25 U; įterpiama DNR ir vektorius moliniu santykiu 5:1; 1X T4 DNR ligazės buferinis tirpalas; d. H₂O iki galutinio tūrio. Ligavimas vykdytas analogiškai aprašytam. Rekombinantinė pET-21c(+) plazmidinė DNR naudota *E. coli* BL21 (DE3) ląstelių transformacijai, taikant elektroporaciją, kaip aprašyta anksčiau. Teigiami transformantai atrinkti ant agarizuotos LB terpės, papildytos ampicilinu (100 µg/mL) ir emulguotu tributirinu arba vinilo lauratu (1,5 % v/v), taip pat atlikus kolonijų PGR, kaip aprašyta anksčiau. Kaip kontrolė ant terpės su vinilo lauratu buvo užsėtos rekombinantinės *E. coli* ląstelės, sintetinančios nemodifikuotą GDEst-95 karboksilesterazę.

2.7 Rekombinantinių baltymų sintezė

Rekombinantinės pET-21c(+) plazmidės su įsiūtais GD-95RM, GDEst-95 arba GDEst-lip genais transformuotos į *E. coli* BL21 (DE3) ląsteles kaip aprašyta (2.5 skyriuje). Visų darbe tirtų rekombinantinių baltymų sintezei, *E. coli* BL21 (DE3) ląstelės užsėtos į 5 mL LB terpės, papildytos ampicilinu (100 µg/mL) ir augintos per naktį 37 °C, aeruojant (180 aps./min.). Tuomet ląstelės užsėjamos į 150 mL šviežios LB terpės, papildytos ampicilinu (100 µg/mL), įvertintas pradinis kultūros OT (OT₆₀₀=0,02 – 0,04). Ląstelės augintos 37 °C, aeruojant (180 aps./min.) ir periodiškai vertinant OT₆₀₀, kol kultūra pasiekia OT₆₀₀ = 0,4 optinio tankio vienetus. Tuomet rekombinantinių baltymų sintezė indukuojama ląstelių augimo terpę papildant pieno permeatu (galutinė koncentracija 4 mM) (Greicius et al., 2023). Kaip kontrolė lygiagrečiai auginama ir ląstelių kultūra, nepaveikta pieno permeatu. Indukcijos laiko momentu ir praėjus 1, 2 ir 4 val. po indukcijos imti ląstelių

mėginiai (galutinis mėginio kiekis $OT_{600}=1,0$). Ląstelės nucentrifuguotos ($12000 \times g$, 2 min), supernatantas pašalintas ir ląstelės suspenduotos 100 μ L NDS-PAGE baltymų dažo (50 mM Tris-HCl buferinio tirpalo (pH 6,8), 2 % natrio dodecilsulfato, 10 % glicerolio ir 0,02 % bromfenolio mėlynojo dažo).

Surinkti indukuotų ir kontrolinių ląstelių mėginiai toliau analizuoti taikant baltymų elektroforezę poliakrilamidiniame gelyje denatūruojančiomis sąlygomis (NDS-PAGE), norint įvertinti rekombinantinių baltymų sintezę ir nustatyti optimalų indukcijos laiką. NDS-PAGE gelių gamybai naudotas 30 % akrilamido tirpalas (sudarytas iš akrilamido ir bis-akrilamido santykiu 1:29). Skirstomojo gelio sudėtis: 12 % akrilamido mišinio; 0,38 M Tris-HCl pH 8,8; 0,1 % NDS; 0,1 % APS; 0,04 % TEMED. Koncentruojamojo gelio sudėtis: 5 % akrilamido mišinio; 0,13 M Tris-HCl pH 6,8; 0,1 % NDS; 0,1 % APS; 0,04 % TEMED. Gelių liejimui ir NDS-PAGE atlikti naudota Mini-PROTEAN sistema (Bio-Rad, Hercules, CA, JAV). NDS-PAGE vykdyta naudojant Laemmli nenutrūkstamą Tris-Glicino buferinio tirpalo sistemą (Laemmli, 1970). Pierce™ Unstained Protein MW Marker naudotas kaip molekulinės masės žymuo. Po baltymų elektroforezės geliai plauti tris kartus d. H₂O po 15 min., ir dažyti naudojant PageBlue™ Protein Staining Solution, remiantis gamintojo rekomendacijomis.

2.8 Tikslinių baltymų gryninimas taikant imobilizuotų metalo jonų giminingumo chromatografiją

Baltymų gryninimui naudota ROTI®Garose-His/Ni derva. Po rekombinantinių baltymų sintezės (2.7. skyrius) ląstelės surinktos centrifuguojant $8000 \times g$ 10 min, supernatantas pašalintas, ląstelės resuspenduotos 1,5 mL Tris-HCl buferiniame tirpale (50 mM, pH 8) ir papildyta 0,02 g lizocimo. Ląstelės ardytos 10 min (amplitudė 38 %, 10 sek. ardymo, 20 sek. šaldymo režimu) ultragarsu, naudojant sonikatorių VC750S (Sonics and Materials, JAV). Ląstelių nuolaužos pašalintos centrifuguojant ($12000 \times g$, 10 min), supernatantas su tirpiaisiais baltymais perkeltas į kolonėlę, užpildytą derva (iš anksto ekvalibruota Tris-HCl buferiniu tirpalu, 50 mM, pH 8). Nespecifiškai prikibę baltymai pašalinti su praplovimo buferiniu tirpalu (Tris-HCl buferinis tirpalas (50 mM, pH 8), papildytas 50 mM imidazolo); tiksliniai baltymai surinkti naudojant eliucijos buferinį tirpalą (Tris-HCl buferinis tirpalas (50 mM, pH 8), papildytas 250 mM imidazolo). Surinkti mėginiai analizuoti NDS-PAGE, kaip aprašyta ankstesniame skyriuje (2.7 skyrius).

Po NDS-PAGE analizės frakcijos su kokybiškai nustatytu didžiausiu tikslinių baltymų kiekiu sumaišytos ir perkeltos į dializės membraną

(SnakeSkin dialysis tubing 3500 MWCO). Membrana su baltymų tirpalu panardinama į buferinį tirpalą (Tris-HCl, 50 mM, pH 8); baltymo mėginio ir buferinio tirpalo santykis 1:100. Dializė vykdyta 24 val., pakeičiant buferinį tirpalą po 12 val. Tuomet mėginys surinktas ir baltymų koncentracija nustatyta įvertinant sugertį ties 280 nm pagal pateiktą formulę (1). Molekulinis svoris ir ekstincijos koeficientas apskaičiuoti remiantis žinoma tikslinio baltymo aminorūgščių seka.

$$\text{Baltymo koncentracija } \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{Sugertis } (\lambda=280\text{nm})}{\text{Baltymo ekstincijos koeficientas } (\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}) \times 1 \text{ cm}} \times \text{baltymo molekulinė masė (g/mol)} \quad (1)$$

2.9 Fermentų aktyvumo įvertinimas

Tiriamų fermentų aktyvumo įvertinimui taikyta *p*-NP dodekanoato hidrolizė (Gudiukaitė et al., 2014). Pradinį reakcijos mišinį sudarė 890 µL buferinio tirpalo (Glicino-NaOH, 50 mM, pH 9) ir 100 µL *p*-NP dodekanoato tirpalo (2,5 mM *p*-NP dodekanoato, ištirpinto DMSO). Mišinys 10 min. inkubuotas 55 °C temperatūroje. Tuomet į reakcijos mišinį įnešta 10 µL išgryninto fermentinio tirpalo ir reakcijos mišinys inkubuotas dar 5 min. Reakcijos mišinys, į kurį nebuvo įpilta fermento, naudotas kaip kontrolė. Po inkubacijos sugertis ($\lambda = 420 \text{ nm}$) įvertinta spektrofotometriškai. Susidariusio *p*-NP kiekis nustatytas remiantis kalibracine kreive. Fermento savitasis aktyvumas apskaičiuotas taikant antrą formulę. Vienas aktyvumo vienetas įvardijamas kaip kiekis *p*-NP (µM) atpalaiduojamas per vieną minutę, naudojant vieną miligramą baltymo.

$$\text{Fermento savitasis aktyvumas } \left(\frac{\text{U}}{\text{mg}} \right) = \frac{\text{Išsiskyres } p\text{-NP kiekis } (\mu\text{M})}{\text{Fermento kiekis (mg)} \times \text{reakcijos laikas (min)}} \quad (2)$$

2.10 Fermentų fizikinių ir cheminių savybių įvertinimas

Skirtingų temperatūrų poveikis tiriamų fermentų aktyvumui buvo vertintas vykdant aprašytą reakciją (skyrius 2.9) skirtingose temperatūrose (diapazonas 30-90 °C). Fermentinis aktyvumas vertintas procentine išraiška, didžiausias fermento aktyvumas atitinkamoje temperatūroje laikomas 100 %.

Temperatūrinio stabilumo įvertinimui 50 µL fermento buvo inkubuota atitinkamoje temperatūroje (30-90 °C) 1 val., tuomet reakcija vykdyta, kaip aprašyta ankstesniame skyriuje (skyrius 2.9). Nepaveikto fermento aktyvumas prilygintas 100 %.

Norint įvertinti fermentų substratinį savitumą buvo naudojami skirtingo riebalų rūgščių grandinės ilgio *p*-NP esteriai: *p*-NP acetatas (C₂), *p*-NP butiratas (C₄), *p*-NP dodekanoatas (C₁₂), *p*-NP miristratas (C₁₄), *p*-NP palmitatas (C₁₆), *p*-NP steratas (C₁₈). Reakcijoje naudojant trumpesnės riebalų rūgščių grandinės ilgio substratus – C₂ ir C₄ – naudotas fosfatinis buferinis tirpalas (K₂HPO₃, 2,14 mM; KH₂PO₃, 28,5 mM; pH 7), kadangi aukštesniame pH pastebėta šių substratų autohidrolizė (Gudiukaite et al., 2017).

2.11 Fermentų kinetinių parametru įvertinimas

Norint įvertinti tiriamų fermentų V_{max} ir K_m, buvo vykdyta jau aprašyta (skyrius 2.9) reakcija, tačiau varijuota substrato koncentracija (1,25 – 50 mM). Remiantis gautais rezultatais nubrėžta Lineweaver-Burk kreivė, pagal kurią nustatyti V_{max} ir K_m. Remiantis gautomis vertėmis apskaičiuotos katalizinės konstantos (K_{cat}) (3 lygtis) ir katalizinio efektyvumo (K_{cat}/K_m) vertės.

$$K_{cat} = V_{max} / [E] \quad (3)$$

K_{cat} – katalizinė konstanta, V_{max} – maksimalus reakcijos greitis, [E] – fermento molekulių kiekis

Aktyvacijos energija apskaičiuota vykdant reakciją 40; 50; 60; 70 °C temperatūrose ir įvertinant išsiskyrusio *p*-NP kiekį po 0; 2 ir 4 min. Skaičiavimai atlikti naudojant Arenijaus lygtį (4).

$$k = Ae^{\frac{E_a}{RT}} \quad (4)$$

k – reakcijos konstanta; Ae – preekspONENTINIS faktorius, E_a – aktyvacijos energija (kJ/mol); T – temperatūra; R – universalioji dujų konstanta (8,314 J × K⁻¹ × mol⁻¹)

2.12 Bioinformatinė analizė

Trimatė darbe analizuotų mutuotų GDEst-95 esterazių struktūra buvo sugeneruota naudojant ColabFold (<https://github.com/sokrypton/ColabFold>), supaprastintą AlphaFold programos versiją. Šablonų informacija nenaudojama ir geriausia sugeneruota struktūra buvo atpalaiduota (pašalinti fiksuoti, teoriškai idealūs kampai tarp skirtingų kovalentiškai sujungtų atomų, taip leidžiant gauti struktūras, geriau atitinkančias energetiškai susilankstymui patogiasias konformacijas (Conway et al., 2014)) naudojant Amber modelį (Jumper et al., 2021; Mirdita et al., 2022). Ligandų struktūros (skirtingo anglies atomų ilgio riebalų rūgščių grandinėje *p*-NP esteriai: C₂, C₄, C₆, C₈,

C₁₀, C₁₂, C₁₄, C₁₆, C₁₈), naudotos substrato-prijungimo modeliavimui, gautos iš NCBI Pubchem Compound duomenų bazės (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Substrato prijungimo modeliavimo eksperimentai atlikti naudojant GNINA 1.0 (McNutt et al., 2021). Tikslinis baltymas analizei *in silico* paruoštas naudojant AutoDockTools (The Scripps Research institute, <https://ccsb.scripps.edu/projects/docking/> (Morris et al., 2009)). Tiksliai ligando-substrato prijungimo analizei ties fermento aktyviuoju centru nubrėžta prijungimo dėžutė 20x20x20. Prijungimui buvo naudoti įprastiniai GNINA 1.0 nustatymai (naudojama autorių sukurta konvoliucinių neuroninių tinklų įverčio funkcija), išskyrus naudojant padidintą išsamumą (angl. *exhaustiveness*) – Monte Carlo grandinių kiekis (kiek paraleliniai vykdoma atsitiktinių ligando struktūros pokyčių (atomų judėjimas, sukimasis ar torsoniai kampai tarp atomų)) padidintas nuo 16 iki 32. Tai leido gauti tikslesnius substrato prijungimo rezultatus (McNutt et al., 2021). Naudojant LigPlot+ (<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LigPlus/>) nustatytos visos galimos vandenilinės jungtys arba hidrofobiniai ryšiai tarp fermento aminorūgščių ir substrato (Laskowski ir Swindells, 2011). Visos trimatės baltymo-substrato struktūros buvo vizualizuotos naudojant PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.5.0 (Schrödinger, LLC).

2.13 Lipolizinių fermentų gebėjimo skaidyti polikaprolaktoną įvertinimas

Norint įvertinti fermentų gebėjimą skaidyti PCL, buvo išliejamos šio polimero plėvelės (Tang et al., 2004; Abdel-Motaal et al., 2014; Khan et al., 2019). Skirtingos vidutinės molekulinės masės PCL granulės (Mn₄₅₀₀₀ ir Mn₈₀₀₀₀) buvo ištirpintos chloroforme maišant (galutinė koncentracija 10 %). 2 mL tirpalo perkelti į 5 cm skersmens stiklinę Petri lėkštelę, chloroformas išgarintas. Gautos plėvelės sukarpytos į ≈ 500 mm² gabaliukus. Plėvelės buvo pasvertos, vidutinis svoris buvo $0,044 \pm 0,005$ g, storis $0,1 \pm 0,01$ mm.

Norint nustatyti sąlygas reikalingas PCL plėvelių skaidymui buvo atlikti optimizavimo eksperimentai. PCL plėvelės perkeltos į 15 mL mėgintuvėlį ir pripildytos fermentiniu tirpalu (3 mL Tris-HCl buferinio tirpalo (50 mM, pH 8); 0,05/ 0,1/ 0,15 arba 0,5 mg tikslinio baltymo (GD-95RM arba GDEst-lip). Mėginiai inkubuoti 30 °C arba 50 °C temperatūroje maišant (130 aps./min.). Kontrolinį mėginį sudarė PCL plėvelė ir buferinis tirpalas be fermento. Skaidymas vykdytas 24 val. Po inkubavimo plėvelės išimtos, nuplautos d. H₂O, išdžiovintos ir svorio pokytis buvo įvertintas pagal pateiktą formulę (5 lygtis).

$$\text{PCL svorio sumažėjimas (\%)} = 100 \times \frac{(S_0 - S_{pd})}{S_0} \quad (5)$$

S_0 – pradinis plėvelės svoris, S_{pd} – galutinis plėvelės svoris po degradacijos

2.14 Organinių tirpiklių poveikio PCL plėvelės skaidymo efektyvumui nustatymas

Organinių tirpiklių poveikis PCL plėvelių skaidymui įvertintas skaidymo mišinį papildant organiniu tirpikliu (galutinė tirpiklio koncentracija 25 % arba 50 % v/v): metanoliu, etanoliu, izopropanoliu, 2-butanoliu, 1-oktanoliu ir izoamilo alkoholiu. Organiniai tirpikliai ir jų koncentracijos pasirinktos remiantis ankstesnių darbų metu gautais rezultatais (Druteika et al., 2020; Savickaite et al., 2021a). Mėginiai inkubuoti 30 °C temperatūroje 24 val. maišant (130 aps./min.). Po inkubacijos plėvelės surinktos, nuplautos d. H₂O, išdžiovinotos ir pasvertos. Kaip kontrolė buvo naudoti šie mėginiai: a) mėginiai, į kuriuos nebuvo įpilta organinio tirpiklio (kontrolė, leidžianti įvertinti organinio tirpiklio poveikį fermento veikimui); b) mėginiai, į kuriuos nebuvo įpilta fermento (kontrolė, leidžianti įvertinti tik organinio tirpiklio poveikį PCL plėvelėms). Organinių tirpiklių poveikis PCL buvo įvertintas taikant standartizuotus PCL degradavimo vienetus (SPD) (6 formulė). SPD apibūdinamas kaip PCL kiekis, suskaidytas per 24 val. naudojant 1 mg fermento, 30 °C temperatūroje.

$$\text{SPD (mg)} = \frac{\text{Pradinė masė (mg)} - \text{galutinė masė (mg)} - \text{autodegradacija (mg)}}{\text{Fermento kiekis (mg)}} \quad (6)$$

PCL degradacijos dinamika taip pat analizuota po 1-, 2-, 4-, ir 8- valandų. Hidrolizė vykdyta naudojant 0,5 mg GD-95RM arba GDEst-lip fermento. Taip pat įvertintas 50 % metanolio (GDEst-lip atveju) arba 25 % etanolio (GD-95RM atveju) poveikis PCL plėvelių skaidymo greičiui, naudojant atitinkamus fermentus ir tirpiklius. PCL skaidymo efektyvumo įvertinimui pritaikyta 6 formulė.

2.15 PCL skaidymo ir esterių sintezės produktų analizė taikant didelio našumo skysčių chromatografijos ir tandeminės masių spektrometrijos metodą (HPLC-MS)

HPLC-MS eksperimentinę dalį atliko Vilniaus universiteto, Gyvybės mokslų centro, Biochemijos instituto, Molekulinės mikrobiologijos ir

biotechnologijos skyriaus vyresnioji mokslo darbuotoja dr. Jonita Stankevičiūtė.

HPLC-MS analizei naudotos tirpios frakcijos, surinktos po eksperimentų, aprašytų 2.13 ir 2.14 skyriuose. Mėginiai sumaišyti su vienodu tūriu acetonitrilo ir centrifuguoti 10 min. $8000 \times g$. Mėginių analizei naudota aukšto našumo skysčių chromatografijos – tandeminės masių spektrometrijos sistema (Shimadzu, Japonija) su fotodiodų gardelės detektoriumi – SPD-M20A (Shimadzu, Japonija) bei masių spektrometru LCMS-2020 (Shimadzu, Japonija), turinčiu elektropurškiamą jonizacijos (angl. *electrospray ionisation* (ESI)) šaltinį. Komponentų chromatografinis atskyrimas atliktas naudojant YMC Pack Pro C18 kolonėlę (išmatavimai 3×150 mm) (YMC, Japonija), 40°C temperatūroje. Mobiliąją fazę sudarė tirpiklis A (0,1 % skruzdžių rūgštis vandenyje) ir 5-95 % acetonitrilo gradientas (tirpiklis B). Masės krūvio santykio (m/z) matavimai atlikti nuo m/z 50 iki m/z 800, 350°C sąlyčio temperatūroje, 250°C desolvacijos linijos temperatūroje, ± 4500 V įtampoje, naudojant azoto dujas kaip purškiamas ir džiovinamąsias dujas. Masių spektrai surinkti tiek teigiamame, tiek neigiamame jonizacijos režimuose. Informacija analizuota naudojant LabSolutions skysčių chromatografijos-masių spektrometrijos programinę įrangą. 6-hidroksiheksolinė rūgštis identifikuota remiantis komerciniu standartu. Etil-6-hidroksiheksanoato ir metil-6-hidroksiheksanoato masės buvo identifikuotos pagal PubChem identifikacinius numerius: CID 357781 ir CID 3083855, atitinkamai.

2.16 PCL plėvelių po poveikio fermentais analizė, taikant skenuojančią elektronų mikroskopiją (SEM)

SEM analizės eksperimentinę dalį atliko Vilniaus universiteto, Chemijos ir geomokslų instituto, Chemijos instituto jaunesnysis asistentas Andrius Pakalniškis.

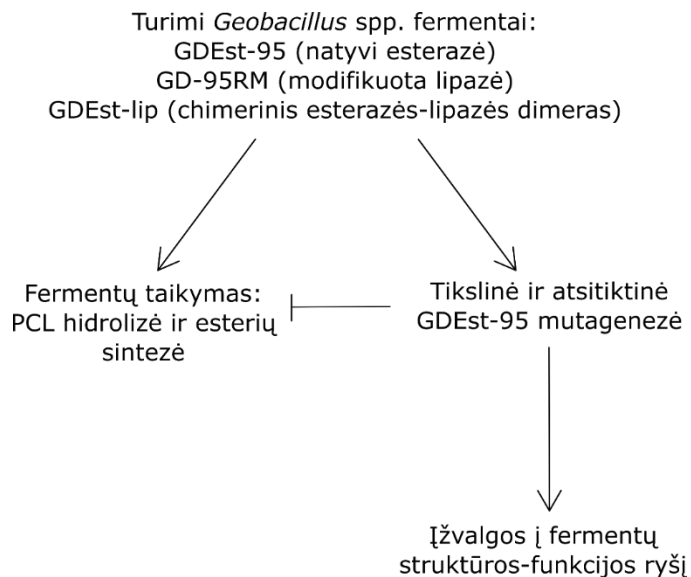
PCL plėvelių paviršiaus morfologijos pokyčiai buvo analizuoti taikant SU-70 skenuojančią elektronų mikroskopą (Hitachi, Tokijas, Japonija). Prieš matavimus mėginiai padengti 5 nm aukso sluoksniu, naudojant Q150ES purškiklį (Quorum, Lughton, United Kingdom). Mėginiai analizuoti esant skirtingam didinimui (100 ir 5000 kartų), naudotas 5 kV elektronų srautas vakuume.

2.17 Statistinė analizė

Kiekybiniai eksperimentai atlikti tris kartus, išvesti gauti vidurkiai. Informacija analizuota naudojant GraphPad 9.0 programą Windows operacinę sistemą, GraphPadSoftware, Bostonas, Masačiutsetsas, JAV (<https://www.graphpad.com/>). Reikšmingi skirtumai nustatyti taikant T-testą (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1.cfm>).

3. REZULTATAI

Šiame darbe *Geobacillus* lipolizinių fermentų tyrimai buvo atliekami dvejomis kryptimis: 1) *Geobacillus* sp. 95 sintetinių esterazių tikslinė ir atsitiktinė mutagenezė, skirta gauti naujos informacijos apie šių fermentų struktūros-funkcijos ryšį bei sukurti geresnėmis savybėmis pasižyminčius fermentus, ir 2) *Geobacillus* sp. 95 modifikuotų lipolizinių fermentų taikymas PCL hidrolizei (3.1 pav.)



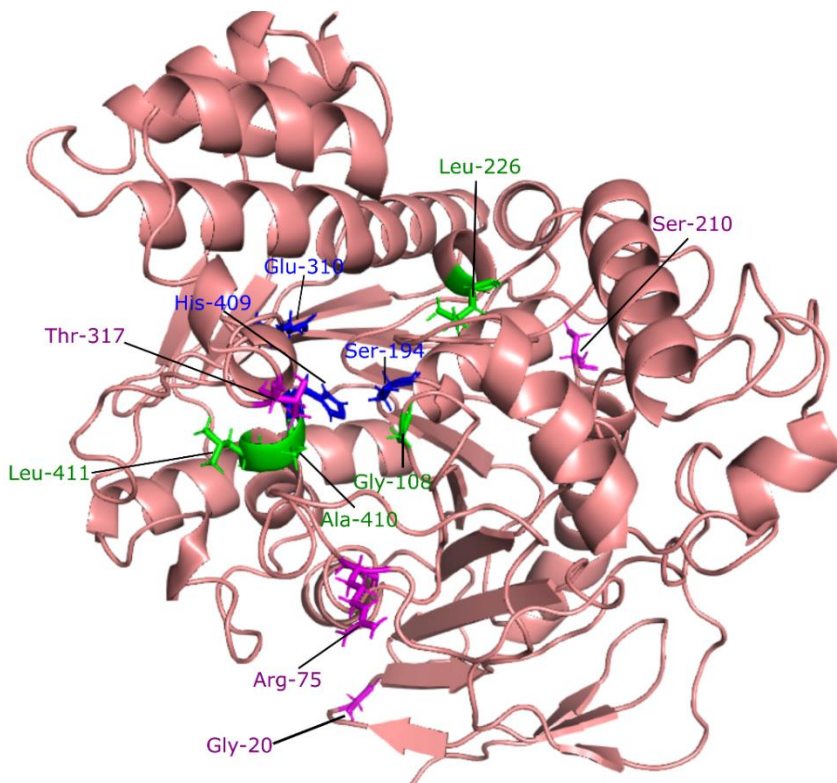
3.1 pav. Supaprastinta darbo eigos schema.

Pirmojoje rezultatų dalyje (skyrius 3.1) pateikiama tikslinės ir atsitiktinės GDEst-95 esterazės mutagenezės rezultatai, tuo tarpu antroji dalis (skyrius 3.2) skirta PCL hidrolizei ir esterių sintezei, taikant ankstesnių tyrimų metu sukurtą modifikuotą GD-95RM lipazę ir chimerinį fermentą GDEst-lip (sintetinis GDEst-95 ir GD-95 dimeras). Buvo tikimasi, jog gauti modifikuoti esterazės variantai taip pat galės būti naudojami taikomojoje šio tyrimo dalyje ir apjungs struktūrinius ir funkcinius GDEst-95 fermento tyrimus. Deja, tačiau gebėjimas skaidyti PCL šiam fermentui nenustatytas, todėl galimos tik naujos išvalgos į šių fermentų struktūros-funkcijos ryšį.

3.1 GDEst-95 esterazės naujų fenotipų kūrimas ir charakterizavimas

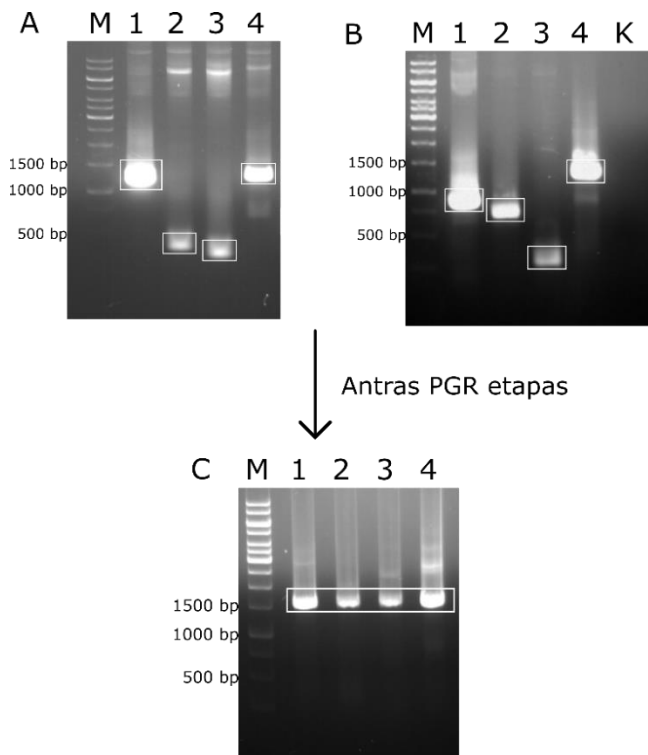
3.1.1 GDEst-95 mutantų kūrimas ir klonavimas

Šiame darbe taikytos dvi strategijos, skirtos sukurti GDEst-95 mutantus: taikiniui specifinė mutagenezė (norint įvertinti numanomų fermento veikimui svarbių aminorūgščių poveikį) ir kryptingoji evoliucija (siekiant atrasti naujas šio fermento aktyvumui ir funkcionalumui svarbias aminorūgštis ar sritis). Aminorūgštys-taikiniai specifinei mutagenezei buvo parinkti remiantis ankstesnių *Geobacillus* sp. sintetinamų 55 kDa dydžio karboksilesterazių tyrimų metu atliktomis analizėmis (Liu et al., 2007; Gudiukaite et al., 2017). Trys aminorūgštys (Gly108, Ala410 ir Leu411) buvo pasirinktos dėl nedidelio atstumo iki katalizinio centro (Ser194, Glu310, His409). Ketvirtoji aminorūgštis kandidatė, Leu226, pasirinkta, kadangi ji lokalizuota ties ertme, vedančia į fermento aktyvųjį centrą (3.2 pav.).



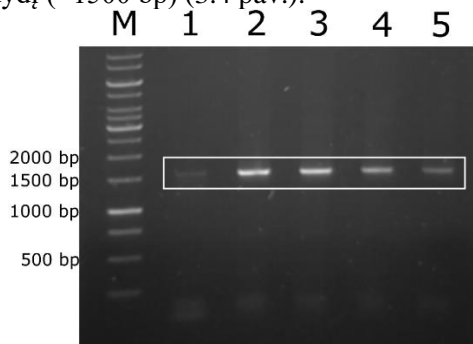
3.2 pav. Numanoma GDEst-95 karboksilesterazės struktūra, sukurta naudojant ColabFold. Katalizinės aminorūgštys pažymėtos mėlyna spalva, žalia spalva pažymėtos tikslinės mutagenezės aminorūgštys, violetinė spalva pažymėta aminorūgštys, modifikuotos atsitiktinės mutagenezės metu. Vizualizuota naudojant PyMOL Molecular Graphics System.

Taikant persidengiančio ilginimo PGR po pirmojo etapo pagausinti Gly108Arg, Ala410Arg, Leu266Arg ir Leu411Ala genų fragmentai, kurie persidengia ties mutacijos sritimis (3.3A ir 3.3B pav.). Skirtingo ilgio PGR produktai, atitinkantys numanomą geno fragmento dydį (2.4 skyrius 2.2 lentelė) buvo sėkmingai padauginti ir išgryninti iš agarozės gelio. Po antro PGR etapo sėkmingai pagausinti pilno ilgio genai, turintys mutacijas tikslinėje vietoje (3.3C pav.). Mutacijų įvedimas patvirtintas atlikus sekoskaitą. Gauti mutantiniai genai įsiūti į klonavimo vektorių pJET1.2/blunt, kuris transformuotas į *E. coli* DH5 α ląsteles. Teigiami klonai atrinti transformantus užsėjus ant terpės papildytos ampicilinu ir tributirinu, kaip papildomas atrankos žingsnis atlikta kolonijų PGR. Iš atrinktų klonų išskirta plazmidinė DNR, tiksliniai genai iškirpti naudojant restrikcijos endonukleazes, gauti tikslinių fragmentai išgryninti, įsiūti į pET-21c(+) raiškos vektorių ir transformuoti į *E. coli* BL21 (DE3) ląsteles. Transformantai atrinkti analogiškai.



3.3 pav. Pirmojo (A, B) ir antrojo (C) etapo metu taikant persidengiančio ilginimo PGR metodą gautų GDEst-95 esterazės mutantų genų fragmentų analizė DNR elektroforezėje agarozės gelyje. A) Gly108Arg (1-2 takeliai) ir Ala410Arg (3-4 takeliai) fragmentai; B) Leu226Arg (1-2 takeliai) ir Leu411Ala (3-4 takeliai) fragmentai; K – kontrolė be matricos; C) pilno ilgio Gly108Arg (1 takelis), Ala410Arg (2 takelis), Leu226Arg (3 takelis), Leu411Ala (4 takelis) pagausinti genai. Tiksliniai genai pažymėti baltu stačiakampiu.

Taikant klaidingą PGR gautų PGR produktų dydis atitiko tikslinį GDEst-95 esterazės geno dydį (≈ 1500 bp) (3.4 pav.).

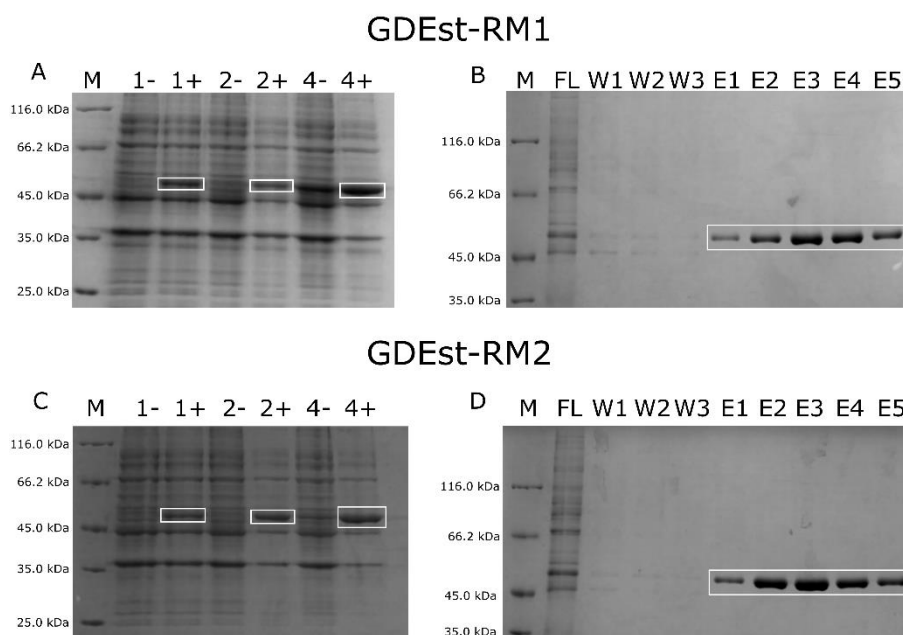


3.4 pav. Produktai, gauti po klaidingosios PGR įvedant atsitiktines mutacijas į GDEst-95 geną. Tikslinis genas pažymėtas baltu stačiakampiu.

Po atsitiktinės mutagenozės gauti GDEst-95 esterazės genai išgryninti iš agarozės gelio, įsiūti į pTZ57R/T klonavimo vektorių ir transformuoti į *E. coli* DH5 α ląsteles. Atrankai naudotas substratas vinilo lauratas (1 %). Tai – vidutinio ilgio (12 anglies atomų riebalų rūgščių grandinėje), vandenyje netirpus vinilo esteris. Dėl ilgesnio riebalų rūgščių grandinės ilgio šis substratas yra hidrolizuojamas sudėtingiau negu įprasti lipolizinių fermentų atrankai naudojami substratai (pvz.: tributirinas). Šį substratą nutarta naudoti, siekiant atrinkti didesniu aktyvumu ir/ar pakitusiu substratiniu savitumu pasižymintį naujus GDEst-95 esterazės variantus, remiantis formuojamų hidrolizės zonų dydžiu ir laiko intervalu, kuris reikalingas, kad hidrolizės zonos taptų vizualiai matomos. Buvo pastebėta, jog hidrolizės zonos formuojamos aplink *E. coli* BL21 (DE3) ląsteles, ekspresuojančias GDEst-95 geną, dažniausiai yra mažesnės (1-2 mm) negu hidrolizės zonos formuojamos aplinkui atsitiktinius GDEst-95 mutantus. Iš viso atrinktos trys kolonijos, kurios pasižymėjo didesnių zonų formavimu. Atrinktų mutantų: GDEst-RM1, GDEst-RM2, GDEst-RM3 formuojamų hidrolizės zonų dydis po 12 val. ląstelių auginimo buvo 2-3 mm. Iš viso atrinktos trys kolonijos, kurios pasižymėjo didesnių zonų formavimu per trumpesnę laiko tarpą. Iš atrinktų transformantų buvo išskirta plazmidinė DNR ir atlikta sekoskaita. Nustatytos šios mutacijos: GDEst-RM1 – Arg75Gln, GDEst-RM2 – Gly20Ser ir Arg75Gln, GDEst-RM3 – Ser210Gly ir Tyr317Ala. Šie fermentai dėl didesnio aktyvumo hidrolizuojant substratą – vinilo lauratą buvo parinkti tolimesniems tyrimams.

3.1.2 Mutuotų GDEst-95 baltymų sintezė ir gryninimas

Mutuoti GDEst-95 variantai (Gly108Arg, Ala410Arg, Leu411Ala, Leu226Arg, GDEst-RM1, GDEst-RM2, GDEst-RM3) ekspresuoti *E. coli* BL21 (DE3) ląstelėse naudojant pieno permeatą kaip induktorių (Greicius et al., 2023). Pieno permeatas – tai šalutinis pieno perdirbimo produktas, gaunamas pieno ultracentrifugavimo metu pašalinant pieno riebalus ir baltymus. Pagrindinė šio produkto sudedamoji dalis yra laktozė (> 82 %), kuri tarnauja kaip induktorius ir gali pakeisti brangesnį induktorių izopropil β -D-1-tiogalaktopiranozidą (IPTG). Ankstesnių darbų metu pieno permeatas kaip induktorius sėkmingai pritaikytas rekombinantinės GDEst-95 esterazės, GD-95RM lipazės ir GDEst-lip sulieto baltymo sintezei (Greicius et al., 2023). Šiame darbe visų tirtų fermentų atveju didžiausias baltymo kiekis buvo nustatytas po 4 val. nuo indukcijos pradžios (pateikiamas GDEst-RM1 (3.5A pav.) ir GDEst-RM2 (3.5C pav.) indukcijos analizės NDS-PAGE pavyzdys). Analogiški rezultatai gauti tiriant ir po taikiniui specifinės mutagenzės gautus GDEst-95 esterazės variantus.



3.5 pav. GDEst-RM1 ir GDEst-RM2 rekombinantinių baltymų sintezės (A, C) ir gryninimo (B, D) NDS-PAGE analizė. M – Pierce™ Unstained Protein MW baltymų molekulinės masės žymuo. A ir C: skaičiai (1-4) nurodo laiką nuo indukcijos pradžios valandomis; + – *E. coli* BL21 (DE3) rekombinantinės ląstelės paveiktos induktoriaus pieno permeatu (4 mM); - – kontroliniai ląstelių mėginiai, kai pieno permeatas nebuvo naudotas. Baltymų gryninimo IMAC rezultatai (B, D): FL – pratekėjusių baltymų frakcija; W1-W3 – praplovimo frakcijos; E1-E5 – elucijos frakcijos. Tiksliniai baltymai pažymėti baltu stačiakampiu.

Tolimesniame etape tiksliniai fermentai buvo sėkmingai išgryninti taikant imobilizuotų metalo jonų giminingumo chromatografiją (3.5B ir 3.5D pav.). Analogiški rezultatai gauti gryninant ir po taikiniui specifinės mutagenezės gautus GDEst-95 esterazės variantus. Frakcijos, su kokybiškai didžiausiu nustatytu baltymo kiekiu buvo apjungtos ir naudojamos tolimesniuose eksperimentuose.

3.1.3 Gly108Arg, Ala410Arg, Leu226Arg ir Leu411Ala mutantų charakterizavimas

Ankstesnis GDEst-95 esterazės charakterizavimas parodė, jog tai – aukštos temperatūroje veikiantis, termostabilus fermentas (Gudiukaite et al., 2017). Nustatyta, jog šio fermento savitasis aktyvumas yra 100 U/mg, optimali veikimo temperatūra 60 °C, >50 % aktyvumo fermentas išlaiko po inkubacijos 30-70 °C temperatūros diapozone. GDEst-95 geriausiai skaidė trumpos riebalų rūgščių grandinės ilgio *p*-NP esterius, o didžiausias aktyvumas nustatytas skaidant *p*-NP butiratą (C₄). Po specifinės mutagenezės eksperimentų gauti fermento variantai Gly108Arg, Ala410Arg ir Leu226Arg pasižymėjo mažesniu savituoju aktyvumu: Gly108Arg – 2,86 U/mg; Ala410Arg – 10,95 U/mg; Leu226Arg – 44,23 U/mg (3.1 lentelė). Savitojo aktyvumo ir fermentų fizikinių bei cheminių savybių analizei pasirinktas substratas *p*-NP dodekanoatas, kadangi jis ankstesniuose tyrimuose naudotas GDEst-95 fermento savybių vertinimui bei pasižymi mažesne autohidrolize lyginant su trumpesnės riebalų rūgščių grandinės *p*-NP esteriais. Dėl mažo aktyvumo Gly108Arg mutantas toliau nebuvo analizuojamas. Tuo tarpu Leu411Ala mutacija padidino GDEst-95 savitąjį aktyvumą du kartus (3.1 lentelė).

3.1 lentelė. GDEst-95 ir jos modifikuotų variantų kinetinės savybės. Kinetinės savybės įvertintos reakciją vykdant 55 °C temperatūroje, naudojant *p*-NP dodekanoatą kaip substratą. Fermentai, kurių aktyvumas padidėjo yra paryškinti. GDEst-95 savybės analizuotos ankstesnių darbų metu (Gudiukaite et al., 2017).

Baltymas	Savitasis aktyvumas (U/mg)	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	K_m (mM)	K_{cat} (min^{-1})	Katalizinis efektyvumas ($\text{min}^{-1}\text{mM}^{-1}$)	Aktyvacijos energija E_a (kJ/mol)
Mutantiniai variantai sukurti taikant taikiniui specifinę mutagenę						
GDEst-95 Gly108Arg	2,86±0,00	-	-	-	-	-
GDEst-95 Ala410Arg	10,95±1,15	2,96	2,23	$1,15 \times 10^3$	$5,18 \times 10^2$	85,42
GDEst-95 Leu226Arg	44,23±14,06	11,86	6,00	$2,09 \times 10^5$	$3,49 \times 10^3$	34,86
GDEst-95 Leu411Ala	200,00±0,00	11,07	4,62	$2,24 \times 10^4$	$4,86 \times 10^3$	11,40
Mutantiniai variantai sukurti taikant klaidingą PGR						
GDEst-RM1	313,00±35,78	16,08	2,59	$8,84 \times 10^5$	$3,41 \times 10^5$	44,13
GDEst-RM2	363,70±43,88	24,57	2,27	$1,35 \times 10^6$	$5,95 \times 10^5$	45,11
GDEst-RM3	160,71±7,28	31,52	9,28	$4,38 \times 10^4$	$4,72 \times 10^3$	12,10
Nemodifikuota <i>Geobacillus</i> sp. 95 esterazė						
GDEst-95	100,00±0,00	5,88	5,88	$3,27 \times 10^5$	$5,60 \times 10^4$	50,30

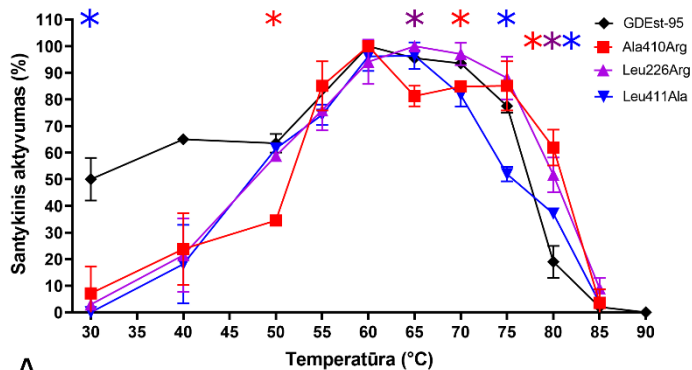
Abu toliau analizuoti arginino pakaitai (Ala410Arg ir Leu226Arg) turėjo neigiamą poveikį GDEst-95 kataliziniams parametrams. Ala410Arg mutantas pasižymėjo du kartus sumažėjusia V_{max} verte, tačiau taip pat 2,64 karto sumažėjo ir Michaelis-Menten konstanta (K_m) – tai rodo padidėjusį fermento giminingumą substratui. Žemesnės K_m vertės leidžia spręsti, jog naudojamos substrato koncentracijos įprastiems eksperimentams (2,5 mM) yra pakankamos pasiekti $\frac{1}{2} V_{max}$. K_{cat} sumažėjo 284 kartus, o katalizinis efektyvumas 108 kartus. Aktyvacijos energija padidėjo 35,12 kJ/mol.

Leu226Arg mutacijos atveju nustatytas V_{max} padidėjimas, tačiau K_m vertė nepakito. Nepaisant padidėjusio reakcijos greičio, K_{cat} sumažėjo 1,56 karto, o katalizinis efektyvumas sumažėjo 16 kartų, kas rodo neigiamą mutacijos įtaką GDEst-95 fermento veiklai. Aktyvacijos energija sumažėjo 15,44 kJ/mol.

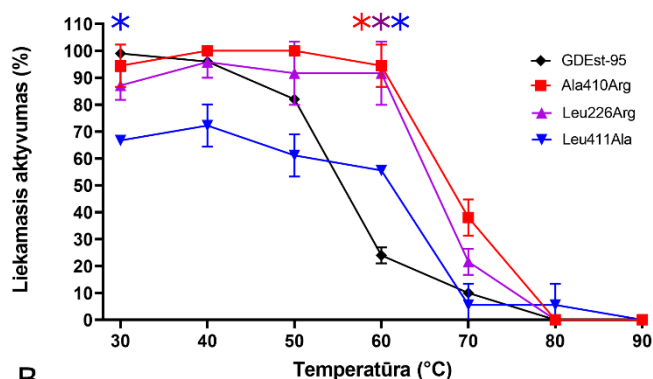
Leu411 modifikacija į alaniną padidino GDEst-95 savitąjį aktyvumą, V_{max} padidėjo beveik du kartus, o K_m sumažėjo 1,88 kartus. Visgi, K_{cat} ir katalizinis efektyvumas sumažėjo atitinkamai 14,60 ir 11,52 karto.

Vertinant temperatūros poveikį fermentų veikimui (3.6A pav.), nustatyta, kad įvestos mutacijos turėjo neigiamą poveikį GDEst-95 aktyvumui žemose (30-45 °C) temperatūrose. Optimalios veikimo temperatūros pokytis nustatytas tik Leu226Arg mutantui (65 °C). Aukštesnėse temperatūrose

(75-85 °C) nustatytas didesnis santykinis Ala410Arg ir Leu226Arg aktyvumas lyginant su tėviniu GDEst-95 fermentu. Nors Leu411Ala mutantas pasižymėjo padidėjusiu savituoju aktyvumu lyginant su nemodifikuota GDEst-95 esteraze (3.1 lentelė), visgi, jam būdingas mažesnis santykinis aktyvumas beveik visame analizuotame temperatūrų diapazone (3.6A pav.).



A



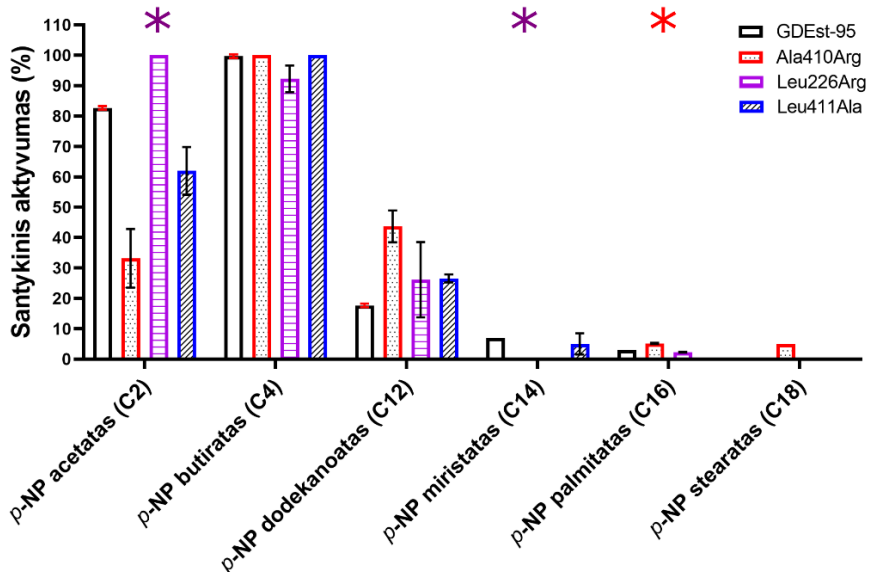
B

3.6 pav. GDEst-95 tikslinių mutantų temperatūrinio aktyvumo (A) ir stabilumo (B) analizė. GDEst-95 vertės analizuotos ankstesnių darbų metu (Gudiukaite et al., 2017). * – rodo, jog $p \leq 0,05$ lyginant atitinkamų mutantų ir GDEst-95 esterazės santykinio aktyvumo vertes tiriamose temperatūrose.

Rezultatai parodė, jog mutacijos į argininę padidino GDEst-95 esterazės temperatūrinį stabilumą (3.6B pav.). Abu mutantai (Leu226Arg ir Ala410Arg) po inkubacijos 60 °C temperatūroje išlaikė daugiau negu 85 % aktyvumo. Abu variantai taip pat pasižymėjo >20 % liekamuoju aktyvumu 70 °C temperatūroje, tačiau po 1 valandos inkubacijos 80 °C temperatūroje visi fermentai neteko daugiau negu 80 % fermentinio aktyvumo.

Leu411Ala variantas pasižymėjo mažesniu temperatūriniu stabilumu žemesnėse temperatūrose (30-50 °C), tačiau išlaikė >50 % aktyvumo 60 °C temperatūroje.

Substratinio savitumo tyrimai parodė, kad Leu226Arg mutantas pasižymėjo didesniu santykinu aktyvumu skaidant *p*-NP acetatą, kiti mutantiniai variantai pasižymėjo mažesniu savitumu šiam substratui (3.7 pav.).



3.7 pav. GDEst-95 tikslinių mutantų substratinio savitumo analizė. GDEst-95 esterazės vertės analizuotos ankstesnių darbų metu (Gudiukaite et al., 2017). * – rodo, jog $p \leq 0,05$ lyginant atitinkamų mutantų ir GDEst-95 esterazės santykinio aktyvumo vertes, hidrolizuojant įvairaus riebalų rūgščių ilgio *p*-NP esterius.

Gauti rezultatai taip pat parodė, kad įvestos mutacijos padidino Ala410Arg ir Leu411Ala mutantų gebėjimą hidrolizuoti vidutinio riebalų rūgščių grandinės ilgio substratą – *p*-NP dodekanoatą.

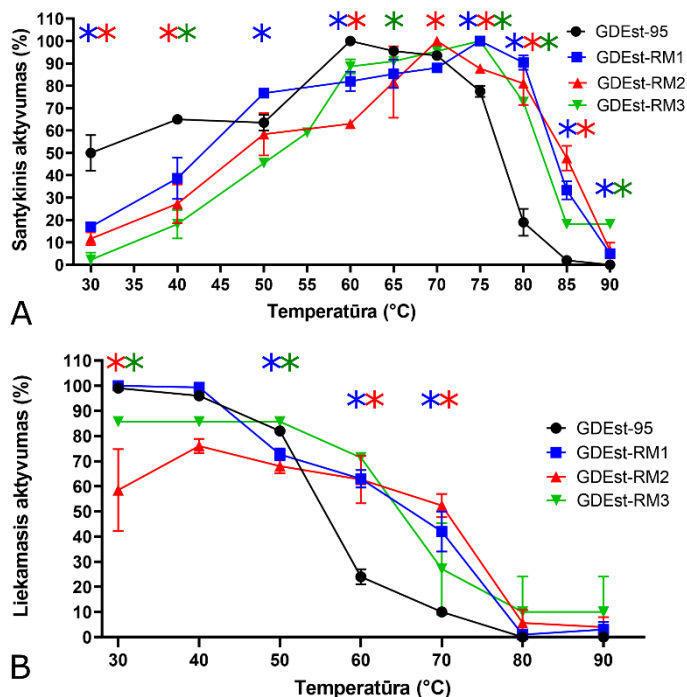
3.1.4 GDEst-RM1, GDEst-RM2 ir GDEst-RM3 mutantų charakterizavimas

Visi mutantiniai GDEst-95 esterazės variantai, gauti atlikus atsitiktinę mutagenezę, pasižymėjo geresnėmis katalizinėmis savybėmis (3.1 lentelė). Lyginat su tėviniu GDEst-95 fermentu, GDEst-RM1 ir GDEst-RM2 esterazių savitasis aktyvumas padidėjo beveik tris kartus (atitinkamai 312 U/mg ir 363 U/mg). GDEst-RM3 aktyvumas padidėjo mažiau, ~1,6 karto (161 U/mg).

Analizė parodė, kad GDEst-RM1 ir GDEst-RM2 mutantams būdingos didesnės V_{max} ir mažesnės K_m vertės, lyginant su GDEst-95 (3.1 lentelė). GDEst-RM1 mutanto V_{max} padidėjo 2,7 karto, o K_m sumažėjo ~2,3 karto. Taip

pat apskaičiuota, kad šio fermento K_{cat} padidėjo 2,7 karto, katalizinis efektyvumas padidėjo daugiau negu 6 kartus, aktyvacijos energija sumažėjo 6,17 kJ/mol. GDEst-RM2 mutanto V_{max} vertė padidėjo daugiau negu keturis kartus, o K_m sumažėjo apie 2,5 karto. Katalizinis efektyvumas padidėjo daugiau negu 10 kartų, tuo tarpu aktyvacijos energija sumažėjo 5,19 kJ/mol. Bendras V_{max} padidėjimas ir K_m sumažėjimas yra svarbūs fermentų aktyvumui, kadangi tiek katalizės greitis, tiek substratinis giminingumas yra padidinami sinergistiškai, taip leidžiant greičiau katalizuoti reakcijas. Tai lemia ir padidėjusias katalizinės konstantos bei katalizinio efektyvumo vertes. Svarbu paminėti, jog šie fermentai turi vieną bendrą mutaciją (Arg75Gln). Abi mutacijos (tiek Arg75Gln, tiek ir Gly20Ser) yra lokalizuotos toli nuo fermento aktyviojo centro, tad, tikėtina, jog šių mutacijų poveikis veikia fermento aktyvumą netiesiogiai.

GDEst-RM1 ir GDEst-RM2 taip pat pasižymėjo padidėjusia optimalia veikimo temperatūra (3.8 pav.).



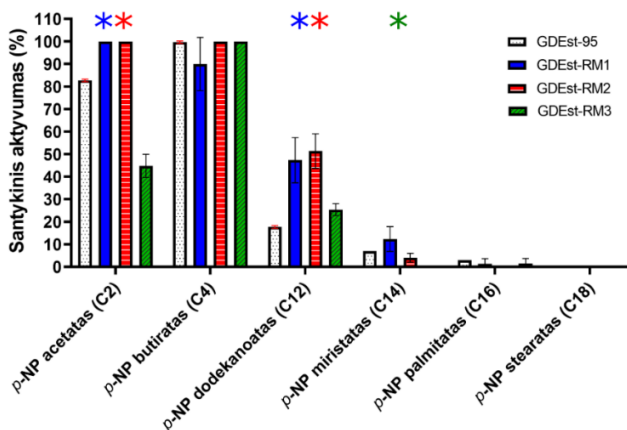
3.8 pav. Atsitiktinių GDEst-95 esterazės mutantų temperatūrinio aktyvumo (A) ir stabilumo (B) analizės rezultatai. GDEst-95 vertės analizuotos ankstesnių darbų metu (Gudiukaite et al., 2017). * – rodo, jog $p \leq 0,05$ lyginant atitinkamų mutantų ir GDEst-95 esterazės santykinio aktyvumo vertes tiriamose temperatūrose.

Didžiausiu lipoliziniu aktyvumu GDEst-RM1 esterazė pasižymėjo 75 °C temperatūroje, tuo tarpu GDEst-RM2 esterazės optimali veikimo temperatūra – 70 °C (lyginant su GDEst-95, GDEst-RM1 aktyvumas 75 °C temperatūroje padidėjo 25 %). Tiek GDEst-RM1, tiek GDEst-RM2 pasižymėjo didesniu aktyvumu aukštesnėse temperatūrose (75-85 °C).

GDEst-RM1 mutanto atveju temperatūrinis stabilumo profilis žemesnėse temperatūrose (30-50 °C) išliko panašus į GDEst-95, tuo tarpu aukštesnėse temperatūrose (60-70 °C temperatūros intervale) fermentas pasižymėjo reikšmingai didesniu liekamuoju aktyvumu. Nors GDEst-RM2 pasižymėjo didesniu savituoju aktyvumu, šio fermento temperatūrinis stabilumas žemesnėse (30-50 °C) temperatūrose sumažėjo iki ~60 % ir buvo žemesnis lyginant su tėviniu GDEst-95. Nepaisant to, GDEst-RM2 išlaikė didesnę temperatūrinį stabilumą 60-70 °C temperatūros intervale, lyginant su GDEst-95. Visų tirtų fermentų liekamasis aktyvumas buvo <10 % po inkubacijos 80 °C temperatūroje.

GDEst-RM3 mutantinis variantas pasižymėjo aukščiausia, daugiau nei 5 kartus didesne V_{max} reikšme, tačiau K_m vertė taip pat padidėjo 1,58 karto. K_{cat} sumažėjo 7,47 karto, o katalizinis efektyvumas beveik 12-ką kartų. Nepaisant to, aktyvacijos energija sumažėjo 38,2 kJ/mol. Šis mutantas taip pat pasižymėjo padidėjusia optimalia veikimo temperatūra (75 °C) ir didesniu temperatūriniu stabilumu 60 °C, lyginant su GDEst-95. GDEst-RM3 fermentas taip pat yra vienintelis, kurio aktyvumas buvo nustatytas po inkubacijos 90 °C temperatūroje.

Substratinio savitumo analizė parodė, kad visi trys GDEst-95 esterazės mutantai teikė pirmenybę trumpos riebalų rūgščių grandinės *p*-NP esteriams (3.9 pav.).



3.9 pav. Atsitiktinių GDEst-95 esterazės mutantų substratinio savitumo analizė. GDEst-95 vertės analizuotos ankstesnių darbų metu (Gudiukaite et al., 2017). * – rodo, jog $p \leq 0,05$ lyginant santykinio substratinio aktyvumo vertes su GDEst-95 santykinio aktyvumu.

GDEst-RM1 ir GDEst-RM2 mutantai, kaip ir daugelis žinomų esterazių, teikia pirmenybę trumpos riebalų rūgščių grandinės esteriams, vis dėl to abu mutantai pasižymėjo reikšmingai didesniu santykinu aktyvumu hidrolizuojant *p*-NP dodekanoatą. Tuo tarpu GDEst-RM3 mutantas parodė sumažėjusį giminingumą *p*-NP acetatui (C₂). Gauti rezultatai rodo, kad atsitiktinės mutacijos (Gly20Ser; Arg75Gln; Ser210Gly; Thr317Ala) turi įtakos GDEst-95 esterazės substratiniam savitumui.

3.1.5 Struktūrinė GDEst-95 mutantų analizė

Bioinformatiniai fermento-substrato prijungimo modeliavimo rezultatai koreliavo su eksperimentiniais rezultatais (3.2 lentelė). Visi atsitiktinės mutagenezės metu sukurti mutantai (GDEst-RM1, GDEst-RM2 ir GDEst-RM3) pasižymėjo mažesne laisvąja energija prijungiant skirtingo riebalų rūgščių grandinės ilgio *p*-NP esterius. Tai rodo didesnę ligando giminingumą baltymui.

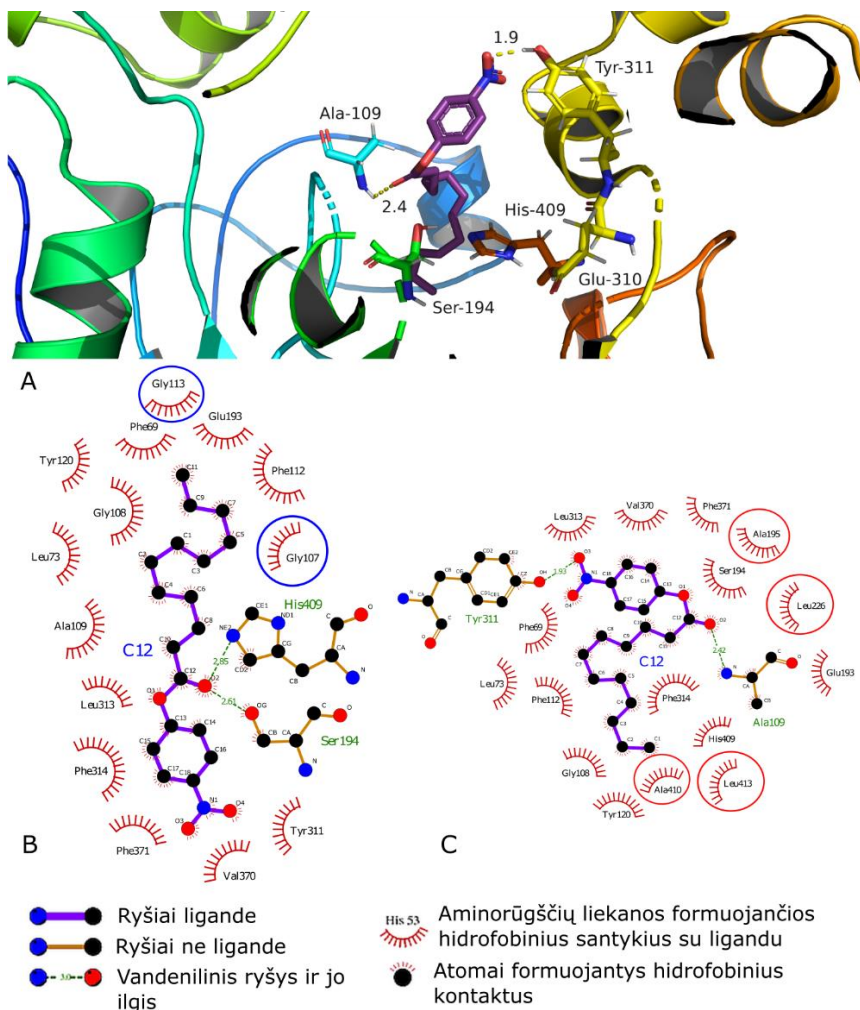
3.2 lentelė. Nuspėjama skirtingų substratų prijungimo prie fermento laisvoji energija (kcal/mol). Variantai, pasižymintys mažesne laisvąja energija (didesniu giminingumu) paryškinti. *p*-NP acetatas – C₂, *p*-NP butiratas – C₄, *p*-NP heksanoatas – C₆, *p*-NP oktanoatas – C₈, *p*-NP dekanooatas – C₁₀, *p*-NP dodekanoatas – C₁₂, *p*-NP myristatas – C₁₄, *p*-NP palmitatas – C₁₆, *p*-NP steratas – C₁₈.

Fermentas/ Substratas	GDEst- 95	GDEst- RM1	GDEst- RM2	GDEst- RM3	Ala410 Arg	Leu226 Arg	Leu411 Ala
C ₂	-5,28	-4,85	-5,41	-5,38	-5,49	-5,33	-5,27
C ₄	-5,80	-6,16	-6,33	-5,79	-6,03	-5,89	-6,29
C ₆	-6,68	-7,04	-7,03	-6,81	-6,89	-5,96	-6,84
C ₈	-6,91	-7,71	-7,76	-7,34	-7,23	-6,28	-7,70
C ₁₀	-7,29	-7,83	-7,77	-7,65	-7,03	-6,56	-8,01
C ₁₂	-8,12	-8,45	-8,89	-8,46	-6,98	-7,80	-7,53
C ₁₄	-7,94	-8,25	-8,37	-8,19	-6,61	-7,83	-6,69
C ₁₆	-7,35	-7,71	-7,84	-7,62	-6,47	-7,52	-6,13
C ₁₈	-5,22	-5,38	-5,95	-5,54	-4,81	-6,12	-3,97

Remiantis padidėjusiu giminingumu prijungiamiems substratams, atsitiktiniai GDEst-95 mutantai (GDEst-RM1, GDEst-RM2 ir GDEst-RM3), tikėtina, turėtų pasižymėti didesniu aktyvumu hidrolizuojant beveik visus *p*-NP esterius. Išimtyms matomos tik modeliuojant GDEst-RM1 ir *p*-NP acetato bei GDEst-RM3 ir *p*-NP butirato giminingumus, kurie yra mažesni negu GDEst-95 esterazės. Ši hipotezė patvirtinta eksperimentiniais rezultatais: GDEst-RM variantų fermentinis aktyvumas buvo didesnis negu GDEst-95; GDEst-RM2 aktyvumas skaidant *p*-NP dodekanoatą padidėjo tris kartus, taip pat remiantis modeliavimo rezultatais, šis substrato-fermento kompleksas turi

mažiausią laisvąją rišimosi energiją (-8,89 kJ/mol). Bendrai didžiausias numanomas fermentų giminingumas nustatytas vidutinio grandinės ilgio riebalų rūgščių substratams: *p*-NP dekanuotui (C₁₀) ir *p*-NP dodekanoatui (C₁₂). Dėl šių priežasčių nuspręsta aminorūgščių, formuojančių ryšius prijungiant substratą, analizę atlikti naudojant *p*-NP dodekanoatą ir GDEst-RM2 fermentą (3.10A pav.). 3D struktūros, sukurtos naudojant ColabFold (3.10 pav.) pasižymėjo aukštu tikslumu – aminorūgščių liekanų patikimumo įvertis (vadinamas pLDDT, išreiškiamas įverčiu nuo 1 iki 100) buvo didesnis nei 94,0; numanoma šablono modeliavimo (TM) vertė (vertė nuo 0 iki 1) buvo virš 0,940 visuose sugeneruotuose esterazės modeliuose. GDEst-RM2 mutanto LigPlot+ analizė (3.10B ir 3.10C pav.) parodė, kad dvi aminorūgščių liekanos (Ala109 ir Tyr311) formuoja vandenilinius ryšius su *p*-NP dodekanoatu. Ala109 buvo identifikuota kaip svarbi substratų prijungimui aminorūgštis 55 kDa dydžio *Geobacillus* karboksilesterazėse ankstesnių darbų metu (Liu et al., 2007). Tyr311 aminorūgštis kol kas nėra tirta ir yra naujas taikynys tolimesniems GDEst-95 esterazės ir kitų jai artimų karboksilesterazių tyrimams.

Analizuojant aminorūgštis, kurios GDEst-95 ir GDEst-RM2 fermentuose galimai formuoja hidrofobinius ryšius su substratu, nustatyta keletas skirtumų (3.10B ir 3.10C pav.). GDEst-RM2 turi du papildomus kontaktus ir iš viso, remiantis modeliu, 16 aminorūgščių formuoja hidrofobines sąveikas su *p*-NP dodekanoatu (GDEst-95 atveju hidrofobinių ryšių formavime su ligandu dalyvauja 14 aminorūgščių). Tarp šių variantų nustatyti 5 kontaktų skirtumai. GDEst-95 unikalūs kontaktai buvo Gly113 ir Gly107 (3.10B pav.), tuo tarpu GDEst-RM2: Leu226, Ala410 ir Leu413 (3.10C pav.). Leu226 ir Ala410 aminorūgščių svarba analizuota šiame darbe ir abu šių aminorūgščių mutantai pasižymėjo sumažėjusiu fermentiniu aktyvumu, taip patvirtinant šių aminorūgščių svarbą užtikrinant substratų prijungimą ir substratinį savitumą 55 kDa *Geobacillus* karboksilesterazėse. Leu413 formuoja naują, kol kas neanalizuotą ryšį su *p*-NP dodekanoatu. Ši aminorūgštis taip pat gali tarnauti kaip mutagenazės taikynys tolimesniuose šių esterazių tyrimuose.



3.10 pav. GDEst-RM2 numanoma 3D struktūra su prijungta *p*-NP dodekanoato molekule (violetinė) (A) ir LigPlot+ GDEst-95 (B) bei GDEst-RM2 (C) esterazės analizė. Skirtingos aminorūgščių liekanos, formuojančios hidrofobinius kontaktus su ligando molekule, pažymėtos mėlynai (unikalios GDEst-95) arba raudonai (unikalios GDEst-RM2).

Analizuojant tikslinius mutantus, tiek substrato-prijungimo modeliai, tiek ir eksperimentiniai rezultatai parodė reikšmingą laisvosios rišimosi energijos padidėjimą ir aktyvumo sumažėjimą lyginant Ala410Arg mutantą su nemodifikuota GDEst-95 esteraze. Leu411Ala mutanto, kuris pasižymėjo padidėjusiu savituoju aktyvumu, laisvoji rišimosi energija su trumpos ir vidutinės riebalų rūgščių ilgio grandinės substratais (C_4 - C_{10}) sumažėjo, tačiau prijungiant ilgesnę riebalų rūgščių grandinę turinčius substratus ($C > 10$) matomas laisvosios energijos padidėjimas. Gly108Arg analizė nesuteikė patikimų rezultatų, todėl jie nėra pateikiami.

3.2. GDEst-lip, GD-95RM ir GDEst-95 lipolizinių fermentų pritaikymas poliesterių skaidymui

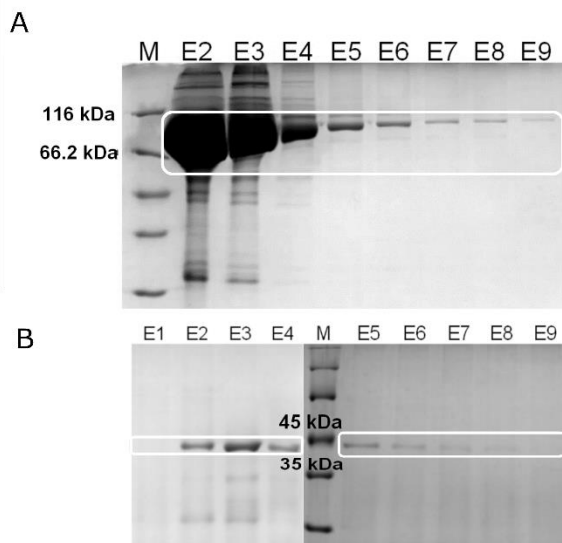
Kita šios disertacijos darbų kryptis – *Geobacillus* fermentų gebėjimo skaidyti poliesterus įvertinimas. Kaip pirminis poliesterių tyrimams pasirinktas PCL, kadangi tai vienas dažniausių, bioskaidžių poliesterių naudojamų norint parodyti tiriamų fermentų potencialą skaidyti plastikus. Šiame darbe kaip nauji perspektyvūs biokatalizatoriai poliesterių skaidymui testuoti ankstesnių darbų metu sukurti ir charakterizuoti GDEst-lip, GD-95RM ir GDEst-95 lipoliziniai fermentai. GDEst-lip – tai chimerinis baltymas, sudarytas iš *Geobacillus* sp. 95 kamieno esterazės (GDEst-95) ir lipazės (GD-95). Abejų genų atviro skaitymo rėmeliai buvo padauginti naudojant pradmenis, įterpiančius SacI restrikcijos endonukleazės atpažįstamą seką atitinkamo geno 5' arba 3' gale. Genai kartu susiūti naudojant T4 ligazę į vieną bendrą atviro skaitymo rėmelį, baltymo domenai perskirti dviejų aminorūgščių skirtuku (glutamo rūgšties ir leucino), dėl naudojamos restrikcijos endonukleazės. Lyginant su tėviniais fermentais, šis sulietas baltymas pasižymi didesniu aktyvumu (600 U/mg), tarpiniu giminingumu ilgos riebalų rūgšties grandinės ($C \geq 12$) substratams bei tarpiniu aktyvumu aukštose (65-70 °C) temperatūrose (Gudiukaite et al., 2017). Didelis aktyvumas, gebėjimas veikti aukštose temperatūrose ir organinių tirpiklių aplinkoje skatina vertinti ir plėsti šio fermento pritaikymo spektrą.

Kitas tiriamas fermentas GD-95RM – modifikuotas GD-95 lipazės (Gudiukaite ir kt., 2014) variantas, gautas po klaidingosios PGR eksperimentų ir pasižymintis trimis aminorūgščių pakaitais: Glu100Lys; Phe154Val; Val174Ile. Ši modifikuota lipazė pasižymi didesniu santykinu aktyvumu (1400 U/mg), žemesne optimalaus veikimo temperatūra, žemesniu temperatūrinio stabilumu ir didesniu giminingumu ilgos riebalų rūgšties grandinės ($C \geq 10$) substratams (Druteika et al., 2020). Tiek GDEst-lip, tiek GD-95RM fermentas pasirinkti šiam darbui, kadangi pasižymi dideliu santykinu aktyvumu ir aktyvumu aukštose temperatūrose. Tai pirmieji tyrimai, skirti įvertinti galimybę, taikyti *Geobacillus* bakterijų lipolizinius fermentus poliesterių (ateityje galimai ir kitų) plastikų degradacijai.

3.2.1 Optimalių PCL hidrolizės sąlygų nustatymas

PCL plėvelių hidrolizės eksperimentams GDEst-lip, GD-95RM ir GDEst-95 sintezės ir gryninimo sąlygos buvo optimizuotos ankstesnių darbų metu (Gudiukaite et al., 2017; Druteika et al., 2020; Greicius et al., 2023). Atlikta NDS-PAGE parodė, jog gryninimas taikant IMAC buvo sėkmingas (3.11

pav.). Pateikta tik GDEst-lip ir GD-95RM fermentų analizė, kadangi tolimesniuose tyrimuose poliesterių degradacijos potencialą parodė tik šie fermentai.



3.11 pav. GDEst-lip (A) ir GD-95RM (B) gryninimo NDS-PAGE analizė. M – Pierce™ Unstained Protein MW molekulinės masės žymuo; E1 – E9 eliacijos frakcijos, tiksliniai baltymai pažymėti balta spalva.

Gautų baltymų dydžiai atitiko teorinį GDEst-lip (98 kDa) ir GD-95RM (43 kDa) fermentų molekulinį dydį. Frakcijos, kuriose po NDS-PAGE buvo matomas tikslinis baltymas, buvo sumaišytos ir naudotos tolimesniuose PCL degradacijos eksperimentuose (skyriai 3.2.2; 3.2.3 ir 3.2.4).

Norint nustatyti optimalias PCL hidrolizės sąlygas, įvertintas temperatūros poveikis (30 °C ir 50 °C), fermento kiekis (0,05/ 0,1/ 0,15 mg) ir hidrolizės laikas (1/ 2/ 4/ 8/ 24 val.), reikalingas suskaidyti skirtingos molekulinės masės (M_n 45000 ir M_n 80000) PCL plėveles (3.3 lentelė).

Rezultatai parodė, kad GD-95RM lipazė ir GDEst-lip sulietas fermentas sėkmingai gali degraduoti PCL plėveles (3.3 lentelė). *Geobacillus* sp. 95 esterazė reikšminga PCL plėvelių degradacija nepasižymėjo, todėl tolimesniuose tyrimuose nenaudota.

3.3 lentelė. GD-95RM ir GDEst-lip gebėjimo vykdyti PCL₄₅₀₀₀ ir PCL₈₀₀₀₀ plėvelių degradaciją optimizavimas.

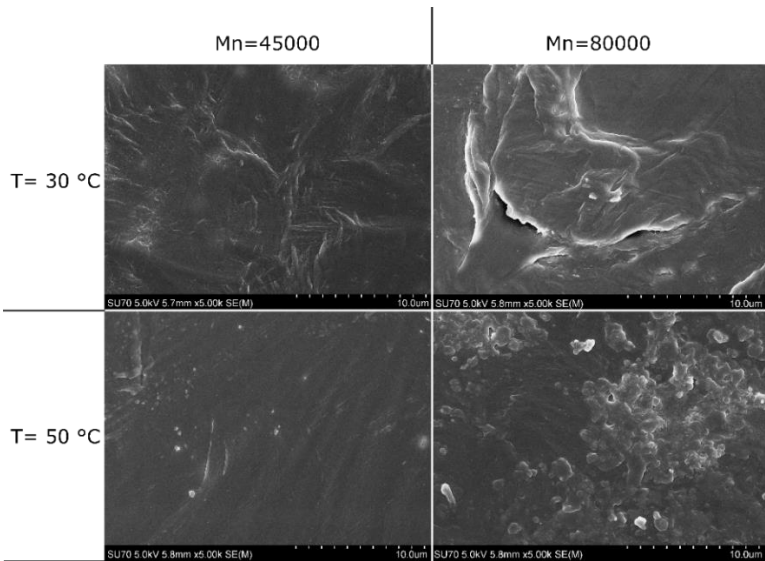
Fermentas	Fermento kiekis mišinyje, mg	Temperatūra, °C	Hidrolizės efektyvumas, %	
			PCL ₄₅₀₀₀	PCL ₈₀₀₀₀
GD-95RM	0,05	50	67,67±10,02	61,50±4,95
	0,1		84,00±1,00	76,00±5,66
	0,15		85,00±4,00	82,00±1,41
	0,05	30	30,00±8,46	39,40±5,13
	0,1		78,33±8,02	71,00±8,49
	0,15		73,00±12,17	78,50±3,54
GDEst-lip	0,05	50	55,50±11,96	71,00±3,27
	0,1		67,67±10,02	84,00±4,24
	0,15		87,67±10,97	85,50±10,61
	0,05	30	20,33±1,53	16,80±3,70
	0,1		22,33±2,52	18,50±0,71
	0,15		20,00±5,20	24,50±5,57

Tyrimė nutarta testuoti 30 °C ir 50 °C temperatūrą, kadangi žemesnių temperatūrų naudojimas sumažina reakcijos energetinius kaštus, tuo tarpu šių fermentų optimali veikimo temperatūra yra aukštesnė (GD-95RM – 50 °C ir GDEst-lip – 60 °C). Svarbu paminėti, jog aukštesnėse temperatūrose (> 60 °C) PCL pradeda lydėtis, tad jas testuoti nėra prasminga. Norint taikyti šiuos fermentus pramoniniuose procesuose galima modeliuoti dvi strategijas: a) naudoti aukštesnę temperatūrą ir mažesnę baltymo koncentraciją arba b) naudoti žemesnę temperatūrą ir didesnę baltymo kiekį. Rezultatai parodė, kad po 24 val. degradacijos 50 °C temperatūroje, abu fermentai hidrolizavo daugiau negu 40 % PCL plėvelės masės naudojant 0,05 mg fermento. 30 °C temperatūroje GD-95RM (0,05 mg/mL) ir GDEst-lip (visos testuotos baltymo koncentracijos) hidrolizavo 20-40 % PCL plėvelių masės per 24 val. (3.3 lentelė).

Remiantis gautais duomenimis, 0,1 mg yra pakankamas ir optimalus GD-95RM fermento kiekis, galintis efektyviai suskaidyti 70 % PCL plėvelės masės 30 °C temperatūroje. Reikšmingas skirtumas skaidant PCL plėveles naudojant 0,1 mg ar 0,15 mg fermento nebuvo nustatytas. Reikšmingų skirtumų taip pat nenustatyta ir skaidant skirtingos molekulinės masės PCL plėveles.

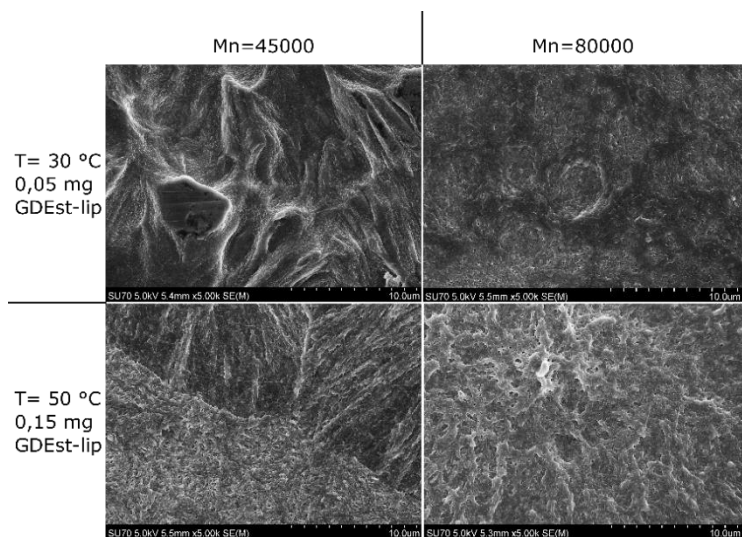
Plėvelių paviršiaus pokyčiai po poveikio GDEst-lip ir GD-95RM fermentais vertinti taikant SEM. Prieš degradaciją PCL plėvelės pasižymėjo

vientisu paviršiumi, kuris nepakito per 24 val. nuo inkubacijos pradžios buferiniame tirpale be fermento (3.12 pav.). Aukštesnė temperatūra (50 °C) taip pat neturėjo reikšmingo poveikio plėvelės struktūrai.



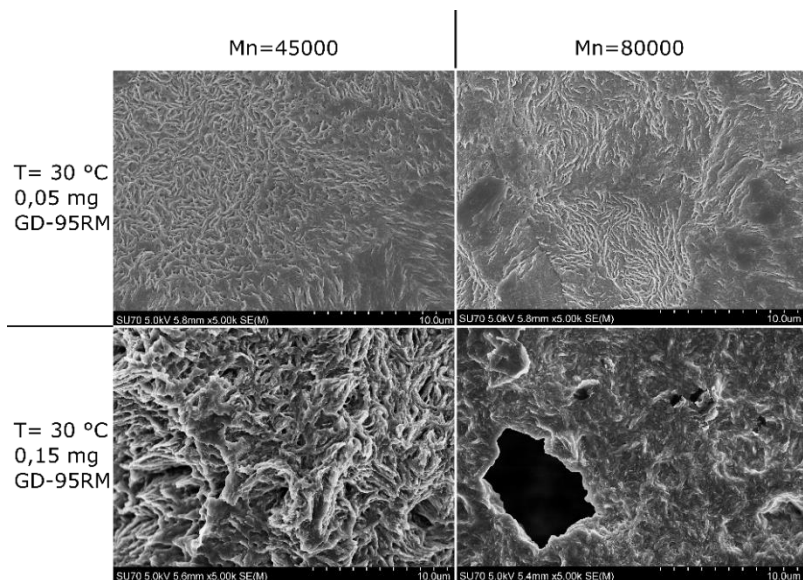
3.12 pav. Skirtingų PCL plėvelių (Mn_{45000} ir Mn_{80000}) SEM mikroskopijos analizė. Kontroliniai mėginiai, kur PCL plėvelės nepaveiktos fermentais. Naudotas 5000 kartų didinimas.

SEM analizė atskleidė, kad net poveikis mažiausia testuota GDEst-lip koncentracija (0,05 mg) ir reakciją vykdant 30 °C temperatūroje sukelia PCL plėvelių paviršiaus nelygumus (3.13 pav.). Naudojant didesnę fermento kiekį (0,15 mg) ir aukštesnę reakcijos temperatūrą netolygumai matomi visame vizualizuotame plėvelės plote, o tai atitinka daugiau nei 75 % PCL plėvelės masės sumažėjimo.



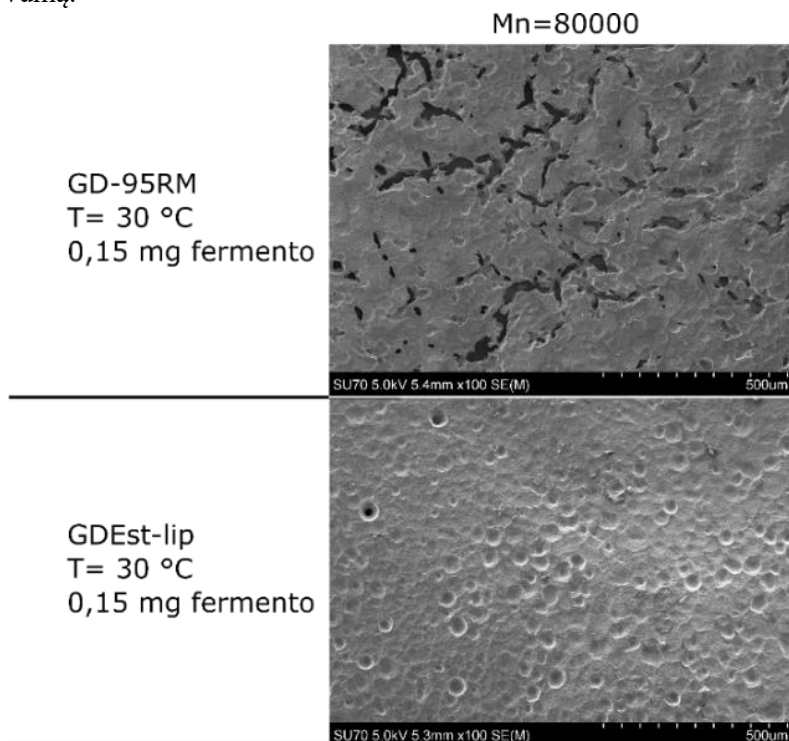
3.13 pav. Skirtingų PCL plėvelių (Mn_{45000} ir Mn_{80000}), paveiktų skirtinga GDEst-lip koncentracija ir esant skirtingai reakcijos temperatūrai, SEM analizė. Naudotas 5000 kartų didinimas.

Vertinant GD-95RM lipazės poveikį PCL plėvelėms (3.14 pav.) ir jį lyginant su GDEst-lip fermentu, SEM analizėje matomi reikšmingi skirtumai. GD-95RM lipaze paveiktos PCL plėvelės paviršius buvo labiau grublėtas ir netolygus. Tai koreliuoja su PCL hidrolizės optimizavimo eksperimentų duomenimis, kai analizuotomis sąlygomis GD-95RM lipazė degradavo virš 70 % PCL plėvelės biomasės.



3.14 pav. Skirtingų PCL plėvelių (Mn_{45000} ir Mn_{80000}), paveiktų skirtingu GD-95RM kiekiu, SEM analizė. Naudotas 5000 kartų didinimas.

Naudojant didesnes GD-95RM fermento koncentracijas (0,1 – 0,15 mg) pastebėtas ermtių formavimasis PCL₄₅₀₀₀ ir PCL₈₀₀₀₀ plėvelių paviršiuje (3.14 ir 3.15 pav.). Tikėtina, jog PCL plėvelių degradacija vyksta netolygiai per visą plėvelės paviršių, besiformuojančios ermtės didėja, kol virsta kiaurymėmis. Tuo tarpu GDEst-lip pasižymi švelnesne degradacija (3.15 pav.). Svarbu paminėti, jog GD-95RM lipazė pasižymi didesniu savituoju aktyvumu (~1400 U/mg), lyginant su GDEst-lip (600 U/mg). Tikėtina, jog tai nulemia skirtingą abiejų fermentų poveikį PCL plėvelių paviršiui ir PCL degradacijos efektyvumą.



3.15 pav. PCL plėvelių, paveiktų GD-95RM ir GDEst-lip fermentais (24 val.) paviršiaus analizė taikant SEM. Naudotas 100 kartų didinimas. Pateikiama PCL Mn₈₀₀₀₀ analizė, kadangi su PCL Mn₄₅₀₀₀ gauti analogiški rezultatai.

Kadangi fermentinė PCL degradacija buvo nustatyta visomis testuotomis reakcijos sąlygomis, tolimesniems eksperimentams pasirinkta naudoti 0,05 mg atitinkamo fermento kiekį, reakciją vykdyti 30 °C temperatūroje. Nors šios sąlygos nebuvo optimalios, jos leidžia įvertinti kitų faktorių, pvz. alkoholių (3.2.2 skyrius) poveikį šių fermentų aktyvumui ir PCL degradacijos efektyvumui. Naudojant didesnes fermentų koncentracijas, fermentų aktyvacijos atveju, didelė tikimybė, jog visa plėvelė bus suskaidyta ir nepavyks įvertinti degradacijos skirtumų.

3.2.2. Alkoholių poveikis GD-95RM ir GDEst-lip fermentų vykdomai PCL plėvelių degradacijai

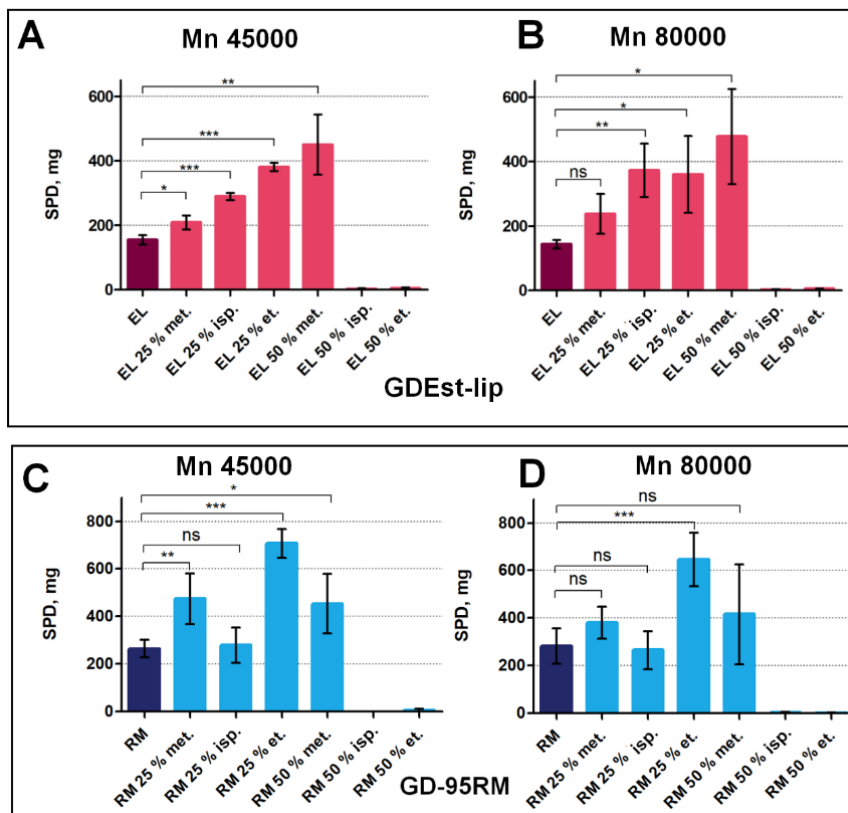
Ankstesnių tyrimų metu nustatyta, kad *Geobacillus* sp. 95 sintetinami lipoliziniai fermentai bei jų variantai, sukurti taikant baltymų inžinerijos metodus, pasižymi stabilumu organiniuose tirpikliuose, o kai kuriais atvejais organiniai tirpikliai net gali pagerinti šių fermentų aktyvumą. Parodyta, kad GD-95RM ir GDEst-lip yra stabili arba aktyvuojama 25 ar 50 % metanolyje ir etanolyje (Savickaite et al., 2021a). Buvo iškelta hipotezė, kad tam tikrų organinių tirpiklių – alkoholių – naudojimas gali padidinti ir PCL plėvelių degradacijos efektyvumą. Taip pat buvo įvertinta, ar PCL plėvelės veikia patys alkoholiai.

Šio eksperimento metu įvertinta 25 % ir 50 % (v/v) metanolio, etanolio, izopropanolio, 2- butanolio, 1-oktanolio ir izoamilo alkoholio poveikis GD-95RM ir GDEst-lip gebėjimui skaidyti PCL plėvelės (3.16 pav.). PCL plėvelių degradacija nebuvo nustatyta naudojant tiriamuosius fermentus ir 2-butanolį, 1-oktanolį ir izoamilo alkoholį.

Siekiant pateikti standartizuotą skaidymo efektyvumo įvertinimą ir geriau palyginti tarpusavyje tiek pačių fermentų efektyvumą, tiek alkoholių įtaką, įvesti SPD (standartiniai PCL degradacijos vienetai) sąvoka. SPD leidžia pateikti, koks PCL kiekis miligramais yra suskaidomas per 24 valandas, naudojant 1 mg fermento, 30 °C temperatūroje. Pradinė PCL plėvelių masė gali skirtis, todėl SPD įvedimas leidžia tiksliau įvertinti skaidymo efektyvumą. Rezultatai parodė, kad naudojant GDEst-lip, be papildomų organinių tirpiklių, vidutinės SPD vertės skaidant PCL₄₅₀₀₀ ir PCL₈₀₀₀₀ atitinkamai siekė 145,5 mg ir 134,0 mg (3.16A ir 3.16B pav.). Remiantis gautais rezultatais galima teigti, kad 25 % metanolio, 25 % etanolio, 25 % izopropanolio ir 50 % metanolio turėjo teigiamą poveikį GDEst-lip katalizuojamai PCL hidrolizės reakcijai. Teigiamas poveikis nustatytas nepriklausomai nuo naudojamos PCL plėvelės vidutinės molekulinės masės (vienintelė išimtis nustatyta skaidant PCL₈₀₀₀₀ plėvelės, naudojant 25 % metanolį – nors vidutinė SPD vertė buvo didesnė, rezultatai nėra statistiškai reikšmingi (3.16B pav.)) Didžiausios SPD reikšmės nustatytos reakcijos mišinį papildžius 50 % metanoliumi ir siekė 442,7 mg ir 472,0 mg (atitinkamai skaidant PCL₄₅₀₀₀ ir PCL₈₀₀₀₀). Tai rodo PCL plėvelių skaidymo efektyvumo padidėjimą, atitinkamai, 3 ir 3,5 kartų.

Vidutinės SPD reikšmės naudojant GD-95RM, be papildomų organinių tirpiklių, siekė 264,0 mg ir 280,7 mg, hidrolizuojat PCL₄₅₀₀₀ ir PCL₈₀₀₀₀ plėvelės. Skaidant PCL₄₅₀₀₀ plėvelės (3.16C pav.) statistiškai reikšmingas teigiamas poveikis nustatytas reakcijos mišinį papildžius 25 % metanolio,

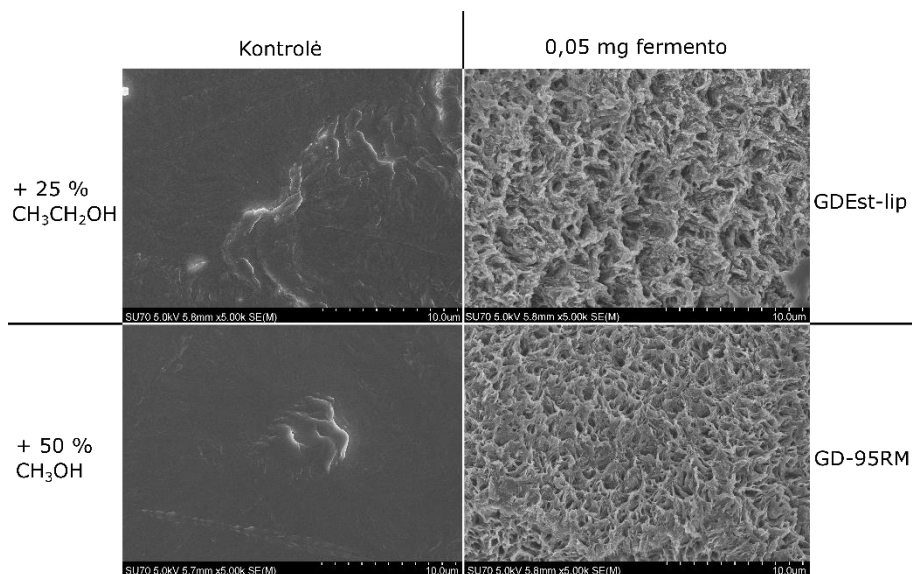
25 % etanolio ar 50 % metanolio. Didžiausia SPD vertė nustatyta naudojant 25 % etanolį – 706,0 mg (SPD padidėjo 2,7 karto). Naudojant 25 % izopropanolį statistiškai reikšmingas skaidymo efektyvumo padidėjimas nenustatytas. Skaidant PCL₈₀₀₀₀ plėveles (3.16D pav.) statistiškai reikšmingas organinių tirpiklių poveikis nustatytas tik naudojant 25 % etanolį – 646,0 mg (SPD padidėjo 2,3 karto). Taikant kitus organinius tirpiklius statistiškai reikšmingo SPD padidėjimo nenustatyta. Tiek GDEst-lip, tiek GD-95RM fermento atveju 50 % etanolio ir izopropanolio visiškai slopino PCL plėvelių degradacijos reakciją (3.16 pav.).



3.16 pav. Trumpos grandinės anglies atomų ilgio alkoholių poveikis PCL plėvelių hidrolizei naudojant GDEst-lip (A, B) ir GD-95RM (C, D) fermentus. Mn – vidutinė PCL molekulinė masė; SPD – standartizuoti PCL degradacijos vienetai; met – metanolis; isp – izopropanolis; et – etanolis. * – $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$; *** – $p \leq 0,001$; ns – rezultatai nėra statistiškai reikšmingi.

Gauti rezultatai parodė, kad alkoholiai gali reikšmingai pagerinti GDEst-lip ir GD-95RM fermentų gebėjimą hidrolizuoti PCL plėveles. Tolimesniuose tyrimuose pasirinkta naudoti GDEst-lip ir 50 % metanolio derinį bei GD-95RM derinį su 25 % etanolio koncentracija.

PCL plėvelės, paveiktos alkoholiais ir tiriamais fermentais taip pat buvo analizuotos taikant SEM (3.17 pav.). Reikšmingų skirtumų analizuojant kontrolines, vien tik alkoholiais paveiktas PCL₄₅₀₀₀ ir PCL₈₀₀₀₀ plėveles, tiek SEM analizės metu, tiek vertinant masės pokytį, nenustatyta (3.17 pav.). Tai rodo, jog nustatyti pokyčiai yra dėl fermentų veiklos ir alkoholiai, labiausiai tikėtina, veikia aktyvuodami GDEst-lip ir GD-95RM fermentus, o ne darydami poveikį pačioms PCL plėvelėms. Naudojant organinių tirpiklių ir fermentų derinį plėvelių paviršius tapo netolygus ir grublėtas (3.17 pav.). Vizualiai PCL plėvelių paviršius nelygumai, yra ryškesni, reakcijos mišinį papildžius organiniu tirpikliu, abiejų fermentų atveju (3.14 ir 3.17 pav.).



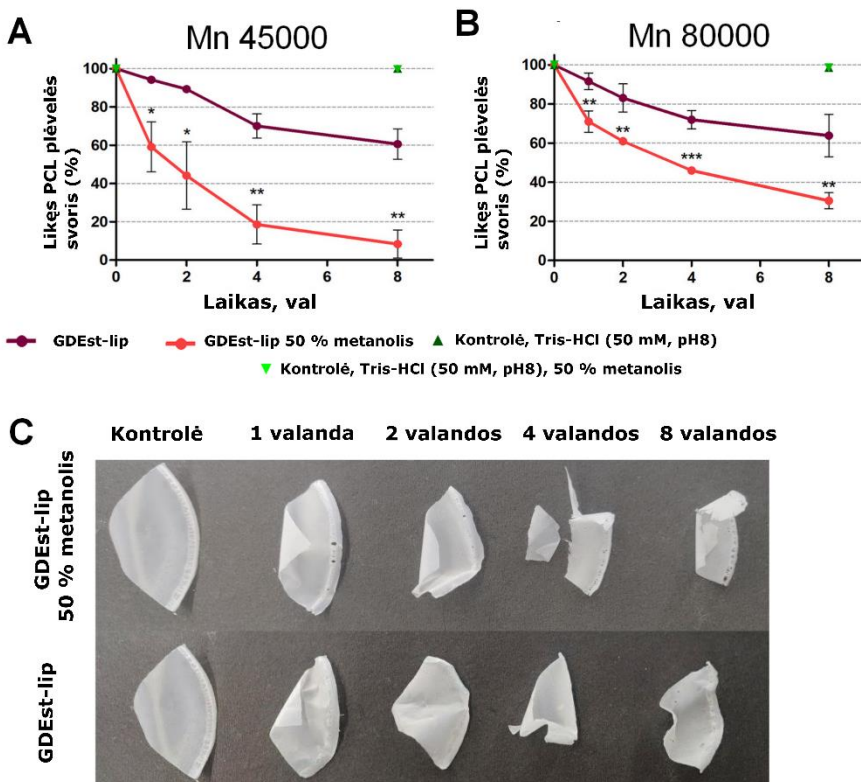
3.17 pav. PCL₈₀₀₀₀ plėvelių, paveiktų GD-95RM ir etanoliu (25 %) bei GDEst-lip ir metanoliu (50 %) analizė, taikant SEM. Kontrolė – PCL₈₀₀₀₀ plėvelės paveiktos tirpalu be fermento. Reakcijos vykdytos 24 val., 30 °C temperatūroje. Naudotas 5000 kartų didinimas.

Tiek liekamoji PCL plėvelių masė, tiek ir SEM analizė rodo efektyvesnę plėvelių skaidymą reakcijos mišinį papildžius organiniais tirpikliais. Gauti rezultatai leidžia teigti, jog naudojant mažesnes fermento koncentracijas ir tinkamą organinį tirpiklį galima gauti efektyvų PCL plėvelių skaidymą.

3.2.3. PCL plėvelių skaidymo dinamikos analizė

Norint įvertinti galimybę suskaidyti PCL plėveles per trumpesnę laiko tarpą bei nustatyti, ar bėgant laikui keičiasi degradacijos greitis ir efektyvumas, buvo atliktas PCL plėvelių skaidymo dinamikos įvertinimas. Eksperimentai atlikti naudojant didesnę fermento koncentraciją – 0,5 mg, kadangi reakciją

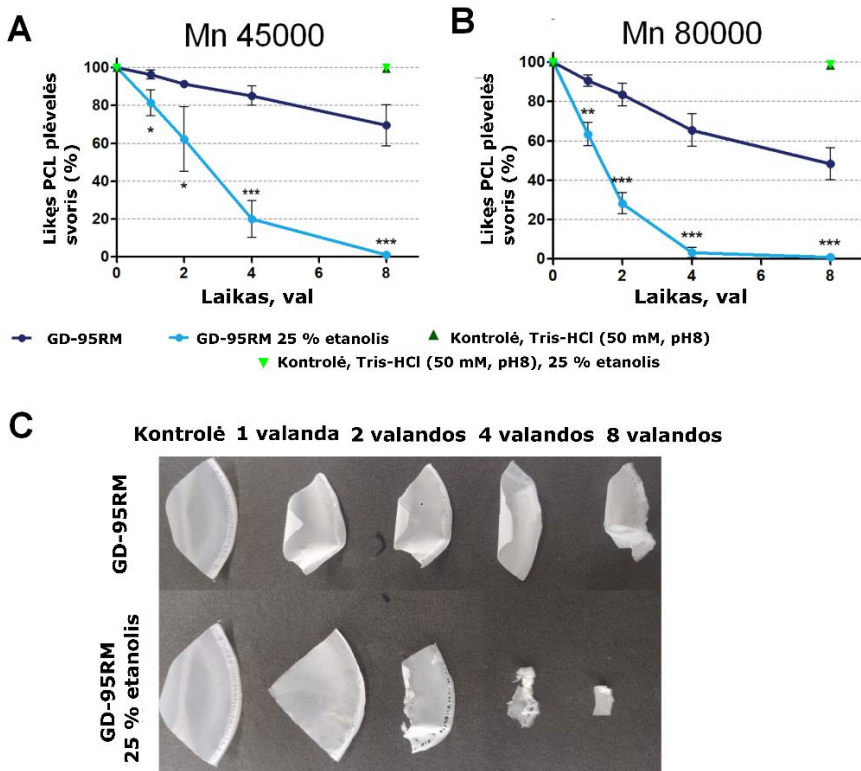
vykdyti trumpiau, bet naudoti didesnę baltymo koncentraciją gali būti dar viena realaus fermentų taikymo strategija. PCL plėvelių degradacijos dinamika analizuota tiek plėvelės paveikus vien tik tiriamų fermentų tirpalu, tiek reakcijos mišinį papildžius organiniu tirpikliu (GDEst-lip atveju 50 % metanoliu; GD-95RM – 25 % etanoliu). Degradacija vertinta 8 valandų intervale (po 1, 2, 4 ir 8 valandų poveikio), reakciją atliekant 30 °C temperatūroje, taip siekiant sudaryti mažiausiai kaštų reikalaujančias sąlygas poliesterių skaidymui. Remiantis gautais rezultatais, GDEst-lip (0,5 mg) gali suskaidyti 40 % (PCL₄₅₀₀₀) ir 36 % (PCL₈₀₀₀₀) per 8 valandas (3.18 pav.). Reakcijos mišinį papildžius 50 % metanoliu gautas ~2,25 kartus didesnis PCL₄₅₀₀₀ masės pokytis (suskaityta 90 % plėvelės) (3.18A pav.) ir 2 kartus didesnis masės pokytis (suskaityta 70 % plėvelės) PCL₈₀₀₀₀ atveju (3.18B pav.). Vizualiniai morfologijos pokyčiai pateikiami 3.18C paveiksle.



3.18 pav. Degradacijos dinamika skaidant PCL₄₅₀₀₀ (A) ir PCL₈₀₀₀₀ (B) plėvelės, naudojant tik GDEst-lip fermentą bei reakcijos mišinį papildžius 50 % metanolio, bei vizualiniai PCL₈₀₀₀₀ plėvelės skaidymo pokyčiai (C). * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

GD-95RM (0,5 mg) per 8 valandas suskaidė 30 % PCL₄₅₀₀₀ (3.19A pav.) ir 50 % PCL₈₀₀₀₀ (3.19B pav.). Reakcijos mišinį papildžius 25 % etanolio

hidrolizės greitis padidėjo daugiau negu 2,5 karto PCL₄₅₀₀₀₀ atveju ir daugiau negu du kartus PCL₈₀₀₀₀ atveju (3.19 pav.). Skaičiavimai parodė, kad taikant GD-95RM ir 25 % etanolio derinį SPD siekė 706,00 mg lyginant su 264,00 mg hidrolizuojant PCL₄₅₀₀₀₀ plėveles bei 646,00 mg lyginant su 280,7 mg hidrolizuojant PCL₈₀₀₀₀. Abejais atvejais per 8 valandas PCL plėvelė buvo pilnai suskaidyta. Vizualiniai PCL₈₀₀₀₀ plėvelės pokyčiai pateikiami 3.19C paveiksle.



3.19 pav. Degradacijos dinamika skaidant PCL₄₅₀₀₀ (A) ir PCL₈₀₀₀₀ (B) plėveles, naudojant tik GD-95RM fermentą bei reakcijos mišinį papildžius 25 % etanolio bei vizualiniai PCL₈₀₀₀₀ plėvelės skaidymo pokyčiai (C). * – $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$; *** – $p \leq 0,001$.

Remiantis gautais rezultatais galima daryti prielaidą, jog naudojant GDEstlip ir GD-95RM fermentus PCL plėvelių skaidymas vyksta gana pastoviu greičiu. Mėginiuose, kurie nebuvo papildyti organiniu tirpikliu, matomas linijiškas plėvelių masės mažėjimas. Gauti rezultatai taip pat rodo, kad skaidymo dinamika nepriklauso nuo naudojamo PCL Mn, kadangi gauti labai artimi grafikų profiliai. Hidrolizės mišinį papildžius atitinkamu organiniu tirpikliu naudotas fermentų kiekis (0,5 mg) yra pakankamas 8 valandų bėgyje suskaidyti didžiąją dalį plėvelės, o GD-95RM atveju net ir per 4 valandas buvo

suskaidyta daugiau negu 80 % PCL plėvelės masės. Natūralu, kad sumažėjus substrato kiekiui reakcija pradeda lėtėti, todėl skaidymo dinamika atitinka neigiamos eksponentinės funkcijos formą.

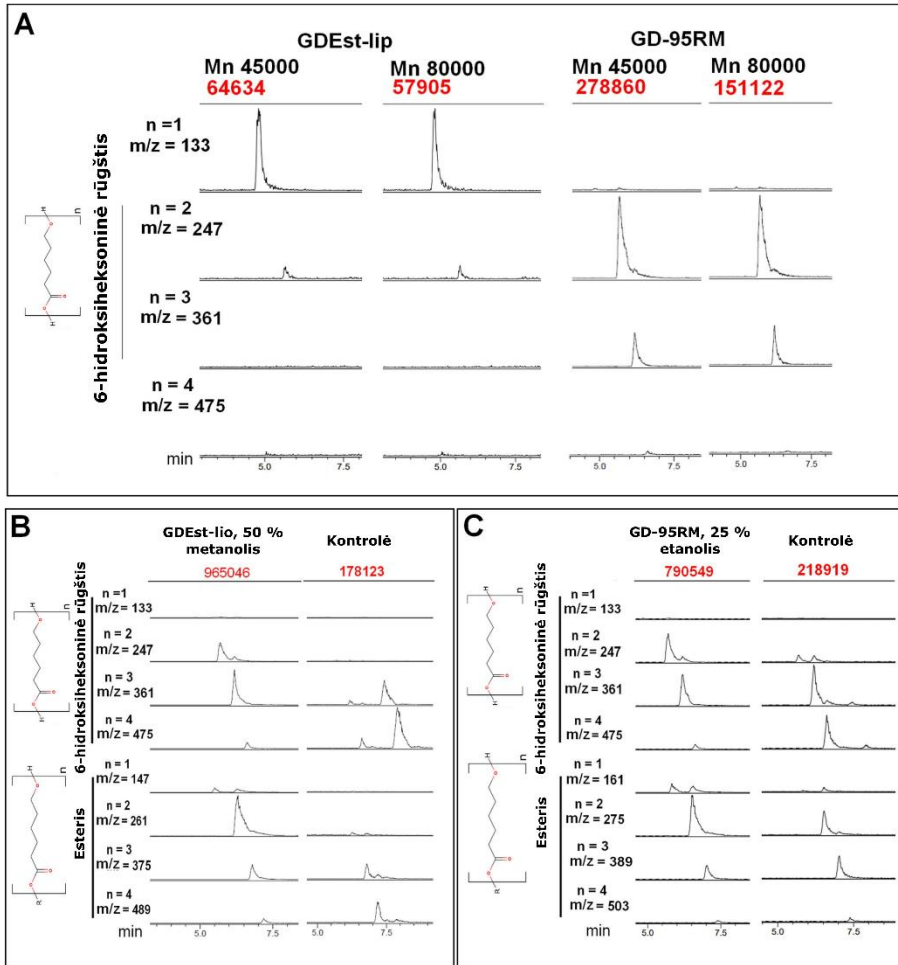
3.2.4. PCL hidrolizės produktų ir gautų esterių nustatymas

Siekiant nustatyti PCL degradacijos produktus, buvo atlikta didelio našumo skysčių chromatografija su tandemine masių spektrometrija (HPLC-MS). Remiantis PCL struktūra, numanomas galutinis PCL hidrolizės produktas yra 6-hidroksiheksoninė rūgštis (6HHA) (PubChem Identifikacijos numeris: CID 14490) ir jos oligomerai (3.4 lentelė).

3.4 lentelė. Linijinių, vandenyje tirpių PCL degradacijos produktų pikų priskyrimas pagal masės-krūvio santykį (m/z).

Linijinis produktas	Molekulinė formulė	Mw, Da	m/z , teigiamas
6HHA	$C_6H_{11}O_3$	132	133
6HHA dimerai	$C_{12}H_{21}O_5$	246	247
6HHA trimerai	$C_{18}H_{31}O_7$	360	361
6HHA tetramerai	$C_{24}H_{41}O_9$	474	475

HPLC-MS analizė leido nustatyti 6HHA ($m/z= 133$) ir jos oligomerus – dimerus ($m/z= 247$), trimerus ($m/z= 361$) ir tetramerus ($m/z= 475$), gautus po PCL plėvelių hidrolizės eksperimentų. Rezultatai parodė, kad po poveikio GD-95RM susidaro 6HHA dimerai ir 6HHA trimerai (nustatyti didžiausi intensyvumo pikai) (3.20A pav.). Tikėtina, jog šie junginiai yra pagrindiniai galutiniai hidrolizės produktai PCL plėvelių skaidymui naudojant GD-95RM lipazę. Nors GDEst-lip pasižymėjo mažesniu hidrolizės efektyvumu (3.3 lentelė, 3.16 pav.), naudojant šį fermentą dominuojantis PCL plėvelių skaidymo produktas yra 6-hidroksiheksoninė rūgštis (3.20A pav.). Kontrolinių mėginių HPLC-MS analizė parodė galimą nežymią autohidrolizę (1 priedas. 1 pav.), visgi kontroliniuose mėginiuose susiformavusių 6HHA monomerų ir oligomerų intensyvumas gerokai mažesnis, o tai rodo mažesnę šių junginių koncentraciją mėginyje. Vertinant hidrolizės metu susidarančių skaidymo produktų HPLC-MS profilius, reikšmingų skirtumų skaidant PCL₄₅₀₀₀ ar PCL₈₀₀₀₀ plėveles nenustatyta.



3.20 pav. PCL₄₅₀₀₀ ir PCL₈₀₀₀₀ plėvelių hidrolizės produktų analizė HPLC-MS, degradacijai naudojant tik GD-95RM ir GDEst-lip fermentus (A) bei reakcijos mišinį papildžius alkoholiu: GDEst-lip + 50 % metanolio (B) ir GD-95RM + 25 % etanolio (C). „n“ – oligomerų sudarančių 6HHA molekulių skaičius. Pikų intensyvumas (y ašies skalė) pateikiama raudonais skaičiais virš grafikų.

Kaip buvo aptarta anksčiau, lipoliziniai fermentai gali atlikti esterinimo ir peresterinimo reakcijas (skyrius 1.1.3). Reakcijos mišiniuose esantis metanolis arba etanolis gali pakeisti vandenį ir atlikti nukleofilinę ataką į fermento-substrato kompleksą, taip išlaisvinant esterį ir regeneruojant fermentą. Lipoliziniai fermentai taip pat gali atlikti tiesioginę esterių sintezės reakciją, kai fermentas suformuoja esterinį ryšį tarp alkoholio ir karboksirūgšties. Šiuo atveju buvo nuspręsta įvertinti, ar vykdant PCL hidrolizę organinių tirpiklių aplinkoje susiformuoja ne tik 6HHA, bet ir jos esteriai. Esteriai yra plačiai naudojami maisto ir kosmetikos pramonės sektoriuose, norint suteikti norimus kvapus arba skonius. Etil-6-

hidroksiheksanoatas yra randamas Bordo vynuose (Villière et al., 2019), yra naudojamas *in vitro* alergijų diagnostikoje, ruošiant specifinio giminingumo reagentus arba sintetinant tarpinius junginius (fenolio karbonato esterius) vaistų gamyboje (Ostergaard ir Larsen, 2007). Vykdamas PCL hidrolizę, naudojant GD-95RM ir GDEst-lip fermentus, kai reakcijos aplinkoje yra alkoholių, galima būtų ne tik pašalinti PCL atliekas, bet kartu sukurti ir didesnę ekonominę vertę turinčius 6HHA rūgšties esterius vieno kombinuoto proceso metu. Rezultatai parodė, kad PCL plėvelių degradavimo mišinius papildžius alkoholiais, abiejų fermentų atveju susidaro ne tik PCL degradacijos produktai – 6HHA, jos dimerai ar trimerai, bet taip pat yra aptinkami ir etil-6-hidroksiheksanoatas ar metil-6-hidroksiheksanoatas, priklausomai nuo naudojamo alkoholio (3.20B ir 3.20C pav.). Reakcijų metu susidarę etil-6-hidroksiheksanoato ir metil-6-hidroksiheksanoato buvo identifikuoti remiantis žinoma molekuline mase PubChem duomenų bazėje (identifikaciniai numeriai: CID 357781 ir CID 3083855, atitinkamai). Nors kontroliniuose mėginiuose taip pat nustatytas esterių susidarymas, gautų produktų intensyvumo pikai reakcijos mišiniuose su fermentais yra reikšmingai didesni. Šių tyrimų metu gauti rezultatai pirmą kartą parodė galimą modifikuotų *Geobacillus* sp. lipolizinių fermentų ne tik panaudojimą efektyviam PCL skaidymui, bet ir kombinuotai esterių sintezei.

4. APTARIMAS

Nors fermentai yra plačiai taikomi pramonėje, o biokatalizatoriai atstovauja pramonės šaką, kurios vertė siekia milijardus (Badenhorst ir Bornscheuer, 2018), geresnėmis savybėmis pasižyminčių fermentų inžinerija vis dar išlieka viena pagrindinių priemonių kurti geresnėmis savybėmis pasižyminčius biokatalizatorius. Viena didžiausių šių dienų problemų, kurią fermentai galėtų padėti išspręsti, yra plastiko tarša. Nors daugelio plastikų skaidymas vis dar išlieka problematiškas, fermentai (lipazės, esterazės, kutinazės ir PETazės) jau yra parodę nemenką potencialą hidrolizuojant esterines jungtis turinčius plastikus. Visgi, kaip ir bet koks įrankis, tiek fermentai, tiek poliesterių skaidymo procesas gali ir turi būti toliau optimizuojami. Tai galima daryti tiek taikant esamas baltymų inžinerijos strategijas, tiek ieškant naujų, netirtų arba menkai tirtų fermentų. Tokios inovacijos yra reikalingos ne tik norint pagerinti esamus procesus, tačiau, taip pat gali būti pradžia, siekiant žinomus fermentus panaudoti naujose srityse. Šioje disertacijoje nagrinėjami du lipolizinių fermentų aspektai: 1) taikant kryptingą evoliuciją ir racionalius metodus analizuota menkai tirta *Geobacillus* sp. 95 sintetinama 55 kDa dydžio esterazė, taip pat 2) įvertintas modifikuotų *Geobacillus* sp. 95 lipolizinių fermentų gebėjimas skaidyti polikaprolaktoną ir kartu formuoti jo skaidymo produktų esterius, taip pritaikant žiedinės ekonomikos principus.

Esterazė GDEst-95 pirmą kartą buvo aprašyta ankstesnių darbų metu (Gudiukaite et al., 2017) – tai karboksilesterazių klasei priskiriamas fermentas, išsiskiriantis savo dydžiu – dauguma literatūroje aprašytų *Geobacillus* spp. esterazių pasižymi mažesniu dydžiu – 35 kDa. Taip pat, struktūriškai labai panaši esterazė – Est55, kitų autorių buvo parodyta, kaip perspektyvus fermentas farmacijoje. Ši 55 kDa *Geobacillus stearothermophilus* karboksilesterazė pasižymėjo gebėjimu katalizuoti irinotekano (CPT-11) hidrolizę į 7-etil-10-hidroksikamtotekiną (SN-38) – topoizomerazės I inhibitorių, naudojama vėžio terapijoje (Liu et al., 2007). Tolimesnių tyrimų metu GDEst-95 fermentas sėkmingai pritaikytas baltymų inžinerijos eksperimentuose: GDEst-95 esterazė buvo sulietas su GD-95 lipaze, taip gaunant GDEst-lip sulietą fermentą, pasižymintį pramonei patraukliomis savybėmis (aktyvumu aukštose temperatūrose, dideliu savituoju aktyvumu, temperatūriniu stabilumu ir atsparumu organiniams tirpikliams) (Gudiukaite et al., 2017). Šio tyrimo metu GDEst-lip fermentas taip pat buvo sėkmingai pritaikytas PCL plėvelių skaidymui ir esterių sintezei organinių tirpiklių aplinkoje.

Norint geriau suprasti GDEst-95 fermento veikimą buvo atlikta tikslinė numanomų svarbių aminorūgščių mutagenezė. Remiantis ankstesnių darbų analize, tikslinei GDEst-95 mutagenezei pasirinkti taikiniai: Gly108, Ala410, Leu226 ir Leu411 (Gudiukaite et al., 2017). Gly108 lokalizuotas santykinai netoli katalizinio serino (Ser194). Remiantis trimačiu modeliu, atstumas tarp šių aminorūgščių yra apie 4 Å ir yra mažesnis negu atstumas tarp Ser194 ir His409, atsakingo už serino deprotonavimą ir vandens/alkoholio stabilizavimą šiems atakuojant fermento-acil kompleksą (Aranda et al., 2014). Taigi, buvo keliami hipotezė, kad modifikacija šioje padėtyje galėtų turėti didelį poveikį fermento veikimui arba substrato rišimuisi. Atsižvelgiant į tai, jog glicinas yra mažiausia aminorūgštis, nutarta ją pakeisti į didesnę, arginino aminorūgštį ir įvertinti šoninės grupės įtaką substrato prijungimui ir GDEst-95 esterazės aktyvumui. Taip pat svarbu aspektas – remiantis LED duomenų baze, šalia Gly108 esanti Ala109 liekana yra atsakinga už oksianijoninės ertmės formavimą, todėl Gly108Arg modifikacija galėtų trikdyti pereinamųjų reakcijų stabilizavimą.

Ala410 yra lokalizuota šalia katalizinio His409. Paprastai, vertinant aminorūgšties poveikį fermento veikimui, ji yra keičiama į alaniną, kadangi tai maža, inertiška, trumpą šoninę grandinę turinti aminorūgštis, leidžianti įvertinti kaip šoninės grupės pašalinimas paveikia fermento veikimą, tuo pačiu išlaikant identišką aminorūgščių sekos ilgį. Kadangi aminorūgštys Gly108 ir Ala410 yra labai panašios struktūros, buvo nuspręsta Ala410 taip pat pakeisti į didesnę arginino aminorūgštį.

Argininas taip pat naudotas kaip Leu226 pakaitas. Leu226 yra lokalizuotas netoli ertmės, vedančios link fermento aktyviojo centro ir iškelta hipotezė, jog ši aminorūgštis gali būti svarbi, atpažįstant arba prisirišant substratą. Ši aminorūgštis pakeista argininu, norint įvertinti, kokį poveikį didesnė aminorūgštis turės substrato prisirišimui. Kita leucino aminorūgštis, Leu411, yra lokalizuota netoli katalizinio His409 ir pakeista į alaniną, norint įvertinti šios aminorūgšties poveikį katalizei.

Įvertinus pakaitų poveikį fermento aktyvumui nustatyta, kad Gly108Arg ir Ala410Arg pakeitimai turėjo didžiausią neigiamą poveikį. Fermento, turinčio Gly108Arg mutaciją, savitasis aktyvumas sumažėjo daugiau negu 95 %, o Ala410Arg mutacija fermento savitąjį aktyvumą sumažino beveik 90 %. Visi kiti pakaitai turėjo mažesnę neigiamą poveikį, tikėtina, dėl mažų atstumų tarp Gly108 ir Ala410, bei Ala410 ir His409. Leu226Arg pakaitas GDEst-95 fermentinį aktyvumą sumažino 56 %. Tikėtina, jog fiziškai didesnė arginino aminorūgštis užstojo fermento aktyvųjų centrą, taip trukdydama substrato prisijungimui. Nepaisant sumažėjusio aktyvumo, fermento V_{max} vertė padidėjo du kartus, o K_m reikšmingai nepasikeitė. Argininas yra ne tik didelė,

tačiau tai taip pat teigiamai įkrauta ir hidrofilinė aminorūgštis. Šios savybės yra svarbios fermento veikimui – teigiamas krūvis gali padėti stabilizuojant substratą, fermentinės reakcijos pereinamąsias stadijas, arba padėti nukreipiant substratą link katalizinio centro (Son et al., 2023). Hidrofilinės aminorūgštys yra svarbios baltymų sąveikai su vandeniu ir tam tikras hidratacijos lygis yra reikalingas fermentiniam veikimui (Nakagawa ir Tamada, 2021).

Siekiant įvertinti kitų, taikant bioinformatikos metodus neaptiktų, bet potencialiai GDEst-95 fermento funkcionalumui svarbių pakaitų poveikį, atlikta klaidingoji PGR. Taikant šį metodą gauti ir atrinkti trys GDEst-95 variantai, pasižymėję geresnėmis katalizinėmis savybėmis: GDEst-RM1 (fermente nustatyta viena mutacija Arg75Gln), GDEst-RM2 (fermente nustatytos dvi mutacijos Gly20Ser ir Arg75Gln), GDEst-RM3 (Ser210Gly ir Thr317Ala mutacijos). GDEst-RM1 ir GDEst-RM2 pasižymėjo beveik tris kartus padidėjusiu savituoju aktyvumu, padidėjusiu temperatūriniu aktyvumu (GDEst-RM1 optimali veikimo temperatūra padidėjo 10 °C, GDEst-RM2 – 15 °C) ir temperatūriniu stabilumu 60-70 °C diapozone. Šių fermentų kinetiniai parametrai taip pat pagerėjo: V_{max} padidėjo 2,7 karto (GDEst-RM1) ir 4,2 karto (GDEst-RM2), o K_m sumažėjo apie 2 kartus (tiek GDEst-RM1, tiek GDEst-RM2 atveju), o tai rodo naujų fermentų padidėjusį giminingumą naudotam substratui. Šių konstantų padidėjimas sąlygojo ir padidėjusį katalizinį efektyvumą (apie 6 ir 10 kartų, atitinkamai GDEst-RM1 ir GDEst-RM2), o aktyvacijos energija sumažėjo apie 6 kJ/mol. Abu mutantai pasižymėjo viena bendra mutacija – Arg75Gln ir gana panašiu katalizinių savybių pokyčiu, todėl tikėtina, kad būtent ši mutacija lėmė geresnes fermento savybes. Arg75 aminorūgštis yra lokalizuota baltymo paviršiuje, toliau nuo aktyviojo centro ir kol kas nebuvo pasiūlytas jos vaidmuo ir svarba atpažįstant ir prijungiant substratą. Tiek argininas, tiek gliutaminas yra polinės aminorūgštys ir dažnai sutinkamos baltymų paviršiuje, todėl dažnai gali pakeisti viena kitą be didesnio neigiamo poveikio baltymo funkcijai (Barnes ir Gray, 2003). Vienas galimų paaiškinimų yra krūvis – glutaminas yra neutrali aminorūgštis, tuo tarpu argininas yra teigiamą krūvį turinti aminorūgštis. Galimai krūvio pašalinimas šioje vietoje pakeičia baltymo susilankstymą, arba palengvina substrato patekimą link katalizinio centro. Atliekant paiešką LED duomenų bazėje, artimiausia seka GDEst-95 esterazei yra *Geobacillus stearothermophilus* karboksilesterazė Est50. Sistema automatiškai anotuoja katalizinės triados ir oksianijoninės ertmės aminorūgščių liekanas, tačiau taip pat išskiria 62-80 pozicijas, kaip formuojančias nepatvirtintą dangtelį. Nors, remiantis literatūros duomenimis, šios struktūros GDEst-95 neturi, potenciali tolimesnių tyrimų eiga galėtų būti

įvertinimas, kokį poveikį kitų, šiai struktūrai priklausančių aminorūgščių pakeitimas, pašalinimas, ar pakeitimas kitų fermentų dangtelių sekomis, turėtų šio fermento aktyvumui ir katalizinėms savybėms.

Gly20Ser funkcija šiuo metu nėra aiški ir reikalauja atskiros analizės, norint nustatyti, koks yra atskiras šių mutacijų poveikis – sudėtinis ar epistatinis. Šiuo metu galima postuliuoti, jog šios aminorūgšties pakeitimas į polinę galėjo teigiamai paveikti baltymo susilankstymą arba hidrataciją ir tai lėmė pagerėjusią katalizinę funkciją bei fizikines ir chemines GDEst-RM2 fermento savybes.

GDEst-RM3 fermento atveju savitasis aktyvumas padidėjo 60 %, V_{\max} ir K_m taip pat pasiekė didžiausias vertes iš visų analizuotų GDEst-95 variantų (atitinkamai $31,52 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ ir $9,28 \text{ mM}$). Nors reakcijos greitis ir padidėjo, K_m vertės rodo sumažėjusį gimingumą substratui. Taigi, taškinės mutacijos, sumažinančios K_m , bet išlaikančios V_{\max} vertę galėtų būti naudojamos tolimesniam šio fermento gerinimui. Viena iš šiame fermente įvykusių mutacijų yra Thr317Ala. Ankstesnių darbų metu Thr317 aminorūgštis buvo įvardinta kaip galimai svarbi surišant tetraetilenglikolį (Gudiukaite et al., 2017). Alanino šoninė grandinė yra mažesnė negu treonino, todėl galimai šis pasikeitimas praplatino substrato surišimo kišenę. Yra žinoma, kad erdvesni aktyvieji centrai gali padėti fermentui prisijungti įvairesnius substratus arba pagerinti katalizę (Boyko et al., 2020). Kita mutacija, Ser210Gly, yra paviršinės, toliau nuo aktyviojo centro esančios mažos, hidrofilinės aminorūgšties pakeitimas maža, labiau hidrofobine aminorūgštimi. Hidrofobiškumas gali neigiamai paveikti fermento susilankstymą ar hidrataciją, ypač fermento paviršiuje.

Bioinformatinė substrato rišimosi su fermentu analizė parodė, jog GDEst-RM1 ir GDEst-RM2 pasižymėjo mažesne laisvąja energija (didesniu fermento-substrato komplekso stabilumu), lyginant su GDEst-95. Lyginant šiuos modifikuotus variantus tarpusavyje, reikšmingi rišimosi energijos skirtumai nebuvo nustatyti. Vienintelė išimtis nustatyta vertinant fermentų gebėjimą prisijungti *p*-NP acetatą: GDEst-95 apskaičiuota laisvoji energija – $-5,28 \text{ kcal/mol}$; GDEst-RM1 – $-4,85 \text{ kcal/mol}$ (aukštesnė – mažesnis fermento-substrato komplekso stabilumas) ir GDEst-RM2 – $-5,41 \text{ kcal/mol}$.

GDEst-RM2 mutanto LigPlot+ analizė parodė, jog dvi aminorūgštys formuoja vandenilinius ryšius su substratu: Tyr311 ir Ala109. Ankstesnės *Geobacillus* sp. 55 kDa esterazių analizės (Liu et al., 2007; Gudiukaite et al., 2017) metu Ala109 taip pat identifikuota kaip šių esterazių veiklai galimai svarbi aminorūgštis. Manoma, jog ji gali stabilizuoti Cys408 aminorūgštį, kurios liekana yra randama oksianijoninėje ertmėje. Oksiduotoje būsenoje Cys408 gali blokuoti fermento aktyvųjį centrą ir tarnauti kaip reguliacinis

elementas (Liu et al., 2007). Remiantis LED duomenų baze, būtent Ala109 yra viena iš aminorūgščių, formuojančių fermento oksianijoninę ertmę. Jokiuose ankstesniuose darbuose Tyr311 nebuvo identifikuota kaip substrato surišimui svarbi aminorūgštis. Ši aminorūgštis formuoja vandenilinį ryšį su *p*-NP nitro grupės deguonies atomu. Tai galėtų turėti stabilizuojantį poveikį ir paaiškinti GDEst-RM2 padidėjusį aktyvumą. Vis dėl to, šiuo metu negalima tiksliai atsakyti, ar ši sąveika reikšminga stabilizuojant karboksilesterius, neturinčius nitro grupių. Nitrogrupės taip pat randamos esteriuose, kurie naudojami kaip insekticidai (pvz.: parationo, metil parationo, fenitrotiono), todėl tokia sąveika galėtų būti svarbi tiriant tokių fermentų galimą panaudojimą bioremediacijoje.

LigPlot+ analizė taip pat parodė kelis aminorūgščių, atsakingų už hidrofobines sąveikas, skirtumus tarp GDEst-95 ir GDEst-RM2 fermentų. GDEst-95 unikalios aminorūgštys: Gly107 ir Gly113. Gly107, remiantis ankstesnių darbų metu atlikto modeliavimo rezultatais, buvo identifikuota, kad aminorūgštis svarbi 2-trimetilamonio etil tiolio prijungimui (Gudiukaite et al., 2017), tuo tarpu Gly113 svarba iki šiol nebuvo tirta ir yra ateities tyrimų objektas. GDEst-RM2 pasižymėjo trimomis unikaliomis aminorūgštimis, dalyvaujančios formuojant hidrofobines sąveikas su substratu: Leu226, Ala410 ir Leu413. Leu226 ir Ala410 buvo analizuotos šio darbo kontekste ir gauti rezultatai patvirtina jų svarbą surišant substratą. Leu413 nebuvo identifikuota kaip svarbi aminorūgštis nei vienos ankstesnės analizės metu. Apibendrintai galima teigti, kad Gly113 ir Leu413 yra nauji aminorūgščių kandidatai tolimesniems tyrimams.

Iš fermentų evoliucijos pusės, baltymo sekos erdvė yra įvardijama, kaip visos įmanomos aminorūgščių sekos kombinacijos. Paprastai jos išreiškiamos kaip 20^n , kur n – baltymo aminorūgščių skaičius. Tai reiškia, jog GDEst-95 sekos erdvėje yra $20^{498} = 8,18 \times 10^{647}$ (palyginimui, yra laikoma, jog visatoje yra $10^{78} - 10^{82}$ atomų). Svarbu paminėti, jog dauguma atsitiktinių aminorūgščių kombinacijų nesuformuos funkcionalių baltymų, o sekos erdvėse yra menkas kiekis funkcionalių baltymų (Keefe ir Szostak, 2001; Tracewell ir Arnold, 2009). Nors paprastai laikoma, jog evoliucija pasirenka labiausiai prisitaikiusius individus (arba šiuo atveju aktyviausias makromolekules), dažnai jie gali būti izoliuojami vietinėse prisitaikymo reljefo viršūnėse (t.y bet kokie pasikeitimai sekoje prives prie mažesniu arba identišku aktyvumu pasižyminčių variantų) (Yubero et al., 2017). Tokioje situacijoje, esant nuolatiniam spaudimui (temperatūrai, pH, maisto medžiagų trūkumui ar bet kokiam kitokiam veiksniai), baltymai, pasižymintys mažesniu aktyvumu, nebus įtvirtinti populiacijoje ir tikėtina, jog populiacija su labiau aktyviais fermento variantais ją nukonkuruos ir grįš į vietinį maksimumą.

Tokiu atveju populiacijai praktiškai nėra galimybių gauti fermentą, pasižymintį didesniu aktyvumu (Carpenter et al., 2023). Baltymų inžinerija leidžia apeiti šį ribojimą ir leidžia analizuoti fermentų variantus, kurie galimai negalėtų susidaryti gamtoje. Taip pat ji leidžia mums pasirinkti parametą, pagal kurią vertinsime baltymo prisitaikymą (aktyvumas, temperatūrinis stabilumas, substratinis specifiškumas ir t.t.) (Tracewell ir Arnold, 2009). Įvairių GDEst-95 parametų analizė pateikta 4.1 paveiksle.

Fermentas	Genotipo erdvė	Fenotipo erdvė	Prisitaikymas		
			U/mg	Temperatūra	Stabilumas
Gly108Arg	322 -GC CGC -	108 -HGRA F -	U/mg ↓ K _{cat} - ND	🌡️ - ND ☀️ - ND	
Ala410Arg	1228 -A CCG GC-	410 -CHR L E-	U/mg ↓ K _{cat} ↓	🌡️ - 0 ☀️ ↑	
Leu226Arg	677 -TT CGC C-	226 -AL R LR-	U/mg ↓ K _{cat} ↓	🌡️ ↑ ☀️ ↑	
Leu411Ala	1232 - GCT CGA-	411 -HA A E L -	U/mg ↑ K _{cat} ↓	🌡️ - 0 ☀️ ↓	
GDEst-RM1	224 -GG CAG -	75 -LG Q MS-	U/mg ↑ K _{cat} ↑	🌡️ ↑ ☀️ ↑	
GDEst-RM2	58 -AA AGC - 224 -GG CAG -	20 -NE S VF- 75 -LG Q MS-	U/mg ↑ K _{cat} ↑	🌡️ ↑ ☀️ - 0	
GDEst-RM3	628 -CC GGC - 949 -G GCG G-	210 -EA G G L - 317 -TL A D P -	U/mg ↑ K _{cat} ↓	🌡️ ↑ ☀️ ↑	

Legenda:

- 🌡️ - optimali veikimo temperatūra lyginant su GDEst-95
- ☀️ - temperatūrinis stabilumas, lyginant su GDEst-95
- ↑ - parametras padidėjo
- ↓ - parametras sumažėjo
- 0 - parametras nebuvo paveiktas
- ND - parametras nebuvo analizuotas

4.1 pav. Tirtų GDEst-95 genotipo-fenotipo erdvės pozicijų vizualizacija. Raudonos raidės nurodo pakeistus nukleotidus ir aminorūgštis.

Antrasis šių tyrimų aspektas – *Geobacillus* sp. 95 kamieno lipolizinių fermentų pagrindu sukurtų fermentų (GDEst-lip sulieta esterazė/lipazė bei GD-95RM lipazė) gebėjimo hidrolizuoti poliesterius, įvertinimas. Šie

fermentai sukurti ir gana plačiai analizuoti ankstesnių darbų metu tiek fundamentiniu, tiek praktinio taikymo aspektais (Gudiukaitė et al., 2014; Gudiukaite, 2016; Gudiukaite et al., 2017; Malunavicius et al., 2018; Druteika et al., 2019, 2020; Savickaite et al., 2021a, 2021b). Taigi, buvo nutarta įvertinti galimybę juos taikyti naujoje srityje – poliesterių degradacijoje. Šie fermentai pasirinkti, kadangi abu pasižymi geresniu aktyvumu negu jų tėviniai variantai, pasižymi gebėjimu veikti plačiame temperatūrų spektre, išlieka stabilūs aukštesnėse temperatūrose, taip pat pasižymi stabilumu ir geresniu aktyvumu organiniuose tirpikliuose (Savickaite et al., 2021a). Abu šie fermentai taip pat pasižymi gebėjimu sintetinti įvairių riebalų rūgščių esterius (Druteika et al., 2020; Savickaite et al., 2021b).

Polikaprolaktonas (PCL) – tai biodegradabilus ir neimunogeninis polimeras, plačiai taikomas biomedicinoje (kaip veikliųjų medžiagų nešiklis arba pastolis audinių inžinerijoje) (Almeida et al., 2019). Šio polimero biodegradacija gali trukti 2-3 metus (Almeida et al., 2019), tačiau kaip buvo užsiminta ankčiau (skyrus 1.1.7), atlikti tyrimai dirbtinio gėlo arba jūros vandens paviršiuje per metus neparodė reikšmingo šio polimero masės sumažėjimo (Bagheri et al., 2017). PCL yra dalinai kristalinis, alifatinis (linijinis) poliesteris, pasižymintis geru tvirtumu, atsparumu cheminėms medžiagoms ar tirpikliams (Deshmukh et al., 2017). PCL gali būti sintetinamas skirtingos molekulinės masės: nuo trapios struktūros ($M_w = 15000$ g/mol) iki minkštos, dalinai kristališkos ($M_w > 40000$ g/mol). PCL taip pat pasižymi geromis mechaninėmis savybėmis, gali tarnauti kaip plastifikatorius, arba maišomas su kitais biologiniais polimerais (Deshmukh et al., 2017). PCL naudojamas kuriant aplinkai netaršias sistemas; vienas tokios sistemos pavyzdys – Han ir kt. sukurtas PCL ir diatomito filtras, skirtas iš vandens pašalinti mikroplastikus ir sunkiųjų metalų jonus (Han et al., 2023). Nors PCL ir pasižymi daugeliu naudingų savybių, kol kas jo taikymas yra ribotas. Paprastesnė šio polimero pašalinimo metodika, ar net pridėtinio produkto sukūrimas iš šio polimero atliekų, galėtų prisidėti prie platesnio šio polimero naudojimo ir pritaikymo. PCL skaidantys fermentai taip pat gali tarnauti kaip pirmasis žingsnis ieškant arba kuriant kitus poliesterius (PLA arba PET) skaidančius fermentus.

Atsižvelgiant į turimus duomenis, apskaičiuotas teorinis PCL kiekis, kuris galėtų būti suskaidomas naudojant GDEst-lip ar GD-95RM fermentus. Nustatyta, kad GD-95RM (1 mg) per 24 val. 30 °C temperatūroje galėtų suskaidyti 264,0 mg PCL₄₅₀₀₀ ir 280,7 mg PCL₈₀₀₀₀. Teoriškai GDEst-lip (1 mg) galėtų suskaidyti 145,5 mg PCL₄₅₀₀₀ ir 134 mg PCL₈₀₀₀₀ plėvelių masės. Kadangi abu fermentai 90-100 % santykinio aktyvumo pasiekia 50 °C temperatūroje, tikėtina, jog šioje temperatūroje būtų galima pasiekti dar

didesnes PCL skaidymo vertes. Šiame darbe PCL degradacijos eksperimentams pasirinkta 30 °C temperatūra, kadangi žemesnė temperatūra turi savų privalumų – pramoniniuose procesuose tai sumažina kainą, o taip pat supaprastina proceso valdymą. Vykdamas hidrolizę 55 °C temperatūroje pastebėtas PCL plėvelės lydymasis ir sumažėjęs skaidymo efektyvumas (rezultatai nepateikti), todėl tikėtina, jog degradacija aukštesnėje temperatūroje įmanoma tik iki tam tikros ribos. Nustatytas didesnis GD-95RM suskaidomos PCL plėvelių kiekis lyginant su GDEst-lip fermentu, labiausiai tikėtina, yra susijęs su didesniu šio fermento savituoju aktyvumu. Įdomus skirtumas nustatytas lyginant šių fermentų PCL hidrolizės reakcijos produktus – mažesniu aktyvumu pasižyminčio GDEst-lip fermento PCL plėvelių skaidymo produktai yra beveik išskirtinai monomerai, tuo tarpu po GD-95RM lipazės vykdomos reakcijos mišinyje vyrauja dimerai. Ankstesnių darbų metu buvo parodyta, jog GDEst-lip pasižymi dvejais, funkcionaliais lipazės ir esterazės aktyviaisiais centrais (Savickaite et al., 2021b). Kaip buvo aptarta (skyrius 1.1) lipazės gali efektyviai skaidyti netirpius ir ilgesnės grandinės substratus, tuo tarpu esterazės teikia pirmenybę vandenyje tirpiems substratams. Galima kelti hipotezę, jog lipazės aktyvusis centras yra atsakingas už greitą ilgų grandinių PCL skaidymą, tačiau skaidymo greitis lėtėja, mažėjant ilgagrandžio substrato kiekiui ir daugėjant trumpagrandžių produktų. Esterazės aktyvusis centras negali skaidyti ilgagrandžio PCL: GDEst-95, ar kiti šio fermento variantai negali skaidyti PCL (rezultatai nepateikti), tačiau galimai gali skaidyti susidarančius oligomerus ir tai daryti efektyviau negu GD-95RM lipazė. Reakcijos mišinio papildymas esteraze, arba analogiškų eksperimentų atlikimas naudojant MutEst-lip (GDEst-lip variantas su nefunkcionuojančiu esterazės aktyviuoju centru) leistų geriau suprasti šio fermento veikimo dinamiką. Gauti rezultatai taip pat iliustruoja potencialią sulietų fermentų naudą – vienas fermento domenas atlieka netirpaus substrato skaidymą etapą, taip sukurdamas prieinamą substratą antrajam domenui.

Reikšmingas skirtumas, vertinant skirtingos vidutinės molekulinės masės PCL plėvelių skaidymo efektyvumą, nenustatytas. Šis rezultatas sutampa su kitų autorių atlikta analize, kurios metu skirtingos molekulinės masės PCL (33000/ 57000/ 76000 g/mol) degradacija vyko beveik identišku greičiu (Ma et al., 2020). Remiantis HPLC-MS analize, PCL hidrolizės mišiniuose rasta tiek 6HHA monomerų, tiek ir jos oligomerų, o tai rodo, jog polimero grandinė yra skaidoma atsitiktinėse vietose. Tokiu atveju polimerizacijos laipsnis – monomerų kiekis makromolekulėje, oligomere, bloke arba grandinėje (Jenkins et al., 1996) – neturės didelės įtakos hidrolizės efektyvumui, juolab, kad vertinamas ne suskaidytų molekulių skaičius, o masės pokytis. Šiame darbe,

norint tiksliau įvertinti ir palyginti tiriamų fermentų efektyvumą, hidrolizuojant PCL, įvesta SPD sąvoka. SPD leidžia įvertinti skaidymo efektyvumą jį normalizuojant 1 mg baltymo, ypač atsižvelgiant į varijuojanti naudojamos plėvelės pradinį svorį.

Degradacijos mišinį papildžius alkoholiais nustatytas reikšmingas PCL degradacijos efektyvumo padidėjimas. Tai koreliuoja su ankstesnių tyrimų metu nustatytu GD-95RM aktyvumo padidėjimu naudojant 25 % etanolį (Druteika et al., 2020). Nepaisant to, skaidant *p*-NP esterius, GDEst-lip aktyvumas naudojant 25 % etanolį ar metanolį nepadidėjo, tačiau padidėjo naudojant *n*-butanolį arba izopropanolį (Gudiukaite et al., 2017). Imobilizavus šį fermentą, jis yra aktyvuojamas naudojant tiek 25 %, tiek 50 % etanolį arba metanolį (Savickaite et al., 2021a). Organinių tirpiklių naudojimas gali padidinti substrato arba reakcijos produktų tirpumą bei užtikrinti reakcijos pusiausvyros nukreipimą į esterių sintezės pusę.

Yra žinoma, jog PCL degradacija gali užtrukti skirtingą laiko tarpą, priklausomai nuo skaidymo sąlygų ir naudojamų fermentų. Baker ir kt. atliko skirtingų kutinazių palyginimą skaidant PCL. Savo tyrimo metu jie analizavo *Alternaria brassicicola*, *Aspergillus fumigatus* (AfC), *Aspergillus oryzae* (AoC), *Humicola insolens* (HiC) ir *Fusarium solani* kutinazes. Skaidymui buvo naudojamas 1 cm², 250 μm storio plėvelė, sverianti 30-35 mg, skaidymui naudota 8,8 μM kutinazės. Šio tyrimo metu gauta, jog HiC suskaidė visą plėvelės masę per 3 val., o AfC ir AoC per 6 val. (Baker et al., 2012). Tai, remiantis literatūros duomenimis, geriausias žinomas PCL hidrolizės rezultatas. Nors minėto tyrimo metu visa PCL plėvelės masė buvo suskaidyta greičiau negu naudojant GD-95RM ar GDEst-lip fermentus, šiuos rezultatus tarpusavyje lyginti gana sudėtinga, kadangi naudojamos skirtingos fermento kiekio išraiškos. Preliminariais skaičiavimais šiame darbe naudota 0,05 mg GDEst-lip kiekis, 3 mL tūryje atitiktų 0,303 μM, o GD-95RM – 0,388 μM. Tai rodo, kad GDEst-lip ir GD-95RM lipoliziniai fermentai šiai dienai pralenkia daugumą literatūroje aprašytų poliesterazių. Tolimesnis tyrimų etapas galėtų būti šių fermentų testavimas, tobulinimas (esant poreikiui) ir pritaikymas PLA ir/ar PET hidrolizei.

Gauti rezultatai rodo, kad GDEst-lip ir/ar GD-95RM fermentai galėtų prisidėti ne tik utilizuojanti PCL atliekas, tačiau taip pat atlieptų žiedinės ekonomikos principus – leistų panaudoti atliekas, kaip žaliavas naujų produktų sintezei. Tai leistų ne tik sumažinti aplinkos taršą, tačiau taip pat suteiktų galimybę sumažinti tokių produktų kainą, energijos sąnaudas ir anglies pėdsaką. Po skaidymo gaunama 6HHA toliau galėtų būti verčiama į kitus produktus (pvz.: 6-aminoheksaninę rūgštį, heksametilendiaminą arba 1,6-heksandiolį), kurie yra svarbūs pramonėje. PCL hidrolizės mišinį

papildžius etanoliu ar metanolium, ne tik būtų pagreitinamas degradacijos procesas, tačiau taip pat atsirastų galimybė vienos reakcijos metu gauti 6HHA esterius. Etil-6-hidroksiheksanoatas gali būti naudojamas kaip reagentas, norint sintetinti kitus pramonei svarbius junginius: etil-6-hidroksiheksanoatą – komercinį kvapiklį (Etil-6-acetoksilheksanoatas); taip pat, kaip jau buvo minėta, jis gali būti naudojamas vaistų prekursorių sintezėje (Ostergaard ir Larsen, 2007).

Gauti rezultatai iliustruoja tiek *Gebacillus* sp. sintetinamų lipolizinių fermentų pramoninio panaudojimo potencialą, tiek ir skirtingų mutagenezės metodų: kryptingosios evoliucijos ir tikslinės mutagenezės svarbą norint modifikuoti turimus fermentus, siekiant sukurti geresnėmis savybėmis pasižyminčius biokatalizatorius.

IŠVADOS

- Tikslinės mutagenezės tyrimai parodė, jog netoli aktyviojo centro esančių Gly108 ir Ala410, bei ties aktyviojo centro plyšiu esančios Leu226 pakeitimai į arginą turėjo neigiamą, o Leu411 pakeitimas į alaniną – teigiamą poveikį GDEst-95 aktyvumui.
- Taikant klaidingąją PGR sukurti trys geresnėmis savybėmis pasižymintys GDEst-95 variantai: GDEst-RM1, GDEst-RM2 ir GDEst-RM3. Gauti fermento variantai pasižymėjo didesniu savituoju aktyvumu, V_{max} bei aukštesne optimalia veikimo temperatūra lyginant su nemodifikuota GDEst-95.
- GD-95RM ir GDEst-lip geba hidrolizuoti PCL plėvelės: GD-95RM 1 mg fermento per 24 val. gali hidrolizuoti ne mažiau nei 264,0 mg PCL plėvelės masės; GDEst-lip 1 mg fermento per 24 val. gali hidrolizuoti ne mažiau nei 145,5 mg PCL plėvelės masės.
- Reakcijos mišinio papildymas trumpos anglies atomų grandinės alkoholiais reikšmingai pagerina GD-95RM ir GDEst-lip fermentų gebėjimą hidrolizuoti polikaprolaktoną. GD-95RM (1 mg) reakcijos mišinį papildžius 25 % etanolio, per 24 val. gali suskaidyti 2,4 karto didesnį PCL kiekį (646,0 mg); GDEst-lip (1 mg) reakcijos mišinį papildžius 50 % metanolio, per 24 val. gali suskaidyti 3 kartus didesnį (442,7 mg) PCL plėvelės kiekį.
- Reakcijos mišinį papildžius organiniais tirpikliais, tiek GD-95RM, tiek GDEst-lip geba vykdyti metil- arba etil- hidroksiheksoninės rūgšties oligomerų esterių sintezę.

SUMMARY OF DOCTORAL DISSERTATION

List of abbreviations

6HHA – 6-hydroxyhexanoic acid

APS – ammonium persulfate

Da – dalton (non-SI system unit of mass 1 Da = 1,66054×10⁻²⁴ g)

DMSO – dimethyl sulfoxide

d.H₂O – deionised water

G – standard acceleration of gravity (1 *g* = 9,80665 m/s²)

GDP – gross domestic product

HPLC-MS – high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry

IMAC – immobilised metal ion affinity chromatography

IPTG – Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

*K*_{cat} – turnover number

*K*_m – Michaelis-Menten constant

LB – lysogeny broth

m/z – mass/charge ratio

*M*_n – molar mass distribution

*M*_w – molecular mass

MWCO – molecular weight cut-off
OD₆₀₀ – optical density, measured at 600 nm

OECD – The Organisation for Economic Co-operation and Development

PCL – polycaprolactone

PCR – polymerase chain reaction

PLA – polylactic acid

pLDDT – predicted local distance difference test

p-NP – *para*-nitrophenol

rpm – revolutions per minute

SDS – sodium dodecyl sulphate

SDS-PAGE – sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis

SEM – scanning electron microscopy

SOC – super optimal broth with catabolite repression

SPD – standardized PCL degradation units

TEMED – N,N,N',N' - tetramethylethylenediamine

TM – template modeling score

Tris – tris(hydroxymethyl)aminomethane

v/v – volume in volume

V_{\max} – maximum reaction rate

w/v – weight in volume

λ – wavelength

AMINO ACID ABBREVIATIONS

Arg, R – arginine

Asn, N – asparagine

Asp, D – aspartic acid

Gly, G – glycine

His, H – histidine

Leu, L – leucine

Lys, K – lizine

Ser, S – serine

Sm – any small amino acid

X – any amino acid

INTRODUCTION

Since the industrial revolution humanity has made huge strides in the fields of technology, medicine, and economy. Many of these advancements allow us, on average, to live much longer, and more comfortable lives. That being said, in the XXI century we are forced to come to terms with the negative externalities that have come from this progress. Air and water pollution, deforestation, large amounts of waste that persists in the environment for hundreds of years damage not only the global biosphere, but also the quality of human life. According to the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD), air pollution alone causes a global GDP loss of 3.5% (1768 billion US dollars) (Roy and Braathen, 2017). While this pollution is the consequence of the industrial production of goods, we require this process to provide better quality of life to as many people as possible. Thus novel, innovative solutions, that would allow us to maintain high industrial capacity, while providing reduced negative externalities, are urgently needed.

One possible solution to relieve some of these burdens are enzymes. Enzymes are biocatalysts (usually proteins), that are found in all living organisms. Their main function is to increase the rate of chemical reactions in biological systems. Compared to regular chemical catalysts, enzymes possess three main beneficial qualities – they are very efficient in improving reaction rates (in some cases more than 10^{17} times) (Radzicka and Wolfenden, 1995); specificity – enzymes, depending on their function, can bind a wide, or narrow spectrum of substrates; and regulation – certain enzymes can be controlled with additional molecules, like cofactors or by being inhibited by their synthesis products (Price et al., 1999). As enzymes usually do not cause environmental harm, are biodegradable and can be reused, they are of great interest for their possible industrial, environmental and medicinal applications. Enzyme applications are one of the most perspective and ecologically friendly solutions to current and future problems.

Lipolytic enzymes are a group of hydrolases that cleave ester bonds in lipids. These enzymes are well known for their ability to hydrolyse various compounds, as well as form ester bonds (usually between carboxylic acids and alcohols). In recent years, there has been a growing interest in utilising these enzymes for polyester plastic biodegradation. The ability to efficiently remove these plastics would not only significantly reduce global pollution but could also allow the utilisation of the degradation products in synthesising new value-added products.

Emphasis is placed not only on the discovery of novel enzymes, but also on the modification of currently used biocatalysts. By applying protein engineering strategies, it is possible to create desired enzyme modifications and improve enzyme activity, stability, substrate specificity and other properties that are important for a given application. These modifications allow circumventing natural enzyme limitations and to create biocatalysts designed for solving specific problems.

Directed evolution is the modification of enzymes *in vitro* by mimicking the process of natural evolution. Enzymes are randomly modified and selected by desired criteria. Several advantages made directed evolution a preferred method for enzyme modification. Directed evolution does not require extensive knowledge about the structure of the enzyme, this method allows to identify amino acid substitutions that are not identified by homology comparison. Coupled with high-throughput screening, large libraries of enzyme variance can be analysed at a quick pace – many mutants can be screened. Several iterations of mutagenesis can be performed, until the desired criteria are reached and an enzyme with the best properties is received. The main disadvantage of this method is the requirement of high mutant library generation, as well as the requirement for high-throughput screening methods to screen for the best possible enzyme variants.

The term “Directed evolution” did not only borrow the second word from the field of evolution. As the interdisciplinarity of biological sciences increased, terms and concepts from the fields of evolution were applied to protein engineering. One such example are the terms “genotype-phenotype space” and “fitness landscape”. These concepts are a novel way to look at protein engineering when applying mutagenesis and choosing selection strategies. Questions like why certain properties are preserved in proteins, while others are lost; what are the epistatic effects (in this context – the different overall effect of several mutations when compared to the perceived sum of individual mutations); what selection criteria and strategies should be applied when screening. These questions can be applied not only to living organisms, but to macromolecules as well, including enzymes.

In this dissertation an emphasis is given to the lipolytic enzymes (lipases and carboxylesterases) of *Geobacillus* origin. Due to their capability to function and remain stable at higher temperatures, catalyse hydrolysis, ester synthesis and transesterification reactions, these enzymes have intriguing fundamental research and industrial application potential. However due to a lack of knowledge, the aim of this work is to improve the understanding of lesser known 55 kDa *Geobacillus* carboxylesterases as well as evaluating the application of *Geobacillus* lipolytic enzymes in polyester recycling.

Thesis objective: generate and characterise novel *Geobacillus* sp. 95 carboxylesterase variants, as well as evaluate the capability of modified *Geobacillus* sp. 95 lipolytic enzymes (GDEst-lip and GD-95RM) to perform combined polycaprolactone hydrolysis and ester synthesis.

Tasks formulated to achieve the thesis objective:

1. Modify *Geobacillus* sp. 95 carboxylesterase (GDEst-95) using site-directed mutagenesis and evaluate novel amino acids important for enzyme activity;
2. Using a directed evolution approach, modify *Geobacillus* sp. 95 carboxylesterase (GDEst-95) with the intention of creating enzyme variants with improved activity or substrate specificity;
3. Evaluate the capability of GD-95RM and GDEst-lip (modified enzymes, based on *Geobacillus* sp. 95 lipolytic enzymes) to degrade polycaprolactone;
4. Evaluate the effect of organic solvents on the enzymatic degradation of polycaprolactone, and identify esters formed.

Scientific novelty:

In the past several years increased attention is being given to reducing anthropogenic pollution, as well as emphasising circular economy principles. One of the most prominent pollutants globally is plastic waste and there are many incentives to reduce or utilise plastic waste more efficiently. A highly perspective solution to this problem is microbial enzymes. There are expectations that such enzymes could not only degrade plastic waste to less harmful products, but that those products could then be utilised in value added manufacturing.

In this work previously generated enzymes based on native *Geobacillus* sp. 95 lipolytic enzymes: a modified lipase GD-95RM (Druteika et al., 2020) and a fused esterase-lipase GDEst-lip (Gudiukaite et al., 2017) were evaluated for their ability to hydrolyse polycaprolactone (PCL). For the first time, it was determined that both enzymes are able to efficiently hydrolyse PCL, and that the degradation efficiency is significantly enhanced with the addition of organic solvents: ethanol and methanol. It was also determined that the addition of these solvents the enzymes can perform the esterification of the degradation products (6-hydroxyhexanoic acid (6HHA) and its oligomers). This is a first-time example of not only *Geobacillus* lipolytic enzyme

application in polyester degradation, but also shows the novel capability of utilising these enzymes for generating value added products using polyester waste. Based on the results obtained and data from literature, these enzymes are one of the most efficient known biocatalysts for PCL degradation.

In addition, by applying site-specific mutagenesis as well as directed evolution methods, further analysis of the 55 kDa carboxylesterase from *Geobacillus* sp. 95 was performed, to further understand the genotype-phenotype space of this enzyme. Based on earlier analysis, several amino acids – suspected of being important for catalysis, were modified and four new mutant variants were generated: Gly108Arg, Ala410Arg, Leu226Arg and Leu411Ala. Based on the obtained activity results Gly108 and Ala410 are amino acids important for enzyme function, while Leu411Ala mutant possessed improved activity and catalytic characteristics. While *Geobacillus* sp. carboxylesterases are analysed in literature, most research is directed into 30-35 kDa sized enzymes, while only several works analyse the larger 55 kDa *Geobacillus* carboxylesterases: two of the most in depth analysis of these enzymes are already more than 15 years old. This work furthers our understanding of these less known enzymes, provides better understanding of their structure-function relationships, and is a starting point of their genotype-phenotype space analysis.

Using error-prone PCR, 3 new GDEst-95 variants were generated: GDEst-RM1, GDEst-RM2, GDEst-RM3. All three variants showed improved activity and catalytic properties. Interestingly, two variants: GDEst-RM1 (Arg75Gln) and GDEst-RM2 (Gly20Ser and Arg75Gln) possessed not only a common mutation, but both amino acid substitutions occurred at distal sites on the protein surface. The results obtained allow us to claim, that amino acid substitutions at the protein surface can lead to improved biocatalysts. Comparing GDEst-95 and GDEst-RM2 by ligand-protein interaction analysis, shows that the mutations influenced substrate binding and different interactions are observed between the substrate and protein, as well as the different amino acids in the active site. These results provide a basis for further GDEst-95, as well as other 55 kDa carboxylesterase research.

This work provides new theoretical observations about relatively unstudied carboxylesterases, emphasises the importance of surface amino acids for enzyme activity, and shows the potential application of *Geobacillus* lipolytic enzymes in polyester plastic utilisation by circular economic principles.

Statements to be defended:

1. Gly108, Ala410, Leu226, Leu411 are important amino acids for the activity of GDEst-95 carboxylesterase; modifications at these sites can significantly influence enzyme activity.
2. Modifications of amino acids, located at distal distance from the enzyme active centre can lead to improvements in the catalytic properties of GDEst-95 carboxylesterase.
3. Modified *Geobacillus* lipolytic enzymes GD-95RM and GDEst-lip are competitive polyesterases, that can efficiently degrade polycaprolactone.
4. GD-95RM and GDEst-lip can efficiently perform hydrolysis of polycaprolactone and synthesis of methyl- and ethyl- esters of the resulting degradation products.

MATERIALS AND METHODS

Acetonitrile, formic acid, *p*-Nitrophenol, *p*-nitrophenyl (*p*-NP) acetate, *p*-NP butyrate, *p*-NP hexanoate, *p*-NP octanoate, *p*-NP dodecanoate, *p*-NP myristate, *p*-NP palmitate and *p*-NP stearate, polycaprolactone (average molecular weight (Mn) 45.000), polycaprolactone (Mn 80.000) and vinyl laurate were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Company, Switzerland.

Agarose, PageBlue™ Protein Staining Solution, PageRuler™ Unstained Broad Range Protein Ladder, Pierce™ Prestained Protein MW Marker, Pierce™ Unstained Protein MW Marker, SnakeSkin dialysis tubing (3500 MWCO), and tributyrin were purchased from Thermo Scientific™, US.

DreamTaq DNA polymerase, CloneJET PCR Cloning Kit, GeneJET Gel Extraction Kit, GeneJET PCR Purification Kit, GeneJET Plasmid Miniprep Kit, GeneRuler™ 1 kb DNA ladder, InsTAclone PCR Cloning Kit, Restriction endonucleases FastDigest NdeI and FastDigest SallI, and other reagents required for gene cloning experiments were purchased from Thermo Fisher scientific, Lithuania.

Bis-acrylamide was purchased from AppliChem, Germany. Tetramethylethylenediamine (TEMED) was purchased from Bio-Rad, USA.

Decanol was purchased from Alfa Aesar by Thermo Fisher Scientific, Germany. LACTOPRIMA LAC MPP85 (milk permeate powder MPP85), which was used as an inducer, was obtained from BaltMilk (Company “Pienas LT”, Kaunas, Lithuania).

6-hydroxyhexanoic acid was purchased from BLD Pharmatech Ltd., China.

Agar-Agar, ampicillin sodium salt, Butanol (99%), dimethyl sulfoxide (DMSO), ethanol (99%), ethidium bromide, glycine, HCl (37%), imidazole, isopropanol (99%), methanol (99%), NaCl, peptone, ROTI@Garose-His/Ni Beads, Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethane), yeast extract and all other reagents and chemicals used in this study were purchased from Carl Roth GmbH& Co. Kg, Germany unless otherwise specified.

All chemical reagents used in this study were of analytical grade.

Bacterial strains, cultivation conditions and plasmids

Bacterial strains used in this work:

Escherichia coli DH5 α : ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 phoA supE44 gyrA96 λ -thi-1 relA1 (Thermo Fisher Scientific, JAV);

E. coli BL21 (DE3): hsdD gal (λ cIts857 indl Sam7 nin5 lacUV-T7 gene 1 (Thermo Fisher Scientific, JAV).

Cultivation conditions:

All microorganisms used in this work were cultivated in Lysogeny broth (LB) (Bertani, 1951). The medium was composed of 1% peptone; 0.5% yeast extract; 0.5% NaCl. For making solid media agar is added to a final concentration of 1.5%. Media was sterilised by autoclavation: 121 °C, 1 atm, 20 min. After autoclaving media is supplemented by ampicillin (final concentration 100 μ g/mL) and poured into sterile Petri dishes. For recombinant bacteria screening solid media was supplemented with tributyrin or vinyl laurate (final concentration of either was 1% (v/v)).

Plasmids used in this work:

pET-21c(+) plasmids with inserted genes encoding either GD95-RM lipase (Druteika et al., 2020), esterase GDEst-95 (GeneBank number: KX013768.1) or the fused GDEst-lip lipolytic enzyme GDEst-lip (Gudiukaite et al., 2017) were created in previous works.

Vectors used in this work:

For cloning PCR products directly pJET1.2/blunt (part of the CloneJET PCR cloning Kit) and pTZ57R/T (from InsTAclone PCR cloning kit) were used.

Genes coding proteins of interest were ligated into the pET-21c(+) vector (Novagen).

DNA manipulation

GeneJET Plasmid Miniprep Kit was used for plasmid DNA extraction. GeneJET Gel Extraction Kit was used to recover DNA fragments from agarose gels. Procedures were carried out according to the manufacturer recommendations. For *E. coli* DH5 α and *E. coli* BL21 (DE3) transformation, electroporation was used. Electrocompetent *E. coli* DH5 α and *E. coli* BL21 (DE3) cells were prepared using the protocol by Sambrook and Russel (Sambrook and Russel, 2001).

Modification of *Geobacillus* sp. 95 esterase by site-directed mutagenesis

Site-directed mutagenesis was performed by using the overlap extension strategy (Ho et al., 1989). pET-21c(+) vector with inserted native GDEst-95 gene was used as the template. Mutations were introduced in two steps: during the first step fragments overlapping over the mutation site, and possessing the changed nucleotides are generated. During the second step fragments are used as the matrix for amplification and a full-length gene is synthesised, using unmodified primers that are used for standard gene amplification. Site-directed mutagenesis reaction mix was composed of 0.5 μ M of forward and reverse primer; 1 \times Phusion High-Fidelity PCR Master Mix; 1 μ g plasmid DNA; d.H₂O to the desired volume. Reaction conditions: 1) primary denaturation – 98 °C, 30 s; 2) secondary denaturation – 98 °C, 10 s; 3) primer annealing – 65-70 °C (depending on primer), 30 s; 4) extension – 72 °C, 40 s; 5) final extension – 72 °C, 10 min. Steps 2–4 were repeated 35 times. A PCR mixture without template DNA was used as a negative control. All PCR products were analysed in agarose (0.8%) gel DNA electrophoresis (running conditions: 6 V/cm, 1 \times TAE buffer (40 mM Tris; 20 mM acetic acid; 1 mM EDTA)). For visualization 0.5 μ g/mL of ethidium bromide was added to the gel. After the first PCR the desired PCR products were excised and purified from gel using GeneJET Gel Extraction Kit according to the manufacturer recommendations. The purified products were used for the second round of

PCR, the reaction conditions were not altered, save for the annealing temperature which was changed to 62 °C.

Modification of *Geobacillus* sp. 95 esterase by random mutagenesis

Error-prone PCR was performed using DreamTaq DNA polymerase and an increased MgCl₂ concentration. The reaction mix contained: 1× DreamTaq™ buffer; 1.25 U DreamTaq polymerase; 4 μM MgCl₂; dNTP mix (0.2 mM of each nucleotide), 1 μg of template DNA. Reaction conditions: 1) Primary denaturation – 95 °C, 2 min; 2) Secondary denaturation 95 °C, 30 s; 3) primer annealing 63 °C – 30 s; 4) extension – 72 °C, 3 min; 5) final extension 72 °C, 7 min. Steps 2–4 were cycled 35 times. PCR products were analysed using agarose gel electrophoresis as described previously. After DNA electrophoresis, the desired PCR products were purified from gel as described previously.

Cloning of new GDEst-95 variants

After site-directed mutagenesis resulting full length genes were ligated into pJET1.2/blunt cloning vector according manufacturers recommendations. The reaction mixture contained: 1× Reaction buffer, pJET1.2/blunt vector and PCR product in a molar ratio of 1:4, 1 U T4 DNA ligase, d.H₂O to final volume.

PCR products resulting from random mutagenesis were ligated into pTZ57R/T vector by using the TA cloning system. The reaction mix contained: 1× T4 DNA ligase buffer, pTZ57R/T vector, and PCR product in a molar ratio of 1:4, 1 U T4 DNA ligase and d.H₂O to final volume of 20 μL. In both cases ligation was performed at 4 °C, overnight. Afterwards ligase was inactivated by incubating the mixture at 70 °C for 5 min.

Ligation mixtures were transformed into *E. coli* DH5α cells by electroporation: 4 μL of ligation mixture was added to 40 μL of prepared electrocompetent cells and transferred to electroporation cuvettes. The cells were subjected to an electric field (1500-1700 V, 5 ms) and immediately 460 μL of SOC medium was added (2% peptone; 0.5% yeast extract; 0.05% NaCl; 2.5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄; 20 mM glucose). The suspension was collected, incubated for 1 hour at 37 °C, and then plated of solid LB media supplemented with ampicillin (100 μg/mL) and an appropriate substrate: 1.5% (v/v) tributyrin or vinyl laurate. Gene insertion was confirmed by formation of tributyrin or vinyl laurate hydrolysis zones around the respective colonies, and additionally by colony PCR. Colony PCR was

performed as described previously, using DreamTaq polymerase, however no additional MgCl₂ was added and instead of DNA, biomass of 1 colony was added to the PCR mixture, and a longer initial denaturation time (5 min) was used.

Selected transformant colonies were inoculated into 5 mL of LB medium with ampicillin (100 µg/mL), grown overnight, and plasmids were extracted using GeneJET plasmid miniprep kit, according to the manufacturers recommendations. Inserted genes were sequenced (Azenta Life Sciences, Germany).

Afterwards, restriction of genes of interest was performed using FastDigest (FD) NdeI and SalI restriction endonucleases. The reaction mixture contained: 1 µg plasmid DNA, 1U FD NdeI, 1U FD SalI, 1× FastDigest Green buffer, d.H₂O to desired volume. A pET-21c(+) vector was identically digested. After restriction, genes of interest were purified from agarose gel (as described) and ligated into the digested pET-21c(+) expression vector. Ligation mixture was composed of: 1.25 U T4 DNA ligase, DNA insert-vector in a ratio of 5:1, 1× T4 DNA ligase buffer, d.H₂O to final volume. Ligation mixtures were incubated at 4 °C overnight and transformed to *E. coli* BL21 (DE3) cells as described previously. Positive transformants were screened by tributyrin/vinyl-laurate hydrolysis on LB plates with ampicillin, or by colony PCR as described previously. Transformants grown on LB plates supplemented with vinyl laurate were selected based on the size and the time taken for clear hydrolysis zone development. *E. coli* BL21 (DE3) cells expressing unmodified GDEst-95 were used as a baseline for comparison.

Protein expression and purification

E. coli BL21 (DE3) cells harbouring plasmids with desired modified GDEst-95, GD-95RM or GDEst-lip genes, were grown overnight in 5 mL liquid LB medium with ampicillin (100 µg/mL). Afterwards they were inoculated into two culture flasks with 150 mL fresh LB medium with ampicillin (100 µg/mL) (starting OD₆₀₀ = 0.02–0.04). Cells were grown (37 °C, 180 rpm), and optical density measured, until it reached 0.4. Afterwards milk permeate was added to a final concentration of 4 mM (Greicius et al., 2023) into one of the cultures (the other culture was used as uninoculated control). Samples from both growth cultures were taken at the moment of induction, and after 1-, 2- and 4-h postinduction. Then, the cells were centrifuged (12,000 × g, 2 min), supernatant discarded and 100 µL of SDS-PAGE loading buffer (50 mM Tris-HCl buffer (pH 6.8), 2% sodium dodecyl sulphate, 10% glycerol, and 0.02% bromophenol blue) was added.

Collected samples were analysed by 12% SDS-PAGE using Laemmli's discontinuous Tris-Glycine buffer system (Laemmli, 1970) to determine optimal induction time. Resolving gel composition was: 12% acrylamide (mixture of acrylamide with bis-acrylamide in a ratio 29:1), 0.38 M Tris-HCl pH 8.8, 0.1% SDS, 0.1% APS, 0.04% TEMED. Concentrating gel composition was identical, except 5% acrylamide mixture, and 0.13 M Tris-HCl pH 6.8 was used. SDS-PAGE was carried out using the Mini-PROTEAN system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Pierce™ Unstained Protein MW Marker was used as a molecular weight marker. Gels were stained using PageBlue™ Protein Staining Solution, according to the manufacturer's recommendations.

For protein purification, immobilised metal affinity chromatography (IMAC) with ROTI®Garose-His/Ni Beads was used. After protein synthesis induction, *E. coli* BL21 (DE3) cells were harvested by centrifugation at $8000 \times g$ for 10 min, then resuspended in 1.5 mL Tris-HCl buffer (50 mM, pH 8) and 0.02 g of lysozyme was added. The suspension was sonicated on ice using ultrasound sonicator VC 750S (Sonics and Materials, US) for 10 min (amplitude 38%, 10 s sonication, 20 s cooling). Cell debris were removed by centrifugation ($12,000 \times g$, 10 min), and the supernatant was transferred to the column (previously equilibrated with Tris-HCl, 50 mM, pH 8). Unspecifically bound proteins were washed away using Wash Buffer (Tris-HCl 50 mM, pH 8 with 50 mM imidazole) and target protein was eluted using elution buffer (Tris-HCl 50 mM, pH 8 with 250 mM imidazole). Samples were analysed using SDS-PAGE as previously described. After SDS-PAGE analysis, fractions with highest observed protein content and purity were mixed and placed in a dialysis membrane (SnakeSkin dialysis tubing 3500 MWCO). The membrane with target enzymes was submerged in a buffer solution (Tris-HCl, 50 mM, pH 8; 1:100 sample to buffer ratio). Desalting was performed for 24 h, changing the buffer solution after 12 h. Afterwards the sample was collected, and protein concentration was determined using spectrophotometric measurements at 280 nm (molecular weight and molar extinction coefficient were calculated based on the known GDEst-95 amino acid sequence).

Enzyme assays and characterisation

For determining enzyme activity *p*-NP dodecanoate was used (Gudiukaite et al., 2014). For a reaction 890 μ L buffer (Glycine-NaOH, 50 mM, pH 9) was mixed with 100 μ L of the *p*-NP dodecanoate (2.5 mM, dissolved in DMSO) and incubated at 55 °C for 10 min. Afterwards 10 μ L of purified enzyme solution was added and the reaction was incubated for 5 min. Reaction mixture

without enzyme added was used as a blank. After incubation the absorbance ($\lambda = 420$ nm) was measured. A calibration curve was used to determine the released *p*-nitrophenol amount. One unit is defined as the amount of *p*-NP (μ M) released in 1 min using 1 mg of enzyme.

The effect of different temperatures on enzyme activity was determined by performing the described enzyme assay at different temperatures (30–90 °C). For thermostability determination, 50 μ L of enzyme were incubated for 1 h at 30–90 °C and then the reaction was performed as described. For substrate specificity determination different acyl-chain length *p*-NP esters were used: *p*-NP acetate (C₂), *p*-NP butyrate (C₄), *p*-NP dodecanoate (C₁₂), *p*-NP myristate (C₁₄), *p*-NP palmitate (C₁₆), *p*-NP stearate (C₁₈). Due to autohydrolysis at higher temperatures, hydrolysis of C₂ and C₄ substrates were measured using phosphate buffer solution (K₂HPO₃, 2.14 mM; KH₂PO₃, 28.5 mM; pH 7).

To determine V_{\max} and K_m enzymatic assay using different concentrations of *p*-NP-dodecanoate (1.25-50 mM) was performed. The results were plotted on a linearized Lineweaver-Burk plot. Based on these values K_{cat} and K_{cat}/K_m were calculated. Activation energy was measured after performing reaction at 40; 50; 60; 70 °C and evaluating the *p*-NP amount after 0; 2; 4 min. Calculations were performed based on the Arrhenius equation.

Bioinformatic analysis

Three-dimensional (3D) structures of all target esterases were generated via ColabFold (<https://github.com/sokrypton/ColabFold>). Ligand structures for docking were collected from the NCBI PubChem Compound database. The docking experiments were performed using GNINA 1.0 (McNutt et al., 2021). Target protein preparation for docking was conducted via AutoDockTools (The Scripps Research institute, <https://ccsb.scripps.edu/projects/docking/> (Morris et al., 2009)). For more accurate docking, the docking grid box of 20 × 20 × 20 with zero grid spacing was positioned in the centre of the target protein active site. For the docking, default settings of GNINA 1.0 were used except for increased exhaustiveness from 16 to 32 (McNutt et al., 2021). All possible hydrogen bonds or hydrophobic interactions between the enzymes and the substrates were generated via LigPlot+ (<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LigPlus/>) (Laskowski ir Swindells, 2011). All 3D structures of protein-ligand complexes were generated with the PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.5.0, (Schrödinger, LLC).

PCL film hydrolysis using lipolytic enzymes

The PCL films used for the enzymatic degradation were prepared by solvent casting method (Tang et al., 2004; Abdel-Motal et al., 2014; Khan et al., 2019). PCL pellets (Mn₄₅₀₀₀ and Mn₈₀₀₀₀) were dissolved in chloroform (10% w/v) by mixing. 2 mL of the solution were transferred to a glass Petri dish (5 cm diameter) and left to dry overnight. The dry films were removed, cut into smaller pieces (with a surface area of approximately 500 mm²) and weighed (average weight and width of the cut films was found to be 0.044 ± 0.005 g and 0,1±0.01 mm respectively).

PCL films were transferred to 15 mL test tubes and 3 mL of enzyme solution: Tris-HCl (50 mM, pH8) with different amounts (0.05/ 0.1/ 0.15 mg) of enzyme (purified GD-95RM or GDEst-lip) was added. A sample with no added enzyme is used as a control. Samples were incubated at different temperatures (30 and 50 °C) with stirring (130 rpm). After 24 hours PCL films were removed, washed with d.H₂O, dried and weight difference (%) was evaluated.

Influence of organic solvents on PCL film hydrolysis

The effect of organic solvents on PCL degradation was evaluated by adding different organic solvents (methanol, ethanol, isopropanol, 2-butanol, 1-octanol and isoamyl alcohol (final concentration of 25% or 50% (v/v)) to the enzyme mixture. Enzyme amount used was 0.05 mg. Degradation was performed at 30 °C, with shaking (130 rpm), for 24 h. After incubation, the films were removed, washed with deionized water, dried, and weighted. Two types of control reactions were performed in this study: 1) reaction without organic solvent and 2) reaction without enzyme. Degradation efficiency was evaluated using standardized PCL degradation units (SPD). SPD is defined as the amount of PCL, degraded in a 24-hour period, at 30 °C, using 1 mg of enzyme.

Degradation dynamics were also analysed at 1-, 2-, 4-, and 8-hour intervals. Hydrolysis was carried out under optimized conditions using 0.5 mg of enzyme. This was done both by affecting PCL films only with target enzyme and in combination organic solvent and enzyme (50% methanol and GDEst-lip; 25% ethanol and GD-95RM).

Analysis of PCL degradation and esterification products using HPLC-MS

HPLC-MS analysis was performed by senior scientist dr. Jonita Stankevičiūtė at Vilnius University, Life Sciences Center, Institute of Biochemistry, Department of Molecular Microbiology and Biotechnology.

Soluble fractions from previously described PCL₄₅₀₀₀ and PCL₈₀₀₀₀ degradation experiments were analysed. The samples were mixed with an equal volume of acetonitrile and centrifuged for 10 min at 8000 × *g*. The samples were analysed using an HPLC-MS system equipped with a photodiode array detector and mass spectrometer (LCMS-2020) with an electrospray ionization (ESI) source. The chromatographic separation was conducted using a YMC Pack Pro C18 column (3 × 150 mm) at 40 °C and a mobile phase that consisted of 0.1% formic acid water solution (solvent A) and acetonitrile (solvent B) delivered in the 5–95% gradient elution mode. Mass scans were measured from *m/z* 50 up to *m/z* 800 at a 350 °C interface temperature, 250 °C desolvation line (DL) temperature, ±4.500 V interface voltage, and neutral DL/Qarray, using N₂ as nebulizing and drying gas. Mass spectrometry data were acquired in both positive and negative ionization modes. The data were analysed using LabSolutions liquid chromatography-mass spectrometry (LCMS) software. 6HHA was identified based on the commercially available standard. Masses of ethyl-6-hydroxyhexanoate (CID 357781) and methyl-6-hydroxyhexanoate (CID 3083855) were identified by PubChem database.

Scanning electron microscopy (SEM) analysis

SEM analysis was performed by Andrius Pakalniškis at Vilnius University, Institute of Chemistry and Geosciences, Institute of Chemistry.

The surface morphology of the polymer films was analysed using a field emission scanning electron microscope SU-70. Samples were measured using an accelerating voltage of 5 kV, under a high vacuum and different magnifications (100 and 5000×). Prior to analysis, all samples were coated with a 5 nm thick layer of Au, using a Q150T ES sputter.

Statistical analysis

All quantitative experiments were performed in triplicate, and the average values were derived. Data was analysed using GraphPad Prism 9.0 for Windows operating system, GraphPadSoftware, Boston, Massachusetts, USA (<https://www.graphpad.com/>). Statistical significance was evaluated using T-test (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1.cfm>).

RESULTS

Cloning and sequence analysis of esterase GDEst-95 mutants

In this work two strategies for generating GDEst-95 mutants were used: site-directed mutagenesis (to evaluate previously analysed candidate amino acids) and random mutagenesis to screen for possible, unpredicted improved variants. First, to generate site specific mutants of GDEst-95 esterase overlap-extension PCR was used. Amino acids for mutagenesis were chosen based on earlier analysis of 55 kDa carboxylesterases produced by *Geobacillus* bacteria (Gudiukaite et al., 2017; Liu et al., 2007). Three of the four amino acids (Gly108, Ala410 and Leu411) were chosen based on their proximity to the active site residues of GDEst-95 (Ser194, His409, Glu310). The other candidate amino acid, Leu226, is located near the edge of the groove that forms and where the catalytic residues are located. The first PCR round provided gene fragments that overlap over the mutation site (Fig. 1A and B). PCR products of different lengths, that corresponded to their theoretical size, were successfully amplified. The second PCR provided full length genes with mutations at the target sites (Fig. 1C). Sequence analysis confirmed the desired amino acid substitutions at the target sites.

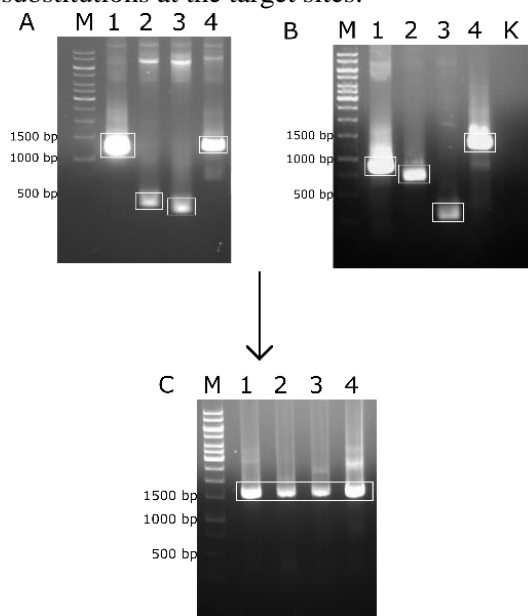


Fig. 1 First (A, B) and second (C) round of overlap extension PCR for generating site-directed GDEst-95 mutants. A) Amplification of Gly108Arg fragments (lanes 1–2), Ala410Arg fragments (lanes 3–4), B) amplification of Leu226Arg fragments (lanes 1–2), Leu411Ala (lanes 3–4), K – control PCR sample without DNA template; C) Full length gene of Gly108Arg (line 1), Ala410Arg (line 2), Leu226Arg (line 3), Leu411Ala (line 4); M – GeneRuler™ 1 kb DNA ladder. Genes of interest are marked in white.

In this work random mutagenesis was performed by using error-prone PCR, using a Taq type polymerase, while also increasing the Mg^{2+} concentration. All products corresponded to the size of the parental gene (≈ 1500 bp) (Fig. 2).

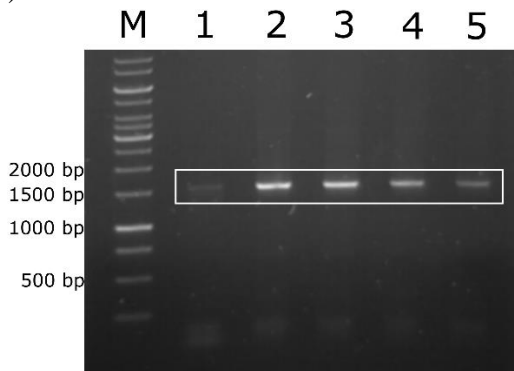


Fig. 2 PCR products obtained after error-prone PCR. Gene of interest is highlighted in white. M – GeneRuler™ 1 kb DNA ladder.

Genes obtained after error-prone PCR genes were ligated into pTZ57R/T cloning vector, transformed into *E. coli* DH5 α cells and screen on solid media containing vinyl-laurate (1%). Vinyl laurate is a medium-acyl chain length water-insoluble vinyl ester and should be more difficult to hydrolyse by esterases. Thus, it is a suitable substrate to easily screen for more active esterase variants or new enzyme variants with broader substrate specificity. Hydrolysis of vinyl-laurate is also unlikely in deleterious mutants and can thus help avoid false positive selection. It was observed that while hydrolysis zones can be observed when the parental enzyme GDEst-95 is expressed, the zones themselves are usually smaller (1–2 mm). Contrarily, three transformants (named GDEst-RM1, GDEst-RM2 and GDEst-RM3) showed clear, larger (2–3 mm) halos around colonies after overnight growth. Plasmids extracted from these colonies were purified and genes of interest sequenced. Sequence analysis showed only several point mutations: Arg75Gln substitution in GDEst-RM1 esterase; two, Gly20Ser and Arg75Gln, substitutions in GDEst-RM2 esterase; two, Ser210Gly and Tyr317Ala, substitution in GDEst-RM3. As these enzymes showed higher activity on vinyl-laurate they were selected for further analysis.

Expression analysis and purification of GDEst-95 mutants

For protein synthesis, milk permeate was used as an inducer. Milk permeate is a by-product formed during milk ultrafiltration, composed of >82% lactose. It serves as a novel, effective and cheap alternative, to other more commonly used inducers (like IPTG or lactose), and its use for

heterologous enzyme synthesis has already been shown (Greicius et al., 2023). Protein expression was successful, and the highest protein production was observed after 4 h post induction, for all analysed enzymes. As an example, analysis of GDEst-RM1 and GDEst-RM2 esterases is presented (Fig. 3A and C).

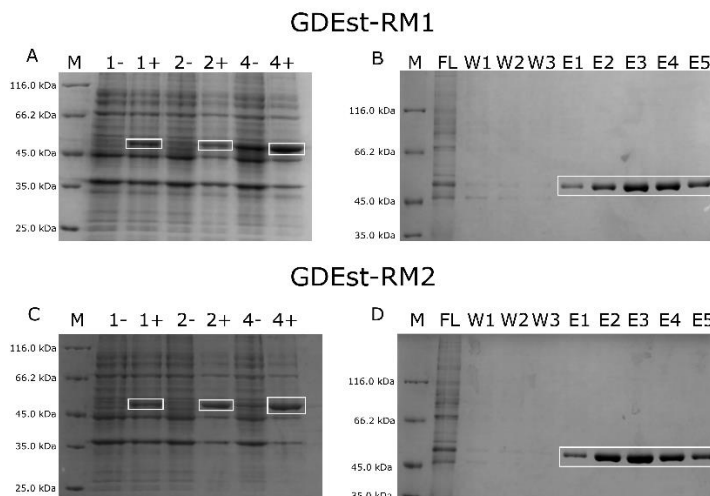


Fig.3 Protein expression (A, C) and purification (B, D) analysis of GDEst-RM1 and GDEst-RM2 enzymes. M – Pierce™ Unstained Protein MW Marker. A and C: numbers (1–4) indicate the time in hours after the start of induction; + – milk permeate was added; – – control samples, where milk permeate was not added. GDEstRM1 and GDEst-RM2 esterases were purified using IMAC. C and D: FL – unbound protein flow through, W1–3 – wash fractions, E1–E5 – elution fractions.

Next, the target new esterases were successfully purified using IMAC (Fig. 3B and D). The highest amount of target protein was observed in elution fractions 2, 3 and 4. Protein expression and purification results of site-specific GDEst-95 mutants were equivalent.

Characterisation of Gly108Arg, Ala410Arg, Leu226Arg, and Leu411Ala mutants

Previous analysis of GDEst-95 biochemical characteristics (Gudiukaite et al., 2017) revealed that it is a thermoactive and thermostable enzyme. Specific activity was determined to be 100 U/mg. Optimal temperature of GDEst-95 was determined to be 60 °C, and it retained >50% of its activity after 30 min incubation at 30–70 °C temperature range. The enzyme displayed highest preference for short chain acyl-esters, specifically *p*-NP butyrate. After directed mutagenesis experiments, Gly108Arg, Ala410Arg and Leu226Arg mutants displayed reduced specific activity (Table 1).

Table 1. Kinetic properties of GDEst-95 esterase and its mutants. For kinetic analysis, a temperature of 55 °C and *p*-NP dodecanoate as substrate were used. Improved variants are bolded. GDEst-95 was analysed in a previous work (Gudiukaite et al., 2017).

Enzyme	Specific activity (U/mg)	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	K_m (mM)	K_{cat} (min^{-1})	Catalytic efficiency ($\text{min}^{-1}\text{mM}^{-1}$)	Activation energy E_a (kJ/mol)
Mutant variants creating using site-specific mutagenesis						
GDEst-95 Gly108Arg	2.86±0.00	-	-	-	-	-
GDEst-95 Ala410Arg	10.95±1.15	2.96	2.23	1.15×10^3	5.18×10^2	85.42
GDEst-95 Leu226Arg	44.23±14.06	11.86	6.00	2.09×10^5	3.49×10^3	34.86
GDEst-95 Leu411Ala	200.00±0.00	11.07	4.62	2.24×10^4	4.86×10^3	11.40
Mutant variants create using error-prone PCR						
GDEst-RM1	313.00±35.78	16.08	2.59	8.84×10^5	3.41×10^5	44.13
GDEst-RM2	363.70±43.88	24.57	2.27	1.35×10^6	5.95×10^5	45.11
GDEst-RM3	160.71±7.28	31.52	9.28	4.38×10^4	4.72×10^3	12.10
Unmodified GDEst-95						
GDEst-95	100.00±0.00	5.88	5.88	3.27×10^5	5.60×10^4	50.30

Gly108Arg retained only 2.86% activity, Ala410 – 10.95%, and Leu226Arg – 44.23%. However, Leu411Ala mutant displayed increased activity by approximately two-fold, respectively. Due to low activity Gly108Arg was excluded from further experiments.

Both arginine mutations had a negative effect on kinetic parameters of GDEst-95 esterase. The data analysis revealed that Ala410Arg mutant possessed twofold reduced V_{max} , however, K_m was reduced by approximately 2.64 times (Table 1). It is possible that lower concentrations of substrate are enough to reach 1/2 of V_{max} for this mutant. It was also observed that K_{cat} was reduced by >284-fold and catalytic efficiency by 108-fold for Ala410Arg mutant. It suggests that Ala410 amino acid is very important for GDEst-95 esterase functionality. It was also detected that after Ala changes to Arg, activation energy was increased by 35.12 kJ/mol.

Contrarily, Leu226Arg mutant demonstrated twofold increased V_{max} , however changes of K_m were negligible. However, K_{cat} was reduced by 1.54 times, catalytic efficiency was reduced by 16-fold. Activation energy for Leu226Arg was reduced by 15.44 kJ/mol.

After Leu411 substitution to Ala, an increase in activity was observed. V_{max} increased by almost twofold, and K_m was reduced by 1.28 times. K_{cat} and catalytic efficiency were reduced by 14.6 times and 11.52 times respectively.

Based on thermoactivity analysis (Fig. 4A), mutated GDEst-95 variants displayed reduced relative activity at lower temperatures (30–45 °C). The optimal temperature activity increased for mutant Leu226Arg (65 °C). At higher temperatures (75–85 °C) relative activity was higher for Ala410Arg, and Leu226Arg mutants than the parental GDEst-95. The analysis also suggested that, despite having the highest specific activity of Leu411Ala mutant, it had lower relative activity than GDEst-95 at almost all tested temperatures (Fig. 4A).

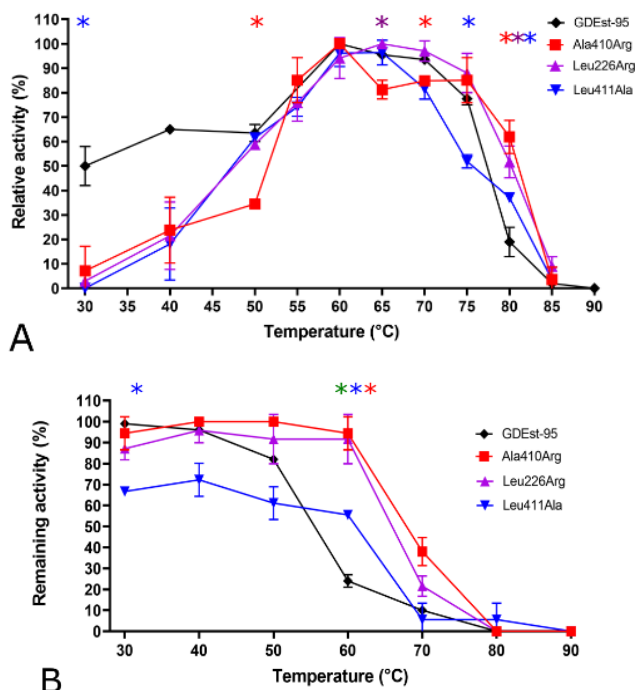


Fig. 4. Thermoactivity (A) and thermostability (B) analysis of site-directed GDEst-95 mutants. * – shows $p \leq 0.05$ when target mutant is compared to GDEst-95 esterase. GDEst-95 was analysed in a previous work (Gudiukaite et al., 2017).

Temperature stability was improved of both arginine mutations, Ala410Arg and Leu226Arg (Fig. 4B). Higher than 85% activity was retained after incubating at 60 °C. Leu411Ala mutants displayed less temperature stability at lower temperatures (30–50 °C) but retained >50% activity at 60 °C. Leu226Arg, Leu411Ala mutants displayed >20% remaining activity at 70 °C temperature, however after 1 h incubation at 80 °C all enzymes lost >80% enzymatic activity.

Mutations did not have a significant effect on substrate specificity (Fig. 5), however, Leu266Arg variant displayed an increased preference to *p*-NP

acetate (C₂), while all other variants showed reduced preference to this substrate.

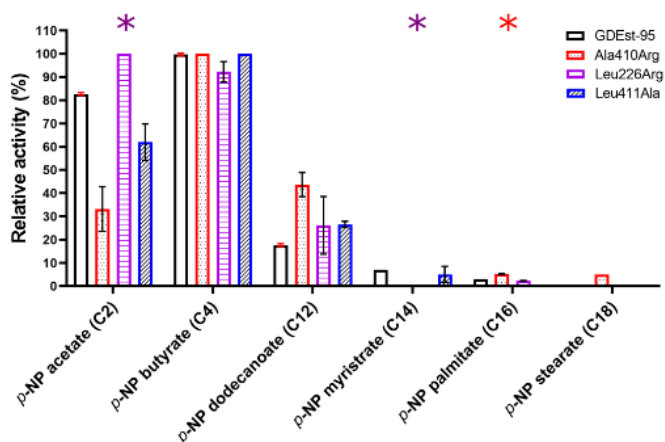


Fig. 5 Substrate specificity analysis of site-directed GDEst-95 mutants. * – shows $p \leq 0.05$ when target mutant compared to GDEst-95 esterase. GDEst-95 was analysed in a previous work (Gudiukaite et al., 2017).

Ala410Arg and Leu411Ala variants also showed higher preference for *p*-NP dodecanoate (Fig. 5).

Characterisation of GDEst-RM1, GDEst-RM2 and GDEst-RM3 esterases

All variants that were obtained after random mutagenesis of GDEst-95 esterase displayed improved catalytic properties. Compared to GDEst95, specific activity of GDEst-RM1 and GDEst-RM2 enzymes was increased more than threefold: 312 U/mg and 363 U/mg, while GDEst-RM3 showed improved specific activity of about 1,6 times (Table 1).

Both GDEst-RM1 and GDEst-RM2 mutants had improved V_{\max} and K_m values (Table 1). V_{\max} of GDEst-RM1 esterase increased about 2.7 times, while K_m was reduced by approximately 2.3 times. K_{cat} value was increased 2.7 times, while activation energy was reduced by about 6.17 KJ/ mol. GDEst-RM2 esterase displayed an increased V_{\max} more than fourfold, while K_m was reduced (similarly to GDEst-RM1) about 2.5 times. Catalytic efficiency increased by more than tenfold, while activation energy was reduced by approximately 5.19 kJ/mol. Increases in V_{\max} and decreased K_m are both important for enzyme activity, as catalysis rate and substrate affinity are increased in conjunction, thus allowing for faster reaction rates. This leads to increased catalytic constant (K_{cat}) and catalytic efficiency (K_{cat}/K_m). It should be noted that both enzymes possessed one common mutation (Arg75Gln) mutations (Gly20Ser and Arg75Gln) are distal mutations located on the

protein surface, so it is more likely they provide an indirect effect on enzyme activity.

GDEst-RM1 and GDEst-RM2 enzymes also displayed higher optimal temperature (Fig. 6 A). GDEst-RM1 had 100% relative activity at 75 °C, while GDEst-RM2 optimal activity was 70 °C (compared to GDEst-95 optimal temperature activity of 60 °C). Thermostability analysis (Fig. 6 B) showed that GDEst-RM1 had similar thermostability to GDEst-95 at lower temperature ranges (30–50 °C) and retained higher lipolytic activity after incubation at 60–70 °C temperatures. GDEst-RM2 showed reduced thermostability than either of the tested enzymes at the lower temperature range (30–50 °C) maintaining approximately 50% specific activity. However, this relative activity was maintained up to 70 °C. All enzymes showed <10% relative activity at 80 °C (Fig. 6B).

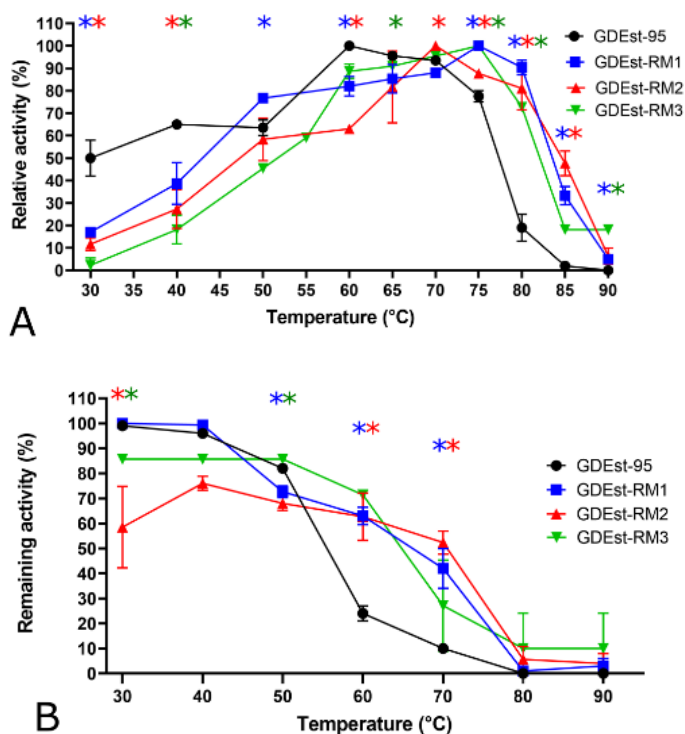


Fig 6. Thermoactivity (A) and thermostability (B) analysis of random GDEst-95 mutants. * – shows $p \leq 0.05$ when target mutant is compared to GDEst-95 esterase. GDEst-95 was analysed in a previous work (Gudiukaite et al., 2017).

GDEst-RM3 mutant showed the highest V_{max} increase by more than fivefold, however K_m was increased by 1.58 times. Obtained results also proposed that GDEst-RM3 mutant displayed 7.47 times lower K_{cat} , and

catalytic efficiency was reduced by almost twelvefold. Activation energy was reduced by 38.2 kJ/mol. This mutant also displayed the higher optimal temperature – 75 °C, and maintained higher temperature stability at 60 °C. Ser210Gly/Tyr317Ala variant was the only mutant that displayed activity at 90 °C.

Substrate specificity analysis showed that all three new carboxylesterases showed preference to short acyl-chain esters (Fig. 7).

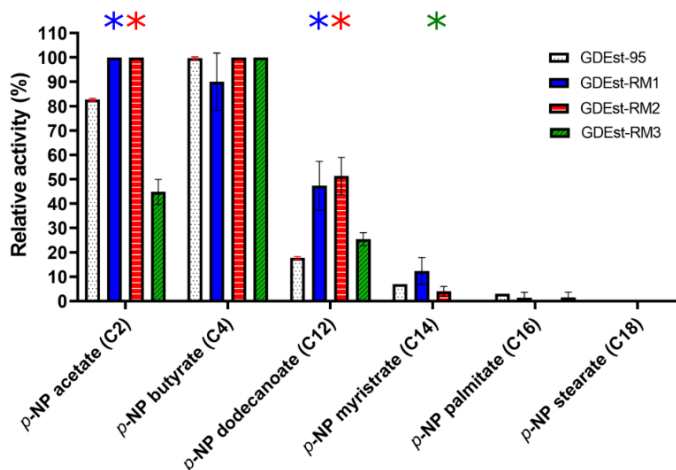


Fig 7. Substrate specificity analysis of random GDEst-95 mutants. * – shows $p \leq 0.05$ when target mutant compared to GDEst-95 esterase. GDEst-95 was analysed in a previous work (Gudiukaite et al., 2017).

The obtained results of substrate specificity coincide with substrate specificity of GDEst-95, as well as with most esterases. GDEst-RM1 and GDEst-RM2 had the highest affinity for short-chain acyl esters, however these variants did show increased hydrolysis of *p*-NP dodecanoate. The data analysis proposed that longer than 12 carbon atoms acyl-chain ester hydrolysis was not significantly affected (Fig. 7). GDEst-RM3 showed a lower preference for *p*-NP acetate than GDEst-RM1 and GDEst-RM2 esterases. The results show that the random mutations (Gly20Ser; Arg75Gln; Ser210Gly; Thr317Ala) can influence substrate specificity of GDEst-95 esterase.

Structural analysis of GDEst-95 mutants

The computational docking experiment correlated with the experimental results, showing that the random mutated GDEst-95 esterases have higher activity towards medium to long chain (C₆-C₁₄) ester compounds (Table 2).

Table 2. Predicted molecular docking binding free energy (kcal/mol) of GDEst-95 esterase and its mutants for different *p*-NP esters. Variants with increased specific activity are bolded.

Enzyme/ Substrate	GDEst- 95	GDEst- RM1	GDEst- RM2	GDEst- RM3	Ala410 Arg	Leu226 Arg	Leu411 Ala
C ₂	-5.28	-4.85	-5.41	-5.38	-5.49	-5.33	-5.27
C ₄	-5.80	-6.16	-6.33	-5.79	-6.03	-5.89	-6.29
C ₆	-6.68	-7.04	-7.03	-6.81	-6.89	-5.96	-6.84
C ₈	-6.91	-7.71	-7.76	-7.34	-7.23	-6.28	-7.70
C ₁₀	-7.29	-7.83	-7.77	-7.65	-7.03	-6.56	-8.01
C ₁₂	-8.12	-8.45	-8.89	-8.46	-6.98	-7.80	-7.53
C ₁₄	-7.94	-8.25	-8.37	-8.19	-6.61	-7.83	-6.69
C ₁₆	-7.35	-7.71	-7.84	-7.62	-6.47	-7.52	-6.13
C ₁₈	-5.22	-5.38	-5.95	-5.54	-4.81	-6.12	-3.97

From the docking results it can be observed that the GDEst-RM1 variant with one random mutation (Arg75Gln) and double mutants GDEst-RM2 (Gly20Ser and Arg75Gln) and GDEst-RM3 (Ser210Gly and Thr317Ala) should exhibit higher enzymatic activity towards all *p*-NP esters compared to the parental GDEst-95 enzyme. Comparing GDEst-95, GDEst-RM1, GDEst-RM2 and GDEst-RM3 docking results, free energy of all substrates was lower for in all cases, except when docking *p*-NP acetate to GDEst-RM1 and *p*-NP butyrate to GDEst-RM3. This hypothesis was proven with experimental results – the enzymatic performance of the GDEst-RM variants was higher than GDEst-95, and GDEst-RM2 esterase even showed a three-fold increase lipolytic activity. The highest predicted binding affinity of the compared enzymes was towards either *p*-NP decanoate (C₁₀) or *p*-NP dodecanoate (C₁₂) and it was decided to conduct further experimental analysis with the later substrate.

The ColabFold generated 3D structure of GDEst-RM2 was chosen for further analysis (Fig. 8). It is worth noting that all the 3D models were of high accuracy – the per-residue confidence metric called pLDDT (1–100) was above 94.0 and the predicted TM-score (0–1) was above 0.940 for all generated esterase models. LigPlot+ analysis of GDEst-RM2 esterase (Fig. 8B) showed two amino acids possibly forming hydrogen bonds with *p*-NP dodecanoate: Ala109 and Tyr311. While Ala109 has been identified as important in previous works, Tyr311 has not previously analysed and can be an object for future research. Several changes in non-ligand residues involved in hydrophobic contacts were also observed in LigPlot+ results (Fig. 8B and C). GDEst-RM2 had two additional contacts, for a total of 16 amino acid interactions (GDEst-95 had 14). Both variants also differed in residues that had the interactions, in total there were 5 differences. GDEst-95 had unique Gly113 and Gly107 interactions (Fig. 8B), while GDEst-RM2: Leu226, Ala410, and Leu413 (Fig. 8C). Leu226 and Ala410 were analysed in this

work, and their mutants had reduced lipolytic activity. This interaction also suggested their importance in catalysis. Leu413 in a novel interaction, that to our knowledge no previous authors have mentioned as an amino acid important for catalysis.

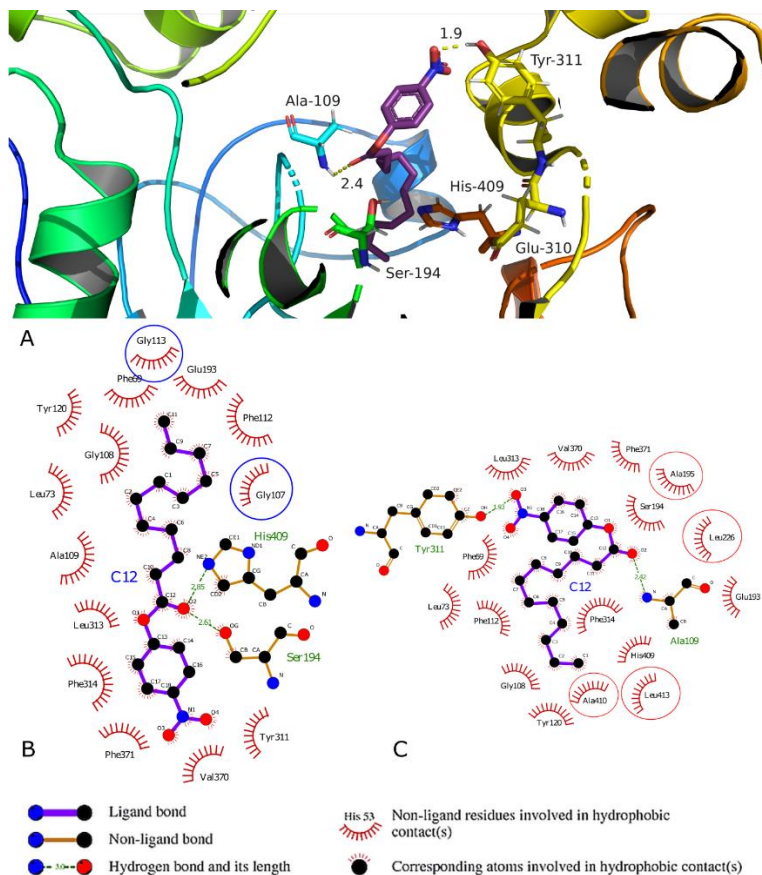


Fig. 8 3D structure of GDEst-RM2 esterase (A) and LigPlot+ analysis of GDEst-95 (B) and GDEst-RM2 (C) esterases. Non-ligand residues involved in hydrophobic contacts that differ are circled in blue (GDEst-95) and red (GDEst-RM2).

When analysing site-specific mutants, both docking and experimental results showed increased binding energy, and reduced affinity (Table 2). One exception is the Leu411Ala mutation, which showed increased specific activity and possessed higher affinity towards short chain *p*-NP esters (C₄-C₁₀), but not towards longer chain *p*-NP esters (C>10). Leu411Ala docking results also show reduced free energy for short to medium acyl chain length substrates (C₄-C₁₀), but higher free energy for binding longer acyl chain

substrates (>10). Docking analysis of Gly108Arg did not yield reliable results and are not provided.

Determination of cost-attractive conditions for PCL film hydrolysis

Conditions for GDEst-95, GD-95RM and GDEst-lip synthesis and purification were optimised in previous works (Druteika et al., 2020; Greicius et al., 2023; Gudiukaite et al., 2017). Both GD-95RM and GDEst-lip are modified proteins generated in previous works. GD-95RM (Druteika et al., 2020) is a modified *Geobacillus* sp. GD-95 lipase, acquired after error-prone PCR differing from the native enzyme by three amino acid substitutions (Glu100Lys; Phe154Val; Val174Ile) and possessing higher activity. GDEst-lip is a fused heterodimer of GDEst-95 esterase and GD-95 lipase through a restriction endonuclease site (Gudiukaite et al., 2017). Both proteins showed highest activity than their native counterparts and were further analysed for PCL degradation applications in this work.

Protein synthesis and purification were successfully carried out (Fig. 9), however the results are only provided for GDEst-lip and GD-95RM, as GDEst-95 did not show any activity against PCL films.

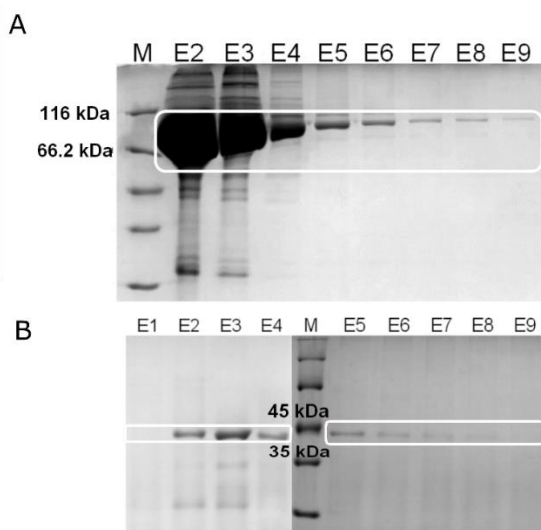


Fig. 9 GDEst-lip (A) and GD-95RM (B) purification analysis using SDS-PAGE. M - Pierce™ Unstained Protein MW molecular mass marker; E1 – E9 elution fractions, proteins of interest are highlighted in white.

Both proteins corresponded to their theoretical weight: GDEst-lip – 98 kDa (Fig. 9A) and GD-95RM – 43 kDa (Fig. 9B). The purification fraction with highest observed amount of target enzyme was collected, mixed and used for further experiments.

Firstly, different temperatures (30 °C and 50 °C), amounts of enzyme (0.05/ 0.1/ 0.15 mg) were tested to determine the optimum degradation conditions. Both tested enzymes displayed the capability to degrade PCL films of different molecular weight (Table 3), while GDEst-95 did not show significant PCL film biodegradation and was not analysed further.

Table 3. The capability of GD-95RM and GDEst-lip to perform degradation of PCL₄₅₀₀₀ and PCL₈₀₀₀₀ films.

Enzyme	Enzyme amount, mg	Temperature, °C	Hydrolysis efficiency, %	
			PCL ₄₅₀₀₀	PCL ₈₀₀₀₀
GD-95RM	0.05	50	67.67±10.02	61.50±4.95
	0.1		84.00±1.00	76.00±5.66
	0.15		85.00±4.00	82.00±1.41
	0.05	30	30.00±8.46	39.40±5.13
	0.1		78.33±8.02	71.00±8.49
	0.15		73.00±12.17	78.50±3.54
GDEst-lip	0.05	50	55.50±11.96	71.00±3.27
	0.1		67.67±10.02	84.00±4.24
	0.15		87.67±10.97	85.50±10.61
	0.05	30	20.33±1.53	16.80±3.70
	0.1		22.33±2.52	18.50±0.71
	0.15		20.00±5.20	24.50±5.57

Results showed that after 24 h at 50 °C, both enzymes hydrolysed >40% of PCL films using 0.05 mg of the enzyme. At 30 °C, both GD-95RM and GDEst-lip enzymes (0.05 mg) were able to hydrolyse 20–40% of PCL films within 24 h (Table 3). The obtained data also indicated that 0.1 mg is a suitable amount of enzyme to degrade PCL films efficiently, as the weight of PCL films decreased by >70%, except for GDEst-lip capability to degrade PCL at 30 °C temperature. No significant differences between degradation using 0.1 mg and 0.15 mg of enzymes were detected. Also, no significant differences in enzyme hydrolysis efficiency were found between PCL₄₅₀₀₀ and PCL₈₀₀₀₀.

The surface morphology changes of the PCL₄₅₀₀₀ and PCL₈₀₀₀₀ films before and after hydrolytic degradation were investigated using SEM. Before degradation, PCL films had a relatively homogeneous surface which was not affected after 24-hour incubation in buffer solution without the enzymes

(Fig. 10). Before degradation PCL films displayed a smooth surface that was not affected by incubation in buffer solution, at either tested temperature.

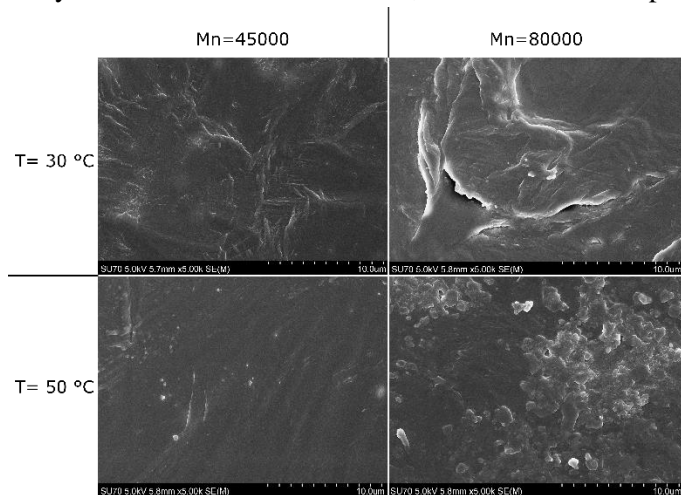


Fig. 10 Different PCL film (Mn_{45000} and Mn_{80000}) SEM analysis. Control samples, where PCL films were not effected by enzymes. 5000 \times magnification.

The analysis indicated the presence of surface irregularities and roughness when only 0.05 mg of GDEst-lip was used, and the reaction was performed at 30 °C (Fig. 11). Using larger amounts of enzyme (0.15 mg) and higher temperature (50 °C) causes irregularities to appear throughout the visualised film and coincides with a 75% reduction the mass of the PCL film.

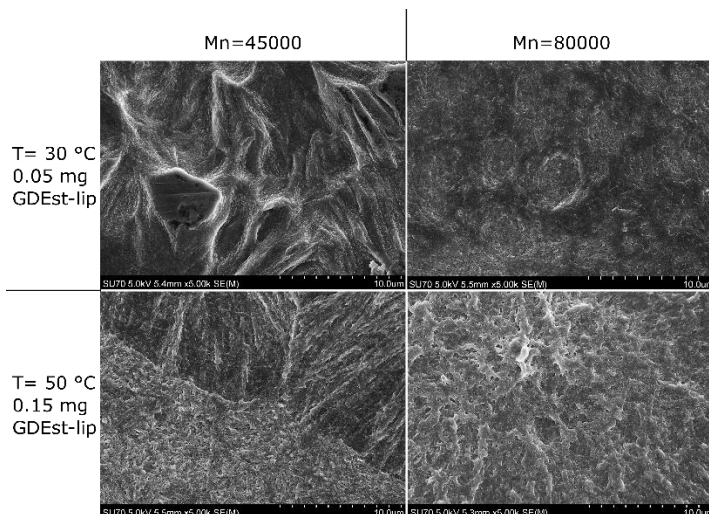


Fig. 11 SEM analysis of different PCL films (Mn_{45000} and Mn_{80000}) effected by varying concentrations of GDEst-lip at different temperature. 5000 \times magnification.

SEM analysis of GD-95RM effect on PCL films showed a better performance in PCL₈₀₀₀₀ degradation resulting in increased hole formation. The >70% degradation lead to a structure loss of PCL films (Fig. 12).

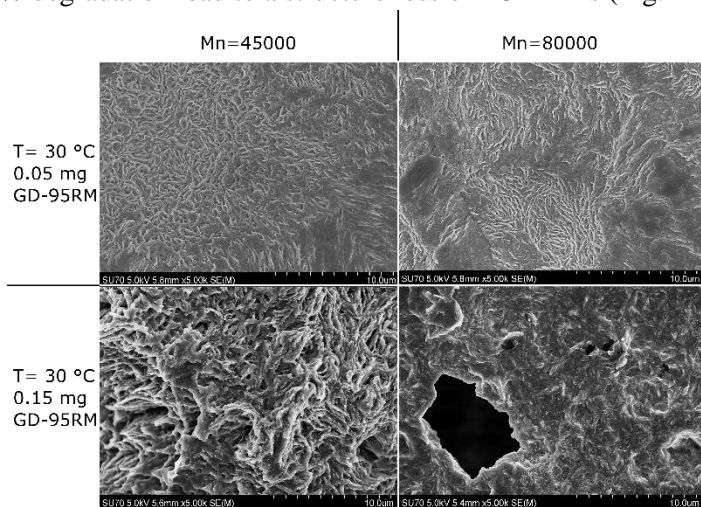


Fig. 12 SEM analysis of different PCL films (Mn₄₅₀₀₀ and Mn₈₀₀₀₀) effected by varying concentrations of GD-95RM. 5000× magnification.

Using higher enzyme concentration (0.1-0.15 mg) formation of crater-like structures was observed on the surface of both PCL₄₅₀₀₀ and PCL₈₀₀₀₀ (Fig. 13). It appears likely that degradation occurs unevenly, and the size of the craters increases, until gaps are formed. GDEst-lip showed less deformation of PCL films than GD-95RM, likely due to the latter's lower enzymatic activity (~600 U/mg) compared to GD-95RM (~1400 U/mg).

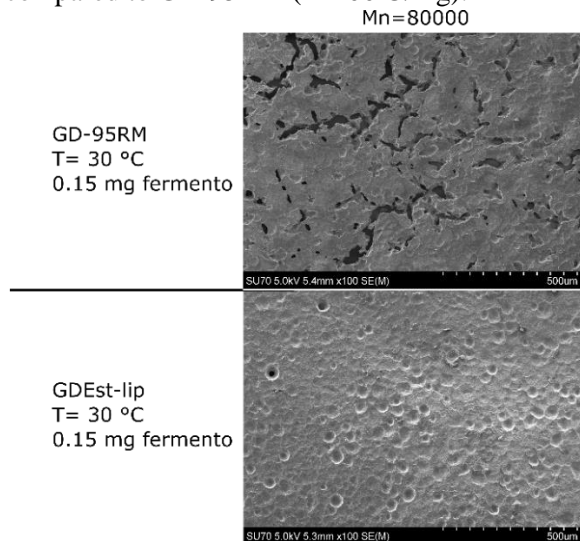


Fig. 13 SEM analysis of different PCL films (Mn₈₀₀₀₀) effected by 0.15 mg of GD-95RM or GDEst-lip. 100× magnification.

As degradation of PCL₄₅₀₀₀ and PCL₈₀₀₀₀ films was achieved after enzymatic treatment at all tested conditions, for further experiments, an enzyme amount of 0.05 mg was chosen, and hydrolysis was carried out at 30 °C to reduce temperature costs and to have a more precise system to investigate the effect of organic solvents.

Effect of organic solvents on PCL hydrolysis

It is known that various alcohols can have a beneficial effect on the hydrolytic activity of lipolytic enzymes. Moreover, the addition of alcohols can allow for an esterification reaction to occur which leads to the formation of desirable esters. In this study, the effect of 25% and 50% (v/v) methanol, ethanol, 2-propanol, 2-butanol, 1-octanol, and isoamyl alcohol on the ability of GD-95RM and GDEst-lip enzymes to degrade PCL films was evaluated (Fig. 14). No PCL hydrolysis was observed in the presence of 2-butanol; 1-oktanol; or isoamyl alcohol.

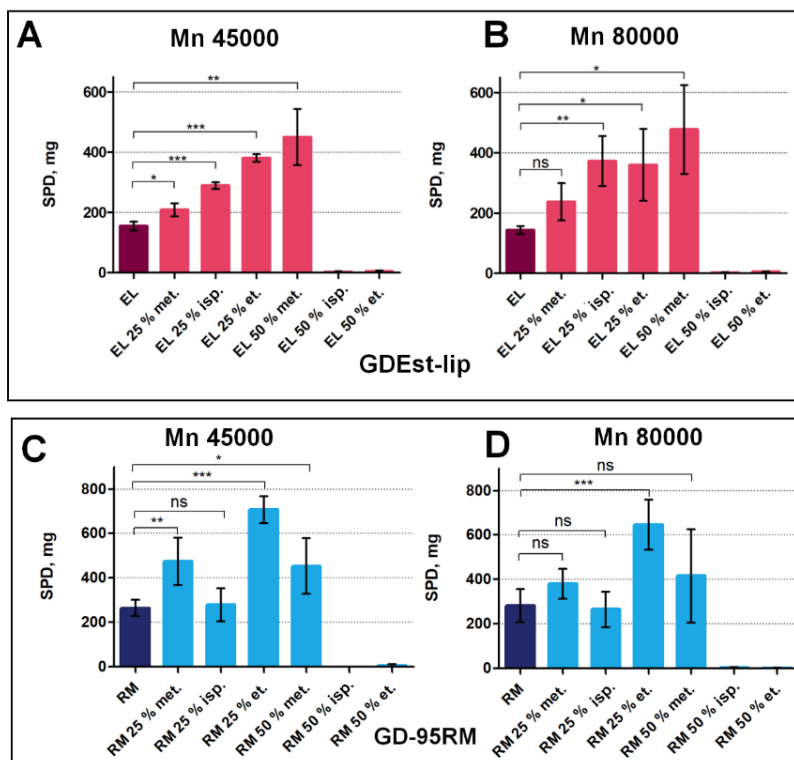


Fig. 14 Effect of short chain alcohols on PCL hydrolysis using GDEst-lip (A, B) and GD-95RM (C, D). Mn – average PCL molecular mass; SPD – standardized PCL degradation units; met – methanol; isp – 2-propanol; et – ethanol. Error bars display standard deviation. Statistical significance was calculated using t-test. * – $p \leq 0.05$; ** – $p \leq 0.01$; *** – $p \leq 0.001$; ns – results are not statistically significant.

To be able to evaluate and compare the results of PCL hydrolysis standardized PCL degradation units (SPD) were used. The average SPD of GDEst-lip was 145.5 mg and 134.0 mg for PCL₄₅₀₀₀ (Fig. 14A) and PCL₈₀₀₀₀ (Fig. 14B), respectively. The results indicated that 25% methanol, ethanol, 2-propanol, and 50% methanol statistically significantly increased the degradation ability of GDEst-lip toward PCL₄₅₀₀₀ (Fig. 14A). Similar results were obtained in PCL₈₀₀₀₀ hydrolysis, with one exception – no statistically significant results were observed when using 25% methanol (Fig. 14B). Using 50% methanol the SPD of GDEst-lip increased 3.0 and 3.5-fold, reaching 442.7 mg (PCL₄₅₀₀₀) and 472.0 mg (PCL₈₀₀₀₀), respectively. The average SPD of GD-95RM was 264.0 mg and 280.7 mg for PCL₄₅₀₀₀ and PCL₈₀₀₀₀, respectively. A statistically significant increase of PCL₄₅₀₀₀ hydrolysis using GD-95RM was observed using 25% methanol or ethanol and 50% methanol (Fig. 14C). The only statistically significant increase in PCL₈₀₀₀₀ hydrolysis was observed using 25% ethanol (Fig. 14D). After addition of 25% ethanol in the reaction mixture, SPD increased 2.7 and 2.3-fold, reaching 706.0 mg (PCL₄₅₀₀₀) and 646.0 mg (PCL₈₀₀₀₀), respectively. PCL film degradation was inhibited when using 50% 2-propanol or ethanol in all tested reactions. PCL films retrieved after degradation experiments were analysed using SEM (Fig. 15). As very similar efficiency and mode of PCL₄₅₀₀₀ and PCL₈₀₀₀₀ hydrolysis were obtained, the results are presented only for PCL₈₀₀₀₀

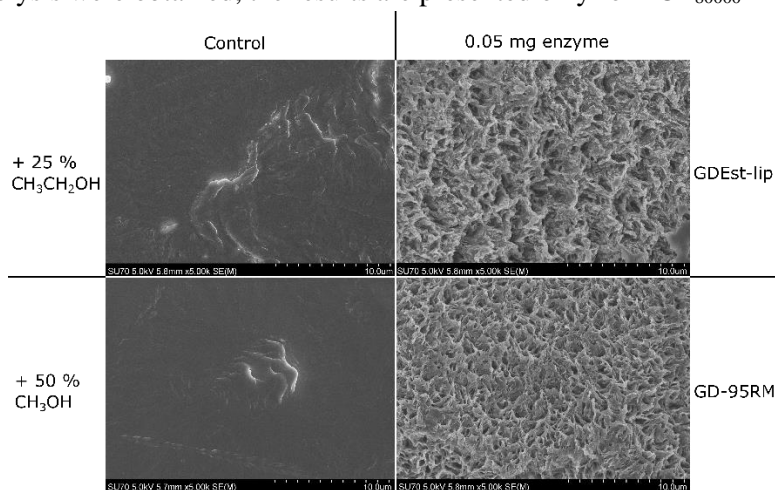


Fig. 15 SEM analysis of PCL₈₀₀₀₀ films surface after the 24-h treatment with GDEst-lip and GD-95RM in combination with selected alcohols.

SEM analysis indicated increased porosity, surface irregularities, and roughness. The hydrolysis pattern and PCL film surface changes were very similar when using either enzyme or alcohol. SEM analysis also demonstrated that ethanol (25%) and methanol (50%) did not affect PCL film surface and

the degradation of polyester polymers was achieved mainly by enzymatic hydrolysis. The mass loss in control samples was also not observed.

Degradation dynamics of PCL films by GD-95RM and GDEst-lip enzymes

Based on the obtained results, PCL₄₅₀₀₀ and PCL₈₀₀₀₀ degradation dynamics were evaluated using 50% methanol in the reaction mixture for GDEst-lip enzyme and 25% ethanol for GD-95RM lipase. The amount of the target enzyme was increased to 0.5 mg in order to reduce the time required for PCL decomposition. The degradation dynamics were evaluated within the first 8 h of treatment. The dynamics of PCL degradation catalysed by both enzymes were also assessed without the addition of alcohols. Results suggested that GDEst-lip (0.5 mg) can degrade about 40% (PCL₄₅₀₀₀) and 36% (PCL₈₀₀₀₀) of a PCL film within 8 h (Fig. 16). The addition of 50% methanol causes an approximately two-fold increase in PCL degradation rate and after 8-hour incubation, 90% (PCL₄₅₀₀₀, Fig. 16A) and 70% (PCL₈₀₀₀₀, Fig. 16B) of the films are hydrolysed. The visual changes of PCL₈₀₀₀₀ films during GDEst-lip-catalysed hydrolysis is presented (Fig. 16C).

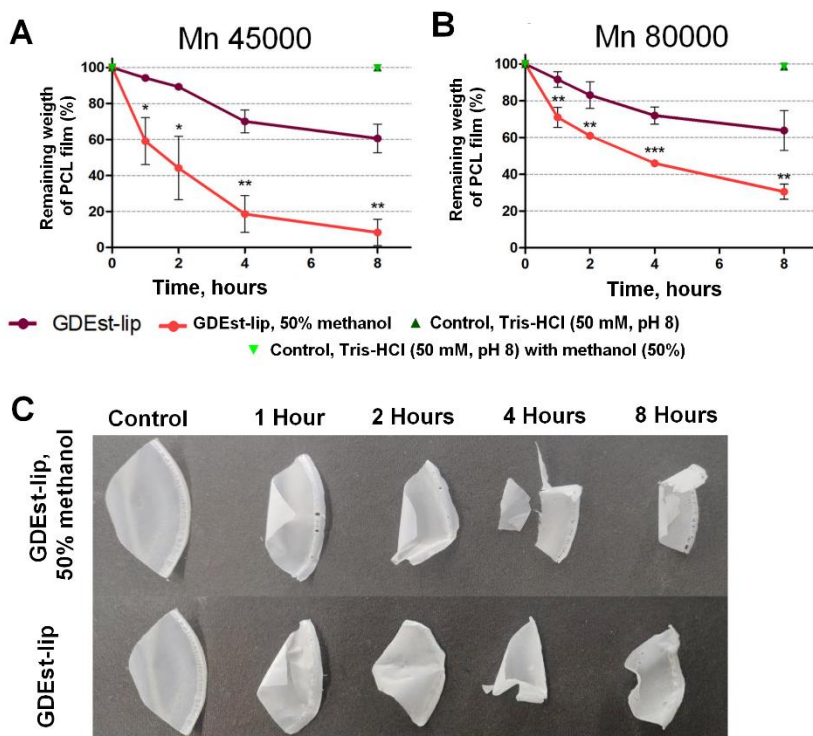


Fig. 16 degradation of PCL₄₅₀₀₀ (A) and PCL₈₀₀₀₀ (B) films using GDEst-lip fused enzyme and visual changes of PCL₈₀₀₀₀ films after treatment (C). Mn – average PCL molecular mass. Error bars display standard deviation. Statistical significance was calculated using t-test. * – $p \leq 0.05$; ** – $p \leq 0.01$; *** – $p \leq 0.001$.

GD-95RM (0.5 mg) can degrade approximately 30% (PCL₄₅₀₀₀, Fig. 17A) and 50% (PCL₈₀₀₀₀, Fig. 17B) of a PCL film during an 8-hour period. The addition of ethanol at a final concentration of 25% increased hydrolysis rate almost three-fold (PCL₄₅₀₀₀) and two-fold (PCL₈₀₀₀₀), respectively (Fig. 17). In both cases, the PCL film was completely degraded within 8 h. The visual changes of PCL₈₀₀₀₀ films during GD-95RM enzymatic hydrolysis are presented (Fig. 17C).

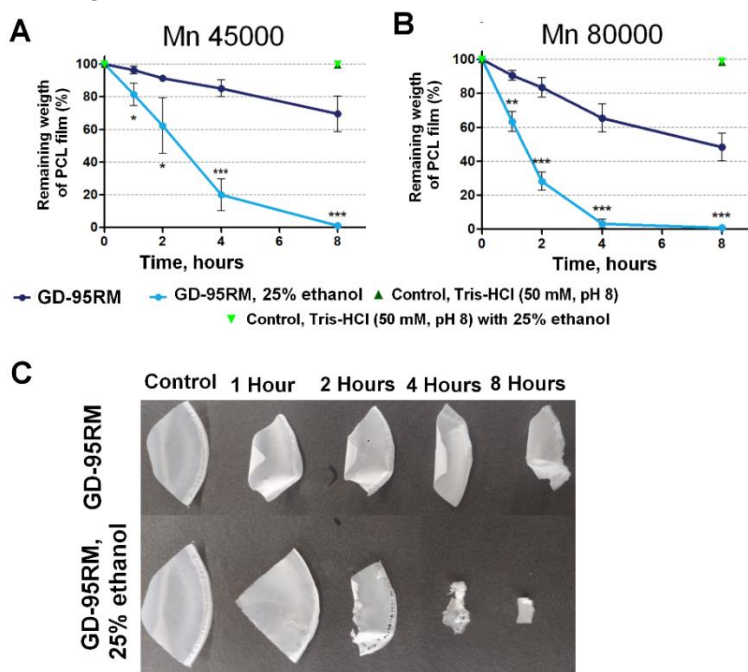


Fig. 17 Degradation of PCL₄₅₀₀₀ (A) and PCL₈₀₀₀₀ (B) films using GD-95RM lipase and visual changes of PCL₈₀₀₀₀ films after treatment (C). Mn – average PCL molecular mass. Error bars display standard deviation. Statistical significance was calculated using t-test. * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$; *** – $p < 0.001$.

Based on these results it can be assumed that GDEst-lip and GD-95RM enzyme hydrolysis occurs at a relatively constant rate. In samples that did not contain organic solvents a linear mass reduction of PCL films is observed. The dynamic of PCL hydrolysis does not seem to be related to the average molecular weight of PCL. Addition of organic solvents significantly increases PCL degradation and in 8 hours most of film is completely hydrolysed. GD-95RM with the addition of organic solvents can hydrolyse >90% of PCL film mass in 4 hours. During hydrolysis using organic solvents the reaction clearly slows down during the course of the reaction, but this is to be expected, as the amount of substrate in the sample also decreases.

Identification of hydrolysis products and ester synthesis

In studying the hydrolysis of PCL films, it was decided to investigate the products formed during enzymatic degradation. The PCL hydrolysis mixtures were analysed by HPLC-MS. Based on PCL structure, the predicted products of PCL hydrolysis were 6HHA (PubChem Identifier: CID 14490) and its oligomers. After the HPLC-MS analysis, 6HHA ($m/z = 133$) and its oligomers dimer ($m/z = 247$), trimer ($m/z = 361$), and tetramer ($m/z = 475$) were detected for both enzymes and both types of PCL films (Fig. 18A). Using GD-95RM, the highest intensity peaks were observed for 6HHA dimer and 6 HHA trimer, suggesting that these compounds dominated as the final hydrolysis products of PCL films, while using GDEst-lip resulted in the production of 6 HHA monomer (Fig. 18A).

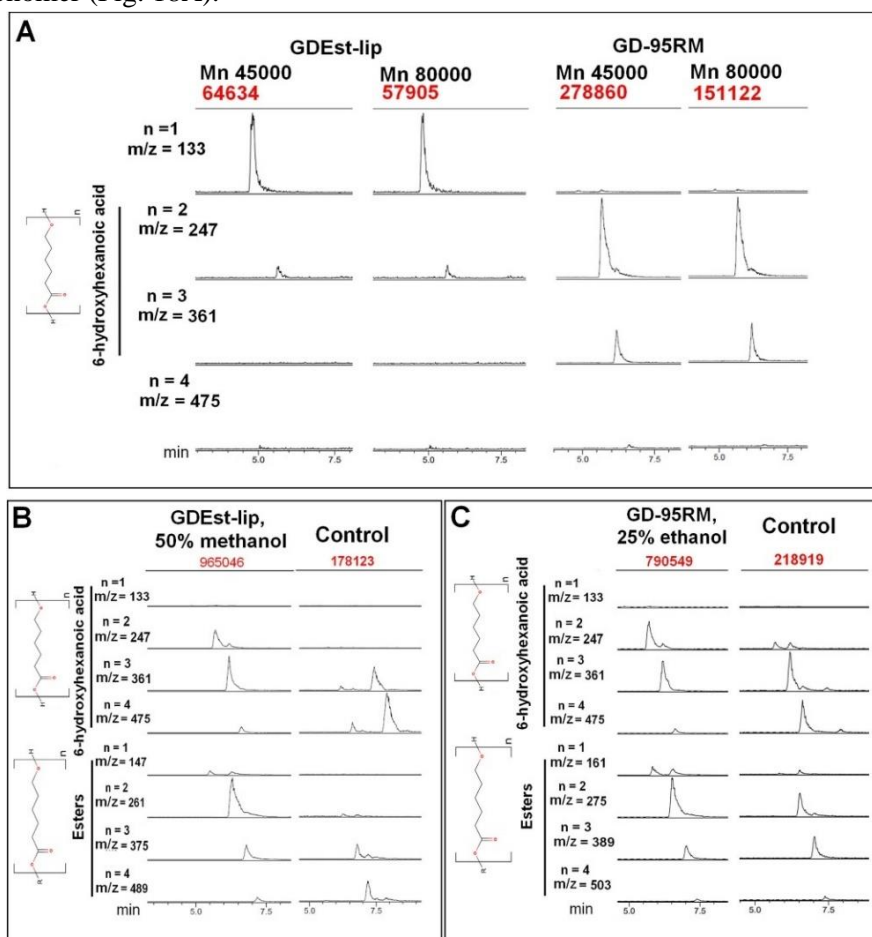


Fig 18. HPLC-MS analysis of PCL films hydrolysis products (A) and compounds produced during the degradation of PCL₈₀₀₀₀ film by GDEst-lip (0.05 mg) in 50% methanol (B) and by GD-95RM (0.05 mg) in 25% ethanol (C). The reactions have been performed for 24 h, at 30 °C temperature with agitation (130 rpm). “n” represents the number of molecules constituting the oligomer. The intensity of the peaks on the y-axis is presented in red.

If alcohols are present in the reaction mixture ethyl or methyl esters of 6HHA could potentially be produced. The 6 HHA esters production during degradation of PCL₈₀₀₀₀ in a reaction mixture composed of 0.05 mg GDEst-lip and 50% methanol (Fig. 18B) or GD-95RM and 25% ethanol (Fig. 18C) are presented as examples as very similar results were obtained using PCL₄₅₀₀₀. It was observed that after supplementing the reaction mixture with alcohols, both types of PCL hydrolysis products, 6 HHA, its dimers, trimers, and tetramers and their corresponding esters, are produced (Fig. 18B and C). Ethyl 6-hydroxyhexanoate and methyl 6-hydroxyhexanoate have been identified based on mass available at PubChem Identifier: CID 357781 and CID 3083855, respectively. After 24-hour degradation using GDEst-lip and methanol (Fig. 18B), the major products were dimers and trimers of 6HHA. Even though there are peaks observed in the control samples their intensity is much lower compared to samples after degradation; thus, GDEst-lip can successfully catalyse PCL hydrolysis and ester synthesis. The product profile observed after GD95-RM hydrolysis was very similar to that of GDEst-lip, except in the control samples, more 6HHA dimers are observed (Fig. 18C). This could be in part due to the influence of ethanol. Nevertheless, the relative intensity of peaks representing target products was much higher in the degradation mixtures compared to the intensity of peaks in control reactions (Fig. 18C). This concludes that GD-95RM can be defined as an attractive polyesterase for PCL hydrolysis and ester production.

DISCUSSION

While enzymes are commonly used throughout various industries, and biocatalysts make up a multi-billion-dollar industry (Badenhorst and Bornscheuer, 2018), one of the most common ways to generate new enzymes is still protein engineering. One of the biggest current challenges that humanity is facing, in which novel enzymes could help – is plastic pollution. While certain enzymes have been documented to be able to hydrolyse various polyesters there still is a lack of both fundamental and practical knowledge about possible application of enzymes from certain bacteria (for example *Geobacillus* sp.). New enzyme variants based on improvements done to current ones by site-specific or random mutagenesis could first be a possible solution to the plastic pollution problem, but it can also be the first step in utilising enzymes in different, novel ways. In this dissertation two aspects of lipolytic enzymes are presented: 1) structure-function relationship of poorly understood 55 kDa carboxylesterase found in the genus *Geobacillus*; 2) the ability of modified *Geobacillus* sp. 95 lipolytic enzymes to perform hydrolysis

of polyesters and produce esters in accordance with the principles of circular economy.

Carboxylesterase GDEst-95, first described in earlier works (Gudiukaite et al., 2017) – is a carboxylesterase, synthesised by *Geobacillus* sp. 95 strain, that possesses a unique protein size of 55 kDa. Most similar carboxylesterases analysed in literature are of 35 kDa in size. GDEst-95 has successfully been expressed in *E. coli* and used for protein engineering experiments: a chimeric protein GDEst-lip was created by fusing the coding sequence of this enzyme with GD-95 (a lipase synthesised by *Geobacillus* sp. 95). A highly similar esterase was analysed for its ability to hydrolyse the prodrug irinotecan (CPT-11) into the active form 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) a topoisomerase I inhibitor used in cancer therapy (Liu et al., 2007)).

To better understand this enzyme site-directed mutagenesis of possible amino acids, important for enzyme activity was performed. In this work Gly108Arg, Ala410Arg, Leu226Arg and Leu411Ala substitutions were analysed. Gly108Arg and Ala410Arg mutations had the significant negative impact on enzyme activity; Leu226Arg substitution reduced enzyme activity by about 56% and Leu411Ala mutation actually had a positive effect on enzyme activity. It is likely that the larger arginine substitution had a negative impact on the structure of the binding site in the case of Gly108Arg and Ala410Arg mutations. Mutation Leu226Arg could have had a smaller impact, and improved certain characteristics, since arginine is also a positively charged amino acid, and this property can be important for stabilising transition states, or orienting the substrate toward the active site, at locations near the protein surface (Son et al., 2023).

To evaluate currently unknown amino acid substitution effect on GDEst-95 activity, random mutagenesis was performed. Three variants were selected and further analysed: GDEst-RM1 (one mutation Arg75Gln); GDEst-RM2 (two mutations Gly20Ser and Arg75Gln); and GDEst-RM3 (two mutations Ser210Gly and Thr317Ala). GDEst-RM1 and GDEst-RM2 both possessed an almost threefold increase in specific activity, improved temperature activity (optimum working temperature for GDEst-RM1 increased by 10 °C and by GDEst-RM2 by 15 °C) and temperature stability at 60-70 °C range. The catalytic parameters of these enzymes were also improved (V_{max} increased by 2.7 and 4.2 times respectively while K_m was reduced by approximately 2 times). Catalytic efficiency increased by approximately 6 and 10 times respectively for GDEst-RM1 and GDEst-RM2, and activation energy was reduced by 6 kJ/mol. Since Arg75 is a common amino acid, that was mutated in this experiment it is likely that this mutation is responsible for most of the positive effect on enzyme activity. The effect of Gly20Ser mutation is

currently unknown and requires further analysis. GDEst-RM3 enzyme had an increase in specific activity by 60%, V_{\max} and K_m values ($31.52 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ or 9.28 mM , respectively) also reached their highest observed values using this enzyme. While the reaction rate increases the affinity for the substrate was reduced. Further mutagenesis, that improves K_m , while not reducing V_{\max} could help create an even more active GDEst-95 variant.

Docking analysis confirmed that GDEst-RM1 and GDEst-RM2 had lower binding energies with different *p*-NP esters when compared to GDEst-95. Both enzymes possessed similar values. GDEst-RM2 was used in LigPlot+ analysis, and it was shown that two novel amino acids form hydrogen bonds Tyr311 and Ala109. Ala109 had been identified as a possibly important amino acid in previous works (Gudiukaite et al., 2017; Liu et al., 2007) and can stabilise Cys408, a residue found at the active site. Cys408 is found in the active site and is an important regulatory element (Liu et al., 2007). Tyr311 has not been identified as an important residue in previous works and appears to form a hydrogen bond with the nitro group of *p*-NP. This could have a stabilising effect on the carboxylesterase, however, does this influence remains to be seen. LigPlot+ analysis also identified unique hydrophobic interactions between *p*-NP dodecanoate and GDEst-95 (Gly107 and Gly113) or GDEst-RM2 (Leu226, Ala410 and Leu413). Leu226 and 410 were analysed in this work, and this highlights the importance of these amino acids, while neither Gly113 or Leu413 have been experimentally analysed to evaluate their importance and are objects of further research.

It is usually thought that evolution selects for the most adapted population (or in our case macromolecules), often they can become confined in local optimums of the fitness landscape (that is to say, any single mutation is going to have a deleterious or neutral effect) (Yubero et al., 2017). In such conditions proteins that are less active will not be fixed in a population, and more active unmodified variants will outcompete any mutants. In such conditions there are few practical ways for a more active variant to emerge, even if such a structure exist on the sequence space (Carpenter et al., 2023). Protein engineering allows us to bypass this limitation and analyse various enzyme variants that would not be observable in nature. It also allows us to choose a particular parameter, that we use to evaluate enzyme fitness (activity, temperature stability, substrate specificity etc.) (Tracewell and Arnold, 2009). A summary of various GDEst-95 parameters evaluated is presented in figure 19.

Enzyme name	Genotype space	Phenotype space	Fitness		
			U/mg	↓	🌡️
Gly108Arg	³²² -GC C GC -	¹⁰⁸ -H G RAF-	U/mg ↓ 🌡️ - ND	K _{cat} - ND	☀️ - ND
Ala410Arg	¹²²⁸ -A C CG GC-	⁴¹⁰ - C HRLE-	U/mg ↓ 🌡️ - 0	K _{cat} ↓	☀️ ↑
Leu226Arg	⁶⁷⁷ -TT C GC C-	²²⁶ -AL R LR-	U/mg ↓ 🌡️ ↑	K _{cat} ↓	☀️ ↑
Leu411Ala	¹²³² - G CT CGA-	⁴¹¹ -HAA E L-	U/mg ↑ 🌡️ - 0	K _{cat} ↓	☀️ ↓
GDEst-RM1	²²⁴ -GG C AG -	⁷⁵ -LG Q MS-	U/mg ↑ 🌡️ ↑	K _{cat} ↑	☀️ ↑
GDEst-RM2	⁵⁸ -AA A GC -	²⁰ -NE S VF-	U/mg ↑ 🌡️ ↑	K _{cat} ↑	☀️ - 0
	²²⁴ -GG C AG -	⁷⁵ -LG Q MS-			
GDEst-RM3	⁶²⁸ -CC G GC -	²¹⁰ -E A GGL-	U/mg ↑ 🌡️ ↑	K _{cat} ↓	☀️ ↑
	⁹⁴⁹ -G G CG G-	³¹⁷ -TL A DP-			

Legend:

🌡️ - optimal activity temperature, compared to GDEst-95
☀️ - temperature stability, compared to GDEst-95
↑ - parameter was increased
↓ - parameter was decreased
0 - parameter was not affected
ND - parameter was not analysed

Fig 19. Visualisation of analysed points in the GDEst-95 genotype-phenotype space. Red letters indicate the modified nucleotides and amino acids.

The second aspect of this work is analysis of modified *Geobacillus* sp. 95 lipolytic enzymes GD-95RM and GDEst-lip for polycaprolactone hydrolysis and ester synthesis. Both enzymes were chosen because they possessed the attractive catalytic properties. Both enzymes could efficiently hydrolyse PCL films of different average molecular weight. Theoretically 1 mg of GD-95RM can hydrolyse (in 24 hours, at 30 °C) 264.0 mg of PCL₄₅₀₀₀ and 280.7 mg of PCL₈₀₀₀₀ film mass. Theoretically 1 mg of GDEst-lip can hydrolyse (in 24 hours, at 30 °C) 145.5 mg PCL₄₅₀₀₀ and 134 mg of PCL₈₀₀₀₀ film mass. As both enzymes display 90-100% activity at higher temperatures it is likely that even higher hydrolysis rates could be achieved – however lower temperature help reduce the resource cost of this process and is an important consideration for industrial applications.

While GDEst-lip was less efficient at reducing PCL film mass (likely due to the difference in enzyme activity) HPLC-MS analysis revealed that this enzyme produced 6HHA monomers almost exclusively, while GD-95RM

produced mostly trimers and dimers. As GDEst-lip possesses two active enzymes (an esterase and a lipase) is hypothesised, that the lipase domain cleaves the insoluble PCL film, while when soluble dimers and trimers are in the solution the esterase domain completes the hydrolysis (as esterases are usually seen as showing preferences for soluble short chain esters, while lipases show preference for insoluble longer chain esters). The fact that GDEst-95 does hydrolyse PCL films seems to favour this theory. A similar experiment where GD-95RM is supplemented with GDEst-95 at the end of hydrolysis could help answer this question.

A significant positive effect in PCL films degradation was observed when the reaction mixture was substituted with alcohols. This correlates with earlier works (Druteika et al., 2020; Gudiukaite et al., 2017; Savickaite et al., 2021a). Organic solvent can help increase the solubility of substrates or products and could also change the reaction conditions to favour ester synthesis. Higher hydrolysis rates and ester synthesis were observed after substituting the enzymes with 25% ethanol (GD-95RM) and 50% methanol (GDEst-lip).

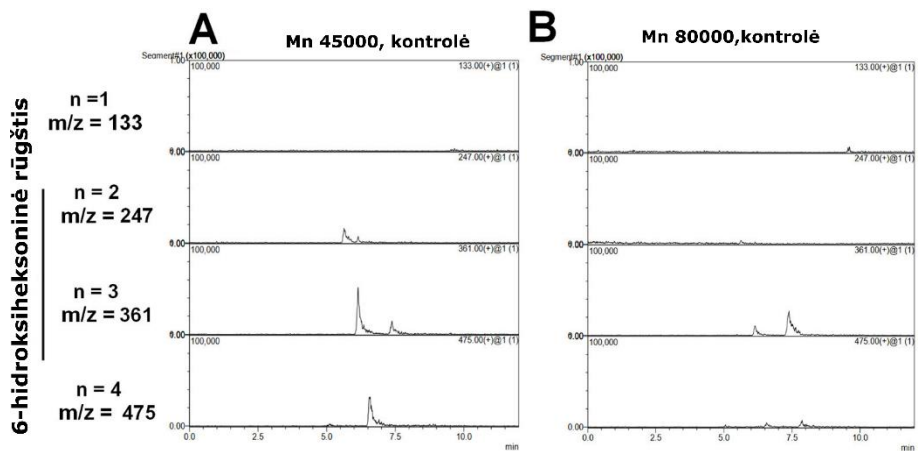
The obtained results show that GDEst-lip and GD-95RM could not only be used to hydrolyse PCL waste, but also be used in circular economic principles by allowing to utilise PCL waste for the synthesis of novel products. This would not only reduce environmental pollution, but would allow to reduce the price, energy costs and carbon footprint of processes involved in the manufacture of such waste. 6HHA could further be converted to other industrially important products (6-hydroxyhexanoic acid; hexamethyldiamine or 1,6-hexanediol). 6HHA esters like ethyl-6-hydroxyhexanoate could be used as a reagent for synthesising other industrially important compounds: ethyl-6-acetohexanoate or could be used as a precursor in pharmaceutical synthesis (Ostergaard and Larsen, 2007).

The results obtained illustrate the possible industrial application of *Geobacillus* sp. lipolytic enzymes and the potential of different mutagenesis methods: site-specific and random mutagenesis to acquire more information about lesser-known enzymes and modify currently available enzymes.

CONCLUSIONS

- Site-specific mutagenesis of amino acids Gly108 and Ala410 located near the active centre, and Leu226 substitutions to arginine had a negative, while Leu411 substitution to alanine had a positive effect on GDEst-95 activity.
- Using error-prone PCR three GDEst-95 variants: GDEst-RM1, GDEst-RM2, GDEst-RM3, with improved properties were generated. The mutated variants possessed improved V_{\max} and have a higher optimal working temperature when compared to unmodified GDEst-95.
- GD-95RM and GDEst-lip can perform PCL film hydrolysis: 1 mg of GD-95RM can degrade more than 264.0 mg of PCL weight; GDEst-lip 1 mg can degrade more than 134.0 mg of PCL weight.
- The addition of organic solvents can significantly improve PCL film hydrolysis by using GD-95RM or GDEst-lip enzymes. After adding 25% ethanol to the PCL degradation mixture GD-95RM enzyme (1 mg) can degrade 2,4 times more of PCL (646.0 mg), after adding 50% methanol – GDEst-lip (1 mg) can degrade 3 times more than of PCL (442.7 mg).
- Adding organic solvents to the reaction mixture, results in synthesis of ethyl-hydroxyhexanoate or methyl-hydroxyhexanoate by both GD-95RM and GDEst-lip.

PRIEDAI



1 priedas. 1 pav. PCL₄₅₀₀₀ (A) ir PCL₈₀₀₀₀ (B) hidrolizės kontrolinių mėginių HPLC-MS analizė. Plėvelės buvo inkubuotos Tris-HCl buferiniame tirpale (50 mM, pH 8) 24 val. 30 °C temperatūroje su maišymu (150 rpm). „n“ – skaičius 6HHA molekulių, sudarančių oligomerą.

PADĖKA

Norėčiau išreikšti didžiausią padėką savo vadovei doc. dr. Renatai Gudiukaitei už tai, jog per šiuos daugybę bendrų darbo metų buvo puiki vadovė, kuri patarė ir palaikė, kada buvo sunku, pabarė ir pakentė mane, kada nebūdavo jėgų ar noro dirbti. Visada būsiu dėkingas, už tai, kad nuo pat pirmųjų bakalauro studijų metų sutiko priimti į laboratoriją ir leido man pasinerti į mokslininko gyvenimą.

Norėčiau padėkoti dr. Jonitai Stankevičiūtei bei Andriui Pakalniškiui už bendradarbiavimą. Be Jūsų prisidėjimo ir bendradarbiavimo šioje disertacijoje pateikti rezultatai būtų buvę gerokai skurdesni.

Labai dėkoju savo studentams, tiek tiems, kuriems galėjau vadovauti, tiek esamiems. Jūsų ambicija, darbštumas ir atsidavimas mokslui ne tik svariai prisideda ir padeda įgyvendinti mokslines idėjas laboratorijoje, tačiau taip pat yra pavyzdys ir priminimas to užkrečiančio noro sužinoti ir padaryti daugiau.

Norėčiau padėkoti visiems Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedros kolegoms už patarimus, diskusijas ir padrašinimą. Tiek moksliniais, tiek ir gyvenimiškais klausimais.

Labai dėkoju prof. dr. Elenai Servienei ir doc. dr. Julijai Armalytei už tai, jog sutiko būti šio darbo recenzentėmis ir už daugybę naudingų komentarų ir patarimų, kurie leido patobulinti ne tik disertaciją, tačiau taip pat buvo puiki pamoka ateities rašto darbams. Taip pat norėčiau padėkoti kitiems savo disertacijos komisijos nariams prof. dr. Rolandui Meškiui, prof. dr. Romui Kazlauskui ir doc. dr. Jolantai Sereikaitei už jų skirtą laiką ir pastabas.

Atskirai išreiškiu padėką VU GMC doktorantūros mokyklai už tai, jog padėjo rasti kelią kartais tikrai painiame doktorantūros studijų procese ir nenuilstantį darbą organizuojant doktorantūros studijas.

Galiausiai, tačiau tikrai ne mažiausiai, norėčiau padėkoti savo šeimai ir draugams. Jūsų šiluma ir rūpestis mane lydėjo visus studijų metus. Jūs – kurie padrašinote ir išklausėte, kada buvo sunku, o dažnai net suteikėte patarimų ką būtų galima padaryti geriau. Jūs pakentėte visus sunkumus, kada vėluodavau, ar turėdavau pakeisti planus. Jūsų kantrybė, pagalba ir rūpestis leidžia man daryti tai, ką labiausiai myliu gyvenime. Ačiū Jums už tai!

PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

Remiantis disertacijos rezultatais paskelbtos publikacijos

1. **Malunavicius, V.**, Padaiga, A., Stankeviciute, J. Pakalniskis, A., Gudiukaite, R. Engineered *Geobacillus* lipolytic enzymes – attractive polyesterases that degrade polycaprolactones and simultaneously produce esters. Int J Biol Macromol. 2023. 2023, 253(8), 127656. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127656>
2. **Malunavicius, V.**, Vaskevicius, L., Gusaite, A., Gudiukaite, R. Rational and random mutagenesis of GDEst-95 carboxylesterase: New functionality insights. Int J Biol Macromol. 2024, 256, 128331. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.128331>

Pranešimų disertacijos tema sąrašas:

1. **Malūnavičius V.**, Savickaitė A., Peleckas R., Gudiukaitė, R. Functionality analysis of organic solvents tolerant carboxylesterase from *Geobacillus* sp. 95 (stendinis pranešimas). Vita Scientia 2020. Sausio 3 d., 2020, Vilnius, Lietuva, stendinis pranešimas. Pranešimas įvertintas geriausio stendinio pranešimo apdovanojimu.
2. **Malūnavičius V.**, Gudiukaitė R. Protein engineering of *Geobacillus* lipolytic enzymes – from enzyme fusions to directed evolution. The COINS International conference of Life sciences 2020. Vasario 25 – 27, 2020, Vilnius, Lietuva, žodinis pranešimas. Pranešimas įvertintas geriausio žodinio pranešimo apdovanojimu.
3. **Malūnavičius V.**, Gusaitė, A., Pronckutė, S., Gudiukaitė, R. *Geobacillus* sp. 95 esterase: analysis of important amino acids for substrate binding and activity. FEBS3+2022. Liepos 15 – 17, 2022, Estija, Talinas, stendinis pranešimas.
4. **Malūnavičius, V.**, Gusaitė, A., Gudiukaitė, R. Furthering the understanding of *Geobacillus* sp. 95 esterase (GDEst-95) using site-directed and random mutagenesis. International Conference of Life Sciences The COINS 2023. Balandžio 24 – 27 d., 2023, Vilnius, Lietuva, stendinis pranešimas
5. **Malūnavičius V.**, Gudiukaitė R. Research of *Geobacillus* lipases and esterases – new insights and possible applications. 5th congress of Baltic Microbiologists. Spalio 11 – 13 d., 2023, Vilnius, Lietuva, žodinis pranešimas.

CURRICULUM VITAE

Vardas, Pavardė Vilius Malūnavičius
Adresas Gyvybės mokslų centras, Saulėtekio al. 7, 10257,
Vilnius, Lietuva
El. pašto adresas vilius.malunavicius@gmc.vu.lt

IŠSILAVINIMAS

2019-2023 **Doktorantūros studijos**, gamtos mokslai, biologija, Vilniaus universitetas, Gyvybės mokslų centras, Biomokslų institutas.
2017-2019 **Magistro studijos**, Mikrobiologija, Vilniaus universitetas, Gyvybės mokslų centras, Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedra.
2013-2017 **Bakalauro studijos**, Mikrobiologija ir biotechnologija, Vilniaus universitetas, Gyvybės mokslų centras, Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedra.

DARBINĖ VEIKLA

2024 07 – 2024 09 Projektas “Studentų vasaros praktika 2024”. Projekto numeris P-SV-24-120. Projekto pavadinimas “Archėjinių mikroorganizmų kultivavimo sąlygų optimizavimas ir natyvaus lipolizinio aktyvumo tyrimas”. **Projekto vadovas.**
2022 11 – 2023 09 Aukštųjų mokyklų tinklo optimizavimas ir studijų kokybės gerinimas Šiaulių universitetą prijungiant prie Vilniaus universiteto”. **Projekto ekspertas.**
2020 09 – 2024 09 **Jaunesnysis asistentas**, Vilniaus universitetas, Gyvybės mokslų centras, Biomokslų institutas.
2020 05 – 2023 05 **Jaunesnysis mokslo darbuotojas**, Vilniaus universitetas, Gyvybės mokslų centras, Biomokslų institutas.
2019 08; 2020 03 “Naujų pramonei patrauklių biokatalizatorių kūrimas ir efektyvesnių baltymų inžinerijos metodų vystymas”. **Projekto specialistas.**

UŽRAŠAMS

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Abdel-Motaal, F.F., El-Sayed, M.A., El-Zayat, S.A., Ito, S., 2014. Biodegradation of poly (ϵ -caprolactone) (PCL) film and foam plastic by *Pseudozyma japonica* sp. nov., a novel cutinolytic ustilaginomycetous yeast species. *3 Biotech* 4, 507–512. <https://doi.org/10.1007/s13205-013-0182-9>
2. Adlercreutz, P., 2017. Comparison of lipases and glycoside hydrolases as catalysts in synthesis reactions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101, 513–519. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-8055-x>
3. Akoh, C.C., Lee, G.-C., Liaw, Y.-C., Huang, T.-H., Shaw, J.-F., 2004. GDSL family of serine esterases/lipases. *Prog. Lipid Res.* 43, 534–552. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2004.09.002>
4. Akutsu, Y., Nakajima-Kambe, T., Nomura, N., Nakahara, T., 1998. Purification and Properties of a Polyester Polyurethane-Degrading Enzyme from *Comamonas acidovorans* TB-35. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 62–67. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.1.62-67.1998>
5. Alejaldre, L., Lemay-St-Denis, C., Pelletier, J.N., Quaglia, D., 2022. Tuning Selectivity in CalA Lipase: Beyond Tunnel Engineering. *Biochemistry*. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.2c00513>
6. Ali, S., Khan, S.A., Hamayun, M., Lee, I.-J., 2023. The Recent Advances in the Utility of Microbial Lipases: A Review. *Microorganisms* 11, 510. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020510>
7. Alisch, M., Feuerhack, A., Müller, H., Mensak, B., Andreaus, J., Zimmermann, W., 2004. Biocatalytic modification of polyethylene terephthalate fibres by esterases from actinomycete isolates. *Biocatal. Biotransformation* 22, 347–351. <https://doi.org/10.1080/10242420400025877>
8. Almeida, B.C., Figueiredo, P., Carvalho, A.T.P., 2019. Polycaprolactone Enzymatic Hydrolysis: A Mechanistic Study. *ACS Omega* 4, 6769–6774. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b00345>
9. Angajala, G., Pavan, P., Subashini, R., 2016. Lipases: An overview of its current challenges and prospectives in the revolution of biocatalysis. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 7, 257–270. <https://doi.org/10.1016/j.cbab.2016.07.001>
10. Angkawidjaja, C., You, D., Matsumura, H., Kuwahara, K., Koga, Y., Takano, K., Kanaya, S., 2007. Crystal structure of a family I.3 lipase from *Pseudomonas* sp. MIS38 in a closed conformation. *FEBS Lett.* 581, 5060–5064. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.09.048>
11. Anobom, C.D., Pinheiro, A.S., De-Andrade, R.A., Aguierras, E.C.G., Andrade, G.C., Moura, M.V., Almeida, R.V., Freire, D.M., 2014. From Structure to Catalysis: Recent Developments in the Biotechnological Applications of Lipases. *BioMed Res. Int.* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/684506>

12. Aranda, J., Cerqueira, N.M.F.S.A., Fernandes, P.A., Roca, M., Tuñon, I., Ramos, M.J., 2014. The Catalytic Mechanism of Carboxylesterases: A Computational Study. *Biochemistry* 53, 5820–5829. <https://doi.org/10.1021/bi500934j>
13. Arnal, G., Anglade, J., Gavalda, S., Tournier, V., Chabot, N., Bornscheuer, U.T., Weber, G., Marty, A., 2023. Assessment of Four Engineered PET Degrading Enzymes Considering Large-Scale Industrial Applications. *ACS Catal.* 13, 13156–13166. <https://doi.org/10.1021/acscatal.3c02922>
14. Arora, B., Mukherjee, J., Gupta, M.N., 2014a. Enzyme promiscuity: using the dark side of enzyme specificity in white biotechnology. *Sustain. Chem. Process.* 2, 25. <https://doi.org/10.1186/s40508-014-0025-y>
15. Arora, B., Pandey, P.S., Gupta, M.N., 2014b. Lipase catalyzed Cannizzaro-type reaction with substituted benzaldehydes in water. *Tetrahedron Lett.* 55, 3920–3922. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2014.05.022>
16. Arpigny, J.L., Jaeger, K.E., 1999. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem. J.* 343, 177–183.
17. Backes, E.H., Harb, S.V., Beatrice, C.A.G., Shimomura, K.M.B., Passador, F.R., Costa, L.C., Pessan, L.A., 2022. Polycaprolactone usage in additive manufacturing strategies for tissue engineering applications: A review. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 110, 1479–1503. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34997>
18. Badenhorst, C.P.S., Bornscheuer, U.T., 2018. Getting Momentum: From Biocatalysis to Advanced Synthetic Biology. *Trends Biochem. Sci.* 43, 180–198. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.01.003>
19. Bagheri, A.R., Laforsch, C., Greiner, A., Agarwal, S., 2017. Fate of So-Called Biodegradable Polymers in Seawater and Freshwater. *Glob. Chall.* 1, 1700048. <https://doi.org/10.1002/gch2.201700048>
20. Bajpai, D., Tyagi, V.K., 2007. Laundry Detergents: An Overview. *J. Oleo Sci.* 56, 327–340. <https://doi.org/10.5650/jos.56.327>
21. Baker, P.J., Poultney, C., Liu, Z., Gross, R., Montclare, J.K., 2012. Identification and comparison of cutinases for synthetic polyester degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93, 229–240. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3402-4>
22. Baptista, C., Azagury, A., Shin, H., Baker, C.M., Ly, E., Lee, R., Mathiowitz, E., 2020. The effect of temperature and pressure on polycaprolactone morphology. *Polymer* 191, 122227. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2020.122227>
23. Barnes, M.R., Gray, I.C., 2003. *Bioinformatics for Geneticists*. Wiley.
24. Bashiri, R., Curtis, T.P., Ofițeru, I.D., 2022. The limitations of the current protein classification tools in identifying lipolytic features in putative bacterial lipase sequences. *J. Biotechnol.* 351, 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2022.04.011>

25. Bauer, T.L., Buchholz, P.C.F., Pleiss, J., 2020. The modular structure of α/β -hydrolases. *FEBS J.* 287, 1035–1053. <https://doi.org/10.1111/febs.15071>
26. Bavandi, H., Shahedi, M., Habibi, Z., Yousefi, M., Brask, J., Mohammadi, M., 2022. Biocatalytic decarboxylative Michael addition for synthesis of 1,4-benzoxazinone derivatives. *Sci. Rep.* 12, 12713. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16291-3>
27. Bell, E.L., Smithson, R., Kilbride, S., Foster, J., Hardy, F.J., Ramachandran, S., Tedstone, A.A., Haigh, S.J., Garforth, A.A., Day, P.J.R., Levy, C., Shaver, M.P., Green, A.P., 2022. Directed evolution of an efficient and thermostable PET depolymerase. *Nat. Catal.* 5, 673–681. <https://doi.org/10.1038/s41929-022-00821-3>
28. Ben Rejeb, I., Khemir, H., Messaoudi, Y., Miled, N., Gargouri, M., 2022. Optimization of Enzymatic Degreasing of Sheep Leather for an Efficient Approach and Leather Quality Improvement Using Fractional Experimental Design. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 194, 2251–2268. <https://doi.org/10.1007/s12010-021-03769-5>
29. Bertani, G., 1951. STUDIES ON LYSOGENESIS I. *J. Bacteriol.* 62, 293–300.
30. Bhadran, A., Shah, T., Babanyinah, G.K., Polara, H., Taslimy, S., Biewer, M.C., Stefan, M.C., 2023. Recent Advances in Polycaprolactones for Anticancer Drug Delivery. *Pharmaceutics* 15, 1977. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15071977>
31. Billig, S., Oeser, T., Birkemeyer, C., Zimmermann, W., 2010. Hydrolysis of cyclic poly(ethylene terephthalate) trimers by a carboxylesterase from *Thermobifida fusca* KW3. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 1753–1764. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2635-y>
32. Biundo, A., Ribitsch, D., Guebitz, G.M., 2018. Surface engineering of polyester-degrading enzymes to improve efficiency and tune specificity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 3551–3559. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8850-7>
33. Borgdorf, R., Warwel, S., 1999. Substrate selectivity of various lipases in the esterification of cis- and trans-9-octadecenoic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, 480–485. <https://doi.org/10.1007/s002530051420>
34. Bornscheuer, U.T., 2002. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 73–81. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00599.x>
35. Borrelli, G.M., Trono, D., 2015. Recombinant Lipases and Phospholipases and Their Use as Biocatalysts for Industrial Applications. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 20774–20840. <https://doi.org/10.3390/ijms160920774>
36. Boyko, K.M., Kryukova, M.V., Petrovskaya, L.E., Nikolaeva, A.Y., Korzhenevsky, D.A., Novototskaya-Vlasova, K.A., Rivkina, E.M., Dolgikh, D.A., Kirpichnikov, M.P., Popov, V.O., 2020. Crystal structure of PMGL2 esterase from the hormone-sensitive lipase family with

- GCSAG motif around the catalytic serine. PLoS ONE 15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226838>
37. Branney, C., Carlqvist, P., Magnusson, A., Hult, K., Brinck, T., Berglund, P., 2003. Carbon–Carbon Bonds by Hydrolytic Enzymes. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 874–875. <https://doi.org/10.1021/ja028056b>
 38. Carniel, A., Valoni, É., Nicomedes, J., Gomes, A. da C., Castro, A.M. de, 2017. Lipase from *Candida antarctica* (CALB) and cutinase from *Humicola insolens* act synergistically for PET hydrolysis to terephthalic acid. *Process Biochem.*, Advances in “Polymer/ Fibre Biotechnology” 59, 84–90. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.07.023>
 39. Carpenter, A.C., Feist, A.M., Harrison, F.S.M., Paulsen, I.T., Williams, T.C., 2023. Have you tried turning it off and on again? Oscillating selection to enhance fitness-landscape traversal in adaptive laboratory evolution experiments. *Metab. Eng. Commun.* 17, e00227. <https://doi.org/10.1016/j.mec.2023.e00227>
 40. Casas-Godoy, L., Gasteazoro, F., Duquesne, S., Bordes, F., Marty, A., Sandoval, G., 2018. Lipases: An Overview: Methods and Protocols, in: *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.). pp. 3–38. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8672-9_1
 41. Cecilia, J.A., Ballesteros Plata, D., Alves Saboya, R.M., Tavares de Luna, F.M., Cavalcante, C.L., Rodríguez-Castellón, E., 2020. An Overview of the Biolubricant Production Process: Challenges and Future Perspectives. *Processes* 8, 257. <https://doi.org/10.3390/pr8030257>
 42. Cen, Y., Singh, W., Arkin, M., Moody, T.S., Huang, M., Zhou, J., Wu, Q., Reetz, M.T., 2019. Artificial cysteine-lipases with high activity and altered catalytic mechanism created by laboratory evolution. *Nat. Commun.* 10, 3198. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11155-3>
 43. Chahinian, H., Nini, L., Boitard, E., Dubès, J.-P., Comeau, L.-C., Sarda, L., 2002. Distinction between esterases and lipases: A kinetic study with vinyl esters and TAG. *Lipids* 37, 653–662. <https://doi.org/10.1007/s11745-002-0946-7>
 44. Chandra, P., Enespa, Singh, R., Arora, P.K., 2020. Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. *Microb. Cell Factories* 19, 169. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01428-8>
 45. Chatonnet, A., 2001. Links between kinetic data and sequences in the alpha/beta-hydrolases fold database. *Brief. Bioinform.* 2, 30–37. <https://doi.org/10.1093/bib/2.1.30>
 46. Chatonnet, A., Perochon, M., Velluet, E., Marchot, P., 2023. The ESTHER database on alpha/beta hydrolase fold proteins - An overview of recent developments. *Chem. Biol. Interact.* 383, 110671. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2023.110671>
 47. Choi, Y.H., van Spronsen, J., Dai, Y., Verberne, M., Hollmann, F., Arends, I.W.C.E., Witkamp, G.-J., Verpoorte, R., 2011. Are Natural Deep Eutectic Solvents the Missing Link in Understanding Cellular Metabolism

- and Physiology? *Plant Physiol.* 156, 1701–1705.
<https://doi.org/10.1104/pp.111.178426>
48. Clark, D.P., Pazdernik, N.J., 2016. Chapter 11 - Protein Engineering, in: Clark, D.P., Pazdernik, N.J. (Eds.), *Biotechnology (Second Edition)*. Academic Cell, Boston, pp. 365–392. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385015-7.00011-9>
 49. Conway, P., Tyka, M.D., DiMaio, F., Konerding, D.E., Baker, D., 2014. Relaxation of backbone bond geometry improves protein energy landscape modeling. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 23, 47–55. <https://doi.org/10.1002/pro.2389>
 50. Copley, S.D., 2017. Shining a light on enzyme promiscuity. *Curr. Opin. Struct. Biol., Protein–nucleic acid interactions • Catalysis and regulation* 47, 167–175. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2017.11.001>
 51. Cousin, X., Hotelier, T., Giles, K., Lievin, P., Toutant, J.P., Chatonnet, A., 1997. The alpha/beta fold family of proteins database and the cholinesterase gene server ESTHER. *Nucleic Acids Res.* 25, 143–146. <https://doi.org/10.1093/nar/25.1.143>
 52. Cousin, X., Hotelier, T., Giles, K., Toutant, J.P., Chatonnet, A., 1998. aChEdb: the database system for ESTHER, the alpha/beta fold family of proteins and the Cholinesterase gene server. *Nucleic Acids Res.* 26, 226–228. <https://doi.org/10.1093/nar/26.1.226>
 53. Cousin, X., Hotelier, T., Liévin, P., Toutant, J.P., Chatonnet, A., 1996. A cholinesterase genes server (ESTHER): a database of cholinesterase-related sequences for multiple alignments, phylogenetic relationships, mutations and structural data retrieval. *Nucleic Acids Res.* 24, 132–136.
 54. Cunningham, B.C., Wells, J.A., 1989. High-Resolution Epitope Mapping of hGH-Receptor Interactions by Alanine-Scanning Mutagenesis. *Science* 244, 1081–1085. <https://doi.org/10.1126/science.2471267>
 55. Currin, A., Swainston, N., Day, P.J., Kell, D.B., 2015. Synthetic biology for the directed evolution of protein biocatalysts: navigating sequence space intelligently. *Chem. Soc. Rev.* 44, 1172–1239. <https://doi.org/10.1039/c4cs00351a>
 56. Cvjetko Bubalo, M., Jurinjak Tušek, A., Vinkovič, M., Radošević, K., Gaurina Sršek, V., Radojčić Redovniković, I., 2015. Cholinium-based deep eutectic solvents and ionic liquids for lipase-catalyzed synthesis of butyl acetate. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 122, 188–198. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.09.005>
 57. Danso, D., Chow, J., Streit, W.R., 2019. Plastics: Environmental and Biotechnological Perspectives on Microbial Degradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 85, e01095-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.01095-19>
 58. Deshmukh, K., Basheer Ahamed, M., Deshmukh, R.R., Khadheer Pasha, S.K., Bhagat, P.R., Chidambaram, K., 2017. 3 - Biopolymer Composites With High Dielectric Performance: Interface Engineering, in: Sadasivuni, K.K., Ponnamma, D., Kim, J., Cabibihan, J.-J., AlMaadeed, M.A. (Eds.),

- Biopolymer Composites in Electronics. Elsevier, pp. 27–128. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809261-3.00003-6>
59. Directorate-General for Research and Innovation (European Commission), 2020. Biodegradability of plastics in the open environment. Publications Office of the European Union, LU.
 60. Druteika, G., Sadauskas, M., Malunavicius, V., Lastauskiene, E., Statkeviciute, R., Savickaite, A., Gudiukaite, R., 2020. New engineered *Geobacillus* lipase GD-95RM for industry focusing on the cleaner production of fatty esters and household washing product formulations. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 36, 41. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02816-3>
 61. Druteika, G., Sadauskas, M., Malunavicius, V., Lastauskiene, E., Taujenis, L., Gegeckas, A., Gudiukaite, R., 2019. Development of a new *Geobacillus* lipase variant GDlip43 via directed evolution leading to identification of new activity-regulating amino acids. *Int. J. Biol. Macromol.* <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.163>
 62. Dwivedee, B.P., Soni, S., Sharma, M., Bhaumik, J., Laha, J.K., Banerjee, U.C., 2018. Promiscuity of Lipase-Catalyzed Reactions for Organic Synthesis: A Recent Update. *ChemistrySelect* 3, 2441–2466. <https://doi.org/10.1002/slct.201702954>
 63. Eberl, A., Heumann, S., Brückner, T., Araujo, R., Cavaco-Paulo, A., Kaufmann, F., Kroutil, W., Guebitz, G.M., 2009. Enzymatic surface hydrolysis of poly(ethylene terephthalate) and bis(benzoyloxyethyl) terephthalate by lipase and cutinase in the presence of surface active molecules. *J. Biotechnol.* 143, 207–212. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.07.008>
 64. Elgharbawy, A.A., Riyadi, F.A., Alam, Md.Z., Moniruzzaman, M., 2018. Ionic liquids as a potential solvent for lipase-catalysed reactions: A review. *J. Mol. Liq.* 251, 150–166. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.12.050>
 65. Evitt, A.S., Bornscheuer, U.T., 2011. Lipase CAL-B does not catalyze a promiscuous decarboxylative aldol addition or Knoevenagel reaction. *Green Chem.* 13, 1141–1142. <https://doi.org/10.1039/C0GC00505C>
 66. Fernandez-Lopez, L., Roda, S., Robles-Martín, A., Muñoz-Tafalla, R., Almendral, D., Ferrer, M., Guallar, V., 2023. Enhancing the Hydrolytic Activity of a Lipase towards Larger Triglycerides through Lid Domain Engineering. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 13768. <https://doi.org/10.3390/ijms241813768>
 67. Ferrada, E., Wagner, A., 2010. Evolutionary innovations and the organization of protein functions in genotype space. *PloS One* 5, e14172. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014172>
 68. Fischer, M., Pleiss, J., 2003. The Lipase Engineering Database: a navigation and analysis tool for protein families. *Nucleic Acids Res.* 31, 319–321.

69. Fowler, D.M., Fields, S., 2014. Deep mutational scanning: a new style of protein science. *Nat. Methods* 11, 801–807. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3027>
70. Fröhlich, C., Bunzel, H.A., Buda, K., Mulholland, A.J., van der Kamp, M.W., Johnsen, P.J., Leiros, H.-K.S., Tokuriki, N., 2024. Epistasis arises from shifting the rate-limiting step during enzyme evolution of a β -lactamase. *Nat. Catal.* 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41929-024-01117-4>
71. Gautam, R., Bassi, A.S., Yanful, E.K., 2007. *Candida rugosa* lipase-catalyzed polyurethane degradation in aqueous medium. *Biotechnol. Lett.* 29, 1081–1086. <https://doi.org/10.1007/s10529-007-9354-1>
72. Geyer, R., Jambeck, J.R., Law, K.L., 2017. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Sci. Adv.* 3, e1700782. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700782>
73. Gonzalez, C.E., Ostermeier, M., 2019. Pervasive pairwise intragenic epistasis among sequential mutations in TEM-1 β -lactamase. *J. Mol. Biol.* 431, 1981–1992. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.03.020>
74. Greicius, A., Baliutavicius, T., Lastauskiene, E., Gudiukaite, R., 2023. Application of Milk Permeate as an Inducer for the Production of Microbial Recombinant Lipolytic Enzymes. *Fermentation* 9, 27. <https://doi.org/10.3390/fermentation9010027>
75. Gricajeva, A., Bikutė, I., Kalėdienė, L., 2019. Atypical organic-solvent tolerant bacterial hormone sensitive lipase-like homologue EstAG1 from *Staphylococcus saprophyticus* AG1: Synthesis and characterization. *Int. J. Biol. Macromol.* 130, 253–265. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.110>
76. Guan, L., Gao, Y., Li, J., Wang, K., Zhang, Z., Yan, S., Ji, N., Zhou, Y., Lu, S., 2020. Directed Evolution of *Pseudomonas fluorescens* Lipase Variants With Improved Thermostability Using Error-Prone PCR. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8, 1034. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.01034>
77. Gudiukaite, R., 2016. Geobacillus genties bakterijų sintetinamų lipazių ir esterazių inžinerija ir biokatalizinių savybių įvertinimas. Vilnius University, Vilnius University.
78. Gudiukaitė, 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. *Extrem. Life Extreme Cond.* 18, 131–145. <https://doi.org/10.1007/s00792-013-0605-x>
79. Gudiukaitė, 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, 654–669. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1900-z>
80. Gudiukaite, R., Sadauskas, M., Gegeckas, A., Malunavicius, V., Citavicius, D., 2017. Construction of a novel lipolytic fusion biocatalyst GDEst-lip for industrial application. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 44, 799–815. <https://doi.org/10.1007/s10295-017-1905-4>

81. Gunn, K.H., Neher, S.B., 2023. Structure of dimeric lipoprotein lipase reveals a pore adjacent to the active site. *Nat. Commun.* 14, 2569. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38243-9>
82. 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. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2014.12.001>
83. Haernvall, K., Zitzenbacher, S., Wallig, K., Yamamoto, M., Schick, M.B., Ribitsch, D., Guebitz, G.M., 2017. Hydrolysis of Ionic Phthalic Acid Based Polyesters by Wastewater Microorganisms and Their Enzymes. *Environ. Sci. Technol.* 51, 4596–4605. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b00062>
84. Han, G., Oh, S., Yeo, S.J., Lee, J., Lim, H., 2023. Eco-friendly polycaprolactone-bound diatomite filter for the removal of metal ions and micro/nanoplastics from water. *Sci. Total Environ.* 905, 166956. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166956>
85. Hansen, B.B., Spittle, S., Chen, B., Poe, D., Zhang, Y., Klein, J.M., Horton, A., Adhikari, L., Zelovich, T., Doherty, B.W., Gurkan, B., Maginn, E.J., Ragauskas, A., Dadmun, M., Zawodzinski, T.A., Baker, G.A., Tuckerman, M.E., Savinell, R.F., Sangoro, J.R., 2021. Deep Eutectic Solvents: A Review of Fundamentals and Applications. *Chem. Rev.* 121, 1232–1285. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00385>
86. Hata, K., Matsukura, M., Taneda, H., Fujita, Y., 1996. Mill-Scale Application of Enzymatic Pitch Control During Paper Production, in: *Enzymes for Pulp and Paper Processing*, ACS Symposium Series. American Chemical Society, pp. 280–296. <https://doi.org/10.1021/bk-1996-0655.ch022>
87. He, Y., Li, K., Bo, G., Wang, J., Xu, L., Yan, J., Yang, M., Yan, Y., 2022. Enhancing biodiesel production via liquid *Yarrowia lipolytica* lipase 2 in deep eutectic solvents. *Fuel* 316, 123342. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.123342>
88. Heckman, K.L., Pease, L.R., 2007. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nat. Protoc.* 2, 924–932. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.132>
89. Hedrick, J.L., Magbitang, T., Connor, E.F., Glauser, T., Volksen, W., Hawker, C.J., Lee, V.Y., Miller, R.D., 2002. Application of Complex Macromolecular Architectures for Advanced Microelectronic Materials. *Chem. – Eur. J.* 8, 3308–3319. [https://doi.org/10.1002/1521-3765\(20020802\)8:15<3308::AID-CHEM3308>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/1521-3765(20020802)8:15<3308::AID-CHEM3308>3.0.CO;2-D)
90. Herrero Acero, E., Ribitsch, D., Steinkellner, G., Gruber, K., Greimel, K., Eiteljoerg, I., Trotscha, E., Wei, R., Zimmermann, W., Zinn, M., Cavaco-Paulo, A., Freddi, G., Schwab, H., Guebitz, G., 2011. Enzymatic Surface Hydrolysis of PET: Effect of Structural Diversity on Kinetic Properties of Cutinases from Thermobifida. *Macromolecules* 44, 4632–4640. <https://doi.org/10.1021/ma200949p>

91. Hitch, T.C.A., Clavel, T., 2019. A proposed update for the classification and description of bacterial lipolytic enzymes. *PeerJ* 7, e7249. <https://doi.org/10.7717/peerj.7249>
92. Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K., Pease, L.R., 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77, 51–59. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(89\)90358-2](https://doi.org/10.1016/0378-1119(89)90358-2)
93. Hollenbach, R., Delavault, A., Gebhardt, L., Soergel, H., Muhle-Goll, C., Ochsenreither, K., Syldatk, C., 2022. Lipase-Mediated Mechanoenzymatic Synthesis of Sugar Esters in Dissolved Unconventional and Neat Reaction Systems. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 10, 10192–10202. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.2c01727>
94. Hotelier, T., Renault, L., Cousin, X., Negre, V., Marchot, P., Chatonnet, A., 2004. ESTHER, the database of the α/β -hydrolase fold superfamily of proteins. *Nucleic Acids Res.* 32, D145. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh141>
95. Howard, G.T., Blake, R.C., 1998. Growth of *Pseudomonas fluorescens* on a polyester–polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase–protease enzyme. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 42, 213–220. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(98\)00051-1](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(98)00051-1)
96. Howard, G.T., Crother, B., Vicknair, J., 2001. Cloning, nucleotide sequencing and characterization of a polyurethanase gene (*pueB*) from *Pseudomonas chlororaphis*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 47, 141–149. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(01\)00042-7](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(01)00042-7)
97. Hult, K., Berglund, P., 2007. Enzyme promiscuity: mechanism and applications. *Trends Biotechnol.* 25, 231–238. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.03.002>
98. Itoh, T., 2017. Ionic Liquids as Tool to Improve Enzymatic Organic Synthesis. *Chem. Rev.* 117, 10567–10607. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00158>
99. Jaeger, K.-E., Ransac, S., Koch, H.B., Ferrato, F., Dijkstra, B.W., 1993. Topological characterization and modeling of the 3D structure of lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett.* 332, 143–149. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80501-K](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80501-K)
100. Jaeger, K.E., Steinbüchel, A., Jendrossek, D., 1995. Substrate specificities of bacterial polyhydroxyalkanoate depolymerases and lipases: bacterial lipases hydrolyze poly(ω -hydroxyalkanoates). *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3113–3118.
101. Jenkins, A.D., Kratochvíl, P., Stepto, R.F.T., Suter, U.W., 1996. Glossary of basic terms in polymer science (IUPAC Recommendations 1996). *Pure Appl. Chem.* 68, 2287–2311. <https://doi.org/10.1351/pac199668122287>
102. Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Židek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S.A.A., Ballard, A.J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., Petersen,

- S., Reiman, D., Clancy, E., Zielinski, M., Steinegger, M., Pacholska, M., Berghammer, T., Bodenstern, S., Silver, D., Vinyals, O., Senior, A.W., Kavukcuoglu, K., Kohli, P., Hassabis, D., 2021. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596, 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
103. Juneidi, I., Hayyan, M., Hashim, M.A., Hayyan, A., 2017. Pure and aqueous deep eutectic solvents for a lipase-catalysed hydrolysis reaction. *Biochem. Eng. J.* 117, 129–138. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.10.003>
104. Kapoor, M., Gupta, M.N., 2012. Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochem.* 47, 555–569. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.01.011>
105. Kazlauskas, R.J., 2005. Enhancing catalytic promiscuity for biocatalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol., Bioorganic chemistry / Biocatalysis and biotransformation* 9, 195–201. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2005.02.008>
106. Keefe, A.D., Szostak, J.W., 2001. Functional proteins from a random-sequence library. *Nature* 410, 715–718. <https://doi.org/10.1038/35070613>
107. Khan, F.I., Lan, D., Durrani, R., Huan, W., Zhao, Z., Wang, Y., 2017. The Lid Domain in Lipases: Structural and Functional Determinant of Enzymatic Properties. *Front Bioeng Biotechnol* 5, 16. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2017.00016>
108. Khan, I., Nagarjuna, R., Dutta, J.R., Ganesan, R., 2019. Enzyme-Embedded Degradation of Poly(ϵ -caprolactone) using Lipase-Derived from Probiotic *Lactobacillus plantarum*. *ACS Omega* 4, 2844–2852. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b02642>
109. Kleinaitė, E., Jaška, V., Tvaska, B., Matijošytė, I., 2014. A cleaner approach for biolubricant production using biodiesel as a starting material. *J. Clean. Prod.* 75, 40–44. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.03.077>
110. Kovacic, F., Babic, N., Krauss, U., Jaeger, K.-E., 2018. Classification of Lipolytic Enzymes from Bacteria, in: Rojo, F. (Ed.), *Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils and Lipids, Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 1–35. https://doi.org/10.1007/978-3-319-39782-5_39-1
111. Kumar, A., Yadav, M., Tiruneh, W., 2020. Debarking, pitch removal and retting: Role of microbes and their enzymes. *Phys. Sci. Rev.* 5. <https://doi.org/10.1515/psr-2019-0048>
112. Labet, M., Thielemans, W., 2009. Synthesis of polycaprolactone: a review. *Chem. Soc. Rev.* 38, 3484–3504. <https://doi.org/10.1039/B820162P>
113. Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
114. Lai, J., Huang, H., Lin, M., Xu, Y., Li, X., Sun, B., 2023. Enzyme catalyzes ester bond synthesis and hydrolysis: The key step for sustainable

- usage of plastics. *Front. Microbiol.* 13, 1113705. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1113705>
115. Lai, Y.-F., Zheng, H., Chai, S.-J., Zhang, P.-F., Chen, X.-Z., 2010. Lipase-catalysed tandem Knoevenagel condensation and esterification with alcohol cosolvents. *Green Chem.* 12, 1917–1918. <https://doi.org/10.1039/C004547K>
116. Laskowski, R.A., Swindells, M.B., 2011. LigPlot+: Multiple Ligand–Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery. *J. Chem. Inf. Model.* 51, 2778–2786. <https://doi.org/10.1021/ci200227u>
117. Lenfant, N., Hotelier, T., Bourne, Y., Marchot, P., Chatonnet, A., 2013a. Proteins with an alpha/beta hydrolase fold: Relationships between subfamilies in an ever-growing superfamily. *Chem. Biol. Interact.*, 11th International Meeting on Cholinesterases 203, 266–268. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2012.09.003>
118. Lenfant, N., Hotelier, T., Velluet, E., Bourne, Y., Marchot, P., Chatonnet, A., 2013b. ESTHER, the database of the α/β -hydrolase fold superfamily of proteins: tools to explore diversity of functions. *Nucleic Acids Res.* 41, D423–D429. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1154>
119. Lesuisse, E., Schanck, K., Colson, C., 1993. Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. *Eur. J. Biochem.* 216, 155–160. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb18127.x>
120. Li, K., He, T., Li, C., Feng, X.-W., Wang, N., Yu, X.-Q., 2009. Lipase-catalysed direct Mannich reaction in water: utilization of biocatalytic promiscuity for C–C bond formation in a “one-pot” synthesis. *Green Chem.* 11, 777–779. <https://doi.org/10.1039/B817524A>
121. Liebminger, S., Eberl, A., Sousa, F., Heumann, S., Fischer-Colbrie, G., Cavaco-Paulo, A., Guebitz, G.M., 2007. Hydrolysis of PET and bis-(benzoyloxyethyl) terephthalate with a new polyesterase from *Penicillium citrinum*. *Biocatal. Biotransformation* 25, 171–177. <https://doi.org/10.1080/10242420701379734>
122. Liu, P., Ewis, H.E., Tai, P.C., Lu, C.-D., Weber, I.T., 2007. Crystal structure of the *Geobacillus stearothermophilus* carboxylesterase Est55 and its activation of prodrug CPT-11. *J. Mol. Biol.* 367, 212–223. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.12.067>
123. Long, K., Ghazali, H.M., Ariff, A., Man, Y.C., Bucke, C., 1998. Substrate preference of mycelium-bound lipase from a strain of *Aspergillus Flavus* Link. *Biotechnol. Lett.* 20, 369–372. <https://doi.org/10.1023/A:1005327330034>
124. Lotti, M., Alberghina, L., 2007. Lipases: Molecular Structure and Function, in: Polaina, J., MacCabe, A.P. (Eds.), *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 263–281. https://doi.org/10.1007/1-4020-5377-0_16
125. Lu, H., Diaz, D.J., Czarnecki, N.J., Zhu, C., Kim, W., Shroff, R., Acosta, D.J., Alexander, B.R., Cole, H.O., Zhang, Y., Lynd, N.A.,

- Ellington, A.D., Alper, H.S., 2022. Machine learning-aided engineering of hydrolases for PET depolymerization. *Nature* 604, 662–667. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04599-z>
126. Lutz, S., Iamurri, S.M., 2018. Protein Engineering: Past, Present, and Future, in: Bornscheuer, U.T., Höhne, M. (Eds.), *Protein Engineering: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. Springer, New York, NY, pp. 1–12. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7366-8_1
127. Ma, Q., Shi, K., Su, T., Wang, Z., 2020. Biodegradation of Polycaprolactone (PCL) with Different Molecular Weights by *Candida antarctica* Lipase. *J. Polym. Environ.* 28, 2947–2955. <https://doi.org/10.1007/s10924-020-01826-4>
128. Malunavicius, V., Druteika, G., Sadauskas, M., Veteikyte, A., Matijosyte, I., Lastauskiene, E., Gegeckas, A., Gudiukaite, R., 2018. Usage of GD-95 and GD-66 lipases as fusion partners leading to improved chimeric enzyme LipGD95-GD66. *Int. J. Biol. Macromol.* 118, 1594–1603. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.002>
129. McNutt, A.T., Francoeur, P., Aggarwal, R., Masuda, T., Meli, R., Ragoza, M., Sunseri, J., Koes, D.R., 2021. GNINA 1.0: molecular docking with deep learning. *J. Cheminformatics* 13, 43. <https://doi.org/10.1186/s13321-021-00522-2>
130. Mirdita, M., Schütze, K., Moriwaki, Y., Heo, L., Ovchinnikov, S., Steinegger, M., 2022. ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nat. Methods* 19, 679–682. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01488-1>
131. Monteiro, R.R.C., Berenguer-Murcia, Á., Rocha-Martin, J., Vieira, R.S., Fernandez-Lafuente, R., 2023. Biocatalytic production of biolubricants: Strategies, problems and future trends. *Biotechnol. Adv.* 68, 108215. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108215>
132. Monteiro, R.R.C., Virgen-Ortiz, J.J., Berenguer-Murcia, Á., da Rocha, T.N., dos Santos, J.C.S., Alcántara, A.R., Fernandez-Lafuente, R., 2021. Biotechnological relevance of the lipase A from *Candida antarctica*. *Catal. Today, 1st International Conference on Unconventional Catalysis, Reactors and Applications: Catalysis Beyond the Reactor* 362, 141–154. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2020.03.026>
133. Morris, G.M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M.F., Belew, R.K., Goodsell, D.S., Olson, A.J., 2009. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J. Comput. Chem.* 30, 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
134. Mouhoubi, R., Lasschuijt, M., Ramon Carrasco, S., Gojzewski, H., Wurm, F.R., 2022. End-of-life biodegradation? how to assess the composting of polyesters in the lab and the field. *Waste Manag.* 154, 36–48. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2022.09.025>
135. Müller, R.-J., Schrader, H., Profe, J., Dresler, K., Deckwer, W.-D., 2005. Enzymatic Degradation of Poly(ethylene terephthalate): Rapid Hydrolyse using a Hydrolase from *T. fusca*. *Macromol. Rapid Commun.* 26, 1400–1405. <https://doi.org/10.1002/marc.200500410>

136. Müller, H., Godehard, S.P., Palm, G.J., Berndt, L., Badenhorst, C.P.S., Becker, A., Lammers, M., Bornscheuer, U.T., 2021. Discovery and Design of Family VIII Carboxylesterases as Highly Efficient Acyltransferases. *Angew Chem Int Ed Engl* 60, 2013–2017. <https://doi.org/10.1002/anie.202014169>
137. Nakagawa, H., Tamada, T., 2021. Hydration and its Hydrogen Bonding State on a Protein Surface in the Crystalline State as Revealed by Molecular Dynamics Simulation. *Front. Chem.* 9.
138. Nakajima-Kambe, T., Edwinoliver, N.G., Maeda, H., Thirunavukarasu, K., Gowthaman, M.K., Masaki, K., Mahalingam, S., Kamini, N.R., 2012. Purification, cloning and expression of an *Aspergillus niger* lipase for degradation of poly(lactic acid) and poly(ϵ -caprolactone). *Polym. Degrad. Stab.* 97, 139–144. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2011.11.009>
139. Nasirpour, N., Mohammadpourfard, M., Zeinali Heris, S., 2020. Ionic liquids: Promising compounds for sustainable chemical processes and applications. *Chem. Eng. Res. Des.* 160, 264–300. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2020.06.006>
140. Natta, F.J. van, Hill, J.W., Carothers, W.H., 1934. Studies of Polymerization and Ring Formation. XXIII.1 ϵ -Caprolactone and its Polymers. *J. Am. Chem. Soc.* 56, 455–457. <https://doi.org/10.1021/ja01317a053>
141. Nerurkar, M., Joshi, M., Adivarekar, R., 2015. Bioscouring of cotton using lipase from marine bacteria *Bacillus sonorensis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 175, 253–265. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1259-6>
142. Nikolaivits, E., Pantelic, B., Azeem, M., Taxeidis, G., Babu, R., Topakas, E., Brennan Fournet, M., Nikodinovic-Runic, J., 2021. Progressing Plastics Circularity: A Review of Mechano-Biocatalytic Approaches for Waste Plastic (Re)valorization. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9, 696040. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.696040>
143. Noro, J., Cabo, J., Freitas, D.S., Roque, C.S., de Castro, M., Cavaco-Paulo, A., Silva, C., 2023. Deep Eutectic Solvents as Suitable Solvents for Lipase-Catalyzed Transesterification Reactions. *ChemSusChem* 16, e202300615. <https://doi.org/10.1002/cssc.202300615>
144. Ogbunugafor, C.B., Guerrero, R.F., Shakhnovich, E.I., Shoulders, M.D., 2023. Epistasis meets pleiotropy in shaping biophysical protein subspaces associated with antimicrobial resistance. *bioRxiv* 2023.04.09.535490. <https://doi.org/10.1101/2023.04.09.535490>
145. Ollis, D.L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S.M., Harel, M., Remington, S.J., Silman, I., Schrag, J., 1992. The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng.* 5, 197–211.
146. Ostergaard, J., Larsen, C., 2007. Bioreversible Derivatives of Phenol. 2. Reactivity of Carbonate Esters with Fatty Acid-like Structures Towards Hydrolysis in Aqueous Solutions. *Molecules* 12, 2396–2412. <https://doi.org/10.3390/12102396>

147. Patti, A., Sanfilippo, C., 2022. Stereoselective Promiscuous Reactions Catalyzed by Lipases. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 2675. <https://doi.org/10.3390/ijms23052675>
148. 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. <https://doi.org/10.1093/protein/gzs066>
149. Pleiss, J., Fischer, M., Peiker, M., Thiele, C., Schmid, R.D., 2000. Lipase engineering database: Understanding and exploiting sequence–structure–function relationships. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 10, 491–508. [http://dx.doi.org/10.1016/S1381-1177\(00\)00092-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1381-1177(00)00092-8)
150. Price, N., Stevens, L., Price, N., Stevens, L., 1999. *Fundamentals of Enzymology: Cell and Molecular Biology of Catalytic Proteins*, Third Edition, Third Edition. ed. Oxford University Press, Oxford, New York.
151. Radzicka, A., Wolfenden, R., 1995. A Proficient Enzyme. *Science* 267, 90–93. <https://doi.org/10.1126/science.7809611>
152. Ramnath, L., Sithole, B., Govinden, R., 2016. Classification of lipolytic enzymes and their biotechnological applications in the pulping industry. *Can. J. Microbiol.* 63, 179–192. <https://doi.org/10.1139/cjm-2016-0447>
153. Rauwerdink, A., Kazlauskas, R.J., 2015. How the Same Core Catalytic Machinery Catalyzes 17 Different Reactions: the Serine-Histidine-Aspartate Catalytic Triad of α/β -Hydrolase Fold Enzymes. *ACS Catal.* 5, 6153–6176. <https://doi.org/10.1021/acscatal.5b01539>
154. Reetz, M.T., Mondière, R., Carballeira, J.D., 2007. Enzyme promiscuity: first protein-catalyzed Morita–Baylis–Hillman reaction. *Tetrahedron Lett.* 48, 1679–1681. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2007.01.063>
155. Renault, L., Nègre, V., Hotelier, T., Cousin, X., Marchot, P., Chatonnet, A., 2005. New friendly tools for users of ESTHER, the database of the α/β -hydrolase fold superfamily of proteins. *Chem. Biol. Interact.*, Proceedings of the VIII International Meeting on Cholinesterases 157–158, 339–343. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.10.100>
156. Ronkvist, Å.M., Xie, W., Lu, W., Gross, R.A., 2009. Cutinase-Catalyzed Hydrolysis of Poly(ethylene terephthalate). *Macromolecules* 42, 5128–5138. <https://doi.org/10.1021/ma9005318>
157. Rosato, A., Romano, A., Totaro, G., Celli, A., Fava, F., Zanaroli, G., Sisti, L., 2022. Enzymatic Degradation of the Most Common Aliphatic Bio-Polyesters and Evaluation of the Mechanisms Involved: An Extended Study. *Polymers* 14, 1850. <https://doi.org/10.3390/polym14091850>
158. Roy, R., Braathen, N.A., 2017. The Rising Cost of Ambient Air Pollution thus far in the 21st Century: Results from the BRIICS and the OECD Countries. OECD, Paris. <https://doi.org/10.1787/d1b2b844-en>

159. Sahay, S., Chouhan, D., 2018. Study on the potential of cold-active lipases from psychrotrophic fungi for detergent formulation. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 16, 319–325. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.04.006>
160. Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. CSHL Press.
161. Saran, S., Mahajan, R.V., Kaushik, R., Isar, J., Saxena, R.K., 2013. Enzyme mediated beam house operations of leather industry: a needed step towards greener technology. *J. Clean. Prod.* 54, 315–322. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.04.017>
162. Savickaite, A., Sadauskas, M., Gudiukaite, R., 2021a. Immobilized GDEst-95, GDEst-lip and GD-95RM lipolytic enzymes for continuous flow hydrolysis and transesterification reactions. *Int. J. Biol. Macromol.* 173, 421–434. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.01.133>
163. Savickaite, A., Druteika, G., Sadauskas, M., Malunavicius, V., Lastauskiene, E., Gudiukaite, R., 2021b. Study of individual domains' functionality in fused lipolytic biocatalysts based on *Geobacillus* lipases and esterases. *Int. J. Biol. Macromol.* 168, 261–271. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.026>
164. Sinha, R., Shukla, P., 2019. Current Trends in Protein Engineering: Updates and Progress. *Curr. Protein Pept. Sci.* 20, 398–407.
165. Sivapragasam, M., Moniruzzaman, M., Goto, M., 2016. Recent advances in exploiting ionic liquids for biomolecules: Solubility, stability and applications. *Biotechnol. J.* 11, 1000–1013. <https://doi.org/10.1002/biot.201500603>
166. Son, J., Choi, W., Kim, H., Kim, M., Lee, J.H., Shin, S.C., Kim, H.-W., 2023. Structural and biochemical insights into PsEst3, a new GHSR-type esterase obtained from *Paenibacillus* sp. R4. *IUCrJ* 10, 220–232. <https://doi.org/10.1107/S2052252523001562>
167. Song, H.M., Kim, H.K., 2024. Production of octyl butyrate using psychrophilic mutant lipase from *Croceibacter atlanticus* LipCA lipase developed by a molecular evolution technique. *Enzyme Microb. Technol.* 173, 110370. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2023.110370>
168. Sorokin, D.Yu., Jones, B.E., 2009. Improved method for direct screening of true lipase-producing microorganisms with particular emphasis on alkaline conditions. *Microbiology* 78, 125–130. <https://doi.org/10.1134/S0026261709010160>
169. Starr, T.N., Thornton, J.W., 2016. Epistasis in protein evolution. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 25, 1204–1218. <https://doi.org/10.1002/pro.2897>
170. Sujitha, P., Kavitha, S., Shakilanishi, S., Babu, N.K.C., Shanthi, C., 2018. Enzymatic dehairing: A comprehensive review on the mechanistic aspects with emphasis on enzyme specificity. *Int. J. Biol. Macromol.* 118, 168–179. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.081>
171. Taleb, M.A., Gomaa, S.K., Wahba, M.I., Zaki, R.A., El-Fiky, A.F., El-Refai, H.A., El-Sayed, H., 2022. Bioscouring of wool fibres using

- immobilized thermophilic lipase. *Int. J. Biol. Macromol.* 194, 800–810. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.11.128>
172. Tan, J.-N., Dou, Y., 2020. Deep eutectic solvents for biocatalytic transformations: focused lipase-catalyzed organic reactions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104, 1481–1496. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10342-y>
173. Tang, Z.G., Black, R.A., Curran, J.M., Hunt, J.A., Rhodes, N.P., Williams, D.F., 2004. Surface properties and biocompatibility of solvent-cast poly[ϵ -caprolactone] films. *Biomaterials* 25, 4741–4748. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.12.003>
174. Tawfik, O.K.A.D.S., 2010. Enzyme Promiscuity: A Mechanistic and Evolutionary Perspective. *Annu. Rev. Biochem.* 79, 471–505. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-030409-143718>
175. Tian, X., Zhang, S., Zheng, L., 2016. First *Novozym* 435 lipase-catalyzed Morita–Baylis–Hillman reaction in the presence of amides. *Enzyme Microb. Technol.* 84, 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.12.006>
176. Tournier, V., Duquesne, S., Guillaumot, F., Cramail, H., Taton, D., Marty, A., André, I., 2023. Enzymes’ Power for Plastics Degradation. *Chem. Rev.* 123, 5612–5701. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.2c00644>
177. Tracewell, C.A., Arnold, F.H., 2009. Directed enzyme evolution: climbing fitness peaks one amino acid at a time. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13, 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.01.017>
178. Trodler, P., Pleiss, J., 2008. Modeling structure and flexibility of *Candida antarctica* lipase B in organic solvents. *BMC Struct. Biol.* 8, 9. <https://doi.org/10.1186/1472-6807-8-9>
179. Tyagi, R., Lai, R., Duggleby, R.G., 2004. A new approach to “megaprimer” polymerase chain reaction mutagenesis without an intermediate gel purification step. *BMC Biotechnol.* 4, 2. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-4-2>
180. van Rantwijk, F., Hacking, M.A.P.J., Sheldon, R.A., 2000. Lipase-Catalyzed Synthesis of Carboxylic Amides: Nitrogen Nucleophiles as Acyl Acceptor. *Monatshefte Für Chem. Chem. Mon.* 131, 549–569. <https://doi.org/10.1007/s007060070086>
181. Verger, R., 1997. ‘Interfacial activation’ of lipases: facts and artifacts. *Trends Biotechnol.* 15, 32–38. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(96\)10064-0](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(96)10064-0)
182. Villière, A., Symoneaux, R., Roche, A., Eslami, A., Perrot, N., Le Fur, Y., Prost, C., Courcoux, P., Vigneau, E., Thomas-Danguin, T., Guérin, L., 2019. Comprehensive sensory and chemical data on the flavor of 16 red wines from two varieties: Sensory descriptive analysis, HS-SPME-GC-MS volatile compounds quantitative analysis, and odor-active compounds

- identification by HS-SPME-GC-MS-O. Data Brief 24, 103725. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2019.103725>
183. Wagner, U.G., Petersen, E.I., Schwab, H., Kratky, C., 2002. EstB from *Burkholderia gladioli*: a novel esterase with a beta-lactamase fold reveals steric factors to discriminate between esterolytic and beta-lactam cleaving activity. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 11, 467–478. <https://doi.org/10.1110/ps.33002>
184. Wang, J., Shen, W.-J., Patel, S., Harada, K., Kraemer, F.B., 2005. Mutational Analysis of the “Regulatory Module” of Hormone-Sensitive Lipase. *Biochemistry* 44, 1953–1959. <https://doi.org/10.1021/bi049206t>
185. Wang, J.-L., Liu, B.-K., Yin, C., Wu, Q., Lin, X.-F., 2011. *Candida antarctica* lipase B-catalyzed the unprecedented three-component Hantzsch-type reaction of aldehyde with acetamide and 1,3-dicarbonyl compounds in non-aqueous solvent. *Tetrahedron* 67, 2689–2692. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2011.01.045>
186. Weiss, G.A., Watanabe, C.K., Zhong, A., Goddard, A., Sidhu, S.S., 2000. Rapid mapping of protein functional epitopes by combinatorial alanine scanning. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 8950–8954. <https://doi.org/10.1073/pnas.160252097>
187. Widmann, M., Juhl, P.B., Pleiss, J., 2010. Structural classification by the Lipase Engineering Database: a case study of *Candida antarctica* lipase A. *BMC Genomics* 11, 123. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-123>
188. Wikmark, Y., Engelmark Cassimjee, K., Lihammar, R., Bäckvall, J.-E., 2016. Removing the Active-Site Flap in Lipase A from *Candida antarctica* Produces a Functional Enzyme without Interfacial Activation. *ChemBioChem* 17, 141–145. <https://doi.org/10.1002/cbic.201500471>
189. Wilk, M., Brodzka, A., Koszelewski, D., Madej, A., Paprocki, D., Żądło-Dobrowolska, A., Ostaszewski, R., 2019. The influence of the isocyanooesters structure on the course of enzymatic Ugi reactions. *Bioorganic Chem.* 93, 102817. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.02.042>
190. Williams, G.B., Ma, H., Khusnutdinova, A.N., Yakunin, A.F., Golyshin, P.N., 2023. Harnessing extremophilic carboxylesterases for applications in polyester depolymerisation and plastic waste recycling. *Essays Biochem.* 67, 715–729. <https://doi.org/10.1042/EBC20220255>
191. Woodruff, M.A., Hutmacher, D.W., 2010. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. *Prog. Polym. Sci.* 35, 1217–1256. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002>
192. Xing, Y.-N., Tan, J., Wang, Y., Wang, J., 2021. Enhancing the thermostability of a mono- and diacylglycerol lipase from *Malasszia globosa* by stabilizing a flexible loop in the catalytic pocket. *Enzyme Microb. Technol.* 149, 109849. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2021.109849>

193. Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., Maeda, Y., Toyohara, K., Miyamoto, K., Kimura, Y., Oda, K., 2016. A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). *Science* 351, 1196–1199. <https://doi.org/10.1126/science.aad6359>
194. Yubero, P., Manrubia, S., Aguirre, J., 2017. The space of genotypes is a network of networks: implications for evolutionary and extinction dynamics. *Sci. Rep.* 7, 13813. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14048-x>
195. Zaks, A., Klibanov, A.M., 1985. Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82, 3192–3196. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.10.3192>
196. Zhang, Z., Lan, D., Zhou, P., Li, J., Yang, B., Wang, Y., 2017. Control of sticky deposits in wastepaper recycling with thermophilic esterase. *Cellulose* 24, 311–321. <https://doi.org/10.1007/s10570-016-1104-x>
197. Zhao, L., Rong, L., Zhao, Longfei, Yang, J., Wang, L., Sun, H., 2020. Plastics of the Future? The Impact of Biodegradable Polymers on the Environment, in: He, D., Luo, Y. (Eds.), *Microplastics in Terrestrial Environments: Emerging Contaminants and Major Challenges*. Springer International Publishing, Cham, pp. 423–445. https://doi.org/10.1007/978-93-9045-462-2_462
198. Zhao, X., Hu, H., Wang, X., Yu, X., Zhou, W., Peng, S., 2020. Super tough poly(lactic acid) blends: a comprehensive review. *RSC Adv.* 10, 13316–13368. <https://doi.org/10.1039/D0RA01801E>

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt, www.leidykla.vu.lt
bookshop.vu.lt, journals.vu.lt
Tiražas 15 egz.