

VILNIAUS UNIVERSITETAS

JONITA STANKEVIČIŪTĖ

POLIHIDROKSILIŲ DARINIŲ SINTEZĖ BIODKATALIZĖS METODAIS

Daktaro disertacija  
Fiziniai mokslai, biochemija (04 P)

Vilnius, 2014 metai

Disertacija rengta 2009–2013 metais Vilniaus universiteto Biochemijos institute, Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriuje.

**Mokslinis vadovas:**

dr. Rolandas Meškys (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04 P).

## TURINYS

SANTRUMPŲ IR SUTARTINIŲ ŽYMĖJIMŲ SAŖAŠAS .....	6
ĮVADAS .....	7
1. LITERATŪROS APŽVALGA .....	11
1.1. Biokatalizė.....	11
1.1.1. Biokatalizės privalumai ir trūkumai.....	11
1.1.2. Biokatalizės taikymas pramonėje.....	16
1.2. Chiralinių alkoholių poreikis ir biosintezės perspektyvos .....	18
1.2.1. ADH – fermentai, katalizuojantys asimetrinę ketonų redukciją.....	20
1.2.2. Ketonus redukuojančių oksidoreduktazių specifiskumas kofermentams.....	25
1.2.3. Kofaktorių regeneravimo būdai .....	26
1.2.4. Diolių biosintezė .....	29
1.2.5. Alkoholius oksiduojantys fermentai ir jų pritaikymo galimybės kinetiniam racematų atskirymui.....	32
1.2.6. Angliavandenių biosintezė.....	33
1.3. Regioselektyvus aromatinio žiedo hidroksilinimas.....	36
1.3.1. Selektivus benzeno, tolueno ir ksileno hidroksilinimas naudojant monooksigenazes/reduktazes.....	37
1.3.2. Regioselektyvus piridino ir jo darinių hidroksilinimas.....	38
2. MEDŽIAGOS IR TYRIMO METODAI.....	40
2.1. Medžiagos .....	40
2.1.1. Reagentai.....	40
2.1.2. Bakterijos .....	43
2.1.3. Plazmidės .....	43
2.1.4. Terpės.....	44
2.2. Tyrimo metodai .....	45
2.2.1. Bakterijų auginimo sąlygos.....	45
2.2.2. Plazmidinės DNR skyrimas .....	45
2.2.3. DNR dauginimas <i>in vitro</i> .....	45
2.2.4. DNR manipuliacijos.....	46
2.2.5. Kompetentinių ląstelių paruošimas ir elektroporacija .....	46
2.2.6. Fermentų biosintezė .....	47
2.2.7. Fermentų gryninimas ir tyrimas.....	48
2.2.8. Junginių biokonversijos naudojant sveikas ląsteles.....	54
2.2.9. Beląstelių ekstraktų ruošimas .....	55
2.2.10. Kreatino – $\alpha$ -naftolio testas 2,3-diketonų ir acetoino nustatymui... 55	
2.2.11. Baltymų ir ląstelių imobilizavimas .....	55

2.2.12. <i>Burkholderia</i> sp. MAK1 katalizės priklausomybės nuo temperatūros tyrimas.....	57
2.2.13. Hidroksilintų piridinių ir pirimidinų gryninimas .....	57
2.2.14. Analiziniai metodai .....	58
2.2.15. Kompiuteriniai sekų analizės metodai .....	60
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	61
3.1. Dihidroksiacetono fosfato sintezė panaudojant L- $\alpha$ -glicerofosfato oksidazę iš <i>Enterococcus</i> sp. RL1.....	61
3.1.1. Rekombinantinės GPO iš <i>Enterococcus</i> sp. RL1 biosintezės tyrimas .....	62
3.1.2. Temperatūros įtaka rekombinantinės GPO aktyvumui ir stabilumui	63
3.1.3. Berlyno mėlio panaudojimas rekombinantinės GPO bioreaktoriuje	65
3.2. Aminoalkoholių ir vicininių alkoholių oksidacija, naudojant ADH IIG iš <i>Pseudomonas putida</i> HK5 .....	68
3.3. Alkoholio dehidrogenazė (TpdE) iš <i>Rhodococcus jostii</i> TMP1 .....	74
3.3.1. Bioinformatinė TpdE analizė .....	74
3.3.2. Rekombinantinės dehidrogenazės TpdE biosintezė ir gryninimas ...	76
3.3.3. Rekombinantinės dehidrogenazės TpdE katalizuojamos reakcijos eigos tyrimas ir biocheminis charakterizavimas .....	78
3.3.4. TpdE substratinio specifiškumo nustatymas.....	81
3.3.5. Rekombinantinės TpdE <i>in vitro</i> kinetinių parametų įvertinimas ....	84
3.3.6. TpdE Arg19Thr taškinio mutanto konstravimas ir tyrimas .....	86
3.3.7. TpdE substratų biokonversijos <i>in vivo</i> tyrimas .....	87
3.3.8. 2,3-Diketonų redukcijos produktų identifikavimas .....	89
3.3.9. Rekombinantinės TpdE iš <i>R. jostii</i> stereoselektyvumo tyrimas .....	91
3.4. <i>Burkholderia</i> sp. MAK1 – vertingas biokatalizatorius įvairių hidroksilintų piridino darinių sintezei .....	94
3.4.1. 2-Hidroksipiridino biokonversijos tyrimas .....	94
3.4.2. N-Alkil-2-hidroksipiridinių transformacija, kai katalizatorius – <i>Burkholderia</i> sp. MAK1 bakterijos.....	95
3.4.3. 2-Hidroksipiridinių, turinčių pakaitus trečioje padėtyje, transformacija <i>Burkholderia</i> sp. MAK1 ląstelėmis .....	98
3.4.4. <i>Burkholderia</i> sp. MAK1 bakterijų panaudojimas 2-hidroksipiridinių, turinčių pakaitus ketvirtoje arba/ir šeštoje padėtyse, hidroksilinimui .....	99
3.4.5. <i>Burkholderia</i> sp. MAK1 bakterijų gebėjimo hidroksilinti 2-aminopiridiną tyrimas .....	102
3.4.6. Įvairių hidroksilintų 2-aminopiridinių biosintezė panaudojant <i>Burkholderia</i> sp. MAK1 bakterijas.....	105
3.4.7. Piridino ir metilpiridinių transformacijos <i>Burkholderia</i> sp. MAK1 bakterijomis tyrimas.....	111

3.4.8. Piridino darinių hidroksilinimo, katalizuojamo <i>Burkholderia</i> sp. MAK1 bakterijomis, priklausomybės nuo temperatūros tyrimas .....	114
3.4.9. Alginatiniame gelyje imobilizuotų <i>Burkholderia</i> sp. MAK1 ląstelių pritaikymas hidroksilintų piridinių biosintezėje .....	115
3.5. Rezultatų aptarimas .....	116
IŠVADOS .....	119
PUBLIKACIJOS DISERTACIJOS TEMA .....	120
PADĖKA .....	122
LITERATŪROS SĄRAŠAS .....	123

## SANTRUMPŲ IR SUTARTINIŲ ŽYMĖJIMŲ SĄRAŠAS

ADH – alkoholio dehidrogenazė

AKR – aldo-keto reduktazė

AP – anglies pluoštas

BM – Berlyno mėlis

DHAP – dihidroksiacetono fosfatas

GC-MS – dujų chromatografija-masių spektrometrija

GP – L- $\alpha$ -glicerofosfatas

GPO – L- $\alpha$ -glicerofosfato oksidazė

HPLC-MS – aukšto slėgio skysčių chromatografija-masių spektrometrija

IPTG – izopropil- $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozidas

MDR – vidutinių grandinių dehidrogenazė/reduktazė

NDS – natrio dodecilsulfatas

PAAG – poliakrilamidinis gelis

PQQ – pirolochinolino chinonas

SDR – trumpų grandinių dehidrogenazė/reduktazė

SS – aminintas silikagelis

## ĮVADAS

Biokatalizės metodai įvairių produktų gamybai taikomi jau daugybę amžių ir siejami su kepinių ir alaus pramonės atsiradimu (Roberts et al., 1995). Tuo tarpu biokatalizatoriai, kaip įrankiai, organinėje sintezėje pradėti naudoti tik XX a. aštuntajame dešimtmetyje, kai mokslininkai ir pramonininkai grynus fermentus ar visas ląsteles panoro pritaikyti chiralinių junginių sintezei. Didžioji dalis tyrimų tuomet buvo sukoncentruota ties hidrolizininiais fermentais (pvz., lipazėmis, proteazėmis ir acilazėmis) arba redukuojančiais fermentais (pvz., alkoholio dehidrogenazėmis ir liofilizuotomis mielėmis) (Drauz et al., 2012).

Dabar prieinamas gerokai platesnis biokatalizatorių spektras, todėl unikalūs biotechnologiniai sprendimai ir nauji procesai vis plačiau taikomi farmacijos, medienos bei popieriaus pramonėje, maisto ir įvairių cheminių junginių gamybos procesuose, žemės ūkyje ir medicinoje (Fessner ir Anthonsen, 2009). Nors išaugusi chiralinių alkoholių, ypač kelis chiralinius centrus turinčių junginių, paklausa paskatino ieškoti naujų biokatalizatorių bei atlikti jų perkonstravimo darbus (Zeng ir Sabra, 2011), iki šiol stinga efektyvią katalizę vykdančių fermentų. Juntamas poreikis tobulinti ir kurti naujus alkoholių biosintezės metodus.

Selektyvus aromatinio žiedo hidroksilinimas yra vis dar labai sudėtingas organinės sintezės uždavinys (Ullrich ir Hofrichter, 2007). Hidroksilinti piridinai, vadinami piridinoliais, komerciškai patrauklūs, nes turi platų pritaikymą herbicidų, insekticidų, fungicidų ir augalų augimo reguliatorių gamyboje. Be to, piridino dariniai yra paklausūs farmacijos produktų sintonai. Šiuo metu piridinai naudojami ne vien kaip biologiškai aktyvios medžiagos: iš piridinų monomerų sintetinami unikaliomis fizikinėmis savybėmis pasižymintys polimerai (Scriven ir Murugan, 2005). Įvairių hidroksilintų piridinų sintezei potencialus įrankis – biokatalizė. Yra žinoma, kad aerobinėmis sąlygomis alkilintų piridinų ir pirazinų metabolizmas bakterijose prasideda aromatinio žiedo hidroksilinimu laisvoje pozicijoje. Tokias reakcijas

katalizuoja katabolinės oksidoreduktazės, kurios galėtų būti pritaikomos regioselektyviam *N*-heterociklų hidroksilinimui (Drauz et al., 2012; Sun et al., 2014).

Organinėje sintezėje nepakanka naujų regioselektyvių piridino darinius modifikuojančių biokatalizatorių – ląstelių ar grynų fermentų. Nors literatūroje yra nemažai duomenų apie bakterinį piridino metabolizmą, visgi trūksta fermentų, pasižyminčių plačiu substratiniu specifiškumu.

Todėl **šio darbo tikslas** ir yra ištirti bei įvertinti polihidroksilių darinių sintezės galimybes biokatalizės metodais.

### **Darbo uždaviniai**

- Sukurti dihidroksiacetono fosfato sintezės reaktorių, kuriame vandenilio peroksidas pašalinamas elektrochemiškai.
- Nustatyti alkoholio dehidrogenazės IIG iš *Pseudomonas putida* HK5 enantioselektyvumą ir įvertinti šio fermento pritaikomumą chiralinių alkoholių sintezėje.
- Ištirti rekombinantinės alkoholio dehidrogenazės TpdE iš *Rhodococcus jostii* TMP1 substratinį specifiškumą.
- Įvertinti optiškai grynų diolių biosintezės galimybes *in vitro* ir *in vivo* panaudojant rekombinantinę dehidrogenazę TpdE.
- Įvertinti *Burkholderia* sp. MAK1 bakterijomis sintetinamų hidropiridinių įvairovę ir hidroksilinimo selektyvumą.

### **Mokslinis naujumas**

Stereoselektyvioje angliavandenių biosintezėje svarbiu substratu tapo dihidroksiacetono fosfatas. Kai dihidroksiacetono fosfato gamybai naudojama *L*- $\alpha$ -glicerofosfato oksidazė, susiduriama su problema – reakcijos metu susidaro šalutinis produktas – vandenilio peroksidas, kuris negrįžtamai slopina biokatalizatorių. Šiame darbe siekėme padidinti dihidroksiacetono fosfato gamybos efektyvumą. Sukonstravome dihidroksiacetono fosfato bioreaktorių, kuriame darbinis elektrodas buvo sudarytas iš Berlyno mėliu modifikuoto anglies pluošto ir imobilizuotos *L*- $\alpha$ -glicerofosfato oksidazės. Šiame



unikaliame reaktoriuje vandenilio peroksidas buvo šalinamas elektrochemiškai. Pagrindinis dihidroksiacetono fosfato bioreaktoriaus privalumas – nebereikalingas papildomas fermentas vandenilio peroksido pašalinimui. Šio darbo rezultatai suteikia galimybę Berlyno mėliu modifikuotus elektrodus pritaikyti biokatalizinių procesų, kuriuose naudojamos vandenilio peroksidą generuojančios oksidazės, optimizavimui.

Šiame darbe pirmą kartą parodytas alkoholio dehidrogenazės IIG iš *Pseudomonas putida* HK5 gebėjimas enantioselektyviai oksiduoti įvairius pirminius ir antrinius alifatinius bei ciklinius alkoholius ir aminoalkoholius, pirmenybę teikiant (*S*)-enantimerams. Taigi, alkoholio dehidrogenazė IIG iš *Pseudomonas putida* HK5 gali būti pritaikoma enantiomeriškai grynų alkoholių sintezei kinetinio racematų atskyrimo būdu.

Buvo nustatyta, kad rekombinantinė alkoholio dehidrogenazė TpdE iš *Rhodococcus jostii* TMP1 pasižymi itin plačiu substratiniu specifiškumu ir gali stereoselektyviai redukuoti linijinius skirtingo ilgio 2,3-diketonus, įvairius aciloinus ir butan-3-ono-2-il- esterius. 2,3-ir 3,4-diketonų redukcijos produktų analizė dujų chromatografijos-masių spektrometrijos sistema parodė, kad TpdE redukuoja abi substrato ketogrupes, todėl produkto molekulėje susidaro du nauji chiraliniai centrai. Diketonų biokonversijos į atitinkamus diolius sėkmingai vyko katalizatoriumi naudojant tiek gryną fermentą, tiek *Escherichia coli* BL21 (DE3) ląsteles su rekombinantiniu TpdE. TpdE iš *Rhodococcus jostii* TMP1 dėl plataus substratinio specifiškumo, stereoselektyvumo ir aktyvumo tiek *in vivo*, tiek *in vitro* yra patrauklus katalizatorius chiralinių alkoholių sintezėje asimetrinės ketonų redukcijos būdu.

Aromatinių junginių oksidacinis funkcionalizavimas naudojant biokatalizatorių (gryną fermentą ar visą ląstelę) yra patogus būdas tikslinių produktų gamybai. Ištyrėme piridino darinių hidroksilinimą, kai katalizatorius – *Burkholderia* sp. MAK1 bakterijos. Kaip galimus *Burkholderia* sp. MAK1 substratus išmėginome įvairius piridinus, pirazinus ir pirimidinus, daugiausiai 2-hidroksi ir 2-aminopiridinus su metilo, chloro, bromo ar kitokiais pakaitais.

Paaiškėjo, kad iš 110 tirtų substratų net 73 junginiai buvo oksiduojami. Remdamiesi UV-Vis, HPLC-MS bei  $^1\text{H}$  ir  $^{13}\text{C}$  BMR analizių rezultatais, įrodėme, kad *Burkholderia* sp. MAK1 katalizuoja regioselektyvų hidroksilinimą. Kai aromatinio heterociklo 2-oje padėtyje yra hidroksi- arba amino- grupė hidroksilinimas vyksta į *para* padėtį, tuo tarpu kai 2-oje padėtyje pakaitų nėra arba yra metilo grupė, susidaro atitinkami *N*-oksidai. Mūsų žiniomis šiame darbe pirmą kartą parodyta aminopiridinolių sintezė biokatalizės būdu. Pavyko susintetinti ir identifikuoti keletą naujų, anksčiau literatūroje neaprašytų hidroksipiridinų ir pirimidinų, pavyzdžiui, 6-amino-4-chloro-3-hidroksipiridiną, 6-amino-4-fluoro-3-hidroksipiridiną, 2-amino-4,5-dihidroksipirimidiną, kurie turi potencialų pritaikymą vaistų ir antioksidantų gamyboje. *Burkholderia* sp. MAK1 ląstelės gali būti imobilizuojamos alginatiniame gelyje. Taip katalizatoriaus savybės išlieka nepakitusios, o biokatalizės procesą valdyti tampa paprasčiau. Taigi, aprašėme naują, ypač plataus substratinio specifiškumo biokatalizatorių – *Burkholderia* sp. MAK1, kurį galima pritaikyti regioselektyviai hidroksipiridinų sintezei.

### **Ginamieji disertacijos teiginiai**

1. Dihidroksiacetono fosfato sintezė ir vandenilio peroksido pašalinimas vyksta naudojant rekombinantinės L- $\alpha$ -glicerofosfato oksidazės iš *Enterococcus* sp. RL1-anglies pluošto-Berlyno mėlio elektrokatalizinę sistemą.
2. Alkoholio dehidrogenazė IIG iš *Pseudomonas putida* HK5 yra enantioselektyvi (*S*)-(+)-alkoholiams.
3. Baltymas TpdE iš *Rhodococcus jostii* TMP1 yra nuo NADPH priklausoma klasikinė trumpų grandinių dehidrogenazė/reduktazė, galinti redukuoti diketonus.
4. TpdE *in vivo* ir *in vitro* diketonų redukciją katalizuoja stereoselektyviai.
5. *Burkholderia* sp. MAK1 bakterijos katalizuoja regioselektyvų piridino darinių hidroksilinimą.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1. Biokatalizė

Biokatalizė – tai procesas, kurio metu vyksta organinių junginių cheminės transformacijos, dalyvaujant natūraliems katalizatoriams – fermentams ar ląstelėms (Tramper, 1996). Palyginus su chemine katalize, biokatalizė turi daug privalumų. Jai būdingas didesnis produktyvumas, trumpesnis proceso kelias, didesnis selektyvumas. Biokatalizės metuose taikomos švelnesnės reakcijos sąlygos, išvengiant aukšto slėgio bei temperatūrų. Biokatalizatorių privalumai itin išryškėja tais atvejais, kai pagrindinė problema – reakcijos specifiskumas ar kai stengiamasi išvengti pašalinių reakcijų. Būtent dėl šių priežasčių naudojant biokatalizatorius produktų gamybos kaštai labai sumažėja (Illanes, 2008).

Biokatalizatoriams būdingi tokie patys termodinaminiai principai kaip ir kitiems katalizatoriams. Egzistuoja daugybė fermentinių reakcijų modelių, įrodančių, kad visų fermentų veikimą galima paaiškinti cheminiais bei fizikiniais principais. Be to, fermentai gali sukurti išskirtines ir palankesnes reakcijos sąlygas, tokias kaip kritiškai mažas  $pK_a$  dydis arba labai teigiamas potencialas redukuotiems metalo jonams. Randama vis daugiau fermentų, galinčių katalizuoti organinės chemijos reakcijas (Hagen, 2006).

Biokatalizė plačiai taikoma farmacijos pramonėje, maisto ir įvairių cheminių preparatų gamybos procesuose, medienos bei popieriaus pramonėje, žemės ūkyje, medicinoje (Fessner ir Anthonsen, 2009; Sheldon et al., 2007).

### 1.1.1. Biokatalizės privalumai ir trūkumai

Ilgą laiką biokatalizė buvo intensyviai kritikuojama. Skeptikai vardijo biokatalizės trūkumus, kurių vienas pagrindinių buvo itin siauras fermentų substratinis specifiskumas. Nemažu trūkumu buvo laikomas ir palyginti nedidelis prieinamų fermentų skaičius (Bommarius ir Riebel, 2004), taip pat

akcentuojami fermentinių reakcijų laiko ir erdvės (t. y. aktyviame centre esančių substrato prisijungimo vietų) apribojimai. Laukinio tipo fermentai dažnai yra jautrūs katalizatoriai, aktyvūs tik vandeninėje terpėje. Be to, fermentinio aktyvumo išlaikymui reikalingos žinios apie konkrečių fermentų biochemines savybes. Šios savybės lėmė dalies organinės chemijos specialistų nenorą biokatalizę panaudoti jų vykdomose sintezėse (Drauz et al., 2012). Fermentinėms reakcijoms reikalingi sudėtingi ir brangūs kofaktoriai, dėl to fermentų pritaikymas biokatalizėje yra ribotas (Illanes, 2008).

Šiuolaikinės technologijos leidžia efektyviau vykdyti naujų fermentų paiešką bei pritaikyti juos pramonėje. Didelio našumo DNR sekoskaita suteikė galimybę nuskaityti ir aprašyti ištikus genomus, taip aptinkant naujus fermentus, potencialiai pritaikomus biokatalizėje. Rekombinantinės DNR technologijos pritaikymas lėmė žymiai didesnę fermentų produkcijos efektyvumą, o kartu ir perversmą biokatalizės srityje. Buvo aptikta daug naujų fermentų bei ieškoma sąlygų, užtikrinančių didesnę baltymų stabilumą ir produktyvumą. Pagaliau, cheminės sintezės keliai, kur vienoje ar visose pakopose galima naudoti fermentus, tapo pritaikomi praktiškai (Carreira ir Yamamoto, 2012; Rasor ir Voss, 2001).

Šiandien nemažai fermentų galima gauti taip pat lengvai, kaip ir bet kokius kitus cheminius reagentus (Drauz et al., 2012). Didžiausias fermentų pranašumas cheminių katalizatorių atžvilgiu – jų selektyvumas. Fermentai, katalizuodami substrato transformaciją, gali atskirti skirtingas chemines grupes (chemoselektyvumas), identiškų funkcinių grupių lokalizaciją (regioselektyvumas) ir stereoizomerus ar prochiralinių/mezo junginių orientaciją (stereoselektyvumas) (Gotor et al., 2008). Šį atrankumą lemia skirtinga pereinamųjų būsenų tarp fermento ir įvairių substratų susidarymo energija arba substratų orientacijos veikimo mechanizmo greitį ribojančiose stadijose. Iš visų fermentinio selektyvumo tipų stereoselektyvumui skiriamas didžiausias dėmesys (Drauz et al., 2012).

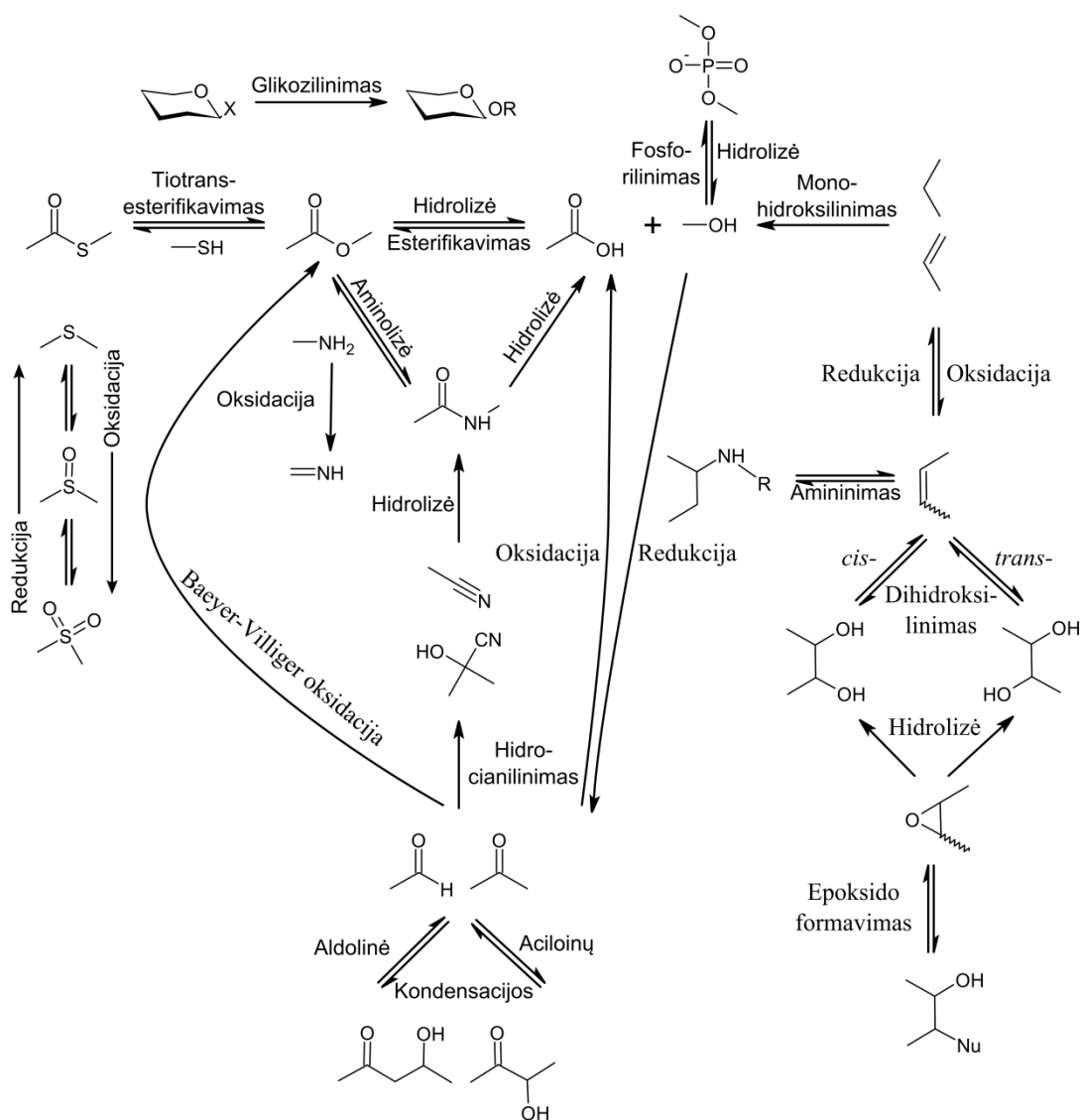
Fermentas laikomas stereoselektyviu, jei teikiama pirmenybė vieno stereoizomero susidarymui. Kai stereoizomerai yra enantiomerai, tai fermentas

vadinamas enantioselektyviu, kai diastereomerai – diastereoselektyviu (Moss, 1996). Pagal šį apibrėžimą stereoselektyvumas ir enantioselektyvumas (ar diastereoselektyvumas) yra lygiaverčiai terminai, nes vertinama tik susidariusių produktų prigimtis. Kai substratas yra prochiralinis arba mezo ir vieno enantiomero susidaro daugiau, procesas yra stereoselektyvus, bet ne enantioselektyvus, nes substratas ne chiralinis. Antra vertus, kuomet substratu naudojamas enantiomerų mišinys, ir vienas enantiomeras transformuojamas greičiau, procesas gali būti enantioselektyvus ir stereoselektyvus. Pagal šį substratų kriterijų stereoselektyvios transformacijos gali būti vykdomos dviem skirtingais keliais: taikant asimetrinę sintezę ar atskiriant raceminį mišinį. Dėl didelio atrankumo, fermentų kaip biokatalizatorių panaudojimas yra svarbus sintetinant labai grynus organinius junginius, kur būtinas mikropriemaišų pašalinimas (Fessner ir Anthonsen, 2009). Platus chemo-, regio- ir stereoselektyvių biotransformacijų pritaikymas galėtų stipriai supaprastinti pramoninius procesus ir padaryti juos ekonomiškai patraukliais bei ekologiškais (Drauz et al., 2012; Liese et al., 2006).

Fermentai yra aktyviausi esant švelnioms sąlygoms (kambario temperatūroje, kai pH neutralus) bei pirmumą teikia vandeninei terpei. Paskutiniu metu šis faktas dažniau laikomas privalumu nei trūkumu. Tokiomis sąlygomis galima naudoti jautrius substratus, o katalizės procesas yra saugesnis aplinkai ir sveikatai (Carreira ir Yamamoto, 2012). Vis dėlto pramoninėje biokatalizėje svarbu, kad fermentai būtų aktyvūs aukštesnėje temperatūroje ar organinių tirpiklių aplinkoje. Jau yra fermentų, veikiančių tiek švelniomis, tiek agresyviomis sąlygomis (aukštoje temperatūroje, kritiniuose pH, organiniuose tirpikliuose), reikalingomis specifiniams procesams (Illanes, 2008).

Dar vienas biokatalizės privalumas – didelė katalizuojamų reakcijų įvairovė (1.1 pav.). Laboratorinėmis sąlygomis fermentiniai biokatalizatoriai konstruojami taip, kad pasižymėtų platesniu substratiniu specifiškumu, enantioselektyvumu ar didesniu stabilumu ir būtų tinkami specifiniams uždaviniams pasiekti (Carreira ir Yamamoto, 2012). Dėl to atsiranda daugiau galimybių biokatalizę taikyti pramonėje (Straathof et al., 2002; Zaks, 2001;

Carreira ir Yamamoto, 2012). Vis dažniau ji sujungiama su chemine katalize, pritaikoma sintetinant sudėtingus organinius junginius. Galiausiai, būtina paminėti, jog daugeliu atvejų biokatalizė pateikia technologijų pasirinkimo bei sprendimo galimybes. Tuo tarpu kitų technologijų atveju toks lankstumas neįmanomas (Johannes et al., 2005).



1.1 pav. Organinėje sintezėje dažniausiai naudojami fermentinės transformacijos (Drauz et al., 2012; Carreira ir Yamamoto, 2012).

Visgi, aptariant šiandieninę biokatalizę, išlieka trys pagrindiniai trūkumai:

1) biokatalizatoriai nėra pakankamai stabilūs norimuose tirpikliuose (Illanes, 2008);

2) trūksta biokatalizatorių, galinčių vykdyti reakcijas su prieinamais substratais, gaunant tikslius produktus (Bommarius ir Riebel, 2004);

3) ilgas ir brangus naujų ir geresnių biokatalizatorių kūrimas bei tobulinimas (Illanes, 2008).

Mažas fermentų stabilumas norimoje terpėje yra pagrindinis biokatalizatorių trūkumas. Mažesni nei 1 Å konformaciniai pokyčiai gali lemti staigų fermentinio aktyvumo praradimą, kuris yra būtinas baltymo molekulės vientisumo kriterijus (Carter ir Wells, 1988). Fermentų inaktyvacija gali vykti įvairiomis sąlygomis. Pavyzdžiui, esant kritinei temperatūrai ar pH, vandens, organinių tirpiklių ar dujų absorpcijai bei susidarius specifiniams kovalentiniams ryšiams (Caussette et al., 1998; Slusarczyk et al., 2000).

Pernelyg mažai biokatalizatorių yra tinkami reakcijoms, kurių metu su esamais substratais gaunami tiksliniai produktai. Nors biokatalizatorių yra beveik kiekvienai reakcijai, tačiau dauguma jų nėra pakankamai gerai apibūdinti ar komerciškai prieinami. Vis dėlto paskutiniu metu komerciškai prieinamų fermentų kiekis didėja ir laukiama dar greitesnio progreso šioje srityje (Bommarius ir Riebel, 2004).

Nauji ar geresni biokatalizatoriai kuriami ir tobulinami gana ilgai. Tai trunka vidutiniškai apie 10–20 metų. Pavyzdžiui, akrilamido gamybos proceso gerinimas vyko 20, L-karnitino – 15 metų. Šis trūkumas išlieka dėl nepakankamo biotechnologijos ir biokatalizės pritaikymo (Bommarius ir Riebel, 2004).

Biokatalizę palyginus su kitomis katalizės rūšimis, pavyzdžiui, homogenine katalize, kur ligandai yra atsakingi už specifiškumą, ar heterogenine katalize, kur kataliziškai aktyviame centre yra kieti nešikliai (zeolitai ar metalų oksidai), išryškėja tiek fermentinės katalizės privalumai, tiek ir trūkumai (Bommarius ir Riebel, 2004; Drauz et al., 2012). Fermentų privalumai prieš tokias sistemas susideda iš griežto enantio-, regio- ir

stereoselektyvumo bei švelnių katalizės sąlygų. Tuo tarpu trūkumai išlieka tie patys kaip ir cheminės katalizės atveju (Fessner ir Anthonsen, 2009).

### 1.1.2. Biokatalizės taikymas pramonėje

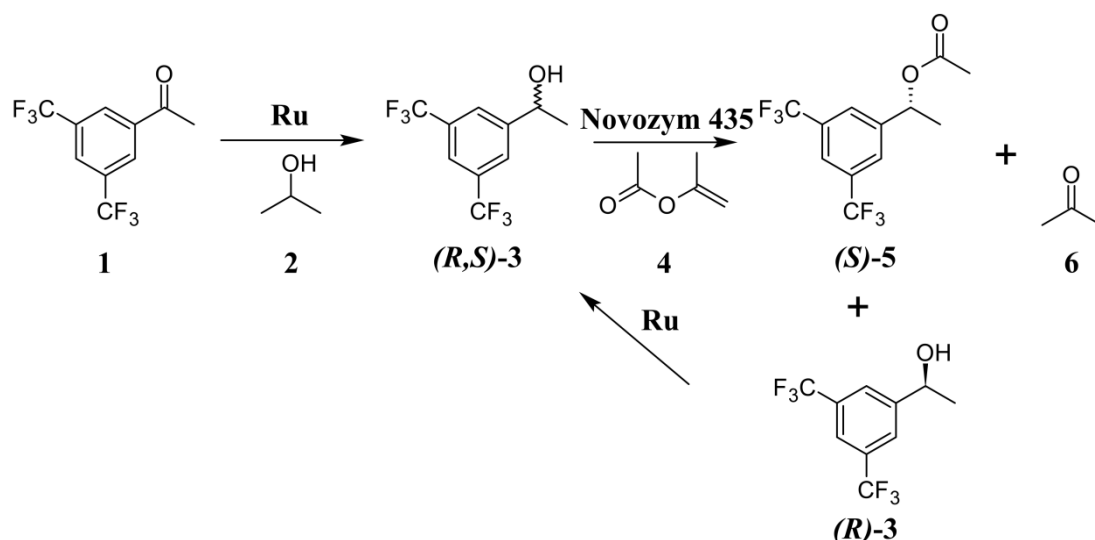
Biokatalizės procesai ir technologijos sparčiai veržiasi į įvairių krypčių cheminių procesų pramonę. Daugiastadijiniai vieno reaktoriaus procesai turi pranašumą, nes išvengiama tarpinių gryninimų, dėl to išauga bendras proceso efektyvumas. Didelis iššūkis yra suderinti fermentinės ir cheminės katalizės stadijų vyksmą viename reaktoriuje. Neretai katalizatorių suderinamumą riboja pernelyg skirtingos reakcijų sąlygos, pavyzdžiui, terpė ar temperatūra. Tokie apribojimai sprendžiami naudojant fermentus, kurie yra stabilūs tipinėmis cheminės sintezės sąlygomis (organiniuose tirpikliuose, aukštesnėse temperatūrose) arba chemokatalizę vykdant vandeniniuose tirpaluose (Burda et al., 2008).

Iki šiol sėkmingiausiais laikomi nitrilo hidratazės ir nitrilazių pritaikymai biokatalizės procesuose. Pavyzdžiui, pastaruoju metu iš akrilonitrilo pagaminama 30 000 tonų akrilamido per metus. Kelios skirtingos įmonės taiko biokatalizę enantiomeriškai grynų aminorūgščių gamybai. Plati biokatalizės pritaikymo sritis yra maisto pramonė: jau dabar izogliukozė gaunama iš javų gliukozės, naudojant gliukozės izomerazę; termolizinas katalizuoja dirbtinio saldiklio – aspartamo – sintezę. Negana to, fermentiniai procesai yra svarbūs norint gauti tarpinius vaistų produktus (Hagen, 2006).

Kompanija Merck ir Ko patentavo vieno reaktoriaus chemofermentinį kinetinį antrinių alkoholių atskyrimo procesą. Lipazė buvo pritaikyta enantioselektyviam acilinimui, o rutenis – likusio enantiomero racemizavimui (Broxterman ir Verzij, 2003). Pagal šio proceso schemą sintetinamas (*R*)-[3,5-bis(trifluorometil)fenil]-etan-1-olis (3) ir atitinkami esteriai (1.2 pav.). Galutinis produktas yra uždegiminėms ligoms bei psichiatriniais sutrikimams gydyti skirtų preparatų sintonas (Munoz ir Covenas, 2011). Imobilizuota lipazė B iš *Candida antarctica* (Novozym 435) atrankiai acilina (*R*)-[3,5-



bis(trifluorometil)fenil]-etan-1-olį (3) iki (*R*)-[3,5-bis(trifluorometil)feniletil]-acetato (5), o likęs (*S*)-(3) racemizuoja ruteniu. Šalutinis produktas – acetonas (6), kuris susidaro acilinimo metu iš izoprenilacetato (4), pašalinamas distiliuojant, kai slėgis sumažintas. Raceminis (3) gaunamas iš atitinkamo prochiralinio ketono (1) redukcijos būdu, kai katalizatorius rutenis, o vandenilio donoras – lipazės netransformuojamas alkoholis (pvz., izopropanolis) (2) (1.2 pav.). Galutinis produktas atskiriamas nuo likusio acilo grupės donoro (4) distiliuojant, katalizatoriai pašalinami filtravimo būdu. Bendra proceso išeiga 77 %, enantiomerinis grynumas *ee* >99,5 % (Carreira ir Yamamoto, 2012).



1.2 pav. Kinetinis 3,5-bis(trifluorometil)fenil-etan-1-olio racemato atskyrimas chemofermentiniu būdu. 1 – 3,5-bis(trifluorometil)fenil-etan-1-onas, 2 – izopropanolis, 3 – 3,5-bis(trifluorometil)fenil-etan-1-olis, 4 – izopropenilacetatas, 5 - 3,5-bis(trifluorometil)feniletil-acetatas, 6 – acetonas, Ru – rutenis, Novozym 435 – *C. antarctica* lipazė (Broxterman ir Verzij, 2003).

Fermentų imobilizacija gali padėti techniniam biokatalizės proceso vystymui: gaunami grynesni produktai, padidinama išeiga, sumažinamas šalutinių medžiagų kiekis. Imobilizuoti fermentai plačiausiai naudojami ypač grynų cheminių medžiagų bei vaistų gamyboje (Hagen, 2006).

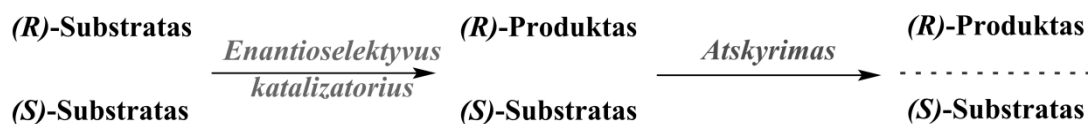
Ląstelių ar fermentų imobilizacija sudaro sąlygas tęstinams, o ne pakopiniams veiksams. Tai palengvina proceso kontroliavimą ir sumažina kaštus. Žinoma, šie privalumai taikomi didelės apimties procesams. Tuo tarpu didžioji dalis bioproduktų gaminami mažais kiekiais (Hagen, 2006; Drauz et al., 2012).

## **1.2. Chiralinių alkoholių poreikis ir biosintezės perspektyvos**

Chiraliniai alkoholiai yra naudinga žaliava įvairių farmacijos produktų sintezėje. Pastaraisiais metais žymiai išaugo optiškai aktyvių cheminių junginių poreikis maisto, chemijos pramonės ir žemės ūkio srityse (Zeng ir Sabra, 2011; Goldberg et al., 2007a; Haberland et al., 2002). Chiralinių alkoholių pasiūla vis dar nepakankama, todėl svarbu ieškoti efektyvių enantiomeriškai grynų junginių sintezės būdų. Daugybę optiškai grynų junginių šiandien sėkmingai galima susintetinti naudojant atrankias organines reakcijas, tačiau grynų chiralinių alkoholių gavimas organinės cheminės sintezės metodais išlieka problematiškas ir brangus (Kataoka et al., 2003). Susintetinti raceminiai alkoholių mišiniai gryninami taikant kinetinio izomerų atskyrimo metodus. Alkoholių racematai gali būti gryninami naudojant dirbtinius asimetrinius katalizatorius, pavyzdžiui, 2,2'-bis(difenilfosfino)-1,1'-binaftilą (BINAP) (Mikami et al., 2000).

Pastaraisiais metais chemikai didelį dėmesį skyrė biokatalizatorių, fermentų ar ląstelių, pritaikymui optiškai grynų junginių sintezei (Zheng, 2011). Šiuo metu galima įvardyti keturis chiralinių alkoholių gamybos metodus, kai naudojami stereospecifiniai biokatalizatoriai. Tai kinetinis racematų atskyrimas (Fiaud, 1988), asimetrinė ketonų redukcija (D'Arrigo et al., 2000), asimetrinis angliavandenilių grandinės hidroksilinimas (Adam et al., 2000) ir aldolinė kondensacija susidarant angliavandeniams (Silvestri et al., 2003). Kinetinis racematų atskyrimas paremtas dviejų enantiomerų diferencijavimu raceminiame mišinyje (1.3 pav.). Naudojant enantioselektyvų biokatalizatorių enantiomerai reaguoja skirtingu greičiu. Taip gaunamas lėčiau

reaguojančiu enantiomeru praturtintas pavyzdys, o chiralinio junginio išgryninimas tampa žymiai paprastesnis (Fiaud, 1988).

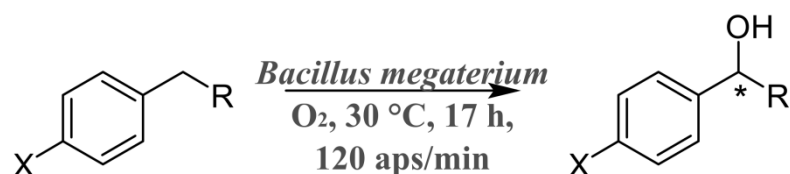


1.3 pav. Bendra kinetinio racematų atskyrimo schema (Fiaud, 1988).

Asimetrinės ketonų redukcijos atveju prochiraliniai ketonai yra verčiami į chiralinius neraceminius alkoholius (1.4 pav.) (Heidlas ir Tressl, 1990). Kinetinio racematų atskyrimo metodo privalumas yra tai, kad paprasta pritaikyti įprastinį cheminį sintezės procesą: dažnai pakanka cheminį katalizatorių pakeisti biokatalizatoriumi. Tuo tarpu svariausias asimetrinės ketonų redukcijos, asimetrinio angliavandenilių grandinės hidroksilinimo (1.5 pav.) ir aldolinės kondensacijos iki angliavandenių privalumas – teorinė chiralinio alkoholio išeiga, kuri lygi 100 %. Maksimali teorinė išeiga taikant kinetinį racematų atskyrimą yra tik 50 % nuo pradinio mišinio kiekio (Kataoka et al., 2003).



1.4 pav. Asimetrinės ketonų redukcijos schema (Heidlas ir Tressl, 1990).



1.5 pav. Asimetrinio angliavandenilių grandinės hidroksilinimo schema (Adam et al., 2001).

Kuriant chiralinių alkoholių biosintezės sistemas darbai pradedami nuo potencialių biokatalizatorių paieškos, todėl svarbu turėti specifinį biokatalizatorių atrankos būdą. Kitas žingsnis – atrinktų fermentų charakterizavimas, leidžiantis identifikuoti efektyviausius kandidatus

pramoninei biokatalizei. Siekiant fermentus naudoti pramoninėms konversijoms, reikia užtikrinti nuolatinį aprūpinimą biokatalizatoriumi. Tam, kad būtų gauti dideli biokatalizatoriaus kiekiai, fermentą koduojantys genai klonuojami ir optimizuojama baltymo sintezė. Chiralinių alkoholių sintezei dažniausiai naudojamos nuo NAD(P)H priklausomos alkoholių dehidrogenazės (ADH)/reduktazės. Taigi, norint užtikrinti efektyvų chiralinių alkoholių biosintezės sistemos funkcionavimą, būtina išspręsti kofermentų regeneracijos problemą. Paskutiniame etape chiralinių alkoholių biosintezė turi būti pritaikyta pramoniniu lygiu, ieškoma tinkamiausios reaktoriaus sistemos (Matsuda et al., 2009; Huisman et al., 2009; Ni ir Xu, 2012).

### **1.2.1. ADH – fermentai, katalizuojantys asimetrinę ketonų redukciją**

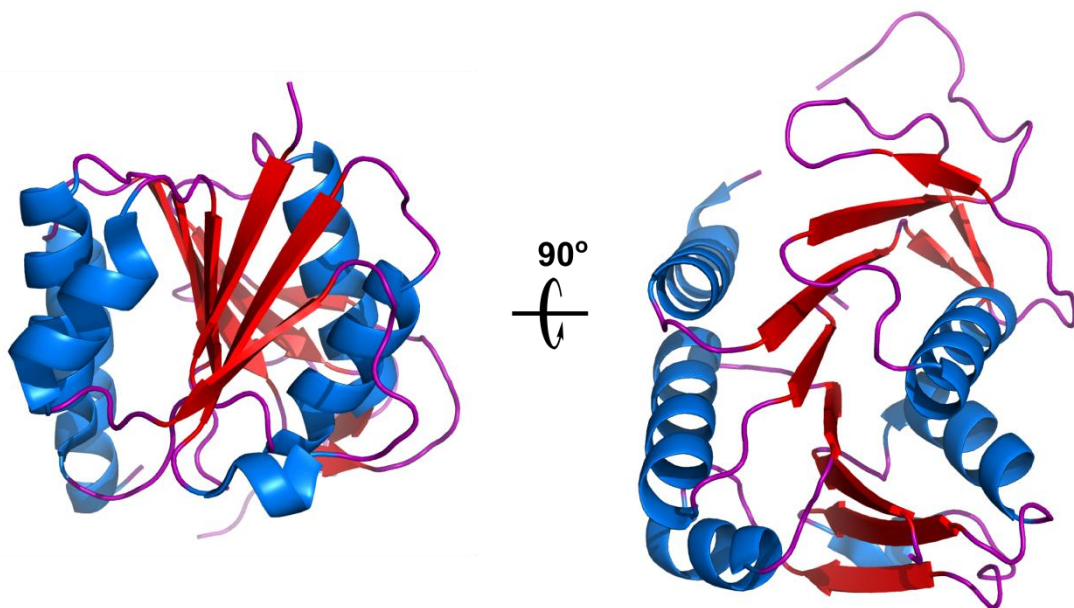
Yra keletas ADH klasifikavimo būdų. Jos gali būti skirstomos pagal struktūrą, įskaitant subvienetų skaičių ir dydį, Rosmano sanklodos egzistavimą, struktūrai reikalingus metalų jonus, arba pagal stereocheminės reakcijos eigą ir susiformavusį produktą (Carreira ir Yamamoto, 2012). Prieš 30 metų remiantis bakterijų, mielių, vabzdžių ir žinduolių ADH struktūrų analizėmis buvo suformuotos atskiros nuo NAD(P)H priklausomų dehidrogenazių šeimos (Jornvall et al., 1981). Tokios analizės suteikė žinių apie fermentų evoliuciją, leido juos suskirstyti į klases, izofermentus (Danielsson ir Jornvall, 1992; Jornvall et al., 1999). Įgyvendinus keletą genomų sekoskaitos projektų, tapo akivaizdu, kad skirtingų šeimų dehidrogenazės/reduktazės beveik kiekviename genome sudaro didelę genų produktų grupę (Jornvall et al., 1999; Pearl et al., 2005). Oksidoreduktazių paplitimas ir funkcinė įvairovė tiek prokariotuose, tiek žinduoliuose rodo jų svarbą šių organizmų metabolizmui (Jornvall et al., 1999), pavyzdžiui, nukenksminant ksenobiotikus ar dalyvaujant hormonų ir signalinių molekulių (žinduolių hidroksisteroidų ir prostaglandinų dehidrogenazių) reguliavime (Nobel et al., 2001; Oppermann et al., 2003; Oppermann et al., 1996; Oppermann ir Maser, 2000; Chang et al., 2003).

Biokatalizės srityje svarbios trys ADH superšeimoms: trumpų grandinių dehidrogenazės reduktazės (SDR), vidutinių grandinių dehidrogenazės reduktazės (MDR) ir aldo-keto reduktazės (AKR) (Carreira ir Yamamoto, 2012).

### ***1.2.1.1. SDR superšeima***

SDR yra viena didžiausių iš dabar žinomų baltymų superšeimų, kuri apima platų substratų spektrą. Genomų tyrimai parodė, kad SDR genai sudaro apie  $\frac{1}{4}$  visų organizmuose aptinkamų dehidrogenazių genų (Kallberg ir Persson, 2006). Šios šeimos atstovų yra visose gyvybės formose (Jornvall et al., 1999). Intensyvi bakterinių genomų sekoskaita lėmė, kad apie 75 % šiuo metu žinomų SDR yra bakteriniai fermentai (Kavanagh et al., 2008).

SDR sekų panašumas yra mažas, tačiau visiems fermentams būdingas konservatyvus dinukleotidų kofaktorių jungimosi motyvas – Rosmano sankloda (Kallberg ir Persson, 2006; Pearl et al., 2005) (1.6 pav.). Šis struktūrinis elementas sudarytas iš centrinės susivijusios  $\beta$ -klostės (6–7  $\beta$ -juostų), kurią iš abiejų pusių supa 3–4  $\alpha$ -spiralės. Dėl persikryžiavimo tarp 3 ir 4 juostų, bendra juostų topologija yra 3-2-1-4-5-6-7, kuri sukuria charakteringą nikotinamido prisijungimo vietą. Šiam motyvui būdinga labai varijuojanti Gly turtinga seka, kuri užtikrina struktūrinį vientisumą ir sudaro sąlygas nukleotidinio kofaktoriaus pirofosfato prisijungimui. Rūgštinė aminorūgšties šoninė grupė, esanti iškart už antros  $\beta$ -juostos ir per 20 aminorūgščių liekanų nutolusi nuo Gly turtingos sekos, jungiasi prie 2' ir 3' adenino ribozės hidroksigrupių, nulemdama NAD(H) specifiskumą. SDR šeimoje NAD(P)H jungimąsi diktuoja bazinė šoninė grupė, esanti Gly-turtingame segmente ir/arba kilpoje už antros  $\beta$ -juostos (Lesk, 1995; Kavanagh et al., 2008).



1.6 pav. Rosmano sankloda (PDB kodas 3QVO). Mėlyna spalva –  $\alpha$ -spiralės, raudona –  $\beta$ -juostos, violetinė – nestructūrizuotos kilpos.

Du pagrindiniai SDR fermentų tipai – klasikinės ir išplėtos SDR – yra lengvai nustatomi (Jornvall et al., 1995). Klasikinių SDR grandinės ilgis yra ~250 aminorūgščių, o išplėstų C-gale yra papildomas 100 aminorūgščių domenai. Kiti trys tipai – tarpinės, kompleksinės ir divergentinės SDR – gali būti atskiriami pagal charakteringus sekų motyvus (1.1 lentelė).

1.1 lentelė. Penkių SDR pošeimių kofaktoriaus rišimosi ir aktyvaus centro sekų motyvai (Kavanagh et al., 2008).

Pošeimė	Kofaktoriaus rišimasis	Aktyvus centras
Klasikinė	TGxxx[AG]xG	YxxxK
Išplėsta	[ST]GxxGxxG	YxxxK
Tarpinė	[GA]xxGxx[GA]	YxxxK
Divergentinė	GxxxxxSxA	YxxMxxxK
Kompleksinė	GGxGxxG	YxxxN

x – bet kokios aminorūgšties liekana. Skliaustuose pateiktos alternatyvios aminorūgštys, kurių sekoje gali nebūti.

Didžioji dalis SDR yra oligomeriniai fermentai: homodimerai arba homotetramerai (1.2 lentelė). SDR atstovai turi viendomenę struktūrą. Jų

substrato prijungimo vieta paprastai lokalizuota kintančiame C-galo regione, nors pasitaiko išimčių, kai SDR turi mažus papildomus domenų (Jornvall et al., 1995; Oppermann et al., 2003). Daugelis SDR turi katalizei svarbią, bet ne griežtai konservatyvią Tyr bazę. Šios aminorūgšties katalizines savybes sustiprina greta esantis Lys, kuris drauge su oksiduotu, teigiamą krūvį turinčiu kofaktoriu sumažina Tyr hidroksigrupės  $pK_a$  (Koumanov et al., 2003). Lys  $\epsilon$ -aminogrupė dalyvauja nikotinamido ribozės prijungime. Tuo tarpu aktyvaus centro Ser stabilizuoja ir orientuoja substrato karbonilinę grupę. Tyr, Lys ir Ser katalizinę triadą dažnai papildo Asn (Kavanagh et al., 2008). Įdomu tai, kad nors SDR aminorūgščių sekų panašumas mažas, tretinėms struktūroms būdingas konservatyvus susisukimo modelis (Carreira ir Yamamoto, 2012).

### **1.2.1.2. MDR superšeima**

MDR atstovų vidutinis subvieneto dydis ~350 aminorūgščių liekanų. Šią superšeimą sudaro chinono reduktazės, leukotrieno B<sub>4</sub> dehidrogenazės, poliolių dehidrogenazės, nuo Zn<sup>2+</sup> priklausomos ADH ir dar daug kitų fermentų šeimų (Persson et al., 2008). Pirmoji gerai charakterizuota MDR buvo žinduolių ADH, kurios pirminė struktūra nustatyta dar 1970 m. (Jornvall, 1970).

MDR baltymų architektūra sudėtingesnė nei SDR superšeimos baltymų. Dažniausiai jų subvienetai sudaryti iš dviejų domenų: kofermento rišimosi domeno ir katalizinio domeno. Kofermento rišimosi domenui yra būdinga anksčiau detaliam aprašyta Rosmano sanklodos topologija (Carreira ir Yamamoto, 2012; Kavanagh et al., 2008).

MDR ketvirtinės struktūros labai skirtingos: jos būna dimerinės, tetramerinės, tačiau pasitaiko ir monomerinės bei trimerinės. Visą superšeimą galima suskirstyti į du baltymų tipus: metaloproteinus, turinčius cinką (1 ar 2 Zn<sup>2+</sup> viename subvienete), ir baltymus, neturinčius cinko ar kitokio metalo (1.2 lentelė) (Hedlund et al., 2010). Cinko turinčių fermentų atveju vienas cinko jonas lokalizuotas kataliziniame centre ir vadinamas kataliziniu cinku, o

struktūrinis cinkas dalyvauja sąveikaujant subvienetams, formuojantis ketvirtinei struktūrai (Vallee ir Auld, 1990).

1.2 lentelė. SDR, MDR ir AKR superšeimų charakteristikų palyginimas (Carreira ir Yamamoto, 2012).

<b>Parametras</b>	<b>SDR</b>	<b>MDR</b>	<b>AKR</b>
<b>Aminorūgštys monomere</b>	250	350	325
<b>Ketvirtinė struktūra</b>	di- arba tetrameras	di- arba tetrameras	monomeras
<b>Metalo jonai</b>	nėra	0, 1 arba 2 Zn <sup>2+</sup> /subvienete	nėra
<b>Struktūrinė ypatybė</b>	-	-	( $\alpha/\beta$ ) <sub>8</sub> -statinė
<b>Kofermento rišimosi motyvas</b>	Rosmano sankloda	Rosmano sankloda	Nėra Rosmano sanklodos
<b>Struktūrinės katalizinės ypatybės</b>	katalizinė tetrada Asn, Ser, Tyr, Lys	-	katalizinė tetrada Tyr, Lys, Asp, His
<b>Svarbūs atstovai</b>	( <i>R</i> )-ADH iš <i>Lactobacillus kefir</i>	( <i>S</i> )-ADH iš <i>Rhodococcus erythropolis</i>	Glicerolio DH iš <i>Gluconobacter oxydans</i>

Iš 86 apibūdintų MDR šeimų 35 turi abu – katalizinį ir struktūrinį cinko jonus, 7 MDR šeimos turi vieną Zn<sup>2+</sup> ir 38 MDR šeimų nariai cinko neturi. MDR šeimų cinką turintys fermentai dažnesni eukariotuose. Jie priklausomi nuo NAD<sup>+</sup> ir gali būti laikomi dehidrogenazėmis. Cinko neturintys MDR nariai dažniausiai aptinkami bakterijose ir jie veikia kaip nuo NADPH priklausančios reduktazės (Hedlund et al., 2010).

Kataliziniai SDR ir MDR mechanizmai yra skirtingi. Cinką turinčių MDR katalizinis cinko jonas su hidroksilu (iš disocijavusio vandens) dalyvauja deprotonuojant substratą, ir vyksta hidrido pernaša ant kofermento nikotinamidinės dalies. SDR ADH atveju, kur Tyr hidroksigrupė stabilizuojama gretimu Lys, vyksta rūgštinė–bazinė katalizė ir hidridas pernešamas ant kofermento (Carreira ir Yamamoto, 2012).



### **1.2.1.3. AKR superšeima**

AKR – fermentų superšeima, plačiai paplitusi daugelyje organizmų, nuo bakterijų iki žinduolių. Dažniausiai AKR yra monomeriniai baltymai, turintys charakteringą ypatybę –  $(\alpha/\beta)_8$ -statinės struktūrą (1.2 lentelė). Vidutinės baltymo grandinės ilgis yra 325 aminorūgštys, kurios lemia 34–37 kDa molekulinę masę. Dar viena charakteringa AKR ypatybė yra ta, kad fermentai neturi Rosmano sanklodos motyvo, kuris svarbus kofermento NAD(P)H jungimuisi (Hoog et al., 1994). Pagal aminorūgščių sekų palyginimus šios superšeimos fermentai buvo suskirstyti į 14 šeimų (AKR1–AKR14). Vienos AKR šeimos nariai turi būti <40 % panašūs į bet kurią kitą šeimą (Jez ir Penning, 2001).

Substrato prisijungimui ir konversijai AKR naudoja aktyviame centre esančią katalizinę tetradą, kurią sudaro Tyr, Lys, Asp ir His (1.2 lentelė). Nepaisant bendro šios superšeimos narių struktūrinio panašumo, fermentai pasižymi skirtingais substratiniais specifiškumais. Jie katalizuoja įvairių alifatinių bei aromatinių aldehydų ir ketonų, įskaitant cukrus, steroidus ir ksenobiotikus, virsmus. Nustatyta, jog atskiri AKR fermentai katalizuoja plataus spektro substratų redukciją (Carreira ir Yamamoto, 2012).

### **1.2.2. Ketonus redukuojančių oksidoreduktazių specifiškumas kofermentams**

Asimetrinę ketonų redukciją vykdančioms karbonilo reduktazėms ir ADH yra būtinas hidrido šaltinis. Tam dažniausiai naudojamas nikotinamidinis kofermentas – NADH arba NADPH (Goldberg et al., 2007a). Retais atvejais pasitaiko, kad fermento aktyviame centre yra prisijungęs flavinas (Walsh, 1980) ar metoksantinas (pvz., PQQ) (McWhirter ir Klapper, 1990).

Specifiškumas kofermentui yra svarbi nuo NAD(P)<sup>+</sup> priklausomų oksidoreduktazių savybė, leidžianti ląstelėms atskirti metabolinius kelius. Daugelis nuo NAD<sup>+</sup> priklausomų fermentų dalyvauja oksidaciniuose

katabolinėse reakcijose. Tuo tarpu NADPH reikalingas biosintezės procesuose, pavyzdžiui lipidų biosintezės (Mittl et al., 1994). NADPH nuo NADH skiriasi tik fosfato grupe, esančia adenozino ribozės 2`-pozicijoje, todėl dehidrogenazių atrankumą  $\text{NAD}^+$  arba  $\text{NADP}^+$  lemia efektyvūs (vos kelių aminorūgščių) struktūriniai skirtumai (Rosell et al., 2003).

Atrankumas kofermentui turi komercinę reikšmę. Atsižvelgiant į kofermento kainą, stabilumą ir regeneravimo galimybes pirmenybė teikiama  $\text{NAD}^+$ . Kai pH 5, NADPH skilimo greitis yra 3–4 kartus didesnis nei NADH, o kai pH 7 – skirtumas 10–20 kartų (Chenault ir Whitesides, 1987). Dėl to stengiamasi pakeisti fermentų, priklausomų nuo  $\text{NADP}^+$ , specifiškumą taip, kad kofermentu būtų naudojamas  $\text{NAD}^+$ . Daugeliu atvejų aminorūgštys, lemiančios atrankumą šiems kofaktoriams, lokalizuotos baltymo C-gale Gly turtingame motyve, per kurį jungiasi kofaktorius. Nuo  $\text{NADP}^+$  priklausomuose fermentuose atrankumui svarbios Arg arba Lys aminorūgščių šoninės grandinės, kurios elektrostatiškai sąveikauja su  $\text{NADP}^+$  2`-fosfato grupe. Taigi, šios aminorūgštys ir tampa taikiniais perkonstruojant kofermento rišimosi sritį (Carreira ir Yamamoto, 2012).

1995 m. Chen su kolegomis paskelbė duomenis apie izocitrato dehidrogenazės specifiškumo iš  $\text{NADP}^+$  į  $\text{NAD}^+$  pakeitimą, atlikus šešias aminorūgščių mutacijas adenoziną rišančioje kišenėje (Chen et al., 1995). Nuo  $\text{NADP}^+$  priklausomos vidutinės grandinės ADH kofaktoriaus specifiškumą pavyko pakeisti sukūrus trigubą mutantą (G223D/T224I/H225N) (Rosell et al., 2003). Dar vienas sėkmingas kofaktoriaus „perjungimo“ pavyzdys – *Candida tenuis* ksilozės reduktazė. Sekoje pakeitus vos dvi aminorūgštis (K274R/N276D), ji tapo nuo  $\text{NAD}^+$  priklausomu fermentu (Petschacher et al., 2005).

### **1.2.3. Kofaktorių regeneravimo būdai**

Kai biokatalizei naudojami gryni fermentai, reakcijos mišinyje turi būti užtikrinami pastovūs kataliziniai kofermentų kiekiai. Kadangi ADH

kofermentai yra brangūs, todėl efektyviai katalizei būtina kofermentų regeneravimo sistema, kuri veikia lygiagrečiai su substrato konversija į produktą. Literatūroje yra aprašytos fermentinės (gliukozės dehidrogenazės ir formiato dehidrogenazės), elektrocheminės, fotocheminės ir cheminės NAD(P)H regeneravimo galimybės (De Wildeman et al., 2007; Goldberg et al., 2007a; Hollmann et al., 2010).

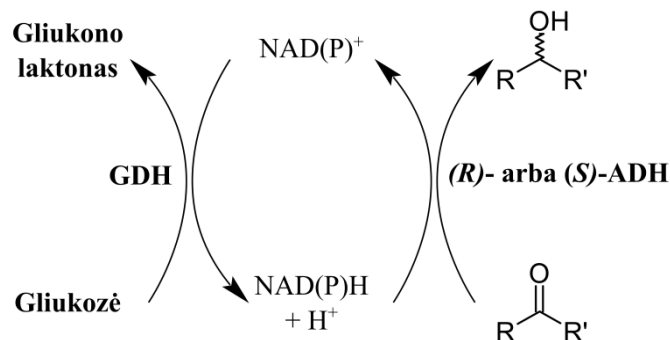
Kofaktoriai keičiasi tik tarp redukuoto ir oksiduoto būvio, todėl regeneravimui tampa patrauklios elektrocheminės sistemos. Visgi, tiesioginės katodinės NADP<sup>+</sup> redukcijos trūkumas – mažas regioselektyvumas ir pašalinės reakcijos, vykstančios dėl didelių viršįtampių (Biade et al., 1992; Hollmann et al., 2010). Dėl to buvo sukurtos organinės ir metalus turinčios elektronų šaudyklės, perduodančios elektronus tarp elektrodo ir NADP<sup>+</sup>/NADPH (Steckhan et al., 1991).

Rodis, rutenis, platina ir jų druskos taikomi chemiam NAD(P)H regeneravimui (Goldberg et al., 2007a). Homogeniniai fotosensibilizatoriai, tokie kaip rutenio ar cinko kompleksai, dažai (pvz., metileno mėlis), heterogeniniai puslaidininkiai, koloidai (pvz., kadmio sulfidas ar titano dioksidas) gali būti pritaikomi NAD(P)H fotocheminei regeneracijai dalyvaujant dihidrolipoamido dehidrogenazei ar feredoksino reduktazei (Julliard et al., 1986; Rickus, 2005).

Visgi dažniausiai naudojamos fermentinės NAD(P)H regeneravimo sistemos. Jos skirstomos į du tipus: sujungtas su fermentu arba su substratu (Hummel ir Kula, 1989). Su fermentu sujungtoje sistemoje naudojamas antras fermentas ir papildomas substratas, kuris oksiduojamas. Pavyzdžiui, formiato dehidrogenazė formiatą oksiduoja iki CO<sub>2</sub> (Goldberg et al., 2007a). Ši regeneravimo sistema naudojama *L-tert*-leucino pramoninėje gamyboje (Bommarius ir Riebel, 2004). Tarp šios sistemos privalumų pirmiausiai minimi jos inertiškumas, lengvai pašalinamas koproduktas, pigūs formiato dehidrogenazė ir kosubstratas – formiatas (Goldberg et al., 2007a). Vis dėlto dauguma formiato dehidrogenazių yra nuo NAD<sup>+</sup> priklausomi fermentai, o daug ADH priklauso nuo NADPH. Dažniausiai formiato dehidrogenazės

sugeba redukuoti ir  $\text{NADP}^+$ , tačiau reakcijos yra lėtos (Ernst et al., 2005). Efektyviau tokį neatitikimą galima išspręsti naudojant transhidrogenazes, kurios perneša redukcinis ekvivalentus tarp  $\text{NADH}$  ir  $\text{NADPH}$  (Weckbecker ir Hummel, 2004).

Fermentinei  $\text{NADPH}$  regeneracijai dažnai naudojamos gliukozės dehidrogenazė ir gliukozės-6-fosfato dehidrogenazė, kurios, atitinkamai, oksiduoja gliukozę ir gliukozės-6-fosfatą (Weckbecker ir Hummel, 2004). Abu fermentai pasižymi dideliu aktyvumu ir stabilumu. 1.7 paveiksle pavaizduota chiralinių alkoholių gamybos schema, kai  $\text{NAD(P)H}$  regeneravimui naudojama gliukozės dehidrogenazė. Esminis gliukozės-6-fosfato dehidrogenazės  $\text{NADPH}$  regeneravimo sistemos trūkumas – brangus substratas (Goldberg et al., 2007a). Literatūroje aprašyta keletas atvejų, kai kofaktoriaus regeneravimo sistemoje antras fermentas yra taip pat  $\text{ADH}$  (Leonida, 2001).



1.7 pav. Chiralinių alkoholių sintezė su  $\text{NAD(P)H}$  regeneravimo sistema. GDH – gliukozės dehidrogenazė (Drauz et al., 2012).

Kitas būdas regeneruoti  $\text{NADPH}$  – panaudoti vandenilio hidrogenazes. Pagrindinis tokios sistemos privalumas yra tas, kad nesusidaro pašalinių produktų (Mertens ir Liese, 2004). Fosfito dehidrogenazė oksiduoja fosfitą iki fosfato drauge redukuodama  $\text{NAD}^+$ . Todėl šis fermentas gali būti pritaikomas kofaktoriaus regeneravimui. Be to, parodyta, kad fosfito dehidrogenazė yra suderinama su laktato dehidrogenaze, arklio kepenų  $\text{ADH}$ , malato dehidrogenaze, ksilozės reduktaze (Johannes et al., 2007).

Visais atvejais su fermentu sujungtose kofaktoriaus regeneravimo sistemose tuo pačiu metu naudojami du fermentai. Tuo tarpu su substratu sujungtose regeneravimo sistemose tiek tikslinio produkto gamybai, tiek kofaktoriaus regeneravimui naudojamas vienas fermentas. Pastaruoju atveju reikalingas papildomas substratas. Chiralinių alkoholių gamybos metu dažniausiai papildomai pridedama 2-propanolio, kuris oksiduojamas iki koprodukto – acetono. Koproduktas gali būti šalinamas proceso metu, taip valdant reakcijos pusiausvyrą (Goldberg et al., 2007a).

Kofaktoriaus regeneravimo problemos būtų galima išvengti biokatalizei naudojant visą ląstelę. Tuomet, pridėjus gliukozės ar kito lengvai panaudojamo energijos šaltinio, vyksta vidinė kofaktoriaus regeneracija drauge su ląstelių metabolizmu (Goldberg et al., 2007b). Be to, genų inžinerijos metodais sukuriamos patobulintos ląstelės, turinčios tikslinės redukcijos reakcijoje dalyvaujantį fermentą bei fermentą, skirtą kofaktoriaus regeneravimui. Tokios ląstelės užtikrina pakankamą redukcijos efektyvumą, biokatalizės procesas tampa paprastas, o pašalinių produktų nesusidaro (Groger et al., 2006; Ni et al., 2011; Ni ir Xu, 2012).

#### **1.2.4. Diolių biosintezė**

Pakankamai nauja ir didelio dėmesio susilaukusi pramoninės biotechnologijos kryptis – 1,3-propandiolio, 1,2-propandiolio, 2,3-butandiolio ir 1,4-butandiolio biosintezės. Šie dioliai gali būti gaminami iš įvairių atsinaujinančių išteklių ir net iš biokuro gamybos atliekų (Saxena et al., 2009; Zeng ir Sabra, 2011).

2,3-Butandiolis susidomėjimo sulaukė dėl savo unikalaus stereoizomerizmo. Jis turi tris stereoizomerų formas: *R,R*, *S,S* ir *mezo*, kurios gali būti gaunamos bakterinių fermentacijų būdais. Pirmasis komercinis 2,3-butandiolio pritaikymas buvo sintetinės gumos gamyba Antrojo pasaulinio karo metais. Gamybai naudotas 2,3-butandiolis buvo susintetintas biokatalizės būdu. Kai 1950 m. nafta tapo lengvai išgaunama ir pigi, šio diolio biosintezės

procesas buvo pakeistas į cheminį. Šiuo metu dėl patobulėjusių technologijų, ekologinių ir politinių aplinkybių 2,3-butandiolį vėl pradėta gaminti biokatalizės metodais (Zeng ir Sabra, 2011). Šis alkoholis naudojamas plastikų, spausdinimo rašalo, kvėpalų, drėkinančių ir minkštinančių agentų, plastifikatorių ir vaistų pramoninėje gamyboje (Ji et al., 2011; Wang et al., 2013).

2,3-Butandiolio sintezė iš angliavandenių yra mišrios rūgščių fermentacijos dalis įvairių mikroorganizmų augimo metu anaerobinėmis arba mikroaerobinėmis sąlygomis. Kelios *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Paenibacillus* ir *Serratia* genčių bakterijos buvo aprašytos kaip 2,3-butandiolio producentai gliukozės fermentacijos metu (Gao et al., 2012; Celinska ir Grajek, 2009; Ji et al., 2011; Qin et al., 2006; Zhang et al., 2011). Didžiausiu 2,3-butandiolio gamybos efektyvumu pasižymėjo *Klebsiella pneumoniae* ir *Klebsiella oxytoca* bakterijos. Pastarasis mikroorganizmas nepatogeninis, todėl yra potencialus kandidatas pramoninės 2,3-butandiolio gamybos pritaikymui (Yang et al., 2014).

Yang su kolegomis identifiko ir charakterizavo *Rhodococcus erythropolis* WZ010 bakterinę ląstelę kaip universalų katalizatorių, vykdančią stereoselektyvią įvairių arilketonų redukciją (Yang et al., 2012). Dabar žinoma, kad alkoholinės fermentacijos metu *R. erythropolis* WZ010 gali sintetinti optiškai gryną (2*S*,3*S*)-2,3-butandiolį. Rekombinantinė nuo NAD<sup>+</sup> priklausoma acetoino(diacetilo) reduktazė iš *R. erythropolis* WZ010 vykdo ketonų redukciją ir yra griežtai (*S*)-stereospecifinė (Wang et al., 2013).

Priklausomai nuo mikroorganizmų ir jų kultivavimo sąlygų, be 2,3-butandiolio susidaro ir kiti galutiniai produktai: etanolis, acetatas, laktatas ar sukcinatas. Biotechnologiniuose procesuose vengiama tokių šalutinių produktų, nes jie mažina tikslinio produkto gamybos išėigą, grynumą ir didina kainą. Dėl to ieškoma alternatyvių efektyvesnių producentų 2,3-butandiolio sintezei. Buvo konstruojamos *E. coli*, galinčios selektyviai sintetinti grynus 2,3-butandiolio izomerus. Visgi, gautas menkas optiškai grynų izomerų produktyvumas (Ui et al., 2004; Yu et al., 2011). Siekiant padidinti

produktyvumą kuriami nauji visos ląstelės biokatalizatoriai su papildoma  $\text{NAD}^+$  regeneravimo sistema (Xiao et al., 2010).

2,3-Butandiolio sintezė gali būti vykdoma naudojant grynus fermentus – 2,3-butandiolio dehidrogenazes, dar vadinamas acetoino (diacetilo) reduktazėmis. Šie fermentai katalizuoja acetoino redukciją iki 2,3-butandiolio. Pasitaiko ir tokių, kurie sugeba dviem etapais diacetilą redukuoti iki vicininio, du stereocentrus turinčio alkoholio – 2,3-butandiolio (Wang et al., 2013). Laukinio tipo mikroorganizmai dažniausiai gamina dviejų 2,3-butandiolio stereoizomerų mišinį (Yan et al., 2009). Alkoholio oksidacijos metu SDR tipo 2,3-butandiolio dehidrogenazės yra stereospecifinės *mezo*-2,3-butandioliui ir/arba *(2S,3S)*-2,3-butandioliui. Tuo tarpu *(2R,3R)*-2,3-butandiolio dehidrogenazės paprastai yra cinką turintys MDR fermentai (Ying ir Ma, 2011; Takeda et al., 2011).

*R. erythropolis* genties bakterijos turi didelį rinkinį oksidoreduktazių, kurios asimetriškai redukuoja prochiralinius ketonus susidarant chiraliniams alkoholiams (de Carvalho ir da Fonseca, 2005). Buvo apibūdintos dvi nuo  $\text{NADP}^+$  priklausomos SDR iš *R. erythropolis* MAK154 ir *R. erythropolis* BCRC 10909, galinčios sintetinti du chiralinius centrus turinčius aminoalkoholius (Kataoka et al., 2006; Lin et al., 2010). *R. erythropolis* DSM 43297 genome aptiktas genas, koduojantis nuo  $\text{NAD}^+$  priklausomą MDR, kuri stereospecifiškai redukuoja acetofenoną (Abokitse ir Hummel, 2003). Tuo tarpu anksčiau minėta *R. erythropolis* WZ010 acetoino(diacetilo)reduktazė, be diacetilo ir acetoino, selektyviai redukuoja etilpiruvatą, 2,2,2,-trifluoroacetofenoną, 4-bromoacetofenoną, 2-bromoacetofenoną, acetofenoną ir benzaldehidą (Wang et al., 2013).

Visgi, nepaisant plačios chiralinių alkoholių biosintezės galimybių studijos, tokių junginių paklausa išlieka didesnė už pasiūlą.

### 1.2.5. Alkoholių oksiduojantys fermentai ir jų pritaikymo galimybės kinetiniam racematų atskyrimui

Alkoholių oksidaciją katalizuojantys fermentai pagal naudojamo kofaktoriaus prigimtį yra skirstomi į keturias klases: 1) nuo pirolochinolino chinono (PQQ) priklausomus fermentus (nuo PQQ priklausomos metanolio ir etanolio dehidrogenazės, nuo PQQ priklausomos hemą turinčios ADH, membraninės ADH); 2) FAD turinčias alkoholio oksidazes; 3) nuo NAD(P)<sup>+</sup> priklausomas ADH; 4) fermentus, turinčius hemą ir kofaktorių F<sub>420</sub>. Visi šie fermentai skiriasi naudojamais kofaktoriais, aminorūgščių sekomis, struktūra ir substratiniumi specifiškumu. Vis dėlto jie visi katalizuoja reakciją, kurią galima aprašyti lygtimi:

$R-OH + A_{oks} \rightarrow R=O + HA_{red}$ , R – alifatinė arba aromatinė grupė, A – elektronų akceptoriaus oksiduota (oks) arba redukuota (red) forma.

Alkoholių oksidaciją katalizuojantys fermentai dėl savo plataus substratinio specifiškumo susilaukė didelio dėmesio enantioselektyvios alkoholių oksidacijos pramonėje (Inoue et al., 2005; Matsushita et al., 2002; Amidžojo et al., 2005). Literatūroje aprašytos chinoninės, hemą turinčios ADH išskirtos iš *Comamonas testosteroni* (Stigter et al., 1997; Geerlof et al., 1994), *Acetobacter pasteurianus* (Machado et al., 1998) ir *Ralstonia eutropha* (Zarnt et al., 2001), pasižyminčios stereoselektyvumu, kai substratais naudojami enantiomeriškai gryni alkoholiai. Chinohemobaltymai katalizuoja pirminių arba antrinių alifatinių ir ciklinių alkoholių oksidaciją. Šie baltymai geba oksiduoti mono- ir polihidroksilius junginius. Biokatalizei chinohemobaltymais gali būti naudojami įvairūs natūralūs ir dirbtiniai elektronų akceptoriai (pvz., azurinas, citochromai, fenazino metasulfatas, dichlorofenolio indofenolis, fericianidas) (Toyama et al., 1995; Jongejan et al., 2000; Matsushita et al., 2002; Tetianec et al., 2007; Laurinavicius et al., 2002). Dėl to nuo PQQ priklausomos ADH tampa patraukliais taikiniai pritaikymui pramoninėje sintezėje, biojutiklių ir katalizinių sistemų kūrimo (Šetkus et al., 2004; Adachi et al., 2003; Laurinavicius et al., 2002). Skirtingai nei nuo

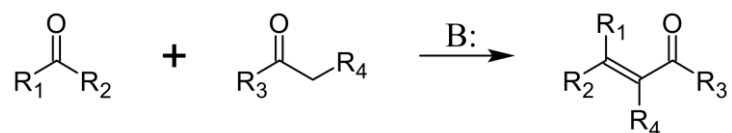


NAD(P)<sup>+</sup> priklausomoms ADH, chinobaltyminėms ADH aprūpinimas papildomais brangiais kofaktoriais nėra būtinas (Promden et al., 2008).

*Pseudomonas putida* HK5 bakterijos, auginamos terpėje su skirtingais alkoholiais, gamina tris skirtingas nuo PQQ priklausomas ADH (ADH I, ADH IIB ir ADH IIG) (Toyama et al., 1995). Kai *Pseudomonas putida* HK5 ląstelės auginamos terpėje su 1,2-propandioliu ar gliceroliu, sintetinama ADH IIG. ADH IIG gali atskirti enantiomerines antrinių alkoholių ir 1,2-cikloheksandiolio formas (Bachmatova et al., 2004; Toyama et al., 1995). D-Pseudoefedrino sintezėje aminoalkolių enantiomerų biokataliziniam atskyrimui naudojama nuo NADP<sup>+</sup> priklausoma L-1-amino-2-propanolio dehidrogenazė (Urano et al., 2011). Tuo tarpu duomenų apie nuo PQQ priklausomų ADH pritaikymą selektyviai aminoalkolių oksidacijai dar nėra.

### 1.2.6. Angliavandenių biosintezė

Paskutiniu metu smarkiai išaugo susidomėjimas nuo dihidroksiacetono fosfato (DHAP) priklausomomis aldolazėmis (Bommarius ir Riebel, 2004). Aldolinės kondensacijos metu aldehido ar ketono α-anglies atomas prisijungia prie kito aldehido ar ketono karbonilo grupės. Ši reakcija yra vadinama aldoline kondensacija, nes, kai kuriais atvejais, produktas reakcijos metu dehidratuojasi susidarant α, β-nesotiems junginiams (Clayden et al., 2000) (1.8 pav.).

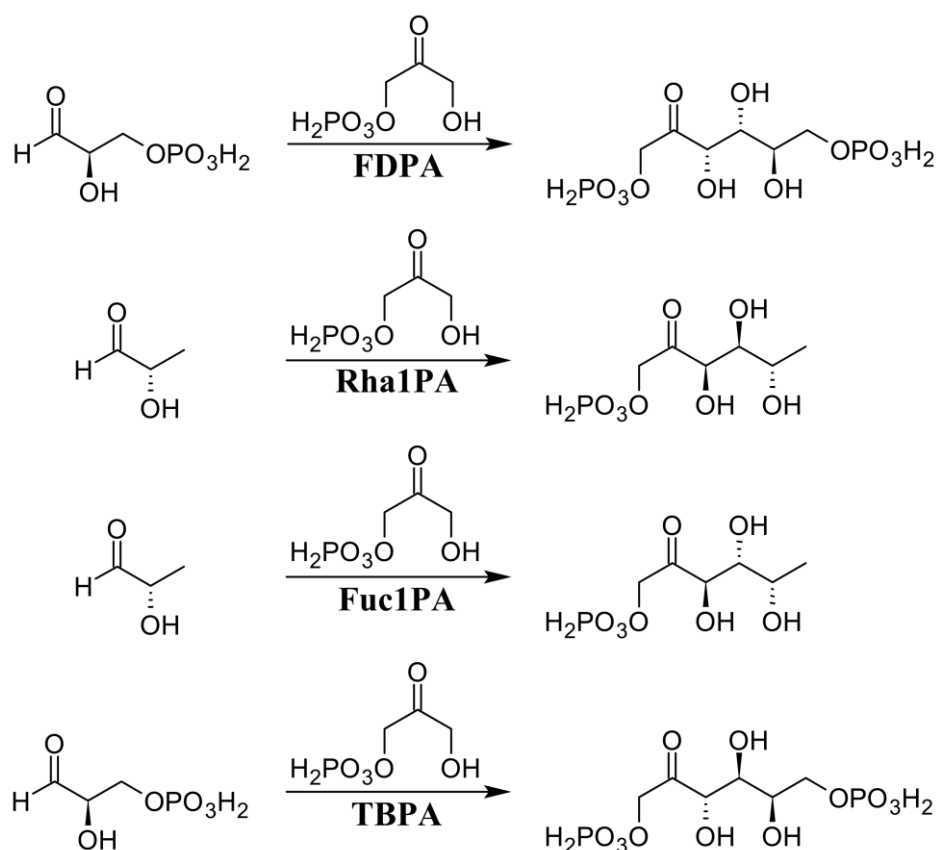


1.8 pav. Aldolinė kondensacija: aldehido ar ketono α-anglies atomas prisijungia prie kito aldehido ar ketono karbonilo grupės, susidarant α, β-nesotiems junginiams (Clayden et al., 2000).

Aldolazės – liazių grupės fermentai. Evoliucijos eigoje susiformavo dviejų tipų aldolazės. I tipo aldolazės aptinkamos žinduoliuose ir

aukštesniuose augaluose. Jų aktyvaus centro Lys šoninė grupė sudaro Šifo bazę su DHAP karbonilo grupe ir, susidaręs iminas, tautomerizuoja į enaminą, kuris, savo ruožtu, stereoselektyviai jungiasi prie akceptoriaus (aldehido arba ketono). Prokariotams ir žemesniesiems eukariotams būdingos II tipo aldolazės, kurios tą pačią reakciją vykdo dalyvaujant cinko jonams (Bommarius ir Riebel, 2004; Sheldon et al., 2007).

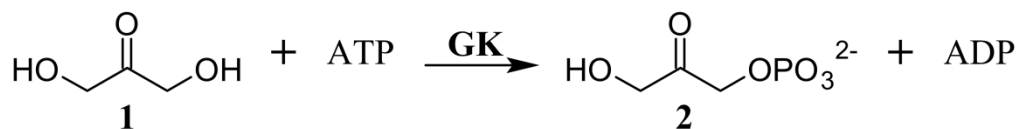
Nuo DHAP priklausomų aldolazių katalizuojamose reakcijose gaunami produktai turi po du naujus stereocentrus (1.9 pav.). Taigi, gali būti gaunami keturi skirtingi stereoisomerai. Vis dėlto yra stereoselektyvių aldolazių, katalizuojančių vieno iš stereoisomerų susidarymą. Ramnulozės 1-fosfato aldolazė, L-fukuliozės 1-fosfato aldolazė, tagatozės 1,6-bisfosfato aldolazė ir fruktozės 1,6-bisfosfato aldolazė katalizuoja kondensacijos reakcijas, kurių



1.9 pav. Keturių skirtingų stereoisomerų sintezė, katalizuojant nuo DHAP priklausomoms aldolazėms. FDPA - fruktozės 1,6-bisfosfato aldolazė, Rha1PA - ramnulozės 1-fosfato aldolazė, Fuc1PA - L-fukuliozės 1-fosfato aldolazė, TBPA - tagatozės 1,6-bisfosfato aldolazė (Silvestri et al., 2003).

metu gaunami skirtingų konfigūracijų angliavandeniai (Silvestri et al., 2003) (1.9 pav.).

Didelis nuo DHAP priklausomų aldolazių trūkumas yra tas, kad DHAP negali būti pakeistas dihidroksiacetonu. DHAP yra brangus substratas. Šis junginys tapo svarbiu substratu fermentinėje angliavandenių sintezėje ir todėl didelis dėmesys skiriamas aukštos kokybės DHAP gavimui biokatalizės metodais (Sheldon et al., 2007). 1.10 paveiksle parodyta *Klebsiella pneumoniae* aprašyta reakcija, kur tikslinis produktas tiesiogiai gaunamas iš dihidroksiacetono, veikiant glicerolio kinazei (Chevalier et al., 1990) (1.10 pav.).



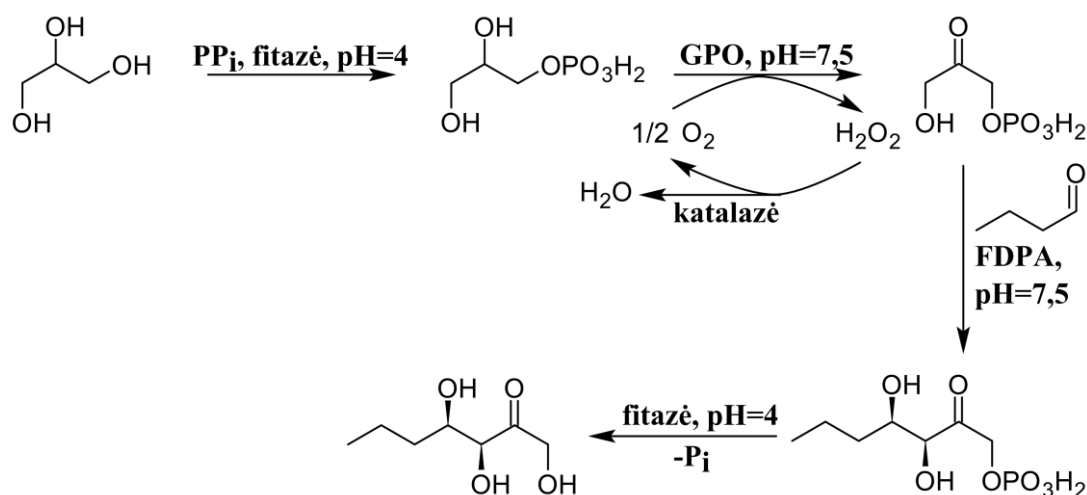
1.10 pav. Tiesioginis dihidroksiacetono fosfato (2) gavimas iš dihidroksiacetono (1) *Klebsiella pneumoniae* bakterijose (Chevalier et al., 1990).

Iš *Aerococcus* (Mackova et al., 2000), *Streptococcus* (Claiborne, 1986; Esders ir Michrina, 1979) ir *Enterococcus* (Parsonage et al., 1998) bakterijų buvo išgrynintas nuo FAD priklausomas fermentas – L- $\alpha$ -glicerofosfato oksidazė (GPO), kuri katalizuoja L- $\alpha$ -glicerofosfato (GP) konversiją į DHAP ir vandenilio peroksidą (Fessner ir Sinerius, 1994; Krämer ir Steckhan, 1997) (1.11 pav.). Susidaręs vandenilio peroksidas slopina GPO. Apskritai, šio šalutinio produkto pašalinimas tampa pagrindine priežastimi, dėl kurios stringa efektyvus įvairių oksidazių pritaikymas biokatalizėje (Schumperli et al., 2007).



1.11 pav. DHAP biosintezė iš GP katalizuojant GPO (Fessner ir Sinerius, 1994).

Eksperimentiškai buvo parodyta (1.12 pav.), kad derinant keturių fermentų sistemą – glicerolio fosforilinimą ir oksidaciją, susidarant DHAP, bei aldolinę kondensaciją ir defosforilinimą, viename reaktoriuje iš pigios žaliavos – glicerolio – galima sintetinti didesnės pridėtinės vertės ir plataus panaudojimo angliavandenius.



1.12 pav. Glicerolio konversija į angliavandenius, naudojant suderintą keturių fermentų sistemą. FDPA – fruktozės 1,6-bisfosfato aldolazė (Sheldon et al., 2007).

GP oksidacijos metu susidaręs vandenilio peroksidas pašalinamas naudojant katalazę (Sheldon et al., 2007).

### 1.3. Regioselektyvus aromatinio žiedo hidroksilinimas

Hidroksilinimas yra deguonies pernašos reakcija, kai organinėse molekulėse vandenilio atomai pakeičiami hidroksigrupėmis (Nelson et al., 2013). Hidroksilinti aromatiniai junginiai yra vaistų sintonai. Jie yra svarbūs tarpininkai maisto ir parfumerijos kvapų, žemės ūkio chemikalų ir polimerų sintezėje (Ma et al., 2013). Būtent dėl to per pastaruosius dešimt metų didelio pramonininkų ir mokslininkų dėmesio susilaukė selektyvus aromatinių junginių hidroksilinimas, kuris vis dar lieka iššūkiu organinėje sintezėje (Ullrich ir Hofrichter, 2007).

### 1.3.1. Selektyvus benzeno, tolueno ir ksileno hidroksilinimas naudojant monooksigenazes/reduktazes

Benzeno, tolueno ir ksileno oksidacijai naudojami vandenilio peroksidas ir metalų katalizatoriai (pvz., vanadis, paladis,  $\text{TiO}_2$ ), tačiau reakcijų selektyvumas išlieka ribotas (Lücke et al., 2004; Tani et al., 2005). Ciklinių alkanų ir alkenų tiesioginės oksigenazinės reakcijos vyksta superkritiniame anglies dioksido. Tuo tarpu aromatiniams junginiams ta pati sintezės schema netinka (Campestrini ir Tonellato, 2005).

Biokatalizinė deguonies pernaša panaudojant grynus fermentus ar visas bakterines ląsteles yra efektyvus būdas regioselektyviam hidroksilinimui. Biotransformacijomis, apimančiomis hidroksilinimo reakcijas, pirmą kartą susidomėta 1952 m. po sėkmingos mikrobinės steroidų transformacijos naudojant *Rhizopus arrhizus* grybą. Šis mikroorganizmas vykdo steroidų, pvz., progesterono, konversiją į atitinkamus 11- $\alpha$ -hidroksilo darinius (Peterson et al., 1952). Vėliau naudojant žymėtą  $^{18}\text{O}_2$  buvo parodyta, kad biokatalizės metu į aromatinis junginius iš deguonies molekulės įjungiami vienas arba abu deguonies atomai. Tokias reakcijas katalizuojatys fermentai pavadinti oksigenazėmis. Paaiškėjo, kad jie dalyvauja visų gyvų sistemų (nuo archėjų ir bakterijų iki žinduolių) metabolizme (Estabrook, 2003). Pagal tai, kiek deguonies atomų – vienas ar du – įjungiami į substratą, fermentai skirstomi į mono- ir dioksigenazes (Holland, 1998).

Šiuo metu žinomos tik tolueno/benzeno monooksigenazės, vykdančios aromatinių junginių hidroksilinimą iki katecholio (Ma et al., 2013). Pavyzdžiui, tolueno *orto*-monooksigenazė iš *Burkholderia cepacia* G4 oksiduoja tolueną ir benzeną susidarant atitinkamiems katecholiams (Newman ir Wackett, 1995). Tolueno/*o*-ksileno monooksigenazė iš *Pseudomonas stutzeri* OX1 gali oksiduoti tolueną ir *o*-ksileno atitinkamai iki metilkatecholio ir 3,4-dimetilkatecholio, bet benzeną oksiduoja tik iki fenolio (Bertoni et al., 1996). Tolueno/benzeno 2-monooksigenazė iš *Burkholderia* sp. JS150 transformuoja

toluena susidarant 3-metilkatecholiui dviejų nuoseklių monooksigenazinių reakcijų metu (Johnson ir Olsen, 1997).

Antra vertus, informacijos apie regioselektyvų benzeno ir tolueno hidroksilinimą iki katecholių bei tokio tipo reakcijas katalizuojančias fenolio hidroksilazes yra mažai. Vienas iš sėkmingų fenolio hidroksilazės pavyzdžių yra šešiakomponentė nuo flavino priklausoma monooksigenazė, išskirta iš *P. stutzeri* OX1 bakterijų (Cafaro et al., 2005). Neseniai aprašyta katecholio darinių biosintezė iš nehidroksilintų aromatinių angliavandenilių, kai transformaciją katalizuoja fermentas – fenolio hidroksilazė iš *Arthrobacter* sp. W1 (Ma et al., 2013).

### 1.3.2. Regioselektyvus piridino ir jo darinių hidroksilinimas

Heterociklinį atomą turintys organiniai junginiai sudaro apie 2/3 visų žinomų organinių junginių. Vienas svarbiausių, plačiai gamtoje paplitusių aromatinių heterociklų yra piridinas (Kaiser et al., 1996). Piridinas toksiškas žmonėms ir gamtoje laikomas teršalu. Dėl šios priežasties nemažai dėmesio skiriama jo biodegradacijos tyrimams. Yra duomenų apie išskirtas *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Gordonia*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Nocardiodes*, *Paracoccus*, *Pimelobacter*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Shinella*, ir *Streptomyces* genčių bakterijas, kurios geba skaidyti piridiną (Sun et al., 2011; Sun et al., 2014). Šiuo metu žinomos dvi pagrindinės bakterinio piridino skaidymo strategijos: redukcinis kelias be pradinio hidroksilinimo (Watson ir Cain, 1975) ir hidroksilinimo reakcija, lydima aromatinio žiedo redukcijos (Mudliar et al., 2008). Daugelis iš anksčiau minėtų piridiną skaidančių bakterijų naudoja pirmą strategiją. Aprašyti vos trys bakteriniai kamieniai, kurie piridino metabolizmą pradeda žiedo hidroksilinimu. Du iš jų yra *Rhodococcus* genties atstovai, piridiną hidroksilinantys, atitinkamai, susidarant 2-hidroksipiridinui ir 2,3-dihidroksipiridinui (Zefirov et al., 1994; Sun et al., 2011). Tuo tarpu *Arthrobacter* genties bakterijos piridino skaidymą pradeda hidroksilinimu į 3-

čią padėtį (Khasaeva et al., 2011). Tokias hidroksilinimo reakcijas katalizuojantys fermentai yra svarbūs biotechnologiniu požiūriu, nes jie galėtų būti pritaikomi regioselektyviai piridino darinių biosintezei. Vis dėlto šios hidroksilazės iki šiol neišskirtos.

Sun su kolegomis pademonstravo, kad iš dešimties fenolį skaidančių bakterijų rūšių penkios (*Diaphorobacter*, *Acidovorax*, *Acinetobacter* (du bakteriniai kamienai) ir *Corynebacterium*) galėjo transformuoti ir piridiną. Nustatyta, kad šiose bakterijose tiek fenolis, tiek piridinas indukuoja fenolio hidroksilazės genus. HPLC-MS analizė parodė, kad visais atvejais iš piridino susidarė metabolitas ( $m/z=96,07$ ), kurio molekulinė masė identiška monohidroksilintam piridinui (Sun et al., 2014). Nėgana to, literatūroje aprašyta daug mikroorganizmų, įskaitant *Arthrobacter*, *Achromobacter*, *Agrobacterium* ir *Nocardia* genčių atstovus, kurie negali metabolizuoti piridino, tačiau lengvai skaido hidroksipiridiną (O'Loughlin et al., 1999; Houghton ir Cain, 1972; Shukla ir Kaul, 1986).

Apibendrinant galima teigti, kad piridino ir jo darinių hidroksilinimo reakcijos yra gerokai dažnesnės nei anksčiau manyta. Vis dėlto stinga efektyvių biokatalizatorių, kuriuos būtų galima pritaikyti regioselektyviai piridinolių biosintezei.

Apibendrinus literatūros duomenis, akivaizdu, kad chiralinių alkoholių paklausa farmacijos, maisto, žemės ūkio ir chemijos pramonėje viršija pasiūlą. Stinga biokatalizatorių optiškai grynų polihidroksilių darinių sintezei. Nėra mikroorganizmų ar fermentų, tinkamų regioselektyviam *N*-heterociklinių junginių hidroksilinimui. Aprašyti tikslinių junginių biosintezės metodai yra per mažo efektyvumo, kad būtų pritaikomi pramoninėje biokatalizėje. Dėl išvardintų priežasčių šiame darbe buvo tiriami polihidroksilių darinių sintezės keliai biokatalizatoriais naudojant grynus fermentus ar visas ląsteles.

## 2. MEDŽIAGOS IR TYRIMO METODAI

### 2.1. Medžiagos

#### 2.1.1. Reagentai

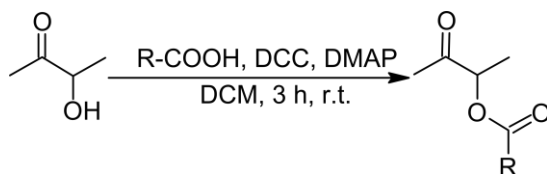
Reagentai	Gamintojas
5-Bromo-4-chloroindolil- $\beta$ -D-galaktopiranozidas, izopropil- $\beta$ -D-galaktopiranozidas (IPTG), restrikcijos endonukleazės ir jų buferiniai tirpalai, T4 DNR ligazė, <i>Gene Ruler DNA Ladder Mix</i> ir <i>Mass Ruler High Range DNA Ladder</i> DNR molekulinės masės žymenys, <i>Unstained Protein Molecular Weight Marker</i> baltymų molekulinės masės žymenys, <i>Maxima Hot Start Green PCR Master Mix</i>	Thermo Fisher Scientific, Lietuva
<i>ZYMO Plasmid PREP</i> plazmidinės DNR skyrimo rinkinys	Zymo Research Corp., JAV
PGR pradmenys	Metabion, Vokietija
Mielių ekstraktas, NA ( <i>nutrient agar</i> ) terpė, NB ( <i>nutrient broth</i> ) terpė, BHI ( <i>brain-heart infusion broth</i> ) terpė, triptonas	Oxoid, Anglija
Krienuų peroksidazė, acetoinas, ampicilinas, gliukozė, glicerolis, NaOH, KOH, kalio acetatas, natrio acetatas, amonio acetatas, $\beta$ -merkaptoetanolis, 1,2-propandiolis, ( <i>R</i> )-1-amino-2-propanolis, Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , ( <i>S</i> )-1-amino-2-propanolis, piruvo rūgštis, imidazolas, metilaminas, sferinis silikagelis (dalelių dydis 0,035–0,045 mm, poros skersmuo 260–340 Å)	Fluka, Vokietija
NADP <sup>+</sup> , NADH, NADPH, glutaro aldehidas, $\alpha$ -naftolis, <i>o</i> -dianizidinas	Reanal, Vengrija
<i>N</i> -propil-2-piridonas, <i>N</i> -butil-2-piridonas, butan-3-ono-2-il-valeratas, butan-3-ono-2-il-izovaleratas, butan-3-ono-2-il-heksanoatas, butan-3-ono-2-il-heptanoatas, butan-3-ono-2-il-nikotinas, butan-3-ono-2-il-izonikotinas, butan-3-ono-2-il-pikolinas	dr. Daiva Tauraitė ir Rytis Ražanas, Lietuva
<i>o</i> -hidroksianilinas, <i>m</i> -hidroksianilinas, <i>p</i> -hidroksianilinas, 2-amino-3 <i>H</i> -dipirido[3,2-b:2',3'-e][1,4]oksazino-3-onas, 2-metilpiridino- <i>N</i> -oksidai, 3-metilpiridino- <i>N</i> -oksidai, 4-metilpiridino- <i>N</i> -oksidai	dr. Jonas Šarlauskas, Lietuva



<p>Plonasluoksnēs chromatografijas plokštelēs, natrio dodecilsulfatas (NDS), 2-hidroksipiridinas, 2-aminopiridinas, 2-pikolinas, 2-chloropiridinas, 2-karboksipiridinas, 2-hidroksimetilpiridinas, 2-etilpiridinas, 2-merkaptopiridinas, <i>N</i>-metil-2-piridonas, 2-hidroksipiridino-<i>N</i>-oksidas, piridino-<i>N</i>-oksidas, 3-hidroksipiridinas, 3-bromo-2-hidroksipiridinas, 3-metil-2-hidroksipiridinas, 2-hidroksinikotino rūgštis, 3-metoksipiridonas, 2,3-dihidroksipiridinas, 2-amino-3-metilpiridinas, 2-ciano-3-metilpiridinas, 2,3-lutidinas, 2-amino-3-hidroksipiridinas, 2-amino-3-cianopiridinas, 2,3-diaminopiridinas, 2-amino-3-nitropiridinas, 2-hidroksi-4-metil-3-nitropiridinas, 2,4-dihidroksipiridinas, 2,6-dihidroksipiridinas, 2-hidroksi-6-metilpiridinas, 2-hidroksipirimidinas, 2-amino-4-metilpiridinas, 2-amino-4,6-dimetilpiridinas, 6-amino-3-metilpiridinas, piridinas, 3-pikolinas, 4-pikolinas, 2,4-lutidinas, 2,5-lutidinas, 2,6-lutidinas, 3,4-lutidinas, 3,5-lutidinas, 2,3,5-kolidinas, simetrinis kolidinas, 2-piranonas, citrazino rūgštis, anilinas, 6-hidroksipikolino rūgštis, 5-hidroksipikolino rūgštis, 3-ciano-6-metil-2-hidroksipiridinas, 2,6-diaminopiridinas, pirazinas, acetilpirazinas, 2,3-dimetilpirazinas, 2,5-dimetilpirazinas, 2,6-dimetilpirazinas, 2,3,5-trimetilpirazinas, aminopirazinas, tetrametilpirazinas, 2-pikolino-<i>N</i>-oksidas, 2-hidroksietilpiridinas, 2-amino-3-piridinokarbonitrilas, 3-metilpiridazinas, 3-hidroksi-2-metilpiridinas, 4-metil-2-piridinokarbonitrilas, piridino-2,6-dikarbonitrilas, 4-etilpiridinas, 2,3-ciklopentenopiridinas, 5-metil-6,7-dihidrociklopentanopirazinas, 2,4-diaminopirimidinas, 5-hidroksi-2-metilpiridinas, 6-hidroksipikolino rūgštis, 3-hidroksipikolino rūgštis, etilpiridonas, nikotinamidas, 4-nitro-(4-benzil)piridinas, 2-pikolino-<i>N</i>-oksidas, piridino-4-karboksirūgštis, 3-cianopiridinas, piridino-2,3-dikarboksirūgštis, 4-hidroksipiridinas, 3-fluoropiridin-2-olis, 3-chloropiridin-2-olis, 6-chloro-2-hidroksipiridinas, 6-bromopiridin-2-olis, 2-hidroksi-6-metilpiridinas, 2-amino-6-hidroksipiridinas, 4-chloro-2-hidroksipiridinas, 4-ciano-2(1H)-piridinonas, 4,6-dimetil-2-hidroksipiridinas, 3-amino-2-hidroksi-6-metilpiridinas, 2-hidroksi-3-trifluorometilpiridinas, 2-hidroksi-4-trifluorometilpiridinas, 2-hidroksi-6-trifluorometilpiridinas, 2-amino-4-chloropiridinas, 2-amino-6-bromopiridinas, 2-amino-6-chloropiridinas, 2-amino-3-bromopiridinas, 6-fluoropiridino-2-aminas, 2-aminopiridino-4-olis, 2-amino-3-chloropiridinas, 2-amino-4-fluoropiridinas, 2-amino-3,6-dibromopiridinas,</p>	<p>Sigma-Aldrich, Vokietija, ir Combi Blocks Inc., JAV</p>
---	--

2-amino-3-metoksipiridinas, 2-amino-6-metoksipiridinas, 2-amino-6-trifluorometilpiridinas, etil-2-aminonikotinas, 2-aminopirimidin-4-olis, 2-amino-4-chloropirimidinas, 2-amino-4-bromopiridinas, 4-bromo-2-hidroksipiridinas, 2-amino-3-fluoropiridinas, 3-bromo-6-metilpiridin-2-olis, alginio rūgštis, (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> )-2,3-butandiolis, (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> )-2,3-butandiolis, <i>mezo</i> -2,3-butandiolis, diacetilai, 2,3-pentandionas, 2,3-heksandionas, 2,3-heptandionas, 3,4-heksandionas, DL- $\alpha$ -glicerofosfatas, kreatinas, 3-aminopropiltrioksosilanas, ( $\pm$ )-3-amino-1,2-propandiolis, 2-amino-1,3-propandiolis, <i>rac</i> -serinas, ( <i>R</i> )-serinas, <i>rac</i> -treoninas, ( <i>R</i> )-treoninas, ( <i>S</i> )-treoninas, glicinas, MES, 2-pentanonas, 3-metil-1,2-ciklopentandionas, 2-oksoglutaro rūgštis, 3-merkaptio-2-butanonas, 3-bromo-2-butanonas, 3-hidroksi-3-metil-2-butanonas, butan-3-ono-2-il-butanoatas, glicerolio-3-fosfato dehidrogenazė iš triušio raumenų, jaučio serumo albuminas	
Anglies pluošto drobė C-BX 200	Toray Ind., Jungtinė Karalystė
NaCl, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , MgSO <sub>4</sub> , CaCl <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , MnSO <sub>4</sub> , FeSO <sub>4</sub> , HCl, K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ], FeCl <sub>3</sub> , MnO <sub>2</sub> , CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O, citrinos rūgštis, gintaro rūgštis	Reachim, Rusija ir Lachema, Čekija
Acto rūgštis	Chempur, Lenkija
Etanolis	Vilniaus degtinė, Lietuva
Agarozė, etidžio bromidas	Serva, Vokietija
Akrilamidas, etilendiaminotetraacto rūgštis (EDTA), fenolio-chloroformo mišinys	Roth, Vokietija
Kanamicinas, tris(hidroksimetil)aminometanas (Tris)	AppliChem, Vokietija
Agaras, dimetilformamidas, dimetilsulsoksidas (DMSO), metanolis, acetonitrilas ir skruzdžių rūgštis	Merck, Vokietija

Keli šiame darbe naudoti ketoesteriai (3-oksobutan-2-il alkanooatai) susintetinti katalizatoriais naudojant *N,N*-dicikloheksilkarbodiimidą ir 4-dimetilaminopiridiną pagal 2.1 paveiksle pateiktą schemą.



2.1 pav. Ketoesterių sintezės schema. R:  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{C}_2\text{H}_5$ ,  $-i\text{-C}_3\text{H}_7$ ,  $-\text{C}_4\text{H}_9$ ,  $-i\text{-C}_4\text{H}_9$ ,  $-\text{C}_5\text{H}_{11}$ ,  $-\text{C}_6\text{H}_{13}$ ,  $-\text{C}_7\text{H}_{14}\text{-CH=CH-C}_8\text{H}_{16}$ ,  $-o\text{C}_5\text{H}_4\text{N}$ ,  $-m\text{C}_5\text{H}_4\text{N}$ ,  $-p\text{C}_5\text{H}_4\text{N}$ . DCC – *N,N*-dicikloheksilkarbodiimidas, DMAP – 4-dimetilaminopiridinas, DCM – dichlormetanas.

Susintetinti junginiai buvo gryninami naudojant silikagelio kolonėlę, kai eliuentas heksano/chloroformo mišinys. Junginių struktūros nustatytos ir grynumas įvertintas naudojant HPLC-MS ir BMR spektroskopiją.

### 2.1.2. Bakterijos

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  [ $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ (lacZY-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17( $r_K^-m_K^+$ ) sup E44 thi-1 gyrA96 relA1] – Pharmacia, Švedija;

*Escherichia coli* BL21 (DE3) [ $F^-$  ompT gal hsdS $_B$  ( $r_B^-m_B^-$ ) dcm lon (DE3)] – Avidis, Prancūzija;

*Burkholderia* sp. MAK1 bakterinis kamienas išskirtas Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriuje (Vilniaus universiteto Biochemijos institutas) pagal gebėjimą panaudoti 2-hidroksipiridiną kaip vienintelį anglies ir energijos šaltinį (Gasparavičiūtė, 2008).

### 2.1.3. Plazmidės

pTZ57R/T – Ap $^f$ , oriColE1, lacZ $\alpha$ , PGR produktų klonavimui (Thermo Fisher Scientific, Lietuva).

pET-28b(+) – Km<sup>r</sup>, T7 promotorius, poli-His seka baltymo C-gale (Novagen, Vokietija).

pTpdE – į pET-21b(+) (Novagen, Vokietija) vektorių klonuotas *tpdE* genas.

pET-R19T – į pET-28b(+) (Novagen, Vokietija) vektorių klonuotas TpdE taškinį R19T mutantą koduojantis genas.

pGPO – į pET-21d(+) (Novagen, Vokietija) vektorių klonuotas *gpo* genas.

#### 2.1.4. Terpės

**EFA terpė:** K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 10 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 4 g/l, mielių ekstraktas – 0,5 g/l, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 1 g/l, MgSO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O – 0,2 g/l, agaras – 15 g/l, druskų tirpalas, pH 7,2 – 10 ml/l.

**Druskų tirpalas:** CaCl<sub>2</sub> × 2 H<sub>2</sub>O – 2 g/l, MnSO<sub>4</sub> × 4 H<sub>2</sub>O – 1 g/l, FeSO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O – 0,5 g/l. Druskos buvo tirpinamos 0,1 N HCl ir autoklavuojamos, po to įdedamos į sterilią EFA terpę.

**Nutrient broth (NB), nutrient agar (NA) ir brain-heart infusion (BHI)** terpės paruoštos pagal gamintojo (Oxoid, Anglija) nurodymus.

**Luria Bertani terpė:** triptono – 10 g/l, mielių ekstrakto – 5 g/l, NaCl – 3 g/l, MgSO<sub>4</sub> – 1 g/l.

**MAK1 terpė (*Burkholderia* sp. MAK1 auginimui):** triptono – 10 g/l, mielių ekstrakto – 5 g/l, MgSO<sub>4</sub> – 1 g/l.

Visos terpės autoklavuojamos 20 min 1 atm slėgyje 121 °C temperatūroje.

## 2.2. Tyrimo metodai

### 2.2.1. Bakterijų auginimo sąlygos

*E. coli* ant agarizuotos NA terpės auginamos 37 °C. Skystose BHI, NB ar LB terpėse jos auginamos 30 °C temperatūroje aeruojant (180 aps./min). Priklausomai nuo naudojamo vektoriaus transformuotų *E. coli* bakterijų atrankai naudojamas ampicilinas (50 µg/ml) arba kanamicinas (40 µg/ml).

*Burkholderia* sp. MAK1 ant agarizuotos EFA terpės su 0,2 % 2-hidroksipiridino auginamos 30 °C temperatūros termostate. *Burkholderia* sp. MAK1 ląstelės biokonversijoms užsėjamos iš naktinės kultūros ir auginamos parą 1 l MAK1 terpės (kolbose po 200 ml) su 0,2 % 2-hidroksipiridino. Šių bakterijų naktinė kultūra – ląstelės, užaugintos 25 ml MAK1 terpės su 0,2 % 2-hidroksipiridino per naktį. Užaugintos ląstelės surenkamos centrifuguojant (30 min 4000 g), tris kartus plaunamos 10 mM kalio fosfato buferiniu tirpalu, pH 7,2, ir suspenduojamos 300 ml to paties buferinio tirpalo. Taip gauta *Burkholderia* sp. MAK1 ląstelių suspensija naudojama biokonversijoms.

### 2.2.2. Plazmidinės DNR skyrimas

Plazmidinė DNR iš *E. coli* bakterijų skiriama naudojant ZR Plasmid Miniprep<sup>TM</sup> (Zymo Research) arba GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific) rinkinius pagal gamintojų pateiktas rekomendacijas.

Skiriant didesnius plazmidinės DNR kiekius taikytas šarminės denatūracijos metodas pagal Sambrook ir Russell (Sambrook ir Russell, 2001).

### 2.2.3. DNR dauginimas *in vitro*

Klonavimui skirti DNR fragmentai padauginami atliekant polimerazinę grandininę reakciją (Saiki et al., 1988). Fragmentų padauginimui naudotas

Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2x) rinkinys (Thermo Scientific) ir specifiniai pradmenys (Metabion). Matrica – pTpdE plazmidinė DNR.

#### **2.2.4. DNR manipuliacijos**

DNR hidrolizė restrikcijos endonukleazėmis bei fragmentų ligavimas T4 DNR ligaze atliekami remiantis gamintojo rekomendacijomis. *E. coli* transformantų atranka bei elektroforezė agarozės gelyje atliekami remiantis standartinėmis Sambrook ir Russell metodikomis (Sambrook ir Russell, 2001).

DNR koncentracija nustatyta atliekant elektroforezę agarozės gelyje, naudojant Mass Ruler<sup>TM</sup> DNA Ladder (High Range) DNR kiekio žymenį.

#### **2.2.5. Kompetentinių ląstelių paruošimas ir elektroporacija**

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  ląstelės užsėjamos į 5 ml BHI terpės ir auginama per naktį (15–16 val.) 30°C temperatūroje aeruojant. 1 ml naktinės kultūros užsėjamas į 200 ml BHI terpės. Auginama aeruojant 30°C temperatūroje, kol optinis tankis ( $A_{600}$ ) pasiekia 0,5–0,9. Tuomet ląstelės atvėsina laikant 15 min ledo vonioje. Paskui centrifuguojama 10 min 3000 g šaldant, supernatantas pašalinamas. Ląstelės du kartus plaunamos 40 ml šalto 10 % glicerolio tirpalo. Ląstelės resuspenduojamos, surenkamos centrifuguojant anksčiau minėtomis sąlygomis. Galiausiai ląstelės suspenduojamos 1 ml šalto 10 % glicerolio tirpalo.

Elektroporacijai naudojamos kiuvetės atšaldomos ledo vonioje. Į 100  $\mu$ l elektrokompetentinių ląstelių įdedama ~1  $\mu$ g DNR ir suspensija su DNR perkeliama į atšaldytą kiuvetę. Ši įdedama į elektroporacijos aparatą, kuriame nustatoma 2,0 kV/cm<sup>2</sup> įtampa. Elektros impulso trukmė 4–5 ms. Po elektroporacijos ant ląstelių nedelsiant užpilama 900  $\mu$ l BHI terpės, suspensija perkeliama į mėgintuvėlį. Ląstelės inkubuojamos 30 min 37 °C temperatūroje, paskui išsėjamos ant NA terpės su atitinkamu antibiotiku.

## **2.2.6. Fermentų biosintezė**

### **2.2.6.1. Rekombinantinės GPO iš *Enterococcus sp. RL1* biosintezė**

*E. coli* BL21 (DE3)/pGPO bakterijos auginamos 25 ml NB, LB arba BHI terpės (į kurią papildomai įdėta 50 µg/ml ampicilino) 30 °C temperatūroje aeruojant. Bakterijų kiekis skystoje terpėje nustatomas spektrofotometriškai, matuojant optinį tankį esant 600 nm bangos ilgiui. Sterili terpė naudojama kaip kontrolė. GPO sintezė indukuojama, kai optinis tankis 0,6–1,6. Induktoriaus IPTG koncentracija 0,05–0,5 mM IPTG. Po indukcijos auginama 4, 6, 18 ir 24 val. Kultūra buvo surenkama centrifuguojant (10 min 4000 g).

### **2.2.6.2. Rekombinantinio baltymo *TpdE* iš *Rhodococcus jostii* *TMP1* biosintezės sąlygų optimizavimas**

*E. coli* pTpdE transformantai atrinkti pagal atsparumą ampicilinui. *E. coli* BL21 (DE3)/pTpdE bakterijos auginamos 25 ml NB arba BHI terpės, į kurią papildomai įdėta 50 µg/ml ampicilino 30 °C temperatūroje aeruojant. Bakterijų kiekis skystoje terpėje nustatomas spektrofotometriškai, matuojant optinį tankį esant 600 nm bangos ilgiui. Sterili terpė naudojama kaip kontrolė. TpdE sintezė indukuojama 0,05–0,5 mM IPTG, kai optinis tankis 0,6, 0,8, 1,0, 1,2, 1,4 ir 1,6. Po indukcijos auginama 4, 6, 17 ir 19 val. Biomasė surenkama centrifuguojant (10 min 4000 g). Nusodintos ląstelės resuspenduojamos 3 ml 50 mM kalio fosfato buferio, pH 7,2 su 0,1 M NaCl, ir suardomos ultragarsu, aušinant ledo-vandens vonioje. Baltymų pavyzdžiai analizuojami elektroforezės būdu NDS-poliakrilamidiniame gelyje.

## **2.2.7. Fermentų gryninimas ir tyrimas**

### **2.2.7.1. GPO gryninimas**

Prieš gryninimo procedūrą ląstelių nuolaužos pašalinamos centrifuguojant (5 min 10000 g). Beląstelinis ekstraktas gryninamas giminingumo chromatografijos būdu Ni<sup>2+</sup>-IMAC HP kolonėlėje (5 ml). Naudojami du buferiniai tirpalai: prijungimo buferinis tirpalas, sudarytas iš 50 mM kalio fosfato, pH 7,2, ir 0,1 M NaCl, bei elucijos buferinis tirpalas, kuris paruošiamas į prijungimo buferinį tirpalą pridėjus 0,5 M imidazolo. Ni<sup>2+</sup>-IMAC HP kolonėlė iš anksto paruošiama ją plaunant prijungimo buferiniu tirpalu. Visi neprisijungę baltymai išplaunami tuo pačiu buferiniu tirpalu, o frakcijos su baltymais, turinčiais 6 histidinių inkarą, surenkamos taikant gradientinę eluciją: prijungimo buferinis tirpalas pakeičiamas elucijos buferiniu tirpalu per 5 kolonėlės tūrius. GPO frakcijose aptinkamas pagal sugertį, kai  $\lambda=430$  nm, ir matuojant GPO fermentinį aktyvumą. Baltymo grynumas įvertinamas elektroforeziškai. Frakcijos su GPO sujungiamos ir dializuojamos per naktį 50 mM kalio fosfato, pH 7,2, buferiniame tirpale arba nudruskinamos naudojant HiTrap Desalting kolonėlę, sukonzentruojamos ir laikomos -20 °C temperatūroje.

### **2.2.7.2. GPO aktyvumo matavimas**

GPO aktyvumas matuojamas pagal susidariusį vandenilio peroksidą. Reakcijos mišinys sudarytas iš 50 mM kalio fosfato buferinio tirpalo, pH 7,2, 0,3 mM *o*-dianizidino, 5 U krienų peroksidazės, 25 mM L- $\alpha$ -glicerofosfato (GP) ir atitinkamo GPO kiekio. Bendras reakcijos mišinio tūris – 1 ml. Reakcija pradedama pridėdant GPO ir spektrofotometriškai matuojamas sugerties intensyvumo didėjimas, kai  $\lambda=430$  nm. Vienas GPO aktyvumo vienetas – tai fermento kiekis, kuris katalizuoja 1  $\mu$ mol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> susidarymą 30 °C temperatūroje per vieną minutę.



### **2.2.7.3. GPO termostabilumo nustatymas**

GPO pavyzdžiai 5 min inkubuoti esant skirtingai temperatūrai, nuo 20 iki 60 °C. Likęs aktyvumas matuotas 2.2.7.2. skyriuje aprašytu būdu, kai temperatūra buvo 30 °C. Nepriklausomi matavimai atlikti tris kartus mažiausiai po tris pakartojimus.

### **2.2.7.4. Išgrynintos rekombinantinės GPO laikymo stabilumo tyrimas**

Rekombinantinė GPO laikoma 4 °C ir –20 °C temperatūroje. Periodiškai matuojamas fermento aktyvumas 30 °C temperatūroje, kaip aprašyta 2.2.7.2. skyriuje. 100 % – pradinis fermento aktyvumas prieš laikymą 4 °C ar –20 °C.

### **2.2.7.5. GPO reaktorių konstravimas**

Anglies pluošto (AP) drobė panardinama į nejoninį detergentą ir veikiama ultragarsu 10 min. Tada ji patalpinama į plastikinius marškinėlius su vario viela – sukuriamas elektrodas, kurio darbinis plotas 20 cm<sup>2</sup>. 50 mM K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] ir 50 mM FeCl<sub>3</sub> druskų mišinys ištirpinamas 100 mM HCl. Į jį panardinamas AP elektrodas ir inkubuojamas 10 min kambario temperatūroje. Ant elektrodo paviršiaus tiesiogiai nusėda Berlyno mėlis. Berlyno mėliu modifikuotas AP elektrodas (AP/BM) plaunamas 100 mM HCl ir džiovinamas 90 min 80 °C temperatūroje.

Reaktoriuje naudojama AP/BM/GPO drobė (4x5 cm) paruošiama kovalentiškai imobilizuojant GPO ant AP/BM. 200 µl GPO (94 U) sumaišoma su 200 µl 5 % (w/v) želatinos tirpalo ir 5 µl 5 % (v/v) glutaro aldehido. Šis mišinys užlašinamas ant AP/BM paviršiaus. Reaktoriuje I darbinis elektrodas sudarytas iš AP/BM, reaktoriuje II – AP/BM/GPO. Darbinis elektrodas patalpinamas į plastikinę celę (7 cm ilgio, 2,5 cm skersmens). Kompensuojamasis elektrodas – 4 cm ilgio ir 0,5 cm skersmens plieninis

vamzdelis prijungtas celės išorėje. Prie celės prijungtas Ag/AgCl lyginamasis elektrodas.

Sistema užpildyta 30 ml 5 arba 50 mM GP tirpalo, paruošto 50 mM kalio fosfato buferiniame tirpale, pH 7,2. Substrato tekėjimo suminis greitis – 50 ml/min. Periodiškai imami pavyzdžiai ir juose nustatomos GP, DHAP ir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koncentracijos.

#### **2.2.7.6. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, DHAP ir GP nustatymas**

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koncentracija matuojama naudojant trijų elektrodų celę (1 ml), sudarytą iš darbinio Pt elektrodo (1 mm skersmens) 0,6 V, lyginamojo Ag/AgCl ir kompensuojamojo Ti plokštelės elektrodo. Elektrocheminiai matavimai atliekami naudojant Voltalab PGZ 402 (Radiometer) potenciostatą.

DHAP analizuojamas naudojant glicerolio-3-fosfato dehidrogenazę. Standartinis reakcijos mišinys sudarytas iš 50 mM kalio fosfato buferinio tirpalo, pH 7,2, 0,2 mM NADH, 2,8 U glicerolio-3-fosfato dehidrogenazės ir mėginio iš reaktoriaus. Bendras reakcijos mišinio tūris – 1 ml. Matuojamas sugerties intensyvumo mažėjimas, kai  $\lambda=340$  nm, susijęs su NADH oksidacija.

Tam, kad iš mėginių būtų pašalintas H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, jie inkubuojami su MnO<sub>2</sub> pertekliumi 30 min kratant. Tada GP koncentracija nustatoma spektrofotometriškai. Standartinis reakcijos mišinys sudarytas iš 50 mM kalio fosfato buferio, pH 7,2, 0,3 mM *o*-dianizidino, 5 U krienų peroksidazės, 2,3 U GPO ir mėginio iš reaktoriaus. Bendras reakcijos mišinio tūris – 1 ml. Matuojamas sugerties intensyvumas, kai  $\lambda=420$  nm. GP kalibracinės kreivės ribos 0–0,25 mM.

#### **2.2.7.7. Alkoholio dehidrogenazės iš *Pseudomonas putida* HK5 aktyvumo nustatymas**

Darbe naudota iš *Pseudomonas putida* HK5 išgryninta alkoholio dehidrogenazė (ADH IIG) (Bachmatova et al., 2004). Fermento aktyvumas

matuojamas 30 °C temperatūroje esant intensyviai maišymui. Reakcijos mišinys sudarytas iš 50 mM Tris-HCl buferinio tirpalo, pH 8,0, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], 20 mM substrato (glicerolio ar kitokio alkoholio), 5–10 µl laisvo ar imobilizuoto fermento suspensijos. Bendras reakcijos mišinio tūris – 1 ml. Imobilizuotas fermentas po reakcijos atskiriamas trumpai centrifuguojant. ADH IIG aktyvumas matuotas spektrofotometriškai pagal sugerties intensyvumo mažėjimą dėl K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] redukcijos, kai λ=420 nm (ε<sub>420</sub>=1020 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>). Vienas ADH IIG aktyvumo vienetas – tai toks fermento kiekis, kuris katalizuoja 1 µmol K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] redukciją per 1 min.

#### **2.2.7.8. TpdE gryninimas**

Prieš gryninimo procedūrą ląstelių nuolaužos pašalinamos centrifuguojant (5 min 10000 g). Beląstelinis ekstraktas gryninamas Ni<sup>2+</sup>-IMAC HP kolonėlėje (1 ml) giminingumo chromatografijos būdu. Proceso metu naudojami du buferiniai tirpalai: prijungimo buferis, sudarytas iš 50 mM kalio fosfato, pH 7,2, ir 0,1 M NaCl, bei eliucijos buferis, kuris paruoštas į prijungimo buferį pridėjus 0,5 M imidazolo. Ni<sup>2+</sup>-IMAC HP kolonėlė iš anksto paruošiama ją plaunant prijungimo buferiu. Visi neprijungę baltymai išplaunami tuo pačiu buferiu, o frakcijos su baltymais, turinčiais 6 histidinių inkarą, surenkamos taikant smūginę eliucijos strategiją: prijungimo buferį iš karto pakeičiant eliucijos buferiu. Frakcijos su tiksliniu baltymu atrenkamos pagal fermentinį aktyvumą. Grynumas įvertinamas elektroforeziškai. Frakcijos su TpdE sujungiamos, imidazolas pašalinamas dializuojant 50 mM kalio fosfato, pH 7,2, buferiniame tirpale arba naudojant 5 ml HiTrap Desalting nudruskinimo kolonėlę. Tada pridedama glicerolio, santykiu 1:1. Išgrynintas baltymas laikomas –20 °C temperatūroje.

### **2.2.7.9. TpdE aktyvumo matavimas**

Alkoholio dehidrogenazės TpdE aktyvumas matuojamas 30 °C temperatūroje pagal sugerties pokytį, NADPH oksiduojant iki NADP<sup>+</sup>, kai  $\lambda=340$  nm ( $\epsilon_{340}=6220$  M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>). Reakcijos mišinys sudarytas iš 50 mM kalio fosfato buferinio tirpalo, pH 7,2, 200  $\mu$ M NADPH, 10 mM substrato (diketono ar aciloino) ir atitinkamo beląstelinio ekstrakto kiekio. Bendras reakcijos mišinio tūris – 1 ml. Reakcija pradama pridedant substrato. Vienas alkoholio dehidrogenazės TpdE aktyvumo vienetas – tai toks fermento kiekis, kuris katalizuoja 1  $\mu$ mol NADP<sup>+</sup> susidarymą nurodytomis sąlygomis per 1 minutę.

### **2.2.7.10. TpdE kinetinių parametrų nustatymas**

Diketonų ir aciloinų redukcijos kinetiniai matavimai atlikti spektrofotometriškai 50 mM kalio fosfato buferiniame tirpale, pH 7,2. Kinetinės kreivės registruotos pagal sugerties intensyvumo mažėjimą dėl NADPH oksidacijos, kai  $\lambda=340$  nm ( $\epsilon_{340}=6220$  M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>), esant 30 °C temperatūrai. Kinetiniai parametrai diketonams ar aciloinams nustatyti esant 0,2 mM NADPH ir skirtingoms diketonų ar aciloinų koncentracijoms. Tuo tarpu kosubstrato – NADPH – kinetiniai parametrai nustatyti, esant 10 mM diacetilo. Visi matavimai atlikti mažiausiai tris kartus.

Pradinio reakcijos greičio priklausomybės nuo substrato koncentracijos analizė bei  $V_{\max}$  ir  $K_M$  nustatymas atlikti naudojantis Michaelio-Menten lygtimi, GraFit programa (Erithacus Software LTD).

### **2.2.7.11. TpdE stabilumo priklausomybės nuo temperatūros tyrimas**

TpdE inkubuojamas 50 mM kalio fosfato buferiniame tirpale, pH 7,2, esant skirtingoms temperatūroms 10 min. Tada pavyzdžiai nedelsiant atšaldomi lede. Fermento aktyvumas matuojamas 30 °C temperatūroje, kaip nurodyta 2.2.7.9. skyriuje.

#### **2.2.7.12. 2,3-Butandiolių oksidacija TpdE**

Alkoholio dehidrogenazės TpdE oksidacinis aktyvumas matuojamas 30 °C temperatūroje pagal sugerties pokytį, NADP<sup>+</sup> redukuojant iki NADPH, kai bangos ilgis 340 nm. Reakcijos mišinys sudarytas iš 50 mM Gly-NaOH buferinio tirpalo, pH 9,5, 200 μM NADP<sup>+</sup>, 10 mM R,R-, S,S- arba *mezo*- 2,3-butandiolio ir atitinkamo kiekio išgryninto TpdE. Bendras reakcijos mišinio tūris – 1 ml.

#### **2.2.7.13. Baltymų elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje denatūravimo sąlygomis**

Baltymų elektroforezė NDS-poliakrilamidiniame gelyje atliekama pagal standartines metodikas (Laemmli, 1970), naudojant 4,5 % koncentruojantį ir 12 % skirstomąjį gelius. Baltymų preparatai prieš elektroforezę sumaišomi su Coomassie Brilliant Blue R-250 dažų tirpalu, turinčiu 4 % NDS ir 6 % metkaptuoetanolio, ir kaitinami verdančio vandens vonioje 3 min. Baltymai dažomi Coomassie Brilliant Blue R-250 dažais. Po dažymo gelis blukinamas 7 % acto rūgšties tirpalu.

#### **2.2.7.14. Baltymų koncentracijos nustatymas**

Baltymų koncentracija nustatoma Lowry (Lowry et al., 1951) metodu. Baltymų mėginiai praskiedžiami vandeniu iki 400 μl, įpilama 2 ml reaktyvo A (2 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ir 0,1 N NaOH tirpalas) ir 40 μl reaktyvo B (0,5 % vandeninis CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O tirpalas), laikoma kambario temperatūroje 10 min. Įpilama 200 μl praskiesto vandeniu (1:1) Folino reagento ir laikoma 37 °C temperatūroje 45 min. Matuojamas optinis tankis, esant 750 nm bangos ilgiui. Baltymo koncentracija nustatoma pagal jaučio serumo albumino kalibracinę kreivę.

## **2.2.8. Junginių biokonversijos naudojant sveikas ląsteles**

### **2.2.8.1. 2,3-Diketonų redukcija *E. coli* BL21 (DE3)/pTpdE ląstelėmis**

*E. coli* BL21 (DE3)/pTpdE bakterijos užaugintos 25 ml BHI terpės, į kurią papildomai įdėta 50 µg/ml ampicilino 30 °C temperatūroje aeruojant. Biomassė surinkta centrifuguojant (10 min 4000 g). Nusodintos ląstelės 3 kartus plautos 20 ml 50 mM kalio fosfato buferinio tirpalo, pH 7,2 ir resuspenduotos 10 ml to paties buferio. Į ląstelių suspensiją pridėta 0,25 % gliukozės ir 5 mg 2,3-diketono. Ląstelių suspensija inkubuota 30 °C temperatūroje aeruojant 15–18 val.

### **2.2.8.2. Piridinių, pirimidinų ir pirazinų biokonversijos, naudojant *Burkholderia* sp. MAK1 ląsteles, tyrimas**

0,05 g šlapios *Burkholderia* sp. MAK1 ląstelių masės suspenduojama 1 ml 10 mM kalio fosfato buferiniame tirpale, pH 7,2. Į suspensiją pridedama 6 µl 40 % gliukozės ir 0,25 mM substrato, kurio konversija tiriama. Inkubuojama 30 °C temperatūroje kratant. Konversijos eiga stebima HPLC-MS sistema.

### **2.2.8.3. Didesnių hidroksilintų piridinių, pirimidinų ir pirazinų kiekių biosintezė *Burkholderia* sp. MAK1 ląstelėmis**

Biosintezėi naudojama 100 ml *Burkholderia* sp. MAK1 ląstelių suspensijos, gautos 2.2.1. skyriuje aprašytu būdu. Tokiame kiekyje yra ~2 g šlapios ląstelių masės. Į suspensiją pridedama 0,6 ml 40 % gliukozės ir 50 mg substrato. Inkubuojama 30 °C kratyklėje (180 aps./min). Konversijos eiga stebima HPLC-MS sistema.

### **2.2.9. Beląstelinių ekstraktų ruošimas**

Beląsteliniai ekstraktai ruošiami bakterijas suspenduojant buferiniame tirpale ir 3,5 min ardant ultragarsu VC750 (Sonics & Materials Inc.) dezintegratoriumi: 15 s impulsas, 30 s pertrauka. Suardytų ląstelių nuolaužo pašalintos centrifuguojant (5 min, 10000 g).

### **2.2.10. Kreatino – $\alpha$ -naftolio testas 2,3-diketonų ir acetoino nustatymui**

50 mg  $\alpha$ -naftolio ištirpinama 1 ml DMSO. Šis reagentas naudojamas šviežiai paruoštas. Pagaminami 40 % KOH ir 0,5 % kreatino vandeniniai tirpalai. Į 100  $\mu$ l analizuojamo pavyzdžio pridedama 5  $\mu$ l kreatino, 10  $\mu$ l  $\alpha$ -naftolio ir 5  $\mu$ l KOH. Reakcijos mišinys švelniai sumaišomas ir inkubuojamas kambario temperatūroje 30 min. Spektrofotometriškai nustatomi 2,3-diketonų ir acetoino dariniai, užrašant UV-Vis sugerties spektrą arba matuojant sugerties intensyvumą, kai  $\lambda=540$  nm.

### **2.2.11. Baltymų ir ląstelių imobilizavimas**

#### ***2.2.11.1. Silikagelio modifikavimas 3-aminopropiltrietskisilano***

Imobilizavimui naudotas sferinis silikagelis, kurio dalelių dydis 0,035–0,045 mm, poros skersmuo 260–340 Å. 3 g silikagelio sumaišoma su 20 ml 1 % 3-aminopropiltrietskisilano, pH 3,5, ir šildoma verdančio vandens vonioje maišant. Po valandos nuosėdos surenkamos, plaunamos acetonu ir dejonizuotu vandeniu. Tuomet silikagelis suspenduojamas 10 ml dejonizuoto vandens. Toks aminintas silikagelis (SS) naudojamas baltymų imobilizavimui.

### **2.2.11.2. ADH IIG kovalentinis imobilizavimas ant silikagelio per glutaro aldehidą**

0,3 ml (90 mg) SS plaunama su 2,5 tūrio 50 mM Tris-HCl buferinio tirpalo, pH 8,0, turinčio 2 mM CaCl<sub>2</sub>. Nuosėdos resuspenduojamos 1 ml to paties buferio. Pridėjus 0,02 % glutaro aldehido, mišinys inkubuojamas 30 °C temperatūroje 30 min maišant. Tuomet nuosėdos 5 kartus plaunamos 1 ml to paties buferio. Į šlapias nuosėdas pridedama 0,6 ml ADH IIG (santykiu 27 µg baltymo ir 1 mg SS) ir mišinys inkubuojamas 30 °C temperatūroje 30 min maišant. Imobilizacija stabdoma blokuojant laisvas aldehido grupes, pridėjus 200 mM metilamino. Po imobilizacijos nuosėdų suspensija (ADH IIG-GA-SS) plaunama tuo pačiu buferiu su 1 M NaCl 5 kartus. Galiausiai, nuosėdos suspenduojamos 0,3 ml 50 mM Tris-HCl buferinio tirpalo, pH 8,0, papildyto 2 mM CaCl<sub>2</sub>.

### **2.2.11.3. *Burkholderia* sp. MAK1 imobilizavimas alginatiniame gelyje**

Paruošta po 20 ml skirtingos koncentracijos algino rūgšties tirpalų. 50 mM Tris-HCl buferiniame tirpale, pH 7,0, ištirpita 1 %, 2 % arba 3 % algino rūgšties ir suspenduota po 0,5 g *Burkholderia* sp. MAK1 ląstelių. Šie tirpalai švirkštu iš maždaug 20 cm aukščio iš lėto lašinami į stiklinę su 200 ml 50 mM Tris-HCl buferinio tirpalo, pH 7,0, turinčiame 100 mM CaCl<sub>2</sub>. Susidarę alginatiniai rutuliukai su imobilizuotomis *Burkholderia* sp. MAK1 ląstelėmis plaunami tokiu pačiu buferiniu tirpalu su CaCl<sub>2</sub> ir jame paliekami per naktį.

Alginatinio gelio rutuliukai (po 1 g) su imobilizuotomis bakterijomis įdėti į 20 ml 50 mM Tris-HCl buferinio tirpalo, pH 7,0, su 60 µl 40 % gliukozės ir 5 mg 2-aminopiridino bei inkubuoti 30 °C kratyklėje. Konversijos eiga stebėta pagal produkto smailės didėjimą naudojant HPLC-MS sistemą.



### **2.2.12. *Burkholderia* sp. MAK1 katalizės priklausomybės nuo temperatūros tyrimas**

0,2 g *Burkholderia* sp. MAK1 ląstelių, užaugintų 2.2.1. skyriuje aprašytu būdu suspenduojama 10 ml 10 mM kalio fosfato buferio, pH 7,2. Į suspensiją pridedama 60 µl 40 % gliukozės ir 5 mg 2-amino-4-chloropiridino. Paruošiami 6 vienodi bandiniai, kurie inkubuojami kratyklėse (180 aps./min) esant nuo 20 °C iki 45 °C temperatūrai. Periodiškai po 100 µl pavyzdžio paimama ir konversijos eiga stebima naudojant HPLC-MS sistemą.

### **2.2.13. Hidroksilintų piridinių ir pirimidinų gryninimas**

Po 2.2.8.3. skyriuje aprašytos biosintezės *Burkholderia* sp. MAK1 ląstelės pašalinamos centrifuguojant (20 min, 4000 g). Supernatantas vakuuminiu rotaciniu garintuvu išdžiovinamas iki sausos masės. Ant sausų nuosėdų užpilama 5 ml dejonizuoto vandens. Tirpalas gryninamas naudojant atvirkštinių fazių C18 kolonėlę, kuri sujungta su spektrofotometru ( $\lambda=254$  nm) ir saviraščiu. Kolonėlė sulygsvarinta vandeniu. Taikoma slenkstinio gradientinio eliuavimo strategija: po vandeninio gryninamo mėginio užnešimo kolonėlė plaunama 10 ml H<sub>2</sub>O, tada 10 ml 20 % metanolio vandeninio tirpalo, 10 ml 50 % metanolio vandeninio tirpalo ir 10 ml 100 % metanolio. Renkamos frakcijos, kurių tūris skiriasi priklausomai nuo gryninamos medžiagos. Frakcijos analizuojamos plonasluoksnės chromatografijos būdu ir HPLC-MS. Frakcijos su gryna medžiaga sujungiamos, nugarinamos vakuuminiu rotaciniu garintuvu. Įvertinama biokonversijos išeiga. 10 mg grynios medžiagos tirpinama DMSO-d<sub>6</sub> ir naudojama <sup>1</sup>H BMR ir <sup>13</sup>C BMR analizei.

## **2.2.14. Analiziniai metodai**

### **2.2.14.1. UV-Vis spektrofotometrija**

UV-Vis spektrofotometriniai matavimai atlikti Helios Gamma spektrofotometru (Thermo Corporation) ir Power Wave<sup>TM</sup> plokštelių skaitytuvu (BioTec Instruments Inc.). Visi matavimai pakartoti mažiausiai tris kartus.

### **2.2.14.2. Plonasluoksnė chromatografija**

Plonasluoksnės chromatografijos stacionari fazė – silikageliu dengtos plokštelės su fluorescenciniu dažu F<sub>254</sub>, kuris sužadinamas, kai  $\lambda=254$  nm. Sistemos mobili fazė – chloroformo ir metanolio mišinys, sumaišytas santykiu 9:1 (anilinams) arba 5:1 (piridino dariniams). Plokštelės analizuotos šviesoje, kurios  $\lambda=254$  nm.

### **2.2.14.3. Tandeminė aukšto slėgio skysčių chromatografija ir masių spektrometrija**

Naudojama aukšto slėgio skysčių chromatografijos ir masių spektrometrijos (HPLC-MS) sistema sudaryta iš CBM-20A valdymo bloko, dviejų LC-2020AD pompų, SIL-30AC automatinio mėginių ėmiklio, CTO-20AC kolonėlių termostato, SPD-M20A Prominence fotodiodų gardelės detektoriaus ir LCMS-2020 masių spektrometro su ESI šaltiniu (Shimadzu, Japonija).

2-Amino-1,3-propandiolio transformacijos produktų, reakciją katalizuojant *Pseudomonas putida* HK5 ADH IIG chromatografinis frakcionavimas atliekamas naudojant Hydrosphere C18 kolonėlę, 150×4 mm (YMC, Japonija) 40 °C temperatūroje. Naudojama mobili fazė sudaryta iš vandeninio 0,1 % skruzdžių rūgšties tirpalo (A tirpiklis) ir acetonitrilo (B tirpiklis). Abiejų tirpiklių tekėjimo suminis greitis – 0,6 ml/min. Gradientinio

eliuavimo programa: 0–1 min, 0 % B; 1–8 min, 95 % B; 8–11 min, 95 % B; 11–12 min, 0 % B; 12–15 min, 0 % B.

Piridinių, pirimidinų, piridazinių, pirazinių ir jų transformacijos produktų *Burkholderia* sp. MAK1 bakterijomis chromatografinis frakcionavimas atliekamas naudojant YMC – Pack Pro C18, 150×3 mm kolonėlę (YMC, Japonija) 40 °C temperatūroje. Mobilį fazę sudaryta iš vandeninio 0,1 % skruzdžių rūgšties tirpalo (A tirpiklis) ir acetonitrilo (B tirpiklis). Tirpiklių tekėjimo suminis greitis – 0,5 ml/min. Pagal analizuojamų junginių savybes taikytos dvi gradientinio eliuavimo programos. Programa I: 0–1 min, 5 % B; 1–5 min, 95 % B; 5–7 min, 95 % B; 7–8 min, 5 % B; 8–12 min, 5 % B. Programa II: 0–1 min, 5 % B; 1–5 min, 60 % B; 5–7 min, 60 % B; 7–8 min, 5 % B; 8–10 min, 5 % B.

Masių spektrai užrašomi nuo  $m/z$  10 iki  $m/z$  500, esant 350 °C temperatūrai ir  $\pm 4,500$  V įtampai (neutrali DL/Qarray įtampa), naudojant N<sub>2</sub> kaip purškiamąsias ir džiovinamąsias dujas. Masių spektrometrijos analizė atlikta tiek teigiamu, tiek neigiamu jonizacijos režimu. Duomenys analizuoti naudojant LabSolutions LCMS programinę įrangą.

Baltymai iš pavyzdžių, kurie buvo veikiami fermentais ar ląstelėmis, prieš HPLC-MS analizę išsodinami acetonitrilu.

#### **2.2.14.4. Dujų chromatografija ir masių spektrometrija**

Dujų chromatografijos ir masių spektrometrijos (GC-MS) analizės atliekamos naudojant GCMS-QP2010 Ultra Plus sistemą (Shimadzu, Japonija). Chromatografinė fragmentacija atlikta Rtx®-1701 kolonėlėje (30 m×0,25 mm, 0,25 μm su 5 m Integra-prieškolone, Restek, JAV). Helis – nešančiosios dujos – buvo leidžiamas pastoviu 40 cm/s greičiu. GC kolonėlės termostato temperatūra buvo keliamą 15 °C/min greičiu nuo 80 °C iki 250 °C, tada 2,7 min palaikoma pastovi. Bendra analizės trukmė – 15 min. Purkštovo temperatūra 250 °C, jonizacijos šaltinio – 220 °C. Detekcija vykdoma pasirinktų jonų režimu. Smailės identifikuojamos pagal užsilaikymo trukmę ir

fragmentacijos pobūdį. Injekcijos tūris 0,3 µl. Duomenų surinkimui ir analizei naudota GC-MS Solution 2.71 programa (Shimadzu, Japonija).

#### **2.2.14.5. $^1\text{H}$ BMR ir $^{13}\text{C}$ BMR analizė**

$^1\text{H}$  BMR ir  $^{13}\text{C}$  BMR spektrai užrašyti Bruker Ascend 400 spektrometru. 400 MHz dažnis  $^1\text{H}$  BMR ir 100 MHz dažnis  $^{13}\text{C}$  BMR. Visi spektrai užrašyti naudojant DMSO- $d_6$  tirpiklį. Spektrai kalibruoti pagal DMSO- $d_6$  būdingus signalus:  $^1\text{H}$   $\delta$  2.50,  $^{13}\text{C}$   $\delta$  39.5. Cheminių poslinkių reikšmės pateiktos skalėje m. d.  $^1\text{H}$  BMR spektrų aprašymuose naudojami šie sutrumpinimai: s – singletas, d – dubletas, dd – dubleto dubletas, td – tripleto dubletas, m – multipletas.

#### **2.2.15. Kompiuteriniai sekų analizės metodai**

DNR sekų analizė ir palyginimas atliekamas naudojant Vector NTI 9.0 (Life Technologies) programinę įrangą. DNR sekoskaitos chromatogramos analizuojamos Chromas lite 2.1 programa (<http://technelysium.com.au>). DNR ir baltymų sekų homologų paieška vykdoma NCBI BLAST duomenų bazėje (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). TpdE baltymo erdvinės struktūros prognozavimui naudojamas interaktyvus serveris HHpred (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>). Struktūrinių homologų paieška vykdoma PDB duomenų bazėje. Tikėtina dominančios sekos tretinė struktūra apskaičiuojama naudojantis MODELLER programine įranga. Struktūrinių modelių analizei ir palyginimui su žinomomis struktūromis naudojama PyMOL programa. Teorinio ir eksperimentinio struktūrinių modelių tikslumo ir patikimumo įvertinimui naudojamas ProSA įrankis.

### 3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Pagal tirtus objektus visus darbo rezultatus galima suskirstyti į keturias pagrindines dalis: 1) šiame darbe siekėme padidinti DHAP sintezės efektyvumą, nes tai būtinas substratas chiralinių angliavandenių sintezėje naudojant nuo DHAP priklausomas aldolazes, tačiau dėl neefektyvių gamybos būdų išlieka brangus; 2) taip pat tyrėme ADH IIG iš *Pseudomonas putida* HK5 kaip potencialų biokatalizatorių chiralinių alkoholių gamybai; 3) aiškinomės rekombinantinės alkoholio dehidrogenazės TpdE iš *Rhodococcus jostii* TMP1 pritaikymo optiškai grynų polihidroksilių darinių sintezėje galimybes; 4) atlikome regioselektyvaus aromatinių heterociklų hidroksilinimo tyrimus, kai biokatalizatorius – *Burkholderia* sp. MAK1 ląstelės.

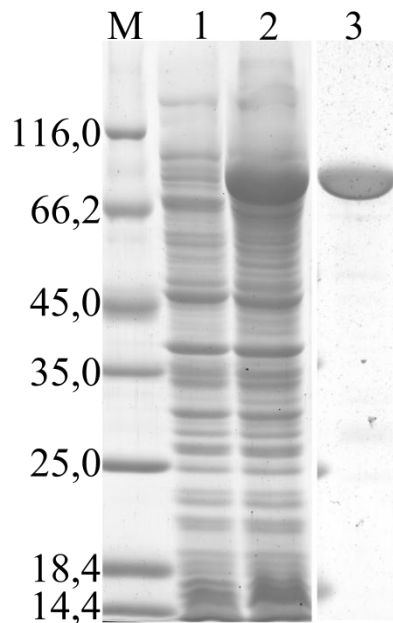
#### 3.1. Dihidroksiacetono fosfato sintezė panaudojant L- $\alpha$ -glicerofosfato oksidazę iš *Enterococcus* sp. RL1.

DHAP sintezės galimybės tyrinėjamos jau ne vieną dešimtmetį. Nors pasiūlyta nemažai DHAP sintezės metodų (Charmantray et al., 2004; Enders et al., 2005; Schumperli et al., 2007), vis dar trūksta sėkmingai pritaikomų efektyvių biokatalizinių sistemų jo sintezei. Kaip aprašyta literatūros apžvalgoje, katalizatoriumi naudojant GPO, GP yra verčiamas į DHAP ir vandenilio peroksidą. Pastarasis produktas slopina GPO aktyvumą, todėl turi būti pašalinamas iš reakcijos mišinio (Schumperli et al., 2007). Tam, kad vandenilio peroksidas būtų pašalintas, gali būti naudojami bimetaliniai lydiniai, mišrios metalų oksidazės arba katalazė. Visgi, nei vieno iš jų neįmanoma pritaikyti ciklais dirbančiame DHAP bioreaktoriuje (Hernandez et al., 2012; Maria et al., 2012; Schoevaart et al., 2000). Todėl siekėme sukurti DHAP sintezės GPO bioreaktorių, turintį elektrocheminę dalį, skirtą efektyviam vandenilio peroksido pašalinimui.

### 3.1.1. Rekombinantinės GPO iš *Enterococcus* sp. RL1 biosintezės tyrimas

Kuriant GPO bioreaktorių reikalingi dideli aktyvaus fermento kiekiai. Dėl šios priežasties pirmiausiai tyrėme rekombinantinės GPO iš *Enterococcus* sp. RL1 biosintezę *E. coli* BL21 (DE3) kamiene. Daugiausiai šio baltymo buvo susintetinta, kai ląstelės augintos LB terpėje 30 °C iki OD<sub>600</sub> pasiekė 1,0, tuomet *gpo* geno raiška indukuota 0,5 mM IPTG ir biosintezė vykdyta 18 val. Ląstelių biomasė buvo surenkama ir suardoma kaip aprašyta metodinėje dalyje. Kadangi klonuoto *gpo* geno C-galas sulietas su 6 His koduojančia seka, tai rekombinantinės GPO gryninimui buvo pasirinktas giminingumo chromatografijos būdas ir naudota Ni<sup>2+</sup>-chelatinė kolonėlė.

*E. coli* BL21 (DE3) be pGPO ir *E. coli* BL21 (DE3) su pGPO beląsteliniai ekstraktai bei tikslinė frakcija po giminingumo chromatografijos analizuota NDS-PAAG (3.1 pav.).

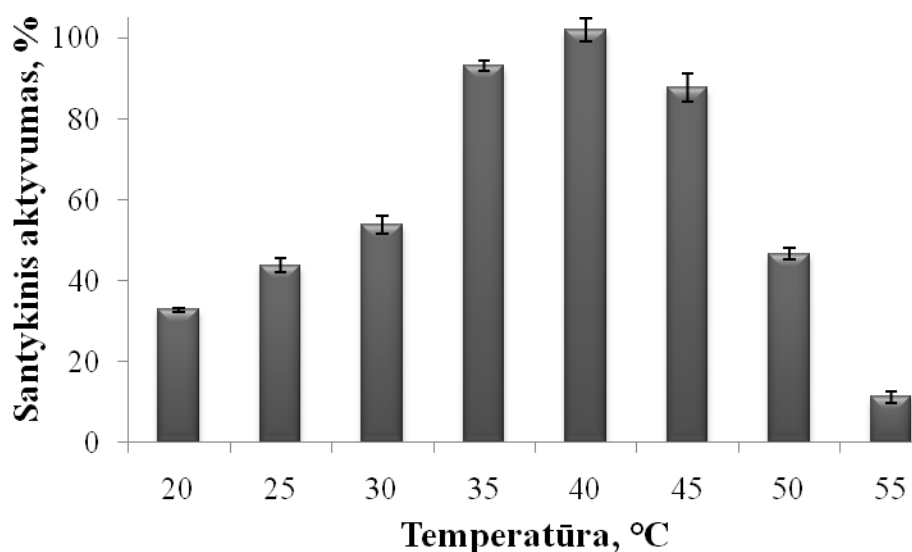


3.1 pav. Rekombinantinio GPO elektroforezinis vaizdas 12 % NDS PAAG. M – molekulių masių žymuo, kurio vertės nurodytos kDa, 1 – *E. coli* BL21 (DE3) beląstelinis ekstraktas, 2 – *E. coli* BL21 (DE3) pGPO beląstelinis ekstraktas, 3 – GPO po gryninimo giminingumo chromatografijos būdu.

Paaikėjo, kad po gryninimo procedūrų pavyko gauti homogenišką tikslinį baltymą. Nustatyta, kad iš 1 l *E. coli* BL21 (DE3) pGPO kultūros gauta 1232 U fermento, kurio specifinis aktyvumas buvo 28,3 U/mg. Tolimesniuose eksperimentuose naudota išgryninta GPO.

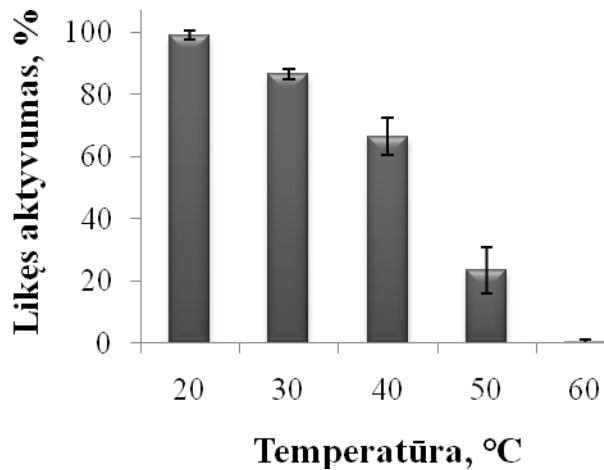
### 3.1.2. Temperatūros įtaka rekombinantinės GPO aktyvumui ir stabilumui

Buvo tiriama GPO aktyvumo priklausomybė nuo temperatūros. Fermento aktyvumas matuotas, kai temperatūra buvo 20–50 °C (3.2 pav.). Paaiškėjo, kad didžiausiu aktyvumu fermentas pasižymėjo 40 °C temperatūroje.



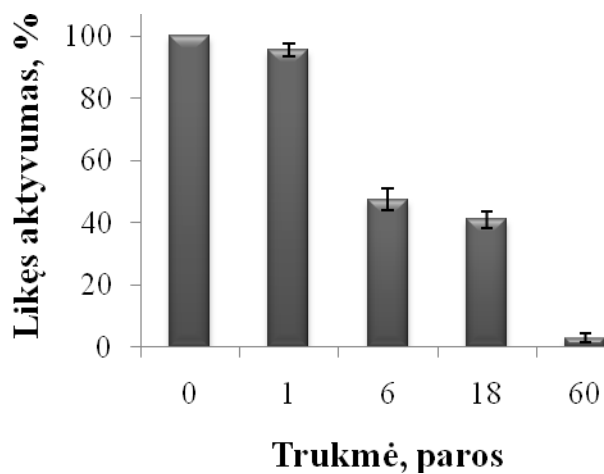
3.2 pav. Rekombinantinės GPO aktyvumo priklausomybė nuo temperatūros. Reakcijos mišinį sudarė 50 mM K-fosfato buferinis tirpalas, pH=7,2, 0.3 mM *o*-dianizidino, 5 U krienų peroksidazės, 25 mM GP ir 2,3 U GPO. Bendras reakcijos mišinio tūris – 1 ml. 100 % atitinka maksimalų fermento aktyvumą.

Siekiant užtikrinti optimalias GPO veikimo sąlygas, buvo tiriamas fermento termostabilumas (3.3 pav.). GPO pavyzdžiai 5 min inkubuoti esant 20–60 °C temperatūrai, o likęs aktyvumas matuotas, kai temperatūra buvo 30 °C. Fermentas pasirodė esąs jautrus aukštesnėms temperatūroms. Kai temperatūra buvo 60 °C, GPO visiškai prarado aktyvumą. Tuo tarpu esant 40 °C temperatūrai – kai fermento darbinis aktyvumas didžiausias – GPO vos per 5 min netekdavo trečdaliao aktyvumo. Vadinasi, norint šį fermentą pritaikyti efektyviai DHAP sintezei, svarbu proceso temperatūrą pasirinkti 20–30 °C ribose.



3.3 pav. GPO termostabilumas. Fermento pavyzdžiai 5 min inkubuoti esant 20–60 °C. Likęs aktyvumas matuotas 30 °C. 100 % – fermento aktyvumas prieš inkubavimą.

Tiriant rekombinantinės GPO laikymo stabilumą (3.4 pav.) paaiškėjo, kad 4 °C temperatūroje fermentas pusės aktyvumo netenka per 6 paras. Tuo tarpu laikomas –20 °C temperatūroje fermentas buvo stabilus: po metų GPO aktyvumas sumažėjo tik 19 %.



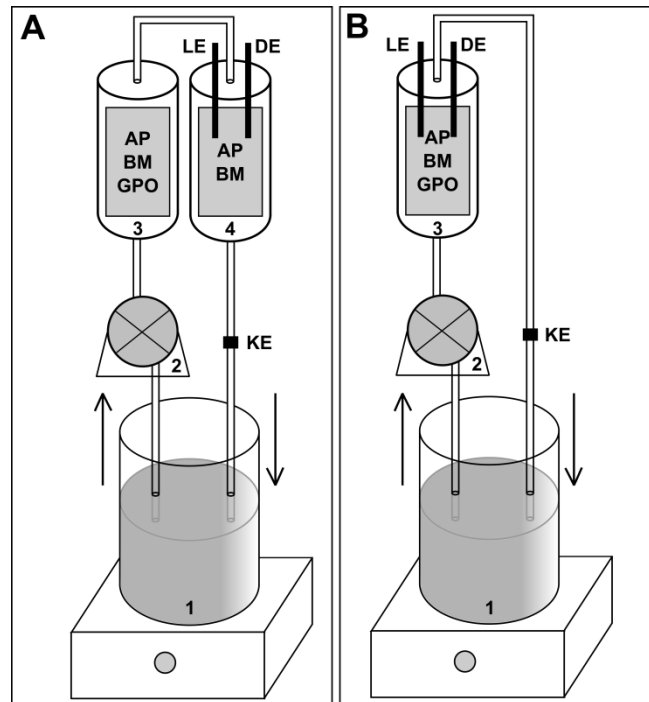
3.4 pav. GPO laikymo stabilumas. Fermento pavyzdžiai inkubuoti esant 4 °C temperatūrai. Likęs aktyvumas matuotas 30 °C. 100 % – fermento aktyvumas prieš inkubavimą.

Taigi, apibendrinus šiame tyrimų etape gautus rezultatus, tapo aišku, kad optimali rekombinantinės GPO veikimo temperatūra yra 20–30 °C, o fermento laikymui geriausiai tinka –20 °C temperatūra.



### 3.1.3. Berlyno mėlio panaudojimas rekombinantinės GPO bioreaktoriuje

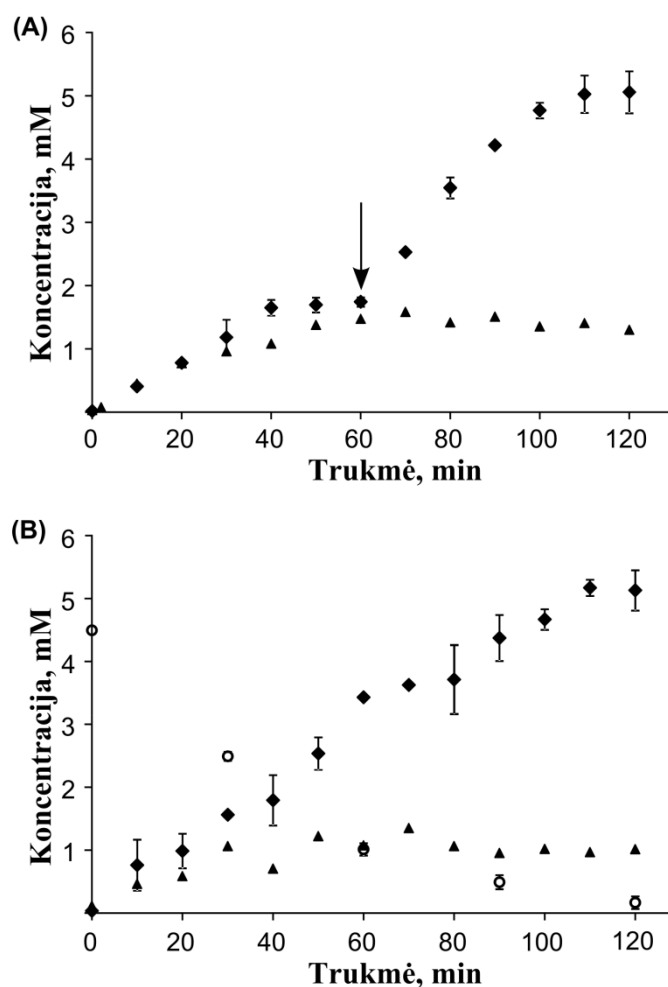
Pirmiausiai, DHAP sintezei skirtą GPO bioreaktorių sukonstravome iš dviejų dalių (reaktorius I). Vienoje dalyje ant Berlyno mėliu modifikuoto anglies pluošto buvo imobilizuotas GPO (AP/BM/GPO), kitoje – Berlyno mėliu modifikuotas anglies pluoštas (AP/BM) buvo paruoštas kaip darbinis elektrodas, skirtas vandenilio peroksido skaidymui (3.5 A pav.). Reaktorių I



3.5 pav. Bioreaktoriai DHAP sintezei. (A) Reaktorių I, (B) reaktorių II. LE – lyginamasis elektrodas, DE – darbinis elektrodas, KE – kompensuojamasis elektrodas. 1 – substrato tirpalas, 2 – peristaltinė pompa, 3 – AP/BM/GPO audinys (A) arba elektrodas (B), 4 – AP/BM elektrodas.

užpildėme 5 mM GP tirpalu ir periodiškai matavome DHAP bei vandenilio peroksido koncentracijos pokyčius. Svarbu pažymėti, kad pirmąsias 60 min darbinis elektrodas nebuvo įjungtas. 3.6 A paveiksle matome, jog šiame biokonversijos etape susidariusio vandenilio peroksido kiekis buvo lygus susintetinto DHAP kiekiui. Įjungus darbinį AP/BM elektrodą, vandenilio peroksido kiekis nustojo augti. Tuo tarpu DHAP koncentracija ir toliau didėjo. Tai reiškė, kad AP/BM elektrodas eliminavo vandenilio peroksidą. Kai AP/BM

elektrodas buvo įjungtas nuo eksperimento pradžios (3.6 B pav.), DHAP gamybos greitis pasiekė  $0,05 \text{ mM min}^{-1}$ , o GP per 2 valandas beveik visiškai ( $>98 \%$ ) buvo konvertuotas į DHAP. Nuolat matuojant vandenilio peroksido koncentraciją pastebėta, kad per 30 min ji pasiekė maksimumą ( $1,2 \pm 0,3 \text{ mM}$ ) ir toliau vykdamas biokonversiją nebesikeitė.

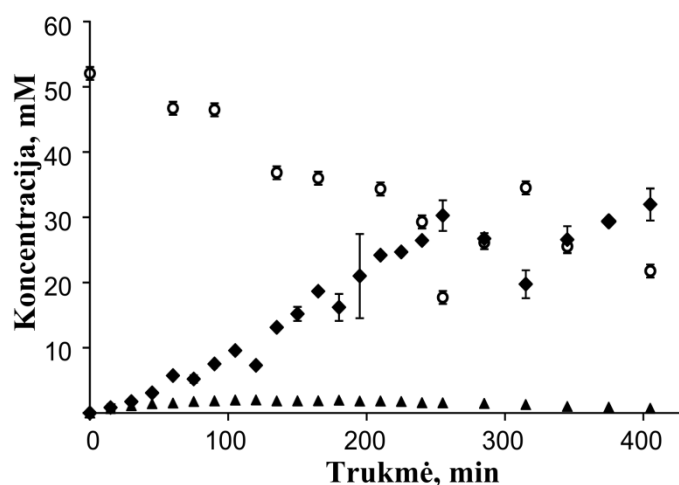


3.6 pav. Elektrocheminė GP konversija į DHAP reaktoriuje I. AP/BM elektrodo potencialas +500 mV; 30 ml 5 mM GP tirpalas buvo pumpuojamas per kolonėlę  $50 \text{ ml min}^{-1}$  greičiu. (A) DHAP ir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> susidarymas, kai 60 min nuo proceso pradžios AP/BM elektrodas neįjungtas; rodyklė žymi momentą, kai įjungtas AP/BM elektrodas. (B) AP/BM elektrodas įjungtas visos konversijos metu. Užpildytas rombas – DHAP; tuščiaaviduris apskritimas – GP; užpildytas trikampis – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Vertinant biokonversijos proceso efektyvumą labai svarbus parametras yra pradinė substrato koncentracija. Siekiama, kad pradinė substrato

koncentracija būtų kuo didesnė, nes tai sumažina produkto atskyrimo kaštus. Visgi, neretai didelės substrato koncentracijos slopina fermentų aktyvumą. Norėdami padidinti GPO reaktoriaus I efektyvumą, jį užpildėme 50 mM GP tirpalu (koncentracija 10 kartų didesnė, nei pradiniuose eksperimentuose). Toks substrato koncentracijos padidinimas lėmė, kad DHAP susidarymo greitis išaugo 3 kartus.

Norėdami supaprastinti DHAP sintezės sistemą, kitame darbo etape sukonstravome vienos dalies bioreaktorių – reaktorių II, kuriame darbinis elektrodas buvo AP/BM/GPO (3.5 B pav.). Veikimo skirtumų tarp reaktoriaus I ir reaktoriaus II nebuvo pastebėta. Pagaminto DHAP kiekis buvo lygus konversijos metu sunaudotam GP kiekiui (3.7 pav.). Proceso išeiga buvo  $64 \pm 5\%$ : 50 mM GP konvertuota į 32 mM DHAP. Vis dėlto svarbiausia, kad vandenilio peroksido koncentracija visos biokonversijos metu neviršijo 2 mM (3.7 pav.).



3.7 pav. Elektrocheminė GP konversija į DHAP reaktoriuje II. AP/BM/GPO elektrodo potencialas +500 mV; tirpalas buvo pumpuojamas per kolonėlę  $50 \text{ ml min}^{-1}$  greičiu. Užpildytas rombas – DHAP; tuščiaiduris apskritimas – GP; užpildytas trikampis –  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Apibendrinant galima teigti, kad sukūrėme greitą ir efektyvią nuo katalazės nepriklausomą DHAP sintezės sistemą.

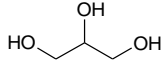
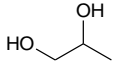
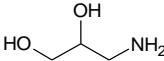
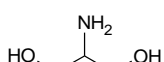
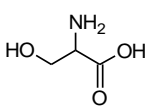
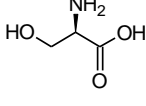
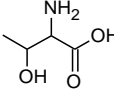
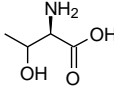
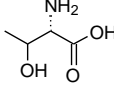
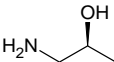
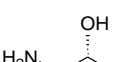
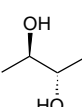
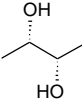
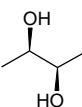
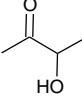
### 3.2. Aminoalkoholių ir vicininių alkoholių oksidacija, naudojant ADH IIG iš *Pseudomonas putida* HK5

Nuo PQQ ir hemo priklausančios ADH pasižymi plačiu substratiniu specifiškumu. Šie fermentai aktyviame centre turi nedifunduojantį kofaktorių, todėl vykdant reakcijas nereikia papildomai pridėti brangių kofaktorių. Dėl šių priežasčių tokios ADH yra patrauklūs katalizatoriai, potencialiai pritaikomi farmacijos, žemės ūkio, maisto ar chemijos pramonėje (Inoue et al., 2005; Promden et al., 2008). Jau anksčiau buvo žinoma, kad ADH IIG iš *Pseudomonas putida* HK5 gali katalizuoti įvairių pirminių ir antrinių alifatinių ar ciklinių alkoholių, tarp jų diolių ir glicerolio, oksidaciją (Toyama et al., 1995). Nusprendėme tirti aminoalkoholių ir vicininių alkoholių (alkoholių, kurių hidroksigrupės prijungtos prie gretimų anglies atomų) oksidacijos galimybes, katalizatoriumi naudojant ADH IIG.

Paaiškėjo, kad ADH IIG substratais gali panaudoti ( $\pm$ )-3-amino-1,2-propandiolį ir 2-amino-1,3-propandiolį. Palyginus 3.1 lentelėje pateiktus rezultatus, galima teigti, kad fermento aktyvumui svarbi aminogrupės padėtis propandiolio grandinėje: oksidacijos greitis substratu naudojant 2-amino-1,3-propandiolį buvo ~3 kartus didesnis nei ( $\pm$ )-3-amino-1,2-propandiolio atveju. Buvo parodyta, jog fermentas nekatalizuoja aminorūgščių serino ir treonino virsmų (3.1 lentelė). Greičiausiai, tinkamai substrato lokalizacijai ADH IIG aktyviame centre trukdo neigiamą krūvį galinti įgyti karboksigrupė.

1-Amino-2-propanolis – prastas ADH IIG substratas. Vis dėlto atliekant eksperimentus su šiuo substratu pastebėtas fermento enantioselektyvumas: oksiduotas tik *S*- enantiomeras (3.1 lentelė). Norėdami įrodyti, kad ADH IIG iš *P. putida* HK5 yra enantioselektyvus fermentas, atlikome fermentinio aktyvumo matavimus, substratais naudodami visus tris vicininio alkoholio – 2,3-butandiolio – enantiomeras. Didžiausiu aktyvumu fermentas pasižymėjo, kai substratu naudotas (2*S*,3*S*)-(+)-2,3-butandiolis. Tuo tarpu naudojant *mezo*-2,3-butandiolį santykinis ADH IIG aktyvumas sumažėjo daugiau nei 5 kartus. (2*R*,3*R*)-(–)-2,3-Butandiolis buvo prastas substratas: kai reakcijoms buvo

3.1 lentelė. Įvairių aminoalkoholių ir vicininių alkoholių oksidacija naudojant laisvą ir imobilizuotą ADH IIG iš *P. putida* HK5.

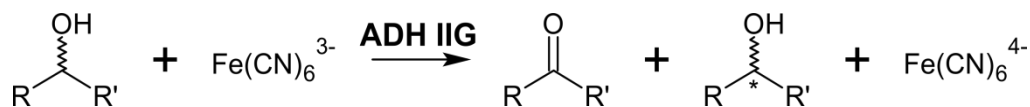
Substratas		Santykinis ADH IIG aktyvumas, %	Santykinis ADH IIG-GA-SS aktyvumas, %
Glicerolis		100	100
1,2-Propandiolis		119	nt*
(±)-3-Amino-1,2-propandiolis		23,8	34
2-Amino-1,3-propandiolis		74,4	83
<i>rac</i> -Serinas		0	nt
( <i>R</i> )-Serinas		0	nt
<i>rac</i> -Treoninas		0	nt
( <i>R</i> )-Treoninas		0	nt
( <i>S</i> )-Treoninas		0	nt
( <i>S</i> )-(+)-1-Amino-2-propanolis		0,8	0,2
( <i>R</i> )-(-)-1-Amino-2-propanolis		0	0
<i>mezo</i> -2,3-Butandiolis		19,6	nt
(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> )-(+)-2,3-Butandiolis		106,8	115
(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> )-(-)-2,3-Butandiolis		5,2	nt
Acetoinas		0	nt

\*nt – netirta

naudojami (2*S*,3*S*)-(+)-2,3-butandiolis ir (2*R*,3*R*)-(-)-2,3-butandiolis, santykinis fermento aktyvumas skyrėsi daugiau nei 20 kartų.

Literatūroje aprašytos kelios nuo PQQ ir hemo priklausomos ADH, išskirtos iš *Acetobacter*, *Gluconobacter* ir *Comamonas* genčių bakterijų, kurios pasižymi enantioselektyvumu oksiduodamos (*R*)- arba (*S*)- antrinius alkoholius (Jongejan et al., 2000). Mūsų atveju galima teigti, kad optiškai grynų 2,3-butandiolių oksidacijos metu ADH IIG iš *P. putida* HK5 pirmenybę teikia (*S*)- (+) hidroksigrūpei. Dėl ryškaus enantioselektyvumo ADH IIG galėtų būti pritaikoma optiškai aktyvių alkoholių sintezei kinetinio racematų atskyrimo būdu (3.8 pav.).

Verta paminėti, kad ADH IIG buvo neaktyvi, kai substratu naudotas acetoinas (3.1 lentelė). Tai leidžia daryti išvadą, kad fermentas oksiduoja tik vieną simetrinio alkoholio – 2,3-butandiolio hidroksigrūpę.

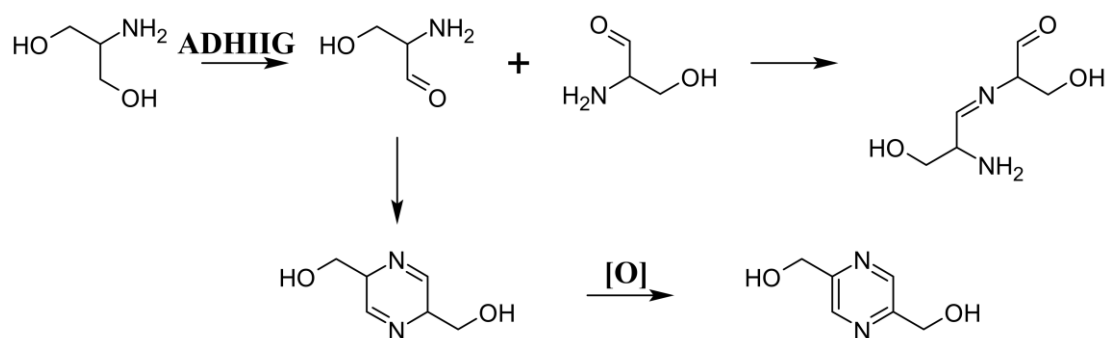


3.8 pav. ADH IIG iš *P. putida* HK5 katalizuojama alkoholio oksidacija.

Fermentų imobilizavimas dažnai padeda užtikrinti ilgesnį jų veikimą, leidžia fermentus panaudoti keletą kartų, o kartais yra pasikeitusio substratinio specifiškumo priežastis (Durán et al., 2002). ADH IIG buvo kovalentiškai per glutaro aldehidą imobilizuota ant silikagelio granulių. Nustatyta, kad beveik visais tirtais atvejais ADH IIG santykinis aktyvumas po imobilizacijos šiek tiek išaugo. Šį efektą galėjo lemti fermento konformaciniai pokyčiai imobilizacijos metu susidarant kovalentiniams ryšiams tarp fermento ir glutaro aldehido.

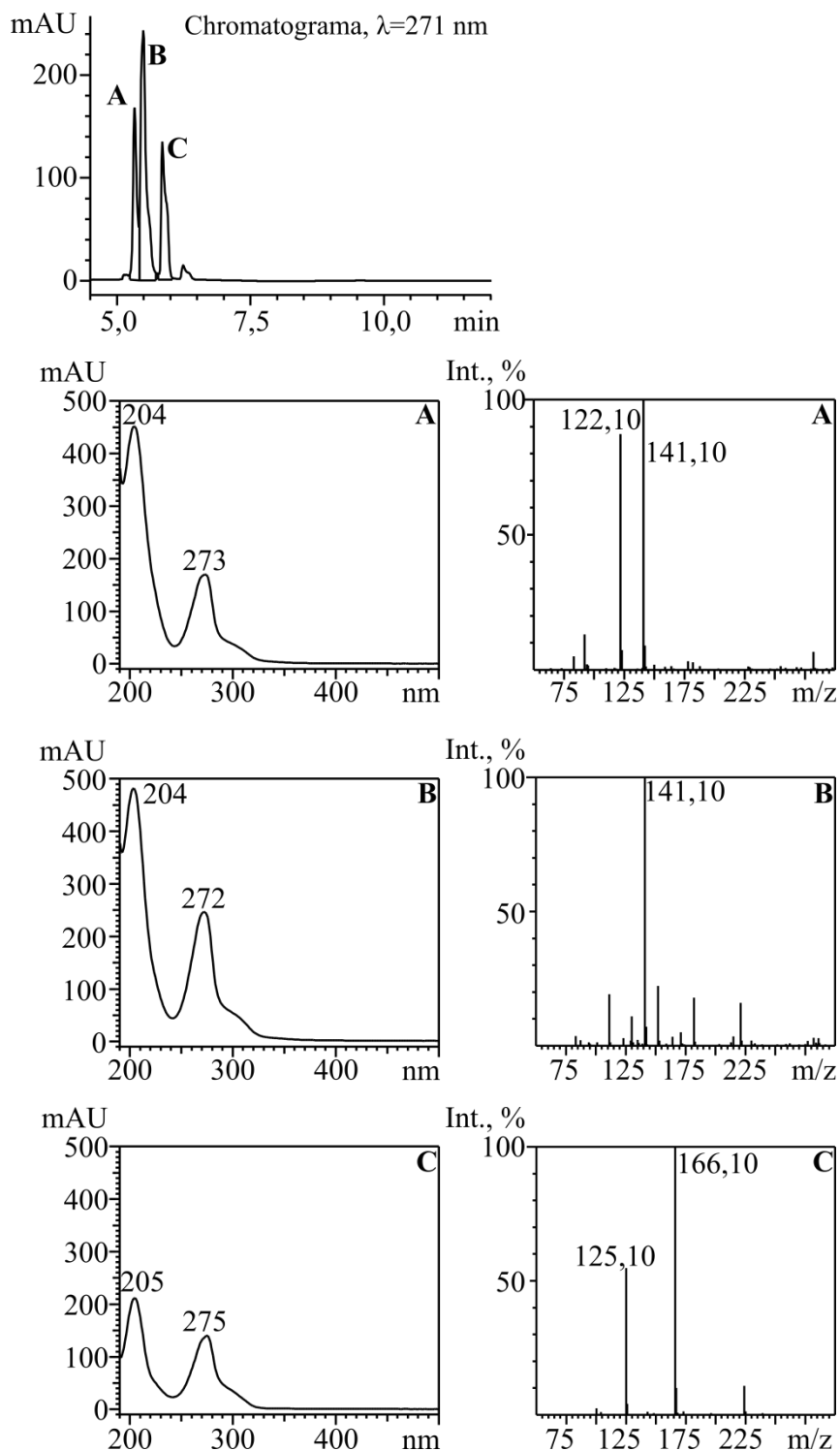
ADH IIG katalizuoja 2-amino-1,3-propandiolio oksidaciją iki 2-amino-3-hidroksipropanolio. Aminokarboniliniai junginiai yra labai nestabilūs. Literatūroje aprašyta klasikinė pirazinų sintezės schema, kai tarpusavyje kondensuojantis dviems  $\alpha$ -aminokarboniliniams junginiams susidaro 3,6-dihidropirazinas, kuris švelniomis sąlygomis oksiduojasi iki pirazino. Ši sintezės schema praktiškai sunkiai įgyvendinama, nes aminokarbonilinis

pirmtakas komerciškai nėra prieinamas (Eicher ir Hauptmann, 2003). Tikėtina, kad katalizuojant ADH IIG iš 2-amino-1,3-propandiolio susidaręs 2-amino-3-hidroksipropanalis gali kondensuotis, susidarant 2,5-dihidroksimetilpirazinui (3.9 pav.). Neatmetama ir 2-amino-3-hidroksipropanolio polimerizacijos tikimybė.



3.9 pav. Galimų 2-amino-1,3-propandiolio transformacijų schema, pradinę reakciją katalizuojant *P. putida* HK5 ADH IIG. 1 – (E)-2-(2-amino-3-hidroksipropilidenamino)-3-hidroksipropanalis, 2 – 2,5-dihidroksimetilpirazinas.

Siekdami išsiaiškinti, kas susidaro 2-amino-3-hidroksipropanolio spontaninių virsmų metu, reakcijos mišinį po oksidacijos analizavome HPLC-MS sistemoje (3.10 pav.). Junginius išskirsčius 0,1 % skruzdžių rūgšties-acetonitrilo gradientu „Hydrosphere C18“ kolonėlėje, chromatogramoje buvo matomos trys dominuojančios smailės. Visų šių smailių sugerties spektrai labai panašūs. Chromatogramoje matyti, kad A ir B junginių sulaikymo trukmė mažai skiriasi (3.10 pav.), todėl šių junginių sugerties spektrai gali būti persidengę. Iš masių spektrometrijos duomenų akivaizdu, kad A smailėje yra dvi medžiagos, kurių molekulinio jono  $[M+H]^+$  masės atitinkamai lygios 122,10 ir 141,10. B smailėje yra grynas junginys, kurio molekulinė masė lygi 141,10. C smailėje esančio junginio molekulinio jono  $[M+H]^+$  masė lygi 125,10. Matomas ir šio junginio agregatas su acetonitrilu ( $[M+ACN+H]^+=166,10$ ). A smailės pirmąjį molekulinį joną galima priskirti 2-amino-2-hidroksimetilpropano-1,3-diolui, geriau žinomam Tris pavadinimu,



3.10 pav. Reakcijos mišinio po 2-amino-1,3-propandiolio oksidacijos ADH IIG chromatograma bei smailių UV sugerties spektrai ir molekuliųjų jonų  $[M+H]^+$  detekcijos duomenys. Analizė atlikta HPLC-MS sistemoje.

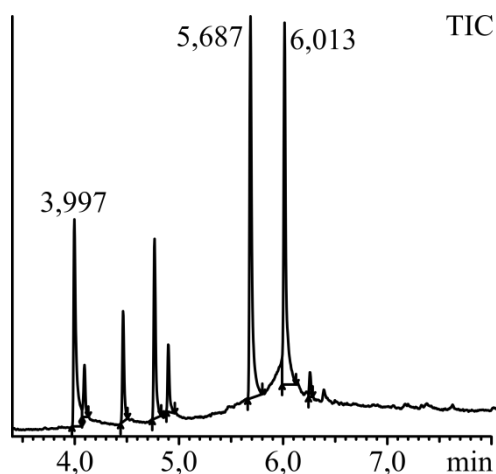
kuris buvo pagrindinė naudotos buferinės sistemos sudedamoji dalis. Tuo tarpu antrasis molekulinis jonas, esantis A ir B smailėse atitinka protonizuoto 2,5-dihidroksimetilpirazino molekulinę masę. Trečiojo junginio molekulinę masę



16 Da mažesnė nei 2,5-dihidroksimetilpirazino masė. Norint identifikuoti pastarąjį junginį reikėtų papildomų eksperimentų.

Jei 2-amino-3-hidroksiopropanalis polimerizuotųsi, susidarytų produktas, kurio molekulinė masė lygi 160. Visoje chromatogramoje atlikus tiek teigiamo, tiek neigiamo šio galimo produkto jonų paiešką, tokios masės junginys nebuvo aptiktas.

Lygiagrečiai HPLC-MS analizei tyrimus atlikome GC-MS sistemoje (3.11 pav.). Remiantis junginių fragmentacijos duomenimis buvo nustatyta, kad junginys, kurio užsilaikymo trukmė 3,997 min yra 2-amino-1,3-propandiolis. 5,687-tą chromatografijos minutę aptikta smailė buvo Tris, o 6,013-tą minutę smailė žymėjo junginį, kurio  $M_r=140$ . Pastarojo junginio fragmentacijos rezultatai patvirtino, kad tai alkoholis. Be to, analizė parodė, kad šis junginys turi aromatinį žiedą su dviem azoto atomais. Chromatogramoje 2-amino-3-hidroksiopropanalis nebuvo aptiktas, o tai tik patvirtino šio junginio nestabilumą.



3.11 pav. Reakcijos mišinio po 2-amino-1,3-propandiolio oksidacijos ADH IIG chromatograma, analizę atlikus GC-MS sistemoje.

Apibendrinami analizių HPLC-MS bei GC-MS sistemose rezultatus, galime teigti, kad ADH IIG iš *P. putida* HK5 katalizuoja 2-amino-1,3-propandiolio oksidaciją iki nestabilaus 2-amino-3-hidroksiopropanolio, kuris savaime kondensuojasi susidarant 2,5-dihidroksimetilpirazinui.

### 3.3. Alkoholio dehidrogenazė (TpdE) iš *Rhodococcus jostii* TMP1

Anksčiau buvo parodyta, kad TpdE iš *Rhodococcus jostii* TMP1 tetrametilpirazino skaidymo metu katalizuoja tarpinio metabolito – *N*-(3-oksobutan-2-il)acetamido – redukciją. Be to, eksperimentiškai pagrįsta, jog *tpdE* geno raiška nėra visiškai specifinė tetrametilpirazinui (Kutanovas et al., 2013). Dėl to tikėtina, kad *tpdE* raiška *R. jostii* TMP1 bakterijoje indukuojama ir vykstant kitų *N*-heterociklinių junginių skaidymui. Pastaroji hipotezė bei naujų ir efektyvių biokatalizatorių trūkumas paskatino atlikti detalesnę TpdE biocheminę analizę.

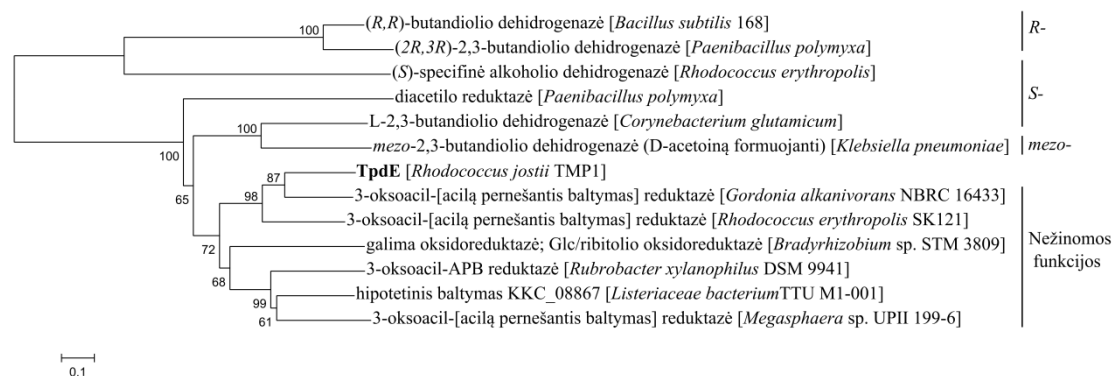
#### 3.3.1. Bioinformatinė TpdE analizė

Atlikus baltymo TpdE aminorūgščių sekos analizę paaiškėjo, kad baltymas yra panašiausias į 3-oksoacil-[acilo grupę pernešančius baltymus] reduktazes (3.12 pav.). Visgi, visų aptiktų TpdE sekos homologų funkcijos eksperimentiškai nėra patvirtintos iki šiol. Fermento sekos analizė parodė, kad šis baltymas turi NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup> surišimo domeną – Rosmano sanklodą, būdingą trumpų grandinių dehidrogenazių/reduktazių šeimai. TpdE N-gale (15–22 aminorūgštys) aptiktas konservatyvus sekos regionas Thr-Gly-Gly-Ser-Arg-Gly-Ile-Gly. Iš literatūros duomenų žinoma, kad ši SDR šeimai būdinga Gly turtinga seka (Thr-Gly-X<sub>3</sub>-Gly-X-Gly) priklauso kofermento rišimosi regionui (Oppermann et al., 2003). Kiti TpdE sekoje aptikti dažni SDR sekų motyvai yra Asn-Asn-Ala-Gly (94–97 aminorūgštys), pavienis Asp69, pavienis Asn119, Pro191-Gly192, po kurio eina konservatyvus Thr196. Šių aminorūgščių funkcijos buvo išaiškintos ir plačiai aprašytos, atlikus chemines modifikacijas, sekų palyginimus, struktūrų analizes bei vietai specifinius pakeitimus (Oppermann et al., 2003; Filling et al., 2002; Oppermann et al., 1997). Anksčiau išvardinti konservatyvūs sekos motyvai tretinėje SDR struktūroje priskiriami trims fermento vietoms: kofermento rišimosi regionui

su centrine  $\beta$  klostė – tipinei Rosmano sanklodai, aktyviam centrai ir substrato rišimosi regionui.

Atlikus TpdE palyginamąją analizę su žinomos struktūros SDR šeimos atstovais (Filling et al., 2002; Oppermann et al., 2003), nustatyta, kad TpdE esantys Thr-Gly-Gly-Ser-Arg-Gly-Ile-Gly ir Asn-Asn-Ala-Gly motyvai yra svarbūs Rosmano sanklodos centrinės  $\beta$  klostės struktūros palaikymui: aminorūgščių šoninių grandinių ir pagrindinės peptidinės grandinės tarpusavio sąveikos užtikrina reikiamą kofermento orientaciją. Tuo tarpu konservatyvios aminorūgštys Asp69, Ala96 ir Thr196 bei Pro191-Gly192 motyvas tiesiogiai sąveikauja su kofermentu.

Pagal analogiją su kitomis SDR galima teigti, kad TpdE aminorūgštys Ser148, Tyr161 ir Lys165 sutaro katalizinę triadą. Paprastai katalizinėje triadoje Tyr veikia kaip katalizinė bazė, Ser stabilizuoja substratą, o Lys sąveikauja su nikotinamido riboze ir sumažina Tyr  $pK_a$  (Oppermann et al., 2003). Remiantis TpdE grandinės ilgiu bei charakteringais kofaktoriaus rišimosi ir aktyvaus centro motyvais, fermentą galima priskirti klasikinei SDR pošeimei.

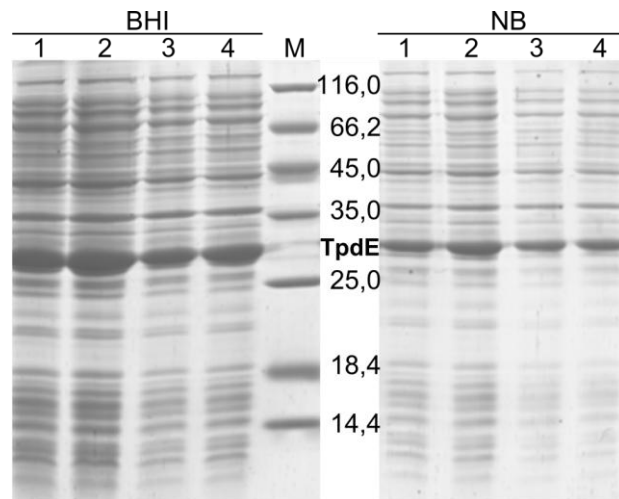


3.12 pav. TpdE iš *R. jostii* TMP1 aminorūgščių sekos giminingumo medis. Medis buvo sudarytas grupių apjungimo metodu. 0,1 – 1 aminorūgšties pakeitimas 10 aminorūgščių. Skaičiai prie šakų rodo grupių išskyrimo patikimumą procentais.

Fermento seką palyginus su žinomos funkcijos trumpų grandinių dehidrogenazių/reduktazių sekomis, buvo parodyta, kad TpdE nuo jų filogenetiškai stipriai nutolęs: sekų sutapimas ne didesnis nei 31 %.

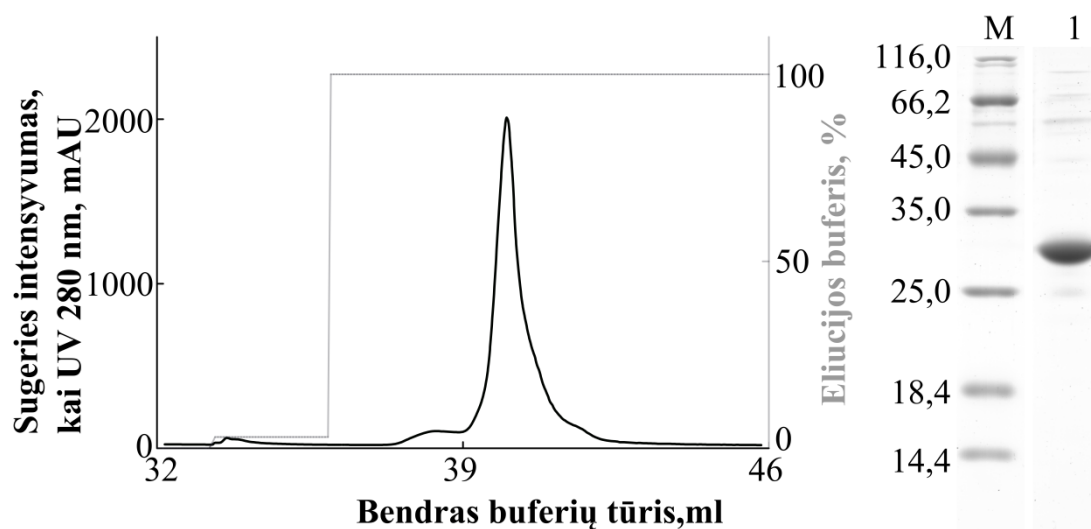
### 3.3.2. Rekombinantinės dehidrogenazės TpdE biosintezė ir gryninimas

Fermento charakterizavimui reikalingi dideli aktyviaus baltymo kiekiai. Todėl siekiant užtikrinti optimalias sąlygas *tpdE* geno raiškai, atliktas šio geno raiškos tyrimas. Metodinėje dalyje aprašytu būdu užaugintos *E. coli* BL21 (DE3) bakterijos, turinčios rekombinantinę pTpdE plazmidę (pET-21b(+)) plazmidinį vektorių, į kurį klonuotas *tpdE* genas). Norėdami sužinoti, kaip rekombinantinio baltymo TpdE sintezė priklauso nuo kultivavimo terpės sudėties, induktoriaus koncentracijos, indukcijos momento ir trukmės, atlikome keletą eksperimentų. Rezultatus analizavome baltymų elektroforezės denatūruojančiomis sąlygomis būdu. Elektroforeziškai nustatyta *tpdE* koduojamo baltymo molekulinė masė (~28 kDa) atitiko molekulinę masę, apskaičiuotą pagal baltymo seką (27,7 kDa) (3.13 pav.). Buvo nustatyta, kad daugiausiai aktyvaus baltymo susintetinama, kai ląstelės auginamos BHI terpėje 30 °C iki OD<sub>600</sub> pasiekia 0,8, ir *tpdE* geno raiška indukuojama 0,1 mM IPTG, o biosintezė vykdoma 17 val.



3.13 pav. Rekombinantinės dehidrogenazės TpdE iš *R. jostii* TMP1 biosintezės *E. coli* BL21 (DE3) kamiene priklausomybė nuo terpės sudėties ir induktoriaus koncentracijos. TpdE biosintezė vykdyta BHI ir NB terpėse, kai IPTG koncentracija 1 – 0,05 mM, 2 – 0,1 mM, 3 – 0,2 mM, 4 – 0,5 mM. M – molekulinį masių žymuo (kDa).

Rekombinantinė dehidrogenazė TpdE buvo sintetinama su 6 His inkaru baltymo C-gale. Dėl šios priežasties jos grynimui pasirinkta giminingumo chromatografijos strategija naudojant Ni<sup>2+</sup> chelatinę kolonėlę. Po vieno gryninimo etapo pasiektas daugiau nei 80 % baltymo grynumas (3.14 pav.) ir TpdE išgryninimo laipsnis buvo 1,54 karto (3.2 lentelė).



3.14 pav. Rekombinantinio TpdE su 6 His inkaru gryninimo chromatograma ir elektroforezinis vaizdas. M – molekulių masių žymuo, 1 – TpdE po gryninimo naudojant Ni<sup>2+</sup> chelatinę kolonėlę.

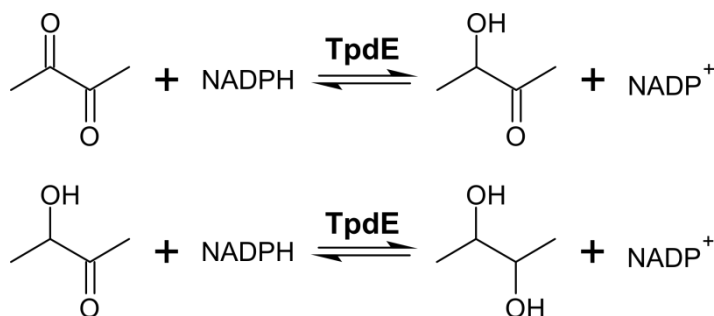
3.2 lentelė. Rekombinantinio TpdE gryninimas. Fermentas buvo gryninamas iš 1 l kultūros.

Gryninimo stadija	Bendras aktyvumas, U	Specifinis aktyvumas, U/mg	Išgryninimo laipsnis, kartais	Išeiga, %
Pradinis	7780	4052	-	-
Po Ni <sup>2+</sup> -IMAC	5933	6258	1,54	76,3

TpdE gryninimo išeiga buvo 76,3 %. Toks fermentinio aktyvumo praradimas gali būti susijęs su TpdE jautrumu gryninimo procedūroms. Kitame darbo etape išgrynintą TpdE naudojome fermento biocheminiam apibūdinimui.

### 3.3.3. Rekombinantinės dehidrogenazės TpdE katalizuojamos reakcijos eigos tyrimas ir biocheminis charakterizavimas

Žinant, kad TpdE geba redukuoti *N*-(3-oksobutan-2-il)acetamido karbonilinį deguonį, kitu galimu substratu buvo pasirinktas metaboliniuose keliuose dažnas junginys, simetrinis diketonas – diacetilas. Paaiškėjo, jog TpdE efektyviai katalizuoja diacetilo redukciją, kosubstratu naudodamas NADPH. Pastaruoju atveju liko neaišku, koks produktas – acetoinas ar 2,3-butandiolis – susidaro po diacetilo redukcijos. Norėdami tai išsiaiškinti, tyrėme, ar TpdE gali redukuoti acetoiną. Spektrofotometriškai nustatėme sugerties intensyvumo mažėjimą, kai  $\lambda=340$  nm. Tai reiškia, kad reakcijos mišinyje mažėja NADPH kiekis: NADPH oksiduojamas iki  $\text{NADP}^+$  hidridą pernešant ant karbonilinio deguonies. Taigi, remiantis šiais rezultatais galima tvirtinti, kad TpdE katalizuoja dviejų etapų diacetilo redukciją iki 2,3-butandiolio (3.15 pav.).

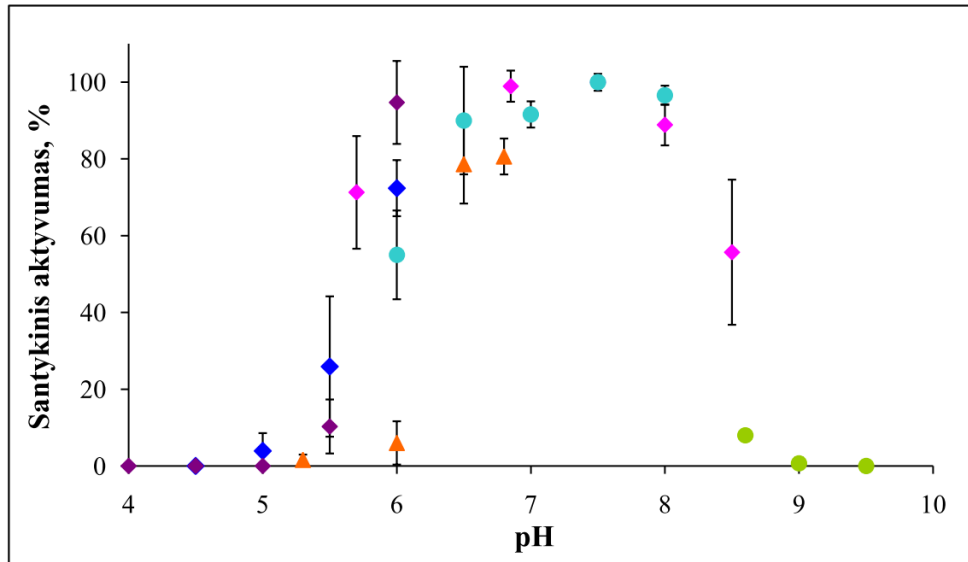


3.15 pav. Dviejų etapų diacetilo konversija iki 2,3-butandiolio katalizuojant TpdE.

TpdE aktyvumo priklausomybė nuo pH buvo nustatoma naudojant Na-citrato, Tris-HCl, Na-fosfato, Na-sukcinato, Gly-NaOH ir MES buferinius tirpalus (pH 4,0–9,5). TpdE aktyvumas matuotas 30 °C.

Rezultatų analizė parodė, kad daugiau nei 50 % aktyvumo fermentas išlaikė, kai pH buvo tarp 6,0 ir 8,0 (3.16 pav.). Didžiausias ketonų redukcijos aktyvumas nustatytas, kai buferinio tirpalo pH buvo 7,5. Iš gautų rezultatų matome, kad TpdE buvo aktyviausias reakciją vykdant Na-fosfato ir Tris-HCl buferiniuose tirpaluose. Naudojant šiuos du buferinius tirpalus matoma aiški

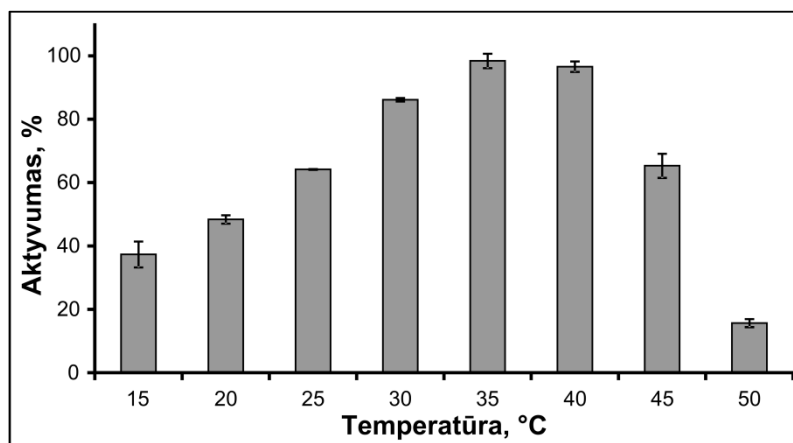
TpdE aktyvumo priklausomybė nuo pH, tuo tarpu buferio prigimtis reikšmingos įtakos aktyvumui neturėjo (3.16 pav.).



3.16 pav. TpdE aktyvumo priklausomybė nuo pH ir buferio prigimties. Aktyvumas matuotas spektrofotometriškai pagal sugerties intensyvumo mažėjimą dėl NADPH oksidacijos, kai  $\lambda=340$  nm. Antrasis substratas – diacetilas. Buferių koncentracija 50 mM. 100 % – aktyvumas, kai buferis Na-fosfato, pH=7,5. Mėlyna spalva – Na-citrato, violetinė – Na-sukcinato, rožinė – Tris-HCl, žydra – Na-fosfato, oranžinė – MES, žalia – Gly-NaOH buferiniai tirpalai.

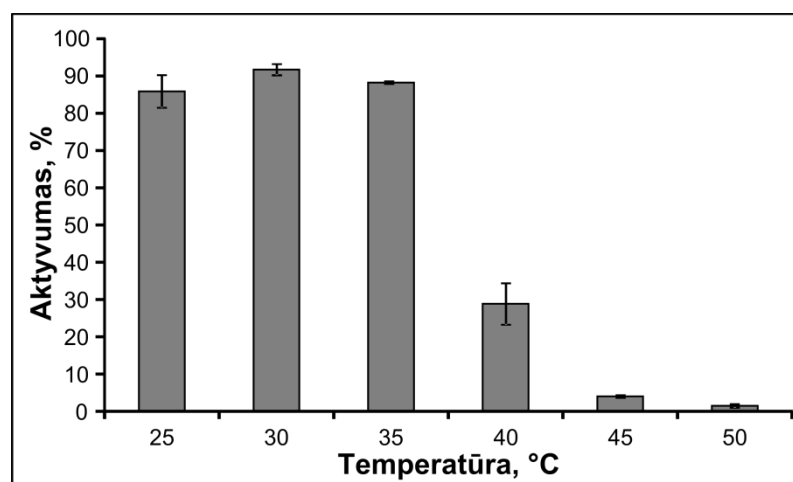
Svarbus fermentus charakterizuojantis parametras yra optimali veikimo temperatūra. Dėl to, siekdami išsamiai apibūdinti TpdE, atlikome eksperimentus, parodančius fermento aktyvumo ir stabilumo priklausomybę nuo temperatūros.

3.17 paveiksle pateikti rezultatai rodo, kaip fermento aktyvumas keitėsi temperatūrų ribose nuo 15 iki 50 °C. Didžiausiu aktyvumu TpdE pasižymėjo, kai reakcija vykdyta 35–40 °C temperatūroje. Toliau keliant temperatūrą pastebėtas staigus aktyvumo verčių sumažėjimas, kuris, greičiausiai, susijęs su natyvios baltymo struktūros praradimu.



3.17 pav. TpdE aktyvumo priklausomybė nuo temperatūros. Aktyvumas matuotas esant skirtingoms temperatūroms fosfato buferiniame tirpale (50 mM, pH 7,2).

Rekombinantinio TpdE termostabilumas stebėtas 25–50 °C temperatūrų intervale (3.18 pav.). Kai prieš vykdant reakciją fermento pavyzdžiai buvo inkubuojami 25, 30 ar 35 °C temperatūroje, šis inkubavimas jo aktyvumui pastebimos įtakos neturėjo. Tais atvejais, kai fermentas inkubuotas 40 °C, jis netekdavo net 71 % aktyvumo, o 45 °C ir aukštesnė temperatūra beveik visiškai inaktyvuodavo TpdE. Reiškia, šis baltymas yra jautrus aukštesnei nei 35 °C temperatūrai: įvyksta negrįžtamas natyvaus TpdE denatūravimas.



3.18 pav. TpdE stabilumo priklausomybė nuo temperatūros. Stabilumui nustatyti fermentas 10 min inkubuotas fosfato buferiniame tirpale, likęs aktyvumas matuotas 30 °C.



Apibendrinus temperatūros įtaką rekombinantinio TpdE aktyvumui ir stabilumui, galima teigti, kad optimali fermento veikimo temperatūra yra 30–35 °C. Esant aukštesnei temperatūrai reakcija vyksta greičiau, tačiau fermentas yra nestabilus, todėl didesnis greitis nekompensuoja aktyvumo nuostolių, atsiradusių dėl baltymo denatūracijos.

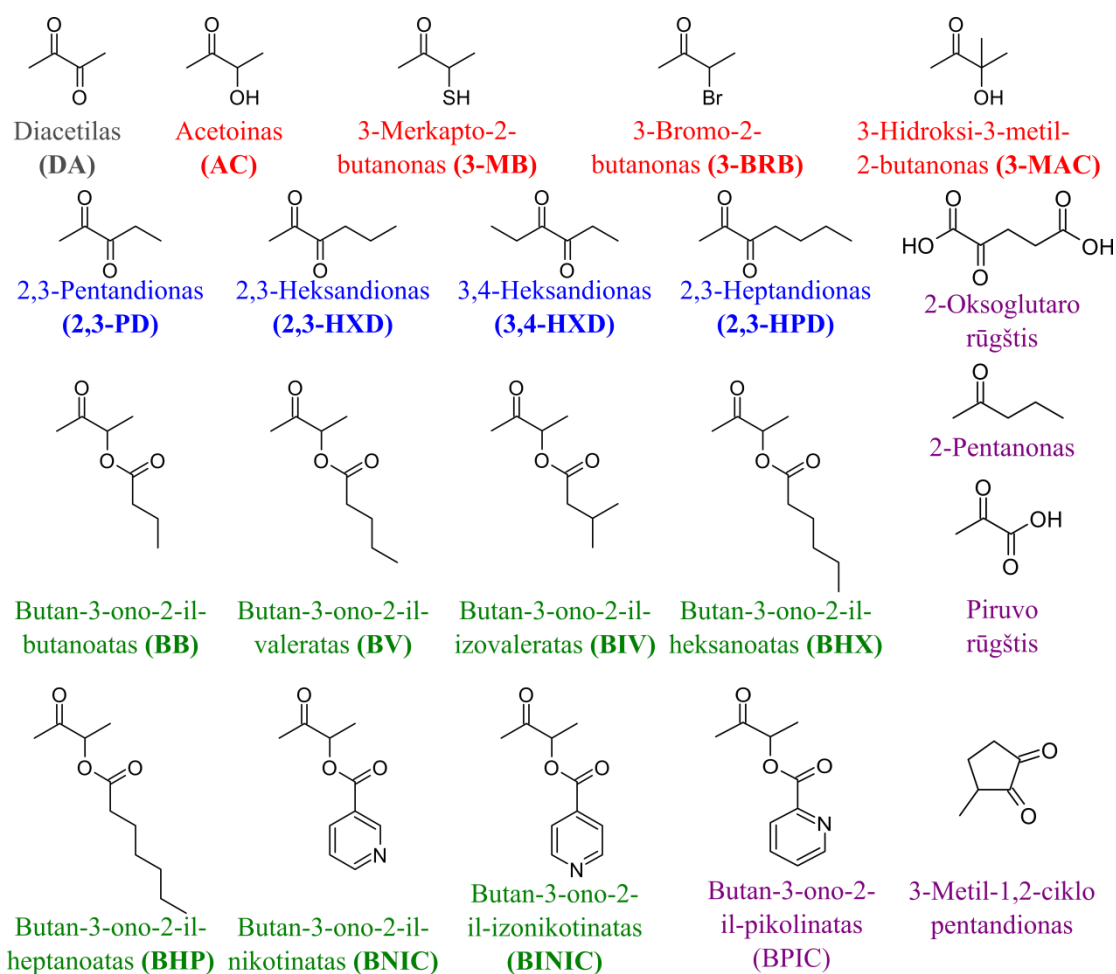
### **3.3.4. TpdE substratinio specifiškumo nustatymas**

Labai svarbi fermento savybė – substratinis specifiškumas, dar vadinamas savitumu. Dėl to buvo įdomu išsiaiškinti, ar TpdE gali redukuoti platesnį substratų spektrą. Pirmiausiai kaip potencialūs TpdE substratai buvo patikrinti įvairaus ilgio 2,3-diketonai (3.19 pav.). Atsižvelgdami į tai, kad fermentas geba redukuoti diacetilą, reakciją su šiuo substratu prilyginome 100 % aktyvumui. Paaiškėjo, kad TpdE gali redukuoti 2,3-pentandioną, 2,3-heksandioną ir 2,3-heptandioną. Gautų rezultatų analizė parodė, kad kuo ilgesnė buvo diketono C- grandinė, tuo lėčiau vyko reakcija (3.20 pav.).

Kitame rekombinantinio TpdE substratinio specifiškumo tyrimų etape siekėme sužinoti, ar ketogrupių padėtis substrato grandinėje svarbi TpdE katalizės greičiui. Dėl to TpdE aktyvumą matavome, kai reakcijos mišinyje buvo 10 mM 3,4-heksandiono. 3.20 paveiksle matome, kad 3,4-heksandiono redukcija vyko nežymiai lėčiau nei 2,3-heksandiono, todėl galime teigti, kad ketogrupių padėtis substrate nedaro reikšmingos įtakos diketonų redukcijos greičiui katalizuojant TpdE. Taip pat nustatyta, jog tam, kad vyktų katalizė nepakanka vienintelės ketogrupės grandinėje: TpdE negalėjo redukuoti 2-pentanono.

Nustatę, kad TpdE gali redukuoti įvairius linijinius diketonus, nusprendėme patikrinti, ar šis fermentas katalizuoja reakcijas su cikliniais diketonais. Galimu substratu pasirinkome 3-metil-1,2-ciklopentandioną (3.19 pav.). Stebint spektrofotometriškai jokio sugerties intensyvumo mažėjimo (kai  $\lambda=340$  nm), susijusio su NADPH oksidacija, neužfiksavome. Tai reiškia, kad tiriamas fermentas neredukuoja ciklinių diketonų.

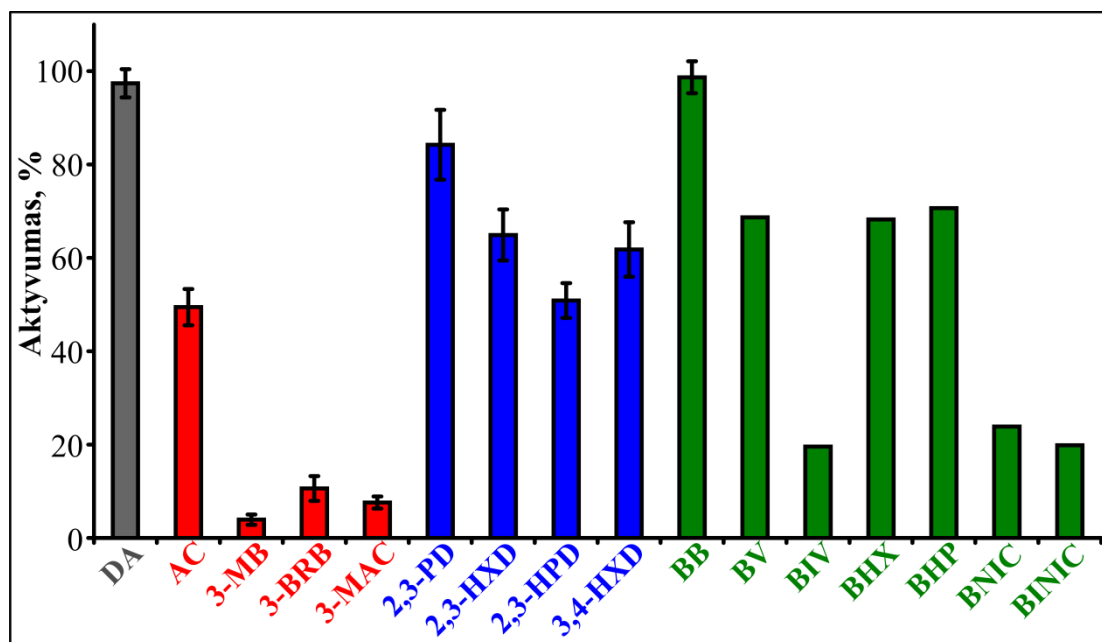
Reakcija su piruvo rūgštimi irgi nevyko. Vadinasi, diacetile vienos iš metilo grupių pakeitimas į hidroksigrupę yra kritinis fermento aktyvumui. 2-Oksoglutarato rūgštis taip pat nebuvo tinkamas TpdE substratas. Tikėtina, kad junginyje esanti karboksigrupė trukdo tinkamam substrato priartinimui ir orientavimui TpdE aktyviame centre.



3.19 pav. Junginiai, naudoti kaip potencialūs rekombinantinio TpdE iš *R. jostii* TMP1 substratai. Raudona spalva žymi aciloinus, mėlyna – diketonus, žalia – esterius, pilka diacetilą. Violetine spalva išskirti junginiai, kurių redukcija nevyksta katalizuojant TpdE.

Žinodami, kad TpdE dviem stadijomis vykdo diacetilo redukciją (pirmiausiai iki acetoino, ir tuomet iki 2,3-butandiolio), nusprendėme patikrinti skirtingų aciloinų redukcijos galimybes (3.19 pav.). 3-Hidroksi-3-metil-2-butanonas nuo acetoino skiriasi tuo, kad 3-pozicijoje turi papildomą metilo grupę. Kai šis junginys naudotas kaip TpdE substratas, reakcija vyko 7,5 karto

lėčiau nei acetoino atveju. Tuo tarpu, kai vietoje acetoino hidroksigrupės, junginio struktūroje buvo merkapto (3-merkapto-2-butanonas) arba bromo pakaitas, nustatytas TpdE santykinis aktyvumas atitinkamai lygus vos 3,9 % ir 10,6 % (3.20 pav.).



3.20 pav. Įvairių substratų redukcija naudojant rekombinantinį TpdE iš *R. jostii* TMP1. Raudona spalva žymi aciloinus, mėlyna – diketonus, žalia – esterius, pilka – diacetilą. TpdE aktyvumas matuotas fosfato buferiniame tirpale (50 mM, pH 7,2), esant 0,2 mM NADPH ir 10 mM atitinkamo substrato. 100 % – aktyvumas, kai substratu naudotas diacetilas.

*N*-(3-oksobutan-2-il)acetamidas, kurio redukciją TpdE efektyviai katalizuoja *R. jostii* TMP1 bakterijose tetrametilpirazino skaidymo metu, turi vieną karbonilo ir vieną esterinę grupes. Remdamiesi šia informacija nusprendėme patikrinti, ar TpdE gali redukuoti butan-3-ono-2-il-butanoatą (3.19 pav.). Paaiškėjo, kad reakcija su šiuo junginiu vyksta. Negana to, TpdE aktyvumas esant 10 mM esterio buvo 98,7±3,4 % (3.20 pav.). Natūraliai kilo noras patikrinti TpdE katalizės galimybes naudojant ir kitokius butan-3-ono-2-il- esterius, tačiau susidūrėme su problema: nebuvo komerciškai prieinamų junginių.

Pagal metodinėje dalyje pateiktą schemą buvo susintetinti keli esterių variantai: šakotas butan-3-ono-2-il-izovaleratas bei skirtingo ilgio linijiniai

butan-3-ono-2-il- valeratas, heksanoatas ir heptanoatas (dr. D. Tauraitė, R. Ražanas) (3.19 pav.). TpdE aktyvumas su visais linijiniais esteriais buvo panašus ir siekė ~69 %, o aktyvumas su izovaleratu tebuvo 19,8 % (3.20 pav.). Vadinasi, šakotumas esterio grandinėje neigiamai veikia tiriamo fermento aktyvumą.

Naudojantis ta pačia sintezės schema buvo gauti dar trys potencialūs TpdE substratai: butan-3-ono-2-il-nikotinas, butan-3-ono-2-il-izonikotinas ir butan-3-ono-2-il-pikolinas. Kai reakcijos mišinyje buvo nikotinato ir izonikotinato esteriai, TpdE aktyvumas buvo atitinkamai lygus 23,9 % ir 19,9 %. Tuo tarpu reakcijos mišinyje esant pikolinato esteriu NADPH oksidacija nebuvo stebima, reiškia, šis esteris nebuvo redukuojamas. Pastarieji rezultatai leidžia manyti, kad piridino žiede esančio azoto padėtis pakaitų atžvilgiu yra lemiamą TpdE gebėjimui katalizuoti reakciją.

Išanalizavus rekombinantinio TpdE substratinį specifiškumą, galima teigti, kad fermentas gali redukuoti skirtingo ilgio linijinius 2,3-diketonus, įvairius aciloinus ir butan-3-ono-2-il- esterius. Tokia didelė substratų įvairovė yra privalumas, siekiant platesnio fermento pritaikymo.

### **3.3.5. Rekombinantinės TpdE *in vitro* kinetinių parametru įvertinimas**

TpdE kinetinius parametrus įvertinome matuodami pradinio reakcijos (ketogrupės redukcijos) greičio priklausomybę nuo įvairių substratų koncentracijos, esant fiksuotai NADPH koncentracijai. Ši priklausomybė buvo hiperbolinė, todėl jai glodinti pritaikyta Michaelio-Menten lygtis.  $K_M$  ir  $k_{kat}$  vertės pateiktos 3.3 lentelėje.

TpdE specifiškumo konstanta  $k_{kat}/K_M$  buvo didžiausia, kai substratu naudotas butan-3-ono-2-il-butanoatas. 2,3-Diketonų  $K_M$  vertės kito priklausomai nuo grandinės ilgio: mažiausia  $K_M$  vertė buvo 2,3-pentandiono atveju, ilginant substrato grandinę  $K_M$  vertės didėjo. Tokia pati tendencija išliko ir apskaičiavus specifiškumo konstantų vertes. Vadinasi, ilgesnės nei 2,3-pentandiono grandinės diketonai pasižymi mažesniu giminingumu TpdE.

3.3 lentelė. TpdE kinetiniai parametrai pagal substratų ketogrupės redukciją. Matavimų paklaidos neviršijo 15 %.

Substratas	$K_M$ , mM	$k_{kat}$ , s <sup>-1</sup>	$k_{kat}/K_M$ , mM <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup>
Diacetilas	1,9±0,3	6140±292	3232±439
2,3-Pentandionas	0,98±0,2	5702±351	4027±1082
2,3-Heksandionas	2,2±0,4	5263±234	2414±380
2,3-Heptandionas	6,9±0,9	5263±229	763±86
3,4-Heksandionas	3,3±0,6	4386±205	1329±205
Butan-3-ono-2-il-butanoatas	0,76±0,1	22456±760	29548±4092
Acetoinas	5,0±0,3	4094±317	822±94
3-Hidroksi-3-metil-2-butanonas	14,6±4,0	2807±205	192±41
3-Merkapto-2-butanonas	14,4±4,8	3772±439	262±59
3-Bromo-2-butanonas	3,75±0,7	5228±205	1394±205

Ketogrupių padėtis alifatinėje grandinėje reikšmingos įtakos  $K_M$  neturėjo. 3,4-Heksandiono menama  $K_M$  buvo vos 1,5 karto didesnė nei 2,3-heksandiono. Pastarojo diono  $k_{kat}$  buvo 17 % didesnė nei atitinkamo 3,4-diketono. Galiausiai, apskaičiuotos šių substratų specifiškumo konstantos skyrėsi beveik du kartus. Dėl to, galima teigti, kad ketogrupių padėtis yra svarbi TpdE substratų giminingumui su fermentu: 2,3-diketonai yra geresni substratai nei to paties grandinės ilgio 3,4-diketonai.

Acetoino specifiškumo konstanta buvo ~4 kartus mažesnė, nei diacetilo. Tai reiškia, kad fermentas teikia pirmenybę diketonams, o ne aciloinams. Acetoino kinetinius parametrus palyginome su kelių aciloinų atitinkamais įverčiais. 3-Hidroksi-3-metil-2-butanonas nuo acetoino skiriasi trečioje pozicijoje esančia metilo grupe. Pasirodė, kad dėl papildomos metilo grupės substrato  $K_M$  vertė padidėjo 2,9 karto. Tai lėmė reikšmingą šio substrato giminingumo TpdE aktyviam centrui sumažėjimą. Panaši tendencija buvo ir 3-merkapto-2-butanono atveju. Vadinasi, merkapto grupė daro neigiamą įtaką

substrato giminingumui. Kai substratu naudotas 3-bromo-2-butanonas, specifiškumo konstanta acetoino atžvilgiu išaugo 1,7 karto. Taigi, trečioje pozicijoje esantis bromas yra geresnė funkcinė grupė nei hidroksigrupė.

### 3.3.6. TpdE Arg19Thr taškinio mutanto konstravimas ir tyrimas

Anksčiau parodėme, kad TpdE yra labai specifinis kofermentui NADPH (Kutanovas et al., 2013). Šis kofermentas yra TpdE kosubstratas: kai ketogrupė redukuojama, NADPH oksiduojamas. Dėl šios priežasties vykdamas *in vitro* biokatalizę būtina užtikrinti nuolatinį NADPH tiekimą. NADPH yra brangus, todėl praktikoje taikomos jo regeneravimo sistemos arba keičiamas fermento specifiškumas (iš NADPH į NADH) tikslingai mutuojuant kofermento surišimo sritį (Kamerbeek et al., 2003; Leisch et al., 2011).

TpdE konservatyvią NADPH surišimo sritį palyginome su žinomos struktūros nuo  $\text{NAD}^+$  priklausomos D-3-hidroksibutirato dehidrogenazės iš *Pseudomonas fragi* kofermento surišimo sritimi (Ito et al., 2006). Struktūros analizė parodė, kad su  $\text{NAD}^+$  adenozino riboze sąveikauja D-3-hidroksibutirato dehidrogenazės Thr hidroksigrupė. Tuo tarpu TpdE atitinkamoje pozicijoje yra argininas.

Šiame darbo etape siekėme sukonstruoti TpdE Arg19Thr mutantą ir nustatyti mutanto savitumą kofermentui. Mutantinio TpdE Arg19Thr konstravimui buvo naudojami R19TF ir R19TR pradmenys. Gautas PGR produktas buvo klonuojamas į pTZ57R/T vektorių. Iš teigiamų klonų skirta plazmidinė DNR, ir, atlikus hidrolizę restrikcijos endonukleazėmis *NcoI* ir *XhoI*, fragmentas klonuotas į pET-28b(+) raiškos vektorių. Atlikta gautų klonų su plazmide sekoskaita ir įsitikinta, kad pavyko gauti tikslinį TpdE Arg19Thr mutantą. Šio mutantinio baltymo sintezei naudotas *E. coli* BL21 (DE3) kamienas. TpdE Arg19Thr baltymas buvo sintetinamas tomis pačiomis sąlygomis kaip ir TpdE.

TpdE Arg19Thr sintezės efektyvumui vienos aminorūgšties pakeitimas įtakos neturėjo: susintetinti panašūs kaip ir TpdE baltymo kiekiai. Vis dėlto,

nei beląsteliniame ekstrakte su mutantiniu baltymu, nei išgrynintame preparate nuo NADH priklausomo fermento aktyvumo nebuvo užfiksuota. Apskritai, Arg pakeitimas į Thr inaktyvavo baltymą, tad aktyvumo nebuvo ir su įprastu kofermentu NADPH.

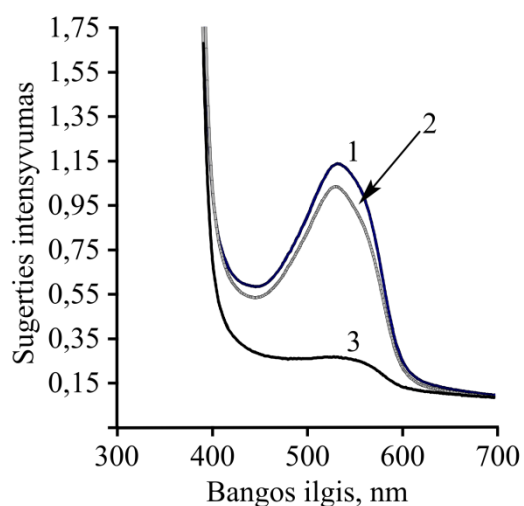
Apsvarsčius ir įvertinus gautus rezultatus, galime teigti, kad Arg yra svarbus kofermento prijungimui ir orientavimui aktyviame centre. Ateityje planuojama sukonstruoti seriją TpdE mutantų, kuriuose Arg19 bus pakeistas įvairiomis aminorūgštimis.

### **3.3.7. TpdE substratų biokonversijos *in vivo* tyrimas**

Kofermento regeneracijos problemos galima išvengti biokonversijai panaudojant pilnas ląsteles su tiksliniu biokatalizatoriumi. Tokiu atveju ląstelės pačios atlieka kofermento regeneravimo funkciją. Taigi, buvo svarbu ir įdomu išsiaiškinti, ar diketonų redukciją galima vykdyti *in vivo* naudojant *E. coli* BL21 (DE3) pTpdE ląsteles.

Šiame darbo etape *E. coli* BL21 (DE3)/pTpdE ląstelės užaugintos ir pTpdE raiška indukuota optimalioms fermento biosintezei sąlygomis. Siekiant atsikratyti terpės likučiais, surinkta kultūra du kartus plauta 0,9 % NaCl tirpalu. Tuomet ląstelės suspenduotos 50 mM kalio fosfato buferiniame tirpale, pH=7,2. 20 ml terpės užauginta kultūra suspenduota 10 ml buferio. Į ląstelių suspensiją pridėta 2 mM diacetilo ir 0,1 g gliukozės. Biokonversijos eiga stebėta spektrofotometriškai pagal diacetilo suvartojimą, jį prieš tai modifikavus metodinėje dalyje aprašytu būdu.

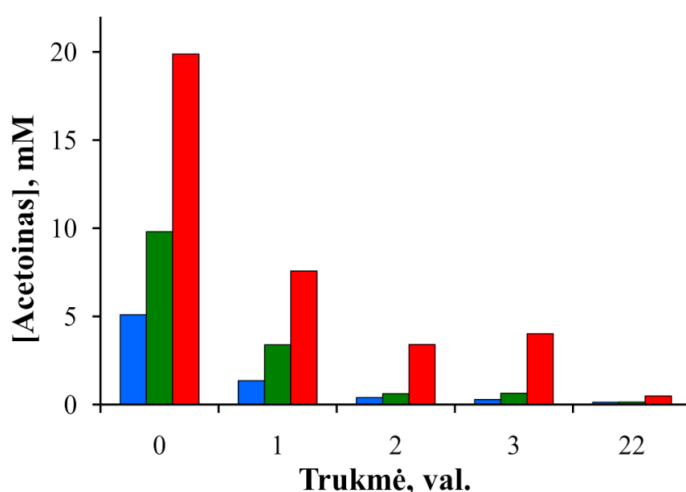
Kaip matyti 3.21 paveiksle, praėjus 18 val. nuo eksperimento pradžios, reakcijos mišinyje diacetilo beveik neliko. Vadinasi, *E. coli* BL21 (DE3) pTpdE ląstelės gali būti panaudojamos šio substrato redukcijai iki 2,3-butandiolio.



3.21 pav. Diacetilo konversija *E. coli* BL21 (DE3)/pTpdE ląstelėse. Prieš rašant sugerties spektrus diacetilas derivatizuotas  $\alpha$ -naftoliu. 1 – pradinė diacetilo sugertis, 2 – kontrolinis mėginys, diacetilas inkubuotas 18 val. 50 mM kalio fosfato buferiniame tirpale, pH=7,2, be ląstelių, 3 – diacetilas su ląstelėmis buferyje inkubuotas 18 val.

Lygiagrečiai biokonversijos tyrimus atlikome TpdE substratais naudodami 2,3-pentandioną, 2,3-heksandioną ir 2,3-heptandioną. Visais tirtais atvejais substratų sunaudojimo profilis buvo panašus kaip ir diacetilo atveju. Atlikę šiuos eksperimentus, sužinojome, kad 2,3-pentandiono, 2,3-heksandiono ir 2,3-heptandiono konversiją galima vykdyti *in vivo* naudojant *E. coli* BL21 (DE3) pTpdE ląsteles.

Indukuotas *E. coli* BL21 (DE3) pTpdE ląsteles naudojome ir acetoino biokonversijos tyrimui (3.22 pav.). Šio substrato redukciją stebėjome, kai



3.22 pav. Acetoino biokonversija *in vivo*, naudojant indukuotas *E. coli* BL21 (DE3)/pTpdE ląsteles. Acetoinas nustatytas spektrofotometriškai pagal kolorimetrinę reakciją su  $\alpha$ -naftoliu ir kreatinu. Mėlyna spalva žymi atvejį, kai pradinė acetoino koncentracija 20 mM, žalia – kai 10 mM, raudona – kai 20 mM.



pradinė jo koncentracija reakcijos mišinyje buvo 5 mM, 10 mM ir 20 mM. Reakcijos eigą sekėme spektrofotometriškai, pagal acetoino koncentracijos mažėjimą bėgant laikui. Eksperimento kontroliavimui pasirinkome atitinkamus acetoino kiekius ir juos inkubavome buferyje be ląstelių bei su *E. coli* BL21 (DE3) ląstelėmis be TpdE.

Išanalizavus gautus rezultatus, paaiškėjo, kad visais trimis atvejais naudojant indukuotas *E. coli* BL21 (DE3)/pTpdE ląsteles vyksta visiška acetoino konversija. Greičiausiai jis buvo redukuojamas, kai pradinė junginio koncentracija buvo 20 mM (3.22 pav.). Apibendrinus paaiškėjo, kad 2,3-butandiolio sintezę galima vykdyti iš diacetilo arba acetoino naudojant *E. coli* BL21 (DE3) ląsteles su TpdE baltymu.

### 3.3.8. 2,3-Diketonų redukcijos produktų identifikavimas

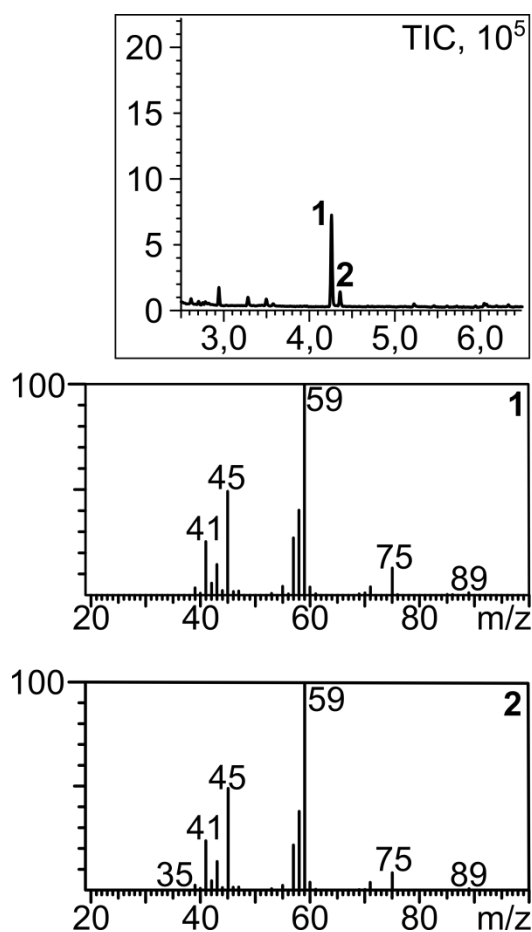
Anksčiau buvo parodyta, kad simetrinis diketonas – diacetilas – redukuojamas dviem etapais iki 2,3-butandiolio. Nustačius, kad TpdE substratais gali panaudoti įvairus linijinius 2,3- ir 3,4-diketonus, tapo įdomu, ar ir šiais atvejais TpdE katalizuoja dviejų etapų redukciją.

Įvairių diketonų konversiją vykdėme, naudodami *E. coli* BL21 (DE3) pTpdE ląsteles. Nei analizuoti substratai, nei susidarę produktai neturėjo charakteringų UV-Vis spektrų. Be to, masių spektrometrijos metu jie nesijonizavo naudojant ESI ar APCI jonizacijos šaltinius. Dėl to įvairių diketonų konversijos produktai tirti GC-MS sistema.

Pirmiausiai atlikome palyginamąją substrato 2,3-pentandiono analizę, kuri parodė, kad šis junginys fragmentuojasi į du dominuojančius jonus,  $m/z$  43 ir  $m/z$  57. Šių fragmentų masių suma lygi 100 Da ir atitinka 2,3-pentandiono molekulinę masę.

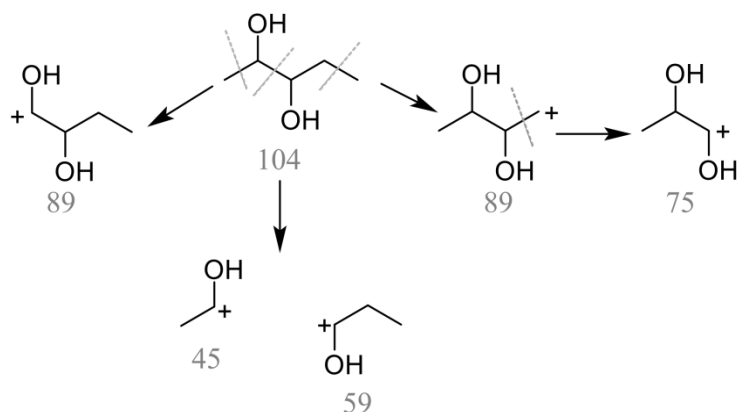
Kitos analizės metu siekėme identifikuoti 2,3-pentandiono konversijos, naudojant TpdE, produktus. Po 2,3-pentandiono redukcijos susidarė vienas dominuojantis produktas, kuris fragmentavosi į  $m/z$  45 ir  $m/z$  59 jonus (3.23 pav.). Šių fragmentų masių suma lygi 104 ir atitinka butandiolio molekulinę

masę. Taip pat nustatyta, kad fragmentacijos eigoje susidarė minoriniai jonai, kurių  $m/z$  atitinkamai lygūs 41, 75 ir 89.



3.23 pav. Produktų, susidariusių po 2,3-pentandiono redukcijos TpdE, chromatograma ir molekūlių fragmentų detekcijos duomenys. Analizė atlikta GC-MS sistemoje.

Remdamiesi visais GC-MS analizės duomenimis, sudarėme produkto fragmentacijos schemą, kuri padėjo identifikuoti reakcijoje susidariusį junginį (3.24 pav.). Patvirtinta, kad TpdE katalizuoja abiejų 2,3-pentandiono ketogrupių redukciją ir susidaro 2,3-pentandiolis.



3.24 pav. 2,3-Pentandiolio fragmentacijos schema. Skaičiai po fragmentais žymi jų masės ir krūvio santykį ( $m/z$ ).

Taip pat atlikome 2,3-heksandiono, 3,4-heksandiono ir 2,3-heptandiono bei šių TpdE substratų redukcijos produktų GC-MS analizes. 2,3-Heksandionas skilo į du pagrindinius jonus, kurių  $m/z$  43 ir 71, o jonų masių suma atitiko analizuojamo junginio molekulinę masę ( $M=114$ ). Po reakcijos susidarė vienas dominuojantis produktas. Jo fragmentai  $m/z$  45 ir 73 atitiko atvejį, kai susidarė 2,3-heksandiolis. Simetrinio substrato – 3,4-heksandiono molekulė skilo į du vienodus jonus, kurių  $m/z$  57. Susidariusio reakcijos produkto fragmentacija atitiko simetrinio junginio fragmentacijos modelį: nustatytas vienas pagrindinis jonas, kurio  $m/z$  59. Vadinasi, TpdE gali redukuoti abi 3,4-heksandiono ketogrupes ir susidaro 3,4-heksandiolis. Atlikus 2,3-heptandiono analizę, paaiškėjo, kad charakteringų fragmentų  $m/z$  buvo 43 ir 85, o redukcijos produkto  $m/z$  – 45 ir 87. Tai leidžia teigti, kad galutinis reakcijos produktas – 2,3-heptandiolis.

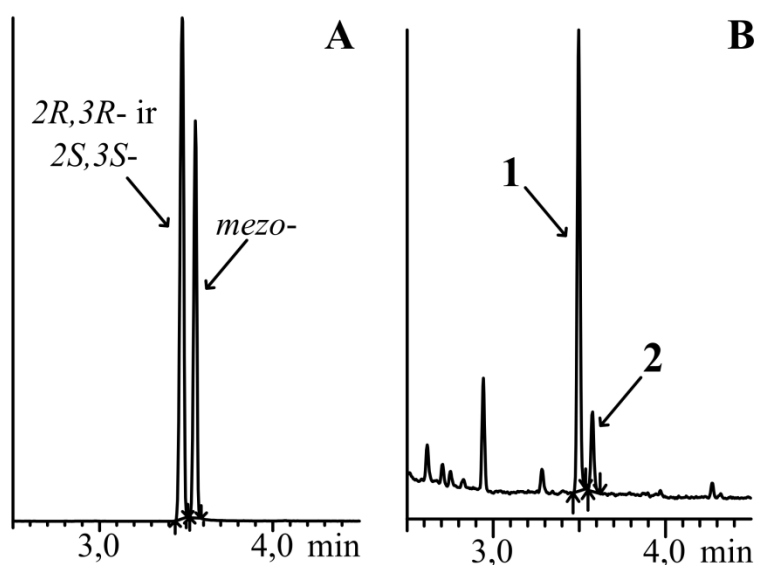
Apibendrinus visus TpdE reakcijos produktų identifikavimo rezultatus, tapo aišku, jog šis fermentas katalizuoja įvairaus ilgio 2,3-dionų ir 3,4-heksandiono redukciją iki atitinkamų diolių.

### 3.3.9. Rekombinantinės TpdE iš *R. jostii* stereoselektyvumo tyrimas

Visais atvejais GC chromatogramose greta pagrindinių produktų smailių pastebėjome dar esant mažesnes, kurių molekulės fragmentavosi identiškai 1-

osioms. 3.23 paveiksle šios smailės pažymėtos 1 ir 2. Toks pastebėjimas leido manyti, kad chromatografijos metu galėjo atsiskirti 2,3-diolių stereoizomerai. Remdamiesi paskutiniu pastebėjimu iškėlėme hipotezę, jog TpdE yra stereoselektyvus fermentas.

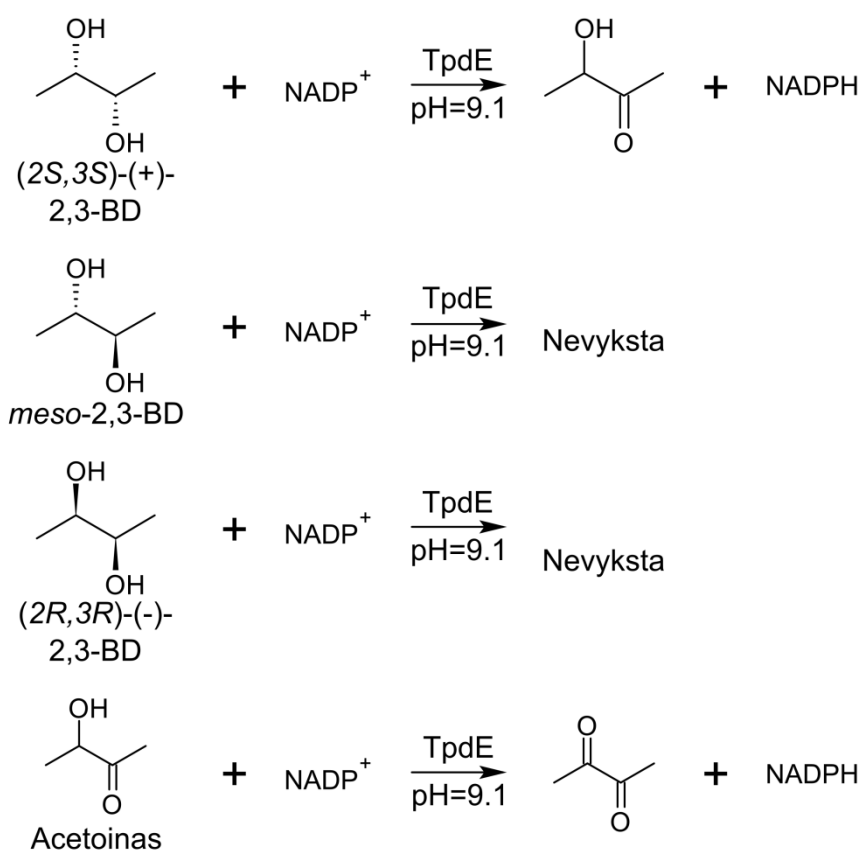
2,3-Butandiolis yra simetrinis junginys ir turi tris enantiomeras: *2S,3S*, *2R,3R* ir *mezo*. GC-MS sistemoje analizavome grynus ir visais galimais deriniais sumaišytus enantiomeras. Taip išsiaiškinome, kad *2S,3S* ir *2R,3R* enantiomerų smailės GC-MS chromatogramoje persidengia, o *mezo* enantiomeras atsiskiria (3.25 pav. A). Šia informacija pasinaudojome analizuodami diacetilo biokonversiją *E. coli* BL21 (DE3) pTpdE ląstelėmis susidarant 2,3-butandioliiui (3.25 pav. B).



3.25 pav. 2,3-Butandiolio chromatograma. A – 2,3-butandiolio enantiomerų standartai, B – diacetilo konversijos *E. coli* BL21 (DE3)/pTpdE ląstelėmis produktai – 2,3-butandiolio enantiomerai. Analizė atlikta GC-MS sistemoje.

Remiantis standartų užsilaikymo kolonėlėje trukme buvo nustatyta, kad chromatogramoje pirmoji smailė atitinka *2S,3S* ir *2R,3R* enantiomeras, o antroji – *mezo*. Pirmos ir antros smailių plotų santykis buvo 6 ir 1. Taigi, TpdE dirba stereoselektyviai, nes *mezo*-2,3-butandiolio susidaro palyginus maži kiekiai.

Vis dėlto, iš chromatogramų negalima atsakyti, ar reakcijos metu susidaro grynai 2*S*,3*S*-, 2*R*,3*R*-enantiomerai, ar šių enantiomerų mišinys. Dėl šios priežasties, tirdami TpdE stereoselektyvumą, nusprendėme išanalizuoti grįžtamąją reakciją: diolių oksidaciją iki diketonų. Substratais naudojome visus tris 2,3-butandiolio enantiomerus ir acetoiną. Reakcijas vykdėme 50 mM natrio bikarbonatiniame buferyje, kai pH buvo 9,1. Reakcijų eigą sekėme spektrofotometriškai pagal NADP<sup>+</sup> redukciją. Produkto susidarymas stebėtas su vieninteliu butandioliu – (2*S*,3*S*)-(+)-2,3-butandioliu bei acetoinu (3.26 pav.). Nepaisant to, kad reakcija su (2*S*,3*S*)-(+)-2,3-butandioliu buvo 8,7 karto lėtesnė nei su acetoinu, galima teigti, jog TpdE stereoselektyviai katalizuoja diketonų redukciją iki optiškai aktyvių *S,S*-diolių.



3.26 pav. TpdE stereoselektyvumo tyrimas 50 mM natrio bikarbonatiniame buferyje, pH=9,1, substratais naudojant 2,3-butandiolio enantiomerus.

Įvertinus TpdE platų substratinį specifiškumą ir stereoselektyvumą, šis fermentas yra patrauklus katalizatorius chiralinių alkoholių sintezei asimetrinės ketonų redukcijos būdu.

### **3.4. *Burkholderia* sp. MAK1 – vertingas biokatalizatorius įvairių hidroksilintų piridino darinių sintezei**

Selektyvus aromatinio žiedo hidroksilinimas yra vis dar labai sudėtingas organinės sintezės uždavinys. Tuo tarpu biokatalizė yra potencialus įrankis įvairių piridinolių sintezei. Yra žinoma, kad aerobinėmis sąlygomis alkilintų piridinių ir pirazinių metabolizmas bakterijose prasideda aromatinio žiedo hidroksilinimu laisvoje pozicijoje. Tokias reakcijas katalizuoja katabolinės oksidoreduktazės, kurios galėtų būti pritaikomos regioselektyviam *N*-heterociklų hidroksilinimui (Kutanovas et al., 2013; Sun et al., 2014).

Šioje darbo dalyje tyrėme įvairių piridinių transformacijas biokatalizatoriumi naudodami gyvas ląsteles, o ne gryną fermentą. Darbui pasirinktas *Burkholderia* sp. MAK1 kamienas, kuris atrinktas mūsų skyriuje ankstesnių tyrimų metu (Gasparavičiūtė, 2008).

#### **3.4.1. 2-Hidroksipiridino biokonversijos tyrimas**

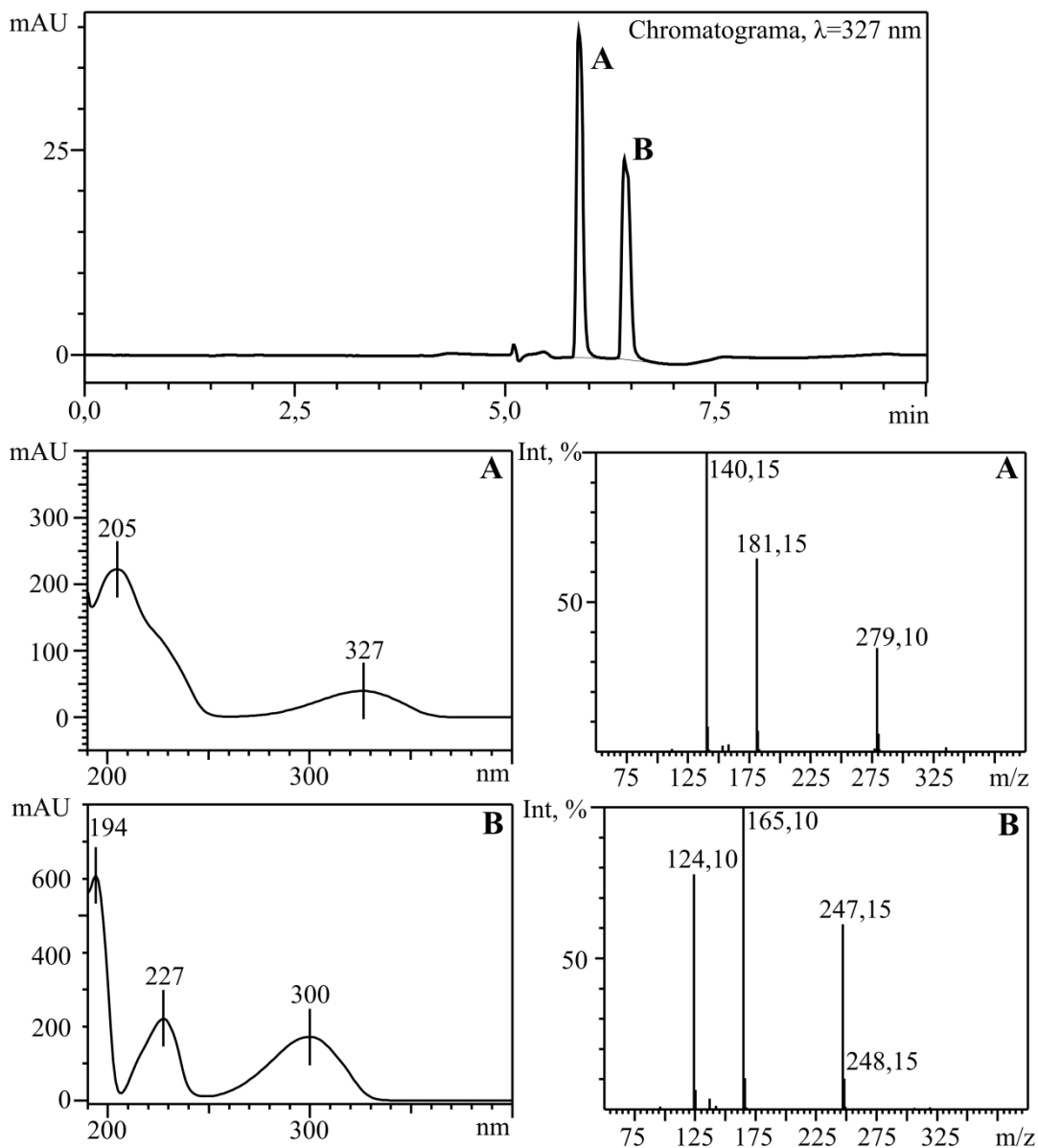
Buvo manoma, kad *Burkholderia* sp. MAK1 bakterijos skaido 2-hidroksipiridiną susidarant 2,5-dihidroksipiridinui, o pastarąjį junginį atakuoja žiedą atidarančios dioksigenazės. Norėdami tai įrodyti, ląsteles auginome terpėje su 2-hidroksipiridinu. Pastebėjome, kad didėjant bakterijų kiekiui terpė imdavo žalsvėti, vėliau spalva išnykdavo. Antra vertus, kai ląstelės augintos be šio junginio, terpės spalva nesikeitė. Vadinasi, žalio pigmento susidarymas susijęs su 2-hidroksipiridino skaidymu. 2-Hidroksipiridinu indukuotos bakterijos buvo inkubuojamos 50 mM kalio fosfato buferiniame tirpale su 2-hidroksipiridinu metodinėje dalyje aprašytu būdu. Tuomet atlikta pavyzdžio HPLC-MS analizė ir nustatyta, kad laikui bėgant substrato nebelieka. Kadangi

chromatogramoje neaptikta net tarpinio produkto pėdsakų, galima teigti, kad jis greitai skaidomas atidarant žiedą. Literatūroje yra duomenų, kad terpėje kaupiantis 2,5-dihidroksipiridinui atsiranda žalia spalva (Behrman ir Stanier, 1957; Karvelis et al., 2012). Taigi, galima spėti, kad *Burkholderia* sp. MAK1 bakterijų monooksigenazė pirmiausiai katalizuoja 2-hidroksipiridino hidroksilinimą penktoje pozicijoje.

Kai *Burkholderia* sp. MAK1 bakterijos buvo užaugintos terpėje be 2-hidroksipiridino, šio junginio skaidymas nevyko. Tai reiškia, jog 2-hidroksipiridino 5-monooksigenazė yra indukuojama 2-hidroksipiridinu.

#### **3.4.2. N-Alkil-2-hidroksipiridinų transformacija, kai katalizatorius – *Burkholderia* sp. MAK1 bakterijos**

Kitame etape tyrėme *Burkholderia* sp. MAK1 2-hidroksipiridinu indukuojamos monooksigenazės substratinį specifiškumą. Žinodami, kad šios bakterijos lengvai transformuoja 2-hidroksipiridiną, potencialiais substratais pasirinkome jo *N*-alkilintus darinius. Ląsteles kalio fosfato buferiniame tirpale su pasirinktu junginiu inkubavome 20 valandų. Reakcijos eigą stebėjome naudodami tandeminę HPLC-MS sistemą. 3.27 paveiksle pateikti *N*-etil-2-hidroksipiridino konversijos *Burkholderia* sp. MAK1 ląstelėmis analizės duomenys. Reakcijos mišinį išskirsčius 0,1 % skruzdžių rūgštis–acetonitrilo gradientu, chromatogramoje buvo matomos dvi dominuojančios smailės.



3.27 pav. *N*-Etil-2-hidroksipiridino transformacijos *Burkholderia* sp. MAK1 ląstelėmis chromatograma bei smailių UV sugerties spektrai ir molekulinio jono  $[M+H]^+$  detekcijos duomenys. Analizė atlikta HPLC-MS sistemoje.

Gautų rezultatų analizė parodė, jog pradinio junginio smailė laikui bėgant mažėjo. Tai reiškia, kad šios ląstelės vykdė *N*-etil-2-hidroksipiridino transformaciją. Be to, susidaręs produktas toliau nebuvo metabolizuojamas, o kaupėsi reakcijos mišinyje. Chromatogramoje (3.27 pav.) (A) smailė žymi naujai susidariusį junginį, (B) – *N*-etil-2-hidroksipiridiną (substratą). Palyginus su substratu, produkto UV sugerties spektras ~30 nm pasislinkęs į tolimesnių bangų sritį, o tokia įtaka būdinga hidroksigrūpei. (A) smailės molekulinio jono

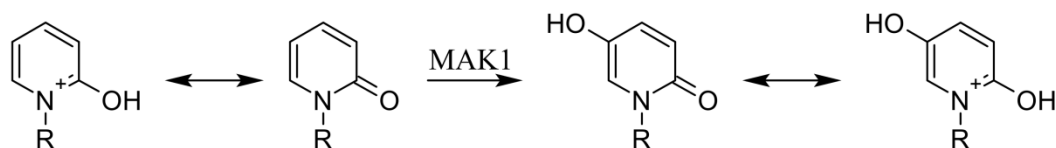


$[M+H]^+$  masė lygi 140,15 ir yra 16 Da didesnė nei pradinės medžiagos. Masių spektre taip pat matomas šio junginio aduktas su acetonitrilu ( $[M+ACN+H]^+=181,15$ ) bei dimerinė forma ( $[2M+H]^+=279,10$ ). Molekulinio jono masės padidėjimas patvirtino, jog *N*-etil-2-hidroksipiridinas buvo hidroksilintas.

Tokie patys eksperimentai atlikti, kai substratais naudoti *N*-metil-2-hidroksipiridinas, *N*-propil-2-hidroksipiridinas ir *N*-butil-2-hidroksipiridinas. Iš gautų rezultatų paaiškėjo, jog *Burkholderia* sp. MAK1 ląstelės transformuoja *N*-metil-2-hidroksipiridino ir *N*-propil-2-hidroksipiridino aromatinius žiedus iki galutinių hidroksilintų produktų. Tuo tarpu *N*-butil-2-hidroksipiridinas po inkubavimo su bakterijomis liko nepakitęs. Vadinasi, šis junginys nėra *Burkholderia* sp. MAK1 substratas. Greičiausiai, *N*-butil grupė yra per didelė tinkamam substrato orientavimui fermento aktyviame centre.

Visais atvejais konversijos buvo vykdomos naudojant 2-hidroksipiridinu indukuotas ląsteles. Kai *N*-alkilpiridiniai inkubuoti buferyje su neindukuotomis ląstelėmis, junginiai nebuvo transformuojami. Tai leidžia manyti, kad už *N*-alkilpiridinių hidroksilinimą atsakingas tas pats fermentas, kuris katalizuoja 2-hidroksipiridino transformaciją.

Pagal analogiją 2-hidroksipiridinui galima daryti išvadą, kad šios bakterijos *N*-alkilintus 2-hidroksipiridinus hidroksilina 5-oje padėtyje (3.28 pav.).



3.28 pav. *N*-alkil-2-hidroksipiridino transformacijos *Burkholderia* sp. MAK1 ląstelėmis schema. R=CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>.

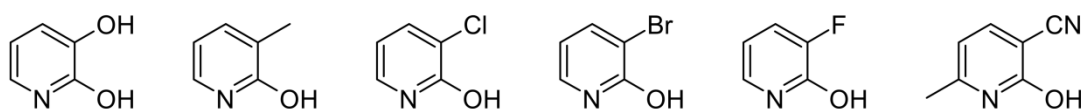
Įsitikinome, kad nedidelė *N*-alkil grupė netrukdo 2-hidroksipiridino hidroksilinimui, tačiau būtent dėl pakaito šioje pozicijoje nebevyksta hidroksilinto piridino aromatinio žiedo atidarymas. Taigi, atlikus *N*-alkil-2-hidroksipiridinių transformacijos *Burkholderia* sp. MAK1 bakterijomis tyrimus,

paaiškėjo, kad šios bakterijos yra tinkamas biokatalizatorius *N*-alkil-2,5-dihidroksipiridinių sintezei.

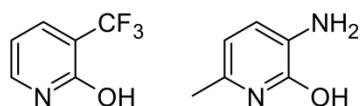
### 3.4.3. 2-Hidroksipiridinių, turinčių pakaitus trečioje padėtyje, transformacija *Burkholderia* sp. MAK1 ląstelėmis

*Burkholderia* sp. MAK1 ląsteles inkubavome buferiniame tirpale su piridino dariniais, turinčiais hidroksigrupę antroje padėtyje ir įvairius pakaitus trečioje padėtyje. Kai 2-hidroksipiridino trečioje pozicijoje buvo hidroksi-, metilo, chloro, bromo ar fluoro grupė (3.29 pav.), po inkubavimo substrato visiškai nelikdavo. Tuo tarpu medžiagas tą patį laiką inkubavus buferyje be ląstelių, žymių kiekybinių pokyčių neužfiksuota. Tai reiškia, kad junginių neliko ne dėl spontaninių procesų, bet dėl ląstelių veiklos. 3-Trifluormetil-2-hidroksipiridinas buvo lėtai transformuojamas susidarant galutiniam produktui, kurio molekulinė masė 16 Da didesnė nei pradinio junginio. Tuo tarpu junginių, trečioje padėtyje turinčių karboksi- arba metoksi- grupes *Burkholderia* sp. MAK1 nesugebėjo transformuoti.

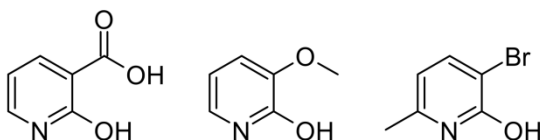
Substratas nyksta



Substratas nyksta, produktas kaupiasi



Reakcija nevyksta



3.29 pav. 2-Hidroksipiridinių, turinčių įvairius pakaitus trečioje padėtyje, transformacija *Burkholderia* sp. MAK1 ląstelėmis.

Apibendrinus šiuos rezultatus ir juos palyginus su *N*-alkil-2-hidroksipiridinių transformacijos rezultatais (3.4.2. skyrius) galima teigti, kad 3-čioje padėtyje esantys pakaitai netrukdo nei junginių hidroksilinimui, nei

piridino žiedo atidarymui. Tik tuomet, kai 3-čioje padėtyje yra erdviškai didelė grupė, pvz., 3-trifluormetil-, po hidroksilinimo susidaręs produktas nemetabolizuojamas.

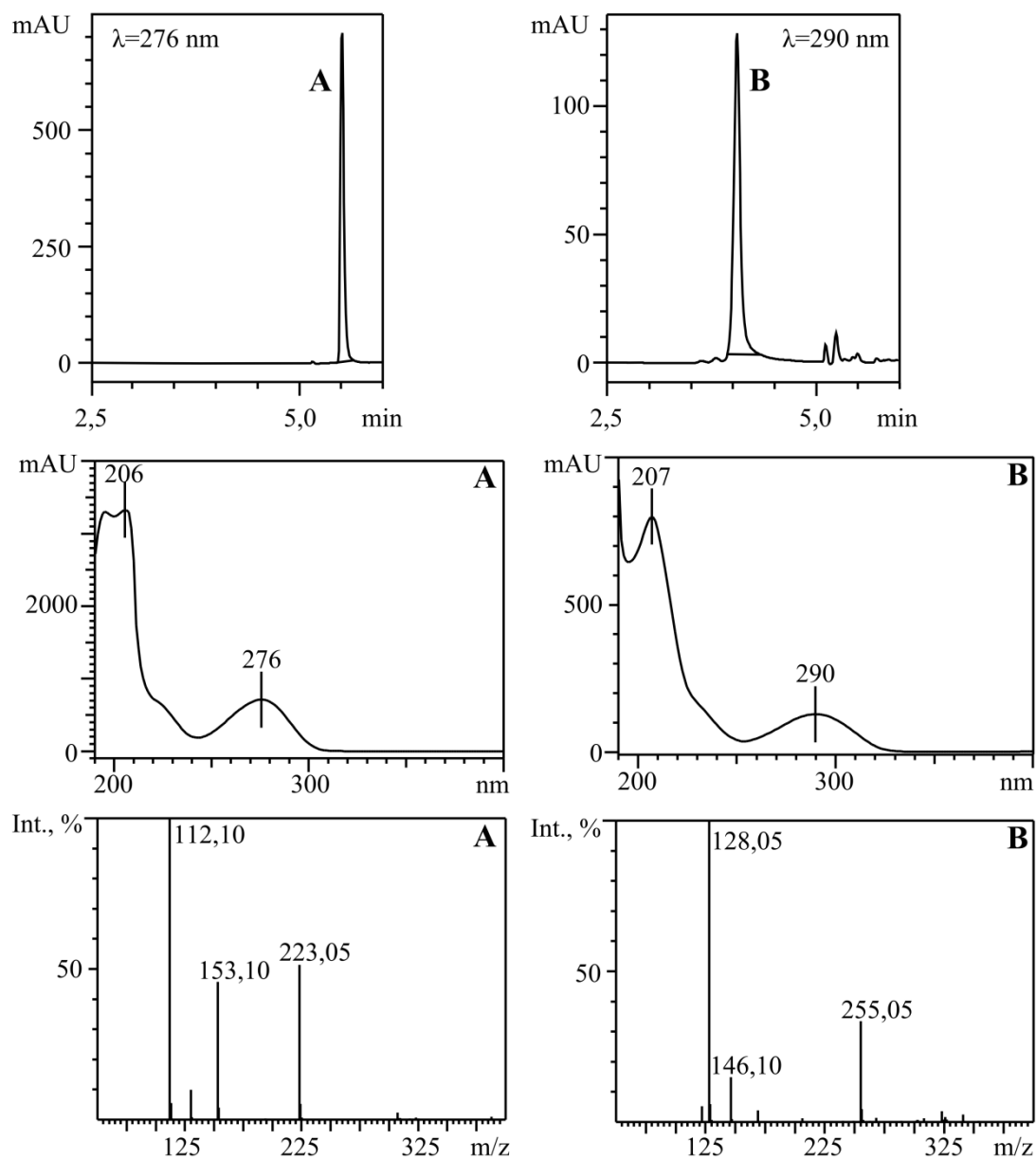
Išsiaiškinus, kad *Burkholderia* sp. MAK1 ląstelės sėkmingai hidroksilina 2-hidroksipiridinus su pakaitais 3-čioje padėtyje, tapo įdomu, ar jos gali transformuoti 2-hidroksipiridinus, turinčius pakaitus 3-čioje ir 6-toje padėtyse (3.29 pav.). Pastarieji rezultatai buvo labai įvairūs. Pavyzdžiui, 3-ciano-6-metil-2-hidroksipiridiną ląstelės lėtai metabolizavo: atlikus HPLC-MS analizę užfiksuotas pradinio junginio mažėjimas, o naujų augančių smailių neatsirado. 3-Amino-6-metil-2-hidroksipiridino atveju substrato smailė chromatogramoje mažėjo ir atsirado nauja, kurios molekulinė masė buvo 278. Pradinės medžiagos molekulinė masė – 124, todėl tikėjomės aptikti junginį, kurio  $M_r=140$ , t. y. 16 Da didesnė nei pradinio. Toks didelis molekulinės masės skirtumas, tikriausiai, buvo dėl to, kad po 3-amino-6-metil-2-hidroksipiridino hidroksilinimo 5-toje padėtyje, susidaręs junginys spontaniškai dimerizavosi iki stabilesnio produkto.

Ląsteles inkubavus su 3-bromo-6-metil-2-hidroksipiridinu, nei hidroksilinimas, nei kitokie junginio virsmai nevyko. Kadangi 3-bromo-2-hidroksipiridinas šiomis bakterijomis buvo pilnai suskaidytas, o 6-toje pozicijoje esanti metilo grupė netrukdė 3-ciano-6-metil- ir 3-amino-6-metil- 2-hidroksipiridinių hidroksilinimui, manome, kad reakcijos vyksmui su 3-bromo-6-metil-2-hidroksipiridinu trukdė 3-čioje padėtyje esanti bromo grupė.

#### **3.4.4. *Burkholderia* sp. MAK1 bakterijų panaudojimas 2-hidroksipiridinių, turinčių pakaitus ketvirtoje arba/ir šeštoje padėtyse, hidroksilinimui**

Ištyrus 1-oje ir 3-čioje padėtyse pakaitus turinčių 2-hidroksipiridinių konversijos galimybes *Burkholderia* sp. MAK1 ląstelėmis, beliko išsiaiškinti, ar šis mikroorganizmas gali katalizuoti 4-toje, 6-toje arba 4-toje ir 6-toje padėtyse pakaitus turinčių 2-hidroksipiridinių transformaciją.

Nustatyta, kad 2,4-dihidroksipiridiną 20 val. inkubavus buferyje su *Burkholderia* sp. MAK1, jis visiškai transformuotas (3.30 pav.). Tandeminė HPLC-MS analizė parodė, kad susidarė naujas junginys, kurio  $\lambda_{\max}$  pasislinkęs į ilgesnių bangų pusę ir buvo lygus 290 nm. Iš masių spektrometrijos duomenų sužinojome, kad substrato molekulinio katijono masė  $[M+H]^+=112,10$ . Jis taip



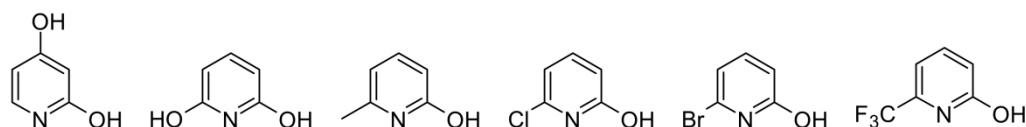
3.30 pav. 2,4-Dihidroksipiridino transformacijos *Burkholderia* sp. MAK1 ląstelėmis chromatograma, smailių UV sugerties spektrai ir molekulinų jonų  $[M+H]^+$  detekcijos duomenys. A – reakcijos mišinio analizė, kai  $t=0$  val., B – reakcijos mišinio analizė, kai  $t=20$  val. Analizės atliktos HPLC-MS sistemoje.

pat matomas, sudaręs aduktą su acetonitrilo molekule ( $[M+ACN+H]^+=153,10$ ) ir kaip dimeras ( $[2M+H]^+=223,05$ ). Tuo tarpu naujai susidariusio junginio molekulinė masė buvo 16 Da didesnė, nei substrato:  $[M+H]^+=128,05$ . Masių spektrometre jis sudarė aduktą su vandens molekule ( $[M+H_2O+H]^+=146,10$ ), ir buvo matomas dvigubas ( $[2M+H]^+=255,05$ ) (3.30 pav.).

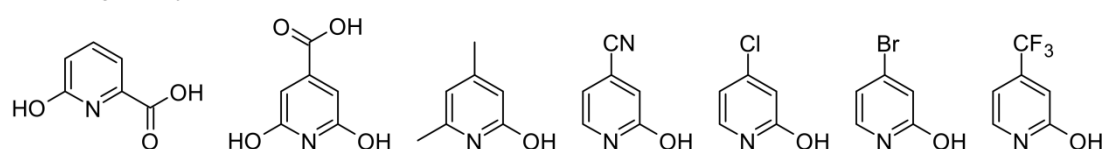
Remiantis produkto molekulinės masės verte ir UV sugerties spektro poslinkiu galima daryti išvadą, kad produktas buvo hidroksilintas: susidarė 2,4,5-trihidroksipiridinas.

Kai 2-hidroksipiridino 4-toje padėtyje buvo ne hidroksi-, o ciano-, chloro, bromo ar trifluormetilo grupė, hidroksilinimas nevyko (3.31 pav.). Vadinasi, 4-tos pozicijos pakaitas reikšmingas piridino žiedo hidroksilinimo metu: trukdo tinkamai orientuoti substratą arba erdviškai riboja reakcijoje dalyvaujančią piridino žiedo padėtį.

Substratas transformuojamas



Reakcija nevyksta



3.31 pav. 2-Hidroksipiridinių, turinčių pakaitus 4-toje, 6-toje arba 4-toje ir 6-toje padėtyse, transformacija *Burkholderia* sp. MAK1 ląstelėmis.

2,6-Dihidroksipiridinas buvo pilnai transformuojamas. Virsmų metu susidarė mėlynos spalvos pigmentas. Nors šio junginio nepavyko identifikuoti HPLC-MS sistemoje, tačiau iš literatūros duomenų žinome, kad mėlynas pigmentas susidaro dimerizuojantis 2,3,6-trihidroksipiridinui (Holmes et al., 1972). Reiškia, 2,6-dihidroksipiridinas yra hidroksilinamas *Burkholderia* sp. MAK1 ląstelių įprastoje pozicijoje. Kai 6-toje padėtyje buvo metilo, chloro, bromo ar trifluormetilo grupė, vyko ne tik piridino žiedo hidroksilinimas, bet ir tolimesis žiedo atidarymas. Prie tokios išvados buvo prieita, nes minėtais

atvejais substrato nelikdavo, o naujų produktų, turinčių charakteringus UV-Vis spektrus nesusidarydavo. Tik kai 6-toje pozicijoje buvo karboksigrupė, piridino žiedo hidroksilinimas nevyko. Karboksigrupė yra erdviškai didelė bei gali būti neigiamai įkrauta. Tai, tikriausiai, lėmė, kad biokatalizė nevyko.

*Burkholderia* sp. MAK1 4,6-dimetil-2-hidroksipiridino ir 2,6-dihidroksi-4-karboksipiridino (3.31 pav.) negalėjo transformuoti.

Apibendrinant galima teigti, kad 6-toje padėtyje esantys nedideli pakaitai netrukdo nei junginių hidroksilinimui, nei piridino žiedo atidarymui.

### **3.4.5. *Burkholderia* sp. MAK1 bakterijų gebėjimo hidroksilinti 2-aminopiridiną tyrimas**

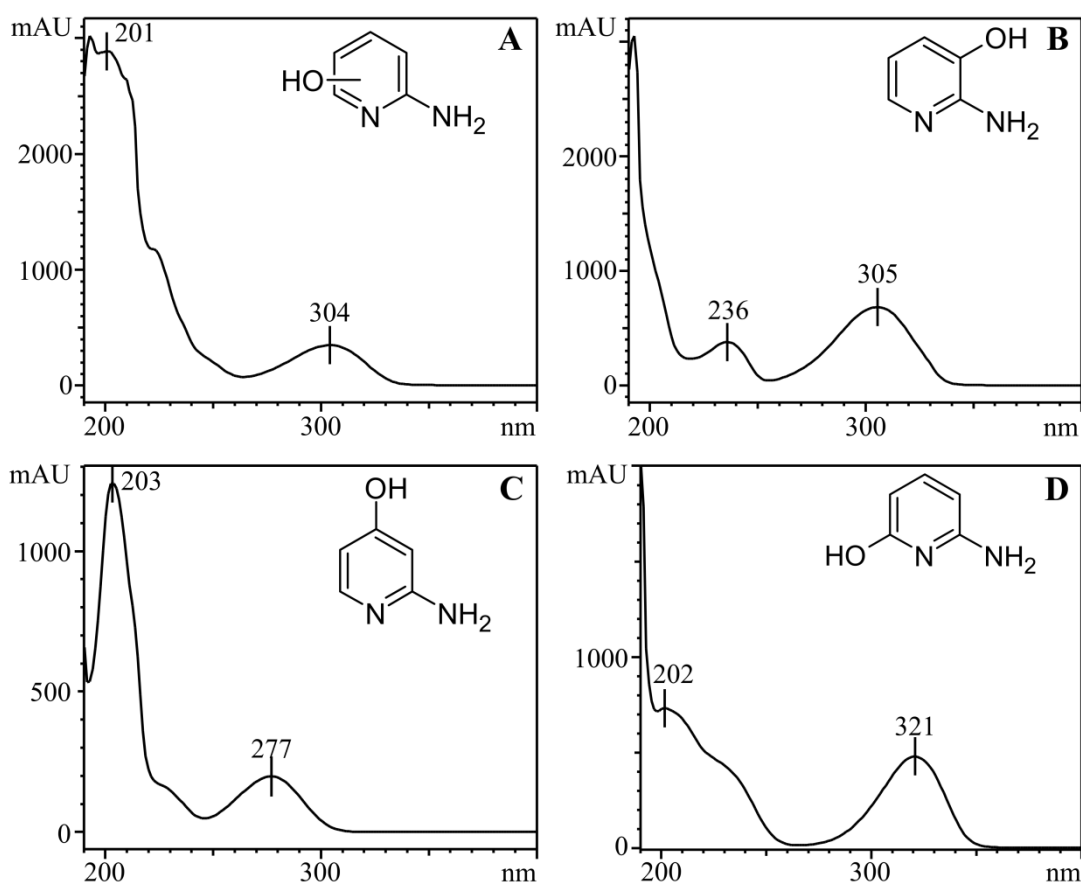
Žinodami, kad tiriamos bakterijos gali hidroksilinti 2-hidroksipiridiną ir įvairius jo darinius, nusprendėme išsiaiškinti, ar hidroksilinimas galimas, kai 2-oje padėtyje yra aminogrupė. Pirmiausiai potencialiu substratu pasirinkome 2-aminopiridiną.

Po 2-aminopiridino inkubavimo su ląstelėmis atlikus tandeminę HPLC-MS analizę, pastebėta, jog substrato smailė išnyko ir chromatogramoje atsirado nauja, kurios molekulinė masė 16 Da didesnė nei pradinio junginio. Tai reiškia, kad įvyko 2-aminopiridino hidroksilinimas ir susidaręs produktas toliau nebuvo metabolizuojamas.

Nustatyta, jog po 2-aminopiridino hidroksilinimo susiformavusio produkto UV sugerties spektrui būdingas maksimumas, kai  $\lambda=304$  nm, ir nedidelis petys, kai  $\lambda=225$  nm (3.32 pav. A). Šį spektrą palyginome su 3-čioje, 4-toje ir 6-toje padėtyse hidroksigrupę turinčių 2-aminopiridinų spektrais (3.32 pav. B–D). Pastebėjome, kad 2-amino-4-hidroksipiridinui būdingas  $\lambda_{\max}=277$  nm, o 2-amino-6-hidroksipiridino  $\lambda_{\max}$  buvo lygus 321 nm. Nežinomo junginio UV sugerties spektras buvo panašiausias į 2-amino-3-hidroksipiridino, tačiau pastarasis turėjo papildomą smailę, kai  $\lambda=236$  nm. Kadangi nei vieno iš standartų spektrai nesutapo su tiriamu produktu ir žinant, kad 2-

hidroksipiridinas hidroksilinamas į 5-tą padėtį, buvo prieita prie išvados, jog 2-aminopiridinas taip pat hidroksilinamas į 5-tą padėtį.

Buvo įdomu sužinoti, ar *Burkholderia* sp. MAK1 katalizė gali vykti, jei aromatiname žiede yra du azoto atomai. Potencialiu substratu pasirinkome 2-aminopiraziną. Po junginio inkubavimo su ląstelėmis atlikus HPLC-MS analizę paaiškėjo, jog susidaro naujas junginys, kurio molekulinė masė 16 Da didesnė nei substrato. Vadinasi, *Burkholderia* sp. MAK1 geba hidroksilinti ir 2-aminopiraziną.

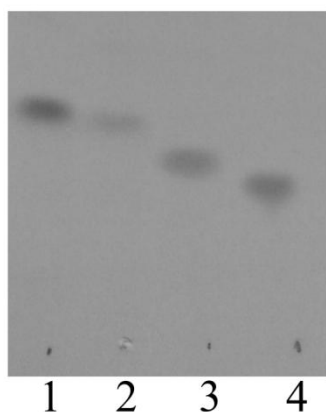


3.32 pav. Hidroksilintų 2-aminopiridinių UV sugerties spektrai. A – hidroksilintas 2-aminopiridinas, naudojant *Burkholderia* sp. MAK1 ląsteles, B – 2-amino-3-hidroksipiridinas, C – 2-amino-4-hidroksipiridinas, D – 2-amino-6-hidroksipiridinas.

Kitame tyrimų etape siekėme išsiaiškinti *Burkholderia* sp. MAK1 bakterijų gebėjimą hidroksilinti aniliną. Ląstelės buvo inkubuojamos buferiniame tirpale su šiuo junginiu. Reakcijos mišinio HPLC-MS analizė

parodė, kad susidaro produktas, kurio molekulinė masė 16 Da didesnė nei anilino. Taigi, *Burkholderia* sp. MAK1 gali hidroksilinti ir aniliną. Iš ankstesnių duomenų žinome, kad 2-aminopiridino hidroksilinimas vyksta į 5-tą padėtį. Tuo tarpu, kuri padėtis yra atakuojama, kai substrato aromatiniam žiede nėra azoto atomo, buvo neaišku. Kadangi yra trys anilino hidroksilinimo galimybės, tai *o*-, *m*- ir *p*- hidroksianilinus naudojome kaip standartus nežinomo junginio identifikavimui. HPLC-MS analizės chromatogramoje *o*- ir *m*- hidroksianilinais persidengė vienoje smailėje, o *p*-hidroksianilinas atsiskyrė. Pastarojo junginio užsilaikymo trukmė skyrėsi nuo identifikuojamo produkto. Tad *Burkholderia* sp. MAK1 bakterijos aniliną hidroksilina ne į *para* padėtį. *o*- ir *m*- hidroksianilinių UV sugerties spektrai buvo identiškai ir sutapo su nežinomo junginio spektru. Dėl to HPLC-MS analizės nepakako, kad būtų identifiкуotas produktas.

Visus hidroksianilinus išskirstėme plonasluoksnės chromatografijos būdu ir jų migravimą palyginome su bakterijomis hidroksilinto anilino. 3.33 paveiksle matome, kad plonasluoksnės chromatografijos plokštelėje atsiskyrė visi trys standartiniai junginiai, o identifiкуojamas produktas judėjo taip pat kaip *o*-hidroksianilinas. Pastarieji rezultatai neprieštaravo HPLC-MS analizės duomenims. Vadinasi, vyko ataka į *orto* padėtį benzeno žiede ir susidarė *o*-hidroksianilinas, dar vadinamas 2-aminofenoliu.



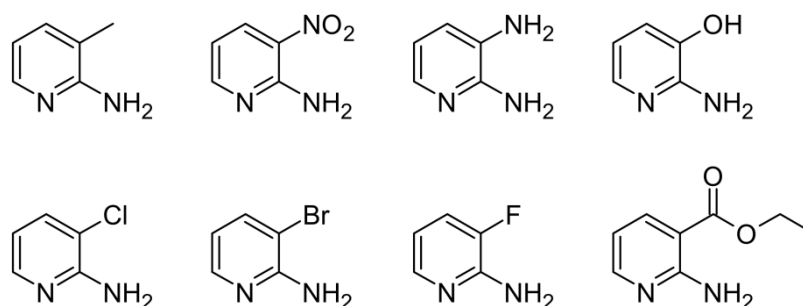
3.33 pav. Produkto, susidariusio po anilino hidroksilinimo *Burkholderia* sp. MAK1 ląstelėmis, identifiкуavimas plonasluoksnės chromatografijos būdu. Mobilio fazė – chloroformo ir metanolio mišinys (9:1). 1 – *o*-hidroksianilinas, 2 – identifiкуojamas produktas, 3 – *m*-hidroksianilinas, 4 – *p*-hidroksianilinas.



Susintetintas *o*-hidroksianilinas gali būti pritaikomas dažų bei farmacijos pramonėje (Mitchell ir Waring, 2000; Grychtol ir Mennicke, 2000; Hunger et al., 2000). Apibendrinant galima teigti, kad *Burkholderia* sp. MAK1 bakterijos geba hidroksilinti ne tik piridino, bet ir benzeno darinius.

### 3.4.6. Įvairių hidroksilintų 2-aminopiridinių biosintezė panaudojant *Burkholderia* sp. MAK1 bakterijas

Buvo nustatyta, kad *Burkholderia* sp. MAK1 ląstelės katalizavo ir 2-aminopiridinių, 3-čioje padėtyje turinčių metilo, nitro-, chloro, bromo ar fluoro grupes (3.34 pav.) transformacijas. Įdomu tai, kad šios ląstelės gebėjo hidroksilinti ir etil-2-aminopiridino-3-karboksilatą (3.34 pav.) – junginį, turintį stambų pakaitą 3-padėtyje.



3.34 pav. *Burkholderia* sp. MAK1 bakterijų hidroksilinami 2-aminopiridiniai, turintys pakaitus 3-čioje padėtyje.

2-Amino-3-chloropiridino konversijos produktą išgryninome panaudodami atvirkštinių fazių C18 kolonėlę. Buvo užrašyti šio junginio <sup>1</sup>H ir <sup>13</sup>C BMR spektrai. <sup>1</sup>H BMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 9.24 (s, 1H, OH), 7.56 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, CH), 7.11 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, CH), 5.51 (s, 2H, NH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C BMR spektre buvo matomos penkios smailės: (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 149.46, 146.21, 133.73, 125.21, 113.58. Tiek BMR spektrų analizė, tiek masių spektrometrijos rezultatai patvirtino, kad 2-amino-3-chloropiridino biokonversijos *Burkholderia* sp. MAK1 ląstelėmis metu susidaro 2-amino-3-chloro-5-hidroksipiridinas. Šiomis bakterijomis transformavus 50 mg 2-amino-

3-chloropiridino, po gryninimo gauta 17 mg produkto. Bendra konversijos išeiga buvo 34 %.

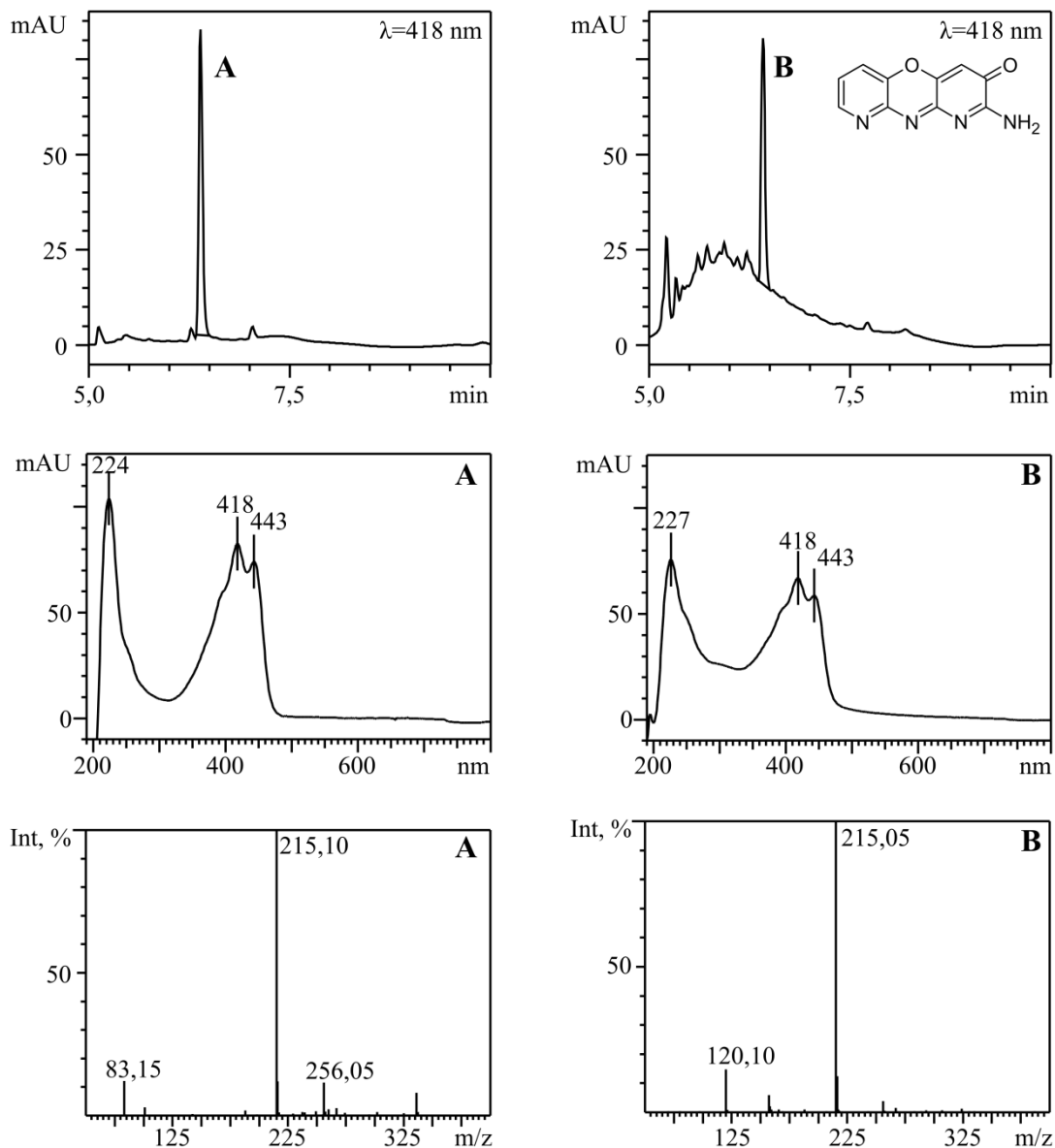
Taigi buvo pademonstruota, kad *Burkholderia* sp. MAK1 bakterijas galima panaudoti kaip biokatalizatorių 2-amino-3-chloro-5-hidroksipiridino sintezei.

Kai *Burkholderia* sp. MAK1 substratais buvo naudoti 2,3-diaminopiridinas ir 2-amino-3-hidroksipiridinas, susidarė spalvoti junginiai: atitinkamai geltonai rudas, kurio  $[M+H]^+=214$ , ir geltonai žalias, kurio  $[M+H]^+=215$ . Literatūroje yra duomenų apie 2-aminofenoksazin-3-ono gavimo būdus iš 2-hidroksianilino, pavyzdžiui, katalizatoriais naudojant įvairius dirbtinius fermentus, sukurtus ciklodekstrinų pagrindu (Lopez et al., 2007). Pagal analogiją organinės sintezės būdu iš 2-amino-3-hidroksipiridino buvo susintetintas 2-amino-3*H*-dipirido[3,2-b:2',3'-e][1,4]oksazino-3-onas (dr. J. Šarlauskas, nepublikuoti duomenys) ir palygintas su bakterijų veiklos produktu (3.35 pav.).

Sutapus šių junginių užsilaikymo trukmei, UV-Vis sugerties spektrui ir jonizacijos pobūdžiui, tapo aišku, kad *Burkholderia* sp. MAK1 katalizuoja oksidacinę 2-amino-3-hidroksipiridino dimerizaciją. Nors cheminio standarto 2,3-diaminopiridino darinio palyginimui neturėjome, akivaizdu, kad šis junginys taip pat dimerizuojasi.

Svarbu paminėti, jog tai pirmas atvejis, kai aprašyta tokių junginių biosintezė. Tuo tarpu jų struktūriniai analogai literatūroje pristatomi kaip potencialūs priešvėžiniai ir antimikrobiniai vaistai (Tse et al., 2012).

Kitame darbo etape tyrėme 2-aminopiridinų, turinčių pakaitus 4-toje padėtyje, biokonversijos galimybes. Kai 2-aminopiridino 4-toje padėtyje buvo metilo, chloro, bromo arba fluoro funkcinė grupė, *Burkholderia* sp. MAK1 bakterijos šiuos junginius hidroksilindavo. Atlikus HPLC-MS analizes, visais išvardintais atvejais buvo matomas substrato nykimas ir produkto, kurio molekulinė masė 16 Da didesnė nei pradinio junginio, kaupimasis.



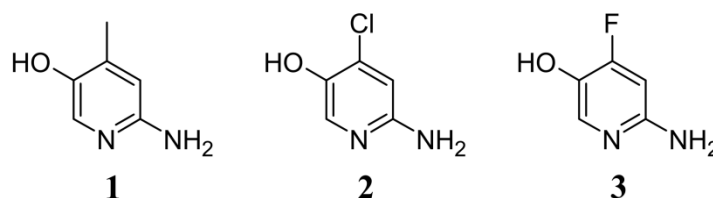
3.35 pav. *Burkholderia* sp. MAK1 bakterijų 2-amino-3-hidroksipiridino oksidacijos produkto palyginimas su chemiškai susintetintu standartu. A – produkto chromatograma, UV-Vis ir masių spektrai, B – cheminiu būdu susintetinto standarto chromatograma, UV-Vis ir masių spektrai. Analizės atliktos HPLC-MS sistemoje.

Po 50 mg 2-amino-4-metilpiridino, 2-amino-4-chloropiridino ir 2-amino-4-fluoropiridino buvo transformuota *Burkholderia* sp. MAK1 bakterijomis. Naudodami C18 atvirkštinių fazių kolonėlę, išgryninome susintetintus produktus. Buvo užrašyti šių junginių  $^1\text{H}$  ir  $^{13}\text{C}$  BMR spektrai. Paaikškėjo, kad po 2-amino-4-metilpiridino biokonversijos susidaro 5-toje padėtyje hidroksilintas produktas (3.36 pav. 1), kurio  $^1\text{H}$  BMR (400 MHz,

DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  8.33 (s, 1H, OH), 7.87 (d,  $J = 6.6$  Hz, 1H, CH), 6.70 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 6.61 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H, CH), 2.18 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), o <sup>13</sup>C BMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  138.00, 136.73, 113.72, 109.39, 79.65, 77.18. Bendra konversijos išeiga 34 %.

2-Amino-4-chloropiridino konversijos produkto <sup>1</sup>H BMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  8.04 (d,  $J = 7.0$  Hz, 1H, OH), 7.05 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 6.84–6.83 (m, 1H, CH), 6.66 (dd,  $J = 7.0, 2.9$  Hz, 1H, CH). <sup>13</sup>C BMR spektre buvo penkios smailės: (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  151.70, 138.34, 131.29, 112.44, 108.17. Remdamiesi BMR spektrais, nustatėme, kad po hidrosilinimo *Burkholderia* sp. MAK1 bakterijomis susidarė 6-amino-4-chloro-3-hidroksipiridinas (3.36 pav. 2). Bendra konversijos išeiga buvo 50 %.

2-Amino-4-fluoropiridinas buvo transformuotas susidarant 5-toje padėtyje hidrosilintam junginiui (3.36 pav. 3). Tai nustatyta remiantis BMR spektrais. <sup>1</sup>H BMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  8.07 (dd,  $J = 7.2, 6.0$  Hz, 1H, OH), 7.11 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 6.62 (dd,  $J = 9.1, 3.2$  Hz, 1H, CH), 6.54 (td,  $J = 7.3, 3.4$  Hz, 1H, CH). <sup>13</sup>C BMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  161.39, 158.91, 139.03, 100.74, 95.45. Bendra konversijos išeiga buvo 68 %.

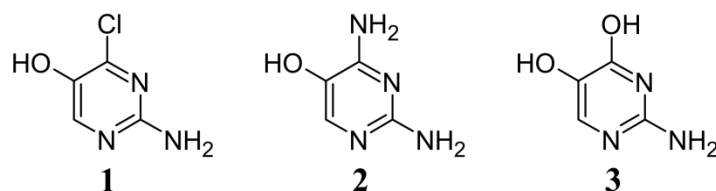


3.36 pav. Išgryninti ir identifikuoti *Burkholderia* sp. MAK1 bakterijų veiklos produktai. 1 – 6-amino-4-metil-3-hidroksipiridinas, 2 – 6-amino-4-chloro-3-hidroksipiridinas, 3 – 6-amino-4-fluoro-3-hidroksipiridinas.

Tai pirmas atvejis, kuomet aprašyta 2-amino-4-metil-5-hidroksipiridino biosintezė. Be to, iki šiol literatūroje nebuvo jokių duomenų apie 2-amino-4-chloro-5-hidroksipiridino ir 2-amino-4-fluoro-5-hidroksipiridino sintezę. Pagal analogiją aminofenoliams šie nauji junginiai ateityje galėtų būti pritaikyti dažų, vaistų, pesticidų ir kitose pramonės šakose (Arora ir Bae, 2014).

Siekėme nustatyti, ar *Burkholderia* sp. MAK1 bakterijos gali katalizuoti pirimidino žiedą turinčių substratų hidrolizę. Žinodami, kad tiriamos bakterijos hidrosilina 2-amino-4-chloropiridiną, pirmiausiai ląsteles inkubavome buferyje su 2-amino-4-chloropirimidinu. Po HPLC-MS analizės paaiškėjo, kad substrato koncentracija buferyje su ląstelėmis mažėjo, ir reakcijos metu susiformavo produktas, kurio molekulinė masė 16 Da didesnė nei pradinio junginio (3.37 pav. 1).

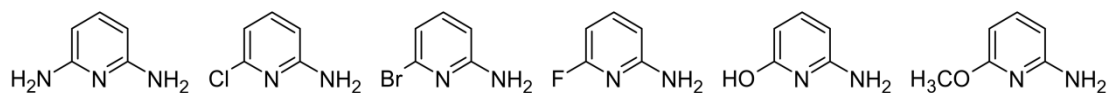
Hidrosilinimas buvo nustatytas ir substratais naudojant 2,4-diamino- ar 2-amino-4-hidroksi- pirimidinus (3.37 pav. 2 ir 3). Taigi, pavyko parodyti, jog *Burkholderia* sp. MAK1 ląstelės gali būti panaudojamos ne tik 2-aminopiridinų, bet ir atitinkamų pirimidinų hidrosilinimui.



3.37 pav. 2-Aminopirimidinų, turinčių pakaitus 4-toje padėtyje, konversijos *Burkholderia* sp. MAK1 bakterijomis produktai. 1 – 2-amino-4-chloro-5-hidroksipirimidinas, 2 – 2,4-diamino-5-hidroksipirimidinas, 3 – 2-amino-4,5-dihidroksipirimidinas.

Išgryninus 2-amino-4-hidroksi-pirimidino konversijos produktą ir užrašius  $^1\text{H}$  ir  $^{13}\text{C}$  BMR spektrus, paaiškėjo, kad po hidrosilinimo susidaro 2-amino-4,5-dihidroksipirimidinas. Bendra konversijos išeiga po gryninimo – 18 %. Nemaži medžiagos nuostoliai buvo dėl gryninimo procedūros, tad ateityje išeigą tikimasi padidinti optimizuojant gryninimo sąlygas.

Dar viena 2-aminopiridinų grupė, kurią tyrėme – 6-toje padėtyje pakaitus turintys junginiai (3.38 pav.). HPLC-MS rezultatų analizė parodė, kad 2,6-diaminopiridinas yra konvertuojamas, tačiau susidaręs produktas chromatogramoje nebuvo matomas. Vizualiai matėsi, kad laikui bėgant keitėsi buferinio tirpalo, kuriame vykdyta konversija, spalva. Tikėtina, jog po hidrosilinimo susidaręs produktas polimerizavosi.



3.38 pav. 2-Aminopiridiniai, turintys pakaitus 6-toje padėtyje, kurie naudoti *Burkholderia* sp. MAK1 bakterijų substratinio specifiškumo tyrimui.

Tuo tarpu chloro ir bromo grupes 6-toje padėtyje turintys junginiai buvo hidroksilinami: susidariusių produktų molekulinė masė, nustatyta tandemine HPLC-MS sistema, buvo 16 Da didesnė nei substratų. 2-Amino-6-fluoropiridino konversija vyko labai lėtai. Greičiausiai todėl ir nepavyko chromatogramoje aptikti susidarančio produkto. Kai konversijai naudotas 2-amino-6-hidroksipiridinas, chromatogramoje stebėjome kelių produktų susidarymą. Tikėtina, jog šis substratas hidroksilinamas tiek į 5-tą, tiek į 3-čią padėtį, dėl to chromatogramoje ir stebime kelis naujus junginius. 2-Amino-6-metoksipiridinas nebuvo hidroksilinamas.

2-Amino-6-chloropiridino konversijos *Burkholderia* sp. MAK1 ląstelėmis produktas buvo sėkmingai išgrynintas naudojant C18 atvirkštinių fazių kolonėlę. Buvo užrašytas  $^1\text{H}$  BMR spektras (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  9.79 (s, 1H, OH), 6.84 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H, CH), 6.38 (m, 1H, CH), 5.90 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ). Spektro analizė parodė, jog susidaręs junginys – 6-amino-2-chloro-3-hidroksipiridinas.

3.4.4. skyriuje nagrinėdami 6-toje pozicijoje pakaitus turinčių 2-hidroksipiridinių konversiją priėjome prie išvados, kad, jei pakaitai nedideli, po hidroksilinimo vyksta piridino žiedo atidarymas. Tuo tarpu 6-toje padėtyje pakaitus turintys 2-aminopiridiniai toliau nemetabolizuojami. Vadinas, *Burkholderia* sp. MAK1 bakterijos gali būti pritaikytos 6-toje pozicijoje pakaitus turinčių 2-aminopiridinių regioselektyviam hidroksilinimui.

Apibendrinant šio skyriaus rezultatus verta pabrėžti, jog *Burkholderia* sp. MAK1 bakterijos gali regioselektyviai į 5-tą padėtį hidroksilinti įvairius 2-aminopiridinus. Jų pagalba pavyko susintetinti keletą naujų, anksčiau literatūroje neaprašytų hidroksipiridinių ir pirimidinų, pavyzdžiui, 6-amino-4-chloro-3-hidroksipiridiną, 6-amino-4-fluoro-3-hidroksipiridiną, 2-amino-4,5-dihidroksipirimidiną.

### 3.4.7. Piridino ir metilpiridinių transformacijos *Burkholderia* sp. MAK1 bakterijomis tyrimas

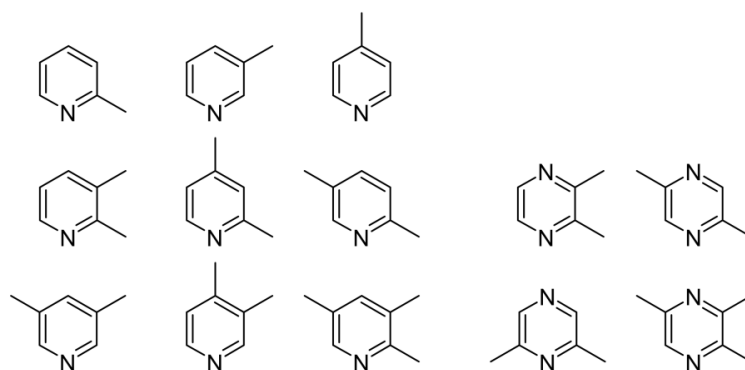
Įvairių 2-hidroksi- ir 2-amino- piridinių konversijos *Burkholderia* sp. MAK1 ląstelėmis tyrimai parodė, kad šių bakterijų 2-hidroksipiridinu indukuojama 5-monooksigenazė pasižymi itin plačiu substratiniu specifiškumu. Buvo įdomu išsiaiškinti, ar tiriamos bakterijos gali katalizuoti piridino virsmus.

Po piridino inkubavimo buferiniame tirpale su ląstelėmis atlikus HPLC-MS analizę, nustatyta, kad junginys buvo transformuojamas į produktą, kurio molekulinė masė 16 Da didesnė. Reakcijos metu susidariusio produkto UV sugerties spektras beveik nesiskyrė nuo piridino ir nesutapo su turimų standartų – 2-oje, 3-čioje ar 4-toje padėtyje hidroksigrupę turinčių piridinių – spektrais. Tai įvertinus, buvo iškelta hipotezė, jog reakcijos metu iš piridino susidaro piridino-*N*-oksidas. Piridino-*N*-oksido smailė HPLC chromatogramoje, UV sugerties spektras bei molekulės jonizacijos pobūdis sutapo su piridino transformacijos produktu. Vadinasi, *Burkholderia* sp. MAK1 bakterijos piridiną oksiduoja 1-oje padėtyje.

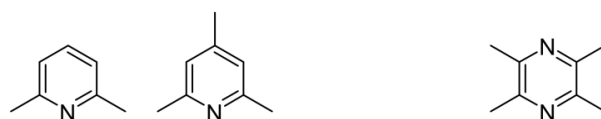
Kadangi konversiją vykdėme su ląstelėmis, nebuvo tikri, jog piridino oksidaciją katalizuoja tas pats fermentas, kuris 5-toje padėtyje hidroksilina 2-hidroksi- ir 2-amino- piridinus. Išanalizavus eksperimentų rezultatus, buvo pastebėta, kad oksidacija vyko, kai piridinas inkubuotas su 2-hidroksipiridinu indukuotomis ląstelėmis. Tuo tarpu neindukuotos ląstelės konversijos nekatalizavo. Šie rezultatai leidžia teigti, jog tiek piridino oksidaciją 1-oje padėtyje, tiek 2-hidroksi- ir 2-amino- piridinių oksidaciją 5-toje padėtyje katalizuoja vienas ir tas pats fermentas.

Tyrėme *Burkholderia* sp. MAK1 bakterijų gebėjimą transformuoti piridinus ir pirazinus, įvairiose aromatinio žiedo padėtyse turinčius metilo grupę/-es. Visų tirtų junginių struktūros pateiktos 3.39 paveiksle.

Substratas transformuojamas



Reakcija nevyksta



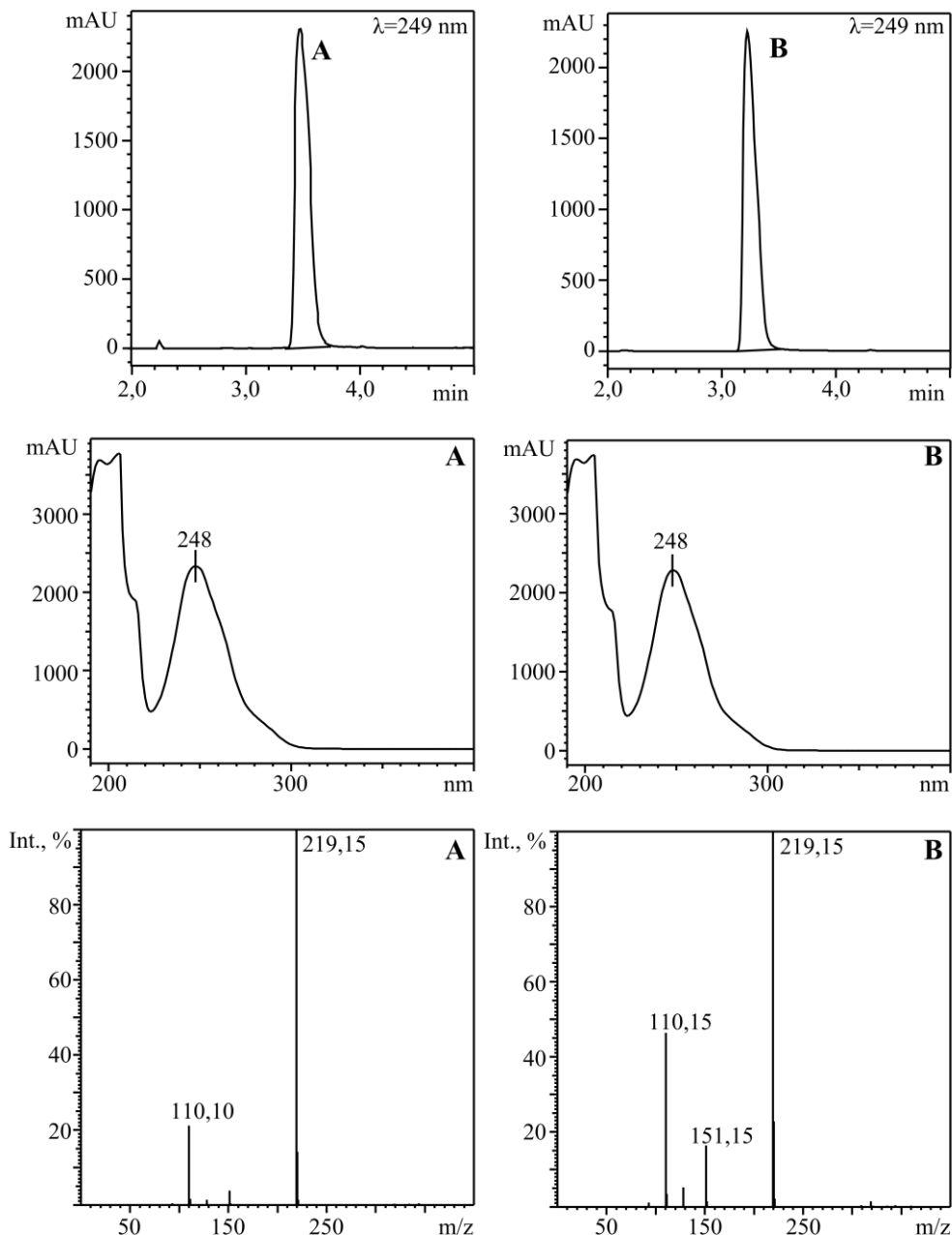
3.39 pav. Metilpiridinių ir metilpirazinių transformacija *Burkholderia* sp. MAK1 ląstelėmis.

Kai *Burkholderia* sp. MAK1 bakterijas inkubavome buferiniame tirpale su 2-metilpiridinu, laikui bėgant reakcijos mišinio chromatogramoje stebėjome naujos smailės atsiradimą (3.40 pav. A).

Nustatyta, kad susidariusio produkto molekulinė masė 16 Da didesnė nei 2-metilpiridino. Taigi, įvyko substrato oksidacija. Kadangi naujo junginio UV sugerties spektro maksimumas beveik nesiskyrė nuo substrato, labiausiai tikėtina buvo, jog oksidacijos metu susidarė *N*-oksidas. Palyginus produkto ir 2-metilpiridino-*N*-oksido užsilaikymo trukmę, UV sugerties spektrus ir molekulinės mases, pasirodė, jog visos charakteristikos sutampa (3.40 pav. A ir B). Tai reiškia, kad 2-metilpiridiną *Burkholderia* sp. MAK1 oksidavo 1-oje padėtyje.

Piridinai, metilinti 3-čioje ar 4-toje padėtyse, taip pat buvo oksiduojami. Naudodami chemiškai susintetintą standartą nustatėme, jog *Burkholderia* sp. MAK1 bakterijos katalizavo 4-metilpiridino oksidaciją 1-oje padėtyje: susidarė 4-metilpiridino-*N*-oksidas. Tyrimų metu paaiškėjo, jog piridino žiede esančios dvi ar trys metilo grupės taip pat netrukdo *N*-oksido susidarymui, išskyrus tuos atvejus, kai užimtos 2-ra ir 6-ta padėtys (3.39 pav.).





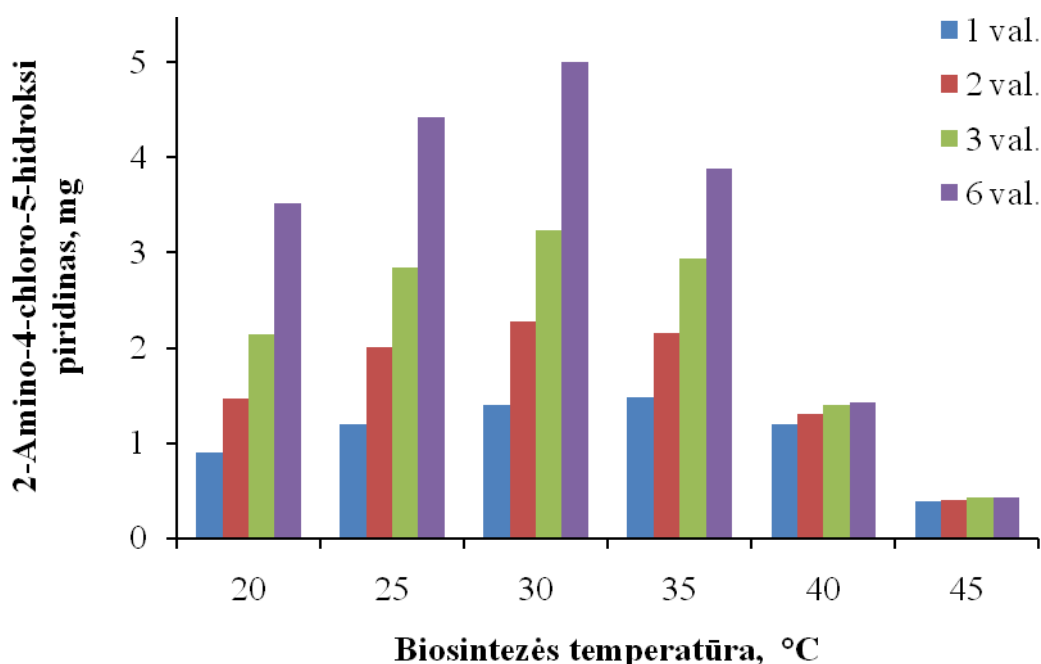
3.40 pav. 2-Metilpiridino konversijos *Burkholderia* sp. MAK1 bakterijomis produkto palyginimas su chemiškai susintintu standartu. A – reakcijos mišinio chromatograma, produkto UV sugerties ir masių spektrai, B – cheminiu būdu susintetinto 2-metilpiridino-*N*-oksido chromatograma, UV sugerties ir masių spektrai. Analizės atliktos HPLC-MS sistemoje.

*Burkholderia* sp. MAK1 bakterijos galėjo oksiduoti ir metilintus pirazinus. Pirazinų oksidacijai užtikrinti pakako vienos laisvos padėties greta bet kurio iš azotų. Pavyzdžiui, reakcija vyko, kai substratu buvo 2,6-dimetilpirazinas ar 2,3,5-trimetilpirazinas, o su tetrametilpirazinu nevyko.

### 3.4.8. Piridino darinių hidroksilinimo, katalizuojamo *Burkholderia* sp. MAK1 bakterijomis, priklausomybės nuo temperatūros tyrimas

Norėdami išsiaiškinti, kokia piridinių biokonversijos *Burkholderia* sp. MAK1 bakterijomis temperatūra užtikrina didžiausius hidroksilinto produkto kiekius, ląsteles inkubavome 20–45 °C temperatūrų intervale. Buvo vykdoma 2-amino-4-chloropiridino konversija. Periodiškai atlikome konversijos mišinių analizes HPLC-MS sistemoje. Substrato pasirinkimą lėmė tai, jog biokonversijos būdu jau buvome gavę ir išgryninę 2-amino-4-chloro-5-hidroksipiridiną – junginį, kurį galėjome naudoti kiekybiniu standartu.

Rezultatai pateikti 3.41 paveiksle. Paaiškėjo, kad pirmą valandą biokonversija greičiausiai vyko esant 35 °C temperatūrai, bet jau nuo antros valandos daugiausiai 2-amino-4-chloro-5-hidroksipiridino buvo aptinkama esant 30 °C temperatūrai. Kai temperatūra buvo 40 °C, pirmą proceso valandą susidarė 1,2 mg produkto, o ląsteles inkubuojant ilgiau konversija sustojo.



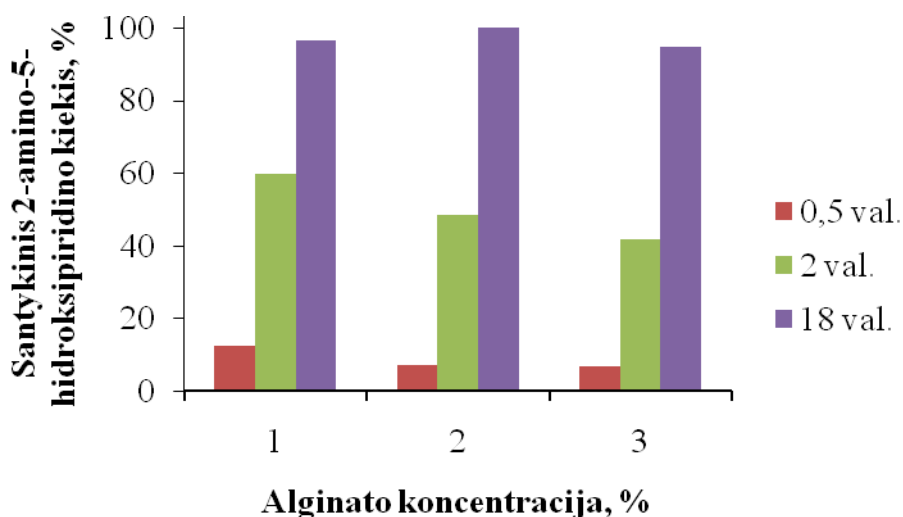
3.41 pav. 2-Amino-4-chloro-5-hidroksipiridino biosintezės *Burkholderia* sp. MAK1 bakterijomis priklausomybė nuo proceso temperatūros. Duomenys pateikti kaip trijų matavimų vidurkis, paklaidos neviršijo 15 %.

Akivaizdu, kad 40–45 °C temperatūra netinkama hidroksilintų piridinių sintezei dėl biokatalizatoriaus inaktyvacijos. Esant 35 °C temperatūrai reakcija vis dar vyko, tačiau jau lėčiau nei esant 30 °C temperatūrai. Po 21 valandos visas substratas buvo paverstas į produktą, kai biokonversija vykdyta 20–35 °C temperatūrų intervale.

Lygiagrečiai atlikti eksperimentai, kai substratais buvo naudoti 2-amino-3-chloropiridinas ir 2-amino-4-fluoropiridinas. Gauti rezultatai atitiko anksčiau išnagrinėtą 2-amino-4-chloropiridino konversijos atvejį. Taigi, įvertinus ir apibendrinus gautus rezultatus, paaiškėjo, kad reakciją katalizuojančios monooksigenazės optimali veikimo temperatūra – 30 °C.

### 3.4.9. Alginatiniame gelyje imobilizuotų *Burkholderia* sp. MAK1 ląstelių pritaikymas hidroksilintų piridinių biosintezėje

*Burkholderia* sp. MAK1 ląstelės buvo imobilizuotos 1 %, 2 % ir 3 % alginatiniame gelyje. Konversijos eiga stebėta pagal 2-amino-5-hidroksipiridino susidarymą (3.42 pav.).



3.42 pav. 2-Amino-5-hidroksipiridino biosintezės imobilizuotomis *Burkholderia* sp. MAK1 bakterijomis priklausomybė nuo alginato koncentracijos. Konversija vykdyta 50 mM Tris-HCl buferiniame tirpale, pH 7,0. Analizė atlikta HPLC-MS sistema. 100 % prilyginta didžiausio ploto 2-amino-5-hidroksipiridino smailė.

Ląstelių imobilizacijai naudojant skirtingos koncentracijos alginatą, pastebėta, kad priklausomai nuo koncentracijos skiriasi alginatinių rutuliukų dydis: kuo didesnė koncentracija, tuo didesni rutuliukai. Dėl šios priežasties iš vienodo tūrio 1 % alginato buvo pagamintas didesnis rutuliukų skaičius ir taip gautas didesnis aktyvaus paviršiaus plotas. Greičiausiai, dėl šios priežasties pradiniuose konversijos etapuose, daugiau produkto buvo aptikta 1 % alginatiniuose rutuliukuose. Visgi, didesnės koncentracijos alginatiniai rutuliukai ilgiau išliko stabilūs.

Apibendrinant galima teigti, kad *Burkholderia* sp. MAK1 ląstelėms sugavimas alginatiniame gelyje netrukdo piridino hidroksilinimui ir yra tinkamas imobilizacijos būdas.

### 3.5. Rezultatų aptarimas

Stereo- ir regio- selektyvi alkoholių sintezė – sudėtinga užduotis naudojant cheminius katalizatorius. Dėl to naujų ir efektyvių biokatalizatorių paieška, tyrimas bei pritaikymas ar esamų biokatalizinių metodų patobulinimas yra labai svarbus tikslinių junginių biosintezės raidai.

Šiame darbe pirmą kartą pademonstravome DHAP sintezės reaktorių, kuriame efektyviai pašalinamas GPO aktyvumą slopinantis vandenilio peroksidas. Iki šiol literatūroje aprašytose DHAP sintezės sistemose vandenilio peroksido pašalinimui buvo naudojama katalazė. Tokių bioreaktorių trūkumas yra tas, kad papildomas fermentas, skaidantis šalutinį produktą, turi būti suderinamas su pagrindinę reakciją vykdančiu katalizatoriumi. Be to, šie reaktoriai nepasižymi ilgaamžiškumu (Hernandez et al., 2012; Maria et al., 2012). Karyakin yra aprašęs efektyvų elektrocheminį vandenilio peroksido nustatymo metodą, paremtą jo redukcija ant Berlyno mėlio elektrodo (Karyakin, 2001). Tuo remdamiesi sukonstravome DHAP sintezės reaktorių, kuriame darbinis elektrodas sudarytas iš Berlyno mėliu modifikuoto anglies puošto su imobilizuota GPO. Šiame reaktoriuje susidaręs vandenilio

peroksidas iškart suskaidomas elektrochemiškai. Taigi, sintezė gali būti vykdoma optimaliomis GPO sąlygomis ir bioreaktoriaus katalizinis efektyvumas priklauso tik nuo GPO stabilumo užtikrinimo. Ateityje tokią DHAP sintezės sistemą būtų galima suderinti su nuo DHAP priklausomomis aldolazėmis ir panaudoti selektyviai angliavandenių sintezei. Antra vertus šis efektyvus vandenilio peroksido pašalinimo būdas galėtų būti panaudotas vystant kitus biokatalizinius procesus, kur yra naudojamos vandenilio peroksidą generuojančios oksidazės.

Nuo PQQ priklausoma ADH IIG iš *P. putida* HK5 pasižymi plačiu substratiniu specifiškumu. Ji katalizuoja įvairių pirminių ir antrinių alifatinių bei ciklinių alkoholių oksidaciją. Šiame darbe pirmą kartą parodėme, kad ADH IIG gali oksiduoti aminoalkoholius ir vicininius alkoholius. Remdamiesi 1-amino-2-propanolio ir 2,3-butandiolio pavyzdžiais įrodėme, jog ši ADH yra enantioselektyvus fermentas, kuris pirmenybę teikia (*S*)-enantiomerui. Vadinas, ADH IIG iš *P. putida* HK5 galėtų būti pritaikoma kinetiniam racematinių alkoholių mišinių atskyrimui ir optiškai grynų alkoholių sintezei. Anksčiau buvo žinomos ADH iš *Acetobacter*, *Gluconobacter* ir *Comamonas* genčių bakterijų, kurios enantioselektyviai oksiduoja (*R*) arba (*S*) antrinius alkoholius (Jongejan et al., 2000). Vis dėlto, selektyvi aminoalkoholių oksidacija, naudojant nuo PQQ priklausomą ADH, parodyta pirmą kartą. Galiausiai, katalizatoriumi naudodami ADH IIG iš *P. putida* HK5, pademonstravome unikalų 2,5-dihidroksimetilpirazino sintezės būdą iš 2-amino-1,3-propandiolio. Anksčiau buvo žinomi tik cheminiai daugiastadijiniai šio junginio gavimo būdai (Das ir Frey, 2012).

Šiame darbe charakterizavome nuo NADPH priklausomą ADH TpdE iš *R. jostii* TMP1. Anksčiau buvome parodę, kad minėtas fermentas dalyvauja tetrametilpirazino skaidymo kelyje (Kutanovas et al., 2013). Dabar pavyko išsiaiškinti, kad TpdE dviem etapais katalizuoja diacetilo oksidaciją iki 2,3-butandiolio. Fermentas vykdo stereoselektyvią katalizę, kurios dominuojantis produktas – (*2S,3S*)-2,3-butandiolis. TpdE iš *R. jostii* TMP1 palyginus su literatūroje aprašytomis (*S*)-specifinėmis ADH iš *R. erythropolis* MAK154, *R.*

*erythropolis* BCRC 10909, *R. erythropolis* DSM 43297 ir *R. erythropolis* WZ010 (Kataoka et al., 2006; Lin et al., 2010; Abokitse ir Hummel, 2003; Wang et al., 2013), jis išsiskiria dėl itin plataus substratinio specifiškumo. Iki šiol nebuvo prieinamo biokatalizatoriaus, galinčio stereoselektyviai redukuoti įvairaus ilgio 2,3- ir 3,4- diketonus, aciloinus ir butan-2-ono-3-il-esterius. Dar vienas TpdE biokatalizės privalumas yra tas, kad fermentas sėkmingai dirba ne tik *in vitro*, bet ir *in vivo*. Tai reiškia, jog chiralinių diolių ir aciloinų sintezę galima vykdyti ląstelėse, taip išvengiant kofaktoriaus regeneravimo problemos.

Regioselektyviai piridinolių biosintezei katalizatoriumi naudojome *Burkholderia* sp. MAK1 ląsteles, kurios pasirinktos dėl gebėjimo 2-hidroksipiridiną panaudoti kaip vienintelį anglies ir energijos šaltinį. Anksčiau manyta, kad piridino žiedą hidroksilinančios monooksigenazės yra siauro substratinio specifiškumo fermentai. Katalizei 2-hidroksipiridinu indukuotomis *Burkholderia* sp. MAK1 ląstelėmis pasirinkome 110 potencialių substratų – skirtingų piridino, pirimidino ir pirazino darinių. Nustatyta, kad 73 iš jų buvo selektyviai hidroksilinami. Apibendrinę šių biokonversijų rezultatus pastebėjome dėsningumus: 2-hidroksi- ir 2-amino- piridinai bei pirimidinai regioselektyviai hidroksilinami į penktą padėtį, o piridinas, pirazinas bei jų metilinti dariniai – į pirmą padėtį, susidarant *N*-oksidams. 2,5-Dihidroksipiridinus *Burkholderia* sp. MAK1 ląstelės toliau metabolizuoja, todėl šių junginių biosintezei reikėtų naudoti gryną monooksigenazę arba visos ląstelės biokatalizatorių, netransformuojantį susidariusių tikslinių produktų. Šį ląstelinį biokatalizatorių paprasta imobilizuoti alginatiniame gelyje, o dėl imobilizacijos tampa lengviau valdyti biosintezės procesą. Taigi, *Burkholderia* sp. MAK1 bakterijos gali būti pritaikytos regioselektyviai piridinolių sintezei.

Naudodami *Burkholderia* sp. MAK1 bakterijas pirmą kartą susintetinome keletą naujų, anksčiau literatūroje neaprašytų hidroksipiridinų ir pirimidinų, tarp kurių buvo 6-amino-4-chloro-3-hidroksipiridinas, 6-amino-4-fluoro-3-hidroksipiridinas, 2-amino-4,5-dihidroksipirimidinas.

## IŠVADOS

1. Dihidroksiacetono fosfato reaktorius, kurio darbinis elektrodas sudarytas iš Berlyno mėliu modifikuoto anglies pluošto su imobilizuota L- $\alpha$ -glicerofosfato oksidaze, eliminuoja vandenilio peroksidą ir gali būti naudojamas greitai ir efektyviai dihidroksiacetono fosfato sintezei.
2. Alkoholio dehidrogenazė IIG iš *Pseudomonas putida* HK5 yra enantioselektyvi (*S*)-(+)-alkoholiams, todėl ji gali būti pritaikoma enantiomeriškai grynų alkoholių sintezei kinetinio racematų atskyrimo būdu.
3. TpdE baltymas iš *Rhodococcus jostii* TMP1 yra nuo NADPH priklausoma klasikinė trumpų grandinių dehidrogenazė/reduktazė, galinti redukuoti skirtingo ilgio linijinius 2,3-diketonus, įvairius aciloinus ir butan-3-ono-2-il-esterius.
4. TpdE dehidrogenazė stereoselektyviai katalizuoja diketonų redukciją iki optiškai aktyvių (*S,S*)-diolių ir gali būti panaudojama chiralinių alkoholių sintezei asimetrinės ketonų redukcijos būdu *in vivo* bei *in vitro*.
5. *Burkholderia* sp. MAK1 bakterijos katalizuoja *N*-alkil-2,5-dihidroksipiridinų, įvairių 2-amino-5-hidroksipiridinų bei 2-amino-5-hidroksipirimidinų sintezę.
6. 2-Hidroksipiridinu indukuotos *Burkholderia* sp. MAK1 bakterijos katalizuoja piridino, pirazino bei jų metilintų darinių oksidaciją susidarant atitinkamiems *N*-oksidams.

## PUBLIKACIJOS DISERTACIJOS TEMA

### Straipsniai

1. **Stankevičiūtė J.**, Kurtinaitienė B., Stankevičiūtė R., Meškienė R., Gasparavičiūtė R., Marcinkevičienė L., Laurinavičius V., Meškys R. (2014) Prussian Blue as an alternative to catalase: a bioelectrocatalytic system for production of dihydroxyacetone phosphate. *Chemija*, 2:115–118.
2. Kutanovas S., **Stankevičiūtė J.**, Urbelis G., Tauraitė D., Rutkienė R., Meškys R. (2013) Identification and characterization of tetramethylpyrazine catabolic pathway in *Rhodococcus jostii* TMP1. *Appl Environ Microbiol*, 79:3649–3657.
3. Laurinavičius V., Razumiene J., Kurtinaitiene B., **Stankevičiūtė J.**, Meškys R. (2012) Reagentless and mediator-based electrochemical biosensors for food industry and medicine. *Proceedings of the IEEE Sensors*, 1549–1552.
4. Marcinkevičienė L., **Stankevičiūtė J.**, Bachmatova I., Vidžiūnaitė R., Chaleckaja A., Meškys R. (2012) Biocatalytic properties of quinoxaline alcohol dehydrogenase IIG from *Pseudomonas putida* HK5. *Chemija*, 23(3): 223–232.
5. **Stankevičiūtė J.**, Kutanovas S., Rutkienė R., Ražanas R., Tauraitė D., Striela R., Meškys R. Purification and characterization of alcohol dehydrogenase TpdE from *Rhodococcus jostii* TMP1. Rengiamas spaudai.

### Rezultatai pristatyti konferencijose

1. **Stankevičiūtė J.**, Vaitekūnas J., Gasparavičiūtė R., Petkevičius V., Tauraitė D., Urbonavičius J., Meškys R. (2014) Whole cell regioselective hydroxylation of *N*-heteroaromatic compounds using *Burkholderia* sp. MAK1. FEBS-EMBO 2014, Paryžius, Prancūzija.
2. **Stankevičiūtė J.**, Vaitekūnas J., Gasparavičiūtė R., Petkevičius V., Tauraitė D., Meškys R. (2014) Oxyfunctionalization of pyridine derivatives using whole cells of *Burkholderia* sp. MAK1. Biocat2014, Hamburgas, Vokietija.



- 3. Stankevičiūtė J.,** Kutanovas S., Rutkienė R., Ražanas R., Tauraitė D., Meškys R. (2013) Purification and characterization of alcohol dehydrogenase TpdE from *Rhodococcus jostii* TMP1. The 5th Congress of European Microbiologists (FEMS), Leipcigas, Vokietija.
- 4. Laurinavicius V.,** Razumiene J., Kurtinaitiene B., **Stankeviciute J.,** Meskys R. (2012) Reagentless and mediator based electrochemical biosensors for food and medicine. IEEE Sensors 2012, Taipėjus, Taivanas.
- 5. Stankevičiūtė J.,** Kutanovas S., Rutkienė R., Meškys R. (2012) Purification and characterization of alcohol dehydrogenase from *Rhodococcus jostii* TMP1. Biochemija ir biofizika Vilniaus universitete, Vilnius, Lietuva. (Pirma vieta stendinių pranešimų sekcijoje.)
- 6. Stankevičiūtė J.** (2012) Alkoholio dehidrogenazių panaudojimas chiralinių junginių sintezei. Lietuvos Biochemikų Draugijos XII-oji konferencija "Biochemijos studijoms Lietuvoje – 50 metų", Tolieja, Molėtų raj., Lietuva. Žodinis pranešimas.
- 7. Stankevičiūtė J.,** Kutanovas S., Rutkienė R., Meškys R. (2012) Purification and characterization of alcohol dehydrogenase from *Rhodococcus jostii* TMP1. Lietuvos Biochemikų Draugijos XII-oji konferencija "Biochemijos studijoms Lietuvoje – 50 metų", Tolieja, Molėtų raj., Lietuva.
- 8. Astrauskaitė I.,** Užusienis T, **Stankevičiūtė J.,** Kurtinaitienė B. (2012) Glicerofosfato oksidazės panaudojimas dihidroksiacetono fosfato biosintezėje. Lietuvos Biochemikų Draugijos XII-oji konferencija "Biochemijos studijoms Lietuvoje – 50 metų", Tolieja, Molėtų raj., Lietuva.

## PADĖKA

Dėkoju savo darbo vadovui dr. Rolandui Meškiui už galimybę atlikti šį darbą, vertingus patarimus ir nesibaigiančias idėjas planuojant eksperimentus bei pagalbą parengiant disertaciją. Esu dėkinga visiems Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriaus darbuotojams ir studentams.

Taip pat dėkoju dr. Simonui Kutanovui už tyrimų objektą – TpdE, dr. Renatai Gasparavičiūtei už *Burkholderia* sp. MAK1, Ritai Meškienei už klonuotą GPO geną, dr. Irinai Bachmatovai ir dr. Liucijai Marcinkevičienei už ADH IIG, dr. Daivai Tauraitėi, dr. Jonui Šarlauskui ir Ryčiui Ražanui už susintetintus junginių standartus, dr. Bogumilai Kurtinaitienei už bendradarbiavimą kuriant DHAP bioreaktorių, dr. Reginai Vidžiūnaitei už pagalbą vertinant TpdE kinetinius parametrus. Esu dėkinga Romualdai Strielai už GC-MS analizes.

Už aktyvias diskusijas, gerą atmosferą, ir sveiką kritiką ačiū laboratorijos draugams – Renatai, Simonai, Vidai, Justui, Simui ir Vytautui.

Noriu padėkoti savo biologijos mokytojai Ritai Kareckienei ir Neakivaizdinės jaunųjų biochemikų mokyklos kuratorei Elvyrai Kilikevičienei už sudominimą ir pirmąsias biochemijos žinias.

Taip pat dėkoju Mamai, Tomui ir visiems artimiesiems, draugams, kurie visuomet palaiko mano siekius ir skatina stengtis bei žengti pirmyn.

Šis darbas iš dalies buvo finansuojamas VP1-3.1-ŠMM-07-K-03-015 ir VP1-3.1-ŠMM-08-K-01-001 projektų lėšomis.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Abokitse K, Hummel W (2003) Cloning, sequence analysis, and heterologous expression of the gene encoding a (*S*)-specific alcohol dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* DSM 43297. *Appl Microbiol Biotechnol* 62: 380-6.
2. Adachi O, Moonmangmee D, Shinagawa E, Toyama H, Yamada M, Matsushita K (2003) New quinoproteins in oxidative fermentation. *Biochim Biophys Acta* 1647: 10-7.
3. Adam W, Lukacs Z, Harmsen D, Saha-Moller CR, Schreier P (2000) Biocatalytic asymmetric hydroxylation of hydrocarbons with the topsoil-microorganism *Bacillus megaterium*. *J Org Chem* 65:878-82.
4. Adam W, Lukacs Z, Kahle C, Saha-Möller CR, Schreier P (2001) Biocatalytic asymmetric hydroxylation of hydrocarbons by free and immobilized *Bacillus megaterium* cells. *J Mol Catal B: Enzym* 11: 377-85.
5. Amidjojo M, Franco-Lara E, Nowak A, Link H, Weuster-Botz D (2005) Asymmetric synthesis of *tert*-butyl (3*R*,5*S*) 6-chloro-dihydroxyhexanoate with *Lactobacillus kefir*. *Appl Microbiol Biotechnol* 69: 9-15.
6. Arora PK, Bae H (2014) Bacterial degradation of chlorophenols and their derivatives. *Microb Cell Fact* 13: 31.
7. Bachmatova I, Marcinkevičienė L, Meškys R (2004) Alcohol dehydrogenase from *Pseudomonas putida* HK5: purification and characterization. *Biologija* 2: 89-93.
8. Behrman EJ, Stanier RY (1957) The bacterial oxidation of nicotinic acid. *J Biol Chem* 228: 923-45.
9. Bertoni G, Bolognese F, Galli E, Barbieri P (1996) Cloning of the genes for and characterization of the early stages of toluene and *o*-xylene catabolism in *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Appl Environ Microbiol* 62: 3704-11.
10. Biade AE, Bourdillon C, Lava JM, Mairesse G, Moiroux J (1992) Complete conversion of l-lactate into d-lactate. A generic approach involving enzymatic catalysis, electrochemical oxidation of NADH, and electrochemical reduction of pyruvate. *J Am Chem Soc* 114: 893-7.
11. Bommarius AS, Riebel BR (2004) Biocatalysis: fundamentals and applications. *Weinheim: Wiley-VCH*.
12. Broxterman QB, Verzij GKM (2003) Process for the synthesis of (*R*)-1-(3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl)ethan-1-ol and esters thereof by dynamic kinetic resolution. *Merck & Co., Inc. WO2003043575*.
13. Burda E, Hummel W, Groger H (2008) Modular chemoenzymatic one-pot syntheses in aqueous media: combination of a palladium-catalyzed cross-coupling with an asymmetric biotransformation. *Angew Chem Int Ed Engl* 47: 9551-4.

14. Cafaro V, Notomista E, Capasso P, Di Donato A (2005) Regiospecificity of two multicomponent monooxygenases from *Pseudomonas stutzeri* OX1: molecular basis for catabolic adaptation of this microorganism to methylated aromatic compounds. *Appl Environ Microbiol* 71: 4736-43.
15. Campestrini S, Tonellato U (2005) Selective catalytic oxidations in supercritical carbon dioxide. *Curr Organ Chem* 9: 31-7.
16. Carreira EM, Yamamoto H (2012) Volume 7: Synthetic methods VI. Enzymatic and semi-enzymatic. *Elsevier, Amsterdam*.
17. Carter P, Wells JA (1988) Dissecting the catalytic triad of a serine protease. *Nature* 332: 564-8.
18. Caussette M, Gaunand A, Planche H, Monsan P, Lindet B (1998) Inactivation of enzymes by inert gas bubbling. A kinetic study. *Ann N Y Acad Sci* 864: 228-33.
19. Celinska E, Grajek W (2009) Biotechnological production of 2,3-butanediol--current state and prospects. *Biotechnol Adv* 27: 715-25.
20. Chang NS, Doherty J, Ensign A, Lewis J, Heath J, Schultz L, Chen ST, Oppermann U (2003) Molecular mechanisms underlying WOX1 activation during apoptotic and stress responses. *Biochem Pharmacol* 66: 1347-54.
21. Charmantray F, El Blidi L, Gefflaut T, Hecquet L, Bolte J, Lemaire M (2004) Improved straightforward chemical synthesis of dihydroxyacetone phosphate through enzymatic desymmetrization of 2,2-dimethoxypropane-1,3-diol. *J Org Chem* 69: 9310-2.
22. Chen R, Greer A, Dean AM (1995) A highly active decarboxylating dehydrogenase with rationally inverted coenzyme specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 11666-70.
23. Chenault HK, Whitesides GM (1987) Regeneration of nicotinamide cofactors for use in organic synthesis. *Appl Biochem Biotechnol* 14: 147-97.
24. Chevalier M, Lin EC, Levine RL (1990) Hydrogen peroxide mediates the oxidative inactivation of enzymes following the switch from anaerobic to aerobic metabolism in *Klebsiella pneumoniae*. *J Biol Chem* 265: 42-6.
25. Claiborne A (1986) Studies on the structure and mechanism of *Streptococcus faecium* L-alpha-glycerophosphate oxidase. *J Biol Chem* 261: 14398-407.
26. Clayden J, Greeves N, Warren S (2000) Organic chemistry. reactions of enolates with aldehydes and ketones: the aldol reaction. *Oxford University Press, USA* 689-722.
27. D'Arrigo P, Pedrocchi-Fantoni G, Servi S (2000) Stereoselective synthesis of chiral compounds using whole-cell biocatalysts. In *Patel RN (ed) Stereoselective biocatalysis* 365-96.
28. Danielsson O, Jornvall H (1992) "Enzymogenesis": classical liver alcohol dehydrogenase origin from the glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 9247-51.
29. Das SK, Frey J (2012) Regioselective double Boekelheide reaction: first synthesis of 3,6-dialkylpyrazine-2,5-dicarboxaldehydes from DL-alanine. *Tetrahedron Lett* 53: 3869-72.

30. de Carvalho CC, da Fonseca MM (2005) The remarkable *Rhodococcus erythropolis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 67: 715-26.
31. De Wildeman SM, Sonke T, Schoemaker HE, May O (2007) Biocatalytic reductions: from lab curiosity to "first choice". *Acc Chem Res* 40: 1260-6.
32. Drauz K, Groger H, May O (2012) Enzyme catalysis in organic synthesis. *Wiley-VCH, Weinheim*.
33. Durán N, Rosa MA, D'Annibale A, Gianfreda L (2002) Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme Microb Technol* 31: 907-31.
34. Eicher T, Hauptmann S (2003) The chemistry of heterocycles. 2nd ed. Pyrazine. *Wiley-VCH Verlag* 417-22.
35. Enders D, Voith M, Lenzen A (2005) The dihydroxyacetone unit--a versatile C(3) building block in organic synthesis. *Angew Chem Int Ed Engl* 44: 1304-25.
36. Ernst M, Kaup B, Muller M, Bringer-Meyer S, Sahm H (2005) Enantioselective reduction of carbonyl compounds by whole-cell biotransformation, combining a formate dehydrogenase and a (*R*)-specific alcohol dehydrogenase. *Appl Microbiol Biotechnol* 66: 629-34.
37. Esders TW, Michrina CA (1979) Purification and properties of L- $\alpha$ -glycerophosphate oxidase from *Streptococcus faecium* ATCC 12755. *J. Biol. Chem.* 254: 2710-5.
38. Estabrook RW (2003) A passion for P450s (remembrances of the early history of research on cytochrome P450). *Drug Metab Dispos* 31: 1461-73.
39. Fessner W-D, Sinerius G (1994) Synthesis of dihydroxyacetone phosphate (and isosteric analogues) by enzymatic oxidation; sugars from glycerol. *Angew Chem Int Ed Engl* 33: 209-12.
40. Fessner WD, Anthonsen T (2009) Modern biocatalysis: stereoselective and environmentally friendly reactions. *Weinheim: Wiley-VCH*
41. Fiaud JC, Kagan, H.B. (1988) Kinetic resolution. *Topics in Stereochemistry* 18: 249-340.
42. Filling C, Berndt KD, Benach J, Knapp S, Prozorovski T, Nordling E, Ladenstein R, Jornvall H, Oppermann U (2002) Critical residues for structure and catalysis in short-chain dehydrogenases/reductases. *J Biol Chem* 277: 25677-84.
43. Gao J, Yang HH, Feng XH, Li S, Xu H (2012) A 2,3-butanediol dehydrogenase from *Paenibacillus polymyxa* ZJ-9 for mainly producing *R,R*-2,3-butanediol: purification, characterization and cloning. *J Basic Microbiol* 52: 1-9.
44. Gasparavičiūtė R (2008) Piridino ir piridinolių katabolizmą koduojančių genų tyrimas. *Daktaro disertacija*
45. Geerlof A, Rakels JJ, Straathof AJ, Heijnen JJ, Jongejan JA, Duine JA (1994) Description of the kinetic mechanism and the enantioselectivity of quinoxaemoprotein ethanol dehydrogenase from *Comamonas testosteroni* in the oxidation of alcohols and aldehydes. *Eur J Biochem* 226:537-46.

46. Goldberg K, Schroer K, Lutz S, Liese A (2007a) Biocatalytic ketone reduction--a powerful tool for the production of chiral alcohols--part I: processes with isolated enzymes. *Appl Microbiol Biotechnol* 76:237-48.
47. Goldberg K, Schroer K, Lutz S, Liese A (2007b) Biocatalytic ketone reduction--a powerful tool for the production of chiral alcohols-part II: whole-cell reductions. *Appl Microbiol Biotechnol* 76:249-55.
48. Gotor V, Alfonso I, Garcia-Urdiales Er (2008) Asymmetric organic synthesis with enzymes. *Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim*.
49. Grychtol K, Mennicke W (2000) Metal-complex dyes. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 22: 595-633.
50. Groger H, Chamouleau F, Orologas N, Rollmann C, Drauz K, Hummel W, Weckbecker A, May O (2006) Enantioselective reduction of ketones with "designer cells" at high substrate concentrations: highly efficient access to functionalized optically active alcohols. *Angew Chem Int Ed Engl* 45: 5677-81.
51. Haberland J, Kriegesmann A, Wolfram E, Hummel W, Liese A (2002) Diastereoselective synthesis of optically active (2*R*,5*R*)-hexanediol. *Appl Microbiol Biotechnol* 58: 595-9.
52. Hagen J (2006) Industrial catalysis: a practical approach. 2nd ed. *Weinheim: Wiley-VCH*.
53. Hedlund J, Jörnvall H, Persson B (2010) Subdivision of the MDR superfamily of medium-chain dehydrogenases/reductases through iterative hidden Markov model refinement. *BMC Bioinformatics* 11: 534.
54. Heidlas J, Tressl R (1990) Purification and properties of two oxidoreductases catalyzing the enantioselective reduction of diacetyl and other diketones from baker's yeast. *Eur J Biochem* 188: 165-74.
55. Hernandez K, Berenguer-Murcia A, Rodrigues RC, Fernandez-Lafuente R (2012) Hydrogen peroxide in biocatalysis. A dangerous liaison. *Curr Org Chem* 16: 2652-72.
56. Holland HL (1998) Microbial transformations. *Curr Opin Chem Biol* 2: 77-84.
57. Hollmann F, Arends IWCE, Buehler K (2010) Biocatalytic redox reactions for organic synthesis: nonconventional regeneration methods. *Chem Cat Chem* 2: 762-82.
58. Holmes PE, Rittenberg SC, Knackmuss HJ (1972) The bacterial oxidation of nicotine. Synthesis of 2,3,6-trihydroxypyridine and accumulation and partial characterization of the product of 2,6-dihydroxypyridine oxidation. *J Biol Chem* 247: 7628-33.
59. Hoog SS, Pawlowski JE, Alzari PM, Penning TM, Lewis M (1994) Three-dimensional structure of rat liver 3 alpha-hydroxysteroid/dihydrodiol dehydrogenase: a member of the aldo-keto reductase superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 2517-21.
60. Houghton C, Cain RB (1972) Microbial metabolism of the pyridine ring. Formation of pyridine diols (dihydroxypyridines) as intermediates in the degradation of pyridine compounds by micro-organisms. *Biochem J* 130: 879-93.

61. Huisman GW, Liang J, Krebber A (2009) Practical chiral alcohol manufacture using ketoreductases. *Curr Opin Chem Biol* 14: 122-9.
62. Hummel W, Kula MR (1989) Dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. *Eur J Biochem* 184: 1-13.
63. Hunger K, Mischke P, Rieper W, Raue R, Kunde K, Engel A (2000) Azo dyes. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* 1-15.
64. Illanes A (2008) Enzyme biocatalysis: principles and applications. *Springer Science*.
65. Inoue K, Makino Y, Itoh N (2005) Purification and characterization of a novel alcohol dehydrogenase from *Leifsonia* sp. strain S749: a promising biocatalyst for an asymmetric hydrogen transfer bioreduction. *Appl Environ Microbiol* 71: 3633-41.
66. Ito K, Nakajima Y, Ichihara E, Ogawa K, Katayama N, Nakashima K, Yoshimoto T (2006) D-3-hydroxybutyrate dehydrogenase from *Pseudomonas fragi*: molecular cloning of the enzyme gene and crystal structure of the enzyme. *J Mol Biol* 355: 722-33.
67. Yan Y, Lee CC, Liao JC (2009) Enantioselective synthesis of pure (*R,R*)-2,3-butanediol in *Escherichia coli* with stereospecific secondary alcohol dehydrogenases. *Org Biomol Chem* 7: 3914-7.
68. Yang C, Ying X, Yu M, Zhang Y, Xiong B, Song Q, Wang Z (2012) Towards the discovery of alcohol dehydrogenases: NAD(P)H fluorescence-based screening and characterization of the newly isolated *Rhodococcus erythropolis* WZ010 in the preparation of chiral aryl secondary alcohols. *J Ind Microbiol Biotechnol* 39: 1431-43.
69. Yang TH, Rathnasingh C, Lee HJ, Seung D (2014) Identification of acetoin reductases involved in 2,3-butanediol pathway in *Klebsiella oxytoca*. *J Biotechnol* 172: 59-66.
70. Ying X, Ma K (2011) Characterization of a zinc-containing alcohol dehydrogenase with stereoselectivity from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus guaymasensis*. *J Bacteriol* 193: 3009-19.
71. Yu B, Sun J, Bommarreddy RR, Song L, Zeng AP (2011) Novel (*2R,3R*)-2,3-butanediol dehydrogenase from potential industrial strain *Paenibacillus polymyxa* ATCC 12321. *Appl Environ Microbiol* 77: 4230-3.
72. Jez JM, Penning TM (2001) The aldo-keto reductase (AKR) superfamily: an update. *Chem Biol Interact* 130: 499-525.
73. Ji XJ, Huang H, Ouyang PK (2011) Microbial 2,3-butanediol production: a state-of-the-art review. *Biotechnol Adv* 29: 351-64.
74. Johannes T, Simurdiak MR, Zhao H (2005) Encyclopedia of chemical processing. *CRC Press* 101-30.
75. Johannes TW, Woodyer RD, Zhao H (2007) Efficient regeneration of NADPH using an engineered phosphite dehydrogenase. *Biotechnol Bioeng* 96: 18-26.
76. Johnson GR, Olsen RH (1997) Multiple pathways for toluene degradation in *Burkholderia* sp. strain JS150. *Appl Environ Microbiol* 63: 4047-52.

77. Jongejan A, Machado SS, Jongejan JA (2000) The enantioselectivity of quinoxaemoprotein alcohol dehydrogenases: mechanistic and structural aspects. *J Mol Catal B: Enzym* 8: 121.
78. Jornvall H (1970) Horse liver alcohol dehydrogenase. The primary structure of the protein chain of the ethanol-active isoenzyme. *Eur J Biochem* 16: 25-40.
79. Jornvall H, Hoog JO, Persson B (1999) SDR and MDR: completed genome sequences show these protein families to be large, of old origin, and of complex nature. *FEBS Lett* 445: 261-4.
80. Jornvall H, Persson B, Krook M, Atrian S, Gonzalez-Duarte R, Jeffery J, Ghosh D (1995) Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry* 34: 6003-13.
81. Jornvall H, Persson M, Jeffery J (1981) Alcohol and polyol dehydrogenases are both divided into two protein types, and structural properties cross-relate the different enzyme activities within each type. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 4226-30.
82. Julliard M, Le Petit J, Ritz P (1986) Regeneration of NAD(+) cofactor by photosensitized electron transfer in an immobilized alcohol dehydrogenase system. *Biotechnol Bioeng* 28: 1774-9.
83. Kaiser JP, Feng Y, Bollag JM (1996) Microbial metabolism of pyridine, quinoline, acridine, and their derivatives under aerobic and anaerobic conditions. *Microbiol Rev* 60: 483-98.
84. Kallberg Y, Persson B (2006) Prediction of coenzyme specificity in dehydrogenases/reductases. A hidden Markov model-based method and its application on complete genomes. *FEBS J* 273: 1177-84.
85. Kamerbeek NM, Olsthoorn AJ, Fraaije MW, Janssen DB (2003) Substrate specificity and enantioselectivity of 4-hydroxyacetophenone monooxygenase. *Appl Environ Microbiol* 69: 419-26.
86. Karyakin A (2001) Prussian Blue and its analogues: electrochemistry and analytical applications. *Electroanalysis* 13: 813-9.
87. Karvelis L, Gasparavičiūtė R, Meškys R (2012) Characterization of 2,5-dihydroxypyridine dioxygenases from *Sinorhizobium* sp. L1. *Biologija* 58: 43-50.
88. Kataoka M, Kita K, Wada M, Yasohara Y, Hasegawa J, Shimizu S (2003) Novel bioreduction system for the production of chiral alcohols. *Appl Microbiol Biotechnol* 62: 437-45.
89. Kataoka M, Nakamura Y, Urano N, Ishige T, Shi G, Kita S, Sakamoto K, Shimizu S (2006) A novel NADP<sup>+</sup>-dependent L-1-amino-2-propanol dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* MAK154: a promising enzyme for the production of double chiral aminoalcohols. *Lett Appl Microbiol* 43: 430-5.
90. Kavanagh KL, Jornvall H, Persson B, Oppermann U (2008) Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families: the SDR superfamily: functional and structural diversity within a family of metabolic and regulatory enzymes. *Cell Mol Life Sci* 65: 3895-906.



91. Khasaeva FM, Vasiliuk NV, Lebedev AT (2011) Study on 2-methylpyridine initial catabolic pathways in *Arthrobacter* sp. KM-2MP strain. *Mikrobiologija* 80: 335-43.
92. Koumanov A, Benach J, Atrian S, Gonzalez-Duarte R, Karshikoff A, Ladenstein R (2003) The catalytic mechanism of *Drosophila* alcohol dehydrogenase: evidence for a proton relay modulated by the coupled ionization of the active site Lysine/Tyrosine pair and a NAD<sup>+</sup> ribose OH switch. *Proteins* 51: 289-98.
93. Krämer L, Steckhan E (1997) Coimmobilization of L- $\alpha$ -glycerophosphate oxidase with catalase and its application for the synthesis of dihydroxyacetone phosphate. *Tetrahedron* 53: 14645–50.
94. Kutanovas S, Rutkiene R, Urbelis G, Tauraite D, Stankeviciute J, Meskys R (2013) Bioconversion of methylpyrazines and pyridines using novel pyrazines-degrading microorganisms. *Chemija* 24: 67-73.
95. Kutanovas S, Stankeviciute J, Urbelis G, Tauraite D, Rutkiene R, Meskys R (2013) Identification and characterization of a tetramethylpyrazine catabolic pathway in *Rhodococcus jostii* TMP1. *Appl Environ Microbiol* 79: 3649-57.
96. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5.
97. Laurinavicius V, Razumiene J, Kurtinaitiene B, Lapenaite I, Bachmatova I, Marcinkeviciene L, Meskys R, Ramanavicius A (2002) Bioelectrochemical application of some PQQ-dependent enzymes. *Bioelectrochemistry* 55: 29-32.
98. Leisch H, Morley K, Lau PC (2011) Baeyer-Villiger monooxygenases: more than just green chemistry. *Chem Rev* 111: 4165-222.
99. Leonida MD (2001) Redox enzymes used in chiral syntheses coupled to coenzyme regeneration. *Curr Med Chem* 8: 345-69.
100. Lesk AM (1995) NAD-binding domains of dehydrogenases. *Curr Opin Struct Biol* 5:775-83.
101. Liese A, Seelbach K, Wandrey C (2006) Industrial biotransformations. 2nd ed. *Weinheim: Wiley-VCH*.
102. Lin W, Chen C, Chen H, Hsu W (2010) Enantioselective synthesis of (*S*)-phenylephrine by whole cells of recombinant *Escherichia coli* expressing the amino alcohol dehydrogenase gene from *Rhodococcus erythropolis* BCRC 10909. *Process Biochem J* 45: 1529-36.
103. Lopez OL, Marinescu L, Bols M (2007) New cup-shaped  $\alpha$ -cyclodextrin derivatives and a study of their catalytic properties in oxidation reactions. *Tetrahedron* 63: 8872-80.
104. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-75.
105. Lücke B, Narayana KV, Martin A, Jähnisch K (2004) Oxidation and ammoxidation of aromatics. *Adv Synth Catal* 346: 1399-1402.
106. Ma F, Shi SN, Sun TH, Li A, Zhou JT, Qu YY (2013) Biotransformation of benzene and toluene to catechols by phenol hydroxylase from *Arthrobacter* sp. W1. *Appl Microbiol Biotechnol* 97: 5097-103.

107. Machado SS, Wandel U, Jongejan JA, Straathof AJJ, Duine JA (1998) Characterization of the enantioselective properties of the quinoxinoprotein alcohol dehydrogenase of *Acetobacter pasteurianus* LMG 1635. *Biosci Biotechnol Biochem* 63: 10-20.
108. Mackova M, Kost'Al J, Demnerova K (2000) Properties and stability of glycerophosphate oxidase isolated from a mutant strain of *Aerococcus viridans*. *Lett Appl Microbiol* 30: 188-91.
109. Maria G, Ene MD, Jipa I (2012) Modelling enzymatic oxidation of D-glucose with pyranose 2-oxidase in the presence of catalase. *J Mol Catal B: Enzym* 74: 209–18.
110. Matsuda T, Yamanaka R, Nakamura K (2009) Recent progress in biocatalysis for asymmetric oxidation and reduction. *Tetrahedron: Asymm* 20: 513-57.
111. Matsushita K, Toyama H, Yamada M, Adachi O (2002) Quinoxinoproteins: structure, function, and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 58: 13-22.
112. McWhirter RB, Klapper MH (1990) Semiquinone radicals of methylamine dehydrogenase, methoxatin, and related *o*-quinones: a pulse radiolysis study. *Biochemistry* 29: 6919-26.
113. Mertens R, Liese A (2004) Biotechnological applications of hydrogenases. *Curr Opin Biotechnol* 15: 343-8.
114. Mikami K, Korenaga T, Ohkuma T, Noyori R (2000) Asymmetric activation/deactivation of racemic Ru catalysts for highly enantioselective hydrogenation of ketonic substrates. *Angew Chem Int Ed Engl* 39: 3707-10.
115. Mitchell SC, Waring RH (2000) Aminophenols. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* 3: 59-77.
116. Mittl PR, Berry A, Scrutton NS, Perham RN, Schulz GE (1994) Anatomy of an engineered NAD-binding site. *Protein Sci* 3: 1504-14.
117. Moss GP (1996) Basic terminology of stereochemistry. *Pure & Appl Chem* 68: 2193-222.
118. Mudliar SN, Padoley KV, Bhatt P, Sureshkumar M, Lokhande SK, Pandey RA, Vaidya AN (2008) Pyridine biodegradation in a novel rotating rope bioreactor. *Bioresour Technol* 99: 1044-51.
119. Munoz M, Covenas R (2011) NK-1 receptor antagonists: a new paradigm in pharmacological therapy. *Curr Med Chem* 18: 1820-31.
120. Nelson DL, Lehninger AL, Cox MM (2013) Lehninger principles of biochemistry. *New York: W.H. Freeman*.
121. Newman LM, Wackett LP (1995) Purification and characterization of toluene 2-monooxygenase from *Burkholderia cepacia* G4. *Biochemistry* 34: 14066-76.
122. Ni Y, Li CX, Zhang J, Shen ND, Bornscheuer UT, Xu JH (2011) Efficient reduction of ethyl 2-oxo-4-phenylbutyrate at 620 g/L by a bacterial reductase with broad substrate spectrum. *Adv Synth Catal* 353: 1213-7.
123. Ni Y, Xu JH (2012) Biocatalytic ketone reduction: a green and efficient access to enantiopure alcohols. *Biotechnol Adv* 30: 1279-88.

124. Nobel S, Abrahmsen L, Oppermann U (2001) Metabolic conversion as a pre-receptor control mechanism for lipophilic hormones. *Eur J Biochem* 268: 4113-25.
125. O'Loughlin EJ, Sims GK, Traina SJ (1999) Biodegradation of 2-methyl, 2-ethyl, and 2-hydroxypyridine by an *Arthrobacter* sp. isolated from subsurface sediment. *Biodegradation* 10: 93-104.
126. Oppermann U, Filling C, Hult M, Shafqat N, Wu X, Lindh M, Shafqat J, Nordling E, Kallberg Y, Persson B, Jornvall H (2003) Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update. *Chem Biol Interact* 143-144: 247-53.
127. Oppermann UC, Belai I, Maser E (1996) Antibiotic resistance and enhanced insecticide catabolism as consequences of steroid induction in the gram-negative bacterium *Comamonas testosteroni*. *J Steroid Biochem Mol Biol* 58: 217-23.
128. Oppermann UC, Maser E (2000) Molecular and structural aspects of xenobiotic carbonyl metabolizing enzymes. Role of reductases and dehydrogenases in xenobiotic phase I reactions. *Toxicology* 144: 71-81.
129. Oppermann UC, Persson B, Filling C, Jornvall H (1997) Structure-function relationships of SDR hydroxysteroid dehydrogenases. *Adv Exp Med Biol* 414: 403-15.
130. Parsonage D, Luba J, Mallett TC, Claiborne A (1998) The soluble alpha-glycerophosphate oxidase from *Enterococcus casseliflavus*. Sequence homology with the membrane-associated dehydrogenase and kinetic analysis of the recombinant enzyme. *J Biol Chem* 273: 23812-22.
131. Pearl F, Todd A, Sillitoe I, Dibley M, Redfern O, Lewis T, Bennett C, Marsden R, Grant A, Lee D, Akpor A, Maibaum M, Harrison A, Dallman T, Reeves G, Diboun I, Addou S, Lise S, Johnston C, Sillero A, Thornton J, Orengo C (2005) The CATH domain structure database and related resources Gene3D and DHS provide comprehensive domain family information for genome analysis. *Nucleic Acids Res* 33: D247-51.
132. Persson B, Hedlund J, Jornvall H (2008) Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families: the MDR superfamily. *Cell Mol Life Sci* 65: 3879-94.
133. Peterson DH, Murray HC, Eppstein SH, Reinecke LM, Weintraub A, Meister PD, Leigh HM (1952) Microbiological transformations of steroids. I. Introduction of oxygen at carbon-11 of progesterone. *J Am Chem Soc* 74: 5933-6.
134. Petschacher B, Leitgeb S, Kavanagh KL, Wilson DK, Nidetzky B (2005) The coenzyme specificity of *Candida tenuis* xylose reductase (AKR2B5) explored by site-directed mutagenesis and X-ray crystallography. *Biochem J* 385: 75-83.
135. Promden W, Vangnai AS, Pongsawasdi P, Adachi O, Matsushita K, Toyama H (2008) Disruption of quinoprotein ethanol dehydrogenase gene and adjacent genes in *Pseudomonas putida* HK5. *FEMS Microbiol Lett* 280: 203-9.

136. Qin JY, Xiao ZJ, Ma CQ, Xie NZ, Liu PH, Xu P (2006) Production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae* using glucose and ammonium phosphate. *Chin J Chem Eng* 14: 132-6.
137. Rasor JP, Voss E (2001) Enzyme catalysed processes in pharmaceutical industry. *Appl Catal A: General* 221: 145-58.
138. Rickus J (2005) Impact of coenzyme regeneration on the performance of an enzyme-based optical biosensor: a computational study. *Biosens Bioelectron* 21: 965-72.
139. Roberts SM, Turner NJ, Willetts AJ, Turner MK (1995) Introduction to biocatalysis using enzymes and microorganisms. *Cambridge University Press: UK* 1-35.
140. Rosell A, Valencia E, Ochoa WF, Fita I, Pares X, Farres J (2003) Complete reversal of coenzyme specificity by concerted mutation of three consecutive residues in alcohol dehydrogenase. *J Biol Chem* 278: 40573-80.
141. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-91.
142. Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor, New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
143. Saxena RK, Anand P, Saran S, Isar J (2009) Microbial production of 1,3-propanediol: recent developments and emerging opportunities. *Biotechnol Adv* 27: 895-913.
144. Schoevaart R, van Rantwijk F, Sheldon RA (2000) A four-step enzymatic cascade for the one-pot synthesis of non-natural carbohydrates from glycerol. *J Org Chem* 65: 6940-3.
145. Schumperli M, Pellaux R, Panke S (2007) Chemical and enzymatic routes to dihydroxyacetone phosphate. *Appl Microbiol Biotechnol* 75: 33-45.
146. Scriven EFV, Murugan R (2005) Pyridine and pyridine derivatives. Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology. *John Wiley & Sons, Inc.* 20: 1-53.
147. Sheldon RA, Arends I, Hanefeld U (2007) Green chemistry and catalysis. *Weinheim: Wiley-VCH*.
148. Shukla OP, Kaul SM (1986) Microbiological transformation of pyridine *N*-oxide and pyridine by *Nocardia* sp. *Can J Microbiol* 32: 330-41.
149. Silvestri MG, DeSantis G, Mitchell M, Wong CH (2003) Asymmetric aldol reactions using aldolases. *Top Stereochem* 23: 267-342.
150. Slusarczyk H, Felber S, Kula MR, Pohl M (2000) Stabilization of NAD-dependent formate dehydrogenase from *Candida boidinii* by site-directed mutagenesis of cysteine residues. *Eur J Biochem* 267: 1280-9.
151. Steckhan E, Herrmann S, Ruppert R, Dietz E, Frede M, Spika E (1991) Analytical study of a series of substituted (2,2'-bipyridyl)(pentamethylcyclopentadienyl)rhodium and -iridium complexes with regard to their effectiveness as redox catalysts for the indirect electrochemical and chemical reduction of NAD(P)<sup>+</sup>. *Organometallics* 10: 1568-77.

152. Stigter ECA, van der Lugt JP, Somers WAC (1997) Enantioselective oxidation of secondary alcohols by quinohemoprotein alcohol dehydrogenase from *Comamonas testosteroni*. *J Mol Catal B: Enzym* 2: 291-7.
153. Straathof AJ, Panke S, Schmid A (2002) The production of fine chemicals by biotransformations. *Curr Opin Biotechnol* 13: 548-56.
154. Sun JQ, Xu L, Tang YQ, Chen FM, Liu WQ, Wu XL (2011) Degradation of pyridine by one *Rhodococcus* strain in the presence of chromium (VI) or phenol. *J Hazard Mater* 191: 62-8.
155. Sun JQ, Xu L, Tang YQ, Chen FM, Zhao JJ, Wu XL (2014) Bacterial pyridine hydroxylation is ubiquitous in environment. *Appl Microbiol Biotechnol* 98: 455-64.
156. Šetkus A, Galdikas A, Laurinavičius V, Meškys R, Mironas A, Razumienė J (2004) Electric charge transport in the symmetric metal-enzyme junctions affected by biochemical interaction. *Colloid Surf A* 249: 141-3.
157. Takeda M, Muranushi T, Inagaki S, Nakao T, Motomatsu S, Suzuki I, Koizumi J (2011) Identification and characterization of a mycobacterial (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol dehydrogenase. *Biosci Biotechnol Biochem* 75: 2384-9.
158. Tani M, Sakamoto T, Mita S, Sakaguchi S, Ishii Y (2005) Hydroxylation of benzene to phenol under air and carbon monoxide catalyzed by molybdovanadophosphoric acid. *Angew Chem Int Ed Engl* 44:2586-8.
159. Tetianec L, Dagys M, Kulys J, Ziemys A, Meskys R (2007) Study of the reactivity of quinohemoprotein alcohol dehydrogenase with heterocycle-pentacyanoferrate(III) complexes and the electron transfer path calculations. *Central Eur J Biol* 2: 502-17.
160. Toyama H, Fujii A, Matsushita K, Shinagawa E, Ameyama M, Adachi O (1995) Three distinct quinoprotein alcohol dehydrogenases are expressed when *Pseudomonas putida* is grown on different alcohols. *J Bacteriol.* 177: 2442-50.
161. Tramper J (1996) Chemical versus biochemical conversion: when and how to use biocatalysts. *Biotechnol Bioeng* 52: 290-5.
162. Tse H, Chan E, Lam CW, Leung KF, Chow P, Lee KC, Sze KH, Cheung SK, Tse MK, Ho PL, Leung SP, Lau SK, Woo PC, Yuen KY (2012) Production of 2-aminophenoxazin-3-one by *Staphylococcus aureus* causes false-positive results in beta-galactosidase assays. *J Clin Microbiol* 50: 3780-2.
163. Ui S, Takusagawa Y, Sato T, Ohtsuki T, Mimura A, Ohkuma M, Kudo T (2004) Production of L-2,3-butanediol by a new pathway constructed in *Escherichia coli*. *Lett Appl Microbiol* 39: 533-7.
164. Ullrich R, Hofrichter M (2007) Enzymatic hydroxylation of aromatic compounds. *Cell Mol Life Sci* 64: 271-93.
165. Urano N, Fukui S, Kumashiro S, Ishige T, Kita S, Sakamoto K, Kataoka M, Shimizu S (2011) Directed evolution of an aminoalcohol dehydrogenase for efficient production of double chiral aminoalcohols. *J Biosci Bioeng* 111: 266-71.

166. Vallee BL, Auld DS (1990) Active-site zinc ligands and activated H<sub>2</sub>O of zinc enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 220-4.
167. Walsh C (1980) Flavin coenzymes: at the crossroads of biological redox chemistry. *Acc Chem Res* 13: 148-55.
168. Wang Z, Song Q, Yu M, Wang Y, Xiong B, Zhang Y, Zheng J, Ying X (2013) Characterization of a stereospecific acetoin(diacetyl) reductase from *Rhodococcus erythropolis* WZ010 and its application for the synthesis of (2*S*,3*S*)-2,3-butanediol. *Appl Microbiol Biotechnol* 98: 641-50.
169. Watson GK, Cain RB (1975) Microbial metabolism of the pyridine ring. Metabolic pathways of pyridine biodegradation by soil bacteria. *Biochem J* 146: 157-72.
170. Weckbecker A, Hummel W (2004) Improved synthesis of chiral alcohols with *Escherichia coli* cells co-expressing pyridine nucleotide transhydrogenase, NADP<sup>+</sup>-dependent alcohol dehydrogenase and NAD<sup>+</sup>-dependent formate dehydrogenase. *Biotechnol Lett* 26: 1739-44.
171. Xiao Z, Lv C, Gao C, Qin J, Ma C, Liu Z, Liu P, Li L, Xu P (2010) A novel whole-cell biocatalyst with NAD<sup>+</sup> regeneration for production of chiral chemicals. *PLoS One* 5: e8860.
172. Zaks A (2001) Industrial biocatalysis. *Curr Opin Chem Biol* 5: 130-6.
173. Zarnt G, Schrader T, Andreesen JR (2001) Catalytic and molecular properties of the quinohemoprotein tetrahydrofurfuryl alcohol dehydrogenase from *Ralstonia eutropha* strain Bo. *J Bacteriol* 183: 1954-60.
174. Zefirov NS, Agapova SR, Terentiev PB, Bulakhova IM, Vasyukova NI, Modyanova LV (1994) Degradation of pyridine by *Arthrobacter crystallopoietes* and *Rhodococcus opacus* strains. *FEMS Microbiol Lett* 118: 71-4.
175. Zeng AP, Sabra W (2011) Microbial production of diols as platform chemicals: recent progresses. *Curr Opin Biotechnol* 22: 749-57.
176. Zhang L, Yang Y, Sun J, Shen Y, Wei D, Zhu J, Chu J (2011) Microbial production of 2,3-butanediol by a mutagenized strain of *Serratia marcescens* H30. *Bioresour Technol* 101: 1961-7.